

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 740**

21 Número de solicitud: 201231750

51 Int. Cl.:

A61L 15/16 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

13.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.06.2014

Fecha de la concesión:

25.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.04.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070774

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID (Madrid) ES;
FUNDACIÓN RIOJA SALUD (20.0%) y
UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES (20.0%)**

72 Inventor/es:

**REYES ORTEGA, Felisa;
RODRIGUEZ CRESPO, Gema;
AGUILAR DE ARMAS, M^a Rosa;
GONZÁLEZ GÓMEZ, Álvaro;
SAN ROMÁN DEL BARRIO, Julio;
SOLÍS CORREA, Raúl Enrique;
GARCÍA HONDUVILLA, Natalio;
BUJÁN VARELA, Julia;
CIFUENTES NEGRETE, Alberto;
MARTÍNEZ RAMÍREZ, Alfredo;
GARCÍA SANMARTÍN, Miren Josune y
STENZEL, Martina**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **APÓSITO PARA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS COMPROMETIDAS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un producto sanitario bioactivo, que es un apósito, caracterizado porque comprende al menos una capa interna compuesta de un hidrogel y una capa externa compuesta de un poliuretano biodegradable y bioadsorbible, estando la capa interna impregnada con un péptido N-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina y la capa externa con nanopartículas de bemiparina encapsulada en un polímero o un copolímero biodegradables. Con esta composición se consigue la dosificación secuencial y controlada de los componentes activos. Asimismo, otro objeto de la presente invención es un método de preparación del apósito bicapa y el uso del mismo en medicina, estando especialmente diseñado para tratar y favorecer la cicatrización de heridas, como son las heridas comprometidas y las úlceras, especialmente en pacientes con diabetes y con reducido riego sanguíneo.

ES 2 468 740 B1

APÓSITO PARA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS COMPROMETIDAS

DESCRIPCIÓN

5 Campo de la Invención

El área donde se engloba la presente invención es el sector químico-farmacéutico, ya que se trata de un dispositivo o material susceptible de ser utilizado en el campo médico que facilita y mejora la cicatrización de heridas comprometidas.

10

Antecedentes de la Invención

La cicatrización de heridas supone un equilibrio entre la actividad inflamatoria y vascular del tejido conjuntivo y de las células epiteliales. Las heridas cutáneas cicatrizan mediante dos procesos distintos: epitelización y contracción. Con el uso de apósitos se pretende favorecer el proceso de epitelización frente al de contracción. La cicatrización es más rápida en un ambiente húmedo y se utilizan apósitos para absorber el exceso de líquido o retenerlo en una herida que de otro modo estaría seca, a fin de lograr un "ambiente húmedo en la herida". Las lesiones cutáneas producidas por insuficiencia vascular afectan a un gran número de personas y suponen un alto coste para el sistema de salud en las sociedades desarrolladas (Jiménez y Jiménez, 2004).

20

Las técnicas de cicatrización convencionales como la sutura, cauterización o el empleo de grapas presentan varias desventajas como el dolor y la necesidad de tenerlas que retirar tras la regeneración del tejido. Sin embargo, el uso de otros materiales sanitarios como son los apósitos tiene la ventaja de no ser dolorosos para el paciente, se adhiere a la piel fácilmente, su utilización es fácil y simple y no necesita ser retirado. Para que el apósito cumpla esta serie de ventajas debe de ser biodegradable, biocompatible (va a estar en contacto directo con la herida por lo que no puede presentar toxicidad), bioabsorbible y presentar una cierta estabilidad (buenas propiedades mecánicas) para que pueda ser efectivo en el proceso de cicatrización de la herida.

25

En la actualidad, la mayoría de los productos que se comercializan para la cicatrización de heridas comprometidas son sistemas inyectables que se administran en la propia lesión y/o sus alrededores, como se describe en las solicitudes de patente WO03/053458A1, WO 2011/002249 o en Zhang et al. (2011). Otros sistemas se constituyen in situ en la zona a regenerar (WO 2011/028031), aunque el inconveniente de este proceso es que no se pueden controlar las propiedades mecánicas finales del sistema. En la solicitud de patente WO2010/120757 se describe un material o sistema unicapa tridimensional (*scaffold*) que está formado en base a un polisacárido fotocurado (quitosano) que contiene como molécula bioactiva una proteína, que es la gelatina.

35

Otro ejemplo de sistema unicapa es el uso de una matriz de colágeno para la cicatrización de heridas originadas por quemaduras, descrito por Van Zuijen. Se han utilizado matrices de colágeno e hialuronato sódico entrecruzadas con carbodiimida como sistema unicapa para regeneración tisular, por presentar una buena porosidad que permite albergar moléculas activas como factores de crecimiento. El hialuronato sódico es un glucosaminoglicano formado por unidades repetitivas de ácido D-glucurónico y β -1,3-N-acetil-D-glucosamina- β -1,4. Es el componente principal del fluido sinovial, del tejido cartilaginoso y del humor vítreo. Presenta la propiedad de retener grandes cantidades de agua y de adoptar una conformación extendida en disolución (Mao et al., 2003; Collins y Birkinshaw, 2008; Picard et al., 2009; y Vanderhooft et al., 2009).

40

45

Existen muy pocos sistemas bicapa o multicapa para liberar fármacos, y los que existen se han utilizado en implantes o recubrimientos dentales (solicitud de patente US2011/0038921 A1), pero no para el tratamiento de heridas.

50

Algunos de los compuestos que se conocen para favorecer la cicatrización de heridas y úlceras son el péptido N-terminal de 20 aminoácidos de la proadrenomedulina (PAMP; Bergmann et al. 2008), que tiene propiedades angiogénicas, re-epitalizantes y antimicrobianas; y la bemiparina (heparina de bajo peso molecular; Martínez-González y Rodríguez, 2010; Rullán et al., 2008), que es un polisacárido sulfonado perteneciente a la familia de los glicosaminoglicanos que actúa como modulador trombótico y/o reestenótico y además es capaz de formar complejos activos con factores de crecimiento (FGF y VEGF entre otros), incrementando la actividad biológica de dichos factores (Capila y Linhardt, 2002).

55

El uso de nanopartículas como sistemas portadores de fármacos ha sido muy utilizado en las últimas décadas por ser un sistema eficiente de encapsulación, liberación de fármacos y de fácil administración como sistema inyectable en pacientes (Ríos, 2003; Lassalle y Ferreira, 2007; y Mundargi et al., 2008). El uso de polímeros biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico, conocidos como PLGA y sus derivados está muy extendido por ser un material ejemplar por sus propiedades biodegradables, biocompatibles y poder encapsular eficientemente una gran variedad de moléculas (proteínas, péptidos, genes, vacunas, antígenos, factores de crecimiento, etc. (Capila, I., and R. J. Linhardt. 2002. Heparin-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* 41 (3):390-412). Las matrices en base a EUDRAGIT (Ceballos et al., 2005; Dillen et al., 2006; y Moustafine et al., 2006) son bastante atractivas en la empresa farmacéutica debido a su alta estabilidad

60

65

química, buena compactabilidad y disponibilidad de una gran variabilidad de productos en el mercado que presentan distintas propiedades químicas. Numerosos trabajos se han publicado de nanopartículas preparadas con PLGA y EUDRAGIT para encapsular heparina, con objeto de mejorar la estabilidad de dicho fármaco en el organismo (Jiao et al., 2002; Hoffart et al., 2003; Chung et al., 2006; y Hoffart et al., 2006).

5 Actualmente, no se han descrito apósitos que incluyan PAMP en su estructura y lo liberen en procesos de cicatrización, ni materiales compuestos que liberen conjuntamente heparina con otros componentes activos, de forma secuencial y controlada.

10 Con el sistema que aquí se describe se ha conseguido la dosificación secuencial y controlada de ambos componentes activos (PAMP y heparina), permitiendo así la revascularización y cicatrización de heridas comprometidas, especialmente en pacientes con diabetes y con reducido riego sanguíneo. Así, en este trabajo se propone un producto sanitario, que es un apósito (una gasa, una tirita...), para su uso en regeneración de
 15 heridas comprometidas en piel, entendiéndose por herida comprometida aquella que presenta una cicatrización comprometida, que hace referencia a una cicatrización anómala, es decir, cicatrización que puede verse afectada (generalmente retrasada) por una patología como pueda ser la diabetes o los procesos isquémicos. El apósito está constituido por al menos dos capas bio-funcionalizadas capaces de mejorar la cicatrización de heridas y úlceras, especialmente en los casos en que el proceso está dificultado como sucede en pacientes diabéticos, con
 20 reducido riego sanguíneo y personas de la tercera edad. Para ello, se prepararon materiales compuestos poliméricos biodegradables y reabsorbibles capaces de ejercer como soporte y de liberar controladamente los componentes activos.

Descripción general de la Invención

25 La presente invención está dirigida a un producto sanitario bioactivo, que es un apósito, caracterizado porque comprende al menos:

- una capa interna compuesta de un hidrogel constituido por una combinación de hialuronato sódico y gelatina, y estando entrecruzado (estabilizado) con al menos un agente entrecruzante, y
- una capa externa compuesta de un copolímero de bloque tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$ que es poliuretano
 30 biodegradable y bioadsorbible,

estando la capa interna impregnada con un péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina (PAMP), y la capa externa con nanopartículas de bemiparina encapsulada en un polímero o un copolímero biodegradables.

35 Este apósito multicapa es biodegradable, bioadsorbible y biocompatible, presentando unas propiedades mecánicas óptimas para la liberación secuencial y dosificada de los compuestos bioactivos que incorpora, siendo así de gran utilidad para la revascularización y regeneración de heridas, siendo de especial interés en úlceras comprometidas en la piel. La dosificación de los componentes bioactivos (PAMP y nanopartículas conteniendo bimeparina) se produce de forma programada en el tiempo, de acuerdo con el comportamiento biodegradativo de
 40 cada una de las capas. Al configurarse de la forma descrita, el PAMP en la capa de hidrogel y la bemiparina sobre la capa de poliuretano, se favorece la cicatrización de la herida por un proceso de epitelización y no por contracción de la herida. Asimismo, es la disposición de las capas lo que permite una liberación secuencial.

45 Los hidrogeles formados por ácido hialurónico-gelatina tienen la ventaja de proporcionar un ambiente húmedo idóneo para la migración y proliferación celular, y tiene propiedades hidrofílicas, ofreciendo un equilibrio de hidratación mantenida en el tiempo necesario para conseguir una óptima cicatrización de las lesiones. Por un lado, la gelatina presenta en su estructura química residuos de lisina o glutamina que presentan grupos amino libres que pueden actuar como puntos de entrecruzamiento y permite así obtener un gel mucho más estable. Por su parte, el hialuronato sódico presenta la propiedad de retener grandes cantidades de agua y adoptar una
 50 conformación extendida en disolución, aportando buenas propiedades de hidratación al hidrogel. El entrecruzamiento permite a su vez obtener un hidrogel con buena estabilidad mecánica y térmica. El hidrogel se degrada y absorbe a lo largo del tiempo, no siendo necesario retirarlo.

55 La base de poliuretano, que aísla y protege el resto del apósito del exterior, es biodegradable y permite la liberación de dicha molécula. Los poliuretanos segmentados son copolímeros de bloque que están constituidos por dos tipos de segmentos: blandos y rígidos. Los segmentos rígidos incluyen las conexiones de un diisocianato (alifático o aromático) y una diamina o un diol de bajo peso molecular, estos últimos se denominan extendedores de cadena. La combinación de ambos tipos de segmentos forman un copolímero del tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$, siendo A_nB_m el segmento blando y C_oD_p el segmento rígido. Existe cierto grado de inmiscibilidad entre los segmentos
 60 rígidos y los blandos del poliuretano segmentado, esto significa que aunque los poliuretanos son isotrópicos, microscópicamente no son estructuralmente homogéneos. Existe un cierto grado de mezclado entre estos dos tipos de segmentos, aunque la separación de fases de los dos segmentos ocurre, produciendo una estructura consistente en micro dominios de segmentos rígidos dispersos en una matriz de segmentos blandos. Esta estructura con micro dominios exhibida por los poliuretanos es la responsable de sus excelentes propiedades
 65 mecánicas, así como también contribuye a su biocompatibilidad. Esta capa es de naturaleza hidrófoba y degradación lenta, estimulando además la revascularización del tejido dañado y protege de agentes infecciosos.

Gracias a esta adecuada dosificación a lo largo del tiempo, el agente bioactivo PAMP actúa en las capas más externas de la piel, estimulando la formación de vasos sanguíneos en la parte más superficial de la dermis. La aplicación del péptido directamente sobre la herida no resulta apropiado ya que éste migra a las capas profundas de la piel y estimula la angiogénesis en la dermis donde no era tan necesario.

La bio-funcionalización del apósito se realiza por un lado con un péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de la proadrenomedulina (PAMP), que presenta propiedades angiogénicas, re-epitelizantes, antimicrobianas y antibacterianas, cualidades muy útiles en el proceso de cicatrización al proteger de agentes infecciosos. Este péptido se expresa en la piel humana de forma natural, por lo que se mostró como una molécula ideal para bio-funcionalizar un producto sanitario destinado a facilitar la curación de heridas y úlceras. Al estar incorporado en la estructura de la capa interna se libera directamente al tejido subyacente. Además, esta molécula está incluida en un hidrogel, que es biodegradable (se degrada y reabsorbe), con lo que se asegura una liberación sostenida en el tiempo.

Por otro lado, el apósito se bio-funcionaliza con bemiparina, una heparina de bajo peso molecular que actúa como modulador trombótico y/o reestenótico, y que además es capaz de formar complejos activos con factores de crecimiento (FGF y VEGF entre otros) incrementando la actividad biológica de dichos factores. De esta forma se asegura la cicatrización de las heridas comprometidas a largo plazo. Se denominan heparinas de bajo peso molecular aquellas que presentan valores de entre 3 y 6 kDa y longitudes de cadena de entre 12 y 18 unidades de sacáridos. La Bemiparina concretamente se obtiene por la degradación química de la heparina y presenta un peso molecular de unos 3.6 kDa.

La bemiparina se encuentra encapsulada en nanopartículas que pueden tener distintas formulaciones poliméricas, evitando la interacción prematura de este tipo de heparina con el péptido PAMP. El uso de nanopartículas como sistemas portadores de bemiparina confieren mayor estabilidad a este compuesto en comparación con su forma libre, manteniendo su actividad biológica y haciéndola dosis dependiente. Se ha comprobado así que la estabilidad de la bemiparina encapsulada es mayor que en su forma libre, ya que las nanopartículas portadoras mantienen la actividad de la bemiparina. La bioactividad de estas nanopartículas cargadas con bemiparina se ha demostrado a partir de un ensayo de proliferación celular modulado por la formación de un complejo ternario entre el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), su receptor de membrana FGFR-1c y la bemiparina (Ejemplo 4). El bFGF está comprendido dentro de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). *In vivo*, los FGF pueden inducir la formación del mesoderma en embriones de xenopus en desarrollo, que tienen una actividad angiogénica potente (ES 2 204 886 T3). El bFGF forma un complejo ternario específico con la heparina y su receptor de membrana, de forma que modula la respuesta celular (Bos et al., 1999; y Tanghetti, 2002).

En definitiva, en este trabajo se describen novedosos sistemas portadores de bemiparina acompañado de otros agentes bioactivos, que presentan una estructura química similar al EUDRAGIT pero mejoran la difusión del fármaco en la matriz polimérica, facilitando así su liberación de forma controlada.

Un segundo objeto de la invención es un método de preparación del producto sanitario aquí descrito, que comprende al menos las siguientes etapas:

- añadir las nanopartículas de bemiparina a la capa de poliuretano mediante impregnación con una dispersión acuosa de dichas nanopartículas;
- hidratar la capa de hidrogel y depositar dicha capa sobre la capa de poliuretano previamente impregnada con las nanopartículas de bemiparina;
- añadir el péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina a la capa de hidrogel mediante disolución acuosa; y
- sellar el producto obtenido a partir de las dos capas.

Un tercer objeto de la presente invención estaría constituido por el apósito descrito, en cualquiera de sus variantes, para su uso en medicina. Esta memoria engloba así tanto el uso del producto sanitario en medicina como un método de tratamiento médico que comprende aplicar el producto sanitario sobre una parte externa (la piel) del cuerpo de un paciente. Asimismo engloba el uso de una capa (interna) compuesta de un hidrogel constituido por una combinación de hialuronato sódico y gelatina, estando el hidrogel entrecruzado (estabilizado) con al menos un agente entrecruzante, y que se encuentra impregnada con un péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina; y una segunda capa (externa) compuesta de un copolímero de bloque tipo $(A_n B_m)_x (C_o D_p)_y$ que es poliuretano biodegradable y bioadsorbible que contiene nanopartículas de bemiparina encapsulada en un polímero o un copolímero biodegradables para la fabricación de un apósito para su uso en medicina. Debe entenderse en el ámbito de la presente invención que el paciente puede ser un animal o un ser humano. De manera especial, pero sin resultar una limitación a su uso, el producto puede emplearse con pacientes con diabetes y con reducido riego sanguíneo.

De igual forma, la presente invención se refiere a un kit de recubrimiento de heridas y úlceras, que comprende el producto sanitario antes descrito.

Descripción detallada de la invención

El producto sanitario objeto de protección consiste en un sistema biodegradable formado por dos capas de diferente estructura y naturaleza para que actúe como un sistema de liberación dirigida y controlada de compuestos bioactivos. Dicho producto, como se ha dicho, es un apósito que puede englobar una amplia variedad de materiales como vendas, gasas, tiritas, etc.

Los agentes bioactivos se liberan rápida o lentamente según se incorporen en la capa interna o externa del producto sanitario (Fig. 1).

El agente entrecruzante del hidrogel es preferiblemente seleccionado dentro del grupo compuesto por genipina, tripolifosfato sódico, glicerol fosfato sódico y salicina. Más preferentemente todavía, el hidrogel es estabilizado con genipina, lo que le confiere estabilidad y una alta hidrofiliia. Preferiblemente, la concentración del agente entrecruzante en el hidrogel está comprendida entre 0.5% y 10% en peso respecto a la mezcla polimérica, siendo más preferida aún una concentración del 1% en peso respecto a dicha mezcla.

En una realización preferida, el hidrogel está compuesto por un 60% en peso de gelatina y un 40% en peso de hialuronato sódico sobre la masa polimérica que constituye el hidrogel, aunque esta proporción puede variar en otros valores, pudiendo ser por ejemplo al revés: 40% en peso de gelatina y 60% de hialuronato sódico. Se debe tener en cuenta no obstante que la consistencia mecánica varía con la proporción; cuanto mayor sea la proporción de gelatina, más resistencia mecánica tendrá el hidrogel formado y cuanto más hialuronato contenga, más flexible es el hidrogel final. En otra realización preferida, el hidrogel incorpora adicionalmente al menos un polímero seleccionado entre colágeno, quitosano y dextrano. El hidrogel puede prepararse mediante mezcla de disoluciones acuosas de los dos componentes, mezcla a la que posteriormente se añade en agente entrecruzante.

Preferentemente, el poliuretano, de fórmula $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$, tiene un peso molecular comprendido entre 3000 y 40000 Daltons, incluidos ambos límites, siendo más preferiblemente de 19000 Daltons. Más preferentemente, está constituido por un segmento blando (A_nB_m) formado a partir de policaprolactona diol (PLC) y plurónico-L61 (PL61) y un segmento rígido (C_oD_p) compuesto por un poli(éter de tetrametilenglicol)(PTMG) y un diisocianato de L-lisina seleccionado entre metil, etil, propil, isopropil, butil e isobutil. Preferentemente es diisocianato de metil L-lisina. En una realización preferida, el poliuretano es un copolímero de bloque tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$ donde n y m están comprendidos entre 0.2 y 0.8, siendo $m + n = 1$ y preferiblemente $m=n=0.5$, $o=2$ y $p=1$. X e y están preferentemente comprendidos entre 0.2 y 0.8, siendo $x + y = 1$ y preferiblemente $x=y=0.5$. A= poli(caprolactonadiol), B= plurónico-L61, C= diisocianato de metilo de L-lisina) y D= poli(éter de tetrametilenglicol).

En la síntesis de poliuretanos, el uso de macrodioles con alta dispersión de longitudes de cadena tiene una influencia notable en la morfología y separación de fases. Por lo tanto, la necesidad de disponer de polioles hidrolizables con longitud de cadena uniforme, funcionalidad controlada y adecuado peso molecular requiere de una cuidadosa síntesis y caracterización de los productos. La longitud de cadena influye en la cristalinidad del poliéster, mientras que la uniformidad tiene una influencia importante en el grado de separación de fases en los sistemas poliuretánicos.

El empleo de diisocianato de L-lisina (LDI) en la formulación del poliuretano se debe a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Rechichi et al., 2008; y Han et al., 2011), propiedades que hacen que se utilice en numerosas aplicaciones biomédicas.

Preferentemente, el polímero que encapsula la bemiparina en las nanopartículas es seleccionado entre PLGA, EUDRAGIT y QUITOSANO, mientras que si se trata de un copolímero, éste es en un caso preferido un copolímero de bloque anfifílico metacrílico formado por poli(metacrilato de metil-b-[2-(metacrililoiloxi)etil]trimetilamonio) (poli(MMA-b-MAETMA) de peso molecular M_w entre 8000 y 100000, siendo el preferido 80000. La composición molar puede variar entre (98:2) y (50:50), siendo la preferida (98:2).

De manera preferida, las nanopartículas que encapsulan la bemiparina presentan un tamaño medio comprendido entre 20 y 1000 nm estando dicho tamaño más preferiblemente comprendido entre 50-300 nm, incluidos ambos límites. El tamaño de las nanopartículas fue medido por dispersión de luz dinámica, mediante un equipo Zetasizer modelo Nano ZS de Malvern Instruments.

El producto sanitario puede incorporar opcionalmente otras capas, como puede ser una capa adhesiva, para fijarlo a la parte del cuerpo donde se aplica con el fin de cicatrizar la herida o úlcera. También puede, opcionalmente, incorporar uno o más agentes activos adicionales en cada una de sus capas indistintamente, como pueden ser antibióticos, antiinflamatorios o factores de crecimiento, entre otros. Por agente activo se entiende un producto al que se le atribuyen efectos beneficiosos en el ser humano.

Respecto al procedimiento de obtención del apósito, cabe destacar que la síntesis de los copolímeros de bloque se realizó preferentemente mediante polimerización radical controlada por transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible (RAFT), técnica recientemente descrita por Keddie et al. (2012) y Gregori y Stenzel (2012). Esta técnica es una de las más poderosas de la polimerización radical viva, ya que se puede utilizar para polimerizar prácticamente todos los monómeros comunes y se ha empleado con éxito en sistemas homogéneos, incluyendo en agua (MacCormick y Lowe, 2004; y Lowe y McCormick, 2007), y heterogéneos (Lansalot et al., 2002; y Biasutti et al., 2005). Se puede utilizar RAFT para la síntesis de copolímeros de bloque con bajos índices de polidispersidad y con alta eficacia (Stenzel et al. 2004; Garnier y Laschewsky, 2005; y Yusa et al., 2005). Además se puede utilizar RAFT para la síntesis de estructuras más complejas (Barner-Kowollik et al., 2003; y Gregori y Stenzel, 2012).

Preferentemente, la dispersión acuosa de nanopartículas contiene un porcentaje en peso de dichas nanopartículas comprendido entre 1% y 25% en masa respecto a la masa polimérica (poliuretano) incluidos ambos límites, siendo más preferentemente todavía del 5% en masa respecto a la masa polimérica. Es decir, un porcentaje del 5% de nanopartículas en la disolución significa que por cada 60 mg de poliuretano se tienen 3 mg de nanopartículas. Cada muestra o disco de poliuretano de 2 cm de diámetro pesa 60 mg y de esta forma se añaden 3 mg de nanopartículas cargadas con bemiparina. Eso da un 5% en masa de las nanopartículas respecto a la masa de poliuretano. En este ejemplo, la disolución de nanopartículas que se emplea tiene una concentración de 6 mg/ml, de la cual se añade 0.5 ml sobre el disco de poliuretano, obteniendo así una carga de 3 mg de nanopartículas por disco (o muestra).

Por otro lado, la disolución acuosa que contiene *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina y que se añade al hidrogel presenta una concentración de dichos péptidos PAMP comprendida entre 1fmol hasta 1 mmol PAMP/disco, siendo más preferentemente de 1 nmol PAMP/disco. Cuando se afirma que se añade un nanomol de PAMP en la capa del hidrogel significa que por cada disco (capa) de hidrogel queda 1nmol de PAMP. Para ello se prepara por ejemplo una disolución de PAMP 2 micromolar y se toman 0.5 ml de ésta para cargar el hidrogel, de forma que la concentración neta por capa de hidrogel es de 1 nanomol de PAMP.

De manera preferida, tras añadir las nanopartículas a la capa de poliuretano, la mezcla se mantiene durante 24h controlando la saturación de agua atmosférica, lo que favorece la difusión de las partículas a través de la película. De manera también preferida, se puede dejar evaporar el disolvente a temperatura ambiente. También preferiblemente, el hidrogel se hidrata con PBS durante un tiempo comprendido entre 0.5 y 4 horas, más preferiblemente 2h, y posteriormente se deposita sobre la película de poliuretano cargada con las nanopartículas de bemiparina. De manera preferida, la combinación de las capas se deja 2 horas para favorecer su hinchamiento, y 24 horas más de contacto. En una realización preferida, el apósito se sella entre dos capas de parafilm para evitar la evaporación total del disolvente. Más preferentemente todavía, el apósito se sella previa hidratación de ambas capas, añadiendo una pequeña cantidad de agua destilada (0.2-0.5 mL) y a continuación poniendo en contacto dichas capas manteniendo 24h en atmosfera saturada de vapor de agua, para favorecer el sellado.

El producto sanitario objeto de la invención puede emplearse en una realización preferida para el tratamiento y cicatrización de heridas, más preferentemente heridas comprometidas, y úlceras. Especialmente y de forma preferida, es aplicable a pacientes con diabetes, reducido riego sanguíneo o personas de la tercera edad.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1. Esquema del apósito bicapa sintetizado con los agentes bioactivos (PAMP y bemiparina). 1) Capa de poliuretano, 2) Hidrogel de gelatina-hialuronato sódico, 3) Nanopartículas cargadas con bemiparina, 4) PAMP.

Figura 2. a) Esquema de la formación de la capa de hidrogel compuesta por gelatina e hialuronato sódico entrecruzado con genipina, b) Fotografía de los xerogeles y los hidrogeles en agua.

Figura 3. Espectros ATR-FTIR del sistema gelatina-hialuronato sódico entrecruzado con 5% de genipina a distintos tiempos (s) de reacción.

Figura 4. Grado de hidratación alcanzado en el equilibrio por los geles entrecruzados con genipina a distintos pH y con diferentes concentraciones de genipina (%p/p genipina/polímero).

Figura 5. Barrido dinámico de tiempo del sistema gelatina-hialuronato sódico entrecruzado con distintas concentraciones de genipina.

Figura 6. Barridos de frecuencia del sistema gelatina-hialuronato sódico utilizando distintas concentraciones de genipina como agente entrecruzante.

Figura 7. Esquema de síntesis del extendedor de cadena (segmento blando).

- Figura 8.** Esquema de síntesis del segmento rígido.
- Figura 9.** Esquema de síntesis del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61].
- 5 **Figura 10.** Termograma obtenido por DSC a 5 °C/min en atmósfera de nitrógeno.
- Figura 11.** Espectro ATR-FTIR del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] sintetizado.
- Figura 12.** Espectro de ¹H-RMN del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] preparado.
- 10 **Figura 13.** Análisis termogravimétrico del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61].
- Figura 14.** Grado de hidratación del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] en agua.
- 15 **Figura 15.** Esquema de polimerización del MMA con el agente de transferencia CPADB.
- Figura 16.** Esquema de síntesis de los copolímeros de bloque vía RAFT.
- Figura 17.** Evolución de la distribución de peso molecular del PMMA con el tiempo y la conversión.
- 20 **Figura 18.** Espectro de ¹H-RMN del PMMA obtenido por polimerización RAFT.
- Figura 20.** Espectro ¹H-RMN del copolímero de bloque 86/14 p(MMA_n-b-MAETMA_m) en DMSO-d₆.
- 25 **Figura 21.** Esquema de formación de las nanopartículas por el método de emulsión múltiple. 1) Sistema Unimicelar, 2) Sistema Multimicelar, 3) NP cargada con bemiparina, 4) Imagen obtenida por TEM del sistema nanoparticulado compuesto por el copolímero de bloque RAFT 86/14 p(MMA_n-b-MAETMA_m) cargado con bemiparina, 5) w/o emulsión, 6) w/o/w emulsión.
- 30 **Figura 22.** Imágenes obtenidas por SEM de los distintos sistemas de nanopartículas: a) EUDRAGIT, b) PLGA, c) QUITOSANO, d) 86/14 p(MMA_n-b-MAETMA_m), e) 92/8 p(MMA_n-b-MAETMA_m) y f) 98/2 p(MMA_n-b-MAETMA_m).
- Figura 23.** Análisis EDAX realizado a 15 keV de los copolímeros de bloque p(MMA_n-b-MAETMA_m), a) 86/14, b) 92/8 y c) 98/2.
- 35 **Figura 24.** Espectro FTIR de la bemiparina (línea continua), del PLGA (guión largo), del sistema nanoparticulado PLGA-bemiparina (guión corto).
- Figura 25.** Perfil de liberación de la bemiparina a pH= 7.4 a 37 °C en el tiempo, HPLC-UV-Vis.
- 40 **Figura 26.** Perfil de liberación de la bemiparina a pH= 10 a 37 °C en el tiempo, HPLC-UV-Vis.
- Figura 27.** Esquema de formación del complejo ternario entre la bemiparina el FGF-2 y su correspondiente receptor de membrana (FGFR-1c).
- 45 **Figure 28.** Ensayo de proliferación BaF32 con los distintos sistemas de NP utilizando distintas concentraciones de bemiparina.
- Figura 29.** Imágenes de SEM de las nanopartículas del sistema 98/2 p(MMA-b-MAETMA) NP sobre la película de PU (a, b) en el interior de la película de PU, (c) en la superficie superior de la película de PU, (d) en la superficie inferior de la película de PU.
- 50 **Figura 30.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal y de campo claro a) micrografía del sistema bicapa control (formado por el hidrogel y la capa de poliuretano), b) micrografía del sistema bicapa que contiene 1nmol PAMP en el HG y 5% p del sistema 98/2 p(MMA-b-MAETMA) NP en la capa de poliuretano, después de haber sido injertados durante 5 días bajo la piel de los ratones, c) imagen del corte histológico transversal del tejido teñido con hematoxilina-eosina tras 14 días de implantación del sistema bicapa control, d) imagen del corte histológico transversal del tejido con sistema bicapa SPU + NP + BEMI + HG + PAMP implantado.
- 55 **Figura 31.** Sistema de sujeción de los discos bicapa en un animal isquémico. Se emplea una sutura no absorbible de forma continua (A) sujeta en cinco puntos, formando una estrella de cinco puntas (B). Puede observarse en A la incisión debida a la realización de la isquemia (flecha).
- 60 **Fig. 32:** Análisis morfométrico de los procesos de contracción y reepitelización. Los datos fueron obtenidos a partir de las mediciones realizadas sobre las heridas tras el sacrificio de los animales. Se observa una mayor
- 65

contribución de la reepitelización en el cierre en los grupos tratados con los sistemas cargados con PAMP. Los datos están expresados como porcentaje del área inicial del defecto cubierta mediante cada proceso.

Figura 33. Inmunohistoquímica contra α SMA. Se observa un mayor número de vasos seccionados (puntas de flecha) en el grupo isquémico +Bemi/+PAMP (A) frente al grupo –Bemi/-PAMP (B). Imágenes a 200 aumentos. (C) Valores obtenidos en los recuentos de los seis grupos, expresados como número de secciones vasculares por campo observado a 200 aumentos.

Ejemplos

A continuación se ilustra el apósito objeto de protección, así como de sus efectos y ventajas en el campo médico mediante varios ejemplos que no deben considerarse en ningún caso limitantes del mismo. Este producto sanitario que contiene moléculas bioactivas ha sido probado en dos modelos animales: ratón y conejo. Se han utilizado conejos normóxicos e isquémicos, con un grado de isquemia 3, para simular y comparar pacientes sin problemas de cicatrización con aquellos que presentan problemas circulatorios o de diabetes. Los ratones fueron modificados genéticamente para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) en los vasos sanguíneos.

Ejemplo 1: Hidrogeles de gelatina-hialuronato sódico entrecruzados con genipina.

Materiales

La gelatina (GE) de cerdo tipo A se obtuvo de Sigma-Aldrich, el hialuronato sódico (HA) grado oral de peso molecular 100 kDa se obtuvo de Bioibérica, la genipina se obtuvo de Challenge Bioproducts CO. Todos los reactivos se utilizaron sin previa purificación.

Métodos

La preparación de los hidrogeles de gelatina e hialuronato sódico se ha realizado utilizando distintos agentes entrecruzantes con el fin de obtener sistemas entrecruzados química o físicamente (Fig. 2). Los hidrogeles se obtuvieron por mezcla de ambos biopolímeros, los cuales se entrecruzaron empleando diferentes concentraciones (0.5, 1, 2 y 5 % respecto a la mezcla polimérica) de salicina, genipina, tripolifosfato y glicerol fosfato. Los hidrogeles se prepararon por casting de una mezcla de disoluciones acuosas de ambos componentes: 60% gelatina (100 mg/ml) y 40% hialuronato sódico (50 mg/ml). A la mezcla se le añadió el entrecruzante y rápidamente se depositó en un molde de teflón donde se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente.

Se realizaron ensayos termogravimétricos (TGA), estudios reológicos y de hinchamiento, de los hidrogeles para comprobar su resistencia mecanodinámica y su estabilidad.

Caracterización

La caracterización por ATR-FTIR se llevó a cabo utilizando dos cristales de CaF_2 de 2 mm de espesor y 25 mm de diámetro. Se utilizó un equipo Perkin-Elmer Spectrum One, realizando un barrido de 4000 a 600 cm^{-1} . Se realizaron 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo TGA Q500 (TA) entre 25 y 600 °C en atmósfera de nitrógeno a 10 °C/min.

Las medidas de reología se llevaron a cabo en un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado de TA Instruments modelo ARG2, utilizando una geometría de platos paralelos. Las muestras en disolución se midieron utilizando un plato superior de metacrilato y 40 mm de diámetro. Para las muestras en estado gel se usó un plato superior de acero de 20 mm de diámetro.

Resultados y discusión

El proceso de la reacción de entrecruzamiento se puede observar (Fig. 3) a través de la disminución de intensidades de las bandas características de los grupos funcionales ($\nu_{\text{OH}} = 3600 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{NH}_2} = 3400 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{CO}} = 1660 \text{ cm}^{-1}$) del hidrogel en el espectro ATR-FTIR. Cuando se produce el entrecruzamiento a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos OH, COOH y NH_2 , se observa un ensanchamiento y una disminución en la intensidad de las bandas características. Además, al aumentar el tiempo de reacción, se observa la aparición de una segunda señal de un grupo carbonilo ($\nu_{\text{CO}} = 1620 \text{ cm}^{-1}$) que se debe al entrecruzamiento químico que se produce entre la gelatina y la genipina que da lugar a nuevos enlaces carbonilo con distinto entorno químico que los originales que presentan los polímeros sin entrecruzar ($\nu_{\text{CO}} = 1660 \text{ cm}^{-1}$).

Grado de Hidratación

El porcentaje de hidratación de los geles se midió a 37 °C utilizando medios acuosos a distintos pH (2, 7.4 y 10), realizando cada medida por triplicado. El porcentaje del grado de hidratación de los geles se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\%H_e = [(W_e - W_o)/W_o] \times 100$, donde H_e es el grado de hidratación en el equilibrio, W_e es el peso del gel entrecruzado en el equilibrio y W_o es el peso inicial del gel. El grado de hidratación en el equilibrio se representa en la figura 4. Se observa que conforme aumenta la concentración de agente entrecruzante disminuye el máximo de hidratación alcanzado en el equilibrio. Esto se debe a que el hidrogel presenta un mayor grado de entrecruzamiento, por tanto es más compacto y el disolvente penetra menos en la estructura polimérica. El grado de hidratación en el equilibrio de los geles entrecruzados con genipina varía entre 1200% para los hidrogeles preparados con un 5% de entrecruzante y 3000% para aquellos preparados sólo con un 0.5%.

Además se observó que a pH= 7.4 la degradación del hidrogel entrecruzado con un 1% de genipina comenzó a partir de las 48 h, en cambio a pH= 2 y pH= 10 la degradación del hidrogel comenzó a partir del sexto y séptimo día respectivamente. A pH= 7.4 los hidrogeles alcanzan un mayor grado de hidratación. Esto se debe a que a pH= 2 los grupos amino no entrecruzados de la gelatina están protonados ($pK_a = 4.8$) y por ello van a interactuar iónicamente con los grupos carbonilos que hay presentes en la matriz polimérica, dando lugar a interacciones iónicas que proporcionan un mayor grado de entrecruzamiento de la estructura del hidrogel. A pH= 10 los grupos carbonilos ($pK_a = 9.4$) están cargados negativamente y pueden interactuar con los grupos amino libres presentes en la estructura. Sin embargo, a pH= 7.4 los grupos iónicos están parcialmente cargados y la interacción iónica que existe entre ellos es de menor fuerza, esto permite una mayor penetración de las moléculas de agua en la matriz, lo que conlleva un mayor grado de hidratación.

Estabilidad Mecánica.

1. Barridos de tiempo

Se realizaron ensayos dinamomecánicos de deformación, tiempo y frecuencia para determinar los módulos de almacenamiento y pérdidas de cada sistema entrecruzado y estimar el punto gel de cada sistema. Los barridos de tiempo se llevaron a cabo fijando un 2% de deformación y 0.5 Hz a 25 °C.

En la figura 5 se observa la transición de los hidrogeles de gelatina-hialuronato sódico entrecruzados con distintas concentraciones de genipina, desde su estado en disolución hacia un sólido viscoelástico (estado gel). Esta transición se da en el transcurso de la reacción, lo que permite estudiar la evolución de las propiedades del material durante la cinética de la reacción de entrecruzamiento. Se observa el incremento del módulo de almacenamiento (G') en función del tiempo, indicando el aumento del carácter sólido del material.

2. Barridos de frecuencia.

El barrido de frecuencia se realizó con un 2% deformación entre 0.01 y 100 Hz a 25 °C. La estabilización de G' hacia las etapas finales (Fig. 6) nos define las propiedades viscoelásticas del gel formado. Se observa como al aumentar la concentración de entrecruzante, el valor del módulo de almacenamiento y el módulo de pérdidas aumenta (Tabla 1), indicándonos una mayor estabilidad del gel. En el gel control (el que no contiene agente entrecruzante) no se alcanzó la estabilidad lineal en el valor de ambos módulos (G' y G''), indicándonos que esta estructura gel no es estable.

Tabla 1. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en estado gel

	Gel Control (0% Genipina)	Genipina 0.5%	Genipina 1%	Genipina 2%	Genipina 5%
G' (Pa)	378	1060	3740	6400	20120
G'' (Pa)	61	94	212	385	1300

Estabilidad Térmica

Se realizaron análisis termogravimétricos (TGA) de los sistemas entrecruzados con genipina y se compararon con el gel sin entrecruzar (HG control). Al aumentar la concentración del entrecruzante, la temperatura máxima de degradación así como la temperatura a la que se ha degradado el 10% del sistema aumentan debido a un mayor entrecruzamiento y estabilidad del gel (Tabla 2).

Tabla 2. Temperaturas de degradación del sistema gelatina-hialuronato sódico entrecruzado con distintas concentraciones de genipina

MUESTRA	$T_{10\%}$ (°C) ¹	T_{max} (°C) ²
HG CONTROL	105	312
HG Genip. 0.5%	105	314
HG Genip. 1%	110	317

HG Genip. 2%	135	319
HG Genip. 5%	140	322

1) $T_{10\%}$ = Temperatura a la que se ha degradado el 10% del sistema.

2) T_{max} = Temperatura a la cual la velocidad de degradación es máxima, según la derivada de la curva del termograma.

5 **Ejemplo 2. Película de poliuretano**

Materiales

10 Los reactivos y disolventes detallados a continuación fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y se utilizaron directamente sin previa purificación: poli(éter de tetrametilenglicol) (PTMG) número de alcoholes 55.1, poli(caprolactonadiol) (PCL-diol) de peso molecular de 2000 Da, plurónico-L61 (PL61) de peso molecular 2000 Da, tetrahidrofurano (THF), *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra, 2-etilhexanoato de estaño y diisocianato de metilo de L-lisina.

15 Métodos

Síntesis del extendedor de cadena

20 El extendedor de cadena se preparó a partir de PCL-diol y PL61 en relación molar (1:1) según el siguiente procedimiento experimental.

25 Se preparó una disolución de PCL-diol (6.62 g, 3.3 mmol) en DMF anhidro (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, se calentó 20 min a 135 °C. A continuación se añadieron 2-etilhexanoato de estaño (II) (30 µL, 0.093 mmol) y plurónico-L61 (7.04 g, 6.96 ml, 3.5 mmol). La reacción se agitó 24 h a 135 °C obteniéndose así el extendedor de cadena (50PCL-diol-50PL61) (Fig. 7).

Síntesis del poliuretano

30 En primer lugar, se obtuvo el pre-polímero añadiendo un pequeño exceso de diisocianato de metilo de L-lisina (2.38 g, 2.23 ml, 11.2 mmol) con PTMG (7.62 g, 3.7 mmol) en DMF anhidro (60 ml) y se añadió 2-etilhexanoato de estaño (II) (30 µl, 0.093 mmol). La mezcla se agitó 2 h a 60 °C para obtener el segmento rígido (Fig. 8). En segundo lugar, se añadió el extendedor de cadena al pre-polímero resultante para obtener el poliuretano segmentado (Fig. 9). La reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno a 75 °C durante 24 h.

35 El poliuretano resultante se precipitó en agua. Finalmente, se secó a vacío a 50 °C durante 48 h y se designó como SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61].

Caracterización

40 Los productos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹H-RMN) y de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflexión Atenuada (ATR-FTIR). Los espectros de resonancia se registraron en un equipo Varian Inova-400 MHz, usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer Spectrum One, realizando un barrido de 4000 a 600 cm⁻¹. Se realizaron 32 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹.

45 Mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se determinaron los pesos moleculares promedio en número (M_n), en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (PDI) utilizando un cromatógrafo Perkin-Elmer equipado con una bomba isocrática Serie 250 y un detector de índice de refracción Serie 200. Las muestras se eluyeron a través de tres columnas conectadas en serie de poliestireno-divinilbenceno PL-gel de 500, 10⁴ y 10⁵ nm de tamaño de poro (Polymer Laboratories) termostalizadas a 70 °C. Como fase móvil se utilizó *N,N*-dimetilformamida (DMF) con 0.1% de LiBr a un flujo de 0.3 ml/min. Para el calibrado se utilizaron patrones de poliestireno de peso molecular entre 10300 y 480000 Da.

55 Por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se determinó la temperatura de fusión así como el incremento de la entalpía asociada al proceso empleando un calorímetro (Perkin Elmer DSC8500) previamente calibrado con patrones de Indio y Zinc. Para ello, se depositó la muestra seca de los distintos materiales en el interior de cápsulas de aluminio, que se sellaron y se calentaron a velocidad constante de 5 °C/min, con un flujo de N₂ de 20 ml/min, en el intervalo de temperaturas de -20 a 100 °C. Se tomaron las temperaturas obtenidas en el termograma correspondiente al segundo barrido.

60 El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo TGA Q500 (TA) entre 25 y 600 °C en atmósfera de nitrógeno a 10 °C/min.

El análisis dinámomecánico se llevó a cabo en un analizador mecánico diferencial METTLER DMA 861e, realizando barridos de temperatura entre 0°C y 80 °C a distintas frecuencias (0.5, 1, 3, 5 y 10 Hz).

Resultados y discusión

5 Las características de los poliuretanos segmentados se pueden modificar simplemente cambiando la relación de los segmentos rígidos y blandos; esto es, variando las relaciones molares entre el diisocianato, el polioliol y el extendedor de cadena.

10 El poliuretano obtenido se caracterizó por DSC (Fig. 10). Se observaron tres transiciones endotérmicas principales (29, 49 y 54 °C). Estas transiciones se atribuyen a la fusión de los dominios cristalinos que forman las cadenas de poliuretano. La primera corresponde al segmento rígido formado por PTMG y las dos últimas al segmento blando formado por PCL-diol. La aparición de dos transiciones entálpicas de fusión relativas a la PCL-diol se debe a la existencia de dos dominios cristalinos distintos, uno con mayor grado de orientación en el espacio ($T_f = 54$ °C) y otro con menor grado de orientación ($T_f = 49$ °C).

15 La caracterización por ATR-FTIR (Fig. 11) del poliuretano mostró las bandas características correspondientes: $\nu_{NH} = 3346$ cm^{-1} , $\nu_{CH_2} = 2935$ y 2859 cm^{-1} , $\nu_{CO} = 1723$ cm^{-1} ; $\nu_{CN} = 1549, 1243$ cm^{-1} , $\nu_{COC} = 1190$ cm^{-1} ; $\nu_{C-C} = 1046$ cm^{-1} . La ausencia de banda de absorción a 2273 cm^{-1} , característica del grupo isocianato, indica que reaccionó todo el diisocianato y se eliminó el posible exceso por diálisis.

20 En el espectro de 1H -RMN (Fig. 12) se observan señales características de cada uno de los componentes del poliuretano. Así a 2.25 ppm aparece la señal de grupo metileno (-CH₂-) en posición α al carboxilato de la PCL-diol, a 1.05 ppm aparece el grupo metilo (-CH₃) del PL61, las señales correspondientes a PTMG aparecen a 3.4 ppm (-CH₂-O-) y a 1.6 ppm (-CH₂-C-) solapadas junto con señales de los otros dos componentes. Y las señales características del LDI aparecen a 3.6 ppm y a 4.1 ppm correspondientes al metilo (-CH₃) y el grupo CH en posición α al éster, respectivamente.

25 En el análisis termogravimétrico (Fig. 13) del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] se observan dos pérdidas de peso atribuibles a la degradación térmica de los dos segmentos del poliuretano. Esto indica que el poliuretano presenta dos segmentos diferenciados, uno rígido y otro blando cuyos máximos según la derivada de la curva de degradación son 318 y 398 °C respectivamente. Basándonos en las medidas de TGA podemos decir que el SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] contiene un 42% del segmento rígido y un 58% del segmento blando.

30 La distribución de pesos moleculares y polidispersidad obtenidos por SEC, así como el módulo de pérdidas y almacenamiento y el valor de T_g obtenidos por DMTA para el SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Caracterización por SEC y DMTA del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61].

M_w (Da)	M_n (Da)	PDI	G' (MPa)	G'' (MPa)	T_g (°C)
19109	6983	2.73	500	2000	22

40 El porcentaje de hidratación del SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61] se midió a 37 °C en agua destilada, realizando cada medida por triplicado. El porcentaje del grado de hidratación del poliuretano se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\%H_t = [(W_t - W_o)/W_o] \times 100$, donde H_t es el porcentaje de hidratación a tiempo t , W_t es el peso del poliuretano a tiempo t y W_o es el peso inicial del poliuretano. El perfil de hidratación mostró un valor máximo de 10 a 15% a los 15 días (Fig. 14) y luego disminuyó hasta alcanzar un valor estable de 9% a partir del día 40. Este comportamiento se debe a una respuesta viscoelástica de la película de poliuretano. Al principio el sistema se encuentra en estado sólido, formando una red cristalina rígida (película seca). Cuando el sistema empieza a hidratarse las cadenas que forman los dominios amorfos se hinchan y adquieren mayor flexibilidad, alcanzando el máximo grado de hidratación. Sin embargo, el sistema tiende con el tiempo a un estado de mínima energía, de forma que las cadenas empiezan a relajarse y se contraen, expulsando moléculas de agua que habían penetrado en la red polimérica, hasta alcanzar un grado de hidratación estable. Este comportamiento es característico de los geles viscoelásticos.

Ejemplo 3. Síntesis de copolímeros de bloque

Materiales

55 El [2-(metacrililoiloxi)etil]trimetilamonio (disolución acuosa al 80% p) (MAETMA) y el ácido 4,4'-azobis(4-ciano)valérico (V501) se compraron en Sigma-Aldrich. La heparina de bajo peso molecular (bemiparina, 111,3 U/mg) fue donada por los laboratorios farmacéuticos ROVI. El metacrilato de metilo (MMA) se obtuvo de Acros Organics, el 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) se obtuvo de Merck y se recristalizó en etanol antes de su uso. La pro-adrenomedulina N-20 (PAMP) de peso molecular 2460 Da se obtuvo de Phoenix Pharmaceuticals INC.

Métodos

Los copolímeros de bloque se sintetizaron mediante polimerización radical controlada, a través del mecanismo de Adición, Fragmentación y Transferencia Reversible (RAFT). Para ello se utilizó un agente de transferencia RAFT (ditiobenzoato del ácido 4-cianopentanoico, CPADB) previamente sintetizado y caracterizado.

Primero se sintetizó el bloque hidrófobo por polimerización en masa a partir de CPADB (28 mg, 0.1 mmol) y metacrilato de metilo (MMA) (10.6 ml, 100 mmol), utilizando AIBN (1.64 mg, 0.01 mmol) como iniciador de radicales. A esta mezcla se le pasó una corriente de nitrógeno durante 30 min y se calentó a 60 °C durante 24 h (Fig. 15).

A partir del macroiniciador RAFT de PMMA, se llevó a cabo la polimerización del segundo bloque utilizando cloruro de [(2-metacrililoiloxi)etil]trimetil amonio (MAETMA). Para ello, en un matraz de 250 ml se disolvieron 6.2 ml de una disolución 0.6 mM en DMSO del PMMA (3.74 mmol), 1.8 ml de una disolución 0.42 mM en DMSO de ácido 4,4'-azobis(4-ciano)valérico (0.75 mmol) y distintas cantidades del MAETMA (374, 187 and 93.5 mmol respectivamente) en 34 ml de DMSO para obtener tres copolímeros de bloque con diferente longitud de cadena del componente hidrofílico (PMAETMA) (Fig. 16).

Se pasó una corriente de nitrógeno durante 30 min y se calentó a 70 °C durante 6 h. Finalmente, el producto resultante se dializó en agua durante 3 días utilizando membranas de diálisis tubulares de 3.5 kDa de tamaño de poro.

Caracterización

Los productos se caracterizaron mediante ATR-FTIR y ¹H-RMN, utilizando DMSO-d₆. Los pesos moleculares promedio en número (M_n) y en peso (M_w), así como la polidispersidad (PDI) se determinaron por SEC a 70 °C, utilizando DMF como fase móvil con 0,1% de LiBr a un flujo de 0,3 ml/min. Para el calibrado se utilizaron patrones de poli(metacrilato de metilo) de peso molecular entre 2.9 y 480 kDa obtenidos de Polymer Laboratories.

Para la determinación de la temperatura de transición vítrea se utilizó un aparato Perkin Elmer DSC7. El estudio de DSC se realizó depositando la muestra seca de los distintos materiales en el interior de cápsulas de aluminio que se sellaron y se calentaron a velocidad constante de 10 °C/min, con un flujo de N₂ de 20 ml/min, en el intervalo de temperaturas de -20 a 180 °C. Se tomaron las temperaturas obtenidas en el termograma correspondiente al segundo barrido.

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en atmósfera de N₂ en un equipo TGA Q500 (TA) entre 25 y 600°C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Resultados y discusión

Los resultados de SEC (Fig. 17a) demostraron que el peso molecular aumentó linealmente con la conversión, lo que demuestra que la polimerización se llevó a cabo bajo condiciones controladas con una polidispersidad inferior a 1.3. Esto se demostró también con los cromatogramas de distribución de pesos moleculares obtenidos respecto al tiempo de reacción donde se obtuvo una distribución unimodal en todos los tiempos (Fig. 17b).

En la figura 18 se observa el espectro de ¹H-RMN del PMMA macro RAFT obtenido sin previa purificación. A partir de la relación de integración de las señales correspondientes al monómero residual (5.6 y 6.1 ppm) y las correspondientes al PMMA producto (0.8-1.2 ppm) se calculó una conversión final del 97%. Este valor también se corroboró con un estudio gravimétrico.

A partir del macroiniciador obtenido (PMMA macro RAFT), se prepararon distintos copolímeros de bloque, partiendo de bloques del mismo peso molecular de PMMA y variando la cantidad de PMAETMA para controlar así el grado de hidrofilia del sistema (Tabla 4). En todos los sistemas se obtuvo un buen control de la polimerización, dando lugar a polidispersidades inferiores a 1.5 (Tabla 4). La evolución de la conversión con el tiempo y de la distribución del peso molecular con la conversión se muestra en la figura 16. A bajas conversiones, el peso molecular aumentó linealmente con la conversión, sin embargo a conversiones superiores al 60% la cinética deja de ser de primer orden, debido probablemente a la presencia de reacciones de transferencia que disminuyen la generación de radicales capaces de mantener el proceso de propagación de la polimerización. La polidispersidad en todos los sistemas fue inferior a 1.5 (Fig. 19). Los copolímeros obtenidos se caracterizaron por ¹H-RMN (Fig. 20). Para el cálculo de la relación molar de ambos bloques en los distintos sistemas copoliméricos se analizaron las señales entre 4.2 y 4.4 ppm correspondientes al PMAETMA y las señales entre 0.3 y 1.2 ppm correspondientes a los grupos metilos de ambos bloques. A partir del valor de las integrales se calculó la composición molar de ambos bloques en el copolímero (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción del macroiniciador RAFT (PMMA) y el monómero MAETMA en la alimentación y en el copolímero resultante. Pesos moleculares obtenidos a partir de los valores experimentales de SEC. La conversión se calculó por $^1\text{H-RMN}$

$F_{\text{PMMA/MAETMA}}$ (Alimentación)	$f_{\text{PMMA/MAETMA}}$ (Copolímero) (calculada por $^1\text{H-RMN}$)	(n) unidades de PMMA	(m) unidades de PMAETMA	$M_{n\text{teo}}$ (Da)	$M_{n\text{exp}}$ (calculado por SEC) (Da)	PDI	% conversión a las 6h
90/10	86/14	970	158	69000	66000	1.40	67
95/5	92/8	970	84	61200	64000	1.41	60
97.5/2.5	98/2	970	20	57900	56000	1.45	56

5 Ejemplo 4. Preparación de nanopartículas cargadas con bemiparina

Materiales

10 El poli(alcohol vinílico) (PVA) ($M_w = 31000\text{-}50000$ g/mol, 98-99% hidrolizado) se obtuvo de Sigma-Aldrich. El quitosano (PROTASAN UP CL213, $M_w = 150000\text{-}400000$ g/mol, 75-90% grado de desacetilación) se obtuvo de Novamatrix. El Eudragit RS PO ($M_w = 150000$ g/mol, 4.48-6.77% de unidades de metacrilato de amonio) se obtuvo de Degussa. El PLGA (RESOMER RG 504, 50:50 relación molar, $M_w = 40000$ g/mol) se obtuvo de Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. La bemiparina fue donada por los laboratorios farmacéuticos ROVI. Los copolímeros de bloque $p(\text{MMA}_n\text{-}b\text{-MAETMA}_m)$ fueron sintetizados por polimerización radicalica controlada, RAFT.

Métodos

20 Se han preparado distintas formulaciones de nanopartículas cargadas con bemiparina. Se han empleado diferentes técnicas para la preparación de estos sistemas: por un lado el método de emulsión múltiple o triple emulsión empleando diferentes fases poliméricas y por otro, se han preparado nanopartículas en base a la formación de complejos polielectrolíticos a partir de bemiparina y quitosano.

Nanopartículas preparadas por emulsión múltiple.

25 Para la preparación de estos sistemas se parte de una disolución acuosa de bemiparina (20 mg/ml). Sobre 10 ml de esta fase acuosa se añaden gota a gota 100 ml de una disolución de polímero (10 mg/ml) en acetato de etilo y el sistema se mantiene en agitación constante mediante sonda de ultrasonidos (40 A). De esta manera se forma una primera emulsión que se añade de nuevo gota a gota sobre 400 ml de una disolución acuosa de PVA (20 mg/ml) que actúa como agente estabilizante. El sistema se mantiene de nuevo bajo agitación por ultrasonidos (40 A). Tras el lavado y centrifugación a 12000 rpm para eliminar el estabilizante, las partículas se aíslan por liofilización. La carga de bemiparina de estos sistemas fue entre un 10% y un 15% en peso respecto a la concentración de polímeros (Fig. 21).

Nanopartículas preparadas a partir de bemiparina y quitosano.

40 La preparación de estos sistemas se basa en la formación de complejos polielectrolíticos de bemiparina con quitosano partiendo de disoluciones acuosas de ambos componentes a $\text{pH} = 5$ previamente ajustadas con una disolución de ácido acético (1% v/v). El método de preparación consiste en la adición gota a gota de la disolución de bemiparina (0.03% p/v, 5 ml, $\text{pH} = 5$) sobre la de quitosano (0.1% p/v, 1.5 ml, $\text{pH} = 5$) manteniendo la mezcla en agitación con un homogeneizador a 3400 rpm durante 15 minutos. El aislamiento de las nanopartículas se lleva a cabo por centrifugación a 12000 rpm durante una hora y posterior liofilización. La carga de bemiparina de este sistema fue de un 45% en peso respecto a la concentración de quitosano.

Caracterización de los sistemas

50 Los productos se caracterizaron mediante ATR-FTIR (4000 a 600 cm^{-1}), TGA (25 a $600\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno a $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) y DSC (el barrido se realizó a velocidad constante de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, con un flujo de N_2 de 20 ml/min, en el intervalo de temperaturas de -20 a $180\text{ }^\circ\text{C}$) para determinar la temperatura de transición vítrea de las NP. Para el cálculo de la T_g se tomó la temperatura en la que se alcanza la mitad de la diferencia de calor específico existente entre los estados amorfo vítreo y amorfo elastómero, es decir, $T_g = \frac{1}{2} \Delta C_p$. Este punto se corresponde con el punto de inflexión del cambio de pendiente en el termograma del segundo barrido.

55 La morfología externa e interna de las nanopartículas se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo Philips XL 30 ESEM a un voltage de 15 keV. Las muestras se prepararon depositando una gota de una disolución acuosa (0.01mg/ml) de las mismas sobre un porta de vidrio de 13 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente y la muestra se metalizó utilizando un recubrimiento de cromo.

El microanálisis de la superficie de las nanopartículas se llevó a cabo por dispersión de energía de rayos X (EDAX) a 15 keV.

5 Las medidas de tamaño de partícula y Potencial Zeta (PZ) se realizaron utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) usando un equipo Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern Instruments, UK) equipado con un láser rojo a 633 nm (He/Ne). Para realizar las medidas se utilizaron disoluciones de 0.01 mg/ml, se equilibró la celda a 25 °C durante 5 minutos y se realizaron 5 réplicas de cada medida de 20 barridos.

10 El PZ se calculó utilizando la ecuación de Henry (Ecuación I). A partir de esta ecuación se puede calcular el PZ mediante una simple medida de movilidad electroforética. Si se trabaja en disoluciones acuosas y con concentraciones de electrolito bajas se puede aplicar la aproximación de Smoluchowski que asume que la función de Henry tiene un valor de 3/2, por lo que el PZ se puede calcular como:

$$U_E = 2\epsilon z f(ka) / 3\eta \rightarrow z \approx U_E \eta / \epsilon \quad (\text{Ecuación I})$$

15 Donde U_E = movilidad electroforética, z = potencial zeta (PZ), ϵ = constante dieléctrica, η = viscosidad, y $f(ka)$ = función de Henry.

20 Las medidas de actividad biológica de la bemiparina libre y encapsulada se llevaron a cabo mediante un ensayo de proliferación celular. Para ello se utilizaron células BaF32 que son un tipo de linfocitos B cuya señalización celular está mediada por la formación de un complejo entre la bemiparina, el FGF-2 y su correspondiente receptor FGFR1c en la superficie celular.

25 Resultados y discusión

En todos los casos se obtuvieron partículas con una morfología esférica y con un tamaño de partícula en el rango nanométrico (Fig. 22). El análisis elemental de la superficie de las nanopartículas se llevó a cabo utilizando la técnica de espectroscopía de rayos por energía dispersiva (EDAX). En todos los sistemas se pudo observar la señal de azufre correspondiente a la presencia de bemiparina (Fig. 23).

30 La caracterización mediante espectroscopía infrarroja (FTIR) permitió observar en el sistema nanoparticulado las señales características tanto del polímero ($\nu_{CO} = 1700 \text{ cm}^{-1}$) como de la bemiparina ($\nu_{CO} = 1600 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{OH} = 3500 \text{ cm}^{-1}$) (Fig. 24).

35 El macroiniciador RAFT (PMMA) presentó una T_g experimental de 117 °C. Los copolímeros de bloque RAFT presentan una única transición vítrea correspondiente principalmente al bloque de PMMA. El bloque correspondiente al PMAETMA no presenta una transición vítrea propia debido a no coexistir equimolarmente, sino que se encuentra en muy baja proporción con respecto al segmento de PMMA. Se puede decir que el segmento de PMAETMA no alcanza la concentración crítica para existir segregación de fases entre los distintos bloques, pero sí afecta al valor de T_g correspondiente al bloque de PMMA. Se observa que al aumentar la longitud de la cadena de PMAETMA, la T_g disminuye ligeramente, debido a un aumento del componente hidrofílico en el sistema, teniendo el mismo efecto que un agente plastificante, lo que conlleva a la disminución de la T_g .

40 Al preparar las nanopartículas de estos copolímeros de bloque, se produce la autoasociación del bloque hidrófobo y el bloque hidrófilo, que se enriquece con la agregación de la bemiparina en el sistema. Por tanto, se favorece la segregación de fases entre los distintos bloques, y se pueden observar dos valores de transición vítrea correspondientes a cada uno de los bloques (T_{g1} corresponde al valor de PMAETMA, T_{g2} corresponde al valor de PMMA) (Tabla 5).

50

Tabla 5. Caracterización termogravimétrica de los distintos sistemas copoliméricos y sus correspondientes sistemas nanoparticulados, mediante TGA y DSC

MUESTRA	$T_{10\%} (^{\circ}\text{C})^3$	$T_{\text{max}} (^{\circ}\text{C})^4$	$T_{g1} (^{\circ}\text{C})$	$T_{g2} (^{\circ}\text{C})$
BEMIPARINA	120	242	-	-
PLGA	270	307	46.9	-
PLGA NP cargadas con BEMIPARINA	265	321	47.6	-
EUDRAGIT	330	370	68.0	-
EUDRAGIT NP cargadas con BEMIPARINA	355	403	44.9	89.2
86/14 copolímero	220	384	-	86
86/14 NP cargadas con BEMIPARINA	267	386	39	112
92/8 copolímero	240	386	-	93
92/8 NP cargadas con	275	396	36	114

BEMIPARINA				
98/2 copolímero	245	394	-	110
98/2 NP cargadas con BEMIPARINA	295	405	38	118
QUITOSANO	194	229	-	-
QUITOSANO NP cargadas con BEMIPARINA	135	246	-	-

3) $T_{10\%}$ = Temperatura a la que se ha degradado el 10% del sistema.

4) T_{max} = Temperatura a la cual la velocidad de degradación es máxima, según la derivada de la curva del termograma.

5 El diámetro hidrodinámico medio y los valores de PZ de las nanopartículas se muestran en la tabla 6. Las nanopartículas sin bemiparina presentaron un tamaño medio entre 115 y 290 nm. Se observó que las partículas preparadas a partir de los copolímeros RAFT presentan un tamaño mayor debido a la carga positiva que presentan en las cadenas poliméricas. Esta carga hace que existan fuerzas de repulsión electrostática, provocando un aumento de tamaño en las nanopartículas.

10 Cuando las nanopartículas se cargan con bemiparina, el tamaño disminuye notablemente en los sistemas preparados con los copolímeros RAFT debido a una neutralización de cargas positivas del copolímero que se contrarrestan con las negativas de la bemiparina.

15 En el sistema de PLGA, no se observaron diferencias significativas en el tamaño medio de las nanopartículas debido a que este copolímero no presenta cargas en su superficie.

20 El valor de PZ observado (Tabla 6) en las nanopartículas preparadas con los copolímeros RAFT, el EUDRAGIT y el QUITOSANO sin bemiparina fue un valor positivo (27- 42 mV) debido a la presencia de la carga del amonio cuaternario o del grupo amino del quitosano. En el caso de las nanopartículas PLGA sin bemiparina se observó una pequeña carga superficial negativa debida posiblemente a la carga de los grupos (OH⁻, COO⁻ de los extremos de cadena). Cuando la bemiparina se incorpora en todos los sistemas de nanopartículas, el PZ se vuelve altamente negativo, situándose entre (-10 y -50) mV. Esto demuestra que la bemiparina se ha incorporado al sistema y tiende a situarse en la superficie de la nanopartícula junto con el componente más hidrofílico del sistema polimérico (Fig. 5). Se observa una cierta disminución en valor absoluto del PZ con el incremento de la longitud de cadena del bloque MAETMA en los copolímeros. Esto se puede explicar debido a la presencia de un mayor número de cargas positivas que son neutralizadas por las negativas presentes en la bemiparina, de forma que el valor del PZ en la superficie de la nanopartícula es menor porque hay un menor número de grupos cargados.

30

Tabla 6. Medidas del diámetro hidrodinámico y del PZ de las nanopartículas a partir de DLS.

MUESTRA	DIÁMETRO MEDIO (nm)	PZ (mV)
PLGA NP cargado con bemiparina	119 ± 11	-49 ± 4
EUDRAGIT NP cargado con bemiparina	135 ± 4	-38 ± 4
86/14 NP cargado con bemiparina	216 ± 4	-9 ± 1
92/8 NP cargado con bemiparina	195 ± 9	-11 ± 2
98/2 NP cargado con bemiparina	174 ± 2	-23 ± 1
QUITOSANO cargado con bemiparina	99 ± 12	-22 ± 4
86/14 NP	143 ± 24	37 ± 1
92/8 NP	183 ± 41	36 ± 1
98/2 NP	286 ± 22	27 ± 1
EUDRAGIT NP	236 ± 98	36 ± 5
PLGA NP	114 ± 8	-4 ± 2
QUITOSANO NP	200 ± 55	42 ± 12

35 El cálculo de la eficacia de encapsulación (EE) de fármaco se ha llevado a cabo mediante un método indirecto, a partir del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la bemiparina no encapsulada presente en el sobrenadante obtenido tras el aislamiento por centrifugación de las nanopartículas. Todos los sistemas preparados presentaron unos porcentajes de encapsulación cercanos al 100% (Tabla 7).

Tabla 7. Medidas de la EE de la bemiparina en los distintos sistemas de nanopartículas medidos por HPLC acoplado a un detector UV-Vis.

NP SISTEMA	%EE
PLGA NP	89 ± 3
EUDRAGIT RS PO NP	94 ± 2
86/14 NP	98 ± 2
92/8 NP	96 ± 3

98/2 NP	95 ± 4
QUITOSANO NP	99 ± 1

El estudio de liberación de bemiparina se llevó a cabo utilizando HPLC con detector UV-Vis. Fijando la longitud de onda a 242 nm. La fase móvil utilizada fue agua milli-Q, ajustada con ácido acético glacial a pH= 3, 1 ml/min.

5 La liberación de bemiparina se produce principalmente por difusión del fármaco a través de la matriz polimérica hinchada. Cuanto más hidrofílico es el sistema polimérico, mayor es la cantidad de moléculas de disolvente que penetra en la nanopartícula y, por tanto, mejor difusión y mayor liberación de la misma en el medio. Sin embargo, en el caso del QUITOSANO, del EUDRAGIT y de los copolímeros de bloque RAFT, tenemos presente una carga positiva debido al grupo amino o a la sal de amonio cuaternaria de la colina que lo forman respectivamente. Esta carga positiva interactúa a través de la formación de enlaces iónicos con los grupos sulfónicos y carboxílicos presentes en la bemiparina, por lo que la composición química del sistema polimérico va a afectar a la liberación de bemiparina en el medio. Se observó a pH= 7.4 que la liberación de bemiparina es mayor cuanto menor es el contenido del bloque MAETMA debido a una menor densidad de cargas positivas y por tanto, a una menor retención iónica de la bemiparina. En el caso del EUDRAGIT, se trata de un terpolímero estadístico en el que la distribución de la cadena MAETMA no se encuentra formando un bloque determinado, sino que está distribuida aleatoriamente a lo largo de la cadena polimérica, de forma que el sistema es más hidrofóbico y existe una mayor interacción con las moléculas de bemiparina. Esto conlleva a una mayor retención del fármaco y una menor difusión al medio, por lo que la liberación de bemiparina en el sistema de EUDRAGIT fue más lenta que en el resto de sistemas. En el caso del QUITOSANO el complejo polielectrolítico es dependiente del pH (pKa= 6.8). A pH= 7.4 el grupo amino del quitosano se encuentra parcialmente protonado e interacciona fuertemente con la bemiparina. En el PLGA, al ser un copolímero biodegradable, además del proceso de difusión también tiene lugar un proceso de degradación del copolímero, por lo que a partir de los 30 días de liberación, se observa un aumento de bemiparina en el medio liberado que no se observa en el resto de sistemas, llegando a liberar el 100% de bemiparina encapsulada a los 70 días (Fig. 25).

25 A pH= 10, está favorecida la hidrólisis de los grupos ésteres, por lo que se acelera el proceso de degradación del portador polimérico facilitando la difusión de bemiparina a través del sistema nanoparticulado, obteniéndose un perfil de liberación de la misma más rápido y una liberación mayor que los obtenidos a pH= 7.4 en todos los sistemas. Además, en el caso del sistema quitosano-bemiparina, la liberación del fármaco aumenta a pH= 10 debido a la ruptura del complejo polielectrolítico, ya que el grupo amino a este valor de pH se encuentra totalmente desprotonado y no interactúa iónicamente con la bemiparina, de forma que se favorece su liberación en el medio (Fig. 26).

Ensayo de Proliferación BaF32.

35 La bemiparina forma un complejo ternario (Fig. 27) con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y su correspondiente receptor de membrana específico (FGFR1c) incrementando así el proceso de señalización celular correspondiente al proceso de proliferación (Dillen, K., J. Vandervoort, G. Van den Mooter, and A. Ludwig. 2006. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 314 (1):72-82; Eto, T. 2001. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 22 (11):1693-1711). Teniendo en cuenta esta propiedad, se diseñó un experimento para comprobar que la bemiparina encapsulada mantiene su actividad biológica. Para ello se utilizaron células BaF32 que son un tipo de linfocitos B cuya señalización celular está modulada por un enlace específico entre el FGF-2 y su correspondiente receptor FGFR1c en la superficie celular. La interacción de la bemiparina con el FGF-2 activa la unión específica de este complejo con el receptor FGFR1c, y esto se traduce en un incremento de proliferación celular debido a la interacción específica de la bemiparina con el FGF-2 y su correspondiente receptor de membrana.

50 La bemiparina sin encapsular incrementa la actividad del FGF-2, promoviendo la proliferación celular. Esta respuesta es independiente de la concentración de bemiparina utilizada. Sin embargo, cuando la bemiparina es añadida encapsulada en nanopartículas se observa una cierta dependencia de la respuesta celular con la concentración, muestra indicativa de que la bemiparina encapsulada se está liberando paulatinamente en el tiempo. Este efecto se observó principalmente en el sistema de PLGA y el copolímero 98-2 p(MMA-*b*-MAETMA) (Fig. 28), donde la retención iónica de bemiparina es menor y está más favorecido el proceso de difusión del fármaco a través de la matriz polimérica.

Ejemplo 5. Formación del sistema bicapa que conforma el producto sanitario objeto de la invención

60 El producto sanitario está formado por dos capas poliméricas biodegradables de diferente estructura y naturaleza. Ambas capas pueden contener componentes bioactivos seleccionados de acuerdo con su aplicación, de tal manera que se controla su liberación de forma programada.

En cualquiera de ellas se añade una dispersión o disolución del componente bioactivo, o bien nanopartículas cargadas con el propio componente, de tal forma que queda integrado físicamente en la matriz polimérica biodegradable.

5 a) Incorporación de las nanopartículas cargadas con bemiparina sobre la película de poliuretano.

10 Sobre una película de poliuretano SPU321-LDI-[50PCL-diol-50PL61], de 60 mg de masa y 20 mm de diámetro se añadió una dispersión acuosa de las nanopartículas (0.6 ml, 5 mg/ml) y se mantuvo durante 24h controlando la saturación de agua atmosférica para favorecer la difusión de las partículas a través de la película. Finalmente se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Las películas cargadas con las nanopartículas se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se obtuvieron imágenes de la superficie superior e inferior, así como del corte transversal de la película de poliuretano. Para realizar dicho corte transversal se sumergió la película en nitrógeno líquido y a continuación se fracturó. Las imágenes obtenidas demuestran que las nanopartículas difunden a través de la película de poliuretano distribuyéndose uniformemente, manteniendo su morfología esférica y su tamaño inicial (Fig. 29).

15 b) Incorporación del hidrogel cargado con PAMP sobre la película de poliuretano cargada con las nanopartículas.

20 El hidrogel de gelatina-hialuronato sódico entrecruzado con un 1% de genipina se hidrató con PBS (pH= 7.4) durante 2h y se depositó sobre la película de poliuretano cargada con las nanopartículas de bemiparina. Sobre el hidrogel se añadió una disolución acuosa de PAMP (0.5 ml, 2×10^{-6} M) y el sistema bicapa se mantuvo durante 24h controlando la saturación del agua atmosférica para favorecer la difusión del PAMP en el hidrogel. El sistema se almacenó entre dos capas de parafilm que se sellaron para evitar la evaporación total del disolvente. Se prepararon tres tipos de muestras (Tabla 8):

- 25
- DISCO CONTROL: bicapa formada por el poliuretano (SPU) y el hidrogel (HG). Esta muestra no contiene ni nanopartículas cargadas con bemiparina ni PAMP.
 - DISCO CARGADA CON BEMIPARINA: bicapa formada por la capa de poliuretano cargada con un 5% p de nanopartículas que contienen bemiparina y la capa del hidrogel sin cargar.
 - 30 ➤ DISCO GARGADA CON BEMIPARINA Y PAMP: bicapa formada por la capa de poliuretano cargada con un 5% p de nanopartículas que contienen bemiparina y la capa del hidrogel cargado con 1 nanomol de PAMP.

Tabla 8. Masa de cada uno de los componentes que forman el sistema bicapa.

MUESTRA	Masa (mg) PU	Masa (mg) NP	Masa (mg) bemiparina	UI bemiparina / disco	Moles (nmol) PAMP / disco
SPU+HG CONTROL	60	0	0	0	0
SPU + NP + BEMI + HG	60	3	0.3	33.4	0
SPU + NP + BEMI + HG + PAMP	60	3	0.3	33.4	1

35

Ejemplo 6. Ensayos in vivo del sistema bicapa: modelo animal de ratón

40 Los tres tipos de membranas bicapa preparadas (Tabla 8) fueron colocadas en un bolsillo practicado en la dermis dorsal de ratones modificados genéticamente que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) en los vasos sanguíneos. Después de 5 días, las membranas fueron extraídas y fijadas en formalina tamponada. Se hicieron fotografías de las membranas con una lupa equipada con luz ultravioleta y se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 30a y 30b). Se observó la diferencia entre un disco doble que no llevaba PAMP (micrografía de la izquierda) en el que no se observan vasos sanguíneos, y uno que sí lo llevaba (micrografía de la derecha) en el que se observa la neo-formación de vasos sanguíneos.

45

Las imágenes de microscopía óptica con tinción de hematoxilina-eosina corresponden a los discos extraídos tras 14 días de implantación e incluidos en resina. Se observa una mayor formación de vasos sanguíneos en la zona del implante que contiene los discos cargados con PAMP (Fig. 30d).

50

Ejemplo 7. Ensayos in vivo del sistema bicapa: modelo de isquemia experimental realizado en conejos

55 Para evaluar los efectos sobre la curación de heridas de los tres sistemas bicapa, se empleó un modelo experimental de cicatrización de defecto excisional con isquemia en oreja de conejo blanco de Nueva Zelanda. Los animales se dividieron en dos grupos: isquémicos y normóxicos (control). La isquemia se realizó mediante ligadura y seccionamiento de la arteria y vena central de ambas orejas, 24 horas antes de la intervención. Se

realizaron defectos excisionales cutáneos en el dorso de cada una de las orejas, con un diámetro de 2 cm. Inmediatamente después, se aplicaron los sistemas bicapa correspondientes, los cuales fueron inmovilizados utilizando sutura no absorbible sujeta a los extremos de la herida, siguiendo las diagonales de un pentágono regular formando una estrella de cinco puntas (Fig. 31).

A los catorce días de la intervención, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras para su análisis morfológico e histológico.

El porcentaje de cierre del defecto fue similar en todos los grupos, aunque la contribución proporcional de los procesos de contracción y reepitelización mostró diferencias. Los sistemas cargados con Bemiparina y PAMP provocaron una menor contracción de la herida, favoreciendo el cierre de la misma por epitelización, especialmente en el grupo isquémico (Fig. 32).

La capacidad angiogénica de los sistemas bicapa se evaluó mediante inmunohistoquímica contra α -actina de músculo liso (α SMA) sobre cortes del tejido cicatrizal. Con estas muestras, se hicieron recuentos de las secciones vasculares observadas en la dermis neoformada mediante microscopía óptica en campos a 200 aumentos. Se pudo observar un incremento en el número de secciones en las muestras relativas a los sistemas cargados con Bemiparina y PAMP (Fig. 33).

Referencias bibliográficas

- Bergmann, A., N. Morgenthaler, J. Papassotiropoulos, and J. Struck. 2008. diagnosis and assessment of risk for sequelae of diabetes mellitus using fragment of proadrenomedullin, 21 pp.
- Bos, G. W., N. M. Scharenborg, A. A. Poot, G. H. M. Engbers, T. Beugeling, W. G. Van Aken, and J. Feijen. 1999. Proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin- heparin conjugate loaded with basic fibroblast growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research* 44 (3):330-340.
- Capila, I., and R. J. Linhardt. 2002. Heparin-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* 41 (3):390-412.
- Ceballos, A., M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti, and P. Mura. 2005. Influence of formulation and process variables on in vitro release of theophylline from directly-compressed Eudragit matrix tablets. *Il Farmaco* 60 (11-12):913-918.
- Cervantes-Uc, J. M., J. I. M. Espinosa, J. V. Cauich-Rodríguez, A. Ávila-Ortega, H. Vázquez-Torres, A. Marcos-Fernández, and J. San Román. 2009. TGA/FTIR studies of segmented aliphatic polyurethanes and their nanocomposites prepared with commercial montmorillonites. *Polymer Degradation and Stability* 94 (10):1666-1677.
- Collins, M. N., and C. Birkinshaw. 2008. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (11):3335-3343.
- Chung, Y.-I., G. Tae, and S. Hong Yuk. 2006. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials* 27 (12):2621-2626.
- Dillen, K., J. Vandervoort, G. Van den Mooter, and A. Ludwig. 2006. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 314 (1):72-82.
- Eto, T. 2001. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 22 (11):1693-1711.
- Gregory, A., and M. H. Stenzel. 2012. Complex polymer architectures via RAFT polymerization: From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 37 (1):38-105.
- Han, J., R. W. Cao, B. Chen, L. Ye, A. Y. Zhang, J. Zhang, and Z. G. Feng. 2011. Electrospinning and biocompatibility evaluation of biodegradable polyurethanes based on L-lysine diisocyanate and L-lysine chain extender. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 96 A (4):705-714.
- Haslik, W., L. P. Kamolz, G. Nathschläger, H. Andel, G. Meissl, and M. Frey. 2007. First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm® as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns* 33 (3):364-368.
- Hoffart, V., A. Lamprecht, P. Maincent, T. Lecompte, C. Vigneron, and N. Ubrich. 2006. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *Journal of Controlled Release* 113 (1):38-42.
- Hoffart, V., N. Ubrich, A. Lamprecht, K. Bachelier, C. Vigneron, T. Lecompte, M. Hoffman, and P. Maincent. 2003. Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 10 (1):1-7.
- Jiao, Y. Y., N. Ubrich, V. Hoffart, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, and P. Maincent. 2002. Preparation and Characterization of Heparin-Loaded Polymeric Microparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28 (8):1033-1041.
- Jimenez, P. A., and S. E. Jimenez. 2004. Tissue and cellular approaches to wound repair. *The American Journal of Surgery* 187 (5, Supplement 1):S56-S64.
- Lassalle, V., and M. L. Ferreira. 2007. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromolecular Bioscience* 7 (6):767-783.

- Mao, J. S., H. F. Liu, Y. J. Yin, and K. D. Yao. 2003. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 24 (9):1621-1629.
- Martinez-Gonzalez, J., and C. Rodriguez. New challenges for a second-generation low-molecular-weight heparin: focus on bempiparin. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8 (5):625-634.
- 5 Mohammadi, M., S. K. Olsen, and O. A. Ibrahim. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (2):107-137.
- Moustafine, R. I., I. M. Zaharov, and V. A. Kemenova. 2006. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (1):26-36.
- 10 Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T. M. Aminabhavi. 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125 (3):193-209.
- Pal, K., A. K. Banthia, and D. K. Majumdar. 2007. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech* 8 (1).
- 15 Park, S.-N., H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh. 2003. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials* 24 (9):1631-1641.
- Peng, H. T., L. Martineau, and P. N. Shek. 2008. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (3):997-1007.
- 20 Picard, J., S. Giraudier, and V. Larreta-Garde. 2009. Controlled remodeling of a protein-polysaccharide mixed gel: examples of gelatin-hyaluronic acid mixtures. *Soft Matter* 5 (21):4198-4205.
- Rechichi, A., G. Ciardelli, M. D'Acunzio, G. Vozzi, and P. Giusti. 2008. Degradable block polyurethanes from nontoxic building blocks as scaffold materials to support cell growth and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84A (4):847-855.
- 25 Richard, C., J. P. Liuzzo, and D. Moscatelli. 1995. Fibroblast Growth Factor-2 Can Mediate Cell Attachment by Linking Receptors and Heparan Sulfate Proteoglycans on Neighboring Cells. *Journal of Biological Chemistry* 270 (41):24188-24196.
- Rios, M. 2003. Micro- and nanoparticle systems show promise for oral dosage forms. *Pharmaceutical Technology* 27 (2):17-18.
- 30 Rullan, M., L. Cerda, G. Frontera, L. Masmiquel, and J. Llobera. 2008. Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bempiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Diabetic Med.* 25 (9):1090-1095.
- Stenzel, M. H. 2008. RAFT polymerization: an avenue to functional polymeric micelles for drug delivery. *Chemical Communications* (30):3486-3503.
- 35 Tanghetti, E., R. Ria, P. Dell'Era, C. Urbinati, M. Rusnati, M. G. Ennas, and M. Presta. 2002. Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): Recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene* 21 (24):3889-3897.
- Vanderhooff, J. L., M. Alcoutlabi, J. J. Magda, and G. D. Prestwich. 2009. Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* 9 (1):20-28.
- 40 Zandi, M., H. Mirzadeh, and C. Mayer. 2007. Effects of concentration, temperature, and pH on chain mobility of gelatin during the early stages of gelation. *Iranian Polymer Journal (English Edition)* 16 (12):861-870.
- Zeng, C., N. W. Zhang, and J. Ren. 2012. Synthesis and properties of bio-based thermoplastic polyurethane based on poly(L-lactic acid) copolymer polydiol. *Journal of Applied Polymer Science* 125 (4):2564-2576.
- Zhang, H., W. Cui, J. Bei, and S. Wang. 2006. Preparation of poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) nanoparticles and their degradation behaviour in aqueous solution. *Polymer Degradation and Stability* 91 (9):1929-1936.
- 45 Zhang, Z., J. Ni, L. Chen, L. Yu, J. Xu, and J. Ding. 2011. Biodegradable and thermoreversible PCLA-PEG-PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion. *Biomaterials* 32 (21):4725-4736.

REIVINDICACIONES

1. Un apósito caracterizado porque comprende al menos:
- una capa interna compuesta de un hidrogel constituido por una combinación de hialuronato sódico y gelatina, y estando estabilizado con al menos un agente entrecruzante, y
 - una capa externa compuesta de un copolímero de bloque tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$ que es poliuretano biodegradable y bioadsorbible,
- estando la capa interna impregnada con un péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina, y la capa externa con nanopartículas de bemiparina encapsulada en un polímero o un copolímero biodegradables.
2. Apósito según la reivindicación anterior, donde el agente entrecruzante es seleccionado dentro del grupo compuesto por genipina, tripolifosfato sódico, glicerol fosfato sódico y salicina.
3. Apósito según la reivindicación anterior, donde el agente entrecruzante es genipina.
4. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde del agente entrecruzante está contenido en el hidrogel en una concentración comprendida entre 0,5% y 10% en peso respecto a la mezcla polimérica, incluidos ambos límites.
5. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el hidrogel está compuesto por un 60% en peso de gelatina y un 40% en peso de hialuronato sódico sobre la masa polimérica del hidrogel.
6. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el hidrogel incorpora adicionalmente al menos un polímero seleccionado entre colágeno, quitosano y dextrano.
7. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el poliuretano tiene un peso molecular comprendido entre 3000 y 40000 Daltons, incluidos ambos límites.
8. Apósito según la reivindicación anterior, donde el poliuretano está constituido por un segmento blando A_nB_m formado a partir de policaprolactona diol y plurónico 61, un segmento rígido C_oD_p compuesto por un poli(éter de tetrametilenglicol) y un diisocianato de L-lisina seleccionado dentro del grupo compuesto por metil, etil, propil, isopropil, butil e isobutil.
9. Apósito según la reivindicación anterior, donde el diisocianato de L-lisina es diisocianato de metil L-lisina.
10. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el poliuretano es un copolímero de bloque tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$ donde *n* y *m* están comprendidos entre 0.2 y 0.8, siendo $m + n = 1$ y preferiblemente $m=n=0.5$, $o=2$ y $p=1$.
11. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el poliuretano es un copolímero de bloque del tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$, *X* e *y* estando comprendidos entre 0.2 y 0.8, siendo $x + y = 1$ y preferiblemente $x=y=0.5$.
12. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde cuando la bemiparina está encapsulada por un polímero, éste es seleccionado dentro del grupo compuesto por PLGA, EUDRAGIT y QUITOSANO, y cuando está encapsulada por un copolímero, éste es un copolímero de bloque anfifílico metacrílico formado por poli(metacrilato de metilo-*b*-[2-(metacriloi)oxi]etil]trimetilamonio..
13. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde las nanopartículas que encapsulan la bemiparina presentan un tamaño medio comprendido entre 20 y 1000 nm, incluidos ambos límites.
14. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que incorpora una o más capas adicionales y/o uno o más agentes activos adicionales.
15. Apósito según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es seleccionado dentro del grupo compuesto por una gasa, una venda y una tirita.
16. Un método de preparación del apósito descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende al menos las siguientes etapas:
- añadir las nanopartículas de bemiparina a la capa de poliuretano mediante impregnación con una dispersión acuosa de dichas nanopartículas;
 - hidratar la capa de hidrogel y depositar dicha capa sobre la capa de poliuretano previamente impregnada con las nanopartículas de bemiparina;
 - añadir el péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina a la capa de hidrogel mediante disolución acuosa; y
 - sellar el producto obtenido a partir de las dos capas.

- 5 17. Método según la reivindicación anterior, donde la dispersión acuosa de nanopartículas presenta un porcentaje en peso de dichas nanopartículas comprendido entre 1% y 25% en masa respecto a la masa polimérica de poliuretano incluidos ambos límites, y la disolución acuosa que contiene el péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina y que se añade al hidrogel presenta una concentración de dicho péptido comprendida entre 1fmol hasta 1 mmol péptido/disco.
- 10 18. Método según la reivindicación anterior, donde el apósito se sella previa hidratación de ambas capas, añadiendo una cantidad de agua destilada comprendida entre 0.2 y 0.5 mL y poniendo a continuación en contacto dichas capas manteniendo 24h en atmosfera saturada de vapor de agua.
19. Uso de una capa compuesta de un hidrogel constituido por una combinación de hialuronato sódico y gelatina, estando entrecruzado (estabilizado) con al menos un agente entrecruzante, y que se encuentra impregnada con un péptido *N*-terminal de 20 aminoácidos de proadrenomedulina; y una segunda capa compuesta de un copolímero de bloque tipo $(A_nB_m)_x(C_oD_p)_y$ que es poliuretano biodegradable y bioadsorbible que contiene nanopartículas de bemiparina encapsulada en un polímero o un copolímero biodegradables, tal cual se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la fabricación de un apósito para su uso en medicina.
20. Uso según la reivindicación anterior, para el tratamiento y cicatrización de heridas y/o úlceras.
21. Un kit de recubrimiento de heridas y úlceras en la piel, que comprende el apósito descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

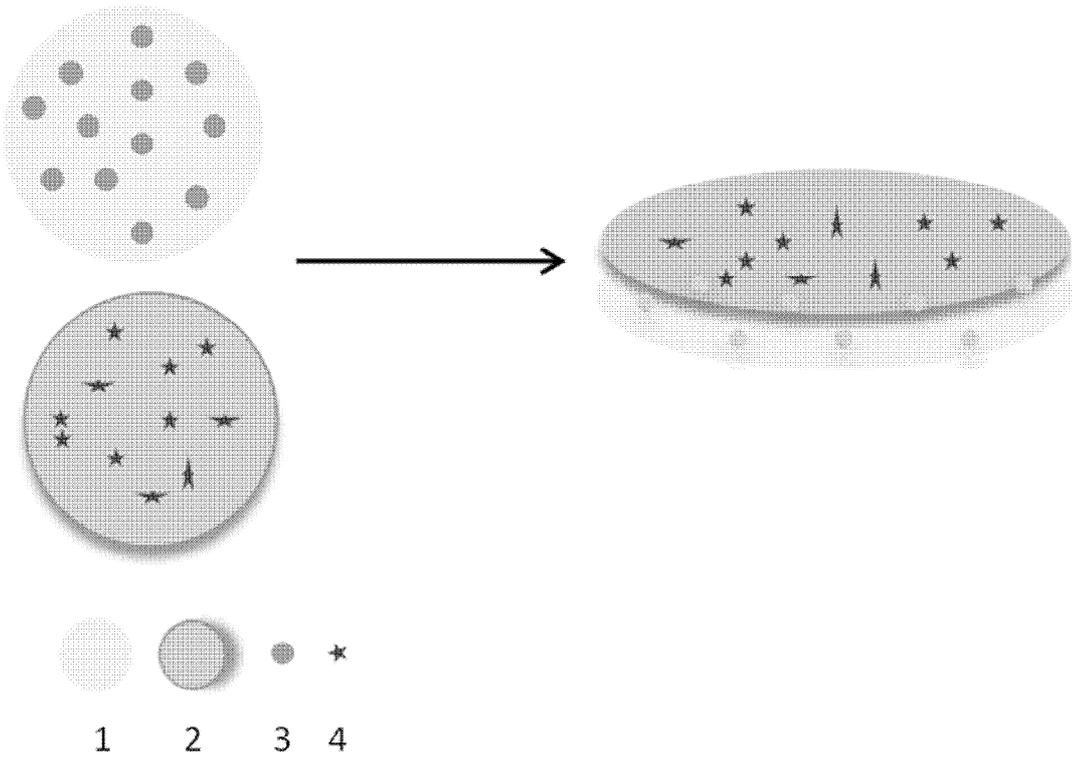


FIG. 1

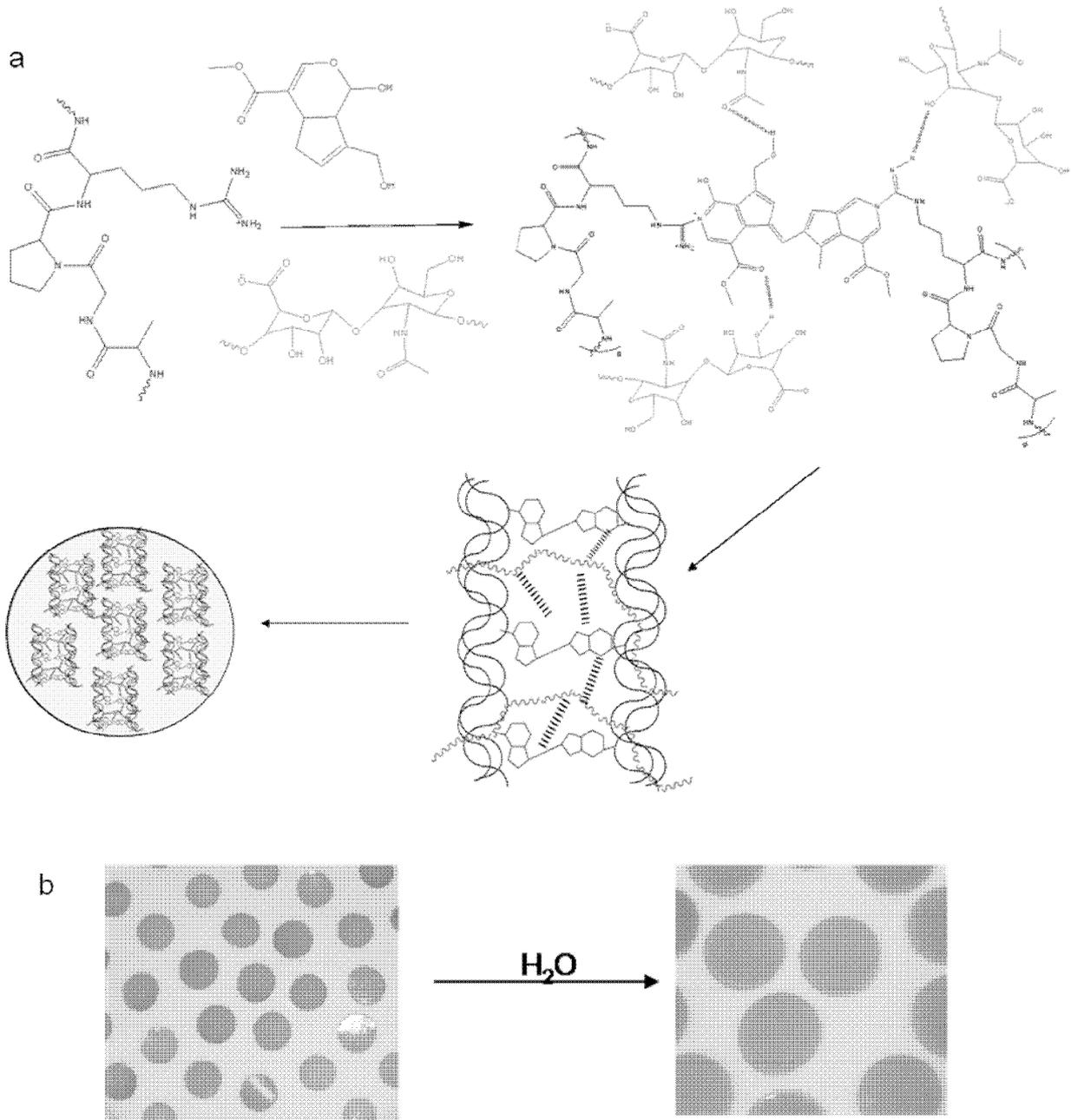


FIG. 2

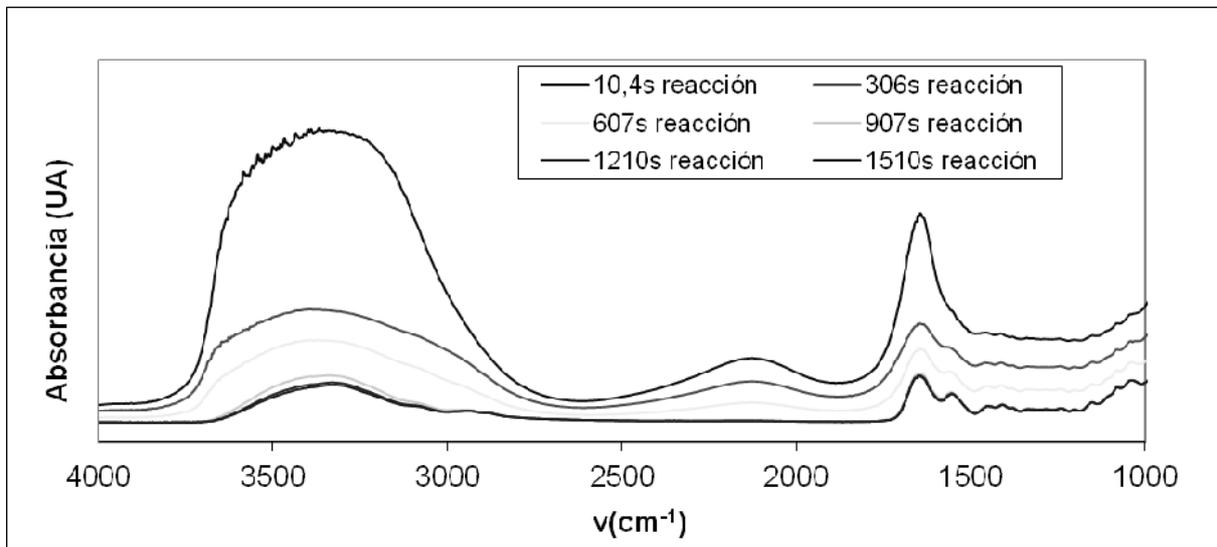


FIG. 3

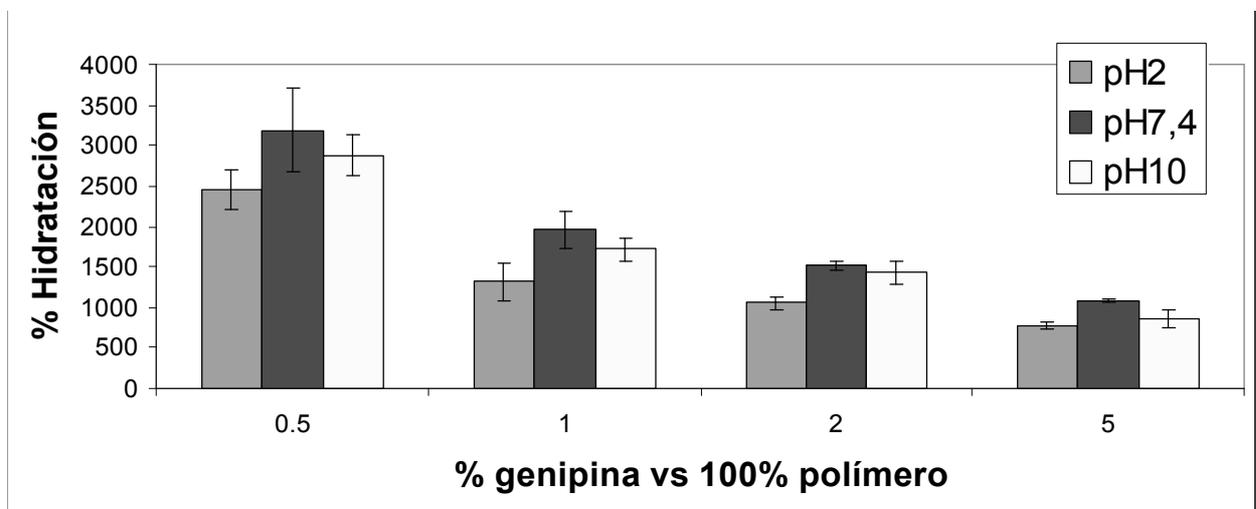


FIG. 4

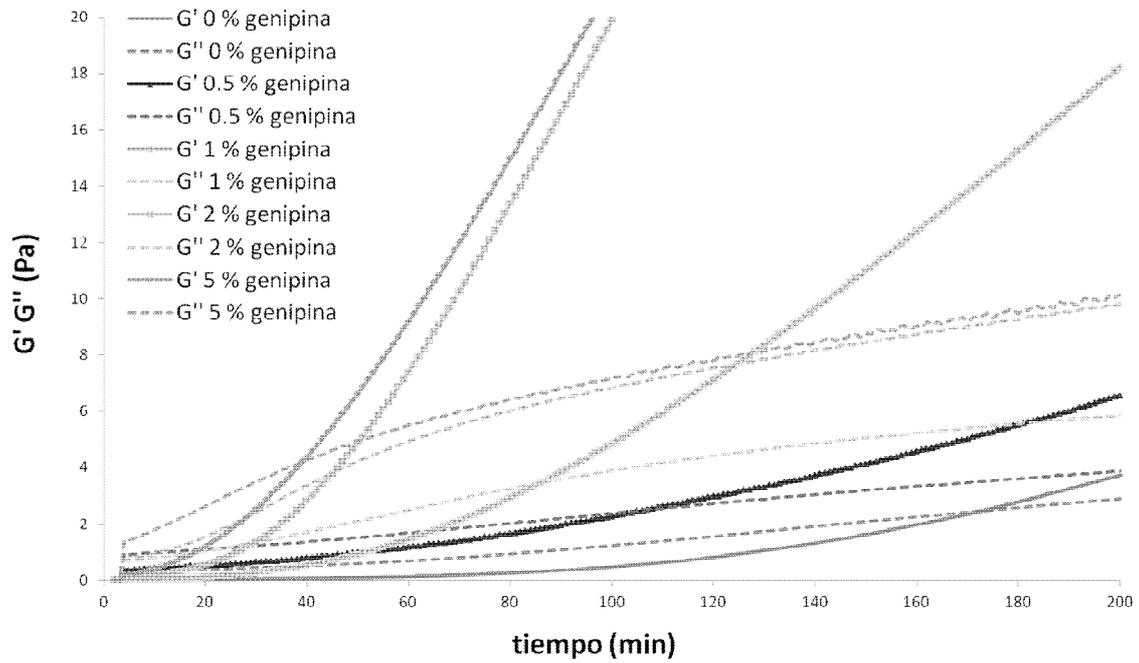


FIG. 5

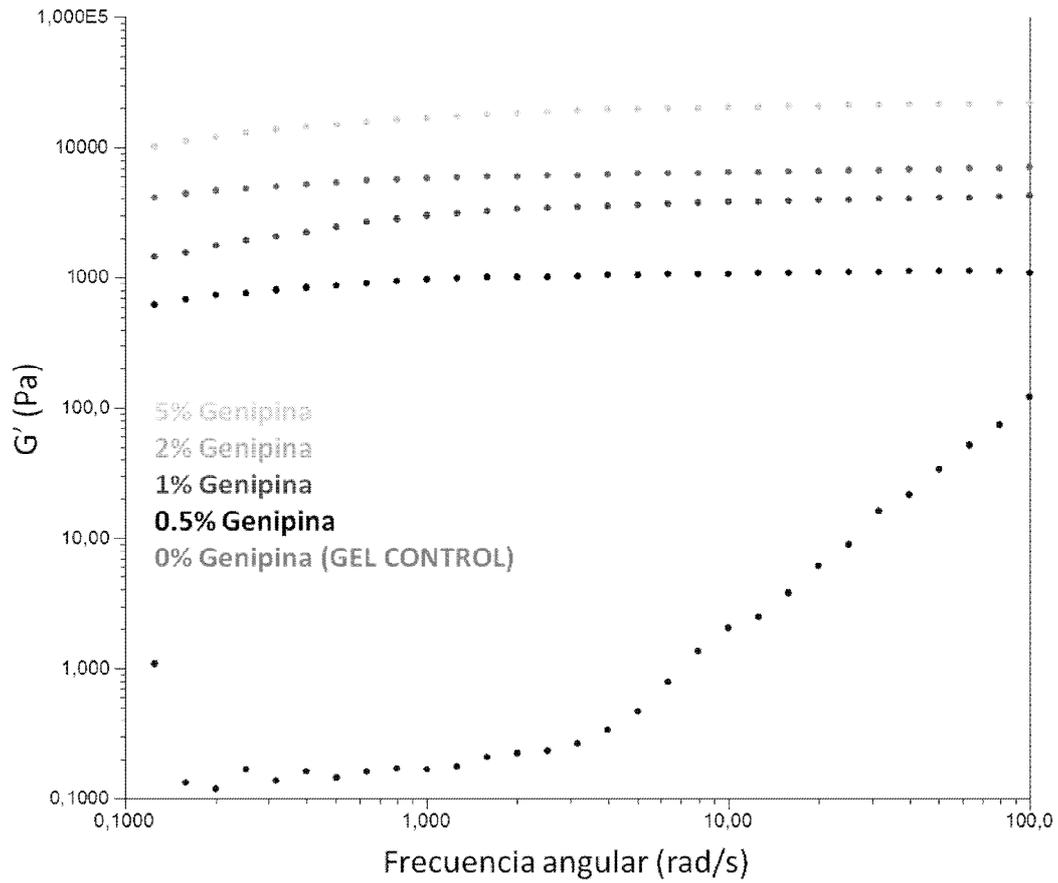


FIG. 6

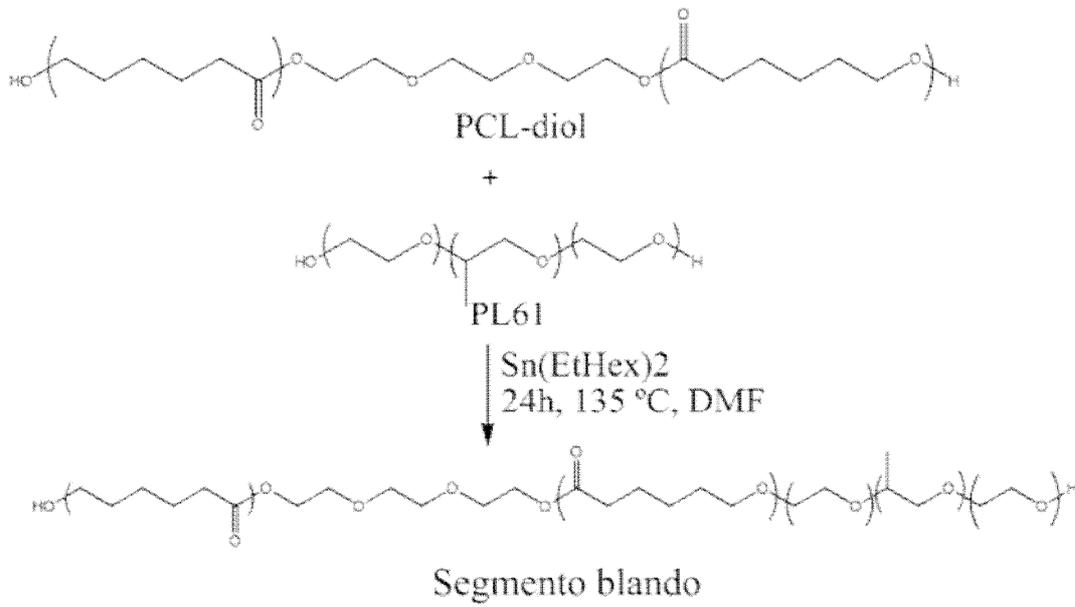


FIG. 7

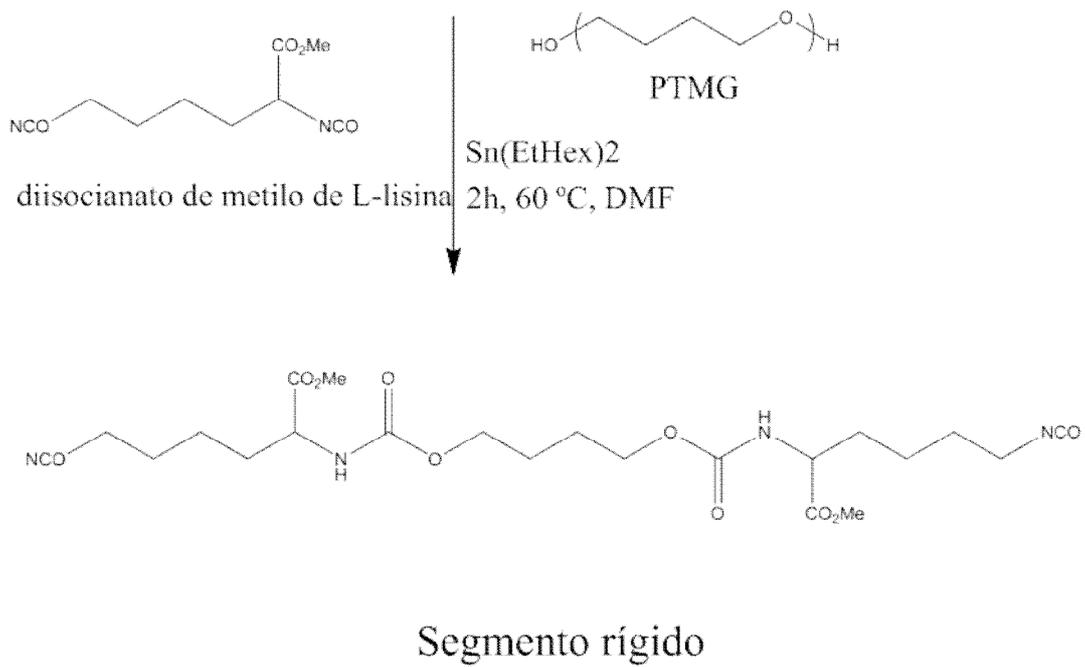


FIG. 8

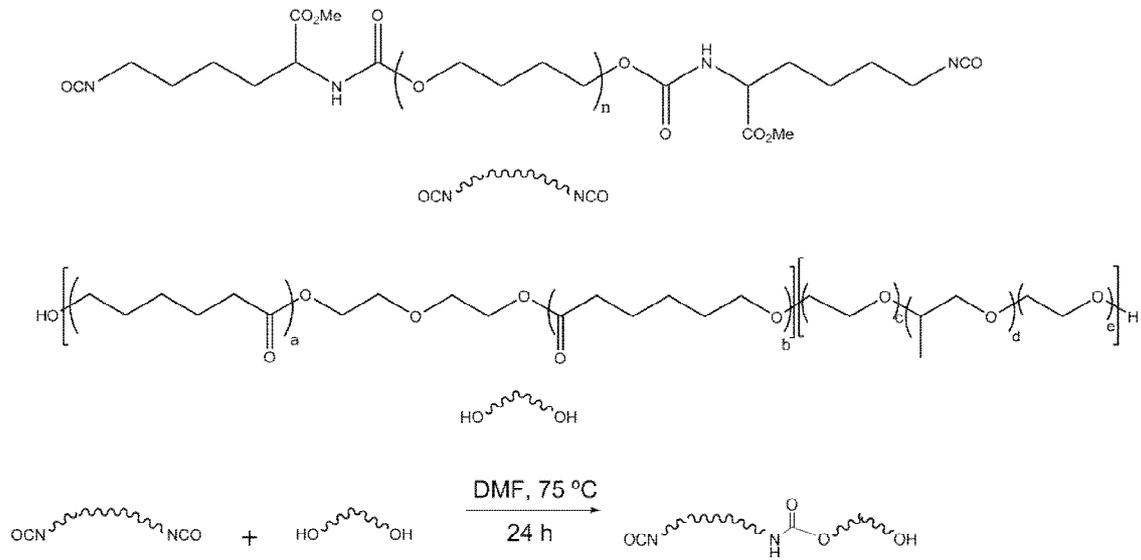


FIG. 9

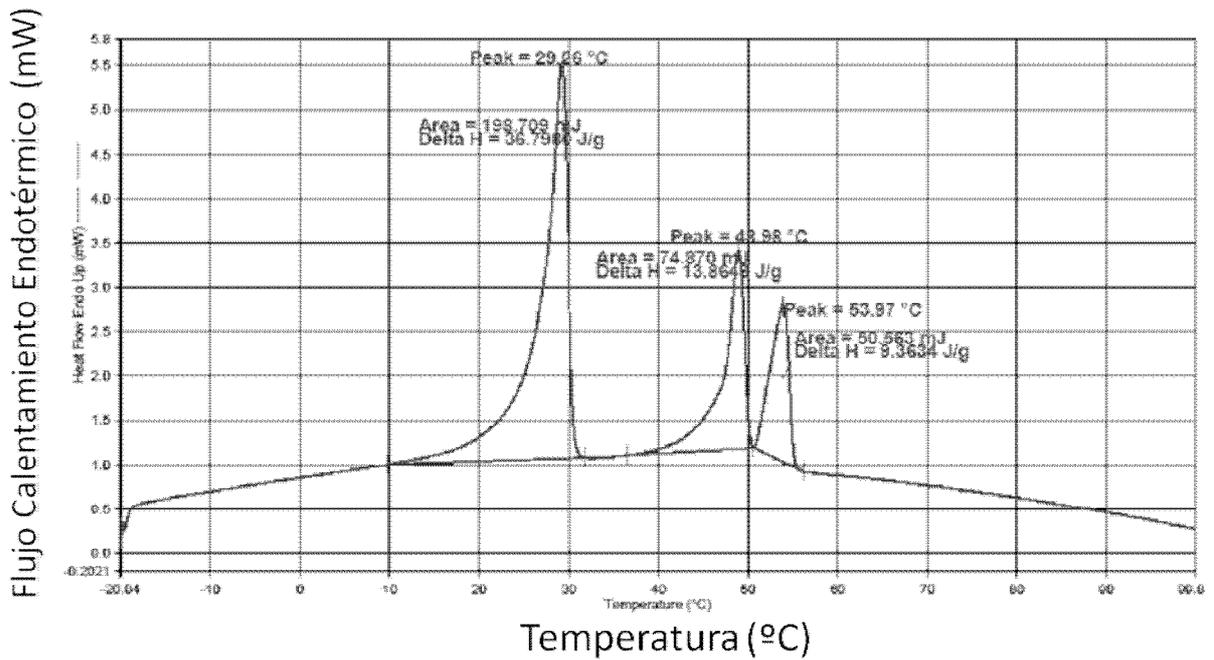


FIG. 10

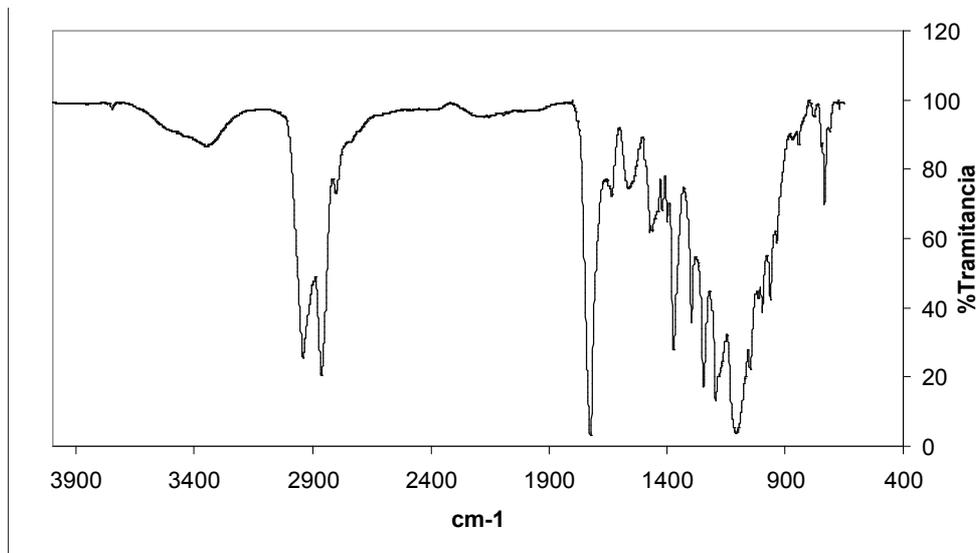


FIG. 11

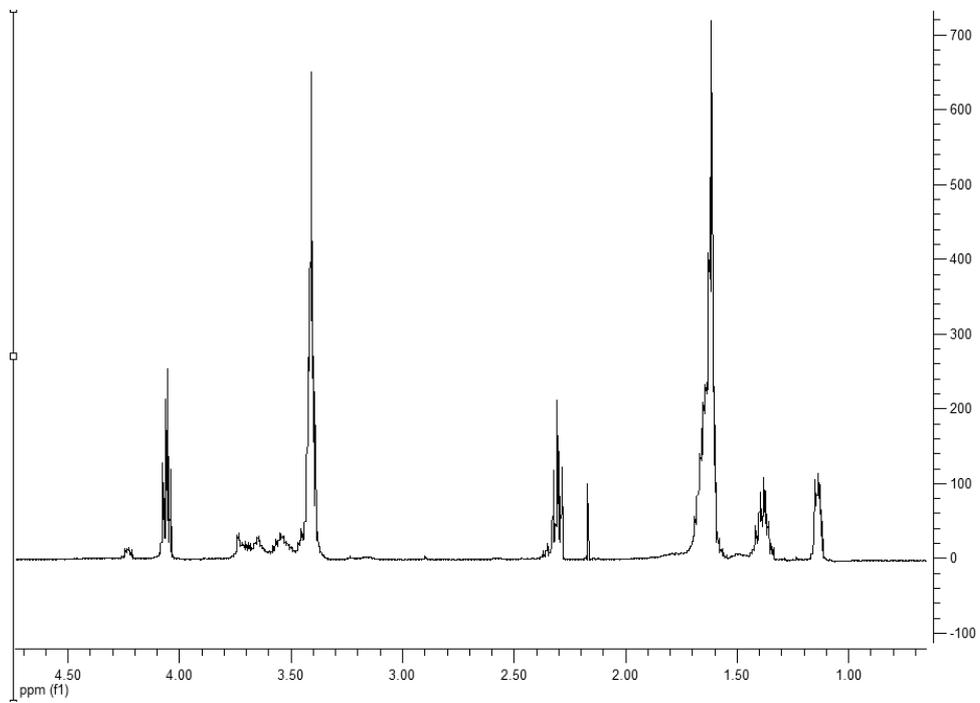


FIG. 12

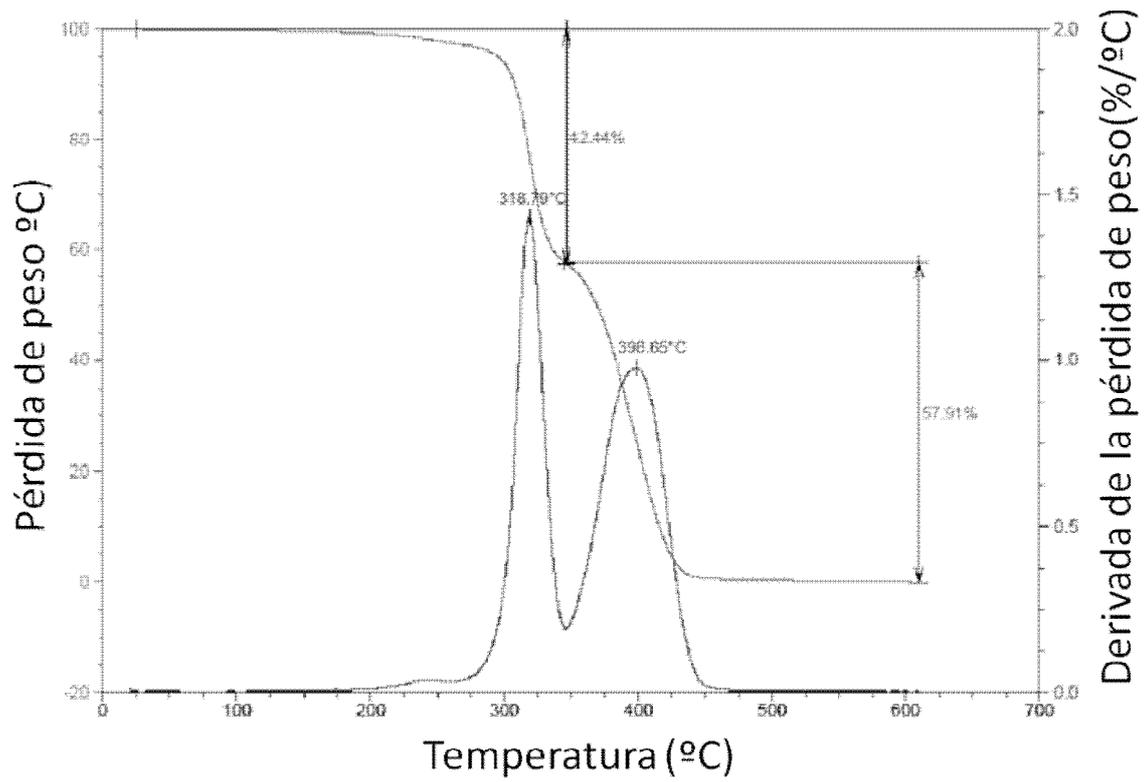


FIG. 13

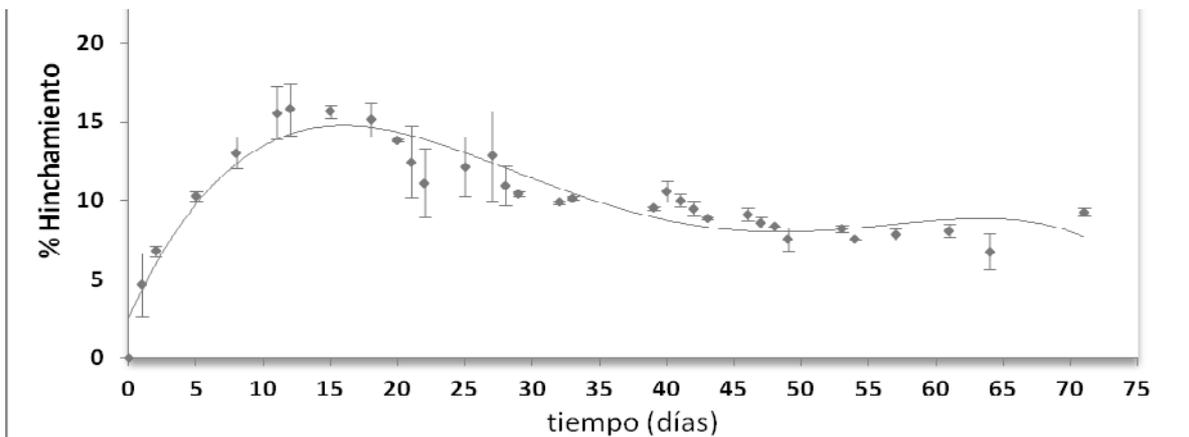


FIG. 14

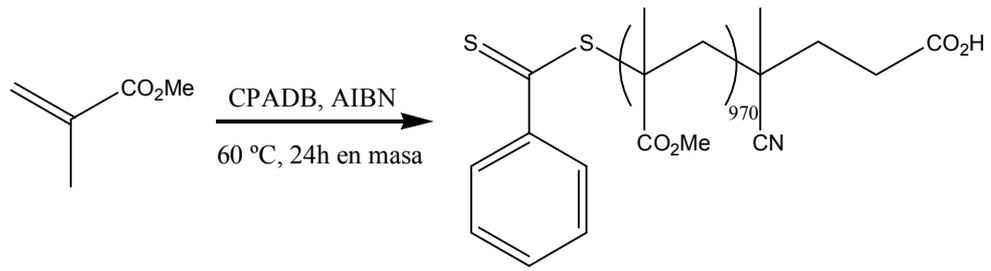


FIG. 15

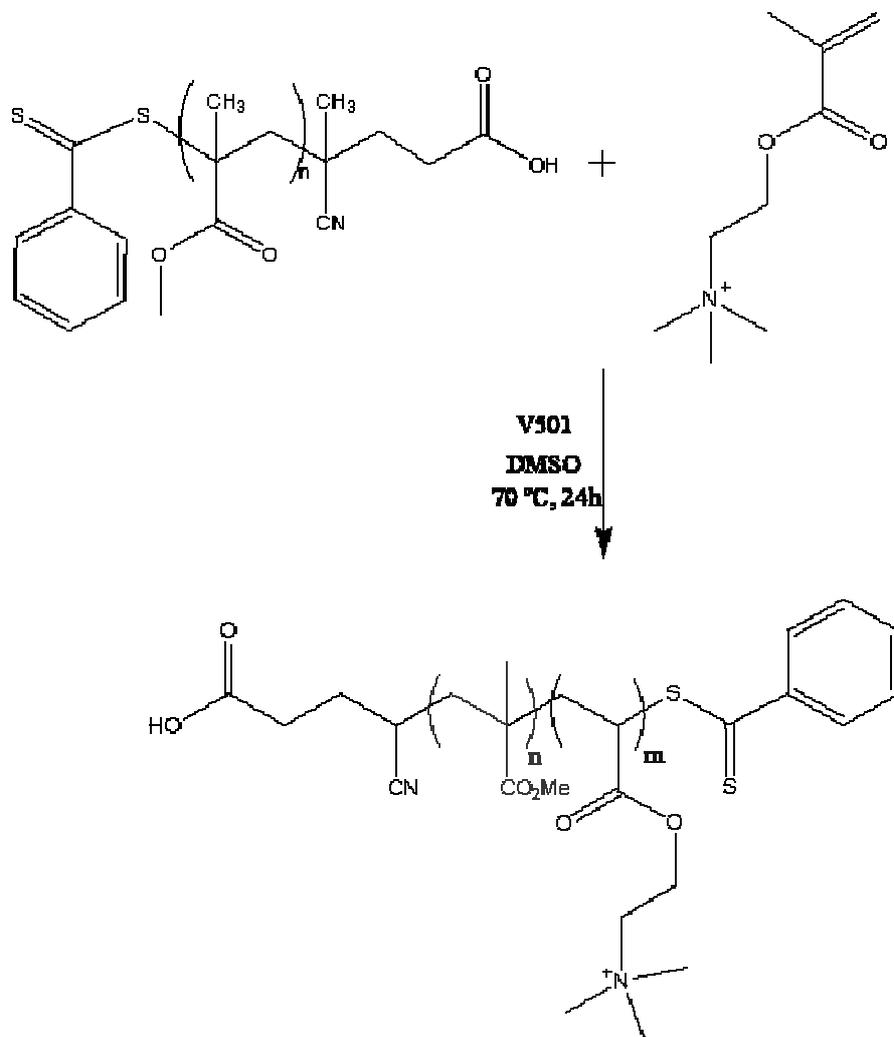


FIG. 16

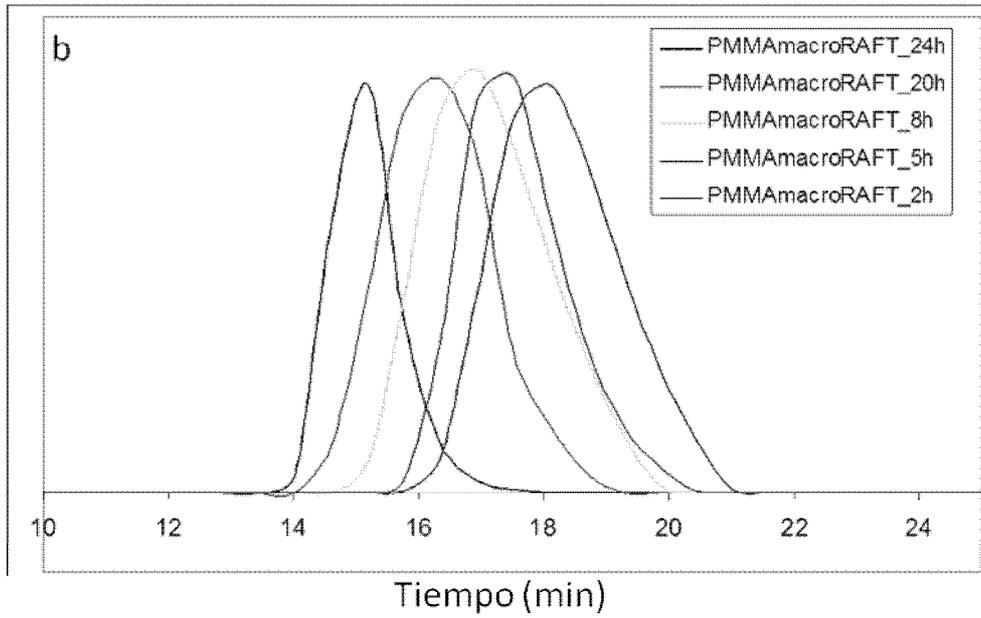
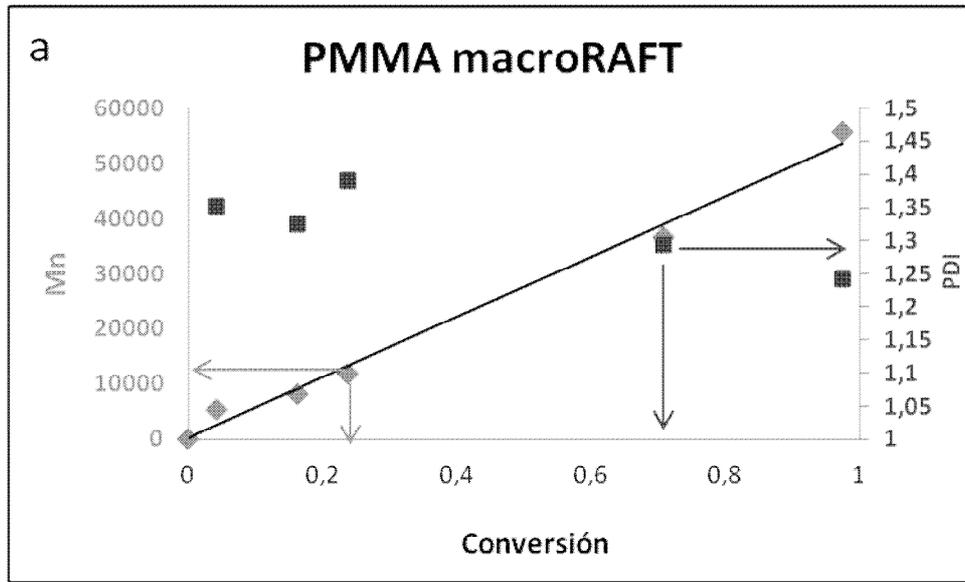


FIG. 17

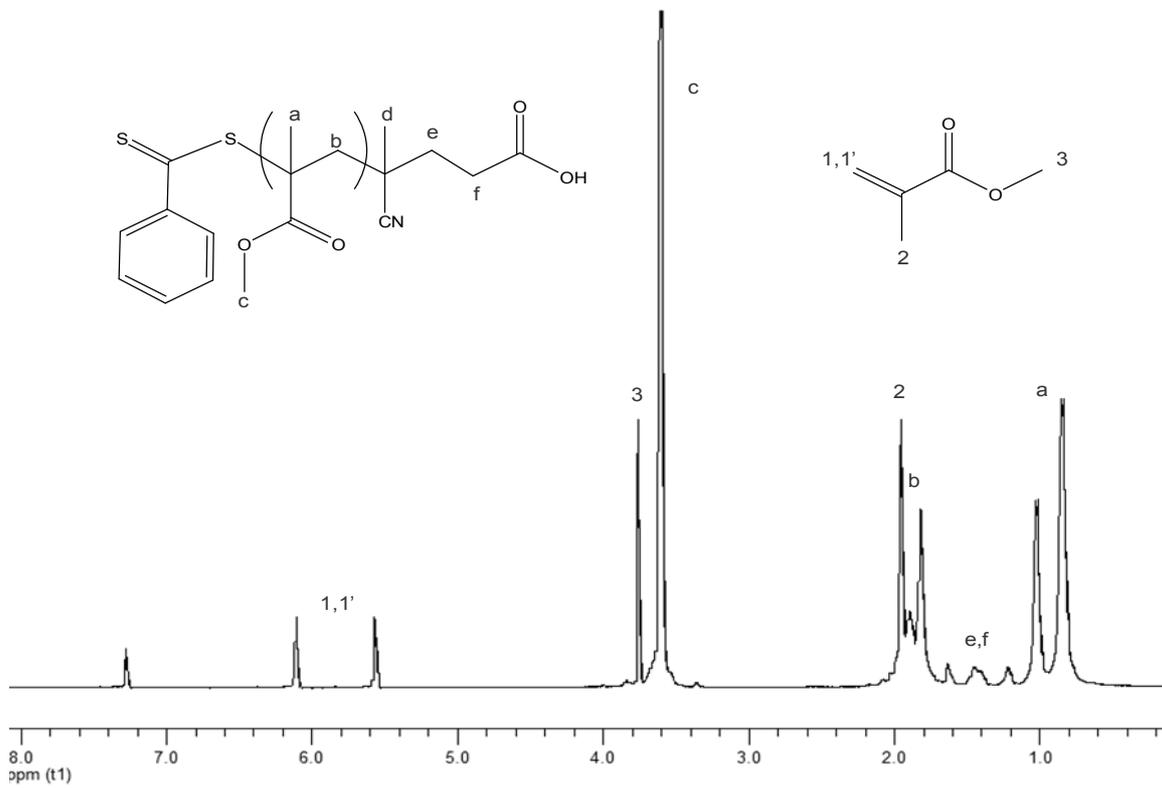


FIG. 18

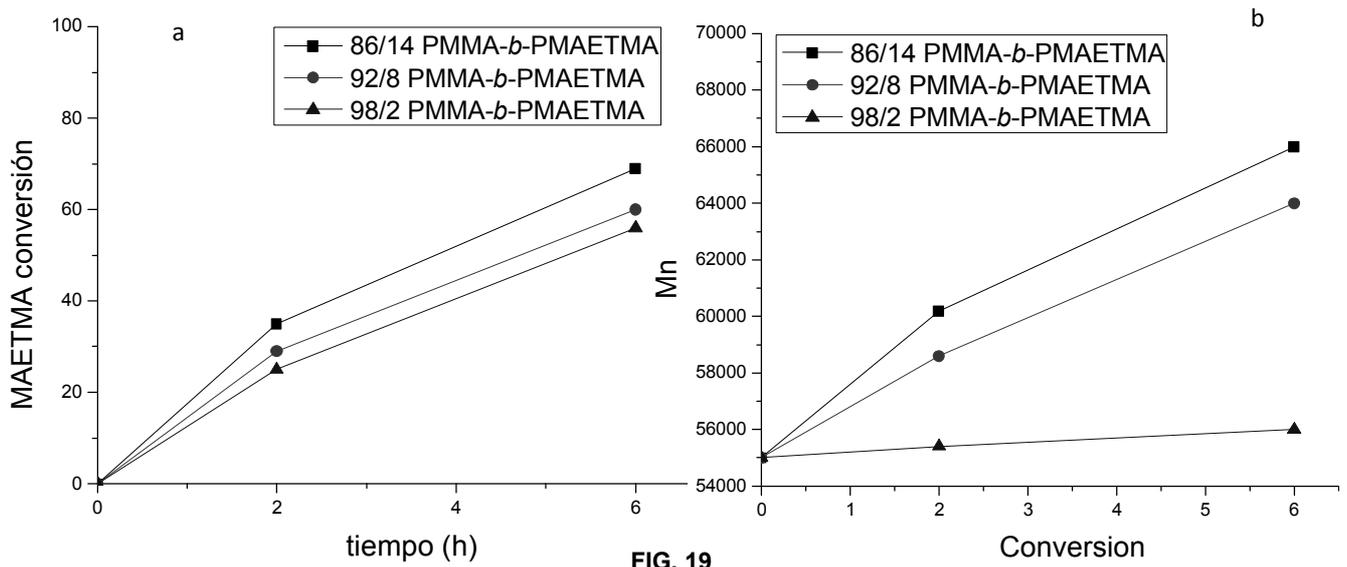


FIG. 19

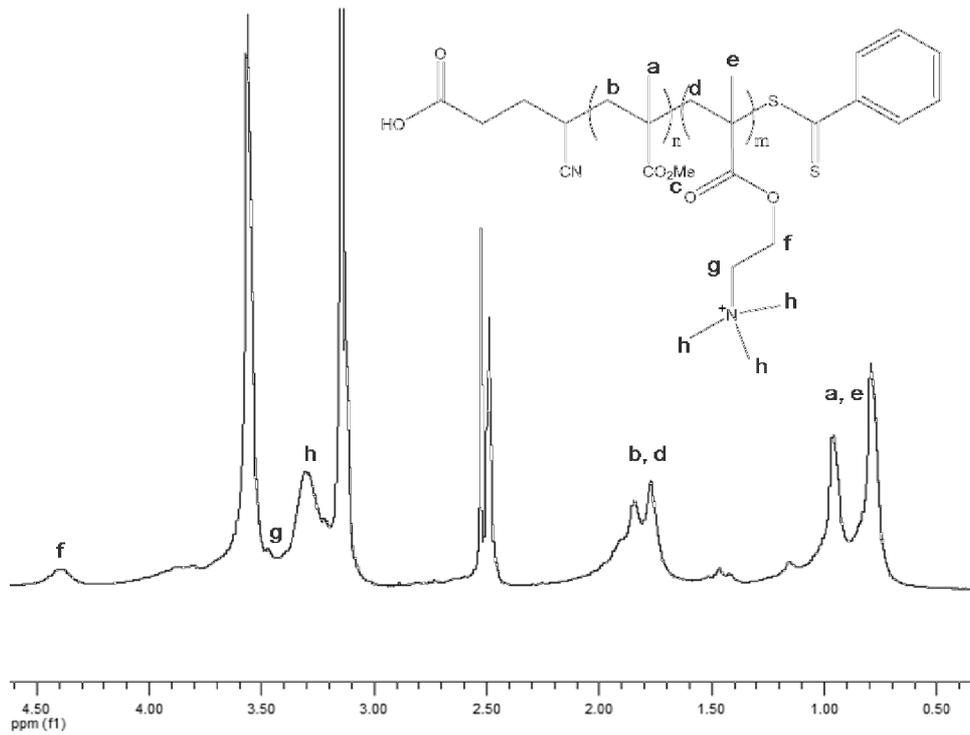


FIG. 20

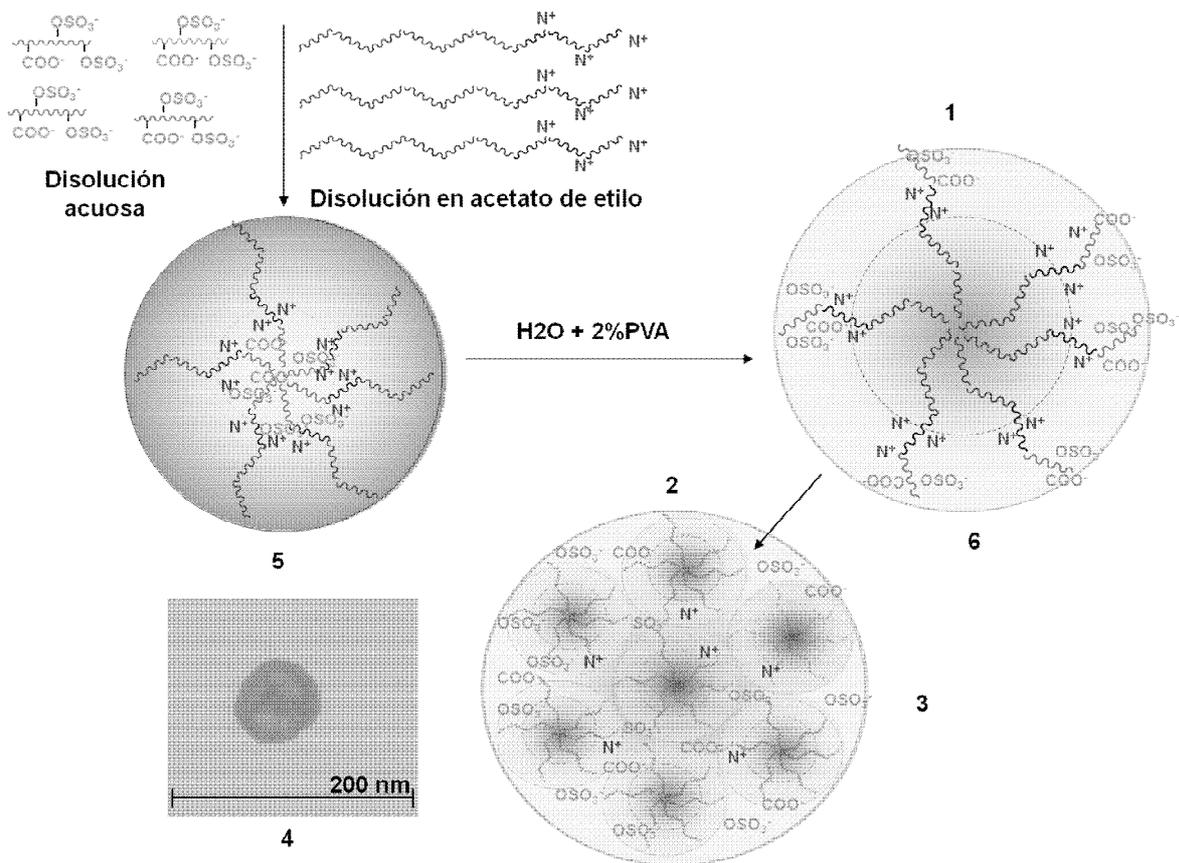


FIG. 21

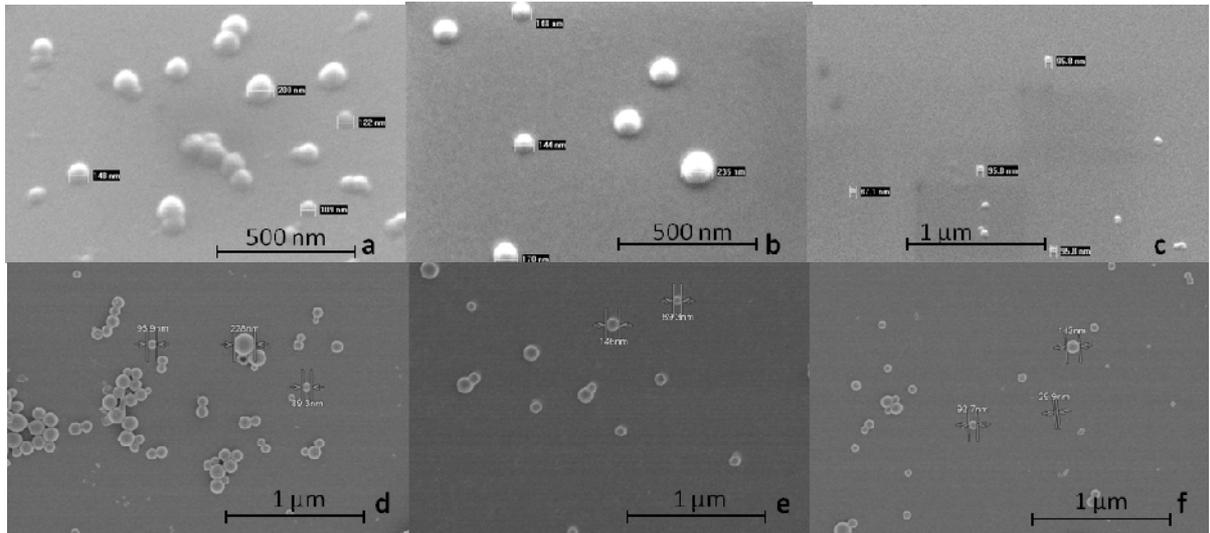


FIG. 22

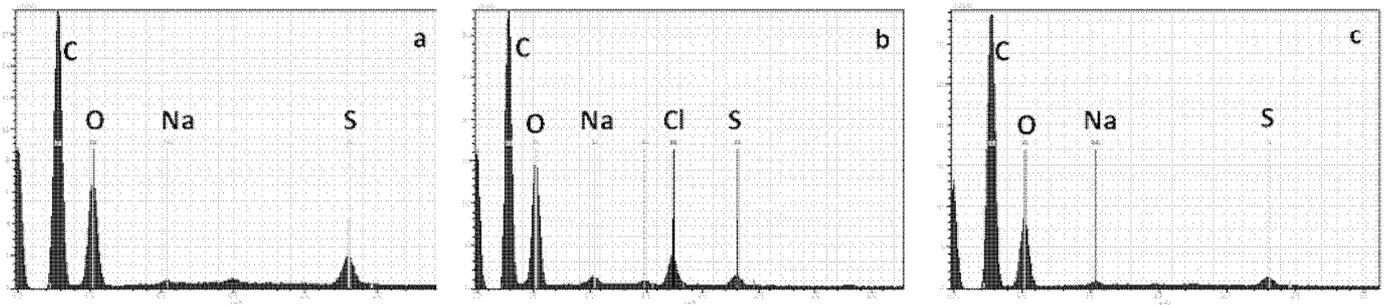


FIG. 23

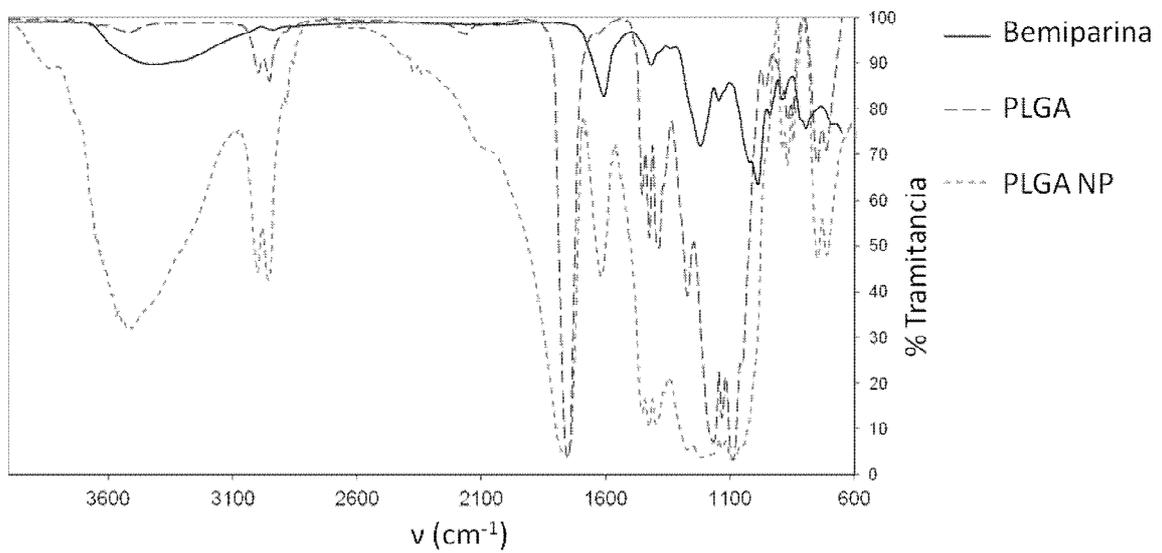


FIG. 24

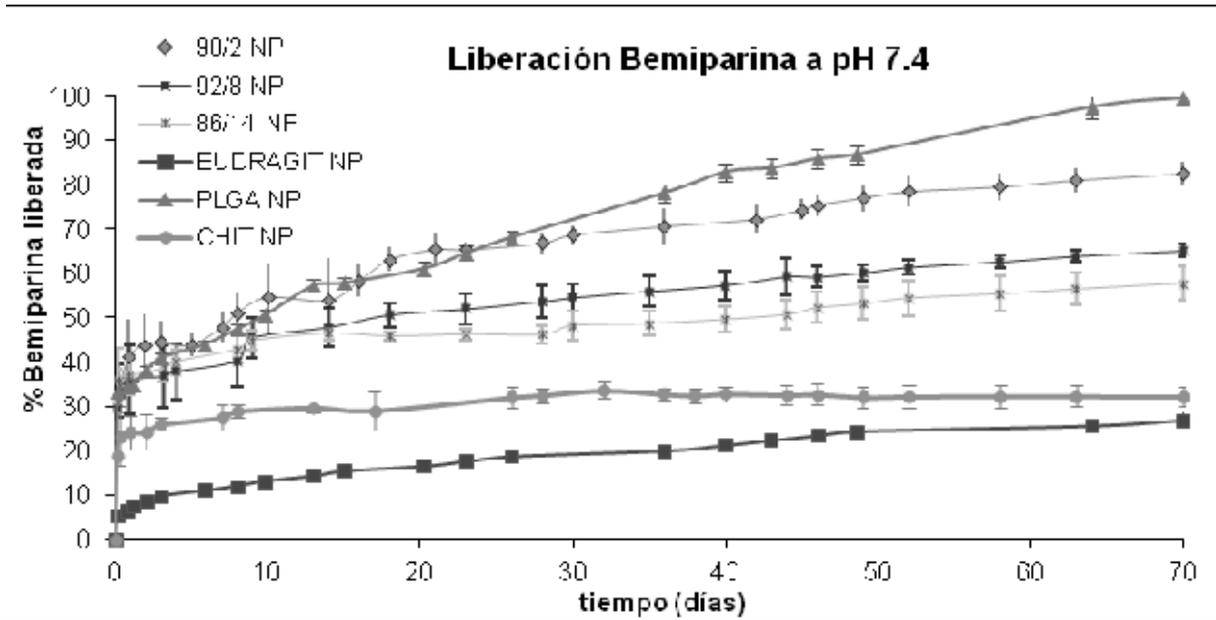


FIG. 25

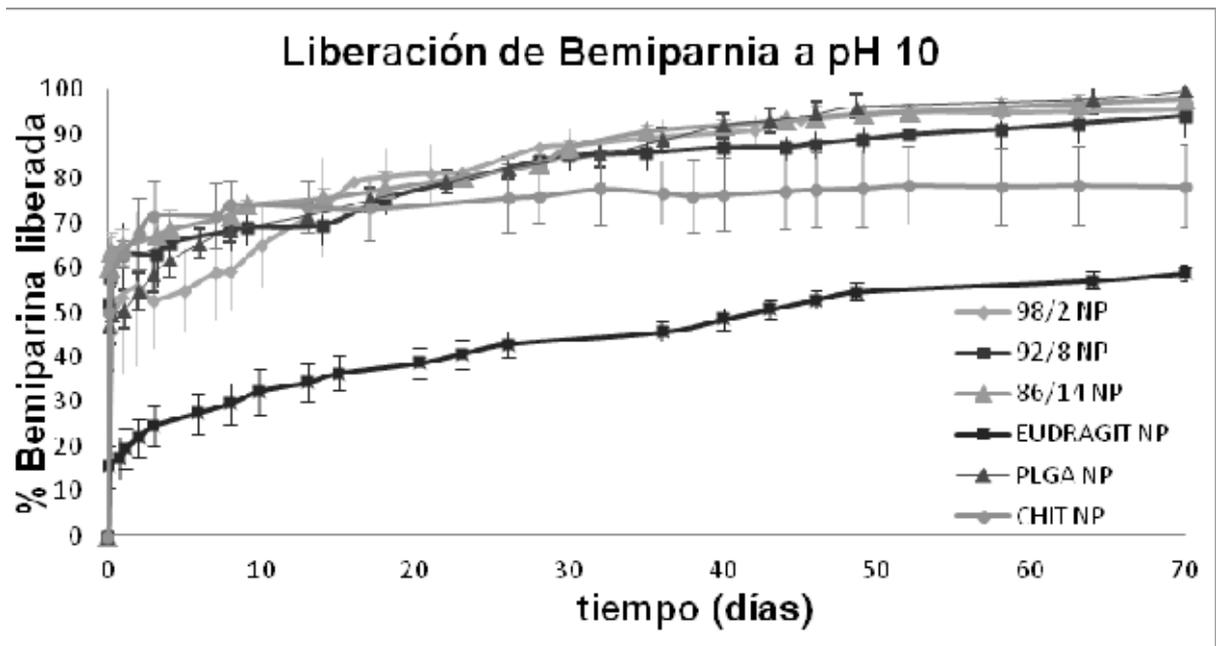


FIG. 26

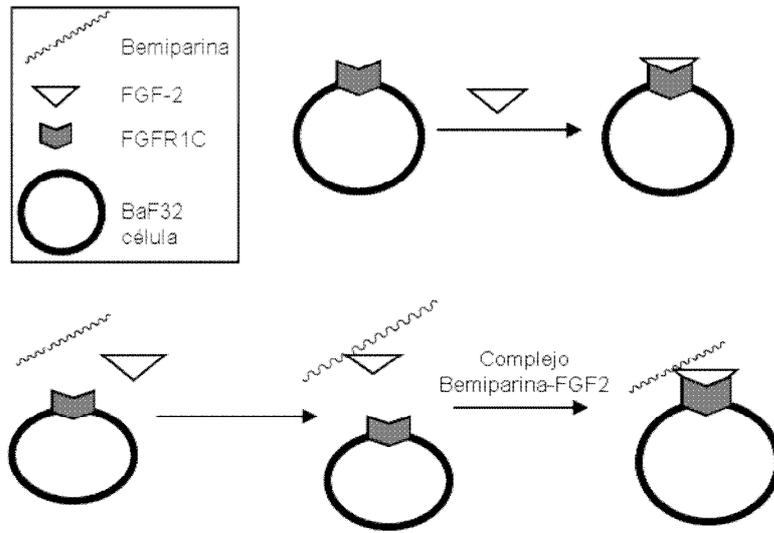


FIG. 27

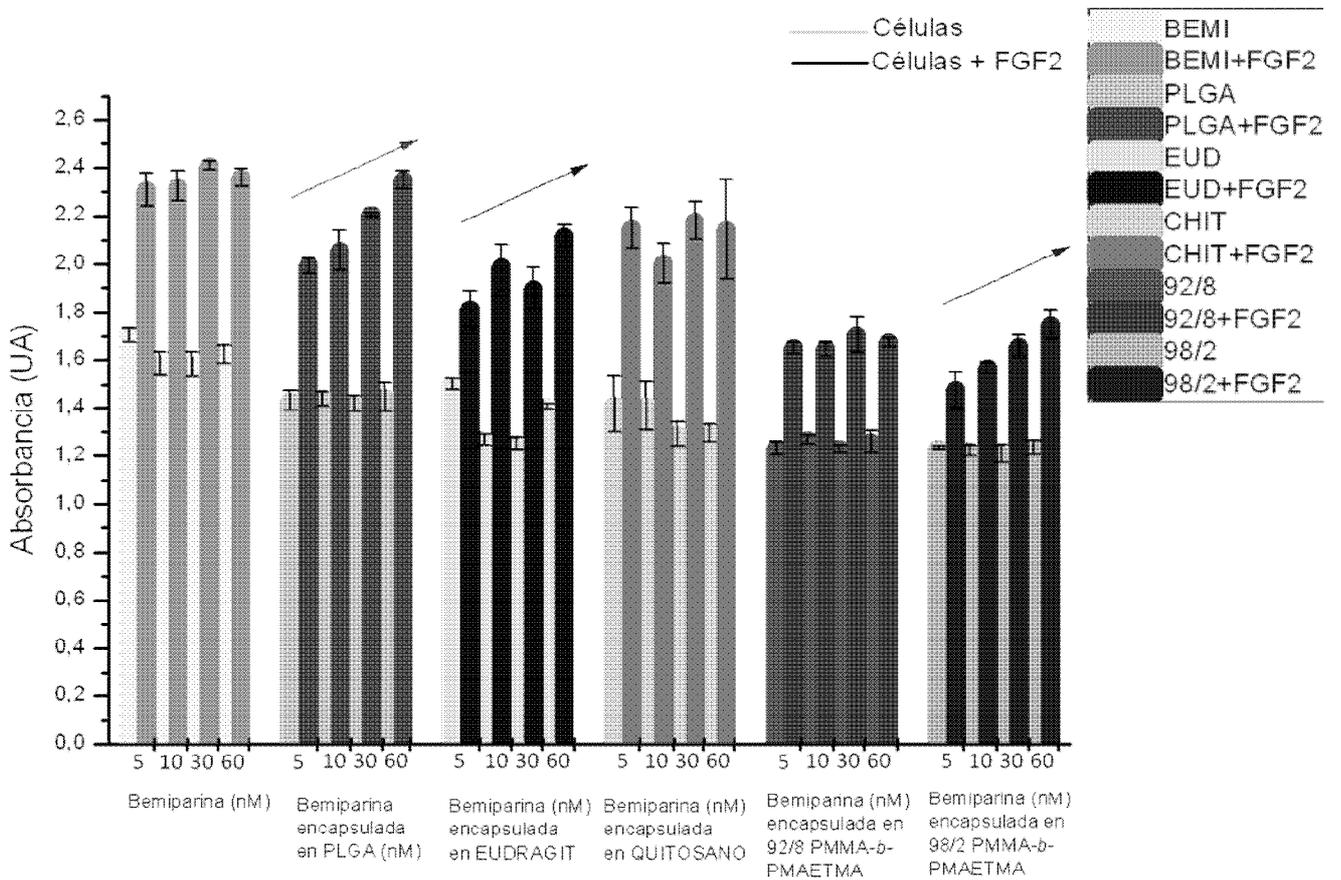


FIG. 28

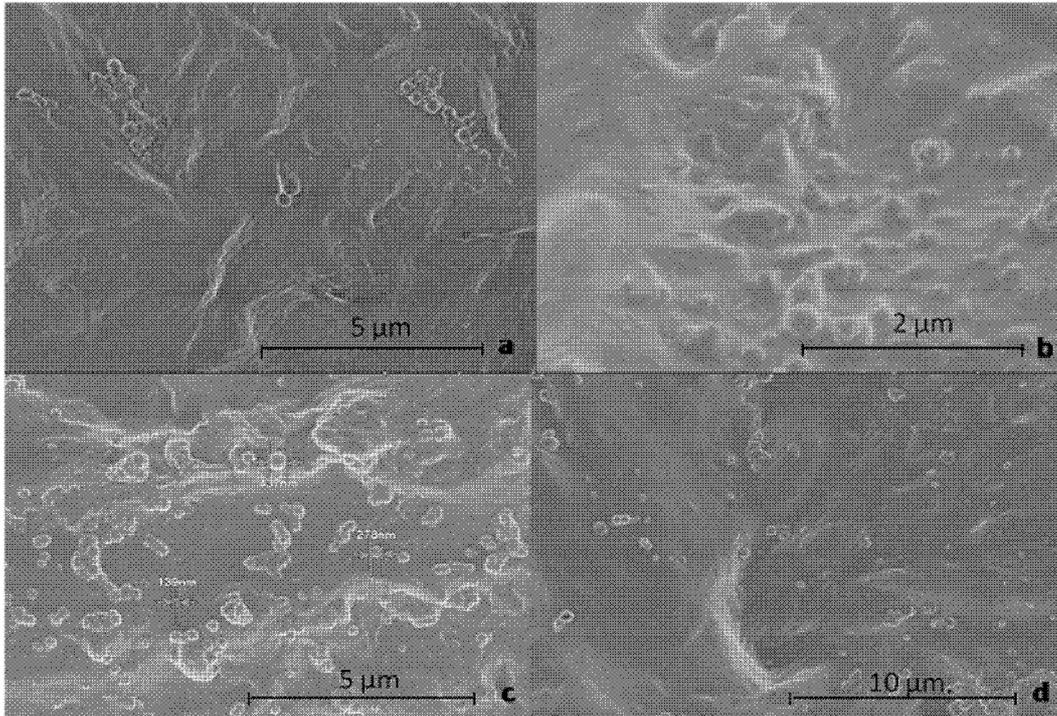


FIG. 29

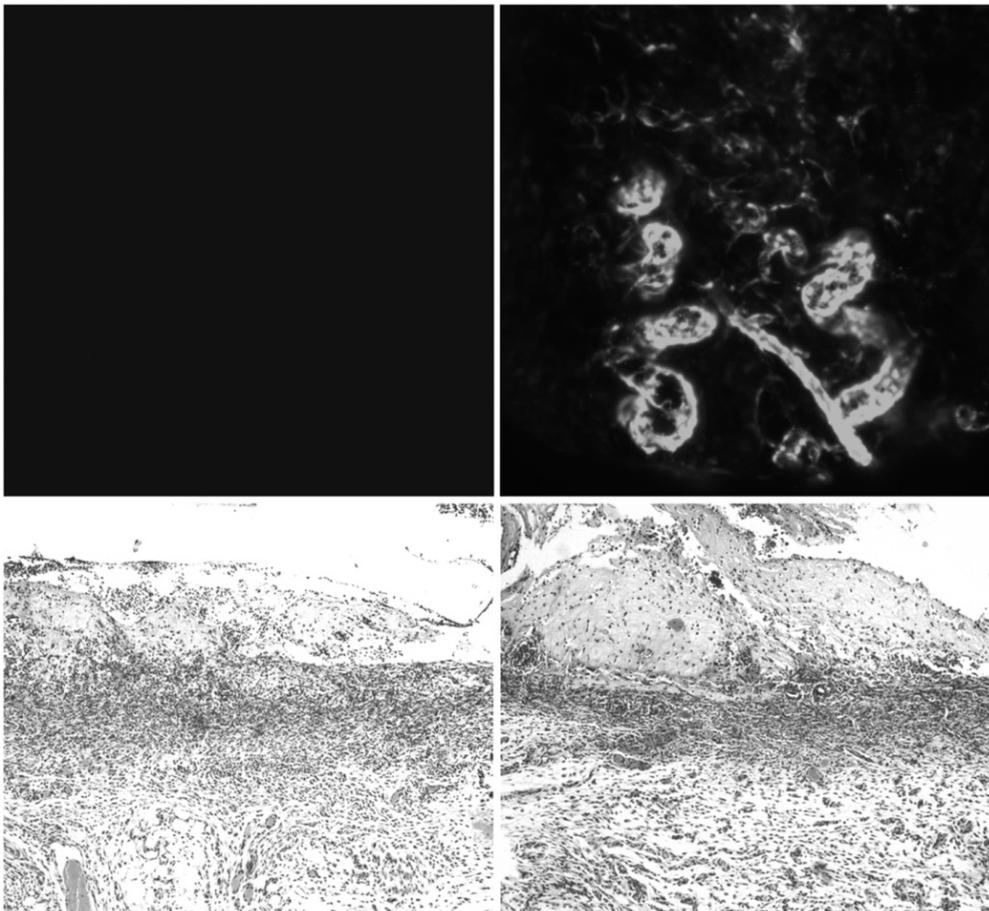
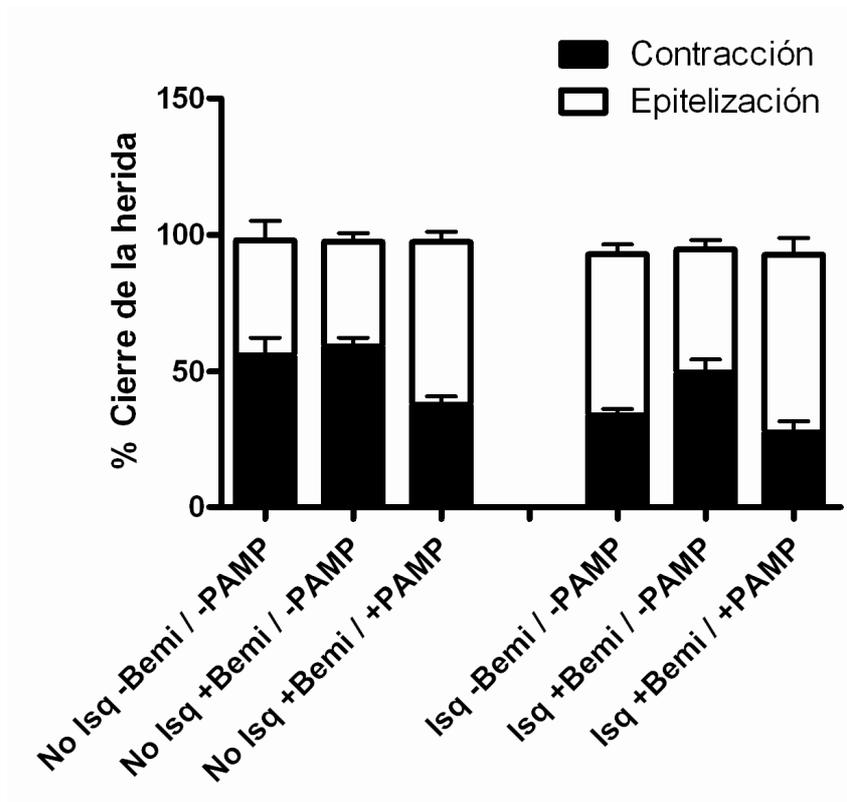
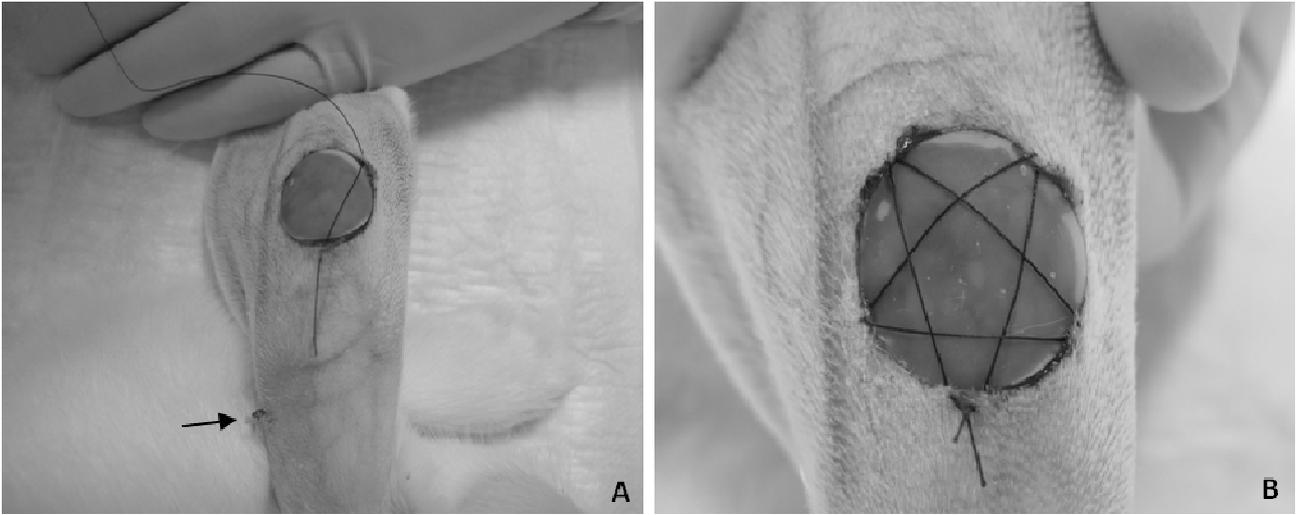


FIG. 30



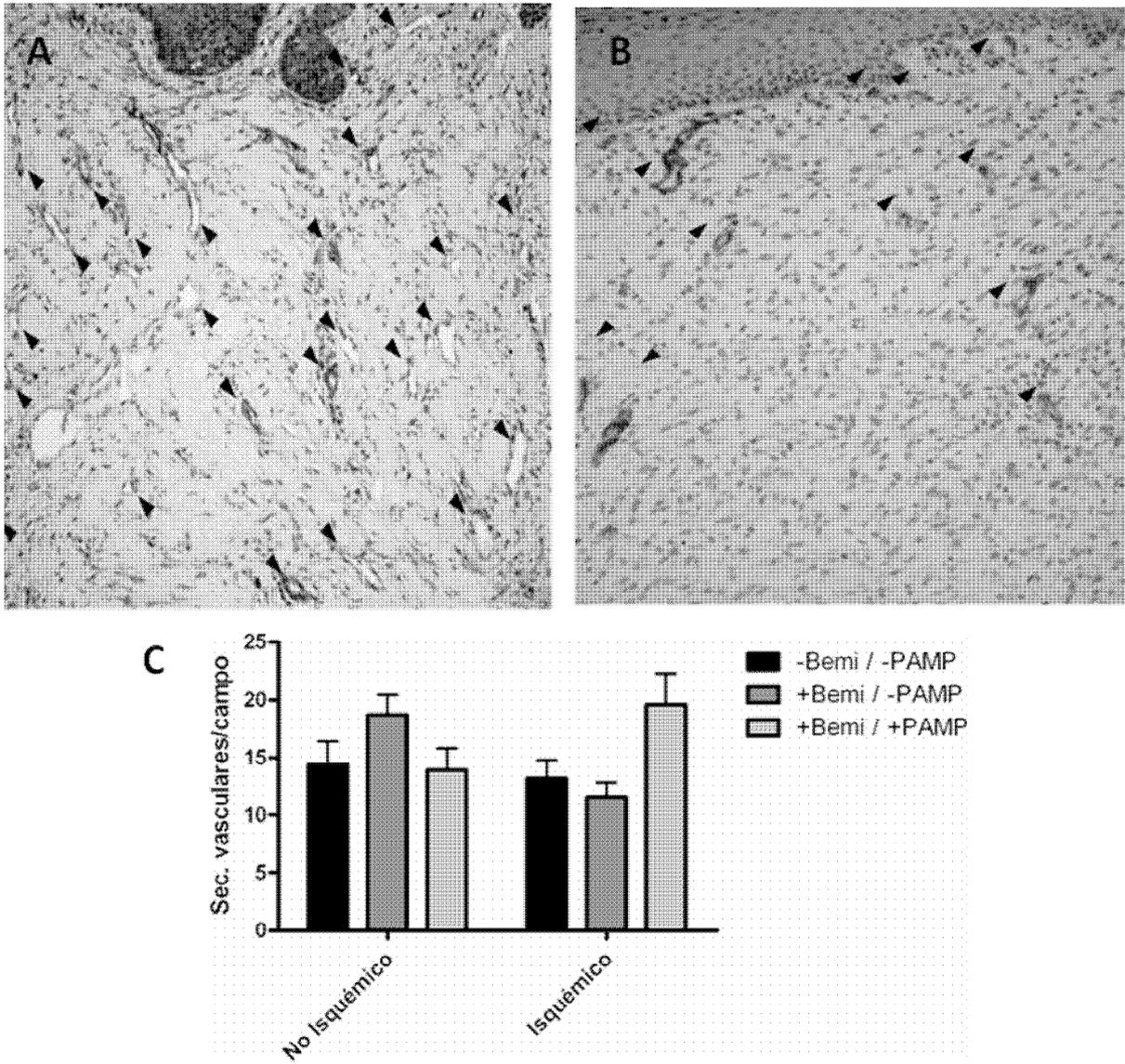


FIG. 33