

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 515**

51 Int. Cl.:

C08G 69/48 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

A61K 49/18 (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/EP2012/057271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12724295 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2699620**

54 Título: **Soporte no-particulado de poli-ε-lisina reticulada**

30 Prioridad:
20.04.2011 GB 201106742

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2018

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 2 673 515 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

Soporte no-particulado de poli- ϵ -lisina reticulada

5 La presente invención se refiere a un soporte polimérico no-particulado, 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 no-particulado que comprende poli- ϵ -lisina reticulada, especialmente a un soporte de poli- ϵ -lisina reticulada en macroforma. 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 Con el fin de la presente invención, el término soporte polimérico se usa para describir el polímero en cualquier forma tal como un monolito, una membrana, una fibra a modo de ejemplos, con la excepción de una versión en partículas.

15 La poli- ϵ -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 (ϵ)-amino. Esta estructura es poco usual por que los enlaces amida se forman entre los grupos carboxilo y ϵ -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 α -amino. La polidispersidad en la poli- ϵ -lisina que existe de forma natural normalmente está entre 25-35 aminoácidos. En la poli-lisina comercialmente disponible tradicional, el péptido tiene una polidispersidad poco controlada mucho más ancha que normalmente contiene cualquiera de 5-500 aminoácidos.

20 La poli- ϵ -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- ϵ -lisina es eficazmente un Nylon 5 de α -amino.

25 La poli- ϵ -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- ϵ -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, medicina regenerativa y diagnósticos médicos.

30 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.

35 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 extracción en fase sólida, cristalización y cromatografía.

40 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 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.

45 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., 21, 1057-73, 1979).

55 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

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.

5 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.

10 Se usan frecuentemente materiales poliméricos 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.

15 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).

25 El uso de materiales poliméricos 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 materiales poliméricos de una naturaleza física para adecuarse a la aplicación. Para facilitar el uso, estos materiales poliméricos son frecuentemente monolíticos.

30 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 tiene 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. Estos materiales poliméricos son generalmente rígidos y tienen buenas características de flujo y son adecuados para su uso en columnas rellenas.

35 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- ϵ -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- ϵ -lisina. El documento US2003/103931 se refiere a poli- ϵ -lisina reticulada con compuestos de epíclorhidrina o bis-epoxi. El documento JP1152330 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- α -lisinas que contienen 50-100 grupos lisina.

40 Sigue existiendo la necesidad de encontrar un polímero alternativo y rentable adecuado para su uso como soporte no-particulado, por ejemplo, un soporte monolítico en una amplia variedad de aplicaciones. Los presentes inventores han encontrado ahora que un polímero de poli- ϵ -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.

45 En un primer aspecto, la invención proporciona un polímero de poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado que comprende poli- ϵ -lisina y un reticulante unido por enlaces amida en el que el polímero está reticulada con un reticulante que 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- ϵ -lisina.

55 El polímero de poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado está preferentemente en macroforma. El término "macroforma" significa que el polímero se forma en una forma no-particulado y es monolítico y tiene una forma que es capaz de ser usada o manipulada como una entidad individual a diferencia de en forma de partículas, que requiere múltiples partículas para el uso eficaz. Ejemplos de macroformas incluyen una hoja, una fibra y un artículo, para los presentes

finas un artículo que tiene una longitud significativa en las tres dimensiones a diferencia de una fibra que tiene una longitud significativa en una dimensión y una hoja en dos dimensiones.

5 El polímero no-particulado puede contener poros. El tamaño y la distribución de poros pueden adaptarse según el uso previsto. Preferentemente, el polímero no-particulado contiene macroporos, microporos o supermacroporos o está en forma de un hidrogel microporoso o una fibra.

La invención también proporciona un soporte no-particulado que comprende un polímero de poli- ϵ -lisina reticulada según el primer aspecto de la invención.

10 Realizaciones adicionales del soporte se definen en las reivindicaciones 3 a 5. Preferentemente, el reticulante convierte la poli- ϵ -lisina en insoluble. El polímero de poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 En una realización especialmente preferida, los enlaces entre el reticulante y la poli- ϵ -lisina comprenden enlaces amida, preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 50 %, deseablemente al menos el 90 % y especialmente sustancialmente todos los enlaces son enlaces amida.

45 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.

50 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.

55 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.

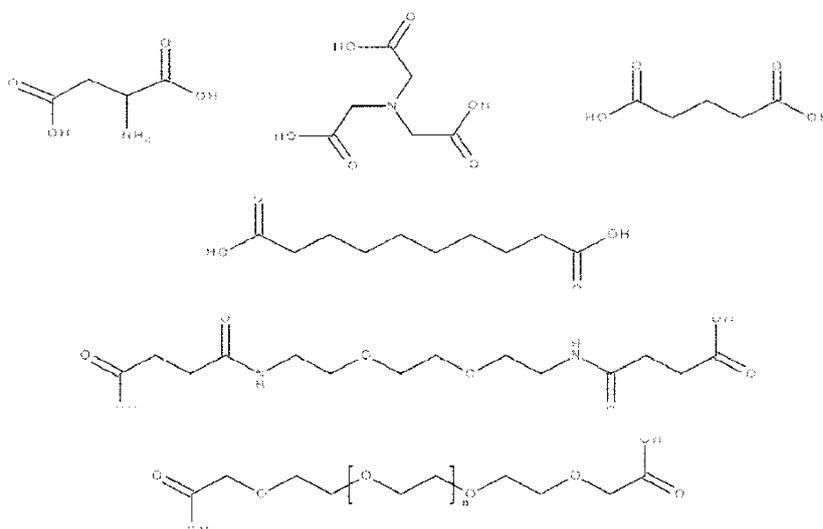
La cadena alifática que une los grupos ácidos puede ser hidrófila, preferentemente un bis-carboxi-poliálquilenglicol, por ejemplo bis-carboxi-poli-etilenglicol, o la cadena alifática puede ser hidrófoba que proporciona un reticulante hidrófobo, por ejemplo, el ácido sebácico proporciona un soporte más lipófilo. El reticulante puede derivar de un material precursor, por ejemplo un anhídrido. Ejemplos de otros reticulantes adecuados incluyen ácido nitrilotriacético, ácido glutárico y $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

La integridad física del soporte no-particulado o macroforma puede deteriorarse o perderse donde el reticulante tenga una longitud de cadena de menos de 5 átomos. En una realización preferida, x comprende un grupo hidrocarbilo y comprende solo átomos de hidrógeno y de carbono, preferentemente 3 a 14, más preferentemente 6 a 12 y especialmente 6 a 8 átomos de carbono. Preferentemente, el reticulante tiene 8 a 10 átomos de carbono. El grupo hidrocarbilo puede ser lineal o ramificado, preferentemente lineal. El grupo hidrocarbilo puede estar saturado o insaturado, preferentemente saturado. Ejemplos de reticulantes preferidos incluyen ácidos dicarboxílicos que tienen 8 a 10 átomos de carbono tales como ácido sebácico y ácido azelaico.

La poli- ϵ -lisina puede ser derivatizada o modificada antes de la reticulación para permitir otra química de reticulación conocida para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la poli- ϵ -lisina puede convertirse en derivados o modificarse antes de la reticulación para permitir otra química de reticulación familiar para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la poli- ϵ -lisina podría ser previamente convertida en derivados mediante reacción con anhídrido glutárico, luego reticularse usando aminas multi-funcionales usando la química de activación descrita en el presente documento.

La poli- ϵ -lisina puede ser reticulada usando un aminoácido, por ejemplo ácido aspártico y ácido glutámico. La poli- ϵ -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.

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:



Mientras que la polidispersidad de la poli- ϵ -lisina no es crítica, en una realización preferida la polidispersidad de la poli- ϵ -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- ϵ -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 α -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.

Adecuadamente, la cantidad relativa de poli- ϵ -lisina y reticulante está seleccionada de forma que la poli- ϵ -lisina sea el principal componente del polímero de poli- ϵ -lisina reticulada. Donde se requiere un polímero completamente reticulado, se seleccionarán las cantidades relativas de polímero de poli- ϵ -lisina y reticulante para proporcionar

- equivalentes molares estequiométricos con respecto a los grupos alfa-amino de la poli-ε-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-ε-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-ε-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-ε-lisina reticulada comprende de más de 0,001 a 20 mmol/g, 0,01 a 10 mmol/g de polímero de poli-ε-lisina reticulada, preferentemente de 0,1 a 8 mmol/g y más preferentemente de 1 a 8 mmol/g especialmente para la síntesis de polipéptidos, por ejemplo, de 1 a 3 mmol/g.
- En otra realización, el polímero de poli-ε-lisina reticulada comprende de 0,01 a 0,3 mmol/g, particularmente ventajoso para la síntesis de secuencias de ácidos nucleicos.
- El polímero de poli-ε-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.
- El soporte de poli-ε-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.
- El polímero de poli-ε-lisina reticulada puede contener un exceso del reticulante para proporcionar funcionalidad carboxilo para una aplicación dada.
- El polímero no-particulado puede 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. La mezcla de poli-ε-lisina y reticulante y los componentes de polimerización, por ejemplo un catalizador e iniciador, se mezclan adecuadamente y se cuecen en la macroforma deseada, por ejemplo una hoja o artículo, o pueden hilarse en una fibra. En el caso de fibras, el polímero puede reticularse después de que las fibras de poli-ε-lisina se hayan hilado o la reticulación puede producirse antes o durante la reticulación. Normalmente se filtran, lavan y clasifican para aislar la distribución del tamaño de partícula requerida. El polímero no-particulado de la invención puede ser poroso, preferentemente macroporoso o microporoso. Estos términos son conocidos para el experto en la materia.
- El término "macroporoso" se refiere a polímeros que normalmente están relativamente altamente reticulados y son rígidos. Un polímero macroporoso normalmente tiene poros en el intervalo de Angstrom (1-5000 Å, es decir, 0,1 a 500 nm).
- El término "microporoso" se refiere a polímeros que tienen un nivel relativamente bajo de material reticulado y que pueden no tener poros como tales, pero se solvatan e hinchan para formar geles en un disolvente apropiado, por ejemplo un hidrogel microporoso. Polímeros o soportes microporosos según la invención son deseablemente de un tamaño tal como para proporcionar un polímero translúcido o preferentemente transparente.
- El término "supermacroporoso" se refiere a polímeros que están normalmente altamente reticulados, pero tienen poros mucho mayores que un polímero macroporoso, por ejemplo, una esponja. Los poros normalmente son del orden de magnitud de micrómetros a mm, normalmente 0,5 μm hasta 1 mm. Adecuadamente, los polímeros o soportes de la invención para cultivo celular tienen poros de 20 μm a 500 μm.
- Es posible producir productos que tengan solo un tamaño de poros o características, pero el polímero a partir del cual se produce el producto puede tener poros más pequeños. Por ejemplo, puede prepararse un producto supermacroporoso que tiene poros en la escala de micrómetros a mm a partir de un polímero que es microporoso o macroporoso. En el Ejemplo 1 más adelante, el producto es supermacroporoso pero el polímero real es microporoso.
- Un polímero o soporte según la invención comprende adecuadamente huecos de 0,01 a 0,5 mm (10 a 500 micrómetros), por ejemplo 0,01 a 0,1 mm (10 a 100 micrómetros). En una realización preferida, el polímero macroporoso comprende huecos de 0,05 a 0,3 mm (50 a 300 micrómetros) y más preferentemente 0,1 a 0,2 mm (100 a 200 micrómetros). 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-ε-lisina reticulada funcionalizada para formar un ácido carboxílico.

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

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

10 El soporte polimérico 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. Pueden emplearse polímeros que tienen ligandos covalentemente unidos a su superficie, o mediante polímeros unidos a la superficie, 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.

El soporte polimérico monolítico 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.

20 El soporte polimérico monolítico 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 el soporte o polímero 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.

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

30 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 proporciona el uso de un soporte o recubrimiento macroporoso o microporoso polimérico según la invención para cultivar células preferentemente sobre la superficie del soporte o recubrimiento. Adecuadamente, pueden cultivarse células madre sobre el soporte polimérico de la invención para reducir la diferenciación incontrolada y para controlar la diferenciación deseada.

55 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.

5 La invención proporciona el uso de poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado o un soporte monolítico 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.

Donde se hace referencia en el presente documento al polímero de la invención en lo que respecta a usos adecuados, el soporte de la invención también es adecuado para tales usos, a menos que se establezca de otro modo.

10 Un producto de tratamiento de heridas se define en las reivindicaciones 10 a 12, mientras que el diagnóstico médico se define en las reivindicaciones 13 a 14, y el uso de un soporte no-particulado se define en la reivindicación 15.

15 En una realización preferida, la invención proporciona una hoja que comprende una poli- ϵ -lisina reticulada que tiene hojas con microporos, macroporos o supermacroporos para su uso en el tratamiento de heridas. Estas hojas pueden usarse internamente tras la cirugía posoperatoria como parches para prevenir la adherencia. Similarmente, el polímero puede usarse *in vivo* para promover la regeneración de tejido.

Estas hojas también pueden usarse para aplicaciones en el tratamiento de heridas externas. Algunas ventajas del polímero descrito en la presente invención radican en la biocompatibilidad, la porosidad, la naturaleza hidrófila y la facilidad de modificación química. La modificación química permite la unión de otras especies tales como proteínas de unión a células, péptidos de unión a células, o péptidos anticoagulantes a modo de ejemplos.

20 Ventajas particulares del polímero descrito en la presente invención resultan de su biocompatibilidad y en algunas circunstancias el potencial de ser bioresorbidos *in vivo* para producir sustancias que existen de forma natural tras la degradación enzimática.

25 Las hojas del polímero tienen posibles usos en aplicaciones sanitarias, por ejemplo como un absorbente en pañales. Otro ejemplo de aplicación del polímero en forma de hoja sería la administración de agentes antibióticos, antimicrobianos y antifúngicos para la asistencia médica femenina. En particular, las propias hojas de polímero pueden tener propiedades antisépticas útiles ya que la poli- ϵ -lisina tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas. Los reticulantes ácido sebácico y ácido dodecanodioico también son antisépticos, de manera que las hojas de polímero con exceso de reticulante también pueden tener propiedades antisépticas y se prefieren.

30 Una hoja, artículo o fibra se define en la reivindicación 9. 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 Adecuadamente, el soporte comprende microporos y puede prepararse en forma clara. El polímero puede proporcionar adecuadamente un polímero de sustitución para aplicaciones ópticas que incluyen lentes de contacto y vendas corneales, por ejemplo. El polímero puede ser moldeado en forma de una lente de contacto. En esta forma, el polímero puede proporcionar una superficie antibacteriana y antifúngica y también podría usarse para la lenta liberación de fármacos. Las propiedades ópticas de las formas claras del polímero también tienen aplicaciones en instrumentos ópticos tales como microscopios y telescopios.

La invención proporciona un procedimiento de producción de una lente que comprende combinar poli- ϵ -lisina y un reticulante en presencia de un catalizador de polimerización y moldear en un receptáculo en forma de lente para producir un monolito microporoso transparente.

5 Se han preparado estructuras macroporosas tridimensionales para una amplia variedad de aplicaciones. Éstas incluyen monolitos porosos como fases estacionarias para cromatografía, discos porosos para la filtración de especies, materiales porosos para bombas electroosmóticas, soportes sólidos para la síntesis en fase sólida y otras transformaciones químicas, materiales aislantes, membranas porosas para su uso en aplicaciones de celdas de combustible y armazones multidimensionales para la ingeniería de tejido.

10 Los problemas asociados a las actuales tecnologías para la preparación de estructuras 3D se refieren principalmente a la incapacidad de crear dimensiones de poros y canales de interconexión bien definidos. En circunstancias donde las dimensiones de poro se definen mejor, la variedad de tipos de polímero que puede aplicarse está limitada.

En una realización preferida, la estructura 3D se forma por auto-ensamblaje del polímero macroporoso.

15 En aplicaciones cromatográficas, las estructuras 3D se denominan frecuentemente monolitos. Cuando los monolitos se usan para aplicaciones cromatográficas, la estructura 3D sustituye la fase estacionaria en partículas tradicional. A diferencia de la difusión, que es la fuerza impulsora típica para la transferencia de masa dentro de los poros de fases estacionarias en partículas, este flujo convectivo a través de los poros de un monolito permite un aumento sustancial en la velocidad de separación de grandes moléculas tales como proteínas, por ejemplo. Normalmente, el material monolítico se prepara en un molde plano o tubular, se saca la hoja o cilindro del molde, y el polímero poroso se perfora o corta en rebanadas para obtener discos. Los poros dentro de estos monolitos se incorporan mediante la adición de porógenos. En los monolitos basados en sílice, por ejemplo, los porógenos normalmente son moléculas grandes tales como polietilenglicoles. En monolitos basados en poliestireno, por ejemplo, el porógeno es frecuentemente tolueno. Los porógenos actualmente en uso introducen una amplia distribución de tamaños de poro con conectividad imprecisa que es perjudicial para el rendimiento cromatográfico de los monolitos. Las columnas monolíticas preparadas a partir de la poli- ϵ -lisina reticulada de la presente invención son especialmente útiles en cromatografía y una amplia variedad de aplicaciones de cromatografía, por ejemplo cromatografía de afinidad, de intercambio iónico, de fase inversa, de fase normal y quiral.

20

25

La estructura tridimensional (3D) se define en las reivindicaciones 6 a 8. Las celdas de combustible de membrana de intercambio protónico, también conocidas como celdas de combustible de membrana de electrolito polimérico (PEM), son un tipo de celda de combustible que se desarrolla para aplicaciones de transporte, por ejemplo. Estas celdas de combustible PEM usan una membrana de electrolito polimérico especial que, entre sus propiedades, debe dar flujo convectivo eficiente que viene impuesto por la estructura de poros uniforme. Las propiedades químicas y físicas adicionales que pueden ser únicamente aplicadas usando la tecnología descrita en el presente documento pueden proporcionar beneficios añadidos a este campo. El polímero de la presente invención puede ser fácilmente modificado para introducir una variedad de características que se aplicarían en este campo.

30

35

Un polímero macroporoso 3D preparado usando el polímero de la invención 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.

40 La invención es particularmente útil en soportar catalizadores de metales preciosos, por ejemplo catalizadores de paladio. Un ejemplo ventajoso particular es acetato de paladio soportado sobre poli- ϵ -lisina reticulada funcionalizada para formar un ácido carboxílico.

La naturaleza quiral de la poli- ϵ -lisina también puede conferir una selectividad quiral a tales catalizadores.

45 El polímero macroporoso 3D de la invención puede usarse en cualquier procedimiento químico o físico en el que se usa un soporte sólido.

El polímero macroporoso 3D o un recubrimiento de polímero pueden emplearse en aplicaciones que implican polímeros electroconductores y emisores de luz. El soporte en partículas que contiene polímeros emisores de luz puede disponerse sobre paneles de visualización.

50 El polímero macroporoso 3D es particularmente útil para la síntesis en fase sólida de una especie orgánica, particularmente macromoléculas. En una realización preferida, el polímero macroporoso 3D puede emplearse en la síntesis de péptidos, oligonucleótidos u oligosacáridos.

55 El polímero macroporoso 3D según la invención simplifica la síntesis en fase sólida mediante el uso de equipo más simple que el convencionalmente empleado. El polímero macroporoso 3D puede usarse él mismo en forma monolítica en un sistema basado en columna. En este caso, el polímero que forma el polímero macroporoso 3D proporciona el soporte para la síntesis en fase sólida.

Si el polímero macroporoso 3D se forma alrededor de un soporte de polímero tradicional para la síntesis en fase sólida, el polímero macroporoso 3D puede ser inerte y simplemente proporcionar un esqueleto mecánico para soportar el polímero tradicional para la síntesis en fase sólida.

5 En los dos ejemplos descritos anteriormente, el polímero macroporoso 3D puede encapsularse dentro de perlas semilla como se describe en la patente WO2008/012064.

10 En una realización preferida, el polímero reticulado de la invención está en forma de un polímero macroporoso 3D y puede usarse para inmovilizar especies que incluyen proteínas, polipéptidos, anticuerpos, oligonucleótidos, enzimas, células completas o flúor. El polímero macroporoso puede estar dispuesto en una matriz, siendo cada polímero macroporoso 3D en la matriz usado para ensayar un componente diferente de una solución. Los polímeros macroporosos 3D que tienen ligandos covalentemente unidos a su superficie o mediante polímeros unidos a la superficie pueden emplearse en 'pocillos'. Entonces puede detectarse la unión específica de un ligando diana tal como antígeno o secuencia de ADN o ARN complementaria usando procedimientos establecidos.

15 El polímero macroporoso 3D de la invención también puede emplearse para inmovilizar un biocatalizador. 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. Los problemas observados para la síntesis en fase sólida y cromatografía citados en el presente documento pueden observarse similarmente con la extracción en fase sólida. El polímero macroporoso 3D de la invención proporciona ventajas similares a las proporcionadas en cromatografía y síntesis en fase sólida.

20 El polímero macroporoso 3D 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 se emplea comúnmente en la fabricación de biodiésel. Además, el flujo convectivo mejorado a través de la estructura de polímero macroporoso 3D de la presente invención puede ser particularmente adecuado para el flujo de aceites vegetales viscosos a través de la matriz y, por tanto, encuentran aplicación particular para la fabricación de biodiésel.

25 En aún 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, agentes 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 ser preparadas en células de animales. Un ejemplo importante de una proteína compleja tal es la hormona eritropoyetina. El coste de cultivar cultivos de células de mamífero es alto, por lo que las empresas están constantemente buscando mejorar las técnicas.

30 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).

35 La invención descrita en el presente documento permite la preparación de un polímero biodegradable que proporciona un entorno más natural para el cultivo celular mientras que proporciona un material biodegradable que puede manipularse para liberar solo aminoácidos que existen de forma natural tras la degradación. Estas estructuras de polímero macroporoso 3D, comúnmente denominadas supermacroporosas cuando se crean poros superiores a 100 μm , son susceptibles a la rápida migración de células y nutrientes en condiciones estáticas y convencionales. Las estructuras de polímero macroporoso 3D de la presente invención pueden fabricarse o moldearse en casi cualquier forma o tamaño y, por tanto, proporcionan un armazón importante para la medicina regenerativa. La gelatina es colágeno hidrolizado donde enlaces amida inter e intracatenarios han sido químicamente hidrolizados para formar cadenas de péptidos solubles. 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. La invención descrita en el presente documento permite la preparación de un polímero biodegradable que proporciona un entorno más natural para otras aplicaciones de cultivo celular. La invención puede emplearse en el cultivo de algas tales como *Botryococcus braunii*, para la producción de biocombustible. La poli- ϵ -lisina reticulada preparada como un armazón macroporoso 3D puede proporcionar un entorno fácilmente modificado para el cultivo de algas y diseñarse para ser flotante sobre la superficie de estanques, proporcionando acceso mejorado a la luz UV.

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 soporte en partículas, soporte macroporoso, soporte o recubrimiento microporoso según la invención y un material funcional tal como una enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano picante, soportado por el polímero en el soporte para reaccionar selectivamente con o unirse al compuesto que va a detectarse.

5 Muchos diagnósticos médicos se basan en soportes sólidos para inmovilizar diversos ligandos de diagnóstico. El polímero macroporoso 3D de la presente invención puede usarse en un procedimiento de diagnóstico médico donde se requiere la separación física de la fase sólida mediante una fase líquida. Aplicaciones de diagnóstico, cribado y de bibliotecas de compuestos frecuentemente usan sistemas de micromatrices. Es posible combinar poli- ϵ -lisina, reticulante y agentes de activación por separado mediante una impresora sobre una variedad de superficies para establecer disposiciones precisas para micromatrices. Similarmente, podría usarse una técnica de impresión para preparar una piel artificial para el cuidado de heridas y medicina regenerativa.

10 En una realización adicional, el polímero puede ser fabricado en fibras bien mediante electro-hilado o por técnicas tradicionales para la fabricación de fibras. Esteras de fibra, fibras sueltas o fibras tejidas tendrán aplicaciones en todos los campos descritos.

15 El polímero también puede aplicarse pulverizando, de manera que puede proporcionar recubrimientos útiles para una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, recubrimientos antimicrobianos y antifúngicos.

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.

20 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.

25 La Figura 6 muestra una SEM del producto del Ejemplo 1 antes de la disolución de los globos de poliacrilonitrilo.

Las Figuras 7a y 7b muestran SEM de la hoja supermacroporosa auto-ensamblada del Ejemplo 2.

Las Figuras 8a, 8b y 8c muestran muestras seccionadas de las células teñidas que muestran proliferación a través del polímero del Ejemplo 3.

30 La Figura 9 muestra muestras seccionadas de las células teñidas que muestran proliferación a través del polímero en el Ejemplo 4.

La Figura 10 muestra una fotografía del tubo supermacroporoso auto-ensamblado del Ejemplo 6.

La Figura 11 muestra una SEM de la estera de nanofibra reticulada resultante del Ejemplo 9.

La Figura 12 muestra una fotografía de la lente del Ejemplo 10.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

35 **Ejemplo 1 - Preparación de poli- ϵ -lisina reticulada supermacroporosa**

Se disolvió poli- ϵ -lisina (200 mg, 1 mmol de contenido de amina) en DMF/agua (2,45 cm³, 1:1 v/v) y se añadió NMM (0,137 cm³, 1,2 mmoles) seguido de anhídrido glutárico (70 mg, 0,6 mmoles de anhídrido glutárico, es decir, un exceso con respecto a la amina). Se dejó que la reacción avanzara durante 2 horas.

40 Se añadió N-hidroxisuccinimida (143 mg) seguido de Expancel 920 DEX 80 d30 (80 μ m de globos de poliacrilonitrilo) (50 mg, \sim 3 cm³) y se añadió EDCI (224 mg, 1,2 mmoles) para iniciar la polimerización. La mezcla se mezcló cuidadosamente durante 1 minuto, se moldeó en una hoja sobre una superficie de polipropileno antes de cortar en discos usando un horador. Se dejó que la polimerización se completara durante la noche a temperatura ambiente.

45 Una SEM del producto antes de la disolución de los globos de poliacrilonitrilo se muestra en la Figura 6. Las cavidades mostradas tienen aproximadamente 20 a 100 micrómetros de tamaño como se muestra comparando con la barra de escala de 300 micrómetros en la porción derecha inferior de la figura.

Los discos preparados anteriormente se trataron con DMF durante la noche para disolver los globos de poliacrilonitrilo, luego se lavaron cuidadosamente con tampón fosfato potásico (100 mmol/dm³, pH 7) y agua antes de la liofilización del agua.

La poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa que se ha usado mostró que soportaba el crecimiento tridimensional y la proliferación de células madre embrionarias humanas.

Ejemplo 2 - Preparación de una hoja de poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa auto-ensamblada

5 Se preparó una solución que contenía poli-ε-lisina (4,93 g, 28,7 mmoles de contenido de amina), ácido dodecanodioico (3,47 g, 30 mmoles de contenido de carboxilo) e hidróxido sódico (1,15 g, 28,7 mmoles) en agua (100 cm³).

Se añadió una solución de EDCI (14,46 g, 75 mmoles) y HONSu (1,65 g, 14 mmoles) en agua (30 cm³) a la solución anterior y la mezcla se vertió inmediatamente en una bandeja para formar una capa de 5 mm de profundidad.

10 Después de 20-30 minutos, la mezcla había solidificado formando una hoja supermacroporosa de 5 mm de espesor. La hoja se lavó cuidadosamente con agua, luego se secó por liofilización.

Las SEM de la hoja supermacroporosa auto-ensamblada se muestran en la Figura 7a y 7b.

Ejemplo 3 - Cultivo 3D de células madre embrionarias de ratón (ESC) sobre poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa auto-ensamblada

15 Se lavaron discos supermacroporosos cortados de la hoja anterior con solución salina tamponada con fosfato (3xPBS) y se irradiaron con UV durante 30 min antes del contacto con las células.

Los discos se sembraron con células madre embrionarias de ratón y se cultivaron en DMEM de alta glucosa Advanced™ (Gibco, Invitrogen, RU) complementado con β-mercaptoetanol 1 mM (Gibco, Invitrogen, RU), L-glutamina 2 mM (Gibco, Invitrogen, RU), 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF) (Millipore, RU) y 2 % de suero bovino fetal (PAA). Este medio se cambió cada dos días.

20 La inmunotinción de ESC en contacto con polímero implicó fijar las células en 4 % de paraformaldehído (PFA), seguido de lavado con PBS (3x). Las células se incubaron con solución de bloqueo (10 % de suero bovino fetal, 0,1 % de Triton X-100 en PBS) a TA durante 40 min. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadió solución de anticuerpo primario (Oct4/Nanog), las células se incubaron a 4 °C durante la noche. Las células se lavaron (3xPBS), y se añadió solución de anticuerpo secundario y se incubó a TA durante 2 h, tras lo cual las células se lavaron (3xPBS) y se contratiñeron con marcador de núcleos, DAPI (1 cm³ de DAPI: 1 μl (1/100** de solución madre de trabajo + 1 ml de PBS), se incubaron a TA en la oscuridad durante 5 min. Las células se lavaron tres veces en PBS y se montaron sobre un portaobjetos con un cubreobjetos y medio de montaje fluorescente.

Muestras seccionadas de las células teñidas que muestran proliferación a través del polímero se muestran en la Figura 8a, 8b y 8c.

30 Se sembraron ESC sobre polímeros, para determinar la unión de ESC y, lo que es más importante, el efecto que el polímero tiene sobre la auto-renovación de ESC con el tiempo.

35 En la Figura 8a se sembraron ESC sobre polímeros supermacroporosos y se dejó que proliferaran durante 7 días. Después de 7 días, las ESC y los polímeros se fijaron, se incorporaron en gelatina, se congelaron y se seccionaron, antes de la co-tinción con DAPI (azul) y fosfatasa alcalina (roja). El polímero soporta la viabilidad y unión de ESC, y las ESC retienen la expresión de fosfatasa alcalina. La barra de escala representa 100 μm y las imágenes son representativas de la población completa. El experimento se repitió 3 veces.

40 Para la Figura 8b, se sembraron ESC sobre polímeros supermacroporosos y se dejó que proliferaran durante 7 días. Después de 7 días, las ESC y los polímeros se fijaron, se incorporaron en gelatina, se congelaron y se seccionaron, antes de la tinción con marcador de auto-renovación, nanog (verde). Se muestra que el polímero soporta la unión de ESC; además, las ESC siguen siendo positivas para nanog, así mantienen la capacidad de auto-renovación. La barra de escala representa 25 μm. Las imágenes son representativas de la población completa.

45 En la Figura 8c, se sembraron ESC sobre polímeros supermacroporosos y se dejó que proliferaran durante 7 días. Después de 7 días, las ESC y los polímeros se fijaron, se incorporaron en gelatina, se congelaron y se seccionaron, antes de la co-tinción con marcador de auto-renovación Oct4 (rojo) y marcador de núcleos DAPI (azul). El polímero soporta la unión de ESC, además las ESC siguen siendo positivas para Oct4, manteniendo, por tanto, la capacidad de auto-renovación. La barra de escala representa 50 μm. Las imágenes son representativas de la población completa.

50 El polímero soportó la unión de ESC y además las ESC retuvieron la expresión de fosfatasa alcalina durante hasta 7 días. Similarmente, las ESC mantuvieron la expresión de marcadores de auto-renovación, factores de transcripción, Nanog y Oct4 después de 7 días. Conjuntamente, esto sugiere que este polímero específico no solo soporta la viabilidad de ESC, sino que soporta el mantenimiento de pluripotencia de ESC, crucial en cualquier condición de cultivo de aumento de escala de ESC.

Ejemplo 4 - Cultivo 3D de células de riñón sobre poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa auto-ensamblada

Se lavaron discos supermacroporosos cortados de la hoja anterior con solución salina tamponada con fosfato (3xPBS) y se irradiaron con UV durante 30 min antes del contacto con las células.

5 Los discos se sembraron con células madre de riñón (KSC) y se cultivaron en DMEM de alta glucosa (Gibco, Invitrogen, RU) complementado con 10 % de suero de bovino fetal (PAA), L-glutamina 2 mM (Gibco Invitrogen, RU), 1 % de NEAA (Gibco, Invitrogen, RU), 2-β-mercaptoetanol 1 mM (Gibco Invitrogen, RU). Este medio se cambió cada dos días.

10 Se sembraron KSC (teñidas con GFP) sobre el polímero y se monitorizó la unión/interacción. Inicialmente, en el día 1, las KSC siguieron estando redondeadas sobre la superficie, sin embargo, en el día 10, la morfología de KSC parece normalmente aplanada alrededor de la superficie del polímero.

Muestras seccionadas de las células teñidas que muestran proliferación a través del polímero se muestran en la Figura 9. Se sembraron KSC GFP sobre polímero supermacroporoso y se monitorizó la unión/interacción. Inicialmente, en el día 1, las KSC siguieron estando redondeadas sobre la superficie, sin embargo, en el día 10, la morfología de KSC parece normalmente aplanada alrededor de la superficie del polímero.

15 Ejemplo 5 - Cultivo de células nerviosas de Schwann sobre poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa auto-ensamblada

20 Se dispusieron por triplicado muestras del polímero supermacroporoso en pocillos de una placa de cultivo de tejido de 12 pocillos y se esterilizó por UV durante 1 hora antes de hidratar las muestras en medio de crecimiento celular de Schwann [SCGM (DMEM + 10 % de FBS + GGF + forskolina)]. Se sembraron dos densidades celulares (500.000 y 50.000 células de Schwann) sobre cada una de los armazones de polímero supermacroporoso en SCGM. Se usó el ensayo de absorbancia de azul de Alamar para probar la proliferación celular.

Los resultados del azul de Alamar muestran que las células de Schwann se unen inicialmente y sobreviven en los armazones de polímero supermacroporoso después de 24 horas. Se dejó que progresara la proliferación celular global durante un periodo de 5 días en todas las muestras probadas.

25 En resumen, se demostró la unión de células de Schwann inicial y el crecimiento por la reducción de azul de Alamar a las 24 horas en todas las muestras probadas. Todos los materiales probados soportaron la supervivencia a largo plazo de las células de Schwann y, por tanto, son biomaterial adecuado para soportar la regeneración nerviosa.

Ejemplo 6 - Preparación de un tubo de poli-ε-lisina reticulada supermacroporosa auto-ensamblada

30 Se preparó una solución que contenía poli-ε-lisina (4,93 g, 28,7 mmoles de contenido de amina), ácido dodecanodioico (3,47 g, 30 mmoles de contenido de carboxilo) e hidróxido sódico (1,15 g, 28,7 mmoles) en agua (100 cm³).

Se añadió una solución de EDCI (14,46 g, 75 mmoles) y HONSu (1,65 g, 14 mmoles) en agua (30 cm³) a la solución anterior y la mezcla se vertió inmediatamente en un molde tubular.

35 Después de 20-30 minutos, la mezcla había solidificado formando un tubo de 15 mm de diámetro externo con un espesor de pared de 5 mm. El tubo se lavó cuidadosamente con agua, luego se secó por liofilización.

Una fotografía del tubo supermacroporoso auto-ensamblado se muestra en la Figura 10.

Ejemplo 7 - Preparación de un monolito de columna supermacroporoso para separaciones cromatográficas

40 Se preparó una solución que contenía poli-ε-lisina (0,49 g, 2,9 mmoles de contenido de amina), ácido dodecanodioico (0,35 g, 3,0 mmoles de contenido de carboxilo) e hidróxido sódico (0,115 g, 2,9 mmoles) en agua (10 cm³).

Se añadió una solución de EDCI (1,45 g, 7,5 mmoles) y HONSu (0,165 g, 1,4 mmoles) en agua (3 cm³) a la solución anterior y la mezcla se usó inmediatamente para llenar una columna de HPLC vacía (4,6 mm de diámetro x 10 cm).

Después de 20-30 minutos, la mezcla había solidificado formando un monolito. El monolito se lavó cuidadosamente con agua en un sistema de HPLC.

45 Ejemplo 8 – Inmovilización de proteína A sobre monolito de columna supermacroporoso de poli-ε-lisina reticulada para la purificación de anticuerpos**Acoplamiento de rProteína A a poli-ε-lisina reticulada**

50 Se disolvió N-hidroxisuccinimida (1 g) en tampón MES frío (25 mmol/dm³, pH 5,0, 2,5 cm³) y se mezcló con EDCI (1 g) disuelto en tampón MES (25 mmol/dm³, pH 5,0, 2,5 cm³). Esta solución se pasó a través del monolito usando una bomba de HPLC. El monolito se lavó con tampón MES (25 mmol/dm³, pH 5,0, 50 cm³) e inmediatamente se

pasó una solución de rProteína A (5 cm³, 4 mg/cm³ en 25 mmol/dm³ de MES, pH 5,0) sobre la columna y se dejó que reposara durante la noche. El monolito se lavó con Trizma-HCl (30 cm³ pH 7,4) para bloquear cualquier éster de N-hidroxisuccinimida restante sobre el polímero. El monolito se lavó con agua (100 cm³) y se guardó en agua.

5 Se probó el monolito basado en proteína A para determinar si retuvo IgG humana en condiciones normales conocidas para aquellos expertos en la materia. Se mostró que la columna retenía IgG humana como era de esperar.

Ejemplo 9 - Preparación de una fibra electrohilada

10 Se electrohiló (24 kV, 0,5 cm³/h) una solución que contenía poliacrilonitrilo (0,8 g, 150.000 de peso molecular promedio), poli-ε-lisina (0,4 g) y ácido sebácico (0,24 g) en DMSO (6 cm³) sobre un tambor de rodillos a 40 °C y 30 % de humedad.

Se trató una porción (5 cm²) de la estera de fibra electrohilada producida con una solución acuosa de EDCI (1 g en 5 cm³ de agua) durante 1 h, luego se lavó cuidadosamente con agua. La estera de fibra reticulada resultante se lavó cuidadosamente con N,N-dimetilformamida para eliminar el soporte de PA, luego se lavó con metanol antes de secar al aire.

15 Una SEM de la estera de nanofibra reticulada resultante se muestra en la Figura 11.

Ejemplo 10 - Preparación de una lente ópticamente clara

Se preparó una solución que contenía poli-ε-lisina (0,49 g, 2,9 mmoles de contenido de amina), ácido sebácico (0,15 g, 1,45 mmoles de contenido de carboxilo) e hidróxido sódico (0,06 g, 1,5 mmoles) en agua (1,5 cm³).

20 Se añadió una solución de EDCI (0,83 g, 4,35 mmoles) en agua (1 cm³) a la solución anterior y la mezcla se usó inmediatamente para llenar la base de tubos de ensayo de polipropileno para demostrar la capacidad de moldear una lente.

Después de 20-30 minutos, la mezcla había solidificado formando un polímero claro que se parecía a una lente de contacto. La lente se lavó cuidadosamente con agua, luego se dejó secar al aire.

Una fotografía de la lente se muestra en la Figura 12.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polímero de poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado que comprende poli- ϵ -lisina y un reticulante unido por enlaces amida, en el que el polímero se reticula con un reticulante que comprende dos o más grupos ácido carboxílico y una cadena alifática que une los dos o más grupos reaccionando con una amina del carbono alfa de la poli- ϵ -lisina.
2. Un soporte no-particulado que comprende un polímero según la reivindicación 1.
3. Un soporte no-particulado según la reivindicación 2, en el que la poli- ϵ -lisina reticulada se usa para recubrir un medio no-particulado directa o indirectamente.
- 10 4. Un soporte no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que la poli- ϵ -lisina reticulada se usa para recubrir un medio no-particulado orgánico o un medio no-particulado inorgánico.
- 15 5. Un soporte basado en poli- ϵ -lisina reticulada no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la poli- ϵ -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.
6. Una estructura tridimensional que comprende una poli- ϵ -lisina reticulada según la reivindicación 1.
7. Una estructura macroporosa tridimensional según la reivindicación 6 recubierta con poli- ϵ -lisina reticulada en la que la poli- ϵ -lisina reticulada usada para recubrir está unida covalentemente a la estructura microporosa, macroporosa o de fibra directa o indirectamente.
- 20 8. Una estructura de poli- ϵ -lisina reticulada tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en la que la poli- ϵ -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 9. Una hoja, artículo o fibra que comprende un polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o un soporte no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o una estructura reticulada tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 30 10. Un producto de tratamiento de heridas que comprende un polímero según la reivindicación 1, un soporte no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o una estructura reticulada tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
11. Un producto para el tratamiento de heridas según la reivindicación 10, que comprende además un componente o una composición para tratar una herida y/o un agente terapéutico.
- 35 12. Un producto de tratamiento de heridas según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el polímero o soporte está en forma de una hoja.
13. Un diagnóstico médico que comprende un soporte no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o una estructura reticulada tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que comprende además un material funcional unido al soporte o retenido por el soporte.
- 40 14. Un diagnóstico médico según la reivindicación 13, en el que el material funcional comprende una enzima soportada por el polímero.
- 45 15. Uso de un soporte no-particulado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o una estructura reticulada tridimensional según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 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 la separación cromatográfica; para su uso como un absorbente o como un vehículo biodegradable para un producto de liberación controlada, en la producción de una lente o en la fabricación enzimática de biodiésel.
- 50

Figura 1

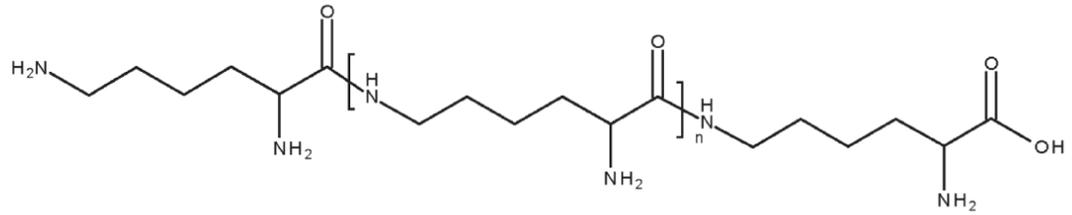


Figura 2

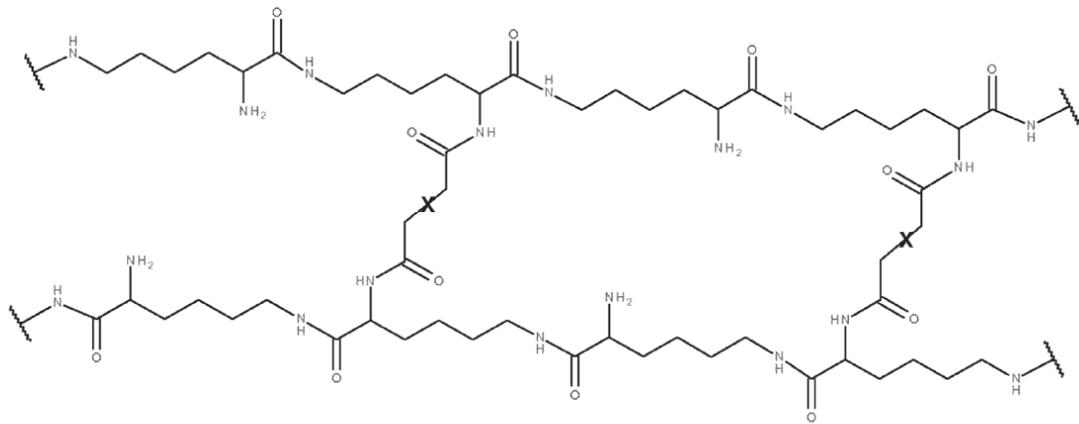


Figura 3

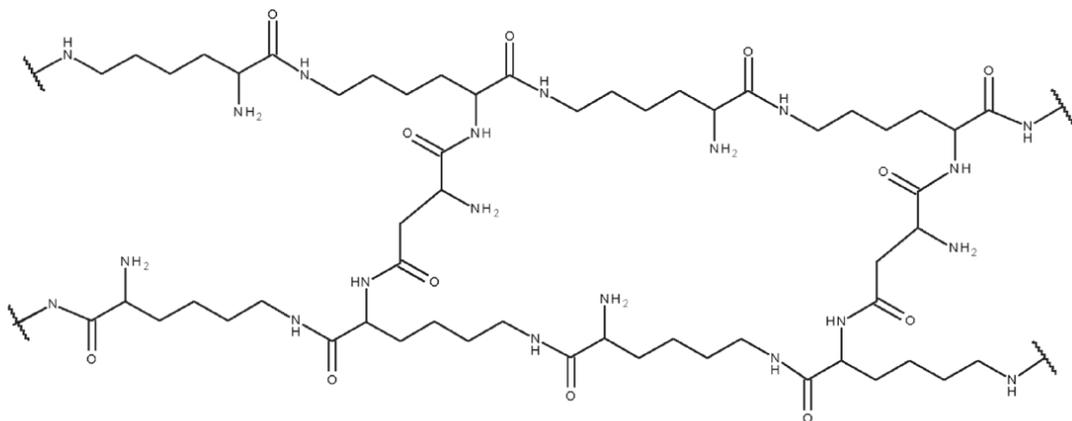


Figura 4

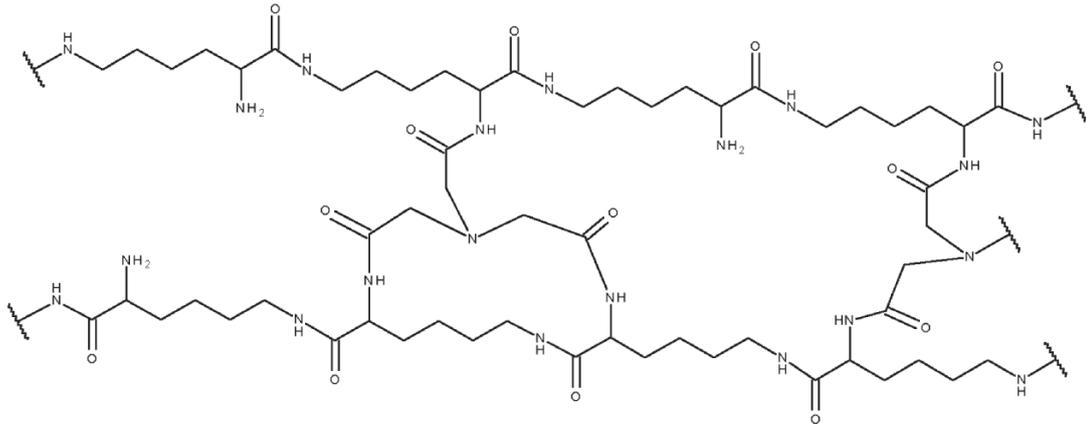


Figura 5 5

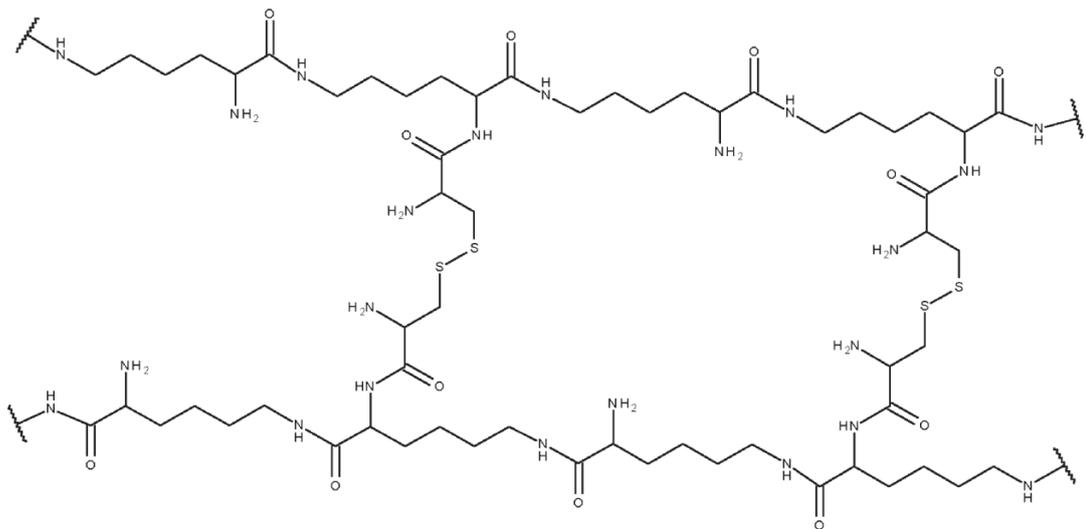
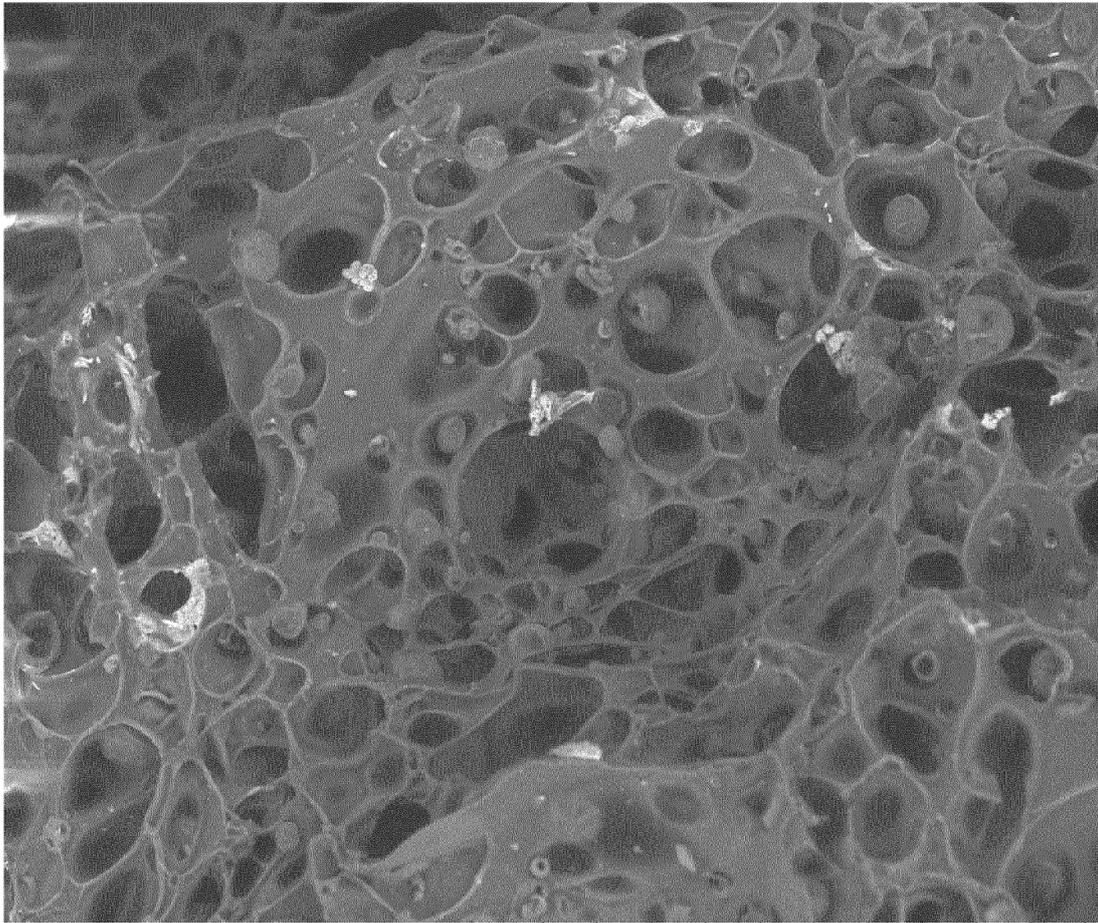


Figura 6



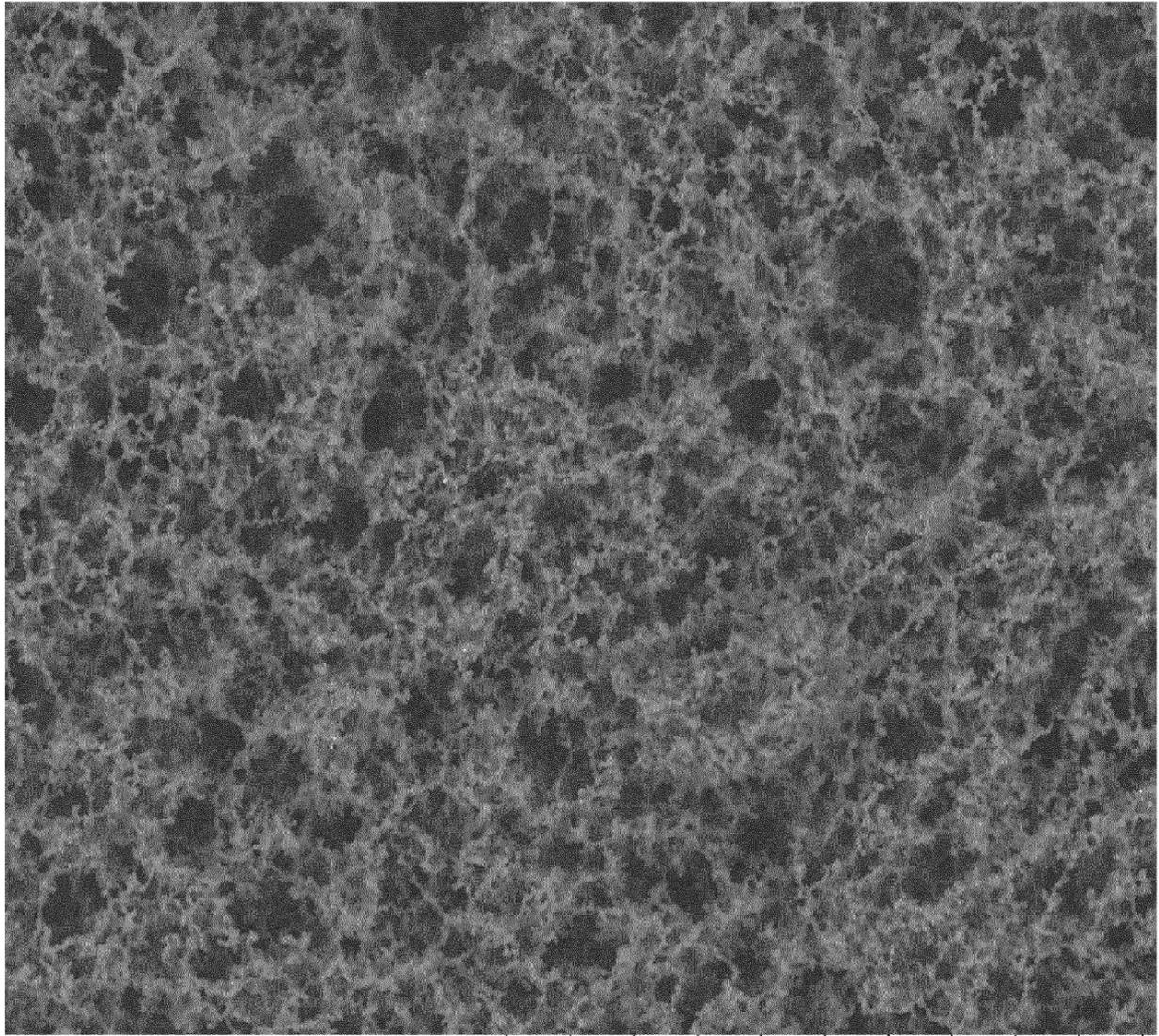
TM3000_0018

11/01/2011

14:36 HL

300 um

Figura 7a



310BProj68

27/09/2011

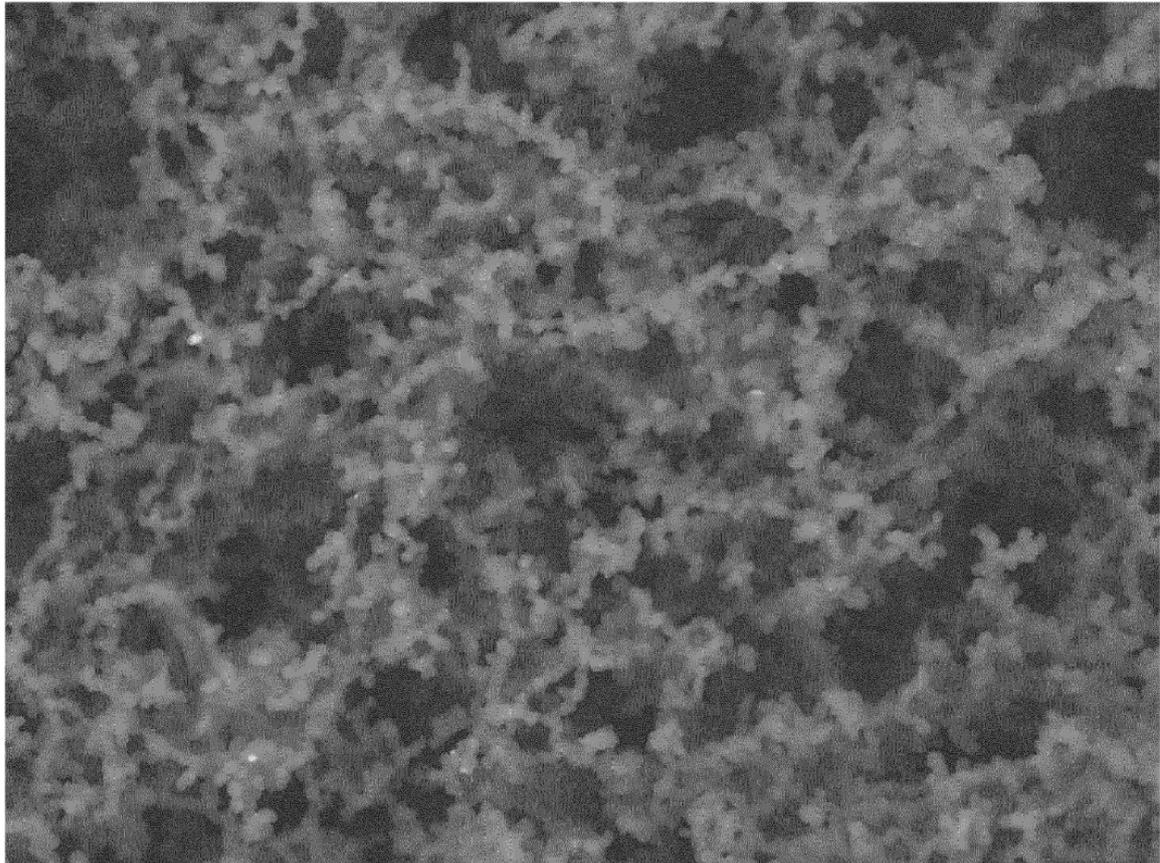
14:41 HL

D5,5

x500

200 um

Figura 7b



310BProj68

27/09/2011

14:43 HL

D5,5 x1,5k

50 um

Figura 8a

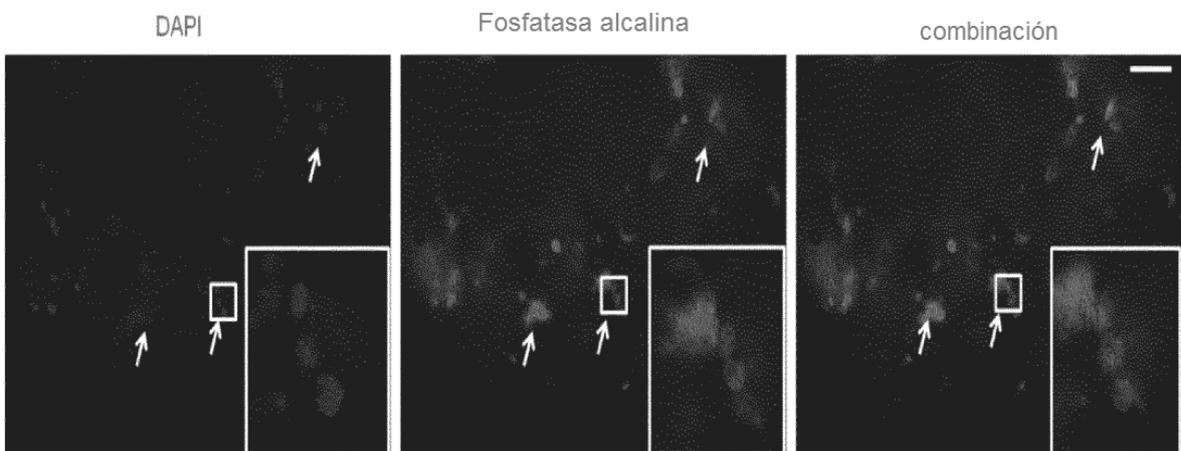


Figura 8b



Figura 8c

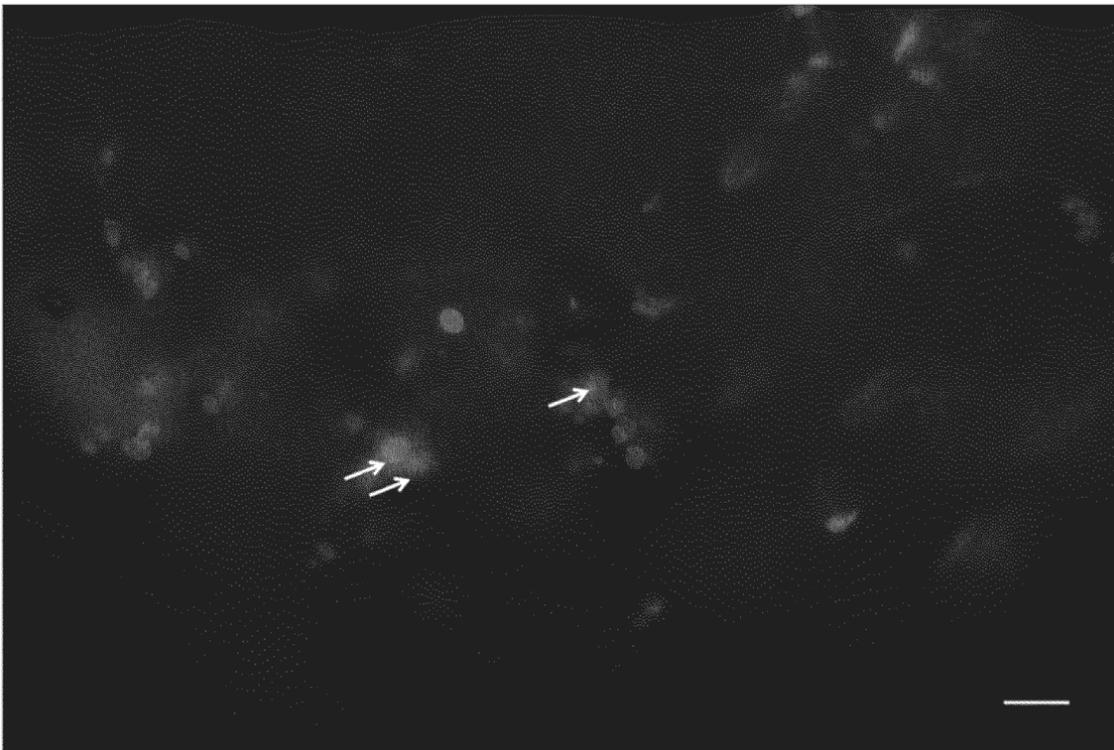


Figura 9

Polímero 3D sin perla_ + células madre de riñón GFP (verde)

1 día después de la siembra

10 días después de la siembra

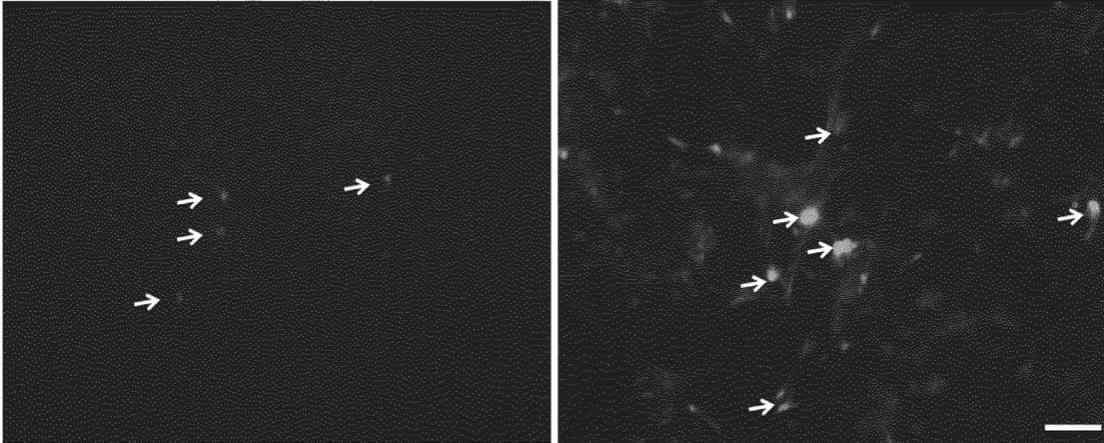


Figura 10

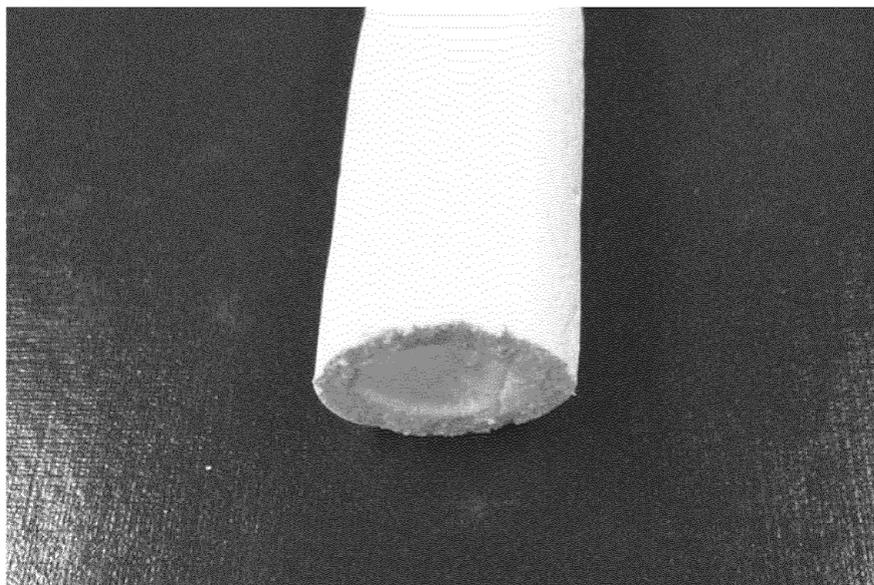


Figura 11

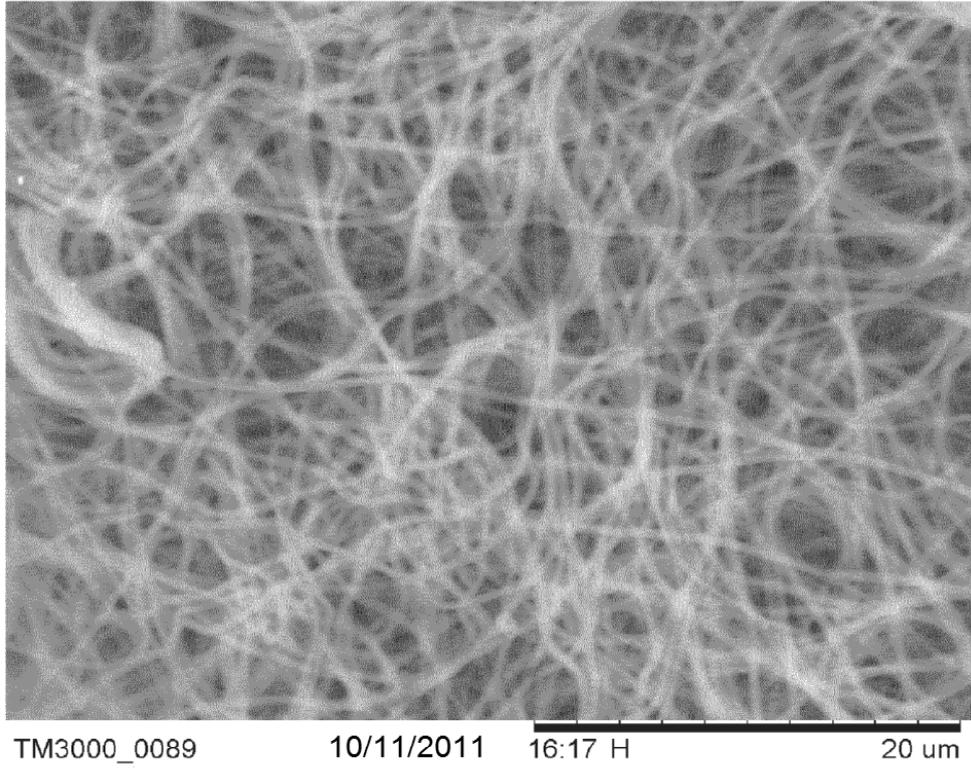


Figura 12

