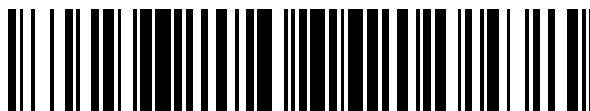


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 902**

51 Int. Cl.:

**C08G 69/48** (2006.01)

**C08J 3/24** (2006.01)

**A61K 49/18** (2006.01)

**C12N 11/02** (2006.01)

**A61L 15/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/EP2012/057264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12721432 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2699619**

54 Título: **Partículas de poli- e-lisina reticulada**

30 Prioridad:  
**20.04.2011 GB 201106742**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2018**

73 Titular/es:  
**SPHERITECH LTD (100.0%)  
The Heath Business and Technology Park  
Runcorn, Cheshire WA7 4QX, GB**

72 Inventor/es:  
**WELLINGS, DONALD**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 662 902 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Partículas de poli-  $\epsilon$ -lisina reticulada

5 La presente invención se refiere a un soporte polimérico, un procedimiento de preparación del soporte y al uso del soporte en un procedimiento en fase sólida. En particular, la invención se refiere a un soporte polimérico que comprende poli- $\epsilon$ -lisina reticulada. El soporte es útil en una amplia variedad de procedimientos físicos y químicos, especialmente donde se requiere la interacción con un sustrato, por ejemplo, síntesis en fase sólida, extracción en fase sólida, reactivos en fase sólida, inmovilización de especies, cultivo celular, catálisis, cromatografía y en diagnósticos médicos.

10 La poli- $\epsilon$ -lisina es una poliamida polidispersa de cadena corta que existe de forma natural que consiste en el aminoácido lisina unido mediante enlaces amida entre el grupo carboxilo y el épsilon ( $\epsilon$ )-amino. Esta estructura es poco usual por que los enlaces amida se forman entre los grupos carboxilo y  $\epsilon$ -amino de la lisina, mientras que un enlace peptídico normal entre aminoácidos en un péptido y la poli-lisina tradicionalmente empleada se forma entre los grupos carboxilo y  $\alpha$ -amino. La polidispersidad en la poli- $\epsilon$ -lisina que existe de forma natural normalmente está entre 25-35 aminoácidos. En la poli-lisina comercialmente disponible tradicional, el péptido tiene una polidispersidad  
15 poco controlada mucho más ancha que normalmente contiene cualquiera de 5-500 aminoácidos.

La poli- $\epsilon$ -lisina reticulada tiene estructuralmente una naturaleza más elástica que la poli-lisina tradicional debido a la mayor longitud de cadena entre los enlaces amida. Estructuralmente, la poli- $\epsilon$ -lisina es eficazmente un Nailon 5 de  $\alpha$ -amino.

20 La poli- $\epsilon$ -lisina se fabrica actualmente por fermentación bacteriana a gran escala como conservante alimentario. Es barata y está fácilmente disponible en cantidades comerciales. En la presente invención, los presentes inventores describen la reticulación de poli- $\epsilon$ -lisina para formar soportes poliméricos insolubles que tienen aplicaciones a través de una variedad de tecnologías. Éstas incluyen la síntesis de péptidos en fase sólida, síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, extracción en fase sólida, reactivos en fase sólida, inmovilización de especies, cultivo celular, catálisis, cromatografía, liberación lenta de productos agroquímicos y liberación lenta de productos farmacéuticos, cuidado de  
25 heridas, medicina regenerativa y diagnósticos médicos.

Se conocen materiales de soporte sólido útiles en los procedimientos sintéticos en fase sólida. Un amplio intervalo de procedimientos físicos y químicos emplean materiales de soporte sólido que incluyen, a modo de ejemplo, síntesis de moléculas orgánicas, en particular péptidos y oligonucleótidos, inmovilización de especies, soporte de catalizadores, intercambio iónico, extracción de especies de un material, diagnósticos y cromatografía.

30 Normalmente, la síntesis multi-etapa de una molécula orgánica implica numerosas etapas de aislamiento para separar productos intermedios, producidos en cada etapa, antes de progresar a la etapa posterior. Estos procedimientos requieren frecuentemente tiempo, gasto y puede ser eficientes con respecto al rendimiento. Los productos intermedios frecuentemente requieren la purificación para eliminar reactivos en exceso y subproductos de reacción y procedimientos tales como precipitación, filtración, extracción en disolventes bifásicos; pueden emplearse  
35 extracción en fase sólida, cristalización y cromatografía.

La síntesis en fase sólida ofrece algunas ventajas con respecto a la síntesis en fase de disolución. Por ejemplo, los procedimientos de aislamiento usados en la síntesis en fase de disolución pueden evitarse de algún modo uniendo reversiblemente la molécula diana a un soporte sólido. Los reactivos en exceso y algunos de los productos secundarios pueden eliminarse por filtración y lavado del soporte sólido. La molécula diana puede recuperarse con  
40 rendimiento esencialmente cuantitativo en algunos procedimientos que normalmente son particularmente difíciles en la síntesis en fase de disolución. Además, el tiempo requerido para realizar operaciones sobre un soporte sólido normalmente es muy inferior al requerido para llevar a cabo la etapa equivalente en una síntesis en fase de disolución.

También se conoce la inmovilización de especies en una variedad de procedimientos. Por ejemplo, se usan soportes de polímero comúnmente para la inmovilización de catalizadores para su uso en química orgánica tradicional que incluyen quimio y biocatálisis. Pueden emplearse enzimas inmovilizadas para realizar reacciones químicas orgánicas o para resolución quiral, por ejemplo el uso de penicilina amidasa inmovilizada para la resolución de alcoholes secundarios (E. Baldaro y col., Tet. Asym. 4, 1031, (1993)) y también se usa penicilina G amidasa inmovilizada para la hidrólisis de bencilpenicilina en la fabricación de amoxicilina (Carleysmith, S. W. y Lilly, M.D. Biotechnol. Bioeng.,  
50 21, 1057-73, 1979).

También se usan soportes sólidos para inmovilizar macromoléculas biológicas para aplicaciones médicas y de diagnóstico. Esto incluye inmovilización de proteínas, anticuerpos monoclonales y policlonales. El cultivo celular se lleva a cabo comúnmente en soportes sólidos con características superficiales y morfología específicas. Las enzimas inmovilizadas sobre los soportes también pueden emplearse como sensores para generar una señal. Un  
55 ejemplo es la detección de glucosa por el sistema de enzimas acoplado de glucosa oxidasa/peroxidasa, en el que la presencia de glucosa genera peróxido de hidrógeno que a su vez es el sustrato para peroxidasa para la oxidación de una amplia variedad de sustratos para proporcionar una señal coloreada, fluorescente o luminiscente.

Puede utilizarse una variedad de flúores cuya fluorescencia es sensible a cationes o aniones específicos para indicar concentraciones de iones específicos que incluyen iones hidrógeno para la medición del pH.

Se usan frecuentemente partículas poliméricas en cromatografía donde los soportes sólidos se llaman fases estacionarias. En ciertos modos de cromatografía, el coste de las fases estacionarias puede ser restrictivo. En otros modos, la naturaleza física de la fase estacionaria puede reducir la eficacia de la tecnología. Por ejemplo, los polímeros blandos usados frecuentemente para afinidad, intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular no pueden usarse a altos caudales debido a la naturaleza deformable de las partículas. Los polímeros macroporosos rígidos usados para muchos otros modos de cromatografía pueden frecuentemente ser mecánicamente friables y posteriormente padecen una vida corta.

La aplicación de soportes sólidos o fases estacionarias en separaciones cromatográficas es muy amplia, por ejemplo, complejas separaciones de alta tecnología usadas en la industria farmacéutica y de biotecnología y procedimientos a mayor escala usados en la industria de la minería. Algunos de los fármacos más valiosos en la industria farmacéutica se purifican por cromatografía preparativa y la separación cromatográfica mejorada sería técnicamente beneficiosa y económicamente ventajosa. En la industria de la minería y de la recuperación de metales preciosos, una gran porción del paladio mundial, un componente crítico en una amplia variedad de aplicaciones y procedimientos industriales que incluyen convertidores catalíticos y la fabricación de productos de alto valor, puede ser refinado usando éteres corona inmovilizados (Traczyk, F.P.; Bruening, R.L.; Izatt, N.E. "The Application of Molecular Recognition Technology (MRT) for Removal and Recovery of Metal Ions from Aqueous Solutions"; en Fortschritte in der Hydrometallurgie; 1998, Vorträge beim 34. Metallurgischen Seminar des Fachausschusses für Metallurgische Aus- und Weiterbildung der GDMB; 18-20 de Noviembre de 1998; Goslar).

El uso de partículas poliméricas en la extracción en fase sólida y en la preparación de reactivos en fase sólida también es conocido en la industria química, farmacéutica y de biotecnología.

Soportes de fase sólida conocidos generalmente comprenden partículas de polímero de un tamaño particular y naturaleza física para adecuarse a la aplicación. Para facilitar el uso, estas partículas de polímero son frecuentemente esféricas y tienen una distribución del tamaño de partícula definida. La naturaleza esférica de las partículas mejora las características de flujo y de filtración del polímero. Aunque los usos de soportes sólidos son ventajas operacionales, hay desventajas al enfoque en fase sólida.

En la síntesis de péptidos, el poliestireno es ampliamente empleado como un soporte de polímero para soportar el péptido en crecimiento y es relativamente barato, está ampliamente disponible y proporciona rendimiento aceptable en la síntesis de péptidos. Otros soportes comercialmente disponibles comúnmente usados para la síntesis en fase sólida de péptidos y oligonucleótidos pueden ser caros, por ejemplo, debido a los complejos procedimientos de fabricación. Se usan generalmente polímeros microporosos y polímeros macroporosos. Los polímeros microporosos tienen un nivel relativamente bajo de reticulante que permite que las partículas de polímero se solvaten y, por consiguiente, hinchen en disolventes adecuados. Los polímeros macroporosos frecuentemente tienen un alto nivel de reticulante en la matriz de polímero y contienen grandes poros. Estas partículas de polímero son generalmente rígidas y tienen buenas características de flujo y son adecuadas para su uso en columnas rellenas.

Se conoce una variedad de polímeros que incluyen aquellos en los documentos WO2007/028607 y EP1967217A2 que se refieren a nanopartículas y el uso de poli- $\epsilon$ -lisina como un recubrimiento sobre las partículas para conferir actividad antimicrobiana. El documento JP2006/307004 se refiere a hidrogeles. El documento US2010/161021 se refiere a la reticulación de un polisacárido para aplicaciones en parche miocárdico. La polilisina se refiere en términos genéricos a, pero no se hace referencia a, poli- $\epsilon$ -lisina. El documento US2003/103931 se refiere a poli- $\epsilon$ -lisina reticulada con compuestos de epiclohidrina o bis-epoxi. El documento JP11152330 describe reticulada. Los documentos JP2003171464 y JP2003176353 se refieren a la fabricación de un polímero soluble. El documento EP2210917 se refiere a poli-L-lisina reticulada por aldehído. El documento WO9013256 se refiere a poli- $\alpha$ -lisinas que contienen 50-100 grupos lisina.

Sigue existiendo la necesidad de encontrar un polímero alternativo o rentable adecuado para su uso como soporte en una amplia variedad de aplicaciones. Los presentes inventores han encontrado ahora que un polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada proporciona una excelente combinación de características, puede ser adaptado según las propiedades deseadas por selección apropiada del reticulante y puede emplearse rentablemente en una amplia variedad de aplicaciones.

En un primer aspecto, la invención proporciona un polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada que comprende poli- $\epsilon$ -lisina y un reticulante unido por enlaces amida en el que el reticulante comprende dos o más grupos ácido carboxílico y una cadena alifática que une los dos o más grupos adaptados para reaccionar con una amina del carbono alfa de la poli- $\epsilon$ -lisina.

El polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada es particularmente útil en proporcionar un soporte para una amplia variedad de aplicaciones, especialmente donde la reticulación proporciona un polímero que es insoluble en agua y otros disolventes. Donde se emplean niveles de reticulación más bajos, el polímero puede ser soluble en agua y esto proporciona ventaja en ciertas aplicaciones como se describe más adelante. Adecuadamente, el polímero

comprende poli-ε-lisina y un reticulante unido por enlaces amida.

El polímero puede estar en cualquier forma adecuada que incluye una macroforma no en partículas, por ejemplo, una hoja, artículo, fibra, o en forma de partículas.

5 El componente de poli-ε-lisina de la poli-ε-lisina reticulada es el principal componente del polímero reticulado. El reticulante actúa uniendo juntos los polímeros de poli-ε-lisina de forma que los polímeros de poli-ε-lisina proporcionen una estructura, por ejemplo una red para su uso en una variedad de aplicaciones que incluyen soporte para la síntesis de moléculas orgánicas, por ejemplo polipéptidos y polinucleótidos, cromatografía, uso como un soporte para materiales funcionales como se describe en el presente documento más adelante.

10 El reticulante puede tener tres o más grupos funcionales para unirse al mismo número de cadenas del polímero de poli-ε-lisina o menos cadenas, pero con múltiples enlaces con una o más de tales cadenas. El reticulante puede contener otros grupos funcionales que no participan en la reacción de reticulación y siguen disponibles para reacción con otras especies durante el uso del polímero reticulado.

15 El nivel de reticulación en el soporte polimérico puede usarse para controlar la forma física y reactividad química de la poli-ε-lisina reticulada final. La introducción de altos niveles de reticulación producirá estructuras rígidas adecuadas para la preparación de soportes de polímero macroporoso, mientras que un bajo nivel de reticulación producirá materiales más microporosos más blandos. La funcionalidad amina es alta con bajos niveles de reticulación, que puede ser fácilmente adaptada por terminación controlada. La manipulación, solvatación y propiedades físicas también pueden definirse por el tipo de reticulante introducido.

20 Adecuadamente, el reticulante comprende un compuesto específico o grupo de compuestos. El reticulante puede comprender una unidad de repetición y ser polidisperso, sin embargo, la polidispersidad es estrecha para garantizar el control apropiado con respecto a la estructura de red formada tras la reticulación. El reticulante comprende al menos dos grupos funcionales capaces de reaccionar con una amina del carbono alfa de la poli-ε-lisina. Ejemplos de grupos funcionales comunes adecuados para este fin incluyen ácidos carboxílicos.

25 Los enlaces amida son biodegradables y el polímero reticulado de la invención y los soportes que lo comprenden son especialmente útiles en aplicaciones en las que la biodegradabilidad es importante. Además, los enlaces amida pueden ser metabolizados, por ejemplo, por enzimas que incluyen proteasas, además de ser biodegradables y ser particularmente ventajosos para su uso en aplicaciones médicas y especialmente uso médico sobre o en el cuerpo humano o animal. Los polímeros y soportes de la invención proporcionan beneficio en aplicaciones médicas donde el polímero o soporte se degrada adecuadamente con el tiempo, evitando así la necesidad de procedimientos para eliminar el soporte después de que su función se haya completado.

30 En una realización especialmente preferida, los enlaces entre el reticulante y la poli-ε-lisina comprenden enlaces amida, preferentemente al menos el 1 % de los grupos épsilon-amina están reticulados, más preferentemente al menos el 50 %, deseablemente al menos el 90 % y especialmente sustancialmente todos los enlaces son enlaces amida.

35 En una realización preferida adicional, el polímero está ligeramente reticulado y del 1 a hasta el 50 %, 1 al 20 % y 1 al 10 % de los grupos épsilon-amina están reticulados. Polímeros ligeramente reticulados y soportes de la invención son especialmente útiles en la síntesis de especies orgánicas, por ejemplo péptidos y secuencias de nucleótidos, y en la administración de especies activas, por ejemplo agentes farmacéuticamente activos.

40 Por consiguiente, en una realización preferida, el reticulante puede comprender un poliácido. En una realización preferida, el reticulante comprende un compuesto de fórmula  $X[CO_2H]_n$  donde n es 2 o más, preferentemente 2 a 6, más preferentemente 2 a 4 y x es un grupo de enlace hidrófobo o hidrófilo, preferentemente alifático. Adecuadamente, el grupo x tiene un peso molecular de 14 a 250, más preferentemente 28 a 140, excluyendo cualquier sustituyente funcional en el grupo de enlace.

45 X puede contener heteroátomos, por ejemplo oxígeno y nitrógeno, como parte del esqueleto del grupo de enlace y puede contener grupos funcionales para la reacción con otras especies durante el uso del polímero de poli-ε-lisina reticulada.

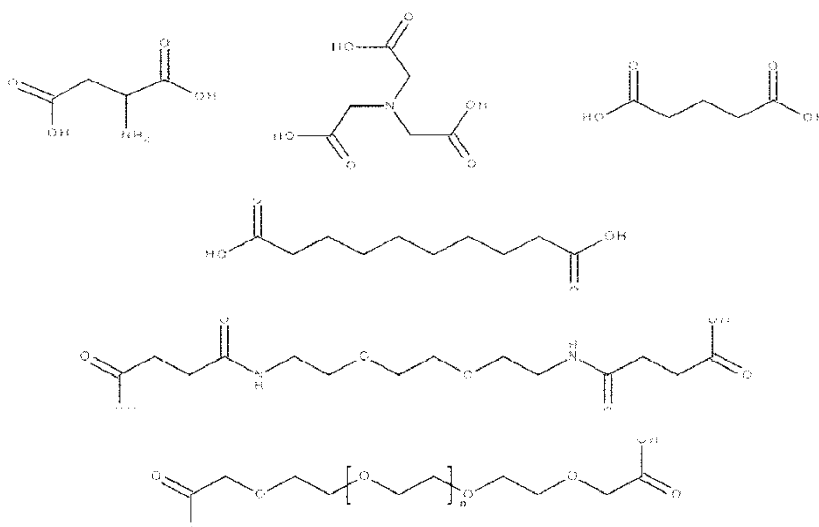
50 La cadena alifática que une los grupos ácidos puede ser hidrófila, preferentemente un bis-carboxi-polialquilenglicol, por ejemplo bis-carboxi-poli-etilenglicol, o la cadena alifática puede ser hidrófoba que proporciona un reticulante hidrófobo, por ejemplo, el ácido sebáico proporciona un soporte más lipófilo. El reticulante puede derivar de un material precursor, por ejemplo un anhídrido. Ejemplos de otros reticulantes adecuados incluyen ácido nitrilotriacético, ácido glutárico y  $HOOCCH_2CH_2CONHCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHCOCH_2CH_2COOH$ . Adecuadamente, el reticulante está seleccionado según sus características de solvatación de forma que tras la reacción con el polímero de poli-ε-lisina, el polímero y el reticulante estén contenidos dentro de una fase dispersa que comprende un disolvente para el reticulante y la poli-ε-lisina dentro de una fase continua inmiscible.

55 En una realización preferida, x comprende un grupo de hidrocarburo y comprende solo átomos de hidrógeno y de carbono, preferentemente 2 a 14, más preferentemente 3 a 12 y especialmente 5 a 8 átomos de carbono. El grupo

de hidrocarburo puede ser lineal o ramificado, preferentemente lineal. El grupo de hidrocarburo puede estar saturado o insaturado, preferentemente saturado. Ejemplos de reticulantes preferidos incluyen ácidos dicarboxílicos que tienen 8 a 12 átomos de carbono tales como ácido sebáico, ácido dodecanodioico y ácido azelaico.

5 La poli- $\epsilon$ -lisina puede ser derivatizada o modificada antes de la reticulación para permitir otra química de reticulación conocida para aquellos expertos en la materia. La poli- $\epsilon$ -lisina puede ser reticulada usando un aminoácido, por ejemplo ácido aspártico y ácido glutámico. La poli- $\epsilon$ -lisina reticulada en este caso solo generaría aminoácidos que existen de forma natural solo tras la degradación. La reacción con cistina, por ejemplo, produciría un polímero reticulado de un modo similar, pero en este caso la estructura contendría un puente disulfuro de cisteína, que otra vez tras la degradación generaría aminoácidos que existen de forma natural.

10 Ejemplos de reticulantes preferidos incluyen ácido glutámico, cistina, EDTA (ácido etilendiaminatetraacético), ácido adípico, ácido dodecanodioico, péptidos sintéticos, especialmente péptidos basados en la estructura de colágeno natural, péptidos sintéticos que contienen la secuencia de tripéptidos -Arg-Gly-Asp-, el péptido de unión a célula en fibrinógeno y otras proteínas naturales, polímeros que existen de forma natural que contienen múltiples grupos ácido carboxílico que incluyen gelatina, ácido alginico y éteres corona con múltiples ácidos carboxílicos especialmente adecuados para su uso en la quelación de metales y cromatografía. Ejemplos adicionalmente adecuados se muestran a continuación:



20 Mientras que la polidispersidad de la poli- $\epsilon$ -lisina no es crítica, en una realización preferida la polidispersidad de la poli- $\epsilon$ -lisina es adecuadamente de 10 a 50 y preferentemente entre 25-35 aminoácidos. Una polidispersidad más estrecha permite control más preciso con respecto a las propiedades definitivas del soporte de polímero reticulado. La poli- $\epsilon$ -lisina reticulada tendrá muchas aplicaciones, por ejemplo en varios modos de cromatografía, pero puede ser de particular ventaja para separaciones quirales debido a los centros L-quirales de repetición a lo largo de la cadena. Los grupos  $\alpha$ -amino laterales pueden ser fácilmente modificados para incorporar otros sitios de unión cromatográfica u otros restos quirales que conferirán una variedad de propiedades selectivas quirales sobre el soporte.

30 Adecuadamente, la cantidad relativa de poli- $\epsilon$ -lisina y reticulante está seleccionada de forma que la poli- $\epsilon$ -lisina sea el principal componente del polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada. Donde se requiere un polímero completamente reticulado, se seleccionarán las cantidades relativas de polímero de poli- $\epsilon$ -lisina y reticulante para proporcionar equivalentes molares estequiométricos con respecto a los grupos alfa-amino de la poli- $\epsilon$ -lisina y los grupos funcionales de reticulación. Donde se desea la funcionalidad de amina, se emplea una cantidad correspondiente más baja de reticulante para proporcionar la proporción deseada de grupos amina libres. Adecuadamente, el polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada tiene del 0 al 95 % de sus grupos alfa-amino como grupos amina libres. En una realización preferida en la que se ha hecho reaccionar una proporción relativamente grande de los grupos amina, por ejemplo 50 al 100 %, el polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada adecuadamente presentará características relativamente rígidas. Donde se ha hecho reaccionar una proporción menor de los grupos amina para proporcionar la reticulación, por ejemplo del 5 a hasta el 50 % de los grupos amina, el polímero es adecuadamente relativamente blando o de tipo gel. Los polímeros blandos o de tipo gel son especialmente útiles en la síntesis de polipéptidos, particularmente polipéptidos largos.

En una realización preferida, el polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada comprende de más de 0,001 a 20 mmol/g, 0,01 a 10 mmol/g de polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada, y preferentemente de 0,1 a 8 mmol/g por ejemplo de 1 a 8 mmol/g especialmente para la síntesis de polipéptidos.

45 En otra realización, el polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada comprende de 0,01 a 0,3 mmol/g, particularmente

ventajoso para la síntesis de secuencias de ácidos nucleicos.

5 En una realización preferida, el reticulante y el polímero de poli- $\epsilon$ -lisina se hacen reaccionar en un disolvente en el que se solvatan, por ejemplo agua, que se dispersa dentro de una fase continua inmiscible, por ejemplo diclorometano. La concentración de los reactantes en el disolvente afectará el grado al que el polímero reticulado se encoge con la eliminación del disolvente y proporciona poros más grandes dentro del polímero reticulado. Puede emplearse dimetilformamida como disolvente.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un soporte en partículas que comprende un polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada según la invención.

10 Las partículas poliméricas pueden prepararse normalmente por un procedimiento de polimerización en dispersión o emulsión en el que una solución de monómeros se dispersa en un disolvente inmiscible (fase continua) antes del inicio de la polimerización. Entonces, las partículas de polímero formadas normalmente se filtran, se lavan y se clasifican para aislar la distribución del tamaño de partícula requerida.

15 En una realización preferida, el polímero reticulado se forma sobre o alrededor de una partícula, preferentemente una partícula hueca. Esto proporciona un efecto de semilla y permite que se formen partículas de polímero de una estrecha distribución del tamaño de partícula.

En una realización preferida adicional, el polímero reticulado se forma sobre la superficie de una partícula. Preferentemente, la partícula es sílice, pero puede ser otro polímero conocido, por ejemplo poliestireno e hidroxilapatita. Una partícula de sílice recubierta es adecuada para aplicaciones en cromatografía líquida de alta presión, por ejemplo.

20 En una realización preferida, el polímero reticulado se forma sobre o alrededor de nanopartículas. Esto proporciona un efecto de semilla y permite que se formen partículas de polímero de tamaño de nanopartícula. Tales partículas tendrán aplicaciones sanitarias en la administración de fármacos tal como la transfección, por ejemplo.

25 El polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada puede hacerse reaccionar adicionalmente para proporcionar funcionalidad particular para una aplicación dada. Adecuadamente, el polímero se hace reaccionar con un compuesto que tiene al menos tres grupos funcionales, dos para reaccionar con el polímero para proporcionar reticulación entre dos cadenas de polímero y el otro para proporcionar funcionalidad libre para su uso en la aplicación deseada.

30 El soporte de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada puede ser adicionalmente funcionalizado, por ejemplo por conversión en un ácido carboxílico usando ácido succínico según se desee. A modo de ejemplo, puede tratarse un soporte de amina funcionalizada con N-hidroxisuccinimida y clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodimida en la preparación de un polímero activado para inmovilizar una proteína, por ejemplo proteína A.

35 El polímero reticulado, preferentemente un polímero reticulado en partículas, también puede comprender un material funcional soportado por el polímero. Ejemplos de materiales funcionales adecuados incluyen un catalizador, una especie iniciadora para la síntesis de péptidos, un activo farmacéutico, un activo agroquímico, una macromolécula, una enzima, una secuencia de ácidos nucleicos y una proteína. Adecuadamente, el polímero reticulado está soportado sobre una partícula hueca. El polímero reticulado puede formar una rejilla o red alrededor de toda o parte de la partícula. La partícula hueca comprende adecuadamente grupos funcionales, por ejemplo grupos ácido carboxílico que pueden reaccionar con grupos amina libres sobre el polímero y proporcionar un enlace covalente entre el polímero reticulado y la partícula.

40 El polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada o soporte en partículas que comprende el polímero de la invención es particularmente útil en soportar catalizadores metálicos valiosos, por ejemplo catalizadores de paladio. Un ejemplo particularmente ventajoso es acetato de paladio soportado sobre poli- $\epsilon$ -lisina reticulada funcionalizada para formar un ácido carboxílico.

45 La invención proporciona en un aspecto adicional un procedimiento de producción de un material de soporte en partículas que comprende las etapas de proporcionar una partícula, preferentemente una partícula hueca, poner en contacto la partícula con una solución de poli- $\epsilon$ -lisina y reticulante, efectuar la polimerización de la poli- $\epsilon$ -lisina y reticulante para formar un recubrimiento de polímero sobre la superficie de la partícula.

50 Adecuadamente, la polimerización se inicia por un procedimiento de inicio de la polimerización conocido para aquellos expertos en la materia. En una realización preferida, partículas huecas mezcladas con una solución de poli- $\epsilon$ -lisina y reticulante con funcionalidad carboxilo se añaden a un disolvente que es inmiscible con la poli- $\epsilon$ -lisina y el disolvente de reticulante y un carbodimida añadida para efectuar la polimerización. Donde la solución de poli- $\epsilon$ -lisina y de reticulante es acuosa, el disolvente es, por ejemplo, tolueno.

55 Si se prefiere, el recubrimiento de polímero puede unirse covalentemente a la partícula ya sea durante la polimerización o posterior a la polimerización. Alternativamente, una o más de la poli- $\epsilon$ -lisina y el reticulante pueden unirse covalentemente a la superficie de partícula antes del inicio de la polimerización. Preferentemente, la partícula está hueca.

El soporte en partículas de la invención puede usarse en cualquier procedimiento químico o físico, en el que se usa un soporte sólido.

El soporte puede emplearse en aplicaciones que implican polímeros electroconductores y que emiten luz. El soporte que contiene polímeros que emiten luz puede disponerse sobre paneles de visualización.

- 5 El soporte en partículas es particularmente útil para la síntesis en fase sólida de una especie orgánica, particularmente macromoléculas. En una realización preferida, el soporte en partículas puede emplearse en la síntesis de péptidos, oligonucleótidos u oligosacáridos.

La invención proporciona además el uso de un soporte en partículas según la invención como fase sólida en un procedimiento de cromatografía.

- 10 El soporte en partículas de la invención también es útil para la extracción en fase sólida para eliminar especies de un líquido que se pone en contacto con el soporte, bien en forma discontinua o como un flujo sobre el soporte, por ejemplo extracción iónica e intercambio iónico.

- 15 El soporte de la invención puede usarse para inmovilizar especies que incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, enzimas o flúores y puede estar situado en una matriz, ensayando cada soporte un componente diferente de una solución. Las partículas que tienen ligandos covalentemente unidos a su superficie, o mediante polímeros unidos a la superficie, puede emplearse como 'pocillos'. Entonces puede detectarse la unión específica de un ligando diana tal como antígeno o secuencia de ADN o ARN complementaria usando procedimientos establecidos.

- 20 El soporte en partículas de la invención también puede emplearse para inmovilizar un biocatalizador o células completas para su uso en biocatálisis. Los biocatalizadores se usan frecuentemente en columnas o en sistemas con placas filtrantes para la separación de la fase sólida de la mezcla en extracción.

El soporte en partículas de la invención es especialmente útil en inmovilizar especies que incluyen reactivos en fase sólida, metal y otros catalizadores, biocatalizadores, enzimas, proteínas, anticuerpos que incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, células completas y polímeros. La invención es particularmente ventajosa en soportar enzimas, por ejemplo la lipasa Cal B. La lipasa Cal B puede emplearse en un procedimiento de transesterificación.

- 25 La invención proporciona además un procedimiento de fabricación enzimática de biodiesel usando un soporte de la invención.

La presente invención también es especialmente útil en la inmovilización de ligandos de afinidad tales como Proteína A. La Proteína A se usa adecuadamente en la purificación de anticuerpos monoclonales.

- 30 En una aplicación adicional, el soporte en partículas de la invención también puede usarse en quimiocatálisis, por ejemplo inmovilizando catalizadores de metales de transición y ligandos.

- 35 En todavía una aplicación adicional, la presente invención puede usarse en cultivo celular. El cultivo en masa de líneas de células de animal es fundamental para la fabricación de vacunas virales y muchos productos de biotecnología. Los productos biológicos producidos por la tecnología de ADN recombinante en cultivos de células de animal incluyen enzimas, hormonas sintéticas, inmunobiológicos (anticuerpos monoclonales, interleucinas, linfocinas) y agentes antineoplásicos. Pueden producirse muchas proteínas más simples usando ADNr en cultivos bacterianos; las proteínas más complejas que están glucosiladas (modificadas con hidrato de carbono) actualmente deben prepararse en células de animal. Un ejemplo importante de una proteína compleja tal es la hormona eritropoyetina. El coste de cultivo de los cultivos celulares de mamífero es alto, por lo que las empresas están constantemente buscando mejorar las técnicas.

- 40 Las células pueden cultivarse en suspensión o como cultivos adherentes. Sin embargo, las células adherentes requieren una superficie, que puede recubrirse con componentes de la matriz extracelular para aumentar las propiedades de adhesión y proporcionar otras señales necesarias para el crecimiento y la diferenciación. Generalmente, las células derivadas de tejidos sólidos son adherentes. El cultivo organotípico implica cultivar células en un entorno tridimensional a diferencia de placas de cultivo bidimensionales. Este sistema de cultivo 3D es bioquímicamente y fisiológicamente más similar al tejido *in vivo*, pero es técnicamente exigente de mantener debido a muchos factores (por ejemplo, difusión). La gelatina es colágeno hidrolizado donde enlaces amida inter e intracatenarios han sido hidrolizados químicamente para formar cadenas de péptido soluble. El colágeno es un entorno ideal y natural para que las células se adhieran y diferencien. La poli-ε-lisina también puede ser copolimerizada con otras proteínas, por ejemplo gelatina para formar un entorno de tipo colágeno.

- 50 En un aspecto adicional, la invención proporcional el uso de un soporte o recubrimiento en partículas, macroporoso o microporoso según la invención para cultivar células preferentemente sobre la superficie del soporte o recubrimiento. Adecuadamente, pueden cultivarse células madre sobre el soporte en partículas de la invención para reducir la diferenciación incontrolada y para controlar la diferenciación deseada.

En una realización especialmente preferida, la invención es beneficiosa para su uso en el cuidado de heridas. Las

heridas crónicas son agravadas por las metalino-proteasas que pueden ser inactivadas por partículas de polímero que quelan iones metálicos requeridos por la enzima. La poli-ε-lisina reticulada, preferentemente terminada con especies quelantes de metal, es adecuada para su uso en la presente solicitud. La invención proporciona el uso de poli-ε-lisina reticulada o un soporte en partículas que comprende poli-ε-lisina reticulada como producto de tratamiento de heridas o componente del mismo. El producto de tratamiento de heridas puede comprender un artículo flexible, pero preferentemente comprende un artículo auto-portante. El producto de tratamiento de heridas comprende adecuadamente un polímero o soporte en partículas según la invención y un componente o una composición para tratar una herida y/o un agente terapéutico.

La invención es particularmente útil en pruebas de diagnóstico médico tales como inmunoensayo. Por consiguiente, la invención proporciona además diagnósticos médicos para detectar la presencia de un compuesto que comprende un polímero según la invención y un material funcional tal como una enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano picante, soportada por el polímero en el soporte para reaccionar selectivamente con o unirse al compuesto que va a detectarse.

Muchos diagnósticos médicos se basan en soportes sólidos para inmovilizar diversos ligandos de diagnóstico. El soporte de polímero de la presente invención puede usarse en un procedimiento de diagnóstico médico donde la separación física de la fase sólida a través de una fase líquida.

En una aplicación adicional, el soporte de polímero puede usarse como un absorbente. El soporte de polímero puede usarse para absorber vertidos domésticos, por ejemplo té, café y vino, o puede usarse en aplicaciones a mayor escala, por ejemplo, para absorber aceite de vertidos. El soporte de absorbente puede usarse para absorber el vertido y luego dejar que se biodegrade o, en el caso de vertido de aceite en un cuerpo de agua, atrapar eficazmente el aceite y retener el aceite en una masa flotante para la recogida y deposición. Ventajosamente, la poli-ε-lisina reticulada es biodegradable, que facilita la deposición con impacto ambiental reducido.

El soporte de polímero de la invención puede usarse como un vehículo biodegradable para llevar un compuesto que va a ser liberado durante un periodo de tiempo, por ejemplo un compuesto o composición farmacéutico o agroquímico. Este uso proporciona un medio para confeccionar una pauta de dosificación del compuesto según la carga del compuesto en el soporte. En el caso de un producto farmacéutico, esto puede ser ventajoso para ayudar en la correcta dosificación de un activo, por ejemplo con liberación lenta continua en vez de requerir que un paciente tome grandes dosis periódicas, por ejemplo en quimioterapia.

La invención se ilustra por referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra una representación en diagrama de poli-ε-lisina.

La Figura 2 muestra una representación en diagrama de poli-ε-lisina reticulada con un ácido carboxílico bifuncional.

La Figura 3 muestra una representación en diagrama de poli-ε-lisina reticulada con ácido aspártico como ejemplo.

La Figura 4 muestra una representación en diagrama de poli-ε-lisina reticulada con cistina.

La Figura 5 muestra una representación en diagrama de poli-ε-lisina reticulada con ácido nitriloacético.

Las Figuras 6a y 6b muestran fotografías de las microesferas queladas de Pd<sup>2+</sup> y Pd<sup>0</sup>.

La Figura 7 muestra una fotografía de microscopio de las partículas.

La Figura 8 muestra un cromatograma de la prueba de HPLC.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Ejemplo 1 - Preparación de partículas que tienen superficie activa de amina**

#### **1. Hidrólisis de la superficie de partículas (para producir -COOH)**

Se dispusieron partículas huecas de polímero (500 cm<sup>3</sup>, Akzo Nobel - Expancel, calidad 920 DEX80) en una botella de polipropileno de 1 dm<sup>3</sup> y se cubrieron con solución de hidróxido sódico (100 g en 500 cm<sup>3</sup> 4:1 v/v de agua / metanol). La mezcla se dejó en una incubadora de rotor a temperatura ambiente durante la noche.

Las partículas se lavaron en un embudo de decantación con agua (5 x 500 cm<sup>3</sup>), ácido clorhídrico acuoso (1 mol/dm<sup>3</sup>, 5 x 500 cm<sup>3</sup>), luego agua (5 x 500 cm<sup>3</sup>). Las partículas se lavaron entonces con metanol (5 x 500 cm<sup>3</sup>) y se secaron al aire. Se crearon partículas que tenían grupos ácido carboxílico libres sobre la superficie de la partícula.

#### **2. Recubrimiento de partículas con poli-ε-lisina reticulada**

Se dispusieron las partículas de DEX80 preparadas anteriormente (50 cm<sup>3</sup>, funcionalidad -COOH) en un matraz



redondo y se suspendieron en una solución (100 cm<sup>3</sup>) de poli-ε-lisina (10 g, 51,5 mmoles de -NH<sub>2</sub>), ácido nitriloacético (2,64 g, 41,5 mmoles de COOH) y N-metilmorfolina (4,2 g, 41,5 mmoles). Esta suspensión se dispersó con agitación rápida en diclorometano (DCM) (250 cm<sup>3</sup>) que contenía SPAN 80 (2 % en p/v). Se añadió una solución de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) (23,9 g, 125 mmoles) en DCM (250 cm<sup>3</sup>) y se dejó que la polimerización avanzara durante 2 h.

Se eliminó la capa de DCM por decantación y las partículas se lavaron sobre un tamiz de acero inoxidable de 75 μm con cantidades abundantes de agua de grifo. Las partículas se transfirieron a un vidrio sinterizado y se lavaron con agua (5 x 500 cm<sup>3</sup>), luego se lavaron con metanol (5 x 500 cm<sup>3</sup>) y se secaron al aire (rendimiento 5,8 g).

La carga de amina de la poli-ε-lisina reticulada se determinó acoplado Fmoc-Gly-OH al polímero, seguido de ensayo de Fmoc. La carga fue 0,9 mmol/g (máximo teórico 1 mmol/g).

### 3. Recubrimiento de partículas con poli-ε-lisina reticulada

Se dispusieron las partículas de DEX80 preparadas anteriormente (50 cm<sup>3</sup>, funcionalidad -COOH) en un matraz redondo y se suspendieron en una solución (100 cm<sup>3</sup>) de poli-ε-lisina (10 g, 51,5 mmoles de -NH<sub>2</sub>), HOOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (4,99 g, 26,7 mmoles de COOH) y N-metilmorfolina (2,7 g, 26,7 mmoles). Esta suspensión se dispersó con agitación rápida en tolueno (250 cm<sup>3</sup>) que contenía SPAN 80 (5 % en p/v). Se añadió una solución de EDCI (10 g, 52 mmoles) en DCM (250 cm<sup>3</sup>) y se dejó que la polimerización avanzara durante 1,5 h.

La fase orgánica se eliminó por decantación y las partículas se lavaron en un tamiz de acero inoxidable de 75 μm con acetona (~1 dm<sup>3</sup>) y cantidades abundantes de agua de grifo. Las partículas se transfirieron a un vidrio sinterizado y se lavaron con agua (5 x 500 cm<sup>3</sup>), luego se lavaron con metanol (5 x 500 cm<sup>3</sup>) y se secaron al aire (rendimiento 11,5 g, ~90 % del teórico).

La carga de amina de la poli-ε-lisina reticulada se determinó acoplado Fmoc-Gly-OH al polímero, seguido de ensayo de Fmoc. La carga fue 0,84 mmol/g (teoría 1,7 mmol/g).

## Ejemplo 2 - Síntesis del péptido ACP(64-75)

### 1. Acoplamiento del agente de enlace de enlace

Se acopló ácido 4-hidroxi metilfenoxiacético (HMPA) (0,5 g, 3 mmoles) a la poli-ε-lisina reticulada preparada en el Ejemplo 1.2 anterior (1,1 g, 0,9 mmoles) usando DIC (0,5 g, 4 mmoles) y HOBt (0,81 g, 6 mmoles) en N,N-dimetilformamida (DMF) (10 cm<sup>3</sup>).

La reacción de acoplamiento estuvo completa por el ensayo de ninhidrina en el plazo de 90 min. El soporte de polímero se lavó sobre un vidrio sinterizado con alícuotas de DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

### 2. Acoplamiento de Fmoc-Gly-OH

Se acopló Fmoc-Gly-OH (0,89 g, 3 mmoles) al polímero de HMPA preparado anteriormente usando DIC (0,5 g, 4 mmoles) y DMAP (12 mg, 0,1 mmoles) en N,N-dimetilformamida (DMF) (10 cm<sup>3</sup>) durante 60 min.

Se repitió el acoplamiento y el polímero se lavó sobre un vidrio sinterizado con alícuotas de DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % v/v) y la reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

### 3. Acoplamiento de Fmoc-Asn(Trt)-OH

Se disolvieron Fmoc-Asn(Trt)-OH (1,492 g, 2,5 mmoles) y tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-N, N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió 4-metilmorfolina (NMM) (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de H-Gly-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

### 4. Acoplamiento de Fmoc-Ile-OH

Se disolvieron Fmoc-Ile-OH (0,884 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

- 5 Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 5. Acoplamiento de Fmoc-Tyr(tBu)-OH

Se disolvieron Fmoc-Tyr(tBu)-OH (1,149 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

- 10 La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

- 15 6. Acoplamiento de Fmoc-Asp(OtBu)-OH

Se disolvieron Fmoc-Asp(OtBu)-OH (1,029 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

- 20 La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 7. Acoplamiento de Fmoc-Ile-OH

- 25 Se disolvieron Fmoc-Ile-OH (0,884 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

- 30 Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 8. Acoplamiento de Fmoc-Ala-OH

- 35 Se disolvieron Fmoc-Ala-OH (0,823 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

- 40 Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 9. Acoplamiento de Fmoc-Ala-OH

- 45 Se disolvieron Fmoc-Ala-OH (0,823 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el

soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 10. Acoplamiento de Fmoc-Gln(Trt)-OH

Se disolvieron Fmoc-Gln(Trt)-OH (1,607 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió 4-metilmorfolina (NMM) (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>).

#### 11. Acoplamiento de Fmoc-Val-OH

Se disolvieron Fmoc-Val-OH (0,848 g, 2,5 mmoles) y TBTU (0,763 g, 2,38 mmoles) en DMF (5 cm<sup>3</sup>). Se añadió NMM (0,412 cm<sup>3</sup>, 3,7 mmoles) y la mezcla se pre-activó durante 2-3 minutos antes de añadirla al polímero de péptido-HMPA anterior.

La reacción de acoplamiento se acopló hasta la finalización como se ha determinado por el ensayo de ninhidrina. Se lavó el soporte de polímero con alícuotas (10 x 10 cm<sup>3</sup>) de DMF.

Se añadió piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) a la mezcla. La reacción se dejó reposar durante 3 minutos. Se llevó a cabo un segundo tratamiento con piperidina/DMF (20 cm<sup>3</sup>, 20 % en v/v) durante 7 minutos y se lavó el soporte de polímero con DMF (10 x 10 cm<sup>3</sup>) y dietil éter (5 x 10 cm<sup>3</sup>) antes de secar al aire (rendimiento 1,93 g, 86 % del teórico).

#### 12. Escisión de péptido

Se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (20 cm<sup>3</sup>) que contenía agua (2,5 % en v/v) y triisopropilsilano (TIPS) (2,5 % en v/v) al polímero de péptido-HMPA preparado anteriormente (0,93 g). La mezcla se dejó escindir durante 2 horas.

El soporte de polímero se lavó con TFA (5 x 15 cm<sup>3</sup>) en un embudo de decantación. Las soluciones de escisión de TFA combinadas y los lavados se redujeron a un aceite en un evaporador rotatorio. El aceite se trituró con dietil éter para formar un sólido blanco. El éter se eliminó por decantación y el péptido se secó al aire durante la noche (rendimiento 0,4 g).

Se mostró que el péptido contenía un componente importante por HPLC de fase inversa y se co-eluyó con una muestra de ACP(64-75) preparada en un soporte de polímero tradicional. El péptido preparado sobre esta poli-ε-lisina reticulada tuvo una calidad ligeramente más alta en comparación con ACP(64-75) preparada en el soporte de polímero tradicional.

#### Ejemplo 3 - Síntesis del péptido ACP(64-75)

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2 usando el polímero reticulado. La preparación de ACP(64-75) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 sobre la poli-ε-lisina reticulada preparada en el Ejemplo 1.3 produjo un péptido de calidad similar incluso cuando todos los acoplamientos se limitaron a 1 hora.

#### Ejemplo 4 - Inmovilización de proteína A sobre poli-ε-lisina reticulada Acoplamiento de rProteína A a poli-ε-lisina reticulada

Para convertir las aminas sobre el soporte de polímero en grupos ácido carboxílico, se trató una poli-ε-lisina reticulada con 0,1 mmol/g de carga de amina (0,2 g) con anhídrido glutárico (2 g) en agua (5 cm<sup>3</sup>) durante la noche (el polímero resultante fue negativo para ninhidrina). El soporte de polímero se lavó sobre un vidrio sinterizado con agua (5 x 10 cm<sup>3</sup>). Se usó tampón ácido morfolinoetanosulfónico (MES) (25 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 5,0, 3 x 20 cm<sup>3</sup>) para lavar el soporte de polímero antes del acoplamiento de proteína.

Se disolvió N-hidroxisuccinimida (1 g) en tampón MES frío (25 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 5,0, 2,5 cm<sup>3</sup>) y esta solución se añadió al soporte de polímero. Se disolvió EDCI (1 g) en tampón MES (25 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 5,0, 2,5 cm<sup>3</sup>) y esta solución se añadió a la mezcla. El soporte de polímero se mezcló durante 30 minutos en una incubadora de rotor de botellas para la activación. El soporte de polímero se lavó con tampón MES (25 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 5,0, 5 x 10 cm<sup>3</sup>) e inmediatamente se añadió una solución de rProteína A (5 cm<sup>3</sup>, 4 mg/cm<sup>3</sup> en 25 mmol/dm<sup>3</sup> de MES, pH 5,0) a la mezcla y se dejó que el acoplamiento avanzara durante un fin de semana a temperatura ambiente con mezcla en una incubadora de rotor de botellas. El soporte de polímero se drenó sobre un vidrio sinterizado y se lavó con Trizma-HCl (30 cm<sup>3</sup> a pH 7,4) para bloquear cualquier éster de N-hidroxisuccinimida restante sobre el polímero. El soporte de polímero se lavó con agua (10 x 10 cm<sup>3</sup>) y se guardó como una suspensión en agua.

Se probó el medio basado en Proteína A para determinar si retuvo IgG humana usando una columna de cromatografía de relleno en condiciones normales conocidas para aquellos expertos en la materia usando IgG humana. Se mostró que la columna retenía la IgG humana como era de esperar.

#### **Ejemplo 5 - Preparación de partículas esféricas reticuladas con ácido sebácico**

5 Se disolvieron poli- $\epsilon$ -lisina (42,88 g, 250 mmoles de contenido de amina), ácido sebácico (12,64 g, 125 mmoles de contenido de carboxilo) y NaOH (5,5 g, 137,5 mmoles) en agua (208 cm<sup>3</sup>), luego se dispersaron con agitación rápida en diclorometano (DCM) (1,25 dm<sup>3</sup>) que contenía 1,5 % en m/v de SPAN 80.

10 Se disolvió EDCI (36 g, 187,5 mmoles) en DCM (250 cm<sup>3</sup>) y se añadió a la dispersión anterior. Se dejó que la polimerización avanzara durante 90 minutos. Se eliminó el DCM por filtración y las microesferas de polímero se lavaron con DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>) para eliminar el Span 80 residual. El polímero se lavó entonces minuciosamente con agua, se neutralizó con solución de NaOH (1 mol/dm<sup>3</sup>), luego se lavó otra vez con agua seguido de MeOH (3 x 500 cm<sup>3</sup>), DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>), luego Et<sub>2</sub>O (2 x 250 cm<sup>3</sup>). Las microesferas de polímero se secaron al aire durante la noche (rendimiento 34 g).

#### **Ejemplo 6 - Inmovilización de la lipasa Cal B**

15 Se midió una muestra de las microesferas de polímero (2 g) preparadas en el Ejemplo 5 en una botella de polipropileno. Se disolvió anhídrido glutárico (6 g) en una solución de metanol (20 cm<sup>3</sup>) y N-metilmorfolina (6 cm<sup>3</sup>), se añadió al polímero y se dispuso en la máquina incubadora de rotor durante 24 h.

20 Después de 24 h, el polímero se lavó minuciosamente con agua. Se añadió una solución saturada de N-hidroxisuccinimida (3,2 g) y EDCI (5,3 g) en agua (20 cm<sup>3</sup>) a las esferas en una botella de polipropileno y se puso de nuevo en la incubadora de rotor durante 1 h con el fin de activar el carboxilo. Después de 1 h se sacó una muestra (50 mg) para hacer de control negativo en el ensayo de BCA (ácido bicinconínico) que siguió. El resto del polímero se lavó minuciosamente con agua, luego se añadió a una botella que contenía 10 % de solución de enzima Cal B (40 cm<sup>3</sup>) antes de ponerse en la máquina de incubadora de rotor durante 24 h para permitir que la enzima se acoplara al ácido carboxílico activado. Después de 24 h, el polímero se lavó minuciosamente con agua para eliminar cualquier enzima sin acoplar antes ser lavada en una solución al 5 % en v/v de etanolamina para terminar cualquier grupo carboxilo libre restante, previniendo así que tuviera lugar cualquier reacción adicional.

25 Se llevó a cabo un ensayo de BCA usando un kit de ensayo de BCA de Pierce® (N.º 23225) para determinar la carga de Cal B sobre el polímero. Se determinó que la carga era 218 mg de Cal B por g de polímero.

30 Se mostró que la actividad de la enzima inmovilizada era equivalente a la enzima libre en solución confirmando que la enzima inmovilizada podría usarse en reacciones de transesterificación que incluyen, por ejemplo, la producción enzimática de biodiesel.

#### **Ejemplo 7 - Preparación de partículas reticuladas con ácido nitriloacético (NTA)**

35 Se disolvieron poli- $\epsilon$ -lisina (40 g, 206 mmoles de contenido de amina), NTA (10,96 g, 172 mmoles de contenido de carboxilo) y N-metilmorfolina (17,37 g, 172 mmoles) en agua (140 cm<sup>3</sup>), luego se dispersaron con agitación rápida en diclorometano (DCM) (750 cm<sup>3</sup>) que contenía 2 % en m/v de SPAN 80.

40 Se disolvió EDCI (49,5 g, 258 mmoles) en DCM (400 cm<sup>3</sup>) y se añadió a la dispersión anterior. Se dejó que la polimerización avanzara durante 90 minutos. Se eliminó el DCM por filtración y las microesferas de polímero se lavaron con DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>) para eliminar el Span 80 residual. El polímero se lavó entonces minuciosamente con agua, se neutralizó con solución de NaOH (1 mol/dm<sup>3</sup>), luego se lavó otra vez con agua, seguido de MeOH (3 x 500 cm<sup>3</sup>), DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>), luego Et<sub>2</sub>O (2 x 250 cm<sup>3</sup>). Las microesferas de polímero se secaron al aire durante la noche (rendimiento 47 g).

#### **Ejemplo 8 - Preparación de partículas reticuladas con NTA terminado con NTA para la quelación de níquel y posterior cromatografía de afinidad por metal inmovilizada (IMAC)**

45 Se hinchó una porción de las microesferas de polímero (10 g, 10 mmoles) preparadas en el Ejemplo 7 anteriormente en agua en una botella de polipropileno. Se preparó una solución de EDCI (19,17 g, 100 mmoles) y NTA (19,1 g, 100 mmoles) en agua (~100 cm<sup>3</sup>) y se añadió a las microesferas hinchadas. La mezcla se dejó en un molino de rodillos durante la noche para completar la terminación con NTA.

50 El polímero se lavó minuciosamente con agua, seguido de MeOH (3 x 100 cm<sup>3</sup>), DCM (3 x 100 cm<sup>3</sup>), luego Et<sub>2</sub>O (2 x 50 cm<sup>3</sup>) antes de secar al aire. Este material no fue adecuado para la quelación con níquel para el posterior uso en IMAC.

Se confirmó que este polímero de IMAC era adecuado para la purificación de proteínas marcadas con His por técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

**Ejemplo 9 - Preparación de partículas reticuladas con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA)**

Se disolvieron poli- $\epsilon$ -lisina (42,88 g, 250 mmoles de contenido de amina), EDTA (9,13 g, 125 mmoles de contenido de carboxilo) en agua (200 cm<sup>3</sup>), luego se dispersaron con agitación rápida en diclorometano (DCM) (750 cm<sup>3</sup>) que contenía 2 % en m/v de SPAN 80.

- 5 Se disolvió EDCI (36 g, 187,5 mmoles) en DCM (250 cm<sup>3</sup>) y se añadió a la dispersión anterior. Se dejó que la polimerización avanzara durante 90 minutos. Se eliminó el DCM por filtración y las microesferas de polímero se lavaron con DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>) para eliminar el Span 80 residual. Entonces, el polímero se lavó minuciosamente con agua, se neutralizó con solución de NaOH (1 mol/dm<sup>3</sup>), luego se lavó otra vez con agua, seguido de MeOH (3 x 500 cm<sup>3</sup>), DCM (3 x 500 cm<sup>3</sup>) luego Et<sub>2</sub>O (2 x 250 cm<sup>3</sup>). Las microesferas de polímero se secaron al aire durante la noche (rendimiento 27 g).

**Ejemplo 10 - Preparación de partículas reticuladas con EDTA y terminadas con EDTA para la posterior quelación de metales**

- 15 Se hinchó una porción de las microesferas de polímero (10 g, 10 mmoles) preparadas en el Ejemplo 9 anterior en agua en una botella de polipropileno. Se preparó una solución de EDCI (19,17 g, 100 mmoles) y EDTA (29,2 g, 100 mmoles) en agua (~100 cm<sup>3</sup>) y se añadió a las microesferas hinchadas. La mezcla se dejó en un molino de rodillos durante la noche para completar la terminación con EDTA.

El polímero se lavó minuciosamente con agua, seguido de MeOH (3 x 100 cm<sup>3</sup>), DCM (3 x 100 cm<sup>3</sup>), luego Et<sub>2</sub>O (2 x 50 cm<sup>3</sup>) antes de secar al aire. Este material no fue adecuado para la quelación de metales.

- 20 Para confirmar las propiedades de quelación de metales, se añadió 1 g de este polímero a una solución de acetato de paladio (100 mg) en ácido acético (20 cm<sup>3</sup>). Después de 2 h a temperatura ambiente, se decoloró el color naranja de la solución de acetato de paladio y el color se transfirió a las microesferas de polímero. Las esferas se lavaron con metanol y se dejaron en metanol para convertir el Pd<sup>2+</sup> quelado en Pd<sup>0</sup>.

Las fotografías de las microesferas queladas de Pd<sup>2+</sup> y Pd<sup>0</sup> se muestran en las Figuras 6a y 6b.

**Ejemplo 11 - Preparación de partículas super paramagnéticas flotantes**

- 25 Se dispusieron partículas huecas de DEX80 (50 cm<sup>3</sup>) en un matraz redondo y se suspendieron en una solución (100 cm<sup>3</sup>) de poli- $\epsilon$ -lisina (10 g, 51,5 mmoles de -NH<sub>2</sub>), ácido sebácico (2,6 g, 25,75 mmoles de COOH) y N-metil morfolina (2,6 g, 25,75 mmoles). Se añadieron nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (1 g, 50 nm de tamaño de partícula) y la suspensión se dispersó con agitación rápida en diclorometano (DCM) (250 cm<sup>3</sup>) que contenía SPAN 80 (2 % en p/v). Se añadió una solución de EDCI (23,9 g, 125 mmoles) en DCM (250 cm<sup>3</sup>) y se dejó que la polimerización avanzara durante 2 h.

Se eliminó la capa de DCM por filtración y las partículas se lavaron sobre un tamiz de acero inoxidable de 500  $\mu$ m con cantidades abundantes de agua de grifo. Las partículas se transfirieron a un vidrio sinterizado y se lavaron con agua (5 x 500 cm<sup>3</sup>) y se guardaron como una suspensión en agua.

Se muestra una fotografía de microscopio de las partículas en la Figura 7.

**Ejemplo 12 - Preparación de nanopartículas superparamagnéticas**

Se transfirieron nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (3 g, 50 nm de tamaño de partícula) a un tubo de vidrio de paredes gruesas. Se añadió una solución saturada de ácido cítrico en agua y la mezcla se sonicó durante 30 minutos a 40 °C. Las nanopartículas se lavaron con agua (10 x 30 cm<sup>3</sup>) usando las propiedades magnéticas para retener las partículas durante la decantación.

- 40 Se disolvió poli- $\epsilon$ -lisina (2 g) en agua (5 cm<sup>3</sup>) y se añadió a las nanopartículas queladas con ácido cítrico. La mezcla se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió EDCI (2 g) disuelto en agua (2 cm<sup>3</sup>). La mezcla se sonicó durante 30 minutos adicionales a 40 °C, luego se dejó a temperatura ambiente durante la noche.

- 45 Las nanopartículas se lavaron con agua (10 x 30 cm<sup>3</sup>), MeOH (5 x 30 cm<sup>3</sup>) y Et<sub>2</sub>O (10 cm<sup>3</sup>) usando las propiedades magnéticas para retener las partículas durante la decantación. Las nanopartículas se secaron al aire (rendimiento 3,9 g).

Las nanopartículas recubiertas de poli- $\epsilon$ -lisina reticuladas con ácido cítrico resultante fueron positivas para ninhidrina, confirmando la presencia del recubrimiento de amina. El contenido de amina de las nanopartículas se determinó acoplando Fmoc-Leu-OH al polímero, seguido de determinación del contenido de Fmoc. Se determinó que la carga de amina era 66  $\mu$ mol/g.

**Ejemplo 13 - Preparación de partículas de sílice recubiertas con poli- $\epsilon$ -lisina y terminadas con ácido palmítico.**

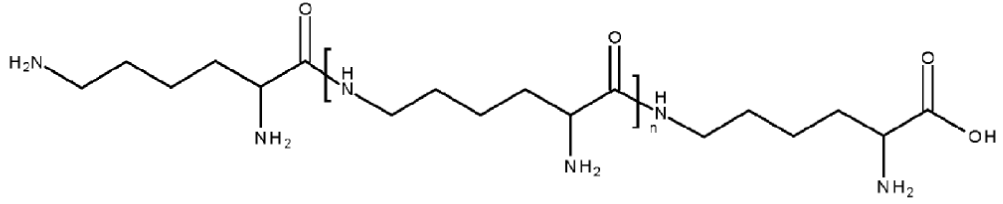
- 5 Se suspendieron partículas de sílice (10 g de Kromasil, 10  $\mu\text{m}$ , poro de 1000 Å) en una solución de aminopropiltrimetoxisilano en MeOH/agua (50  $\text{cm}^3$ , 1 % en p/v, 10 % de agua), se mezclaron durante 5-10 minutos, luego se lavaron con MeOH y DMF antes de transferir a una botella de polipropileno. Se añadió DMF (50  $\text{cm}^3$ ), seguido de anhídrido glutárico (5 g) y N-metilmorfolina (10  $\text{cm}^3$ ). La mezcla se dejó en una mezcladora de rodillos durante la noche.
- Las partículas se lavaron minuciosamente con DMF, luego se resuspendieron en DMF (50  $\text{cm}^3$ ). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (1,72 g) y diisopropilcarbodiimida (DIC) (3,37  $\text{cm}^3$ ) y la mezcla se mezcló con rodillos durante 5 h. Las partículas se lavaron otra vez minuciosamente con DMF.
- 10 Se disolvió poli- $\epsilon$ -lisina (1,57 g) en agua (25  $\text{cm}^3$ ) y se añadió a las partículas de sílice mojadas con DMF. Se añadió N-metilmorfolina (0,44  $\text{cm}^3$ ) y la mezcla se mezcló con rodillos durante la noche.
- 15 Las partículas se lavaron minuciosamente con agua, MeOH y DMF. Se disolvieron ácido palmítico (1,2 g), N-hidroxisuccinimida (0,52 g) y DIC (1,1  $\text{cm}^3$ ) en DMF (50  $\text{cm}^3$ ) y se añadió a las partículas de sílice mojadas con DMF. Se añadió N-metilmorfolina (0,74  $\text{cm}^3$ ) y la mezcla se mezcló con rodillos durante la noche. Se repitió el acoplamiento de ácido palmítico y las partículas se lavaron minuciosamente con DMF, agua y MeOH antes de secar al aire.
- Se cargaron estas partículas de cromatografía de fase inversa en una columna de HPLC y se probaron para confirmar las propiedades cromatográficas. El cromatograma de la prueba de HPLC se muestra en la Figura 8.

## REIVINDICACIONES

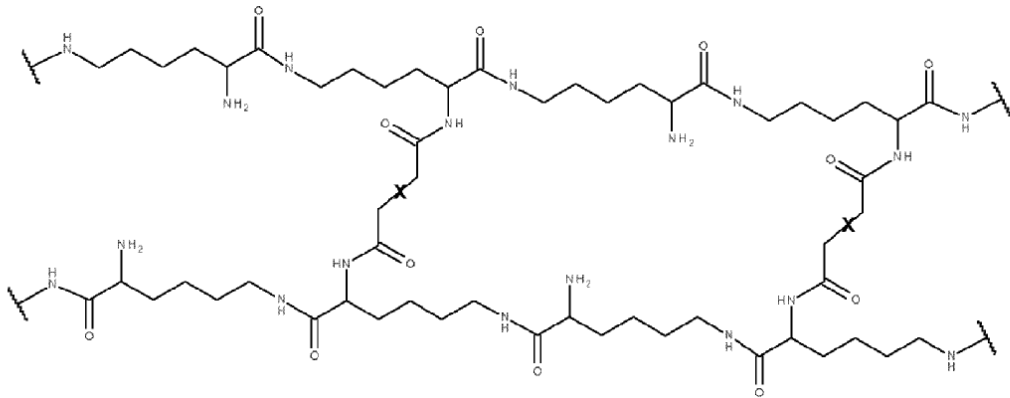
1. Un polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada que comprende poli- $\epsilon$ -lisina y un reticulante unido por enlaces amida en el que el reticulante comprende dos o más grupos ácido carboxílico y una cadena alifática que une los dos o más grupos adaptada para reaccionar con una amina del carbono alfa de la poli- $\epsilon$ -lisina.
- 5 2. Un polímero según la reivindicación 1, que es insoluble en agua y otros disolventes.
3. Un polímero según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en forma de partículas.
4. Un soporte en partículas que comprende un polímero de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 10 5. Un soporte en partículas según la reivindicación 4, en el que el soporte de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada es una partícula esférica, elipsoidal o irregular.
6. Un soporte en partículas según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el soporte de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada se usa para recubrir una partícula directa o indirectamente.
7. Un soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el soporte de poli- $\epsilon$ -lisina reticulada se usa para recubrir una partícula y unirse covalentemente a la misma.
- 15 8. Un soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la poli- $\epsilon$ -lisina reticulada se usa para recubrir una partícula de polímero orgánico.
9. Un soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la poli- $\epsilon$ -lisina reticulada se usa para recubrir una partícula de polímero inorgánico.
- 20 10. Un soporte en partículas basado en poli- $\epsilon$ -lisina reticulada según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que la poli- $\epsilon$ -lisina reticulada está funcionalizada para proporcionar un material que comprende un catalizador, una especie iniciadora para la síntesis de péptidos, una especie iniciadora para la síntesis de oligonucleótidos, una especie iniciadora para la síntesis orgánica en fase sólida, un activo farmacéutico, un activo agroquímico, una superficie para la separación cromatográfica, una especie para promover el cultivo o la diferenciación celular, una proteína u otra macromolécula biológica.
- 25 11. Un producto para el tratamiento de heridas que comprende un polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.
12. Un producto para el tratamiento de heridas según la reivindicación 11, que comprende además un componente o una composición para tratar una herida y/o un agente terapéutico.
- 30 13. Un diagnóstico médico que comprende un soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 y que comprende un material funcional unido al soporte o retenido por el mismo.
14. Un diagnóstico médico según la reivindicación 13, en el que el material funcional comprende una enzima soportada por el polímero.
- 35 15. Uso de un soporte en partículas según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 en un procedimiento seleccionado de síntesis en fase sólida de péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos; extracción en fase sólida; química orgánica en fase sólida; inmovilización de una especie seleccionada de reactivos en fase sólida, catalizadores de metal y otros, biocatalizadores, enzimas, proteínas, anticuerpos incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales, células completas y polímeros; cultivo de células; preparación de una fase estacionaria para separación cromatográfica; o para su uso como un absorbente o como un vehículo biodegradable para un producto de liberación controlada.

40

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

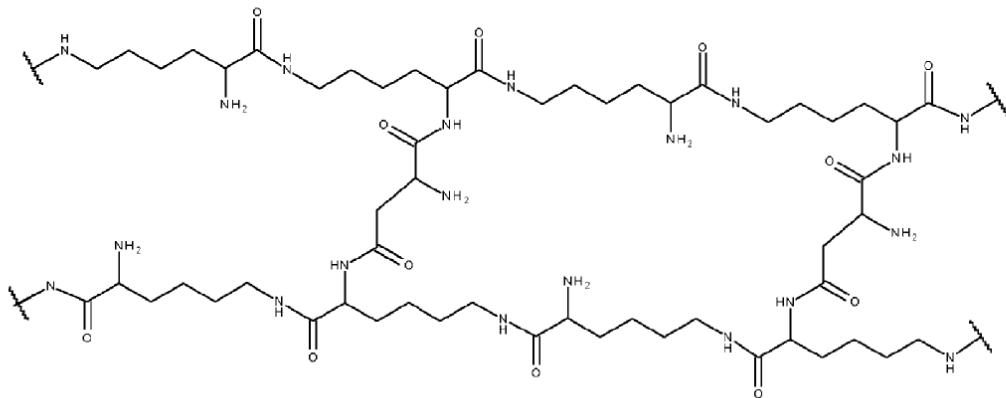




Figura 4

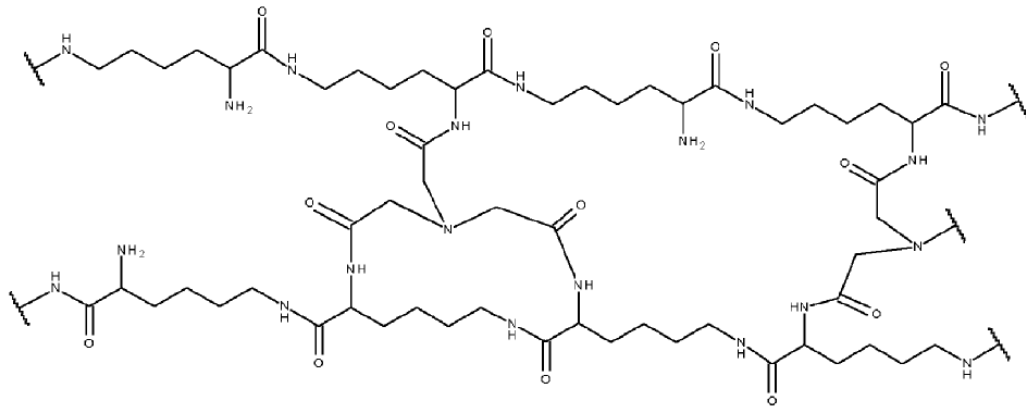


Figura 5

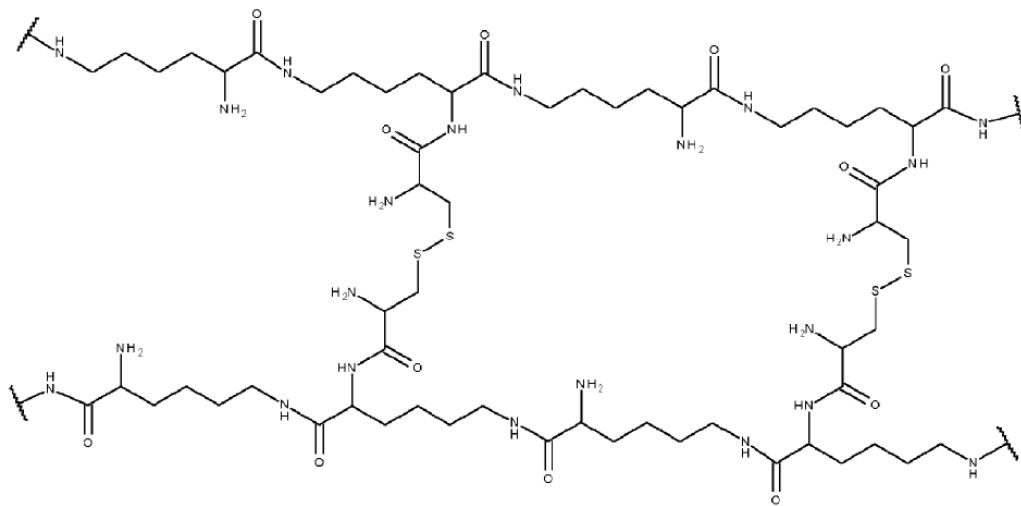


Figura 6a

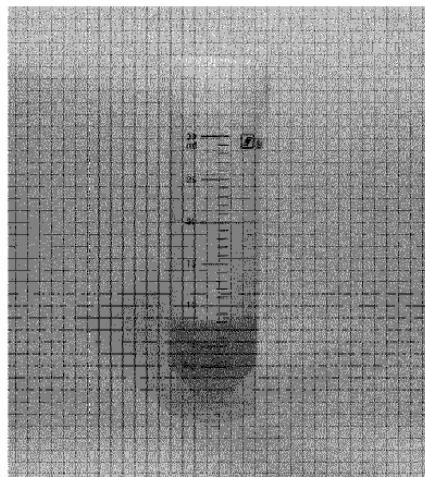


Figura 6b

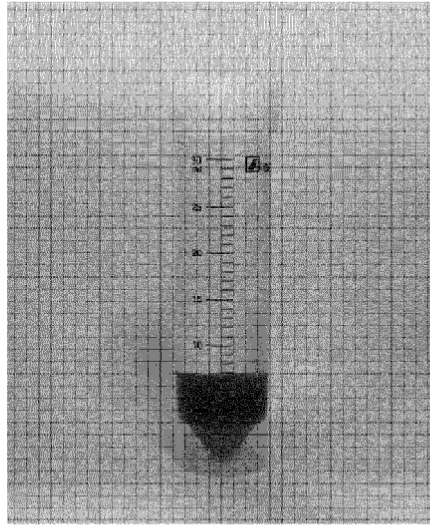


Figura 7

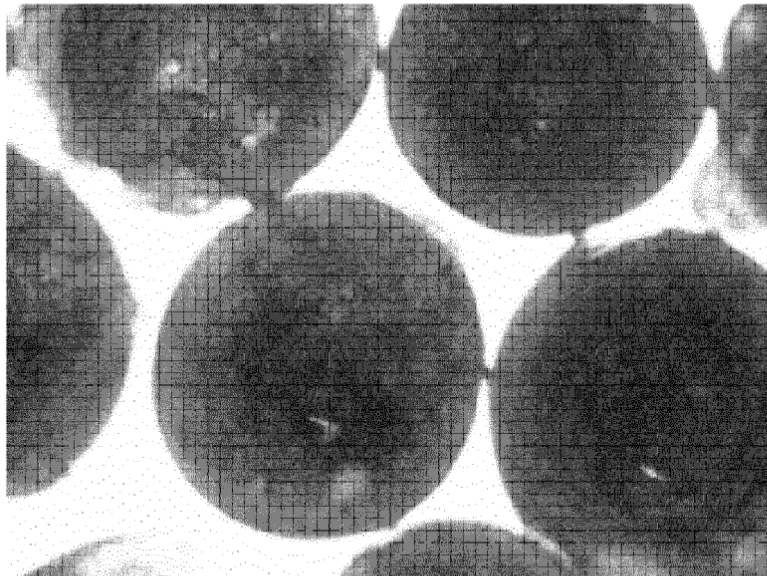


Figura 8

