

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 319**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/718** (2006.01)  
**A61L 15/28** (2006.01)  
**A61L 15/64** (2006.01)  
**C08B 31/04** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**C08J 9/00** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61L 24/08** (2006.01)  
**C08B 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010 E 10834831 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2506859**

54 Título: **Microesferas de almidón hidrolizado con ligandos endógenos cargados**

30 Prioridad:

**04.12.2009 SE 0901521**

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

**27.09.2016**

73 Titular/es:

**MAGLE AB (100.0%)  
Magle Stora Kyrkogata 6  
223 50 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**MALMSJÖ, MALIN;  
THORDARSON, EDDIE;  
APPELL, STEN PETER y  
FYHR, PETER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 584 319 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**

Microesferas de almidón hidrolizado con ligandos endógenos cargados

5 La presente invención se define mediante las reivindicaciones, a saber, se refiere a microesferas biodegradables de almidón hidrolizado con ligandos endógenos y cargados que están unidos a éste. La invención también se refiere a un material que comprende tales microesferas y al uso de las microesferas o del material en la hemostasia, la cicatrización de heridas, el cultivo celular o la embolización vascular.

El almidón, un polímero ramificado de glucosas (cadenas de  $\alpha$ 4-glucosa con ramificaciones en  $\alpha$ 6), es un material natural que se encuentra en las plantas y en los animales, donde funciona como un almacén de energía. El polímero consiste en amilosa (de cadena larga y poco ramificada) y amilopectina (muy ramificada y de cadena corta).

10 Las microesferas degradables de almidón (MDA) están formadas por cadenas de almidón reticulado. Las microesferas degradables de almidón se han utilizado para la oclusión vascular temporal con y sin la coadministración de fármacos citotóxicos (tratamiento de tumores y prevención de hemorragias) durante muchos años, pero también se utilizan para la hemostasia tópica e intraoperatoria.

15 La amilasa del plasma degrada las microesferas de almidón *in vivo* en oligosacáridos, maltosa y, finalmente, en glucosa, que entra en el metabolismo normal.

Las micropartículas de almidón o de almidón modificado se han mostrado en la técnica anterior, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. 6.060.461 y la solicitud de patente internacional WO 2009/091549, entre otras cosas, para la hemostasia biocompatible.

20 Además, la patente de los EE. UU. 3.812.252 se refiere a un almidón hidrolizado y al uso del mismo para tratar heridas, entre ellas las crónicas.

La cicatrización de las heridas es el proceso intrincado en el cual la piel u otro órgano se repara a sí mismo después de la lesión. El modelo clásico de cicatrización de heridas se divide en cuatro fases secuenciales, aunque solapantes: (1) hemostática, (2) inflamatoria, (3) proliferativa y (4) de remodelación.

25 La hemostasia es la fase principal en la cicatrización de las heridas, en la que se consigue detener el proceso de la hemorragia. Al cabo de muy pocos minutos desde la lesión de la piel u otro órgano, las plaquetas (trombocitos) se activan y se agregan en el sitio de la lesión para formar un coágulo de fibrina.

30 Cuando se produce la lesión endotelial, las células endoteliales dejan de inhibir la coagulación y comienzan a segregar factores de coagulación que inducen la hemostasia después de la lesión. La hemostasia tiene tres etapas principales: 1) vasoconstricción, 2) bloqueo temporal mediante un tapón de plaquetas y 3) coagulación de la sangre mediante la conversión del fibrinógeno en fibrina y la formación de un coágulo que sella el agujero hasta que los tejidos están reparados.

En la fase inflamatoria, se fagocitan y retiran las bacterias y los residuos, y se liberan los factores que provocan la migración y la división de las células implicadas en la fase proliferativa.

35 Al cabo de aproximadamente 2 a 3 días, los fibroblastos comienzan a entrar en el sitio de cicatrización, lo que marca el comienzo de la fase proliferativa incluso antes de que la fase inflamatoria haya terminado. Esta fase se caracteriza por angiogénesis, depósito de colágeno, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. Durante la angiogénesis se forman nuevos vasos de sangre, que son necesarios para el suministro del oxígeno y los nutrientes al sitio de la herida con los que sostener las posteriores etapas de cicatrización de heridas. Simultáneamente, los fibroblastos comienzan a acumularse en el sitio de la herida, y su número alcanza un punto máximo al cabo de 1 a 2 semanas después del traumatismo. Al final de la primera semana, los fibroblastos son las principales células en la herida.

45 En los primeros 2 o 3 días después de la lesión, los fibroblastos se dedican principalmente a proliferar y migrar, mientras que después son las principales células que hay por debajo de la matriz de colágeno en el sitio de la herida. Inicialmente, los fibroblastos utilizan la costra de fibrina formada durante la fase inflamatoria para atravesarla y adherirse a la fibronectina. A continuación, los fibroblastos depositan la sustancia fundamental en el lecho de la herida y más tarde el colágeno, al que se pueden adherir para la migración. El tejido de granulación, que crece desde la base de la herida, comienza a aparecer en la herida ya durante la fase inflamatoria y continúa creciendo hasta que se cubre el lecho de la herida. El tejido de granulación consiste en nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatorias, células endoteliales, miofibroblastos y los componentes de una nueva matriz extracelular provisional. La reepitelización de la epidermis se produce cuando las células epiteliales proliferan y «se arrastran» para colocarse encima del lecho de la herida, lo que proporciona una protección para el nuevo tejido que se está formando desde abajo.

5 El cultivo celular es el proceso mediante el cual las células crecen en condiciones controladas. El desarrollo histórico y los métodos del cultivo celular están muy interrelacionados con los del cultivo de tejidos u órganos. El cultivo de células animales se convirtió en una técnica corriente de laboratorio a mediados del siglo XX, pero el concepto de mantener las líneas celulares vivas separadas de su fuente de tejido original se descubrió en el siglo XIX. El cultivo de tejidos es el crecimiento de los tejidos y/o células separadas del organismo. Típicamente se ve facilitado por el uso de un medio de crecimiento líquido, semisólido o sólido, tal como caldo o agar. En esta especificación, el cultivo celular y el cultivo de tejidos se utilizarán de manera sinónima.

10 Algunas células viven en suspensión de forma natural, sin estar adheridas a una superficie, tales como las células que existen en el torrente circulatorio. Estas células se pueden hacer crecer en suspensión. Sin embargo, la mayoría de las células procedentes de tejidos sólidos son dependientes de anclaje, se llaman células adheridas. Para crecer, las células adheridas requieren una superficie, tal como el plástico para cultivo de tejidos, o un microvehículo. Están disponibles microvehículos para hacer crecer las células adheridas, por ejemplo, microesferas de dextrano. Cuando las células adheridas se recogen o se les da un pase (transporte del subcultivo), hay que despegar las células de la superficie sobre la que han crecido. La forma habitual de hacerlo es mediante la adición de una mezcla de tripsina y EDTA al cultivo.

15 La embolización (oclusión) vascular se utiliza como una alternativa mínimamente invasiva a la cirugía. El propósito de la embolización es el de impedir que el torrente circulatorio fluya a una región del cuerpo, lo que crea una isquemia que, a efectos prácticos, consigue reducir un tumor o bloquear un aneurisma.

20 El procedimiento se realiza como un procedimiento endovascular, por un especialista en radiología en un tratamiento intervencionista. Es habitual que a la mayoría de los pacientes se les realice el tratamiento con poca o ninguna sedación, aunque esto depende mayormente del órgano a embolizar.

El acceso al órgano se logra por medio de un alambre de guía y uno o varios catéteres. El émbolo artificial utilizado suele ser uno de los siguientes métodos: espiral o hidroespiral, partículas, espuma o tapón.

25 Los agentes utilizados para el tratamiento de embolización son, entre otros, agentes embólicos líquidos que son capaces de fluir por las estructuras vasculares complejas. Los ejemplos de estos agentes son etiodol, hecho de yodo y aceite de semilla de amapola, que es un agente muy viscoso y que se utiliza normalmente para las quimioembolizaciones, en especial para los hepatomas; esclerosantes, que endurecerán el revestimiento endotelial de los vasos, y el etanol.

30 Los agentes embólicos particulados también se utilizan para embolizar las arteriolas precapilares o las pequeñas arterias. Gelfoam® ocluye de forma temporal los vasos durante 5 semanas. Las microesferas son agentes que se utilizan con frecuencia para la embolización aséptica y la quimioembolización. Las microesferas de alcohol polivinílico (PVA) y de gelatina acrílica no son degradables *in vivo*, por lo que permanecen para siempre en el paciente. Según la situación, se utilizan diferentes tamaños de microesferas, cuyo diámetro oscila de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 1,2 mm.

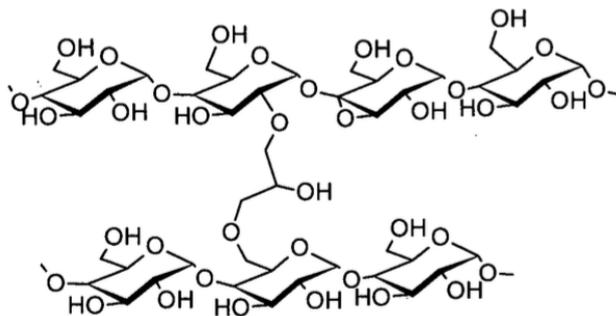
35 La invención se refiere a una microesfera biodegradable que tiene un diámetro de 10 a 2000 µm que comprende almidón hidrolizado reticulado al cual se ha conjugado, mediante un enlace éster carboxílico, al menos un tipo de ligando que se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos y ácidos orgánicos que contienen nitrógeno, en donde dicho ligando es una molécula endógena con carga positiva cuya masa molecular es de menos de 1000 Da, que comprende al menos otra función de ácido carboxílico y/o al menos una función amina, y en donde se conjugan de media de 0,05 a 1,5 ligandos a cada resto de glucosa en el almidón hidrolizado.

40 En algunos casos, puede ser interesante alterar las propiedades de las microesferas biodegradables de almidón. La presente invención proporciona modos de alternar la capacidad de biodegradación de las microesferas biodegradables de almidón; la afinidad de las microesferas biodegradables de almidón a sistemas biológicos y/o sus componentes; el grado de hinchamiento de las microesferas biodegradables de almidón; la velocidad de hinchamiento de las microesferas biodegradables de almidón; la capacidad de compresión o elasticidad de la microesfera biodegradable de almidón y/o la selectividad de la interacción química con los iones y las moléculas del interior y de la superficie de la microesfera biodegradable de almidón. El sistema biológico y/o los componentes que se acaban de describir pueden, por ejemplo, constituir un órgano o célula o cualquiera de sus componentes; bacterias; virus; proteínas y enzimas; polisacáridos; lípidos; moléculas pequeñas e/o iones.

45 Se describe una microesfera biodegradable que tiene un diámetro de 10 a 2000 µm que comprende almidón hidrolizado reticulado sobre el cual se ha conjugado al menos un tipo de ligando a través de un enlace éster carboxílico, en donde dicho ligando es una molécula endógena con carga cuya masa molecular es de menos de 1000 Da, que comprende al menos otra función de ácido carboxílico y/o al menos una función amina, y en donde se han conjugado de media de 0,05 a 1,5 ligandos a cada resto de glucosa del almidón hidrolizado.

55 La presente invención también se refiere a diferentes usos y aplicaciones de esta microesfera.

- 5 Las microesferas de acuerdo con la invención comprenden almidón hidrolizado con ácido y reticulado. Las microesferas se pueden fabricar de almidón hidrolizado en ácido mediante la emulsión de una solución de almidón en un solvente orgánico, tal como tolueno o dicloruro de etileno. Las cadenas de poliglucosa se interconectan con un reactante de reticulación, tal como epiclorhidrina, lo que forma enlaces éter (1,3-oxipropán-2-ol) con glicerol, como se muestra a continuación, lo que forma microesferas degradables de almidón (MDA).



- 10 La amilasa degrada las MDA *in vivo* para dar oligodextrinas y finalmente glucosa. Las interconexiones permanecen como oligosacáridos de tamaño variable. En la actualidad se desconoce su destino *in vivo*, pero es probable que se secreten por la orina o bien se filtren hacia el sistema reticuloendotelial y se degraden.
- 10 Las microesferas son biodegradables, lo que se define como un material que se degrada y/o metaboliza, y se excreta en condiciones fisiológicas (*in vivo*). En este caso, fisiológico (*in vivo*) comprende animales, más específicamente vertebrados, y lo más específicamente mamíferos.

- 15 Básicamente, las microesferas biodegradables de almidón se degradan totalmente y se eliminan de su medio fisiológico, tal como el cuerpo humano. En función de la aplicación, las microesferas se diseñan para ser degradadas al cabo de un tiempo determinado que es el idóneo para el uso que se les pretende dar. Este tiempo puede oscilar desde minutos hasta 3 meses, más preferiblemente hasta 1 mes.

El tamaño de la microesfera biodegradable de acuerdo con la invención está en la microescala de 10  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$ .

- 20 Las propiedades de las MDA se pueden alterar mediante la unión de ligandos a las MDA y, más en particular, a los grupos hidroxilo de la glucosa. Las propiedades de las MDA están afectadas por la elección de los ligandos y también por el número de ligandos unidos al almidón.

- 25 Los ligandos se unen a las MDA por conjugación mediante un enlace éster carboxílico a los monómeros de glucosa de las MDA. Para permitir la conjugación de los ligandos al almidón hidrolizado a través de este enlace éster, los ligandos deberían comprender al menos una función de ácido carboxílico, a saber, al menos uno grupo  $-\text{COOH}$ , capaz de formar un enlace éster. El enlace éster se puede hidrolizar por hidrólisis química y/o enzimática *in vivo*, y la utilización de tal enlace éster da lugar a un ligando que se puede biodespegar.

- 30 Además, los ligandos deberían ser sustancias endógenas que están cargadas a un pH fisiológico, a saber, a pH de 6 a 8. Además de la función de ácido carboxílico utilizada para permitir la conjugación del ligando al almidón hidrolizado a través de un enlace éster, los ligandos deberían comprender al menos otra función de ácido carboxílico y/o al menos una función amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Como los ligandos son compuestos endógenos, la MDA se degrada así en los compuestos endógenos que se metabolizan y/o excretan.

Así pues, el ligando está cargado positivamente. Los ligandos podrían también tener partes apolares (hidrófobas) para modificar más las propiedades de la MDA. También es posible utilizar una mezcla de ligandos diferentes.

Los ligandos cargados necesitan un contraión. Cuando el ligando está cargado positivamente, el contraión estará cargado negativamente. Este contraión puede ser un contraión fisiológicamente activo.

- 35 Los ligandos endógenos deberían ser además moléculas pequeñas con una masa molecular de menos de 1000 Da.

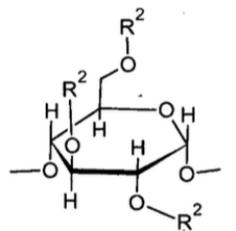
A cada resto de glucosa en la MDA, se le podrían conjugar, de media, de 0,05 a 1,5 ligandos de acuerdo con la invención. La proporción molar de ligando por glucosa es, así pues, de 1,5:1 a 1:20 en la MDA.

El ligando se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos y otros ácidos orgánicos con nitrógeno.

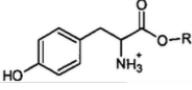
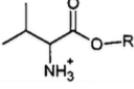
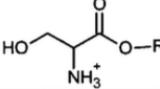
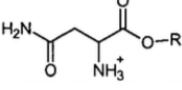
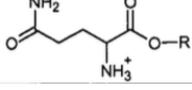
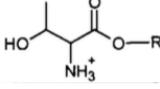
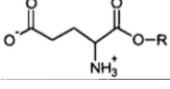
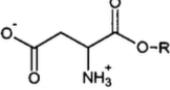
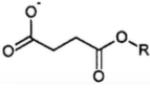
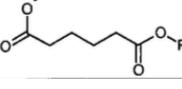
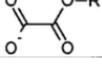
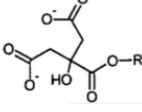
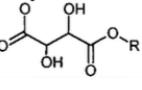
Los ligandos que se pueden preferir para algunas realizaciones de la invención se recogen en la tabla 1.

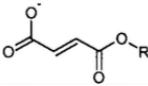
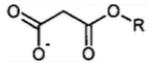
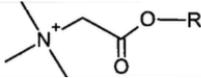
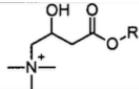
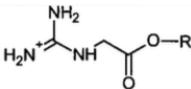
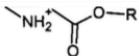
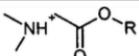
- 40 La tabla 1 muestra los ligandos preferidos. La R en las estructuras representa un monómero de glucopiranosilo,

mostrado a continuación, del almidón hidrolizado. R<sup>2</sup> representa un ligando, en cualquiera de sus posibles posiciones 2, 3 y/o 6, sobre el resto de glucosa de la MDA, como se muestra a continuación.



Aminoácidos como R <sup>2</sup>	Carga	Propiedades	Estructura
Arginina	2+	polar	
Histidina	+ (10%)	polar	
Lisina	2+	polar	
Glicina	+	polar	
Prolina	+		
Alanina	+	hidrófobo	
Isoleucina	+	hidrófobo	
Leucina	+	hidrófobo	
Fenilalanina	+	hidrófobo	
Triptófano	+	hidrófobo	

Tirosina	+	hidrófobo	
Valina	+	hidrófobo	
Serina	+	polar	
Asparagina	+		
Glutamina	+	polar	
Treonina	+	polar	
Ácido glutámico	±	polar	
Ácido aspártico	±	polar	
<b>Ácidos como R<sup>2</sup></b>	<b>Carga</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Estructura</b>
Ácido succínico	-		
Ácido adípico	-		
Ácido oxálico	-		
Ácido cítrico	2-		
Ácido tartárico	-		

Ácido maleico	-		
Ácido malónico	-		
<b>Ácidos orgánicos con nitrógeno como R<sub>2</sub></b>	<b>Carga</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Estructura</b>
Betaína	+		
Carnitina	+		
Creatina	+		
Metilglicina	+		
Dimetilglicina	+		

La microesfera descrita más arriba se podrían utilizar para hemostasia, cicatrización de heridas, cultivo celular *in vitro* y embolización vascular. La microesfera descrita más arriba también se podrían utilizar para producir un material biodegradable idóneo para ser usado para la cicatrización de las heridas.

- 5 Estas diferentes aplicaciones se explican con más detalle a continuación.

#### Hemostasia

En algunas realizaciones para el uso en la hemostasia, los ligandos conjugados a las microesferas están cargados positivamente.

- 10 En algunas realizaciones, los ligandos conjugados a las microesferas están cargados positivamente. Entonces, el contraíón utilizado podría ser ácido elálgico.

Para la hemostasia, las microesferas de acuerdo con la invención deberían tener preferiblemente un diámetro medio de 10  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ .

Cuando se utilizan para ha hemostasia, las microesferas de acuerdo con la invención se pueden poner sobre/en la herida como un polvo, en una solución o adheridas a una estructura de refuerzo, tal como una gasa.

- 15 Cicatrización de heridas

Para la cicatrización de las heridas, las microesferas se podrían utilizar para producir un material. Este material debería tener una estructura tridimensional que consiste en las microesferas y vacíos entre las microesferas.

Debido a los vacíos, el material será permeable tanto para los gases como para los líquidos, y, así pues, no formará un gel cuando entre en contacto con líquidos.

- 20 El hecho de que el material no sea un material gelificante, significa que es posible evitar una capa formadora de película cuando se utilice el material sobre/en una herida, y, mediante esto, se podrá impedir que se forme un edema por debajo de la capa; facilitar el transporte eficaz de oxígeno y nutrientes y demás, sin obstruir la migración de las células, y permitir la transducción eficaz de la presión hacia o desde el tejido subyacente.

- Las microesferas del material podrían ser una fracción de tamaño homogéneo. Para establecer vacíos entre las microesferas, en muchos casos se prefiere que las microesferas del material tengan un tamaño claramente uniforme. Si las microesferas no tuvieran un tamaño uniforme, los vacíos se llenarían con microesferas más pequeñas, lo que crea una estructura más sólida que será perjudicial para el efecto pretendido del material. Cuando las microesferas forman parte de una fracción de tamaño homogéneo, el tamaño de las microesferas debe, al menos para algunas realizaciones, no diferir en más de  $\pm 15\%$  de la mediana. Por ejemplo, en una fracción de microesferas de  $300\ \mu\text{m}$ , las microesferas, cada microesfera por separado podría medir de  $255$  a  $345\ \mu\text{m}$ . El tamaño de los vacíos, a saber, el espacio entre las esferas redondas empaquetadas con un tamaño uniforme, se podría calcular como  $((2/\text{raíz cuadrada de } 3) - 1) \approx 0,155$  veces el diámetro de las microesferas.
- 5 El material puede consistir en una red de una sola pieza, sólida, porosa y tridimensional.
- Las microesferas se pueden conjugar a un sustrato de refuerzo, con lo que se inmovilizan las microesferas. Tal refuerzo puede ser una gasa común o un material de espuma polimérica.
- Para ser usados en la cicatrización de heridas, los ligandos conjugados a las microesferas están cargados positivamente.
- 15 Para ser usados en la cicatrización de heridas, los ligandos conjugados a las microesferas están cargados positivamente y son hidrófobos.
- Para la cicatrización de heridas, las microesferas de acuerdo con la invención tienen preferiblemente un diámetro medio de  $200\ \mu\text{m}$  a  $2000\ \mu\text{m}$ .
- 20 Preferiblemente, los vacíos del material tienen un diámetro de  $30\ \mu\text{m}$  a  $300\ \mu\text{m}$  y, más preferiblemente, de  $100\ \mu\text{m}$  a  $300\ \mu\text{m}$ . Los vacíos deberían ser al menos de  $30\ \mu\text{m}$ , ya que esto permite el paso de las células del tejido y los haces de células nerviosas que típicamente tienen un diámetro de  $20$  a  $30\ \mu\text{m}$ .
- Además, las características superficiales del material estimulan la adherencia y la proliferación celulares. Esto implica la afinidad celular por la superficie del material y una elasticidad del material que es adecuada para la adherencia.
- 25 El material biodegradable idóneo para la cicatrización de heridas de acuerdo con la invención estimula en particular la adhesión, migración y proliferación celulares, tanto en el tratamiento estándar de la cicatrización de las heridas como en los procedimientos de THPN (tratamiento de heridas con presión negativa) específicamente para la tercera y cuarta fases del proceso de cicatrización de heridas, a saber, las fases proliferativa y de remodelación.
- 30 La estructura tridimensional del material biodegradable idóneo para la cicatrización de las heridas de acuerdo con la invención disminuye la formación de tejido cicatrizal. Al observarse que el tejido cicatrizal se caracteriza por un depósito más bien unidireccional de colágeno, es probable que se disminuya la cicatrización con una matriz capaz de forzar un depósito desorganizado de colágeno. En conjunto, el material de acuerdo con la presente invención estimula y facilita el crecimiento permanente de un nuevo tejido de granulación sano en la herida.
- 35 En la cicatrización de las heridas, puede ser ventajoso el retraso de la capacidad de biodegradación del material entre 2 días y 2 semanas, mediante la selección de uno o varios ligandos adecuados. Esto permite una cicatrización adecuada sin necesidad de cambiar el vendaje si no es necesario por otras razones.
- Cuando se utiliza para la cicatrización de las heridas o para el tratamiento de las heridas, el material de acuerdo con la invención se puede añadir sobre/en la herida como un polvo, en una solución, adherido a una estructura de refuerzo, tal como una gasa, o como una red en una única pieza sólida.
- 40 El material de acuerdo con la invención puede también formar parte de un vendaje para heridas.
- Se ha demostrado que cuando se aplica una capa de  $2\ \text{mm}$  de esferas biodegradables de almidón no gelificantes de un diámetro medio de  $200\ \mu\text{m}$  que tiene una superficie cargada positivamente a un lecho de una herida, se obtiene una muy buena granulación con un crecimiento de células de hasta  $500\ \mu\text{m}$  en cuatro días.
- Cultivo de células *in vitro*
- 45 Para ser usadas en el cultivo de células *in vitro*, las microesferas tienen preferiblemente un diámetro medio de  $200\ \mu\text{m}$  a  $1000\ \mu\text{m}$ , más preferiblemente entre  $200\ \mu\text{m}$  y  $500\ \mu\text{m}$ .
- Para los cultivos de células *in vitro*, los ligandos están cargados positivamente.
- 50 Los huecos son importantes para los cultivos de células ya que permiten un paso eficaz para la adhesión y el crecimiento de las células, y también permiten un transporte eficaz de la matriz de crecimiento y de las moléculas más grandes dentro del cultivo.

Embolización vascular

Para la embolización vascular, la microesfera de acuerdo con la invención tiene preferiblemente un diámetro medio de 10  $\mu\text{m}$  a 1200  $\mu\text{m}$ .

5 Las microesferas de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, tal y como se describe más arriba y tal y como se especifica en las reivindicaciones, se pueden utilizar en métodos para estimular, facilitar o realizar la hemostasia, la cicatrización de heridas y/o la embolización vascular. De igual forma, el material de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, tal y como se describe más arriba y tal y como se especifica en las reivindicaciones, se puede utilizar en un método para facilitar o realizar la cicatrización de las heridas.

10 Las microesferas o el material, respectivamente, se administra a continuación en una cantidad eficaz a un mamífero, tal como un humano, que necesita la hemostasia, la cicatrización de heridas y/o la embolización vascular. Puede ser un humano que padece una herida sangrante o algún otro tipo de herida, tanto interna como externa, tal como en la piel.

15 Por «administración» se pretende hacer referencia a que las microesferas o el material de acuerdo con la invención se pone en contacto con el área donde se necesita hemostasia, cicatrización de herida y/o embolización vascular. En el caso de una herida, con el propósito de hemostasia o cicatrización de herida, el material podría, por ejemplo, colocarse en la cavidad de la herida o en la superficie de la herida. En el caso de la cicatrización de herida, las MDA se pueden formular como un polvo, suspensión o ungüento. En el caso de la hemostasia, las MDA se pueden aplicar como un polvo seco o se pueden incorporar a una gasa o a un apósito. En el caso de la embolización, las MDA se suspenden preferiblemente en un medio idóneo, tal como una solución salina fisiológica.

20 En este contexto, «cantidad eficaz» significa una cantidad que tendrá un efecto positivo sobre la hemostasia, cicatrización de heridas y/o embolización vascular.

25 Las microesferas de acuerdo con la invención también se pueden utilizar en los métodos para estimular, facilitar o realizar *in vitro* el cultivo de células. Las microesferas de acuerdo con la invención se pueden añadir a continuación a un medio de cultivo adecuado. Las células a cultivar también se añaden a este medio de cultivo. Las microesferas se pueden añadir al medio de cultivo a la vez que las células, antes de añadir las células o después de añadir las células. A continuación se deja que las células se propaguen. Tal y como se explica más arriba, el cultivo celular de esta especificación también incluye el cultivo de tejidos.

30 Las microesferas de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, tal y como se describe más arriba y tal y como se especifica en las reivindicaciones, podrían además utilizarse para estimular, facilitar o realizar la homeostasia, la cicatrización de heridas y/o la embolización vascular.

Las microesferas de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, tal y como se describe más arriba y tal y como se especifica en las reivindicaciones, se pueden además utilizar para la producción de un producto sanitario o una composición farmacéutica.

35 Las microesferas de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, tal y como se describe más arriba y tal y como se especifica en las reivindicaciones, se pueden además fabricar específicamente para ser usadas para estimular, facilitar o realizar hemostasia, cicatrización de heridas y/o embolización vascular.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, las palabras «comprender» y «contener», y las variaciones de las palabras, por ejemplo, «que comprende» y «comprende», significan «que incluye, pero sin limitación», y no pretenden excluir otros restos, aditivos, componentes, integrantes o etapas.

40 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de esta especificación, el singular engloba el plural a menos que el contexto lo requiera de otra manera. En particular, cuando se utiliza el artículo indefinido, la especificación se debe saber que contempla una pluralidad así como una singularidad, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

45 Rasgos, integrantes, características, compuestos, restos químicos o grupos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo concreto de la invención se debe saber que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, a menos que sea incompatible con el mismo.

**Breve descripción de los dibujos**

La invención se describe en más detalle a continuación en los ejemplos, que se refieren a los dibujos adjuntos en los que:

50 La figura 1 es un dibujo esquemático de una microesfera degradable de almidón (MDA) y las modificaciones químicas realizadas en este estudio.

La figura 2 ilustra que se puede suponer que el hinchamiento de las microesferas sigue la difusión de Fick con un ritmo rápido de hinchamiento inicial que disminuye exponencialmente:

$$Y = Y_{\infty} (1 - e^{-kt})$$

5 en donde  $k$  = la constante de hinchamiento de primer orden e  $Y_{\infty}$  = el incremento de volumen en el hinchamiento máximo.

La figura 3 ilustra la adherencia de plaquetas. La figura 3A muestra las microfotografías de contraste de fases y de fluorescencia que muestran las MDA y las plaquetas adheridas a las MDA de acuerdo con diferentes lotes modificados. La figura 3B muestra primeros planos de la unión entre dos MDA agregadas (lote 4) y los agregados de plaquetas pegados a las MDA. Para la imagen se utilizó microscopía de contraste por interferencia diferencial (CID).

10 La figura 4 ilustra un estudio *in vivo* de tres de los lotes de MDA. Los lotes 5, 6 y 9 se evaluaron en un modelo de hemorragia experimental (traumatismo renal) en ratas con anticoagulantes. Todos los animales tratados con el lote 9 obtuvieron una hemostasia primaria, el 29% volvieron a sangrar en menos de 20 min de observación. Los otros lotes mostraban una eficacia hemostática significativamente menor, y pocos animales consiguieron una hemostasia primaria.

15 La figura 5 ilustra la hemorragia de acuerdo con el lote de tratamiento en el estudio experimental *in vivo*. La hemorragia se midió pesando el exceso de sangre recogida en una gasa. Había una diferencia significativa de hemorragia entre los diferentes lotes ( $p = 0,001$ ), donde el lote 5 era una MDA sin modificar, el lote 6 demostró la activación de la coagulación, y la MDA del lote 9 adsorbió las plaquetas.

### Ejemplos

20 Las microesferas degradables de almidón (MDA) se prepararon mediante emulsión y reticulación del almidón hidrolizado con epíclorhidrina en tolueno. Posteriormente, las MDA se lavaron repetidamente con etanol seguido de agua destilada y finalmente deshidratación sucesiva con concentraciones crecientes de etanol y finalmente se secaron durante una noche a 60 °C.

#### Detalles sobre la preparación de las MDA

25 Se disuelven 2 g de hidróxido de sodio en 280 ml de agua purificada, se le añaden 2 g de borohidruro de sodio y se disuelve. Se le disuelven 153 g de almidón hidrolizado mediante agitación lenta durante al menos 2 horas. Se disuelven 20 g de tensioactivo (Rhodafac PA17) en 450 g de tolueno. A continuación, se le añade la solución de almidón y se emulsiona en la solución de tolueno, se incrementa la temperatura a 70 °C y la emulsión se agita hasta que se ha alcanzado la distribución con el tamaño de gota deseado. Se le añaden 22 g de epíclorhidrina y se realiza la reticulación durante 5 horas. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se deja sedimentar, tras lo cual se decanta el sobrenadante. A las MDA se les dan tres lavados con etanol al 95%, un lavado con ácido acético al 0,8%, seguido de 4 lavados con agua purificada y finalmente se deshidrataron con etanol absoluto antes del secado a 60 °C en un armario de secado ventilado.

30 Determinación del grado de sustitución (GS)

35 El grado de sustitución se define como el número promedio de sustituciones por monómero de glucosa.

El método de la saponificación alcalina, seguido por la titulación del exceso de álcali se empleó para determinar el grado de sustitución. A una muestra de 250 mg de MDA se le añadieron 10 ml de NaOH a 0,50 M y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 72 h con una agitación ocasional. El exceso de NaOH se tituló con HCl a 0,50 M con el uso de fenolftaleína como indicador.

40 Determinación de la capacidad de degradación con amilasa

Se diluyó una muestra de MDA (3 a 6 mg) con tampón de fosfato, pH 7 (5 ml), y a continuación se le añadieron 400 µl de saliva humana, seguido de la incubación a 37 °C durante 4 h. La muestra se dejó reposar durante 20 min o se centrifugó, y a continuación se tomó una muestra pequeña del fondo y se analizó al microscopio para determinar la presencia o ausencia de las microesferas.

45 Procedimiento general para la sustitución de las MDA con ácidos dioicos (ejemplos recogidos en la tabla 1)

Las MDA (1 g) se suspendieron en DMF (10 ml), a esta mezcla se le añadieron anhídrido succínico (154 mg, 1,54 mmol) y piridina (124 µl, 1,60 mmol). La mezcla se agitó y se calentó a 90 °C durante una noche, y el material se lavó a continuación tres veces con 40 ml de etanol seguido con 5 ml de NaHCO<sub>3</sub> saturado, y a continuación tres veces con 30 ml de agua. El material se deshidrató con etanol y se secó en un horno a 60 °C. El material se analizó por FTIR, lo que mostró el éster carbonílico a 1730 cm<sup>-1</sup>.

50

GS: 0,25 (determinado según se describe más arriba).

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Procedimiento general para la sustitución de las MDA con ésteres

Modificación con betaína

- 5 Se mezclaron betaína (1,66 g, 10,8 mmol) y CDI (1,75 g, 10,8 mmol) con 50 ml de DMF y se calentó a 80 °C durante 2 h. A continuación se le añadió MDA (5 g) y la temperatura se subió a 90 °C, y la mezcla se agitó durante una noche. La mezcla se lavó con etanol (250 ml) dos veces, con cloruro de hidrógeno diluido (250 ml) y dos veces con agua (250 ml). El material se deshidrató con etanol y se secó durante una noche a 60 °C.

FTIR: muestra el éster carbonílico a 1751  $\text{cm}^{-1}$ .

- 10 GS: 0,23 (determinado según se describe más arriba).

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificación con dimetilglicina

Igual que en el ejemplo con betaína de más arriba, pero se utilizaron MDA (2 g), hidrocloreuro de *N,N*-dimetilglicina (430 mg, 3,1 mmol) y CDI (500 mg, 3,1 mmol).

- 15 FTIR: muestra el éster carbonílico a 1753  $\text{cm}^{-1}$ .

GS: 0,24 (determinado según se describe más arriba).

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificación con *N*<sub>α</sub>-acetil-L-arginina

- 20 Igual que en el ejemplo con betaína de más arriba, pero se utilizaron MDA (2 g), *N*<sub>α</sub>-acetil-L-arginina (623 mg, 2,5 mmol) y CDI (400 mg, 2,5 mmol).

FTIR: muestra el éster carbonílico a 1748  $\text{cm}^{-1}$ .

GS: 0,24 (determinado según se describe más arriba).

Degradable por la  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificación con prolina

- 25 Igual que en el ejemplo con betaína de más arriba, pero se utilizaron MDA (1 g), Boc-Pro-OH (266 mg, 1,2 mmol) y CDI (200 mg) seguido de la desprotección del *tert*-butoxicarbonilo con TFA.

FTIR: muestra el éster carbonílico a 1743  $\text{cm}^{-1}$ .

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificación con glicina

- 30 Igual que en el ejemplo con betaína de más arriba, pero se utilizaron MDA (1 g), Boc-Gly-OH (216 mg, 1,2 mmol) y CDI (200 mg) seguido de la desprotección del *tert*-butoxicarbonilo con TFA.

FTIR: muestra el éster carbonílico a 1748  $\text{cm}^{-1}$ .

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificación con fenilalanina

- 35 Igual que en el ejemplo con betaína de más arriba, pero se utilizaron MDA (1 g), Boc-Phe-OH (327 mg, 1,2 mmol) y CDI (200 mg) seguido de la desprotección del *tert*-butoxicarbonilo con TFA.

FTIR: muestra el éster carbonílico a 1743  $\text{cm}^{-1}$ .

Degradable por  $\alpha$ -amilasa (determinado según se describe más arriba).

Modificaciones de la superficie indespegables que se utilizan para investigar los efectos de la carga

Las modificaciones de la superficie se ilustran en la figura 1.

#### Octenilsuccinato (negativo e hidrófobo)

5 Se suspendieron 80 g de MDA en agua purificada, se le añadió anhídrido *N*-octenilsuccínico (Pentagon) a 0,08 g/g de MDA secas y la reacción dejó continuar durante 3 h. Se mantuvo un pH por encima de 7,4 mediante adiciones de NaOH a 0,75 M. El material resultante se lavó 8 veces con 2000 ml de agua purificada, después se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y finalmente se secó durante una noche a 60 °C (Hui Rea. «Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch». *Food Chemistry* 2009; 114: 81-6).

#### Carboximetilación (negativa)

10 Se suspendieron 50 g de MDA en agua purificada; se le añadió ácido cloroacético a 0,1 g/g de MDA secas y la reacción continuó durante 5 h a 70 °C. Antes de añadir ácido cloroacético, se disolvió en agua y se neutralizó con NaOH a 1 M. El material resultante se lavó 6 veces con 2000 ml de agua purificada y después se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y finalmente se secó durante una noche a 60 °C (Tomaski P, Schilling, C. H. «Chemical modification of starch». *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2004; 59: 175-403).

#### Acetilación (hidrófoba)

15 Se suspendieron 50 g de MDA en agua purificada, se les añadió anhídrido acético a 0,05 g/g de MDA secas. El anhídrido acético se añadió gota a gota y se mantuvo un pH entre 7,3 y 7,8 mediante adiciones de NaOH a 0,75 M. El material resultante se lavó 7 veces con 2000 ml de agua purificada, después de deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y finalmente se secó durante una noche a 60 °C (Sathe S. K., Salunkhe, D. K. «Isolation, Partial Characterisation and Modification of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Starch». *J. Food Sci.* 1981; 46: 617-21).

#### Cloruro de dietilaminoetilo, Aldrich (positivo)

25 Se suspendieron 50 g de MDA en agua purificada, se le añadieron 0,375 mol de hidrocloreuro de DEAE y la temperatura se incrementó a 60 °C. Se le añadieron 250 ml de soluciones de hidróxido de sodio a 3 M y la reacción se mantuvo a 60 °C durante una hora. A continuación, las MDA se lavaron con 20 l de agua purificada en un embudo Büchner. Las MDA se deshidrataron y se secaron como más arriba (Manousos M, Ahmed M, Torchio C, Wolff J, Shibley G, Stephens R et al. «Feasibility studies of oncornavirus production in microcarrier cultures». *In vitro*, junio de 1980; 16 (6): 507-15).

#### Ácido elágico (adsorbido/absorbido negativo)

30 El ácido elágico (Alfa Aesar) se adsorbió pasivamente con dos métodos diferentes. Método 1: se disolvió el ácido elágico a 0,1 mM en agua y a continuación se mezcló con las MDA. Método 2: se disolvió el ácido elágico a 0,1 mM en etanol y a continuación se mezcló con las MDA (Ratnoff O. D., Saito H. «Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen and plasma thromboplastin antecedent». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, febrero de 1979; 76 (2): 958-61). Se lavó y se secó como más arriba. El ácido elágico se absorbió/adsorbió pasivamente y no era aplicable para medir las cargas.

35 Las diferentes modificaciones de la superficie se produjeron con protocolos de modificación estándares (sin optimizar). Las modificaciones se seleccionaron para demostrar el concepto de un efecto hemostático *in vitro* e *in vivo*, y no se valoró si eran toxicológicamente aceptables en los humanos.

#### Carga de la superficie

El grado de carga de la superficie se midió mediante un detector de cargas en partículas PCD 02 (Mütek).

#### Diseño

40 Las nueve MDA con modificaciones diferentes se aleatorizaron con anonimato. No se envió ninguna información sobre las modificaciones a quienes realizaban los estudios.

#### Caracterización de las MDA

45 La forma de las microesferas de almidón se determinó por observación al microscopio (AxioObserver Z1, Zeiss) y el diámetro de las esferas se midió en un mínimo de cinco esferas en cada uno de los nueve lotes. Se determinó la absorción mediante la medición del diámetro antes y a intervalos de tiempo fijados (1, 3, 9, 15 y 30 s) después de la adición de 100 µl de tampón de fosfato. Se midieron un mínimo de cinco esferas de cada lote y a continuación se calculó su volumen con la suposición de que la MDA era completamente esférica. El hinchamiento de las microesferas se produce por la difusión del agua al interior y la hidratación del polímero, un proceso que continúa hasta llegar al equilibrio a una relajación máxima de las cadenas de almidón reticulado. Por consiguiente, se puede

50

suponer que el proceso sigue la difusión de Fick con un ritmo rápido de hinchamiento al principio que disminuye exponencialmente. Así pues, los datos se podrían explicar mediante:

$$Y = Y_{\infty}(1 - e^{-kt})$$

en donde  $k$  es la constante de hinchamiento de primer orden e  $Y_{\infty}$  es el incremento del volumen en un hinchamiento máximo.

#### Adhesión de plaquetas *in vitro*

Para estudiar la posible afinidad o interacción entre los diferentes lotes de MDA y los factores de importancia conocida para el proceso de coagulación, se investigó la adherencia de las plaquetas a los diferentes lotes de MDA. Se le añadieron 450  $\mu$ l de plasma heparinizado rico en plaquetas a tubos de ensayo que contenían 1  $\mu$ g de MDA y después se agitó en un agitador orbital durante 20 minutos a 500 rpm. Después, las MDA se lavaron exhaustivamente en PBS al dejar repetidamente el sedimento de MDA en el fondo y cambiar el sobrenadante por PBS recién preparado, y después al agitar vorticialmente el tubo. A continuación, las plaquetas adheridas a MDA se fijaron con PFA al 3,7% en PBS y se permeabilizaron con Triton-X al 0,1% en PBS, y finalmente se tiñeron con fluorescencia con Alexa 546-faloidina. Se realizó un enjuague exhaustivo entre las etapas del procedimiento. Las imágenes de las MDA y las plaquetas fluorescentes se tomaron con un microscopio de fluorescencia AxioObserver Z1 (Zeiss) y el programa toma de imágenes AxioVison (Zeiss).

#### Estudio piloto *in vivo* en un modelo experimental de hemorragia renal

El estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la buena práctica de laboratorio y fue autorizado por el Comité de ética de la universidad local para experimentos con animales. Se eligieron tres lotes diferentes de MDA basándose en el resultado de los estudios *in vitro* descritos más arriba. Para el análisis *in vivo* se eligieron un lote neutro, uno que activó la coagulación y, finalmente, un lote con propiedades de adhesión de las plaquetas. Los lotes se distribuyeron al azar y con anonimato para el investigador que realizó el estudio. Se anestesiaron 21 ratas Sprague-Dawley macho adultas y aclimatadas (peso medio de 342 g, IQR: 314-360) con suministro libre de comida y agua (Hynorm, Janssen Pharma, Bélgica y Midazolam Hameln, Pharma Hameln, GmbH). Después del cateterismo de la vena yugular (para las inyecciones i.v.), se realizó una laparotomía transversal. Se diseccionó el riñón izquierdo y los vasos renales se pinzaron dos minutos después de la administración i.v. de 200 UI/kg de heparina sin fraccionar (UH, LEO Pharma A/S, Dinamarca). A continuación, se extirpó un tercio lateral del riñón y se aplicó 1 ml de las MDA aleatorizadas sobre la superficie desnuda del riñón, se comenzó la compresión manual (con una compresa de gasa entre el polvo de almidón y los dedos del investigador) y se retiró la pinza del vaso. Se mantuvo la compresión 2 minutos y a continuación se liberó para controlar la hemostasia. Si se producía la hemorragia, se continuaba con la compresión con controles de hemostasia cada minuto. Se definió la hemostasia primaria como ausencia de hemorragia visible al cabo de 20 minutos de la resección renal. Los animales que consiguieron la hemostasia se observaron otros 20 minutos por si volvía a producirse una hemorragia. Todos los animales se sacrificaron con una inyección i.v. de ácido fenobarbitúrico y etanol. Se recogió la sangre perdida y se pesó. Los criterios de valoración del estudio fueron: capacidad para conseguir la hemostasia primaria, tiempo para la hemostasia, frecuencia de otra hemorragia y pérdida de sangre.

#### Estadística

Los datos descriptivos se presentan con valores de la mediana y un margen intercuartílico o individual (IQR). Se realizaron pruebas no paramétricas, ya que la distribución de los datos era asimétrica. Se realizaron análisis de  $\chi^2$  para las tablas de contingencia y se utilizó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis cuando se compararon los datos sin emparejar. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Se utilizó el software SPSS 17.0 para Mac y Windows ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

#### Resultados

##### Modificaciones de las MDA

Las cargas de la superficie se ofrecen en la tabla 2. El procedimiento de síntesis no estaba optimizado y la carboximetilación no dio lugar a una carga apreciable en la superficie. No se espera que la acetilación cambie la carga de la superficie, mientras que otros métodos deben conducir a una carga superficial positiva y negativa significativa.

Tabla 2: Las modificaciones químicas de las MAD y el resultado en cargas medidas.

Lote	Modificación de la MAD:	Inclusión del tamaño:	Carga:
1	Anhídrido <i>N</i> -octenilsuccínico	–	11,8 µequ/g aniónico
2	Ácido cloroacético	–	0,7 µequ/g aniónico
3	Anhídrido acético	–	0,3 µequ/g aniónico
4	Cloruro de dietilaminoetilo	>80 µm	459 µequ/g catiónico
5	Ninguna modificación superficial	–	0,5 µequ/g catiónico
6	Ácido eláxico <sup>1</sup>	–	NA
7	Cloruro de dietilaminoetilo	<80 µm	Sin medir
8	Ácido eláxico <sup>2</sup>	–	NA
9	Cloruro de dietilaminoetilo <sup>3</sup>	>150 µm	100 µequ/g catiónico

<sup>1</sup>Disuelto en agua.

<sup>2</sup>Disuelto en etanol.

<sup>3</sup>Reticulación más extensa.

#### Caracterización de las esferas de almidón

- 5 Había una diferencia significativa del diámetro en seco entre los lotes ( $p = 0,006$ ), en donde el lote 6 tenía las esferas de tamaño más pequeño (mediana del diámetro: 54 µm; IQR: 38-58) y el lote 2 las de tamaño más grande (mediana del diámetro: 72 µm; IQR: 67-76). Después de añadir el tampón de fosfato, todos los lotes incrementaron rápidamente el volumen (figura 2) y después de 30 s se habían expandido entre 5 y 25 veces su volumen seco (tabla 3). La magnitud de hinchamiento era significativamente diferente entre los lotes ( $p = 0,001$ ).
- 10 Tabla 3. Volumen seco de las MDA y después de 30 segundos en la solución de tampón de fosfato.

Lote de MDA	Volumen seco, pl*	Volumen, pl,* 30 s	% de incremento del volumen
1	157 (110-165)	1123 (943-1150)	700 (647-1000)
2	195 (158-231)	1047 (871-1629)	600 (512-715)
3	102 (79-128)	775	760 (653-760)
4	128 (120-180)	1838 (1551-2187)	1308 (1001-1559)
5	88 (60-126)	998 (688-1110)	1071 (853-1264)
6	82 (28-105)	750 (439-1114)	1058 (714-1311)
7	166 (130-219)	829 (760-1083)	538 (371-751)
8	113 (95-163)	659 (599-875)	619 (521-666)
9	125 (92-249)	3368 (1697-3368)	2593 (2040-2593)

\* Mediana de los valores (IQR), volumen en picolitros (1 pl = 1 ml<sup>-9</sup>).

Estimulación de las plaquetas

Resultaba evidente la adhesión de plaquetas a las MDA en tres de los lotes modificados (n.<sup>os</sup> 4, 7 y 9), mientras que el resto de los lotes de MDA no influían en absoluto en las plaquetas (figura 3). Los resultados se confirmaron con PRP de tres donantes diferentes.

El estudio experimental piloto *in vivo* aleatorizado con anonimato

Todos los animales tratados con el lote 9 obtuvieron la hemostasia primaria, en comparación con la hemostasia primaria en el 14-43% con los otros lotes (figura 4). El tiempo para la hemostasia también difería entre los grupos ( $p = 0,044$ ), en donde los animales tratados con el lote 9 eran los más rápidos (mediana de 2 min; IQR: 2-3:20), mientras que el lote 6 necesitaba 6 min de media ( $n = 3$ ) y el lote 5, 10 min ( $n = 1$ ) antes de que dejaran de sangrar. Dos animales tratados con el lote 9 eran los únicos que volvieron a sangrar ( $p = NS$ , en comparación con los otros lotes). Los animales tratados con el lote 9 perdían menos sangre (mediana de 1 g; IQR: 0,4-1,2) en comparación con los otros lotes (lote 5: 5 g, 4,3-6,7; lote 6: 5,3 g, 2,2-8,6),  $p = 0,001$  (figura 5).

El efecto hemostático propuesto de las MDA mediante la absorción de líquido (y pequeñas moléculas) desde la sangre y la concentración de los factores de coagulación endógenos sobre las esferas podría ser dependiente de un hinchamiento rápido y considerable de las microesferas. Todos los lotes de este estudio vieron incrementado su volumen con rapidez después de la adición del tampón de fosfato, pero la velocidad y la cantidad total de hinchamiento difería entre los lotes. El hinchamiento depende de la relajación de las cadenas de poliglucosa a medida que se van hidratando. Esto está limitado por muchas interconexiones y está facilitado por la repulsión de carga de los ligandos. Sin embargo, no pudimos encontrar ninguna correlación clara con las características medidas (p. ej., carga). La baja reticulación y el hinchamiento alto y rápido implican la degradación rápida y, por lo tanto, el incremento de volumen no será peligroso incluso si se aplica durante la intervención quirúrgica en localizaciones donde el espacio puede llegar a ser escaso al final del procedimiento. En este estudio, la absorción rápida del líquido y el hinchamiento de las MDA no eran suficientes para la hemostasia *in vivo*, y sólo 1 de los 7 animales obtuvo la hemostasia primaria al tratarlos con microesferas sin modificar.

La MDA con mejor capacidad hemostática *in vivo* se demostró que era la que tenía propiedades estimulantes de las plaquetas. Las plaquetas se adhirieron a las MDA cargadas positivamente, los lotes preparados con dietilaminoetilo (DEAE) (4, 7 y 9), lo que está de acuerdo con la descripción de adhesión de plaquetas a las superficies que exponen grupos con carga positiva (Lee, J. H., Khang G., Lee J. W., Lee H. B. «Platelet adhesion onto chargeable functional group gradient surfaces». *J. Biomed Mater Res.*, mayo de 1998; 40 (2): 180-6). No se realizó ninguna cuantificación objetiva de la cantidad de plaquetas que se adhirieron al correspondiente lote modificado con DEAE, pero en una valoración a simple vista no se observó ninguna diferencia obvia en la cantidad de plaquetas adheridas entre los lotes 4, 7 y 9, incluso si se había medido una diferencia de carga entre el lote 4 y el 9. El cloruro de DEAE reacciona con los grupos hidroxilo de la superficie de las MDA, lo que genera grupos DEAE que son positivos a pH fisiológico. Los ligandos del DEAE producen microesferas que no son biodegradables y probablemente son inadecuadas para el uso con humanos. Sin embargo, como demostración preliminar para distinguir si las esferas pueden convertirse en adherentes de plaquetas y si esto tiene alguna importancia hemostática, la modificación con DEAE resultó valiosa. Una estimulación rápida y eficaz de las plaquetas es crucial para la hemostasia instantánea producida por un tapón físico de plaquetas agregadas. Las plaquetas también son necesarias para la amplificación eficaz y la propagación de la generación de trombina, un proceso muy catalizado por la superficie de plaquetas estimuladas, lo que da lugar a una red de fibrina que estabiliza el tapón de plaquetas primario.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una microesfera biodegradable que tiene un diámetro de 10 a 2000  $\mu\text{m}$  que comprende almidón hidrolizado reticulado sobre el cual se ha conjugado, mediante un enlace de éster carboxílico, al menos un tipo de ligando que se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos y ácidos orgánicos que contienen nitrógeno, en donde dicho ligando es una molécula endógena cargada positivamente con una masa molecular de menos de 1000 Da que comprende al menos una función de ácido carboxílico adicional y/o al menos una función de amina, y en donde se han conjugado de promedio de 0,05 a 1,5 ligandos a cada resto de glucosa del almidón hidrolizado.
- 10 2. Una microesfera de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, glicina, prolina, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, tirosina, valina, serina, asparagina, glutamina, treonina, ácido glutámico y ácido aspártico; o un ácido orgánico que contiene nitrógeno seleccionado del grupo que consiste en betaína, carnitina, creatina, metilglicina y dimetilglicina.
- 15 3. Una microesfera de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ligando tiene un contraíón fisiológicamente activo.
4. Una microesfera de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para ser usada en la hemostasia.
5. Un material para ser usado en conexión con la cicatrización de heridas, que comprende microesferas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas microesferas forman una estructura tridimensional que comprende vacíos entre las microesferas.
6. Un material de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ligando es hidrófobo.
- 20 7. Una microesfera de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para ser usada para la embolización vascular.
8. Un apósito para heridas que comprende el material de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
- 25 9. Un método para el cultivo *in vitro* de células, en donde al menos una microesfera de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se añade a un medio de cultivo al cual también se añaden las células a cultivar, y entonces se deja que las células se propaguen.

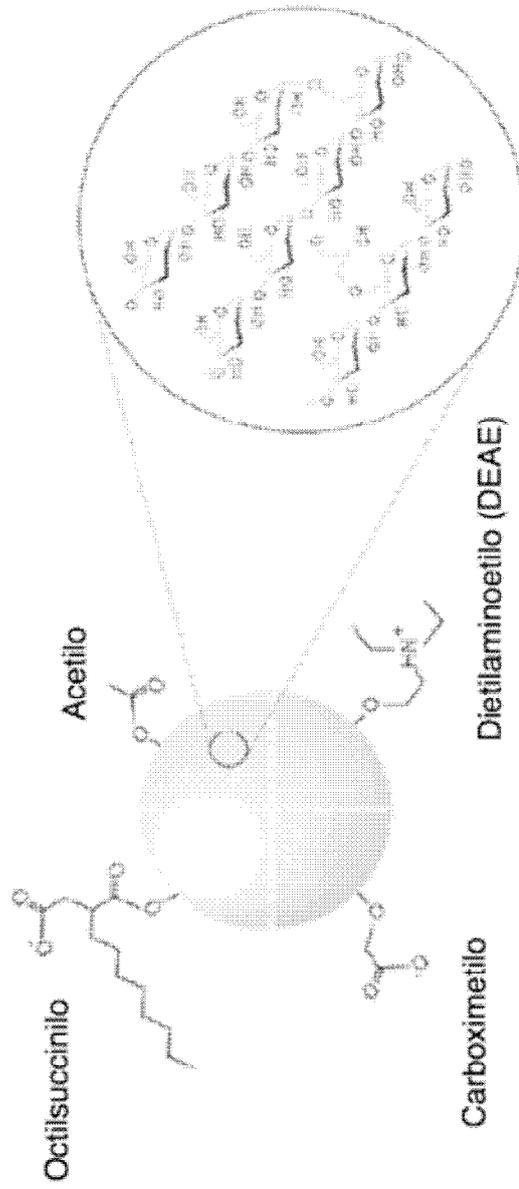


Fig. 1

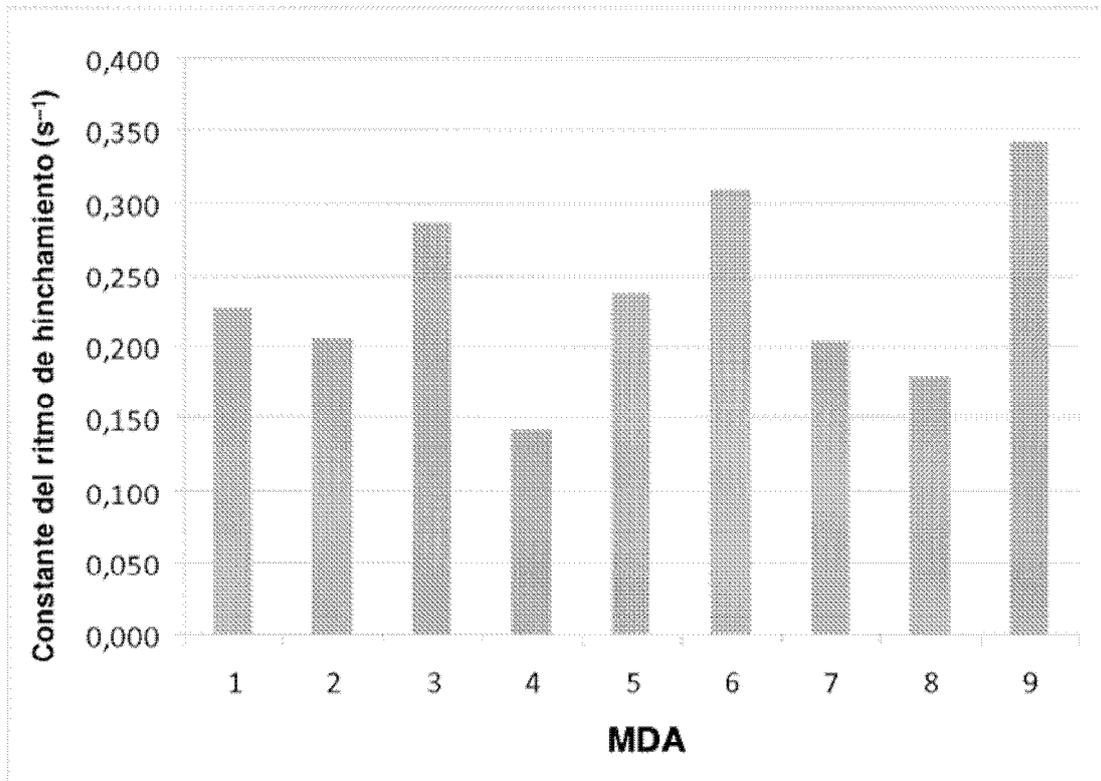


Fig. 2

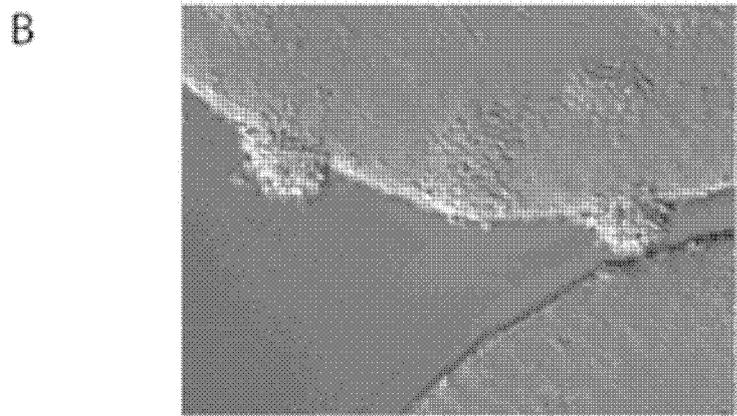
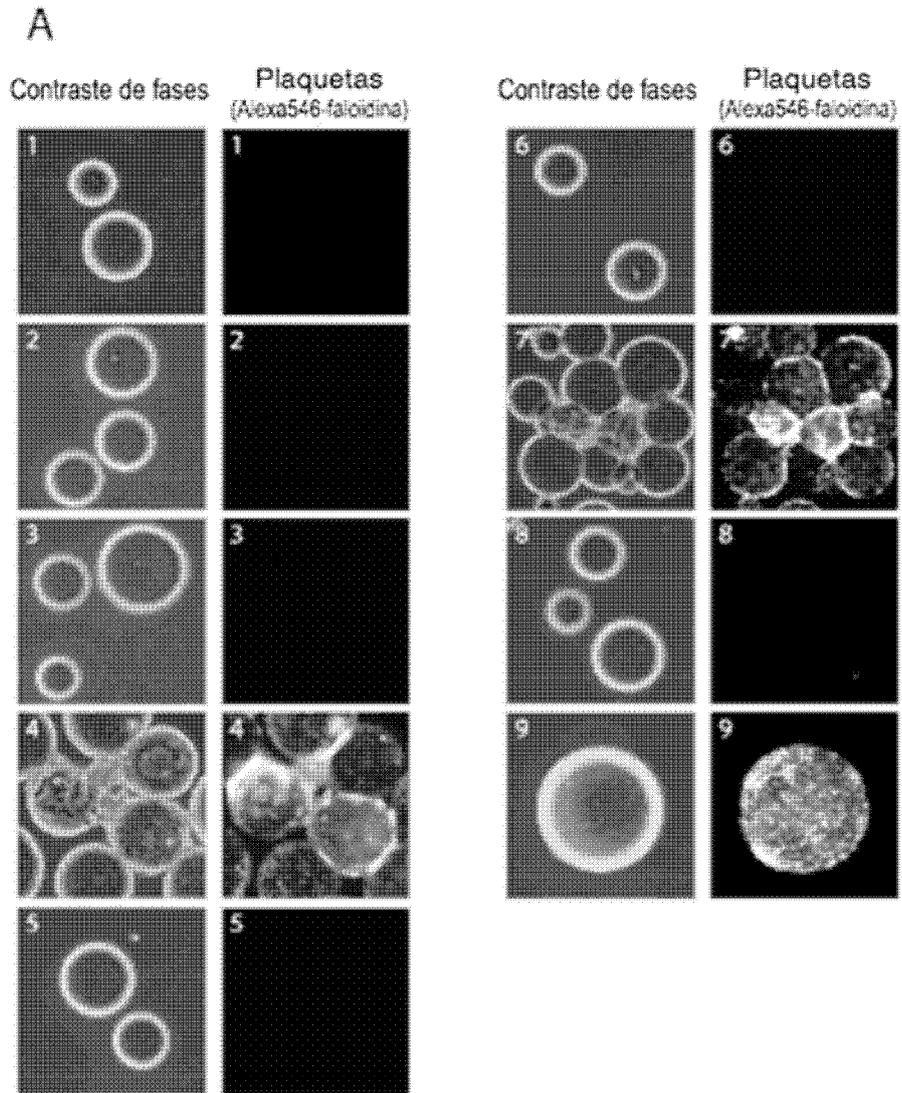


Fig. 3

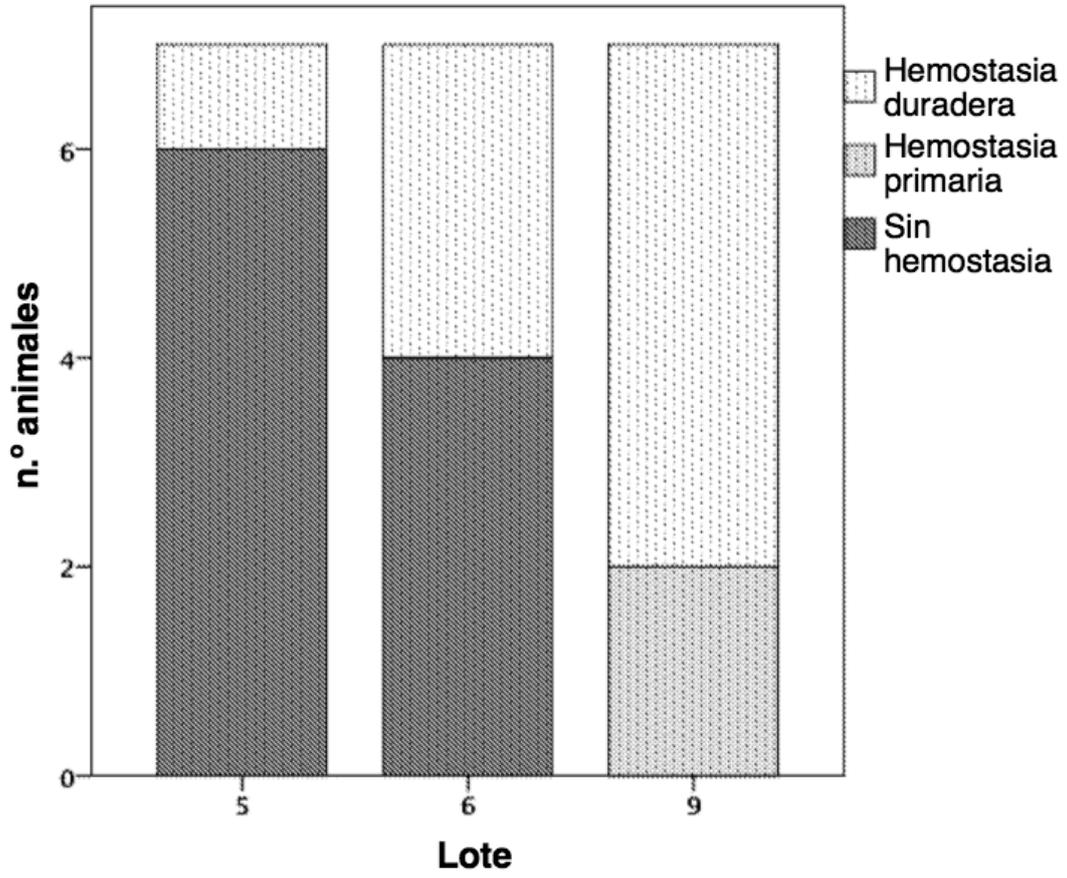


Fig. 4

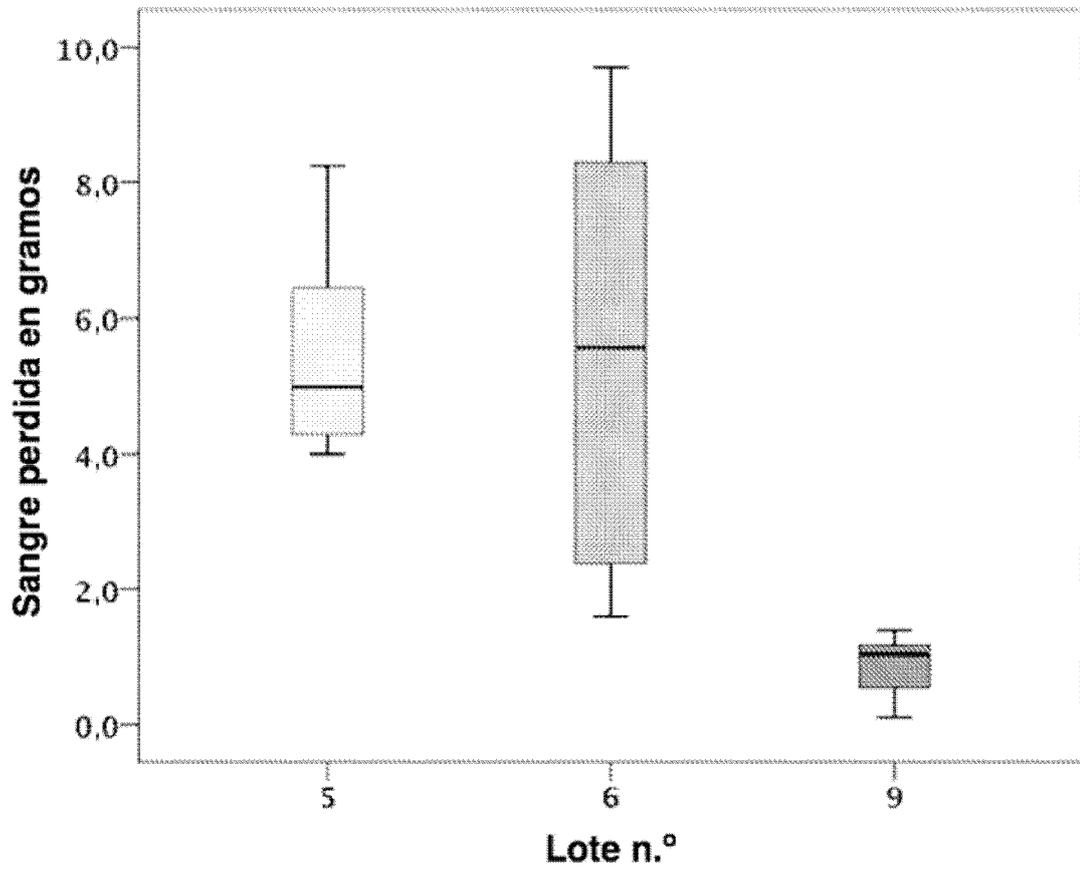


Fig. 5