

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 146**

21 Número de solicitud: 201731386

51 Int. Cl.:

**C08F 212/08** (2006.01)

**C08F 220/18** (2006.01)

**C08F 120/20** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

**A61M 1/34** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**05.12.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.11.2018**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA  
(100.0%)**

**Pza. De La Universidad, 2  
02071 ALBACETE ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ ROMERO, Juan Francisco;  
DE LUCAS MARTÍNEZ, Antonio;  
CARMONA FRANCO, Manuel Salvador;  
BORREGUERO SIMÓN, Ana María;  
REDONDO CALVO, Francisco Javier;  
PADILLA VALVERDE, David y  
GARRIDO MARTÍN, María Del Prado**

74 Agente/Representante:

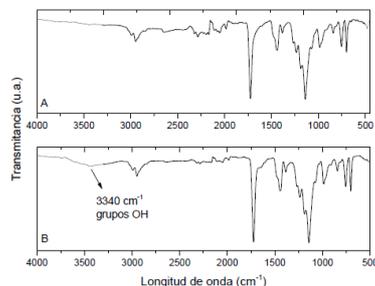
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS LIGANTES DE PROTEÍNAS, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y  
CARTUCHOS DE DIÁLISIS QUE CONTIENEN DICHAS PARTÍCULAS**

57 Resumen:

La presente invención describe partículas de copolímero de estireno y metacrilato de metilo funcionalizadas en su superficie con metacrilato de polietilenglicol. Este material permite la inmovilización en su superficie de proteínas mediante enlace covalente. La invención describe el procedimiento de obtención de las partículas y su uso en la eliminación de compuestos tóxicos presentes en la sangre refractarios a los tratamientos de diálisis, tales como el exceso de bilirrubina. La invención también describe cartuchos de diálisis que contienen las partículas funcionalizadas unidas a proteínas como la albúmina, compatibles con los actuales sistemas de diálisis.

FIGURA 1



ES 2 691 146 A1

**DESCRIPCIÓN**

**PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS LIGANTES DE PROTEÍNAS, MÉTODO DE  
OBTENCIÓN Y CARTUCHOS DE DIÁLISIS QUE CONTIENEN DICHAS  
PARTÍCULAS**

**5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención pertenece al campo de la química y la farmacia y la medicina, más concretamente al subcampo de la química de biopolímeros.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

10 La bilirrubina es un metabolito presente en el cuerpo humano como consecuencia de la degradación de la hemoglobina. La bilirrubina es conjugada y degradada por el hígado, pero enfermedades de este órgano o el consumo de medicamentos que inhiban el proceso de conjugación, pueden provocar la acumulación de altas concentraciones de bilirrubina en sangre o hiperbilirrubinemia.

15 Actualmente, los enfermos críticos por hiperbilirrubinemia son tratados mediante dos sistemas: el sistema MARS® (Molecular Adsorbent Recirculating System, Teraklin AG) y el sistema PROMETHEUS® (Fresenius Medical Care AG). En estos sistemas, la sangre se enfrenta a una disolución concentrada de albúmina a través de un dializador que consiste en un cartucho de diálisis que contiene una membrana polisulfonada, de  
20 manera que las toxinas que están unidas a la albúmina de la sangre son captadas por la albúmina presente en el dializador. Las principales diferencias de estos sistemas son el tipo de albúmina y la efectividad en la eliminación de los compuestos ligados a la albúmina sanguínea.

En el sistema MARS®, la albúmina es puesta en contacto con la sangre del paciente a  
25 través de una membrana polisulfonada de alto flujo logrando, por una parte, la depuración de sustancias dializables y, por otra, el paso de las sustancias unidas a la albúmina del paciente a la albúmina del dializador. El inconveniente de este sistema es que emplea albúmina sintetizada fuera del cuerpo humano, lo cual encarece mucho este proceso y, además, se ha visto que es poco efectivo en la eliminación de las  
30 toxinas fuertemente ligadas a la albúmina del paciente.

En el sistema PROMETHEUS®, el plasma que contiene la albúmina pasa a través de 2 columnas de adsorción en serie donde las toxinas unidas a la albúmina se capturan por contacto directo con el material adsorbente. Posteriormente, el plasma sanguíneo y la albúmina detoxificada se devuelven al paciente, por lo que no se requiere  
5 albúmina externa para este proceso. El inconveniente de estos sistemas es que precisan un elevado consumo de albúmina, lo que se traduce en un elevado coste del procedimiento.

Las membranas de diálisis presentes tanto en estos sistemas de diálisis como en los tradicionales, presentan inconvenientes tales como problemas de hipersensibilidad a  
10 las membranas sintéticas, coagulación de la sangre, modificación de la actividad biológica de la sangre, ensuciamiento, llegando a la obstrucción de la membrana por moléculas, y poca superficie de diálisis. La obstrucción de la membrana de diálisis por moléculas presentes en el fluido biológico por un lado impide el paso de las moléculas que se desea eliminar y, por otro, produce un incremento de la presión  
15 dentro del dializador, lo que genera problemas durante la diálisis. El ensuciamiento reduce significativamente el flujo a través de las membranas de diálisis y, además, el flujo a través de las mismas es costoso. Por lo tanto, es necesario encontrar un material biocompatible pueda acoplarse a un sistema de diálisis, permita inmovilizar proteínas durante este proceso y cuya superficie no esté limitada por la superficie de  
20 la membrana en el dializador.

La inmovilización de proteínas en un material puede ocurrir de tres formas: adsorción física, retención por atrapamiento e inmovilización mediante enlace iónico o covalente. El primero de ellos es un enlace débil que no altera la conformación de la proteína, pero no impide la lixiviación de la misma; el segundo método, implica el  
25 atrapamiento de la proteína en un gel polimérico o en microcápsulas, dando lugar a una inmovilización más estable que la adsorción física y el tercero, implica la activación de una superficie que reaccionará con los aminoácidos de la proteína, que quedará unida al material de forma irreversible.

Para poder llevar a cabo el anclaje covalente de proteínas a una matriz, es necesario  
30 activar su superficie para que sea reactiva a los grupos nucleófilos presentes en las proteínas que se van a unir. Actualmente, la activación de matrices para anclaje covalente de proteínas se tiene lugar fundamentalmente mediante dos técnicas

diferentes: la polimerización en monocapas autoensambladas y la polimerización en filamentos.

Las monocapas autoensambladas son finas capas de moléculas químicas o biológicas adheridas a la superficie de la matriz, que presentan ventajas tales como la flexibilidad en su fabricación, el orden molecular y su simplicidad. Kowalczyrska HM *et al.* (2011) 5  
inmovilizaron albúmina sobre membranas de poliestireno sulfonadas y no sulfonadas, observando que, para que el anclaje de la albúmina fuera efectivo, son necesarias concentraciones elevadas de albúmina. El inconveniente de las monocapas autoensambladas es que tienen baja estabilidad frente a la oxidación y, la 10  
conformación del polímero en estructura de monocapas dificulta el acceso del tóxico a los centros activos de la membrana.

Como alternativa, se han desarrollado filamentos poliméricos capaces de activar la matriz de la partícula y retener biomoléculas tales como proteínas. Las ventajas de la polimerización en filamentos es que presentan buena estabilidad química y mecánica y 15  
flexibilidad de síntesis de diferentes grupos funcionales. Además, el uso de este tipo de anclaje evita los problemas de las monocapas autoensambladas puesto que la selección del filamento polimérico se realiza en base al compuesto que se desee anclar, quedando éste unido al filamento de forma irreversible.

La polimerización en filamentos puede realizarse sobre membranas o sobre partículas. 20  
Consiste en la incorporación de estructuras lineales o ramificadas bien a una matriz polimérica, o bien en la superficie de partículas poliméricas. Este tipo de polimerización en filamentos tiene el objeto de “alejar” la biomolécula que se quiere anclar de la matriz con objeto de preservar su actividad biológica, ya que se ha demostrado que, si la biomolécula no está separada de la matriz, su actividad se 25  
reduce por efectos fundamentalmente conformacionales, ya que suele haber mayor impedimento estérico y deformación de la biomolécula como resultado de su desnaturalización.

Para que resulte de interés la polimerización en filamentos, éstos deben cumplir las siguientes características: ser inertes a biomoléculas que no se desea inmovilizar, 30  
ausencia de interacciones hidrofóbicas y flexibilidad para evitar el ensuciamiento del material.

Normalmente, la polimerización en filamentos se ha llevado a cabo sobre membranas. Chunming L *et al.* (2014) llevaron a cabo una inmovilización de seroalbúmina bovina (BSA) sobre filamentos de polietilenglicol y glicidil metacrilato en una membrana de polipropileno para prevenir la hemólisis de la sangre. Esto permite su uso en el almacenamiento y transporte de sangre. El problema de la polimerización en filamentos sobre membranas es que las membranas tienen baja capacidad de fijación, tienen captación espontánea de proteínas y biomoléculas y además tienen una menor superficie específica. Por lo tanto, este tipo de polimerización en filamentos no se considera adecuado para inmovilizar de forma específica y eficiente, proteínas que mantengan su actividad biológica.

El anclaje sobre partículas con filamentos, en vez de en membranas con filamentos, facilita el acceso a los puntos de unión de las biomoléculas que se deseen unir y aumenta la superficie disponible para la polimerización de los filamentos, mejorando por lo tanto su eficacia, ya que permite tener un material con más biomoléculas. Además, este tipo de partículas son más estables. Las partículas con filamentos tienen mayor superficie específica que las membranas poliméricas, lo que les proporcionan una mayor capacidad de captación de sustancias en un menor espacio y cantidad de material.

El problema técnico presente en la invención es la obtención de un material que pueda ser incorporado en dializadores y mejore la efectividad del proceso de diálisis en la retención de compuestos tóxicos presentes en la sangre.

Bergström K *et al.* (1991) es considerado como el estado de la técnica más cercano al problema técnico de la invención, que describe superficies planas de estireno preoxidado funcionalizado con polietilenglicol tetrafuncional para la inmovilización de albúmina. Sin embargo, este material consiste en una superficie plana con una baja superficie de contacto, lo que impide su aplicación en un cartucho de diálisis, dado que la superficie de estireno preoxidado al que se ancla el metacrilato de polietilenglicol tiene los mismos problemas que los indicados para las membranas.

La solución que se propone en esta invención al problema técnico son partículas de copolímero de estireno y metacrilato de metilo, funcionalizadas en su superficie con metacrilato de polietilenglicol, al que se puede anclar una proteína orgánica, como por ejemplo la albúmina. El material particulado de la invención puede incorporarse fácilmente a un cartucho de diálisis, incrementando la superficie disponible para la

unión de las proteínas que se desee inmovilizar y, en consecuencia, la eficiencia de la diálisis.

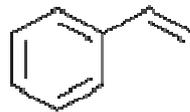
**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 En una realización, la presente invención se refiere a partículas de copolímero de estireno y metacrilato de metilo funcionalizadas en su superficie con metacrilato de polietilenglicol.

A efectos de la presente invención, un copolímero se define como una macromolécula compuesta por dos o más monómeros o unidades repetitivas, química o estructuralmente distintas que se unen mediante enlaces covalentes de  
10 diferentes formas. Los monómeros se unen entre sí mediante enlaces covalentes en un proceso denominado polimerización.

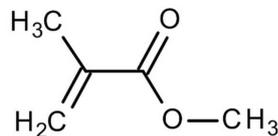
El estireno es un hidrocarburo aromático de fórmula  $C_8H_8$ , que comprende un anillo de benceno con un sustituyente etileno (Fórmula 1).

15



Fórmula 1

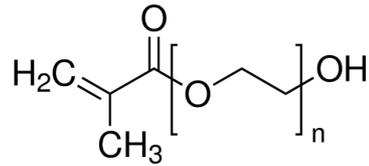
El metacrilato de metilo (2-metilpropenoato de metilo) es un compuesto químico de fórmula  $C_5H_8O_2$  (Fórmula 2).



20

Fórmula 2

El metacrilato de polietilenglicol es un poliéter con grupos terminales metacrilato e hidroxilo (Fórmula 3).



Fórmula 3

En la que n es el número de veces que se repite la unidad del éter [-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]

5 Los filamentos de metacrilato de polietilenglicol se definen como moléculas lineales de la Fórmula 3.

A efectos de la presente invención, una “partícula funcionalizada” se define como una partícula de copolímero que comprende monómeros de estireno y de metacrilato de metilo, y al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol anclado en su superficie. A efectos de la presente invención, los términos: anclado, unido, 10 incorporado, pegado, fusionado, asociado deben considerarse sinónimos. En una realización de la invención, los filamentos de metacrilato de polietilenglicol se unen a la superficie de la partícula mediante un grupo vinílico que le permite incorporarse a las cadenas de la partícula de copolímero.

El material de la invención está formado por una matriz compuesta por partículas de 15 copolímero, que comprende monómeros de estireno y de metacrilato de metilo, a la que se unen en su superficie, filamentos de metacrilato de polietilenglicol durante la polimerización de la partícula de copolímero. La elección del momento de adición de los filamentos de metacrilato de polietilenglicol determina su posición con respecto a la matriz, lo que permite controlar que los filamentos queden incorporados en el interior o 20 en el exterior de la matriz del material. Una característica esencial del material de la presente invención es que los filamentos de metacrilato de polietilenglicol están unidos a la superficie de las partículas.

Una ventaja de esta unión de los filamentos en la superficie de las partículas, es que 25 tienen mayor superficie específica que las membranas poliméricas descritas en el estado del arte, lo que les permite tener una mayor superficie en la que se puedan anclar otras moléculas en un menor espacio y cantidad de material. Por otra parte, estas partículas funcionalizadas superficialmente evitan la necesidad de permeación del fluido a través del polímero, lo que facilita la transferencia de materia.

En una realización preferida, el material de la invención comprende partículas funcionalizadas con un diámetro medio comprendido entre 400 y 800  $\mu\text{m}$ .

Las partículas funcionalizadas de la invención pueden unirse o ligarse a proteínas. En un aspecto de la invención, las partículas funcionalizadas son ligantes de proteínas. A efectos de la presente invención, ligante se refiere a que las partículas funcionalizadas pueden tener unida o anclada a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol superficie al menos una proteína orgánica mediante enlace covalente.

A efectos de la presente invención, la expresión "partícula biofuncional" se define como una partícula funcionalizada tal y como se ha descrito anteriormente, que tiene anclada en su superficie, unida a al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol, una proteína orgánica. A efectos de la presente invención, una proteína orgánica se considera aquella formada aminoácidos proteínogénicos unidos mediante enlaces peptídicos.

El material de la presente invención se caracteriza porque el filamento de metacrilato de polietilenglicol presente en el material presenta al menos un grupo terminal hidroxilo, que permite su unión covalente a proteínas orgánicas a través de los aminoácidos serina y treonina de dicha proteína.

En una realización preferida de la invención, la proteína orgánica está anclada covalentemente a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol, manteniendo su capacidad bioactiva para retener compuestos biológicos sin afectar a su conformación ni ocasionando su desnaturalización. En una realización preferente, la proteína orgánica anclada en la superficie de las partículas funcionalizadas es la albúmina. La albúmina (o seroalbúmina) es una proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo de mamíferos. A efectos de la presente invención, la albúmina unida a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol puede ser de origen animal o humano. En una realización, la albúmina unida a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol es seroalbúmina bovina (BSA). La seroalbúmina bovina procede de *Bos taurus*, tiene 607 aminoácidos y está descrita en las bases de datos Uniprot (P02769) GenBank (CAA76847.1). En una realización de la invención, la seroalbúmina bovina unida a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 99% o un 100% de identidad con la secuencia descrita anteriormente. La albúmina unida a los filamentos de metacrilato de

polietilenglicol puede ser la proteína completa o un fragmento de la misma, y estar sola, conjugada con un marcador celular o formando parte de una proteína quimérica.

La presente invención también describe métodos para obtención de partículas funcionalizadas ligantes de proteínas.

5 En una realización, la presente invención se dirige a un método de obtención de partículas funcionalizadas de copolímero de estireno y metacrilato de metilo, dichas partículas obtenidas mediante un proceso de polimerización en suspensión y unidas en su superficie a filamentos de metacrilato de polietilenglicol. Dicho método comprende las siguientes etapas:

- 10 a) preparación de una fase continua formada por agua y un polímero con estructura anfipática lineal, de peso molecular superior a 40000, entre 40 y 60°C, con una velocidad de agitación comprendida entre 300 y 800 rpm,
- b) poner en contacto la fase continua con un gas extrapuro,
- c) preparación de una fase discontinua formada por monómeros de estireno y de 15 metacrilato de metilo y un iniciador de polimerización de tipo radicalico,
- d) añadir la fase discontinua obtenida en la etapa c) sobre la fase continua de la etapa b) manteniendo la agitación,
- e) aumentar la temperatura entre 70°C y 95°C,
- f) adición de al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol,
- 20 g) incubación durante 2 a 10 horas a temperatura entre 90°C y 100°C,
- h) lavado de las partículas obtenidas en la etapa g) con agua y filtración de las partículas,
- i) secado de las partículas.

25 La presente invención también se refiere a un método de obtención de partículas biofuncionales que comprenden partículas de copolímero de estireno y de metacrilato de metilo, que tienen unidos covalentemente en su superficie filamentos de metacrilato de polietilenglicol, unidos a una proteína orgánica. Dicho método comprende las etapas a) – i) descritas anteriormente para la obtención de las partículas funcionalizadas y además siguientes etapas:

- 30 j) mezclar las partículas obtenidas en la etapa j) con PBS pH7,4,
- k) introducción las partículas de la etapa k) en un lecho termostatzado a 37°C,
- l) incubar las partículas de la etapa l) entre 30 y 60 minutos,

- m) introducción de la proteína orgánica en el lecho termostatzado de la etapa m),
- n) recirculación de la disolución de la etapa n) a través del lecho termostatzado que comprende las partículas durante 12 a 36 horas a 37°C,
- o) secado de las partículas.

5 En una realización más preferida, el polímero con estructura anfipática lineal y peso molecular elevado del paso a) actúa como agente dispersante. Un agente dispersante es un aditivo que se utiliza para lograr que un soluto tenga distribución y dispersión homogénea en un disolvente. En una realización más preferida, este compuesto es polivinilpirrolidona. En una realización más preferida, este compuesto es  
10 polivinilpirrolidona con peso molecular entre 40000 y 1300000. En una realización más preferida, el agente dispersante es polivinilpirrolidona K90.

En una realización de la invención, la fase continua se introduce en un reactor de vidrio manteniendo la agitación. Este reactor puede ser cualquier reactor discontinuo tipo tanque agitado, termostatzado y dotado de un sistema de agitación tipo ancla  
15 conocido en el sector.

El contacto de la fase continua con el gas extrapuro de la fase b) tiene como objetivo prevenir la interferencia del oxígeno atmosférico en el proceso de polimerización y la oxidación de los compuestos utilizados. Este proceso se conoce en el estado del arte como inertización. En una realización preferida, el gas extrapuro empleado se  
20 selecciona entre nitrógeno o argón con pureza superior al 90%. En una realización más preferida, el gas extrapuro es nitrógeno con 99% a 99,9999% de pureza. En una realización, el contacto entre el gas extrapuro y la fase continua tiene lugar entre 40°C y 60°C durante 30 a 90 minutos. En una realización más preferida, la tiene lugar a 60°C durante 60 minutos.

25 Los iniciadores radicálicos o radicalarios son compuestos que inician la polimerización de los monómeros en una mezcla mediante su reacción con los radicales libres presentes en dichos monómeros. En una realización preferida, el iniciador de polimerización de tipo radicálico de la etapa c) se selecciona entre peróxido de diacilo, peroxidicarbonato, dialquilperóxido, peroxiésteres, peróxido cíclico e hidroperóxido. En  
30 una realización más preferida, el iniciador radicálico es un peróxido. En una realización todavía más preferida, el iniciador radicálico es peróxido de benzoilo.

El aumento de la temperatura por encima de 70°C en la etapa e) (o de polimerización) provoca que se inicie la reacción de polimerización entre los monómeros de estireno y metacrilato de metilo. En una realización preferida, la temperatura se aumenta entre 70°C y 95°C. En una realización preferida, la polimerización tiene una duración entre 6 y 10 horas.

La etapa f) transcurre en una reacción en suspensión. Para que el anclaje de los filamentos de metacrilato de polietilenglicol en esta etapa tenga lugar en la superficie de la partícula de formada en el paso e), es imprescindible que éstos se añadan, gota a gota, una vez que se alcanza el punto de identidad de las partículas. El punto de identidad de las partículas es el momento en el que la distribución de las partículas en una solución de polimerización es estable (el tamaño de las partículas no varía sustancialmente). Este aspecto es esencial en las partículas de la presente invención, dado que al añadir los filamentos de metacrilato de polietilenglicol en este momento, éstos únicamente se unirán a la superficie de las partículas y no en otra parte. En el método de la presente invención para obtener partículas funcionalizadas, el punto de identidad se alcanza entre 60 minutos y 180 minutos después del inicio de la etapa f) de polimerización. En una realización más preferida, la adición de los filamentos de polietilenglicol tiene lugar a los 120 minutos después del inicio de la etapa f). En una realización preferida, la concentración del metacrilato de polietilenglicol es 1% en peso respecto a la masa de reacción.

En la etapa g), la reacción se incuba entre 90°C y 100°C de dos horas a 10 horas. En una realización preferida, la incubación es de 3 horas a 90°C.

En una realización de la invención, el lavado de las partículas con agua en la etapa i) tiene lugar mediante adición de alícuotas de agua sobre las partículas durante el proceso de filtración. La filtración de las partículas tiene lugar mediante adición de las partículas y el agua de lavado en un embudo Büchner conectado a un matraz tipo Kitasato. Así, las partículas quedan retenidas sobre el papel de filtro mientras que el agua de lavado atraviesa dicho filtro, impulsada por una bomba de vacío conectada al matraz Kitasato.

En una realización de la invención, el secado de las partículas en la etapa j) tiene lugar a temperatura ambiente, entre 25 y 35°C.

Para la producción de las partículas biofuncionales de la invención, en la etapa j), las partículas funcionalizadas obtenidas en el paso i) se sumergen en suero fosfato salino (PBS) durante un intervalo de 30 minutos a dos horas a temperatura ambiente. En una realización preferida, las partículas funcionalizadas se sumergen en PBS durante 60 minutos. El objetivo de esta incubación es estabilizar las partículas obtenidas.

En la etapa k), las partículas funcionalizadas de la etapa j) se introducen en un lecho termostatzado a 37°C y se incuban durante 30 minutos a 3 horas. En una realización más preferida las partículas se incuban durante 60 minutos. El lecho termostatzado consiste en una columna de vidrio para cromatografía, termostatzada, con una longitud de 200 mm y 50 mm de diámetro, con una placa porosa que soporta a las partículas. Las partículas en PBS forman un lecho en la columna de vidrio.

En la etapa m), se incorpora en el lecho termostatzado de la etapa l) una disolución en tampón fosfato salino de la proteína orgánica de interés. La relación entre la proteína de interés y las partículas funcionalizadas es de 0,2 a 3 gramos por gramo de partículas. En una realización más preferida, la relación es de 0,5 gramos por gramo de partículas.

En la etapa n), la disolución de la proteína orgánica recircula en el lecho termostatzado junto a las partículas funcionalizadas entre 12 y 36 horas) a 37°C. Durante este tiempo, la proteína se une de forma covalente a los grupos hidroxilo presentes en los filamentos de metacrilato de polietilenglicol de las partículas. La proteína se une a los grupos hidroxilo del metacrilato de polietilenglicol de las partículas funcionalizadas debido a la reacción de dichos grupos con los aminoácidos serina y/o treonina de su secuencia. En una realización más preferida, la proteína orgánica que se une a los filamentos de metacrilato de polietilenglicol es la albúmina. En una realización preferida, la albúmina unida a las partículas es de albúmina de suero bovino (BSA).

En una realización de la invención, el secado de las partículas en la etapa o) tiene lugar a temperatura ambiente, entre 25 y 35°C.

Las características de las partículas biofuncionales obtenidas mediante el proceso descrito anteriormente dependen de: (1) el peso molecular del polímero con estructura anfipática lineal de peso molecular superior a 40000, ya que sólo compuestos de la familia de la polivilpirrolidona con más de 40000 de peso molecular, llevan a la

formación de las partículas del tamaño deseado; (2) de la velocidad de agitación, ya que únicamente velocidades de agitación entre 300 y 800 rpm, ya que velocidades fuera de ese rango producirían partículas demasiado grandes o demasiado pequeñas, que podrían provocar problemas en la circulación de la sangre a través del cartucho, y

5 (3) del momento en el que se añade el metacrilato de polietilenglicol para conseguir su inserción en la superficie de las partículas. La generación de partículas pequeñas es un inconveniente en los dializadores, dado que partículas de pequeño tamaño pueden taponar un cartucho de diálisis impidiendo el paso de otras moléculas. El control de las variables anteriores permite obtener partículas de un tamaño adecuado (400-800  $\mu\text{m}$ )

10 para que fluidos como la sangre circulen a través de ellas, sin provocar una pérdida de presión que afecte a su actividad biológica o favorezca su coagulación.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para eliminar la bilirrubina de un fluido biológico, que comprende:

- a) disolución de bilirrubina en sosa 0,06 M a temperatura ambiente a una

15 velocidad de agitación de 500-1000 rpm,

- b) introducción en un frasco hermético de vidrio el material que comprende partículas biofuncionales,
- c) adición de disolución de bilirrubina, PBS y heparina sódica sobre el fluido biológico,

20 d) adición de la disolución de la etapa c) en el frasco hermético de vidrio para ponerlo en contacto con las partículas biofuncionales presentes en el material,

- e) agitación de la mezcla en un incubador orbital a una velocidad de 200-500 rpm y a una temperatura de 37°C, durante 12-36 horas...

en la que la bilirrubina presente en el fluido biológico se une a la albúmina presente

25 en la superficie de las partículas presentes en material.

En una realización preferida, el fluido biológico es sangre. Este método permite eliminar sustancias tóxicas de la sangre tales como medicamentos o bilirrubina, debido a que éstas moléculas se unen a la proteína presente en la superficie de la partícula biofuncionalizada. En una realización preferida, la sangre ha sido previamente

30 obtenida de un sujeto humano o animal y tratada con heparina. En una realización más preferida, el sujeto ha sido previamente diagnosticado de hiperbilirrubinemia.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de las partículas biofuncionales descritas anteriormente para la eliminación de a bilirrubina en sangre obtenida de un sujeto.

5 Otra realización de la invención se refiere a un material de relleno de un cartucho de diálisis que comprende las partículas biofuncionales tal y como se han descrito anteriormente.

En otra realización, la presente invención se dirige a un material que comprende al menos una partícula biofuncional tal y como se ha descrito anteriormente para uso en el tratamiento de hiperbilirrubinemia.

10 En otra realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de hiperbilirrubinemia en un sujeto, que comprende poner en contacto la sangre de un sujeto que padece hiperbilirrubinemia con el material de la invención, que comprende al menos una partícula comprende un copolímero compuesto por monómeros de estireno y de metacrilato de metilo, dicho copolímero tiene metacrilato de  
15 polietilenglicol anclado covalentemente en su superficie, que a su vez tiene unido albúmina.

Las partículas biofuncionales obtenidas mediante el método de la invención permiten reducir los niveles de bilirrubina en sangre desde niveles superiores a 10 mg/dL, que pondrían en peligro la supervivencia de un paciente, hasta niveles inferiores a 5  
20 mg/dL, propios de una persona sana que no requiere tratamiento para la hiperbilirrubinemia. Además, este método para reducir los niveles de bilirrubina en sangre permite realizar el proceso en menos de 24 horas, lo cual es compatible con un proceso de diálisis convencional y, además, sin afectar al resto de parámetros bioquímicos sanguíneos tales como la glucosa, el colesterol, etc.

25 Las partículas biofuncionales de la invención tienen la ventaja de no interferir en la diálisis de la sangre, permitiendo su paso al interior del cartucho de diálisis (o dializador) sin provocar una pérdida de presión que pudiera afectar al caudal de circulación de la sangre y provocara su coagulación. El tamaño de las partículas es por lo tanto una característica esencial del material de la invención. En la presente  
30 invención, el tamaño de las partículas tiene diámetro comprendido entre 400 y 800  $\mu\text{m}$ . Otra ventaja del material de la presente invención es su elevada selectividad hacia la bilirrubina, lo que permite el tratamiento de la sangre sin afectar a los otros

componentes de la sangre o a los nutrientes transportados. La sangre pasa a través de las partículas, estando en contacto este fluido con la superficie de todas las partículas, lo que incrementa la eficiencia de unión de los compuestos tóxicos presentes en la sangre a la proteína, preferiblemente la albúmina, presente en la superficie de las partículas biofuncionales.

Otra de las ventajas que presentan las partículas biofuncionales aquí descritas es que su uso en sistemas de diálisis de sangre permite simplificar los tratamientos actualmente existentes, los sistemas MARS® y PROMETHEUS®, ya que mejoran la economía de estos tratamientos, que consumen altas cantidades de albúmina debido a su baja selectividad por la bilirrubina.

Las partículas biofuncionales tienen la ventaja de poder incluirse en un único cartucho de diálisis que puede ser acoplado en línea con los aparatos convencionales de diálisis descritos en el estado del arte. Esto ofrece la ventaja de resultar más simple y económico que los sistemas de tratamiento MARS® y PROMETHEUS®, ya que, al contrario de lo que ocurre en estos dos sistemas, también evitaría la utilización de sistemas adicionales de bombeo y monitorización.

El dializador es la parte fundamental un sistema de diálisis, dado que es el compartimento en el que se produce la eliminación de las toxinas presentes en la sangre. El dializador, se compone de un cartucho de diálisis, o carcasa de recubrimiento, en el que se encuentra la membrana que separa la sangre y el líquido de diálisis.

Se ha demostrado que las partículas biofuncionales de la invención presentan una eficacia en la eliminación de bilirrubina del 83%. Sin embargo, la eficacia de los sistemas MARS® y PROMETHEUS® se ha visto que no supera el 50%. Además, las partículas de la invención comprenden un copolímero totalmente biocompatible que además evita problemas de circulación a través del cartucho de diálisis, lo que previene la coagulación o modificación de la actividad biológica de la sangre.

Otra realización de la presente invención se refiere a un cartucho de diálisis que tiene en su interior un material que comprende las partículas biofuncionales de la invención tal y como se han descrito anteriormente.

Otra realización de la invención se refiere al uso de las partículas biofuncionales descritas anteriormente o de un material que las comprenda, en un dializador o en un cartucho de diálisis.

5 En una realización particular, el cartucho de diálisis es de un material de plástico biocompatible. En una realización más preferida, el material del cartucho de diálisis que comprende las partículas biofuncionales de la invención, o un material que las comprenda, es poliuretano.

10 Otra ventaja más de las partículas biofuncionales de la invención en comparación con los métodos propuestos en el estado del arte para eliminar bilirrubina en sangre, es su buen comportamiento mecánico. Las partículas presentan una estructura lo suficientemente rígida como para evitar que taponen la salida del cartucho de diálisis e impidan el retorno de la sangre.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de las partículas biofuncionales descritas anteriormente en un mecanismo de diálisis de sangre.

15 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de eliminación de bilirrubina acoplado a un proceso de diálisis de sangre que comprende el paso de la sangre a través de un dializador que comprende al menos un cartucho de diálisis que a su vez comprende las partículas biofuncionales descritas anteriormente.

20 Las partículas biofuncionales de la presente invención son retienen selectivamente compuestos tóxicos presentes en la sangre de un paciente, tales como el exceso de bilirrubina durante un tratamiento de diálisis, sin producir coagulación ni modificación de la actividad biológica del fluido.

Todas estas propiedades otorgan al producto de la invención una ventaja tecnológica definitiva con respecto a la técnica actual.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes,  
30 no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras características

técnicas, aditivos, componentes o pasos. El término “comprende”, además, incluye el término “consiste”.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Espectroscopía infrarroja (FTIR) en la que se observa la ausencia del grupo hidroxilo en las partículas no funcionalizadas (A) y la presencia del grupo hidroxilo en las partículas funcionalizadas (B).

10 **Figura 2:** Esquema de la instalación empleada para la inmovilización de albúmina en las partículas funcionalizadas y la eliminación de bilirrubina disuelta en PBS.

15 **Figura 3.** Concentración de bilirrubina en sangre antes del tratamiento (barras negras) y después de 24 horas (barras blancas) usando dos concentraciones de partículas biofuncionales, 4,5 g (Experimento 1) y 3 g (Experimento 2). La línea horizontal superior (4 mg/dL) se corresponde con el valor a partir del cual se necesita tratamiento para hiperbilirrubinemia y la línea horizontal inferior (1,25 mg/mL) se corresponde con la concentración de bilirrubina normal en sangre.

## MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

20 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los ejemplos indicados a continuación.

### **Ejemplo 1: Síntesis de las partículas funcionalizadas.**

25 Polivinilpirrolidona K90 se diluyó en agua miliQ. Esta disolución (fase continua) se introdujo en un reactor de vidrio, donde se inertizó con gas N<sub>2</sub> de 99,9999% de pureza y se calentó a 60°C durante 1 hora.

Posteriormente, se preparó la fase discontinua, mezclando metacrilato de metilo de pureza 99%, estireno de pureza  $\geq 99\%$  y como iniciador radicalico se usó peróxido de benzoilo Luperox® A75 de pureza 75%.

La fase continua se añadió al reactor y se subió la temperatura a 80°C, considerándose este punto el inicio de la reacción. La composición en peso de la mezcla de reacción fue: 4,55% de estireno, 18,13% de metacrilato de metilo, 77,04% de agua, 0,23% de peróxido de benzoilo y 0,07% de polivinilpirrolidona.

5 Aproximadamente después de 120 minutos se alcanzó el punto de identidad de las partículas y se añadieron 5 g de metacrilato de polietilenglicol. Transcurridas dos horas se incrementó la temperatura a 90°C y dos horas después, se subió la temperatura a 100°C, teniendo la reacción una duración total de entre 6 y 10 horas.

10 Finalizada la reacción, las partículas se lavaron con alícuotas de agua, se filtraron y se secaron a temperatura ambiente. Las partículas obtenidas se caracterizaron mediante Espectroscopía Infrarroja (FTIR). En la **Figura 1B** se muestra el espectro FTIR de las partículas funcionalizadas, en el que se observa una señal a 3340  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo del metacrilato de polietilenglicol presente en las partículas. La importancia de esta señal reside en que la presencia de los grupos  
15 hidroxilo en las partículas permite demostrar la funcionalización de las partículas, ya que esa señal no aparece en las partículas de copolímero de estireno y metacrilato de metilo no funcionalizadas (**Figura 1A**). Además, la presencia de este grupo hidroxilo permite el anclaje a las partículas mediante la reacción del hidroxilo con los grupos ácidos de los aminoácidos serina y treonina presentes en las proteínas. Las partículas  
20 obtenidas pueden emplearse como soporte para la inmovilización de proteínas, tales como la albúmina.

### **Ejemplo 2: Inmovilización de albúmina en partículas funcionalizadas.**

25 Se preparó 1 L de disolución tampón fosfato salino (de aquí en adelante PBS) 0,01 M pH=7,4. Posteriormente se preparó una disolución de concentración de 1 mg/mL de albúmina de suero bovino de pureza  $\geq 96\%$  y pH 5,2 en el PBS.

Por otro lado, 5 g de partículas funcionalizadas se sumergieron en 40 mL de PBS pH=7,4 durante la hora previa al proceso de inmovilización de proteína. Posteriormente, las partículas fueron introducidas en una columna de vidrio y la  
30 disolución de albúmina se recirculó hacia el lecho de partículas con un caudal de 10 L/h (**Figura 2**). Se mantuvo una temperatura constante de 37°C en todo el sistema.

Después de 24 horas las partículas fueron extraídas de la columna y secadas a temperatura ambiente. Las partículas con albúmina anclada fueron caracterizadas mediante análisis EDAX y Espectroscopía Infrarroja FTIR. El análisis EDAX mostró una concentración de nitrógeno en las partículas del 1,73% en peso.

- 5 La presencia de la albúmina en la superficie de las partículas permite su unión con otras proteínas.

**Ejemplo 3: Eliminación de bilirrubina disuelta en PBS.**

10 Se diluyeron 11 mg de bilirrubina de pureza  $\geq 95\%$  en 400 mL de PBS. Seguidamente, se introdujeron 2 g de partículas biofuncionales obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 2 en el interior de una columna de vidrio y la disolución de bilirrubina en PBS se introdujo en un matraz reactor cilíndrico de vidrio encamisado.

15 A continuación, la disolución de bilirrubina se impulsó hacia el lecho de partículas con un caudal de 10 L/h, recirculando la disolución de bilirrubina saliente del lecho de partículas durante 24 horas y manteniendo una temperatura constante de 37°C en el sistema. Además, el sistema de reacción fue aislado de la luz para evitar la degradación de la bilirrubina. La concentración de bilirrubina pasó de 1,8 a 0,3 mg/dL.

20 De este experimento se deduce que las partículas biofuncionales que comprenden albúmina anclada en su superficie se pueden utilizar para la eliminación de bilirrubina en un medio con condiciones similares al suero sanguíneo humano.

**Ejemplo 4: Eliminación de bilirrubina disuelta en sangre.**

Se diluyeron 45 mg de bilirrubina de pureza  $\geq 95\%$  en 200 mL de sangre, 150 mL de PBS y 2 mL de heparina sódica al 1%, 5000 UI / 5 mL (Hospira Prod. Farm y Hosp).

25 La disolución se introdujo en un frasco de vidrio hermético, que se introdujo a su vez en un agitador orbital, donde permaneció en agitación a 200 rpm durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las partículas biofuncionales obtenidas en el Ejemplo 2 fueron filtradas y caracterizadas mediante análisis EDAX, aumentando el contenido en nitrógeno del 1,73 al 2,93% en peso. Se realizaron dos experimentos, utilizando 4,5 g  
30 de partículas (Experimento 1) y 3 g de partículas (Experimento 2).

Tal y como se observa en la **Figura 3**, la concentración de bilirrubina se redujo en ambos experimentos por debajo de los valores de referencia de bilirrubina en sangre que no exigirían tratamiento.

<b>CONCENTRACIÓN DE BILIRRUBINA (mg/dL)</b>		
	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>
<b>Tiempo 0 h</b>	10,2	9,9
<b>Tiempo 24h</b>	1,8	3,2

- 5 De este resultado se concluye que las partículas que comprenden albúmina anclada en su superficie se pueden utilizar para la eliminación de bilirrubina de sangre humana llegando a niveles aceptables para los pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 10 Kowalczyriska, H.M., *et al.* *Albumin adsorption on unmodified and sulfonated polystyrene surfaces in relation to cell-substratum adhesion.* Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 2011, 84(2); 536-44.
- 15 Chunming L. *et al.* *Improving hemocompatibility of polypropilene via Surface-initiated atom transfer radical polymerization for covalently coupling BSA.* RSC Advances, 2014, 4(47): 24842-51.
- Bergström K. *et al.* *Protein immobilization to polystyrene via long poly (ethyleneglycol) chains.* Biotechnology and bioengineering, 1991, 38(8); 952-5.

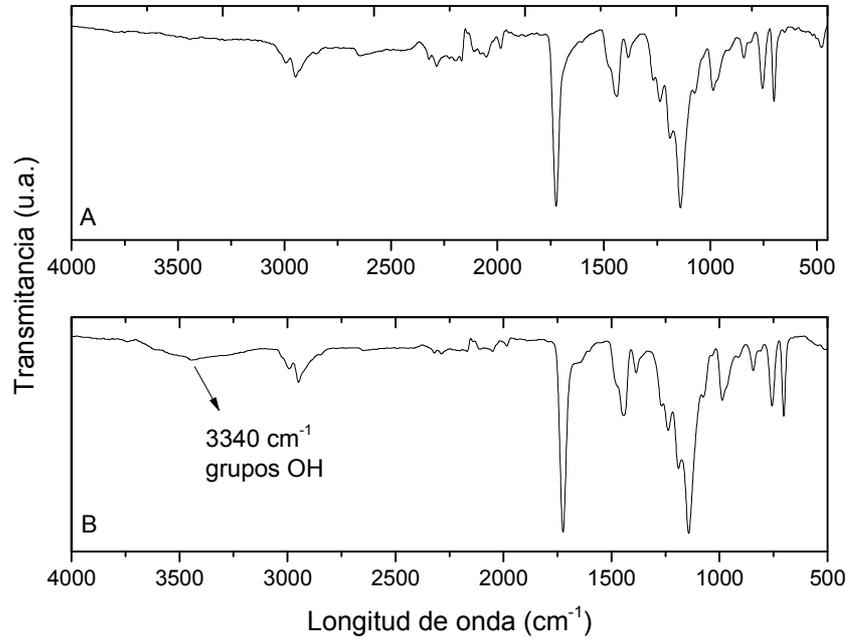
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Partículas funcionalizadas ligantes de proteínas caracterizadas porque comprenden copolímero de estireno y metacrilato de metilo y al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol unidos en la superficie de dichas partículas.
2. Partículas funcionalizadas ligantes de proteínas, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizadas porque los filamentos de metacrilato de polietilenglicol están además unidos covalentemente a una proteína orgánica.
- 10 3. Partículas funcionalizadas ligantes de proteínas, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizadas porque la proteína orgánica es albúmina.
4. Partículas funcionalizadas ligantes de proteínas, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque tienen un diámetro medio comprendido entre 400 y 800  $\mu\text{m}$ .
- 15 5. Método de obtención de las partículas funcionalizadas ligantes de proteínas de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
  - 20 a) preparación de una fase continua formada por agua y un polímero con estructura anfipática lineal, de peso molecular superior a 40000 entre 40 y 60°C, con una velocidad de agitación comprendida entre 300 y 800 rpm e introducir en un reactor de vidrio manteniendo la agitación,
  - b) poner en contacto la fase continua de la etapa a) con un gas extrapuro,
  - c) preparación de una fase discontinua formada por monómeros estireno y metacrilato de metilo y un iniciador de polimerización de tipo radicalico seleccionado del grupo que consiste en: un peróxido de diacilo, un peroxidicarbonato, un dialquilperóxido, un peroxiéster, un peróxido 25 cíclico y un hidroperóxido,
  - d) añadir la fase discontinua obtenida en la etapa c) sobre la fase continua de la etapa b) manteniendo la agitación,
  - e) aumentar la temperatura entre 70°C y 95 °C,
  - 30 f) adición de al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol,
  - g) incubación durante 2 a 10 horas a temperatura entre 90°C y 100°C,

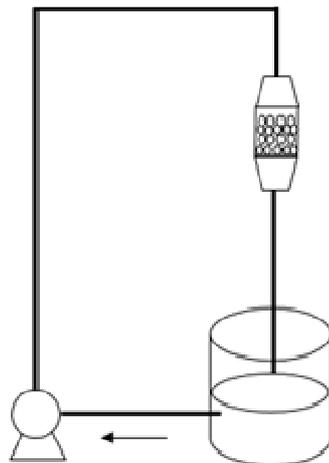
- h) lavado de las partículas obtenidas en h) con agua y filtración de las partículas,
  - i) secado de las partículas.
6. Método de obtención de las partículas funcionalizadas ligantes de proteínas de la reivindicación 2, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- a) preparación de una fase continua formada por agua y un polímero con estructura anfipática lineal, de peso molecular superior a 40000 entre 40 y 60°C, con una velocidad de agitación comprendida entre 300 y 800 rpm e introducir en un reactor de vidrio manteniendo la agitación,
  - b) poner en contacto la fase continua de la etapa a) con un gas extrapuro,
  - c) preparación de una fase discontinua formada por monómeros estireno y metacrilato de metilo y un iniciador de polimerización de tipo radicalico seleccionado del grupo que consiste en: un peróxido de diacilo, un peroxidicarbonato, un dialquilperóxido, un peroxiéster, un peróxido cíclico y un hidroperóxido,
  - d) añadir la fase discontinua obtenida en la etapa c) sobre la fase continua de la etapa b) manteniendo la agitación,
  - e) aumentar la temperatura entre 70°C y 95 °C,
  - f) adición de al menos un filamento de metacrilato de polietilenglicol,
  - g) incubación durante 2 a 10 horas a temperatura entre 90°C y 100°C,
  - h) lavado de las partículas obtenidas en h) con agua y filtración de las partículas,
  - i) secado de las partículas,
  - j) incubación de las partículas obtenidas en la etapa i) en PBS pH 7,4,
  - k) introducción las partículas de la etapa j) en un lecho termostatzado a 37°C,
  - l) incubar las partículas de la etapa k) entre 30 y 60 minutos,
  - m) introducción de la proteína orgánica en el lecho termostatzado de la etapa l),
  - n) recirculación de la disolución de la etapa m) a través del lecho termostatzado que comprende las partículas durante 12 a 36 horas a 37°C,
  - o) secado de las partículas.

7. Método de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque el agente dispersante del paso a) es polivinilpirrolidona con peso molecular entre 40000 y 1300000.
- 5 8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque el gas extrapuro de la etapa b) es gas N<sub>2</sub> y se pone en contacto a 60°C durante 1 hora.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque la adición del metacrilato de polietilenglicol en la etapa f) tiene lugar ente 60 y 180 minutos después del inicio de la etapa e).
- 10 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque la proteína que se añade en la etapa m) es albúmina.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque la albúmina es seroalbúmina bovina.
- 15 12. Método para eliminar bilirrubina en un fluido biológico caracterizado porque comprende:  
a) introducir en un reactor de vidrio las partículas de acuerdo con la reivindicación 3,  
b) poner en contacto un fluido biológico con las partículas del paso a),  
c) someter a la mezcla de la etapa b) a circulación a través del lecho de  
20 partículas.
13. Método para eliminar bilirrubina de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque el fluido biológico es sangre.
14. Uso de las partículas funcionalizadas ligantes de proteínas de acuerdo con la reivindicación 3 en un dializador.
- 25 15. Material de relleno de un cartucho de diálisis caracterizado porque comprende las partículas funcionalizadas ligantes de proteínas de la reivindicación 3.
16. Cartucho de diálisis caracterizado porque comprende el material de la reivindicación 15.

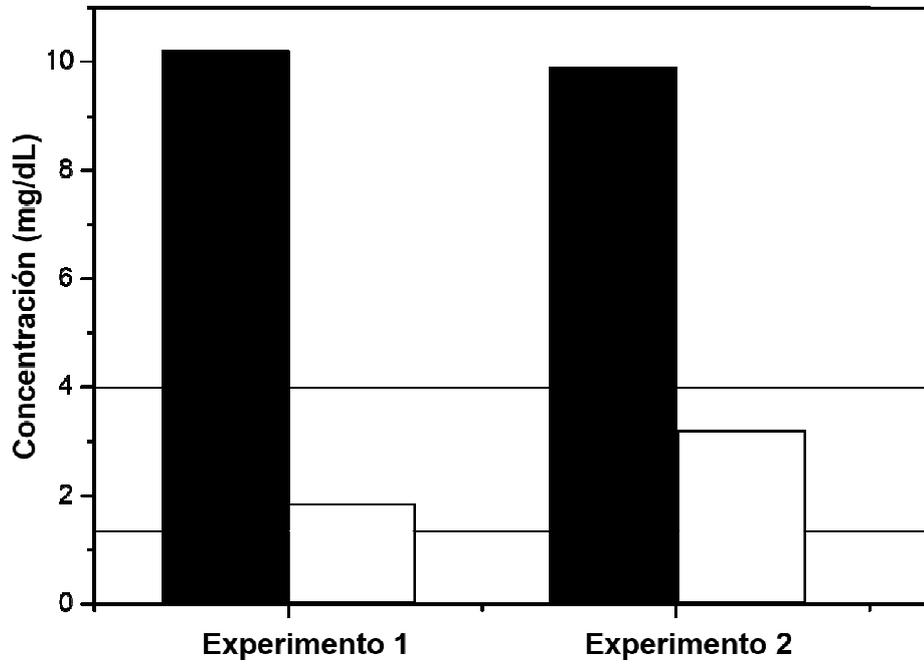
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**





②① N.º solicitud: 201731386

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.12.2017

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BYUN J-W <i>et al.</i> , Surface-grafted polystyrene beads with comb-like poly(ethylene glycol) chains: Preparation and biological application; <i>Macromolecular Bioscience</i> , 17/05/2004, Vol. 4, Páginas 512 - 519, ISSN 1616-5187 (print), <DOI: doi:10.1002/mabi.200300071>	1-16
A	JAYACHANDRAN N KIZHAKKEDATHU <i>et al.</i> , Poly(oligo(ethylene glycol)acrylamide) brushes by surface initiated polymerization: Effect of macromonomer chain length on brush growth and protein adsorption from blood plasma; <i>Langmuir</i> , American Chemical Society, US., 17/03/2009, Vol. 25, Páginas 3794 - 3801, ISSN 0743-7463, <DOI: doi:10.1021/la803690q>	1-16
A	VAN DELDEN C J <i>et al.</i> Poly (ethylene oxide)-modified carboxylated polystyrene lattices-immobilization chemistry and protein adsorption; <i>Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition</i> 1996, 30/11/1995, Vol. 8, No. 4, Páginas 251-268, ISSN 0920-5063.	1-16
A	GESSNER A <i>et al.</i> Plasma protein adsorption on poly (ethylene-glycol) (PEG) modified polystyrene nanoparticles: Influence of PEG surface density; <i>Proceedings of the Controlled Release Society 1999 us.</i> , 30/11/1998, Páginas 597 - 598, ISSN 1022-0178 (print)	1-16
A	D'SA, R.A. <i>et al.</i> Chemical grafting of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate onto polymer surfaces by atmospheric pressure plasma processing; <i>Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids United States</i> 02 Feb 2010, Vol. 26, No. 4, Páginas 1894 - 1903, ISSN 1520-5827 (Electronic), <DOI: doi:10.1021/la902654y pubmed:19795890>	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
04.09.2018

Examinador  
N. Vera Gutierrez

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08F212/08** (2006.01)

**C08F220/18** (2006.01)

**C08F120/20** (2006.01)

**G01N33/68** (2006.01)

**G01N33/72** (2006.01)

**A61M1/34** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08F, G01N, A61M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, PATENW