

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 011**

51 Int. Cl.:

C08F 2/24 (2006.01)

C08F 220/00 (2006.01)

C08F 220/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2007 E 07755261 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2004702**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de microesferas hinchables y deformables**

30 Prioridad:

11.04.2006 US 791084 P

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

17.09.2013

73 Titular/es:

**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

**FIGULY, GARRET D.;
MAHAJAN, SURBHI y
SCHIFFINO, RINALDO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 423 011 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

Procedimiento para la preparación de microesferas hinchables y deformables

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar microesferas hinchables/deformables.

5 Antecedentes de la invención

Hay una necesidad de microesferas con propiedades que son ventajosas para muchos tipos de aplicaciones, incluyendo aplicaciones médicas. Las microesferas con alta densidad, también una gran capacidad para hincharse en un medio acuoso, serían útiles para aplicaciones de absorción tales como control de derrame a pequeña escala y para aplicaciones de reparto en que llevarían y liberarían ingredientes activos tales como fertilizantes, herbicidas, pesticidas, cosméticos, champús y medicamentos. Las microesferas con propiedades adicionales de durabilidad y capacidad de deformación proporcionarían un valioso material para la introducción en animales, incluyendo seres humanos, para aplicaciones tales como aumento de tejido, relleno de huecos, tratamiento de heridas y embolización. El aumento de tejido implica la introducción de materiales en un área colapsada para producir una función de relleno, tal como el tratamiento de cicatrices o arrugas. El relleno de huecos implica la introducción de materiales en un espacio vacío, tal como uno creado por eliminación de una masa tisular. El tratamiento de heridas implica la introducción de materiales para parar el sangrado, proporcionar relleno, repartir medicación y absorber fluidos. Dichos materiales son especialmente útiles en situaciones de emergencia que incluyen accidentes y operaciones militares. El tratamiento de embolización implica la introducción de un material en la vasculatura para bloquear el flujo sanguíneo en una región particular, y puede usarse para tratar tumores no cancerosos, tal como fibromas uterinos, y tumores cancerosos, además de para controlar el sangrado provocado por procesos tales como úlceras de estómago, aneurismas y heridas. Puede desearse el bloqueo en el caso de malformación arteriovenosa (AVM), donde se dan conexiones anormales entre arterias y venas. Adicionalmente, el bloqueo puede desearse para el control pre-quirúrgico del flujo sanguíneo.

Se han producido y usado microesferas de hidrogel en el aumento tisular y tratamientos de embolización. Las propiedades de una muestra de microesferas se refieren generalmente no solo a los materiales usados en el preparado de microesferas, sino también al procedimiento por el que se preparan las microesferas. La patente de EE.UU. núm. 6.218.440 describe un procedimiento para preparar microesferas de hidrogel en que se prepara primero una emulsión, y después esta emulsión se suspende en un medio oleoso. Las microesferas formadas por este procedimiento tienen muchas cavidades unidas por poros interconectados, con cavidades en el interior del material en comunicación con la superficie, ya que se produce un material polimérico hidrófilo reticulado poroso.

La Patente de EE.UU. núm. 4.446.261 describe un procedimiento para hacer microesferas de hidrogel que incluye dispersar una disolución que contiene monómero, agente de reticulado e iniciador en un medio de dispersión que consiste en hidrocarburos que tienen de 6 a 10 átomos de carbono o hidrocarburos aromáticos halogenados, con un coloide protector disuelto en este material oleoso.

La patente de EE.UU. núm. 6.436.424 describe microesferas adecuadas para el aumento dérmico que se dice que se hinchan con el contacto con fluidos fisiológicos en el sitio de inyección hasta cuatro veces el diámetro promedio de las microesferas antes de la inyección. Estas microesferas de hidrogel se dice que están hechas por métodos estándar de polimerización y preparación de microesferas descritas en la técnica. Las microesferas descritas en la patente de EE.UU. núm. 6.790.456 son las mismas que las descritas en la patente de EE.UU. núm. 6.436.424.

El documento JP1994056676A describe una suspensión usada para la embolización que contiene agente de contraste lipídico y partículas de hidrogel altamente absorbentes de agua de alcohol vinílico y polímero de acrilato sódico que son aproximadamente 1,0 mm de diámetro o menos.

Ejemplos adicionales de documentos que describen microesferas hinchables y deformables son los documentos EP 0 349 250 A2, WO 98/33825 A, patente de EE.UU. núm. 4.935.456 y documento DE 10 2004 042948 A1. Sin embargo, permanece una necesidad de un nuevo procedimiento para preparar microesferas que sea sencillo, consistente y produzca microesferas con propiedades valiosas.

Compendio de la invención

La presente invención es un procedimiento para hacer un preparado de microesferas, que comprende:

a) formar una primera disolución que comprende:

- 50 (i) agua;
- (ii) al menos un monómero miscible en agua;
- (iii) un agente de reticulado que es miscible en la primera disolución en menos que o igual a 5% en moles respecto a los moles totales de monómero y agente de reticulado, seleccionándose dicho agente de reticulado del

- grupo que consiste en N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N'-metilen-bis-metacrilamida, N-metilolacrilamida, N-metilolmetacrilamida, acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, diacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de polietilenglicol, sales de metal polivalente de ácido acrílico y ácido metacrílico, fosfoacrilatos de divinilbenceno, divinilbenceno, divinilfenilfosfina, divinilsulfona, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano, fosfometacrilatos, etilenglicol-diglicidiléter, glicerín-triglicidiléter, glicerín-diglicidiléter y polietilenglicol-diglicidiléter;
- 5 (iv) un coloide protector soluble en agua;
- (v) un emulsionante; y
- (vi) un azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura;
- 10 b) formar una segunda disolución que comprende una mezcla de cloruro de metileno y cloroformo o una mezcla de cloruro de metileno y un disolvente o mezcla de disolventes que tiene una suma de diferencias en parámetros de solubilidad de Hansen respecto a los parámetros de solubilidad de Hansen del cloroformo de menos que 0,21, y un coloide protector soluble orgánico;
- 15 c) formar una primera suspensión con agitación que comprende la primera y segunda disolución a una temperatura por debajo de la temperatura de iniciación del azoiniciador de (a);
- d) aumentar la temperatura de la primera suspensión en agitación a una temperatura a la que se activa el azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura;
- e) agitar la primera suspensión hasta que forme una segunda suspensión que comprende un precipitado gelatinoso suspendido en una fase líquida orgánica, en donde se forman las microesferas;
- 20 f) permitir que se enfríe la segunda suspensión a una temperatura que está a o por debajo de 30°C mientras se agita la segunda suspensión;
- g) lavar la segunda suspensión al menos una vez con el disolvente de deshidratación en donde el agua se elimina de las microesferas que forman un preparado de microesferas; y
- h) recuperar el preparado de microesferas.
- 25 Cuando se selecciona el monómero miscible en agua del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo, la primera disolución tiene un pH de al menos 3, con tal que no contenga un monómero seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, ácido
- 30 estireno-sulfónico y sales de ácido estireno-sulfónico.
- Cuando el monómero miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y sales de ácido de estireno-sulfónico, la primera disolución tiene un pH de menos que 3 y puede contener opcionalmente al menos un monómero miscible con agua seleccionado del grupo que consiste en ácido
- 35 acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un proceso temporal de hinchado en agua de microesferas preparadas mediante el actual procedimiento: A) sin agua añadida, B) 4 seg después del contacto con agua, C) 14 seg después del contacto con

40 agua, con los límites de las microesferas mejorados.

La Figura 2 muestra en A) microscopía óptica que muestra deformación de contacto de microesferas hinchadas, B) microscopía de barrido electrónico (SEM) que muestra la superficie esencialmente suave y la esfericidad esencial de las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento (sin hinchar).

La Figura 3 muestra un gráfico de capacidad de hinchado de las microesferas frente a la cantidad de agente de

45 reticulado.

La Figura 4 muestra un gráfico de capacidad de hinchado de las microesferas frente al pH de la disolución de monómero.

La Figura 5A muestra un gráfico de los tamaños de muestras de microesferas separadas por un tamiz. La Figura 5B muestra un gráfico del porcentaje de tamaños de volumen acumulativo de muestras de microesferas separadas por

50 un tamiz.

La Figura 6 muestra secciones transversales de SEM de: A) una microesfera porosa de celda abierta como se prepara usando el procedimiento del Ejemplo 5, y B) una microesfera de poro de celda cerrada como se prepara usando el procedimiento del Ejemplo 1.

La Figura 7 muestra las fotografías originales sobre los que están basados los dibujos de la Figura 1.

5 Descripción detallada

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar microesferas que es sencillo, consistente y produce microesferas con propiedades valiosas a un alto rendimiento. Las microesferas resultante tienen propiedades de consistencia general en tamaño y forma, alta densidad, baja fractura, alta capacidad de hinchado, hinchado rápido y capacidad de deformación después del hinchado. El procedimiento hace uso de un azoiniciador activo a baja temperatura, soluble en agua, en una disolución acuosa de monómero, agente de reticulado y emulsionante. Un medio orgánico clorado se usa en la formación de una suspensión con la disolución acuosa. La disolución acuosa y el medio orgánico incluyen ambos adicionalmente coloides protectores. La disolución acuosa y medio orgánico, además de la mezcla de los dos, se toman inicialmente por debajo de la temperatura de iniciación del azoiniciador. El medio orgánico, que puede comprender una mezcla de cloroformo y cloruro de metileno, debería tener una temperatura de ebullición suficientemente alta para que el azoiniciador soluble acuoso pueda activarse para provocar la polimerización que produce microesferas.

Las microesferas tienen propiedades que las hacen altamente útiles en, por ejemplo, aplicaciones médicas tales como embolización, aumento tisular y tratamiento de heridas.

Cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se enumera en este documento como o bien un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, la cantidad enumerada, concentración u otro valor o parámetro se entiende que incluye todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier límite de intervalo o valor preferido superior y cualquier límite de intervalo o valor preferido inferior, independientemente de si dichos intervalos se describen de forma separada. Donde un intervalo de valores numéricos se enumera en este documento, a menos que se afirme otra cosa, el intervalo se entiende que incluye los extremos del mismo, y todos los números enteros y fracciones en el intervalo. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos enumerados cuando se define un intervalo.

Las siguientes definiciones y abreviaturas se van a usar para la interpretación de las reivindicaciones y la memoria.

El término "microesferas" o "microesfera" se refiere o bien a una población de partículas de tamaño de micras o una partícula individual, dependiendo del contexto en que se use la palabra, que tiene una alta medida de esfericidad. La medida de esfericidad de una población de microesferas puede estar en el intervalo de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, siendo típico el 95%. Las microesferas son esencialmente esféricas, aunque una población de microesferas puede incluir algunas partículas individuales que tienen una menor medida de esfericidad.

El término "miscible" se refiere a la mezcla de dos líquidos sin separación de dos fases. Además, un sólido es miscible si una disolución hecha con el sólido es miscible con otro líquido. Específicamente, un monómero líquido puede él mismo ser miscible con agua. Un monómero sólido es miscible en agua cuando una disolución acuosa preparada con el monómero sólido puede mezclarse con agua sin tener una separación de dos fases.

El término "hidrocarburo esencialmente clorado" se refiere a un hidrocarburo que es del 50% a totalmente clorado. El tetracloruro de carbono es un ejemplo de un hidrocarburo tal.

El término "lechada" se refiere a una composición que es material particulado en un líquido.

Los términos "primera suspensión" y "segunda suspensión" se refieren a suspensiones formadas durante el procedimiento de preparación de microesferas que se describe en este documento.

El término "suspensión de embolización" se refiere a una suspensión que contiene microesferas y se administra usando un catéter y/o aguja para el tratamiento de embolización.

El término "deformable" se refiere a la propiedad de ser capaz de cambiar la forma en respuesta a una presión externa. Las microesferas son deformables si no retienen su forma cuando se hinchan, después de la absorción de un medio acuoso, y se someten a presión.

El término "tubo esencialmente insustituible" se refiere al tubo que no tiene expansión observable visualmente bajo las condiciones de ensayo en que se usa.

El término "medio de control de hinchado" se refiere a un medio que controla el hinchado de las microesferas, preparado mediante el actual procedimiento, tal que hay poco hinchado o ninguno. Una pequeña cantidad de hinchado puede darse, sin embargo, el hinchado completo que es aproximadamente 50x o más que el volumen original no se da.

Monómero y agente de reticulado

Los monómeros que pueden usarse en el procedimiento actual para preparar microesferas son monómeros miscibles en agua que incluyen, aunque no están limitados a, ácido acrílico, ácido metacrílico, sales (tal como de sodio y amonio) de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico, sales de ácido estireno-sulfónico, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo. Los monómeros pueden usarse de forma independiente o en combinaciones como co-monómeros. Los monómeros que funcionan bien como componentes de monómero sencillo (subgrupo 1) incluyen ácido acrílico, ácido metacrílico, sales (tales como de sodio y amonio) de ácido acrílico y ácido metacrílico, ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y sales de ácido estireno-sulfónico. Preferiblemente, los siguientes monómeros se usan como co-monómeros con al menos uno de los monómeros del subgrupo 1: acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo. Lo más útil en la producción de microesferas para aplicaciones médicas son monómeros que tienen biocompatibilidad tales como ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo y combinaciones de los mismos. En una realización el monómero es una combinación que comprende ácido acrílico y al menos un monómero del grupo de acrilato sódico, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilato de 2-hidroxietilo, ácido estireno-sulfónico y la sal sódica de ácido estireno-sulfónico. En otra realización, el monómero es ácido estireno-sulfónico o una combinación que comprende ácido estireno-sulfónico y la sal sódica de ácido estireno-sulfónico.

Muchos de estos monómeros son líquidos que son miscibles con agua. Para monómeros que son sólidos, una disolución acuosa del monómero puede prepararse, y esta disolución de monómero es miscible con agua. Los monómeros ácidos y sales de monómeros pueden combinarse para ajustar el pH de una disolución de monómero. Es particularmente útil neutralizar parcialmente un monómero ácido, proporcionando así una mezcla de monómero ácido y sal de monómero. Los monómeros ácidos que pueden usarse son, por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y combinaciones de los mismos. Un monómero antes de la neutralización parcial se denomina como un monómero inicial. Un monómero ácido está típicamente parcialmente neutralizado usando una base. Bases adecuadas incluyen, aunque no están limitadas a hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio y combinaciones de las mismas. Las bases que contienen cationes divalentes, tal como hidróxido de calcio e hidróxido de bario pueden usarse también; sin embargo, se usan preferiblemente en combinación con una base que contiene cationes monovalentes porque los cationes divalentes tienen una fuerte tendencia a inducir el reticulado iónico, que podría alterar gravemente las propiedades deseables de las microesferas. Para algunas aplicaciones puede ser deseable sustituir una parte de la base con hidróxido de bario ($Ba(OH)_2$) para introducir un elemento radio-opaco, que hace a las microesferas resultantes tratables con la formación de imágenes por rayos x. El hidróxido de bario puede usarse en una relación de hasta aproximadamente 1:1 en peso de $Ba(OH)_2$ a NaOH, para producir una sal de combinación que incluye sal de bario. De forma alternativa, una sal de monómero de bario puede incluirse en una combinación de monómero.

Un agente de reticulado que es miscible con una disolución de monómero acuosa se copolimeriza con el monómero en el actual procedimiento. Ejemplos de agentes de reticulado que pueden usarse incluyen, aunque no están limitados a N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N'-metilen-bismetacrilamida, N-metilolacrilamida, N-metilolmetacrilamida, acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, diacrilato de polietilenglicol y dimetacrilato de polietilenglicol (que son los más útiles con monómeros hidrófobos), sales de metal polivalente de ácido acrílico y ácido metacrílico, fosfoacrilatos de divinilbenceno, divinilbenceno, divinilfenilfosfina, divinilsulfona, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano, fosfometacrilatos y poliol-poliglicidiléteres tales como etilenglicol-diglicidiléter, glicerintriglicidiléter, glicerin-diglicidiléter y polietilenglicol-diglicidiléter y combinaciones de los mismos. La cantidad de agente de reticulado incluido para la copolimerización puede variar y está relacionado inversamente a la cantidad de capacidad de hinchado en las microesferas producidas usando el actual procedimiento. Diferentes cantidades de agente de reticulado dan por resultado capacidades de hinchado sobre un intervalo de aproximadamente 1,5 gramos de agua por gramo de microesferas a sobre 100 gramos de agua por gramo de microesferas. Generalmente es útil una cantidad de agente de reticulado que da por resultado microesferas con una capacidad de hinchado de al menos aproximadamente 50 gramos de agua por gramo de microesferas. Particularmente útil es una cantidad de agente de reticulado que da por resultado microesferas con una capacidad de hinchado de al menos aproximadamente 70 gramos de agua por gramo de microesferas. La cantidad exacta de agente de reticulado necesario variará dependiendo del agente específico usado y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. La cantidad de agente de reticulado se calcula como % en moles (porcentaje en moles) en base a la suma de los moles de monómero y los moles de agente de reticulado. Así, el % en moles se calcula como los moles de agente de reticulado/(moles de monómero + moles de agente de reticulado). Por ejemplo, 4,0% en moles de N,N'-metilenbisacrilamida con respecto a los moles de monómero de ácido acrílico + acrilato sódico + agente de reticulado produce microesferas con un hinchado de aproximadamente 50 gramos de agua por gramo de microesferas, 2,9% en moles de N,N'-metilenbisacrilamida produce microesferas con un hinchado de aproximadamente 70 gramos de agua por gramo de microesferas, y 2,3% en moles de N,N'-metilenbisacrilamida produce microesferas con un hinchado de aproximadamente 107 gramos de agua por gramo de microesferas. Preferiblemente, el % en moles de agente de reticulado es igual a o menos que aproximadamente 5% en moles, preferiblemente, igual a o menos que aproximadamente 4% en moles, más preferiblemente aproximadamente 0,08%

en moles a aproximadamente 4% en moles, lo más preferiblemente aproximadamente 0,08% en moles a aproximadamente 2,3% en moles respecto a los moles totales de monómero y agente de reticulado. Las microesferas con muy alto hinchado (es decir, sobre 250 gramos de agua por gramo de microesfera) pueden prepararse usando un monómero hidrófilo tal como acrilato sódico, una baja cantidad de agente de reticulado (por ejemplo, 0,083% en moles de N,N'-metilenbisacrilamida), con condiciones de secado a baja temperatura, como se describe en el Ejemplo 35 posterior.

Primera disolución

Un monómero y agente de reticulado como se describe anteriormente se preparan en una disolución acuosa, junto con componentes adicionales, que se denomina en este documento como la "primera disolución". El monómero se incluye generalmente a aproximadamente 0,5% a aproximadamente 30% como porcentaje en peso de la primera disolución. Los porcentajes en peso de monómero de aproximadamente 15% a aproximadamente 25% y aproximadamente 20% a aproximadamente 25% son particularmente útiles en el procedimiento de la invención. Si una combinación de monómeros se usa en el procedimiento, la cantidad total de todos los monómeros es aproximadamente 0,5% a aproximadamente 30%, además de aproximadamente 15% a aproximadamente 25% y además de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, como porcentaje en peso de la primera disolución.

El pH de la primera disolución puede variar y es un factor en la capacidad de hinchado de las microesferas preparadas en el procedimiento de la invención. El intervalo de pH útil de la primera disolución depende también del monómero particular o combinación de monómeros usada. Si la primera disolución contiene al menos un monómero del subgrupo 2 que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxiethyl y metacrilato de 2-hidroxiethyl, pero no contiene un monómero del subgrupo 3 que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacrililoiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacrililoiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y sales de ácido estireno-sulfónico, entonces el pH de la primera disolución es al menos aproximadamente 3, preferiblemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 10, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, para producir microesferas con una alta capacidad de hinchado. Por ejemplo, una mezcla de ácido acrílico y acrilato sódico a un pH de entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 10, y de 2 a 5% en moles de agente de reticulado N,N'-metilenbisacrilamida (con respecto al monómero), cuando se usa en el procedimiento de la invención, produce microesferas con una capacidad de hinchado de al menos aproximadamente 80 gramos de agua por gramo de microesferas. Si la primera disolución contiene al menos un monómero del subgrupo 3 que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacrililoiletano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacrililoiletano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico, y sales de ácido estireno-sulfónico, entonces el pH de la primera disolución es menos que aproximadamente 3 para producir microesferas altamente hinchables (véase los Ejemplos 36-38).

El pH de la primera disolución puede ajustarse en cualquier número de rutas. Por ejemplo, si el monómero se prepara como una disolución de monómero, como se describe anteriormente, el pH de la disolución de monómero gobernará el pH de la primera disolución. En el caso de un monómero ácido, el pH de la disolución de monómero está relacionado con la cantidad de base o sal de monómero añadida a la disolución de monómero ácido. De forma alternativa, el pH de la primera disolución puede ajustarse como se necesite mediante la adición de ácido o base después de que se han añadido todos los componentes.

Incluido en la "primera disolución" está un componente que puede modificar la viscosidad de una disolución acuosa para proporcionar una tensión superficial que permite la formación de gotitas en la suspensión acuosa/orgánica que se forma durante el actual procedimiento de preparación de microesferas. Este componente se denomina en este documento como un "coloide protector". Una variedad de compuestos naturales y sintéticos que son solubles en medios acuosos pueden usarse como un coloide protector que incluyen derivados de celulosa, poli(acrilatos (tales como poli(ácido acrílico) y poli(ácido metacrílico)), polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, poli(alcohol de vinilo) parcialmente hidrolizado y otros polioles, goma guar y goma agar. Son particularmente útiles los éteres de celulosa tales como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y bencilcelulosa; además de ésteres de celulosa tales como acetato de celulosa, butilato de celulosa, butilato de acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de celulosa, propionato de acetato de celulosa, butirato de acetato de celulosa y ftalato de acetato de celulosa. La cantidad del coloide protector en la primera disolución es suficiente para reducir la coalescencia de microgotitas en la suspensión acuosa/orgánica, y está generalmente entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 3% en % en peso de la primera disolución. Se prefiere metilcelulosa a aproximadamente 0,5% a aproximadamente 0,6% en peso.

Un emulsionante se incluye en la primera disolución para promover la formación de una emulsión estable además de la primera disolución a una segunda disolución orgánica (descrita posteriormente). Puede usarse cualquier emulsionante que establezca la emulsión acuosa/orgánica. Emulsionantes adecuados incluyen, aunque no están limitados a alcoholes de alquilaril-poliéter tales como los tensioactivos no iónicos Triton™ X disponibles comercialmente de Union Carbide (Danbury, CN). Estos productos generalmente contienen mezclas de longitudes de cadena de polioxietileno e incluyen, por ejemplo, Triton® X-100: polioxietileno (10) isoocilfeniléter; Triton® X-100, reducido: polioxietileno (10) isoocilciclohexiléter; Triton® N-101, reducido: polioxietileno ramificado nonilciclohexiléter; Triton® X-114: (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-poli(etilenglicol); Triton® X-114, reducido: polioxietileno

(8) isooctilciclohexiléter; Triton® X-405, reducido: polioxietileno (40) isooctilciclohexiléter; y Triton™ X-405: polioxietileno (40) isooctilfeniléter, disolución al 70% en agua. Es particularmente adecuado Triton™ X-405, disolución al 70% en peso, que es un preparado de alcohol de alquilaril-poliéter que tiene un promedio de al menos aproximadamente 30 unidades de óxido de etileno por cadena lateral de éter. Típicamente, el emulsionante en la primera disolución se usa a una concentración de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en % en peso de la primera disolución.

Además, la primera disolución incluye un iniciador de polimerización. El iniciador usado en el procedimiento de la invención es un azoiniciador soluble en agua que tiene una baja temperatura de activación. Los azoiniciadores son diazocompuestos sustituidos que descomponen térmicamente para generar radicales libres y gas nitrógeno. La temperatura de activación del azoiniciador usado es suficientemente baja para que el punto de ebullición de una segunda disolución orgánica (descrita posteriormente) esté por encima de la temperatura de activación del azoiniciador. Ejemplos de azoiniciadores solubles en agua a baja temperatura adecuados incluyen, aunque no están limitados a, dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano); 4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico); y dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano. Un azoiniciador particular, que tiene una temperatura de activación particular, se usa con una composición de segunda disolución orgánica (descrita posteriormente) a una temperatura y con un periodo de tiempo de reacción que es efectivo en el inicio de la polimerización. Lo más efectivo es el uso de un azoiniciador a una temperatura que está cerca de su temperatura de activación óptima y que está además por debajo de la temperatura de ebullición de la segunda disolución orgánica. Sin embargo, un azoiniciador puede usarse a una temperatura que es menor que su temperatura de activación óptima para permanecer por debajo de la temperatura de ebullición de la segunda disolución orgánica, aunque esto requerirá un tiempo de reacción más largo para la polimerización. Un azoiniciador particularmente adecuado tiene una temperatura de activación que es menor que aproximadamente 53°C y este azoiniciador se usa con una segunda disolución orgánica que tiene una temperatura de ebullición de aproximadamente 55°C. Un azoiniciador particularmente adecuado es VA-044™, dihidrocloruro de (2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano, disponible comercialmente a partir de Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Richmond, VA) que tiene una temperatura de activación de entre 51°C y 52°C.

El azoiniciador tiene ventajas sobre otros iniciadores tales como persulfatos e hidroperóxidos. El azoiniciador es eficaz cuando se usa en cantidades muy bajas, en contraste con otros iniciadores. El azoiniciador se usa a aproximadamente 0,1% a 1,0% en % en peso de monómero. Preferiblemente se usa aproximadamente 0,5% de azoiniciador. El bajo nivel de azoiniciador da por resultado niveles muy bajos de contaminación de iniciador en el hidrogel polimerizado en comparación con la contaminación resultante del uso de otros iniciadores. Además, no hay contaminación de metal resultante del azoiniciador, mientras que otros iniciadores incluyen típicamente catalizadores metálicos que dejan contaminación metálica en el producto polimerizado. Además, otros iniciadores típicos son sensibles al oxígeno, y, por lo tanto, las disoluciones en contacto con estos iniciadores deben des-airearse. El contenido en oxígeno restante de las disoluciones des-aireadas es variable, llevando a inconsistencia en el procedimiento de formación de microesferas. Con el uso de un azoiniciador, no se necesita des-aireación, lo que reduce la complejidad de la preparación de la disolución para el uso en el procedimiento de formación de microesferas y aumenta la consistencia del preparado de microesferas. Además, los iniciadores de persulfato generalmente dan más conversión y rendimientos inconsistentes que los azoiniciadores.

Segundas disoluciones

Una disolución orgánica actúa como un medio de dispersión en el procedimiento de preparación de microesferas, y se denomina en este documento la "segunda disolución".

Un medio orgánico particularmente útil en el procedimiento de preparación de microesferas es una mezcla que contiene cloroformo y cloruro de metileno. El cloruro de metileno solo no tiene una temperatura de ebullición suficientemente alta para permitir el uso de un azoiniciador acuoso a baja temperatura. El cloroformo solo no es suficiente para soportar la formación de microesferas. La combinación de cloroformo y cloruro de metileno proporciona una disolución orgánica que tiene una temperatura de ebullición que permite el uso de un azoiniciador acuoso a baja temperatura y que soporta la formación de microesferas en la suspensión acuosa/orgánica. El cloroformo y el cloruro de metileno pueden usarse en relaciones de volumen entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 1:20. Más adecuada es una disolución de cloroformo y cloruro de metileno con una relación de volumen de aproximadamente 5:1 y 1:5. Particularmente adecuada es una relación de volumen de 3:1 de disolución de cloroformo:cloruro de metileno que tiene una temperatura de ebullición de aproximadamente 53°C.

Adicionalmente, otros disolventes o mezclas de disolvente pueden usarse en combinación con un hidrocarburo esencialmente clorado tal como cloruro de metileno. Por ejemplo, puede ser deseable sustituir el cloroformo en las mezclas de cloroformo-cloruro de metileno descritas anteriormente por los peligros para la salud del cloroformo. Disolventes o mezclas de disolventes adecuadas para sustituir el cloroformo pueden seleccionarse combinando los parámetros de solubilidad de Hansen (Hansen, Hansen Solubility Parameters, A User's Handbook, CRC Press LLC, Boca Ratón, FL, 2000) de disolvente o mezclas de disolventes particulares a los del cloroformo. Los parámetros de solubilidad de Hansen son una extensión de los parámetros de solubilidad de Mildebrand. Según Hansen, "la base para los parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) es que la energía total de vaporización de un líquido consiste en varias partes individuales, que llegan de las fuerzas de dispersión (atómica), fuerzas de dipolo permanente-dipolo permanente (molecular) y unión de hidrógeno (molecular) (intercambio de electrones)". Los materiales que tienen

ES 2 423 011 T3

HSP similares tienen alta afinidad los unos con los otros. La ecuación básica para los HSP es que la energía total de cohesión, E , debe ser la suma de las energías individuales:

$$E = E_D + E_P + E_H$$

- 5 Donde E_D es la energía de cohesión de dispersión de Hansen, E_P es la energía de cohesión de polaridad de Hansen, y E_H es la energía de cohesión de unión de hidrógeno de Hansen. Dividiendo esta expresión por el volumen molar, da el parámetro de solubilidad de Hildebrand total como la suma de los cuadrados de los componentes de Hansen:

$$\delta^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2$$

- 10 El cloroformo tiene una dispersión de Hansen de 17,8, polaridad de Hansen de 3,1 y unión de hidrógeno de Hansen de 5,7 en unidades de la raíz cuadrada de megapascales ($\text{mPa}^{1/2}$). Un programa de software (Molecular Modeling Pro Plus, ChemSW, Fairfield, CA) está disponible para calcular los parámetros de solubilidad de Hansen a partir de la estructura molecular. Mezclas de disolventes preferidas tienen una suma de las diferencias (en valor absoluto) en parámetros de solubilidad de Hansen respecto a los parámetros de solubilidad de Hansen del cloroformo de menos que aproximadamente 0,21. Un cálculo de la muestra de la suma de las diferencias en parámetros de solubilidad de Hansen para una mezcla de 30% en volumen (porcentaje en volumen) de heptanoato de etilo y 70% en volumen de acetato de fenetilo respecto al cloroformo se muestra en la Tabla A. Las mezclas de disolventes adecuadas se dan en la Tabla B.

Tabla A

Cálculo de la suma de las diferencias en parámetros de solubilidad de Hansen para una mezcla de 30% en volumen de heptanoato de etilo y 70% en volumen de acetato de fenetilo respecto al cloroformo					
Parámetro de Hansen	[1] Cloroformo	[2] Heptanoato de etilo	[3] Acetato de fenetilo	0,3 x [2] + 0,7 x [3]	Diferencia
Dispersión	17,8	16,254	18,520	17,840	0,040
Polaridad	3,1	3,025	3,123	3,093	0,007
Unión de hidrógeno	5,7	4,686	6,034	5,630	0,070
Suma de diferencias = 0,117					

Tabla B

Mezclas de disolventes que pueden sustituirse por cloroformo	
Mezcla de disolventes (% en volumen)	Diferencia en parámetros de solubilidad de Hansen respecto al cloroformo
20% de oleato de metilo:80% de acetato de fenetilo	0,1180
30% de heptanoato de etilo:70% de acetato de fenetilo	0,1170
30% de octanoato de metilo:70% de acetato de fenetilo	0,1352
40% de carbonato de dietilo:60% de acetato de metilfenilo	0,1457
20% de fenilpropilmetiléter:80% de fenilpropiléter	0,1501
70% de etilfeniléter:30% de acetato de fenilpropilo	0,1570
20% de dietilenglicolbutiléter:80% de fenilpropilmetiléter	0,1703
20% de propionato de etilo:80% de acetato de fenilpropilo	0,1740
80% de acetato de fenilpropilo:20% de tripropilamina	0,1856
90% de fenilpropiléter:10% de tolueno	0,2015
30% de hexanoato de metilo:70% de acetato de fenilpropilo	0,2048
20% de palmitato de isopropilo:80% de acetato de fenetilo	0,2073

En una realización, la segunda disolución comprende una combinación de una mezcla de disolventes de 30% en volumen de heptanoato de etilo (CAS núm. 106-30-9) y 70% en volumen de acetato de fenetilo (CAS núm. 103-45-7), con cloruro de metileno en una relación de volumen de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, además de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, y adicionalmente además de aproximadamente 3:1.

- 5 La segunda disolución comprende además un componente que modifica la viscosidad que proporciona una tensión superficial que permite la formación de gotas en la suspensión acuosa/orgánica formada durante el actual procedimiento de preparación de microesferas. Este componente que modifica la viscosidad se denomina de nuevo un "coloide protector". Una variedad de compuestos naturales y sintéticos solubles en medios orgánicos pueden usarse como un coloide protector, que incluyen, aunque no están limitados a, derivados de celulosa, poliacrilatos (tal como poli(ácido acrílico) y poli(ácido metacrílico)), polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, poli(alcohol de vinilo) parcialmente hidrolizado y otros polioles, goma guar y goma agar. Son particularmente útiles los éteres de celulosa tales como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y bencilcelulosa; además de ésteres de celulosa tales como acetato de celulosa, butilato de celulosa, butilato de acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de celulosa, propionato de acetato de celulosa, butirato de acetato de celulosa y ftalato de acetato de celulosa. La cantidad de coloide protector en la segunda disolución orgánica es suficiente para reducir la coalescencia de microgotas en la suspensión acuosa/orgánica, y está generalmente entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5% en % en peso de la segunda disolución orgánica. Es particularmente adecuada la etilcelulosa a aproximadamente 1,5% en peso.

Procedimiento para la preparación de microesferas

- 20 La primera disolución y la segunda disolución se combinan con agitación para formar una primera suspensión. La segunda disolución se usa en una cantidad que es adecuada para formar una buena suspensión, mientras que la cantidad puede ser tan grande como sea práctica. Generalmente la relación de volumen de las disoluciones segunda a primera está en el intervalo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2:1. Preferiblemente la relación de volumen de las disoluciones segunda a primera está en el intervalo de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 4:1.

- Las disoluciones primera y segunda pueden combinarse en cualquier orden. Específicamente, la primera disolución puede añadirse a la segunda disolución, la segunda disolución puede añadirse a la primera disolución, o las dos disoluciones pueden combinarse simultáneamente. Preferiblemente, la primera disolución se añade a la segunda disolución. Durante la combinación de las disoluciones primera y segunda, la mezcla resultante se agita a una velocidad capaz de formar una suspensión uniforme a partir de las dos disoluciones. La agitación puede ser por cualquier método que mezcle completamente las dos disoluciones, tal como agitación o mezcla. Típicamente, la segunda disolución se agita en un envase mientras la primera disolución se vierte en el mismo envase. La primera y segunda disolución combinadas se agita a una temperatura que está por debajo de la temperatura de azoiniciación (y por encima del punto de congelación de la disolución) para formar una primera suspensión uniforme. Generalmente la temperatura está por debajo de aproximadamente 50°C, y más típicamente está por debajo de aproximadamente 40°C. Se prefiere una temperatura que está por debajo de aproximadamente 30°C. Típicamente la primera suspensión se agita a aproximadamente 100 a 600 rpm, dependiendo del tamaño del envase, a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora a una hora.

- 40 La agitación de la primera suspensión permite la formación de pequeñas gotitas en la suspensión. El tamaño de las gotitas en formación, y por lo tanto, el tamaño de las microesferas que se producen, está relacionada con la velocidad de agitación. Cuando la agitación se reduce, las gotitas se fusionan. La agitación se mantiene a una velocidad suficiente para reducir la coalescencia de las gotitas permitiendo la formación de microesferas de tamaño de micras. Por ejemplo, para la formación de microesferas en el intervalo de tamaño de 40 a 500 micras, la agitación es típicamente de aproximadamente 150-250 rpm, cuando se usa en un envase de un litro. La velocidad de agitación óptima para cualquier sistema particular dependerá de muchos factores, incluyendo el monómero particular, agente de reticulado y sistema disolvente usado, la geometría del envase, la geometría del agitador y las propiedades deseadas de las microesferas para la aplicación pretendida. Por ejemplo, el tamaño de las microesferas depende de la velocidad de agitación. En general, se obtienen microesferas más grandes a menores velocidades de agitación. La velocidad de agitación para cualquier condición dada puede optimizarse fácilmente por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria.

- Después de la formación de la primera suspensión, se aplica un bajo nivel de calor de manera que la temperatura de la primera suspensión se lleva a una temperatura que está por debajo de la temperatura de ebullición de la primera disolución, y por debajo o a la temperatura de ebullición de la segunda disolución. Típicamente la temperatura está entre aproximadamente 50°C y 55°C, dependiendo de la mezcla de la segunda disolución. Se prefiere traer la temperatura de la primera suspensión hecha con una relación de cloroformo y cloruro de metileno de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 51°C o 52°C. A esta temperatura el azoiniciador de baja temperatura se activa. La primera suspensión se agita hasta que forma una segunda suspensión que comprende un precipitado de microesferas gelatinosas en el medio de suspensión, que es predominantemente una fase líquida orgánica. El precipitado gelatinoso aparece como un material lechoso que se cae de la suspensión. Adicionalmente, una espuma blanca puede verse en la parte superior de la segunda suspensión. Típicamente, la agitación de la primera suspensión para formar la segunda suspensión a la temperatura elevada es durante aproximadamente 8-10 horas.

La segunda suspensión se agita durante otro periodo de tiempo a temperatura ambiente para asegurar que la polimerización y la formación de microesferas está completa. Durante este tiempo la segunda suspensión se enfría a una temperatura que es fácilmente manejable. Generalmente esta está a o por debajo de 30°C. La temperatura ambiente, típicamente a aproximadamente 25°C, se usa convenientemente. Típicamente la agitación permanece a aproximadamente 150-250 rpm, cuando se usa un envase de un litro, durante aproximadamente 8-14 horas.

La agitación se cesa, permitiendo a las microesferas formadas depositarse en el fondo del envase. La eliminación del agua a partir de estas microesferas de hidrogel puede conseguirse lavando con un disolvente deshidratante tal como metanol, etanol o acetona. Es particularmente útil el metanol, que se añade, y la mezcla se agita opcionalmente de forma suave durante aproximadamente una hora para permitir el buen intercambio de disolvente. Las microesferas se recuperan entonces mediante un método tal como la decantación o el filtrado, y pueden lavarse una segunda vez con metanol y recuperarse de nuevo. Con la eliminación del agua, las microesferas cambian de apariencia de lechosas y gelatinosas a duras y blancas opacas. Las microesferas finalmente pueden lavarse en etanol, lo que es deseable para la eliminación de metanol residual, particularmente para el uso de microesferas en aplicaciones médicas. Las microesferas lavadas en etanol forman un tipo de lechada de microesferas. Las microesferas pueden secarse opcionalmente para formar un polvo de microesferas. El secado libra a las microesferas de disolvente de lavado restante y agua adicional. El secado puede ser por cualquier método estándar tal como usando aire, calor y/o vacío. Es particularmente útil el secado al vacío en un horno de vacío puesto a aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C con una purga de nitrógeno. El uso de menores temperaturas de secado requiere tiempos de secado más largos. Para la preparación de microesferas altamente hinchables, se prefiere el secado a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C) al vacío con una purga de nitrógeno (véase el Ejemplo 34). Una pequeña cantidad de agua permanece generalmente en la microesfera después del secado. La cantidad de agua restante puede ser aproximadamente 1% a 10% del peso total de la microesfera. El preparado resultante de microesferas, aunque reteniendo una pequeña cantidad de agua en las microesferas, fluye cuando se inclina o gira en un envase y forma así un polvo de microesferas de flujo libre.

Propiedades físicas de la microesfera

Las microesferas preparadas según el actual procedimiento son esencialmente esféricas. Una población de microesferas tiene medidas de esfericidad centradas casi aproximadamente el 95%, en un intervalo de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%. La población puede incluir algunas microesferas individuales que tengan una medida de esfericidad menor, mientras se mantiene la alta medida de esfericidad para la población como un todo.

Las microesferas están en el intervalo de tamaño de aproximadamente 10 a aproximadamente 730 micras de diámetro, además de aproximadamente 14 a aproximadamente 730 micras de diámetro. Una prevalencia de las microesferas está en el intervalo de tamaño de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 micras de diámetro, como se ve cuando se analiza una pequeña muestra de tamaño de microesferas. Una mezcla de tamaños heterogénea de microesferas puede separarse en muestras de microesferas de intervalos específicos de tamaño, si se desea, para aplicaciones específicas. Las microesferas pueden separarse mediante métodos tales como separación en lecho fluidizado y tamizado, también denominado como filtrado por rejilla. Es particularmente útil el tamizado a través de una serie de tamices apropiados para recuperar muestras que contienen microesferas de tamaños deseados. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras separadas de microesferas usando una serie de tamices con tamaños de malla de 35 a 400 micras. Pueden obtenerse muestras separadas de microesferas que tienen diámetros que oscilan entre aproximadamente 30 y aproximadamente 44 micras; aproximadamente 115 a aproximadamente 165 micras; aproximadamente 180 y aproximadamente 330 micras; y con intervalos de tamaño que caen además entre y fuera de estos grupos de ejemplos. Estas muestras de microesferas separadas por tamaños ejemplifican la producción de preparados de microesferas que tienen un tamaño predominante que oscila entre aproximadamente 30 micras y 600 micras de diámetro e incluyen microesferas en un intervalo de tamaño que está generalmente en +/- 30% de la media para aproximadamente el 90% de la muestra. Los preparados de microesferas pueden producirse teniendo microesferas en un intervalo de tamaño que está generalmente en +/- 20% de la media para aproximadamente el 90% de la muestra.

Las microesferas preparadas según el actual procedimiento tienen una alta densidad, aun una alta capacidad de hinchado. Las microesferas tienen baja porosidad, especialmente en comparación con las microesferas descritas en la Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, como se vio por microscopía de barrido electrónico (SEM). Las microesferas de la Patente de EE.UU. núm. 6.218.440 tienen cavidades unidas por poros interconectados en donde al menos algunas de las cavidades en el interior del material comunican con la superficie del material. Estas microesferas tienen poros a todo su través y además una superficie porosa rugosa. Las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento tienen por comparación un relativamente pequeño número de huecos incrustados en un material sólido. Generalmente, aunque no invariablemente, estos huecos son huecos de celda cerrada que no están interconectados los unos con los otros o a la superficie de la microesfera. La superficie de la actuales microesferas es generalmente lisa y redondeada, aunque pueden estar presentes algunas imperfecciones de la superficie. La porosidad de las microesferas puede además evaluarse por medidas de densidad. Un preparado de microesferas preparadas mediante el actual procedimiento tiene una densidad de masa de 0,68 g/cm³ (Ejemplo 6). Se espera que las microesferas producidas por el actual procedimiento tendrán una densidad de masa de al menos aproximadamente 0,5 g/cm³. En contraste, la densidad de masa de las microesferas preparadas según un método

de la técnica anterior (Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, Ejemplo 2) se midió para ser 0,182 g/cm³ (véase el presente Ejemplo 6). La densidad individual de microesfera de las actuales microesferas está entre aproximadamente 0,9 g/cm³ y aproximadamente 2 g/cm³, mientras que la densidad individual de las microesferas preparadas según el método en la técnica anterior (Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, Ejemplo 2) se midió para ser 0,8 g/cm³ o menos (véase el presente Ejemplo 6).

La densidad y porosidad de las microesferas juega un papel en la durabilidad de las microesferas. Las microesferas preparadas por el actual procedimiento son altamente duraderas ya que las microesferas hinchadas tienen resistencia sustancial a la fractura cuando se pasan a través de una aguja de pequeño calibre. Bajo las mismas condiciones, las microesferas altamente porosas hinchadas rompen, y tienen así baja durabilidad. Por ejemplo, las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento que se hinchan y se pasan a través de una aguja de calibre 20 mantienen un diámetro promedio similar al de la muestra de partida, mientras el diámetro promedio de las microesferas preparadas según un método en la técnica anterior (Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, Ejemplo 2) después de pasar a través de una aguja de calibre 20 se reduce en casi la mitad, indicando fractura de las partículas.

Como se describe anteriormente, la capacidad de hinchado (cantidad de absorción de agua) de las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento, puede variar dependiendo de la cantidad de agente de reticulado añadido a la primera disolución. Por ejemplo, el agente de reticulado puede añadirse en una cantidad tal que imparte una capacidad de hinchado a las microesferas de aproximadamente 50 gramos de agua por gramo de microesferas, una cantidad para impartir una capacidad de hinchado de aproximadamente 70 gramos por gramo de microesferas, y de forma alternativa, una cantidad para impartir una capacidad de hinchado de aproximadamente 100 gramos por gramo de microesferas. Es particularmente adecuado un preparado de microesferas que tiene al menos 70 gramos de absorción de agua por gramo de polvo de microesferas. Usando la misma cantidad de agente de reticulado, las microesferas preparadas según un método en la técnica anterior (Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, Ejemplo 2) tenía menos de la mitad de esta capacidad de hinchado (véase el Ejemplo 6, Tabla 7).

Las microesferas hechas mediante el actual procedimiento muestran rápido hinchado. Las microesferas individuales pueden verse alcanzar un tamaño máximo en aproximadamente 15 seg de contacto de las microesferas con agua. Así, las microesferas individuales alcanzan su capacidad total de hinchado en aproximadamente 15 seg, y típicamente en aproximadamente 10 seg. Una población de microesferas tiene además rápido hinchado mientras cada microesfera tenga suficiente exposición al agua. En general, cuando se pone en contacto una población de microesferas con agua, esas microesferas en el centro de la población, o en el fondo del envase, no tienen total exposición al agua, de manera que su tiempo de hinchado es más largo. Por ejemplo, 1 gramo de microesferas puede alcanzar el 50% del hinchado total en 5 seg y aproximadamente el 70% del hinchado total en 10 seg con exposición al agua como se describe en los Métodos Generales. Generalmente el hinchado total se alcanza en 30 seg para una población de microesferas bajo las condiciones de contacto con agua descritas.

Un atributo adicional de las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento es la capacidad de deformación después del hinchado. Cuando se colocan bajo presión, las microesferas hinchadas no mantienen su forma esencialmente esférica, aunque se comprime en el eje de la presión y se expande en el eje que es perpendicular a la presión. Así, los factores medioambientales, tales como presión de un medio de flujo o de las paredes de un envase cerrado, pueden provocar deformación de las microesferas. Además, la presión de microesferas individuales próximas unas a otras puede provocar deformación. Esta capacidad de deformación se piensa que se imparte y aumenta a través de la estructura de huecos de celda cerrada de las microesferas. Aunque sin desear estar atado por la teoría, se cree que los huecos de celda cerrada son capaces de comprimirse dejando que el hidrogel hinchado en las microesferas se deforme de forma máxima.

Esta capacidad para deformarse permite a las microesferas tomar una forma de un espacio continente, y para llenar ese espacio. Adicionalmente, las microesferas deformadas tienen un contacto de área superficial aumentada las unas con las otras, en comparación con el área de contacto entre gotas esféricas. El contacto de área superficial aumentado entre las microesferas deformadas proporciona una estructura más compacta que la que es alcanzable con microesferas esféricas no deformables. Esta estructura compacta proporciona alta resistencia a la penetración. La capacidad de deformación es altamente deseable en algunas aplicaciones tales como en el tratamiento de embolización, donde las microesferas compactas, deformadas, pueden proporcionar fuerte bloqueo a sitios vasculares diana. En un sistema de ensayo que usa un tubo esencialmente insustituible, flexible, que tiene un diámetro interno de 1,58 mm, las microesferas deformadas, hinchadas, fueron capaces de formar oclusiones que resistieron muy altas presiones. Por ejemplo, 15 mg de microesferas secas, cuando se hincharon totalmente, formaron oclusiones de microesferas que no se desplazaron por presión de agua menor que aproximadamente 114 mm de Hg (15,2 kilopascas (kPa)). Comenzando con 18 mg de microesferas secas, las oclusiones formadas se desplazaron por presión de agua a aproximadamente 570 mm de Hg (76,0 kPa), y comenzando con 20 mg de microesferas secas, las oclusiones formadas resistieron por encima de 1.000 mm de Hg de presión (133 kPa).

Propiedades de microesfera ventajosas para aplicaciones médicas

Las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento son biocompatibles por su falta de toxicidad, son no inflamatorias y son no hemolíticas. Las microesferas tienen una respuesta al hinchado en la sangre completa que es

similar a la respuesta de hinchado en el agua, alcanzando hasta 100 veces de hinchado en segundos. Estas propiedades permiten a las microesferas descritas en este documento usarse en aplicaciones médicas, donde puede tomarse ventaja de su potencial total de hinchado. Además, la resistencia a la fractura de las microesferas descritas en este documento las hace particularmente adecuadas para la embolización ya que la resistencia a la fractura reduce el potencial para efectos tales como embolismo corriente abajo del sitio diana, respuesta inflamatoria indeseada, exacerbación de la cascada de coagulación y la pérdida de oclusión terapéutica.

El preparado de microesferas

Un preparado de microesferas se prepara según el actual procedimiento y contiene microesferas hinchables/deformables que tienen las propiedades descritas en este documento. El preparado de microesferas puede ser el producto directo del procedimiento antes del secado, donde las microesferas forman una lechada de microesferas que incluyen disolvente de extracción. La etapa de secado adicional del procedimiento produce un polvo de microesferas. El polvo de microesferas puede hacerse disponible para usar como un polvo o para la adición de un líquido apropiado al uso pretendido. La adición de un líquido al polvo de microesferas produce una lechada de microesferas o una suspensión de microesferas. Los líquidos usados en una suspensión de microesferas puede ser cualquiera que sea apropiado para el uso pretendido. Por ejemplo, un líquido biocompatible que controla el hinchado se usa para suspender microesferas para usos médicos, tales como aumento tisular, tratamiento de heridas y embolización. Líquidos biocompatibles de control de hinchado típicos incluyen, por ejemplo, propilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), Ethiodol[®], MD-76[®] y aceite mineral. El Ethiodol[®] y MD-76[®] son agentes de contraste usados típicamente en procedimientos de arteriografía intervascular medica o linfografía. El Ethiodol[®] contiene yodo combinado orgánicamente con ésteres de etilo de los ácidos grasos de aceite de semilla de amapola y está disponible de SAVAGE Laboratories[®] (Melville, NY). El MD-76[®] es una disolución acuosa de diatrizoato de meglumina (CAS núm. 131-49-7, 66% en peso) y diatrizoato sódico (CAS núm. 737-31-5, 10% en peso) tamponado con sodio monobásico, con un pH de 6,5 a 7,7, que tiene yoduro unido orgánicamente para proporcionar visualización radiológica. El MD-76[®] se fabrica por Mallinckrodt Inc. (St. Louis, MO).

Suspensión de embolización

Un preparado de microesferas hecho según el actual procedimiento se usa para preparar una suspensión para el tratamiento de embolización, denominado en este documento una "suspensión de embolización". La esterilidad es un factor importante en el tratamiento de embolización. El procedimiento de preparación de microesferas descrito que incluye un lavado final de etanol, proporciona un tratamiento de esterilización. Puede llevarse a cabo esterilización adicional extendiendo el lavado de etanol durante un largo periodo de tiempo, tal como toda la noche. La esterilidad puede mejorarse usando medidas adicionales tales como llevando a cabo el procedimiento para hacer las microesferas en un ambiente estéril, y tratando el preparado de microesferas con luz UV, óxido de etileno o radiación gamma, como se sabe por un experto en la técnica.

La suspensión de embolización incluye un vehículo biocompatible. El vehículo proporciona no solo un medio para suspender y administrar las microesferas, sino además para controlar el hinchado de las microesferas. Típicamente, el vehículo usado en la suspensión tiene una viscosidad suficientemente baja para permitir el reparto de las microesferas a través de agujas de pequeño calibre y catéteres, tales como aquellos de calibre 20 o 7 French (F) o más pequeños. Se usa una medida de calibre para agujas, mientras que se usa una medida French para catéteres, ambos de los cuales designan el diámetro externo. El diámetro interno de una aguja o catéter está relacionado con el diámetro externo, aunque depende también del grosor de la pared y por tanto puede variar entre fabricantes. Así, las medidas precisas de los diámetros internos de las agujas y catéteres no están especificadas por la unidad de calibre o French. Sin embargo, los diámetros de calibre interno de catéteres y agujas específicas se conocen o pueden obtenerse fácilmente por un experto en la técnica. Los vehículos biocompatibles que limitan el hinchado de las microesferas, y así son medios de control de hinchado, incluyen los agentes de contraste usados comúnmente Ethiodol[®] (SAVAGE Laboratories[®], Melville, NY) y MD-76[®] (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO). Además, el hinchado puede controlarse por concentración salina y fortaleza iónica, además de con pH o DMSO. Vehículos biocompatibles particularmente adecuados son aquellos que contienen DMSO por encima de aproximadamente 60% de concentración, aquellos con un pH ácido y agentes de contraste. El agente de contraste MD-76[®] permite algún hinchado, que oscila entre aproximadamente 3,5x y aproximadamente 7,5x del volumen original, y puede usarse como un medio de control de hinchado. Pueden mezclarse diferentes vehículos, tal como combinando un porcentaje de DMSO y un agente de contraste para establecer la cantidad deseada de hinchado de la microesfera (explicado posteriormente) en la suspensión de embolización.

La concentración de microesferas en la suspensión de embolización varía dependiendo del vehículo usado y el tamaño de catéter a usar para administrar la suspensión, que depende a su vez del tamaño de la vasculatura a embolizar. Además, el tamaño de las microesferas afecta a la concentración usada, donde muestras de microesferas de tamaños diferentes pueden prepararse, por ejemplo, por tamizado, como se describe en este documento. Por ejemplo, 250 mg/mL de concentración de microesferas de aproximadamente 250 micras en DMSO (no hinchadas) pueden usarse con catéteres de 6F o mayores. Para el reparto de altas concentraciones de microesferas con catéteres más pequeños, tal como 5F o menores, sería deseable tener hinchado limitado de las microesferas para la administración de la suspensión de microesferas. El hinchado limitado puede tener lugar antes de o durante la administración. El hinchado limitado puede ser hasta aproximadamente 10x del volumen original de

las microesferas. El hinchado limitado proporciona capacidad de deformación de las microesferas que las permite pasar a través de catéteres y agujas de diámetro pequeño. El hinchado limitado puede alcanzarse por métodos tales como ajustando la concentración de sal, pH o concentración de DMSO del vehículo, o con el uso de un agente de contraste. Por ejemplo, con aproximadamente 50% o menos de concentración de DMSO en el vehículo, las microesferas comienzan a hincharse. Además, las microesferas pueden hincharse a entre aproximadamente 3,5x y 7,5x del volumen original en el agente de contraste. El paso a través de catéteres 5F puede alcanzarse con suspensiones que contienen, por ejemplo, 150 mg/mL de microesferas de 250 micras en MD-76[®]. Además, las suspensiones de embolización que contienen 300 mg/mL de microesferas de 50-150 micras en MD-76[®] pueden pasar a través de un catéter 5F. El tamaño específico y la concentración de microesferas, además del vehículo deseado, pueden elegirse por un experto en la técnica para el tratamiento de embolización particular a llevar a cabo.

Tratamiento de embolización

La suspensión de embolización que contiene el preparado de microesferas hecho como se describe en este documento, se administra a un mamífero para la embolización, como se conoce por un experto en la técnica, por ejemplo como se describe en "Uterine Artery Embolization and Gynecologic Embolotherapy", Spies y Pelage, 2005 ISBN: 0-7817-45532-2 y en "Vascular and Interventional Radiology: Principles and Practice", Bakal et al., 2002 ISBN: 0-86577-678-4. La administración de la suspensión de embolización que contiene microesferas preparada mediante el actual procedimiento es generalmente mediante el paso a través de un catéter o aguja en la vasculatura del mamífero de manera que las microesferas alcancen un sitio diana. Como la suspensión de embolización contacta con la sangre en la vasculatura, las microesferas hinchables/deformables se hinchan y forman una oclusión. La oclusión bloquea eficazmente el flujo sanguíneo distal al sitio de la oclusión. El sitio de la oclusión puede ser cualquier sitio diana donde, por tratamiento médico, se desee bloquear el flujo sanguíneo. Por ejemplo, el sitio de oclusión puede ser en un vaso sanguíneo que alimenta un tumor tal como un fibroma uterino o un tumor canceroso, en una malformación arteriovenosa, o en un vaso sanguíneo donde no está contenida la sangre, tal como en el caso de una úlcera o daño del estómago. La embolización preoperatoria puede además llevarse a cabo para parar el flujo sanguíneo a una región marcada para cirugía.

Las microesferas hinchables/deformables, hechas mediante el actual procedimiento, sorprendentemente se encontraron que proporcionaban oclusión más fácilmente administrada y más duradera que lo esperado y como previamente se describe en la técnica. La carga embólica funcional, que se define como la cantidad de masa de microesferas secas necesaria para establecer una oclusión cuando se reconstituía en sustituto de sangre en un tubo de diámetro fijo, es menor que lo esperado. Así, catéteres más pequeños que los esperados pueden usarse para repartir una carga embólica funcional efectiva de las microesferas hinchables/deformables, en comparación al tratamiento con microesferas conocido en la técnica. El reparto de microesferas hinchables/deformables en catéteres pequeños, tal como catéteres 5F y 3F, permite la mejor colocación de microesferas usando los catéteres más pequeños para alcanzar más cerca un sitio diana. El uso de catéteres más pequeños reduce además el riesgo de vasoespasmo, provocado por la irritación del catéter, que puede dar por resultado el aborto del procedimiento u oclusiones finales falsas que se desintegran después de la resolución del vasoespasmo. El uso de catéteres pequeños también se permite por la capacidad de deformación de las microesferas, como se describe en este documento. También debido a su capacidad de deformación, las microesferas son capaces de profunda penetración en el vaso antes de la oclusión, como se ve en la embolización de la vasculatura renal porcina en los Ejemplos, posteriormente. La profunda penetración lleva además al empaquetado mejorado de las microesferas en los vasos, llevando a fuertes oclusiones.

Las microesferas preparadas como se describe en este documento forman oclusiones más duraderas de lo esperado. Esta característica es más probablemente atribuible a las propiedades hinchables y deformables de las microesferas. El hinchado de las microesferas en el ambiente elástico de la arteria diana crea una fuerza de retroceso desde la pared arterial que deforma a su vez las microesferas, creando así una oclusión empaquetada con máximo contacto de superficie entre microesferas deformadas, hinchadas. El apretado empaquetamiento de las microesferas hinchadas, deformadas, se mostró con estudios in vivo de embolización en vasculatura renal porcina. Además, las presiones de desplazamiento se midieron para oclusiones de microesferas hinchadas, deformadas, in vitro. El sistema in vitro usó un tubo de diámetro interno de 1,58 mm, que es un diámetro mayor que el típico de vasos diana y por lo tanto más difícil de bloquear. El tubo usado para medir la capacidad de duración de la oclusión era flexible, y no expandible a las presiones de ensayo usadas. Tubos tales como tubo Tygon[®], específicamente tubo Beverage (B-44-3) con un diámetro interno de 1,58 mm, diámetro externo de 4,76 mm y grosor de la pared del tubo de 1,59 mm, es particularmente adecuado para el ensayo. Las oclusiones de microesferas preparadas según el procedimiento de la invención resisten presiones sanguíneas fisiológicas, y presiones mucho mayores. Por ejemplo, 15 mg (masa seca medida) de microesferas de tamaño 250-500 micras de diámetro, forman oclusiones que resisten de promedio aproximadamente 125 mm de Hg (16,7 kPa), 18 mg de microesferas de tamaño 250-500 micras de diámetro forman oclusiones que resisten de media aproximadamente 600 mm de Hg (80,0 kPa), y 20 mg de microesferas de tamaño 250-500 micras de diámetro forman oclusiones que resisten de media por encima de 1.000 mm de Hg (133 kPa) de presión.

Para cualquier determinación sencilla, un mínimo de 15 mg del polvo de microesferas de la invención, cuando están totalmente hinchadas, es capaz de formar una oclusión, como se describe anteriormente, que puede resistir una presión tan alta como aproximadamente 110 mm de Hg (14,6 kPa) sin desplazarse. Un mínimo de 18 mg de polvo

de microesferas de la invención, cuando está totalmente hinchada, es capaz de formar una oclusión, como se describe anteriormente, que puede resistir una presión tan alta como aproximadamente 550 mm de Hg (73,3 kPa) sin desplazarse. Un mínimo de 20 mg de polvo de microesferas de la invención, cuando está totalmente hinchada, es capaz de formar una oclusión, como se describe anteriormente, que puede resistir una presión tan alta como aproximadamente 1000 mm de Hg (133 kPa) sin desplazarse.

Las cantidades de microesferas, preparadas mediante el actual procedimiento, que son capaces de formar oclusiones duraderas, pueden fácilmente repartirse a través de microcatéteres. Las suspensiones de hasta aproximadamente 10 mg/mL de microesferas no hinchadas pueden repartirse a través de un catéter 5F. Así, menos de 2 mL de una suspensión de 10 mg/mL de las actuales microesferas pueden formar una oclusión duradera como se describe anteriormente. Las microesferas en un medio de DMSO fueron también capaces de pasar a través de un microcatéter 3F cuando están a una concentración de 10 mg/mL y 30 mg/mL.

Algunos medios usados típicamente, tal como Ethiodol[®], son demasiado viscosos para pasar a través de microcatéteres. Así, medios alternativos con baja viscosidad, aun con la capacidad de limitar el hinchado de microesferas, se usan en suspensiones de embolización repartidas con microcatéteres. El pequeño volumen de las microesferas, preparadas mediante el actual procedimiento, que se reparte para formar una oclusión permite el uso de medios de suspensión que pueden provocar efectos perjudiciales cuando se inyectan en un mamífero en volúmenes mayores. Por ejemplo, los medios que incluyen más del 60% de DMSO o medios con un pH en el intervalo de 2-3 pueden usarse en suspensiones de embolización para controlar el hinchado de las microesferas. Varios mililitros de estos medios pueden administrarse para repartir una cantidad adecuada de microesferas para formar una oclusión. Adicionalmente, para minimizar los efectos de medios potencialmente dañinos, una disolución de tamponado puede administrarse antes de o después de administrar la suspensión de embolización. La solución salina tamponada con fosfato o tampón de bicarbonato son ejemplos de disoluciones que pueden usarse de esta manera.

Además de la formación de una oclusión, las actuales microesferas usadas en la embolización pueden prepararse además de manera que sean capaces de repartir medicamentos, tal como fármacos o agentes terapéuticos. La medicación puede cargarse en las microesferas usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las microesferas pueden estar imbuidas con la medicación hinchando las microesferas en un medio que contiene la medicación y dejándola asimilarse en las microesferas. Las microesferas pueden entonces secarse o deshincharse eliminando el agua por lavado con un disolvente deshidratante, como se describe anteriormente. Adicionalmente, la medicación puede recubrirse en las microesferas usando métodos tales como pulverización, inmersión y similares. Opcionalmente, pueden añadirse múltiples recubrimientos para producir una variedad de efectos de reparto. La medicación puede además incorporarse directamente en las microesferas durante su preparación añadiendo el medicamento a la primera disolución. Después del reparto de las microesferas que contienen la medicación al sitio diana, el fármaco o agente terapéutico se libera a lo largo del tiempo mientras las microesferas están en contacto con fluidos corporales. Por ejemplo, fármacos anti-cancerígenos pueden repartirse mediante microesferas que forman una oclusión en proximidad a un tumor canceroso. El reparto en microesferas embolizantes de agentes tales como factores anti-angiogénicos, fármacos anti-inflamatorios, analgésicos y anestésicos locales, proporcionan tratamiento adicional al bloqueo físico de la embolización. Agentes terapéuticos adicionales que pueden repartirse en la actual microesfera se describen en el documento WO 01/72281.

Suspensión de microesferas

Un preparado de microesferas hecho según el actual procedimiento se usa para preparar una suspensión para tratamiento médico, denominado en este documento una "suspensión de microesferas". La esterilidad es un factor importante en el tratamiento médico. El procedimiento de preparación de microesferas descrito incluyendo un lavado final de etanol, proporciona un tratamiento de esterilización. Puede llevarse a cabo esterilización adicional extendiendo el lavado de etanol durante un largo periodo de tiempo, tal como toda la noche. La esterilidad puede mejorarse usando medidas adicionales tales como llevar a cabo el procedimiento para hacer las microesferas en un ambiente estéril, y tratar el preparado de microesferas con luz UV, óxido de etileno o radiación gamma, como se conoce por un experto en la técnica.

La suspensión de microesferas incluye un vehículo biocompatible. El vehículo proporciona no solo un medio para suspender y administrar las microesferas, sino también controlar el hinchado de las microesferas. Un vehículo usado en la suspensión puede tener una viscosidad suficientemente baja para permitir el reparto de las microesferas a través de agujas y catéteres de pequeño calibre, tal como aquellos de calibre 20 o 7 French (F) o menores. Una medida de calibre se usa para agujas, mientras que una medida French se usa para catéteres, ambos de los cuales designan el diámetro externo. El diámetro interno de una aguja o catéter está relacionado con el diámetro externo, aunque también depende del espesor de la pared y así puede variar entre fabricantes. Así, medidas precisas de los diámetros interiores de agujas y catéteres no se especifican por la unidad de calibre o French. Sin embargo, los diámetros de calibre interno de catéteres y agujas específicas se conocen o pueden obtenerse fácilmente por un experto en la técnica. Vehículos biocompatibles que limitan el hinchado de las microesferas y así son medios de control de hinchado, incluyen los agentes de contraste usados comúnmente Ethiodol[®] (SAVAGE Laboratories[®], Melville, NY) y MD-76[®] (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO). Además, el hinchado puede controlarse por la concentración de sal y fortaleza iónica, además de con el pH. El disolvente polar orgánico dimetilsulfóxido (DMSO),

se encontró, como se describe en los Ejemplos en este documento, que es un medio útil para controlar el hinchado de las microesferas, y para hacer una suspensión de microesferas para administrar las microesferas. Las microesferas suspendidas en DMSO a concentraciones entre aproximadamente 60% y 100% sufren de forma apreciable el no hinchado. Vehículos biocompatibles particularmente adecuados son aquellos que contienen DMSO por encima de aproximadamente 60% de concentración, aquellos con un pH ácido y agentes de contraste. El agente de contraste MD-76[®] permite algún hinchado, que oscila entre aproximadamente 3,5x y aproximadamente 7,5x del volumen original, y pueden usarse como un medio de control de hinchado. Vehículos diferentes pueden mezclarse, tal como combinando un porcentaje de DMSO y un agente de contraste para establecer la cantidad deseada de hinchado de microesferas (explicado posteriormente) en la suspensión de microesferas.

La concentración de microesferas en la suspensión de microesferas varía dependiendo del vehículo usado y el tamaño de catéter o jeringa a usar para administrar la suspensión, que a su vez depende del tratamiento específico a llevar a cabo. Además, el tamaño de las microesferas afecta a la concentración usada, donde muestras de microesferas de distinto tamaño pueden prepararse, por ejemplo por tamizado, como se describe en este documento. Por ejemplo, 250 mg/mL de concentración de microesferas de aproximadamente 250 micras en DMSO (no hinchadas) pueden usarse con catéteres de 6F y mayores. Para el reparto de altas concentraciones de microesferas con catéteres más pequeños, tal como 5F y menores, puede ser deseable tener hinchado limitado de las microesferas para administrar la suspensión de microesferas. El hinchado limitado puede tener lugar antes de o durante la administración. El hinchado limitado puede ser hasta aproximadamente 10x del volumen original de las microesferas. El hinchado limitado proporciona capacidad de deformación de las microesferas que las permite pasar a través de catéteres y agujas de pequeño diámetro. El hinchado limitado puede alcanzarse por métodos tales como ajustando la concentración de sal, pH o concentración de DMSO del vehículo, o con el uso de un agente de contraste. Por ejemplo, con aproximadamente 50% o menos de concentración de DMSO en el vehículo, las microesferas comienzan a hincharse. Además, las microesferas pueden hincharse a entre aproximadamente 3,5x y 7,5x del volumen original en agente de contraste. El paso a través de catéteres 5F puede alcanzarse con suspensiones que contienen, por ejemplo, 150 mg/mL de microesferas de 250 micras en MD-76[®]. Además, las suspensiones de microesferas que contienen 300 mg/mL de microesferas de 50-150 micras en MD-76[®], pueden pasar a través de un catéter 5F. El tamaño específico y concentración de las microesferas, además del vehículo deseado, puede elegirse por un experto en la técnica para el tratamiento médico particular a llevar a cabo.

Tratamientos médicos

Una variedad de tratamientos médicos pueden realizarse administrando microesferas, preparadas usando el actual procedimiento, a un mamífero. Dichos tratamientos médicos pueden implicar relleno de huecos, aumento tisular y oclusión, absorción de fluidos y/o reparto de medicación. Para tratamientos tales como rellenos de huecos, aumento tisular y oclusión, típicamente una suspensión de microesferas se administra a un sitio anatómico diana usando una aguja o un catéter. La concentración de la suspensión y el tamaño de la aguja o catéter para el reparto se determina mediante la posición del sitio diana, y puede fácilmente determinarse por un experto en la técnica.

La formación de oclusiones en posiciones fuera de la vasculatura puede usarse como tratamientos para bloquear el flujo de fluidos corporales distintos de la sangre. Las microesferas hechas mediante el actual procedimiento pueden administrarse en cualquier situación médica donde la formación de una oclusión en una ruta de paso proporciona un tratamiento deseable. Los sitios diana que son rutas de paso anatómicos que no son vasculatura incluyen, por ejemplo, tubos y conductos. Las propiedades de las microesferas preparadas mediante el actual método, tal como las oclusiones particularmente duraderas que forman, como se describe anteriormente, las hacen valiosas para los tratamientos de oclusión. Un ejemplo es la oclusión de fistulas del tracto urinario. Las fistulas del tracto urinario son pasos anormales que conectan el tracto urinario a otros órganos, incluyendo la piel y la vagina (Avritscher et al. (2004) *Radiographics* 24 Supl. 1:S217-236). Las fistulas del tracto urinario pueden darse de forma espontánea o como un resultado de cirugía pélvica. Cuando están presentes, las fistulas del tracto urinario llevan a pérdida de orina. Un remedio para esta situación es ocluir las fistulas individuales u ocluir el uréter y desviar el flujo de orina usando un tubo de nefrostomía implantado. Una suspensión de microesferas, preparadas usando el actual procedimiento, puede introducirse en el tracto urinario usando un catéter. Las microesferas se hinchan por la exposición a fluidos fisiológicos formando una oclusión que bloquea completamente el flujo de orina a través de la fístula o el uréter. La oclusión pueden usarse además en el tratamiento de la pancreatitis (Cavouti et al. (1988) *Surgery* 103(3):361-366). La pancreatitis es una inflamación del páncreas, en que las enzimas pancreáticas digieren el tejido pancreático. La pancreatitis puede resultar de situaciones tales como consumo excesivo de alcohol o cálculos biliares, y a menudo lleva a dolor severo, náuseas y vómito. Un tratamiento de pancreatitis crónica severa es la oclusión del conducto pancreático. Una suspensión de microesferas, preparadas usando el actual procedimiento, pueden introducirse en el conducto pancreático usando un catéter, mientras el conducto pancreático se visualiza de forma endoscópica. Las microesferas se hinchan por la exposición a fluidos fisiológicos formando una oclusión que bloquea el conducto pancreático.

El control de natalidad puede lograrse por oclusión tanto en hombres como en mujeres (Chvapil et al. (1990) *Journal of Reproductive Medicine* 35(9):905-910; Davis et al. (1979) *Obstetrics & Gynecology* 1979; 53:527-529). La introducción de microesferas, preparadas en el actual procedimiento, en los conductos deferentes puede llevarse a cabo para crear una oclusión, bloqueando así el flujo del fluido seminal. La introducción de microesferas, preparadas

en el actual procedimiento, en la trompa de Falopio puede llevarse a cabo para crear una oclusión, bloqueando así la entrada de óvulos en el útero. En ambos casos las microesferas pueden introducirse usando catéteres.

Un ejemplo adicional de un tratamiento de oclusión es en el caso de ojos secos (Hamano (2005) Seminars in Ophthalmology 20(2):71-74). Los ojos secos resultan por la producción insuficiente de lágrima o pobre calidad de lágrima. Un remedio para los ojos secos es ocluir el punto, que es la abertura del conducto lagrimal en el margen del párpado. El conducto lagrimal desagua lágrimas del ojo, y la oclusión del punto bloquea el drenaje de lágrimas del ojo. Cuando el drenaje de lágrimas desde el ojo se bloquea, las lágrimas se mantienen en el ojo durante un periodo de tiempo más largo, y más lágrimas están presentes para lubricar el ojo. Las microesferas preparadas mediante el actual procedimiento pueden inyectarse directamente en el punto, donde se hinchan por la exposición a fluidos fisiológicos y forman una oclusión, proporcionando así un tratamiento para el ojo seco.

El aumento tisular es otro tratamiento médico que puede usarse en una variedad de situaciones, y que se beneficia de la administración de microesferas preparadas mediante el actual método. El aumento tisular puede usarse como un tratamiento para trastornos tales como debilidad de esfínteres, cicatrización dérmica, pérdida de tono dérmico, degeneración de las encías, y otras situaciones donde hay adelgazamiento o degeneración de tejidos. La rápida y alta capacidad de hinchado, capacidad de deformación, además de otras características de las actuales microesferas, las hacen un material eficaz para usar en el aumento tisular.

Las microesferas preparadas por el actual método pueden usarse como agente aumentador para tratar la enfermedad de reflujo gastro-esofágico (GERD). El GERD es el retorno de los contenidos ácidos del estómago al esófago. En la digestión normal, el esfínter esofágico inferior se abre para permitir pasar a la comida al estómago y se cierra para prevenir que la comida y los jugos estomacales ácidos fluyan de nuevo al esófago. El GERD ocurre cuando el esfínter esofágico inferior es débil o se relaja, permitiendo que los contenidos estomacales fluyan de vuelta al esófago. Un tratamiento de este trastorno es usar un agente aumentador para proporcionar soporte físico al esfínter esofágico inferior (Ozawa et al. (2005) Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery 11(3):146-153). En esta aplicación, las actuales microesferas que se suspenden en un vehículo biocompatible se inyectan directamente en el esfínter esofágico inferior. Las microesferas se hinchan por exposición a los fluidos fisiológicos proporcionando masa aumentada en el sitio de inyección, que a su vez proporciona a los músculos del esfínter de capacidad adicional para controlar el flujo de la comida digerida.

Las microesferas preparadas mediante el actual método pueden usarse además como un agente de aumento para tratar la incontinencia urinaria, particularmente, la incontinencia urinaria por estrés de las mujeres. La incontinencia urinaria por estrés es la pérdida de orina desde la vejiga provocada por presión que se da durante actividades tales como ejercicio, tos y estornudo. Una causa de este problema es la debilidad del esfínter uretral, un músculo en forma de anillo en la base de la vejiga que controla el flujo de orina. Un remedio para este trastorno es usar un agente de aumento para proporcionar soporte físico al esfínter uretral (Madjar et al. (2003) Journal of Urology 170 (6 Pt 1):2327-2329). En esta aplicación, las microesferas se suspenden en un vehículo biocompatible y se inyectan directamente en el esfínter urinario. Las microesferas se hinchan por exposición a fluidos fisiológicos proporcionando masa aumentada en el sitio de la inyección, que a su vez proporciona a los músculos del esfínter capacidad adicional para controlar el flujo de orina.

El aumento de masa de tejidos dérmicos, incluyendo fascia, tejidos subcutáneos y dérmicos, puede usarse para tratar trastornos dérmicos que incluyen cicatrices, laxitud dérmica y adelgazamiento dérmico, y puede usarse en algunos tipos de cirugías plásticas cosméticas y reconstructivas. Dichos trastornos de la piel a menudo se muestran como deficiencias de contorno, que pueden tratarse usando las actuales microesferas. Las deficiencias de contorno en la piel pueden darse como resultado de factores tales como envejecimiento, exposiciones medioambientales, pérdida de peso, nacimiento de niños, cirugía o enfermedad. Las deficiencias de contorno incluyen líneas de fruncimiento de ceño, líneas de preocupación, arrugas, patas de gallo, líneas de marioneta, estrías, y cicatrices internas y externas. El aumento de las capas de la piel puede reducir o eliminar las deficiencias de contorno. Las actuales microesferas, que se suspenden en un vehículo biocompatible, se inyectan en la capa dérmica deseada donde se hinchan por la exposición a fluidos fisiológicos. Las microesferas hinchadas aumentan entonces la capa dérmica para modificar el contorno de la piel.

Las situaciones médicas pueden dar por resultado el caso de huecos en posiciones o bien externos a los órganos o internos en los órganos, o puede haber huecos naturales que necesiten tratamiento debido a un proceso médico. La rápida y alta capacidad de hinchado, además de la capacidad de deformación y otras características de las microesferas preparadas por el actual método las hacen deseables como un material a usar en tratamientos de relleno de huecos. En la enfermedad diverticular intestinal, unas formas de divertículo intestinal, que es una pequeña invaginación en un área debilitada de la pared del intestino. Cuando está presente, un divertículo intestinal puede inflamarse como resultado de atrapamiento fecal en la bolsa, y puede además tener hemorragia. Un tratamiento para esta situación es rellenar la invaginación eliminando así el atrapamiento de material y reduciendo el riesgo de hemorragia. Las actuales microesferas pueden introducirse como una suspensión en el divertículo intestinal. El hinchado de las microesferas por contacto con fluidos fisiológicos da por resultado el relleno del divertículo.

Los huecos externos a los órganos pueden formarse después de la escisión quirúrgica del tejido blando u órganos tal como en el caso de resecciones parciales de pulmón, histerectomías, mastectomías o escisiones del intestino.

Los espacios vacíos que se crean por eliminación de estos órganos se llenan con fluidos y restos, creando compromiso mecánico y elevando el riesgo de infección. Un tratamiento para esta situación es usar un agente aumentador mecánico para llenar el espacio externo al órgano (Giudicelli et al. (1979) *Annales de Chirurgie* 33(3):151-154). En esta aplicación, las microesferas se suspenden en un vehículo biocompatible, después se inyectan en el espacio externo al órgano (incluyendo la pleura, pericardio o peritoneo) usando una aguja o catéter. Las microesferas se hinchan con la exposición a los fluidos fisiológicos y llenan el espacio externo al órgano.

Las actuales microesferas pueden además usarse para llenar espacios internos de los órganos para mejorar el funcionamiento mecánico de órganos, particularmente el corazón y el pulmón. En el fallo cardíaco, las cámaras cardíacas pueden agrandarse para compensar el estrés. La dilatación de las cámaras cardíacas afecta de forma adversa la función de bombeo del corazón, dando por resultado en fallo cardíaco adicional. Además, la cámara cardíaca agrandada crea un saco en que en que la sangre estacionaria puede formar un coágulo, que puede viajar al cerebro y da por resultado un ictus. El mismo procedimiento se da en el pulmón; un pulmón dañado puede formar sacos bullosos en una enfermedad conocida como enfisema buloso. Dichos sacos bullosos son áreas aisladas por la infección y pueden comprimir mecánicamente un pulmón sano. Un remedio para estas situaciones es usar un agente aumentador mecánico para rellenar el espacio interno del órgano (cámara cardíaca en el corazón, o saco buloso en el pulmón). En esta aplicación, las microesferas se suspenden en un vehículo biocompatible y se inyectan en el espacio interno del órgano usando una aguja o catéter. Las microesferas se hinchan con la exposición a fluidos fisiológicos y rellenan el espacio interno del órgano.

Además, los huecos pueden crearse mediante procedimiento quirúrgicos tales como una biopsia, eliminación de un tumor, extracción dental o eliminación de tejido infectado o dañado. En cualquiera de estos casos el hueco puede rellenarse mediante administración de las actuales microesferas. Rellenar dichos huecos puede reducir la incidencia de infección y minimizar la apariencia anormal de tejido externo.

Las microesferas, hechas usando el actual procedimiento, pueden usarse en el tratamiento de heridas, tanto quirúrgicas (que incluyen incisiones quirúrgicas) o accidentales (que incluyen, por ejemplo, cortes, rasguños, abrasiones, daños y llagas), para proporcionar tratamientos tales como absorción de fluidos, proporcionar relleno y/o repartir medicamentos. Para estas aplicaciones las microesferas pueden contenerse en una cubierta estéril que es permeable a los fluidos y/o medicaciones, tal como una gasa de algodón o sintética. Esta microesfera que contiene el elemento se denomina un sobre. Las microesferas usadas de esta manera pueden estar secas (un polvo; no en una suspensión), y la rápida y alta capacidad de propiedades de hinchado se usan para la absorción de fluido. Una cantidad contenida de microesferas puede aplicarse a una herida o en una incisión quirúrgica para este propósito. Por ejemplo, un tipo de sobre que contiene las actuales microesferas puede insertarse en una incisión quirúrgica para absorber los fluidos corporales liberados. Una cubierta de herida externa, que incluye una venda, escayola u otra cubierta, puede usarse para soportar las microesferas secas para la aplicación sobre una herida para absorber los fluidos corporales liberados. La cubierta de la herida incluye un material de soporte en contacto con las microesferas que puede contener las microesferas, tal como un material poroso o de malla. De forma alternativa, las microesferas pueden estar unidas al material de soporte.

Adicionalmente, las microesferas pueden comprender una medicación, que incluye un fármaco o agente terapéutico, que se libera a lo largo del tiempo mientras las microesferas entran en contacto con los fluidos corporales. Fármacos y agentes terapéuticos adecuados se conocen bien en la técnica. Una lista extensa se da en Kabonov et al. en la Patente de EE.UU. núm. 6.696.089, en particular en las columnas 16 a 18. Los ejemplos incluyen, aunque no están limitados a, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicas, agentes anti-cancerígenos, vacunas, radiomarcadores, antiinflamatorios, agentes anti-glaucomicos, agentes anti-histamínicos, factores anti-angiogénicos, anestésicos locales, agentes anestésicos generales, agentes anti-neoplásicos, anticuerpos, vitaminas, péptidos y análogos de péptidos, enzimas, agentes anti-alérgicos, fármacos circulatorios, agentes anti-tuberculares, agentes anti-anginales, agentes anti-protozoanos, agentes anti-reumáticos, narcóticos, agentes glicósido cardíacos, sedantes, hormonas y esteroides, y similares. La medicación puede cargarse en las microesferas usando los métodos descritos anteriormente.

Las microesferas que contienen un fármaco o agente terapéutico pueden incorporarse en un sobre o cubierta externa tal como un vendaje o escayola, y aplicarse a heridas, quirúrgicas o accidentales, internas o externas, como se describe anteriormente para microesferas no impregnadas. Un vendaje que contiene las microesferas que contienen un agente terapéutico puede aplicarse a un tejido externo que está dañado gravemente tal como por una laceración o quemadura, para detener rápidamente la pérdida de sangre y repartir unas altas concentraciones de agente terapéutico directamente al sitio del daño. Por ejemplo, un vendaje que contiene microesferas cargadas con un factor de crecimiento, puede promover el curado y crecimiento de nuevo tejido (Ulubayram et al. (2001) *Biomaterials* 22(11):1345-1256). Este tipo de vendaje puede contener microesferas tanto impregnadas como secas para el reparto de medicación y absorción. Otros tipos de cubiertas de heridas pueden incorporar microesferas para usar de esta manera.

Los agentes terapéuticos impregnados en las microesferas puede repartirse además usando un parche transdérmico que contiene las microesferas. En muchos estados de enfermedad, que incluyen infecciones, cáncer e inflamación, es deseable alcanzar una alta concentración de agente terapéutico directamente al sitio enfermo, con liberación controlada del agente terapéutico en el tejido circundante. El reparto de fármaco dirigido con liberación controlada

puede alcanzarse usando un parche transdérmico que incorpora las actuales microesferas que contienen el(los) agente(s) terapéutico(s) apropiado(s).

- 5 De forma alternativa, para alcanzar el sitio diana para el reparto de fármaco, las microesferas que contienen el fármaco o agente terapéutico apropiado pueden repartirse al sitio usando una aguja o catéter (Misirli et al. (2005) Journal of Microencapsulation 22(2):167-178). Las microesferas que contienen un fármaco o agente terapéutico pueden usarse además en la oclusión, relleno de huecos, aumento de tejido y otros tratamientos médicos.

Equipos

- 10 Se proporciona adicionalmente un equipo que incluye microesferas hinchables/deformables preparadas según el procedimiento descrito en este documento, que puede ser en una lechada, un polvo o una suspensión. La cantidad de microesferas en el equipo puede variar dependiendo de la aplicación pretendida específica. Por ejemplo, como se describe anteriormente, una oclusión puede estar formada por diferentes cantidades de las actuales microesferas tal como 15 mg, 18 mg o 20 mg. La cantidad de microesferas dependerá de factores tales como el diámetro del sitio a ocluir y la presión que la oclusión debe resistir. Particularmente útil es un equipo que contiene microesferas hinchables/deformables, preparado según el procedimiento descrito en este documento, en una suspensión y
- 15 opcionalmente una jeringa y/o un catéter para usar en la administración de las microesferas. El equipo puede incluir también un vehículo biocompatible. Típicamente incluido en un equipo son las instrucciones para el uso de los componentes.

Ejemplos

La presente invención es define adicionalmente en los siguiente Ejemplos.

- 20 El significado de las abreviaturas usadas es como sigue: "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "seg" significa segundo(s), "µL" significa microlitro(s), "mL" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "nm" significa nanómetro(s), "mm" significa milímetro(s), "cm" significa centímetro(s), "cm³" significa centímetros cúbicos, "µm" significa micrómetro(s) o micra(s), "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "g" significa gramo(s), "mol" significa mol(es), "rpm" significa revoluciones por minuto, "% en peso" significa porcentaje en peso, "cP" significa centipoise, "kGy" es
- 25 kiloGray(s), "F" significa French, "G" significa gauge. En la designación d₄²⁰, d es densidad, el 4 es la temperatura del patrón usado para comparar las densidades, típicamente agua a 4°C, y el 20 es la temperatura a la que se mide la densidad del material objeto.

Materiales generales y métodos

- 30 Los compuestos químicos y otros ingredientes se compraron en Aldrich (Milwaukee, WI) y se usaron como se recibieron a menos que se especifique otra cosa. Los disolventes se compraron en EMD Chemical (Darmstadt, Alemania) o Aldrich, como se especifica posteriormente. El iniciador de polimerización VA-044 se usó como se recibió de Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Richmond, VA). Todos los medios de cultivo celular se compraron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Método de medida de hinchado de microesferas

- 35 La relación de hinchado se determinó según un método descrito en la siguiente referencia: Figuly, Garret D., et al. Macromolecules 1997, 30, 6174-6184. En un embudo de filtro poroso grueso, pre-secado, tarado, de 150 mL, se añadió aproximadamente 1 g de microesferas. El tallo del embudo se selló con un tapón de caucho. El embudo se colocó en un matraz de filtrado, y aproximadamente 150 mL de agua destilada a temperatura ambiente se añadieron al embudo y sus contenidos. Los contenidos se agitaron, si fuera necesario, para dispersar totalmente el agua y las
- 40 microesferas. Los contenidos se dejaron sin molestar durante 15 min. El tapón se quitó entonces del tallo del embudo, y se aplicó succión durante 5 min. El tallo y el lado inferior del embudo se enjuagaron entonces con etanol para eliminar cualquier gota de agua restante, y la succión se continuó entonces durante unos 5 min adicionales. Cualquier gota de agua restante se secó del embudo. El embudo y los contenidos se pesaron entonces para determinar el peso de agua retenida por las microesferas. El hinchado se calculó como sigue:

- 45
$$\text{Hinchado} = \frac{[(\text{masa total de microesferas húmedas} + \text{embudo}) - (\text{masa total de microesferas secas} + \text{embudo})] / \text{masa de microesferas secas}}{[\text{masa húmeda de microesferas} - \text{masa seca de microesferas}] / \text{masa seca de microesferas}} = \frac{\text{masa de agua retenida (g)}}{\text{masa de microesferas secas (g)}}$$

Ejemplo 1

Preparación de microesferas hinchables usando ácido acrílico y propiedades de la microesfera

- 50 En un matraz de tres cuellos de 5 L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 36,0 g de etilcelulosa, 1200 mL de cloroformo y 570 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 100 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa; entonces el agitador se aumentó en velocidad a 180 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 1,50 g de metilcelulosa, 3,00 g de N,N'-metilbisacrilamida (2,3% en moles de

monómero), 26,01 g de Triton™ X-405 (polioxietileno (40) isooctilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 149,4 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 58,5 g de ácido acrílico y 81 g de disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa B.

- 5 En este punto, mientras se agita rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,15 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la “primera disolución”) se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la “segunda disolución”). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la “primera suspensión”) a 180 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La primera suspensión se calentó
10 entonces a 51°C y se agitó a 180 rpm durante unas 10 h adicionales a esa temperatura para permitir la formación esencial de microesferas (la “segunda suspensión”). La segunda suspensión se agitó entonces a 180 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 1200 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con unos 250 mL adicionales de metanol. Se filtraron de nuevo y finalmente se lavaron con 250 mL de etanol. Se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno dejado a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento final de microesferas secas fue de 73,4 g.

- Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilaban generalmente de 25 micras a 250 micras como se mide a partir de las fotos adquiridas por medio de microscopía de barrido electrónico. El hinchado de
20 microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 89 g de agua/g de microesferas.

- Las microesferas se colocaron en un portaobjetos de cristal que se colocó después bajo una lente de microscopio. Una gota de agua se colocó en el portaobjetos. El movimiento del frente de agua a través del portaobjetos se observó por medio de una cámara digital de exposición múltiple de alta velocidad, tomando fotografías a 2
25 fotogramas por segundo. Las imágenes se grabaron, además del tiempo que se tomó el frente de agua para moverse a través del portaobjetos. Las microesferas alcanzaron casi el máximo tamaño en 4 seg. Después de 14 seg solo se observó un ligero aumento en el tamaño de las microesferas. Las imágenes de las microesferas se muestran en la Figura 1, sin agua añadida en A), 4 seg después del contacto del agua en B), y 14 seg después de contactar el agua en C). Así las microesferas mostraron hinchado muy rápido, en cuestión de segundos.

- 30 Se observaron las microesferas hinchadas bajo un microscopio óptico. Se observó que las microesferas en contacto cercano las unas con las otras no permanecían esféricas, sin embargo mostraron deformación de las superficies limítrofes aumentando así el área de contacto entre microesferas adyacentes. La extensión de los contactos entre las microesferas hinchadas y deformadas casi eliminaron los espacios abiertos entre microesferas, como se ve en la Figura 2A.

- 35 Las medidas de esfericidad de las microesferas se hicieron en una escala de masa usando el sistema de análisis de partículas Beckman-Coulter™ Rapid-VUE® (Hialeah, FL), usando un valor umbral adaptativo de 56%. Una muestra de 20 mg de microesferas se suspendió en 75 mL de agua (microesferas hinchadas), se suspendieron 50 mg de muestra de microesferas en 75 mL de DMSO (microesferas no hinchadas), y ambas muestras se ensayaron en el analizador de partículas. Los resultados mostraron que las microesferas tanto hinchadas como no hinchadas fueron
40 casi esféricas con una esfericidad medida centrada cerca del 95%, indicando un alto grado de esfericidad para las microesferas preparadas mediante el procedimiento descrito en este Ejemplo. Un dibujo de microesferas no hinchadas se muestra en la Figura 2B.

Ejemplo 2

Control de absorción de agua de microesferas hinchables por medio de densidad de reticulado.

- 45 Todas las muestras para este estudio se prepararon de la siguiente manera, donde el único ingrediente que se varió fue la cantidad del agente de reticulado N,N'-metilenbisacrilamida. Los valores para este ingrediente se muestran en la Tabla 1 como cantidad en gramos de agente de reticulado y % en moles de agente de reticulado con respecto a la suma de los moles de monómero + agente de reticulado en la mezcla de reacción.

- 50 En un matraz de tres cuellos de 1 L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 12,0 g de etilcelulosa, 400 mL de cloroformo y 190 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 150 rpm hasta que la etilcelulosa se disolvió; entonces el agitador se aumentó en velocidad a 250 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz se preparó una disolución de 0,50 g de metilcelulosa, cantidades variables (véase la Tabla 1 posterior) de N,N'-metilenbisacrilamida, 8,67 g de disolución al 70% de Triton™ X-405, y 49,8 g de agua (disolución B). En un tercer
55 matraz separado se mezclaron 19,5 g de ácido acrílico y 25 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de 5,3) (disolución C). La disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa B.

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadieron 0,05 g de azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción, que formó una suspensión, se dejó agitar a 250 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente (la "primera suspensión"). La primera suspensión se calentó entonces a 51°C y se agitó a 250 rpm durante una 8,5 h adicionales a esa temperatura para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 250 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 800 mL de etanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión, para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con metanol adicional. Se filtraron de nuevo y finalmente se lavaron con etanol. Se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento de microesferas para cada muestra se da en la Tabla 1.

El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Los resultados de absorción de agua por cada muestra de microesferas que tienen una diferente cantidad de agente de reticulador, calculado además como porcentaje en moles de reticulador, se muestran en la Tabla 1 y se muestra un gráfico de estos datos en la Figura 3.

Tabla 1. Efectos del reticulador en el rendimiento e hinchado de microesferas

Muestra	Reticulador (g)	% en moles de reticulador	Hinchado (g H ₂ O/g de microesferas)	Rendimiento (g)
1	1,00	2,3	107,4	23,9
2	1,25	2,9	72,2	24,0
3	1,50	3,5	55,8	24,8
4	1,75	4,0	50,7	24,8
5	2,00	4,6	42,7	24,9
6	2,50	5,6	32,3	29,8
7	5,00	10,7	11,5	29,4
8	7,50	15,2	4,8	32,8
9	15,0	26,5	1,5	37,1

Como puede observarse a partir de la Tabla 1 y el gráfico en la Figura 3, cuando el contenido de reticulador aumentó, el hinchado disminuyó. Este resultado indica que el comportamiento de hinchado de las microesferas puede hacerse a medida ajustando la relación molar de agente de reticulador al monómero en la mezcla de ingredientes del preparado de microesferas.

Ejemplo 3

Control de absorción de agua de microesferas hinchables por medio de pH inicial de monómero de ácido acrílico.

Todas las muestras para este estudio se prepararon de la siguiente manera, donde el único ingrediente que se varió fue la cantidad de disolución de hidróxido sódico añadido para ajustar el pH del monómero de ácido acrílico. Los valores de este ingrediente se presentan en la Tabla 2.

En un matraz de tres cuellos de 1 L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 12,0 g de etilcelulosa, 400 mL de cloroformo y 190 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 150 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa; entonces el agitador se aumentó en velocidad a 250 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,50 g de metilcelulosa, 1,00 g de N,N'-metilbisacrilamida (2,3% en moles), 8,67 g de Triton™ X-405 (disolución al 70%) y 49,8 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 19,5 g de ácido acrílico y cantidades variables (véase Tabla 2) de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (disolución C). El volumen total de disolución C se hizo constante para cada muestra mediante la adición de agua. El pH de cada muestra de disolución C de ácido acrílico se midió (Tabla 2). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa B.

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,05 g de azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. La disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción se dejó agitar a 250 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando la "primera suspensión". La primera suspensión se

5 calentó entonces a 51°C, y se agitó a 250 rpm durante unas 8,5 h adicionales a esa temperatura para permitir la formación esencial de microesferas (la “segunda suspensión”). La segunda suspensión se agitó entonces a 250 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 800 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con metanol adicional. Se filtraron de nuevo y finalmente se lavaron con etanol. Se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento de microesferas para cada muestra se da en la Tabla 2.

10 El hinchado de microesferas preparado en cada muestra se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Los resultados de absorción de agua para cada muestra de microesferas que tienen un pH diferente de la disolución C se muestran en la Tabla 2 y se dibujaron en gráfico en la Figura 4.

Tabla 2. Efectos del pH en el rendimiento e hinchado de las microesferas

Muestra	NaOH al 25% en agua (g)	pH	Hinchado (g H ₂ O/g de microesferas)	Rendimiento (g)
1	0	1,85	0,7	20,1
2	1,8	2,80	6,1	19,8
3	5,1	3,45	131,3	19,2
4	15	4,35	88,5	21,4
5	30	5,31	107,4	23,9
6	41	6,41	84	25,9
7	42,69	7,28	83,5	25,8
8	42,8	8,35	126,5	15,7
9	42,84	9,82	130,3	18,2
10	42,86	10,13	115,4	18,2

15 Como puede observarse a partir de los datos en la Tabla 2 y la Figura 4, el ácido acrílico no neutralizado, que produce un polímero altamente ácido (bajo pH), produce microesferas con baja capacidad de hinchado. Sin embargo, una vez que el monómero se neutraliza a un pH de aproximadamente 3,4, el polímero resultante se vuelve muy hidrófilo, y se producen altos hinchados. Aumentando más el pH (neutralización del ácido acrílico) no se aumenta la capacidad de hinchado última de las microesferas.

Ejemplo 4

Separación de microesferas según el tamaño.

20 Un total de 15 cargas de microesferas (1079 g) preparadas según el Ejemplo 1, se combinaron y se molieron con rodillo durante 3 h para asegurar la buena mezcla. Las microesferas se pasaron entonces a través de tamices como sigue.

25 Tamices de ocho pulgadas (20,32 cm) de diámetro de tamaños deseados se apilaron desde la abertura más pequeña al fondo (encajada en un recipiente) a la abertura más grande en la parte superior. Los tamaños de tamiz usados para separar las microesferas fueron:

Micras	500	250	180	125	75	38	Recipiente
Malla	35	60	80	120	200	400	--

30 La muestra entera se tamizó (eliminando la necesidad de dividir la muestra para obtener una muestra representativa). Para esta gran muestra, una parte pequeña se tamizó después de otra pequeña parte. Se usaron alícuotas que cubrían un tamiz a una profundidad de aproximadamente 32 mm a 48 mm. Se puso una cobertura en el tamiz superior y la pila de tamices se colocó en un Agitador de Tamices de 3 pulgadas (7,62 cm) Vibratorio Gilson SS-5. Cada muestra se hizo marchar durante 10 min tanto con la vibración como la llave activados.

Los pesos de siete contenedores se grabaron y cada uno se designó para una fracción de tamiz específica. Cada tamiz (o recipiente) se descargó entonces en su contenedor designado. Un arma Sigma-Aldrich Zerostat3 se usó como necesario para neutralizar la carga estática portada por las microesferas y facilitar el vaciado de cada tamiz. Los tamices se volvieron a apilar y el procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario para procesar la

muestra entera. Después de tamizarse la parte final, un cepillo se frotó a través del fondo de tamiz vaciándose para mover las partículas de tamaño aproximado medidas a presión en las aberturas del tamiz. El peso neto de cada contenedor se determinó entonces y se dio en la Tabla 3. Estos resultados muestran que la predominancia de microesferas osciló en tamaño entre 38 y 500 micras, siendo el tamaño de 125 a 500 micras el más predominante.

5

Tabla 3. Distribución de tamaño de microesferas mediante tamizado.

Tamaño de tamiz	Microesferas que pasan a través del tamiz (g)
<38 micras	1
38-75 micras	13
75-125 micras	74
125-180 micras	138
180-250 micras	443
250-500 micras	377
>500 micras	1

10

El tamaño de partícula para la muestra recuperada a partir de cada tamiz específico se determinó como sigue. Un Beckman Coulter Multisizer 3 se relleno con una mezcla filtrada 2:1 en volumen de metanol:glicerol en que se había disuelto cloruro de litio al 3% (en peso). Se eligió un tubo de apertura que era adecuado para la fracción de tamiz a medir. Un tubo de apertura puede detectar partículas con diámetros que caen en un intervalo de 2 a 60% del diámetro de apertura, y la partícula más grande dicta el tamaño de apertura. Un tubo de apertura de 2000 micras se usó para las microesferas no cribadas y para la fracción de >500. Un tubo de apertura de 200 micras se usó para la fracción de 38-75 micras y para la fracción de <38 micras. Para las fracciones intermedias se usó un tubo de apertura de 1000 micras. Un vaso de precipitados de fondo redondo se relleno con aproximadamente 400 mL de electrolito de metanol/glicerol/cloruro de litio y se colocó en la plataforma de muestreo con el tubo de apertura sumergido en el electrolito.

15

20

Se usó una espátula para agitar y extraer de cada muestra de tamiz una alícuota de las microesferas a medir que se añadió a una cubeta de 20 mL que contenía metanol. La muestra se colocó en un baño ultrasónico durante diez segundos. Un cuentagotas medicinal se usó entonces para transferir una parte de esta lechada a un vaso de precipitados asentado en la plataforma de muestreo. Durante la extracción las partículas permanecieron en movimiento de manera que podía obtenerse una alícuota representativa. Esto se aseguró usando el cuentagotas medicinal como un agitador, mientras que al mismo tiempo entra y se expulsa continuamente la lechada. Tanto si el contenido total del cuentagotas medicinal se usó, o si solo se usó una parte, el cuentagotas se movió rápidamente de la cubeta al vaso de precipitados y la parte a usar se lanzó en chorro en el vaso de precipitados (esto evita la segregación de tamaño provocada por quedarse en el cuentagotas). Esta etapa de transferencia se repitió tanto como fue necesario para llevar al indicador de coincidencia del Multisizer a aproximadamente 5%. El agitador se activó entonces y se puso a una velocidad tan grande como era posible sin el riesgo de sacar burbujas de aire en el líquido. Una marcha controlada manualmente se comenzó entonces, y se paró después de 60 a 75 seg. Los datos del Multisizer se muestran en las Figuras 5A y 5B. Como se ve en la Figura 5A, el pico en el tamaño de microesferas para cada muestra de tamiz es diferente de una a otra muestra, con superposición en tamaño en los límites. Un gráfico del análisis de tamaños de las microesferas acumulativas se muestra en la Figura 5B, y el análisis de distribución de tamaños resultante se da en la Tabla 4. Típicamente, el pico para cada muestra mostrada en la Figura 5A está en la categoría del 50%.

25

30

Tabla 4. Tamaños acumulativos de microesferas en muestras de microesferas tamizadas

TAMAÑO DE PARTÍCULA EN MICRAS A PORCENTAJE ACUMULATIVO EN VOLUMEN PARA 7 MICROESFERAS MEDIANTE UN BECKMAN COULTER MULTISIZER 3					
Muestra; tamaño de tamiz	10%	25%	50%	75%	90%
A; <38 micras	29,97	33,97	37,24	39,94	44,18
B; 38-75 micras	14,06	56,33	66,08	73,65	78,30
C; 75-125 micras	77,88	89,06	101,50	112,00	120,50
D; 125-180 micras	116,90	127,80	140,30	153,10	163,00
E; 180-250 micras	149,90	168,20	189,70	210,20	227,80
F; 250-500 micras	182,10	224,10	258,10	294,90	330,10

TAMAÑO DE PARTÍCULA EN MICRAS A PORCENTAJE ACUMULATIVO EN VOLUMEN PARA 7 MICROESFERAS MEDIANTE UN BECKMAN COULTER MULTISIZER 3					
Muestra; tamaño de tamiz	10%	25%	50%	75%	90%
G; >500 micras	438,30	497,20	576,20	659,00	729,90

Así las microesferas pueden separarse en muestras de tamaño específico, conteniendo cada una un tamaño predominante de microesfera, con alguna variación de tamaño. La variación de tamaño está dentro de +/- 30% de la media para el 90% de las microesferas en la muestra para todas menos la muestra B. La mayoría de las muestras tienen variación de +/- 20%, y una tiene una variación de +/- 16%.

- 5 La capacidad de hinchado se midió para cada una de las muestras B a F usando el procedimiento descrito en los Métodos Generales. Cada muestra tenía un hinchado máximo que fue mayor que 70 gramos de agua por gramo de microesferas, como se muestra en la Tabla 5. Las muestras con tamaños mayores de microesferas, E y F, tenían un pequeño aumento en las capacidades de hinchado por encima de las de las muestras de microesferas más pequeñas, aunque el total del tamaño de las microesferas no afectó mucho a la capacidad de hinchado.

10 Tabla 5. Absorción de agua en muestras de microesferas tamizadas

Muestra	B	C	D	E	F
Hinchado (g H ₂ O/g de microesferas)	77,1	80,7	80,0	88,6	90,0

Ejemplo 5 (Comparativa)

Ejemplo comparativo para la preparación de microesferas de hidrogel.

- 15 Este ejemplo compara las propiedades de microesferas de hidrogel preparadas usando el procedimiento descrito en el actual Ejemplo 1 con aquellas de la microesferas de hidrogel preparadas por comparación usando el método del Ejemplo 2 de la Patente de EE.UU. núm. 6.218.440.

- 20 Siguiendo el método del Ejemplo 2 de la Patente de EE.UU. núm. 6.218.440, en un matraz de fondo redondo de 1 L equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 12,0 g de etilcelulosa y 590 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 250 rpm hasta que la etilcelulosa se disolvió; y el agitador se mantuvo entonces a esa velocidad para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,50 g de metilcelulosa, 1,00 g de N,N'-metilenbisacrilamida, 8,67 g de Triton™ X-405 (disolución al 70%) y 49,8 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se

- 25 mezclaron 19,5 g de ácido acrílico y 19,5 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa B. En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se prepararon tres disoluciones separadas como sigue: (a) 2,00 g de persulfato de amonio en 3,0 g de agua (disolución D); (b) 1,2 g de hidrosulfuro sódico en 0,2 g de agua (disolución E); y (c) 1,2 g de cloruro de hierro III en 0,2 g de agua (disolución F).

- 30 Mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadió la disolución D y se agitó durante 5 min. La disolución combinada de B, C y D se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A. Después de esta adición, las disoluciones catalíticas restantes E y F se añadieron, y la mezcla de reacción se dejó agitar durante unas 20 h adicionales a temperatura ambiente. Después de este tiempo se añadieron aproximadamente 350 mL de metanol a la mezcla de reacción, y las microesferas se dejaron agitar durante una hora adicional. Las microesferas resultantes se filtraron entonces y unos 400 mL adicionales de metanol se usaron entonces para lavar las microesferas. De nuevo, las microesferas se filtraron y lavaron con 700 mL de etanol. Se filtraron después de nuevo y se colocaron en un horno al vacío puesto a 50°C con una purga de nitrógeno. Después
- 35 de secar, se recuperaron 34,5 g de un producto tostado rosado en forma de microesferas.

Ejemplo 6

Propiedades de las microesferas – Estudios comparativos

- 40 Los estudios comparativos se llevaron a cabo con las microesferas producidas como se describe en el actual Ejemplo 5 y una muestra de microesferas preparadas según el actual Ejemplo 1. Las microesferas del procedimiento del Ejemplo 5 eran rosas a tostado, mientras que las microesferas del procedimiento del Ejemplo 1 eran blancas, como se determinó por inspección visual (Tabla 7).

Usando el ensayo para el hinchado en los Métodos Generales, las microesferas preparadas mediante el procedimiento del Ejemplo 5 absorbieron 46 g de agua por g de microesferas, mientras que las microesferas del procedimiento del Ejemplo 1 absorbieron 98 g de agua por g de microesferas.

Los intervalos de diámetro de las microesferas en las muestras se obtuvieron por medio de inspección visual de las micrografías de barrido electrónico puestas a baja ampliación para observar una alta población de microesferas. Las microesferas más pequeñas y más grandes vistas en cada población de microesferas se midieron y se usaron como los intervalos superior e inferior para el diámetro, como se da en la Tabla 7. Las microesferas del Ejemplo 5 tenían diámetros que oscilaban entre 100 y 475 micras, mientras que las microesferas del procedimiento del Ejemplo 1 tenían diámetros entre 25 y 250 micras. Nótese que en este actual Ejemplo 6, una pequeña muestra de las microesferas del procedimiento del actual Ejemplo 1 se ensayó, en comparación con la muestra analizada en el actual Ejemplo 4, llevando a un intervalo menor en tamaños que los mostrados en la Tabla 4.

La densidad de masa se midió rellenando un cilindro graduado tarado de 50 cm³ con microesferas a la marca de 50 cm³, presionándolas para asegurar la máxima densidad de empaquetado y pesando el cilindro graduado relleno. La densidad de masa se determinó entonces obteniendo el peso de las microesferas por diferencia y dividiendo ese peso por 50 para obtener un valor de densidad medido como g/cm³. Las microesferas del procedimiento del Ejemplo 1 tenían una densidad mucho mayor que las microesferas del procedimiento del Ejemplo 5 (Tabla 7).

La fractura de microesferas se ensayó como sigue. Una muestra de 60 mg de microesferas, preparadas como en el Ejemplo 1 o como en el Ejemplo 5, se añadieron a 10 mL de o bien agua desionizada a pH = 2,1 para evitar el hinchado o a pH = 7,0 para permitir el hinchado. Incluido en el agua estaban 30 mg de naranja de acridina, un tinte catiónico usado para teñir las microesferas. Cada muestra de microesferas se filtró usando una bolsa de muestras particulada de micromalla, y se suspendió en 10 mL de disolución con el mismo pH que la disolución de partida. Cada muestra se mezcló haciendo vórtice, y se inyectaron 2 mL a través de una aguja de calibre 20 o 21. Las muestras inyectadas se recogieron, y la distribución de tamaño de las partículas resultantes se analizó usando un sistema de análisis de partículas Beckman-CoulterTM RapidVUE[®] descrito en el Ejemplo 2. El experimento de inyección se repitió 3 veces para cada muestra. Como se muestra en la Tabla 6, ambos tipos de microesferas no hinchadas (en disolución ácida) pasaron a través de agujas de calibre 20 y calibre 21 sin fractura, ya que los diámetros de muestra promedio permanecieron constantes en la variabilidad del ensayo. Sin embargo, el diámetro promedio de las microesferas tipo Ejemplo 5 hinchadas (en disolución neutra) se redujo enormemente después de pasar a través de las agujas de calibre 21 (en aproximadamente un tercio) y calibre 20 (en casi la mitad). En contraste, el diámetro promedio de las microesferas tipo Ejemplo 1 hinchadas (en disolución neutra) se redujeron solo ligeramente después de pasar a través de agujas de calibre 21 y calibre 20. Las muestras de las microesferas tipo Ejemplo 5 después del paso a través de la aguja de calibre 21 se vieron por microscopía óptica. Los fragmentos de microesferas fueron predominantes.

Tabla 6. Diámetros promedio de muestras de microesferas después de las inyecciones.

Microesferas preparadas como en el Ejemplo 1						
Disolución de reparto	Ácida			Neutra		
Tamaño de aguja	Ninguno	20 G	21 G	ninguno	20 G	21 G
Diámetro promedio de la marcha	257	240	235	618	569	545
Diámetro promedio de la marcha	251	236	223	627	582	549
Diámetro promedio de la marcha	239	225	212	628	586	562
Diámetro promedio total	249	234	224	624	579	552
Desviación estándar	10	8	11	5	9	9
Microesferas preparadas como en el Ejemplo 5						
Disolución de reparto	Ácida			Neutra		
Tamaño de aguja	Ninguno	20 G	21 G	Ninguno	20 G	21 G
Diámetro promedio de la marcha	252	258	298	623	367	403
Diámetro promedio de la marcha	238	252	269	632	371	422
Diámetro promedio de la marcha	226	252	256	644	384	425
Diámetro promedio total	239	254	274	633	374	417
Desviación estándar	13	4	22	11	9	12

La densidad de las microesferas se midió mediante la siguiente técnica de gradiente de densidad. Un gradiente de densidad continuo se estableció en una columna vertical. El gradiente se estableció mezclando parcialmente la columna con capas de disolvente que tienen diferentes densidades. En este caso heptano (d₄²⁰ = 0,684) y tetracloruro de carbono (d₂₅²⁵ = 1,589) se mezclaron usando diferentes relaciones para obtener mezclas de baja y

alta densidad. Entonces estas mezclas se mezclaron un vez más a través de sistema de purga de nitrógeno para producir una mezcla de densidad.

Una mezcla de microesferas se introdujo en el gradiente, y las microesferas alcanzaron un punto de equilibrio después de 24 h, donde la densidad del líquido igualó la densidad de las microesferas. Los tubos de gradientes se controlaron por temperatura a 25°C. Flotadores calibrados de densidades conocidas se usaron para calibrar el tubo de gradiente en términos de posición frente a densidad. La densidad de las microesferas se determinó usando un ocular de aumento calibrado enfocable, para identificar la diferencia medible entre el flotador calibrado y las microesferas de muestra, que permite una conversión directa a un valor de densidad de microesferas como se da en la Tabla 7. Una parte de las microesferas del Ejemplo 5 flotaron en lo alto del gradiente indicando una densidad de menos que 0,8 g/cm³, que no era medible en el sistema usado.

Las secciones transversales de las muestras de microesferas se obtuvieron a través de técnicas de corte y microtomización estándar. Las secciones transversales de las microesferas se examinaron usando técnicas de microscopía de barrido electrónico estándar. Como se ven en las micrografías de la Figura 6, las microesferas del procedimiento del Ejemplo 5 eran extremadamente porosas (Figura 6A) mientras que las microesferas del procedimiento de los Ejemplos 1 contenían huecos de celdas cerradas en números relativamente bajos (Figura 6B). Esta característica visual de extensión de porosidad es consistente con las características de densidad y fractura de las dos muestras de microesferas diferentes.

Tabla 7: Propiedades comparativas de las microesferas del procedimiento del Ejemplo 5 y el procedimiento del Ejemplo 1.

Propiedad	Microesferas del procedimiento del Ejemplo 5	Microesferas del procedimiento del Ejemplo 1
Color	Rosa a tostado	Blanco
Capacidad de hinchado	46 g de agua/g de microesferas	98 g de agua/g de microesferas
Intervalo de diámetro	100-475 micras	25-250 micras
Densidad de masa (seca)	0,182 g/cm ³	0,680 g/cm ³
Densidad de las microesferas	0,80 g/cm ³ o menos	1,54 g/cm ³
Durabilidad de microesferas hinchadas	Fractura en el movimiento a través de una aguja de calibre 20	No fractura en el movimiento a través de una aguja de calibre 20

Puede observarse claramente a partir de este ejemplo comparativo que el actual método preparativo para microesferas de hidrogel descritas en el Ejemplo 1 produce microesferas más compactas, más densas, más esféricas, que pueden hincharse hasta 2 veces mejor que las microesferas producidas usando el método del Ejemplo comparativo 5.

Además, las microesferas preparadas mediante el procedimiento del Ejemplo 1 son capaces de deformarse después del hinchado. En un portaobjetos de microscopio de cristal se colocó un grupo de microesferas secas preparadas como en el Ejemplo 1. Las microesferas se cubrieron con un segundo portaobjetos de microscopio de cristal y se aplicó presión presionando el portaobjetos superior contra las microesferas y el portaobjetos inferior a mano, mientras se observaban las microesferas por el microscopio. Cuando las microesferas secas se presionaron de esta manera, no se observó deformación detectable de las microesferas. En este punto se añadió agua en cantidad suficiente para hidratar totalmente las microesferas provocando que se hincharan. La presión se aplicó de nuevo como se describe anteriormente. Cuando se observó bajo el microscopio se vio que las microesferas se deformaban fácilmente bajo la presión a un punto donde parecía que eran muy planas. Al liberar la presión, las microesferas recuperaron inmediatamente su forma esférica original. Las microesferas preparadas según el procedimiento del Ejemplo 5 comenzaron a deformarse y después fracturarse cuando se trataron con la misma presión.

Ejemplo 7

Esterilización de microesferas hinchables/deformables

Las muestras individuales de microesferas preparadas como en el Ejemplo 1 se expusieron o bien a etanol durante 15 min, a luz ultravioleta (UV) de 260 nm durante 30 min, o a radiación gamma a aproximadamente 28 kGy. En todos los casos, las microesferas esterilizadas resultantes mostraron coeficientes de expansión similares a las microesferas no esterilizadas cuando se expusieron a agua neutra, indicando que no había ocurrido reticulado adicional u otros procedimientos negativos durante los procedimientos de esterilización.

Ejemplo 8

Ensayo de contacto de celda directo para evaluar la citotoxicidad de las microesferas hinchables/deformables.

5 Se hicieron crecer células de fibroblasto humano NIH3T3 (obtenidas a partir del ATCC, núm. CRL-1658) en medio esencial modificado Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10%. Un cultivo celular se puso a prueba con 10 mg de microesferas preparadas como en el Ejemplo 1 según el procedimiento estándar de FDA ISO10993-5:1999. La muestra de microesferas se recubrió en el fondo de un pocillo en una placa de cultivo de poliestireno. El pocillo se esterilizó entonces bajo luz UV y se sembró con 50.000-100.000 células NIH3T3. El cultivo celular se incubó durante 48 h. Las células crecieron normalmente confluentes y recubrieron el fondo del pocillo, creciendo hasta los bordes de las microesferas. Este resultado demostró una falta de citotoxicidad de las microesferas.

Ejemplo 9

10 Ensayo de activación de macrófagos para evaluar el potencial inflamatorio de las microesferas hinchables/deformables.

El ensayo se hizo usando cultivos de Macrófago J774 según el procedimiento estándar de FDA ISO10993-5:1999. Las células de Macrófago J774 se obtuvieron a partir de ATCC (núm. TIB-67) y se hicieron crecer en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%.

15 Un cultivo celular de macrófago peritoneal de ratón J774 se puso a prueba con 10 mg de microesferas preparadas como en el Ejemplo 1. La muestra de microesferas se recubrió en el fondo de un pocillo en una placa de cultivo de poliestireno. El pocillo se esterilizó entonces bajo luz UV y se sembró con células J774. El cultivo celular se incubó durante 48 h. El cultivo celular se analizó entonces por TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), un indicador de la respuesta inflamatoria, usando un ensayo ELISA, como se describe por Lara et al. (Journal of Dental Research 82(6):460-465, 2003). El ensayo se llevó a cabo usando un equipo comprado de R&D systems (catálogo núm. MTA00), que utiliza un anticuerpo policlonal frente al TNF- α de ratón. La valoración de TNF- α fue similar al control negativo (un pocillo blanco), que indicó la naturaleza no inflamatoria de las microesferas.

Ejemplo 10

Ensayo de hemolisis para evaluar la hemocompatibilidad de microesferas hinchables/deformables

25 El ensayo se hizo usando glóbulos rojos humanos según los estándares de FDA (estándares ISO10993-4:2002). Los glóbulos rojos se obtuvieron a partir de donantes humanos y se diluyeron a una disolución al 5% de glóbulos rojos en solución salina tamponada con fosfato (concentración 1X, pH 7,4).

30 Las disoluciones de microesferas preparadas como en el Ejemplo 1 se hicieron en solución salina tamponada con fosfato a concentraciones de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$. Los glóbulos rojos se pusieron a prueba con las muestras de microesferas incubando 500 μL de cada disolución de microesferas con 25 μL de glóbulos rojos al 5%. Los glóbulos rojos con microesferas se incubaron durante 30 min con agitación. Los glóbulos rojos se analizaron entonces por hemolisis, usando espectrofotometría, como se describe por Malinauskas (Artificial Organs 21 (12):1255-1267, 1997). La extensión de la hemolisis se determinó midiendo la liberación de hemoglobina a partir de glóbulos rojos lisados. La cantidad de hemoglobina liberada por la muestra se midió de forma espectrofotométrica a 540 nm. Las microesferas de hidrogel indujeron 0,0% de hemolisis a una concentración de microesferas de 500 $\mu\text{g/mL}$. Esto indicó la naturaleza no hemolítica de las microesferas.

Ejemplo 11

Expansión de microesferas hinchables/deformables en sangre completa

40 Se extrajo sangre completa a partir de un conejo y se almacenó en un tubo de polipropileno de 15 mL (tubo Falcon). Las microesferas preparadas como en el Ejemplo 1 se suspendieron en la sangre aproximadamente 30 min después de sacarse del conejo. En este tiempo, alguna cantidad mínima de coagulación era visible en la muestra de sangre. Una muestra de 10 mg de microesferas se suspendió en una muestra de sangre de 5 mL durante 3 min y después se observó bajo un microscopio óptico. Las microesferas expuestas mostraron coeficientes de expansión similares (véase el Ejemplo 13) a las microesferas que se expusieron a agua neutra, demostrando que las microesferas suspendidas en sangre completa tenían una respuesta de hinchado similar a aquellas en agua pura. Adicionalmente, el periodo de tiempo del hinchado fue aproximadamente el mismo; las esferas se hincharon totalmente en la sangre completa en segundos.

Ejemplo 12

Determinación de niveles de DMSO apropiados para reparto de microesferas no hinchadas

50 Las disoluciones que contenían diferentes concentraciones de DMSO se ensayaron por su efecto en el mantenimiento de las microesferas hinchables/deformables preparadas como se describe en el Ejemplo 1 en un estado no hinchado. Las disoluciones que contenían diferentes cantidades de DMSO y agua enumeradas en la Tabla 8 se prepararon en nueve tubos de ensayo Eppendorf de 0,5 mL separados.

Tabla 8. Disoluciones con concentración de DMSO variable

Experimento	DMSO (μL)	Agua (μL)	% de agua en la mezcla
1	100	0	0
2	100	20	16,7
3	100	60	37,5
4	100	100	50
5	100	150	60
6	100	200	66,7
7	100	300	75
8	100	400	80
9	0	400	100

A cada tubo de ensayo se añadieron 5 mg de las microesferas hinchables/deformables preparadas en el Ejemplo 1. Cada tubo se agitó entonces brevemente para sumergir todas las microesferas, y cada uno se dejó estar durante al menos 3 min para permitir el hinchado completo de las microesferas. En este punto las muestras de cada tubo se tomaron y se visualizaron bajo un microscopio a una ampliación de 5x. El nivel de hinchado de las microesferas en cada tubo se comparó cualitativamente. La comparación mostró que las disoluciones que contenían una alta concentración de DMSO (disoluciones 1-3) suprimieron eficazmente el hinchado de las microesferas. La disolución que contenía 50% de agua (disolución 4) provocó el hinchado muy significativo de las microesferas, y las disoluciones que contenían un mayor porcentaje de agua (disoluciones 5-9) produjeron aproximadamente el mismo nivel de hinchado en la microesferas con el 50% de agua.

Ejemplo 13

Determinación del efecto del pH para el reparto de microesferas no hinchadas

Tres disoluciones de diferentes pH se prepararon añadiendo HCl y/o NaOH a agua y cuantificando el pH resultante con un pH metro. Las disoluciones de pH 2,0; 7,1 y 10,2 se prepararon. En este punto, microesferas individuales preparadas como se describe en el Ejemplo 1 se aislaron en un cubreobjetos de microscopio en su estado no hinchado. Se grabó una imagen de la microesfera seca a una ampliación de 20x, y el diámetro de la microesfera se midió y se grabó. Una gota (suficiente para saturar la microesfera) de una de las disoluciones acuosas de pH conocido se añadió entonces a la microesfera. La microesfera hidratada se visualizó entonces bajo un microscopio a una ampliación de 5x, y el diámetro en el punto más ancho se midió y se grabó. El coeficiente de expansión volumétrica se calculó entonces para la microesfera después de la hidratación usando la siguiente ecuación: volumen de microesfera hidratada / volumen de microesfera seca = coeficiente de expansión volumétrica. Esto se calculó como sigue:

$$\frac{4/3\pi(d_{hid}/2)^3}{4/3\pi(d_{seca}/2)^3}$$

donde d_{hid} = diámetro de la microesfera hidratada y d_{seca} = diámetro de la microesfera seca.

Cada conjunto de condiciones se repitió 5 veces con una nueva microesfera cada vez. Los resultados, mostrados en la Tabla 9, demostraron que en una disolución de pH ácido, las microesferas sufrieron apenas hinchado.

Tabla 9. Efecto del pH en el hinchado de las microesferas

pH de la disolución	2,0	7,1	10,2
Coficiente de expansión promedio	1,18	85,85	73,91
Desviación estándar	0,12	20,98	23,75

Ejemplo 14

Evaluación de agentes de contraste MD-76[®] y Ethiodol[®] como medios para el reparto de microesferas hinchables/deformables.

Una única microesfera seca a partir de un preparado descrito en el Ejemplo 1 se aisló en un portaobjetos de microscopio y se visualizó con un aumento de 10x. El diámetro se grabó. Aproximadamente 0,25 mL de medio de contraste MD-76[®] (suministrado por Tyco; Mansfield, MA) se añadió directamente al portaobjetos, suspendiendo la microesfera. Un tiempo de 3 min se dejó para el contacto de microesfera/contraste. La microesfera se visualizó

entonces de nuevo usando un microscopio a una ampliación 5x, y el diámetro se grabó. El coeficiente de expansión volumétrica de la microesfera se computó como se describe en el Ejemplo 13. El procedimiento de suspensión y medida se repitió entonces unas 5 veces adicionales. El coeficiente de expansión promedio de microesferas suspendidas en MD-76[®] fue 4,9, con un intervalo de entre 3,6 y 7,4. Los experimentos se repitieron usando agua neutra en lugar de MD-76[®]. A partir de estos experimentos un coeficiente de expansión promedio de 117,5 se obtuvo, con un intervalo de entre 88 y 146.

El experimento se repitió usando Ethiodol[®] (suministrado por SAVAGE Laboratories[®], Melville, NY). Los coeficientes de expansión de la microesferas en Ethiodol[®] fueron menores que los obtenidos por microesferas en MD-76[®] como se determina por inspección visual.

10 Ejemplo 15

Paso de microesferas hinchables/deformables a través de catéteres usando DMSO

Las microesferas preparadas como se describe en el Ejemplo 1 con un diámetro seco promedio de aproximadamente 250 micras se suspendieron en DMSO mezclando en un Tubo Falcon de 60 mL durante 3 min con un Mezclador de Toque de Vórtice (velocidad 10). Las suspensiones consistieron en 2000 mg de las microesferas en 8 mL (250 mg/mL), o 5 mL (400 mg/mL) de DMSO. Se hizo un intento para inyectar 2,5 mL de cada suspensión a través de cada uno de catéteres de diversos tamaños usando una jeringa de 10 mL. Los siguientes catéteres se usaron: un catéter guía Cordis Vistabritetip (7F), un catéter guía Medtronic A VE Z² (6F), y un catéter de dilatación Cordis PTA, opta 5 (5F). La suspensión de 250 mg/mL pasó fácilmente a través del catéter guía Medtronic A VE Z² (6F) y el catéter guía Cordis Vistabritetip (7F). Sin embargo, la suspensión no pasó a través del catéter de dilatación Cordis PTA, Opta 5 (5F). Las microesferas se agregaron alrededor del punto de entrada del lumen del catéter 5F. La suspensión de 400 mg/mL no fue capaz de pasar a través de cualquiera de los catéteres. Esta disolución podría incluso no mantener la homogeneidad cuando se inyectó de la jeringa de 10 mL sin catéter asociado, lo que indicó una sobresaturación de microesferas en DMSO. Así, esto representa un límite superior de concentración para las microesferas, a pesar de las dimensiones del catéter.

25 Las microesferas que se pasaron a través del catéter 6F a 250 mg/mL se recogieron y se observaron bajo un microscopio óptico con ampliación de 10x. No se observó diferencia en el nivel de fragmentación para las microesferas pasadas cuando se comparan con los controles. El paso de las microesferas a través del catéter no tuvo efectos adversos visibles en la integridad física de las microesferas.

Ejemplo 16

30 Paso de microesferas hinchables/deformables a través de un catéter 5F.

Dos muestras de microesferas preparadas como se describe en el Ejemplo 1 se prepararon adicionalmente como en el Ejemplo 15. La primera muestra se preparó usando 750 mg de microesferas con un diámetro seco promedio de casi 250 micras y 5 mL de medio de contraste MD-76[®] (150 mg/mL). La segunda muestra se preparó usando 1500 mg de microesferas con un diámetro seco promedio de aproximadamente 100 micras, preparadas tamizando como se describe en el Ejemplo 4, y 5 mL de medio de contraste MD-76[®] (300 mg/mL). Ambas suspensiones pasaron fácilmente a través de un catéter de dilatación Cordis PTA, Opta 5 (5F). Como se determina en el Ejemplo 14, las microesferas tuvieron un coeficiente de expansión promedio de 4,9 en MD-76[®].

Ejemplo 17

Oclusión in vivo de la vasculatura porcina con microesferas hinchables/deformables.

40 Las suspensiones de microesferas que se hicieron como se describe en el Ejemplo 1 se prepararon adicionalmente añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hicieron 48 h antes de la administración. Los estudios porcinos se llevaron a cabo en tres días separados usando cerdos adultos macho. Una jeringa de 12 mL se usó para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 6F. Antes de cada inyección intentada, el catéter se guió angiográficamente a la posición diana. El medio de inyección y la vasculatura a la que se dirige para cada experimento se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Experimentos in vivo

Experimento	Masa de microesferas (mg)	Dilución	Volumen repartido (mL)	Vaso/órgano	Medio (10 mL)
1	200	Ninguna	4,5	Riñón der./arteria renal	DMSO
2	500	Ninguna	5,0	Riñón izq./rama superior de la arteria renal	DMSO:solución salina 9:1

Experimento	Masa de microesferas (mg)	Dilución	Volumen repartido (mL)	Vaso/órgano	Medio (10 mL)
3	1000	3 mL de DMSO	6,0	Corazón/arteria coronaria derecha	DMSO:solución salina 9:1

La vasculatura diana se localizó fácilmente en todas las inyecciones intentadas. La baja viscosidad de los medios repartidos facilitó el paso de las microesferas a través del catéter. Después de la inyección de las microesferas, se inyectó el medio de contraste para determinar angiográficamente si el vaso diana se había ocluido (desvío del contraste indicaba la oclusión del vaso). La visualización mostró claramente el bloqueo del flujo sanguíneo distal al sitio diana en cada experimento. La disección de la arteria renal mostró una oclusión formada por microesferas hinchadas en el sitio diana. Las microesferas ocluyeron con éxito la vasculatura renal porcina y la arteria coronaria derecha porcina.

Ejemplo 18

Oclusión del tubo con microesferas hinchables/deformables y cuantificación de la presión interna necesaria para desplazar la oclusión.

Un sistema de tubo conectado en forma lineal que consiste en orden de una jeringa de 60 mL, un tubo de 80 cm de longitud con un transductor de presión de grado clínico en línea (núm. 72-4496; Harvard Apparatus) en el centro, y un tubo Tygon® de diámetro interno de 1,58 mm desmontable (AAB00003 B-44-3 Beverage Tubing, núm. TBT-062B, Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL) se usó para ensayar la durabilidad de las oclusiones formadas por microesferas preparadas como se describe en el Ejemplo 1. Este tubo Tygon® tiene un diámetro externo de 4,76 mm y un espesor de pared de 1,59 mm. El tubo con el transductor en línea fue tubo AAB00009 B-44-3 Tygon®, que se conectó a un extremo de la jeringa, y en el otro extremo al tubo AAB00003 B-44-3 Tygon® a través de un conector de etapa posterior (STCR-09/16, Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL). El tubo AAB00003 Tygon® se desmontó del sistema y se relleno con 2,5 mL de suspensión acuosa que contenía diversos pesos (peso seco) de microesferas (250-500 micras de diámetro seco) como se enumera en la Tabla 11. El tubo se volvió a montar. La jeringa se usó para impartir de forma gradual presión interna al tubo Tygon®. La presión necesaria para desplazar las microesferas desde el tubo Tygon® se grabó como lecturas a partir del transductor de presión. Los resultados se dan en la Tabla 11.

Tabla 11. Presión de desplazamiento para oclusiones de microesferas hinchables/deformables in vitro

Marcha núm.	Microesferas de hidrogel hinchables de masa seca (mg)	Presión resultante grabada (mm Hg)/(kPa)
1	15	140/(18,7)
2	15	114/(15,2)
3	15	126/(16,8)
1	18	570/(76,0)
2	18	660/(88,0)
3	18	588/(78,4)
1	20	Max (>1000/133)
2	20	Max (>1100/133)
3	20	Max (>1000/133)

Las oclusiones de microesferas fueron capaces de resistir por encima de 1.000 mm de Hg (133 kPa) de presión. Los resultados de este estudio demostraron que las microesferas hinchables/deformables son capaces de ocluir sistemas de alto flujo, baja resistencia. Este sistema modela cuidadosamente el escenario más difícil de ocluir, malformaciones arterio-venosas debido al diámetro relativamente grande del tubo Tygon®. En la mayoría de aplicaciones potenciales distintas el diámetro del vaso se reduce constantemente en el tejido diana, lo que garantiza virtualmente la oclusión en algún nivel en el árbol vascular.

Ejemplo 19 (Comparativo)

Oclusión del tubo comparativa con microesferas de hidrogel no hinchables y cuantificación de la presión interna necesaria para desplazar la oclusión.

Como comparación, la durabilidad de las oclusiones formadas por microesferas que tienen casi ninguna capacidad de hinchado se ensayó como se describe en el Ejemplo 18. Estas microesferas se prepararon como en la Muestra 9 en el Ejemplo 2, que tenían una capacidad de hinchado de 1,5 gramos de agua por gramo de microesferas, lo que

se considera no ser hinchable. El tubo Tygon® se desmontó del sistema y se rellenó con unos 2,5 mL de suspensión acuosa que contenía diversos pesos (peso seco) de las microesferas altamente reticuladas (250-500 micras de diámetro seco, como se enumera en la Tabla 12. Se usó una jeringa para impartir gradualmente presión interna al tubo Tygon®. La presión necesaria para desplazar las microesferas del tubo Tygon® se muestra en la Tabla 12 para cada muestra.

5

Tabla 12. Presión de desplazamiento para oclusiones de microesferas no hinchables in vitro.

Marcha núm.	Microesferas de hidrogel no hinchables de masa seca (mg)	Presión resultante grabada (mm de Hg)/(kPa)
1	20	<15 (2,0)
2	20	<15 (2,0)
3	20	<15 (2,0)
1	100	<18 (2,4)
2	100	<15 (2,0)
3	100	<15 (2,0)
1	500	43 (5,7)
2	500	66 (8,8)
3	500	37 (4,9)

En este ejemplo la naturaleza no hinchable de las microesferas no permite un empaquetamiento apretado de las microesferas y se alcanza una oclusión extremadamente ineficaz, como se determina por la baja presión que es adecuada para desplazar la oclusión.

10 Ejemplo 20

Reparto de microesferas hinchables/deformables suficiente para la oclusión a través de un microcatéter 3F.

Cuatro suspensiones diferentes de las microesferas del Ejemplo 1 se prepararon como las siguientes muestras:

15 1) 1 mL de volumen húmedo (corresponde aproximadamente a 10 mg de masa seca) diluido a 6 mL con solución salina tamponada con fosfato (0,138 M de NaCl, 0,0027 M de KCl, pH 7,4) en una jeringa de 6 mL. Estas microesferas están totalmente hinchadas.

2) 10 mg de masa seca suspendida en 6 mL de 0,3 g/mL de cloruro sódico en agua en una jeringa de 6 mL. Esta concentración de cloruro sódico limita el hinchado.

3) 30 mg de masa seca suspendida en 6 mL de 0,3 g/mL de cloruro sódico en agua en una jeringa de 6 mL.

4) 60 mg de masa seca suspendida en 6 mL de 0,3 g/mL de cloruro sódico en agua en una jeringa de 6 mL.

20 5) 120 mg de masa seca suspendida en 6 mL de 0,3 g/mL de cloruro sódico en agua en una jeringa de 6 mL.

Cada suspensión se inyectó a través de un microcatéter trenzado separado Renegade® Fiber 3F que tiene un diámetro interno de 533 micras (Lot núm. 7704153, Boston Scientific, Natick, MA). La punta de cada microcatéter se colocó en un vaso de precipitados para monitorizar cualquier efluente. Para todas las inyecciones, la jeringa se agitó constantemente para asegurar la mezcla adecuada.

25 A partir de la suspensión de la muestra 1 que contenía microesferas hinchadas, algunas microesferas fueron capaces de pasar a través del microcatéter Renegade®, aunque la amplia mayoría, más del 95%, permaneció en la jeringa. Las suspensiones de las muestras 2, 3 y 4 de microesferas de hinchado limitado pasaron a través de los microcatéteres completamente. La suspensión de la muestra 5 permitió algún paso de microesferas, aunque el microcatéter se bloqueó después de repartirse aproximadamente 3 mL de la suspensión. Este experimento
30 demostró que cantidades de 10 mg, 30 mg y 60 mg de microesferas de hinchado limitado fueron capaces de pasar a través de un catéter 3F que tiene un diámetro interno de 533 micras. Así, un catéter 3F puede usarse para repartir una cantidad de microesferas hinchables/deformables que es suficiente para formar una oclusión altamente duradera como se ensaya en el Ejemplo 18.

Ejemplo 21

35 Preparación de microesferas que contienen bario como un agente de visualización.

En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 12,0 g de etilcelulosa, 400 mL de cloroformo y 190 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 160 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa; después se aumentó en velocidad del agitador a 250 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,50 g de metilcelulosa, 1,00 g de N,N'-metilénbisacrilamida, 8,67 g de Triton X-405 (disolución al 70%) y 49,8 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 19,5 g de ácido acrílico, 4,0 g de hidróxido de bario y 16,4 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6), y 10 mL de agua (disolución C). La disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa B.

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,05 g de iniciador VA-044 soluble en agua (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano) y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción se dejó agitar a 250 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando la "primera suspensión". La primera suspensión se calentó entonces a 51°C y se agitó a 250 rpm durante unas 5,5 h adicionales a esa temperatura, y otras 15 h a temperatura ambiente, formando la "segunda suspensión". Después de este tiempo, aproximadamente 400 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con unos 250 mL adicionales de metanol. Se filtraron de nuevo y finalmente se lavaron con 250 mL de etanol. Se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C.

Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento final de microesferas secas fue 23,1 g. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 86 g de agua/g de microesferas. Un análisis de visualización por rayos X indicó claramente que el bario estaba contenido en la estructura de la microesfera permitiendo una excelente visualización de microesferas individuales cuando estaban secas. Cuando las microesferas se hincharon, la densidad del bario se diluyó de manera que la visualización se volvió más difícil.

Ejemplo 22

Reparto de microesferas hinchables/deformables en DMSO a través de un microcatéter 3F.

Las microesferas del Ejemplo 1 se suspendieron en DMSO a concentraciones de 10 mg/mL, 30 mg/mL y 60 mg/mL. Se cargaron seis mililitros de cada suspensión en una jeringa y se inyectaron a través de un microcatéter trenzado Renegade[®] Fiber 3F separado que tiene un diámetro interno de 533 micras (Lot núm. 7704153, Boston Scientific, Natick, MA). La punta de cada microcatéter se colocó en un vaso de precipitados para monitorizar cualquier efluente. Para todas las inyecciones, la jeringa se agitó constantemente para asegurar la mezcla adecuada. Usando la suspensión de 10 mg/mL, las microesferas pasaron a través del catéter al vaso de precipitados, como se observó añadiendo agua al vaso de precipitados de recogida. Algunas microesferas se adhirieron a las paredes y al émbolo de la aguja, más probablemente provocado por la electricidad estática debido a la sequedad del aire. Se obtuvieron resultados similares usando la suspensión de 30 mg/mL, con algunas microesferas pasando a través del catéter y algunas adhiriéndose a la jeringa. Usando la suspensión de 60 mg/mL, el catéter se ocluyó después de un par de milímetros de DMSO pasados a través del catéter. Una suspensión de control de 10 mg/mL de microesferas en agua (totalmente hinchadas) ocluyeron el catéter inmediatamente, y la oclusión fue visible en el punto de entrada del catéter.

Ejemplo 23

Preparación de microesferas hinchables usando ácido metacrílico.

En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 95 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 180 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,419 g de N,N'-metilénbisacrilamida (2,4% en moles de monómero), 4,335 g de Triton[™] X-405 (disolución al 70%) y 26,22 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 9,75 g de ácido metacrílico y 9,06 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de ácido metacrílico se añadió entonces a la disolución B.

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua iniciador VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min para formar la "primera disolución". La primera disolución se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se agitó a 412 rpm durante aproximadamente 1,5 h a temperatura ambiente, formando la "primera suspensión". La velocidad de agitación se redujo a 225 rpm y la primera suspensión se calentó a 51°C. La primera suspensión se mantuvo a la misma velocidad de agitación y temperatura durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (es decir, la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 225 rpm

durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la polimerización completa. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la suspensión para eliminar agua a partir de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, se lavaron con unos 75 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo, y finalmente se lavaron con 75 mL de etanol. Las microesferas se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento final de microesferas secas fue 7,8 g.

Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilan generalmente de 40 micras a 150 micras como se mide a partir de fotos conseguidas usando microscopía de barrido electrónico. El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 98 g de agua/g de microesferas.

Ejemplo 24

Preparación de microesferas hinchables usando una combinación de acetato de feniletilo, heptanoato de etilo y cloruro de metileno como disolvente.

En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 12,0 g de etilcelulosa (Aldrich núm. 200646), 280 mL de acetato de feniletilo (Aldrich núm. 290580), 120 mL de heptanoato de etilo (Aldrich núm. 112364) y 190 mL de cloruro de metileno (EMD núm. DX0831-6). La mezcla se agitó a una velocidad de 360 rpm hasta que se disolvió toda la etilcelulosa, haciendo la disolución A. En un segundo matraz, se preparó una disolución que contenía 0,50 g de metilcelulosa (Aldrich núm. 274429), 49,8 g de agua, 1,0 g de N,N-metilenbisacrilamida (Aldrich núm. 146072) y 8,67 g de Triton X-405 (70% en peso de disolución en agua; Aldrich núm. 234737), haciendo la disolución B. En un tercer matraz separado, se mezclaron 19,5 g de ácido acrílico y 22,0 g de disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% en peso. La disolución de hidróxido sódico se añadió lentamente usando una pipeta mientras el ácido acrílico se agitó en un baño de hielo, haciendo la disolución C.

La disolución C de ácido acrílico se añadió a la disolución B de agua/metilcelulosa mientras se agitaba de forma vigorosa. Entonces, se añadieron 0,025 g del iniciador VA-044 soluble en agua. La disolución se agitó durante 5 min formando la "primera disolución". Entonces, la primera disolución se añadió a la disolución A de etilcelulosa ("segunda disolución"). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h a 360 rpm formando la "primera suspensión". Entonces, la suspensión se calentó a 55°C durante 4 h con agitación a 360 rpm, formando la "segunda suspensión". Después de este tiempo, la segunda suspensión se agitó a 200 rpm toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se añadieron 400 mL de metanol usando un embudo de adición y la agitación se continuó durante 1 h a temperatura ambiente. Las microesferas formadas durante este procedimiento se recogieron por filtración, se lavaron con metanol, se lavaron varias veces con etanol y después se secaron durante 3 días en un horno al vacío a 100°C con una ligera purga de nitrógeno. El rendimiento final de las microesferas secas, blancas, fue de 24,84 g.

El hinchado de las microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 82,8 g de agua/g de microesferas.

Ejemplo 25 (comparativo)

Preparación de microesferas de bajo hinchado usando acrilamida como un monómero sencillo.

En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 250 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,51 g de N,N'-metilenbisacrilamida (2,4% en moles de monómero), 4,335 g de TritonTM X-405 (disolución al 70% en peso en agua) y 19,0 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 9,75 g de acrilamida y 14,0 g de agua (el pH observado estuvo entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de acrilamida se añadió entonces a la disolución de reticulador.

Entonces, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador VA-044 soluble en agua (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min, formando la "primera disolución". La primera disolución se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a 244 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando la "primera suspensión". La velocidad de agitación se redujo a 225 rpm y la suspensión se calentó a 49°C con agitación continuada durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 224 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la suspensión para eliminar el agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con unos 175 mL adicionales de metanol. Se filtraron de nuevo, se lavaron dos veces con 150 mL de etanol, y se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El rendimiento final de las microesferas secas fue 11,2 g.

Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilan generalmente de 10 micras a 170 micras como se midió a partir de fotos conseguidas usando microscopía de barrido electrónico. El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expuso al agua, las microesferas absorbieron 5 g de agua/g de microesferas.

- 5 Las microesferas se prepararon usando N-hidroximetilacrilamida como monómero usando un procedimiento similar. Las microesferas resultantes absorbieron 6 g de agua/g de microesferas.

Estos resultados sugieren que cuando se usan acrilamida o N-hidroximetilacrilamida como monómeros sencillos, se obtienen microesferas con bajo hinchado. Sin embargo, cuando estos monómeros se usan como un co-monómero con ácido acrílico, se producen microesferas con alto hinchado, como se muestra en los Ejemplos 26 y 27.

- 10 Ejemplos 26 y 27

Preparación de microesferas hinchables usando ácido acrílico y acrilamida como co-monómeros.

- 15 En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 250 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,50 g de N,N'-metilénbisacrilamida (2,4% en moles de cantidad total de monómeros), 4,335 g de Triton™ X-405 (70% en peso de disolución en agua) y 25,3 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 8,775 g de ácido acrílico y 9,74 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (disolución C). A esta disolución se añadieron 0,975 g de acrilamida para generar una disolución de co-monómero con 90% de ácido acrílico y 10% de acrilamida en peso (el pH se observó que era entre 4 y 5). El experimento se repitió usando una relación de co-monómero de 70% de ácido acrílico y 30% de ácido acrílico. La cantidad de NaOH y el reticulador se cambiaron para acomodar las relaciones de monómero, como se muestran en la Tabla 13. Esta disolución de monómero se añadió entonces a la disolución acuosa (disolución B).

Tabla 13. Condiciones experimentales para la preparación de microesferas de ácido acrílico-acrilamida

Ejemplo	% de ácido acrílico/% de acrilamida	Reticulador (g)	Ácido acrílico (g)	NaOH (moles)	Acrilamida (g)	Velocidad de agitación (rpm)
26	90/10	0,500	8,775	0,061	0,975	325
27	70/30	0,503	6,825	0,047	2,925	335

- 25 Entonces, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min, formando la "primera disolución". La primera disolución se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se agitó (véase la Tabla 13 para velocidades de agitación) durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando la "primera suspensión". La velocidad de agitación se redujo a aproximadamente 225 rpm y la suspensión se calentó a 50,5°C con agitación continuada durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (es decir, la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 225 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la suspensión para eliminar el agua de las microesferas, y las microesferas se agitaban durante una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces y se lavaron con unos 75 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo, se lavaron dos veces con 75 mL de etanol y se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco.

- 40 El diámetro de las microesferas secas resultantes se midió a partir de fotos adquiridas usando microscopía de barrido electrónico y el hinchado se determinó como se describe en los Métodos Generales. Los resultados se resumen en la Tabla 14. En contraste a las microesferas preparadas usando acrilamida sola (Ejemplo 25), las microesferas preparadas usando ácido acrílico y acrilamida como co-monómeros tenía alto hinchado.

Tabla 14. Propiedades de las microesferas de ácido acrílico-acrilamida

Ejemplo	Rendimiento (g)	Diámetro (µm)	Hinchado (g de H ₂ O/g de microesferas)
26	7,93	30-310	118
27	8,92	30-245	78

Ejemplos 28-30

Preparación de microesferas hinchables usando ácido acrílico y metacrilato de 2-hidroxietilo como co-monómeros.

En tres matraces separados de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, cada uno equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se prepararon disoluciones de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). Cada mezcla se agitó a 250 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En una serie de segundos matraces, se prepararon tres disoluciones de 0,25 g de metilcelulosa, cantidades variables de N,N'-metilénbisacrilamida para dar 2,4% en moles de cantidad total de monómeros (como se enumera en la Tabla 15), 4,335 g de TritonTM X-405 (70% en peso de disolución en agua) y 25,3 g de agua (disolución B). En una tercera serie de matraces separados, se mezclaron cantidades variables de ácido acrílico y disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6) (disolución C) como se da en la Tabla 15. A estas disoluciones se añadieron diferentes cantidades de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) para generar las disoluciones de comonómeros con composiciones de ácido acrílico y metacrilato de 2-hidroxietilo como se da en la Tabla 15. La cantidad de NaOH y el reticulador se cambiaron para acomodar las relaciones de monómeros. Cada disolución de monómero se añadió entonces a la disolución B apropiada.

Tabla 15. Condiciones experimentales para la preparación de microesferas de ácido acrílico-metacrilato de 2-hidroxietilo.

Ejemplo	% de ácido acrílico/% de HEMA	Reticulador (g)	Ácido acrílico (g)	NaOH (moles)	HEMA (g)	Velocidad de agitación (rpm)
28	95/5	0,489	9,262	0,064	0,49	368
29	67/33	0,43	6,825	0,047	3,12	380
30	50/50	0,39	4,875	0,034	4,875	375

Entonces, mientras se agitaban rápidamente las mezclas de las Disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y las disoluciones resultantes se agitaron durante 5 min, formando las "primeras disoluciones". Las primeras disoluciones se añadieron entonces a los matraces de fondo redondo que contenían la disolución A apropiada (las "segundas disoluciones"). Las mezclas de reacción resultantes se agitaron (véase la Tabla 15 para velocidades de agitación) durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando las "primeras suspensiones". La velocidad de agitación se redujo a aproximadamente 225 rpm y las suspensiones se calentaron a 51°C con agitación continuada durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (las "segundas suspensiones"). Las suspensiones se agitaron entonces durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, se añadieron lentamente aproximadamente 250 mL de metanol a las suspensiones para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron durante una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, se lavaron con unos 75 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo, se lavaron dos veces con 75 mL de etanol y se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco.

El diámetro de las microesferas secas resultantes se midió a partir de fotos adquiridas usando microscopía de barrido electrónico y el hinchado se determinó como se describe en los Métodos Generales. Los resultados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16. Propiedades de las microesferas de ácido acrílico-metacrilato de 2-hidroxietilo

Ejemplo	Rendimiento (g)	Diámetro (µm)	Hinchado (g de H ₂ O/g de microesfera)
28	8,2	45-230	112
29	5,7	15-145	109
30	4,0	15-190	174

Ejemplos 31-33

Preparación de microesferas hinchables usando ácido acrílico y acrilato de 2-hidroxietilo como co-monómeros.

En tres matraces separados de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado cada uno con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se prepararon disoluciones de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). Cada mezcla se agitó a 250 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En una serie de segundos matraces, se prepararon tres disoluciones de 0,25 g de metilcelulosa, cantidades variables de N,N'-metilénbisacrilamida para dar 2,4% en moles de cantidad total de monómeros (como se enumera en la Tabla 17), 4,335 g de TritonTM X-405 (70% en peso de disolución en agua) y 25,3 g de agua (disolución B). En una tercera serie de matraces separados, se mezclaron cantidades variables de ácido acrílico y disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6) (disolución C) como se da en la Tabla 17. A estas disoluciones se añadieron diferentes cantidades de acrilato de 2-hidroxietilo (HEA) para generar las disoluciones de co-monómero con composiciones de ácido acrílico y metacrilato de 2-

hidroxietilo como se da en la Tabla 17. La cantidad de NaOH y el reticulador se cambiaron para acomodar las relaciones de monómero. Cada disolución de monómero se añadió entonces a la disolución B apropiada.

Tabla 17. Condiciones experimentales para la preparación de microesferas de ácido acrílico-acrilato de 2-hidroxietilo

Ejemplo	% de ácido acrílico/% de HEA	Reticulador (g)	Ácido acrílico (g)	NaOH (moles)	HEA (g)	Velocidad de agitación rpm
31	95/5	0,49	9,262	0,064	0,49	370
32	80/20	0,463	7,8	0,054	1,95	325
33	60/40	0,42	5,85	0,041	3,9	327

5 Entonces mientras se agitaban rápidamente las mezclas de las Disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g de azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y las disoluciones resultantes se agitaron durante 5 min, formando las "primeras disoluciones". Las primeras disoluciones se añadieron entonces a los matraces de fondo redondo que contenían la disolución A apropiada (las "segundas disoluciones"). Las mezclas de reacción resultantes se agitaron (véase la Tabla 17 para velocidades de agitación) durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, formando las "primeras suspensiones". La velocidad de agitación se redujo a aproximadamente 225 rpm y las suspensiones se calentaron a 51°C con agitación continuada durante casi 10 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (las "segundas suspensiones"). Las suspensiones se agitaron entonces durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a las suspensiones para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron durante una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, se lavaron con unos 75 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo, se lavaron dos veces con 75 mL de etanol y se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes fueron de color blanco.

El diámetro de las microesferas secas resultantes se midieron a partir de fotos adquiridas usando microscopía de barrido electrónico y el hinchado se determinó como se describe en los Métodos Generales. Los resultados se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Propiedades de microesferas de ácido acrílico-acrilato de 2-hidroxietilo

Ejemplo	Rendimiento (g)	Diámetro (µm)	Hinchado (g de H ₂ O/g de microesferas)
31	4,74	15-180	148
32	8,17	45-250	75
33	8,18	30-230	97

Ejemplo 34

Control de absorción de agua por microesferas hinchables por medio de condiciones de secado de microesferas hinchables.

25 En un matraz de tres cuellos de 5 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 36,0 g de etilcelulosa, 1200 mL de cloroformo y 570 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 100 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa; entonces el agitador se aumentó de velocidad a 200 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 1,50 g de metilcelulosa, 3,00 g de N,N'-metileno-bisacrilamida (2,3% en moles de monómero), 26,01 g de TritonTM X-405 (polioxietileno (40) isoocilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 149,4 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 58,5 g de ácido acrílico y 75 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución B acuosa.

35 En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de Disoluciones B y C, se añadieron 0,15 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la "primera suspensión") a 200 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La primera suspensión se calentó entonces a 51°C y se agitó a 140 rpm durante unas 10 h adicionales a esa temperatura para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 140 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 1200 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar durante una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, se lavaron con unos 250 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo, y finalmente se lavaron con 250 mL de

etanol. Una parte de las microesferas se secó entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a temperatura ambiente durante 144 h. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 120 g de agua/g de microesferas.

- 5 Para comparación, una segunda carga de microesferas producidas a partir del procedimiento se secó en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C durante 52 h. Las microesferas blancas resultantes se ensayaron para hinchado como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 90 g de agua/g de microesferas.

10 Estos resultados indicaron que un procedimiento de secado lento a temperatura ambiente lleva a las microesferas a mostrar un mayor grado de hinchado que las preparadas usando un procedimiento de secado caliente.

Ejemplo 35

Preparación de microesferas altamente hinchables.

15 La preparación de microesferas altamente hinchables puede conseguirse a través del uso de un monómero altamente hidrófilo, tal como acrilato sódico, baja densidad de reticulado y un procedimiento de secado a temperatura ambiente. El siguiente procedimiento ilustra dicha preparación.

20 En un matraz de tres cuellos de 5 L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 36,0 g de etilcelulosa, 1200 mL de cloroformo y 570 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 100 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa; entonces el agitador se aumentó de velocidad a 200 rpm para crear un ligero vórtice. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 1,50 g de metilcelulosa, 0,10 g de N,N'-metilbisacrilamida (0,08% en moles de monómero), 26,01 g de Triton™ X-405 (polioxitileno (40) isoocitilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 96,9 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 58,5 g de ácido acrílico y 127,5 g de disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH entre 9 y 10) (disolución C). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución B acuosa.

25 En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de las Disoluciones B y C, se añadieron 0,15 g de azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano) y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se permitió agitar (la "primera suspensión") a 200 rpm a aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La primera suspensión se calentó entonces a 51°C y se agitó a 140 rpm durante una 10 h adicionales a esa temperatura para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 140 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 1200 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar durante una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, se lavaron con unos 250 mL adicionales de metanol, se filtraron de nuevo y finalmente se lavaron con 250 mL de etanol. Una parte de las microesferas se secaron entonces en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a temperatura ambiente durante 64 h. Las microesferas resultantes fueron de color blanco. El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 269 g de agua/g de microesferas. La densidad de masa promedio de estas microesferas se midió que era $0,884 \pm 0,061 \text{ g/cm}^3$ (promedio y desviación estándar de 5 determinaciones).

35 Para comparación, una segunda carga de microesferas producidas a partir del procedimiento se secó en un horno de vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C durante 64 h. Las microesferas blancas resultantes se ensayaron para hinchado como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 120 g de agua/g de microesferas.

45 El rendimiento total de las microesferas (secas bajo ambas condiciones) fue 81,6 g. Un examen micrográfico de barrido electrónico de las gotas de producto indicó intervalos de tamaño esférico de 50 micras a 250 micras.

Ejemplo 36

Preparación de microesferas hinchables usando ácido estireno-sulfónico.

50 En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 269 mL de cloroformo y 97 g de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 244 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,175 g de N,N'-metilbisacrilamida (2,4% en moles de monómero), 4,335 g de Triton™ X-405 (polioxitileno (40) isoocitilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 5,0 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 9,75 g de ácido 4-estirenosulfónico, hidrato de sal sódica (0,047 moles) y 17,24 g de una disolución de HCl al 10% (0,047 moles; para convertir la sal sódica del monómero a la forma ácida), además se añadieron 28,9 g de agua a esta disolución (para

alcanzar un pH de 0) (disolución C). La disolución de monómero se añadió entonces a la disolución de reticulador (disolución B). La cantidad total de agua en el medio fue de 49,4 g, incluyendo la del HCl. La cantidad de cloroformo y cloruro de metileno se aumentaron respecto a las cantidades usadas con ácido acrílico (Ejemplo 1) para mantener una relación similar de disoluciones orgánica a acuosa.

5 En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. La disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la "primera suspensión") a 235 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La velocidad de agitación se redujo a 224 rpm y la primera suspensión se calentó a 50,3°C. La suspensión se mantuvo a la misma velocidad de agitación y temperatura durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 223 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, el material obtenido fue demasiado blando para aislarse. La masa blanda se lavó con acetona y se filtró entonces de nuevo. El material se lavó adicionalmente con 100 mL de metanol y se lavó de nuevo dos veces con porciones de 80 mL de etanol. Finalmente los sólidos se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes se obtuvieron como un polvo fino con un tinte amarillo. El rendimiento final de las microesferas secas fue 5,26 g.

20 Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilaron generalmente de 10 micras a 70 micras como se midió a partir de fotos adquiridas por medio de microscopía de barrido electrónico. El hinchado de las microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 471 g de agua/g de microesferas.

Ejemplo 37

25 Preparación de microesferas hinchables usando ácido estirenosulfónico y la sal sódica del ácido estirenosulfónico.

En un matraz de tres cuellos de 1 L, de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 274 g de cloroformo y 99 mL de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 244 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,175 g de N,N'-metilbisacrilamida (2,4% de moles de monómero), 4,335 g de TritonTM X-405 (polioxietileno (40) isoocitilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 5,0 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 9,75 g de ácido 4-estirenosulfónico, hidrato de sal sódica (0,047 moles) y 8,62 g de una disolución de HCl al 10% (0,0236 moles; para convertir el 50% de la sal sódica del monómero a la forma ácida), además se añadieron 32,3 g de agua a esta disolución (para alcanzar un pH de 0) (disolución C). La disolución de monómero se añadió entonces a la disolución de reticulador (disolución B). La cantidad total de agua en el medio fue 45,06 g, incluyendo la procedente de HCl. La cantidad de cloroformo y cloruro de metileno se aumentó respecto a las cantidades usadas con ácido acrílico (Ejemplo 1) para mantener una relación similar de disoluciones orgánica a acuosa.

40 En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. La disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la "primera suspensión") a 235 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La velocidad de agitación se redujo a 223 rpm y la primera suspensión se calentó a 50,4°C. La suspensión se mantuvo a la misma velocidad de agitación y temperatura durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 223 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar el agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, el material obtenido fue demasiado blando para aislarse. La masa blanda se lavó con acetona y después se filtró de nuevo. El material se lavó adicionalmente con 100 mL de metanol y se lavó de nuevo dos veces con porciones de 80 mL de etanol. Finalmente los sólidos se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 100°C. Las microesferas resultantes se obtuvieron como un polvo fino con un tinte amarillo. El rendimiento final de microesferas secas fue 6,29 g.

55 Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilaban generalmente de 30 micras a 230 micras como se mide a partir de fotos adquiridas por medio de microscopía de barrido electrónico. El hinchado de las microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 536 g de agua/g de microesferas.

Ejemplo 38

Preparación de microesferas hinchables usando la sal sódica de ácido estirenosulfónico y ácido acrílico.

En un matraz de tres cuellos de 1L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 244 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,175 g de N,N'-metilbisacrilamida (2,4% en moles de contenido total de monómero: hidrato de sal sódica de ácido estirenosulfónico y ácido acrílico), 4,335 g de Triton™ X-405 (polioxietileno (40) isoocitilfeniléter – disolución al 70% en agua), y 17,76 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 4,785 g de ácido 4-estirenosulfónico, hidrato de sal sódica (0,0236 moles) y 4,785 g de ácido acrílico (0,068 moles), además se añadieron 15,24 g de agua a esta disolución (la disolución tenía un pH de 1) (disolución C). La disolución de monómero se añadió entonces a la disolución de reticulador (disolución B).

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g del azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano), y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la "primera suspensión") a 275 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La velocidad de agitación se redujo a 222 rpm y la primera suspensión se calentó a 50,4°C. La suspensión se mantuvo a la misma velocidad de agitación y temperatura durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 223 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar el agua de las microesferas, y las microesferas se dejaron agitar una hora adicional. Las microesferas se filtraron entonces, el material obtenido fue demasiado blando para aislarse. La masa blanda se lavó con acetona y se filtró entonces de nuevo. El material se lavó adicionalmente con 100 mL de metanol y se lavaron de nuevo dos veces con porciones de 80 mL de etanol. Finalmente los sólidos se secaron en un horno al vacío purgado con nitrógeno puesto a 70°C durante un periodo de tres días. Las microesferas resultantes se obtuvieron como un polvo fino con un tinte amarillo. El rendimiento final de las microesferas secas fue de 3,65 g.

Las microesferas secas resultantes mostraron diámetros que oscilan generalmente de 10 micras a 95 micras como se mide a partir de fotos adquiridas por medio de microscopía de barrido electrónico. El hinchado de microesferas se ensayó como se describe en los Métodos Generales. Cuando se expusieron al agua, las microesferas absorbieron 332 g de agua/g de microesferas.

Ejemplo 39

Preparación de microesferas hinchables usando ácido acrílico y reticulador de diacrilato de poli(etilenglicol).

En un matraz de tres cuellos de 1 L de fondo redondo, equipado con un agitador superior, termómetro, condensador de reflujo y puerto de entrada de nitrógeno, se preparó una disolución de 6,0 g de etilcelulosa, 200 mL de cloroformo y 72 mL de cloruro de metileno (disolución A). La mezcla se agitó a 180 rpm hasta que se disolvió la etilcelulosa. En un segundo matraz, se preparó una disolución de 0,25 g de metilcelulosa, 0,838 g de diacrilato de poli(etilenglicol) (2,4% en moles de monómero), 4,335 g de Triton™ X-405 (polioxietileno (40) isoocitilfeniléter – disolución al 70% en agua) y 24,9 g de agua (disolución B). En un tercer matraz separado se mezclaron 9,75 g de ácido acrílico y 10,82 g de una disolución acuosa de hidróxido sódico al 25% (para alcanzar un pH de entre 5 y 6) (disolución C). Esta disolución de ácido acrílico se añadió entonces a la disolución acuosa (disolución B).

En este punto, mientras se agitaba rápidamente la mezcla de disoluciones B y C, se añadieron 0,025 g de azoiniciador soluble en agua VA-044 (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano) y la disolución resultante se agitó durante 5 min. Esta disolución (la "primera disolución") se añadió entonces al matraz de fondo redondo que contenía la disolución A (la "segunda disolución"). La mezcla de reacción resultante se dejó agitar (la "primera suspensión") a 327 rpm durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. La velocidad de agitación se redujo a 224 rpm y la primera suspensión se calentó a 50,4°C. La suspensión se mantuvo a la misma velocidad de agitación y temperatura durante casi 6 h para permitir la formación esencial de microesferas (la "segunda suspensión"). La segunda suspensión se agitó entonces a 225 rpm durante otras 14 h a temperatura ambiente para asegurar la completa polimerización. Después de este tiempo, aproximadamente 250 mL de metanol se añadieron lentamente a la segunda suspensión para eliminar el agua de las microesferas, y las microesferas se agitaron durante una hora adicional.

Las microesferas resultantes se agruparon juntas al fondo del matraz de reacción en una gran masa que fue difícil de separar en microesferas individuales. Una pequeña porción de la masa de microesferas recogida se eliminó usando pincitas. Diversos disolventes, incluyendo acetona, metanol, etanol y hexano, se utilizaron para ensayar si la porción podría separarse en microesferas individuales. Las microesferas individuales se observaron bajo un microscopio óptico de mesa. Finalmente, se encontró que el agua era capaz de disolver las gotas.

El uso del reticulador muy hidrófilo diacrilato de poli(etilenglicol) con ácido acrílico produjo microesferas que fueron difíciles de aislar. Se cree que este reticulador y reticuladores hidrófilos similares trabajarían mejor con monómeros

más hidrófobos que proporcionarían un mejor equilibrio de las propiedades hidrófobas e hidrófilas para las microesferas.

Ejemplo 40

Masa de tejido in vivo de esfínter esofágico inferior con microesferas hinchables/deformables.

- 5 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y se prepara una suspensión de microesferas añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Una jeringa de 12 mL se usa para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 14F. Un endoscopio se introduce de forma nasal y se guía al nivel de la unión gastro-esofágica. El catéter se introduce a través de un endoscopio y la suspensión se inyecta en las paredes del esfínter esofágico inferior. La inyección se hace a lo largo de la capa de músculo o capa submucosa profunda del cardias gástrico. Se llevan a cabo múltiples inyecciones de una manera circunferencial alrededor del esófago bajo control endoscópico. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en el esfínter esofágico inferior.

Ejemplo 41

Masa de tejido in vivo del esfínter urinario de la vejiga con microesferas hinchables/deformables.

- 15 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 14F. El catéter se introduce en la uretra y la suspensión se inyecta en las paredes del esfínter de la vejiga. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en el esfínter de la vejiga.

Ejemplo 42

Oclusión in vivo del tracto urinario con microesferas hinchables/deformables.

- 25 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y la suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 9F. El catéter se introduce de forma percutánea, por medio de aproximación trans-renal; la posición del catéter se visualiza inyectando medio de contraste estándar. La suspensión se inyecta entonces en el uréter distal. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en el uréter distal, dando por resultado la oclusión completa del uréter. La oclusión se confirma inyectando medio de contraste estándar en el catéter.

Ejemplo 43

Aumento dérmico in vivo con microesferas hinchables/deformables.

- 35 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Las suspensiones se inyectan entonces en la piel a través de una aguja de calibre 30 o menor, usando una jeringa de 10 ml, en el sitio deseado de aumento dérmico. La suspensión se inyecta en la capa dérmica deseada (epidermis, dermis, grasa o capa subcutánea). Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en la posición de la inyección.

Ejemplo 44

- 40 Relleno in vivo de divertículo intestinal con microesferas hinchables/deformables.

Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 14F. Un colonoscopio se introduce rectalmente y se guía al sitio de la bolsa diverticular. El catéter se introduce y se coloca en el sitio de la bolsa diverticular bajo la guía colonoscópica. La suspensión se inyecta en la bolsa diverticular. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y rellenan la bolsa diverticular. Las microesferas se aseguran en el divertículo. El relleno completo del divertículo se confirma por visualización de bario del tracto gastrointestinal.

Ejemplo 45

- 50 Relleno in vivo del conducto pancreático con microesferas hinchables/deformables.

5 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Una jeringa de 12 mL se usa para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 5F. Un endoscopio se introduce nasalmente y se guía al conducto pancreático. El catéter se introduce y se coloca en el sitio del conducto pancreático; la posición del catéter se visualiza inyectando medio de contraste estándar. La suspensión se inyecta en el conducto pancreático. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y rellenan el conducto. Las microesferas se aseguran en el conducto pancreático. El relleno completo del conducto pancreático se confirma inyectando medio de contraste estándar.

Ejemplo 46

10 Oclusión in vivo de la trompa de Falopio con microesferas hinchables/deformables.

15 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y la suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Una jeringa de 12 mL se usa para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter curvado 5F. El catéter se introduce vaginalmente en el útero y se coloca en la trompa de Falopio; la posición del catéter se visualiza inyectando medio de contraste estándar. La suspensión se inyecta entonces en la trompa de Falopio. Al contacto con los fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en la trompa de Falopio, dando por resultado la oclusión completa de la trompa de Falopio. La oclusión se confirma inyectando medio de contraste estándar en el catéter.

Ejemplo 47

20 Oclusión in vivo de conductos deferentes con microesferas hinchables/deformables.

25 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y la suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de una aguja de linfangiograma de calibre 30. La aguja se introduce de trans-escrotalmente y se coloca en el conducto deferente; la posición de la aguja se visualiza inyectando medio de contraste estándar. La suspensión se inyecta entonces en el conducto deferente. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en los conductos deferentes, dando por resultado la completa oclusión de los conductos deferentes. La oclusión se confirma inyectando medio de contraste estándar en la aguja.

Ejemplo 48

30 Oclusión in vivo del punto con microesferas hinchables/deformables.

35 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y se prepara una suspensión de microesferas añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de una aguja de calibre 25. El párpado inferior se baja para exponer el punto inferior, y la aguja se inserta en la abertura del punto. La suspensión se inyecta entonces en el punto. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en el punto, dando por resultado la completa oclusión del punto. La oclusión se confirma por el aumento de retención de lágrima en el ojo tratado.

Ejemplo 49

Oclusión in vivo de la arteria bronquial con microesferas hinchables/deformables.

40 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 3F. El catéter se introduce percutáneamente y se coloca en el orificio de la arteria bronquial a ocluir; la posición del catéter se visualiza inyectando medio de contraste estándar. La suspensión se inyecta entonces en la arteria bronquial. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan, dando por resultado la completa oclusión de la arteria bronquial. La oclusión se confirma inyectando medio de contraste estándar en el catéter.

Ejemplo 50

Relleno in vivo de espacios externos a los órganos con microesferas hinchables/deformables.

50 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y se prepara una suspensión de microesferas añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Las suspensiones se inyectan entonces percutáneamente a través de una aguja de calibre 30 o menor, usando una jeringa de 10 mL, en el sitio deseado de relleno de espacio. La suspensión

se inyecta en el espacio externo al órgano deseado (peritoneo, pericardio, pleura). Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en la posición de la inyección.

Ejemplo 51

Relleno in vivo de cámaras cardiacas con microesfera hinchables/deformables.

- 5 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1, y una suspensión de microesferas se prepara añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Se usa una jeringa de 12 mL para inyectar cada suspensión preparada a través de un catéter 6F. El catéter se introduce percutáneamente y se coloca en la cámara cardiaca a rellenar (aurícula derecha, ventrículo derecho, aurícula izquierda o ventrículo izquierdo). La posición del catéter se visualiza inyectando medio de contraste estándar. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y rellenan el espacio entre órganos en la posición de la inyección.
- 10

Ejemplo 52

Reparto de fármacos in vivo con microesferas hinchables/deformables.

- 15 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1. Un agente terapéutico en una disolución o suspensión acuosa se añade a las microesferas y las microesferas se dejan que absorban el agente terapéutico. Las microesferas se secan y se preparan adicionalmente añadiendo 200 a 1000 mg de microesferas a 5 mL de DMSO en un tubo Falcon de 15 mL. Las suspensiones se hacen 48 h antes de la administración. Las suspensiones se inyectan entonces percutáneamente a través de una aguja de calibre 30 o menor, usando una jeringa de 10 mL, en el sitio deseado de reparto de fármaco. La suspensión se inyectó en el espacio deseado (piel, peritoneo, pericardio, pleura). Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y se aseguran en la posición de la inyección. El fármaco se libera en un modo controlado en el sitio de la inyección.
- 20

Ejemplo 53

Reparto de fármaco transdérmico in vivo con microesferas hinchables/deformables.

- 25 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1. Un agente terapéutico en una disolución o suspensión acuosa se añade a las microesferas y las microesferas se dejan que absorban el agente terapéutico. Las microesferas se secan y se preparan adicionalmente incorporando las microesferas en un parche transdérmico. El parche se aplica a la piel en el sitio deseado de reparto de fármaco. Al contacto con los fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan y el fármaco se libera en un modo controlado en el sitio de la aplicación del parche.

Ejemplo 54

- 30 Vendaje in vivo de sitios dañados con microesferas absorbidas hinchables/deformables.

Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1. Un agente terapéutico en una disolución o suspensión acuosa se añade a las microesferas y las microesferas se dejan que absorban el agente terapéutico. Las microesferas se secan y se preparan adicionalmente incorporando las microesferas en un vendaje. El vendaje se aplica a la piel en el sitio de la herida y el sangrado. Al contacto con fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan para parar el sangrado y el fármaco se libera en un modo controlado en el sitio de la aplicación del vendaje.

35

Ejemplo 55

Vendaje in vivo de sitios dañados con microesferas hinchables/deformables.

- 40 Las microesferas se hacen como se describe en el Ejemplo 1. Las microesferas se preparan adicionalmente incorporando las microesferas en un vendaje. El vendaje se aplica a la piel en el sitio del daño y el sangrado. Al contacto con los fluidos fisiológicos, las microesferas se hinchan para parar el sangrado en el sitio de aplicación del vendaje.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para hacer un preparado de microesferas, que comprende:

a) formar una primera disolución que tiene un pH de al menos 3 que comprende:

(i) agua;

5 (ii) al menos un monómero miscible en agua seleccionado del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo;

con tal que:

10 La primera disolución no contenga un monómero seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloleitano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloleitano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y sales de ácido estireno-sulfónico;

15 (iii) un agente de reticulado que es miscible en la primera disolución en menos que o igual a 5% en moles, respecto a los moles totales de monómero y agente de reticulado, seleccionándose dicho agente de reticulado del grupo que consiste en N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N'-metilen-bis-metacrilamida, N-metilolacrilamida, N-metilolmetacrilamida, acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, diacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de polietilenglicol, sales de metal polivalente de ácido acrílico y ácido metacrílico, fosfoacrilatos de divinilbenceno, divinilbenceno, divinilfenilfosfina, divinilsulfona, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano, fosfometacrilatos, etilenglicol-diglicidiléter, glicerín-triglicidiléter, glicerín-diglicidiléter y polietilenglicol-diglicidiléter;

20 (iv) un coloide protector soluble en agua;

(v) un emulsionante; y

(vi) un azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura:

25 b) formar una segunda disolución que comprende una mezcla de cloruro de metileno y cloroformo o una mezcla de cloruro de metileno y un disolvente o mezcla de disolventes que tienen una suma de diferencias en parámetros de solubilidad de Hansen respecto a los parámetros de solubilidad de Hansen del cloroformo de menos que 0,21, y un coloide protector soluble orgánico;

c) formar una primera suspensión con agitación que comprende la primera y segunda disolución a una temperatura por debajo de la temperatura de iniciación del azoiniciador de (a);

30 d) aumentar la temperatura de la primera suspensión en agitación a una temperatura a la que se activa el azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura;

e) agitar la primera suspensión hasta que forma una segunda suspensión que comprende un precipitado gelatinoso suspendido en una fase líquida orgánica, en donde se forman las microesferas;

f) permitir enfriarse a la segunda suspensión a una temperatura que está a o por debajo de 30°C mientras se agita la segunda suspensión;

35 g) lavar la segunda suspensión al menos una vez con un disolvente deshidratante en donde el agua se elimina de las microesferas formando un preparado de microesferas; y

h) recuperar el preparado de microesferas.

2. Un procedimiento para hacer un preparado de microesferas, que comprende:

a) formar una primera disolución que tiene un pH menor que 3 que comprende:

40 (i) agua;

(ii) al menos un monómero miscible en agua seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-acriloiletano-sulfónico, ácido 2-metacriloleitano-sulfónico, sales de ácido 2-acriloiletano-sulfónico y ácido 2-metacriloleitano-sulfónico, ácido estireno-sulfónico y sales de ácido estireno-sulfónico;

45 (iii) opcionalmente al menos un monómero miscible en agua seleccionado del grupo que consiste en: ácido acrílico, ácido metacrílico, sales de ácido acrílico y ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilamidas N-sustituidas, metacrilamidas N-sustituidas, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxietilo;

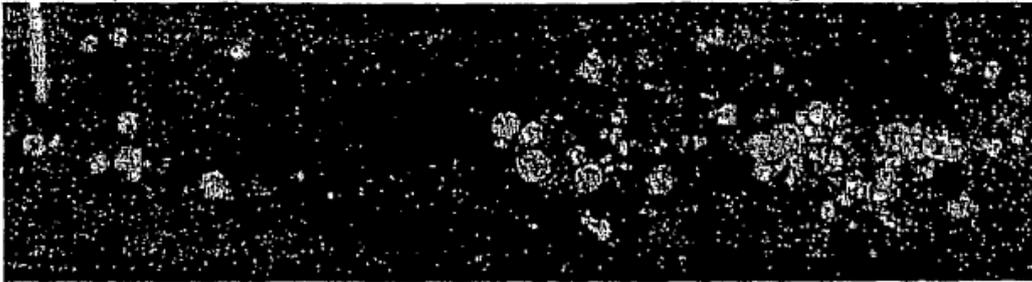
- (iv) un agente de reticulado que es miscible en la primera disolución en menos que o igual a 5% en moles respecto a los moles totales de monómero y agente de reticulado, seleccionándose dicho agente de reticulado del grupo que consiste en N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N'-metilen-bis-metacrilamida, N-metilolacrilamida, N-metilolmetacrilamida, acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, diacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de polietilenglicol, sales de metal polivalente de ácido acrílico y ácido metacrílico, fosfoacrilatos de divinilbenceno, divinilbenceno, divinilfenilfosfina, divinilsulfona, 1,3-diviniltetrametildisiloxano, 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano, fosfometacrilatos, etilenglicol-diglicidiléter, glicerín-triglicidiléter, glicerín-diglicidiléter y polietilenglicol-diglicidiléter;
- (v) un coloide protector soluble en agua;
- 10 (vi) un emulsionante; y
- (vii) un azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura;
- b) formar una segunda disolución que comprende una mezcla de cloruro de metileno y cloroformo o una mezcla de cloruro de metileno y un disolvente o mezcla de disolventes que tienen una suma de diferencias en parámetros de solubilidad de Hansen respecto a los parámetros de solubilidad de Hansen de cloroformo de menos que 0,21, y un coloide protector soluble orgánico;
- 15 c) formar una primera suspensión con agitación que comprende la primera y segunda disolución a una temperatura por debajo de la temperatura de iniciación del azoiniciador de (a);
- d) aumentar la temperatura de la primera suspensión en agitación a una temperatura a la que se activa el azoiniciador soluble acuoso a baja temperatura;
- 20 e) agitar la primera suspensión hasta que forma una segunda suspensión que comprende un precipitado gelatinoso suspendido en una fase líquida orgánica, en donde se forman microesferas;
- f) permitir enfriarse a la segunda suspensión a una temperatura que está a o por debajo de 30°C mientras se agita la segunda suspensión;
- 25 g) lavar la segunda suspensión al menos una vez con un disolvente deshidratante en donde el agua se elimina de las microesferas formando un preparado de microesferas; y
- h) recuperar el preparado de microesferas.
3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde la mezcla de disolventes de (b) se selecciona del grupo que consiste en: 20% en volumen de oleato de metilo:80% en volumen de acetato de fenetilo, 30% en volumen de heptanoato de etilo:70% en volumen de acetato de fenetilo, 30% en volumen de octanoato de metilo:70% en volumen de acetato de fenetilo, 40% en volumen de carbonato de dietilo:60% en volumen de acetato de metilfenilo, 20% en volumen de fenilpropilmetiléter:80% en volumen de fenilpropiléter, 70% en volumen de etilfeniléter:30% en volumen de fenilpropilmetiléter, 20% en volumen de dietilenglicol-butiléter:80% en volumen de fenilpropilmetiléter, 20% en volumen de propionato de etilo:80% en volumen de acetato de fenilpropilo, 80% en volumen de acetato de fenilpropilo:20% en volumen de tripropilamina, 90% en volumen de fenilpropiléter:10% en volumen de tolueno, 30% en volumen de hexanoato de metilo:70% en volumen acetato de fenilpropilo y 20% en volumen de palmitato de isopropilo:80% en volumen de acetato de fenetilo.
4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el azoiniciador es dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano.
5. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el coloide protector de (a) es metilcelulosa.
- 40 6. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el coloide protector de (b) es etilcelulosa.
7. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el emulsionante es un preparado de alcohol de alquilaril-poliéter.
8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el monómero es una combinación que comprende ácido acrílico y al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste en: acrilato sódico, acrilamida, metacrilato de 45 2-hidroxietilo y acrilato de 2-hidroxietilo.
9. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el agente de reticulado es N,N'-metilenbisacrilamida.
10. Un procedimiento según la reivindicación 2, en donde el monómero es ácido estireno-sulfónico o una combinación que comprende ácido estireno-sulfónico y sal sódica de ácido estireno-sulfónico.
11. Un procedimiento para hacer un preparado de microesferas, que comprende:
- 50 a) formar una primera disolución que tiene un pH de entre 5 y 9 que comprende:

- (i) agua,
- (ii) una combinación que comprende ácido acrílico y al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste en acrilato sódico, acrilamida, metacrilato de 2-hidroxietilo y acrilato de 2-hidroxietilo;
- 5 (iii) el agente de reticulado N,N'-metilbisacrilamida en 0,08% en moles a 2,3% en moles respecto a los moles totales del monómero y el agente de reticulado;
- (iv) coloide protector de metilcelulosa;
- (v) un preparado de alcohol de alquilaril-poliéter como emulsionante, y
- (vi) azoiniciador de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano;
- 10 b) formar una segunda disolución que comprende una combinación de cloruro de metileno y cloroformo, o cloruro de metileno y una mezcla de 30% en volumen de heptanoato de etilo:70% en volumen de acetato de fenetilo; en una relación de volumen que está entre 1:5 y 5:1, y etilcelulosa como un coloide protector soluble orgánico;
- c) formar una primera suspensión con agitación que comprende la primera y segunda disolución a una temperatura de aproximadamente 25°C;
- 15 d) aumentar la temperatura de la primera suspensión en agitación a una temperatura de 51°C a 52°C, en donde se activa el azoiniciador de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano;
- e) agitar la primera suspensión hasta que forme una segunda suspensión que comprende un precipitado gelatinoso suspendido en una fase líquida orgánica, en donde se forman microesferas;
- f) permitir que se enfríe la segunda suspensión que contiene microesferas a una temperatura de aproximadamente 25°C mientras se agita la segunda suspensión,
- 20 g) lavar la segunda suspensión dos veces con metanol, seguido por una vez con etanol, en donde el agua se elimina de las microesferas formando un preparado de microesferas;
- h) recuperar el preparado de microesferas; y
- i) secar el preparado de microesferas para formar un polvo de microesferas de flujo libre.
12. Un procedimiento para hacer un preparado de microesferas, que comprende:
- 25 a) formar una primera disolución que tiene un pH de menos que 3 que comprende:
- (i) agua;
- (ii) ácido estireno-sulfónico o una combinación que comprende ácido estireno-sulfónico y sal sódica de ácido estireno-sulfónico;
- 30 (iii) el agente de reticulado N,N'-metilbisacrilamida en 0,08% en moles a 2,3% en moles respecto a los moles totales de monómero y agente de reticulado;
- (iv) coloide protector de metilcelulosa;
- (v) un preparado de alcohol de alquilaril-poliéter como emulsionante, y
- (vi) azoiniciador de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano;
- 35 b) formar una segunda disolución que comprende una combinación de cloruro de metileno y cloroformo, o cloruro de metileno y una mezcla de 30% en volumen de heptanoato de etilo:70% en volumen de acetato de fenetilo, en una relación de volumen que está entre 1:5 y 5:1, y etilcelulosa como un coloide protector soluble orgánico;
- c) formar una primera suspensión con agitación que comprende la primera y segunda disolución a una temperatura de aproximadamente 25°C;
- 40 d) aumentar la temperatura de la primera suspensión en agitación a una temperatura de 51°C a 52°C, en donde se activa el azoiniciador de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-[2-imidazolin-2-il])propano;
- e) agitar la primera suspensión hasta que forma una segunda suspensión que comprende un precipitado gelatinoso suspendido en una fase líquida orgánica, en donde se forman las microesferas;
- f) permitir que se enfríe la segunda suspensión que contiene microesferas a una temperatura de aproximadamente 25°C mientras se agita la segunda suspensión;

g) lavar la segunda suspensión dos veces con metanol, seguido por una vez con etanol en donde el agua se elimina de las microesferas que forman un preparado de microesferas;

h) recuperar el preparado de microesferas; y

i) secar el preparado de microesferas para formar un polvo de microesferas de flujo libre.



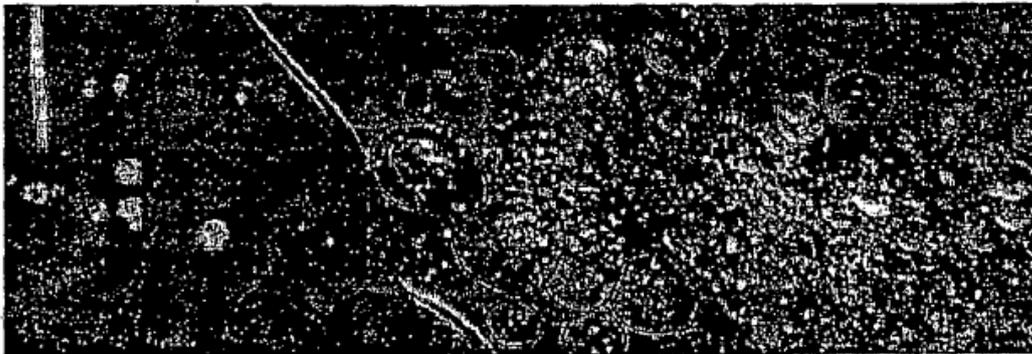
T = 0 seg.

FIG. 1A



T = 4 seg.

FIG. 1B



T = 14 seg.

FIG. 1C

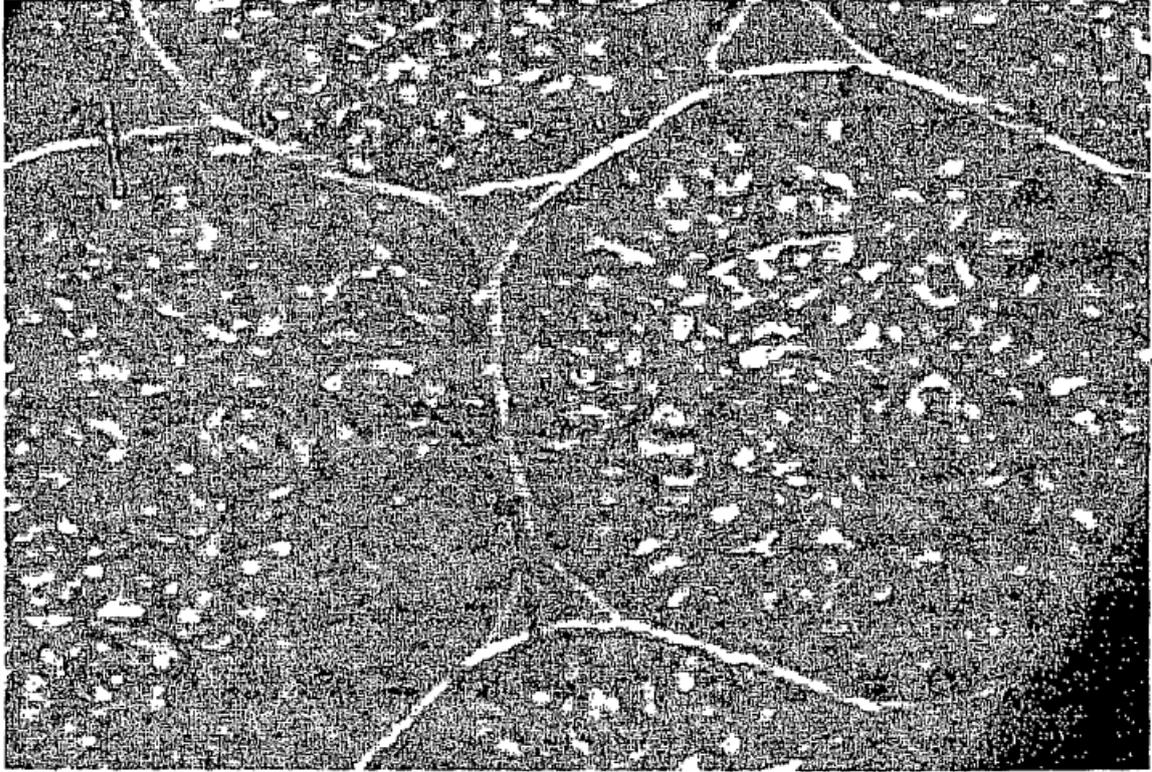


FIG. 2A

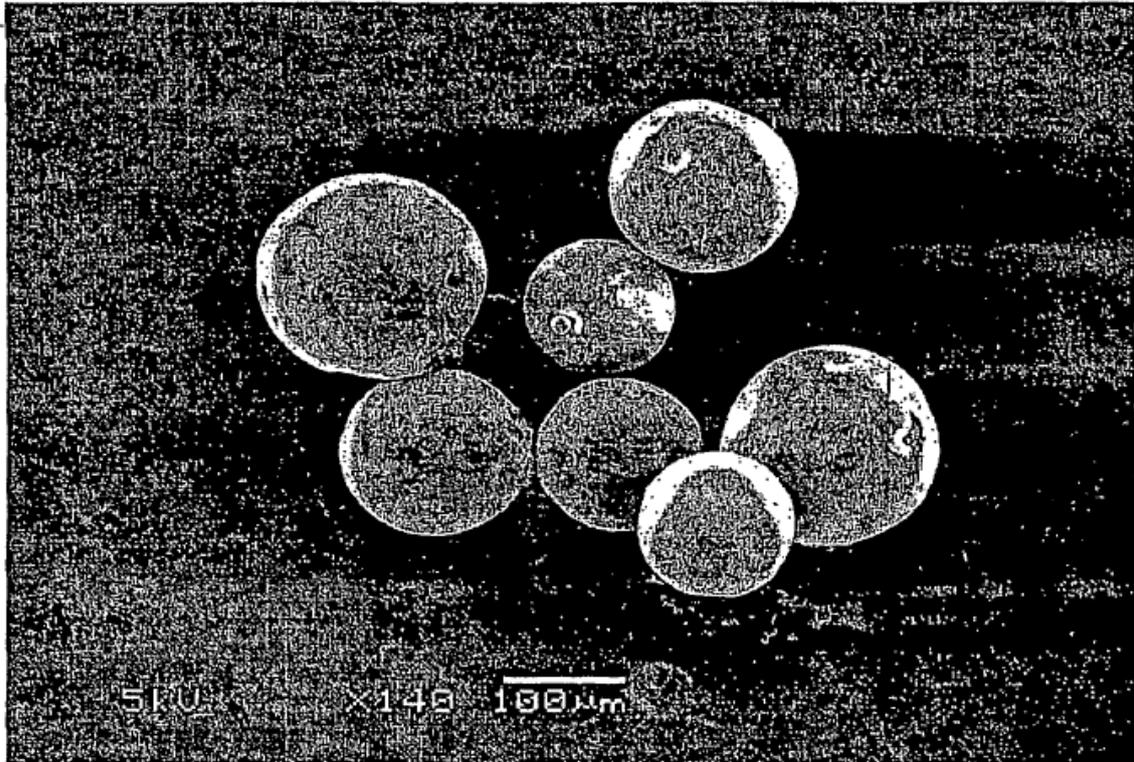


FIG. 2B

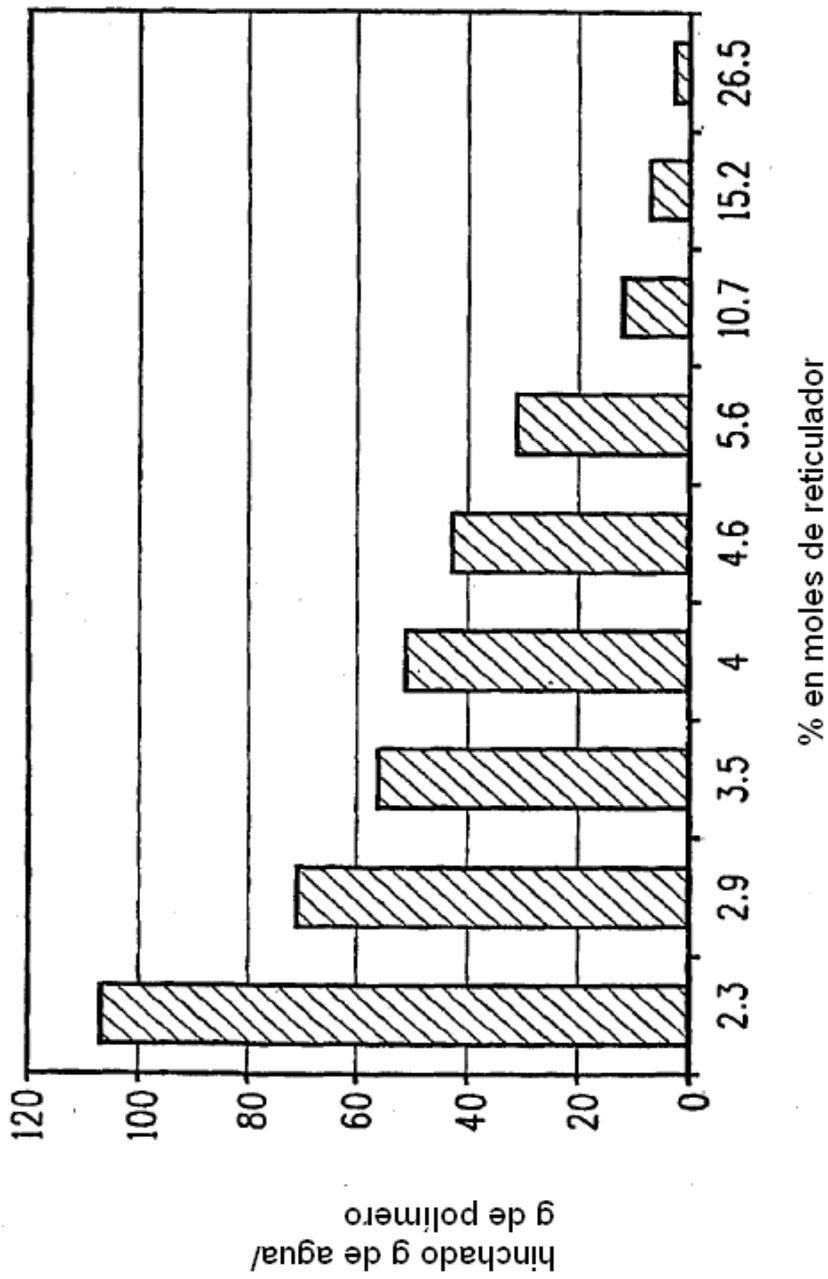


FIG. 3

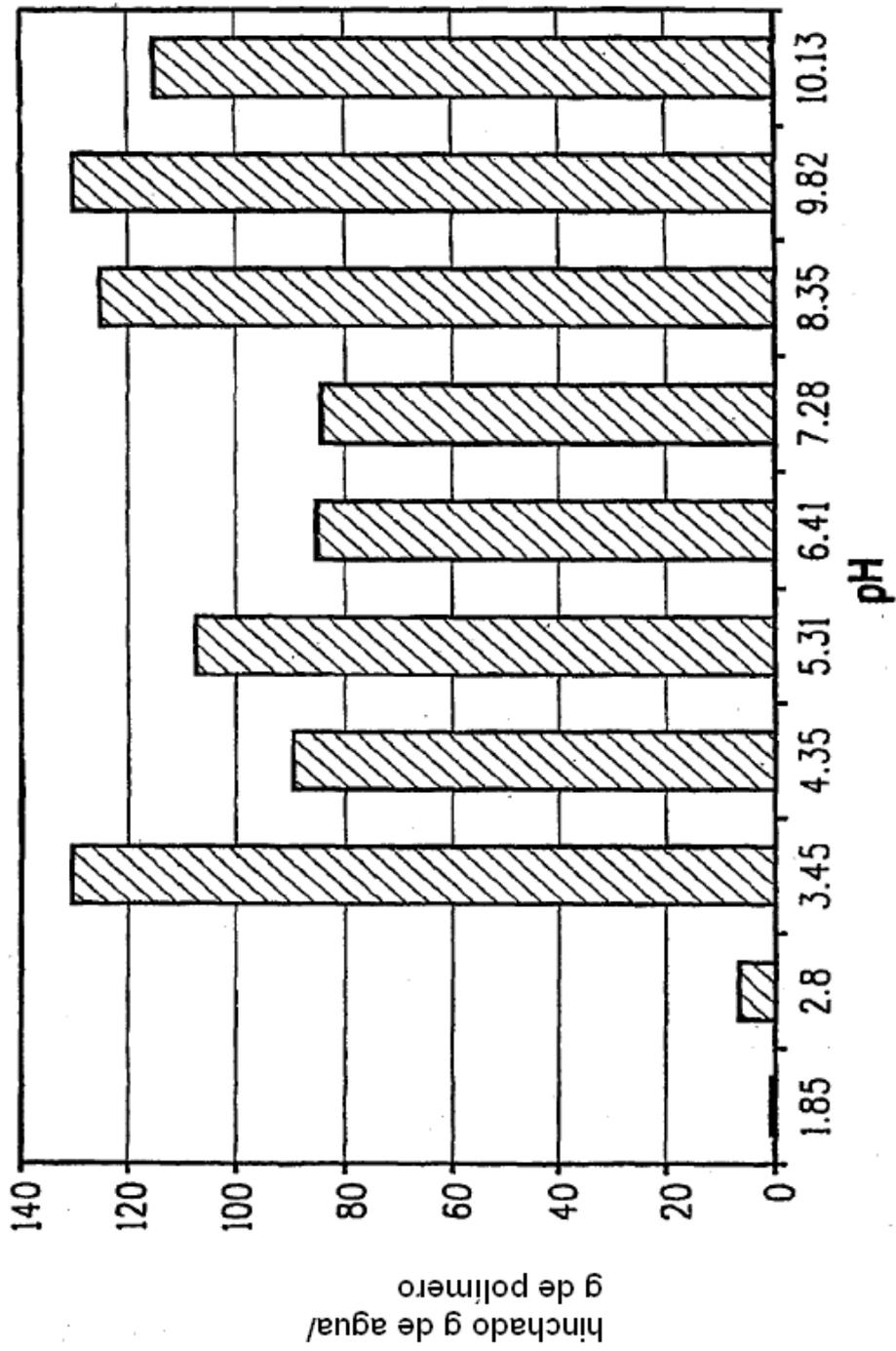
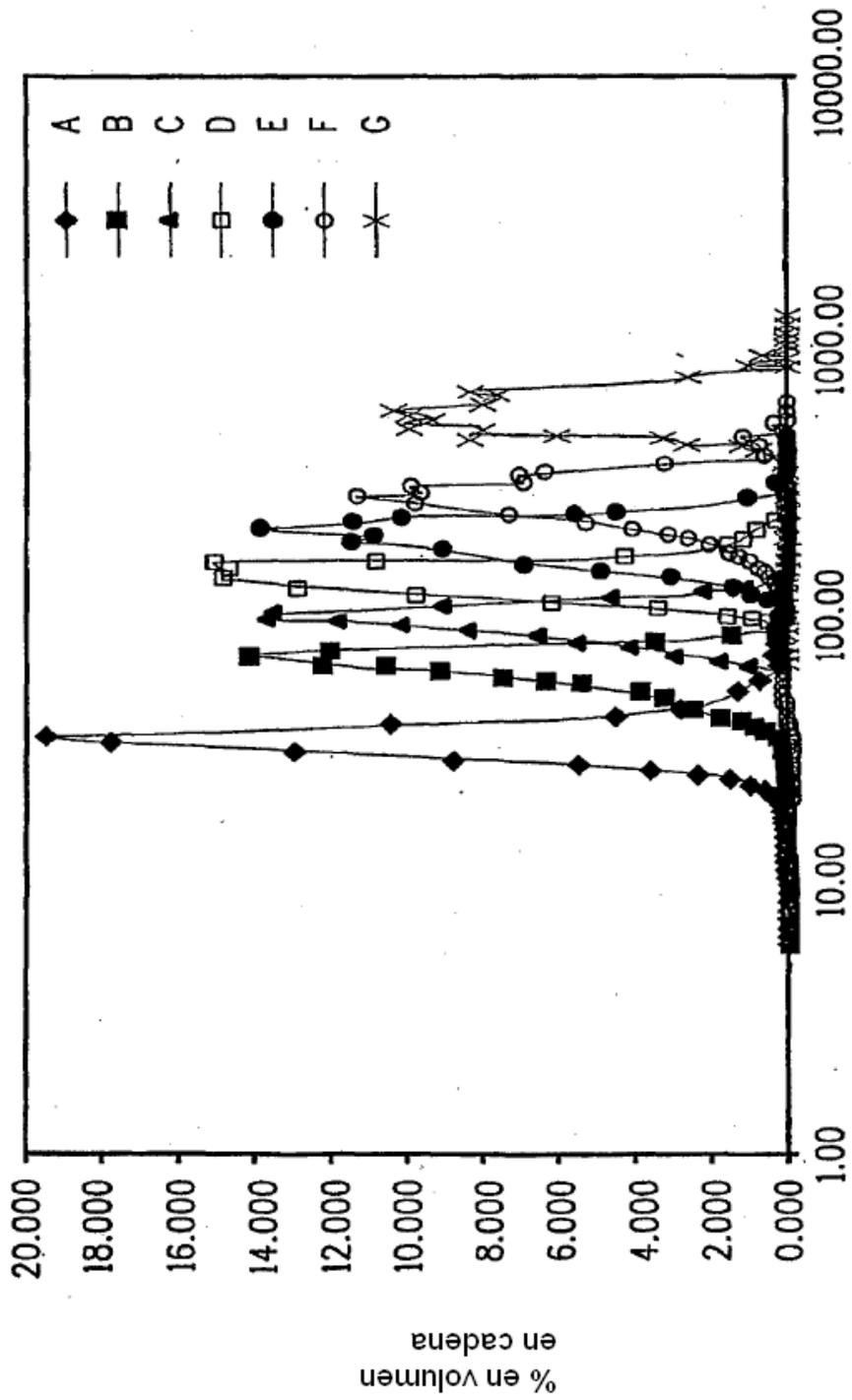


FIG. 4



tamaño en micras

FIG. 5A

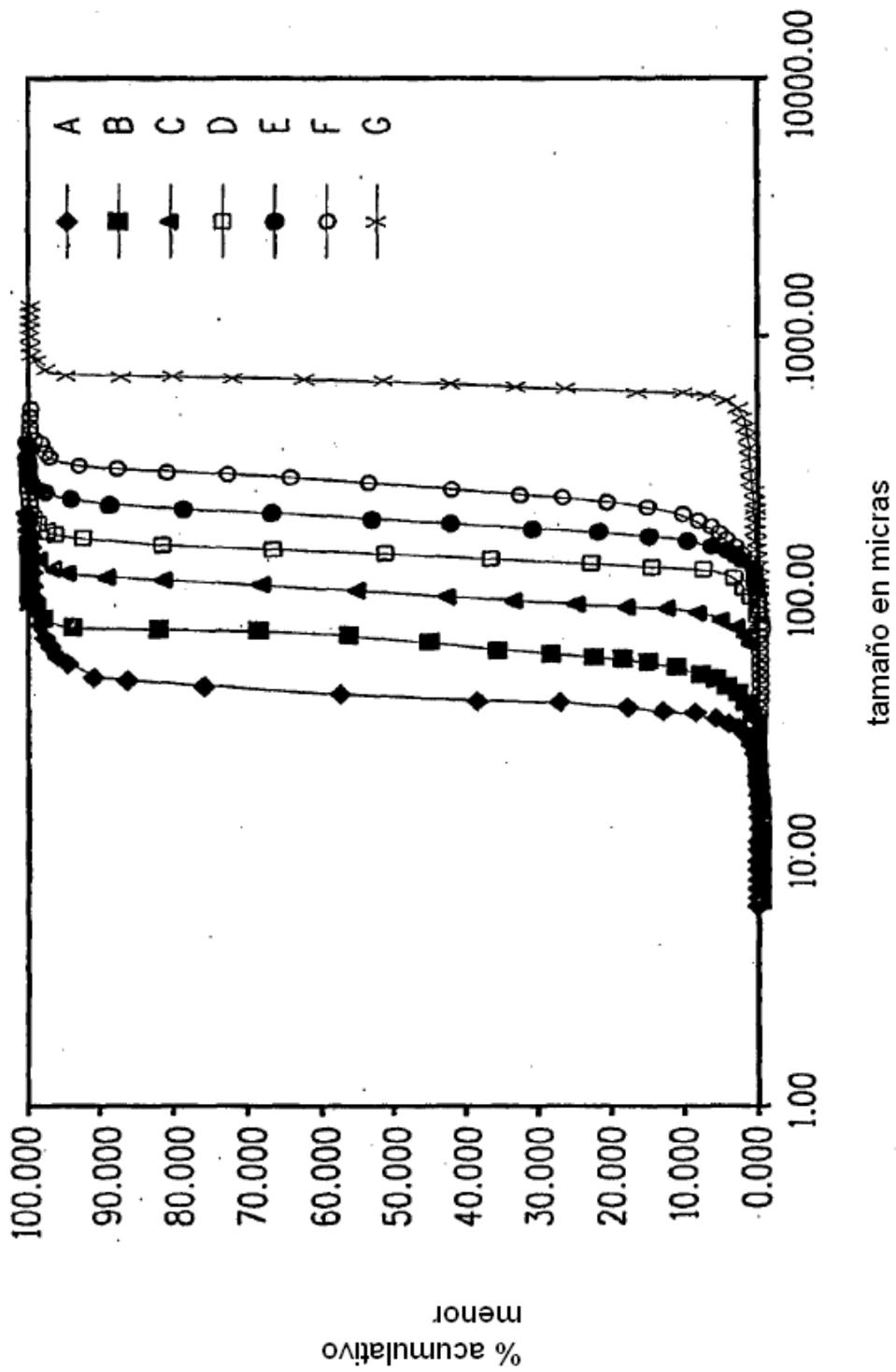


FIG. 5B

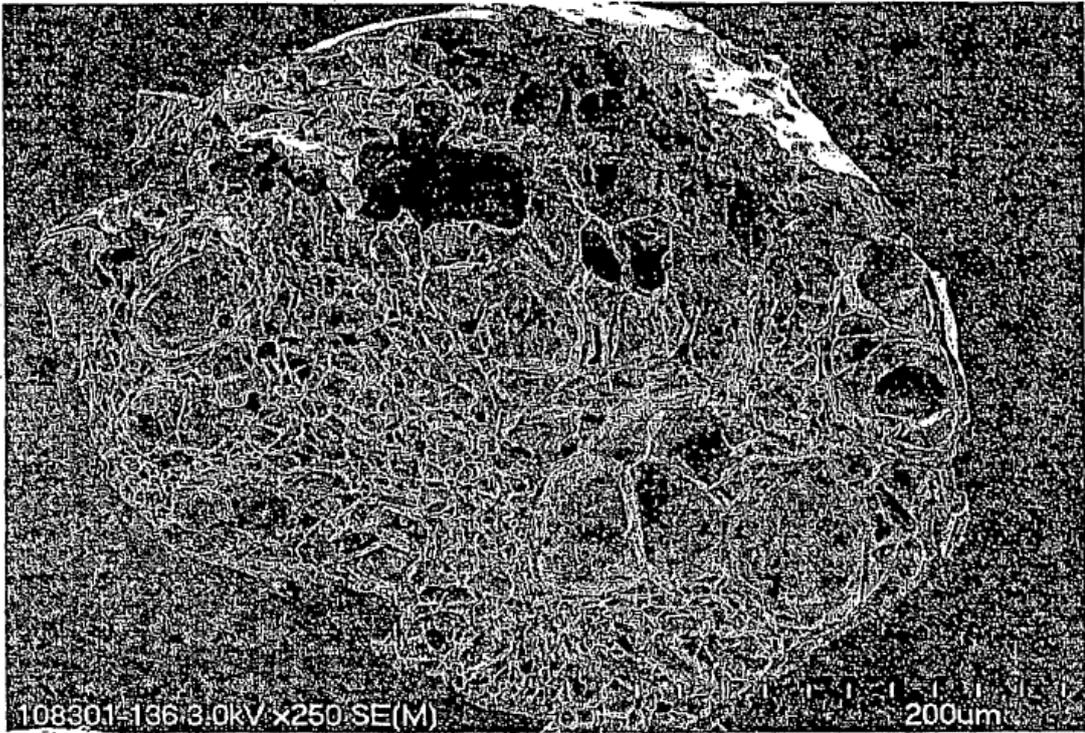
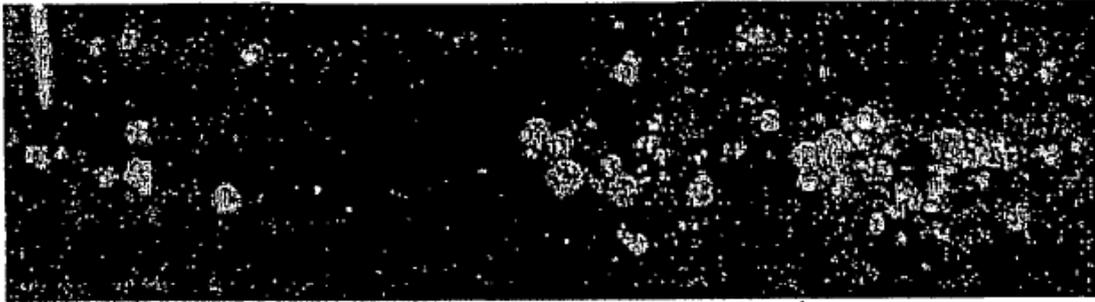


FIG. 6A



FIG. 6B



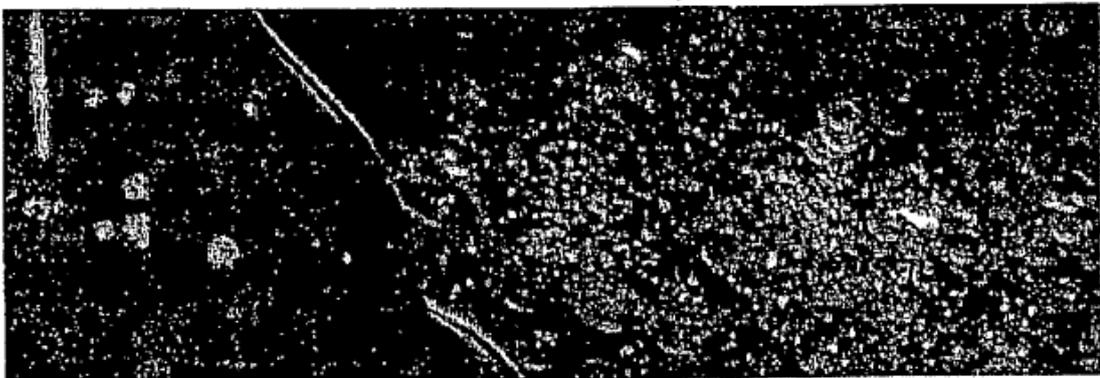
T = 0 seg.

FIG. 7A



T = 4 seg.

FIG. 7B



T = 14 seg.

FIG. 7C