



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 602**

51 Int. Cl.:

C09K 3/00 (2006.01)

B01D 71/68 (2006.01)

B01D 69/08 (2006.01)

A61M 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02772971 .4**

86 Fecha de presentación : **03.10.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1439212**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

54

Título: **Sustancia hidrofílica y procedimiento de obtención de la misma.**

30

Prioridad: **04.10.2001 JP 2001-308677**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73

Titular/es: **TORAY INDUSTRIES, Inc.**
2-1, Nihonbashi Muromachi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP

72

Inventor/es: **Sugaya, Hiroyuki;**
Eika, Yoshihiro y
Ueno, Yoshiyuki

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 299 602 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sustancia hidrofílica y procedimiento de obtención de la misma.

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a una sustancia hidrofílica y a un procedimiento de obtención de la misma, especialmente a una sustancia hidrofílica con resistencia a la adsorción de plaquetas en sangre y a un procedimiento para la obtención de la misma. La presencia de un componente polimérico catiónico la hace adecuada para usos que
10 adquieren ventajas por las buenas características de un polímero catiónico.

Estado de la técnica

Actualmente, en el campo de la medicina se están utilizando una gran variedad de materiales poliméricos. Cuando se utilizan para recipientes de sangre artificial, catéteres, riñones artificiales, u otros productos que directamente contactan con la sangre, pueden ocurrir serios problemas con la adhesión de los componentes de la sangre, como la proteína en sangre y las plaquetas en sangre y dar lugar a la formación de coágulos de sangre. Por ejemplo, una membrana de separación utilizada para la purificación de la sangre puede tener problemas en la membrana con los residuos en sangre que resultan de la activación de las plaquetas en sangre. Para evitar dichos residuos en sangre se han buscado
20 intensamente sustancias hidrofílicas que no adsorban significativamente plaquetas en sangre.

Los materiales convencionales para la purificación de la sangre incluyen distintos tipos de polímeros tales como la celulosa, acetato de celulosa, triacetato de celulosa, poliolefina, poliimida, policarbonato, polialilato, poliéster, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato, poliamida y polisulfona. En particular, se han utilizado las polisulfonas con elevada resistencia térmica como materiales para membranas de diálisis y otros productos diferentes que incluyen películas o
25 filmes y membranas de separación.

Cuando se utiliza como material para la purificación de la sangre, se mezclan con un polímero hidrofílico, tal como la polivinilpirrolidona, para mejorar su compatibilidad con la sangre.

30 La solicitud de patente europea EP-A-1121972 describe membranas modificadas cargadas catiónicamente en las cuales una membrana se vuelve hidrofílica por contacto con un agente tensioactivo polimérico y, a continuación, tiene lugar la reticulación de un agente modificador de la carga catiónica en la membrana.

35 Los inventores han encontrado que la mezcla con sólo un polímero hidrofílico, tal como la polivinilpirrolidona, no es significativamente eficaz para el control de la activación de las plaquetas en sangre. La presente invención pretende eliminar el defecto de los materiales convencionales para proporcionar un procedimiento de obtención de una sustancia hidrofílica que evite la elevada adhesión de las plaquetas en sangre.

40 En respuesta al anterior problema, la presente invención tiene las siguientes características. Especialmente, la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una sustancia hidrofílica caracterizado por la irradiación de un material que contiene la polivinilpirrolidona mojada con una solución acuosa de un polímero catiónico de polietilenimina de manera que tanto el material que contiene la polivinilpirrolidona como la polietilenimina estén en un estado insoluble en agua. En un segundo aspecto, la invención también se refiere a una sustancia hidrofílica que consiste en un material que contiene la polivinilpirrolidona y un polímero catiónico de polietilenimina, donde tanto el material que contiene la polivinilpirrolidona como el de polietilenimina están en un estado insoluble en agua.

Realización preferida de la invención

50 El peso molecular medio en peso del material de polivinilpirrolidona a utilizar en la invención no está limitado a un intervalo particular, pero está preferiblemente comprendido entre 2.000 y 2.000.000, más preferiblemente entre 1.000 y 1.500.000. Por su elevada disponibilidad, preferiblemente se utilizan productos comerciales con un peso molecular medio en peso de 1.100.000, 45.000, 29.000, 9.000, ó 29.000. Un producto de polivinilpirrolidona debe tener dicho peso molecular medio en peso citado más arriba en el momento de su alimentación al procedimiento de fabricación. Si se lleva a cabo dicho procedimiento de reticulación inducida por radiación, el componente de polivinilpirrolidona resultante de la sustancia hidrofílica puede tener un peso molecular mayor al del momento de su alimentación.

60 Los productos de polivinilpirrolidona comerciales incluyen Kollidon 12 PF, 17 PF, 25, 30 y 90 (suministrados por BASF), Luviskol K17, K30, K80 y K90 (suministrados por BASF), y Plasdone K-29/32, K-25, K-90, K-90D y K-90M (suministrados por ISP).

65 El producto de polivinilpirrolidona utilizado para la invención debe ser preferiblemente un homopolímero, pero puede ser un copolímero obtenido por combinación de éste con otros monómeros a menos que disminuyan las buenas características de la presente invención. El contenido de dichos otros monómeros en el copolímero no está limitado a un intervalo particular, pero preferiblemente deberá ser del 80% en peso o inferior.

ES 2 299 602 T3

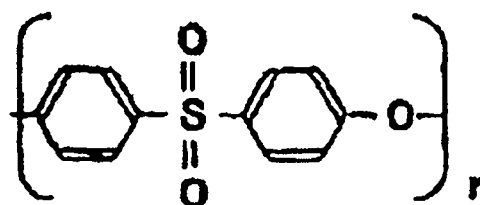
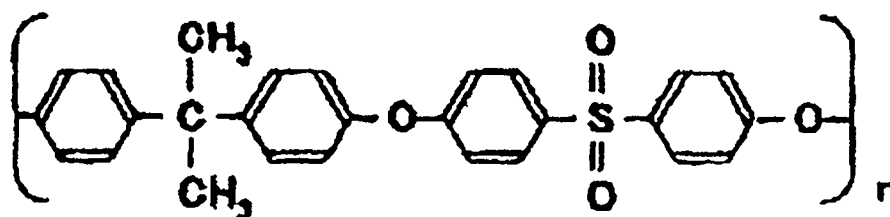
Los productos copoliméricos de polivinilpirrolidona comerciales incluyen Kallidon VA64 (suministrado por BASF), Luviskol VA 64 (suministrado por BASF), Luvitek VPI55 K18P, VPI55, K72W, Quat 73W, VPMA 91W, VPC 55 K65 (suministrado por BASF), y Plasdone S-630 (suministrado por ISP).

La sustancia hidrofílica de la presente invención contiene un componente de polivinilpirrolidona, pero es preferible utilizar un material base en combinación con la polivinilpirrolidona con el fin de mantener la polivinilpirrolidona en una forma estable y evitar que sea fácilmente eluida, deformada o degradada. La estructura y el proceso de combinación utilizado para la polivinilpirrolidona y dicho material base no se limitan a un tipo particular. El material base y la polivinilpirrolidona pueden estar laminados, pero es preferible que estén en forma mezclada o compatible.

El material base no se limita a sustancias concretas, pero es preferible que sea un polímero orgánico. Los polímeros orgánicos preferibles incluyen polisulfonas.

El contenido del componente de polivinilpirrolidona en la sustancia hidrofílica de la presente invención no se limita a un intervalo concreto, pero es preferible que esté en el intervalo comprendido entre 1% y 50% en peso, más preferiblemente entre 1% y 10%, considerando que el material base debe tener un cierto grado de resistencia en la mayoría de casos. El contenido apropiado puede determinarse por RMN y otros procedimientos utilizados individualmente o en combinación.

Las polisulfonas preferibles para utilizar como material para la sustancia hidrofílica de la presente invención incluyen, pero no son limitativas, aquéllas que tienen un anillo aromático, un grupo sulfonilo o un grupo éter en su esqueleto, tales como las polisulfonas representadas por la Fórmula Química 1 ó 2, donde n significa un número entero que muestra el grado de polimerización y que debe estar preferiblemente en el intervalo comprendido entre 50 y 80.



Los productos de polisulfona comerciales incluyen Udel P-1700 y P-3500 (suministrado por Teijin Amoco Engineering Plastic Limited), Ultrason 53010 y S6010 (suministrado por BASF), Victrex (suministrado por Sumitomo Chemical Co., Ltd.), Radel A-200A, A-300, R-5000 y R-5800 (suministrado por Teijin Amoco Engineering Plastic Limited), ultrason E (suministrado por BASF), y Sumikaexcel (suministrado por Sumitomo Chemical Co., Ltd.).

Preferiblemente, la polisulfona utilizada en la invención debe ser un polímero que comprende sólo aquellos monómeros que están representados por la fórmula química 1 ó 2 mencionada más arriba, pero puede ser un copolímero obtenido por combinación con otros monómeros a menos que éstos disminuyan las buenas características de la presente invención. El contenido de dichos otros monómeros utilizado para obtener un copolímero no está limitado a un intervalo concreto, pero debe preferiblemente ser del 10% en peso o inferior.

Además de dicha polivinilpirrolidona y material base (tal como la polisulfona), la sustancia hidrofílica de la invención puede contener otros polímeros y aditivos a menos que éstos disminuyan las buenas características de la presente invención. El contenido de dichos polímeros y aditivos distinto del de dicha polivinilpirrolidona y material base no se limita a un intervalo concreto, pero debe preferiblemente ser del 10% en peso o inferior.

La sustancia hidrofílica de la invención no se limita a formas concretas y puede utilizarse en forma de tubo, perlas, tejido, género no tejido, tejido cortado, membrana plana o membrana de fibra hueca. Dicha sustancia hidrofílica puede también estar moldeada en una forma específica después de disolverse en un disolvente o puede utilizarse como

ES 2 299 602 T3

recubrimiento. Sin embargo, es preferible la membrana de fibra hueca teniendo en cuenta que dicha sustancia puede utilizarse para realizar la función de un riñón artificial y debe tener una gran área de superficie para tener contacto con la sangre para conseguir una elevada eficacia en el proceso.

5 Si la sustancia hidrofílica de la presente invención se utiliza como membrana de separación, su espesor debe estar preferiblemente en el intervalo de 10 μm a 80 μm , más preferiblemente de 20 μm a 50 μm . El tamaño de poro de dicha membrana debe preferiblemente ser de 0,5% o superior, más preferiblemente de 1% o superior, en términos de 1% de permeabilidad a la albúmina. Si se utiliza en forma de membrana de fibra hueca, su diámetro interior debe estar preferiblemente en el intervalo de 100 μm a 300 μm , más preferiblemente de 150 μm a 200 μm .

10 Si se utiliza como membrana de fibra hueca, puede obtenerse mediante un procedimiento convencional. Los procedimientos preferidos incluyen un proceso de fabricación de membrana de separación en el cual una solución preparada mediante el mezclado y disolución de la polivinilpirrolidona en un polímero basado en polisulfona utilizando un disolvente se alimenta como materia prima para la obtención de la membrana.

15 La relación en peso de dicha polisulfona y la polivinilpirrolidona debe estar, preferiblemente, en el intervalo de 20:1 a 1:5, más preferiblemente de 5:1 a 1:1.

20 Los disolventes preferidos para utilizar en el mezclado y disolución de la polivinilpirrolidona en la polisulfona incluyen N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona y dioxano. El contenido de dicho polímero basado en polisulfona debe estar, preferiblemente, en el intervalo de 10% en peso a 30% en peso, más preferiblemente de 15% en peso a 25% en peso.

25 La obtención de dicha membrana a partir de dicha materia prima no se limita a procedimientos concretos y, por lo tanto, puede utilizarse cualquier procedimiento conocido. Un procedimiento adecuado es descargar dicha materia prima desde una boquilla doble anular con un líquido que se haya inyectado en su interior, para permitir que el producto realice una etapa de secado y, a continuación, se conduzca a una cuba de solidificación. Haciendo esto, puesto que la humedad en la etapa de secado puede tener influencia significativa, la densificación excesiva que podría provocar el secado en las proximidades de la superficie exterior puede evitarse suministrando agua a través de la superficie exterior de la membrana mientras se está realizando la etapa de secado con el fin de proporcionar un producto que presente baja permeabilidad y resistencia a la difusión cuando se utilice para diálisis. Para evitar esto, la humedad relativa en la etapa de secado debe estar preferiblemente en el intervalo de 60% a 90%. Para proseguir con el procedimiento, el líquido a inyectar debe, preferiblemente, consistir principalmente en el disolvente que se utiliza para preparar la materia prima. Cuando se utiliza dimetilacetamida, por ejemplo, el líquido a inyectar debe ser preferiblemente una solución acuosa del 45% en peso a 80% en peso, más preferiblemente del 60% en peso al 75% en peso.

35 Dicho polímero catiónico puede ser lineal, ramificado o cíclico. Su peso molecular debe estar preferiblemente en el intervalo de 600 a 10.000.000.

40 Los polímeros típicos incluyen polialquilenimina y polímeros obtenidos mediante la introducción de un sustituyente, y copolímeros que consisten en unidades monoméricas del mismo.

Son preferibles polietileniminas lineales o ramificadas con un peso molecular de 600 a 10.000.000.

45 Los derivados de polietilenimina adecuados pueden obtenerse por alquilación, arboxilación, fenilación, fosforilación o sulfonación de una polietilenimina hasta el grado deseado.

Dichos polímeros catiónicos tales como las polietileniminas ramificadas son preferibles debido a su baja toxicidad, elevada disponibilidad y fácil manejo.

50 Un material que contiene polivinilpirrolidona y un polímero catiónico son partes integrantes de la invención, y es necesario para las mismas no estar en forma significativamente soluble en agua. Dicho estado en forma no significativamente soluble en agua o un estado insoluble en agua, se define como un estado donde la solubilidad de estas sustancias hidrofílicas en agua es del 1% o inferior. El material sólido se obtendrá si la sustancia hidrofílica se sumerge en un peso de nueve veces de agua a 37°C durante una hora y, a continuación, se retira con pinzas u otra herramienta seguido de un secado al vacío por debajo de 50°C. Dicha solubilidad representa la relación del peso de este material sólido con respecto al peso de la sustancia hidrofílica original antes de la inmersión. Si la solubilidad no es suficientemente baja, el producto final sufriría una elusión significativa durante su uso práctico, posiblemente representando un riesgo en la seguridad. Para hacer ambos insolubles, estos pueden estar amasados con un material base insoluble en agua a nivel molecular o pueden tratarse con calor o energía de radiación después de moldearse en una determinada forma. En particular, el tratamiento con radiación es preferible porque la polivinilpirrolidona es fácilmente reticulable.

65 En dicha solución que contiene el polímero catiónico para humedecer el material que contiene la polivinilpirrolidona, dicho polímero debe tener preferiblemente un contenido de 0,01% en peso o superior, más preferiblemente de 0,05% en peso o superior, todavía más preferiblemente de 0,1% en peso o superior con el fin de proporcionar un producto que no adsorba significativamente las plaquetas en sangre.

ES 2 299 602 T3

Dicho tratamiento de radiación puede funcionar para reticular el componente de polivinilpirrolidona en el material aunque el mecanismo no sea claramente conocido. Dicho tratamiento de radiación no se limita a métodos concretos, sino que puede llevarse a cabo mediante irradiación del componente de polivinilpirrolidona mezclado en el material o mediante el revestimiento de completamente o parcialmente la superficie de la polisulfona moldeada con el monómero de polivinilpirrolidona o vinilpirrolidona, seguido de la irradiación de dicha polivinilpirrolidona para combinarse con la base de polisulfona. El tratamiento de radiación puede llevarse a cabo mediante la aplicación de rayos gamma o electrones para mojar el material que contiene la polivinilpirrolidona con una solución de un polímero catiónico.

Así, la irradiación del material que contiene la polivinilpirrolidona mojada con una solución de un polímero catiónico se cree que actúa introduciendo dicho polímero catiónico dentro de dicho material que contiene la polivinilpirrolidona. Previniendo la reticulación excesiva que tiene lugar en dicha polivinilpirrolidona, manteniendo al mismo tiempo las propiedades hidrofílicas de dicha polivinilpirrolidona se llega a una baja adherencia de las plaquetas en sangre.

Dicho estado mojado a que se refiere la invención se entiende como la condición donde dicho material que contiene la polivinilpirrolidona se sumerge en dicha solución o en un estado no seco después de retirar la solución en la cual dicho material que contiene la polivinilpirrolidona ha sido sumergido. Por lo tanto, en tal estado dicho material que contiene la polivinilpirrolidona contiene agua. El grado de dicho mojado no se limita a un intervalo concreto pero en la mayoría de los casos dicho material que contiene polivinilpirrolidona debe preferiblemente contener el 1% en peso o superior de agua relativo al peso de dicho material. O dicho material que contiene la polivinilpirrolidona puede sumergirse en dicha solución acuosa. La dosis de radiación absorbida en dicho estado mojado debe estar preferiblemente en aproximadamente 10-50 kGy, y la esterilización puede realizarse simultáneamente si el material se irradia hasta una dosis superior a 20 kGy. En este caso, la dosis absorbida puede determinarse utilizando una marca dosimétrica pegada a la superficie del módulo.

Si la dosis de esterilización es insuficiente puede llevarse a cabo una esterilización por vapor u otro tipo de tratamiento después del tratamiento de radiación de la polivinilpirrolidona.

El tratamiento de la polivinilpirrolidona será insuficiente si la dosis es inferior a 10 kGy. Por otro lado, la base de polisulfona, soporte, y otras partes pueden sufrir una degradación significativa si la dosis supera 50 kGy.

El material hidrofílico obtenido por el procedimiento de obtención según la presente invención puede servir de forma eficaz para la purificación de la sangre.

A continuación, se describirá el método de ensayo utilizado para determinar la adsorción de las plaquetas en sangre mediante el material hidrofílico de la invención en forma de membranas de fibra hueca.

Primero, se combinan 30 membranas de fibra hueca y todos los extremos del haz de fibras se fijan en un soporte módulo de tubo de vidrio con un agente de encapsulación de base epoxi en una forma que no bloquee la parte hueca de las membranas de fibra hueca para producir un mini-molde. Dicho mini-molde es de aproximadamente 7 mm de diámetro y aproximadamente 10 cm de longitud. La entrada de sangre del mini-molde y la salida de diálisis se conectan a un tubo de silicona y se alimentan 100 ml de agua destilada a la salida de la sangre a un caudal de 10 ml/min para lavar las paredes interiores de las membranas de fibra hueca y del módulo, seguido de su llenado con suero salino fisiológico y el cierre de la entrada y salida de diálisis con un tapón. A continuación, las membranas de fibra hueca se lavan con suero salino fisiológico durante dos horas a un caudal de 0,59 ml/min, seguido de perfusión con 7 ml de una muestra de sangre preparada mezclando 3,2% de citrato dihidrato trisódico y sangre de conejo fresca a un caudal volumétrico de 1:9 durante una hora a un caudal de 0,59 ml/min. A continuación, se lleva a cabo un lavado con suero salino fisiológico utilizando una jeringa y se llenan la parte del lado de las membranas de fibra hueca y la parte del lado de diálisis con una solución al 3% de glutaraldehído, que se dejan durante toda la noche o más para asegurar la fijación con el glutaraldehído. Después de esto, el glutaraldehído se retira lavando con agua destilada y las membranas de fibra hueca se cortan del mini-módulo, seguido de un secado al vacío durante cinco horas. Parte de las membranas de fibra hueca se fijan con una cinta adhesiva de doble cara sobre la muestra de ensayo de un microscopio electrónico de barrido y se cortan en la dirección longitudinal para exponer la superficie interior. A continuación, se lleva a cabo el bombardeo para formar una capa delgada de Pt-Pd sobre la muestra. La superficie interior de la muestra de las membranas de fibra hueca se observa con un microscopio electrónico de barrido (S800 suministrado por Hitachi, Ltd.) a un factor de aumento de 3.000 y el número de plaquetas en sangre encontradas en un área de $1,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ se cuenta. La mejor membrana de separación tiene un menor número de plaquetas en sangre adsorbidas.

A continuación se describirá el método de ensayo utilizado para determinar la adsorción de las plaquetas en sangre a partir del material hidrofílico según la invención en forma de film o película.

El film o película moldeada en forma de una hoja se sitúa sobre la parte inferior de un tubo cilíndrico de poliestireno con un diámetro de 18 mm y el tubo se llena con suero salino fisiológico. Una muestra de sangre preparada mezclando 3,2% de citrato dihidrato trisódico con sangre de conejo fresca a un caudal volumétrico de 1:9 se somete a separación por centrifuga durante 10 min. a 1.000 rpm y el sobrenadante se extrae (referido como plasma 1). A continuación, la sangre restante después de extraer el sobrenadante se somete de nuevo a una separación por centrifuga durante otros 10 min. a 3.000 rpm y el sobrenadante se retira (referido como plasma 2). El plasma 1 se diluye mediante la adición del plasma 2 (el plasma 2 es inferior en contenido de plaquetas en sangre al plasma 1) para proporcionar plasma rico en

ES 2 299 602 T3

plaquetas (PRP) con un contenido de plaquetas en sangre de 20×10^6 ml/. Después de retirar el suero salino fisiológico del tubo preparado más arriba, se añade en el tubo 1,0 ml de dicho PRP y, a continuación, se agita a 37°C durante una hora. Después de esto, la muestra se lava tres veces con suero salino fisiológico y el contenido en sangre se fija con una solución de glutaraldehído al 3%, seguido del lavado con agua destilada y secado al vacío durante cinco horas. El film o película se fija con una cinta adhesiva de doble cara sobre la muestra de ensayo de un microscópico electrónico de barrido y se lleva a cabo el bombardeo para formar una capa delgada de Pt-Pd sobre la muestra. La superficie de la muestra se observa con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S800 (principalmente la parte central de la película se observa a una relación de 3.000 aumentos porque la sangre tiende a juntarse en las partes de la película en contacto con el tubo). El número de plaquetas en sangre encontradas en un área de $1,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ se cuenta.

La sustancia hidrofílica obtenida según la presente invención es altamente compatible con la sangre. Además, la existencia de un polímero catiónico puede impartir en la sustancia hidrofílica adsorptividad a endotoxina o peróxido lipídico. La adsorptividad al peróxido lipídico (LDL oxidado) se evalúa como sigue.

15 (1) Preparación de anticuerpo de LDL antioxidado

Se utilizaron las muestras de anticuerpos de LDL antioxidado preparados por Itabe *et al.* (H. Itabe *et al.*, J. Biol. Chem. 269; 15274, 1994). De forma específica, un homogeneizado con lesión aterosclerótica humana se inyectó en ratones para inmunizarlos y se prepararon hibridomas a partir del bazo del ratón, seguido de la selección de aquellos que reaccionan con LDL que se han tratado con sulfato de cobre. Sus anticuerpos se clasificaron como ratón IgM y no reaccionaron con LDL no tratado, LDL acetilo o LDL malondialdehído. Reaccionaron con peróxidos de algunas fosfatidilcolinas, incluyendo aldehídos e hidroperóxidos de fosfatidilcolinas. En este punto, se prepararon muestras disolviéndolas en una solución tampón de ácido bórico 10 mM (pH 8,5) que contenía NaCl 150 mM (contenido proteico 0,60 mg/ml).

25 (2) Preparación de LDL oxidado

Se desmineralizó un producto LDL comercial (suministrado por Funakoshi Co., Ltd.), se diluyó con una solución tampón de fosfato (a partir de ahora referida como PBS) hasta una concentración de 0,2 mg/ml y después de la adición de una solución de sulfato de cobre 0,5 mM hasta el 1% en peso se dejó reaccionar a 37°C durante 16 horas. Las muestras de LDL oxidados se prepararon mediante la adición de ácido etilendiamintetraacético 25 mM (a partir de ahora referido como EDTA) hasta el 1% en peso y azida sódica al 10% en peso hasta 0,02% en peso.

35 (3) Procedimiento para la adsorción

Se añadió una muestra de LDL oxidado tal y como se ha preparado más arriba al plasma en sangre de un humano de salud normal (Japonés de 30 años).

A partir de las membranas de fibra hueca con un diámetro interior de 200 μm y un espesor de 40 μm , se obtuvo un mini-módulo de 12 cm de longitud conteniendo 70 membranas (área de superficie interior 53 cm^2) y se conectó a un tubo de silicona de 2 cm de longitud con un diámetro interior de 7 mm (diámetro exterior 10 mm, nombre del producto ARAM) y un tubo de silicona con un diámetro interior de 0,8 mm (diámetro exterior 1 mm, nombre del producto ARAM, un tubo de 37 cm de longitud en ambos extremos) por medio de un conector asimétrico, seguido de perfusión con 1,5 ml de dicho plasma en sangre a 25°C que se hizo pasar a través de las membranas de fibra hueca durante cuatro horas a un caudal de 0,5 ml/min (el caudal de suministro de plasma fue de 8×10^2 ml por m^2 de superficie interior de las membranas de fibra hueca).

Se llevó a cabo el mismo proceso de perfusión para los tubos de silicona solos sin utilizar el mini-módulo.

Se determinaron los contenidos de LDL oxidado, LDL y HDL en el plasma en sangre antes y después del proceso de perfusión, y el caudal de extracción adsorptiva se calculó mediante la siguiente ecuación. Caudal de extracción adsorptiva (%) = caudal de extracción adsorptiva en mini-módulo (%) - caudal de extracción adsorptiva en caudal de extracción adsorptiva (%) en tubos de silicona (%) de cada porción = $100 \times (\text{contenido antes de la perfusión} - \text{contenido después de la perfusión}) / \text{contenido antes de la perfusión}$.

55 (4) Determinación de contenido LDL oxidado

Se diluyó un anticuerpo de LDL antioxidado con PBS, se repartió en una placa de 96 pocillos a una velocidad de 100 μl /pocillo y después de agitar a temperatura ambiente durante dos horas se dejó reposar a 4°C durante toda la noche o más para asegurar la adsorción en las paredes.

La solución del anticuerpo se retiró de los pocillos y se dispuso una solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0) que contenía 1% en peso de albumen de suero bovino (Fracción V de BSA suministrado por Corporación Seikagaku) a una velocidad de 200 μl /pocillo, seguido de agitación a temperatura ambiente durante dos horas para obstruir las paredes. Después de la eliminación de la solución de BSA de los pocillos, se dispuso dicho plasma que contenía LDL oxidado y un líquido estándar para el trazado de una curva de calibración (tampón PBS conteniendo 0-2 μm de LDL oxidado) a una velocidad de 100 μl /pocillo. A continuación, las muestras se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min. y se dejaron reposar durante toda la noche a 4°C.

ES 2 299 602 T3

Después de dejar que las muestras llegasen a temperatura ambiente, se retiró la solución de los pocillos y se lavaron los pocillos tres veces con una solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0) que contenía 0,05% en peso de Tween 20 (suministrado por Katayama Chemical, Inc.). A continuación, se añadió en cada pocillo lavado 100 ml de anticuerpo anti-apo B ovino (sitio de unión) diluido con un volumen de 2.000 veces de PBS y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas y después de retirar el anticuerpo anti-apoB ovino de los pocillos, éstos se lavaron tres veces con la solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0) que contenía 0,05% en peso de Tween 20. A continuación, se añadió a cada pocillo 100 ml de anticuerpo IgG anti-ovino marcado con fosfatasa alcalina (Chemicon) diluida con un volumen de 2.000 veces de una solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0) que contenía 2% en peso de Blockace (suministrado por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) y se dejó a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, después de retirar el anticuerpo marcado de los pocillos, éstos se lavaron tres veces con la solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0) que contenía 0,05% en peso de Tween 20 y dos veces con una solución tampón de ácido tris-hidroclorhídrico (pH 8,0). A continuación, se añadió a cada pocillo 100 μ l de una solución 1 mg/ml (0,0005M MgCl₂, solución tampón de dietanolamina 1M, pH 9,8) de ácido p-nitrofenilposfórico (suministrado por Boehringer Mannheim GMBH) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo apropiado, seguido de la determinación de la absorbancia a 415 nm con un lector de placas. Se dibujó una curva de calibración utilizando los resultados con la muestra estándar y se determinó el contenido de LDL oxidado utilizando la curva.

Ejemplo 1

Se añadieron dieciocho partes de polisulfona (Udel P-3500 suministrada por Teijin Amoco Engineering Plastics Limited) y 9 partes de polivinilpirrolidona (Kollidon 30 suministrada por BASF) a 73 partes de N,N-dimetilacetamida y se calentó a 90°C durante 14 horas para asegurar la disolución.

Esta materia prima para la fabricación de la membrana se descargó de la boquilla de orificio de tipo doble anular con un diámetro exterior de 0,3 mm y diámetro interior de 0,2 mm mientras se utilizaba como líquido núcleo una solución que comprendía 58 partes de dimetilacetamida y 42 partes de agua. El material resultante se hizo pasar a través de un proceso seco y se introdujo en un baño de solidificación de agua al 100% para dar la membrana de fibra hueca. A continuación, la membrana de fibra hueca obtenida se añadió a una solución de polietilenimina al 1% en peso (suministrada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., peso molecular 70.000) y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 28 kGy. La membrana de fibra hueca estaba en un estado insoluble. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1. La velocidad de eliminación del LDL oxidado para la sustancia hidrofílica utilizada en el Ejemplo 1 fue del 24%.

Ejemplo 2

En una solución de polietilenimina al 1% en peso (reactivo Aldrich, peso molecular 600) se añadió una membrana de fibra hueca obtenida con el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1.

Ejemplo comparativo 1

En una solución de dietilaminoetil-dextrano al 1% en peso (suministrado por Sigma, peso molecular 500.000) se añadió una membrana de fibra hueca obtenida con el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1.

Ejemplo Comparativo 2

En agua se añadió una membrana de fibra hueca obtenida con el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1. La velocidad de eliminación del LDL oxidado para el material utilizado en el Ejemplo Comparativo 1 fue del 10%.

Ejemplo comparativo 3

En una solución de polivinilpirrolidona al 0,2% en peso (Kollidon 90 con peso molecular 1.200.000 suministrada por BASF) se añadió una membrana de fibra hueca obtenida con el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1.

Ejemplo comparativo 4

En una solución de polietilenglicol al 0,2% en peso (suministrado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., peso molecular 70.000) se añadió una membrana de fibra hueca obtenida con el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. El número de plaquetas en sangre adsorbidas por la membrana de fibra hueca se muestra en la tabla 1.

ES 2 299 602 T3

Preparación de la película 1 de polisulfona

Se añadieron diez partes de polisulfona (Udel P-3500 suministrada por TeijinAmoco Engineering Plastics Limited) y 0,5 partes de polivinilpirrolidona (Kollidon 90 suministrada por BASF) a 89,5 partes de N,N-dimetilacetamida y se
5 disolvió a temperatura ambiente para proporcionar la materia prima para la fabricación de la membrana. Se proyectó en una placa de vidrio, se calentó en una placa térmica hasta una temperatura de superficie de 100°C, en una capa con un espesor de 203 μm . La temperatura de superficie se midió con un termómetro de tipo contacto. Después de proyectarse, el material mantenido en la placa de vidrio se dejó en la placa térmica durante cinco minutos para evaporar el solvente y se sumergió en un baño de agua para formar la película 1 de polisulfona. (La inmersión en un baño de
10 agua facilita que la película pueda despegarse fácilmente de la placa de vidrio).

Preparación de la película 2 de polisulfona

Se añadieron diez partes de polisulfona (Udel P-3500 suministrada por TeijinAmoco Engineering Plastics Limited) a 90 partes de N,N-dimetilacetamida y se disolvió a temperatura ambiente para proporcionar el material de partida para
15 la fabricación de la membrana. Se proyectó mediante el mismo método que en el caso de la película 1 de polisulfona para obtener la película 2 de polisulfona.

Ejemplo 3

La película 1 de polisulfona se añadió a una solución de polietilenimina (suministrada por Sigma, peso molecular 750.000) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 29 kGy. La
20 película estaba en un estado insoluble. A continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. para asegurar la
25 eliminación completa de la polietilenimida adsorbida. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

Ejemplo comparativo 5

La película 1 de polisulfona se añadió a una solución de polivinilpirrolidona (Kollidon K90, suministrada por BASF) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 27 kGy. La
30 película estaba en un estado insoluble. A continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. para asegurar la
35 eliminación completa de la polivinilpirrolidona adsorbida. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

Ejemplo comparativo 6

La película 1 de polisulfona se añadió a una solución de polietilenglicol (suministrado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., peso molecular 2.000.000) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma
40 absorbidos fue de 28 kGy. La película estaba en un estado insoluble. A continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante
45 otros 60 min. para asegurar la eliminación completa del polietilenglicol adsorbido. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

Ejemplo comparativo 7

La película 1 de polisulfona se añadió al agua y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 28 kGy. La película estaba en un estado insoluble. A continuación, la película se limpió con agua purificada,
50 se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.
55

Ejemplo comparativo 8

La película 2 de polisulfona se añadió a una solución de polietilenimina (suministrada por Sigma, peso molecular 750.000) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 28 kGy. A
60 continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. para asegurar la eliminación completa de la polietilenimida adsorbida. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

Ejemplo comparativo 9

La película 2 de polisulfona se añadió a una solución de polivinilpirrolidona (Kollidon K90, suministrada por BASF) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 28 kGy. A con-

ES 2 299 602 T3

tinuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. para asegurar la eliminación completa de la polivinilpirrolidona adsorbida. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

5

Ejemplo comparativo 10

La película 2 de polisulfona se añadió a una solución de polietilenglicol (suministrado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., peso molecular 2.000.000) al 0,1% en peso y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 27 kGy. A continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. para asegurar la eliminación completa del polietilenglicol adsorbido. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

15 Ejemplo comparativo 11

La película 2 de polisulfona se añadió en agua y se irradió con rayos gamma. La dosis de rayos gamma absorbidos fue de 27 kGy. A continuación, la película se limpió con agua purificada, se agitó en agua purificada a 80°C durante 60 min. y después se sustituyó el agua purificada y se agitó a 80°C durante otros 60 min. El agua purificada se sustituyó de nuevo y se llevó a cabo una agitación a 80°C durante otros 60 min. En la tabla 1 se muestra el número de plaquetas adsorbidas por la película.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Forma	COMPONENTE DE LA MEMBRANA en materia prima		Polímero en solución		Numero de plaquetas
		Tipo	p%	Tipo (peso molecular)	p%	
EJEMPLO 1	Membranta de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	Polietilenimina (70.000)	1	8.7
EJEMPLO 2	Membrana de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	Polietilenimina (600)	1	6.3
EJEMPLO 1 COMPARAT.	Membrana de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	Dietilaminoetil-dextran (500.000)	1	18.7
EJEMPLO 2 COMPARAT.	Membrana de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	Nada	-	55.7
EJEMPLO 3 COMPARAT.	Membrana de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	PVP (1 200 000)	0.2	47.5
EJEMPLO 4 COMPARAT.	Membrana de fibra hueca	PSf/PVP	18/9	Polietilenglicol (20.000)	0.2	30.4
EJEMPLO 3	Film	PSf/PVP	10/0.5	Polietilenimina (750.000)	0.1	4.3
EJEMPLO 5 COMPARAT.	Film	psf/PVP	10/0.5	Pvp (1 200 000)	0.1	18
EJEMPLO 6 COMPARAT.	Film	Psf/PVP	10/0.5	Polietilenglicol (2 000.000)	0.1	29.7
EJEMPLO 7 COMPARAT.	Film	PSf/PVP	10/0.5	Nada	-	56
EJEMPLO 8 COMPARAT.	Film	PSf	10	Polietilenimina (750.000)	0.1	64
EJEMPLO 9 COMPARAT.	Film	PSf	10	PVP (1 200 000)	0.1	54.5
EJEMPLO 10 COMPARAT.	Film	Psf	10	Polietilenglicol (2 000.000)	0.1	53
EJEMPLO 11 COMPARAT.	Film	PSf	10	Nada	-	74.7

PSf: polisulfona PVP: polivinilpirrolidona

ES 2 299 602 T3

A partir de la Tabla 1 puede observarse que el número de plaquetas en sangre adsorbidas es pequeño en los ejemplos, mientras el número es superior en el ejemplo comparativo 1 donde no se utilizaron polímeros catiónicos y en los ejemplos comparativos 2 y 3 donde se utilizó la polivinilpirrolidona y el polietilenglicol que son neutros.

5 Aplicación industrial

El procedimiento de obtención de una sustancia hidrofílica según la presente invención puede utilizarse para aplicaciones como la purificación de la sangre y puede proporcionar materiales con compatibilidad especialmente elevada con la sangre, lo que indica que es extremadamente útil.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la fabricación de una sustancia hidrofílica, comprendiendo el procedimiento el tratamiento de un material que contiene polivinilpirrolidona mojada con una solución acuosa de un polímero catiónico de polietilenimida con radiación de manera que el material que contiene la polivinilpirrolidona y el polímero catiónico de polietilenimida se encuentran en un estado insoluble en agua.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el contenido de polietilenimina en la solución es del 0,1% en peso o superior.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho material que contiene polivinilpirrolidona contiene tanto polivinilpirrolidona como un polímero a base de polisulfona.

15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el producto está en forma de membrana de fibra hueca.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el producto es una membrana de separación para riñones artificiales.

20 6. Sustancia hidrofílica obtenible por un procedimiento tal y como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo la sustancia un material que contiene polivinilpirrolidona y un polímero catiónico de polietilenimida, donde tanto el material que contiene polivinilpirrolidona como el polímero catiónico de polietilenimida se encuentran en un estado insoluble en agua.

25 7. Sustancia hidrofílica según la reivindicación 6, que es una membrana de separación para riñones artificiales.

8. Riñón artificial que contiene una sustancia hidrofílica tal y como se ha reivindicado en la reivindicación 6.

30

35

40

45

50

55

60

65