

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 960**

51 Int. Cl.:

A61K 31/734 (2006.01)

B01F 13/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/US2012/071279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12813695 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2793910**

54 Título: **Procedimiento para fabricar una solución de alginato parcialmente reticulada**

30 Prioridad:

21.12.2011 US 201161578613 P

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

11.12.2017

73 Titular/es:

**BELLEROPHON BCM LLC (100.0%)
184 Liberty Corner Rd, Suite 302
Warren NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**CHU, JENNIFER HSING-CHUNG y
SHOCKEY, JOSHUA**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 645 960 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para fabricar una solución de alginato parcialmente reticulada

Esta divulgación se refiere a procedimientos para fabricar soluciones de alginato inyectables, parcialmente reticuladas.

5 Los materiales de gel de polímero reticulado se utilizan ampliamente en la industria biomédica. Por ejemplo, se han aplicado geles de polisacáridos en lentes de contacto, materiales de contacto con la sangre, formulaciones de liberación controlada, apósitos para heridas, bioadhesivos, membranas, superabsorbentes, materiales de encapsulación celular e inmunoaislamiento y estructuras de ingeniería tisular.

10 El uso potencial de materiales de gel de polisacáridos para tratar tejido cardíaco dañado se ha investigado de manera intensiva durante la última década.

15 El foco principal de la investigación ha sido utilizar geles de polisacáridos para tratar el tejido cardíaco después de un infarto de miocardio. El infarto de miocardio provoca típicamente una pérdida aguda de tejido miocárdico y un aumento abrupto de las condiciones de carga lo que induce el remodelado del ventrículo izquierdo. La fase temprana de la remodelación del ventrículo izquierdo implica la expansión de la zona de infarto, que a menudo da como resultado una rotura ventricular o formación de aneurisma tempranas. La remodelación tardía engloba todo el ventrículo izquierdo e implica una dilatación dependiente del tiempo, la inclusión del miocardio con zona periinfarto en la cicatriz, la distorsión de la forma ventricular y la hipertrofia mural. Por consiguiente, puede dar lugar a un deterioro progresivo de la función contráctil, insuficiencia cardíaca y, finalmente, la muerte.

20 En consecuencia, el cese o la inversión de la remodelación progresiva de la cámara es un objetivo importante del tratamiento de insuficiencia cardíaca. Los intentos clínicos de minimizar los efectos devastadores del infarto de miocardio hasta ahora no han podido reparar eficazmente el daño irreversible infligido al tejido cardíaco.

25 Recientemente, los intentos de implantar células vivas en el miocardio dañado han dado esperanzas para reparar el tejido dañado mediante la promoción de la regeneración tisular. Este enfoque ha avanzado considerablemente con el desarrollo de estructuras de biomateriales tridimensionales destinados a apoyar la implantación de células donantes (por ejemplo, células cardíacas o células madre) en el miocardio. Últimamente, las estructuras de biomateriales tridimensionales producidas a partir de gel de polisacáridos se implantaron con éxito en miocardio dañado con resultados prometedores. Sin embargo, el uso clínico de dichas estructuras de biomateriales tridimensionales sembradas con células es limitado debido a la escasez de células donantes adecuadas y al alto riesgo implicado en la cirugía mayor.

30 Un gel de polisacáridos que se ha investigado para tratar tejido dañado es una formulación soluble acuosa parcialmente reticulada de alginato de sodio y cationes de calcio. La solución de alginato parcialmente reticulada puede experimentar una transición de líquido a gel en el tejido corporal dañado con una concentración de calcio extracelular ligeramente elevada, soportando así mecánicamente el tejido. Una aplicación particular es para el tratamiento de tejidos dañados por infarto de miocardio, en cuyo caso la solución de alginato parcialmente reticulada se gelifica en el tejido cardíaco infartado y soporta la pared cardíaca debilitada para prevenir el remodelado cardíaco y la posterior insuficiencia cardíaca congestiva.

35 Sin embargo, existe la necesidad de proporcionar procedimientos mejorados para la fabricación de soluciones inyectables de alginato parcialmente reticuladas que mantengan un estado líquido hasta que interactúen con el tejido dañado.

40 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una solución de alginato parcialmente reticulada que es estable a temperatura ambiente durante al menos 24 horas, que comprende: proporcionar una primera solución acuosa que comprende una sal de alginato monovalente; proporcionar una segunda solución acuosa que comprende una sal catiónica divalente; y mezclar uniformemente la primera solución acuosa y la segunda solución acuosa en un procedimiento de mezclado de multilaminación microfluidico para proporcionar la solución de alginato parcialmente reticulada, en la que el alginato tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 kDa, la concentración de alginato en la solución de alginato parcialmente reticulada está en el intervalo de un 0,8 a un 1,5 % p/v, la concentración de cationes divalentes en la solución de alginato parcialmente reticulada está en el intervalo de un 0,02 a un 0,04 % p/v, y dicha solución de alginato presenta una respuesta elástica (G') que es igual a o mayor que su respuesta viscosa (G'') bajo una frecuencia oscilatoria que varía entre 0,1 y 10 Hz y a temperatura ambiente.

De acuerdo con uno o más modos de realización, la sal catiónica divalente comprende una sal de calcio. En algunos modos de realización, la sal de calcio comprende gluconato de calcio. Uno o más modos de realización prevén que la sal de alginato monovalente comprenda alginato de sodio.

De acuerdo con la invención, la concentración de alginato de sodio en la solución de alginato de calcio es de desde aproximadamente un 0,8 hasta aproximadamente un 1,5 % p/v y la concentración de gluconato de calcio en la solución de alginato de calcio es de aproximadamente un 0,2 a aproximadamente un 0,4 % p/v. De acuerdo con la invención, el alginato tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 kDa.

- 5 El procedimiento puede comprender además la esterilización de la solución de alginato. La esterilización de la solución de alginato puede comprender un filtrado estéril.

El procedimiento puede ser un procedimiento continuo. El caudal volumétrico del procedimiento puede estar en el intervalo de 0,05 a 5 l/min.

- 10 En uno o más modos de realización del procedimiento, el tiempo de mezclado característico (τ_m) es inferior a un tiempo de reacción característico (τ_R). En algunos modos de realización, el procedimiento tiene un tiempo de mezclado local inferior a 1 segundo. Otros modos de realización proporcionan un tiempo de mezclado local inferior a 0,1 segundos. En otros modos de realización, el procedimiento tiene un tiempo de mezclado global inferior a 1 segundo. Algunos modos de realización proporcionan que el tiempo de mezclado local y el tiempo de mezclado global sean inferiores a 0,1 segundos.

- 15 También se describe un procedimiento para preparar una solución de alginato que comprende proporcionar una primera solución acuosa que comprende una sal de alginato monovalente, proporcionar una segunda solución acuosa que comprende una sal de calcio y mezclar uniformemente la primera solución acuosa y la segunda solución acuosa en un procedimiento de mezclado microfluídico para proporcionar una solución de alginato líquido homogénea parcialmente reticulada. En algunos modos de realización de este aspecto, la solución de alginato
20 presenta una respuesta elástica (G') que es igual a o mayor que su respuesta viscosa (G'') y la solución de alginato comprende alginato en una cantidad que varía de un 0,1 a un 4 % (p/v) con un peso molecular que varía de 1 a 300 kDa y cationes de calcio en una cantidad que varía de un 0,02 a un 0,04 % (p/v). De acuerdo con uno o más modos de realización de este aspecto, la sal de alginato comprende alginato de sodio y la sal de calcio comprende gluconato de calcio.

- 25 En el procedimiento descrito, el procedimiento microfluídico comprende multilaminación. El procedimiento descrito puede tener un tiempo de mezclado característico (τ_m) menor que el tiempo de reacción característico (τ_R). El procedimiento descrito puede tener un tiempo de mezclado local inferior a 1 segundo.

La fig. 1A representa un esquema de una placa de canal, placa de mezclado y placa de apertura de una mezcladora de multilaminación de acuerdo con uno o más modos de realización de la invención;

- 30 la fig. 1B representa un esquema de una mezcladora de multilaminación montada de acuerdo con uno o más modos de realización de la invención y

la fig. 2 representa un esquema de un procedimiento de fabricación de acuerdo con uno o más modos de realización de la invención.

La invención está definida por las reivindicaciones.

- 35 Los intentos anteriores de producir soluciones de alginato parcialmente reticuladas a gran escala han dado como resultado mezclas no homogéneas, particularmente la presencia de láminas translúcidas en la solución de alginato final, que se cree que son láminas de gel. Dichos resultados se encontraron tanto en procedimientos discontinuos como continuos, incluso con el uso de homogeneizadores durante el mezclado de las soluciones de componentes.
40 Sin embargo, se ha descubierto que se puede usar un procedimiento de mezclado microfluídico para proporcionar una solución de alginato parcialmente reticulada sin heterogeneidades visibles o detectables.

A menos que se indique lo contrario, todas las concentraciones de mezclas o soluciones se dan como concentraciones en masa, que se definen como la masa de un constituyente o soluto dividido por el volumen de la mezcla.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "solución" se refiere a un líquido en el que dos o más sustancias (*por ejemplo*, soluto y disolvente) se mezclan entre sí y se dispersan uniformemente. La frase "solución acuosa" se refiere a un líquido en el que una o más sustancias (solutos) se dispersan uniformemente en agua (disolvente).

Los términos "líquido" y "fluidizable" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la capacidad de una sustancia para fluir libremente y adoptar la forma del espacio que lo contiene.

- 50 Como se usa en el presente documento, la frase "polímero reticulado" se refiere a una red de unidades de polímero que están interconectadas mediante enlaces covalentes, de hidrógeno o iónicos.

Como se usa en el presente documento, el término "gel" se refiere a una suspensión coloidal semisólida de un sólido en un líquido. El término "hidrogel" se refiere a un gel que contiene agua como líquido.

El término "alginato" se refiere a un copolímero de polisacárido polianiónico derivado de algas marinas (por ejemplo, *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *Eclonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens*, *Ascophyllum codosum*, *L. japonica*, *Durvillaea antarctica*, y *D. potatorum*) y que incluye residuos de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) en proporciones variables.

5 Un aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento de mezclado microfluídico para mezclar uniformemente una primera solución que comprende una sal de alginato y una segunda solución que comprende una sal catiónica divalente. Como se usa en el presente documento, un procedimiento de mezclado "microfluídico" se refiere a un procedimiento que mezcla fluidos en una "microescala". Típicamente, una microescala se refiere a escalas inferiores a un milímetro. Para un procedimiento de mezclado microfluídico, al menos una dimensión característica está en el intervalo de 1 nm a 1 mm. De acuerdo con uno o más modos de realización, un procedimiento microfluídico tiene dimensiones características inferiores o iguales a 500 μm . En algunas implementaciones, un procedimiento microfluídico tiene dimensiones características inferiores o iguales a 100 μm . En algunas implementaciones, un procedimiento microfluídico tiene dimensiones características inferiores o iguales a 50 μm . En otras implementaciones, un procedimiento microfluídico tiene dimensiones características inferiores o iguales a 10 μm . De acuerdo con todavía otras implementaciones, un procedimiento microfluídico tiene dimensiones características inferiores o iguales a 1 μm .

El mezclado microfluídico puede llevarse a cabo de diversas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, la multilaminación de corrientes de fluidos, división y reordenamiento sucesivos de los flujos de fluidos y chorros de fluidos que colisionan. De acuerdo con una o más implementaciones de la invención, el procedimiento microfluídico comprende multilaminación. La multilaminación es un procedimiento en el que las corrientes de fluidos que se van a mezclar se abren en abanico por separado en una gran cantidad de laminillas delgadas. Las laminillas de los dos fluidos están dispuestas de manera alterna de modo que se genera una configuración interdigital. Debido a la difusión y los flujos secundarios, las moléculas de los fluidos se mezclan rápidamente para proporcionar una mezcla uniforme.

La fig. 1A y la fig. 1B muestran una mezcladora de multilaminación microfluídica 100, también conocida como un "cubo de mezclado". La fig. 1A representa la mezcladora de multilaminación en tres secciones transversales para mostrar la placa de canal individual 101, la placa de mezclado 103 y la placa de apertura 105. La fig. 1B muestra la mezcladora de multilaminación montada, con la placa de mezclado 103 descansando sobre la placa de canal 101, y la placa de apertura 105 descansando sobre la placa de mezclado 103.

En la fig. 1A, la placa de canal 101 tiene canales de alimentación 107a y 107b. Cuando se van a mezclar dos fluidos en la mezcladora de multilaminación, el fluido A se introduce en el canal de alimentación 107a y el fluido B se introduce en el canal de alimentación 107b. La placa de mezclado 103 se encuentra directamente encima de la placa de canal 101. Las aberturas de ranura 109a y 109b en la placa de mezclado 103 están dispuestas en dos filas de manera que las aberturas de ranura 109a se solapan parcialmente con el canal 107a y las aberturas de ranura 109b están en comunicación fluida con el canal 107a cuando se monta la mezcladora de multilaminación. Del mismo modo, las aberturas de ranura 109b están dispuestas de manera que se solapan parcialmente con el canal 107b y están en comunicación fluida con el canal 107b cuando se monta la mezcladora de multilaminación. De esta manera, el fluido A y el fluido B se pueden introducir en la mezcladora de multilaminación de manera que no se mezclen en la placa de canal 101 o en la superficie de la placa de mezclado 103, sino que produzcan laminillas delgadas dispuestas en una configuración interdigital, a medida que los fluidos fluyen hacia arriba a través de las placas apiladas.

Las anchuras de las aberturas de ranura 109a y 109b determinarán las anchuras de las laminillas producidas en la mezcladora de multilaminación. Por tanto, para la mezcladora de multilaminación en la fig. 1A, la dimensión característica es la anchura de las aberturas de ranura 109a y 109b. En uno o más modos de realización, la anchura de las aberturas de ranura está en el intervalo de 1 μm a 500 μm . De acuerdo con algunos modos de realización, la anchura de las aberturas de ranura está en el intervalo de 5 μm a 300 μm . En otros modos de realización, la anchura de las aberturas de ranura está en el intervalo de 10 μm a 100 μm . En otros modos de realización, la anchura de las aberturas de ranura está en el intervalo de 25 μm a 75 μm . De acuerdo con todavía otros modos de realización, la anchura de las aberturas de ranura está en el intervalo de 40 μm a 60 μm .

La ranura de apertura 111 está dispuesta de manera que se solapa con ambos conjuntos de aberturas de ranura 107a y 107b. Una vez que los fluidos alcanzan la placa de apertura 105, los fluidos se mezclan rápidamente en la ranura de apertura 111.

Aunque la mezcladora de multilaminación se muestra con tres placas con un total de dos canales, seis aberturas de ranura y una ranura de apertura, los expertos habituales en la técnica reconocerán que las configuraciones alternativas no se apartarán de los principios de una mezcladora de multilaminación. Por ejemplo, una mezcladora de multilaminación puede incluir canales, aberturas de ranura o ranuras de apertura adicionales. Además, las longitudes de los canales y ranuras se pueden ajustar, siempre que las aberturas de ranura sean lo suficientemente estrechas para proporcionar laminillas delgadas, de manera que los fluidos se puedan mezclar rápidamente a través de difusión y flujos secundarios.

Las mezcladoras de multilaminación adecuadas están disponibles comercialmente de Ehrfeld Mikrotechnik BTS GmbH en Wendelsheim, Alemania.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento para preparar una solución de alginato que comprende mezclar uniformemente una primera solución que comprende una sal de alginato y una segunda solución que comprende una sal catiónica divalente. En implementaciones de este aspecto, el tiempo de mezclado característico (τ_m) es inferior al tiempo de reacción característico (τ_R). Aunque sin querer limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las heterogeneidades y la formación de gel son un resultado de la reacción de reticulación que se produce localmente antes de que los componentes de alginato y catiónicos se mezclen uniformemente.

El tiempo de reacción característico (τ_R) se define por:

$$\tau_R = \frac{1}{kC^{n-1}}$$

en el que k es la constante de velocidad de reacción, C es la concentración de reactivo y n es el orden de reacción.

Para reacciones de reticulación de alginato, se forman multímeros de longitud de cadena creciente en una serie de reacciones consecutivas, que se generalizan en las siguientes ecuaciones de reacción:



En la reacción (I), una cadena de alginato y un catión divalente reaccionan para formar un monocomplejo. En la reacción (II), dos monocomplejos y un catión divalente reaccionan para formar un dímero de alginato. En la reacción (III), los dímeros y los cationes divalentes reaccionan para formar multímeros, lo que puede dar como resultado la gelificación.

Además, se espera que el tiempo de reacción sea más largo a medida que aumenta la longitud de la cadena del producto.

La reacción de reticulación en condiciones de reacción típicas es relativamente rápida, por lo que obtener un producto uniforme usando medios de mezclado habituales puede ser desafiante. Para obtener un producto reticulado uniformemente, los componentes se deben combinar de tal manera que estén distribuidos uniformemente en la mezcla a una escala de tiempo más rápida en relación con la velocidad de la reacción/las reacciones.

El tiempo de mezclado característico (τ_m) es el tiempo entre el contacto inicial de los reactivos y la homogeneidad de la mezcla en una escala molecular. Este tiempo de mezclado se puede caracterizar en la escala tanto local como global. A escala local, el mezclado se refiere al mezclado homogéneo de los reactivos en la zona del contacto inicial. El tiempo de mezclado global caracteriza el momento en el que todas las especies que están en el procedimiento son homogéneas. En algunos modos de realización, el "tiempo de mezclado global" es el mismo que el "tiempo de combinación", que es el tiempo requerido para reducir las fluctuaciones de concentración en un 95 %.

En procedimientos en el que $\tau_R < \tau_m$, es posible que se produzca reticulación y se formen heterogeneidades, a pesar de que las concentraciones de alginato y catión divalente son menores que las concentraciones requeridas para la gelificación completa.

Por tanto, uno o más modos de realización de la presente invención proporcionan un procedimiento para producir una solución de alginato parcialmente reticulada en el que $\tau_R > \tau_m$. Utilizando un procedimiento en el que el tiempo de mezclado característico es inferior al tiempo de reacción característico, se puede producir un material parcialmente reticulado uniforme. Algunas implementaciones prevén que el tiempo de mezclado característico sea mucho menor que el tiempo de reacción característico tal que $\tau_R \gg \tau_m$.

Por lo tanto, el tiempo de mezclado puede ser muy corto. En algunas implementaciones, este tiempo de mezclado característico es inferior a 1 segundo. En otras implementaciones, el tiempo de mezclado característico es inferior a 0,1 segundos. Otras implementaciones proporcionan un tiempo de mezclado característico inferior a 0,01 segundos. Aún otras implementaciones proporcionan un tiempo de mezclado característico inferior a

0,001 segundos. De acuerdo con una o más implementaciones, estos cortos tiempos de mezclado característicos se consiguen usando un procedimiento de mezclado microfluídico, tal como una mezcladora de multilaminación.

En una o más implementaciones, el tiempo de mezclado característico es el tiempo de mezclado local. En otras implementaciones, el tiempo de mezclado característico es el tiempo de mezclado global.

5 La fig. 2 muestra un esquema del procedimiento de fabricación 200 para proporcionar una solución de alginato parcialmente reticulada. En la fig. 2, las flechas indican la dirección de movimiento para las diversas soluciones acuosas. La mezcladora 201 mezcla la sal de alginato con agua para proporcionar una solución de sal de alginato, tal como de un 1,5 a un 2,5 % p/p de alginato de sodio. A continuación, la solución de sal de alginato se bombea por la bomba 205 a través del filtro de solución 209 para proporcionar una solución de sal de alginato filtrada, que
10 a continuación se almacena en el tanque 213.

La mezcladora 203 mezcla la sal catiónica divalente con agua para proporcionar una solución de sal catiónica divalente tal como de un 0,4 a un 0,8 % p/p de gluconato de calcio. A continuación, la solución de sal catiónica divalente se bombea por la bomba 207 a través del filtro de solución 211 para proporcionar una solución de sal catiónica divalente filtrada, que a continuación se almacena en el tanque 215.

15 La solución de alginato parcialmente reticulada se puede inyectar en el cuerpo para tratar tejido dañado. En dichas implementaciones, el agua usada para la solución de sal de alginato y la solución de sal catiónica divalente es agua para inyección. El agua adecuada para la inyección tendrá un pH y una osmolaridad controlados, tales como un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 y una osmolaridad de aproximadamente 0. El agua para la inyección se puede purificar antes de mezclarse con la sal de alginato y la sal catiónica divalente,
20 como por destilación u ósmosis inversa.

Las bombas 217 y 219 bombean la solución de sal de alginato y la solución de sal catiónica divalente filtradas, respectivamente, que a continuación se introducen en la mezcladora microfluídica 221. Aunque las soluciones se bombean en la mezcladora de multilaminación en la fig. 2, las soluciones se pueden introducir en la mezcladora de multilaminación de diversas maneras diferentes, como por acción capilar. Como se muestra en la fig. 2, las dos
25 soluciones acuosas se pueden proporcionar como corrientes constantes, y el procedimiento de mezclado microfluídico puede ser un procedimiento continuo. En la mezcladora microfluídica 221, la solución de sal de alginato y la solución de sal catiónica divalente se mezclan uniformemente para proporcionar una solución de alginato líquida homogénea. Las concentraciones de la sal de alginato y la sal catiónica divalente, así como los pesos moleculares promedio de los polímeros de alginato, se eligen de modo que la solución acuosa resultante
30 tenga una reticulación parcial de los polímeros de alginato, pero todavía permanezca líquida y fluidizable.

Opcionalmente, la solución de alginato parcialmente reticulada se puede pasar a continuación a través de un filtro abrillantador 223 para eliminar cualquier heterogeneidad resultante con fines de regulación y seguridad, aunque el procedimiento como se describe en el presente documento puede minimizar las heterogeneidades en la solución de alginato parcialmente reticulada. A continuación, la solución de alginato parcialmente reticulada se recoge en
35 un tanque de recolección de productos 225.

En algunas implementaciones, se desea tener un producto estéril adecuado para su uso como polímero inyectable. Por tanto, el producto se puede esterilizar, usando la bomba 227 para bombear el producto a través de los filtros de esterilización 229. El filtrado estéril puede comprender pasar la solución de alginato parcialmente reticulada a
40 través de una membrana que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0,02 a 2 μm . En algunos modos de realización, la solución de alginato parcialmente reticulada se puede pasar a través de una membrana que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0,1 a 0,5 μm . A continuación, el producto final se recoge en el tanque 231 antes de cargarlo en viales.

Sin embargo, puede ser costoso y oneroso tener todo el equipo de fabricación en un ambiente estéril. Por tanto, de acuerdo con algunas implementaciones, solo una parte del equipo está en una sala blanca de clase 100, clase
45 10 o clase 1. En dichas implementaciones, la esterilización y la carga de viales se realizarían en una sala blanca que cumpla las normas de clase 100, pero no sería necesario tener otras etapas, como el mezclado microfluídico, en una sala blanca que satisface las normas de clase 100. En cambio, el mezclado microfluídico y la preparación de la solución de sal de alginato y la solución de sal catiónica divalente se pueden realizar en salas blancas que satisfagan las normas de clase 100.000, clase 10.000 o clase 1.000. En una implementación específica, el
50 mezclado microfluídico y/o la preparación de la solución de sal de alginato y la solución de sal catiónica divalente se realizan en salas blancas que satisfacen las normas de clase 10.000.

Usando una mezcladora microfluídica que utiliza principios de multilaminación o similares, el volumen del producto fabricado se puede escalar aumentando el número de microestructuras en lugar de aumentar el tamaño de las
55 dimensiones características. Por lo tanto, en lugar de aumentar la anchura de las aberturas de ranura en la mezcladora de multilaminación, se puede aumentar el número de aberturas de ranura en las placas de la mezcladora de multilaminación o se puede aumentar el número de mezcladoras de multilaminación, conservando así las ventajas de las microescala. Alternativamente, la longitud de las aberturas de ranura se puede aumentar,

siempre que la anchura de las aberturas de ranura sea lo suficientemente estrecha para proporcionar laminillas delgadas de fluidos.

Por tanto, son posibles altas velocidades de flujo de mezclado microfluido y, de acuerdo con una o más implementaciones, el procedimiento de fabricación tiene un caudal volumétrico a una escala comercial en lugar de una escala de laboratorio. En uno o más modos de realización, el volumen de solución de alginato parcialmente reticulada producido está en el intervalo de 0,05 a 5 l/min. El caudal volumétrico puede escalarse incluso por encima de 5 l/min, tal como hasta 10 l/min, 20 l/min o incluso 50 l/min. En algunas implementaciones, el volumen de solución de alginato parcialmente reticulada producido está en el intervalo de 0,2 a 3 l/min. En algunas implementaciones, el volumen de solución de alginato parcialmente reticulada producido está en el intervalo de 0,5 a 2 l/min.

La sal de alginato puede ser cualquier sal de alginato farmacológicamente aceptable. Los ejemplos de dichas sales de alginato incluyen, pero no se limitan a, sales alginato monovalentes tales como sales de sodio, potasio, litio, rubidio, cesio y amonio de ácido alginico. La sal de alginato también puede ser un alginato soluble de una base orgánica tal como un alginato de mono-, di- o trietanolamina, alginato de anilina, y similares. En algunas implementaciones, la sal de alginato comprende alginato de sodio.

De acuerdo con una o más implementaciones, el alginato tiene una proporción monomérica entre ácido α -L-gulurónico y β -D-manurónico que varía entre 1:1 y 3:1. En algunas implementaciones, la proporción monomérica está entre 1,5:1 y 2,5:1. En algunas implementaciones, la proporción monomérica es de aproximadamente 2:1.

Una o más implementaciones proporcionan que el alginato tenga un peso molecular que varía entre 1 y 300 kDa. En algunas implementaciones, el peso molecular está entre 5 y 200 kDa. De acuerdo con la invención, el peso molecular del alginato está entre 10 y 100 kDa. En algunas implementaciones, el peso molecular de alginato está entre 20 y 50 kDa.

Los ejemplos de sales catiónicas divalentes para reticular parcialmente los polímeros de alginato son sales de calcio, estroncio, bario y magnesio. De acuerdo con una o más implementaciones, la sal catiónica divalente comprende una sal de calcio. Las sales de calcio farmacológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, gluconato de calcio, citrato de calcio, acetato de calcio, fluoruro de calcio, fosfato de calcio, tartrato de calcio, sulfato de calcio, borato de calcio y cloruro de calcio. En algunos modos de realización, la sal de calcio comprende gluconato de calcio. La sal de gluconato de calcio puede estar en forma tanto anhidra como hidratada.

La solución de alginato parcialmente reticulada presenta una respuesta elástica que es igual a o mayor que su respuesta viscosa bajo frecuencias oscilatorias de baja deformación, en el límite viscoelástico lineal y un comportamiento pseudoplástico, en una relación de ley de potencia.

El término "*viscosidad* (η)" usado en el presente documento se refiere a una medida de la resistencia de un fluido al flujo. Se define como la proporción de tensión de cizallamiento (τ) con respecto a la tasa de cizallamiento ($\dot{\gamma}$):

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

Cuando el fluido cumple la ecuación para todas las velocidades de cizallamiento, se denota como un fluido newtoniano.

Las propiedades viscoelásticas de la composición se pueden determinar aplicando una tensión o deformación sinusoidal de frecuencia f a la muestra y midiendo la respuesta. La respuesta se divide en (i) una parte elástica en fase con la tensión o deformación aplicada, y (ii) una parte viscosa fuera de fase. Debido a los dos componentes, se usa una notación compleja. El módulo de cizallamiento complejo se denota por G^* , que se define mediante la siguiente fórmula:

$$G^* = G' + jG''$$

en la que G' es el módulo de almacenamiento, es decir, la parte elástica, G'' es el módulo de pérdida, es decir, la parte viscosa, y $j^2 = -1$.

El módulo de cizallamiento en función de la frecuencia se puede expresar mediante la pendiente n en un gráfico log-log de G' frente a la frecuencia, f , denotado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Log } G' = n \log f + K$$

en la que K es una constante. En un gel físico $n > 0$, y en un gel covalente $n = 0$.

Las características viscoelásticas se pueden presentar en términos del módulo de almacenamiento G' (denominado en el presente documento la "*respuesta elástica*") y el módulo de pérdida G'' (denominado en el presente documento la "*respuesta viscosa*") como una función de la frecuencia angular.

5 Los valores de la respuesta elástica (G'), la respuesta viscosa (G'') y la viscosidad (η) se pueden determinar usando procedimientos reológicos estándar. De acuerdo con una o más implementaciones, las mediciones reológicas se obtienen bajo una frecuencia oscilatoria que varía dentro del límite viscoelástico. En algunas implementaciones, las mediciones reológicas se obtienen bajo una frecuencia oscilatoria que varía entre 0,01 y 100 Hz. De acuerdo con la invención, las mediciones reológicas se obtienen bajo una frecuencia oscilatoria que varía entre 0,1 y 10 Hz.

Las soluciones de alginato parcialmente reticuladas pueden no tener reticulaciones permanentes, dependen en gran medida de la frecuencia y tienen un cruzamiento $G'-G''$. Esta es la razón por la que la solución de alginato parcialmente reticulada se comporta como un líquido, pero gelificará cuando se expone a niveles elevados de calcio en el tejido dañado.

10 Las soluciones de alginato parcialmente reticuladas se describen en detalle en las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0003010 y 2006/0083721, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

La tabla 1 a continuación muestra la fluidez y las características reológicas de diversas mezclas homogeneizadas de alginato de sodio y gluconato de calcio.

15 *Tabla 1: Aspecto visual y características reológicas de mezclas homogeneizadas de alginato de sodio y gluconato de calcio*

Peso molecular promedio de alginato (kDa)	Concentración de alginato de sodio (% p/v)	Concentración de gluconato de calcio (% p/v)	Aspecto visual	Características reológicas	Concentración de Ca^{2+} (% p/v)
15	1	0,4	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,03724
30	1	0,3	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02793
30	0,8	0,3	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02793
30	1,5	0,3	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02793
100	1	0,270	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02514
100	1	0,275	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02560
100	1	0,3	Solución fluidizable	$G' \geq G''$	0,02793

* G' = respuesta elástica; G'' = respuesta viscosa.

20 Las mezclas de alginato de sodio y gluconato de calcio a una proporción que varía entre aproximadamente 1:0,4 y 1:0,3 se convirtieron en soluciones estables que permanecieron fluidizables libremente durante al menos 24 horas a temperatura ambiente y durante al menos 30 días a 4-8 °C. Dicho comportamiento es típico de soluciones médicas que se pueden inyectar en el torrente sanguíneo, incluso después de largos períodos de tiempo tras el mezclado, pero formarán geles en el tejido dañado.

Por lo tanto, las soluciones de alginato parcialmente reticuladas estables pueden hacerse fluir libremente y presentan respuestas elásticas que son iguales a o mayores que su respuesta viscosa bajo pequeñas frecuencias oscilatorias de deformación en el límite viscoelástico lineal.

25 En una o más implementaciones, la concentración de alginato en la solución de sal de alginato antes de mezclarla con la solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de un 0,2 a un 8 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración de alginato en la solución de sal de alginato está en el intervalo de un 1 a un 4 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración de alginato en la solución de sal de alginato está en el intervalo de un 1,5 a un 3 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración de alginato en la solución de sal de alginato está en el intervalo de un 1,5 a un 2,5 % p/v.

30 Una o más implementaciones proporcionan que la concentración de catión divalente en la solución de sal catiónica divalentes antes de mezclarla con la solución de sal de alginato esté en el intervalo de un 0,01 a un 0,2 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración de catión divalente en la solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de un 0,02 a un 0,1 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración de catión divalente en la solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de un 0,04 a un 0,08 % p/v. En algunas implementaciones,

la concentración de catión divalente en la solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de un 0,05 a un 0,07 % p/v.

5 La proporción de solución de sal de alginato con respecto a solución de sal catiónica divalente dependerá de las concentraciones de las soluciones correspondientes. De acuerdo con algunas implementaciones, la proporción de solución de sal de alginato con respecto a solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de 0,1 a 10. En otras implementaciones, la proporción de solución de sal de alginato con respecto a solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de 0,2 a 5. Otras implementaciones prevén que la proporción de solución de sal de alginato con respecto a la solución de sal catiónica divalente esté en el intervalo de 0,4 a 2,5. Aún otras implementaciones prevén una proporción de solución de sal de alginato con respecto a solución de sal catiónica divalente en el intervalo de 0,5 a 2. En algunas implementaciones, la proporción de solución de sal de alginato con respecto a solución de sal catiónica divalente está en el intervalo de 0,7 a 1,5.

10 De acuerdo con una o más implementaciones, la concentración final (p/v) de alginato en la solución de alginato parcialmente reticulada está en el intervalo de un 0,1 a un 4 %. En implementaciones adicionales, la concentración final (p/v) de alginato en la mezcla está en el intervalo de un 0,5 a un 2 %. En algunas implementaciones, la concentración final de alginato está en el intervalo de un 0,8 a un 1,5 % p/v.

15 Una o más implementaciones de la presente invención proporcionan que la concentración final (p/v) de cationes divalentes en la mezcla esté en el intervalo de un 0,005 a un 0,1 %. En algunas implementaciones, la concentración final de cationes divalentes en la mezcla está en el intervalo de un 0,01 a un 0,05 % p/v. De acuerdo con la invención, la concentración de catión divalente está en el intervalo de un 0,02 % a un 0,04 % p/v. En algunas implementaciones, la concentración del catión divalente está en el intervalo de un 0,025 a un 0,035 % p/v.

20 Cuando se usan gluconato de calcio y alginato de sodio como sal catiónica divalente y sal de alginato, respectivamente, algunas implementaciones proporcionan que la proporción en peso entre gluconato de calcio y alginato de sodio en la solución de alginato parcialmente reticulada varíe entre 2:1 y 1:10. De acuerdo con una o más implementaciones, la proporción en peso está entre 1:1 y 1:6. Modos de realización adicionales proporcionan que la proporción en peso esté entre 1:2 y 1:5. En algunas implementaciones, la proporción en peso está entre 1:3 y 1:4.

25 De acuerdo con una o más implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada tiene una reticulación uniforme entre los polímeros de alginato. Como se usa en el presente documento, la frase "reticulación uniforme" se refiere a extender los enlaces que unen las cadenas de polímero en una distribución sustancialmente no agrupada. En algunas implementaciones, la reticulación uniforme es una distribución sustancialmente aleatoria o incluso una distribución sustancialmente uniforme. La solución reticulada uniformemente adopta una viscoelasticidad sustancial, pero conserva su liquidez y fluidez.

30 La solución de alginato parcialmente reticulada producida por el procedimiento (i) mantiene un estado líquido en el almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 24 horas y (ii) adopta un estado de gel después de la deposición dentro del tejido corporal dañado. En algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada producida por el procedimiento mantiene un estado líquido en contacto con la sangre cuando se inyecta en un vaso sanguíneo, fluye libremente dentro del vaso sanguíneo y adopta un estado de gel solo tras entrar en contacto con tejido corporal dañado.

35 En algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada producida por el procedimiento es estable en almacenamiento, es decir, mantiene su forma de solución líquida e inyectabilidad durante largos periodos de tiempo. De acuerdo con la invención, la solución de alginato parcialmente reticulada es estable a temperatura ambiente o inferior a temperatura ambiente durante un período de al menos 24 horas. En algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada es estable a temperatura ambiente o inferior a temperatura ambiente durante un período de al menos 7 días. En otras implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada es estable a temperatura ambiente o inferior a temperatura ambiente durante un período de al menos 30 días. Otras implementaciones proporcionan que la solución de alginato parcialmente reticulada sea estable a temperatura ambiente o inferior a temperatura ambiente durante un período de al menos un año. En todavía otras implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada es estable a temperatura ambiente o inferior a temperatura ambiente durante un período de al menos 5 años.

40 Además de ser estable en almacenamiento, de acuerdo con una o más implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada mantiene un estado líquido dentro de un vaso sanguíneo después de haberse introducido mediante infusión o cateterismo. En algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada se puede extender por todo el torrente sanguíneo. De acuerdo con algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada puede extenderse fuera del vaso sanguíneo y en el tejido dañado, donde a continuación la solución forma un gel. Por tanto, algunas implementaciones proporcionan que la solución de alginato parcialmente reticulada pueda fluir dentro de un vaso sanguíneo, atravesar los capilares sanguíneos y extenderse en la matriz extracelular del tejido circundante.

Una o más implementaciones prevén que la solución de alginato parcialmente reticulada se pueda administrar en el tejido corporal mediante una aguja. En algunas implementaciones, la solución de alginato parcialmente reticulada se puede administrar a través de una aguja con un calibre 18-27.

- 5 Después de la deposición dentro de un tejido corporal dañado, la solución de alginato parcialmente reticulada puede formar un estado de gel. En algunas implementaciones, una vez gelatinizado, el material viscoelástico proporciona un soporte mecánico y elasticidad sustanciales al tejido corporal, así como una estructura para la regeneración de tejido nuevo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una solución de alginato parcialmente reticulada que es estable a temperatura ambiente durante al menos 24 horas, que comprende: proporcionar una primera solución acuosa que comprende una sal de alginato monovalente; proporcionar una segunda solución acuosa que comprende una sal catiónica divalente; y mezclar uniformemente la primera solución acuosa y la segunda solución acuosa en un procedimiento de mezclado de multilaminación microfluido para proporcionar la solución de alginato parcialmente reticulada, en la que el alginato tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 kDa, la concentración de alginato en la solución de alginato parcialmente reticulada está en el intervalo de un 0,8 a un 1,5 % p/v, la concentración de cationes divalentes en la solución de alginato parcialmente reticulada está en el intervalo de un 0,02 a un 0,04 % p/v, y dicha solución de alginato presenta una respuesta elástica (G') que es igual a o mayor que su respuesta viscosa (G'') bajo una frecuencia oscilatoria que varía entre 0,1 y 10 Hz y a temperatura ambiente.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sal catiónica divalente comprende una sal de calcio.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además esterilizar la solución de alginato, en el que dicha esterilización comprende preferentemente un filtrado estéril.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento es un procedimiento continuo.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la caudal volumétrico del procedimiento está en el intervalo de 0,05 a 5 l/min.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tiempo de mezclado local es inferior a 0,1 segundos.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento tiene un tiempo de mezclado global inferior a 1 segundo.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tiempo de mezclado local y el tiempo de mezclado global son inferiores a 0,1 segundos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la sal de alginato comprende alginato de sodio y la sal catiónica divalente comprende gluconato de calcio.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la concentración de gluconato de calcio en la solución de alginato parcialmente reticulada es de aproximadamente un 0,2 a aproximadamente un 0,4 % p/v.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el procedimiento tiene un tiempo de mezclado característico (T_m) inferior a un tiempo de reacción característico (T_R).
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el procedimiento tiene un tiempo de mezclado local inferior a 1 segundo.

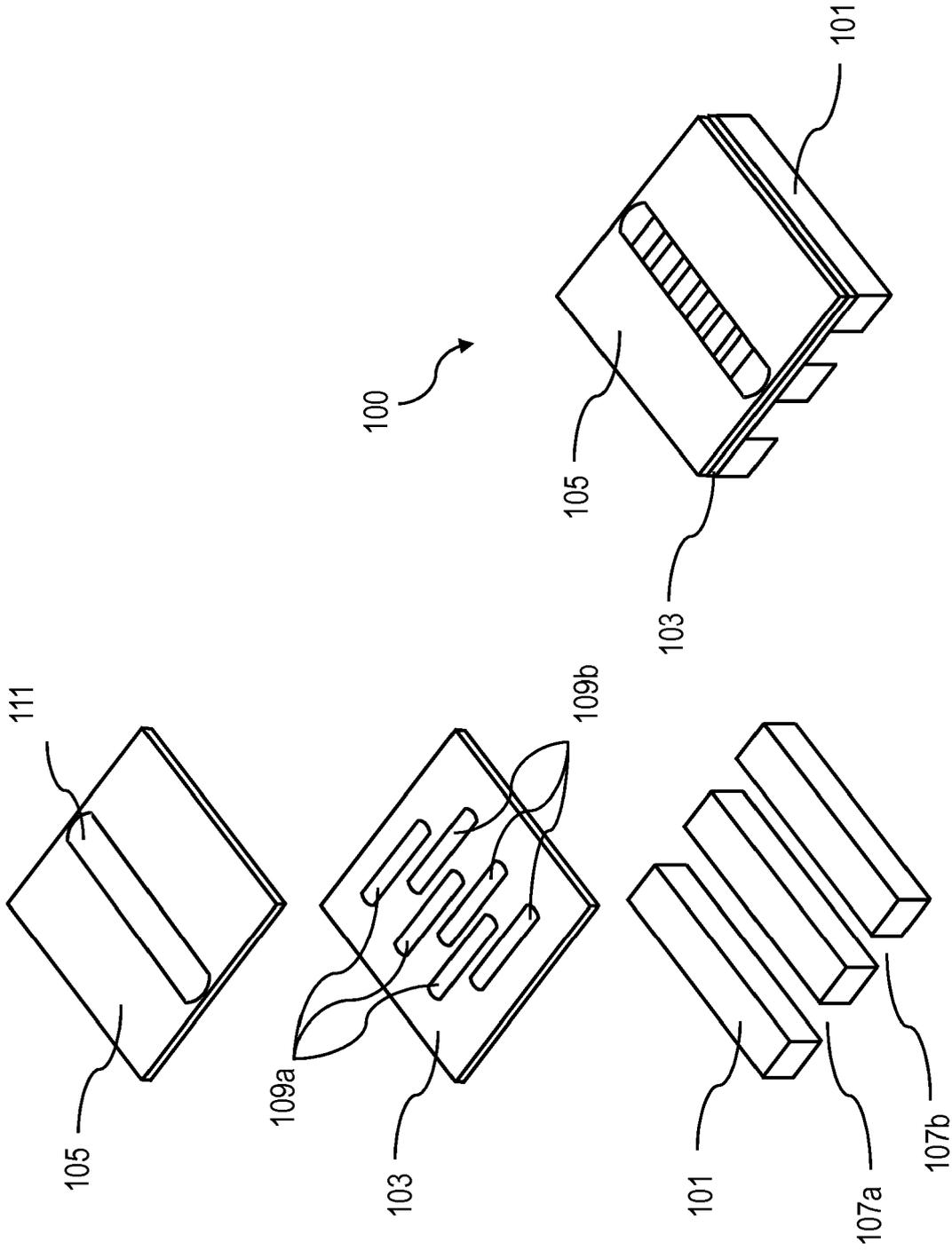


FIG. 1A

FIG. 1B

200

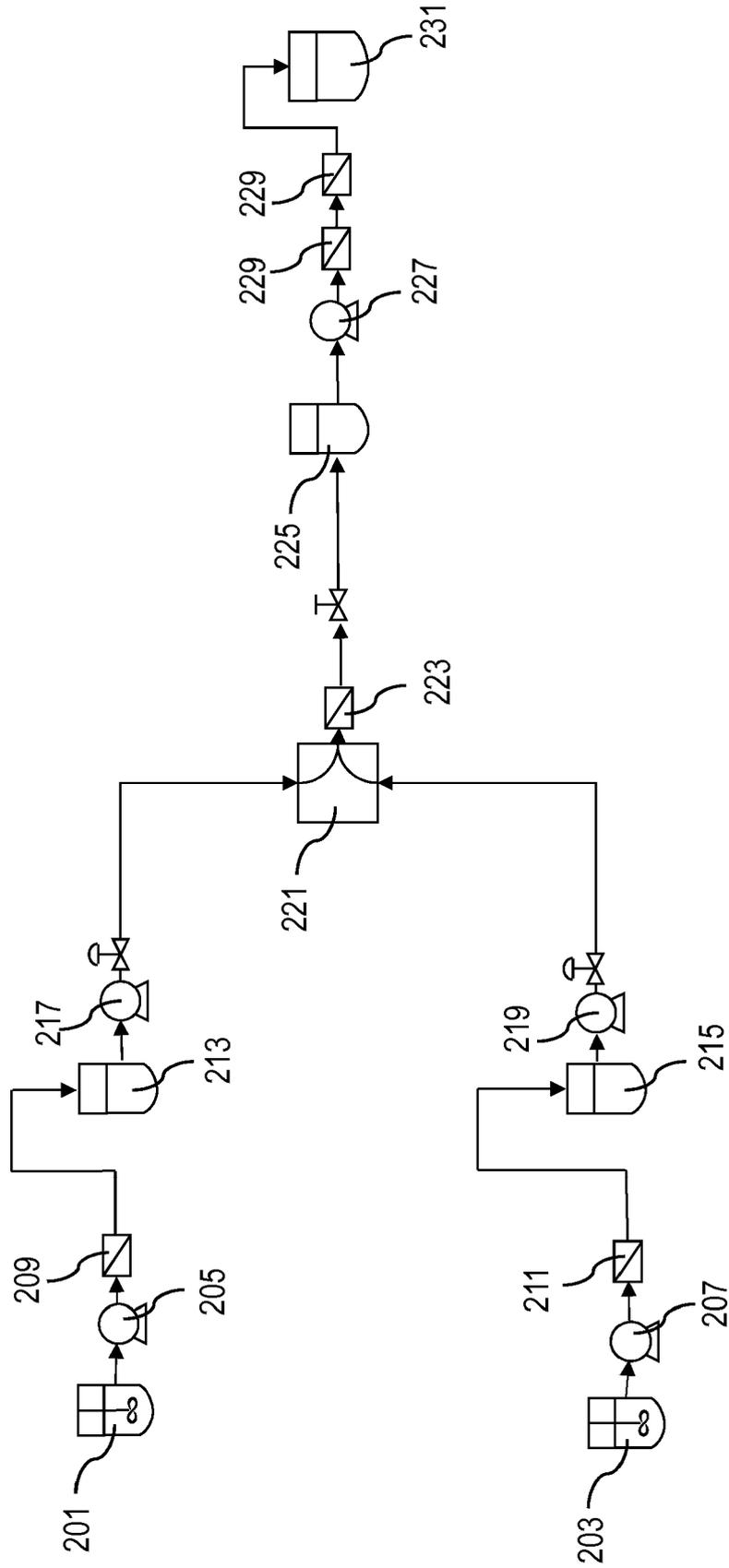


FIG. 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20050003010 A [0065]
- US 20060083721 A [0065]