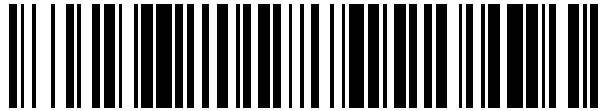


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 070**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**B01D 9/00** (2006.01)

**B01J 13/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07112474 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2014280**

54 Título: **Micropartículas, sustituto sanguíneo y procedimiento de formación de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.01.2015**

73 Titular/es:

**CC-ERY GMBH (100.0%)**  
**Robert-Rössle-Str. 10**  
**13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**BÄUMLER, HANS, DR. y**  
**GEORGIEVA, RADOSTINA, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 527 070 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

Micropartículas, sustituto sanguíneo y procedimiento de formación de los mismos

5 La presente descripción describe realizaciones que se relacionan con un procedimiento para la formación de micropartículas y, en particular, micropartículas que comprenden al menos un compuesto reticulado. Otras realizaciones se refieren a micropartículas.

### Antecedentes de la invención

10 En una escala de calibre, las micropartículas se sitúan entre las nanopartículas a la izquierda y las partículas macroscópicas a la derecha. No hay fronteras nítidas en ambas direcciones y el rango de tamaño se define principalmente entre 100 nm y 100 µm. Las células biológicas, por ejemplo, pertenecen a las micropartículas si se tiene en cuenta el tamaño. Las micropartículas se clasifican según diferentes aspectos: naturales y sintéticas; orgánicas e inorgánicas; cristalinas y amorfas; porosas y no porosas; de estructura núcleo-envolvente, de matriz u homogénea etc. Los procedimientos de fabricación de las micropartículas se dividen generalmente en procedimiento arriba-abajo y abajo-arriba. En el primer caso, un material macroscópico es aplastado por molienda o por

15 homogeneización de alta presión, en el segundo, las partículas se ensamblan a partir de sus compuestos moleculares por precipitación, cristalización, secado por pulverización, etc.

Además, en los últimos años, se han desarrollado procedimientos de ensamblaje de micropartículas que imitan los procesos biológicos. En general, las partículas son cultivadas por estructuración interactiva de materiales orgánicos e inorgánicos por un procedimiento llamado biomimético.

20 Algunos de los procedimientos descritos anteriormente permiten la síntesis de micropartículas con una estructura interna especial. Ejemplos típicos son micropartículas porosas con una superficie interior vasta debido a los poros y cavidades. Una estructura fina muy interesante se puede generar si las partículas porosas se utilizan para el montaje de las estructuras complementarias. Las partículas entonces consisten en la plantilla porosa y la estructura que llena los poros y cavidades.

25 Para una variedad de aplicaciones, se desea producir una gran cantidad de micropartículas, las cuales deben tener un tamaño medio bien definido. Además, las micropartículas formadas deben ser estables para poder ser almacenadas durante mucho tiempo. También se sigue deseando una fabricación fácil y rentable de micropartículas compuestas de diferentes compuestos.

30 En el documento US-5.069.936 se desvelan procedimientos para producir microesferas de proteínas que comprenden las etapas de (a) disolver una proteína, (b) añadir un agente de reticulación, (c) añadir un tensioactivo soluble en agua y (d) añadir un desolubilizante orgánico soluble en agua.

El artículo científico de Duan Li et al. "Hemoglobin protein hollow shells fabricated through covalent layer-by-layer technique", publicado en Biochemical and Biophysical Research Communications 354 (2007) pp. 357-362, describe un procedimiento para formar envoltorios huecos de proteína hemoglobina que se forman mediante adsorción alterna de hemoglobina y glutaraldehído sobre la superficie exterior de moldes.

### Sumario de la invención

35 En vista de lo anterior, se proporciona un procedimiento para la formación de micropartículas que es simple, versátil y adecuado para diferentes materiales. Las micropartículas formadas pueden estar compuestas de un único o de diferentes materiales o compuestos y pueden utilizarse para fines diferentes.

40 Según una realización, se proporciona un procedimiento para la formación de micropartículas. El procedimiento comprende las etapas de:

- proporcionar una primera solución que comprende al menos un anión;
- proporcionar una segunda solución que comprende al menos un catión;
- mezclar la primera solución con la segunda solución en presencia de al menos un primer compuesto para formar moldes porosos, en el que los moldes porosos se forman por precipitación de una sal que comprende el anión y el catión y en el que el primer compuesto se incorpora al menos parcialmente en los moldes porosos y
- 45 - al menos parcialmente, la reticulación del primer compuesto en los moldes porosos.

Según una forma de realización, se proporciona un procedimiento para la formación de micropartículas de acuerdo con la reivindicación 9.

Por los procedimientos anteriores, se pueden formar micropartículas que comprenden:

- 50 - al menos un primer compuesto que es reticulado y

- una estructura reticulada polimérica porosa o esponjosa que se forma al menos por el primer compuesto.

Según una realización, se proporciona un sustituto sanguíneo que comprende micropartículas que comprenden una estructura de red polimérica porosa o esponjosa, que se forma al menos mediante hemoglobina reticulada. A diferencia de las partículas que se forman por reticulación en una solución libre y que están densamente empaquetadas, las micropartículas, como se describe en este documento son de celdas abiertas o de poros abiertos. El tamaño medio de las micropartículas usadas como un sustituto sanguíneo es de al menos 1  $\mu\text{m}$  y puede estar en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y generalmente en el intervalo de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones, los moldes porosos se forman por precipitación de una sal en presencia de un compuesto para ser incorporado en los moldes porosos. El compuesto se proporciona en al menos una de la primera y la segunda solución o en ambas. Durante la precipitación, los moldes crecen y acumulativamente incorporan el compuesto. El compuesto se puede proporcionar en una alta concentración que produce una alta tasa de incorporación de manera que la carga de los moldes con el compuesto es alta. En algunas realizaciones, una mezcla de compuestos se incorpora en los moldes porosos en crecimiento. En otras realizaciones, al menos dos compuestos se incorporan posteriormente mediante una precipitación por etapas o de precipitación de los moldes porosos.

El catión y el anión se seleccionan generalmente de manera que forman una sal que es poco soluble en el disolvente, que es generalmente una solución acuosa. El término "sal poco soluble" tal como se utiliza en esta descripción pretende describir que la sal no es sustancialmente soluble en agua, de modo que los moldes porosos formados son sustancialmente estables en agua.

Una ventaja adicional es que los moldes llenos con el compuesto y, después de la disolución opcional de los moldes, las micropartículas comprendidas por el compuesto se pueden producir en masa para obtener grandes cantidades de micropartículas.

La reticulación del compuesto incorporado en los moldes porosos permite una formación fácil de los polímeros y evita las duras condiciones que se producirían en condiciones de polimerización normales, tales como polimerización radical. Por lo tanto, los polímeros a base de compuestos delicados tales como biomoléculas, por ejemplo, proteínas y enzimas, se pueden formar en condiciones suaves que sustancialmente no afectan al funcionamiento del compuesto. Por lo tanto, el compuesto reticulado mantiene su característica específica que hace que la micropartícula formada sea adecuada para aplicaciones que requieren que el compuesto reticulado mantenga su función o actividad específica (tal como la actividad enzimática, la adsorción de oxígeno y la capacidad de desorción, la actividad del fármaco, por nombrar sólo algunos). La reticulación de una mezcla de compuestos también es posible de modo que se pueda formar un polímero que esté compuesto de al menos dos compuestos diferentes.

Además, puede formarse una estructura de red polimérica que sea suficientemente estable incluso después de una disolución opcional de los moldes porosos. La estructura de red polimérica también proporciona una gran relación superficie-volumen debido a su gran superficie interna que es accesible después de la disolución de los moldes porosos. Generalmente, las micropartículas tienen una estructura de celda abierta o de poros abiertos formada por la red polimérica. Otros compuestos pueden ser, por lo tanto, adsorbidos o acoplados a la estructura de la red polimérica.

El tamaño de las micropartículas formadas se puede ajustar, por ejemplo, mediante el control del procedimiento de precipitación para la formación de los moldes porosos.

En algunas realizaciones se eliminan los moldes y sólo la estructura fina moldeada permanece como una red de cilindros finos, cables o tubos. Plantillas típicas que son fácilmente solubles son, por ejemplo, carbonato de calcio, todos los fosfatos de calcio y sílice.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Una divulgación completa y habilitante de la presente invención, incluyendo el mejor modo de la misma, para un experto normal en la técnica, se expone más particularmente en el resto de la descripción, incluida la referencia a las figuras adjuntas. En este documento:

La Figura 1A muestra una micrografía de micropartículas de albúmina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación baja durante 1 min antes de enjuagar. La muestra contiene 1% de albúmina marcada con FITC para una mejor visualización.

La Figura 1B muestra una micrografía de micropartículas de albúmina reticuladas preparadas a una alta velocidad de agitación durante 20 segundos antes de enjuagar. La muestra contiene 1% de albúmina marcada con FITC para una mejor visualización.

La Figura 2A muestra una micrografía de micropartículas de hemoglobina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación muy baja durante 2 min antes de lavar.

La Figura 2B muestra una micrografía de partículas de hemoglobina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación media durante 30 segundos antes de lavar.

- 5 La Figura 3 muestra un gráfico de los espectros de absorción de micropartículas de hemoglobina reticuladas a alta y baja pO<sub>2</sub>. Para la comparación se muestran los espectros de oxihemoglobina y hemoglobina.

La Figura 4 muestra una micrografía de micropartículas de hemoglobina/albúmina reticuladas preparadas mediante dos etapas de precipitación. Durante la segunda etapa de precipitación se añadió 1% de albúmina marcada con FITC (verde) para una mejor visualización.

- 10 La Figura 5 muestra una micrografía de micropartículas de tripsina/albúmina reticuladas preparadas mediante dos etapas de precipitación. Durante la segunda etapa de precipitación, se añadió 1% de albúmina marcada con FITC (verde) para una mejor visualización.

La Figura 6A muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 64 a aproximadamente 76 kDa.

- 15 La Figura 6B muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 564 kDa.

La Figura 6C muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 64 a 67 kDa.

- 20 La Figura 6D muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano que tienen un peso molecular de aproximadamente 464 kDa.

La Figura 6E muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 464 kDa.

- 25 La Figura 7 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia de las micropartículas modificadas superficialmente preparadas con albúmina e insulina unida. NK: control negativo; I-MP: micropartículas portadoras de insulina

La Figura 8 ilustra las secuencias de un procedimiento para la formación de micropartículas.

La Figura 9 ilustra el crecimiento de los moldes y el llenado de los poros.

La Figura 10 ilustra la formación de una micropartícula que comprende un núcleo y una envoltura.

### **Descripción de realizaciones preferidas**

- 30 Para el propósito de promover y comprender los principios de la invención, se hará ahora referencia a la realización preferida ilustrada en los dibujos y se utilizará un lenguaje específico para describir la misma. No obstante, se entenderá que con ello no se pretende ninguna limitación del ámbito de la invención.

- 35 Un aspecto de la presente invención como se describe en esta descripción es un procedimiento para la formación de micropartículas por precipitación de al menos una sal en presencia de un compuesto o sustancia, en el que la sal precipitada forma moldes en los que el compuesto o sustancia se incorpora durante el crecimiento de los moldes. En una realización, como se ilustra en las Figuras 7 y 8, se proporciona una primera solución 11 que comprende aniones. Además, se proporciona una segunda solución 12 que comprende cationes. Los aniones y los cationes se seleccionan de tal manera que permiten la formación de una sal que es poco soluble en una solución acuosa. Los aniones y los cationes pueden ser orgánicos o inorgánicos. Generalmente, los cationes son de naturaleza inorgánica y pueden ser seleccionados del grupo que contiene iones Ca, iones Mn, iones Mg, iones Ba y mezclas de los mismos. Además, los aniones son generalmente de naturaleza inorgánica y pueden ser seleccionados de entre el grupo que contiene iones carbonato, iones fosfato, iones hidrógenofosfato, iones deshidrógenofosfato y mezclas de los mismos. Por ejemplo, la primera solución puede comprender CaCl<sub>2</sub> para proporcionar iones Ca y la segunda solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para proporcionar iones carbonato que tiene como resultado la formación de partículas de CaCO<sub>3</sub>.
- 45 Una persona experta apreciará que los cationes y aniones no se limitan a los ejemplos anteriores.

Los cationes y los aniones se seleccionan adicionalmente de tal manera que permiten la formación de moldes porosos por precipitación. Las partículas de CaCO<sub>3</sub> son un ejemplo de moldes porosos. Otros ejemplos incluyen, sin limitarse a los mismos, MnCO<sub>3</sub>, todas las partículas de fosfato de calcio, tales como Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaHPO<sub>4</sub> y Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y BaCO<sub>3</sub>.

- 50 Un compuesto, que se ha de incorporar en los moldes porosos que se han de formar, se proporciona en la primera o la segunda solución de 11, 12 o en ambas. Alternativamente, una mezcla de compuestos puede ser proporcionada

en la primera o la segunda solución o en ambas soluciones. También es posible proporcionar un compuesto en una primera solución y otro compuesto en la segunda solución, de tal manera que ambos compuestos se incorporarán durante la precipitación. Proporcionar los compuestos en soluciones separadas ayuda a inhibir las interacciones no deseadas entre los compuestos antes de la incorporación.

- 5 La primera y la segunda solución 11, 12 se mezclan posteriormente (13). Esto inicia la formación de moldes 21 (Figura 9) por precipitación de una sal poco soluble o incluso no soluble formada por los cationes y aniones. La precipitación tiene lugar en presencia del compuesto 25 (Figura 9) o los compuestos, por tanto, que se incorporan cada vez más en los moldes en crecimiento 21. La presencia del compuesto o compuestos 25 puede influir en la cristalización de los moldes 21 y en su estructura. Una estructura porosa natural de los moldes facilita la incorporación del compuesto o los compuestos. Dado que los poros de los moldes pueden estar completamente llenos por el compuesto o compuestos 21 durante el crecimiento, se puede obtener una relación alta entre compuesto y molde, la cual es sustancialmente mayor que la relación que se puede obtener, cuando el compuesto 21 se incorpora posteriormente a una formación completa de moldes porosos 21. La Figura 9 ilustra el crecimiento de los moldes 21.
- 10
- 15 Los moldes porosos 21 se forman generalmente por cristalización. Para iniciar y/o controlar la cristalización, se pueden añadir semillas de cristal a la mezcla o a cualquiera o ambas de la primera y segunda solución. La semilla de cristal puede ser, por ejemplo, partículas muy pequeñas comprendidas por el material de los moldes porosos. Los moldes porosos, que han sido preparados de antemano o con otros medios, también se pueden utilizar como cristales de siembra. Esto permite una formación paso a paso de micropartículas para la incorporación secuencial o por etapas de compuestos separados.
- 20

Una ventaja del “enfoque de precipitación” como se describe en este documento es que se puede conseguir una alta carga de los moldes y, por lo tanto, las micropartículas que se pueden obtener. Se supone que el compuesto o la mezcla de compuestos llena los poros de los moldes en crecimiento. Los moldes se llenan de este modo “desde el interior hacia el exterior”, lo que permite una carga completa sustancial de los moldes.

- 25 Existen otros enfoques diferentes, los cuales incorporan un compuesto en moldes porosos preformados. Allí, el compuesto se mezcla con los moldes pre-formados de manera que la adsorción tiene lugar después de la formación de los moldes. Por lo tanto, los moldes se llenan “desde el exterior hacia el interior”. Dado que la adsorción comienza en el exterior de los moldes y a la entrada a los poros, los poros pueden llegar a ser bloqueados e inhiben aún más la carga de los moldes con el compuesto de manera que los poros interiores no están llenos. En comparación con este enfoque, el “enfoque de precipitación” ofrece, por lo tanto, una alta tasa de carga independiente del tipo del compuesto.
- 30

- En algunas realizaciones, que se ilustran en la Figura 10, se forman moldes porosos 31 que se forman en presencia de un primer compuesto 35 o una primera mezcla de compuestos por precipitación a partir de una primera mezcla formada por la mezcla de una primera solución que comprende aniones y una segunda solución que comprende cationes. Los moldes porosos 31 se pueden formar, por ejemplo, por cristalización espontánea sin adición de semillas de cristal. Los moldes porosos 31 formados de esta manera con el primer compuesto incorporado 35 o la primera mezcla de compuesto se denominan pre-moldes. En una etapa posterior, los pre-moldes 31 se pueden utilizar como cristales de siembra y, por lo tanto, son llevados a o mezclados con una segunda mezcla que se forma mezclando una tercera solución que comprende aniones con una cuarta solución que comprende cationes. La segunda mezcla comprende también un segundo compuesto 36 o una segunda mezcla de compuestos, que se proporciona en al menos una de la tercera y cuarta solución. La tercera y cuarta solución pueden comprender los mismos aniones y cationes que la primera y segunda solución. Los pre-moldes 31 causan o inician la cristalización de una sal formada por los aniones y cationes de la segunda mezcla sobre la superficie de los pre-moldes 31, lo cual da lugar a una formación de una envoltente 32 en los pre-moldes 31. El segundo compuesto 36 o la segunda mezcla de compuestos se incorporan en la envoltente 32 que crece en los pre-moldes 31. Estos moldes 37 formados comprenden un núcleo 31 y una envoltente 32, cada uno de los cuales está lleno de un compuesto o mezclas de compuestos específicos.
- 35
- 40
- 45

- La cristalización espontánea también puede ocurrir en la mezcla que comprende la tercera y cuarta solución, pero dará lugar a moldes porosos más pequeños que sólo incluyen el segundo compuesto o la segunda mezcla de compuestos. Estos moldes se pueden separar fácilmente de los moldes más grandes que comprenden los pre-moldes mediante una etapa de separación adecuada, tal como filtración, clasificación o centrifugación.
- 50

Básicamente, se podría utilizar cualquier partícula porosa o partícula sólida como pre-moldes para iniciar la formación de una envoltente que incluye un compuesto o una mezcla de compuestos. Tales partículas porosas o sólidas funcionan como cristal de siembra para la cristalización de la envoltente.

- 55 La formación de una envoltente puede repetirse si se desea para formar múltiples capas de la envoltente cada una de las cuales puede comprender un compuesto o mezcla de compuestos específicos. Esto permite una fabricación a medida de las micropartículas. Por ejemplo, el compuesto o compuestos de la envoltente exterior son para proteger el compuesto o compuestos de la envoltente (o envoltentes) interiores y el núcleo. Este enfoque también permite la encapsulación de material por un compuesto o compuestos que forman una envoltente.

Los poros de las micropartículas, incluyendo el núcleo y la envolvente pueden tener un tamaño medio (diámetro) en el intervalo de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm.

En algunas realizaciones, el compuesto o compuestos incluidos en los moldes es reticulado (Paso 14 en la Figura 14). La reticulación se puede realizar después de cada etapa de precipitación o al final de la formación del molde. Por ejemplo, diferentes compuestos pueden necesitar diferentes agentes para la reticulación, lo que abre la posibilidad de reticular selectivamente los compuestos. Además, el compuesto o compuestos del núcleo y/o la envolvente o envolventes pueden ser reticulados por separado o simultáneamente. Para la reticulación del compuesto o los compuestos, se utiliza un agente que normalmente tiene al menos dos grupos funcionales. Dicho agente es, por ejemplo, un agente bi-funcional. El agente o agentes de reticulación se pueden seleccionar, sin limitarse a, los de la Tabla 1. También se pueden usar otros agentes de reticulación dependiendo del compuesto o compuestos a reticular. Por ejemplo, la solución de fijación utilizada para la fijación de tejido también sería una opción.

Tabla 1

Nombre	Fórmula química
Glutaraldehído	$C_5H_8O_2$
Divinilsulfona	$C_4H_6O_2S$
Epiclorohidrina	$C_3H_5ClO$
Hidroxiperóxido de cumol	$C_6H_5C(CH_3)_2OOH$
Ácido acético	$C_2H_4O_2$ /Metanol
Dimetilsuberimidato	$C_{10}H_{20}N_2O_2 \times 2ClH$
Bis(3,5-dibromosalicil) fumarato	$C_{18}H_8Br_4O_8$
Poli-(dimetilsiloxano)	$(C_2H_6OSi)_n$
Formaldehído	$CH_2O$
Malondialdehído-bis-(diethylacetal)	$C_{11}H_{24}O_4$
Cloruro de sebacilo	$Cl-CO-(CH_2)_8-CO-Cl$
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida	EDC y NHS

El compuesto o compuestos que se han de reticular tienen que tener al menos un grupo funcional, el cual puede formar, mediante el o con el agente de reticulación, una unión a otros grupos funcionales del mismo o de otros tipos. Ejemplos de grupos funcionales son grupos carboxílico, carbonílico, amino, hidróxílico y sulfhidrílico

Mediante la reticulación del compuesto o compuestos se forma una estructura de la red polimérica en los moldes porosos. Dependiendo de los compuestos y del agente o agentes de reticulación utilizados, todos los compuestos pueden ser reticulados entre sí o sólo ser reticulados selectivamente. Además, el compuesto 35 que forma el núcleo 31 y el compuesto 36 que forma la envolvente 32 pueden ser reticulados de forma selectiva o conjuntamente.

Los compuestos se pueden seleccionar del grupo que comprende polímeros, biomoléculas, proteínas, enzimas, nano-partículas, compuestos activos farmacéuticos, suplementos nutricionales y mezclas de los mismos. Los ejemplos específicos incluyen moléculas que son capaces de unir oxígeno molecular, tales como hemoproteínas, hemoglobina, mioglobina, albúmina y mezclas de las mismas. Otros ejemplos incluyen moléculas que son adecuadas para la unión de toxinas o para iniciar la formación *in vivo* de anticuerpos. Un ejemplo específico de una toxina es la saxitoxina.

Generalmente, los moldes porosos con el compuesto o compuestos encapsulados se lavan antes de la reticulación para eliminar los compuestos libres que no se han incorporado en los moldes. De este modo, sustancialmente no se forman compuestos libres reticulados, lo que representa una ventaja para otros pasos, tales como la purificación y la concentración de los moldes. Además, después de cada etapa de precipitación/incorporación, los moldes obtenidos o los pre-moldes se separan generalmente de la mezcla por etapas de separación adecuadas que incluyen lavado, filtración y centrifugación.

En algunas realizaciones, los moldes porosos 21, 37 se disuelven (paso 15 en la Figura 8) después de la reticulación para formar micropartículas 24, 38, las cuales están comprendidas por al menos un compuesto reticulado (Figuras 9 y 10). El término "micropartículas", como se utiliza en esta descripción, tiene la intención de describir las partículas que comprenden una estructura de la red polimérica que tiene estructura porosa o pseudo-esponjosa. Las micropartículas 24, 28 son generalmente esféricas pero pueden tener cualquier otra forma como cúbica, elíptica o en forma de varilla. Las micropartículas pueden tener un tamaño (diámetro o la extensión más grande) de al menos 20 nm, particularmente al menos 100 nm y más particularmente al menos 500 nm. Además, las micropartículas pueden

tener un tamaño de menos de 50  $\mu\text{m}$ , particularmente menos de 20  $\mu\text{m}$  y más particularmente menos de 5  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, las micropartículas tienen un tamaño medio de entre aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

- 5 El tamaño de los moldes 21, 37 formados y, por lo tanto, de las micropartículas 24, 38 se puede ajustar variando cualquiera de los siguientes parámetros: temperatura, concentración de las soluciones salinas, velocidad y duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización, o una combinación de estos parámetros.

La disolución debe llevarse a cabo en un entorno tal que no afecte o sustancialmente no afecte al funcionamiento y/o la actividad de los compuestos. En el caso del  $\text{CaCO}_3$ , los moldes se pueden resolver fácilmente por un agente quelante tal como EDTA en condiciones suaves para la mayoría de las biomoléculas.

- 10 Los compuestos que se incorporan tienen un peso molecular de al menos 20 kDa, en particular de al menos 30 kDa. Se ha observado que los compuestos que tienen un peso molecular mínimo de al menos 20 kDa forman micropartículas estables después de la disolución de los moldes porosos. Para la incorporación de larga duración o permanente de compuestos más pequeños, es decir, compuestos que tienen un peso molecular de menos de 20 kDa, después de la disolución de los moldes porosos, se puede utilizar una mezcla de al menos un compuesto grande que tiene un peso molecular superior a 20 kDa y el compuesto pequeño. El compuesto o compuestos grandes formarán la "columna vertebral" de la estructura de la red polimérica al que se une el compuesto pequeño.
- 15

- En algunas realizaciones, al menos un primer compuesto se incorpora a los moldes porosos preparados. Para este fin, los moldes porosos se proporcionan en una suspensión que se mezcla con una solución que comprende al menos el primer compuesto. Al permitir que el primer compuesto se adsorba en los moldes durante un tiempo dado, los moldes porosos se llenan al menos parcialmente con el compuesto. Aquí, el primer compuesto se desorbe después de la formación de los moldes.
- 20

- Se pueden incorporar dos o más compuestos siempre que estén juntos en la solución. Si la adsorción está mediada por interacción electrostática, los compuestos deben tener la misma carga electrostática para evitar obstáculos. Este enfoque es un procedimiento de un único paso en el que todos los compuestos se incorporan en un solo paso. Sin ninguna etapa de incorporación adicional, el compuesto o compuestos incorporados son al menos parcialmente reticulados como se describe anteriormente. Los moldes porosos llenos podrían utilizarse posteriormente como cristal semilla para la formación de una envoltura en los moldes porosos llenos como se describe anteriormente. Alternativamente, los moldes porosos llenos se pueden disolver como se describe anteriormente para obtener micropartículas comprendidas por una estructura de red polimérica como se describe anteriormente.
- 25

- Los moldes porosos utilizados para el procedimiento de un solo paso se pueden seleccionar, sin limitarse a, de entre el grupo que comprende  $\text{SiO}_2$ , carbonatos, tales como  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{MnCO}_3$ , fosfatos, tales como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  y mezclas de los mismos.
- 30

- Independientemente de su formación, las micropartículas se pueden marcar, funcionalizar y/o liofilizar. El marcaje y la funcionalización se puede realizar durante la incorporación, antes o después de la disolución de los moldes. En algunas realizaciones, las micropartículas se marcan y/o funcionalizan después de la disolución de los moldes para tener fácil acceso a todos los compuestos reticulados. Las micropartículas con o sin moldes se pueden liofilizar.
- 35

- Independientemente de su formación, las micropartículas o moldes formados se pueden utilizar para diferentes propósitos. Un ejemplo es un vehículo para un fármaco. El principio farmacéuticamente activo puede ser o bien el compuesto reticulado o un compuesto que se adsorbe en o se une covalentemente a, la estructura de red polimérica después de la disolución de los moldes. Cuando el fármaco es reticulado, este se liberará por escisión *in vivo* del enlace, el cual, puede estar, por ejemplo, mediado enzimáticamente. Por otra parte, cuando el fármaco se adsorbe a la estructura de la red polimérica, este se puede liberar por desorción, la cual, por ejemplo, se puede inducir por cambios en el entorno físico-químico.
- 40

- En esta descripción el término "fármaco farmacéutico activo" pretende describir una entidad química que altera, inhibe, activa o de otra manera afecta a eventos biológicos. Por ejemplo, el fármaco incluye, pero no se limita a, sustancias anti-cáncer, agentes anti-inflamatorios, inmunosupresores, anticoagulantes, agentes antitrombóticos, inhibidores enzimáticos, analgésicos, agentes antiproliferativos, sustancias antimicóticas, sustancias citostáticas, factores de crecimiento, hormonas, esteroides, sustancias no esteroideas y antihistamínicos.
- 45

- En algunas realizaciones, las micropartículas comprenden un recubrimiento que encapsula las micropartículas. El recubrimiento se puede formar ya sea antes o después de la disolución de los moldes. Generalmente, el recubrimiento se forma antes de disolver de manera que existe disponible una superficie sustancialmente densa sobre la que se forma el revestimiento. El revestimiento puede estar formado por diferentes procedimientos tales como la deposición de polímeros, lípidos y/o polielectrolitos.
- 50

- Un ejemplo concreto se refiere a las micropartículas que comprenden insulina, la cual se puede liberar *in vivo*. Estas micropartículas pueden comprender insulina, la cual se incorpora en los moldes porosos durante la precipitación o por adsorción en moldes porosos previamente preparados. A continuación, una segunda precipitación con soluciones que contienen dextrano conduce a la generación de una envoltura en la parte superior de la
- 55

micropartícula que contiene la insulina. El dextrano en la envoltente se reticula posteriormente y se disuelve el molde poroso. La liberación de la insulina atrapada depende de la estructura de la envoltente de dextrano.

Otro ejemplo específico se refiere a micropartículas utilizadas como sustituto sanguíneo. Tales micropartículas pueden comprender la hemoglobina reticulada que se incorporó en los moldes porosos durante la precipitación o por adsorción en moldes porosos pre-preparados. La hemoglobina reticulada forma una red polimérica porosa que tiene generalmente una estructura de celda abierta y que permite la difusión de disolvente y oxígeno. Tales micropartículas de hemoglobina reticuladas permiten la adsorción y desorción de oxígeno, lo que las hace adecuadas como un sustituto sanguíneo. Mediante reticulación, las micropartículas están sustancialmente libres de la hemoglobina tetrámero. Se puede usar hemoglobina humana o bovina, o cualquier otra hemoglobina.

El tamaño de las micropartículas de hemoglobina está generalmente en el intervalo entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y particularmente en el intervalo entre aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ . La red polimérica formada por la hemoglobina reticulada puede tener un peso molecular de al menos 560 kDa. El sustituto sanguíneo normalmente comprende, además, una solución fisiológica en la que se dispersan las micropartículas. Alternativamente, las micropartículas comprendidas por hemoglobina reticulada se pueden proporcionar en forma de polvo, tales como partículas liofilizadas, para la dispersión en una solución fisiológica.

Según una realización, se proporciona un kit que comprende un polvo seco de micropartículas de hemoglobina reticuladas y una solución fisiológica.

Además de la hemoglobina, las micropartículas pueden comprender un co-factor tal como 2,3-DPG, por ejemplo, cuando se utiliza hemoglobina humana. Además, las micropartículas de hemoglobina también pueden comprender enzimas tales como enzimas de los glóbulos rojos. Ejemplos de ello son la anhidrasa carbónica y la catalasa.

Para la fabricación de las micropartículas de hemoglobina, la hemoglobina se incorpora durante la precipitación y el crecimiento de los moldes. La hemoglobina también se puede desorber en moldes porosos proporcionados. El co-factor y/o enzimas opcionales se pueden incorporar en los moldes durante la precipitación de los moldes o la desorción junto con la hemoglobina. No hace falta decir que también se pueden incorporar otros compuestos en las micropartículas de hemoglobina. La hemoglobina y los compuestos complementarios adicionales (co-factor, enzimas y proteínas) se reticulan.

Las micropartículas de hemoglobina pueden comprender un núcleo y al menos una envoltente. El núcleo está generalmente compuesto de hemoglobina reticulada con el co-factor opcional, mientras que la envoltente está compuesta de una proteína tal como albúmina. Las enzimas opcionales pueden estar en el núcleo y/o en la envoltente.

Además, las micropartículas de hemoglobina pueden comprender un recubrimiento que encapsula las micropartículas. El recubrimiento se forma normalmente antes de la disolución de los moldes porosos. Los materiales de recubrimiento adecuados son albúmina u otras proteínas, dextranos, poli(óxidos de etileno) y polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares y lípidos de diferente composición.

Para la fabricación de las micropartículas de hemoglobina reticuladas se puede usar cualquiera de los procedimientos descritos en esta descripción. Una persona experta apreciará que podrían ser necesarias modificaciones, que, sin embargo, resultarán evidentes a partir de la descripción. Para completar el sustituto sanguíneo, las micropartículas de hemoglobina reticuladas se pueden dispersar en una solución fisiológica que puede comprender aditivos adicionales.

Básicamente, las micropartículas se pueden utilizar como un vehículo para una pluralidad de sustancias que pueden ser adsorbidas o de otro modo unidas a la estructura de red polimérica de celda abierta o de poros abiertos. Dependiendo de los compuestos reticulados utilizados, se pueden incorporar sustancias hidrófilas o hidrófobas en las micropartículas después de la disolución de los moldes.

Las micropartículas pueden utilizarse además como micro-catalizador o cosméticos.

En algunas realizaciones, las micropartículas comprenden un núcleo y al menos una envoltente, comprendiendo cada una enzima diferente. Tales micropartículas pueden formar una cascada de enzimas de tal manera que una sustancia se altera o se modifica enzimáticamente gradualmente por las respectivas enzimas. Las micropartículas que comprenden dos o más envoltentes permiten la expansión de la cascada en tres o más pasos.

Ahora, se describirán ejemplos específicos conjuntamente con las figuras.

#### **Ejemplo 1: Procedimiento para la formación de micropartículas de albúmina**

El Ejemplo 1 es una realización específica relativa a la formación de una micropartícula que comprende al menos un compuesto reticulado que se incorpora en los moldes porosos durante la precipitación.

Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y albúmina (humana, bovina ...). La solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se proporciona en un recipiente adecuado. La albúmina, que representa aquí el compuesto para ser incorporado, se añade a la



solución de  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se añade a la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  agitando continuamente. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  (moldes) que contienen albúmina y  $\text{NaCl}$ . El tamaño de las partículas de albúmina/ $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de las soluciones salinas, la velocidad y/o duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas (moldes) se separan por centrifugación a  $1000 \times g$  durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de albúmina en el medio de suspensión.

Para la reticulación, se añaden partículas empaquetadas bien mezcladas a una solución de glutaraldehído a una concentración final de 2% y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. El tiempo de incubación se puede variar si se desea una tasa de reticulación diferente. Las partículas de albúmina/ $\text{CaCO}_3$  reticuladas se separan a continuación por centrifugación a  $1000 \times g$  durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído en el medio de suspensión.

Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y se disuelven los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . De esta manera se obtienen micropartículas de albúmina reticulada pura con un tamaño definido (Figuras 1A y 1B). Las micropartículas se separan a continuación por centrifugación a  $2000 \times g$  durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión. Para permitir una mejor visualización de las micropartículas y la confirmación de que las micropartículas comprendían internamente albúmina, se ha usado albúmina marcada con FITC al 1%. La Figura 1A muestra partículas de albúmina reticuladas preparadas a una velocidad baja de agitación (alrededor de  $1 \text{ s}^{-1}$  en este ejemplo) durante 1 min antes de enjuagar mientras que la Figura 1B muestra partículas de albúmina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación elevada ( $10 \text{ s}^{-1}$  en este ejemplo) durante 20 segundos antes de enjuagar.

## Ejemplo 2: Procedimiento para formar micropartículas de hemoglobina

El Ejemplo 2 es una realización específica relativa a la formación de una micropartícula adecuada como sustituto sanguíneo.

Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y hemoglobina (aislada de por ej., glóbulos rojos de mamíferos). La solución de  $\text{CaCl}_2$  se proporciona en un recipiente adecuado. La hemoglobina, que es el compuesto a ser incorporado, se añade a la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y la mezcla se añade a la solución de  $\text{CaCl}_2$  agitando. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  (moldes) que contienen hemoglobina y  $\text{NaCl}$ . El tamaño de las partículas de hemoglobina/ $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de las soluciones salinas, la velocidad y/o la duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas se separan por centrifugación a  $1000 \times g$  durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de hemoglobina en el medio de suspensión.

Para la reticulación, se añaden partículas empaquetadas bien mezcladas (moldes con hemoglobina incorporada) a una solución de glutaraldehído a una concentración final de 2% y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. El tiempo de incubación se puede variar si se desea una tasa de reticulación diferente. Las partículas de hemoglobina/ $\text{CaCO}_3$  reticuladas se separan a continuación por centrifugación a  $1000 \times g$  durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído en el medio de suspensión.

Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y se disuelven los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . De esta manera se obtienen micropartículas de hemoglobina pura reticuladas con un tamaño definido (Figuras 2A y 2B). Las micropartículas se separan a continuación por centrifugación a  $2000 \times g$  durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión.

Las micropartículas de hemoglobina reticuladas mostraron la capacidad de unión reversible del oxígeno como se muestra por los espectros de absorción en la Figura 3, en la que 1 indica micropartículas oxigenadas y 2 micropartículas desoxigenadas. Como comparación se muestran los espectros de hemoglobina (4) y oxi-hemoglobina (3). Las micropartículas oxigenadas ( $p\text{O}_2 = 17 \text{ kPa}$ ) mostraban el espectro típico de la oxi-hemoglobina. Después de la exposición a una atmósfera de  $\text{CO}_2/\text{N}_2$  durante 20 min, se alcanzó una  $p\text{O}_2$  de 5 kPa y la absorción de la suspensión de micropartículas de hemoglobina estaba alterada, mostrando un espectro de desoxi-hemoglobina típico (4).

Los espectros de la solución de hemoglobina y las partículas de hemoglobina se midieron usando un espectrofotómetro (Hitachi K2800). Los valores de  $p\text{O}_2$  y  $p\text{CO}_2$  se midieron mediante un analizador de gases en sangre (ABL 700, Radiometer).

La Figura 2A muestra una micrografía de micropartículas de hemoglobina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación baja o muy baja (alrededor de  $0,5 \text{ s}^{-1}$  en este ejemplo) durante 2 minutos antes de lavarse mientras que la Figura 2B muestra una micrografía de partículas de hemoglobina reticuladas preparadas a una velocidad de agitación media (aproximadamente  $5 \text{ s}^{-1}$  en este ejemplo) durante 30 segundos antes de lavar.

**Ejemplo 3: Procedimiento para la preparación de micropartículas compuestas de hemoglobina/albúmina**

El Ejemplo 3 es una realización concreta relativa a la formación de micropartículas que comprenden un núcleo y una envolvente cada uno de los cuales se compone de diferentes compuestos.

5 Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , hemoglobina (aislada de por ej., glóbulos rojos de mamíferos) y albúmina. La solución de  $\text{CaCl}_2$  se proporciona en un recipiente adecuado. La hemoglobina se añade a la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y la mezcla se añade a la solución de  $\text{CaCl}_2$  agitando. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  (moldes) que contienen hemoglobina y  $\text{NaCl}$ . El tamaño de las partículas de hemoglobina/ $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de las soluciones salinas, la velocidad y/o la duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de hemoglobina en el medio de suspensión.

15 Las partículas se resuspendieron a continuación de nuevo en una solución de  $\text{CaCl}_2$  que contiene albúmina y la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se añade agitando. La nueva precipitación iniciada de  $\text{CaCO}_3$  se produce parcialmente en la superficie de las partículas existentes, lo que conduce a la generación de una envolvente que contiene albúmina. Las partículas que contienen sólo la albúmina están separadas por centrifugación de densidad gradual o filtración en función de su diámetro significativamente más pequeño.

20 Para la reticulación, se añaden partículas empaquetadas bien mezcladas a una solución de glutaraldehído a una concentración final de 2% y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. El tiempo de incubación se puede variar si se desea una tasa de reticulación diferente. Las partículas de hemoglobina/albumina/ $\text{CaCO}_3$  reticuladas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído en el medio de suspensión.

La reacción de reticulación también se puede realizar después de cada etapa de precipitación.

25 Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y se disuelven los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . De esta manera se obtienen micropartículas de hemoglobina pura reticuladas con una envolvente de albúmina reticulada. Las micropartículas se separan a continuación por centrifugación a 2000 x g durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión.

30 La Figura 4 muestra una micrografía de dichas micropartículas de hemoglobina/albumina reticuladas formadas preparadas mediante precipitación de dos etapas. Durante la segunda etapa de precipitación se añadió albúmina marcada con FITC al 1% (verde) para una mejor visualización. Como se hace evidente por la figura 4, las micropartículas comprenden una envolvente exterior fluorescente que se atribuye a la envolvente de la albúmina.

**Ejemplo 4: Procedimiento para la preparación de micropartículas compuestas de tripsina/albumina**

35 El Ejemplo 4 es una realización específica relativa a la formación de una micropartícula que comprende un núcleo y una envolvente de dos compuestos diferentes.

40 Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tripsina y albúmina. La solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se proporciona en un recipiente adecuado. La tripsina se añade a la solución de  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se añade a la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  agitando. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  que contienen tripsina y  $\text{NaCl}$ . El tamaño de las partículas de tripsina/ $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de las soluciones salinas, la velocidad y/o la duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de tripsina en el medio de suspensión.

45 Las partículas se resuspendieron a continuación de nuevo en una solución de  $\text{CaCl}_2$  que contiene albúmina y la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se añade agitando. La nueva precipitación iniciada de  $\text{CaCO}_3$  se produce parcialmente en la superficie de las partículas existentes, lo que conduce a la generación de una envolvente que contiene albúmina. Las partículas que contienen sólo la albúmina se separan por centrifugación de densidad gradual o filtración en función de su diámetro significativamente más pequeño.

50 Para la reticulación, se añaden partículas empaquetadas bien mezcladas a una solución de glutaraldehído a una concentración final de 2% y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. El tiempo de incubación se puede variar si se desea una tasa de reticulación diferente. Las partículas de tripsina/albumina/ $\text{CaCO}_3$  reticuladas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído en el medio de suspensión.

La reacción de reticulación también se puede realizar después de cada etapa de precipitación.

Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y se disuelven los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . De esta manera se obtienen micropartículas de tripsina reticuladas con una envoltente de albúmina reticulada. Las micropartículas se separan a continuación por centrifugación a 2000 x g durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión.

La Figura 5 muestra una micrografía de micropartículas de tripsina/albumina reticuladas preparadas mediante precipitación de dos etapas. Durante la segunda etapa de precipitación, se añadió albúmina marcada con FITC al 1% (verde) para una mejor visualización. Como puede verse en la Figura 5, se forman micropartículas de mayor tamaño que comprenden un núcleo no fluorescente y una envoltente fluorescente y micropartículas más pequeñas, que simplemente comprenden un núcleo fluorescente. Los micropartículas más pequeñas se formaron por cristalización espontánea de  $\text{CaCO}_3$  en la solución de albúmina y, por lo tanto, no comprenden un núcleo de tripsina como las micropartículas más grandes. Las micropartículas del núcleo/envoltente se pueden separar de las micropartículas más pequeñas mediante cualquier técnica de separación adecuada.

#### **Ejemplo 5: Procedimiento para la formación de partículas de dextrano**

El Ejemplo 5 es otra realización específica relativa a la formación de una micropartícula que comprende al menos un compuesto reticulado.

Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y dextrano (PM 4 a 2.500 kDa). La solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se proporciona en un recipiente adecuado. El dextrano se añade a la solución de  $\text{CaCl}_2$  (la concentración de dextrano varía desde 2,5 hasta 10%) y la mezcla se añade a la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  agitando. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  que contienen dextrano y NaCl. El tamaño de las partículas de dextrano/ $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de la sal y de las soluciones de dextrano, la velocidad y/o la duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de dextrano en el medio de suspensión.

Para la reticulación, se resuspenden las partículas empaquetadas bien mezcladas en NaOH 0,1 M y se añade divinilsulfona (DVS) hasta una concentración final de 0,1 a 0,3% (v/v) y las muestras se incuban agitando a temperatura ambiente durante 2 horas.

Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y los cristales de  $\text{CaCO}_3$  se disuelven a temperatura ambiente en 20 min. De esta forma se obtienen micropartículas de dextrano reticulado puro con diferentes distribuciones de tamaño (Figuras 6A a 6E). Las partículas se separan por centrifugación a 2000 x g durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión. La concentración óptima de DVS para las partículas con un tamaño de 2 a 10  $\mu\text{m}$  fue 0,1% (v/v).

La Figura 6A muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 64 a aproximadamente 76 kDa. La Figura 6B muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 564 kDa. La Figura 6C muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 64 a 67 kDa. La Figura 6D muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano que tienen un peso molecular de aproximadamente 464 kDa. La Figura 6E muestra una micrografía de micropartículas de dextrano reticuladas preparadas con dextrano marcado con FITC que tienen un peso molecular de aproximadamente 464 kDa.

#### **Ejemplo 6: Procedimiento para formar micropartículas de albúmina**

El Ejemplo 6 es una realización específica relativa a la formación de una micropartícula que comprende al menos un compuesto reticulado mediante la incorporación del compuesto en moldes porosos preparados previamente.

Las soluciones iniciales son  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y albúmina (humana, bovina ...). La solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se proporciona en un recipiente adecuado y se añade la solución de  $\text{CaCl}_2$  agitando continuamente. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  era igual. Los productos del procedimiento son partículas de  $\text{CaCO}_3$  porosas y NaCl. El tamaño de las partículas de  $\text{CaCO}_3$  se puede ajustar variando la temperatura, la concentración de las soluciones salinas, la velocidad y/o duración de la agitación durante el procedimiento de cristalización. Las partículas formadas se separan por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada.

Las partículas lavadas se resuspendieron a continuación en una solución acuosa de albúmina y la suspensión se incubó con agitación durante 1 hora para permitir la adsorción de la proteína en los poros de las partículas

5 Para la reticulación, se añaden partículas empaquetadas bien mezcladas a una solución de glutaraldehído a una concentración final de 2% y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. El tiempo de incubación se puede variar si se desea una tasa de reticulación diferente. Las partículas de albúmina/CaCO<sub>3</sub> reticuladas se separan a continuación por centrifugación a 1000 x g durante 1 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído en el medio de suspensión.

Por último, se añaden las partículas a una solución de EDTA 0,2 M y se disuelven los cristales de CaCO<sub>3</sub>. De esta manera se obtienen micropartículas de albúmina reticulada pura con un tamaño definido. Las micropartículas se separan a continuación por centrifugación a 2000 x g durante 10 min y el sobrenadante se decanta. El sedimento se lava tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de EDTA en el medio de suspensión.

#### 10 **Ejemplo 7: Procedimiento para la unión de péptidos y proteínas en la superficie de micropartículas poliméricas reticuladas**

El Ejemplo 7 describe una realización concreta relativa a la modificación, funcionalización y/o recubrimiento de la superficie de micropartículas.

15 Las proteínas y péptidos se han unido a las micropartículas preparadas de acuerdo con cualquiera de los ejemplos 1 a 6 utilizando acoplamiento avidina/biotina. Para ello, las micropartículas se acoplan primero a la biotina (1 mg de sulfo-NHS-LG-biotina en PBS por 10<sup>8</sup> partículas) por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, las micropartículas se lavan tres veces con PBS para eliminar el exceso de biotina.

20 Las micropartículas acopladas a biotina se resuspenden a continuación en avidina que contiene PBS (50 µg por 10<sup>8</sup> partículas) y se incuban con agitación durante 1 hora (temperatura ambiente) y finalmente se lavan 3 veces en PBS. Ahora, a los péptidos, proteínas, ADN etc. acoplados a biotina, se pueden unir moléculas que llevan NH<sub>3</sub> en la superficie de las partículas. El acoplamiento de las moléculas se cuantificó por medio de mediciones de citometría de flujo (Figura 7) utilizando avidina o biotina marcada con FITC (NK: control negativo; I-MP: micropartículas portadoras de insulina).

#### 25 **Ejemplo 8: Procedimiento para la unión de polietilenglicol en la superficie de micropartículas poliméricas reticuladas**

El Ejemplo 8 describe otra realización concreta relativa a la modificación, funcionalización y/o recubrimiento de la superficie de las micropartículas.

30 La superficie de las micropartículas preparadas de acuerdo con cualquiera de los ejemplos 1 a 6 se modificó mediante la unión covalente de PEG (PM 2 a 20.000). Para ello, las micropartículas se resuspendieron en una solución de 20 mg/ml de metoxi-polietilenglicol (mPEG) en tampón de borato 0,1 M de pH 9 y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. El procedimiento se terminó con tres etapas de lavado con agua destilada.

35 La unión de PEG a las micropartículas fue confirmada por mediciones del potencial zeta (Nanosizer 3000, Malvern, Reino Unido) con partículas modificadas con PEG que tienen un potencial zeta menor significativo. Por ejemplo, el valor del potencial zeta de las partículas de Hb no modificadas fue 28 ± 5 mV, medido en agua destilada pura (conductividad 0,01 a 0,03 mS/cm). Las partículas de Hb modificadas con PEG mostraron un potencial de sólo 9 ± 3 mV, medido en condiciones similares.

40 Aunque las realizaciones preferidas se han ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y descripción anteriores, las mismas se deben considerar como ilustrativas y no de carácter restrictivo, entendiéndose que sólo la realización preferida se ha mostrado y descrito.

#### **Lista de referencias**

- Documento US 5 484 894
- Documento US 5 955 581
- Documento US 6 228 291
- 45 Documento US 6 423 333
- Documento US 6 914 127
- Documento WO 94/20856
- Documento WO 2005/089727
- 50 T. Chang, "Therapeutic Applications of polymeric artificial cells", Nature Reviews Drug Discovery 2005, 4, 221-235

- G. Sukhorukov et al., "Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds", *Journal of Materials Chemistry* 2004, 14, 2073-2081
- D. Shenoy et al., "Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core-Shell Structures", *Biomacromolecules* 2003, 3, 265-272
- 5 L. Duan et al., "Hemoglobin protein hollow shells fabricated through covalent layer-by-layer technique", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 354, 357-362
- D.V. Volodkin et al., "Matrix polyelectrolyte microcapsules: New systems for macromolecule encapsulation", *Langmuir* 2004, 20(8), 3398-3406
- 10 C. Wang et al., "Combination of adsorption by porous CaCO<sub>3</sub> microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 308, 160-167
- D.C. Volodkin et al., "Protein encapsulation via porous CaCO<sub>3</sub> microparticles templating", *Biomacromolecules* 2005, 5(5), 1962-1972
- 15 L.Y. Wang et al., "Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug", *Journal of Controlled Release* 2005, 106(1), pages 62-75
- A. Sugawara et al., "Self-Organized Calcium Carbonate with Regular Surface-Relief Structures", *Angewandte Chemie* 2003, 42/43, 5299-5303
- T. Sakamoto et al., "Self-Organization of Patterned CaCO<sub>3</sub>/Polymer Composite Films: Tuning of Their Morphologies by the Change of Molecular Weights of Acidic Polymers", *Chemistry Letters* 2006, 35, 3, 310-311
- 20 A. Sugawara et al., "Assembled Structures of Nanocrystals in Polymer/Calcium Carbonate Thin-Film Composites Formed by the Cooperation of Chitosan and Poly(aspartate)", *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 2006, 5153-5160
- 25 N. Hosoda et al., "Template Effect of Crystalline Poly(vinyl alcohol) for Selective Formation of Aragonite and Vaterite CaCO<sub>3</sub> Thin Films", *Macromolecules* 2003, 36, 17, 6449-6452
- A. Sugawara et al., "Self-Organization of Oriented Calcium Carbonate/Polymer Composites: Effects of a Matrix Peptide Isolated from the Exoskeleton of Crayfish", *Angewandte Chemie* 2006, 45/18, 2876-2879
- T. Kato, "Polymer/Calcium Carbonate Layered Thin-film Composites", *Advanced Materials* 2000, 12, 20, 1543-1546
- 30 T. Kato et al., "Effects of Macromolecules on the Crystallization of CaCO<sub>3</sub> the Formation of Organic/Inorganic Composites", *Supramolecular Science* 1998, 5, 3, 411-415
- A. Sugawara et al., "Aragonite CaCO<sub>3</sub> Thin-Film Formation by Cooperation of Mg<sup>2+</sup> and organic polymer matrices", *Chemical Communications* 2000, 487-488
- 35 Arshady, R. (Ed.), "Microspheres, microcapsules and liposomes", Vol. 1: Preparation and chemical application, Vol 2: Medical and biotechnology applications, Citus Books, London, 1999
- Bäuerlein, E. et al. (Ed.), "Handbook of Biomineralization", 3 Volumes, Wiley-VCH, Weinheim, 2007
- Mann, S. (Ed.) *Biomimetic Materials Chemistry*, John Wiley Sons, 1995
- Cölfen, H. und Mann, S., "Geordnete mesoskopische Strukturen durch Selbstorganisation und Transformationen von Hybrid-Nanostrukturen", *Angewandte Chemie* 2003, 115, 21 2452-2468
- 40 Mann, S., "Die Chemie der Form", *Angewandte Chemie* 2000, 112, 19, 3532-3548

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de formación de micropartículas, que comprende las etapas de:
  - proporcionar una primera solución que comprende al menos un anión;
  - proporcionar una segunda solución que comprende al menos un catión;
  - 5 - mezclar la primera solución con la segunda solución en presencia de al menos un primer compuesto para formar moldes porosos, en el que los moldes porosos se forman por precipitación de una sal que comprende el anión y el catión y en el que el primer compuesto se incorpora al menos parcialmente en los moldes porosos y
  - reticular al menos parcialmente el primer compuesto en los moldes porosos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
  - 10 - proporcionar una tercera solución que comprende al menos un anión;
  - proporcionar una cuarta solución que comprende al menos un catión;
  - mezclar la tercera solución con la cuarta solución en presencia de los moldes porosos y al menos un segundo compuesto de manera que los moldes porosos crecen por precipitación de una sal que comprende el anión y el catión, en el que el segundo compuesto se incorpora al menos parcialmente en los moldes porosos.
  - 15 - reticular al menos parcialmente el segundo compuesto en los moldes porosos.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que los pasos de reticulación del primer y del segundo compuesto se realizan en un solo paso.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de:
  - 20 - disolver los moldes porosos para formar micropartículas comprendidas al menos por el primer compuesto y/o al menos el segundo compuesto reticulados.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los aniones de la primera y la tercera solución son seleccionados del grupo que comprende iones carbonato, iones fosfato, iones hidrógenofosfato, ion dihidrógenofosfato y mezclas de los mismos.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los cationes de la segunda y la cuarta solución son seleccionados del grupo que comprende iones Ca, iones Mn, iones Mg, iones Ba y mezclas de los mismos.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional:
  - 30 - lavar los moldes porosos antes de reticular el primero y/o el segundo compuesto.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional:
  - unir anticuerpos y/o antígenos a las micropartículas.
9. Un procedimiento para formar micropartículas, que comprende las etapas de:
  - 35 - proporcionar una suspensión de moldes porosos y una solución que comprende al menos un primer compuesto, en el que el primer compuesto tiene un peso molecular de al menos 20 kDa;
  - mezclar la solución con la suspensión durante al menos la incorporación parcial del primer compuesto en los moldes porosos y
  - sin ninguna incorporación más de otro compuesto adicional en una etapa separada, reticular al menos parcialmente el primer compuesto en los moldes porosos utilizando un agente de reticulación que tiene al menos dos grupos funcionales;
  - 40 - proporcionar una primera solución que comprende al menos un anión;
  - proporcionar una segunda solución que comprende al menos un catión;
  - mezclar la primera solución con la segunda solución en presencia de los moldes porosos y al menos un segundo compuesto, que tiene un peso molecular de al menos 20 kDa, de modo que los moldes porosos crecen por precipitación de una sal formada por el anión y el catión, en el que el segundo compuesto se incorpora al menos parcialmente en los moldes porosos.
  - 45
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la etapa adicional:
  - disolver los moldes porosos para formar micropartículas comprendidas al menos por el primer compuesto y/o al menos el segundo compuesto reticulados.
- 50 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que los moldes porosos proporcionadas están comprendidos por un material seleccionado del grupo que comprende SiO<sub>2</sub>, carbonatos, tales

como  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{MnCO}_3$ , fosfatos, tales como fosfato de calcio, hidrógenofosfatos de calcio y dihidrógenofosfatos de calcio y mezclas de los mismos.

- 5 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primero y/o el segundo compuesto es seleccionado del grupo que comprende polímeros, biomoléculas, proteínas, enzimas, nanopartículas, compuestos farmacéuticamente activos, suplementos nutricionales y sus mezclas.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primero y/o el segundo compuesto tiene un peso molecular de al menos 20 kDa.
14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primero y/o el segundo compuesto es una molécula capaz de unir oxígeno molecular.
- 10 15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primero y/o el segundo compuesto es seleccionado del grupo que comprende hemoproteínas, hemoglobina, mioglobina, albúmina y mezclas de las mismas.
16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primero y/o el segundo compuesto son reticulados por un agente bifuncional.
- 15 17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más de las siguientes etapas de:
- marcar las micropartículas;
  - funcionalizar las micropartículas y
  - liofilizar las micropartículas.
- 20 18. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los moldes porosos comprenden poros que tienen un tamaño medio en el intervalo de 2 nm a 50 nm.
19. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional de:
- incorporar un compuesto farmacéutico activo en las micropartículas.
- 25 20. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional de:
- formar un revestimiento sobre los moldes o las micropartículas.
- 30 21. Un sustituto sanguíneo, que comprende micropartículas, las cuales se pueden obtener por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que las micropartículas están comprendidas por una estructura de red polimérica porosa o esponjosa, que está formada al menos por hemoglobina reticulada y en la que las micropartículas tienen un tamaño medio de al menos 500 nm.
22. El sustituto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 21, en el que las micropartículas tienen un tamaño medio de entre 1  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ .
- 35 23. El sustituto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, en el que la red polimérica formada por la hemoglobina reticulada tiene un peso molecular de al menos 560 kDa.
24. El sustituto sanguíneo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende además una solución fisiológica en la que se dispersan las micropartículas.
25. El sustituto sanguíneo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que la hemoglobina reticulada comprende hemoglobina bovina.
- 40 26. El sustituto sanguíneo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en el que las micropartículas comprenden además un revestimiento exterior.
27. El sustituto sanguíneo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en el que las micropartículas están sustancialmente libres de hemoglobina tetrámero.

Fig. 1A

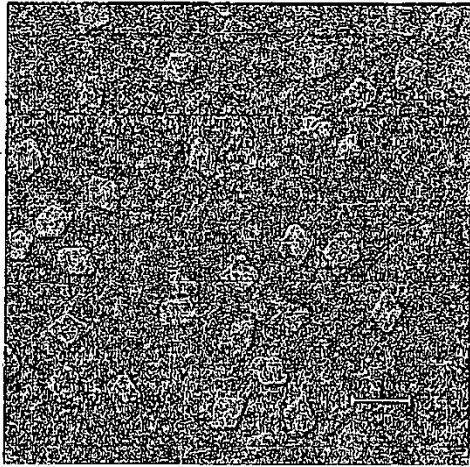


Fig. 1B

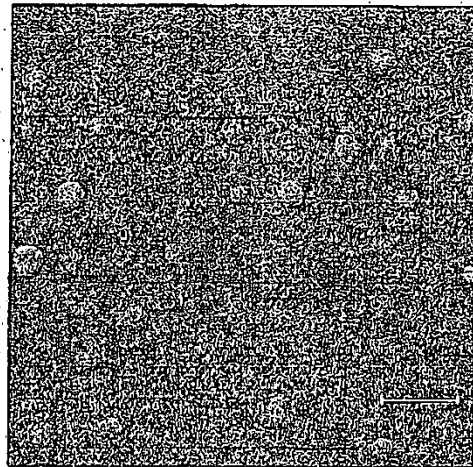


Fig. 2A

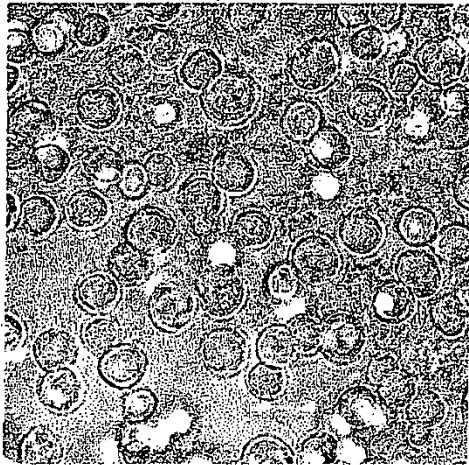


Fig. 2B

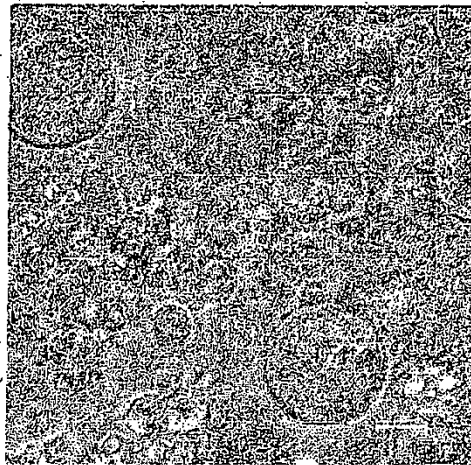




Fig. 3

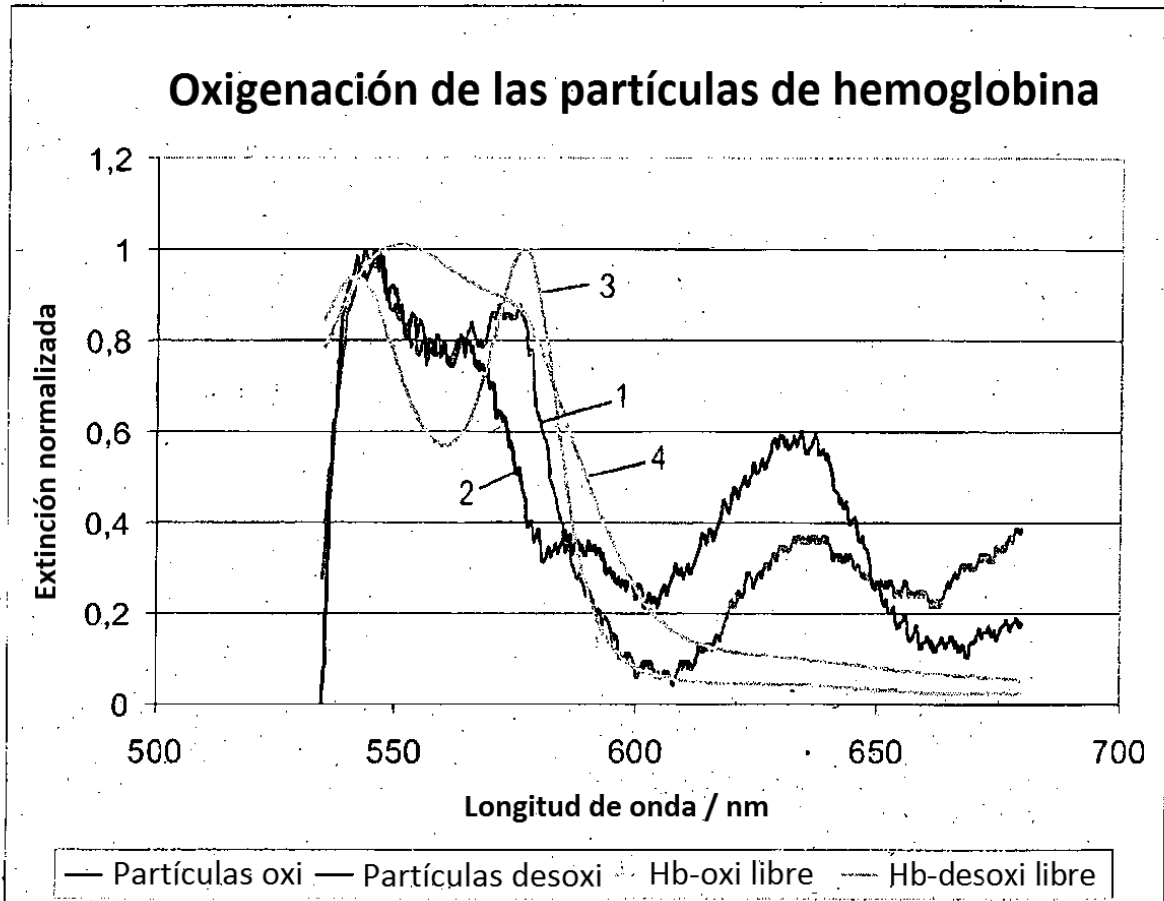


Fig. 4

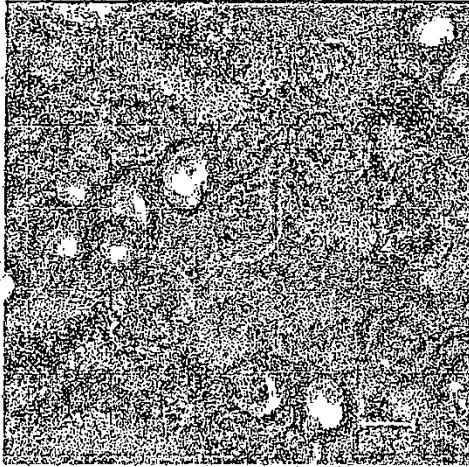


Fig. 5

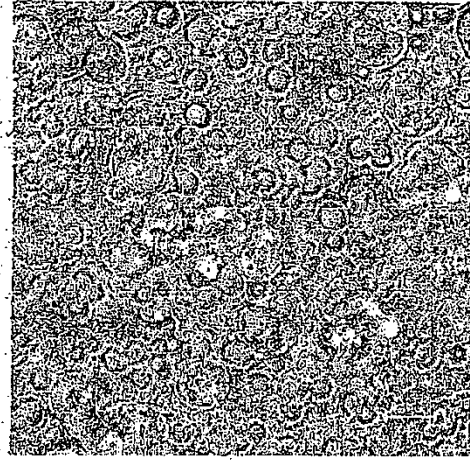


Fig. 6A

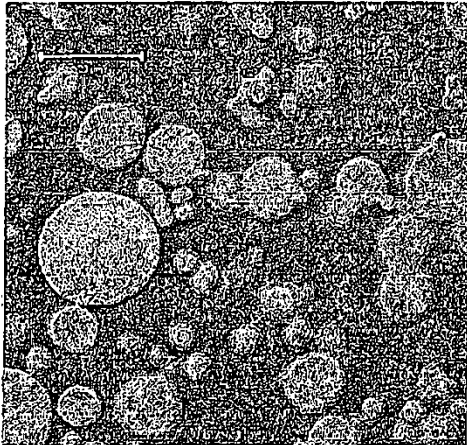


Fig. 6B

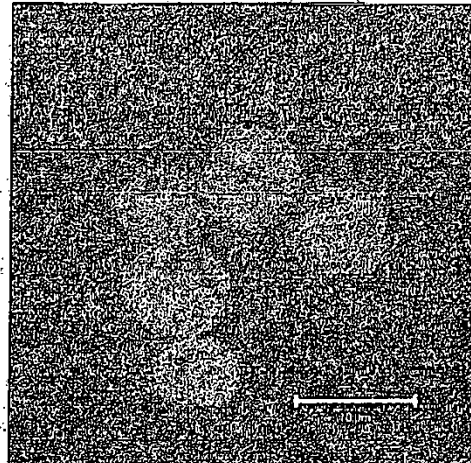


Fig. 6C

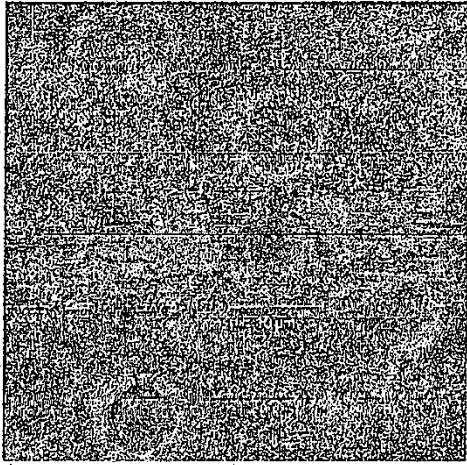


Fig. 6D

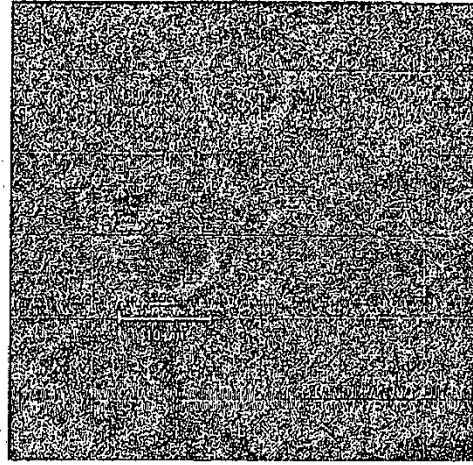


Fig. 6E

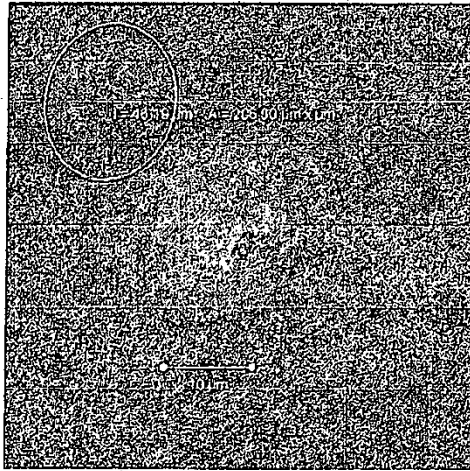


Fig. 7

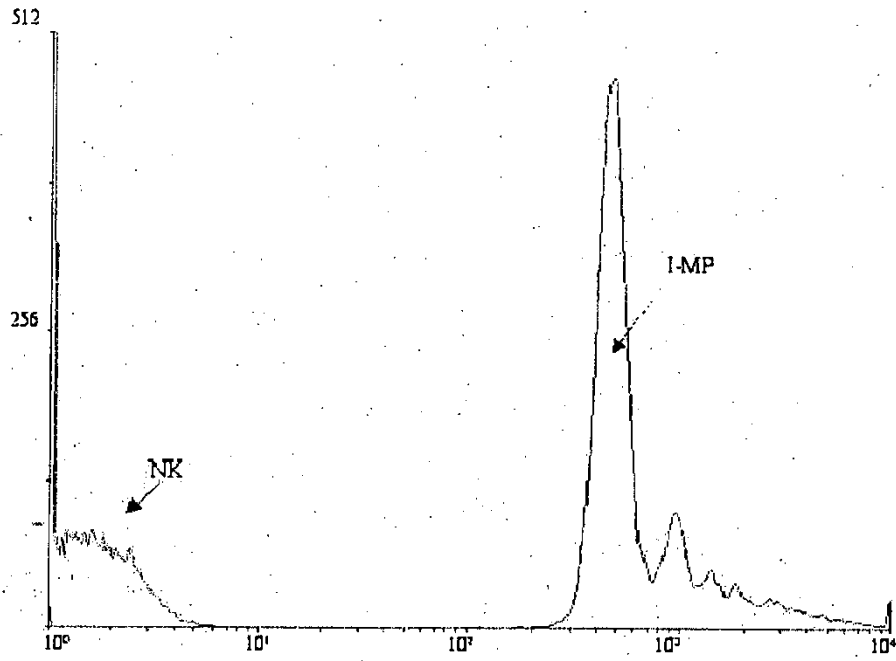


Fig. 8

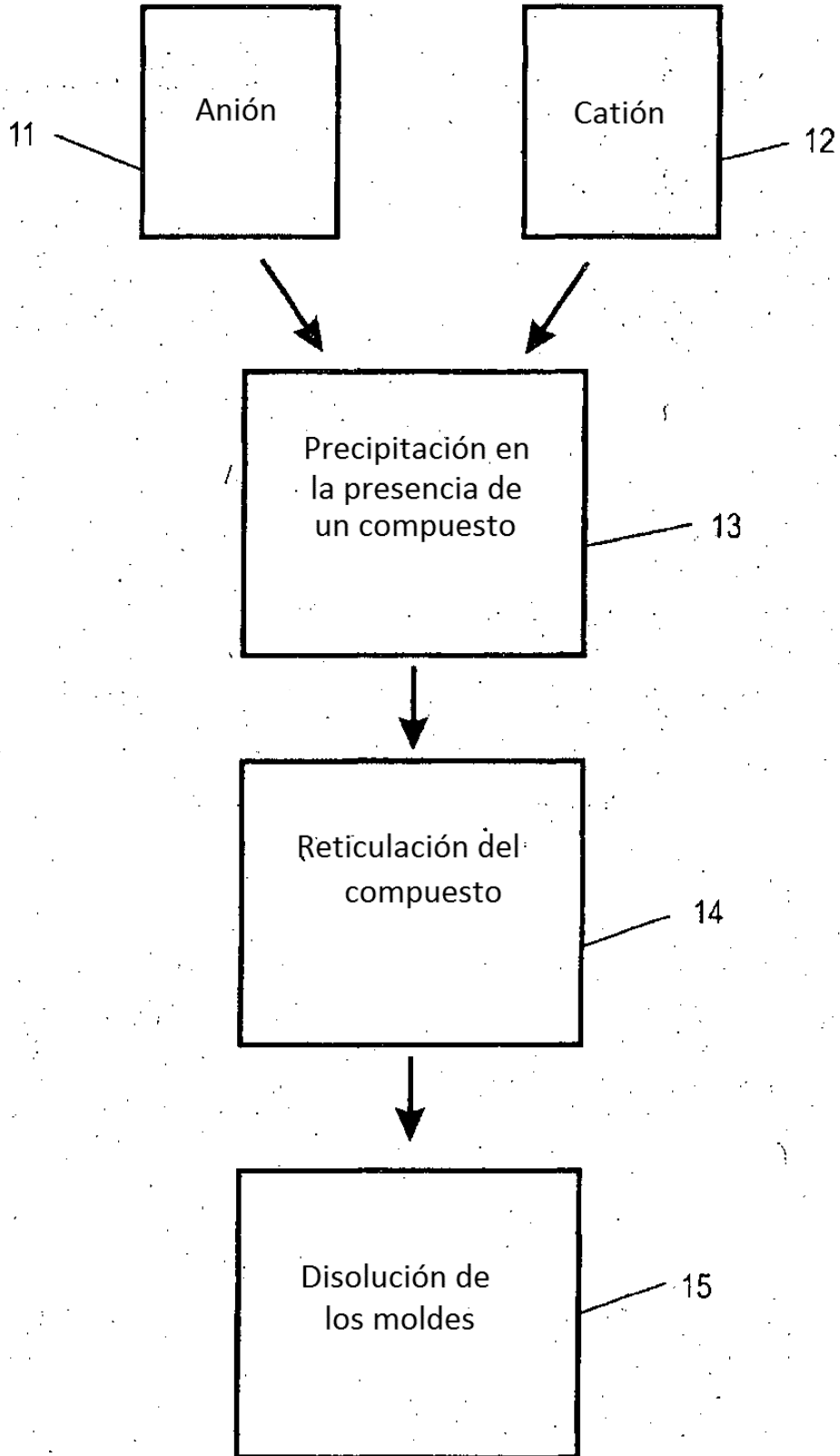


Fig. 9

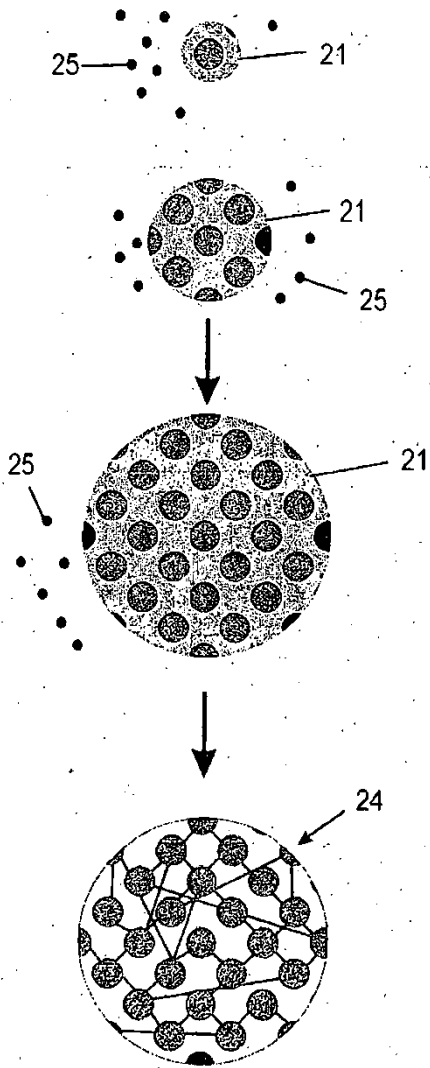


Fig. 10

