

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
24 de marzo de 2022 (24.03.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/058809 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

B32B 9/02 (2006.01) C08L 1/00 (2006.01)
B32B 9/04 (2006.01) C08L 5/04 (2006.01)
B32B 23/14 (2006.01) C08L 5/08 (2006.01)
C08B 37/04 (2006.01) C12N 1/22 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/IB2021/057367

(22) Fecha de presentación internacional:

10 de agosto de 2021 (10.08.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

NC2020/0011554

21 de septiembre de 2020 (21.09.2020) CO

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** [CO/CO];
Carrera 1 No. 18A – 12, Bogotá (CO).

(72) Inventores: **AYALA, Juana María Alejandra**; Calle 146 No. 19-11 Apto 302, Bogotá (CO). **CRUZ JIMENEZ, Juan Carlos**; Carrera 1E No. 19A-40 Universidad de los Andes, Bogotá (CO). **MUÑOZ CAMARGO, Carolina**; Av. Carrera 1 No. 84A-71 Apto 202, Bogotá (CO). **ORTIZ TINOCO, Juan Sebastián**; Calle 6C No. 72B-46 Apto 304, Bogotá (CO). **RUBIO OLAYA, Daniela**; Calle 22a No. 50-55, Bogotá (CO).

(74) Mandatario: **OLARTE, Carlos R.**; Carrera 5 No. 34-03, La Merced, Bogotá, 110311 (CO).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(54) Title: MULTILAYER POLYMERIC MATRIX

(54) Título: MATRIZ POLIMÉRICA MULTICAPA

(57) Abstract: The present invention relates to a porous, adherent and biocompatible multilayer polymer matrix which enables the growth of adherent and suspended cells and an active control of mobilisation and fixation of active compounds. The polymer matrix of the invention can be used in various applications, such as detection systems, cell growth systems and experimental organ models, inter alia. Additionally, the invention relates to the method of processing the polymer matrix by layer-by-layer deposition.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una matriz polimérica multicapa porosa, adherente y biocompatible que permite el crecimiento de células adherentes y en suspensión y un control activo de movilización y fijación de compuestos activos. La matriz polimérica de la invención se puede emplear en aplicaciones diversas, tales como sistemas de detección, sistemas para crecimiento celular y modelos de órganos experimentales, entre otras. Adicionalmente, la invención se refiere al método de elaboración de la matriz polimérica mediante deposición capa a capa.



WO 2022/058809 A1

MATRIZ POLIMÉRICA MULTICAPA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo general de los biomateriales, particularmente a una matriz polimérica multicapa porosa, adherente y biocompatible que permite el crecimiento de células adherentes y en suspensión y el control de la movilización y fijación de compuestos activos. La matriz polimérica de la invención se puede emplear en aplicaciones diversas, tales como sistemas de detección, sistemas para crecimiento celular y modelos de órganos experimentales, entre otras. Adicionalmente, la invención se refiere al método de elaboración de la matriz polimérica mediante deposición capa a capa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

De acuerdo con la definición dada por la Sociedad Europea de Biomateriales (European Society for Biomaterials – ESB) en 1991, los biomateriales corresponden a aquellos utilizados para evaluar, curar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano. Este campo ha tenido un avance vertiginoso en los últimos tiempos, debido a los grandes avances científicos de materiales para aplicación médica, en particular por el desarrollo de nuevos biomateriales cuya estructura y morfología tratan de imitar a los tejidos biológicos y que se aproximan cada vez más a tener las propiedades características tanto mecánicas como biológicas requeridas para una lograr la acción biológica deseada. Este es el caso de los biopolímeros, que son materiales versátiles, con múltiples configuraciones químicas y que permiten generar materiales compuestos con propiedades sinérgicas. Los biopolímeros además de tener características biocompatibles y alta afinidad por ambientes que simulan condiciones *in vivo*, pueden ser modificados para mejorar características deseadas como la resistencia, la capacidad de hinchamiento, adherencia a superficies, entre otras. Las modificaciones de los biopolímeros pueden estar asociadas a la formación de polímeros compuestos como combinaciones de dos de ellos o el entrecruzamiento de los mismos. Los biopolímeros entrecruzados cuentan con nuevas propiedades atribuidas a diferentes interacciones intercadena. Esto está

directamente relacionado con una de las propiedades más buscada para aplicaciones en encapsulación y biomateriales, la cual es la capacidad de hinchamiento, pues permite la absorción grandes cantidades de solvente que facilitan la migración de moléculas hacia el interior de los materiales y por lo tanto, posibilitan la encapsulación de compuestos. Por otra parte, características asociadas a la resistencia y la adherencia a superficie están principalmente asociadas a composición y conformación molecular de los biopolímeros. Una de las familias de polímeros más versátiles por su composición son los polielectrolitos, los cuales son de gran interés por su biocompatibilidad y amplia variedad de aplicaciones pues la diferencia entre cargas iónicas mejora las capacidades adherentes sobre otros materiales e incluso células. Estos biomateriales poliméricos son un área de máximo interés, como se refleja en el número de artículos científicos y de patentes relacionados.

Por ejemplo, la patente US2009/0047517 describe un ensamblaje polimérico multicapa que comprende capas poliméricas unidas covalentemente mediante entrecruzamiento. El proceso de elaboración del material polimérico multicapas se realiza mediante ensamblaje capa por capa (LbL – del inglés layer by layer), que permite obtener una amplia variedad de ensamblajes multicapa con diferentes composiciones y propiedades físicas controladas. El proceso también comprende modificar el ensamblaje polimérico multicapas, haciendo reaccionar al menos un grupo funcional de una de las capas con un compuesto seleccionado entre agentes anti-incrustantes, antimicrobianos, compuestos quelantes, compuestos fluorescentes, anticuerpos, sustancias de barrido y compuestos fisiológicamente activos. El uso de diferentes materiales poliméricos en las diferentes capas del ensamblaje permite ajustar las propiedades del mismo para aplicaciones específicas, como por ejemplo para aplicaciones de liberación controlada o sostenida de fármacos.

Por otra parte, la patente US2005/0287111 se refiere a dispositivos comprendidos en una película LbL que recubre una superficie de un sustrato, en donde dicha película comprende agentes de unión que interactúan con células. Una de las posibles aplicaciones de dichos dispositivos es el aislamiento y liberación de células en condiciones suaves. Las películas LbL se ensamblan mediante la aplicación en serie de capas individuales,

que se asocian entre sí mediante uniones no covalentes. Esta tecnología es aplicable a una variedad de posibles polímeros, en particular polielectrolitos. Las películas se presentan con diversas arquitecturas (número de capas, espesor de las capas individuales, posibilidad de que las capas se fundan, espesor total de la película, etc.). Hay una diversidad de agentes que pueden ser incorporados en la superficie o el interior de dichas películas y la estructura molecular de las mismas permite visualizar, medir o monitorear un agente *in vivo* o *in vitro* mediante técnicas de detección como espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, eléctricas, ópticas, químicas y otras.

Adicionalmente, la patente GB2553074 describe un dispositivo para cultivo celular que comprende un andamio tridimensional, el cual puede estar compuesto de polímeros naturales o sintéticos o híbridos. El andamio tiene porosidad modificada y puede permitir la difusión controlada de agentes desde el andamio hacia la población celular que crece en la superficie externa del mismo. Tales dispositivos pueden ser empleados en aplicaciones que involucren el aislamiento de células. Entre algunas de sus ventajas, estos permiten el aislamiento y la liberación de las células (mediante la degradación de las capas), en condiciones suaves.

Si bien en el estado de la técnica se enseñan alternativas de matrices poliméricas multicapas y debido a la complejidad de los sistemas biológicos aún persiste la necesidad de materiales versátiles y biocompatibles, este último en especial para el uso de sistemas celulares en aplicaciones de investigación y clínicas.

Aún es necesaria la integración de las propiedades características que ofrece el uso combinado de diferentes polímeros para la obtención de materiales versátiles, que permitan responder a las necesidades de múltiples aplicaciones asociadas a la integración de la encapsulación de compuestos y propiedades biocompatibles. Como resultado, es posible enfocar su uso tanto para aplicaciones *in vitro* como *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una matriz polimérica multicapa porosa, adherente y biocompatible, que comprende una capa superior y una capa inferior ambas de un polímero poroso adherente y una capa intermedia de un polímero poroso hinchable.

En un aspecto de la invención, el polímero poroso adherente (PPA) es un polímero natural entrecruzado con una solución alcalina. En otro aspecto de la invención, el polímero poroso hinchable (PPH) es un polímero natural modificado o no modificado, entrecruzado con un polielectrolito ácido.

En otro aspecto de la invención la matriz comprende compuestos activos, compuestos terapéuticos o mezclas de los mismos inmovilizados en una o varias de las capas poliméricas.

En otro aspecto, la invención se refiere a la aplicación de la matriz polimérica multicapa porosa en sistemas de detección, sistemas para crecimiento celular y modelos de órganos experimentales, entre otras.

En otro aspecto, la invención se refiere al método para elaborar la matriz polimérica multicapa porosa por deposición capa a capa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Esquema de la conformación por capas de la matriz polimérica. Se evidencia la composición de cada una de las capas y cómo se distribuyen en la superficie.

FIG. 2 Propiedades de las capas superior e inferior de polímero natural entrecruzado con solución alcalina. A) Capacidad de hinchamiento. Se evidencian diferentes proporciones entre los compuestos que corresponden a diferentes niveles de entrecruzamiento que favorecen o reducen la capacidad de hinchamiento del PPA. B) Resistencia a la degradación hidrolítica. Para diferentes proporciones de polímero natural / solución alcalina (clara de huevo (CH)/Base) se evidencia la resistencia al medio acuoso hasta por 72 horas con una pérdida de peso menor al 10%. C) Porosidad / hinchamiento.

El PPA fue sumergido en agua destilada para observar la porosidad por hinchamiento. Se observa que a una pequeña escala la superficie es altamente porosa permitiendo la inmovilización de moléculas. D) Porosidad / secado. A una escala mayor con el PPA totalmente seco se observa que hay irregularidades en la superficie generadas por el proceso de secado, esto implica que es necesaria la presencia de múltiples capas que permitan la correcta hidratación de los PPA.

FIG. 3 Propiedades de la capa intermedia de polímero modificado o no modificado entrecruzado con polielectrolito. A) Capacidad de hinchamiento. Se evidencian diferentes proporciones entre los compuestos que corresponden a diferentes niveles de entrecruzamiento que favorecen o reducen la capacidad de hinchamiento del PPH. B) Resistencia a la degradación hidrolítica. Para diferentes proporciones de polímero modificado / polielectrolito (carboximetil celulosa (CMC)/ácido poliacrílico (PAA)) se evidencia la resistencia al medio acuoso. C) Adsorción. El PPH se sumergió en una solución de PBS con diferentes moléculas diluidas en concentración conocida. Es posible estimar la capacidad del PPH para interiorizar las moléculas y retenerlas en su estructura polimérica. D) Porosidad. Se observa que la estructura del PPH después de haberse sumergido en agua cuenta con aglomeraciones correspondientes a la presencia de la celulosa y cuenta con espacios múltiples y propicios para la inmovilización de compuestos. E) Se observa la superficie del PPH totalmente seco a una mayor magnificación, en donde se evidencia que se reduce considerablemente la condición porosa, esta propiedad permite inmovilizar las moléculas de forma estable y mantenerlas fijas por largos periodos de tiempo.

FIG. 4 Esquema de la conformación por capas de la matriz polimérica de acuerdo con el Ejemplo 5. Se evidencia la composición de cada una de las capas y cómo se distribuyen en la superficie.

FIG. 5 Biocompatibilidad de la matriz. A) Gráfico de viabilidad celular. La matriz multicapa mantuvo una viabilidad mayor al 90% constante a lo largo del tiempo, hasta un máximo de 72 horas. La alta tasa de degradación de los polímeros por separado en las condiciones de cultivo celular aumentó considerablemente la tasa de mortalidad de

las células. B) Adhesión celular. Se sembraron en la superficie de la matriz multicapa células VERO (mono verde africano), después de 24 horas se fijaron y se tiñeron con dos fluoróforos diferentes tanto el núcleo como las proteínas de la pared celular como se observa en la imagen. Es posible evidenciar que las células desarrollaron estructuras adherentes, adquiriendo una forma alargada y manteniendo su viabilidad por más de 24 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para propósitos de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

Los términos utilizados en la descripción tienen los significados que normalmente se les da en el campo técnico a menos que esta descripción o el contexto indiquen claramente lo contrario.

La presente invención está dirigida a una matriz polimérica multicapa porosa que comprende una capa superior y una capa inferior, ambas de un polímero poroso adherente y una capa intermedia de un polímero poroso hinchable. Para efectos de la presente invención el término “*matriz polimérica multicapa*” hace referencia a un biomaterial que comprende 3 capas a partir de polímeros porosos adherentes e hinchables.

Capas superior e inferior

Las capas superior e inferior de la matriz están constituidas por un polímero poroso adherente (PPA). Particularmente, el término “*polímero poroso adherente*” hace referencia a un polímero natural termoestable entrecruzado con una solución alcalina. Las capas superior e inferior de la matriz polimérica permiten que esta sea adherente y biocompatible.

Para efectos de la presente invención el término “*polímero natural termoestable*” hace referencia a un polímero de origen biológico con capacidad de formar enlaces no covalentes intercadena cuando se somete a procesos de entrecruzamiento por cambios de pH que estabilizan las interacciones internas entre cadenas poliméricas. El polímero natural termoestable puede seleccionarse de polímeros naturales sensibles a pH, adherentes y entrecruzables que incluyen, sin limitarse a polisacáridos (por ejemplo, celulosa, pectina, goma gellan, metilcelulosa, xiloglucano, curdlan, konjac glucomanan, ácido hialurónico, quitosano, alginato, quitina, dextrano y almidón); proteínas (por ejemplo, colágeno, ovalbúmina, lactalbúmina, y gelatina) y matrices extracelulares nativas o modificadas de órganos de cualquier vertebrado y mezclas de las mismas (submucosa intestinal, placenta, miocardio vejiga, etc.).

En una modalidad, el polímero natural se selecciona entre pectina, ácido hialurónico, quitosano, alginato, quitina, dextrano, colágeno, ovalbúmina, gelatina, matrices extracelulares de submucosa intestinal, placenta, miocardio, vejiga y mezclas de los mismos. El polímero natural se encuentra en solución o suspensión en concentraciones entre 10 a 50 mg/mL, 15 a 30 mg/mL o 30 a 50 mg/mL. En una modalidad particular, el polímero natural es clara de huevo.

El polímero natural termoestable está entrecruzado con una solución alcalina, lo cual hace que el PPA formado tenga un pH ajustable de acuerdo con la aplicación deseada. Particularmente, el rango de pH ajustable se encuentra entre 9 y 10,5, lo que permite que el PPA disminuya su capacidad de hinchamiento y por lo tanto aumente la estabilidad en medios acuosos y con temperaturas superiores a los 30°C, condiciones comunes para aplicaciones en las que se busca asemejar el ambiente fisiológico como modelos de órganos y producción de cultivos celulares.

Para efectos de la presente invención, la solución alcalina entrecruzante es del tipo heterobifuncional por lo que permite múltiples conjugaciones entre cadenas poliméricas de diferente naturaleza. Así, la solución alcalina corresponde a entrecruzantes de alta reactividad y se selecciona entre, sin limitarse a, las siguientes:

- bases fuertes, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio e hidróxido de calcio;
- carbodiimidas tales como N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida y diisopropilcarbodiimida;
- imidoésteres tales como dimetil adipimidato, dimetil pimelimidato y dimetil suberimidato;
- maleimidas tales como sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, N-[4-(p-maleimidofenil)-butiril] (MPB) o 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (MCC);
- haloacetilos tales como cloruro de acetilo, cloruro de ethanoilo, cloruro de propanoilo, cloruro de butanoilo y cloruro de malonil bromuro;
- hidrazidas tales como hidrazida fórmica, carbohidrazida, acetidrazida, metil hidrazinocarboxilato, oxalildihidrazida, 1,2-diacetilhidrazina;
- alcoxiaminas tales como 2,2,5-trimetil-4-fenil-3-azahexano-3-nitroxido, N-tert-butil-O-[1-[4-(clorometil)fenil]etil]-N-(2-metil-1-fenilpropil)hidroxilamina; y diazirinas como 3-(4-bromofenil)-3-(trifluorometil)-3H-diazirina, succinimidil 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato, succinimidil 4,4'-azipentanoato, sulfosuccinimidil 4,4'-azipentanoato y sulfosuccinimidil 6-(4,4'-azipentanamido)-hexanoato.

En una modalidad, la base fuerte es hidróxido de sodio, la carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) y la hidrazida es carbohidrazida. En otra modalidad particular, la solución alcalina entrecruzante es hidróxido de sodio.

El polímero natural termoestable y la solución alcalina entrecruzante se mezclan en una proporción entre 20:1 y 200:1, entre 20:1 y 50:1, entre 50:1 y 200:1, hasta formar el PPA que conforma las capas superior e inferior de la matriz. En una modalidad particular la proporción es de 50:1. Adicionalmente, la concentración de la solución alcalina está entre 0,5 y 5 M, entre 0,5 y 2,5 M, entre 0,5 y 1 M o entre 1 M y 5 M. En una modalidad particular, la solución alcalina está en una concentración de 1 M.

De acuerdo con la presente invención el PPA que conforma las capas superior e inferior de la matriz se caracteriza por los siguientes parámetros:

- Porosidad: el PPA se caracteriza por una porosidad que oscila entre el 70% y el 75% lo que permite la encapsulación o atrapamiento de moléculas o compuestos en su interior. Adicionalmente, la porosidad le otorga la capacidad de hinchamiento que es de gran importancia para asemejar ambientes fisiológicos, así como una morfología superficial única, que permite el anclaje de estructuras proteicas presentes en células adherentes.
- Hinchamiento: el PPA se caracteriza por una capacidad de retención de agua no superior al 300%, entre 100% a 300%, entre 150% a 200%, y entre 200% a 300%. En una modalidad, la retención de agua del PPA es de 150%. Estos valores de retención de agua permiten que el PAA se mantenga hidratado con una menor posibilidad de degradación hidrolítica. Adicionalmente, en cuanto a la encapsulación de moléculas, estos niveles de hinchamiento permiten que las partículas migren a través de la matriz y controlar su liberación sostenida al medio.
- Resistencia: el PPA se caracteriza por alta resistencia a la degradación en medio líquido debido al entrecruzamiento del polímero natural con la solución alcalina debido a un aumento en el pH. El tiempo en que el material permanece estable debe oscilar entre las 12 y las 48 horas, siendo 24 horas el óptimo, con un porcentaje de pérdida de peso entre el 5% y 10%. Una estabilidad durante 24 horas permite su uso en múltiples aplicaciones de corto plazo asociadas a la encapsulación de compuestos, el crecimiento de cultivos celulares y la manufactura de modelos de órganos. Por otra parte, el porcentaje de pérdida de peso asociado durante este periodo es aceptable ya que no induce cambios significativos al PPA y, en consecuencia, su capacidad en las aplicaciones de interés.
- Propiedades reológicas: el PPA se caracteriza por una viscosidad entre 0,1 a 1 Pa*s, entre 0,1 a 0,5 Pa*s y entre 0,5 a 1 Pa*s, lo que garantiza la correcta deposición de las capas. Debido al método propuesto para la elaboración de la matriz y la deposición de las capas explicado más adelante, los valores de

viscosidad obtenidos son óptimos para llevar a cabo el proceso de *spin coating* con el PPA y se da lugar a la formación de una capa uniforme. Viscosidades superiores a 2 Pa*s dificultan el proceso provocando la formación de irregularidades en la superficie de las capas.

- Firmeza: el PPA se caracteriza por una firmeza entre 2,5 N a 5,15 N, que varía dependiendo del espesor de las capas. Estos valores aseguran que el PPA cuente con características de firmeza que le confieran estabilidad a lo largo del tiempo, sobre todo después del proceso de secado, pues evita la formación de grietas y el quebrantamiento de la capa formada. Estos procesos se encuentran asociados con las altas tasas de degradación hidrolítica por el quebrantamiento prematuro de las redes poliméricas.
- Hidrofobicidad: el PPA favorece la formación de redes poliméricas tridimensionales, lo que le da uniformidad y dureza, por esta razón la interacción con moléculas como el agua se basa en repeler los efectos de hidrólisis que pueden dañar y colapsar la red. Particularmente, la disminución de puentes de hidrógeno por la presencia de la solución alcalina como entrecruzante le otorgan a la superficie del PPA características hidrofóbicas que favorecen la estabilidad en medios acuosos. Esto permite que el PPA se mantenga estable por periodos prolongados de tiempo en la interacción con medios acuosos. Esto lo hace ideal para aplicaciones en las que se busca contacto permanente con medios acuosos.

El PPA tiene la capacidad de interactuar activamente con otras estructuras por su alto contenido en proteínas y moléculas con radicales altamente reactivos junto con grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, grupos fenólicos y carboxilos en los extremos de las cadenas, que pueden modificarse fácilmente al interactuar con otras estructuras inorgánicas o proteínas orgánicas, formando enlaces estables. Esta capacidad hace que el PPA le aporte versatilidad a la matriz y ésta pueda adherirse a múltiples superficies en diferentes condiciones.

El PPA de la matriz polimérica es apto para la interacción molecular con las proteínas adherentes de las células, mejorando su viabilidad. Por lo tanto, es biocompatible. Adicionalmente, el PPA se caracteriza por una citotoxicidad menor del 5%, indicando

que es viable para células en suspensión. Adicionalmente, la interacción entre el material y las células favorece la formación de estructuras proteicas adherentes indispensables para la supervivencia de células que requieren anclarse a la superficie. Por otra parte, el PPA le da estabilidad a la matriz polimérica, ya que permite el control de las condiciones propicias para el crecimiento celular en condiciones *in vitro* e *in vivo* como por ejemplo una alta humedad y temperatura entre 28°C y 40°C, garantizando que la matriz multicapa no se degrade antes del tiempo necesario para el crecimiento celular.

Capa intermedia

La capa intermedia está constituida por un polímero poroso hinchable (PPH). Particularmente, el término “*polímero poroso hinchable*” hace referencia a un polímero derivado de polisacáridos o de celulosa modificado o no modificado entrecruzado con una solución de un polielectrolito ácido. La capa intermedia de la matriz polimérica permite la movilización y fijación de compuestos moleculares.

Para efectos de la presente invención, el término “*polímero derivado de polisacáridos o de celulosa modificado o no modificado*” es una sustancia que cuenta con una gran capacidad de hinchamiento absorbiendo grandes cantidades de líquidos polares como el agua, así como alta versatilidad para adsorber y retener compuestos. Lo anterior permite la encapsulación y movilización de moléculas en el interior de la capa intermedia, permitiendo el paso de agua sin que los componentes inmovilizados se liberen con rapidez.

Para efectos de la presente invención, el término “*polímero no modificado*” hace referencia a un polímero de origen natural o sintético sin modificaciones químicas adicionales a aquellas requeridas inicialmente para su síntesis y condensación. Es decir, estos polímeros no cuentan con grupos funcionales o modificaciones físicas a nivel molecular que cambien la forma base de las cadenas poliméricas originales. El término “*polímero modificado*” hace referencia a un polímero de origen natural o sintético con modificaciones físicas o químicas que alteran la estructura base de las cadenas

poliméricas y, en últimas, que le otorgan propiedades o características adicionales a las que presenta el material base.

Para los efectos de la presente invención, cuando el polímero es un derivado de polisacáridos se selecciona entre, pero no se limita a, quitosano, alginato, goma xantana, goma guar, ácido hialurónico, almidón, goma acacia y carragenina. Cuando el polímero es un derivado de celulosa se selecciona entre, pero no se limita a, alquil celulosa, hidroxialquil celulosa, éter de celulosa, éster de celulosa y nitrocelulosa. En una modalidad, cuando el polímero es un derivado de celulosa se selecciona entre metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboximetilcelulosa (CMC) y triacetato de celulosa. En una modalidad particular, el polímero es CMC.

El polímero derivado de polisacáridos o de celulosa modificada o no modificada está entrecruzado con un polielectrolito que cuenta con grupos altamente reactivos en los extremos de las cadenas. Para efectos de la presente invención el término “*polielectrolito*” hace referencia a un polímero con grupos ionizables como polianiones y policationes que le dan la capacidad de cambiar su conformación espacial de acuerdo con las condiciones que lo rodean. El polielectrolito se selecciona entre, pero no se limita a, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliacrílico (PAA), poliamidas, poli-2-hidroxi butirato (PHB), gelatina, (A, B)-policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (L-lisina) (PLL), poli (ácido L-glutámico) (PGA), y mezclas de los mismos. En una modalidad particular el polielectrolito es PAA.

El polímero derivado de polisacáridos o de celulosa modificado o no modificado y el polielectrolito se mezclan en una proporción entre 10:4 y 2:0.5, entre 10:4 y 3:1, entre 10:1 y 3:1, entre 10:1 y 2:0,5, hasta formar el PPH que forma la capa intermedia. En una modalidad particular la proporción es de 5:1.

Para la mezcla del polímero derivado de polisacáridos o de celulosa modificado o no modificado y el polielectrolito, el polímero se encuentra en una concentración entre 0,6 y

1,5 % p/v, entre 0,6 y 1 % p/v o entre 1 y 1,5 % p/v, y en una modalidad particular, se encuentra en una concentración de 1 % p/v. Adicionalmente, el polielectrolito se encuentra en una concentración entre 0,1 % y 0,4 % p/v, entre 0,2 % y 0,4 % p/v, entre 0,3 % y 0,4 % p/v, y en una modalidad particular, en una concentración de 0,3 % p/v.

De acuerdo con la presente invención el PPH se caracteriza por diferentes conformaciones cuando está hinchado y cuando está seco. Particularmente, al secarse forma agregados con las moléculas inmovilizadas, y una vez se hincha, permite que se disuelvan estos agregados y migren a través de la matriz, evitando que las moléculas migren al medio y eventualmente se desprendan de la matriz. Adicionalmente, el PPH permite la interacción con moléculas polares como el agua, facilitando su entrada y salida de la capa con mínimas afectaciones, lo que permite que haya una hidratación considerable en una de las capas de la matriz. Esto permite que los agregados que contienen las moléculas inmovilizadas migren a través de la matriz, y no se pierda la capacidad de absorber el agua y mantenerse estable en medios líquidos.

De acuerdo con la presente invención el PPH se caracteriza por los siguientes parámetros:

- Capacidad de adsorción: el PPH se caracteriza por su capacidad de interactuar con grupos carboxilo, carboxilato y nitrilo con sustratos en medios líquidos polares, lo que le otorga una capacidad de adsorción entre 850-1000 mg/g. Lo anterior facilita la inmovilización efectiva de compuestos activos dentro de la capa intermedia.
- Hinchamiento: el PPH se caracteriza por tener una capacidad de hinchamiento superior al 500% y mantenerse estable por un periodo entre 12 y 24 horas. Esta capacidad permite mantener hidratada la matriz polimérica para evitar que las demás capas se fracturen y pierdan sus propiedades.
- Morfología de la superficie: el PPH se caracteriza por poros grandes y muy separados entre sí. La porosidad del PPH oscila entre un 50% y 70% con poros de un tamaño entre 2 μm y 6 μm . Lo anterior facilita la inmovilización efectiva de compuestos activos dentro de la capa intermedia desapareciendo los poros y mostrando una superficie uniforme.

Elaboración de la matriz polimérica

La matriz polimérica multicapa de acuerdo con la presente invención tiene la estructura que se esquematiza en la Figura. 1, y se elabora mediante métodos conocidos en la técnica tales como los comprendidos en los métodos de deposición en superficies para la formación de recubrimientos delgados. Estos incluyen pero no se limitan a procesos de deposición interfacial como *Sol-gel*, *spin-coating* o *dip-coating*.

En una modalidad particular, la matriz multicapa se obtiene mediante deposición capa a capa de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Preparar las soluciones que componen cada una de las capas (PPA y PPH);
2. Depositar el volumen adecuado (según la viscosidad de la solución) del PPA sobre una superficie seleccionada entre vidrio, cerámico o polímero, plana, uniforme y con dimensiones adecuadas para la aplicación requerida, hasta obtener una capa uniforme recubriendo la superficie;
3. Someter a radiación UV durante 10 minutos para asegurar el entrecruzamiento y fijación del PPA depositado, la cual reposa a temperatura ambiente hasta que esté totalmente seca.
4. Repetir los pasos 2 y 3 con la solución del PPH para formar la capa intermedia sobre la capa de PPA.
5. Repiten los pasos 2 y 3 con la solución del PPA para formar la segunda capa externa sobre las dos capas anteriores.

Para efectos de la presente invención, el volumen adecuado hace referencia a la cantidad de solución de PPA o PPH necesario para lograr que cada capa tenga un grosor entre 10 μm y 500 μm , dependiendo de la aplicación de interés y del área de la superficie donde se depositan.

Matriz polimérica multicapa

Como se indicó anteriormente, la matriz polimérica multicapa de la presente invención tiene la estructura que se esquematiza en la Figura 1. Las capas superior, intermedia e inferior de la matriz polimérica se caracterizan por un espesor entre 10 μm y 500 μm , entre 10 μm y 50 μm , entre 50 μm y 150 μm , entre 150 μm y 300 μm , o entre 300 y 500 μm , dependiendo de la aplicación de interés y del área de la superficie donde se depositan.

La matriz polimérica de la presente invención se caracteriza por una mayor estabilidad (mayor duración en el tiempo), y esto se debe, sin querer atarse a una explicación definitiva, a la formación de enlaces poliméricos en las interfaces de las capas que permiten mejorar su resistencia. Por otra parte, la naturaleza de los polímeros PPA y PPH garantiza la biocompatibilidad que permite el adecuado crecimiento de células adherentes y en suspensión.

Adicionalmente, la matriz polimérica de la presente invención se caracteriza por una porosidad que le permite una difusión controlada de compuestos activos de interés, dado que al combinar las porosidades de las tres capas individuales se logra un control activo de movilización y fijación de compuestos de acuerdo con su tamaño, lo que permite separar y diferenciar las moléculas dentro de la matriz.

La matriz multicapa se caracteriza por un pH entre 7 y 8. En una modalidad particular la matriz tiene un pH de 7,4. Las tres capas mantienen el pH estable y en valores adecuados para células, lo que permite tener una adecuada viabilidad celular. Por otra parte, los pH básicos favorecen la interacción de la matriz con el agua, gracias a la polarización de grupos funcionales aniónicos, permitiendo que la matriz se hinche a niveles deseados sin sufrir afectaciones en un periodo de aproximadamente 72 horas.

Compuestos activos inmovilizados

La matriz polimérica multicapa de acuerdo con la presente invención puede tener compuestos terapéuticos de origen natural o sintético inmovilizados en una o varias de las capas. Los compuestos terapéuticos de origen natural tienen actividad biológica y pueden ser empleados para modular procesos celulares desregulados causantes de

condiciones de salud indeseadas o controlar la proliferación de agentes patógenos. Ejemplos de la actividad biológica de dichos compuestos incluye, pero no se limita a propiedades antivirales, antifúngicas, antibacteriales, anticancerígenas, inmunomoduladoras o modulación de cascadas de regulación de procesos metabólicos. Adicionalmente, pueden utilizarse para cumplir funciones de detección, biocatálisis e identificación *in vitro*.

Los compuestos activos sirven para obtener funcionalidades complementarias en la matriz. Estos compuestos incluyen, sin limitarse a ácidos nucleicos, enzimas que metabolizan compuestos para eliminarlos o generar productos deseados, anticuerpos que permiten detectar específicamente una molécula o que se unen específicamente a una molécula o compuesto y lo inmovilizan y hormonas y metabolitos que favorecen procesos celulares. Estos compuestos incorporados en la matriz sirven para favorecer el crecimiento celular por su efecto promotor de crecimiento; tienen actividad antibiótica o antimicótica; sirven para evaluar el efecto de compuestos específicos sobre las células y en el caso de moléculas como ADN, ARN, nucleótidos permiten evaluar cambios en el metabolismo o expresión celular, entre otras posibles aplicaciones de la matriz.

En una modalidad particular, los compuestos activos se seleccionan entre enzimas y anticuerpos.

Los compuestos terapéuticos incluyen, sin limitarse a agentes antimicrobianos, anestésicos, analgésicos, agentes anticancerígenos, agentes angiogénicos, antisépticos, antibióticos, agentes fibróticos, antimitóticos, agentes quelantes, péptidos, proteínas, ADN, ARN, nucleótidos, liposomas, productos sanguíneos, hormonas, sales de plata solubles en agua, factores de crecimiento, y combinaciones de los mismos. En una modalidad particular, los compuestos terapéuticos se seleccionan entre factores de crecimiento y antibióticos.

Los compuestos terapéuticos se adicionan a la matriz en cantidades que van desde 1 mg/mL hasta 1 g/mL.

Usos

De acuerdo con la presente invención, la matriz polimérica multicapa tiene múltiples aplicaciones que incluyen, sin limitarse a sistemas de detección rápida de microorganismos en diferentes matrices que van desde alimentos hasta productos farmacéuticos, contaminantes en agua y alimentos, cultivos celulares, sistemas para crecimiento celular, modelos de órganos experimentales, liberación controlada, sistemas de biocatálisis para aplicaciones ambientales, industriales y farmacéuticas, sistemas de atrapamiento de toxinas y agentes contaminantes, entre otras.

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de las capas superior e inferior:

Para la obtención de las capas superior e inferior se preparó una composición A1 con clara de huevo, la cual se obtuvo de huevos frescos de gallina. Cuidadosamente, después de limpiar la parte exterior de un huevo con etanol al 70%, se abrió un orificio para sacar su contenido interno, lentamente se vertió la clara de huevo en un recipiente evitando que se mezclara con la yema. Una vez obtenida la clara de huevo, se tomaron 50 mL de la misma y se evaluó su pH. Posteriormente, se agregó gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1M hasta alcanzar un pH de 10,5.

Para la obtención de la capa, se utilizó un método de deposición para asegurar una distribución uniforme. Sobre la superficie de un cubreobjetos de 24mm x 24mm se depositaron 20 μ L de la composición A1. La película del polímero natural se formó con un *spin coater* posicionando el cubreobjetos en el soporte con la ayuda de un sistema de vacío. El equipo de *spin coating* se programó para que girara a 1000 rpm con una aceleración de 250 rpm/s durante 30 segundos.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la composición A1 y variando el tipo y cantidad de polímero, el tipo y concentración de solución alcalina, y proporción se preparan las composiciones A2 – A4 como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones de las capas superior e inferior

Composición	A1	A2	A3	A4
Tipo de polímero poroso adherente	Clara de huevo	Matriz extracelular	Alginato	Quitano
Cantidad de polímero	50 mL	25 mL	60mL	40 mL
Tipo de solución alcalina	Hidróxido de sodio	1-etil-3-(3-dimetilamino propilo	Cloruro de calcio	1-etil-3-(3-dimetilamino propilo
Concentración solución alcalina [M]	1 M	0.5 M	1.5 M	1M
Volumen de solución alcalina [mL]	1 mL	1 mL	2 mL	1 mL
Proporción entre el polímero poroso adherente y la solución alcalina	50:1	25:1	30:1	40:1

Ejemplo 2. Caracterización de la capa superior e inferior:

Porosidad:

Para evaluar la porosidad de la capa formada desde un punto cualitativo, éstas se sometieron a un proceso de hinchamiento con agua destilada durante 12 horas y un secado posterior en horno a 60°C durante 1 hora. La superficie de la capa completamente seca se recubrió con una capa fina de un material conductor, por ejemplo, el oro para observar en un microscopio de barrido de electrones JEOL, modelo JSM 6490-LV. Se evaluó la superficie a diferentes magnificaciones, en 600X se evidenció que el proceso de secado afectó considerablemente la superficie de la capa generando su fractura (FIG. 2D), sin atarse a una única explicación, esto podría ser una consecuencia de la deshidratación rápida, lo que indica que la porosidad del polímero es suficiente para la entrada y salida

de agua. Duplicando la magnificación, se encontró una estructura altamente porosa con proyecciones e irregularidades superficiales que sirven como sitios activos para la encapsulación de moléculas y compuestos en su interior (FIG. 2C).

Hinchamiento:

La capacidad de hinchamiento de la capa se determinó a partir de mediciones continuas del peso de la misma después de sumergirla por un tiempo total de 24 horas en agua destilada. Se tomó el peso inicial de la capa totalmente seca para obtener un valor de referencia. La película del PPA se retiró del agua a diferentes intervalos de tiempo, se eliminó el exceso de agua con ayuda de un papel filtro de 0,22 μm , se tomó el peso y se sumergió nuevamente hasta completar el tiempo total. Para calcular el porcentaje de hinchamiento en el tiempo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{P_s - P_m}{P_s} \times 100,$$

donde P_s es peso seco y P_m es el peso después de sumergir la capa de PPA en el agua.

Se encontró que hay un comportamiento de hinchamiento exponencial durante las primeras 6 horas, el cual se mantiene estable hasta completar las 24 horas (FIG. 2A). Esto permite evidenciar que la formulación tiene una interacción favorable con soluciones acuosas permitiendo rápidamente su paso y resistiendo la degradación hidrolítica por lo menos durante las primeras 24 horas.

Resistencia:

Con el fin de evaluar la resistencia del PPA a la degradación hidrolítica, la capa se sumergió en agua destilada durante 72 horas y adicionalmente se mantuvo bajo incubación a 37°C. Se tomó el peso inicial de la capa totalmente seca y una vez sumergida, se retiró del agua a diferentes intervalos de tiempo y se removieron los excesos con papel filtro de 0,22 μm para tomar el peso nuevamente. Para calcular el porcentaje de pérdida de masa se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100,$$

donde P_i es peso seco inicial y P_f es el peso después de sumergir la capa de PPA en el agua.

Se encontró que la formulación propuesta cuenta con una alta resistencia a las condiciones propuestas de humedad y temperatura con una pérdida de menos del 10% de su masa inicial en el tiempo total de evaluación, lo cual es beneficioso para aplicaciones como cultivos celulares, ya que el sistema multicapa se mantiene bajo estas condiciones y requieren un tiempo mínimo de 72 horas para ser exitosos (FIG. 2B).

Ejemplo 3. Obtención de la capa intermedia:

Para la obtención de las capas superior e inferior se preparó una composición B1 con carboximetil celulosa (CMC 263.2 g/mol) y ácido poliacrílico (PAA 72.06 g/mol). Para diluir ambos compuestos se utilizó agua ultrapura (sistema Milli Q-plus, Millipore).

Se tomaron 50 mL del agua y se sometieron a agitación magnética a 5000 rpm, lentamente se añadió al agua 0,5 g de CMC (1 % p/v), se agitó hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se añadieron 0,15g de PAA (0,3 % p/v) y la solución se mantuvo en agitación hasta lograr homogeneidad completa.

Para la obtención de la capa se utilizó un método de deposición para asegurar una distribución uniforme. Sobre la superficie de un cubreobjetos de 24mm x 24mm se depositaron 10 μ L de la composición B1. La película de la capa intermedia se formó con un *spin coater* posicionando el cubreobjetos en el soporte con la ayuda de un sistema de vacío. A continuación, el equipo se programó para que girara a 3000 rpm con una aceleración de 250 rpm/s durante 30 segundos.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la composición B1 y variando el tipo y cantidad de polímero, el tipo y concentración de agente entrecruzante, y proporción se preparan las composiciones B2 – B4 como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de la capa intermedia

Composición	B1	B2	B3	B4
Tipo de polímero poroso hinchable	Caboximetil celulosa (CMC)	Caboximetil celulosa (CMC)	Carboximetil celulosa (CMC)	Alginato
Concentración de polímero [%]	1%	1%	1,5%	0,6%
Tipo de agente entrecruzante	Ácido poliacrílico (PAA)	Ácido cítrico	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDC)	Ácido poliacrílico (PAA)
Concentración de agente entrecruzante [%]	0,3%	0,2%	0,4%	0,2%
Proporción entre el polímero poroso hinchable y agente entrecruzante	10:3	10:2	3,75:1	3:1

Ejemplo 4. Caracterización de la capa intermedia:

Capacidad de absorción:

Para evaluar si la capa permitía la inmovilización de moléculas terapéuticas se realizó un ensayo de absorción, disolviendo diferentes moléculas en un buffer fosfato salino (PBS). Se preparó una solución con anticuerpos (150 kDa) a una concentración final de 30 µg/mL, una solución con la enzima peroxidasa (44 kDa) a una concentración final de 100 µg/mL y una solución de proteína estándar albúmina (66.5 kDa) a una concentración final de 100 µg/mL. Se sintetizaron tres versiones de la formulación propuesta del PPH y cada una se sumergió en una de las soluciones durante 24 horas después de medir el peso seco inicial. A continuación, se retiró el PPH en diferentes intervalos de tiempo, se retiró el exceso de agua con un papel filtro de 0,22 µm y se pesó. De acuerdo a la concentración inicial de las soluciones y el agua absorbida fue posible calcular la concentración de moléculas adsorbidas e inmovilizadas en cada capa (FIG. 3C).

Se encontró que la presencia de las moléculas en el agua no afectó la capacidad de hinchamiento del PPH, lo que permite evidenciar que cuenta con la capacidad de inmovilizar moléculas en su interior en diferentes concentraciones.

Hinchamiento:

La capacidad de hinchamiento de la capa se determinó a partir de mediciones constantes del peso de la misma después de sumergirla por un tiempo total de 24 horas en agua destilada. Se tomó el peso inicial de la capa totalmente seca para obtener un valor de referencia. A continuación, en diferentes intervalos de tiempo se retiró la película del PPH, se eliminó el exceso de agua con ayuda de un papel filtro de 0,22 μm , se tomó el peso y finalmente se sumergió nuevamente en el agua hasta completar el tiempo total. Para calcular el porcentaje de hinchamiento en el tiempo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{P_s - P_m}{P_s} \times 100,$$

donde P_s es peso seco y P_m es el peso después de sumergir la capa de PPH en el agua.

Se encontró que bajo la formulación propuesta del PPH hay un comportamiento exponencial las primeras horas alcanzando un nivel de hinchamiento mayor al 200%, que se mantiene estable a lo largo del tiempo. Esto indica que las características del polielectrolito entrecruzado permiten la entrada y retención de agua, extendiendo las redes poliméricas pero sin inducir efectos negativos que fomenten la degradación durante las primeras 24 horas. Esta capacidad permite retener soluciones acuosas por periodos largos de tiempo incluso para películas muy finas como las que se pueden requerir para algunas aplicaciones (FIG. 3A).

Resistencia:

Con el fin de evaluar la resistencia del PPH a la degradación hidrolítica, la capa se sumergió en agua destilada durante 24 horas y adicionalmente se mantuvo bajo incubación a 37°C. Se tomó el peso inicial de la capa totalmente seca y una vez sumergida se retiró del agua a diferentes intervalos de tiempo y se removieron los excesos con papel filtro de 0,22 μm para tomar el peso nuevamente. Para calcular el porcentaje de pérdida de masa se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100,$$

donde P_i es peso seco inicial y P_f es el peso después de sumergir la capa de PPA en el agua.

Se encontró que, aunque la formulación propuesta de PPH permite aumentar la resistencia a la degradación hidrolítica, perdió aproximadamente la mitad de su peso al cabo de 24 horas. Esto indica que, a pesar de sus altas capacidades de hinchamiento, este es un material inestable en condiciones biológicas y requiere el uso de otros materiales que complementen su función (FIG. 3B).

Morfología de la superficie:

Para evaluar la morfología de la superficie de la capa formada, se sometió a un proceso de hinchamiento con agua destilada durante 12 horas y un secado posterior en horno a 60°C durante 1 hora. La superficie de la capa completamente seca se recubrió con una capa fina de un material conductor como el oro para observar en un microscopio de barrido de electrones JEOL, modelo JSM 6490-LV. Se evaluó la superficie a diferentes magnificaciones. A 500X se evidenció que predominan las estructuras porosas en la superficie, lo cual permite el paso de pequeñas moléculas a través de la red polimérica y le otorga altas capacidades de hinchamiento (FIG. 3D). Por otra parte, a una escala de magnificación de 1000X se evidencian pequeñas aglomeraciones de celulosa que facilitan la inmovilización de compuestos y su estabilidad, ya sea en condiciones secas o húmedas (FIG. 3E).

Ejemplo 5. Obtención de una matriz polimérica multicapa

Para sintetizar la matriz polimérica multicapa se utilizó un método de deposición capa por capa gracias a las cualidades polielectrolíticas de los componentes de cada capa. Esta técnica permite la formación de enlaces entre las diferentes capas manteniendo la estabilidad de la matriz.

Inicialmente se depositó la capa de clara de huevo entrecruzada con NaOH a través del método de *spin coating* como se describió en la composición A1 del Ejemplo 1. Posteriormente, esta capa se sometió a radiación UV durante 5 minutos para asegurar su esterilidad, sellado y exponer los radicales que permiten la formación de enlaces. A continuación, se depositó en su superficie la segunda capa y se formó con la composición B1 descrita en el Ejemplo 3. A continuación, esta segunda capa se sometió nuevamente

a luz UV durante 10 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos adicionales, antes de depositar la capa de la superficie de la misma forma que se hizo para la primera y de esta manera finalizar la formación de la matriz en su totalidad (FIG. 4).

Ejemplo 6: Caracterización de una matriz polimérica multicapa

Biocompatibilidad

Para evaluar la biocompatibilidad de la matriz polimérica se realizó un ensayo *in vitro* con células de tipo adherente. Para cuantificar el efecto de la matriz sobre las células, se realizó un ensayo de viabilidad celular denominado MTT que usa la actividad metabólica como indicador de la viabilidad celular.

Se cultivaron células Vero (ATCC, CCL-81) en una caja de cultivo celular en presencia de DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y penicilina/estreptomicina al 1% (v/v) (medio de crecimiento completo) hasta que se completó una confluencia de aproximadamente el 80 %. Las células se despegaron del frasco de cultivo con tripsina caliente a una concentración 1X, posteriormente se realizó un conteo de las células teñidas con azul de tripan en una cámara de Neubauer para diluirlas nuevamente en medio sin suero y obtener una concentración final de 200000 células/mL.

Para sembrar las células en la superficie de la matriz polimérica multicapa, esta se formó en la superficie de un cubreobjetos y a continuación este se posicionó en una placa de 24 pozos para cultivos celulares. Se estableció como blanco la matriz polimérica multicapa con el medio de cultivo celular, esto con el fin de descartar efectos del polímero sobre los reactivos de la prueba. Para el control positivo se agregaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% a un pozo con células sin el recubrimiento. El blanco, el control positivo y el ensayo se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5-6.5% CO₂. Una vez las células alcanzaron una confluencia del 80%, se añadieron 10 µL del reactivo MTT de tinción y se incubó durante 4 horas en las condiciones previamente mencionadas. Posterior a esto, se añadieron 100 µL de la solución de solubilización y se tomaron 100 µL del medio para medir su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650nm. Se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \times 100.$$

Se encontró que la matriz multicapa preserva la integridad celular manteniendo su viabilidad en valores superiores al 95%, validando que los componentes de la matriz y su conformación son biocompatibles y seguros para su uso en sistemas celulares para aplicaciones de investigación y clínicas (FIG. 5A).

Adhesión celular

Con el fin de determinar si la matriz proporciona una base adecuada para la fijación de estructuras necesaria para la supervivencia de células adherentes, se observaron las células fijadas en la superficie de la matriz polimérica multicapa con microscopía con focal.

Inicialmente se cultivaron células Vero (ATCC, CCL-81) en una caja de cultivo celular con DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y penicilina/estreptomicina al 1% (v/v) (medio de crecimiento completo) hasta que se completó una confluencia de aproximadamente el 80%. Las células se despegaron del frasco de cultivo con tripsina caliente a una concentración 1X, posteriormente se realizó un conteo de las células teñidas con azul de tripan en una cámara de Neubauer para diluirlas nuevamente en medio sin suero y obtener una concentración final de 200000 células/mL.

A esta concentración se cultivaron las células en la superficie de la matriz que se sintetizó en la superficie de un cubreobjetos para colocarlo en el fondo de los pozos de una microplaca de 24 pozos para cultivos celulares. Las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C y 5-6.5% CO₂. Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS para eliminar residuos, posteriormente se añadió 1mL de formaldehído al 4%(v/v) para fijar las células durante 10 minutos. Una vez completada la reacción se añadió tritón a una concentración de 4X y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Para observar las estructuras celulares con precisión se tiñó el núcleo agregando 1 mL de DAPI durante 10 minutos. El exceso de DAPI se retiró para teñir las estructuras

proteicas de la membrana celular que se adhieren a la superficie de la matriz polimérica multicapa agregando 1 mL de Alexa Fluor 488. Finalmente, se lavó nuevamente cada pozo y se observaron las células en un microscopio confocal Olympus FV1000.

Se evidenció en las imágenes obtenidas que efectivamente las células desarrollaron estructuras proteicas especializadas para adherirse a la superficie de la matriz polimérica multicapa, lo cual indica que la matriz proporciona un ambiente apropiado para el crecimiento de cultivos celulares facilitando la proliferación y migración de células de tipo adherente (FIG. 5B).

Ejemplo 7. Aplicaciones de la matriz

Las aplicaciones de la matriz polimérica multicapa incluyen, pero no se limitan a dos grupos generales que comprenden el encapsulamiento de compuestos y/o moléculas y la ingeniería de tejidos. A continuación, se darán ejemplos de las posibles aplicaciones dentro de estas dos categorías.

Dentro de la categoría de encapsulamiento se encuentran aplicaciones como la detección de microorganismos, sustancias y metabolitos. Para el caso específico de los microorganismos, es posible la inmovilización de sistemas de detección basados en el uso de anticuerpos y enzimas reporteras que se unen a proteínas específicas del organismo y reportan su presencia a través de un aumento en la fluorescencia, un cambio de color o el aumento en concentración de una sustancia específica que se pueda medir con la ayuda de instrumentos especializados. Posibles aplicaciones enmarcadas en la detección de microorganismos se incluyen, pero no se limitan a, evaluación microbiológica de alimentos, agua, fármacos, cultivos celulares y diagnóstico de enfermedades generadas por microorganismos.

Para el caso de la detección de sustancias y/o metabolitos es posible inmovilizar moléculas reporteras o microsensores que al reaccionar con la sustancia de interés generen una reacción detectable o permitan evaluar la concentración de esta en el medio. Posibles aplicaciones en este contexto incluyen, pero no se limitan a, evaluación de la

calidad del agua, el aire, los alimentos, los fármacos y el diagnóstico de enfermedades asociadas a desniveles en metabolitos o la presencia de sustancias tóxicas detectables.

Dentro de la categoría de encapsulamiento se encuentran aplicaciones asociadas a la liberación controlada de sustancias con fines clínicos o investigativos, dentro de dichas sustancias se incluyen, pero no se limitan a moléculas terapéuticas, nutrientes e intermediarios de rutas metabólicas. Su uso se enfoca a aplicaciones tales como mejoramiento del efecto de los fármacos por medio de una liberación constante en tiempos prolongados, estudios de cinética de sustancias al ser liberadas de forma controlada, liberación controlada en tiempos prolongados de sustancias beneficiosas para el crecimiento óptimo de modelos de órganos y cultivos celulares.

Adicionalmente, dentro de la categoría de encapsulamiento se encuentran aplicaciones asociadas a la migración interna de las moléculas en la matriz polimérica multicapa estas se incluyen, pero no se limitan al estudio de cinética de moléculas que pueden tener diferentes patrones de migración teniendo en cuenta las características diferenciales de cada una de las capas que comprende la matriz y la separación de moléculas de interés de acuerdo a su tamaño, carga, pH, entre otras.

Dentro de la categoría de ingeniería de tejidos se encuentran aplicaciones en cultivos celulares en suspensión y adherentes en dos y tres dimensiones y modelos de órganos con morfología simple.

Posibles aplicaciones para cultivos de células adherentes en dos dimensiones incluyen la evaluación de líneas celulares con fines clínicos o investigativos. Dentro de la evaluación, el efecto de componentes previamente inmovilizados en la matriz polimérica multicapa, la migración y posterior evaluación de metabolitos generados por las células como reacción a un tratamiento dentro de la matriz polimérica multicapa, la diferenciación de células madre en diferentes tejidos por el efecto de factores de crecimiento y metabolitos previamente inmovilizados en la matriz.

Las aplicaciones asociadas a los cultivos celulares 3D incluyen, pero no se limitan a la encapsulación de células para la formación de esferoides que asemejan un entorno fisicoquímico más cercano al *in vivo*, ya que facilitan la interacción célula-célula y célula-matriz, su uso se puede extender a investigación de tumores y cáncer, trasplantes terapéuticos, evaluación del efecto de fármacos y estudios clínicos. Adicionalmente, dentro de esta categoría se encuentran los modelos de órganos con morfología simple como modelo de barrera para la evaluación del efecto de sustancias en estructuras celulares más complejas que las de dos dimensiones, modelo de piel, modelo de lumen del intestino, entre otros.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz polimérica multicapa porosa que comprende:
una capa superior y una capa inferior ambas de un polímero poroso adherente (PPA); y
una capa intermedia de un polímero poroso hinchable (PPH).
2. La matriz de la Reivindicación 1, en donde el PPA es un polímero natural termoestable entrecruzado con una solución alcalina.
3. La matriz de la Reivindicación 2, en donde el polímero natural termoestable se selecciona del grupo de polisacáridos, proteínas y matrices extracelulares nativas o modificadas de órganos de cualquier vertebrado y mezclas de los mismos.
4. La matriz de la Reivindicación 3, en donde el polímero natural termoestable se selecciona entre albúmina, pectina, ácido hialurónico, colágeno, quitosano, alginato, quitina, dextrano, gelatina, matrices extracelulares de submucosa intestinal, placenta, miocardio, vejiga y mezclas de los mismos.
5. La matriz de la Reivindicación 2, en donde la solución alcalina se encuentra en una concentración entre 0.5 M y 5 M.
6. La matriz de la Reivindicación 5, en donde la solución alcalina se encuentra en una concentración de 1M.
7. La matriz de la Reivindicación 2, en donde la solución alcalina se selecciona entre una base fuerte, carbodiimidas, imidoésteres, maleimidas, haloacetilos, hidrazidas, alcoxiaminas y diazirinas.
8. La matriz de la Reivindicación 7, en donde la base fuerte es hidróxido de sodio, la carbodiimida es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) y la hidrazida es carbohidrazida.

9. La matriz de la Reivindicación 2, en donde el polímero natural termoestable y la solución alcalina se encuentran en una proporción entre 20:1 y 200:1.
10. La matriz de la Reivindicación 9, en donde el polímero natural termoestable y la solución alcalina se encuentran en una proporción de 50:1.
11. La matriz de la Reivindicación 1, en donde el PPH es un polímero derivado de polisacáridos o de celulosa entrecruzado con un ácido orgánico o un polielectrolito ácido.
12. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polímero derivado de polisacáridos se selecciona entre quitosano alginato, goma xantana, goma guar, ácido hialurónico, almidón, goma acacia y carragenina
13. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polímero derivado de celulosa se selecciona entre alquil celulosa, hidroxialquil celulosa, éter de celulosa, éster de celulosa y nitrocelulosa.
14. La matriz de la Reivindicación 13, en donde el polímero derivado de celulosa se selecciona entre metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboximetilcelulosa (CMC) y triacetato de celulosa.
15. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polielectrolito se selecciona entre ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliacrílico (PAA), poliamidas, poli-2-hidroxibutirato (PHB), gelatina, (A, B)-policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (L-lisina) (PLL), poli (ácido L-glutámico) (PGA), y mezclas de los mismos.
16. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polímero derivado de polisacáridos o de celulosa y el polielectrolito se encuentran en una proporción entre 10:4 y 2:0,5.

17. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polímero derivado de polisacáridos o de celulosa y el polielectrolito se encuentran en una proporción de 5:1.
18. La matriz de la Reivindicación 11, en donde el polielectrolito está en una concentración entre 1% y 4% p/v.
19. La matriz de la Reivindicación 1 que además comprende compuestos activos, compuestos terapéuticos o mezclas de los mismos inmovilizados en una o varias de las capas.
20. La matriz de la Reivindicación 19, en donde
los compuestos activos se seleccionan entre enzimas, anticuerpos, hormonas y metabolitos; y
los compuestos terapéuticos se seleccionan entre antifúngicos, antivirales, anestésicos, analgésicos, anticancerígenos, angiogénicos, antisépticos, antibióticos, fibróticos, antimitóticos, quelantes, péptidos, proteínas, ADN, ARN, nucleótidos, liposomas, productos sanguíneos, hormonas, sales de plata solubles en agua, factores de crecimiento, y combinaciones de los mismos.

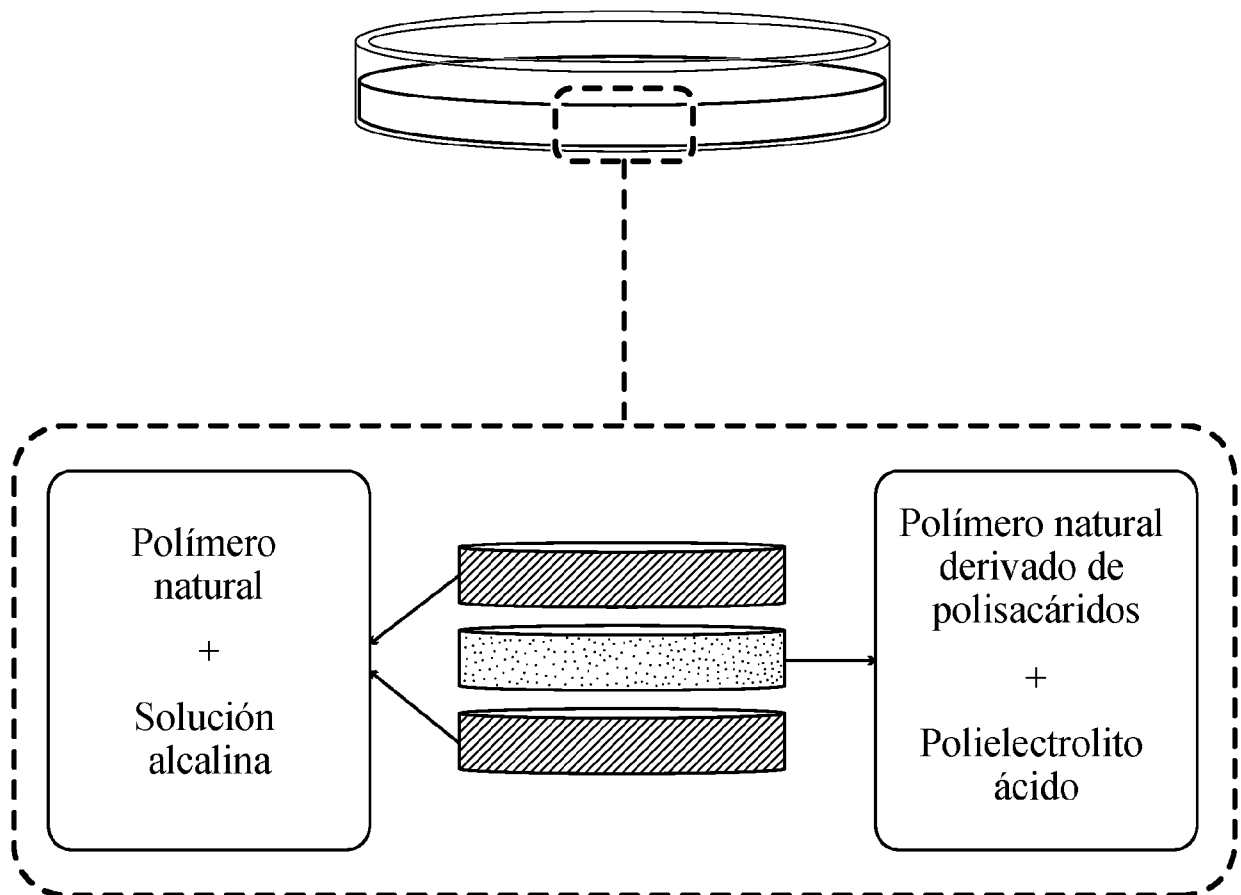


FIG. 1

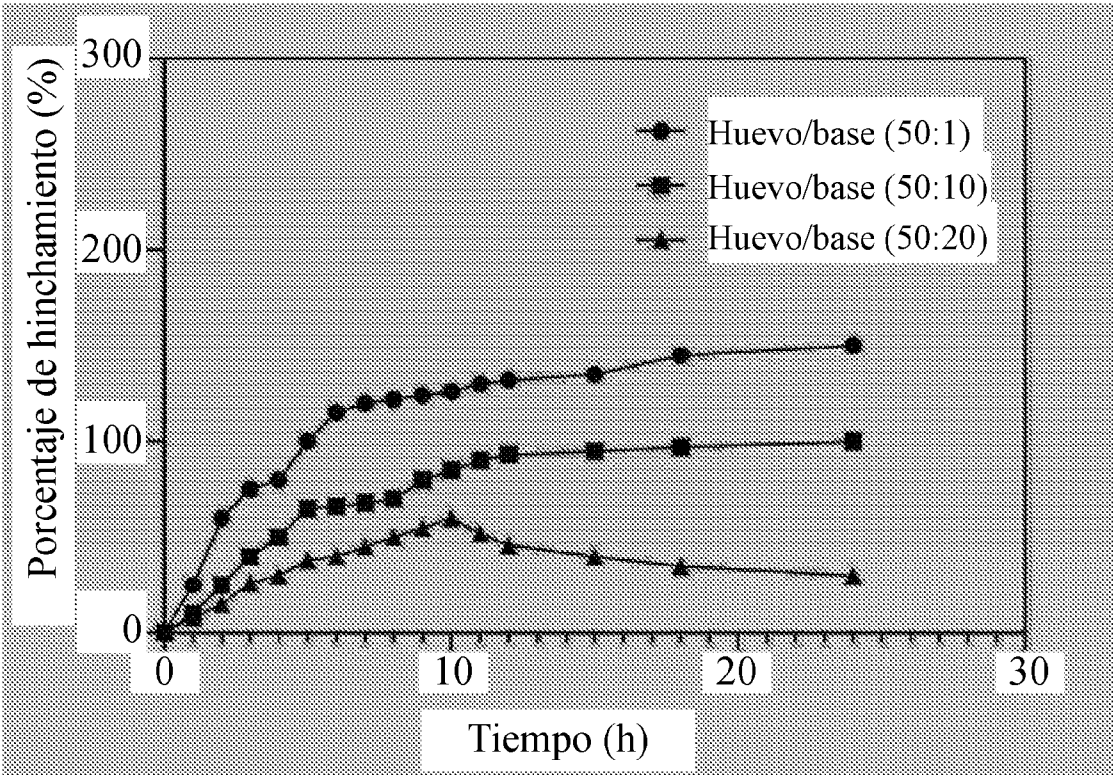


FIG. 2A

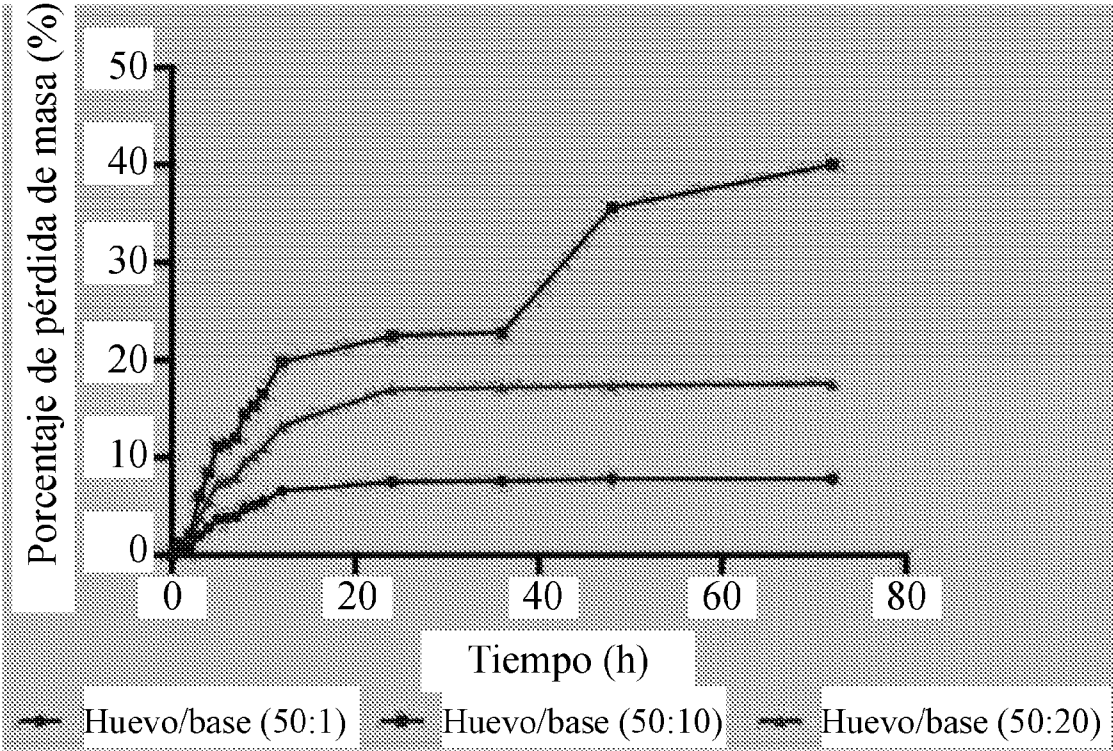


FIG. 2B

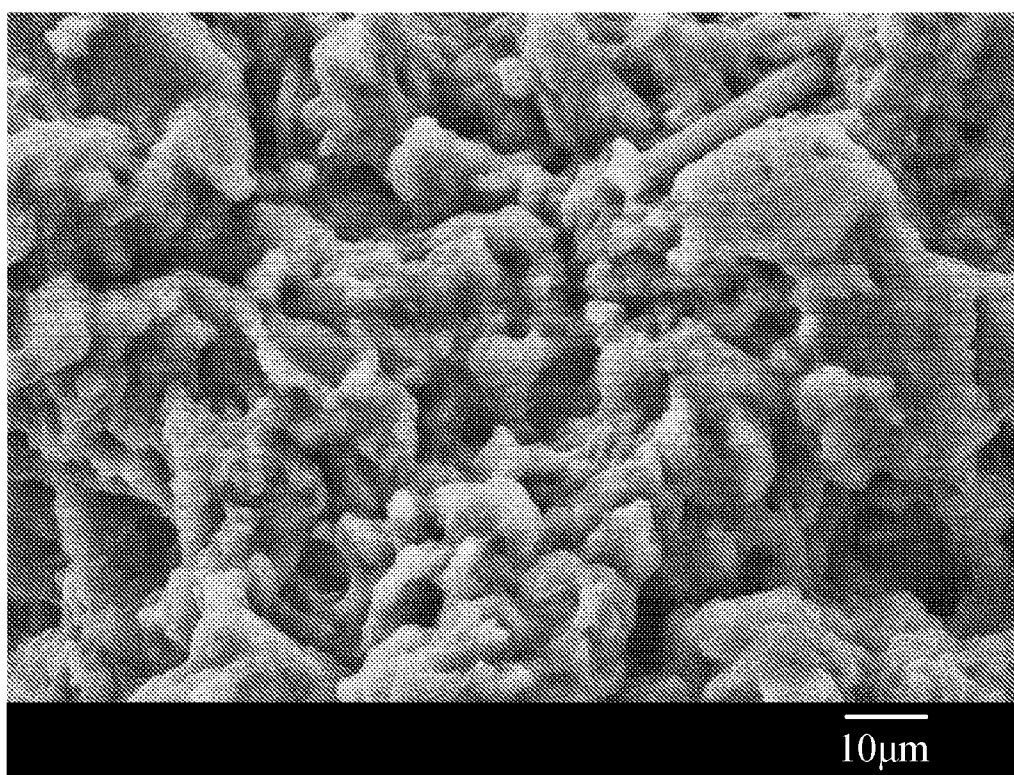


FIG. 2C

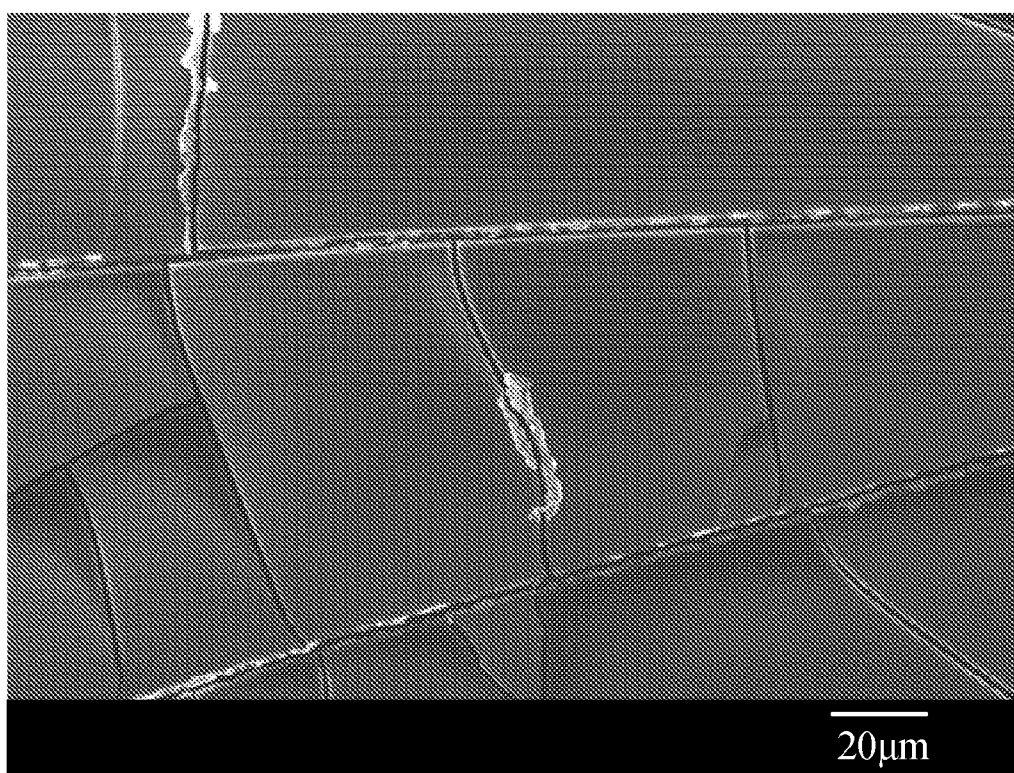


FIG. 2D

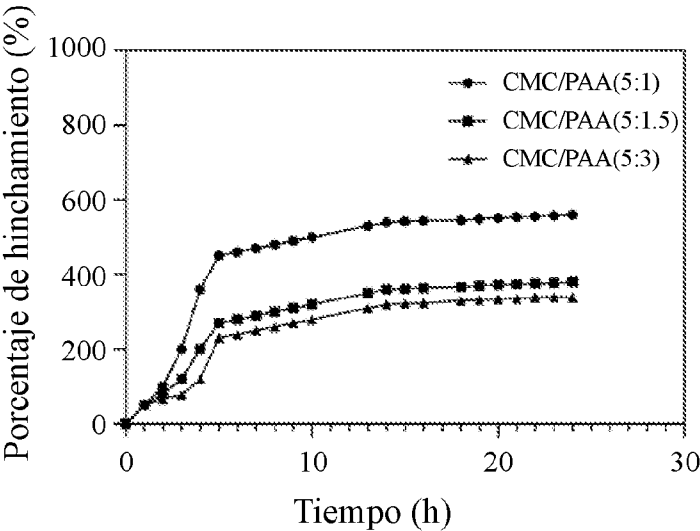


FIG. 3A

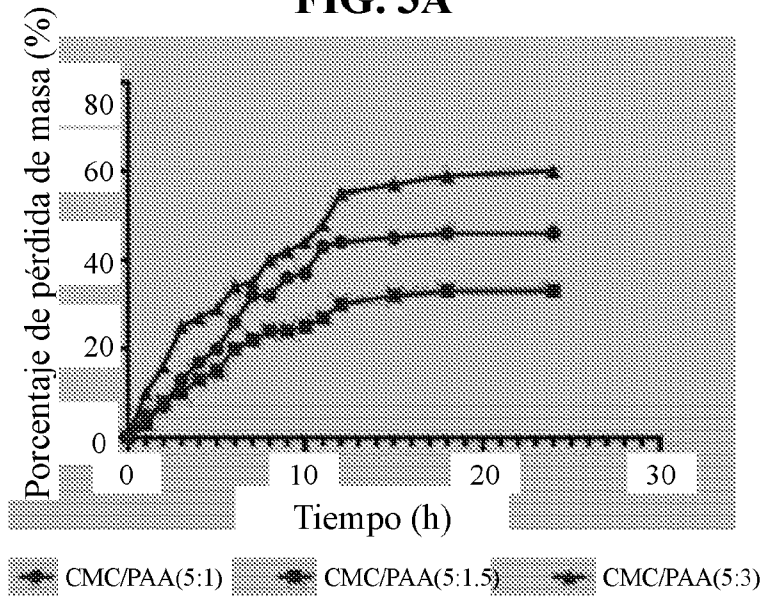


FIG. 3B

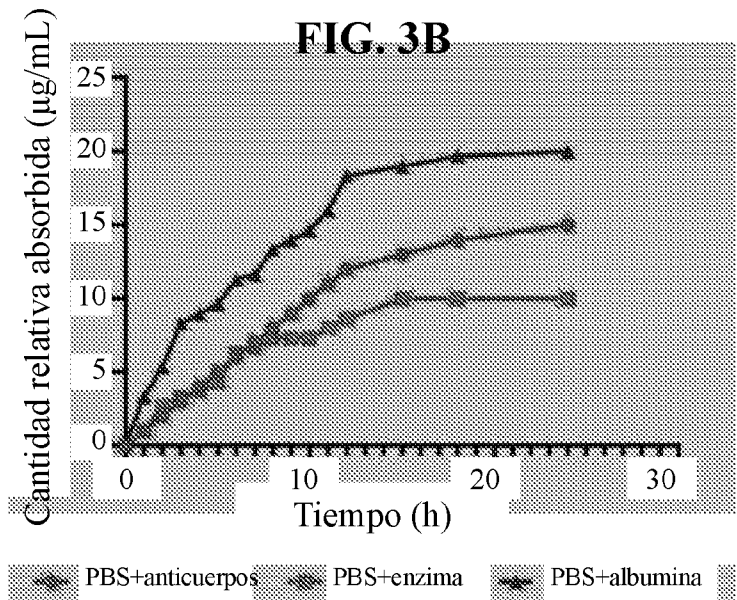


FIG. 3C

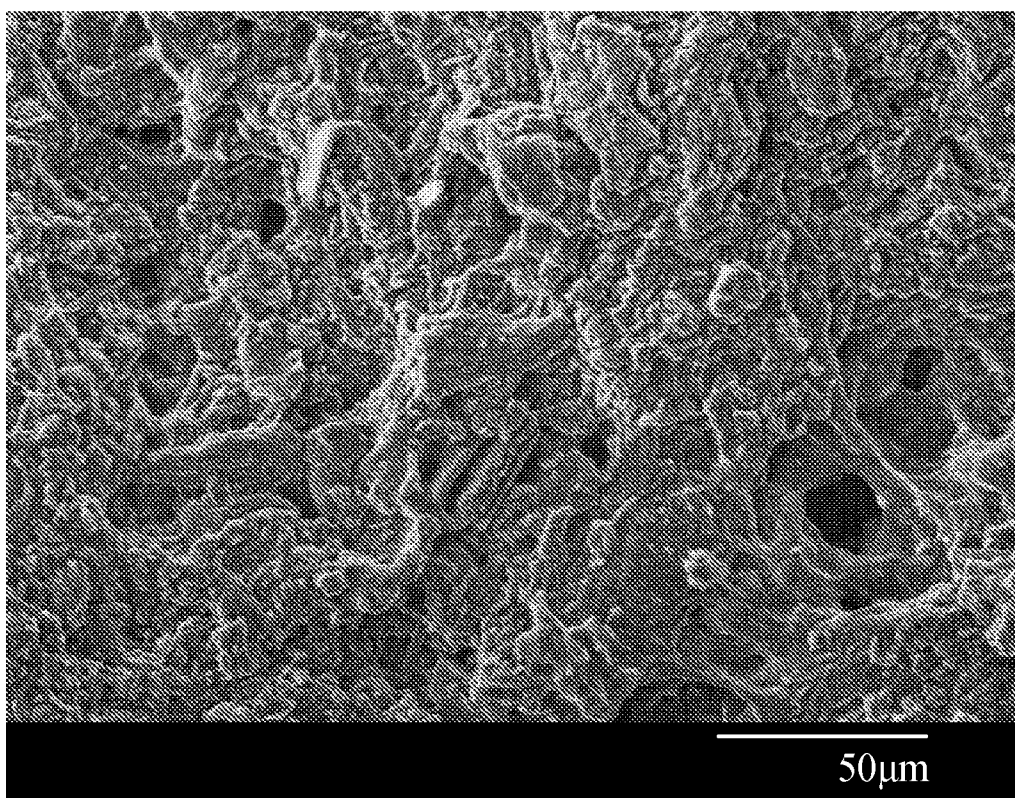


FIG. 3D

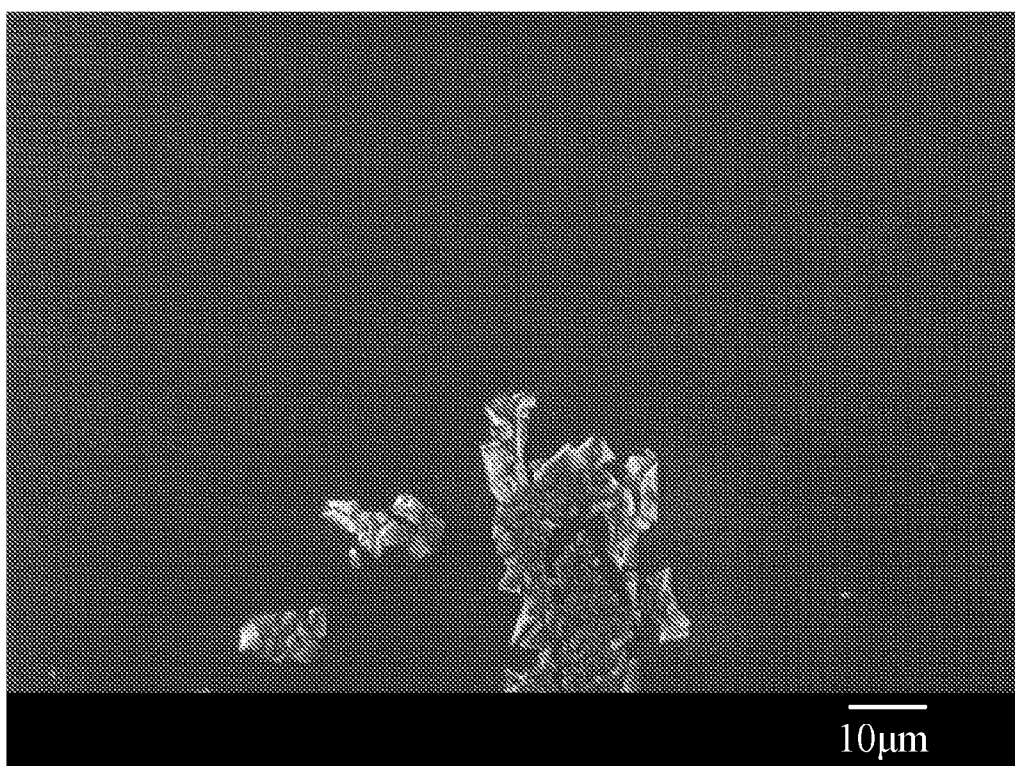


FIG. 3E

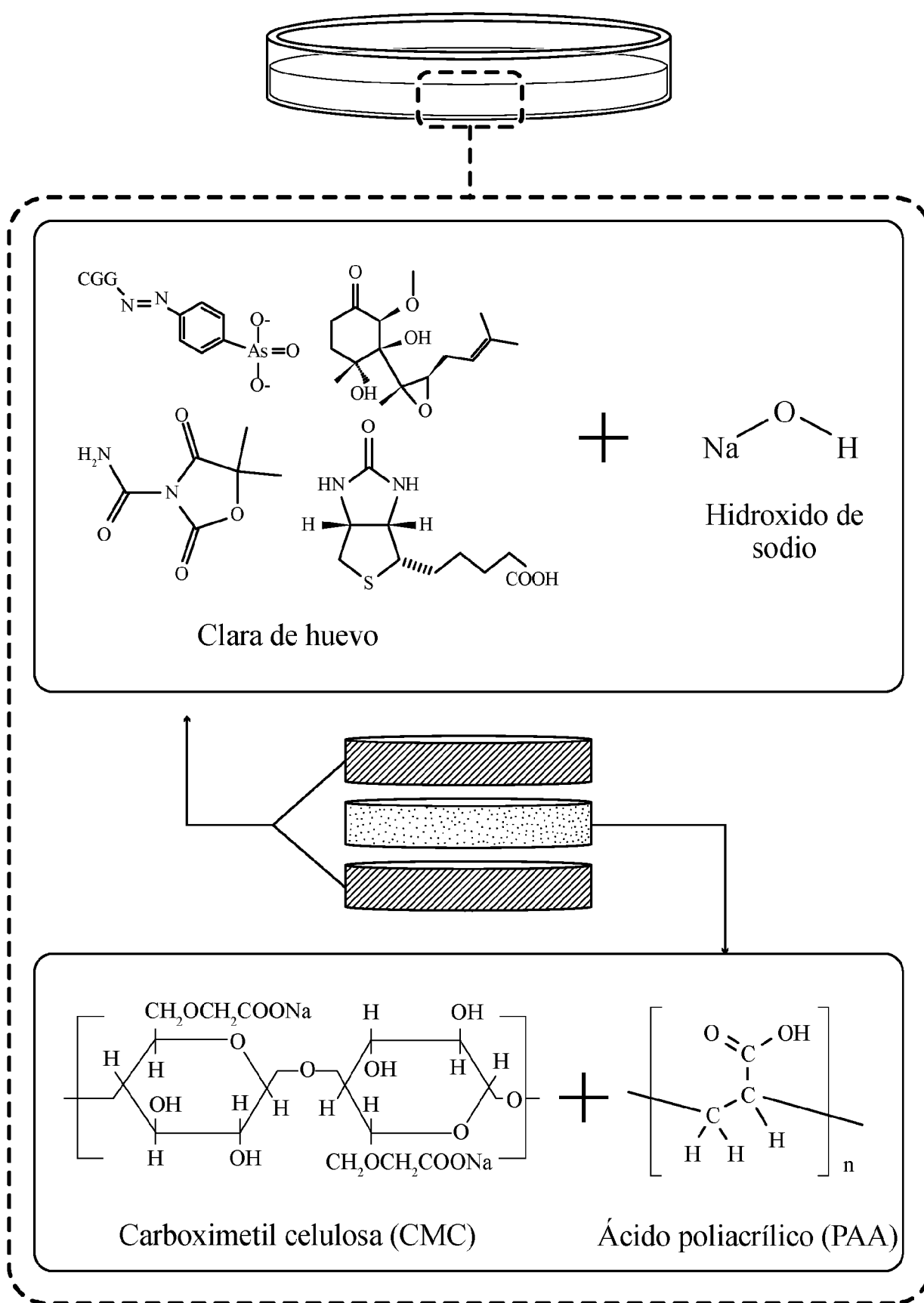


FIG. 4

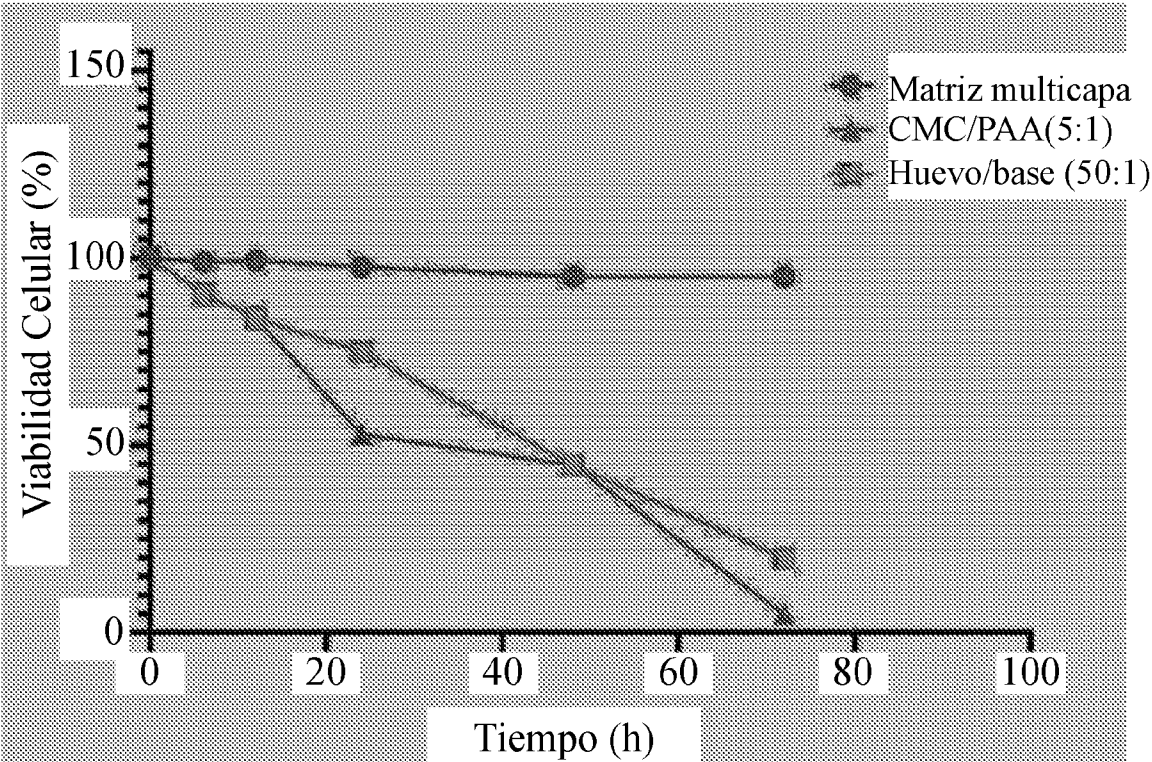


FIG. 5A

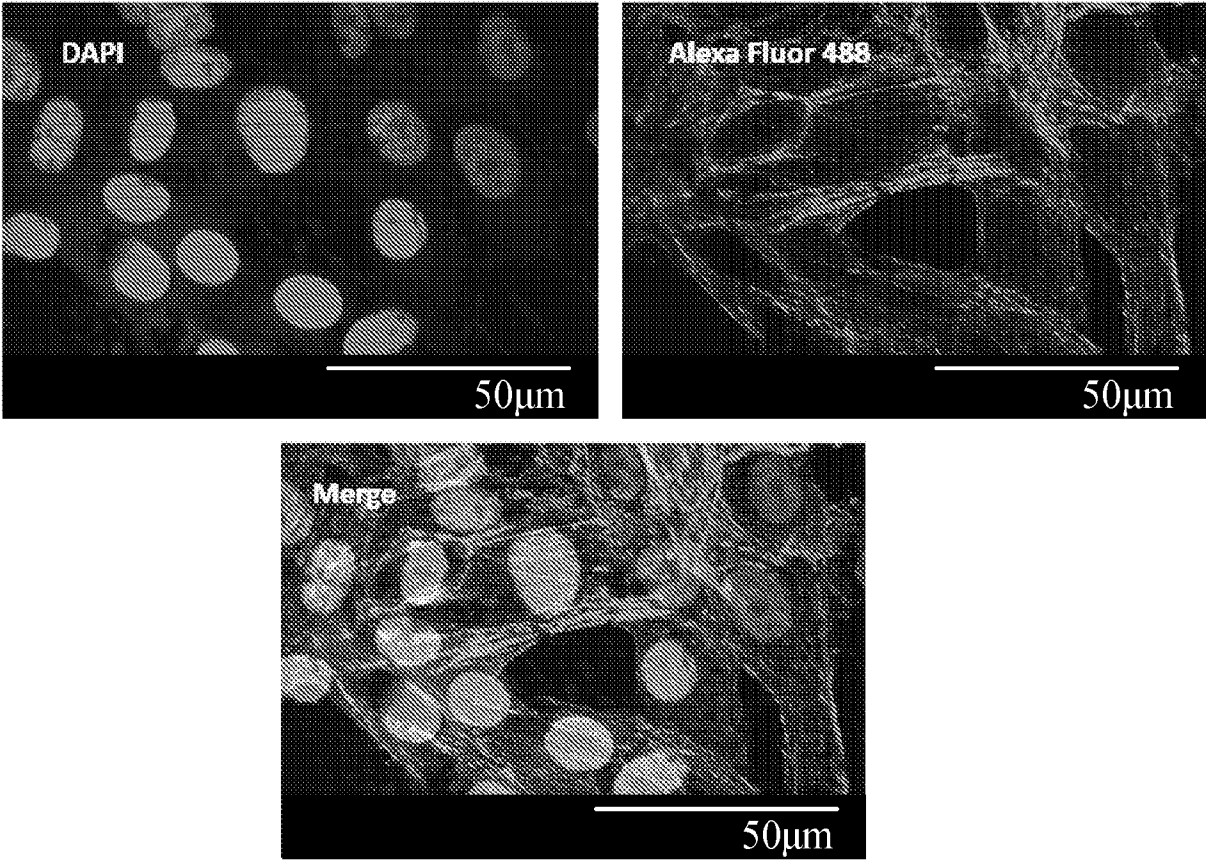


FIG. 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2021/057367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIP: B32B 9/02, 9/04, 23/14, C08B 37/04, C08L 1/00, 5/04, 5/08, C12N 1/22 (2021.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIP: B32B 9/02, 9/04, 23/14, C08B 37/04, C08L 1/00, 5/04, 5/08, C12N 1/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INAPI, BEIC, GOOGLE PATENTS/SCHOLAR, STN, ESPACENET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP2007215519A (FUJIFILM CORP) [30-08-2007] [The whole document]	1-18 19-20
X Y	Wittmer C. et al. Multilayer Nanofilms as Substrates for Hepatocellular Applications. Biomaterials. 2008 October ; 29(30): 4082-4090 DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.06.027 [The whole document]	1-6, 9-12, 15-18 19-20
Y	US2017166884A1 (WORCESTER POLYTECH INST) [15-06-2017] [The whole document]	19-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09/11/2021 09 NOVEMBER 2021

Date of mailing of the international search report

09/12/2021 09 DECEMBER 2021

Name and mailing address of the ISA/

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194

Facsimile No. Piso 17, Santiago, Chile

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/057367

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/0209188A1 (FASTTRACK MEDICAL SOLUTIONS LLC [US]) [30-07-2015] [The whole document]	
A	BORGES J. Layer-by-Layer Assembly of Light-Responsive Polymeric Multilayer Systems. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 5624–5648 DOI: 10.1002/adfm.201401050 [The whole document]	
A	BOUDOU T. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. Adv. Mater. 2010, 22, 441–467 DOI: 10.1002/adma.200901327 [The whole document]	
A	CA 2740597C (SOFRADIM PRODUCTION) [21-11-2017] [The whole document]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2021/057367

Patent document cited in the search report	Publication Date	Patent family member(s)	Publication Date
JP2007215519A	30-08-2007	None	
US2017166884A1	15-06-2017	US10731145B2 US2021171931A1 WO2017106512A1	04-08-2020 10-06-2021 22-06-2017
US2015209188A1	30-07-2015	US10307297B2	04-06-2019
CA2740597C	21-11-2017	AU2009305116A1 AU2009305116B2 CA2740597A1 EP2358410A2 EP2358410B1 US2011257666A1 US9272073B2 WO2010043980A2 WO2010043980A3	22-04-2010 06-11-2014 22-04-2011 24-08-2011 05-08-2015 20-10-2011 01-03-2016 22-04-2010 25-11-2010

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2021/057367

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP: B32B 9/02, 9/04, 23/14, C08B 37/04, C08L 1/00, 5/04, 5/08, C12N 1/22 (2021.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

CIP: B32B 9/02, 9/04, 23/14, C08B 37/04, C08L 1/00, 5/04, 5/08, C12N 1/22

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INAPI, BEIC, GOOGLE PATENTS/SCHOLAR, STN, ESPACENET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X Y	JP2007215519A (FUJIFILM CORP) [30-08-2007] [todo el documento]	1-18 19-20
X Y	Wittmer C. et al. Multilayer Nanofilms as Substrates for Hepatocellular Applications. Biomaterials. 2008 Octubre ; 29(30): 4082-4090 DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.06.027 [todo el documento]	1-6, 9-12, 15-18 19-20
Y	US2017166884A1 (WORCESTER POLYTECH INST) [15-06-2017] [todo el documento]	19-20

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
09/11/2021 09/noviembre/2021	09/12/2021 09/diciembre/2021

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile
N° de fax

Funcionario autorizado
CARTIER UGARTE, Denise
N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2021/057367

C (continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	US 2015/0209188A1 (FASTTRACK MEDICAL SOLUTIONS LLC [US]) [30-07-2015] [todo el documento]	
A	BORGES J. Layer-by-Layer Assembly of Light-Responsive Polymeric Multilayer Systems. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 5624–5648 DOI: 10.1002/adfm.201401050 [todo el documento]	
A	BOUDOU T. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. Adv. Mater. 2010, 22, 441–467 DOI: 10.1002/adma.200901327 [todo el documento]	
A	CA 2740597C (SOFRADIM PRODUCTION) [21-11-2017] [todo el documento]	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/IB2021/057367

Documento de patente citado en el Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
JP2007215519A	30-08-2007	Ninguno	
US2017166884A1	15-06-2017	US10731145B2 US2021171931A1 WO2017106512A1	04-08-2020 10-06-2021 22-06-2017
US2015209188A1	30-07-2015	US10307297B2	04-06-2019
CA2740597C	21-11-2017	AU2009305116A1 AU2009305116B2 CA2740597A1 EP2358410A2 EP2358410B1 US2011257666A1 US9272073B2 WO2010043980A2 WO2010043980A3	22-04-2010 06-11-2014 22-04-2011 24-08-2011 05-08-2015 20-10-2011 01-03-2016 22-04-2010 25-11-2010