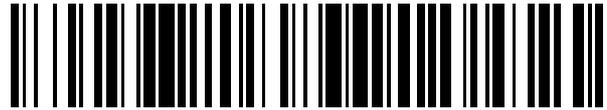


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 941**

51 Int. Cl.:

C08F 220/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2009 E 09748135 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2346914**

54 Título: **Partículas poliméricas preparadas a partir de monómeros de (met)acrilato de alquilenglicol polimerizables**

30 Prioridad:

13.10.2008 GB 0818747

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

13.06.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (100.0%)
University Park
Nottingham, Nottinghamshire NG7 2RD, GB**

72 Inventor/es:

**ALEXANDER, CAMERON;
SHAKESHEFF, KEVIN;
HE, LIANG;
DAVIES, MARTYN;
WANG, WENXIN y
SAUNDERS, BRIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 573 941 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

Partículas poliméricas preparadas a partir de monómeros de (met)acrilato de alquilenglicol polimerizables

5 La presente invención se refiere a partículas poliméricas estabilizadas, y a su uso en aplicaciones de liberación controlada. Las partículas poliméricas pueden usarse en suministro de células, por ejemplo, las partículas poliméricas pueden usarse como matrices de soporte celular. Las partículas poliméricas estables se preparan usando polímeros LCST. Se describen también estos polímeros LCST (polímeros que muestran una temperatura crítica inferior en solución (LCST) en medios acuosos que está entre 10 y 90 °C) y los procesos para su producción.

10 El campo emergente de la medicina regenerativa depende de materiales que combinan la capacidad de suministrar células a un sitio diana y de respaldar el crecimiento celular mientras se mantiene la facilidad de uso en un escenario clínico. La inyección directa de suspensiones celulares al cuerpo sin un vehículo es ineficaz, compromete la viabilidad de las células y genera pobres condiciones de partida para la regeneración de tejido.

15 Se requieren materiales de suministro de células que puedan formularse con células a temperatura ambiente pero que, cuando se inyectan conjuntamente con las células al cuerpo, puedan agregarse *in situ* en un gel poroso que protegerá las células y posteriormente promoverá el crecimiento de tejido.

20 Los polímeros termosensibles (es decir, materiales que experimentan cambios conformacionales de fase como respuesta a un estímulo térmico) han suscitado una atención particular para aplicaciones de modificación técnica de tejido, porque están ahora disponibles muchos de estos polímeros que experimentan una transición de fase cerca de 37 °C. La poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) ha sido el polímero de esta clase más estudiado, pero actualmente no está aprobado por la FDA para aplicaciones clínicas.

25 Ciertos copolímeros de poli(óxido de etileno)-copoli(óxido de propileno) (PEO-PPO) presentan comportamiento de gelificación térmica inversa en agua, formando geles semisólidos cuando se calienta por encima de su temperatura crítica inferior en solución (LCST) y se usan en la industria farmacéutica porque los polímeros base PEO y PPO son biocompatibles. Otros materiales que presentan este comportamiento incluyen poli(caprolactona) (PLC) y copolímeros de bloques de poli(láctida)-(PLA) (por ejemplo, PEO-PLC-PEO).

30 Sin embargo, los geles formados mediante estos polímeros son demasiado mecánicamente inestables para usarlos para andamiajes celulares, suministro de células o las concentraciones requeridas para formar geles estables tras su introducción en el cuerpo son demasiado altas para un uso práctico.

35 Un intento para superar estos problemas es preparando polímeros formadores de micelas con un núcleo o carcasa reticulable, como en Joralemon et al., Journal of the American Chemical Society, 127, 16892-16899 (2005).

40 También es posible generar partículas estables con una superficie sensible, pero estas son exigentes sintéticamente, o requieren monómeros o reticulantes que no se consideran toxicológicamente aceptables. Véase, por ejemplo, Hales et al., Langmuir 20, 10809-10817 (2004); Fujii et al., Journal of the American Chemical Society 127, 7304-7305 (2005); y Pilon et al., Langmuir 21, 3808-3813 (2005).

45 Los agregados de autoensamblaje con polímeros termosensibles en la superficie se han preparado a partir de sílice y a partir de partículas de oro. Véase Zhang et al., Macromolecules 38, 9813-9820 (2005); y Kim, D. J. et al., Macromolecular Chemistry and Physics 206, 1941-1946 (2005).

50 Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido informes en los que los polímeros termosensibles biocompatibles se hayan modificado técnicamente en superficie para formación de partículas biodegradables para generar geles compuestos porosos célula-polímero.

55 En Langmuir, vol. 24, 21 de junio de 2008, páginas 7761-7768, los autores estudian dispersiones de PGLA que contienen copolímeros de PEG-PPG. Dichas dispersiones son totalmente biocompatibles y presentan una agregación estimulada. Las partículas se preparan de acuerdo con un método de deposición interfacial en el que PLGA se disuelve en acetona y la solución se añade a agua que contiene un polímero sensible a la temperatura, induciendo una precipitación inmediata de las partículas poliméricas.

60 En la presente invención se proporcionan nuevas micropartículas "inteligentes" con superficie modificada técnicamente, que pueden prepararse de una manera fácil, que se dispersan con las células a temperaturas por debajo de 37 °C para formar suspensiones fluidas y que forman geles que llenan espacios a la temperatura corporal que respaldan el crecimiento de las células. Las micropartículas incluyen polímeros termosensibles biocompatibles. Estos polímeros se diseñan de manera que pueden dividirse en la superficie de esferas poliméricas biodegradables durante la preparación de la partícula, generando así micropartículas que tienen una estabilidad coloidal y propiedades de biomaterial altamente controlables en un procedimiento sencillo de una sola etapa.

65

En el presente documento se describe la síntesis de la invención de polímeros termosensibles biocompatibles; específicamente, la síntesis de copolímeros anfífilos biocompatibles que tienen cadena prolongada y que presentan una alta solubilidad en agua, justo por debajo de la temperatura corporal, pero que son solubles a 37 °C. Como consecuencia de estas características, estos polímeros pueden actuar para estabilizar partículas coloidales en un primer conjunto de condiciones, pero agregan las partículas en un segundo conjunto de condiciones.

Las micropartículas con superficie modificada técnicamente con un núcleo de polímero biodegradable, y una corona de copolímero biocompatible termosensible diseñada específicamente, pueden producirse en un procedimiento simple de una sola etapa. Las partículas pueden formar suspensiones fluidas por debajo de 37 °C, pero a la inversa pueden formar geles porosos para llenar espacios por encima de esta temperatura, como resultado del colapso de la cadena de la corona de copolímero. Estas partículas, por lo tanto, pueden mezclarse con materiales biológicos a menos de 37 °C y después pueden formarse en geles de encapsulación estables a la temperatura corporal; estos geles de encapsulación estables pueden respaldar el crecimiento celular dentro del gel.

La combinación de la facilidad de preparación, potencial para aumento de escala y las amplias variaciones posibles en la capa de corona del copolímero debido a la síntesis controlada, indica que estos sistemas son prometedores como una nueva clase de agente de suministro biológico y soporte para el crecimiento de tejidos.

La presente invención proporciona, entre otras, las partículas inteligentes, los procesos mediante los cuales estos materiales pueden producirse y su uso como matrices de soporte de células.

Sumario de la invención

Se describe en el presente documento un método para la preparación de un polímero que presenta una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, comprendiendo el método: el uso de uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables como monómeros en una reacción de polimerización.

Una temperatura crítica inferior en solución puede denominarse también como LCST o como una relación temperatura-solubilidad inversa. Una LCST puede determinarse calentando a 1,0 °C.min⁻¹ en un espectrofotómetro Beckman DU-640, tomándose la LCST como la temperatura donde comienza un aumento brusco en la absorbancia a 550 nm.

El método puede implicar las etapas de:

- proporcionar uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables; y
- llevar a cabo la polimerización de los monómeros para generar polímeros con temperaturas críticas inferiores en solución, en medios acuosos, de entre 10 y 90 °C.

Por consiguiente, es significativo que la etapa inventiva de la invención es el uso de monómeros de acrilato y metacrilato de alquilenglicol polimerizables, ya sea individualmente o en diversas combinaciones, para generar polímeros, de manera que las temperaturas críticas inferiores en solución en medio acuoso varían entre 10-90 °C.

Los monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y los monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables pueden seleccionarse de: di(etilenglicol)-acrilato, oligo(etilenglicol)-acrilato, poli(etilenglicol)-acrilato, di(etilenglicol)-metacrilato, oligo(etilenglicol)-metacrilato, poli(etilenglicol)-metacrilato, poli(propilenglicol)-acrilato y poli(propilenglicol)-metacrilato, ya sea individualmente o en diversas combinaciones.

En una realización, se usan dos monómeros en combinación, es decir, el polímero obtenido es un copolímero. Puede ser, por ejemplo, que el método implique la polimerización de poli(etilenglicol)metacrilato (PEGMA) y poli(propilenglicol)metacrilato (PPGMA). En una realización el PEGMA puede tener un Mn de 475 y el PPGMA puede tener un Mn de 430.

Puede usarse cualquier técnica de polimerización para generar los materiales poliméricos. Son especialmente preferibles los métodos por radicales libre y métodos por radicales libres controlados, incluyendo, aunque no exclusivamente, polimerización por radicales con transferencia atómica (ATRP).

Las combinaciones de las unidades monoméricas en el polímero generado pueden ser aleatorias o pueden controlarse de manera que los copolímeros de bloques específicos para la secuencia se produzcan en cualquier combinación de monómeros.

La elección de monómeros de partida (en particular su masa molar) y las condiciones de polimerización pueden controlarse para variar la masa molar del polímero generado. Las masas molares de los polímeros generados pueden variarse para que sean de 1 kDa hasta por encima de 1000 kDa. Preferentemente, para aplicaciones biomédicas, las masas molares de los polímeros son entre 25-75 kDa con índices de polidispersidad (Pm/Mn) entre 1-2,5.

Un polímero descrito en el presente documento muestra una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, pudiendo obtenerse el polímero por el método descrito anteriormente.

5 Por consiguiente, el polímero muestra una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, siendo el polímero el producto de polimerización de uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables.

Los polímeros pueden ser aleatorios o pueden ser copolímeros de bloques de secuencia específica controlados.

10 Los polímeros pueden tener masas molares de 1 kDa hasta por encima de 1000 kDa. Preferentemente, para aplicaciones biomédicas, las masas molares de los polímeros son entre 25-75 kDa, con índices de polidispersidad (Pm/Mn) entre 1-2,5.

15 El polímero puede ser el producto de polimerización de uno o más monómeros seleccionados de: di(etilenglicol)-acrilato, oligo(etilenglicol)-acrilato, poli(etilenglicol)-acrilato, di(etilenglicol)-metacrilato, oligo(etilenglicol)-metacrilato, poli(etilenglicol)-metacrilato, poli(propilenglicol)-acrilato y poli(propilenglicol)-metacrilato, ya sea individualmente o en diversas combinaciones.

20 En una realización, el polímero es el producto de polimerización de dos monómeros, es decir, es un copolímero. Puede ser, por ejemplo, que el copolímero sea el producto de polimerización de poli(etilenglicol)metacrilato (PGMA) y poli(propilenglicol)metacrilato (PPGMA). En una realización el PEGMA puede tener un Mn de aproximadamente 475 y el PPGMA puede tener un Mn de 430. Puede ser que el copolímero de PEGAM-PPGMA tenga un Mn de 15.500.

25 Los polímeros como se han descrito anteriormente pueden denominarse, en lo sucesivo en el presente documento, como polímeros LCST.

30 Los polímeros son adecuadamente copolímeros anfífilos biocompatibles que son de cadena prolongada y que presentan una alta solubilidad en agua justo por debajo de la temperatura corporal, pero que son insolubles a 37 °C. De esta manera, estos polímeros pueden actuar para estabilizar partículas coloidales en un primer conjunto de condiciones, pero para agregar las partículas en un segundo conjunto de condiciones.

35 Por consiguiente, estos polímeros pueden usarse, ya sea individualmente o en combinación, como tensioactivos con superficie modificada técnicamente durante la preparación de partículas de polímero por un método seleccionado de métodos de emulsión, métodos de difusión y métodos de evaporación.

Por consiguiente, la invención proporciona también un método para la preparación de partículas poliméricas, comprendiendo el método:

- 40
- la provisión de uno o más polímeros como se ha descrito anteriormente; y
 - la adición del polímero, como un tensioactivo con superficie modificada técnicamente, a una mezcla de reacción para la preparación de una partícula polimérica por un método seleccionado de métodos de emulsión, métodos de difusión y métodos de evaporación.

45 La invención proporciona también partículas poliméricas obtenibles por este método.

Por consiguiente, la invención proporciona partículas poliméricas que pueden obtenerse por un método seleccionado de métodos de emulsión, métodos de difusión y métodos de evaporación llevados a cabo en presencia de un tensioactivo con superficie modificada técnicamente que es uno o más polímeros como se ha descrito anteriormente.

50 La invención proporciona partículas poliméricas que tienen un núcleo de polímero biodegradable y una corona de copolímero biocompatible termosensible, en el que el copolímero es un polímero como se ha descrito anteriormente.

55 Las partículas poliméricas de la invención pueden tener una fase másica/núcleo de cualquier composición orgánica, pero especialmente preferentemente son polímeros biodegradables tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA o sus homopolímeros constituyentes. Por consiguiente, se prefiere que las partículas poliméricas tengan una fase másica/núcleo de poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico).

60 El uso de los polímeros LCST durante los procedimientos de síntesis en emulsión/difusión/evaporación con PLGA da como resultado la formación de partículas poliméricas estables que varían entre 100 nm y 100 µm de diámetro, siendo los más preferibles de 500 nm a 5 µm para aplicaciones biomédicas.

65 Por consiguiente, en una realización se proporcionan partículas poliméricas que tienen una fase másica/núcleo de PLGA y que pueden obtenerse por un método seleccionado de métodos de emulsión, métodos de difusión y métodos de evaporación, llevados a cabo en presencia de un tensioactivo con superficie modificada técnicamente que es uno o más polímeros como se han descrito anteriormente.

En una realización, la invención proporciona partículas poliméricas que tienen un núcleo de polímero biodegradable y una corona de copolímero biocompatible termosensible, en las que el núcleo de polímero biodegradable es de PLGA y el copolímero es el producto de polimerización de PEGMA y PPGMA.

5 Un aspecto crucial para la etapa inventiva es la capacidad de los polímeros LCST de estabilizar estéricamente las partículas de polímero másico en medio acuoso por debajo de su LCST, pero presentando una estabilidad reducida por encima de la LCST.

10 Por consiguiente, las partículas poliméricas como se han descrito anteriormente son sorprendentemente beneficiosas en tanto que son estables a una temperatura por debajo de la LCST del polímero como se ha descrito anteriormente, pero tienen una estabilidad reducida a temperaturas por encima de la LCST de dicho polímero. Este cambio puede usarse como un desencadenante para asociar/disociar los polímeros LCST y sus combinaciones con las partículas poliméricas másicas.

15 Aunque la invención se describe principalmente con relación al uso de un cambio de temperatura para suscitar un cambio en las propiedades de estabilización estérica de los polímeros LCST, la LCST de un polímero LCST puede variar con otras propiedades de la solución en la que residen las partículas. Por ejemplo, la LCST puede verse afectada por la fuerza iónica, el campo eléctrico, el pH, la composición de disolvente y cualquier agente usado como codisolvente. Cualquier factor que cambie la temperatura crítica inferior en solución de los polímeros LCST puede
20 variarse para provocar un cambio en las propiedades de estabilización estérica de los polímeros LCST y, por lo tanto, provocar un cambio en la estabilidad de las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente.

25 De esta manera, puede preverse que cualquier cambio en las propiedades del disolvente, es decir, la capacidad de un líquido o una mezcla líquida de disolver un soluto, que afecte a la temperatura crítica inferior en solución, puede usarse como un desencadenante para asociar/disociar los polímeros LCST y sus combinaciones con partículas.

De esta manera, la invención se refiere a partículas poliméricas que pueden asociarse reversiblemente en solución/suspensión y a su aplicación en el campo biomédico.

30 Las aplicaciones clave para la invención son en liberación controlada, incluyendo liberación de sabor/fragancia y especialmente en el campo biomédico. La masa de las partículas poliméricas puede incorporar principios activos, que para aplicaciones biomédicas serán fármacos y productos biofarmacéuticos de molécula pequeña para suministro de fármacos convencional, o factores de crecimiento de liberación lenta u otras moléculas solubles para crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa.

35 Las partículas poliméricas de la invención, por lo tanto, pueden comprender ingredientes activos seleccionados de: sabores, fragancias, fármacos y productos biofarmacéuticos de molécula pequeña, y factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa. Estos ingredientes activos se incorporan adecuadamente en la masa de las partículas poliméricas.

40 En los ejemplos prácticos, los principios activos incorporados en la masa de las partículas se ejemplifican mediante marcadores fluorescentes, pero para aplicaciones biomédicas estos serían fármacos y productos biofarmacéuticos de molécula pequeña para suministro de fármaco convencional o factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para crecimiento de tejidos.

45 Por consiguiente, la invención proporciona el uso de las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente en aplicaciones de liberación controlada.

50 Las aplicaciones, por ejemplo, pueden seleccionarse de aplicaciones de liberación de sabor, aplicaciones de liberación de fragancia y aplicaciones biomédicas, tal como aplicaciones de administración convencional de fármacos. En particular, las aplicaciones pueden implicar la liberación de fármacos o productos biofarmacéuticos de molécula pequeña para administración de fármacos convencional, o liberación de factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa.

55 Las partículas pueden dispersarse con células u otros materiales biológicos, a temperaturas por debajo de 37 °C, para formar suspensiones fluidas, y formar geles de llenado de espacios a la temperatura corporal, que respaldan el crecimiento de las células.

60 Por lo tanto, la invención proporciona también un producto que comprende las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente y un material biológico, tal como células.

Tal producto será una dispersión por debajo de la temperatura crítica inferior en solución del polímero, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, puede proporcionarse inicialmente como una suspensión fluida.

Tal producto puede usarse para encapsular las células u otro material biológico por encima de la temperatura crítica inferior en solución del polímero LCST, como se ha descrito anteriormente. A tal temperatura este forma un gel de llenado de espacios que respalda el crecimiento de las células u otro material biológico.

5 Preferentemente, la temperatura crítica inferior en solución del polímero LCST, como se ha descrito anteriormente, está justo por debajo de la temperatura corporal, de manera que el producto es una dispersión a temperatura ambiente y un gel a la temperatura corporal.

10 Esencialmente, cuando las células se proporcionan junto con las partículas, las partículas pueden formar una envuelta porosa para las células durante el crecimiento celular; esto permitirá la generación de arquitecturas de matriz que pueden promover el contacto célula-célula y fomentar una generación de tejidos potenciada.

15 Las partículas poliméricas de la invención, por tanto, pueden verse como un sistema de administración de células coloidales.

La invención proporciona también el uso de las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente como matrices de soporte celular.

20 La invención proporciona también una matriz de soporte celular que comprende las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente.

La invención proporciona también una suspensión fluida que comprende (i) células y (ii) las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente, a una temperatura por debajo de 37 °C.

25 La invención proporciona también un gel para llenar espacios que respalda el crecimiento celular que comprende (i) células y (ii) las partículas poliméricas como se ha descrito anteriormente, a la temperatura corporal.

30 La invención proporciona también el uso de polímeros como se ha descrito anteriormente, ya sea individualmente o en combinación, para preparar micropartículas que se dispersan con las células a temperaturas por debajo de 37 °C, para formar suspensiones fluidas y que forman geles de llenado de espacios a la temperatura corporal, que respaldan el crecimiento celular.

35 Estos polímeros, ya sea individualmente o en combinación, pueden dividirse en la superficie de esferas poliméricas biodegradables durante la preparación de partículas, generando así micropartículas que tienen una estabilidad coloidal y propiedades de biomaterial altamente controlables.

La Figura 1 proporciona una ilustración de los conceptos de la invención.

40 La Figura 1(a) muestra el concepto subyacente a la estabilización estérica de las micropartículas; la prolongación de la cadena de una corona de PEGMA-co-PPGMA hidratada evita las fuerzas de atracción entre partículas dominantes. En la Figura 1(b) puede verse que el colapso de la capa de PEGMA-co-PPGMA por encima de la LCST reduce la estabilidad coloidal; las interacciones atractivas entre las partículas provocan agregación.

45 En la Figura 1(c) se muestra la extensión de este concepto para dispersiones de partículas y células por debajo de la LCST; la encapsulación de las células ocurre por encima de la LCST, como se muestra en la Figura 1(d).

50 En la presente invención, se proporcionan partículas inteligentes con superficie modificada técnicamente que son sencillas de preparar, presentan un comportamiento termosensible bien controlado y son biocompatibles y biodegradables. Estos materiales ofrecen un número de posibilidades en aplicaciones de suministro de células y de modificación técnica de tejidos.

55 Por ejemplo, la química superficial del polímero LCST podría controlarse mediante modificaciones de comonómeros en la polimerización inicial para dar funcionalidades adicionales y respuestas que son de naturaleza biomiméticas. Estas podrían ser respuestas basadas en ácido para ayudar a regular la degradación de PLGA o funcionalidades bioadhesivas para elementos miméticos clave de la matriz extracelular.

Descripción de las figuras

60 Las figuras no limitativas, que ilustran la invención, son las siguientes:

La Figura 1 es un esquema de las partículas poliméricas de la invención, que actúan como un sistema de suministro coloidal de células.

65 La Figura 2 ilustra la síntesis y propiedades de las partículas poliméricas de la invención, que son micropartículas biodegradables termosensibles.

La Figura 3 muestra el análisis con sonda de textura de suspensiones coloidales y geles termorreversibles formados a partir de las partículas poliméricas de la invención.

La Figura 4 muestra la encapsulación *in situ* de células mediante partículas poliméricas de la invención y la formación de un andamiaje de tejido a partir de las partículas poliméricas.

La Figura 5 muestra un espectro de RMN H del copolímero PEGMA-co-PPGMA (25/75), que es un polímero LCST de la invención.

La Figura 6 ilustra el tamaño de partícula típico de las micropartículas de PLGA de acuerdo con la invención.

La Figura 7 muestra el equipo usado para ensayos de compresión uniaxial.

La Figura 8 muestra A) exploración rotatoria de MicroCT, B) exploración reconstructiva de MicroCT para las partículas poliméricas de la invención.

La Figura 9 muestra características de los polímeros LCST de la invención en diferentes entornos.

La Figura 10 muestra la transición de fase, como se observa por DLS, para una solución acuosa de un copolímero PEGMA-PPGMA (25/75), que es un polímero LCST de la invención.

La Figura 11 muestra datos reológicos para micropartículas de PLGA de acuerdo con la invención, de 20 °C a 45 °C.

Descripción detallada de la invención

Los ejemplos de la invención se prepararon de la siguiente manera.

Materiales

Los materiales usados fueron:

- PLGA (relación molar lactida/glicolida de 75/25, peso molecular Mn= 12000, PDI = 1,50) se adquirió de AstraZeneca y se usó tal cual se suministró.
- El polímero (tensioactivo-copolímero o polímero LCST) PEGMA-co-PPGMA (PEGMA/PPGMA=25:75, peso molecular Mn = 15.500, PDI = 1,61) se preparó por copolimerización de metacrilato de poli(etilenglicol) (PEGMA, Mn = 475, Aldrich) y metacrilato de poli(propilenglicol) (PPGMA, Mn = 430, Aldrich), como se describe adicionalmente más adelante.
- Acetato de etilo, azobisisobutironitrilo (AIBN) y 1-dodecanotiol eran de calidad analítica de Aldrich y se usaron tal cual se suministraron.
- Bromuro de cobre (I) (Aldrich, 98 %) y cloruro de cobre (I) (Acros, 95 %) se lavaron con ácido acético glacial para retirar cualquier especie oxidada soluble, se filtraron, se lavaron con etanol y se secaron.

Métodos

1. Preparación del copolímero LCST: PEGMA-co-PPGMA

a) Polimerización por radicales libres convencional.

Un matraz de fondo redondo equipado con una llave de paso tridireccional se cargó con AIBN (0,957 g, 6,1 milimoles), PEGMA (5,532 g, 11,6 milimoles), PPGMA (15 g, 34,9 milimoles) y 1-dodecanetiol (0,38 g, 1,86 milimoles) en butanona desoxigenada (30 ml). La solución se agitó durante 10 minutos hasta que los contenidos se disolvieron completamente, después los contenidos se desoxigenaron mediante ciclos de congelación-descongelación (x 3) seguido de purga con nitrógeno. El matraz se sumergió en un baño de aceite y la polimerización se realizó a 70 °C durante 8 horas. La solución se diluyó con acetona y se precipitó en un gran exceso de hexano. Tras la retirada de la capa de disolvente superior, el polímero precipitado se secó al vacío para deshacerse del disolvente residual. Después, el polímero se disolvió en agua desionizada y posteriormente se purificó por diálisis (corte de peso molecular: 6000) frente a agua desionizada reciente. Finalmente, el agua se retiró por destilación azeotrópica con etanol para dejar el copolímero anfilílo.

b) Polimerización por radicales con transferencia atómica.

Un matraz de fondo redondo equipado con una llave de paso tridireccional se cargó con CuBr (64,5 mg, 0,448 milimoles), biperidina (139 mg, 0,891 milimoles), y después se conectó a una línea de nitrógeno o una bomba de vacío. El oxígeno se retiró mediante ciclos de vacío-nitrógeno repetidos. Una vez cargado con nitrógeno, el matraz se llenó con PEGMA desgasificado (5,532 g, 11,6 milimoles), PPGMA (15 g, 34,9 milimoles) y butanona (30 ml). Después de agitar durante una hora a temperatura ambiente, se añadió una solución de 2-bromopropionato de metilo (1,1 ml) en

butanona (0,42 M), y la polimerización se realizó a la temperatura deseada (típicamente 60 °C) durante 10 horas. Después de la polimerización, la solución se diluyó con acetona y se hizo pasar a través de una columna de sílice para retirar el catalizador de cobre y se precipitó en un gran exceso de hexano. La purificación adicional fue mediante reprecipitaciones y diálisis, seguido de liofilización como se ha descrito anteriormente.

5

2. Preparación de dansilo-copolímero PEGMA-co-PPGMA

Se disolvió 1 g de PEGMA-co-PPGMA ($M_n=15.500$) en THF (15 ml). Se añadieron trietilamina (0,0139 g, 0,137 milimoles) y cloruro de dansilo (0,037 g, 0,137 milimoles) a la solución. La reacción después se puso en la oscuridad con agitación durante una noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtró y después se añadió gota en hexano con agitación vigorosa. La solución después se mantuvo estacionaria durante 30 minutos y se recogió la muestra de polímeros precipitados. El polímero se purificó por precipitación tres veces y finalmente se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente.

15 3. Preparación de micropartículas de PLGA revestidas con copolímero de PEGMA-co-PPGMA

Se prepararon micropartículas de PLGA usando un método de emulsión-evaporación-difusión (ilustrado en la Figura 2). Típicamente, se disolvió PLGA (200 mg) en acetato de etilo (5 ml) y se añadió a una solución de copolímero de PEGMA-co-PPGMA en agua (10 ml, $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). La emulsión resultante se homogeneizó a 11000 rpm durante 45 segundos y se añadió a una segunda solución de PEGMA-co-PPGMA (15 ml, $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) con homogeneización adicional a 1.100 rpm durante 45 segundos. El disolvente orgánico a partir de los núcleos de las partículas se retiró al vacío. Las micropartículas se separaron por centrifugación (2500 rpm) de la fase acuosa y se resuspendieron en agua antes de la liofilización.

25 Descripción de las técnicas analíticas

i. Determinación de las temperaturas críticas inferiores en solución (LCST)

Se calentaron soluciones de polímero de PEGMA-co-PPGMA en PBS (pH 7,4, $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $1,0 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en un espectrofotómetro Beckman DU-640. Las LCST de los sistemas de copolímero se consideraron como el comienzo de un brusco aumento en la absorbancia a 550 nm.

ii. Cromatografía de permeación en gel

El peso molecular promedio en número (M_n), el peso molecular promedio en peso (M_w) y la polidispersidad (M_w/M_n) se obtuvieron por cromatografía de permeación en gel (PL-120 y PL-50 Polymer Labs) con triple detección. Las columnas (PLgel Mixed-C de 30 cm, 2 en serie) se eluyeron con THF y se calibraron con patrones de poliestireno. Toda la calibración y el análisis se realizaron a 40 °C y un caudal de 1 ml/min: en estas condiciones, todos los productos se disolvieron completamente en THF y se hicieron pasar a través de un filtro de 0,2 μm antes de la inyección, observándose poca o ninguna contrapresión.

iii. Mediciones del tamaño de partícula

Los tamaños y distribuciones de micelas y micropartículas se midieron usando instrumentos Malvern Zetasizer Nano y Coulter LS 230 (Beckman Coulter). Para los experimentos de dispersión dinámica de luz, se prepararon soluciones de PEGMA-co-PPGMA ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en agua DI y se filtraron antes de la medición usando un filtro desechable de 0,45 μm (PTPE Acrodisc CR) en una cubeta desechable de poliestireno de 12,5 x 12,5 mm. Para mediciones del tamaño de micropartículas con el Coulter LS230, las muestras se resuspendieron en agua DI a un valor de oscurecimiento de entre el 8 %-12 %.

50

iv. Ensayos de compresión uniaxial

Los ensayos de compresión uniaxial se realizaron en condiciones ambiente con un analizador TA HDPlus suministrado por Stable Micro Systems. La inyectabilidad se determinó a 2 mm/s a través de una boquilla de jeringa PlastipakTM BD de 1 ml. La fuerza de compresión del andamiaje (en húmedo y en seco) se determinó a 0,01 mm/s seguido de formación de gel en un cilindro de jeringa de 4,5 mm de diámetro a 37 °C durante 30 minutos.

La Figura 7 muestra el aparato usado para los ensayos de compresión uniaxial.

60 v. Microscopía de exploración electrónica

Se registraron micrografías de exploración electrónica usando un instrumento JEOL JSM-6060LV. Se pusieron micropartículas poliméricas sobre tocones de platino y se revistieron por bombardeo durante 4 minutos, usando un movimiento planetario rotatorio complejo para permitir que las superficies irregulares se revistieran uniformemente.

65

vi. Cultivo celular

Las células de la línea C2C12 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS), 1 % de glutamina y 2,5 mg/ml de anfotericina B (solución antibiótica/antimicótica), en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se hicieron pasar cada 2-3 días usando 0,25 % de tripsina/0,02 % de EDTA en PBS y se volvieron a sembrar antes de su uso. Para experimentos de microscopía, se pusieron micropartículas de PLGA en viales de Eppendorf y se esterizaron por UV durante 2 horas. Las células C2C12 se tripsinizaron y resuspendieron en DMEM, después se centrifugaron y volvieron a suspender en DMEM que contenía un tinte fluorescente (C34551 Rastreador celular naranja CMRA) durante 45 minutos. Después, las células marcadas se centrifugaron y se les añadió solución salina tamponada de Hank (HBSS). Después se mezclaron aproximadamente 500.000 células (en 0,25 ml de tampón HBSS) con micropartículas de PLGA (150 mg). La mezcla se incubó en seis pocillos de cultivo sin tejido en placas a 37 °C durante 30 minutos para formar un andamiaje y fue seguido de la adición de DMEM para incubación adicional. Se tomaron imágenes de fluorescencia después de que las células se lavaran con PBS estéril y se transfirieran a placas de seis pocillos sin cultivo tisular nuevas. La viabilidad de las células se evaluó usando el ensayo Alamar azul (Biosource Europe).

Análisis

A. Características para copolímeros de PEGMA y PPGMA

En la Tabla 1 se muestran los nuevos polímeros sensibles biocompatibles sintetizados por polimerización de poli(etilenglicol)metacrilato (PEGMA) y poli(propilenglicol)metacrilato (PPGMA) en diversas relaciones de monómero, por los métodos descritos anteriormente.

Tabla 1 - Polimerización de PEGMA y PPGMA por polimerización con radicales con transferencia atómica (ATRP) y polimerización por radicales libres convencional (FRP)

[PEGMA]:[PPGMA]:[I] ^a o CTA ^b (relación en moles)	Mn	PDI	Rendimiento	LCST (°C)
70:30:1 a	33.500	1,43	80 %	70
50:50:1 a	32.700	1,37	81 %	59
25:75:1 a	31.700	1,33	79 %	36
25:75:2 a	16.700	1,39	83 %	35
25:75:2 b	30.300	1,69	99 %	34
25:75:4 b	15.500	1,61	93 %	36

Para ATRP: I^a = Iniciador, [I]/[Cu(I)]/[Bipi] = 2:1:2, Iniciador: 2-bromopropionato de metilo, Monómero/Disolvente (v/v) = 1:1. Disolvente: butanona. Condiciones de reacción: 60 °C durante 10 horas.
 Para FRP: Se usó AIBN como iniciador, AIBN/monómero (relación en peso) = 0,5 %, Monómero/Disolvente (v/v) = 1:1. Disolvente: butanona. Condiciones de reacción: 70 °C durante 8 horas.

Para polimerización por radicales libres convencional (FRP) y polimerización por radicales con transferencia atómica (ATRP) pueden usarse rutas para generar copolímeros de peine que presentan temperaturas críticas inferiores en solución (LCST), en solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4.

Hay interés en polímeros que presentarían LCST a la temperatura corporal. Se prepararon satisfactoriamente copolímeros de PEGMA₂₅-PPGMA₇₅ de masa molar y polidispersidad variables con una LCST de aproximadamente 37 °C.

El control de la relación de iniciador:monómero en las rutas ATRP de la relación de agente de transferencia de cadena (CTA):monómero permite el control sobre la masa molar, mientras que la relación de comonómero posibilita el ajuste de la LCST sobre un amplio intervalo de temperatura.

Se llevó a cabo RMN ¹H en el copolímero de PEGMA-co-PPGMA (25/75), y el espectro se muestra en la Figura 5.

Se evaluó el efecto del peso molecular sobre la LCST de los polímeros (usando copolímeros con los mismos componentes monoméricos) y los resultados se muestran en la Figura 9A. La Figura 9B muestra la LCST para el copolímero de PEGMA-co-PPGMA tanto con calentamiento como con enfriamiento. La Figura 9C muestra la influencia del pH sobre la LCST del copolímero. La Figura 9D muestra el efecto de la concentración de NaCl sobre la LCST. En todas las figuras, se usó PEGMA-co-PPGMA (25/75) y la concentración del copolímero era de 3 mg/ml en cada caso.

La transición de fase de bobina a glóbulo para copolímeros PEGMA_xPPGMA_y se muestra mediante un aumento de la dispersión de luz en la Figura 2(iii). Las transiciones de fase de los polímeros sintetizados se ven como un estrechamiento.

El aumento en las proporciones de componentes PEGMA hidrófilos a monómero de PPGMA hidrófobo aumentó la LCST como se esperaba (véase tanto la Tabla 1 como la Figura 2(iii)). Sin embargo, y de manera importante para esta solicitud, la LCST era similar a través de un amplio intervalo de masas molares para una relación molar PEGMA:PPGMA dada.

5 La Figura 2(iv) representa la transición de sol a gel para los polímeros LCST. Se formaron soluciones de baja viscosidad con copolímeros PEGMA₂₅PPGMA₇₅ de masas molares de bajas a intermedias (< 30 kDa), por debajo de la LCST; estos polímeros precipitaban en solución por encima de la LCST.

10 Aumentar la masa molar de PEGMA₂₅PPGMA₇₅ a 160 kDa dio como resultado un gel estable en agua por encima de la LCST. La muestra por debajo de la LCST está a la izquierda y la muestra por encima de la LCST está a la derecha.

15 A concentraciones de ~1 mg.ml⁻¹ en agua, los polímeros de PEGMA₂₅PPGMA₇₅ formaban micelas, como se pone de manifiesto por la dispersión de luz dinámica, que cambia en el radio hidrodinámico de ~ 100 nm a 350 nm a medida que la temperatura aumentaba desde por debajo de la LCST (~ 35 °C) hasta por encima de la LCST, respectivamente.

La Figura 10 muestra una representación del radio hidrodinámico Rh (eje y) como una función de la temperatura (eje x, en °C) según se mide por DLS para una solución acuosa (1 mg/ml) del copolímero de PEGMA-PPGMA (25/75).

20 B. Síntesis y propiedades de micropartículas biodegradables termosensibles

En la Figura 2(i) hay una ilustración de los monómeros de PEGMA y PPGMA que se copolimerizan por técnicas de radicales libres o de radicales controlados (ATRP), para generar los copolímeros de peine mostrados en la Figura 2(ii).

25 En las Figuras 2 (v-viii) se muestra la preparación de las partículas inteligentes con modificación técnica en la superficie. La preparación de partículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) estabilizadas con los copolímeros de PEGMA-PPGMA se llevó a cabo por el método de emulsión/difusión/evaporación. Específicamente, se añade una solución de PLGA en acetato de etilo a un polímero de PEGMA-co-PPGMA en agua y se agita para generar una emulsión como se muestra en la Figura 2(v). El copolímero anfífilo estabiliza las gotas de disolvente que contiene PLGA durante la agitación rápida, como se muestra en la Figura 2(vi). La evaporación de disolvente de la fase orgánica deja partículas de PLGA revestidas de PEGMA-coPPGMA, como se muestran en la Figura 2(vii). Estas se recubren por centrifugación y se resuspenden en agua, como se muestra en la Figura 2(viii).

35 En las Figuras 2(ix) y 2(x) se muestra un esquema de la respuesta de la superficie de la capa de PEGMA-co-PPGMA. Puede verse que las micropartículas producidas tienen un diámetro de 2-4 μm con una "corona" superficial del polímero LCST sensible.

40 Las partículas formaron dispersiones estables en agua y PBS, pero precipitaron a concentraciones bajas, como se muestra mediante dispersión de luz. La Figura 2(xi) muestra la reducción en la dispersión de la luz que ocurre cuando las partículas precipitan por encima de la LCST.

45 Cuando estaban presentes en mayores concentraciones, las partículas formaban un gel autónomo hidratado. En la Figura 2(xii) se muestra la formación del gel de llenado de espacios (derecha) a partir de una solución fluida de las partículas (izquierda) tras un cambio en la temperatura, por encima de la LCST.

La Microscopía Electrónica de Barrido confirmó la morfología de partícula. En la Figura 2(xiii) se muestra el análisis SEM de las partículas. Esto indica partículas esféricas de baja polidispersidad.

50 La encapsulación de rojo Nilo como un "principio activo" hidrófobo representativo en el núcleo de PLGA permitió una detección simple de los componentes de PLGA y filtros selectivos en microscopía demostraron la presencia tanto del tinte encapsulado como de la capa de PEGMA-PPGMA atrapada en la superficie.

Las estructuras multi-capa de las partículas revestidas se confirmaron por microscopía de fluorescencia (filtro de emisión Texas Red), con rojo Nilo encapsulado en los núcleos de PLGA, como se muestra en la Figura 2(xiv).

55 El uso del copolímero de PEGMA-PPGMA marcado con dansilo permitió la detección de la corona superficial por microscopía de fluorescencia. El PEGMA-co-PPGMA marcado con dansilo reveló el revestimiento superficial, como se muestra en la Figura 2(xv) (filtro de emisión DAPI), que estaba co-localizado con el rojo Nilo encapsulado en los núcleos de PLGA, como se muestra en la Figura 2(xvi) (filtro de emisión rojo Texas).

60 La Figura 6 muestra tamaños de partículas típicos para las micropartículas de PLGA de la invención.

La Figura 11 muestra los datos de reología para las micropartículas de PLGA (concentración de las micropartículas de PLGA, 25 % p/v) de 20 °C a 45 °C.

65

El control del tamaño de partícula fue posible por variación de la relación PEGMA-co-PPGMA:PLGA con perlas más pequeñas y menores polidispersidades, dando como resultado mayores relaciones de PEGMA-co-PPGMA a PLGA. Las preparaciones típicas utilizaban una relación PLGA:PEGMA-PPGMA (p/p) de 2:1, produciendo partículas de 2,4 μm de diámetro, con un coeficiente de varianza del 63 % y >90 % de las partículas con un diámetro < 5 μm . Podían obtenerse tamaños de partículas similares a una relación PLGA:PEGMA-PPGMA de 0,4:1, pero aumentos en la relación de PLGA:PEGMA-co-PPGMA más allá de 4:1 aumentaban el tamaño de partícula por encima de 6 μm y conducían a la posterior agregación.

La estabilidad coloidal de las partículas depende de la carcasa de hidratación del revestimiento PEGMA-co-PPGMA, que a su vez varía con la masa molar.

De esta manera, los polímeros de mayor masa molar son capaces de mantener la estabilidad coloidal de partículas más grandes a través de una extensión mayor de la capa de protección estérica, como se ilustra en la Figura 1.

C. Inyectabilidad y propiedades mecánicas de suspensiones coloidales y geles termorreversibles

La inyectabilidad y las propiedades mecánicas de las suspensiones coloidales y geles termorreversibles formados a partir de las partículas poliméricas se investigaron con un analizador de textura (Figura 3).

Se muestra que la fuerza requerida para inyectar suspensiones de partículas (60 % p/v en PBS) varía solo ligeramente en comparación con un tampón y el movimiento del cilindro de la jeringa. Esto puede verse en la Figura 3a. La línea superior son las suspensiones de partículas, la línea media es el movimiento del cilindro de la jeringa y la línea inferior es el tampón.

El gráfico muestra la fuerza pico de la inyección a través de una boquilla de salida ahusada de 1,6 mm para la jeringa vacía en comparación con un tampón y una suspensión de andamiaje al 60 % p/p de sólidos. La jeringa vacía requiere una fuerza de pico de $1,17 \pm 0,15$ N, $1,125 \pm 0,18$ N con tampón y $2 \pm 0,03$ N con la suspensión de partículas. La fuerza de inyectabilidad pico de la dispersión está bastante dentro de las tolerancias de la operación manual del pistón. Los resultados para los sólidos al 60 % p/p muestran una buena repetibilidad dentro de las escalas de tiempo necesarias por un profesional médico.

En la Figura 3b las curvas fuerza-distancia de las partículas agregadas en húmedo y en seco indican un gel de alta resistencia.

La comparación de la resistencia del gel en húmedo y en seco después de la incubación a 37 °C durante 30 minutos mostró valores similares a 17 y 19 N, respectivamente. Esto indica que la formación de la estructura ocurre dentro de la incubación en un corto periodo desde la incubación.

D. Encapsulación *in situ* de células y formación del andamiaje de tejido

Las micropartículas con superficie modificada técnicamente de acuerdo con la invención, preparadas por el método de emulsión/difusión/evaporación como se ha descrito anteriormente en la sección 3 del método, se mezclaron con mioblastos C2C12 como una línea celular modelo, y se formaron suspensiones fluidas por debajo de la LCST de PEGMA₂₅PPGMA₇₅.

Después de la dispersión de las células a temperatura ambiente con partículas, la encapsulación de las células tuvo lugar a 37 °C produciendo geles estables. La Figura 4a muestra estas suspendidas en medio de crecimiento. Por consiguiente, la incubación de la suspensión mixta de partículas poliméricas y células a 37 °C (es decir, por encima de la temperatura crítica inferior en solución para el polímero LCST) generaba geles, igual que para las partículas poliméricas en solitario.

En las Figuras 4b y 4c se muestran micrografías de geles después de 1 semana de incubación en DMEM. La naturaleza porosa de los geles fue evidente en estas imágenes SEM y también a partir de tomografía micro-computacional (μCT).

La Figura 8 muestra las imágenes μCT para los geles formados a partir de las micropartículas de PLGA. La Figura 8A muestra una exploración rotatoria μCT y la Figura 8B muestra una reconstrucción 3D. Estas muestran macroporos y cavidades después de la encapsulación de las células y el secado.

La visualización de las células dentro de la matriz porosa se llevó a cabo usando marcado con Cell Tracker™; la microscopía de fluorescencia indicaba una distribución homogénea de las células por todo el gel, en comparación con los experimentos de control en un plástico de cultivo sin tejido (Figura 4d). Esta tinción de las células C2C12 con el Cell Tracker™ en el gel de PLGA revestido con PEGMA-PPGMA seccionado indica una viabilidad celular potenciada en el gel.

El uso de la tinción Live/Dead™ indicaba una viabilidad celular profunda en el gel (Figura 4e). Las células C2C12 marcadas con la tinción Live/Dead™ muestran fluorescencia verde mientras que las partículas de la matriz están teñidas de rojo.

5 La viabilidad y el metabolismo se evaluaron mediante el ensayo Alamar Azul. Los datos indicaban que la encapsulación de las células a través del proceso de gelificación térmica *in situ* tuvo lugar con retención completa de la viabilidad después de 24 h, y que las células aún estaban creciendo en este punto temporal. Los datos del ensayo Alamar Azul se muestran en la Figura 4f, confirmando una viabilidad similar para células en y sobre la matriz de gel, en
10 comparación con las células C2C12 en un plástico de cultivo sin tejido (Blanco). La muestra de control es fluorescente a partir del gel de PLGA revestido con PEGMA-PPGMA en solitario.

Significativamente, la viabilidad global de las células C2C12 fue tan buena en los geles como lo era para las mismas células fijadas a la superficie de la matriz preformada de PEGMA-co-PPGMA-PLGA, indicando así que el crecimiento celular puede tener lugar dentro del soporte, sin impedir el acceso de nutrientes durante el periodo de tiempo inicial.
15

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de partículas poliméricas, comprendiendo el método:

- 5 - la provisión de uno o más polímeros que es un polímero que muestra una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, siendo el polímero el producto de polimerización de uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables; y
 10 - la adición del polímero, como un tensioactivo con superficie modificada técnicamente, a una mezcla de reacción para la preparación de una partícula polimérica por un método seleccionado de métodos de emulsión, métodos de difusión y métodos de evaporación.

2. Partículas poliméricas, en las que las partículas son partículas poliméricas estables que tienen un tamaño entre 500 nm y 100 μ m de diámetro, según se mide por dispersión dinámica de luz y en las que las partículas:

- 15 (a) se forman por un método que implica el uso de un polímero LCST durante los procedimientos de síntesis por emulsión/difusión/evaporación con poli(ácido láctico-co-glicólico), siendo el polímero LCST un polímero que muestra una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, siendo este polímero el producto de polimerización de uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables; o
 20 (b) tienen un núcleo de polímero biodegradable que es poli(ácido láctico-co-glicólico), y una corona copolimérica biocompatible termosensible, en las que el copolímero es un polímero que muestra una temperatura crítica inferior en solución, en medio acuoso, que está entre 10 y 90 °C, siendo este polímero el producto de polimerización de uno o más monómeros seleccionados de monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables.

3. Las partículas de la reivindicación 2, en las que las partículas poliméricas:

- 30 (a) tienen una fase másica o núcleo de polímeros biodegradables seleccionadas de poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico); y/o
 (b) comprenden, en su fase másica o núcleo, ingredientes activos seleccionados de: sabores, fragancias, fármacos y productos biofarmacéuticos de molécula pequeña y factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para el crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa.

35 4. Las partículas de la reivindicación 2(a) en las que las partículas poliméricas son partículas poliméricas estables que tienen un tamaño entre 500 nm y 5 μ m de diámetro.

5. Las partículas de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en las que los monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y los monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables se seleccionan de:
 40 di(etilenglicol)-acrilato, oligo(etilenglicol)-acrilato, poli(etilenglicol)-acrilato, di(etilenglicol)-metacrilato, oligo(etilenglicol)-metacrilato, poli(etilenglicol)-metacrilato, poli(propilenglicol)-acrilato y poli(propilenglicol)-metacrilato.

6. Las partículas de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en las que el polímero que muestra una temperatura crítica inferior en solución:

- 45 (a) es el producto de polimerización de dos monómeros o
 (b) es el producto de polimerización de poli(etilenglicol)metacrilato (PEGMA) y poli(propilenglicol)metacrilato (PPGMA)
 o
 (c) es un polímero que tiene una masa molar de 25-75 kDa con un índice de polidispersidad (Pm/Mn) de 1-2,5, según se mide por GPC.

7. El uso de las partículas poliméricas como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6

- 55 (a) en aplicaciones de liberación controlada,
 en las que las aplicaciones se seleccionan opcionalmente de aplicaciones de liberación de sabor, aplicaciones de liberación de fragancia y aplicaciones biomédicas
 y en las que las aplicaciones pueden implicar, opcionalmente, la liberación de fármacos o productos biofarmacéuticos de molécula pequeña para administración convencional de fármacos o liberación de factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa;
 60 o

(b) como matrices de soporte celular,

65 en las que las partículas poliméricas opcionalmente respaldan el crecimiento celular.

8. Un producto que comprende las partículas poliméricas como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, y material biológico, en el que opcionalmente el material biológico son células.
- 5 9. Una matriz de soporte celular que comprende las partículas poliméricas como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que opcionalmente las partículas poliméricas respaldan el crecimiento celular.
10. Una suspensión fluida que comprende (i) células y (ii) las partículas poliméricas como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, a una temperatura por debajo de 37 °C.
- 10 11. Un gel de llenado de espacios que respalda el crecimiento celular que comprende (i) células y (ii) las partículas poliméricas como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, a la temperatura corporal.
- 15 12. El método de la reivindicación 1 en el que los monómeros de acrilato de alquilenglicol polimerizables y los monómeros de metacrilato de alquilenglicol polimerizables se seleccionan de: di(etilenglicol)-acrilato, oligo(etilenglicol)-acrilato, poli(etilenglicol)-acrilato, di(etilenglicol)-metacrilato, oligo(etilenglicol)-metacrilato, poli(etilenglicol)-metacrilato, poli(propilenglicol)-acrilato y poli(propilenglicol)-metacrilato.
- 20 13. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 12 en el que el polímero que muestra una temperatura crítica inferior en solución:
- (a) es el producto de polimerización de dos monómeros o
- (b) es el producto de polimerización de poli(etilenglicol)metacrilato (PEGMA) y poli(propilenglicol)metacrilato (PPGMA)
- o
- 25 (c) es un polímero que tiene una masa molar de 25-75 kDa con un índice de polidispersidad (P_m/M_n) de 1-2,5, según se mide por GPC.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 12 y 13, en el que las partículas poliméricas:
- (a) tienen una fase másica o núcleo de polímeros biodegradables seleccionadas de poli(ácido láctico-co-glicólico),
- 30 poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico); y/o
- (b) comprenden, en la fase másica o núcleo, ingredientes activos seleccionados de: sabores, fragancias, fármacos y productos biofarmacéuticos de molécula pequeña y factores de crecimiento de liberación lenta y otras moléculas solubles para el crecimiento de tejidos, reparación de órganos y medicina regenerativa.

35

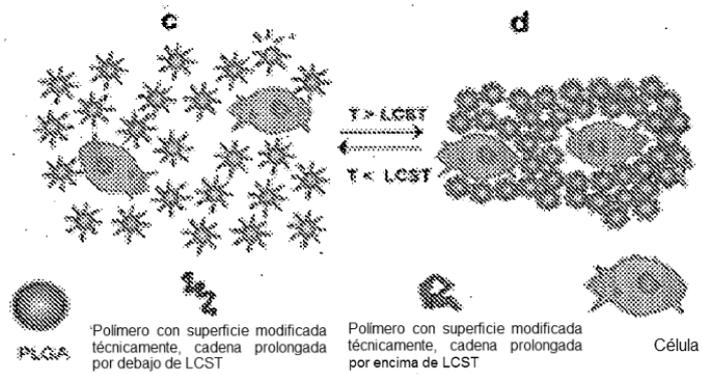
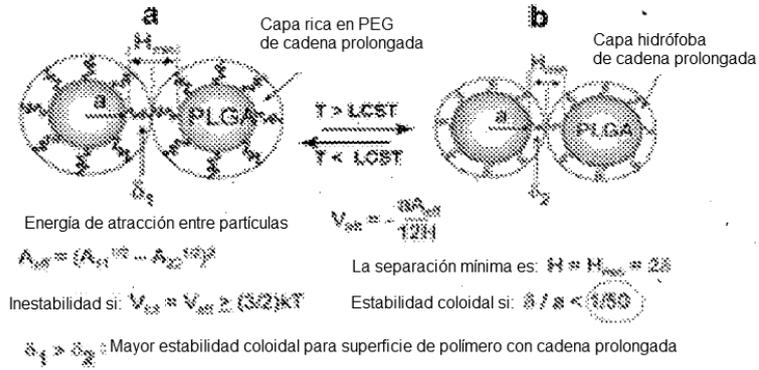


Figura 1

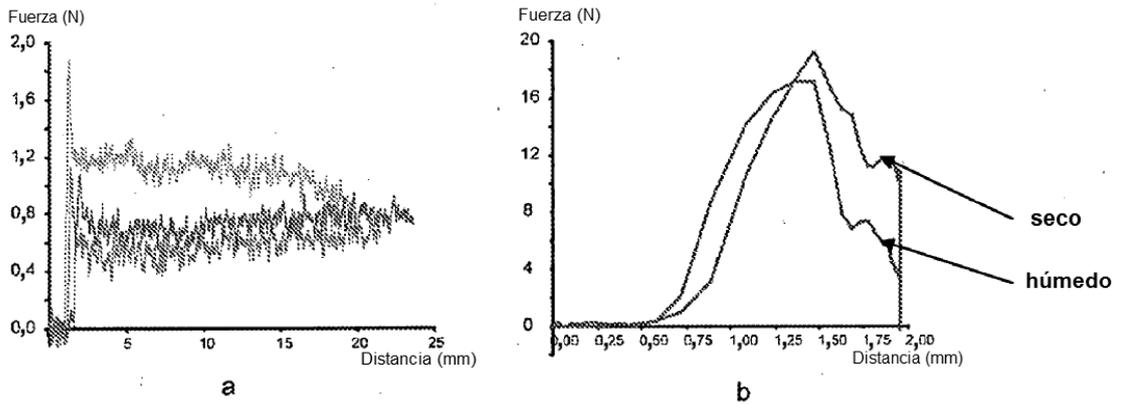


Figura 3

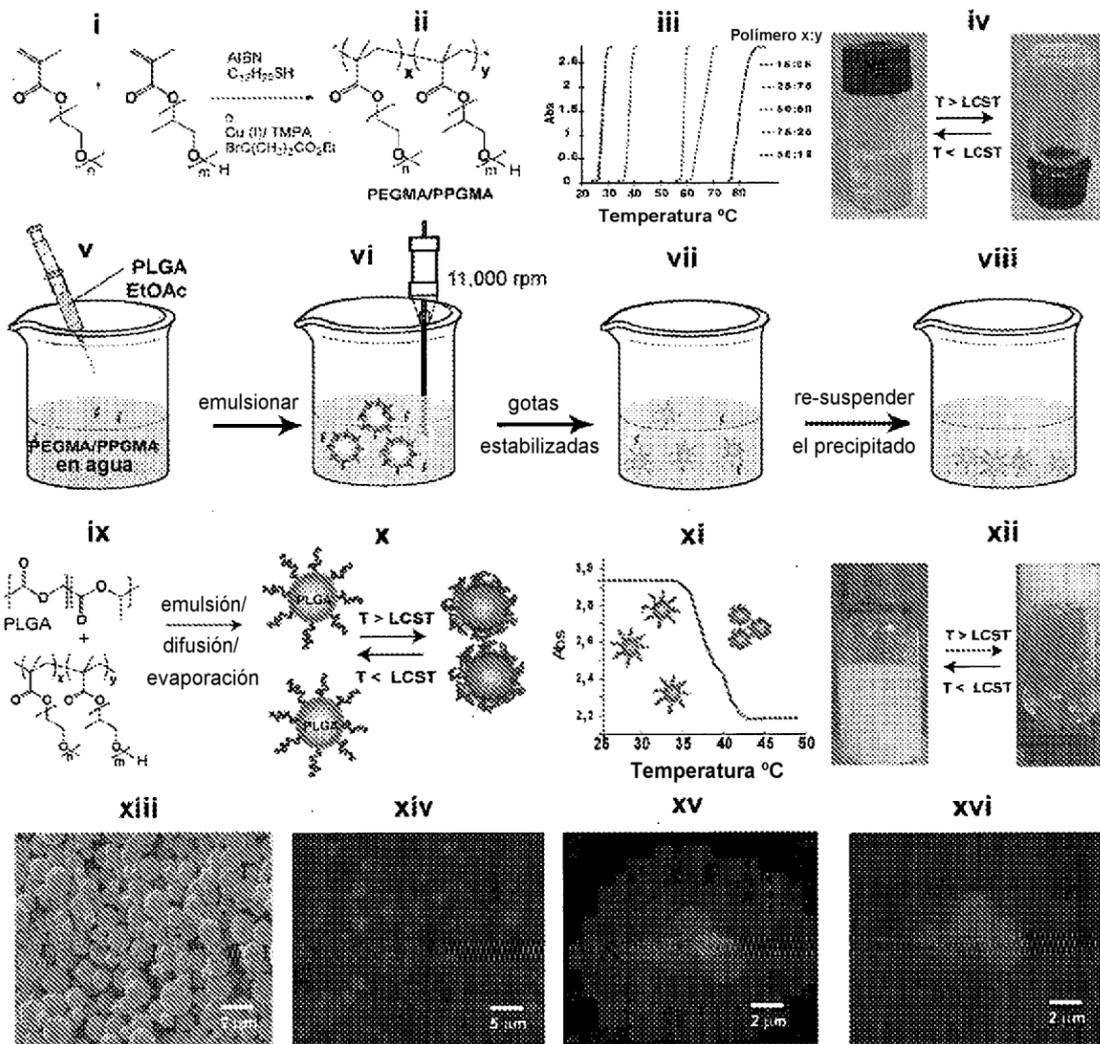


Figura 2

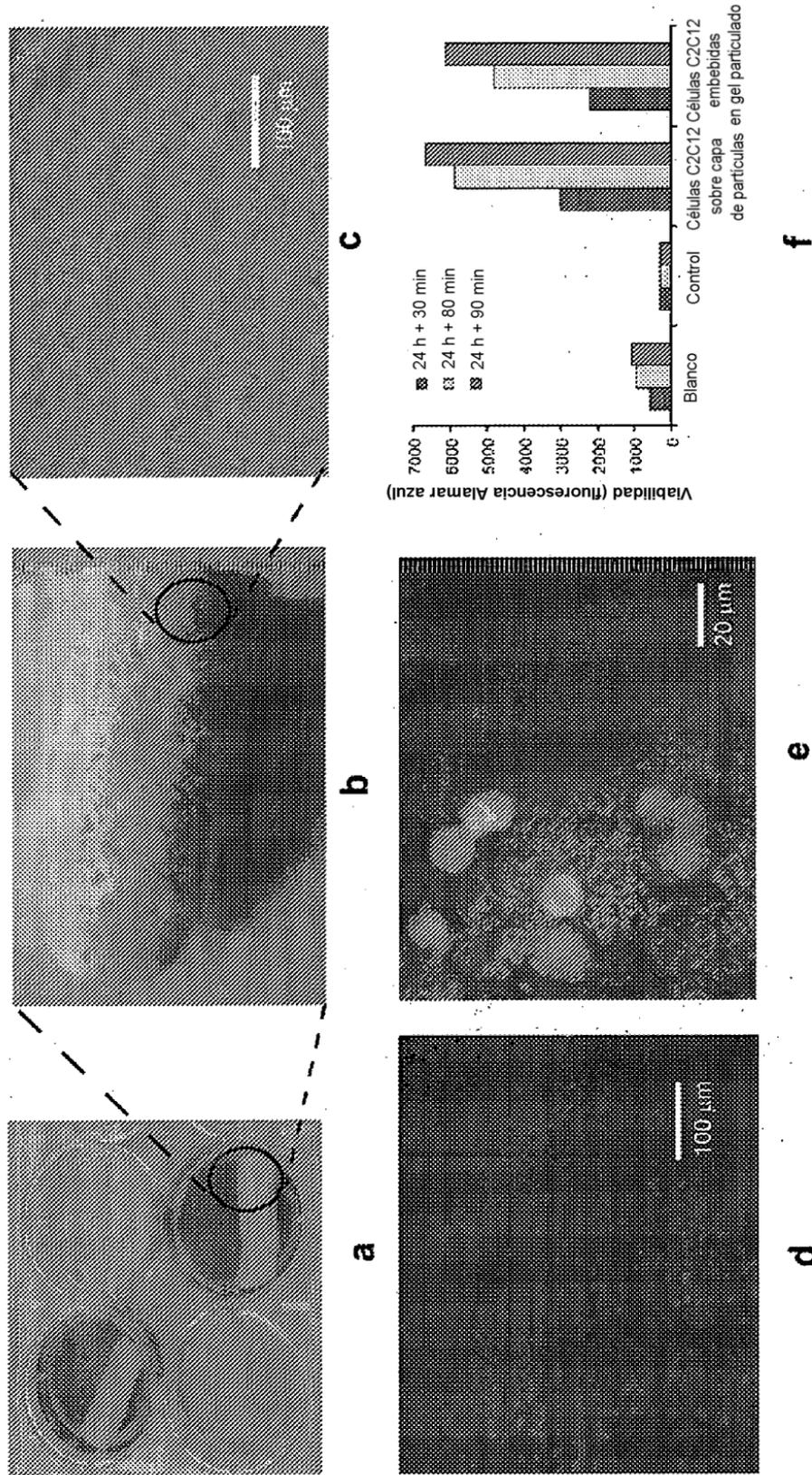


Figura 4

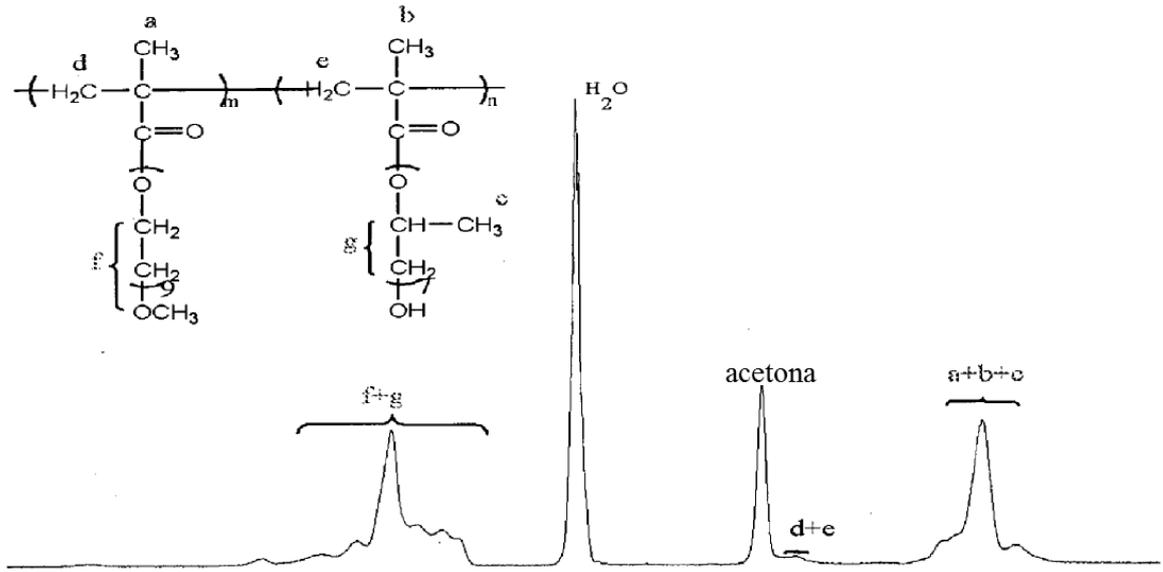


Figura 5

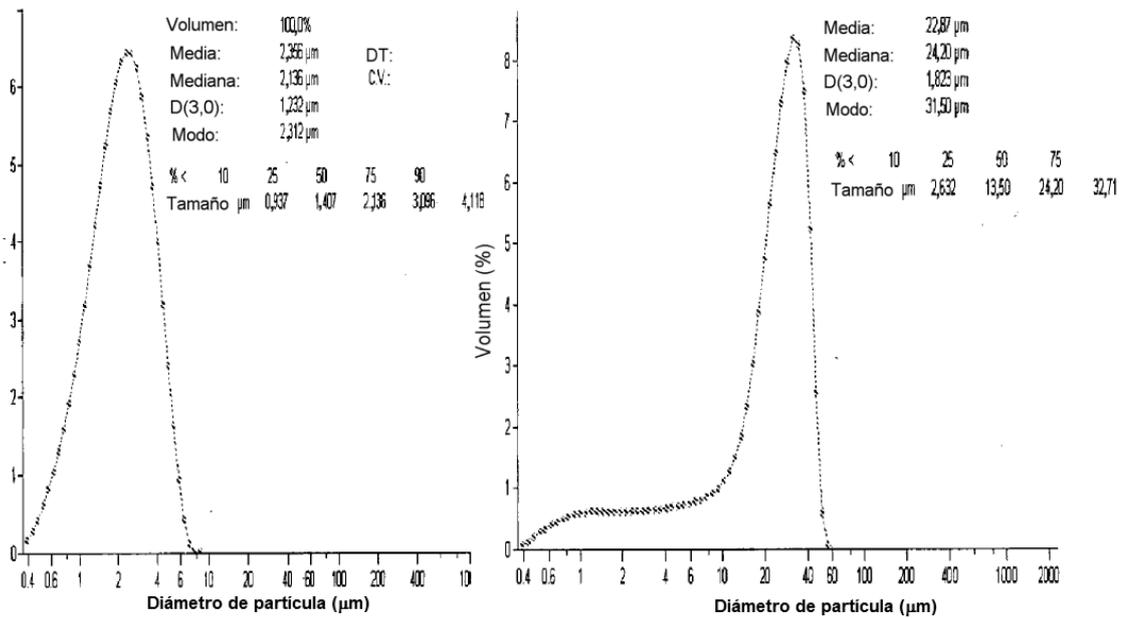


Figura 6

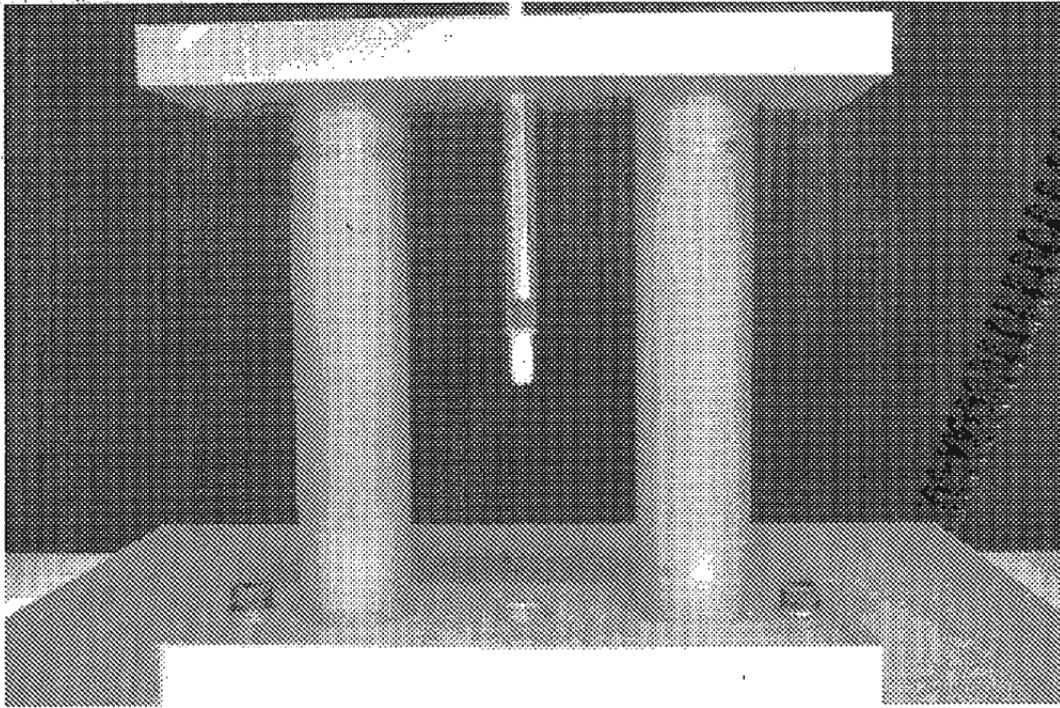
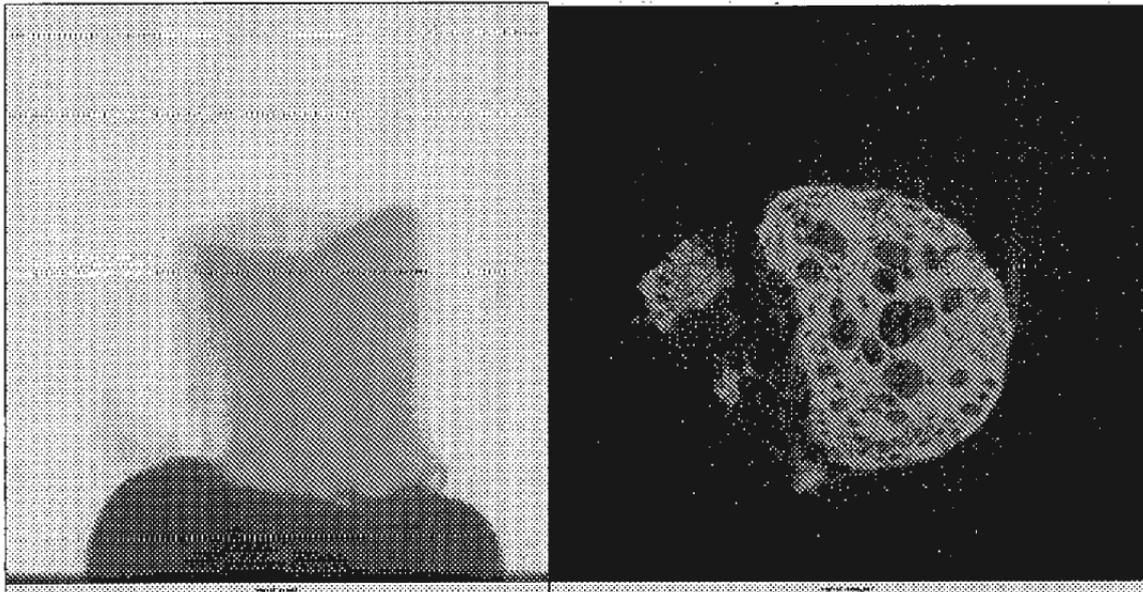


Figura 7



A

B

Figura 8

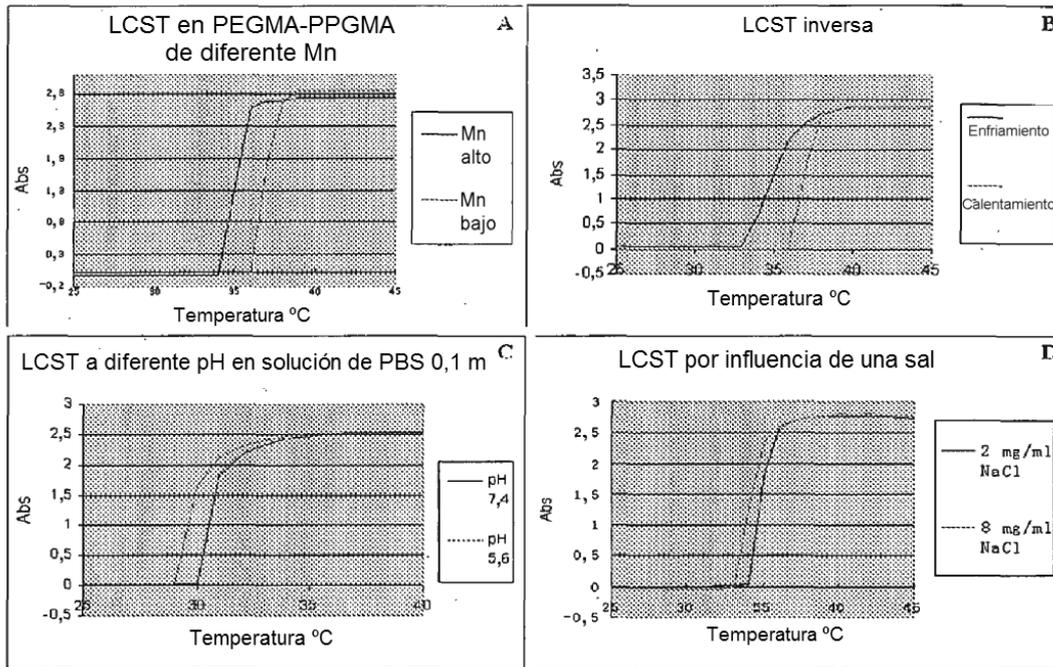


Figura 9

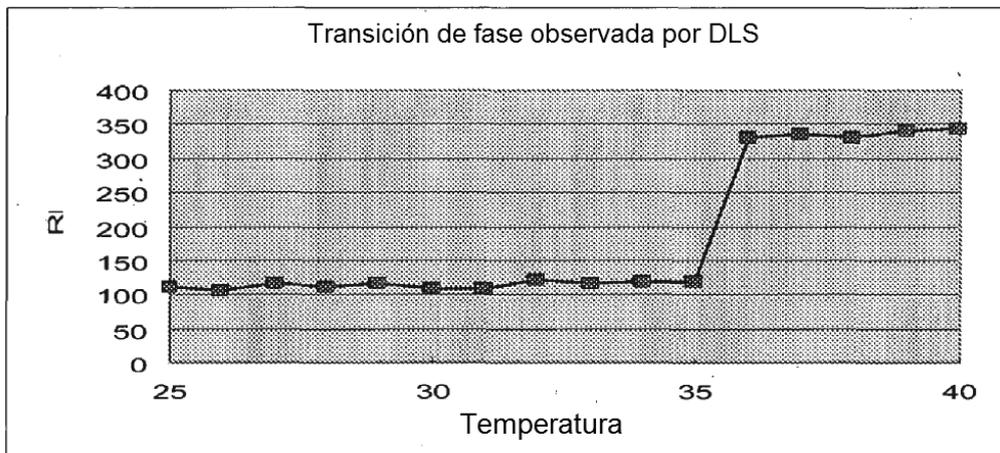


Figura 10

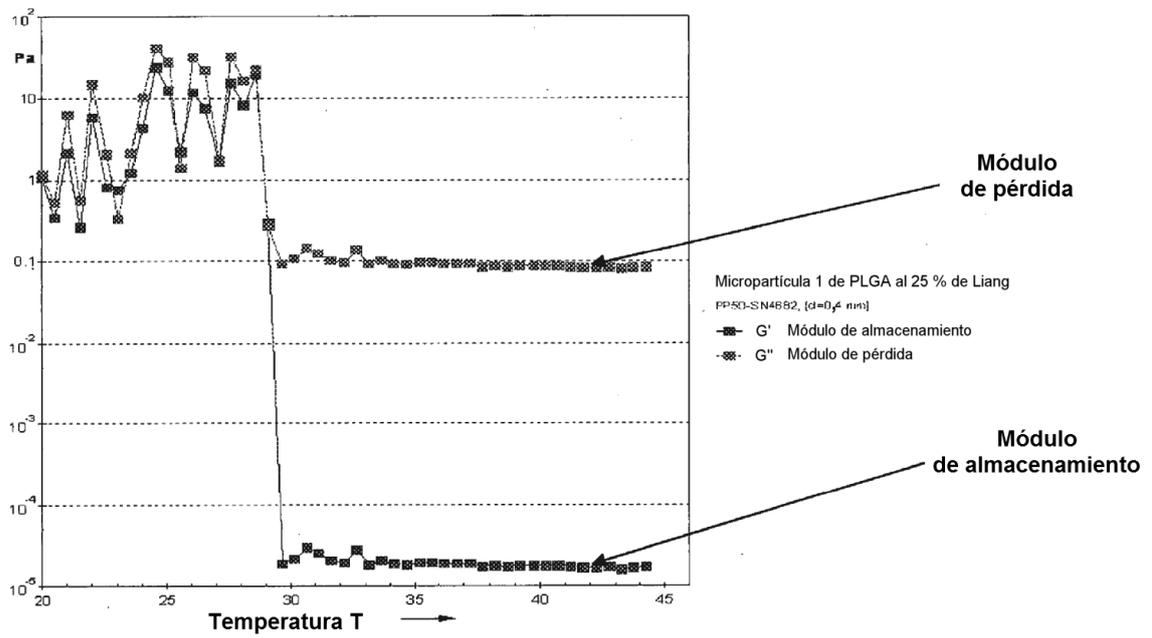


Figura 11