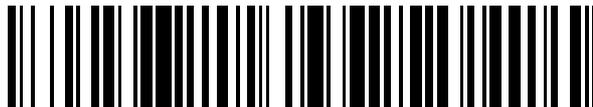


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 954**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2007 PCT/FI2007/000136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2007 WO07135224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2007 E 07730605 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2023893**

54 Título: **Método para almacenar material con base de sílice**

30 Prioridad:

23.05.2006 US 802506 P

24.07.2006 FI 20060698

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

24.04.2018

73 Titular/es:

DELSITECH OY (100.0%)

ITÄINEN PITKÄKATU 4 B

20520 TURKU, FI

72 Inventor/es:

JOKINEN, MIKA;

KOSKINEN, MIKA y

JALONEN, HARRY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 954 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

Método para almacenar material con base de sílice

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para almacenar material con base de sílice soluble en agua con un agente funcional incorporado en el material. Más específicamente la presente invención se refiere a conservar una propiedad o propiedades deseadas del material con base de sílice almacenando el material en disolución con base de agua.

Antecedentes de la invención

10 El oxígeno y el silicio son el elemento más abundante y el segundo más abundante, respectivamente, en la corteza terrestre y por consiguiente una gran cantidad de masa de la corteza terrestre es sílice (59%). La sílice (dióxido de silicio, SiO₂) es un material versátil que se utiliza en un gran número de aplicaciones, tales como preparación de cristal, moldes de vaciado, aditivo en hormigón y cemento, pesticidas, fertilizantes, catálisis, columnas de cromatografía, como material de secado xerogel en desecadores, como aerogel en la recogida de polvo espacial, relleno funcional en pinturas o protectores solares, filtración de agua, distribución de fármacos y génica.

15 La sílice puede obtenerse a partir de fuentes naturales mediante minería y la modificación deseada o sintetizándola a partir de varios precursores. La arena industrial y grava obtenidas por minería, a menudo denominadas "sílice", "arena de sílice" y "arena de cuarzo", incluye arenas y gravas con alto contenido en dióxido de silicio (SiO₂). La sílice puede prepararse/modificarse también a muchas estructuras diferentes mediante métodos de vaporización o síntesis en húmedo, que da por resultado diferentes propiedades tanto con respecto a características de textura como en química (de superficie).

20 Una de las características más interesantes de la sílice es su interacción con muchos organismos vivos y biomoléculas. Ciertas formas cristalinas de sílice son nocivas, como en el caso de la silicosis ("enfermedad del trabajador del carbón"), donde la sílice cristalina inhalada acelera el sobrecrecimiento del tejido fibroso en los pulmones, aunque se ha observado que en forma amorfa y disuelta en agua la sílice tiene una interacción positiva con los organismos vivos y las biomoléculas. También hay un ejemplo vivo en la naturaleza que muestra el potencial de la sílice para el contacto natural con los organismos vivos, un ejemplo del fenómeno que se denomina a veces biosilicificación que da por resultado sílice biogénica. Una de las criaturas vivas más abundantes en la tierra, las diatomeas, usan el correspondiente método de síntesis en húmedo para preparar un "esqueleto" de sílice para cubrir su parte orgánica, es decir, las diatomeas inducen la síntesis de sílice amorfa extrayendo la sílice soluble necesaria, ácido silícico, del agua marina que nuclea y condensa en las diatomeas creando una superficie de sílice.

25 Uno de los métodos más estudiados para preparar sílice es el método de sol-gel. Se hace en fase líquida, que lo hace potencial para muchas aplicaciones. El SiO₂ derivado de sol-gel y otros materiales con base de SiO₂ se preparan normalmente a partir de alcóxidos, alquilalcóxidos, aminoalcóxidos o silicatos inorgánicos que por medio de hidrólisis forman un sol que contiene o bien especies de sílice parcialmente hidrolizadas y/o ácido silícico totalmente hidrolizado. Las posteriores reacciones de condensación de especies que contienen SiOH llevan a la formación de especies de sílice mayores con una cantidad creciente de enlaces siloxano. Además, las especies se agregan, forman partículas de nanotamaño y/o agregados mayores hasta que se forma un gel. Las reacciones (típicamente a ≤40°C) se catalizan normalmente o bien por ácidos minerales (tales como HCl y HNO₃) o bases (tal como NH₃). El gel formado se envejece entonces (típicamente a ≤40°C), se seca a diferente contenido de agua (típicamente a ≤40°C) y/o se trata con calor (típicamente a ≤700°C) a la forma deseada dando por resultado típicamente SiO₂ amorfo y poroso. La última etapa, el tratamiento con calor a temperaturas elevadas (50-700°C) se salta típicamente si el sistema contiene un agente biológicamente activo. Los geles que se secan a temperatura moderada (a ≤50°C) se denominan xerogeles (<Gr. Xero = seco). Los geles de sílice que contienen cantidades sustanciales de agua, por ejemplo 30-90%, se denominan a veces hidrogeles. El SiO₂ derivado de sol-gel amorfo y poroso se conoce por ser biocompatible y se conoce por disolverse en el tejido vivo además de en disoluciones que simulan la parte inorgánica de fluido real del cuerpo humano, por ejemplo, en una disolución acuosa tamponada a pH 7,4 a 37°C con o sin sales inorgánicas encontradas en los fluidos corporales reales.

30 La sílice amorfa hecha mediante el método de sol-gel se conoce por dar por resultado una estructura porosa en nanoescala con una cantidad variable de grupos hidroxilo en la superficie. Se parece a las estructuras de sílice formadas en los procesos de biosilicificación. Dicha sílice se ha observado que tiene una interacción específica con los organismos vivos y muchas biomoléculas. Se sabe que es biocompatible, (por ejemplo, respuesta aceptable observada en el tejido) y biodegradable de forma ajustable en condiciones fisiológicas simuladas y en tejido vivo. Por consiguiente, la sílice derivada de sol-gel y otros materiales con base de sílice amorfa también se usan como tal en aplicaciones de biomateriales e ingeniería tisular. Debido a la posibilidad del fácil encapsulado de diferentes moléculas y otros agentes activos añadiéndolos en el sol reactivo en fase líquida, la sílice también se ha usado como dispositivo de distribución de fármacos para fármacos tradicionales de moléculas pequeñas y diferentes agentes biológicamente y terapéuticamente activos, tales como proteínas y vectores víricos.

El encapsulado puede utilizarse también en muchas otras aplicaciones. Muchas proteínas y enzimas son útiles en (bio)catálisis o en aplicaciones de diagnóstico como sensores (por ejemplo anticuerpo-antígeno) y pueden encapsularse en sílice derivada de sol-gel, que actúa como un material de transporte. También las células vivas pueden encapsularse en sílice, donde pueden actuar como biorreactores, por ejemplo, produciendo proteínas terapéuticas. Por tanto, los estudios en la conservación de la actividad biológica de las proteínas y otros agentes activos en sílice han sido uno de los temas de interés en diferentes campos de la ciencia. Además de agentes sensibles en diferentes aplicaciones relacionadas con la biotecnología, también es posible encapsular otras moléculas activas, que son normalmente casos más fáciles con respecto a la conservación de su actividad y funcionalidad, tales como agentes antimicrobianos, fragancias, perfumes, colores y tintes, colorantes alimentarios, aditivos alimentarios, antioxidantes, humidificadores, vitaminas, explosivos, insecticidas, herbicidas, fungicidas y reactivos/precursores de alto precio para reacciones químicas.

Las moléculas y otros agentes activos encapsulados en sílice sol-gel están en contacto directo con diferentes especies de sílice desde el sol en fase líquida al gel que domina en fase sólida, donde la condensación y la estructura de poro están en continuo desarrollo. Puede darse un encogimiento bastante sustancial durante los procesos de envejecimiento y secado y además reacciones químicas, tales como condensación, se dan, de manera que la estructura, envejecimiento y secado durante el almacenaje, pueden tener efectos cruciales en la actividad de los agentes encapsulados.

El almacenaje en disolución con base de agua proporciona un entorno de agua natural y favorable para las biomoléculas, células vivas, virus y otros agentes activos. El secado del gel de sílice derivado de sol gel provoca el encogimiento de la estructura de poro en nanoescala y además da por resultado la formación de una estructura superficial quebradiza. La sílice se usa en muchas formas, tal como monolitos, fibras, partículas de diferente tamaño y recubrimientos. Las aplicaciones potenciales de las fibras están compuestas normalmente de estructuras donde la interacción sílice-sílice está presente a una escala macroscópica, por ejemplo, en redes de fibras u otras estructuras correspondientes. En dichos casos, el secado de la estructura de sílice hace que la estructura pierda su flexibilidad, que es una propiedad importante, por ejemplo, en uso quirúrgico, por ejemplo, implantación. Algunas formulaciones de sílice pueden también romperse cuando se secan y después reponen en agua, por ejemplo después de la implantación en tejido vivo que contiene una sustancial cantidad de agua. Esto es porque el encogimiento de la estructura de poros durante el secado es un proceso irreversible y la reposición en agua está seguida por la difusión inmediata de agua en los poros a nanoescala provocando altas tensiones a través de fuerzas capilares.

La pérdida de la actividad o viabilidad de las proteínas, enzimas, virus, bacterias y otras células en la sílice derivada de sol-gel se ha tratado en muchas publicaciones. La sensibilidad de las condiciones del entorno varían dependiendo de los agentes específicos y habrían diferencias en las especies también, por ejemplo, entre diferentes proteínas. El envejecimiento, secado, estructura superficial, el papel de la cantidad de agua y alcohol en la estructura son ejemplos en los factores que pueden tener una influencia. Una de las principales preocupaciones es la estabilidad a largo plazo de la actividad biológica y/o disponibilidad de los agentes encapsulados además de la posible rotura de los materiales.

Wang et al. [R. Wang, U. Narang, P. N. Prasad y V. Bright, Affinity of antiluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass, *Anal. Chem.*, 65 (1993) pág. 2671-2675] describe el encapsulado de un anticuerpo en una matriz sol-gel y el almacenaje de la matriz que encapsula el anticuerpo en agua durante hasta 5 semanas. La matriz sol-gel se almacenó en agua para retener la afinidad del anticuerpo.

Livage et al. (J. Livage, T. Choradin y C. Roux, Encapsulation of biomolecules in silica gels, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 13 (2001) pág. R673) trata que la sílice derivada de sol-gel es potencial para el encapsulado de biomoléculas y que el agua interna en sílice tiene una influencia en el plegado de proteínas, aunque también comentan que la estabilidad a largo plazo de los sistemas de encapsulado deberían abordarse completamente.

N. Nassif et al. (N. Nassif, O. Bouvet, M. N. Rager, C. Roux, T. Choradin, J. Livage, Living Bacteria in silica gels, *Nature Materials*, vol. 1 (2002) pág. 42) mostraron la disponibilidad prolongada de bacterias en geles de sílice, aunque comentan que la disponibilidad a largo plazo de las células en compuestos inorgánicos nunca se ha abordado totalmente.

I. Gill y A. Ballesteros (I. Gill, Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol-Gel Bioencapsulates, *Chemistry of Materials* 13 (2001) pág. 3404 e I. Gill y A. Ballesteros, Bioencapsulation within Synthetic Polymers, *TIBTECH* vol. 18 (2000) pág. 282)) también han revisado de forma extensa el encapsulado de biomoléculas en diferentes geles de sílice, tanto xerogeles como hidrogeles (geles con 50-80% de agua intersticial y tamaños de poro entre 4-200 nm). Sin embargo, abordan que los hidrogeles están normalmente más o menos secos y el colapso y el encogimiento estructural y una consecuente pérdida de actividad biológica y ruptura de la estructura del gel de sílice son normales.

Zusman et al. (Zusman et al., Purification of sheep immunoglobulin G using protein A trapped in sol-gel glass, *Analytical Biochemistry*, 201 (1992) pág. 103) también han mostrado que un virus de la gripe intacto entró en un gel de sílice derivado de sol-gel con alto contenido en agua (un hidrogel), donde podría reaccionar con el liposoma recubierto de ácido siálico previamente encapsulado indicando así además indirectamente la conservación de la actividad biológica del virus durante la estancia en el gel de sílice.

M. L. Ferrer et al (M.L. Ferrer, L. Yuste, F. Rojo, F. del Monte, Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes, Chemistry of Materials, 15 (2003) pág. 3614) concluyeron en sus estudios en el encapsulado de bacterias vivas que además del sistema libre de alcohol, el factor principal que afecta a la solubilidad de las células bacterianas encapsuladas en los materiales de sílice sol-gel es el control de la limitación física ejercida por la matriz de sílice (sinéresis) durante el envejecimiento, es decir, sospechan que la estructura que se encoje durante el envejecimiento y el secado puede reducir la viabilidad de las células.

K.K. Flora y J.D. Brennan (K.K. Flora y J.D. Brennan, Effect of Matrix Aging on the Behavior of Human Serum Albumin Entrapped in a Tetraethyl Orthosilicate-Derived Glass, Chemistry of Materials 13 (2001) pág. 4170) han estudiado el encapsulado de albúmina en geles de sílice derivados de TEOS en diferentes condiciones (envejecido en seco (en aire sin lavado), envejecido con lavado (secado en aire después del lavado) y envejecido en húmedo (en tampón) y concluyeron que a pesar del método, después de 2 meses de envejecimiento, las proteínas atrapadas retenían menos del 15% de su capacidad de unión al ligando en disolución debido al desdoblamiento parcial. Sin embargo, estudiaron la situación solo dentro del gel y solo para la albúmina y no tuvieron en cuenta que el desdoblamiento (parcial), a menudo provocado por la adsorción a la superficie de la pared de poros de la sílice o por agregación extensiva de proteínas, se ha observado que es reversible para muchas proteínas, por ejemplo, varía dependiendo del caso y este proceso reversible también es posible mientras las proteínas se desorben mientras se liberan. Aunque la estructura se encoge durante el envejecimiento (independientemente de si se permite el secado o no), el envejecimiento y el secado simultáneo es más efectivo y la estructura puede también alcanzar el punto donde los agentes encapsulados no solo se adsorben de forma diferente, sino que pueden también apretarse físicamente en los poros y esto se da de forma natural más rápido para agentes mayores, como células y virus. En otras palabras, aunque la pérdida de bioactividad se observa dentro de la sílice, puede ser reversible, aunque con un secado demasiado extenso, puede volverse irreversible.

T. Wilson et al. (T. Wilson, R. Viitala, H. Jalonen, R. Penttinen y M. Jokinen, The Release and Biological Activity of Lysozyme from Selected Sol-gel Derived SiO₂ Matrices, sometido a Journal of Materials Science: Material in Medicine, Enero de 2007) observaron que un gel de sílice derivado de sol-gel, que no se había secado, conservaba la actividad de la lisozima liberada, es decir, la cantidad de lisozima biológicamente activa correspondía casi al 100% a la cantidad total de lisozima liberada con o sin agente protector separado, aunque la actividad de la lisozima liberada se redujo sustancialmente ya en las pocas semanas mientras el gel se dejaba secar y envejecer simultáneamente, es decir, la pérdida de bioactividad se había vuelto irreversible.

D. Avnir et al. (D. Avnir et al., Enzymes and other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials, Chemistry of Materials 6 (1994) pág. 1605) revisaron de forma extensa el encapsulado de enzimas, células completas, anticuerpos y otras proteínas en materiales de sol-gel. Mencionan geles húmedos y xerogeles, aunque no mencionan el almacenaje de sílice en disoluciones acuosas, sino más bien los problemas, tales como la fragilidad de la estructura de la matriz de sílice cristalina, seca. También están principalmente interesados en la actividad biológica in situ en el gel de sílice, donde ya se va a evitar una pérdida reversible de actividad biológica.

M. Jokinen et al. (documento WO 2005/082781) almacenaron implantes de sílice con fármacos encapsulados y otros agentes biológicamente activos en tampones saturados con productos de disolución de sílice para comparar las diferencias en los mecanismos de liberación con un sistema de disolución en sumidero, donde la sílice se dejó disolver libremente. La conservación de actividad biológica u otras propiedades funcionales de la sílice o los agentes encapsulados no se estudiaron.

P. Ducheyne et al. (documento US 5.874.109) sumergieron implantes con base de sílice en disoluciones tampón acuosas para estudiar la liberación de fármacos encapsulados. Esto representa un ejemplo típico y usado normalmente en el estudio de biomateriales con base de sílice donde los materiales se sumergen en diferentes disoluciones tampón imitando, al menos parcialmente, los contenidos y propiedades de los fluidos corporales para simular sus propiedades, por ejemplo, capacidad para precipitar fosfato de calcio parecido a mineral óseo (hidroxiapatita), propiedad de biodegradación o liberación de agentes encapsulados in vitro.

Objetos y compendio de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para almacenar un material con base de sílice no disuelto soluble en agua con un agente funcional incorporado en él, conservar una propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto y/o el agente funcional incorporado en él.

Es posible proporcionar un envase con un material con base de sílice no disuelto soluble en agua con un agente funcional incorporado en él, previsto para conservar una propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto y/o el agente funcional incorporado en él.

El envase puede tener diferentes usos.

Por consiguiente la presente invención proporciona un método que se define en la reivindicación 1. Entre otros, el método para almacenar un material con base de sílice no disuelto soluble en agua del que al menos el 70% y preferiblemente al menos el 90%, calculado como SiO₂ de materia seca, consiste en SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizado, con

un agente funcional incorporado en él, para conservar una propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto y opcionalmente del agente funcional incorporado en él en donde dicho material con base de sílice no disuelto se almacena sumergiendo dicho material en un medio en fase líquida que comprende agua en donde

5 a) Dicha fase líquida está inicialmente, es decir, cuando el almacenaje ha comenzado, saturada con un material con base de sílice soluble en agua, que es el mismo que dicho material con base de sílice no disuelto, en un grado tal que dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente no se disuelve en absoluto o no se disuelve esencialmente en dicha fase líquida durante el almacenaje, o

10 b) la proporción de la cantidad de dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente a la cantidad de dicha fase líquida es tal que dicha fase líquida estará saturada o esencialmente saturada mediante una parte disuelta de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua durante el almacenaje, cuya parte disuelta dicha de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua es menos que 5%, preferiblemente menos que 1%.

15 Se describe un envase con un material con base de sílice no disuelto soluble en agua del que al menos el 70% y preferiblemente al menos el 90%, calculado como SiO₂ de materia seca, consiste en SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizado, con un agente funcional incorporado en él, previsto para conservar una propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto y opcionalmente del agente funcional incorporado en él en donde dicho envase comprende un armazón esencialmente cerrado que encierra dicho material con base de sílice no disuelto sumergido en un medio en fase líquida que comprende agua en donde

20 a) dicha fase líquida está saturada con un material con base de sílice soluble en agua, que es el mismo que dicho material con base de sílice no disuelto, en un grado tal que dicho material con base de sílice no disuelto no se disuelve en absoluto o no se disuelve esencialmente en dicha fase líquida, o

25 b) la proporción de la cantidad de dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente a la cantidad de dicha fase líquida es tal que dicha fase líquida estará saturada o esencialmente saturada con el tiempo en un envase cerrado mediante una parte disuelta de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua, cuya parte disuelta dicha es menor que 5%, preferiblemente menor que 1%.

Se describe un uso del envase para conservar un agente funcional, que es un agente biológicamente activo.

Se describe un uso del envase para conservar un dispositivo para la distribución de fármaco oral; bucal; rectal; parenteral, que incluye administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa y administración intra-arterial; pulmonar, nasal, ocular, intrauterina, vaginal, uretral, tópica y transdérmica.

30 Se describe un uso del envase para conservar implantes, preferiblemente implantes vasculares, implantes ortopédicos, implantes dentales o dispositivos médicos implantables.

Se describe un uso del envase previsto para conservar una propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto en donde dicho envase comprende un armazón esencialmente cerrado que encierra dicho material con base de sílice no disuelto sumergido en un medio en fase líquida que comprende agua en donde

35 a) dicha fase líquida está saturada con un material con base de sílice soluble en agua, que es el mismo que dicho material con base de sílice no disuelto, en un grado tal que dicho material con base de sílice no disuelto no se disuelve en absoluto o no se disuelve esencialmente en dicha fase líquida, o

40 b) la proporción de la cantidad de dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente a la cantidad de dicha fase líquida es tal que dicha fase líquida se saturará o se saturará esencialmente con el tiempo en un envase cerrado mediante una parte disuelta de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua, cuya parte disuelta dicha es menor que 5%, preferiblemente menor que 1%

para conservar dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua en donde dicho uso de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua después de haberse almacenado en dicho envase comprende además disolver dicho material, preferiblemente *in vivo*.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 demuestra la transferencia génica con éxito que usa un adenovirus almacenado según el método de la invención.

La Figura 2 muestra por comparación la supervivencia de adenovirus recombinante en PBS puro.

50 La Figura 3 demuestra la transferencia génica con éxito usando adenovirus almacenado según el método de la invención.

La Figura 4 muestra los espectros IR de un implante de gel de sílice recién medido (5 d) y el de un implante después de 98 días de almacenaje en agua.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Términos

5 El término material con base de sílice en el contexto de esta solicitud se refiere a cualquier material que contiene SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizado, es decir SiOH. El material contiene típicamente diferentes cantidades de agua, restos de precursores y otros componentes usados/formados durante su proceso de preparación. Los productos principales típicos de la matriz son SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizados, es decir SiOH y agua encapsulada, que representa típicamente al menos el 60% de los materiales.

10 El material con base de sílice no disuelto puede comprender cualquier estado y/o forma, tal como partículas, fibras o monolitos y puede ser por ejemplo un xerogel o hidrogel. Típicamente el diámetro mínimo promedio medio de las partículas o fibras es al menos 0,1 μm, preferiblemente al menos 1 μm, más preferiblemente al menos 10 μm y lo más preferiblemente al menos 0,1 mm.

15 El término soluble en agua cuando se refiere a material con base de sílice no disuelto en el contexto de esta solicitud se refiere a que dicho material se disolverá en agua, no obstante con moderación y bastante lentamente. Típicamente una fase acuosa saturada por dicho material comprende 10 a 1000 ppm, preferiblemente 20 a 300 ppm y lo más preferiblemente 130 a 150 ppm de Si calculado como SiO₂. Debería anotarse, que la solubilidad, es decir la concentración de saturación, es dependiente del pH. Típicamente dicho material se disolvería en agua a temperatura ambiente a una velocidad de aproximadamente 0,02 a 10% (p/p)/h, preferiblemente 0,04 a 2,5% (p/p)/h más preferiblemente 0,08 a 0,6% (p/p)/h y lo más preferiblemente 0,15 a 0,3% (p/p)/h proporcionado un pH < 9.

20 Agente biológicamente activo en el contexto de esta solicitud se refiere a cualquier agente orgánico o inorgánico que está biológicamente activo, es decir, induce una respuesta biológica estadísticamente significativa en un tejido vivo, órgano u organismo. El agente biológicamente activo puede ser una medicina, péptido, proteína, polisacárido o un polinucleótido. Puede ser una célula o tejido vivo o muerto, bacteria, un virus, un bacteriófago y un plásmido o una parte del mismo. Puede ser un agente para el tratamiento de enfermedades en áreas terapéuticas como alimentaria/metabólica, sangre y coagulación, cardiovascular, dermatológica, genitourinaria, hormonal, inmunológica, infección, cáncer, musculoesquelética, neurológica, parasitaria, oftálmica, respiratoria y sensorial. Puede ser además para el tratamiento de enfermedades como osteoporosis, epilepsia, enfermedad de Parkinson, dolor y disfunción cognitiva. Puede ser un agente para el tratamiento de enfermedades de disfunción hormonal o tratamiento hormonal, por ejemplo, contracepción, terapia de sustitución hormonal o tratamiento con hormonas esteroideas. Puede ser además un agente tal como un antibiótico o antiviral, anti-inflamatorio, neuroprotector, vacuna profiláctica, mejorador de la memoria, analgésico (o combinación analgésica), inmunosupresor, antidiabético o un antiviral. Puede ser un antiasmático, anticonvulsivo, antidepresivo, antidiabético o antineoplásico. Puede ser un anti-psicótico, antiespasmódico, anti-colinérgico, simpatomimético, anti-arrítmico, anti-hipertensivo o diuréticos. Puede ser un agente para el alivio del dolor o sedación. Puede ser también un tranquilizante o un fármaco para la disfunción cognitiva. El agente puede estar en forma de ácido o base libre, una sal o un compuesto neutro. Puede ser un péptido, por ejemplo, levodopa; una proteína, por ejemplo un factor de crecimiento; o un anticuerpo. Puede ser un polinucleótido, un ión soluble o una sal.

35

En el contexto de esta solicitud el término implante se refiere a cualquier dispositivo que pretende insertarse, al menos parcialmente, en un mamífero, incluyendo seres humanos.

40 En el contexto de esta solicitud el término dispositivo para la distribución de fármaco se refiere a cualquier cosa hecha o adaptada para la distribución de fármaco.

Características de la invención

45 El objetivo general de la invención es almacenar materiales con base de sílice biodegradables en un medio con base acuosa para frenar la biodegradación que se da por disolución en agua. Debido a la baja solubilidad de la sílice en agua, la biodegradación puede frenarse de forma conveniente eligiendo un volumen de medio apropiado o poniendo materiales con base de sílice en disolución saturada preparada (con respecto a los productos de disolución de sílice). La baja solubilidad no es un problema para una posible biodegradación deseada, porque los líquidos también pueden cambiarse. Por ejemplo, en caso de implantación en el cuerpo, los fluidos corporales fluyen y se renuevan diariamente, es decir, un implante se degrada en el cuerpo por disolución a pesar de la baja solubilidad. Un objetivo adicional es reducir/frenar la evolución de la estructura con base de sílice dinámica, por ejemplo, el fuerte encogimiento provocado por el secado libre que puede destruir propiedades deseadas, tales como actividad biológica o propiedades mecánicas, o cualquier otra actividad/función aplicable, almacenándola en un medio de almacenaje con base acuosa. La sílice puede almacenarse en cualquier medio de almacenaje que consiste en un líquido donde el agua es un componente esencial. El pH puede elegirse libremente mientras la solubilidad sea suficientemente baja en proporción al volumen de agua para que el material con base de sílice no se disuelva totalmente en el líquido de almacenaje. El medio de almacenaje es preferiblemente una disolución tamponada que imita las condiciones del fluido corporal a 0-37°C y tamponada a pH 7,0-7,5. Si es deseable, también podrían usarse temperaturas por debajo de 0°C con aditivos para disminuir el punto de congelación de la disolución acuosa o de forma alternativa el agua podría congelarse. Cuando se selecciona el pH, las propiedades específicas de los

55

materiales posiblemente encapsulados tienen que tenerse en cuenta. Muchos agentes biológicamente activos y terapéuticos no toleran el alto o bajo pH, aunque más allá de las aplicaciones médicas, puede haber también otras opciones para el pH.

5 Los materiales de sílice o con base de sílice deberían estar preferiblemente totalmente sumergidos en el líquido de almacenaje de manera que permanezca totalmente sumergido en cualquier posición de un envase. La saturación puede tener lugar de forma espontánea mediante la disolución del material o el líquido puede prepararse de forma separada para incluir especies de sílice disueltas a saturación.

10 El material con base de sílice no tiene que ser sílice pura, puede contener diferentes cantidades de agua, restos de precursores u otros componentes. En la práctica, los materiales con base de sílice contienen siempre algo de agua encapsulada en la estructura. El material con base de sílice a almacenar en medio con base acuosa puede contener también cantidades sustanciales de agua y la fase sólida puede aún estar dominando o puede estar sustancialmente seco. Por ejemplo, un hidrogel de sílice puede contener, por ejemplo, 30-90% de agua y puede usarse como un implante además de un xerogel de sílice seco hasta el equilibrio (con respecto a las condiciones circundantes). El material con base de sílice se prepara mediante el método de sol-gel. Los precursores pueden incluir cualquier componente común usado para preparar materiales con base de sílice mediante el método sol-gel, por ejemplo, mediante silicatos orgánicos tales como alcóxidos, aminoalcóxidos, alquilalcóxidos o mediante silicatos inorgánicos, tales como silicatos de sodio o potasio o poli(ácidos silícicos), etc.

20 Los materiales están hechos preferiblemente de silicatos o alcóxidos de sodio o potasio $[\text{Si}(\text{OR})_4; \text{R}=\text{C}_x\text{H}_y, \text{preferiblemente } \text{C}_2\text{H}_5]$ que se hidrolizan total o parcialmente en agua a hidróxidos de silicio $[\text{Si}(\text{OH})_y]$ y se condensan adicionalmente total o parcialmente a siloxanos ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$), es decir, sílice. Por ejemplo, alcóxidos $\text{Si}(\text{OR})_{4-y}(\text{OH})_y$, por ejemplo, tetraetilortosilicato = tetraetoxisilano $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{4-y}(\text{OH})_y$.

25 Por ejemplo, un material con base de sílice puede contener sílice, hidróxido de silicio, agua encapsulada $(\text{Si}_n(\text{OH})_{2x}\text{O}_{2n-x} + z\text{H}_2\text{O})$, alcohol producto de reacción y restos de los precursores $\text{Si}(\text{OR})_{4-y}(\text{OH})_y$ que ha hidrolizado y/o condensado parcial o totalmente. El $[\text{Si}(\text{OR})_{4-y}(\text{OH})_y]$ sin reaccionar o parcialmente reaccionado puede integrarse también con $\text{Si}_n(\text{OH})_{2x}\text{O}_{2n-x} + z\text{H}_2\text{O}$ en cualquier proporción con respecto a los enlaces químicos con silicio o físicamente en poros. $[\text{Si}(\text{OR})_{4-y}(\text{OH})_y]$ y/o $\text{Si}_n(\text{OH})_{2x}\text{O}_{2n-x} + z\text{H}_2\text{O}$, integrados y/o separadamente, pueden incluirse en partículas en nanoescala que son constituyentes de la estructura global de los materiales con base de sílice tales como estructuras monolíticas (barras, comprimidos, etc.), partículas mayores (por ejemplo, microesferas), fibras, recubrimientos, etc. y la integración entre las partículas a nanoescala puede darse mediante enlaces químicos o mediante cualquier otra fuerza de interacción, tal como fuerzas electrostáticas o de van der Waals.

30 La masa del material con base de sílice almacenada y el volumen de las disoluciones acuosas se ajustan preferiblemente de manera que la saturación se de más bien rápido y sin degradación significativa de los materiales. La solubilidad de sílice derivada de sol-gel, amorfa, a pH 7,0-7,5 es lo más habitualmente aproximadamente 130-150 ppm (= $\mu\text{g}/\text{ml}$) a temperaturas cerca de la temperatura ambiente. Además la sílice totalmente cristalina tiene baja solubilidad (unas pocas ppm) en las mismas condiciones que significa en la práctica que todas las formas de sílice son biodegradables. La solubilidad y la saturación deberían entenderse en este contexto de manera que la disolución se ha detenido prácticamente. Se ha presentado que la sílice amorfa y la sílice cristalina tienen diferente solubilidad en agua y también se han presentado mayores diferencias (que en 130-150 ppm) entre diferentes sílices amorfas. La sílice puede, por ejemplo estabilizar parcialmente su propia estructura mediante reprecipitación y/o remodelado de la superficie. Por tanto, los valores observados no necesariamente representan la solubilidad termodinámicamente definida, sino más bien un nivel de disolución después del cual no ocurre nada significativo en la práctica. Por ejemplo, si la cantidad disuelta de sílice es 40 ppm después de un día y la disolución se da solo en 1% en el año siguiente, el nivel de 40 ppm después de un día es prácticamente aplicable a usarse en el sistema de almacenaje descrito.

35 La baja solubilidad de la sílice en condiciones tipo fluido corporal se utiliza para prevenir posibles reacciones que provoquen problemas del material con base de sílice que contiene SiOH- y agua con materiales de envasado y para prolongar el tiempo de almacenaje y la conservación de la actividad biológica de agentes sensibles biológicamente activos, terapéuticos u otros agentes funcionales, que se han encapsulado en materiales con base de sílice. El material con base de sílice, reactivo y/o biodegradable, que contiene tanto grupos hidroxilo libres como agua encapsulada, puede interactuar/reaccionar con cualquier material de envasado usado normalmente y provocar degradación o modificación nociva del envasado o cambios en las propiedades del propio material con base de sílice. Llenando el envase con disolución acuosa que se satura rápidamente por los productos de degradación de la sílice, la interacción directa con el material de envasado puede reducirse esencialmente.

40 Además, hay resultados que muestran que algunos agentes biológicamente activo, tales como proteínas y vectores virales, conservan su actividad biológica cuando se almacenan en sílice que contiene agua más que en estructuras secas. Almacenando la sílice en disolución acuosa, puede mantenerse la humedad o agua como fase esencial del líquido en la estructura porosa de los materiales con base de sílice. El agua en la estructura es favorable para que las proteínas conserven su estructura nativa y un medio natural para los agentes vivos encapsulados, es decir, virus, células y bacterias.

- Muchas realizaciones preferidas apuntan a permitir la liberación controlada del material con base de sílice sin disolver como tal (por ejemplo, cuando actúa como un agente funcional), y/o el agente funcional incorporado en él mediante disolución del material. La disolución y la liberación resultante tienen lugar típicamente en el sitio de acción del agente funcional. Por consiguiente, dependiendo de la aplicación, la liberación puede tener lugar por ejemplo, *in vivo*, *in vitro* y en el campo, por ejemplo, si el agente funcional es un herbicida. La liberación controlada puede alcanzarse por disolución controlada, es decir, disolución del material en un periodo de tiempo deseado, del material con base de sílice. La velocidad de disolución y la velocidad de liberación resultante pueden ajustarse en base a técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, documentos WO 01/40556, WO 00/550349 y WO 2005/082781) y las condiciones específicas en el sitio de disolución.
- Desde el punto de vista del mecanismo de liberación, el sistema de almacenaje es adecuado para cualquier agente encapsulado que esté en la estructura, tal como células o bacterias o se libere principalmente mediante la degradación del material de la matriz de sílice, tal como péptidos, proteínas, polisacáridos y virus, aunque también algunas moléculas más pequeñas mientras la difusión desde los poros típicos de la sílice derivada de sol-gel sea suficientemente pequeña y la liberación esté cubierta principalmente por la degradación de materiales con base de sílice. También es muy probable que el material con base de sílice como tal, especialmente cuando contiene cualquier cantidad de agua, esté reaccionando y cambiando con el tiempo, al menos algunas partes del material pueden condensar lentamente adicionalmente y si además se está secando, puede también afectar a la superficie del material, por ejemplo, volviéndose quebradizo. Por tanto, si el almacenaje en agua no afecta a la funcionalidad del material, también es favorable almacenarlo con el método introducido.
- El área principal de aplicación es para el almacenaje de materiales con base de sílice en uso médico y dental como biomateriales, como tal, o como dispositivos de distribución y/o encapsulado para fármacos y otros agentes terapéuticamente activos, tales como péptidos terapéuticos, proteínas, polisacáridos, vectores no virales y virales, células, bacterias en, por ejemplo, dispositivo médico, estructuras de ingeniería tisular u otros implantes, prótesis o dispositivos inyectables, aunque pueden también aplicarse a cualquier aplicación donde la sílice se utilice en el encapsulado y/o liberación controlada de diferentes agentes funcionales, por ejemplo, en cosmética, diagnóstico, sensores, superficies reflectantes, fragancias, perfumes, colores y tintes, colorantes alimentarios, aditivos alimentarios, antioxidantes, humectantes, vitamina, explosivos, insecticidas, herbicidas, fungicidas, pienso, hormonas vegetales, alimentos vegetales, enzimas, anticuerpos, fármacos veterinarios, agentes antimicrobianos, agentes anti-inflamatorios, catalizadores, reactivos, absorción UV, protectores solares.
- Realizaciones preferidas
- El posible uso del material con base de sílice no disuelto soluble en agua después de haberse almacenado según la invención comprende disolver dicho material, preferiblemente *in vivo*, dando por resultado opcionalmente la liberación del agente funcional incorporado en él.
- En realizaciones típicas el material con base de sílice que satura o satura esencialmente la fase líquida consiste esencialmente en ácido silícico, es decir $\text{Si}(\text{OH})_4$. El medio en fase líquida comprende típicamente al menos 90% y preferiblemente al menos 98% de agua. El pH del medio en fase líquida es de 5,0 a 8,0 y preferiblemente de 7,0 a 7,5.
- El material con base de sílice no disuelto está derivado de sol-gel.
- En muchas realizaciones preferidas de la invención el material derivado de sol-gel se sumerge en el medio en fase líquida solo después de que el material se ha envejecido y/o secado al grado en que el peso de dicho material es $\leq 90\%$, preferiblemente $\leq 70\%$, más preferiblemente $\leq 50\%$ y lo más preferiblemente $\leq 40\%$ del peso del sol correspondiente, es decir, el sol a partir del que se deriva el material.
- En algunas realizaciones típicas la propiedad deseada a conservar es una propiedad del material con base de sílice no disuelto como tal, es decir, que excluye al agente funcional incorporado, y la propiedad es preferiblemente la actividad biológica y/o propiedad mecánica o estructura del material con base de sílice como tal.
- Un agente funcional, que es un agente biológicamente activo como se define en la reivindicación 1, se incorpora en el material con base de sílice no disuelto. El agente funcional que es un agente biológicamente activo puede ser un microorganismo vivo o espora del mismo, o una célula animal o vegetal viva. Si el agente funcional es un microorganismo vivo o una espora del mismo, se selecciona del grupo que consiste en virus, bacterias, protozoos y hongos.
- En algunas realizaciones el agente biológicamente activo es un ácido nucleico, que se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y plásmidos.
- En diferentes realizaciones del método el material con base de sílice no disuelto se almacena durante al menos 3 meses, 1 año e incluso 5 años.
- En el envase la proporción de la cantidad del material con base de sílice no disuelto a la cantidad de la fase líquida es tal que menos del 5%, preferiblemente menos del 1% del material con base de sílice no disuelto se disolverá con

el tiempo en la fase líquida. En el envase la fase líquida comprende típicamente más de 20 ppm, preferiblemente más de 100 ppm, más preferiblemente aproximadamente 130 a 150 ppm de Si calculado como SiO₂.

Algunos usos son para conservar los microorganismos vivos o esporas de los mismos, o células animales o vegetales vivas. Si se usa para conservar microorganismos o esporas de los mismos, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en virus, bacterias, protozoos y hongos.

En algunos usos se conservan ácidos nucleicos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en ADN, ARN y plásmidos.

Un uso posible comprende además, después de almacenar según la invención, disolver el material con base de sílice no disuelto preferiblemente *in vivo*, dando como resultado la liberación del agente funcional si está incorporado en él. Estas realizaciones pueden comprender el uso del envase que comprende el material con base de sílice soluble en agua con o sin el agente funcional incorporado en él.

Ejemplos

Ejemplo 1 (fuera del alcance de la reivindicación 1)

Se encapsulan adenovirus recombinantes (serotipo 5) con un gen marcador LacZ de *E. coli* en sílice durante el proceso sol-gel. Las muestras de sílice biodegradable (disoluble) se empapan entonces en una disolución acuosa, en solución salina tamponada con fosfato, PBS a +37°C y pH 7,4 durante tiempos diferentes. Debido a la baja solubilidad en agua de la sílice, el tampón se satura rápidamente con respecto a los productos de disolución de sílice y la degradación de la sílice para.

A diferentes puntos temporales las muestras de sílice se han cultivado con fibroblastos de piel humana y las células se han teñido con X-Gal. Después de teñirlas puede notarse (microscópicamente) a partir del color deseado que el gen marcador LacZ se ha transferido en las células, lo que se da si las células se han infectado por los virus. Esto muestra que los adenovirus todavía están biológicamente activos y son capaces de transferir genes en las células después de un almacenaje de 28 días en PBS a +37°C y pH 7,4 que está saturado con respecto a los productos de disolución de sílice. Después de 32 días en PBS a +37°C y pH 7,4, no puede observarse actividad. El mismo virus pierde la mayoría de su actividad en PBS puro a +37°C y pH 7,4 ya después de 1 día y totalmente después de 4 días. Si las muestras se dejan secar, no se observa actividad de adenovirus o transferencia génica en las células.

La Figura 1 muestra un color azul (oscuro en dibujos en blanco y negro) que indican la exitosa transferencia génica (LacZ) después de la tinción con X-gal de los fibroblastos de piel humana cultivados en unos implantes de sílice almacenados en tampón acuoso (PBS a 37°C y pH 7,4) con adenovirus recombinantes encapsulados (serotipo 5) con un gen marcador LacZ de *E. coli*. Los diferentes dibujos a, b, c, d, e, f, g, h e i muestran transferencia (o falta de transferencia) cuando se almacenan durante 4, 7, 11, 13, 18, 21, 25, 28 y 32 días respectivamente. Los adenovirus están todavía activos después de 28 días de almacenaje en PBS ("h"), aunque después de 32 días ("i") no puede observarse actividad.

La Figura 2 muestra por comparación la supervivencia de adenovirus recombinantes (serotipo 5) con un gen marcador LacZ de *E. coli* en PBS puro a +37°C y pH 7,4.

Ejemplo 2

Se encapsulan adenovirus recombinantes (serotipo 5) con un gen marcador LacZ de *E. coli* en sílice durante el proceso sol-gel. Las muestras de sílice se mantienen en una disolución acuosa saturada preparada (con respecto a los productos de disolución de sílice) de tampón TRIS 0,05 M (tris-cloruro, por ejemplo, Trizma preset Crystals, Sigma) a +2,2°C (pH 7,0-8,0) durante 229 días. Antes del cultivo celular, las muestras de sílice se dejan disolver en mayor volumen de medio de disolución (en solución salina tamponada de fosfato, PBS a +37°C y pH 7,4) durante 3 días durante los que se disuelve el 10-30% del sílice. Esto se hace para determinar si los adenovirus encapsulados más profundamente en la masa de sílice están todavía activos. Después de 3 días en PBS las muestras de sílice se transfieren a un cultivo de fibroblastos de piel humana. Después de la tinción con X-Gal puede notarse (microscópicamente) a partir del color deseado que el gen marcador LacZ se ha transferido a las células, lo que ocurre si las células se han infectado por los virus. Esto muestra que los adenovirus, también más profundos en la masa de sílice, de hecho están encapsulados en sílice y están aún biológicamente activos y son capaces de transferir genes en las células después de 229 días de almacenaje en tampón TRIS a +2,3°C que está saturado con respecto a los productos de disolución de sílice. Estudios de almacenaje adicionales mostraron alguna actividad hasta 571 días de almacenaje en agua a 2-4°C. Las muestras correspondientes almacenadas a temperatura ambiente (20-25°C) mostraron alguna actividad después de 430 días de almacenaje en agua.

La Figura 3 muestra un color azul (oscuro en un dibujo en blanco y negro) que indica una transferencia génica (LacZ) con éxito después de la tinción con X-gal de fibroblastos de piel humana cultivados en unos implantes de sílice almacenados en tampón acuoso (Tris-cloruro a 2,3°C y pH 7,0-8,0 durante 229 días) con adenovirus recombinantes encapsulados (serotipo 5) con un gen marcador LacZ de *E. coli*.

Ejemplo 3 (fuera del alcance de la reivindicación 1)

Las fibras de sílice derivada de sol-gel se transforman en estructuras tridimensionales permitiendo que las fibras recién hechas, aún parcialmente húmedas, o separadamente en disoluciones acuosas parcialmente disueltas y fibras húmedas se unan libremente en la parte superior de cada una de las otras en capas. La estructura tipo red de fibras que tiene contactos fibra-fibra retiene su flexibilidad mientras la estructura está húmeda. Si la estructura se deja secar, la estructura tipo red se vuelve quebradiza perdiendo su flexibilidad. Colocando la fibra de sílice derivada de sol-gel en estructuras tipo red en una disolución acuosa que se satura bastante rápidamente (ajustando el volumen y la solubilidad típica de la sílice a condiciones neutras a 130-150 ppm) con respecto al producto de disolución de sílice, la degradación (disolución) de la sílice se frena facilitando la conservación de la estructura.

Ejemplo 4 (fuera del alcance de la reivindicación 1)

Las estructuras de sílice monolíticas planeadas para usarse como implantes, por ejemplo, barras, se dejan secar a peso constante en condiciones ambiente a 0-40°C. Estas estructuras de sílice aún están parcialmente húmedas después de alcanzar el peso constante, aunque en la práctica alcanzan el equilibrio con las condiciones circundantes. Algunos ejemplos de sílice, especialmente los hechos con relaciones (R) de agua a alcóxido bastantes bajos (TEOS, ortosilicato de tetraetilo) a $R < 5$ y lo más normalmente a $R < 3$ se rompen en pedazos mientras se sustituyen en disoluciones acuosas, por ejemplo, en solución salina (disolución salina fisiológica), en tampón TRIS (Tris-cloruro) mantenido a +37°C, o en el fluido corporal simulado (SBF por Kokubo et al.) mantenido a +37°C y pH 7,4. La ruptura en pedazos provocada por las fuerzas capilares después de la difusión de agua en pequeños poros de la sílice derivada de sol-gel no se observa si las muestras de sílice monolítica se almacenan en disoluciones acuosas, por ejemplo, en solución salina (disolución salina fisiológica), en TRIS o en SBF, que están saturadas con respecto a los productos de disolución de sílice.

Ejemplo 5 (fuera del alcance de la reivindicación 1)

Se observó que el envejecimiento de la estructura de gel de sílice derivada de gel-sol antes del almacenaje en agua es crucial para la estabilidad de los implantes de gel de sílice. Si los implantes de gel de sílice derivado de sol-gel se sumergen en agua demasiado pronto después de la formación de gel, es decir, cuando la estructura de sílice está muy inmadura y/o el gel de sílice aún contiene muchos líquidos procedentes de la fase sol, los implantes tienden a hincharse y/o romperse durante el almacenaje. Esto se observó comparando el proceso de preparación de la formulación de sílice exactamente igual (relación de agua de sol a TEOS 52,5; que corresponde a los implantes como en los Ejemplos 1 y 2, pero sin los virus encapsulados) en dos cargas (en moldes cilíndricos con un volumen de 400 μ l y con un diámetro de alrededor de 1 cm) con diferentes cantidades de producción, es decir una carga de 20 implantes y otra carga de 40 implantes. Los moldes para cada carga, se mantuvieron abiertos en un desecador Nalgene (5317-0120; 30 x 30 x 30 cm) a 4°C durante 24 h. El peso de los implantes de la carga de 20 implantes fue alrededor de $45 \pm 5\%$ en comparación con el peso del sol correspondiente (disminución lineal como una función del tiempo del 100% a 45% en 24 horas). Estos implantes no se hincharon y se volvieron mecánicamente más fuertes con el tiempo de almacenaje en agua y fueron fáciles de manejar, por ejemplo, no se rompieron cuando se manejaron con fórceps. Exactamente el mismo procedimiento para una carga de 40 implantes en exactamente las mismas condiciones dio implantes de gel de sílice que comenzaron a hincharse después de alrededor del almacenaje de 1 mes en agua. La pérdida de peso de estos implantes durante el envejecimiento y el secado en el desecador durante 24 h no se determinó. Además, estos implantes de gel de sílice eran claramente más blandos que los hechos en la carga de 20 implantes. Los implantes de gel de sílice hinchados se rompieron fácilmente en pedazos, por ejemplo, cuando el líquido de almacenaje se agitó o cuando los implantes se quitaron del recipiente de almacenaje vertiéndolos con el líquido en un plato para el uso adicional. Esto muestra que el envejecimiento y/o secado insuficiente de los implantes de gel de sílice derivados de sol-gel antes del almacenaje en agua ni el secado demasiado severo de los implantes (implantes de gel de sílice secos en el peso constante como se describe en el Ejemplo 4), no se van a preferir típicamente.

Ejemplo 6 (fuera del alcance de la reivindicación 1)

Las medidas FT-IR (Figura 4) realizadas usando el Sistema de espectro BX FT-IR de Perkin Elmer con el modo ATR muestran que la estructura química de las muestras de implante de gel de sílice (relación de agua de sol a TEOS 52,5; que corresponde a implantes como en los Ejemplos 1 y 2, aunque sin los virus encapsulados) no cambian significativamente durante 98 días de almacenaje en agua, aunque el contenido en agua en los implantes gel de sílice lo haga.

En la Figura 4 la línea más gruesa muestra el espectro IR del implante de gel de sílice recién medido (5 días en almacenaje en agua) y la línea más fina el espectro IR del correspondiente implante de gel de sílice almacenado durante 98 días. El solapamiento de los espectros se bastante extenso y los mismos picos se encuentran en ambos espectros, solo han cambiado sus relaciones relativas. Los picos a alrededor de 3300 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} y 970 cm^{-1} indican cambios en el contenido en agua y la cantidad aumentada de Si-O-Si condensado durante el almacenaje de 98 días en agua. La relación entre los picos a 1060 cm^{-1} y 970 cm^{-1} para las muestras de gel de sílice frescas y las muestras de gel de sílice almacenadas en agua durante 98 días fueron 2,3 y 2,8, respectivamente.

5 La relación entre el pico a 3300 cm^{-1} y 1060 cm^{-1} se usó para analizar el contenido en agua. La relación entre los picos para el implante de gel de sílice recién medido (5 días), cuando se almacenó en agua durante 41 días y cuando se almacenó en agua durante 98 días fue 1,16, 0,84 y 0,36, respectivamente. El contenido en agua (p/p) determinado por análisis termogravimétrico (Perkin-Elmer TGA7) fue 89,2% para la muestra de gel de sílice almacenada durante 41 días. El contenido en agua correspondiente de $88\% \pm 5\%$ también se ha observado para la misma formulación de gel de sílice después de tiempos de almacenaje más cortos. La relación entre la relación del pico FT-IR y el tiempo de almacenaje dio una relación lineal como lo hizo la del contenido de sílice (p/p) y la relación del pico FT-IR. Usando a relación lineal para la relación de picos FT-IR y la pérdida de peso para el implante de gel de sílice almacenado durante 98 días, el contenido en agua (p/p) se determinó que era 43,5% indicando que la clara
10 disminución en el contenido de agua dentro de los implantes de gel de sílice se dio entre los días 41 y 98, aunque no se observaron cambios significativos antes de los 41 días de almacenaje en agua.

15 La velocidad de biodegradación de los correspondientes implantes de gel de sílice se midieron en una disolución de tampón TRIS (pH 7,4, 37°C) en un baño de agua en agitación. La disolución de sílice se midió con un espectrofotómetro (UV-1601, Shimadzu) que analizó la absorbancia del complejo de azul de molibdeno a 820 nm. Los resultados muestran que los implantes de gel de sílice frescos se disuelven en un promedio de 2,0% (p/p)/h, aunque la velocidad de disolución disminuye ya después del almacenaje en agua de 25 días a alrededor de 1,1% (p/p)/h y no se observa cambio significativo después del almacenaje de 4 meses, cuando la velocidad de disolución es aún de alrededor de 1,1% (p/p)/h. Esto muestra que el envejecimiento (condensación) de la estructura de sílice se da más rápido que la disminución en el contenido de agua en los implantes.

REIVINDICACIONES

1. Un método en donde un material con base de sílice no disuelto soluble en agua, cuyo material se disuelve en agua a temperatura ambiente a una velocidad de 0,02 a 10% (p/p)/h a pH <9 y que se deriva de sol-gel y del que al menos el 70%, calculado como SiO₂ de materia seca, consiste en SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizado, con un agente funcional que es un agente biológicamente activo que se selecciona de células animales o vegetales vivas o ácidos nucleicos o un grupo que consiste en virus, bacterias, protozoos y hongos incorporados en él, se almacena durante al menos 3 meses para conservar la propiedad o propiedades deseadas de dicho material con base de sílice no disuelto y del agente funcional incorporado en él en donde dicho material con base de sílice no disuelto se almacena sumergiendo dicho material en un medio en fase líquida, que comprende al menos 90% de agua y tiene pH de 5,0 a 8,0, en donde
- 5
- 10 a) dicha fase líquida está inicialmente, es decir cuando el almacenaje está comenzado, saturada con un material con base de sílice soluble en agua, que es el mismo que dicho material con base de sílice no disuelto, en un grado tal que dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente no se disuelve en absoluto en dicha fase líquida durante el almacenaje, o
- 15 b) la proporción de la cantidad de dicho material con base de sílice no disuelto inicialmente a la cantidad de dicha fase líquida es tal que dicha fase líquida se satura mediante una parte disuelta de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua durante el almacenaje, cuya parte disuelta dicha de dicho material con base de sílice no disuelto soluble en agua es menos que 5%.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado en que al menos el 90% del material con base de sílice no disuelto soluble en agua, calculado como SiO₂ de materia seca, consiste en SiO₂ y/o SiO₂ hidrolizado.
- 20 3. El método según la reivindicación 1, caracterizado en que la parte disuelta del material con base de sílice no disuelto soluble en agua es menos que 1%.
4. El método según la reivindicación 1 a 3, caracterizado en que el material con base de sílice que satura la fase líquida consiste en ácido silícico, es decir Si(OH)₄.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado en que el medio de fase líquida comprende al menos 98% de agua.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado en que el pH del medio de fase líquida es de 7,0 a 7,5.
7. El método según la reivindicación 1, caracterizado en que el material derivado de sol-gel se sumerge en dicho medio de fase líquida solo después de que dicho material se ha envejecido y/o secado en el grado de que el peso de dicho material es ≤90%, preferiblemente ≤70%, más preferiblemente ≤50% y lo más preferiblemente ≤40% del peso del sol correspondiente, es decir el sol a partir del que se deriva el material.
- 30 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado en que la propiedad deseada, preferiblemente la actividad biológica, y/o la propiedad mecánica y estructura, del material con base de sílice no disuelto como tal, es decir, que excluye un agente funcional incorporado, se conserva.
- 35 9. El método según la reivindicación 1, caracterizado en que el agente biológicamente activo es un ácido nucleico, que se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y plásmidos.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado en que el material con base de sílice no disuelto se almacena durante al menos 1 año y preferiblemente 5 años.
- 40 11. El método según la reivindicación 1, caracterizado en que la fase líquida comprende más de 20 ppm, preferiblemente más de 100 ppm, más preferiblemente aproximadamente 130 a 150 ppm de Si calculado como SiO₂.

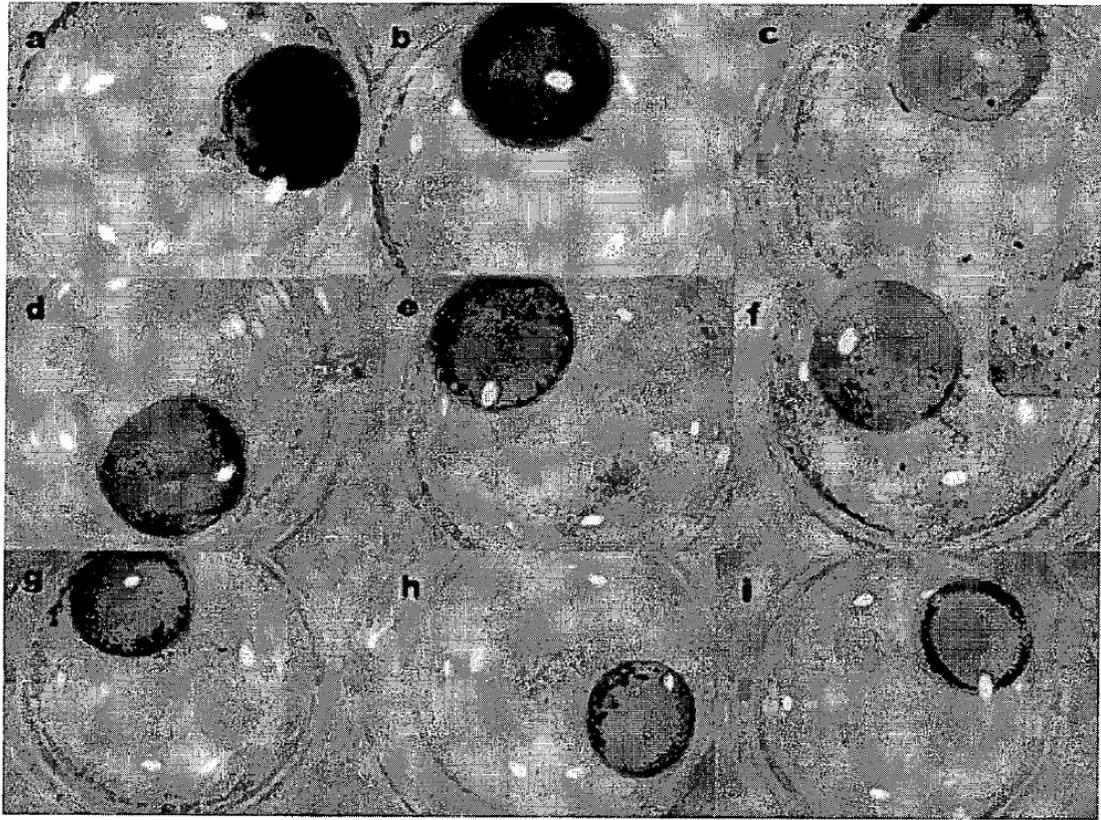


Figura 1

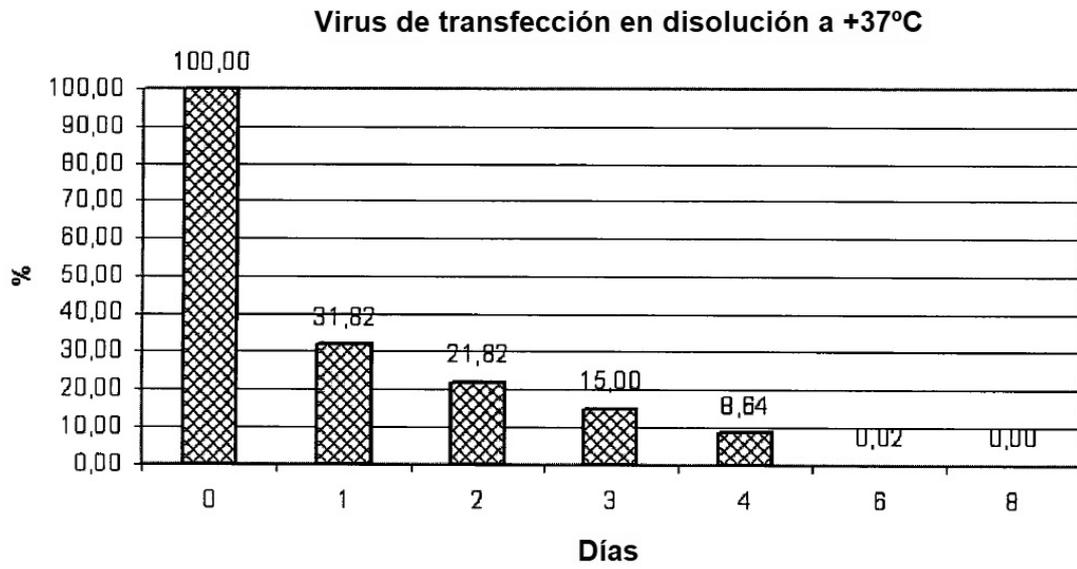


Figura 2

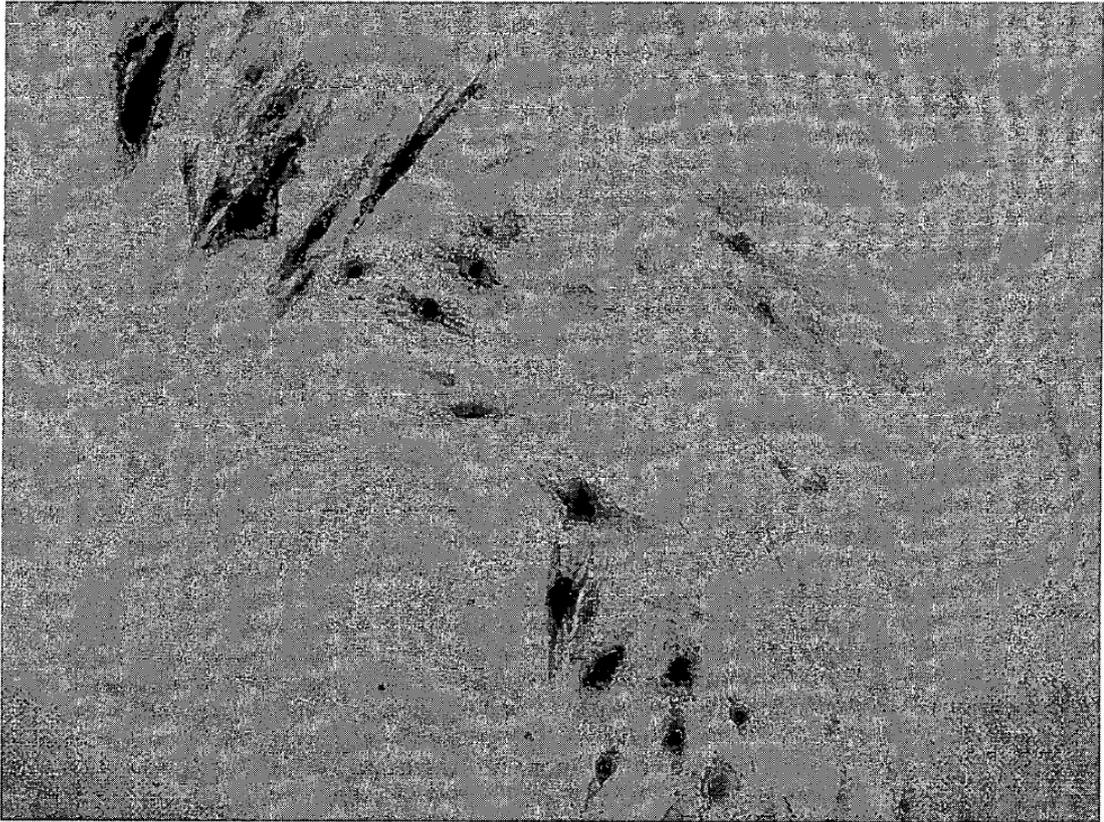


Figura 3

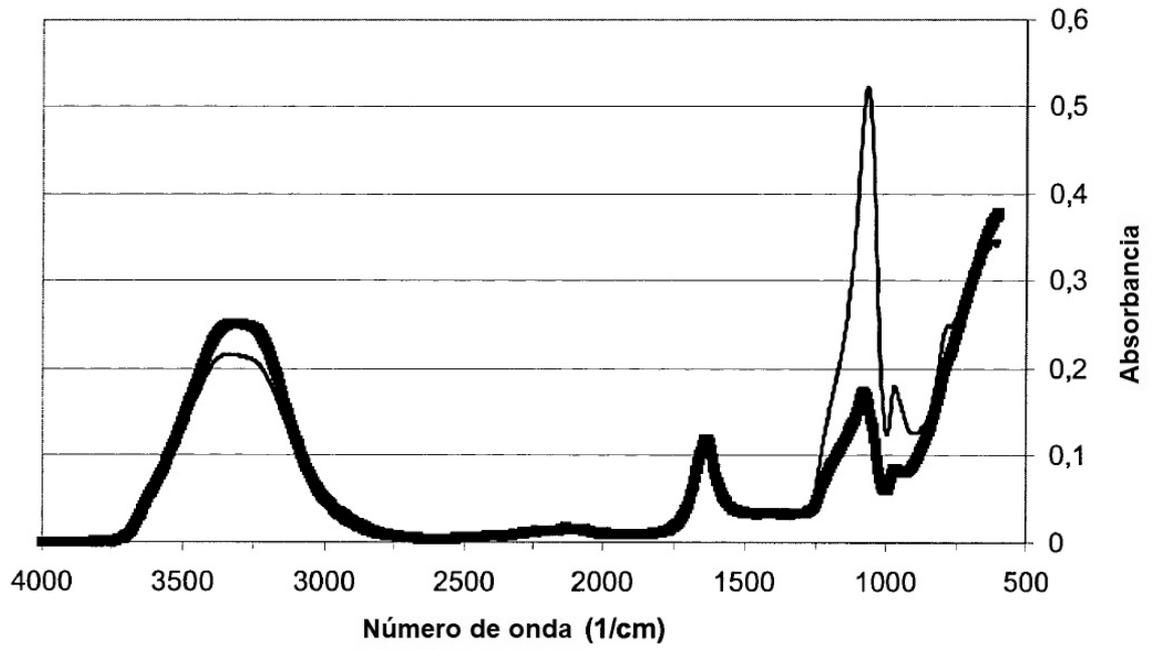


Figura 4