

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 528**

51 Int. Cl.:

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2012** **PCT/EP2012/073434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013** **WO13076232**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2012** **E 12788575 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 2783008**

54 Título: **Métodos para la preparación de hidrogeles mediante el uso de enzimas lipasas**

30 Prioridad:

24.11.2011 GB 201120368

24.11.2011 US 201161563550 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.05.2019

73 Titular/es:

SPERMVITAL AS (100.0%)

Holsetgaten 22

2317 Hamar, NO

72 Inventor/es:

KLINKENBERG, GEIR;

DOMAAS JOSEFSEN, KJELL y

KOMMISRUUD, ELISABETH

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 713 528 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

Métodos para la preparación de hidrogeles mediante el uso de enzimas lipasas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método mejorado para preparar hidrogeles, particularmente hidrogeles de alginato. Los hidrogeles de la presente invención tienen una amplia área de aplicación y son particularmente útiles para la inmovilización de material biológico, más particularmente para la inmovilización y conservación de material celular, tal como, por ejemplo, espermatozoides.

Antecedentes de la invención

Los hidrogeles consisten en cadenas de polímeros que forman una red hidrófila que contiene agua que tiene una amplia área de aplicación en diversos campos industriales, particularmente en las industrias biotecnológica y farmacéutica. Por ejemplo, los hidrogeles se usan para inmovilizar material biológico tales como las células para el trasplante o como sistema de administración para, por ejemplo, ingredientes farmacéuticos activos o nutrientes. Los hidrogeles pueden ser útiles además como apósitos para heridas. Además, los hidrogeles, particularmente los hidrogeles de alginato, se usan ampliamente como agentes espesantes.

Un polímero ampliamente usado para la formación de hidrogeles es el alginato. Los alginatos son polisacáridos aniónicos naturales que constan de ácido β -D-manurónico con enlace 1,4 (M) y ácido α -L-glucurónico (G). (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990, Trends in biotechnology, vol. 8, no. 3, págs. 71-78). Los alginatos comerciales se extraen de algas marinas, tales como *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera* y *Laminaria hyperborea*, y además hasta cierto punto de *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negrescens* y *Sargassum sp.*

Los alginatos pueden prepararse además a partir de algunas bacterias productoras de alginato, por ejemplo, de algunas especies de *Pseudomonas* y de *Azotobacter vinelandii* (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990, *supra*).

Los alginatos se usan comúnmente, entre otros, en la industria alimentaria, por ejemplo, como estabilizadores para el control de la viscosidad, o como agentes espesantes. Los alginatos se usan además ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética, también como estabilizadores, agentes espesantes o desintegrantes. Para los diversos fines, los alginatos que son ricos en ácido gulurónico o ácido manurónico, respectivamente, están disponibles (Mancini y otros (1999), Journal of Food Engineering 39, 369-378, WO8603781, US 4,990,601, US 5,639,467).

Debido a la biocompatibilidad de los alginatos y la capacidad de gelificar en presencia de cationes divalentes tales como, por ejemplo, los iones de calcio, el alginato se usa además comúnmente para la encapsulación de células (Nebel, RL, Balme, J., Saacke, RG y Lim. F. (1985), J. Anim. Sci. 60:1631-1639, Lim, F y Sun, A.M., (1980) Science 210: 908-9100, WO 2006/106400, EP0922451, US6596310, Torre y otros (1998), STP Pharma Sciences, 8 (4), págs. 233-236, Torre y otros, (2000), Biomaterials, 21, págs. 1493-1498, Torre y otros (2002), Journal of Controlled Release, 85, págs. 83-89, Faustini y otros, (2004), Theriogenology, 61, 173-184., Weber y otros (2006), Journal of Biotechnology, 123, págs. 155-163.

Los geles de alginato son útiles además para inmovilizar diversos materiales. Por ejemplo, el documento WO2008/004890 describe partículas de biopolímero útiles para la conservación de espermatozoides, y en donde el material biológico se incrusta en una partícula de polímero que es sólida en todo el diámetro de la partícula. Al incrustar los espermatozoides en los hidrogeles de alginato en lugar de encapsular los espermatozoides, lo que deja a los espermatozoides en el núcleo fluido de las cápsulas, las células se inmovilizan dentro de la red de gel de alginato, lo que restringe la motilidad de las células durante el almacenamiento.

Los hidrogeles de alginato, por ejemplo, los geles de alginato usados para la encapsulación o el atrapamiento de diversos materiales, pueden prepararse mediante mezclado de una solución del material a entrapar con una solución de alginato de sodio, y adición de esta solución a una solución que contenga cationes multivalentes, usualmente cationes divalentes, tales como iones de calcio (por ejemplo, una solución de CaCl_2) (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990, *supra*).

El documento US 6,497,902 describe otro método para preparar hidrogeles biocompatibles, tales como hidrogeles de alginato, que comprenden mezclar las células a incrustar, sal de alginato y un agente que libera calcio, y después adicionar un compuesto que libera calcio a dicha mezcla para formar un gel reticulado. De acuerdo con la patente de Estados Unidos 6,497,902, el agente que libera calcio puede ser D-glucono- δ -lactona (GDL).

El método descrito en la patente de Estados Unidos 6,497,902 puede usarse para inmovilizar espermatozoides útiles para la inseminación artificial (por ejemplo, para la preparación de los hidrogeles de alginato descritos en el documento WO 2008/004890). Por ejemplo, pueden adicionarse espermatozoides diluidos y enfriados (4 °C) a una solución que comprende alginato de sodio disuelto y carbonato de calcio suspendido, y opcionalmente un crioprotector tal como glicerol, y después iniciar la gelificación y obtención del hidrogel de alginato deseado mediante adición de una solución que comprende GDL. La adición de GDL resulta en la formación de ácido glucónico que a su vez reaccionará con el agua y

formará H_3O^+ . El aumento de H_3O^+ , y la presencia de carbonato de calcio, resulta en la liberación de CO_2 y Ca^{2+} . El suministro de Ca^{2+} mediante adición de GDL resulta en la formación del hidrogel de alginato con espermatozoides incrustados.

Después de producirse la gelificación, los recipientes llenos de espermatozoides incrustados en alginato pueden crioconservarse en nitrógeno líquido, lo que proporciona así la crioconservación de espermatozoides que tienen una vida útil excepcionalmente larga.

Sin embargo, los presentes inventores tienen experiencia que el uso de GDL en la preparación de hidrogeles de alginato de acuerdo con el método descrito en la patente de Estados Unidos 6,497,902 implica varios inconvenientes. Cuando se prepara un gel de alginato que comprende espermatozoides inmovilizados de acuerdo con el método descrito anteriormente, es vital que se adicione GDL a la solución inmediatamente después de que se prepare la solución de GDL para evitar la gelificación espontánea. GDL debe adicionarse en forma disuelta en lugar de en polvo para evitar áreas/zonas locales con altas concentraciones de ácido glucónico inicialmente, lo que sería perjudicial para los espermatozoides. Además, después de la adición de GDL, seguirá un período de aumento de la viscosidad como resultado del inicio de la reacción de gelificación. Debido al aumento de la viscosidad, el recipiente usado para formar el hidrogel debe llenarse con bastante rapidez. Durante el tiempo acumulado para transformar la GDL disuelta en ácido glucurónico, la solución se transfiere, por lo tanto, a recipientes adecuados (tal como por ejemplo, mini pajuelas suministradas por IMV, L'Aigle, Francia) para la posterior gelificación e inmovilización del material biológico deseado. El método descrito en la técnica anterior resulta, por lo tanto, en un programa de tiempo bastante corto e inflexible para preparar los hidrogeles que comprenden el material biológico deseado y son una desventaja sustancial desde un punto de vista industrial.

Debido a los inconvenientes del método descrito anteriormente, existe la necesidad de un método mejorado para preparar hidrogeles, particularmente un método que sea adecuado para preparar hidrogeles a escala industrial.

Otros diversos métodos para preparar hidrogeles se han descrito en la técnica anterior. Diversos informes describen la utilización de enzimas que, al someterse a un sustrato específico, proporcionan diversas reacciones que al final resulta en la unión cruzada de varios tipos de polímeros.

Por ejemplo, el documento CN 101439206 describe, entre otras cosas, el uso de polímeros que comprenden una unidad de hidroxilo fenólico y dioxigenasa en un proceso catalizado por enzimas para la preparación de geles de polímeros.

Johnsen y otros (2010), ACS Applied Materials & Interfaces, 2 (7), págs. 1963-1972, informan la preparación de hidrogel a base de PEG que se polimeriza con el uso de glucosa oxidasa. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la β -D-glucosa, y el uso posterior de oxígeno para generar el cofactor de la enzima dinucleótido de flavina y adenina, resulta en la formación de H_2O_2 . Mediante la combinación de iones ferrosos con esta producción enzimática de H_2O_2 , se producen especies de radicales hidroxilo primarios que reaccionan aún más con los monómeros acrilados.

El uso de H_2O_2 y la peroxidasa de rábano picante en la preparación de hidrogeles se ha informado además, consultar, por ejemplo Kurisawa y otros, (2010), J. of Materials Chemistry, 20 (26), págs. 5371-5375, Sakai y otros, (2009), Biomaterials, 30 (20), págs. 3371-3377, Sakai y Kawakami (2006), Acta Biomaterialia, 20017, 3, págs. 495-501, Lee y otros (2009), J. of Controlled Release, 134, págs. 186-193, Wang y otros (2010), Biomaterials, 31, págs. 1148-1157.

Los hidrogeles preparados mediante el uso de oxidasas y H_2O_2 son inapropiados para algunas aplicaciones ya que H_2O_2 es un oxidante fuerte.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un proceso mejorado y simplificado para la preparación de hidrogeles de alginato, particularmente hidrogeles adecuados para inmovilizar material biológico.

Resumen de la invención

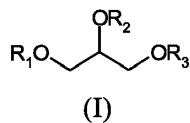
El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso mejorado para preparar hidrogeles de alginato que no ocasione los inconvenientes de los procesos de la técnica anterior.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso simplificado para la preparación de hidrogeles de alginato adecuados para inmovilizar material biológico.

Por lo tanto, la invención se refiere a un hidrogel de alginato en donde su gelificación se inicia mediante la utilización de una lipasa y un sustrato hidrolizable por la lipasa lo que resulta en la formación de H_3O^+ y subsecuentemente la liberación de un catión divalente debido a la presencia de un agente que libera cationes divalentes.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para la preparación de un hidrogel de alginato, dicho proceso que comprende la mezcla de una solución que comprende una lipasa con una solución que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, y en donde la solución comprende la lipasa o la solución que comprende

el sustrato que es hidrolizable por la lipasa adicionalmente comprende alginato, y un compuesto que libera cationes divalentes, en donde el sustrato es un compuesto de la Fórmula I:



en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, y en donde el agente que libera cationes es un carbonato. Al mezclar las dos soluciones, la unión del sustrato a la lipasa resulta en la hidrólisis de dicho sustrato y la subsecuente formación de H_3O^+ . La producción de H_3O^+ además, resulta en la liberación de cationes divalentes que, de este modo, inicia la formación del hidrogel.

De acuerdo con una modalidad, el compuesto que libera cationes divalentes y el alginato están presentes en la solución que comprende la lipasa. De acuerdo con una modalidad, el compuesto que libera cationes divalentes y el alginato están presentes en la solución que comprende dicho sustrato.

De acuerdo con una modalidad de la invención, la lipasa usada en el proceso de acuerdo con la invención es una triacilglicerol lipasa.

De acuerdo con aún otra modalidad de la invención, el compuesto que libera cationes divalentes, es decir, el carbonato, libera cationes divalentes seleccionados del grupo que consiste en Ca^{2+} , Ba^{2+} , y Sr^{2+} .

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, el compuesto que libera cationes divalentes es carbonato de calcio.

De acuerdo con aún una modalidad de la presente invención, R_1 , R_2 y R_3 de la Fórmula I son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_4 .

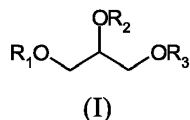
De acuerdo con una modalidad de la presente invención, R_1 , R_2 y R_3 de la Fórmula I se selecciona del grupo que consiste en metanona, etanona, acetona, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, o dodecanona.

Particularmente, por ejemplo, cuando los espermatozoides deben incrustarse en el hidrogel de alginato, el compuesto de la Fórmula I puede seleccionarse del grupo que consiste en triacetina, tripropionina y tributirina, preferentemente tripropionina y tributirina.

De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, la solución que comprende la lipasa o la solución que comprende el compuesto de la Fórmula I que es hidrolizable por la lipasa puede comprender adicionalmente un objeto para incrustarse en el hidrogel de alginato.

El objeto a incrustar en el gel de alginato puede, de acuerdo con un aspecto de la invención, representar material biológico, por ejemplo, material celular tal como espermatozoides.

De acuerdo con aún otra modalidad, se proporciona un proceso para preparar un hidrogel de alginato, que comprende la etapa de mezclar una solución que comprende una lipasa con una solución que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, y en donde la solución comprende dicha lipasa o la solución que comprende dicho sustrato adicionalmente comprende alginato, y un compuesto que libera cationes divalentes, en donde el sustrato es un compuesto de la Fórmula I:

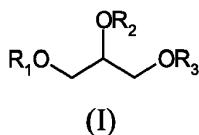


en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, y en donde el agente que libera cationes es un carbonato

Un hidrogel de acuerdo con la presente invención puede prepararse mediante un proceso que comprende las etapas de

i) formar una primera solución mediante dilución de espermatozoides con una solución que comprende una triacilglicerol lipasa;

ii) adicionar a la primera solución obtenida en la etapa i), una segunda solución que comprende alginato, un compuesto que libera cationes divalentes y un compuesto de la Fórmula I:



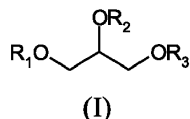
10 en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, iniciar la gelificación;

iii) transferir la solución obtenida en la etapa ii) a un recipiente para gelificar el hidrogel de alginato;

15 iv) opcionalmente someter el hidrogel de alginato de iii) a criopreservación.

Un hidrogel de acuerdo con la presente invención puede prepararse mediante un proceso que comprende las etapas de

20 i) formar una primera solución mediante dilución de espermatozoides con una solución que comprende un compuesto de la Fórmula I:



30 en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida;

ii) adicionar a la solución obtenida en la etapa i), una segunda solución que comprende alginato, un compuesto que libera cationes divalentes y una triacilglicerol lipasa que inicia la gelificación;

35 iii) transferir la solución obtenida en ii) a un recipiente para la gelificación del hidrogel de alginato;

iv) opcionalmente someter el hidrogel de alginato de iii) a criopreservación.

40 La primera y segunda solución de i) y ii) pueden comprender adicionalmente un crioprotector, y la solución obtenida en iii) se somete además a criopreservación. Además, cuando se preparan hidrogeles de alginato que comprenden espermatozoides de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente, los recipientes obtenidos en iii) pueden además someterse a criopreservación, y en donde la solución de la etapa i) y/o de la etapa ii) comprende un crioprotector.

45 El crioprotector presente en la solución de la etapa i) y/o de la etapa ii) puede seleccionarse del grupo que consiste en glicerol, etilenglicol, metanol, DMA, DMSO, propilenglicol, trehalosa, glucosa.

50 Cuando se preparan hidrogeles de alginato que comprenden espermatozoides de acuerdo con la presente invención, el compuesto que libera cationes divalentes puede ser preferentemente carbonato de calcio, y el compuesto de la Fórmula I puede seleccionarse preferentemente del grupo que consiste en triacetina, tripropionina y tributirina.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el alginato es alginato que es rico en ácido gúlico.

55 El hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención puede comprender en una modalidad de la invención:

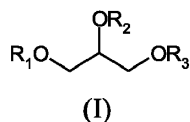
- a. alginato;
- b. un objeto a incrustar en el hidrogel de alginato;
- c. una lipasa usada en la preparación del hidrogel de alginato.

60 El hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención se forma mediante la gelificación del alginato, y en donde la gelificación se logra mediante la liberación de cationes divalentes de un carbonato que libera cationes divalentes como resultado de la hidrólisis de un sustrato de lipasa. El hidrogel formado comprenderá así la lipasa usada en la formación del gel. La presencia de lipasa en el hidrogel de acuerdo con la presente invención indica, así, que se ha aplicado el proceso de la invención.

65

El hidrogel de alginato de acuerdo con la invención comprende un objeto incrustado. De acuerdo con otra modalidad, dicho objeto a incrustar es un material biológico, tal como material celular, por ejemplo, espermatozoides.

De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit de hidrogel de alginato que comprende un recipiente que comprende una lipasa y un segundo recipiente que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, en donde el sustrato que se hidroliza por la lipasa es un compuesto de la Fórmula I:



en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, y en donde dicho kit comprende adicionalmente alginato y un carbonato que libera cationes divalentes.

Una modalidad de acuerdo con este aspecto de la presente invención considera un kit de hidrogel de alginato que comprende un recipiente que comprende una solución que comprende una lipasa, y un segundo recipiente que comprende una solución que comprende alginato, un carbonato que libera cationes divalentes y un sustrato hidrolizable por la lipasa.

Aún otra modalidad de este aspecto considera un kit de hidrogel de alginato que comprende un recipiente que comprende una solución que comprende un sustrato hidrolizable por una lipasa, y un segundo recipiente que comprende una solución que comprende alginato, un carbonato que libera cationes divalentes y una lipasa.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención proporciona un nuevo método para preparar hidrogeles de alginato útiles para diversas áreas de aplicaciones. Particularmente, la presente invención proporciona un nuevo método para preparar hidrogeles que, particularmente, es útil para incrustar e inmovilizar materiales biológicos.

Pueden usarse diversos tipos de alginato para preparar hidrogeles de acuerdo con la presente invención. La proporción de ácido gúlorónico: ácido manurónico no es crítica, es decir, el tipo de alginato y el contenido de ácido gúlorónico frente al ácido manurónico pueden seleccionarse en dependencia de la resistencia, estabilidad, capacidad de hinchamiento, características de erosión, etc. deseadas. El uso de alginatos ricos en G proporcionará, por ejemplo, hidrogeles más fuertes, más estables.

De acuerdo con una modalidad, el alginato usado para formar los hidrogeles es un alginato rico en ácido gúlorónico. El término "alginato que es rico en ácido gúlorónico" o "alginato rico en G" como se usa en la presente descripción denota al alginato que comprende mayores cantidades de ácido gúlorónico en comparación con ácido manurónico en la cadena polimérica de polisacárido del alginato usado. Opuesto, el término "alginato rico en M" o "alginato que es rico en ácido manurónico" como se usa en la presente descripción denota al alginato que comprende mayores cantidades de ácido manurónico en comparación con ácido gúlorónico. El término "rico" usado en relación con alginatos que comprenden cantidades mayores de ácido manurónico o de ácido gúlorónico, respectivamente, es bien conocido y se usa comúnmente por el experto en la técnica, consultar, por ejemplo, Britt Iren Glaerum Svanem y otros, *Journal of Biological Chemistry* Vol 276, No 34, 24 de agosto de 2001 págs. 31542-31550, Sumita Jain y otros *Molecular Microbiology* (2003) 47 (4), págs. 1123-1133, Marco Mancini y otros *Journal of Food Engineering* 39 (1999) pp369-378, *Microbiología Aplicada y Ambiental*, septiembre de 1982, Vol. 44 No.3 págs.754-756, patente de Estados Unidos 5,639,467, solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0159823, Ji Minghou (MH Chi) y otros *Hydrobiologia* 116/117 (1984), págs. 554-556.

Ejemplos no limitantes de tipos de alginatos adecuados para usar de acuerdo con la presente invención son los alginatos de FMC LF 10/40, FMC LF 10/60 y FMC LF 20/60 disponibles de FMC Biopolymer AS, Drammen, Noruega, A2033 de Sigma, Oslo, Noruega, o Pronova UP MYG, Pronova UP LVG disponibles de, por ejemplo, NovaMatrix, Sandvika, Noruega.

La función del hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención es independiente de la forma tridimensional del hidrogel formado, es decir, el hidrogel de alginato puede tener diferentes formas, tales como, por ejemplo, una forma esférica o cilíndrica. Pueden obtenerse varias formas del gel de alginato en dependencia del recipiente usado para la gelificación.

Además, de acuerdo con la presente invención, pueden usarse otros polímeros que, al someterse a una enzima y un sustrato resultan en la liberación de hidrogeles en forma de cationes divalentes.

De acuerdo con la presente invención, una lipasa, junto con un sustrato adecuado para la misma, se usa para iniciar la gelificación del alginato. El término "hidrolasa", como se usa en la presente descripción, pretende abarcar una lipasa que permite la producción de H_3O^+ cuando se mezcla una solución que comprende sustrato(s) con otra solución que comprende la lipasa. De acuerdo con aún otra modalidad de la presente invención, la lipasa es una acil hidrolasa, con

mayor preferencia una triacilglicerol lipasa, tal como, por ejemplo, la triacilglicerol lipasa aislada de la levadura *Candida rugosa*. Una lipasa adecuada está disponible de Sigma-Aldrich Co. LLC (L1754 - Tipo VII o L3001 Tipo I, número CAS 9001-62-1).

5 Debe entenderse que puede usarse cualquier hidrolasa que resulte en una producción neta de H_3O^+ tras la hidrólisis de su sustrato. Por lo tanto, una hidrolasa puede seleccionarse del grupo que consiste en hidrolasas de ésteres carboxílicos, glicosidasas y enzimas que actúan sobre enlaces carbono-carbono en sustancias cetónicas.

10 Ejemplos no limitantes de hidrolasas de ésteres carboxílicos son la carboxilesterasa, triglicerol lipasas, acetil esterasa, estero esterasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, acilglicerol lipasa, g-acetilglucosa deacetilasa, lipoproteína lipasa, acil etil éster graso sintasa, y diacilglicerol acil hidrolasa.

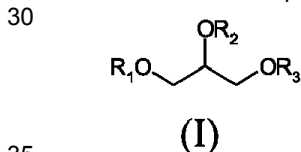
Ejemplos no limitantes de hidrolasas que actúan sobre los enlaces carbono-carbono en sustancias cetónicas son acilpiruvato hidrolasa y acetil piruvato hidrolasa.

15 Un ejemplo no limitante de una glicosidasa es la α -galacturonidasa.

20 Cuando se forma el gel de alginato de acuerdo con la presente invención, la lipasa y el sustrato de ésta están presentes en diferentes soluciones, que al mezclar resultan en el inicio del proceso de gelificación, y en donde una de dichas dos soluciones comprende adicionalmente alginato y un compuesto que libera cationes divalentes. La secuencia de la mezcla, es decir, si la solución que comprende la enzima se adiciona a una solución que comprende el sustrato, o viceversa, o si es la solución que comprende la enzima, que además comprende alginato y el compuesto que libera cationes divalentes, o viceversa, no es crítica.

25 El sustrato usado en la formación de un hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención es un sustrato que al unirse a la enzima resulta en la producción de H_3O^+ . Por lo tanto, el sustrato puede variar en dependencia del tipo de lipasa usada de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, el sustrato es un compuesto de la Fórmula I:

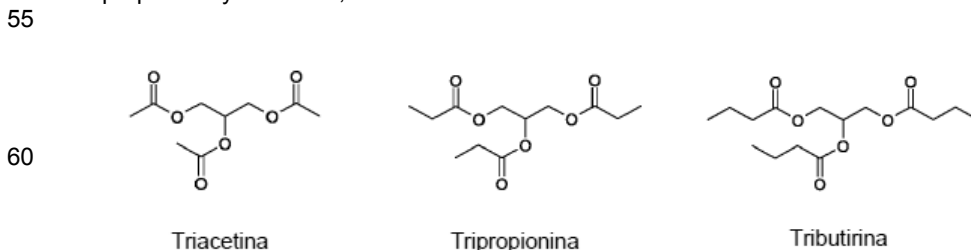


35 en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, tal como, por ejemplo, metanona, etanona, acetona, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, dodecanona, etc. De acuerdo con una modalidad, R_1 , R_2 , y R_3 cada uno son metanona. De acuerdo con otra modalidad, R_1 , R_2 , y R_3 cada uno son etanona. De acuerdo con aún otra modalidad, R_1 , R_2 , y R_3 son acetona. Los sustratos de la Fórmula I son particularmente útiles cuando se forman hidrogeles de alginato con el uso de una triacilglicerol lipasa.

40 Al unirse a la enzima presente en el primer diluyente, dicho éster de la Fórmula I se divide en glicerol y un ácido carboxílico, es decir, proporciona así H_3O^+ .

45 La cadena de alquil carbonilo puede ser ramificada o no ramificada. La cadena de alquil carbonilo puede estar además sustituida o no sustituida. El experto en la técnica reconocerá, en base a las enseñanzas en la presente descripción, que pueden usarse diversos sustratos cubiertos por la fórmula I y pueden seleccionar en base a las enseñanzas en la presente descripción, el sustrato apropiado para usar de acuerdo con la presente invención. El experto en la técnica reconocerá que la longitud de la cadena de alquilo puede variar sin afectar la capacidad de la enzima para producir glicerol y un ácido carboxílico del sustrato, lo que resulta así en la liberación de iones de H_3O^+ .

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el sustrato se selecciona del grupo de triacetina, tripropionina y tributirina, de las fórmulas:



Así, de acuerdo con una modalidad, R_1 , R_2 y R_3 representan alquil carbonilo C_1 - C_4 .

De acuerdo con aún otra modalidad de la presente invención, el sustrato presente se selecciona del grupo que consiste en tripropionina y tributirina.

De acuerdo con la presente invención, la mezcla de la lipasa y el sustrato definido anteriormente resulta en la producción de H_3O^+ . Dicho H_3O^+ además resulta en la liberación de cationes divalentes a partir del agente que libera cationes divalentes. El término agente que libera cationes divalentes pretende abarcar compuestos que resultan en la liberación de, por ejemplo, Ca^{2+} , Br^{2+} o Sr^{2+} .

El agente que libera cationes divalentes es una sal de carbonato, tales como $CaCO_3$, $BrCO_3$ o $SrCO_3$. De acuerdo con una modalidad preferida, el agente que libera cationes divalentes es un agente que libera calcio, tal como, por ejemplo, carbonato de calcio.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el método de la presente invención proporciona la incrustación de diversos materiales en la matriz polimérica del hidrogel. El término "incrustar" o "incrustación" como se usa en la presente descripción debe entenderse como inmovilización de un material en los hidrogeles de alginato de la presente invención, y en donde la red de alginato está presente en todo el diámetro del hidrogel (en contraste con la encapsulación en donde el hidrogel forma una pared alrededor de un núcleo líquido que no comprende una red de polímeros).

Debe entenderse que el término material biológico abarca cualquier tipo de material biológico adecuado para inmovilizarse o encapsularse en hidrogeles biocompatibles. Una lista no limitante de material biológico es, por ejemplo, células para trasplante, tales como, por ejemplo, células productoras de insulina, células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales o espermatozoides para utilización en inseminación artificial y otras tecnologías de reproducción.

En caso de que el material a incrustar sean espermatozoides, la incrustación resulta en que se previene que los espermatozoides tengan su posibilidad natural de movimiento. El grado de inmovilización puede variar en dependencia de las características del hidrogel de alginato, tal como la resistencia mecánica y la capacidad de desintegrarse, por ejemplo, después de la inseminación en un animal receptor.

De acuerdo con una modalidad preferida, el material biológico a inmovilizar de acuerdo con el presente proceso es espermatozoide. Los espermatozoides inmovilizados en un hidrogel de alginato preparado de acuerdo con la presente invención pueden opcionalmente crioprotectarse para su almacenamiento en nitrógeno líquido. El hidrogel de alginato que comprende espermatozoides inmovilizados preparados de acuerdo con la presente invención puede prepararse en dosis de inseminación listas para usar mediante inmovilización de una cantidad adecuada de espermatozoides en el hidrogel de alginato, y llevar a cabo la gelificación en un recipiente, tal como una pajuela comúnmente usada en procedimientos de inseminación artificial con el tamaño, forma y volumen deseados.

Para incrustar (inmovilizar) espermatozoides en un hidrogel de acuerdo con una modalidad de la presente invención, los espermatozoides se diluyen después de la recolección en un diluyente que comprende la enzima o el sustrato. Dicha solución diluida de espermatozoides se enfría opcionalmente a aprox. 4 °C. La solución usada para diluir los espermatozoides se denomina además en la presente descripción solución diluyente (consultar, por ejemplo, el Ejemplo 1).

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, los espermatozoides se diluyen primero en una solución diluyente que no comprende el sustrato o la enzima. El sustrato o la enzima se adicionan después en una segunda etapa de dilución en donde la solución diluyente entonces usada adicionalmente comprende la enzima o el sustrato.

De acuerdo con una modalidad, los espermatozoides se diluyen por segunda vez en una solución diluyente que comprende la lipasa. La solución así obtenida se mezcla después con una segunda solución que comprende alginato, carbonato de calcio y opcionalmente un crioprotector, tal como glicerol, y un sustrato para la enzima presente en la primera solución que comprende los espermatozoides diluidos y la enzima. Al adicionar y mezclar las dos soluciones, la enzima se unirá al sustrato lo que resulta en la formación de un ácido y, así, en un aumento en el nivel de H_3O^+ . El carbonato de calcio que actúa como un tampón evitará un aumento del pH lo que resulta en la liberación de Ca^{2+} y la producción de CO_2 . La liberación de Ca^{2+} resulta en la unión cruzada de las cadenas de polisacáridos del alginato y, así en la formación del hidrogel de alginato.

Debe entenderse que los espermatozoides pueden diluirse además en una solución diluyente que comprende el sustrato hidrolizable por la enzima a usar de acuerdo con la presente invención, que después se mezclan con una segunda solución que comprende la enzima, carbonato de calcio y opcionalmente crioprotector.

Así, los espermatozoides pueden diluirse primero en una solución diluyente, y después de eso someterse a una segunda dilución mediante adición de más solución diluyente que además comprende el sustrato. La solución así obtenida se mezcla después con una solución que comprende la enzima, alginato, carbonato de calcio y opcionalmente un crioprotector, tal como glicerol. Al mezclar las dos soluciones, se inicia la gelificación.

La temperatura del disolvente usado para diluir los espermatozoides y la temperatura de las etapas adicionales de formación del gel pueden variar en dependencia, por ejemplo, del tipo y la fuente de los espermatozoides. Así, el proceso de la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones de refrigeración o a temperatura ambiente (por ejemplo, 20- 24 °C) o incluso a una temperatura más alta, como por ejemplo 30 - 35 °C.

El proceso de la presente invención hace posible controlar la velocidad del proceso de gelificación mediante la variación de la cantidad de enzima usada. Adicionalmente, la concentración del alginato usado influye en las características mecánicas del hidrogel formado y, por lo tanto, además en las características de disolución del hidrogel. La concentración de alginato así puede variar en dependencia de las características deseadas del hidrogel, en dependencia de la rama de aplicación del hidrogel. El experto en la técnica en base a las enseñanzas en la presente descripción, será capaz de seleccionar la cantidad adecuada de enzima, sustrato y alginato a usar para obtener la resistencia deseada del gel y el tiempo deseado de gelificación.

Por ejemplo, el uso de 3 g de triacilglicerol lipasa por litro y 0,3 - 1 g de sustrato por 100 ml en la solución de espermatozoides/alginato obtenida después de mezclar las dos soluciones de acuerdo con la presente invención resulta en un tiempo de gelificación de aproximadamente 2-3 horas cuando la solución se mantiene aproximadamente a 4°C. La cantidad de sustrato puede variar adicionalmente de acuerdo con el tipo de enzima usada.

Adicionalmente, la cantidad de ácido y así la cantidad de H_3O^+ a producirse cuando la mezcla de las dos soluciones puede controlarse por la cantidad de sustrato presente en el segundo diluyente. Así, es posible controlar tanto la velocidad de gelificación como el pH final del proceso, lo que es una ventaja desde el punto de vista industrial. Esto proporciona un proceso de producción mejorado y más fácil, ya que uno puede realizar la gelificación siempre que sea adecuado desde el punto de vista de la producción a medida que la gelificación comienza cuando se mezclan los espermatozoides diluidos en una solución diluyente que comprende lo mismo la enzima como el sustrato.

Para incrustar material biológico, debe entenderse que la solución a mezclar puede comprender adicionalmente compuestos útiles, por ejemplo, para fines de conservación, tales como, por ejemplo, antibióticos, diluyentes, antioxidantes, tampones, etc., ver documento WO 2008/004890.

La concentración de material biológico, por ejemplo, células vivas, incrustadas en los hidrogeles de alginato de acuerdo con la presente invención puede variar en dependencia del tipo/fuente del material. En el caso de incrustar espermatozoides, la concentración puede variar aún más en dependencia de la raza, el animal receptor, las técnicas de inseminación, la presencia de compuestos adicionales (por ejemplo, para fines de conservación), etc., ver por ejemplo documento WO 2008/004890.

Aunque la presente invención es específicamente útil para incrustar material biológico en forma de células o tejidos en un gel de alginato, debe entenderse que los geles de alginato preparados de acuerdo con la presente invención tienen además una gama de otras aplicaciones, que incluyen la incrustación o inmovilización de objetos aparte de material biológico, y además aplicaciones que implican a los hidrogeles per se. La presente invención así no debe interpretarse como limitada a las aplicaciones específicamente descritas en los ejemplos de la descripción.

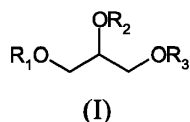
Así, otros objetos de interés pueden incrustarse además en un hidrogel de alginato preparado de acuerdo con la presente invención. El término "objeto a incrustar en el hidrogel de alginato" usado en la presente descripción pretende abarcar cualquier material que sea adecuado para inmovilizarse en un hidrogel. Por ejemplo, en caso de que el hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención se use como un sistema de liberación controlada, el objeto a incrustar puede ser un ingrediente farmacéutico activo. Por ejemplo, los geles de alginato preparados de acuerdo con la presente invención pueden usarse como un sistema de administración de liberación controlada o de liberación sostenida para una gama de compuestos, tales como compuestos farmacéuticamente activos, ver, por ejemplo, los documentos WO98/46211, US 4,695,463, US 6,656,508. Un grupo no limitante de ingredientes farmacéuticamente activos para incrustarse en un hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, proteínas o polipéptidos recombinantes o naturales, compuestos naturales o sintéticos o semisintéticos, tales como factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos, interferones, interleucinas, etc. Los hidrogeles de alginato de acuerdo con la presente invención pueden además tener utilidad dentro de la industria alimentaria, por ejemplo, para la incrustación de nutrientes.

Los hidrogeles preparados de acuerdo con la presente invención pueden además usarse como tales para otros fines industriales, tanto en la industria farmacéutica como en la cosmética (por ejemplo, como agente espesante, en vendajes para heridas, en productos y métodos de salud dental), o en la industria de alimentos para humanos y animales (por ejemplo, en la preparación de alimentos reestructurados, como agente espesante, etc.).

La presente invención proporciona ventajas en comparación con la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se usa la técnica descrita en el documento US 6,497,902, la velocidad de reacción, así como la cantidad de ácido producido, pueden estar influenciados al cambiar la concentración de GDL. Sin embargo, los cambios en la concentración de GDL además afectarán simultáneamente la cantidad de ácido producido y, así el pH final en el gel. La preparación de un hidrogel de alginato con el uso de una enzima y un sustrato hidrolizable por dicha enzima para iniciar la gelificación permite un control significativamente mejor de las velocidades de reacción y de la cantidad de ácido producido (el pH en el gel) en tanto la

velocidad de reacción y el pH final pueden controlarse individualmente mediante el cambio de la concentración de enzima y sustrato, respectivamente.

De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un kit de hidrogel de alginato que comprende un recipiente que comprende una lipasa y otro recipiente que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, en donde el sustrato que se hidroliza por la lipasa es un compuesto de la Fórmula I:



en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, y en donde dicho kit comprende adicionalmente alginato y un compuesto que libera cationes divalentes.

El kit de acuerdo con la presente invención puede contener además otros compuestos necesarios para moldear un hidrogel de alginato de acuerdo con la presente invención. Así, el kit puede comprender además alginato y un compuesto que libera cationes divalentes. Dichos compuestos pueden estar contenidos en el recipiente que comprende la lipasa, en el recipiente que comprende el sustrato hidrolizable por dicha lipasa, o pueden estar contenidos en recipiente(s) separado(s).

Los recipientes pueden comprender además otros compuestos de particular interés en dependencia del uso del hidrogel de alginato a moldear con el uso del kit de la presente invención.

Por ejemplo, en caso de que el kit se use para moldear geles que contengan material biológico, como material celular, por ejemplo, espermatozoides, y en donde el hidrogel de alginato resultante se someta además a la crioconservación, el kit puede contener además un crioprotector tal como, por ejemplo, glicerol, etilenglicol, metanol, DMA, DMSO, propilenglicol, trehalosa, glucosa. Dicho(s) crioprotectores pueden estar contenidos en el recipiente que comprende la lipasa, en el recipiente que comprende el sustrato hidrolizable por dicha lipasa, o pueden estar contenidos en recipiente(s) separado(s).

El kit puede comprender además otros compuestos útiles para fines de conservación, tales como, por ejemplo, antibióticos, diluyentes, antioxidantes, tampones, etc., conocidos por los expertos en la técnica, ver, por ejemplo, el documento WO 2008/004890.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración. Debe entenderse que los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Inmovilización de espermatozoides bovinos

Materiales y métodos

Materiales

Se usaron los siguientes productos químicos: trizma clorhidrato y EDTA de Sigma (St. Luis, Estados Unidos), NaHCO_3 , NaCl , glicerol (>99 %), citrato de sodio y piruvato de sodio de Riedel de Haën (Seelze, Alemania), fructosa y glucosa monohidratado de Norsk Medisinaldepot (Oslo, Noruega), carbonato de calcio de KSL staubtechnik gmbh (Lauingen, Alemania) y alginato de sodio (PROTANAL LF 10/60) de FMC Biopolymer A/S (Drammen, Noruega).

Fuente de espermatozoides

Se recolectaron espermatozoides bovinos en las instalaciones de Geno en Hallsteingard en Trondheim y en Store Ree en Stange, Noruega.

Soluciones tampón

Se usaron las siguientes soluciones diluyentes:

Diluyente para primera dilución de espermatozoides: $1,45 \text{ g l}^{-1}$ de Trizma clorhidrato glucosa, $0,4 \text{ g l}^{-1}$ de citrato de sodio, 1 g l^{-1} de fructosa, $0,22 \text{ g l}^{-1}$ de piruvato de sodio y 200 ml l^{-1} de yema de huevo. El pH de la solución se ajustó a 6,4 por adición de NaOH .

Solución diluyente para dilución secundaria de espermatozoides: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio (a menos que se indique lo contrario), 54 g l^{-1} de fructosa, 170 g l^{-1} de glicerol y 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF10/60. Ambos diluyentes contienen un cóctel antibiótico estándar que proporciona al menos la concentración final requerida en dir UE 88/407. IVT modificada:

3 g l⁻¹ de glucosa, 20 g l⁻¹ de citrato de sodio, 2,1 g l⁻¹ de NaHCO₃, 1,16 g l⁻¹ de NaCl, 3 g l⁻¹ de EDTA, pH 7,35. Las soluciones diluyentes se adicionaron a la enzima (Sigma L1754) o al sustrato como se especifica más abajo.

Dilución, inmovilización y crioconservación de espermatozoides de toro

Los espermatozoides bovinos se recolectaron en las instalaciones de Geno y se diluyeron como se describe más abajo: Inmediatamente después de la recolección, los espermatozoides se diluyeron a una concentración de 219 x 10⁶ células por ml en la solución diluyente para una primera dilución. Después, esta solución se mezcló inmediatamente con un volumen igual de diluyente para una dilución adicional, donde dicho diluyente esta vez comprendía enzima o sustrato. La solución resultante que contenía espermatozoides diluidos se enfrió después a 4 °C.

Después de enfriar a 4 °C, la solución se mezcló con un volumen igual de la solución diluyente para una tercera dilución donde dicho diluyente esta vez comprendía ya sea sustrato (triacetina, tripropionina o tributirina) si los espermatozoides diluidos de la etapa anterior comprendían la enzima o enzima si los espermatozoides diluidos de la etapa anterior comprendían el sustrato. Además, el diluyente esta vez comprendía carbonato de calcio como un compuesto que libera cationes divalentes y alginato. Las soluciones resultantes se transfirieron después a pajuelas de inseminación y se equilibraron a 4 °C durante aproximadamente 3 horas. Las pajuelas de inseminación se transfirieron después a una nevera de N₂ y se congelaron de acuerdo con procedimientos estándar para semen de toro.

Evaluación de la movilidad

La movilidad de los espermatozoides se evaluó a través de una evaluación microscópica. Las pajuelas de semen congeladas se descongelaron mediante mantenimiento de las pajuelas en un baño de agua a 37 °C durante 30 segundos. Antes de la medición, el gel de alginato se licuó en solución de IVT modificada. El contenido de una pajuela de inseminación se adicionó a 0,9 ml de solución de IVT y se agitó cuidadosamente en un tambor de tubos durante aproximadamente 10 minutos. Antes de evaluar la motilidad, los tubos se precalentaron durante un mínimo de 15 minutos en un bloque térmico a 37 °C. Aproximadamente 3 µl de la solución se adicionaron a un portaobjetos de microscopio precalentado e inmediatamente se inspeccionó con el uso de un microscopio óptico. El número de espermatozoides móviles en cada muestra se estimó en el intervalo más cercano de 5 %. Aunque fue prácticamente posible, el operador estuvo desinformado de la identidad de la muestra durante la evaluación.

Resultados

a) Inmovilización de espermatozoides bovinos con el uso de triacetina como sustrato

Los espermatozoides se recogieron y se diluyeron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. A la solución diluyente para la segunda dilución se adicionó enzima (Sigma L1754) a una concentración de 6 g l⁻¹ en la solución final que contenía espermatozoides. La solución diluyente para la tercera dilución contenía 8 g l⁻¹ de carbonato de calcio y se adicionó triacetina a una concentración de 0,5 g/100 ml. Aproximadamente 4 horas después de la dilución secundaria, se formó un gel que inmovilizó a los espermatozoides. Después de aproximadamente 24 horas de almacenamiento a 4 °C, el gel se licuó y se evaluó la motilidad de los espermatozoides inmovilizados. Aproximadamente 60 % de los espermatozoides eran móviles en ese momento.

b) Inmovilización de espermatozoides bovinos con el uso de tripropionina como sustrato

Los espermatozoides se recolectaron, se diluyeron, se inmovilizaron y se crioconservaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. A la solución diluyente para la segunda dilución se adicionó enzima (Sigma L1754) a una concentración de 6 g l⁻¹ en la solución final que contenía espermatozoides diluidos. La solución diluyente para la tercera dilución contenía 4 g l⁻¹ de carbonato de calcio y se adicionó tripropionina a una concentración de 0,30 g/100 ml. Aproximadamente 3 horas después de la dilución secundaria, se formó un gel y se congelaron las pajuelas que contenían los espermatozoides inmovilizados. Las pajuelas de semen se almacenaron en N₂ líquido durante varios días hasta la descongelación y valoración de la motilidad. Aproximadamente 60 % de los espermatozoides eran móviles después de descongelar y licuar el gel.

c) Inmovilización de espermatozoides bovinos con el uso de tripropionina como sustrato

Los espermatozoides se recolectaron, se diluyeron, se inmovilizaron y se crioconservaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. A la solución diluyente para la segunda dilución se adicionó tripropionina a una concentración de 0,30 g/100 ml en la solución final que contenía espermatozoides diluidos. La solución diluyente para la tercera dilución contenía 4 g l⁻¹ de carbonato de calcio y se adicionó enzima Sigma L1754 a una concentración de 6 g l⁻¹. Aproximadamente 2 horas después de la dilución secundaria, se formó un gel. Después de aproximadamente 24 horas de almacenamiento a 4 °C, el gel se licuó y se evaluó la motilidad de los espermatozoides inmovilizados. Aproximadamente 60 % de los espermatozoides eran móviles en ese momento.

d) Inmovilización de espermatozoides bovinos con el uso de tributirina como sustrato

Los espermatozoides se recolectaron, se diluyeron, se inmovilizaron y se crioconservaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. A la solución diluyente para la segunda dilución se adicionó enzima (Sigma L1754) a una concentración de 6 g l^{-1} en la solución final que contenía espermatozoides diluidos. La solución diluyente para la tercera dilución contenía 4 g l^{-1} de carbonato de calcio y se adicionó tributirina a una concentración de $0,35 \text{ g/100 ml}$. Aproximadamente 3 horas después de la dilución secundaria, se formó un gel y se congelaron las pajuelas que contenían los espermatozoides inmovilizados. Las pajuelas de semen se almacenaron en N_2 líquido durante varios días hasta la descongelación y valoración de la motilidad. Aproximadamente 60 % de los espermatozoides eran móviles después de descongelar y licuar el gel.

Ejemplo 2 Preparación controlada de gel de alginato de calcio con el uso de enzimas de lipasa y sustratos de triacetina o trioctanoato

Materiales y métodos

Materiales

Alginato de sodio (PROTANAL LF 10/60) de FMC Biopolymer A/S (Drammen, Noruega), enzimas L3001 y L1754 de Sigma (St. Luis, Estados Unidos), Triacetina y trioctanoato de Sigma (St. Luis, Estados Unidos), carbonato de calcio de KSL staubtechnik gmbh (Lauingen, Alemania)

Soluciones

Se usaron las siguientes soluciones. Solución L1.1: 10 g l^{-1} de solución de enzima L3001 en agua destilada, solución L1.2: $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina en agua destilada. Solución L2.1: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio, 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF10/60 y $0,1 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina en agua destilada. Solución L2.2: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio, 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF10/60 y $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina en agua destilada. Solución L2.3: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio, 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF10/60 y $0,3 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina en agua destilada. Solución L2.4: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio, 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF 10/60 y 10 g l^{-1} de enzima L3001 en agua destilada. Solución L2.5: 4 g l^{-1} de carbonato de calcio, 24 g l^{-1} de alginato de sodio LF10/60 y $0,3 \text{ g l}^{-1}$ de trioctanoato en agua destilada.

Iniciación de la gelificación

La gelificación se inició mediante la mezcla de una de las soluciones L1 con un volumen igual de una de las soluciones L2. Las soluciones se mezclaron de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1: Ensayos experimentales con gelificación mediante el uso de enzima L3001 y sustrato de triacetina. Las combinaciones de soluciones investigadas se muestran en la tabla, así como también las concentraciones de enzima y sustrato de triacetina usadas.

Prueba	Soluciones	Concentraciones
1	L1.1 + L2.1	10 g l^{-1} de enzima L3001, $0,1 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina
2	L1.1 + L2.2	10 g l^{-1} de enzima L3001, $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina
3	L1.1 + L2.3	10 g l^{-1} de enzima L3001, $0,3 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina
4	L1.2 + L2.4	$0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina, 10 g l^{-1} de enzima L3001
5	L1.2 + L2.2	$0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina, $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de triacetina (sin enzima añadida)
6	L1.3 + L2.5	10 g l^{-1} de enzima L1754, $0,4 \text{ g l}^{-1}$ de trioctanoato

Todas las soluciones estaban a temperatura ambiente antes de mezclarse, y las soluciones se dejaron a temperatura ambiente para su gelificación. El curso de tiempo de la reacción de gelificación se siguió por inspección visual de las soluciones.

Resultados

Las enzimas L3001 (lipasa del germen de trigo) y L1754 (lipasa de Candida rugosa) y los sustratos triacetina y trioctanoato se usaron para la gelificación controlada de las soluciones de alginato de sodio. Las soluciones de enzima y sustrato se prepararon y mezclaron de acuerdo con la Tabla 1. La reacción entre enzima y sustrato produce iones H_3O^+ que reaccionan con el carbonato de calcio suspendido en las soluciones. Esta reacción libera iones de calcio que interactúan con las cadenas de polímeros de alginato en la solución y se forma un gel. Los tiempos observados antes de que se formara un gel en los ensayos experimentales se muestran en la Tabla 2. No se formó ningún gel en el ensayo experimental 5 en el que no se adicionaron enzimas. Los resultados muestran que el tiempo de reacción está en

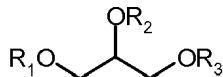
dependencia tanto del tipo de sustrato como de la enzima seleccionada así como también de las concentraciones de enzima y sustrato usadas.

Tabla 2: El tiempo observado antes de la gelificación transcurre después de mezclar soluciones que contienen enzimas (Sigma L3001 o L1754) y/o sustrato (triacetina o trioctanoato).

Prueba	Soluciones	Tiempo para la formación de gel (h:m)
1	L1.1 + L2.1	2:00
2	L1.1 + L2.2	1:50
3	L1.1 + L2.3	1:30
4	L1.2 + L2.4	1:50
5	L1.2 + L2.2	No se formó gel
6	L1.3 + L2.5	0:30

Reivindicaciones

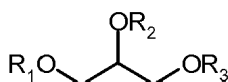
1. Uso de una lipasa y un sustrato que es hidrolizable por la lipasa y un agente que libera cationes divalentes en la preparación de un hidrogel de alginato, en donde el sustrato es un compuesto de la Fórmula I:



(I)

en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, y en donde el agente que libera cationes divalentes es un carbonato.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lipasa es una triacilglicerol lipasa.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la hidrólisis del compuesto de la Fórmula I por la lipasa resulta en la producción de H_3O^+ .
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_1 , R_2 , y R_3 se seleccionan del grupo que consiste en metanona, etanona, acetona, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, o dodecanona.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_4 .
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto de la Fórmula I se selecciona del grupo que consiste en triacetina, tripropionina y tributirina, preferiblemente tripropionina y tributirina.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lipasa y el compuesto de la Fórmula I se usan en la preparación de un hidrogel de alginato que incrusta material biológico, preferentemente espermatozoides.
8. Un proceso para preparar un hidrogel de alginato, que comprende la etapa de mezclar una solución que comprende una lipasa con una solución que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, y en donde la solución que comprende dicha lipasa o la solución que comprende dicho sustrato adicionalmente comprende alginato, y un compuesto que libera cationes divalentes, en donde el sustrato es un compuesto de la Fórmula I:

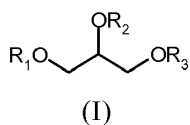


(I)

en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, y en donde el agente que libera cationes divalentes es un carbonato.

9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la solución que comprende la lipasa comprende un carbonato que libera cationes divalentes y alginato.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la solución que comprende el compuesto de la Fórmula I comprende un carbonato que libera cationes divalentes y alginato.
11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde R_1 , R_2 , y R_3 se selecciona del grupo que consiste en metanona, etanona, acetona, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, o dodecanona.
12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_4 .

13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el compuesto de la Fórmula I se selecciona del grupo que consiste en triacetina, tripropionina y tributirina, preferentemente tripropionina y tributirina.
- 5 14. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde el carbonato que libera cationes divalentes es carbonato de calcio.
- 10 15. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 - 13, en donde la solución que comprende la lipasa o la solución que comprende el compuesto de la Fórmula I comprende adicionalmente un objeto a incrustar en el hidrogel de alginato.
- 15 16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el objeto a incrustar en el gel de alginato es material biológico, tal como espermatozoides.
- 20 17. Un hidrogel de alginato que comprende
a) alginato;
b) un objeto a incrustar en el hidrogel de alginato; y
c) una lipasa usada en la preparación del hidrogel de alginato.
- 25 18. Un hidrogel de alginato de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el objeto a incrustar en el gel de alginato es material biológico, preferentemente espermatozoides.
19. Un kit de hidrogel de alginato que comprende un recipiente que comprende una lipasa y un segundo recipiente que comprende un sustrato hidrolizable por la lipasa, en donde el sustrato que se hidroliza por la lipasa es un compuesto de la Fórmula I:



en donde R_1 , R_2 y R_3 independientemente son iguales o diferentes y representan una cadena de alquil carbonilo C_1 - C_{12} , y en donde dicho kit comprende adicionalmente alginato y un carbonato que libera cationes divalentes.