

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 547**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61L 27/22** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

**C08J 9/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2015 PCT/JP2015/079787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2015 E 15853265 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3210634**

54 Título: **Método para preparar microtransportadores, microtransportadores y aplicación de los mismos**

30 Prioridad:

**22.10.2014 GB 201418787**

**22.10.2014 GB 201418789**

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

**25.02.2020**

73 Titular/es:

**FUJIFILM CORPORATION (100.0%)  
26-30, Nishiazabu 2-chome Minato-ku  
Tokyo 106-0031, JP**

72 Inventor/es:

**VAN SPREUWEL-GOOSENS, CAROLINA  
ANTONIA FRANCINA MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 744 547 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para preparar microtransportadores, microtransportadores y aplicación de los mismos

### 5 Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a microtransportadores de gelatina porosa, un método para preparar microtransportadores de gelatina recombinante porosa y el uso de microtransportadores porosos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

#### 2. Descripción de la técnica relacionada

15 En un caso donde el cuerpo de un ser humano o animal está dañado, si este es un daño de tejido menor, en general, el tejido puede repararse mediante el sistema de reparación que el ser humano o el animal originalmente tienen. Sin embargo, en muchos casos, los daños tales como infarto de miocardio o lesiones que acompañan a daños de tejido graves no se pueden reparar mediante la capacidad regenerativa intrínseca del ser humano o el animal. En un caso de daño de tejido grave, es necesario un procedimiento que ayude a la reparación del tejido.

20 Uno de los problemas resultantes del daño extenso al tejido es cómo el espacio o hueco formado se va a cerrar o rellenar. Como solución a este problema, es posible usar una matriz como relleno (semi)permanente para rellenar el espacio o el hueco del sitio donde se ha perdido el tejido. La matriz puede usarse también como un depósito de liberación lenta para liberar un factor de crecimiento o una medicina o para administrar a las células. Cuando se siembran las células deseadas en la matriz por adelantado antes de que las células se inyecten o trasplanten al organismo, se puede llevar a cabo la administración de las células.

25 La gelatina se usa en algunos casos como un material que constituye la matriz en la forma de un microtransportador poroso o similar. Por lo tanto, los productos de microtransportadores de gelatina porosa están atrayendo la atención.

30 En el documento WO03/104313, Nilsson sugiere un método para preparar un microtransportador de gelatina porosa natural que se puede usar como matrices para la regeneración del tejido. El método de preparación de Nilsson incluye etapas de emulsión en dos pasos. En cada una de las etapas, se usa un tensioactivo que tiene un valor HLB (balance hidrófilo) específico. De acuerdo con Nilsson, en la primera etapa de emulsión, se prepara una solución homogénea de gelatina soluble en agua que contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de más de 9, y se añade a la anterior una primera composición que contiene un disolvente orgánico y un emulsionante que tiene un valor HLB de más de 9. Además, de acuerdo con Nilsson, en la segunda etapa de emulsión, se añade una segunda composición que contiene un disolvente orgánico y un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 y, finalmente, se enfría y coagula un material de gelatina, obteniendo de esta forma los microtransportadores.

40

#### Sumario de la invención

45 Gracias al estudio de los inventores de la presente invención, los presentes investigadores intentaron preparar microtransportadores porosos a partir de gelatina recombinante basándose en el método de Nilsson et al., utilizando gelatina natural. Sin embargo, cuando se usó el método de Nilsson para la gelatina recombinante, se obtuvieron partículas similares a pasta o grumos de partículas no homogénea, y ninguna de estas fue ideal para el cultivo de células. Por lo tanto, la presente invención desea proporcionar un método de preparación que posibilite obtener microtransportadores porosos que tengan propiedades únicas y una única distribución del tamaño de partícula.

50 Además, gracias al estudio de los inventores de la presente invención, los presentes investigadores intentaron preparar microtransportadores porosos que tuvieran características mejoradas de crecimiento celular. La presente invención también desea proporcionar microtransportadores de gelatina porosa que tengan excelentes características de crecimiento celular.

55 Como resultado de una investigación intensiva, los inventores de la presente invención descubrieron que, sorprendentemente, cambiando el método de Nilsson et al., y llevando a cabo la segunda etapa de emulsión utilizando un líquido no soluble en agua que sustancialmente no contenga o no contenga en todo el emulsionante que tiene un HLB de menos de 8, se pueden obtener microtransportadores de gelatina recombinante porosa que tienen excelentes características de crecimiento celular. Lo que los inventores han descubierto es un conocimiento que es completamente opuesto al método de Nilsson, en donde el emulsionante se utiliza en una cantidad significativa en la segunda etapa de emulsión. Como se describirá específicamente a continuación, el cambio anteriormente mencionado a partir del método de Nilsson se puede usar para la gelatina recombinante con el fin de proporcionar microtransportadores porosos anteriormente desconocidos que tienen propiedades únicas y una única distribución del tamaño de partícula.

60

65 los inventores de la presente invención también descubrieron que, sorprendentemente, los microtransportadores que

tienen las características definidas que se describirán posteriormente pueden prepararse por el método anteriormente mencionado o similar y tienen características de crecimiento celular particularmente excelentes en comparación con las micropartículas comercialmente disponibles en el mercado.

5 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se divulga también lo siguiente:

- 10 [1] Un método para preparar microtransportadores de gelatina recombinante porosa, que comprende (a) una etapa de generar una primera emulsión mezclando una composición que contiene agua, gelatina recombinante, un líquido no soluble en agua, y un emulsionante, (b) una etapa de generar una segunda emulsión mezclando la primera emulsión con un líquido no soluble en agua a una temperatura superior que la temperatura de gelificación de la gelatina y (c) una etapa de enfriar la segunda emulsión a una temperatura a la cual coagula la gelatina, en la que el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad de menos del 0,5 % en peso.
- 15 [2] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con [1], en el que el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) no contiene el emulsionante que tiene el valor HLB de menos de 8.
- [3] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con [1], en el que el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) no contiene un emulsionante.
- [4] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en el que un valor HLB del emulsionante utilizado en la etapa (a) es mayor de 9.
- 20 [5] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en el que el pH de la primera emulsión está comprendido en un intervalo de 3 a 11.
- [6] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en el que la gelatina recombinante tiene al menos 5 puntos isoeléctricos.
- [7] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que la gelatina recombinante no contiene hidroxiprolina.
- 25 [8] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], que comprende además (d) una etapa de eliminar la gelatina coagulada de la segunda emulsión.
- [9] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en el que la gelatina recombinante contiene al menos 3 motivos RGD.
- 30 [10] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en el que la gelatina recombinante contiene al menos dos restos de lisina, los dos restos de lisina son restos de lisina de los extremos, un primer resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano a un extremo N de la gelatina, un segundo resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano al extremo C de la gelatina, y los restos de lisina de los extremos están separados entre sí por al menos un 25 % del número total de restos de aminoácidos de la gelatina.
- 35 [11] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], en el que en la etapa (b), un volumen del líquido no soluble en agua es mayor que un volumen de la primera emulsión.
- [12] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], en el que, en la etapa (c), el enfriamiento se lleva a cabo a 0,1 °C a 20 °C/min.
- 40 [13] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en el que la primera emulsión contiene la gelatina recombinante en una cantidad de al menos 1 % al 15 % en peso.
- [14] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13], en el que la composición usada en la etapa (a) contiene la gelatina recombinante en una cantidad de 1 al 15 % en peso, agua en una cantidad de 10 al 70 % en peso, el líquido no soluble en agua en una cantidad de 20 al 90 % en peso, y el emulsionante en una cantidad de 0,5 al 20 % en peso.
- 45 [15] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], que comprende además una etapa de reticulación de la gelatina en la etapa (b) y/o después de la etapa (b).
- [16] El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [15], que comprende además una etapa de llevar a cabo la reticulación mediante deshidratación térmica sobre la gelatina después de la etapa (b).
- 50 [17] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa obtenidos por el método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [16].
- [18] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con [17] que tienen poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5 µm y tienen un volumen de huecos medio de al menos un 50 % en volumen.
- 55 [19] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con [17] o [18] que tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm.
- [20] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [19] que tienen una densidad media de 0,04 a 0,5 g/cm<sup>3</sup>.
- 60 [21] los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [20] que tienen un volumen medio de 2 a 25 cm<sup>3</sup>/g.
- [22] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [18] a [21] que se obtienen por el método de preparar microtransportadores porosos de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [16].
- 65 [23] Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con [17] que tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm, en los que al menos un 80 % de los microtransportadores tienen un tamaño de

partícula que es de 30 % al 200 % del tamaño medio de partícula.

[24] Un uso de los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [23] como transportadores de células.

[25] Un uso de los microtransportadores de gelatina porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [23] como matrices para la reparación de daños del tejido.

[26] Un material compuesto que comprende los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [23] y células, en el que las células se encuentran sobre una superficie y/o en el interior de los microtransportadores.

[27] Una composición para inyección que comprende un transportador farmacológicamente aceptable y los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [23] o el material compuesto de acuerdo con [26].

[28] La composición para inyección de acuerdo con [27] que se puede inyectar a través de una jeringuilla que tiene un calibre interno de 80 a 4.000  $\mu\text{m}$ .

[29] Microtransportadores de gelatina porosa que tienen huecos, en los que al menos la mitad de los huecos son esféricos y/o al menos la mitad de los huecos tienen un diámetro que es -30 % a +30 % de un diámetro medio de los huecos.

[30] Los microtransportadores de acuerdo con [29] que tienen poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5  $\mu\text{m}$ .

[31] Los microtransportadores de acuerdo con [29] o [30] que tienen un volumen medio de hueco de al menos un 50 % en volumen.

[32] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [31], en los que el diámetro medio de los huecos está comprendido en un intervalo de 5 % a 25 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores.

[33] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [32] que tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800  $\mu\text{m}$ .

[34] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [33] que tienen una densidad media de 0,04 a 0,5  $\text{g}/\text{cm}^3$ .

[35] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [34] que tienen un volumen medio de 2 a 25  $\text{cm}^3/\text{g}$ .

[36] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [35] que tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800  $\mu\text{m}$ , en los que al menos un 80 % de los microtransportadores tienen un tamaño de partícula que es de 30 % al 200 % del tamaño medio de partícula.

[37] Los microtransportadores de acuerdo con [29] que tienen poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5  $\mu\text{m}$ , un volumen medio de hueco de al menos 50 % en volumen, y un tamaño medio de partícula de 20 a 800  $\mu\text{m}$ , en los que al menos la mitad o más de los huecos son esféricos, al menos un 80 % de los microtransportadores tienen un tamaño de partícula que es un 30 % al 200 % del tamaño medio de partícula, y un diámetro medio de los huecos que está comprendido en un intervalo de 5 % al 25 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores.

[38] Los microtransportadores de acuerdo con [29] que tienen poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5  $\mu\text{m}$ , un volumen medio de hueco de al menos 50 % en volumen, y un tamaño medio de partícula de 20 a 800  $\mu\text{m}$ , en el que al menos la mitad o más de los huecos tienen un diámetro que es -30 % a +30 % de un diámetro medio de los huecos, al menos un 80 % de los microtransportadores tienen un tamaño de partícula que es un 30 % al 200 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores, y el diámetro medio de los huecos está comprendido en un intervalo de 5 % al 25 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores.

[39] Los microtransportadores de acuerdo con [37] o [38], en los que al menos un 75 % de los huecos son esféricos.

[40] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [39], en los que la gelatina es gelatina recombinante.

[41] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [40], en los que la gelatina es gelatina recombinante que tiene al menos 5 puntos isoeléctricos.

[42] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [41], en los que la gelatina es gelatina recombinante que no contiene hidroxiprolina.

[43] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [42], en los que la gelatina es gelatina recombinante que contiene al menos 3 motivos RGD.

[44] Los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [43], en los que la gelatina es gelatina recombinante que contiene al menos dos restos de lisina, los dos restos de lisina son restos de lisina de los extremos, un primer resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano a un extremo N de la gelatina, un segundo resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano al extremo C de la gelatina, y los restos de lisina de los extremos están separados entre sí por al menos un 25 % del número total de restos de aminoácidos de la gelatina.

[45] Un uso de los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44] como transportadores de células.

[46] Un uso de los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44] como matrices para la reparación del daño del tejido.

[47] Un material compuesto que comprende los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a

[44] y células, en el que las células se encuentran sobre una superficie y/o en el interior de los microtransportadores.

[48] Una composición para inyección, que comprende un transportador farmacológicamente aceptable y los microtransportadores de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44] o el material compuesto de acuerdo con [47].

[49] La composición para inyección de acuerdo con [47] que se puede inyectar a través de una jeringuilla que tiene un calibre interno de 80 a 4.000  $\mu\text{m}$ .

Con el método para preparar microtransportadores de gelatina recombinante porosa de la presente invención, como se describirá específicamente más adelante, es posible proporcionar microtransportadores porosos anteriormente desconocidos que tengan propiedades únicas y una única distribución del tamaño de partícula para la gelatina recombinante.

Además, los microtransportadores de gelatina porosa de la presente invención tienen características de crecimiento particularmente excelentes en comparación con las micropartículas comercialmente disponibles en el mercado.

### Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A a 1C son imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de microtransportadores obtenidos por un método de la presente invención, en la que el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad de menos del 0,5 % en peso.

Las Figs. 2A a 2C son imágenes SEM de los microtransportadores de los ejemplos comparativos que se obtuvieron modificando el método de la presente invención, en los que el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad igual o mayor del 0,5 % en peso.

Las Figs. 3A a 3C son imágenes SEM de los microtransportadores CultiSpher G (marca registrada) comercialmente disponibles de GE Healthcare Life Sciences.

La Fig. 1A es una imagen ampliada en un factor de 50 que muestra esquemáticamente los microtransportadores obtenidos por el método de la presente invención. Los microtransportadores de la Fig. 1A tienen una forma esférica excelente y un intervalo estrecho de distribución de tamaño, y prácticamente no forman o no forman en absoluto un grumo, que es un agregado de partículas. La Fig. 1B es una imagen ampliada en un factor alto de 230 que muestra los microtransportadores obtenidos por el método de la presente invención, En la Fig. 1B, se pueden observar claramente los poros superficiales (1). Los poros superficiales (1) están unidos a los huecos de las micropartículas (los huecos internos no se pueden observar en la imagen). La Fig. 1C es una vista en sección transversal de los microtransportadores obtenidos por el método de la presente invención. La Fig. 1C muestra los huecos internos (2), al menos la mitad de los huecos son esféricos y tienen un diámetro que es de -30 % a +30 % del diámetro medio de los huecos. Las Figs. 2C y 3C, que son vistas en sección transversal de los microtransportadores de los ejemplos comparativos y corresponden a la Fig. 1C, muestran que los huecos internos son grandes. Los huecos (2) de la Fig. 1C son prácticamente esféricos. Cuando las cavidades esféricas se solapan o se ponen en contacto entre sí, un hueco que se une a un hueco adyacente tiene poros pequeños en su pared. En la relación entre los huecos (2) y los microtransportadores en términos de tamaño, la mayoría de los huecos (2) son grandes y tienen un intervalo estrecho de distribución de tamaño (por ejemplo, los huecos (2) tienen sustancialmente el mismo tamaño).

Los microtransportadores de la presente invención permiten el cultivo de células acompañado por un excelente crecimiento celular desde el punto de vista de la cantidad y proporción de células. En particular, los microtransportadores pueden utilizarse de forma adecuada para un cultivo celular dinámico en el que los microtransportadores para el cultivo se mantienen suspendidos, y la manipulación de los microtransportadores es sencilla.

La Fig. 2A es una imagen ampliada en un factor de 100 que muestra esquemáticamente los microtransportadores obtenidos por el método de los ejemplos comparativos descrito anteriormente. Como se describirá específicamente en la sección del ejemplo, los microtransportadores de los ejemplos comparativos se obtienen por un método diferente en el que el aceite de maíz de la etapa (b) contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad de 5 % en peso. La mayoría de los microtransportadores de la Fig. 2A están agrupados entre sí. Como resultado, los microtransportadores forman partículas secundarias que tienen formas no uniformes y tienen un amplio intervalo de distribución de tamaños. La Fig. 2B es una imagen ampliada en un factor de 750 que muestra los microtransportadores obtenidos por el método de un ejemplo comparativo. Los microtransportadores del ejemplo comparativo no son esféricos y tienen poros superficiales (3) grandes. Los microtransportadores están agrupados entre sí y forman una estructura secundaria. La Fig. 2C es una vista en sección transversal de los microtransportadores obtenidos por el método del ejemplo comparativo. Como es evidente a partir de la Fig. 2C, desde el punto de vista del tamaño y la forma de los huecos internos (4), los microtransportadores son irregulares, y el diámetro de la mayoría de los microtransportadores es más pequeño que el diámetro de los microtransportadores de la presente invención que se muestra en la Fig. 1B. Los huecos (4) en las micropartículas de la Fig. 2C tienen un intervalo muy amplio de distribución de tamaños. La mayoría de los huecos (4) de la Fig. 2C no son esféricos, y menos de la mitad de los huecos tienen un diámetro que es de -30 % a +30 % del diámetro medio de los huecos.

La Fig. 3A es una imagen ampliada en un factor de 50 que muestra esquemáticamente los microtransportadores comercialmente disponibles CultiSpher G (marca comercial registrada). La Fig. 3B es una imagen ampliada en un factor de 600 que muestra un único transportador CultiSpher G (marca comercial registrada). En esta imagen, se pueden observar claramente los poros superficiales (5). La Fig. 3C es una imagen ampliada en un factor de 300 que muestra una sección transversal de CultiSpher G (marca comercial registrada). En comparación con los huecos en la Fig. 1C, los huecos (6) en los microtransportadores CultiSpher G (marca comercial registrada) que se muestran en la Fig. 3C tienen tamaños y formas irregulares, y la mayoría de ellos no son huecos esféricos, sino más bien poros cilíndricos o tubulares. Muchos de los huecos (6) que se muestran en la Fig. 3C tienen un tamaño más pequeño que el tamaño de partícula de los microtransportadores, y tienen un intervalo más amplio de distribución de tamaños en comparación con los microtransportadores de la Fig. 1C. La mayoría de los huecos (6) de la Fig. 3C no son esféricos y menos de la mitad de los huecos tienen un diámetro que es de -30 % a +30 % del diámetro promedio de los huecos.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

La expresión "gelatina recombinante" usada en la presente memoria descriptiva incluye colágeno recombinante, y el término "gelatina" incluye colágeno. En consecuencia, en la presente memoria descriptiva, Los términos y expresiones "gelatina", "colágeno", "polipéptido de colágeno", y "polipéptido de gelatina" se usan en el mismo sentido.

Los huecos se describirán como espacios o cavidades en algunos casos.

El peso molecular promedio de la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención es preferentemente menos de 150 kDa, y más preferentemente menos de 100 kDa. El peso molecular promedio es preferentemente de al menos 5 kDa, más preferentemente de al menos 10 kDa, e incluso más preferentemente de al menos 30 kDa. El peso molecular promedio de la gelatina recombinante está preferentemente en un intervalo de 50 kDa a 100 kDa, 20 kDa a 75 kDa, y 5 kDa a 40 kDa. Cuando se requiere gelatina de alta concentración de masa para la baja viscosidad, el peso molecular es preferentemente menor que el anterior. La gelatina de los microtransportadores de gelatina porosa de la presente invención es gelatina recombinante. Sin embargo, el intervalo preferido del peso molecular promedio de la gelatina es el mismo que el intervalo descrito anteriormente con respecto a la gelatina recombinante anteriormente mencionada.

La gelatina de acuerdo con la presente invención es gelatina recombinante.

La gelatina recombinante está comercialmente disponible, y por ejemplo, se puede obtener la fabricada por FUJIFILM Corporation. La gelatina recombinante puede prepararse por un método conocido. Por ejemplo, se pueden usar los métodos descritos en los documentos EP0926543 y EP1014176. Los contenidos de los métodos se incorporan a la presente memoria descriptiva por referencia. La técnica de preparar gelatina recombinante se describe también en "High yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*, M.W.T. Werten et al. *Yeast* 15, 1087-1096 (1999)". El documento WO2004/85473 describe también gelatina recombinante adecuada.

Es posible ilustrar una realización en la que la gelatina recombinante contiene al menos dos restos de lisina, los dos restos de lisina son restos de lisina de los extremos, un primer resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano a un extremo N de la gelatina, un segundo resto de lisina del extremo es un resto de lisina más cercano al extremo C de la gelatina, y los restos de lisina de los extremos están separados entre sí por al menos un 25 % del número total de restos de aminoácidos de la gelatina. Esta gelatina recombinante puede obtenerse mediante, por ejemplo, el método descrito en el documento US2009/0246282.

Como otra realización de la presente invención, es posible ilustrar una realización en la que la gelatina recombinante contiene al menos dos restos de aminoácidos, los dos restos de aminoácidos son restos de aminoácidos de los extremos, cada uno de los restos de aminoácidos se seleccionan de manera independiente entre un resto de ácido aspártico y un resto de ácido glutámico, un primer resto de ácido aspártico o un resto de ácido glutámico del extremo es un resto de ácido aspártico o un resto de ácido glutámico más cercano a un extremo N de un polipéptido, un segundo resto de ácido aspártico o un resto de ácido glutámico es un resto de ácido aspártico o un resto de ácido glutámico más cercano a un extremo C de un polipéptido, y cualquiera o ambos del resto del ácido aspártico y el resto de ácido glutámico del extremo están separados entre sí por al menos un 25 % de un número total de restos de aminoácidos en un polipéptido de gelatina recombinante. En la otra realización anteriormente mencionada de la presente invención, la gelatina recombinante tiene al menos un resto de ácido aspártico o un resto de ácido glutámico entre los restos de ácido aspártico del extremo y/o entre los restos de ácido glutámico del extremo.

En una realización, el polipéptido de la gelatina recombinante no forma una triple hélice particularmente estable ni a una temperatura de más de 5 °C ni a una temperatura de más de 25 °C.

La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente prolina en un triplete GXY que corresponde a una gelatina derivada de mamíferos o animales homeotérmicos tales como peces.

A fin de evitar la formación de una triple hélice estable, la proporción de aminoácido que contiene un grupo hidroxilo en los aminoácidos en la gelatina recombinante es preferentemente menor de 2 % y más preferentemente menor de 1 %. Puede evitarse la existencia de hidroxiprolina expresándola en un microorganismo que no exprese simultáneamente una enzima que produzca la hidroxilación de un resto de prolina o satisfaciendo la acción de la misma mediante otro método. "Prácticamente 0" significa que la existencia de hidroxiprolina en el medio de crecimiento tal como levadura produce alguno de los aminoácidos que se van a incorporar a la gelatina.

En una realización adecuada, la gelatina recombinante tiene excelentes características de adhesión celular y, preferentemente, no tiene ninguno de los riesgos relacionados con la salud. Dicha realización puede conseguirse usando gelatina recombinante enriquecida con RGD, por ejemplo, gelatina recombinante en la que una relación de motivos RGD al número total de aminoácidos es al menos de 0,4. Cuando la gelatina enriquecida con RGD tiene 350 o más aminoácidos, es preferible que al menos un motivo RGD este contenido en cada intervalo de los 350 aminoácidos. La relación del motivo RGD es preferentemente al menos de 0,6, más preferentemente al menos de 0,8, incluso más preferentemente al menos de 1,0, aún más preferentemente al menos de 1,2 y lo más preferente al menos de 1,5.

Una relación de 0,4 del motivo RGD corresponde a un estado donde una única secuencia de RGD emerge en cada tramo de 250 aminoácidos. El número de motivos RGD es un número entero. Por lo tanto, para que la relación del motivo RGD sea de 0,4 %, la gelatina que contiene 251 aminoácidos debe tener al menos dos secuencias de RGD. La gelatina recombinante enriquecida con RGD tiene preferentemente al menos dos motivos RGD en cada tramo de 250 aminoácidos, más preferentemente, tiene al menos 3 motivos RGD en cada tramo de 250 aminoácidos, y lo más preferente, tiene al menos 4 motivos RGD en cada tramo de 250 aminoácidos. En otra realización, la gelatina enriquecida con RGD tiene al menos 4 motivos RGD, preferentemente tiene al menos 6 motivos RGD, más preferentemente, tiene al menos 8 motivos RGD, y lo más preferente tiene 12 a 16 motivos RGD.

La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención se deriva preferentemente de una secuencia de colágeno. Los ácidos nucleicos que codifican el colágeno se describen generalmente en documentos conocidos (por ejemplo, se hace referencia a Fuller y Boedtker (1981) *Biochemistry* 20:996-1006; Sandell et al. (1984) *J Biol Chem* 259:7826-34; Kohno et al. (1984) *J Biol Chem* 259:13668-13673; French et al. (1985) *Gene* 39:311-312; Metsaranta et al. (1991) *J Biol Chem* 266:16862-16869; Metsaranta et al. (1991) *Biochim Biophys Acta* 1089:241-243; Wood et al. (1987) *Gene* 61:225-230; Glumoff et al. (1994) *Biochim Biophys Acta* 1217:41-48; Shirai et al. (1998) *Matrix Biology* 17:85-88; Tromp et al. (1988) *Biochem J* 253:919-912; Kuivaniemi et al. (1988) *Biochem J* 252:633640; y Ala-Kokko et al. (1989) *Biochem J* 260:509-516).

La gelatina recombinante enriquecida con el motivo RGD puede prepararse por un método general descrito en, por ejemplo, el documento US2006/0241032.

Para utilizarse como una medicación o utilizarse con fines médicos, es preferible que la gelatina recombinante tenga una secuencia de aminoácidos que esté próxima o sea igual a la secuencia de aminoácidos del colágeno humano natural. La secuencia de aminoácidos de la gelatina es más preferentemente una secuencia de repetición de aminoácidos del colágeno humano natural y, particularmente, la gelatina que tiene una secuencia que contiene un motivo RGD para preparar gelatina recombinante enriquecida con RGD. La relación del motivo RGD en una secuencia seleccionada depende de la longitud seleccionada de la secuencia seleccionada. Si se selecciona una secuencia más corta, la relación del motivo RGD de la gelatina recombinante final se vuelve inevitablemente alta. La repetición de la secuencia de aminoácidos seleccionada se puede utilizar para proporcionar una gelatina recombinante que tenga un peso molecular mayor que el de la gelatina natural. Además, es posible obtener la gelatina recombinante enriquecida con RGD que no sea antigénica, a diferencia de la gelatina natural.

En consecuencia, en una realización adecuada, la gelatina recombinante incluye una parte de la secuencia del colágeno humano natural. La gelatina es preferentemente gelatina enriquecida con RGD que contiene uno o más sitios de la secuencia de aminoácidos de una o más secuencias de aminoácidos de la gelatina humana natural, en una proporción de igual o mayor de 80 %. Cada uno de los sitios anteriormente mencionados de la secuencia de la gelatina humana tiene preferentemente una longitud que consiste en al menos 30 aminoácidos, más preferentemente, tiene una longitud que consiste en al menos 45 aminoácidos, e incluso más preferentemente tiene una longitud que consiste en al menos 60 aminoácidos. Por ejemplo, cada uno de los sitios tiene una longitud que consiste en hasta 240 aminoácidos, preferentemente, tiene una longitud que consiste en hasta 150 aminoácidos y más preferentemente tiene una longitud que consiste en hasta 120 aminoácidos. Es preferible que cada uno de los sitios incluya una o más secuencias de RGD. La gelatina enriquecida con RGD incluye preferentemente uno o más sitios de una o más secuencias del colágeno humano natural.

Los ejemplos de una fuente adecuada de la gelatina recombinante usada en el método de la presente invención incluyen COL1A1-1 humana. El sitio de los 250 aminoácidos que incluye la secuencia de RGD se describe en el documento WO04/85473. La secuencia de RGD de la gelatina recombinante puede unirse a un receptor específico denominado integrina sobre una superficie celular.

La gelatina enriquecida con RGD puede fabricarse por los métodos de recombinación génica descritos en los

documentos EP-A-0926543, EP-A-1014176, o WO01/34646, y particularmente por los métodos descritos en los ejemplos de los documentos EP-A-0926543 y EP-A-1014176. Un método preferido para fabricar la gelatina recombinante enriquecida con RGD incluye la etapa de iniciar el método utilizando una secuencia de ácido nucleico natural que codifica una porción de una proteína de colágeno que incluye una secuencia de aminoácidos de RGD. Repitiendo la secuencia, se puede obtener la gelatina recombinante enriquecida con RGD.

De esta manera, la gelatina recombinante puede fabricarse expresando un ácido nucleico que codifica la gelatina en un microorganismo adecuado. Este método puede llevarse a cabo adecuadamente utilizando células fúngicas o células de levadura. Como células hospedadoras, son adecuadas células hospedadoras de alta expresión tales como *Hansenula*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Neurospora*, o *Pichia*. Las células fúngicas y las células de levaduras son más preferibles que las bacterias ya que las células no se ven fácilmente afectadas por la inadecuada expresión de una secuencia de repetición. Es más preferible que el hospedador no tenga un alto nivel de proteasa que obstaculice la expresión de la estructura de gelatina. En este sentido, *Pichia* o *Hansenula* pueden ilustrarse como un sistema de expresión extremadamente adecuado. El uso de *Pichia pastoris* como sistema de expresión se divulga en los documentos EP0926543 y EP1014176. Un microorganismo puede evitar la activación de un mecanismo de procesamiento posterior a la traducción tal como la hidroxilación de prolina o la hidroxilación de lisina. Por el contrario, el sistema hospedador puede tener una actividad de hidroxilación de la prolina intrínseca hidroxilando la gelatina con alta eficacia.

En otra realización, la gelatina recombinante tiene, en comparación con la gelatina natural, una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) mayor que es, por ejemplo, igual o mayor que 170 °C y particularmente igual o mayor que 180 °C. La gelatina recombinante que tiene una  $T_g$  mayor en comparación con la gelatina natural se describe en el documento WO05/11740.

En otra realización, el grado de glicosilación de la gelatina recombinante es menor que el de la gelatina natural. Por ejemplo, el grado de glicosilación de la gelatina recombinante es menor de un 2 % en peso, preferentemente menor de un 1 % en peso, más preferentemente menor de un 0,5 % en peso, incluso más preferentemente menor de un 0,2 % en peso y aún más preferentemente menor de un 0,1 % en peso. En una realización preferida, la gelatina recombinante no experimenta glicosilación. El grado de glicosilación, representado por el % en peso, significa el peso total de hidratos de carbono por unidad de peso de la gelatina, y puede determinarse mediante espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) o por el método de valoración de Dubois. El término "glicosilación" significa no solo la glicosilación implicada en monosacáridos, sino también la glicosilación implicada en polisacáridos tales como disacáridos, trisacáridos, y tetrasacáridos.

Existen diversos métodos para reducir o evitar la glicosilación. La glicosilación es una modificación posterior a la traducción, y debido a la glicosilación, se forma un enlace covalente entre un carbohidrato y determinado aminoácido de la gelatina. La secuencia de aminoácidos y la célula hospedadora (y una enzima, particularmente, la glicosiltransferasa) determinan el grado de glicosilación. Existen dos tipos de glicosilación que incluyen la N-glicosilación que comienza cuando la N-acetilglucosamina (GlcNAc) se une a un grupo amida de la asparagina (N o Asn), y la O-glicosilación en la que GalNAc se une generalmente a un aminoácido serina (S o Ser) o treonina (T o Thr).

Por lo tanto, seleccionando una célula hospedadora adecuada y/o modificando o seleccionando una secuencia sin un sitio consenso reconocido por la glicosiltransferasa del hospedador, es posible controlar, particularmente reducir, o evitar la glicosilación. Se puede usar la síntesis química de la gelatina para preparar gelatina que no experimente la glicosilación. Utilizando un método conocido, puede generarse gelatina recombinante que experimenta la glicosilación, y a continuación se pueden eliminar la totalidad o la mayoría de hidratos de carbono de la misma. Como alternativa, la gelatina que no ha experimentado glicosilación se puede separar de la gelatina que ha experimentado glicosilación.

En otra realización preferida, la gelatina recombinante contiene hidroxiprolina como resto de aminoácido en una proporción de menos de un 10 % y preferentemente en una proporción de menos de un 5 %. Es preferible que la gelatina recombinante no contenga un resto de hidroxiprolina. Es también preferible que la gelatina recombinante no contenga un resto de aminoácido hidroxilado.

En otra realización, la gelatina recombinante tiene al menos 5 puntos isoeléctricos. Por ejemplo, la gelatina recombinante tiene de 5 a 11 puntos isoeléctricos, más preferentemente tiene 6 o más puntos isoeléctricos, e incluso más preferentemente tiene 7 o más puntos isoeléctricos, de tal manera que la gelatina recombinante que tiene una carga positiva neta se proporciona en condiciones fisiológicas. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se considera que la carga positiva ayuda a la fuerza atractiva, la interacción, y la unión entre células que tienen una membrana que está negativamente cargada de forma global.

Los microtransportadores de gelatina porosa de la presente invención se preparan por el método para preparar microtransportadores de gelatina recombinante de la presente invención.

El pH de la composición usada en la etapa (a) está preferentemente comprendido en un intervalo de 3 a 11 y más

preferentemente en un intervalo de 4 a 8. El pH de la segunda emulsión está preferentemente comprendido en un intervalo de 3 a 11, y más preferentemente comprendido en un intervalo de 4 a 8. Es preferible que la composición usada en la etapa (a) contenga un emulsionante que tenga un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) que sea preferentemente mayor de 9, más preferentemente mayor de 10 y, de forma particularmente preferente 13 a 19.

5 También es posible usar dos o más tipos del emulsionante. Los ejemplos de emulsionantes adecuados incluye ácido monooleico PEG400, ácido monooleico polioxietilenado (HLB: 11.4), PEG400 monoestearato polioxietilenado monolaurato (HLB: 11.6), PEG400 monolaurato polioxietilenado monolaurato (HLB: 13.1), oleato de potasio (HLB: 20.0), lauril sulfato de sodio (HLB: 40), oleato de sodio (HLB: 18), Myrj (marca comercial registrada) 52 (estearato de polioxietileno, HLB: 17), Brij (marca comercial registrada) 58 (alcohol polioxietilencetílico, HLB: 16), Tween (marca comercial registrada) 20 (monoéster del ácido sorbitán láurico polioxietilenado, HLB: 16.7), Tween 21 (monoéster del ácido sorbitán láurico polioxietilenado, HLB: 13.3), Tween 40 (monopalmitato de sorbitán polioxietilenado, HLB: 15.6), Tween 60 (monoestearato de sorbitán polioxietilenado, HLB: 14.9), Tween 61 (monoestearato de sorbitán polioxietilenado, HLB: 9.6), Tween 65 (triestearato de sorbitán polioxietilenado, HLB: 10.5), Tween 80 (monoéster del ácido sorbitán oleico polioxietilenado, HLB: 15.0), Tween 81 (monoéster del ácido sorbitán oleico polioxietilenado, HLB: 10.0), y Tween 85 (trioleato de sorbitán polioxietilenado, HLB: 11.0). Entre estos, Tween 80, Tween 40, Myrj 52, Brij 58, y son preferibles una combinación de dos o más de estos de estos.

El líquido no soluble en agua adecuado utilizado en la etapa (a) es acetato de alquilo (por ejemplo, acetato de etilo), hidrocarburos (por ejemplo, hexano, heptano, ciclohexano, tolueno, o xileno), hidrocarburo halogenado (por ejemplo, cloruro de metileno, monoclorobenceno, o diclorobenceno), aceite (por ejemplo, aceite vegetal (por ejemplo, aceite de maíz)), aceite de parafina, aceite lubricante industrial, y una combinación de dos o más de estos. Entre estos, el aceite de maíz es particularmente preferible como líquido no soluble en agua.

25 el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) contiene preferentemente un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad de menos de 0,1 % en peso, más preferentemente no contiene un emulsionante que tenga un valor HLB de menos de 8, e incluso más preferentemente no contiene un emulsionante.

Los ejemplos del emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 incluyen monoestearato de glicerina (HLB: 3.8), Span (marca comercial registrada) 40 (monopalmitato de sorbitán, HLB: 6.7), Span 60 (monoestearato de sorbitán, HLB: 4.7), Span 65 (triestearato de sorbitán, HLB: 2.1), Span 80 (monoéster del ácido sorbitán oleico, HLB: 4.3), y Span 85 (trioleato de sorbitán, HLB: 1.8).

35 El líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) puede ser igual o diferente del líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (a). En la etapa (a), una relación volumétrica de agua al líquido no soluble en agua es más pequeña que 1:1 y de forma particularmente preferible más pequeña que 1:2. En la etapa (b), una relación volumétrica de agua al líquido no soluble en agua es más pequeña que 2:1 y de forma particularmente preferible más pequeña que 1:1.

40 En general, la primera emulsión y la segunda emulsión tienen cada una dos fases, es decir, una fase no soluble en agua y una fase acuosa. Es preferible que la etapa (a) se lleve a cabo en un estado donde el volumen de la fase no soluble en agua sea el mismo o mayor que el volumen de la fase acuosa, por ejemplo, en un estado donde el volumen de la fase no soluble en agua es dos veces o más que el volumen de la fase acuosa. Es preferible que la etapa (b) se lleve a cabo en un estado donde el volumen de la fase no soluble en agua es mayor que el volumen de la primera emulsión, por ejemplo, en un estado donde el volumen de la fase no soluble en agua no es menor de dos veces el volumen de la primera emulsión.

50 El método de la presente invención puede incluir además una etapa de reticulación de la gelatina, en la etapa (b) y/o después de la etapa (b). La reticulación es una reticulación química tal como una reticulación química que utiliza un agente de reticulación y preferentemente una reticulación térmica tal como una reticulación mediante deshidratación térmica. La gelatina puede reticularse a través, por ejemplo, un grupo amina de la lisina, un grupo carboxílico de ácido glutámico o ácido aspártico, o una combinación de estos.

Como agente de reticulación adecuado de la reticulación química, es preferible un agente de reticulación que no produzca toxicidad o antigenicidad cuando se libera durante la biodegradación. Los ejemplos del agente de reticulación adecuado incluyen glutaraldehído, carbodiimida soluble en agua, un compuesto bisepoxi, formol, 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida, bis-hidroxi-succinimida, éter de glicidilo (por ejemplo, alquilen glicol diglicidil éter o poliglicerol poliglicidil éter), diisocianato (por ejemplo, diisocianato de hexametileno), difenil fosforil azida, D-ribosa, genepin, y una combinación de estos. El método de reticulación se describe también en "Weadock et. al. en Evaluation of collagen cross-linking techniques (Biomater. Med. Devices Artif. Organs, 1983-1984, 11 (4): 293-318)". Entre los anteriores, es posible usar de forma adecuada 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) soluble en agua. Además, puede utilizarse de forma adecuada diisocianato de hexametileno. Los ejemplo de otros agentes de reticulación adecuados incluyen triazina tal como diclorohidroxitriazina. Los ejemplos de otros compuestos de reticulación incluyen divinilsulfona, di-anhídrido, imidato bifuncional, diepoxi, y dimaleimidina. Es también posible utilizar un agente de reticulación bifuncional que tenga diferentes sustituyentes activos en un único compuesto, tal como un compuesto de reticulación bifuncional que contiene epóxido y anhídrido. Es también útil un agente de reticulación enzimática tal como una transglutaminasa.

- El agente de reticulación puede tener más de dos grupos funcionales, y los ejemplos de los mismos incluyen cloruro cianúrico (grupo trifuncional) y un compuesto que contiene dos epóxidos y anhídrido. Estos agentes de reticulación reaccionan generalmente con un grupo amino y/o un grupo sulfhidrilo existente en un aminoácido de la gelatina. Si fuera necesario, se puede usar más de un agente de reticulación. La reticulación se inicia espontáneamente cuando el agente de reticulación entra en contacto con la gelatina, después que se ajusta el pH o similar, mediante luz, o a través de otros mecanismos de activación.
- Glutaraldehído es un agente de reticulación particularmente útil, y este reticula dos restos lisina. EDC es otro agente de reticulación biocompatible adecuado, y este une un grupo amino a un grupo carboxilo. Se puede usar también diisocianato de hexametileno como un agente de reticulación. Durante la reticulación mediante deshidratación térmica, la reticulación se induce debido a la condensación de un grupo amino y a un grupo carboxilo existente en la gelatina, y por tanto se forma un enlace amida. La reticulación mediante deshidratación térmica se lleva a cabo preferentemente a una temperatura igual o mayor de 120 °C.
- En un caso donde los microtransportadores de gelatina porosa de la presente divulgación son gelatinas diferentes de la gelatina recombinante, las realizaciones adecuadas que se refieren a la reticulación son las mismas que se han descrito anteriormente con referencia a la reticulación anteriormente mencionada.
- A fin de realizar una contribución a la formación de partículas, la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente al menos dos restos de lisina. La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente al menos 3 restos de lisina o tiene al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 restos de lisina. En otra realización, La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente, además de los restos de lisina, al menos dos aminoácidos seleccionados entre ácido aspártico y ácido glutámico. La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención contiene más preferentemente al menos 3 restos de ácido aspártico y ácido glutámico o contiene al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 restos de ácido aspártico y ácido glutámico.
- A fin de realizar una contribución a la estructura de la red tridimensional de los microtransportadores, La gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente lisina, ácido aspártico y/o ácido glutámico dispersos en moléculas de gelatina. Por lo tanto, en una realización, cada tramo de 50 restos de aminoácidos tiene al menos un resto de lisina, y preferentemente tiene al menos dos restos de lisina. Como alternativa, cada tramo de 50 restos de aminoácidos tiene al menos un resto de ácido aspártico o ácido glutámico y tiene preferentemente al menos dos restos de ácido aspártico o ácido glutámico, o, cada tramo de 50 restos de aminoácidos tiene preferentemente al menos un resto de lisina y al menos un resto de ácido aspártico o ácido glutámico. Preferentemente, cada tramo de 40 restos de aminoácidos, y más preferentemente, cada tramo de 25 restos de aminoácidos tiene preferentemente al menos un resto de lisina y/o al menos un resto de ácido aspártico o ácido glutámico.
- Es preferible que la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención contenga cada una restos de aminoácidos reticulables que no sean adyacentes entre sí. Por ejemplo, los restos de aminoácidos reticulables separados preferentemente por al menos 5 aminoácidos no reticulables, más preferentemente, separados por al menos 10 aminoácidos no reticulables. El resto de aminoácido reticulable contiene un grupo amina primario (además de un grupo amina primario usado generalmente para formar un enlace amida en un esqueleto de proteínas), -SH, y/o ácido carboxílico (además del ácido carboxílico generalmente utilizado para formar un enlace amida en un esqueleto de proteínas).
- Es preferible que la gelatina recombinante contenga restos de lisina en una proporción mayor (%) o en un número más grande en comparación con la gelatina natural, En particular para la siguiente reticulación. Muchos de los agentes de reticulación se unen a un resto de lisina y/o una amina en el extremo N. En general, en la gelatina natural, cada tramo de 1.000 aminoácidos contiene 25 a 27 restos de lisina y 112 a 133 ácidos glutámico y aspártico. En la gelatina recombinante usada en la presente invención, por ejemplo, el número de restos de lisina puede ajustarse para ser el mismo que anteriormente o puede reducirse y llegar a ser aproximadamente menor de 20, 15, 10 o 5 para cada tramo de 1.000 aminoácidos. Si fuera necesario, por ejemplo, el número de restos de lisina puede ajustarse para ser el mismo que anteriormente o puede aumentarse y llegar a ser aproximadamente mayor de 30, 40, o 50 para cada tramo de 1.000 aminoácidos. Por ejemplo, el número de restos de ácido glutámico o ácido aspártico existente en la gelatina recombinante utilizados en la presente invención se puede ajustar para ser el mismo que anteriormente o se puede reducir y llegar a ser aproximadamente menor de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, o 5 para cada tramo de 1.000 aminoácidos. Si fuera necesario, por ejemplo, el número puede ajustarse para ser el mismo que anteriormente o puede aumentarse y llegar a ser aproximadamente mayor de 150 para cada tramo de 1.000 aminoácidos. Si fuera necesario, alguno o todos los restos de glutamina y asparagina existentes en la gelatina recombinante se pueden desaminar, de tal manera que pueden convertirse en restos de ácido aspártico y ácido glutámico.
- En una realización, mediante una etapa de poner en contacto la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención con un agente de reticulación en una cantidad de 0,02 a 1,0 mmol por 1 gramo de la gelatina

recombinante, la gelatina recombinante se reticula. Por ejemplo, por 1 gramo de la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención, es posible utilizar un agente de reticulación en una cantidad de aproximadamente 0,02, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1,9 mmol.

5 En otra realización, mediante una etapa de poner en contacto la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención con 0,5 a 5,0 mmol de agente de reticulación por 1 gramo de la gelatina recombinante, la gelatina recombinante se reticula. Por ejemplo, por 1 gramo de la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención, es posible utilizar un agente de reticulación en una cantidad de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, y 5,0 mmol.

10 De esta manera, a fin de determinar o personalizar las características físicas de los microtransportadores, es posible utilizar la cantidad del agente de reticulación que se va a utilizar y el número de restos de aminoácidos reticulables. Aumentando el número de restos reticulables y/o aumentando la concentración del compuesto reticulable, es posible obtener microtransportadores fuertes, que son particularmente útiles para el objetivo sometido a estrés mecánico.

15 Disminuir el número de restos de aminoácidos reticulables y/o disminuir la concentración del compuesto de reticulación, es posible obtener microtransportadores fácilmente deformados adecuados para inyección o para utilizarse como una medicación.

20 Es preferible la reticulación térmica debido a que hace posible evitar la contaminación química potencial de la gelatina recombinante de acuerdo con la presente invención, esto es particularmente deseable cuando los microtransportadores se usan como una medicación.

25 Un grado de reticulación afecta al tiempo que tardan los microtransportadores de gelatina en degradarse en el cuerpo. Por lo tanto, la relación de degradación de los microtransportadores para utilizarse como se pretende puede controlarse. Por ejemplo, la relación de degradación puede controlarse cuando los microtransportadores de la presente invención que no contienen células se usan para inyectarse en una parte arrugada en la cirugía estética. Las células alrededor de los microtransportadores mueven los microtransportadores y forman colonias. Los microtransportadores se degradan lentamente debido a las enzimas que los rodean (por ejemplo, metaloproteínasa de matriz), las células que se han movido ocupan la porción arrugada, y como resultado, la arruga se suaviza.

30 En la etapa (a), una relación volumen a volumen de agua al líquido no soluble en agua es preferentemente 5:1 a 1:10, más preferentemente 1:1 a 1:5 y de forma particularmente preferente 2:3 a 1:3.

35 La composición usada en la etapa (a) (y la primera emulsión obtenida) contiene la gelatina recombinante, preferentemente en una cantidad de 1 % a 15 % en peso, más preferentemente en una cantidad 1,5 % a 10 % en peso, y deforma particularmente preferente en una cantidad de 3 % a 5 % en peso, contiene agua preferentemente en una cantidad de 10 % a 70 % en peso, más preferentemente en una cantidad 20 % a 50 % en peso, y deforma particularmente preferente en una cantidad de 30 % a 40 % en peso, contiene el líquido no soluble en agua preferentemente en una cantidad de 20 % a 90 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 40 % a 80 %

40 en peso, de forma particularmente preferible en una cantidad de 50 % a 70 % en peso, y contiene el emulsionante preferentemente en una cantidad de 0,5 % a 20 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 1 % a 10 % en peso, y de forma particularmente preferible en una cantidad de 2 % a 6 % en peso.

45 La etapa (a) se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 10 °C a 100 °C, más preferentemente a una temperatura de 20 °C a 80 °C, y de forma particularmente preferente a una temperatura de 30 °C a 60 °C.

50 La mezcla realizada en la etapa (a) y la etapa (b) puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, la mezcla puede llevarse a cabo homogeneizando o agitando. Es preferible llevar a cabo la mezcla por agitación. En particular, cuando se adopta una agitación de tipo máquina para disolver, la agitación se lleva a cabo preferentemente a una velocidad de 20 a 5.000 revoluciones por minuto (rpm), más preferentemente a una velocidad de 200 a 1.000 rpm, y de forma particularmente preferible a una velocidad de 250 a 600 rpm. La velocidad de mezcla en la etapa (a) puede ser igual o diferente de la velocidad de mezcla en la etapa (b).

55 En la etapa (b), una relación volumen a volumen de la primera emulsión al líquido no soluble en agua mezclado con la primera emulsión es preferentemente 5:1 a 1:100, más preferentemente 2:1 a 1:10 y de forma particularmente preferente 1:1 a 1:3.

60 La segunda emulsión contiene preferentemente la primera emulsión en una cantidad de 1 % a 85 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 10 % a 65 % en peso, y de forma particularmente preferente en una cantidad de 25 % a 50 % en peso, y contiene el líquido no soluble en agua (es decir, el líquido no soluble en agua que se añade al líquido no soluble en agua ya existente en la primera emulsión en la etapa (a) y que la segunda emulsión contiene desde el primer momento en la etapa (b)) en una cantidad de 15 % a 99 % en peso, más preferentemente en una cantidad de 35 % a 90 % en peso, y de forma particularmente preferible en una cantidad de 50 % a 75 % en peso.

65 Es preferible que el líquido no soluble en agua mezclado con la primera emulsión en la etapa (b) contenga un emulsionante que tenga un HLB de menos de 8, preferentemente en una cantidad de 0 % a 0,1 % en peso y más preferentemente en una cantidad de 0 % en peso. Es preferible que el líquido no soluble en agua mezclado con la

primera emulsión en la etapa (b) no contenga un emulsionante.

Es preferible que la etapa (b) se lleve a cabo a una temperatura mayor de la temperatura de gelificación de la gelatina. Se puede determinar la temperatura de gelificación de la gelatina mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, es posible usar el método descrito en "Tosh et al in Applied Physics Letters, Vol. 84, Número 21, 24 de mayo de 2004". En particular, es posible usar el tercer método descrito en el documento anterior. La temperatura de gelificación depende de la identidad de la gelatina y del grado de concentración de la gelatina.

Es preferible que la etapa (b) se lleve a cabo a una temperatura que es de 1 °C a 80 °C, preferentemente 3 °C a 70 °C, y de forma particularmente preferente 5 °C a 60 °C mayor que la temperatura de gelificación de la gelatina.

En general, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura de 10 °C a 100 °C, por ejemplo, a una temperatura comprendida en el intervalo de 15 °C a 70 °C y particularmente a una temperatura comprendida en un intervalo de 20 °C a 60 °C, aunque la temperatura depende de la gelatina.

En realidad, en general, no es importante discernir la temperatura de gelificación de la gelatina con alta precisión. Es suficiente saber de forma grosera la temperatura de gelificación, debido a que la etapa (b) puede llevarse a cabo a una temperatura suficientemente mayor que la temperatura de gelificación a la cual se produce evidentemente la gelificación simplemente discerniendo de forma grosera la temperatura de gelificación a través del cálculo sin medir realmente la temperatura de gelificación.

El enfriamiento llevado a cabo en la etapa (c) puede ser pasivo o activo. Por ejemplo, el enfriamiento pasivo puede llevarse a cabo sencillamente permitiendo a la segunda emulsión enfriarse espontáneamente a la temperatura a la que la gelatina coagula. Se puede llevar a cabo el enfriamiento activo utilizando un método de enfriamiento (por ejemplo, hielo o agua con hielo) para disminuir la temperatura (a una temperatura de enfriamiento controlada, por ejemplo) de la segunda emulsión. El enfriamiento activo es útil para ajustar las propiedades de los microtransportadores finales.

En la etapa (c), es preferible que la segunda emulsión se enfríe a una velocidad de 0,1 °C a 20 °C/min y más preferentemente a una velocidad de 1 °C a 10 °C/min. debido a la velocidad de enfriamiento anteriormente mencionada, se pueden proporcionar microtransportadores que tienen características particularmente útiles. Por ejemplo, en un caso donde la segunda emulsión tiene una temperatura de 60 °C, una velocidad de enfriamiento preferida es de 1,8 °C/min. Transcurridos 30 minutos, la temperatura final de la mezcla obtenida llega a ser a 6 °C. La velocidad de enfriamiento puede ser lineal o no lineal.

El método de la presente invención incluye además preferentemente (d) una etapa de retirar la proteína coagulada de la segunda emulsión y retirar preferentemente la gelatina coagulada mediante filtración.

Considerando las materias descritas hasta el momento, el método de la primera presente invención tiene las siguientes características.

(i) la composición utilizada en la etapa (a) contiene la gelatina recombinante en una cantidad de 3 % a 5 % en peso, agua en una cantidad de 30 % a 40 % en peso, el líquido no soluble en agua en una cantidad de 50 % a 70 % en peso, y el emulsionante en una cantidad de 2 % a 6 % en peso,

(ii) la mezcla en cada una de la etapa (a) y la etapa (b) se lleva a cabo agitando a una velocidad de 250 a 600 rpm,

(iii) la relación volumen a volumen de agua al líquido no soluble en la etapa (a) está comprendida en un intervalo de 2:3 a 1:3,

(iv) la etapa (a) se lleva a cabo preferentemente a una temperatura comprendida en un intervalo de 30 °C a 60 °C,

(v) la composición utilizada en la etapa (b) contiene la primera emulsión en una cantidad de 25 % a 50 % en peso y el líquido no soluble en agua en una cantidad de 50 % a 75 % en peso, y el líquido no soluble en agua no contiene un emulsionante,

(vi) la etapa (c) se lleva a cabo preferentemente de tal manera que la segunda emulsión se enfría en una relación de 1 °C a 10 °C/min, y

(vii) el método de la presente invención incluye además de forma arbitraria una etapa de reticulación de los microtransportadores de gelatina recombinante obtenidos y preferentemente una etapa de reticulación de los microtransportadores por reticulación mediante deshidratación térmica, en el que los microtransportadores tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm.

De acuerdo con una segunda presente invención, se proporcionan microtransportadores de gelatina recombinante porosa que tienen una o más de las siguientes características. Además, los microtransportadores de gelatina porosa de la presente invención tienen preferentemente una o más de las siguientes características.

(a) poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5 µm, por ejemplo, 6 a 30 µm, y particularmente, 10 a 20 µm. es preferible que los poros superficiales tengan un diámetro medio que sea menor

de un 5 % del tamaño de partícula de los microtransportadores.

(b) Un volumen medio de hueco de al menos 50 % en volumen, por ejemplo, 51 % a 95 % en volumen, y particularmente, 60 % a 90 % en volumen

(c) Un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm, por ejemplo, 40 a 600 µm, y particularmente, 100 a 500 µm

5 (d) Una densidad media de 0,04 a 0,50 g/cm<sup>3</sup>, por ejemplo, 0,06 a 0,25 g/cm<sup>3</sup>, y particularmente, 0,1 a 0,2 g/cm<sup>3</sup>

(e) un volumen aprovechado de 2 a 25 cm<sup>3</sup>/g, por ejemplo, 4 a 17 cm<sup>3</sup>/g, y particularmente, 5 a 10 cm<sup>3</sup>/g

(f) Un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm. al menos un 80 % de los microtransportadores tienen un tamaño de partícula que es de 30 % a 200 % el tamaño medio de partícula.

10 El tamaño medio de partícula es un diámetro medio ponderado en volumen, y puede medirse utilizando un Malvern Mastersizer.

El diámetro medio de los poros superficiales puede medirse a través de un análisis de imágenes de tomografía microcomputarizada (CT). Por ejemplo, Es posible utilizar un aparato Skyscan 1172 MicroCT (fabricado por Bruker microCT), y es preferible que el aparato incluya el software VGStudio MAX 2.2.

15

El volumen de hueco medio de los microtransportadores se define mediante la siguiente Fórmula (1)

$$P = (pvl/V) \times 100 \% \quad \text{Fórmula (1)}$$

20 En el presente documento, P es un volumen medio de hueco, pvl es un volumen medio del espacio total en los microtransportadores, y V es un volumen total de microtransportadores y también incluye un volumen espacial.

25 pvl puede medirse mediante barrido micro-CT (por ejemplo, se puede usar un aparato Skyscan 1172 MicroCT (fabricado por Bruker microCT) y es preferible que el aparato incluya el software VGStudio MAX 2.2).

V puede calcularse midiendo el volumen de los microtransportadores (por ejemplo, utilizando el tamaño de los microtransportadores que se determina mediante el análisis de imágenes utilizando el barrido con micro CT) y calculando matemáticamente el volumen medio.

30 Es preferible que los microtransportadores de gelatina recombinante obtenidos por el método de la primera presente invención y una o más de las características (a) a (f) descritas anteriormente y/o una o más de las siguientes características que se refieren a una tercera presente invención. Mediante el método de la primera presente invención, se pueden obtener los microtransportadores de gelatina recombinante porosa. Se pueden aplicar las características (a) a (f) a ambos microtransportadores reticulados de la presente invención y a los microtransportadores no reticulados de la presente invención. A fin de obtener microtransportadores de gelatina que tengan una estructura tridimensional totalmente diferente de la de los microtransportadores comercialmente disponibles que están en el mercado, se puede usar el método de la presente invención.

40 De acuerdo con la tercera presente invención, es posible proporcionar microtransportadores de gelatina recombinante porosa como se define en las reivindicaciones adjuntas que tengan huecos con un diámetro medio que es del 5 % a 25 % (preferentemente 10 % a 20 %) del tamaño de partícula de los microtransportadores. En los microtransportadores de gelatina recombinante porosa de la presente invención, los huecos se unen preferentemente a huecos adyacentes a través de poros. el diámetro medio de los huecos está comprendido en un intervalo de 5 % a 25 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores. A fin de permitir a las células biológicas penetrar en los huecos, es preferible que al menos la mitad, más preferentemente al menos el 75 %, y de forma particularmente preferente el 90 % de los huecos estén suficientemente conectados entre sí y hacia el exterior (por ejemplo, a través de los poros) de los microtransportadores. Es preferible que los huecos tengan una pared porosa (por ejemplo, una pared que tenga orificio) que permita a las células biológicas penetrar en los huecos. Los poros (u orificios) de la pared de los huecos tienen preferentemente un diámetro medio de al menos 5 µm y más preferentemente tienen un diámetro medio de al menos 10 µm.

50 Es preferible que al menos un 75 %, y de forma particularmente preferente un 80 % de los huecos tienen un diámetro que es un -30 % a un +30 % del diámetro medio de los huecos. Además, es preferible al menos un 75 %, y de forma particularmente preferente un 80 % de los huecos son esféricos. Además, es preferible que al menos la mitad, más preferentemente al menos un 75 %, y de forma particularmente preferente un 80 % de los huecos tienen una pared rebajada. De esta manera, las micropartículas de gelatina pueden proporcionar una pluralidad de matrices que caracterizan huecos esféricos/paredes rebajadas, y poros/huecos que permiten a las células o a las sustancias farmacéuticas penetrar en los huecos cuando por ejemplo, dos huecos se solapan entre sí.

60 La gelatina utilizada para preparar microtransportadores que tienen huecos es la gelatina recombinante, y con respecto a otras presentes invenciones, la gelatina es la gelatina recombinante descrita en el presente documento.

65 Cada una de las presentes invenciones proporcionan microtransportadores o proporcionas microtransportadores en combinación con dos de las presentes invenciones. De media, la presente invención proporciona una pluralidad de microtransportadores (al menos 500 mg de microtransportadores como un lote) que tienen las propiedades descritas

anteriormente. Los microtransportadores de gelatina de la presente invención pueden tener cualquier forma, pero el método de la presente invención es particularmente adecuado para preparar partículas esféricas. De esta manera, los microtransportadores obtenidos por el método de la presente invención tienen preferentemente la forma de una esfera, por ejemplo, una microesfera.

De acuerdo con una cuarta presente invención, se proporciona un material compuesto que contiene un microtransportador de gelatina y células, en el que las células existen sobre la superficie y/o en el interior de los microtransportadores. Los microtransportadores son microtransportadores de gelatina recombinante porosa de la presente invención.

El tipo de células de acuerdo con el material compuesto de la presente invención no está limitado, e incluye células humanas o animales. Por ejemplo, se pueden usar células de la piel, y el material compuesto obtenido se puede usar para tratar diversos tipos de daños de la piel. Los ejemplos de las células incluyen también mioblastos (miocitos) que se pueden usar para tratar el infarto de miocardio, y hepatocitos sin dañar que se pueden usar para una sustancia tóxica en una lesión en el hígado. En una realización adecuada, las células incluyen citoblastos tales como embriocitoblastos, hemocitoblastos, neurocitoblastos, citoblastos epidérmicos y citoblastos mesenquimales. Otras células utilizables incluyen células pluripotenciales, células endoteliales, células precursoras, y células derivadas de médula ósea.

El material compuesto de la presente invención puede prepararse cultivando las células y microtransportadores deseados. En general, una suspensión que contiene microtransportadores y células deseadas se mezcla con nutrientes en un recipiente de cultivo. El recipiente de cultivo utilizado depende de la escala de fabricación. Para una fabricación a pequeña escala, se puede usar un recipiente con agitación adecuado para un laboratorio pequeño. Para una fabricación a gran escala, se puede usar un tanque que tenga miles de toneladas de volumen.

Los nutrientes se seleccionan generalmente de acuerdo con las células que van a crecer, y puede estar comercialmente disponible una mezcla de muchos nutrientes y medios. Por ejemplo, es posible usar un medio de eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio basal de Eagle (BME), un medio DMEM/F12, medios F-10 y F-12 de Ham, un medio 199, MEM, medios de Ames, un medio BGJb; (medio de modificación de Fitton-Jackson), un medio de Click, un medio CMRL-1066, medio de Fischer, un medio esencial mínimo de Glasgow (GMEM), un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), un medio L-15 (Leibovitz), un medio 5A modificado por McCoy, un medio NCTC, un medio S-77 de Swim, un medio Waymouth, y medio E de William y medio RPMI 1640.

Los microtransportadores de la presente invención se pueden usar para diversos fines como matrices para la reparación del daño en el tejido, por ejemplo, como transportadores celulares. En consecuencia, los microtransportadores se pueden usar para cultivar piel artificial, tejidos artificiales, adipocitos, músculos, vasos sanguíneos, y similares. Los microtransportadores se pueden usar como transportadores de células para el cultivo de células y los transportadores de células que sobreviven para producir una sustancia deseada antes y después que se trasplanten los microtransportadores en el cuerpo de un ser humano o animal. Las células pueden ser las células del hospedador (autotrasplante) o las células (homólogas o heterólogas) de otras fuentes. En algunos casos, es posible hacer las células como productos deseados, por ejemplo, los adipocitos (preadipocitos) sobre los transportadores en la etapa inicial después del trasplante de tal manera que las células se convierten en adipocitos. Uno de los campos en los que se usan los microtransportadores es, por ejemplo, la cirugía estética.

Los microtransportadores de la presente invención pueden también trasplantarse en el cuerpo de un ser humano o animal sin añadir células a los microtransportadores. Tras el trasplante, las células cercanas en el cuerpo mueven los microtransportadores y forman colonias. Después, los microtransportadores trasplantados se degradan, las células que han formado las colonias forman una estructura como se pretende mediante el trasplante. De acuerdo con una quinta presente invención, es posible proporcionar una composición para inyección que contenga un transportador farmacológicamente aceptable, y los microtransportadores o la composición de la presente invención.

Es preferible que la composición pueda inyectarse a través de una jeringuilla que tiene un calibre interno de 80 a 4.000  $\mu\text{m}$ . El transportador farmacológicamente aceptable adecuado incluye un líquido tal como agua, etanol, y una mezcla que contiene agua y/o etanol. Es preferible que el transportador farmacológicamente aceptable sea estéril, y el transportador puede contener opcionalmente un conservante.

### Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá basándose en ejemplos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

En lo sucesivo en el presente documento, se usarán las abreviaturas descritas a continuación.

"RG1" significa un 10 % en peso de solución de gelatina recombinante enriquecida con RGD (MWT: 51,2 kDa) que tiene un pH de 5,4. Basándose en una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la porción de una secuencia de aminoácido de la gelatina COL1A1-I humana, se preparó la gelatina. Se utilizaron los métodos

descritos en los documentos EP-A-0926543, EP-A-1014176, WO01/34646. La gelatina no contiene hidroxiprolina y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1:

GAPGAPGLQGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPPG  
 ERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGER  
 GDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGER  
 RGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGER  
 GDAGPKGADGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRG  
 LAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPG  
 APGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGA  
 PGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPGPK  
 GERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGA  
 PGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGADG  
 APGKDGVRGLAGPPG;

5

La SEQ ID NO: 1 tiene una longitud consistente en 571 aminoácidos, e incluye 12 motivos RGD.

"RG2" es el mismo que "RG1", excepto que la cantidad de gelatina contenida en RG2 no es un 10 % en peso, sino un 4 % en peso.

10

"RG3" es el mismo que "RG1", excepto que la cantidad de gelatina contenida en RG3 no es un 10 % en peso, sino un 15 % en peso.

"Tween (marca comercial registrada) 80" es un monoéster del ácido sorbitán láurico polioxietileno.

15

"PBS" es una solución salina tamponada con fosfato.

"DAPI" es 4', 6-diamidino-2-fenilindol (para la tinción celular).

20

### **Ejemplo 1**

#### Etapa (a) preparación de la primera emulsión

Una mezcla de RG1 (15 g) y Tween 80 (1,0 g) se calentó a 60 °C y se mantuvo a la misma temperatura durante 15 minutos. Mientras la mezcla se estaba agitando a 550 rpm, un líquido no soluble en agua (aceite de maíz, 30 cm<sup>3</sup>) se añadió al anterior durante 7 minutos. En un estado donde la temperatura se mantuvo a 60 °C, los resultantes se agitó 3 minutos más a 550 rpm, obteniendo por tanto una primera emulsión.

25

#### Etapa (b) Preparación de la segunda emulsión

30

En un estado donde un líquido no soluble en agua (aceite de maíz, 55 cm<sup>3</sup>) se estaba agitando a 350 rpm, se añadió la primera emulsión gota a gota a la anterior durante 3 minutos. Cuando se acabó la adición, lo resultante se agitó 3 minutos más a 20 °C, obteniendo por tanto una segunda emulsión.

35

#### Etapa (c) Enfriamiento de la segunda emulsión

Después de 3 minutos de agitación descrita en la etapa B, la segunda emulsión se mantuvo agitada a 350 rpm y se enfrió en este estado a 5,5 °C durante 5 minutos. Cuando la temperatura de la mezcla llegó a ser 5,5 °C, La mezcla se agitó adicionalmente durante 15 minutos a la misma temperatura. Utilizando un baño de hielo, un recipiente que contenía acetona (300 ml) se enfrió a una temperatura de +1 °C a -1 °C. Después, en un estado de agitación a 350 rpm, se añadió la segunda emulsión a la acetona enfriada. Después, la mezcla se agitó durante 5 minutos a 350 rpm, el recipiente se extrajo del baño de hielo, y la mezcla se mantuvo agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. Como resultado, debido a la acetona, los microtransportadores formados en la mezcla se deshidrataron. Los microtransportadores se separaron mediante filtración y se lavaron varias veces con acetona hasta que se retiraron el agua y el aceite de maíz de los microtransportadores. A continuación los microtransportadores se secaron en un horno a una temperatura de 60 °C.

40

45

Etapa opcional (d) Reticulación

5 Los microtransportadores obtenidos a lo largo de la etapa (c) se reticularon mediante el siguiente tratamiento de deshidratación térmica.

10 Los microtransportadores secos se colocaron en un vial de vidrio y se colocaron en una estufa de vacío Binder VD53 en un vacío durante 96 horas a una temperatura de 145 °C. Los microtransportadores de gelatina recombinante porosa obtenidos se nombraron MS1, y las características se describen en la siguiente Tabla 1 (características de los microtransportadores MS1). Al menos la mitad de los huecos en los MS1 eran esféricos y tenían un diámetro que era -30 % a +30 % del diámetro medio de los huecos.

[Tabla 1]

Diámetro medio de los huecos (µm)	Volumen medio de los huecos (%)	Tamaño medio de partícula (mm)	Densidad media (g/cm <sup>3</sup> )	Volumen medio (cm <sup>3</sup> /g)
45	85	277	0,17	6

15 Se determinaron el diámetro medio del hueco y la forma cortando los microtransportadores y analizando la sección transversal utilizando datos mico CT (obtenidos utilizando un aparato Skyscan 1172 MicroCT que incluía el software VGStudio MAX 2.2 fabricado por Bruker microCT) (véase la Fig. 1C).

20 Se determinó el volumen medio del hueco mediante la Fórmula (1) descrito anteriormente.

El tamaño medio de partícula es un diámetro medio ponderado en volumen de los microtransportadores, y se calculó utilizando un Malvern Mastersizer.

25 Se calculó la densidad media de los microtransportadores y se determinó midiendo el volumen total (incluyendo los huecos y el espacio entre las esferas) de 1 g de los microtransportadores y dividiendo 1 g por el volumen total de los microtransportadores.

30 Se determinó el volumen medio de los microtransportadores midiendo el volumen (incluyendo los huecos y el espacio entre las esferas) de 1 g de los microtransportadores.

**Ejemplos 2 a 9 y Ejemplo comparativo 1**

35 Se repitió el Ejemplo 1 aplicando el cambio que se muestra en la siguiente Tabla 2. En la Tabla 3 se muestran las características de los microtransportadores obtenidos. En todos los microtransportadores MS2 a MS9, al menos la mitad de los huecos eran esféricos y tienen un diámetro de -30 % a +30 % del diámetro medio del hueco. Por el contrario, en ninguno de CMS1 y Cultispher G, al menos la mitad de los huecos eran esféricos y tienen un diámetro de -30 % a +30 % del diámetro medio del hueco.

[Tabla 2]

Ejemplo	Lo que se cambió del Ejemplo 1	Microtransportadores
Ejemplo 2	Se llevó a cabo la etapa (a) a 45 °C.	MS2
Ejemplo 3	Se llevó a cabo la etapa (a) a 75 °C.	MS3
Ejemplo 4	Se llevó a cabo la etapa (a) usando 20 cm <sup>3</sup> de aceite de maíz.	MS4
Ejemplo 5	Se llevó a cabo la etapa (a) usando 40 cm <sup>3</sup> de aceite de maíz.	MS5
Ejemplo 6	Se llevó a cabo la etapa (a) usando 0,5 g de Tween 80.	MS6
Ejemplo 7	Se llevó a cabo la etapa (a) usando 2 g de Tween 80.	MS7
Ejemplo 8	Se llevó a cabo la etapa (a) utilizando RG2.	MS8
Ejemplo 9	Se llevó a cabo la etapa (a) utilizando RG3.	MS9
Ejemplo Comparativo 1	En la etapa (b), Se utilizó aceite de maíz (Span 85) que contenía 5 % en peso de emulsionante que tiene un HLB de menos de 8.	CMS1

40

[Tabla 3]

Microtransportadores	Diámetro medio del hueco (µm)	Volumen medio del hueco (%)	Tamaño medio de partícula (µm)	Densidad media (g/cm <sup>3</sup> )	Volumen medio (cm <sup>3</sup> /g)
MS2	54	84	295	0,20	5
MS3	25	83	320	0,11	9
MS4	42	79	295	0,12	9
MS5	51	85	330	0,11	9
MS6	50	82	280	0,13	8

(continuación)

Microtransportadores	Diámetro medio del hueco (µm)	Volumen medio del hueco (%)	Tamaño medio de partícula (µm)	Densidad media (g/cm <sup>3</sup> )	Volumen medio (cm <sup>3</sup> /g)
MS7	25	84	295	0,10	10
MS8	48	88	270	0,07	14
MS9	20	78	295	0,1	10
CMS1	*	83	290	0,08	12
Cultispher G	*	64	180	0,38	3

El diámetro medio de hueco, el volumen medio de hueco, El tamaño medio de partícula, la densidad media, y el volumen medio se midieron como se describe en el Ejemplo 1.

5 En la tabla, \* muestra que el diámetro medio del hueco no podría medirse debido a que los huecos de CMS1 o Cultispher G no eran esféricos.

10 Las muestras MS1 y CMS1 y el CultiSpher G comercialmente disponible se analizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las imágenes obtenidas se muestran en los dibujos. Las Figs. 1A a 1C muestran MS1, Las Figs. 2A a 2C muestran el Ejemplo Comparativo CMS1 y las Figuras 3A a 3C, que muestran el CultiSpher G comercialmente disponible.

15 Los dibujos muestran que los microtransportadores MS1 se separan excelentemente entre sí y tienen sustancialmente una forma esférica que tiene huecos esféricos excelentemente diferenciados entre sí. Por el contrario, los microtransportadores CMS1 del ejemplo comparativo tienen una forma no esférica, tienen orificios superficiales grandes, y para una estructura secundaria agrupándose juntos. La Fig. 2C es una vista de la sección transversal de los microtransportadores obtenidos por el método del ejemplo comparativo. La Fig. 2C muestra que los huecos son más pequeños que el tamaño de partícula de las micropartículas, en comparación con los  
20 microtransportadores de la presente invención que se muestran en la Figura 1A. Además, los huecos de las micropartículas que se muestran en la Figura 2C tienen tamaño y forma irregulares.

#### Preparación de una composición de microtransportadores-células y ensayo

25 Se midió el crecimiento celular mediante tinción

Un material sintético que contenía el microtransportador de gelatina porosa reticulada descrito en los ejemplos anteriores y el ejemplo comparativo se prepararon del siguiente modo.

#### 30 Etapa de esterilización

En la etapa de evaluación, los microtransportadores (100 mg) se colocaron cada uno en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 cm<sup>3</sup>, exenta de calcio y magnesio), se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación se esterilizó usando un autoclave sin retirar el PBS. Tras la esterilización, se retiró el PBS, y a  
35 continuación, el PBS se añadió nuevamente al anterior. Este ciclo se repitió 3 veces. Los microtransportadores esterilizados obtenidos finalmente se almacenaron en medio DMEM que contenía suero de feto de bovino al 10 % (FBS) a 4 °C hasta que se utilizaron.

#### Preparación de células de C2C12 (miofibroblastos de ratón, ATCC CRL 1772)

40 Las células se cultivaron previamente en un matraz de cultivo T75 y se poblaron densamente hasta un 50 % a 60 %. Cuando crecieron activamente, las células se subcultivaron. Las células se enjuagaron con PBS (1 ml/5 cm<sup>2</sup>), y se retiró el medio DMEM que contenía suero de feto de bovino al 10 %. Se añadió una solución de tripsina/EDTA a las células (3 to 4 ml/75 cm<sup>2</sup>), seguido por incubación durante 6 minutos a 37 °C. Se añadió un medio completo y se usó  
45 en una relación de 1:2 con respecto a la cantidad de tripsina, neutralizando por tanto la tripsina. La solución de células individuales obtenida se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 125 rpm. El sobrenadante se recogió, y las células en los aglomerados celulares obtenidos se volvieron a suspender también en un medio DMEM que contenía FBS al 10 %. La densidad celular se determinó usando un microscopio.

#### 50 Cultivo en matraz con agitación

Un matraz con agitación estéril de 25 ml (Wheaton) se lavó con agua pura (10 cm<sup>3</sup>), y se añadieron microesferas (40 mg) secas en la etapa de evaluación al matraz con agitación. El matraz se llenó con el medio DMEM/FBS al 10 % para el cultivo celular de tal manera que el volumen final del mismo llegó a ser de 8 ml. el matraz se dejó  
55 durante 30 minutos en una estufa incubadora de tal manera que se estableció el equilibrio. Después, las células C2C12 anteriormente mencionado (2 x 10<sup>6</sup> células/2 cm<sup>3</sup>) se añadieron al medio de cultivo. La mezcla obtenida se agitó durante 5 minutos a 50 rpm, la agitación se detuvo, y la mezcla se dejó reposar durante 40 minutos. En este ciclo, la mezcla se agitó durante 3 horas. El ciclo se llevó a cabo 4 veces. Posteriormente, una porción del medio de

cultivo (10 cm<sup>3</sup>) se añadió la anterior, y las células se cultivaron durante 7 días en una estufa incubadora humidificada en las condiciones de 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y 80 rpm. Se retiró un 50 % de medio de cultivo cada día y se sustituyó y se sustituyó con un medio de cultivo sin usar.

5 Análisis

Siete días después del cultivo celular, el material sintético obtenido (microtransportadores + células) se tiñó con DAPI. Cuando se lleva a cabo la unión a un ADN bicatenario, DAPI tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 358 nm (rayos ultravioleta) y su emisión máxima es 461 nm (azul). Los núcleos de las células pueden observarse como puntos resaltados en azul. Se contó el número de núcleos de las células, y el número mostró un grado de crecimiento celular que está relacionado con los microtransportadores reticulados. A través del análisis SEM de la sección transversal de las esferas tras el cultivo celular, se clarificó el grado de crecimiento en los microtransportadores. Se tiñó también ligeramente la superficie externa de los microtransportadores. En la Tabla 4 se muestran los resultados (resultados de crecimiento evaluados mediante la tinción DAPI).

15

[Tabla 4]

Microtransportadores reticulados	Puntuación del crecimiento celular (mediante examen visual después del método de tinción)
MS1	+++
MS2	+++
MS3	++
MS4	++
MS5	++
MS6	+++
MS7	++
MS8	+ +
MS9	++
CultispherG	+
CMS1	+

En la Tabla 4, se usaron las siguientes puntuaciones.

- 20 "+++" significa "crecimiento celular excelente en extremo" determinado mediante examen visual.  
 "++" significa "crecimiento celular excelente" determinado mediante examen visual.  
 "+" significa "crecimiento celular normal" determinado mediante examen visual.

25 Como resulta evidente a partir de la Tabla 4, el crecimiento celular fue mejor en los ejemplos que en los ejemplos comparativos de CMS1 y CultiSpher G.

[Listado de secuencias]

30 Método para preparar microtransportadores de la solicitud internacional 15F03330 aceptada basándose en el Tratado de Cooperación de Patentes, MaJP15079787 20151022—00070140751502115253normal20151022115442201509141117056210\_P1AP10 1\_15\_4. app

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> FUJIFILM Corporation  
 <120> Método para preparar microtransportadores, microtransportadores y aplicaciones de los mismos  
 <130>\201@15F03330  
 <160> 1  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 40 <210> 1  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 <213> Recombinante  
 45 <400> 1

ES 2 744 547 T3

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro  
 35 40 45  
 Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly  
 50 55 60  
 Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro  
 85 90 95  
 Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly  
 100 105 110  
 Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val  
 115 120 125  
 Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro  
 130 135 140  
 Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala  
 165 170 175  
 Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Pro  
 180 185 190  
 Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly  
 195 200 205  
 Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp  
 210 215 220  
 Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly  
 245 250 255  
 Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys  
 260 265 270  
 Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg  
 275 280 285  
 Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly  
 290 295 300  
 Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro  
 325 330 335  
 Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Leu Pro Gly  
 340 345 350  
 Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asp Gly Ala  
 355 360 365  
 Pro Gly Lys Asp Gly Val Arg Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Leu Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Asp Ala Gly Pro

ES 2 744 547 T3

				405					410					415	
Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Met	Pro
			420					425					430		
Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly
		435					440					445			
Asp	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Val
	450				455						460				
Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala
465					470					475					480
Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly
				485					490					495	
Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro
			500					505					510		
Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	Gln
	515						520					525			
Gly	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly
	530					535					540				
Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys
545					550					555					560
Asp	Gly	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly					
				565						570					

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar microtransportadores de gelatina recombinante porosa, que comprende:
  - 5 (a) una etapa de generar una primera emulsión mezclando una composición que contiene agua, gelatina recombinante, un líquido no soluble en agua, y un emulsionante;
  - (b) una etapa de generar una segunda emulsión mezclando la primera emulsión con un líquido no soluble en agua a una temperatura superior a la temperatura de gelificación de la gelatina; y
  - 10 (c) una etapa de enfriar la segunda emulsión a una temperatura a la cual coagula la gelatina, en donde el líquido no soluble en agua utilizado en la etapa (b) contiene un emulsionante que tiene un valor HLB de menos de 8 en una cantidad de menos del 0,5 % en peso,

en el que los microtransportadores tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm.
- 15 2. El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un valor HLB del emulsionante utilizado en la etapa (a) es mayor de 9.
3. El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el pH de la primera emulsión está comprendido en un intervalo de 3 a 11.
- 20 4. El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además:
  - (d) una etapa de eliminar la gelatina coagulada de la segunda emulsión.
- 25 5. El método para preparar microtransportadores porosos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además:
  - una etapa de reticulación de la gelatina en la etapa (b) y/o después de la etapa (b).
- 30 6. Microtransportadores de gelatina porosa que tienen huecos,
  - en donde al menos la mitad de los huecos son esféricos, y
  - al menos, la mitad de los huecos tienen un diámetro que es -30 % a +30 % de un diámetro medio de los huecos,

en donde los microtransportadores tienen un tamaño medio de partícula de 20 a 800 µm,

- 35 y en donde la gelatina es gelatina recombinante.
- 7. Los microtransportadores de acuerdo con la reivindicación 6 que tienen poros superficiales que tienen un diámetro medio de al menos 5 µm.
- 40 8. Los microtransportadores de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 que tienen un volumen medio de hueco de al menos un 50 % en volumen.
- 9. Los microtransportadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el diámetro medio de los huecos está comprendido en un intervalo del 5 % al 25 % del tamaño medio de partícula de los microtransportadores.
- 45 10. Un uso de los microtransportadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 como transportadores de células.
- 50 11. Los microtransportadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para uso como matrices para la reparación del daño de tejidos.
- 55 12. Un material compuesto que comprende:
  - los microtransportadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9; y
  - células,
  - en donde las células se encuentran sobre una superficie y/o en el interior de los microtransportadores.
- 60 13. Una composición para inyección, que comprende:
  - un transportador farmacológicamente aceptable; y
  - los microtransportadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o el material compuesto de acuerdo con la reivindicación 12.
- 65

FIG. 1A

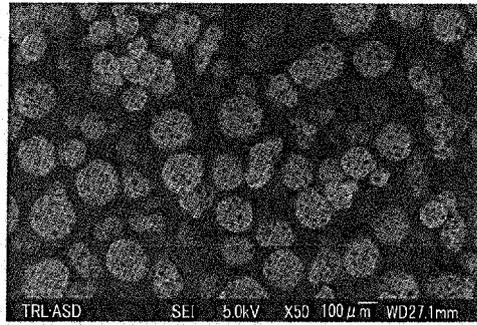


FIG. 1B

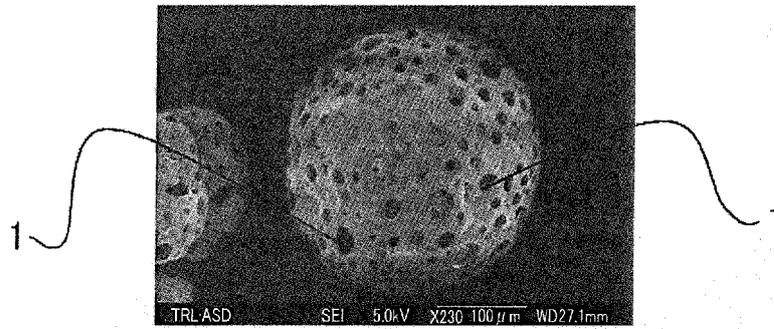


FIG. 1C

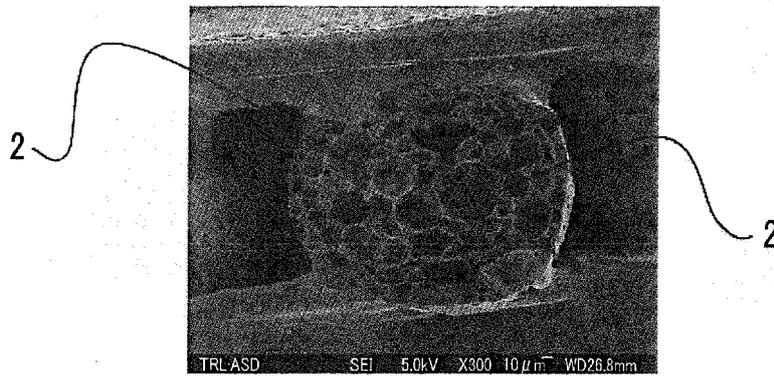


FIG. 2A

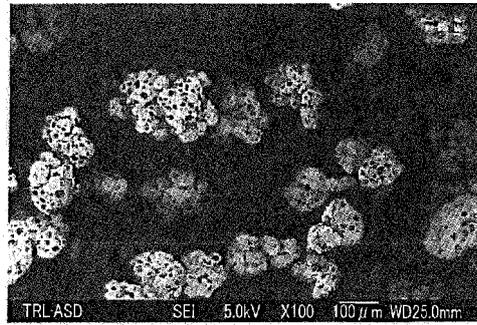


FIG. 2B

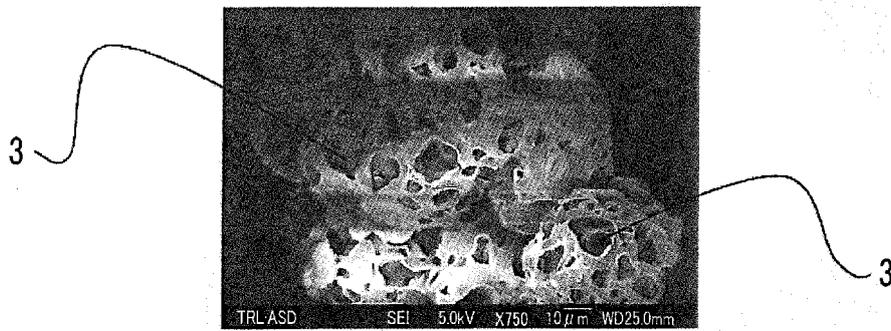


FIG. 2C

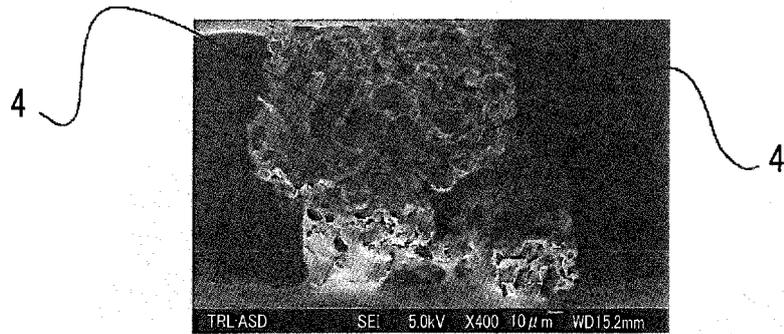


FIG. 3A

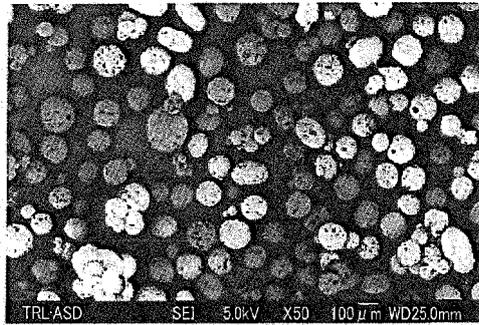


FIG. 3B

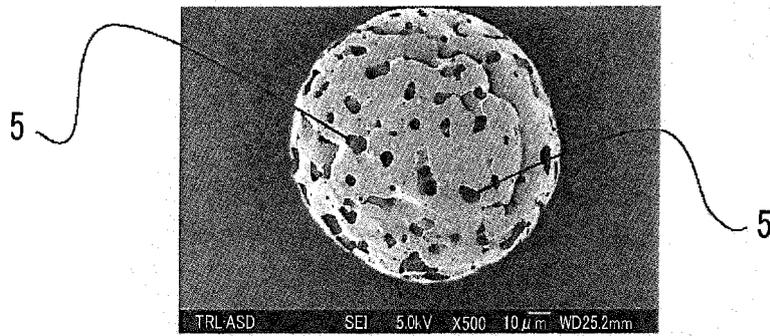


FIG. 3C

