

Client S.A. Capsugel
File 11A-43 940
EX-DT



28

420930

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España, sus territorios y plazas de soberanía, a favor de:

Professor Dr. Peter SPEISER

de nacionalidad suiza, domiciliado en Wassberg strasse 26, 8127 Forch, Suiza, relativa a:

"PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE MICROCAPSULAS DE MATERIAL POLIMERICO"

=====

Inventores: Peter Speiser y Gerd Birkenbach

Prioridad: Solicita de patente en Suiza no 072632/72 de fecha 4 diciembre 1972

ANULADO
PROHIBIDA LA CONSUMO
Y LA EXPORTACION
COTIZACION



BOA / COB

MEMORIA DESCRIPTIVA

- El objeto de la presente invención es la fabricación de novedosas cápsulas de materia plástica coloidosolubles en agua o suspendibles o coloidosolubles en medios hidrófobos
5. de material polímero de buena tolerancia, particularmente de gel de acrilamida y de N,N'-metilen-bis-acrilamida, o de gel de ácido acrílico y de éster metílico del ácido acrílico, de un orden de magnitud submicroscópica, predominantemente micelar, las cuales contienen material biológicamente o farmacodinámicamente activo, particularmente proteínas, antígenos,
10. sustancias farmacológicamente o terapéuticamente activas, o empero insecticidas, fertilizantes, colorantes, formadores de color, adhesivos y catalizadores u otras sustancias técnicamente activas en forma incluida y/o adsorbida. - - - - -
15. Se conoce bien la fabricación y la utilización de las microcápsulas conocidas con un diámetro dentro del margen de por ejemplo 0,1 - 1 mm que contienen sustancias líquidas o sólidas para su utilización en la medicina y en la técnica, como por ejemplo para su aplicación a través de la piel o de la
20. mucosa, para enmascarar el gusto de medicamentos amargos, para recubrimientos resistentes al jugo gástrico, para la protección de sustancias activas contra las influencias del medio ambiente o para el encapsulado de adhesivos que pueden ser acti-



vados por la presión o por la temperatura, para la fabricación de modos de aplicación de insecticidas con efecto depot y para el encapsulado de colorantes. El material de pared de estas microcápsulas consiste generalmente de material polímero o "polimérico", más o menos insoluble al agua, por ejemplo

- 5. gelatina o polímeros sintéticos. El microencapsulado puede efectuarse en este caso como recubrimiento estructural en calderas giratorias, platos, discos, cilindros, etc., así como en el lecho de capas fluidizadas o mediante condensación de pulverización. Un procedimiento corriente en la actualidad para la fabricación de microcápsulas es la llamada coacervación "simple" o "compleja" (J. Pharm. Sc., 59, 1367, (1970)), la cual se efectúa corrientemente en 4 etapas de procedimiento: - - - - -

- 15. a) Fabricación de una suspensión o emulsión de la substancia a encapsular en un líquido portador adecuado, el cual contiene ya el material de pared en forma disuelta. - -

- 20. b) Fabricación del material de pared en la forma de pequeñas gotitas en esta suspensión o emulsión mediante separación de fase o adición de otra fase, formándose en su caso un sistema de tres fases. - - - - -

- c) Recubrimiento de la fase a encapsular por las gotitas de material de fase de pared separadas en b). - - - - -

- 25. d) Solidificación de la envuelta que al principio se encuentra todavía en estado líquido. - - - - -



Durante la totalidad del proceso es necesario agitar con el fin de mantener estable el sistema de varias fases. La formación de las microcápsulas se efectúa en este caso por regla general mediante la coacervación de sistemas de gel, tal como está descrita por ejemplo en las patentes suizas Nº 330.500 y 373.633, en las memorias explicativas ("Auslegeschriften") alemanas Nº 1.256.194 - 1.256.196, en las patentes alemanas Nº 1.180.347, 1.185.585 y 1.189.050, en las patentes americanas Nº 2.800.457, 2.800.458, 3.155.590 y 3.190.837, en la patente británica Nº 1.016.839, en las patentes belgas Nº 699.324, 701.600 y 727.294 y en la memoria de declaración ("Offenlegungsschrift") alemana Nº 1.928.552. El tamaño de las partículas de las microcápsulas fabricadas según estos procedimientos varía entre un mínimo de algunas micras y varios centenares de micras y llega hasta varios milímetros. - - - - -

La aplicación de tales microcápsulas por ejemplo en la medicina está limitada a la administración oral, cutánea, epitelial y enteral. Un cometido substancial de la presente invención estriba, pues, en eliminar esta limitación en la aplicación medicinal y de crear además una forma de cápsula que posea ventajas substanciales para muchas aplicaciones. -

Con el fin de asegurar una administración parenteral, inclusive intravenosa, exenta de peligrosidad, de partículas terapéuticamente activas, debe reducirse el diámetro de sus partículas en el orden de magnitud entre las micras y



varios centenares de micras hasta muy pocos centenares de nanómetros (10^{-9} metros). Esto representa una reducción de 100 a 10.000 veces en comparación con las cápsulas conocidas. Se entiende que para ello se haya tenido que inventar y aplicar un procedimiento fundamentalmente nuevo, con el fin de que resulten partículas con un diámetro que se encuentre en un orden de magnitud inferior a 200 nanómetros predominantemente inferior a los 80 nanómetros. - - - - -

5.

Se pueden obtener partículas de polímeros con un diámetro entre 10 micras y 2 mm mediante polimerización de suspensión según el procedimiento de la patente alemana Nº 1.081.228. - - - - -

10.

Las partículas de materia plástica más pequeñas conocidas hasta ahora se obtienen mediante polimerización de emulsión, en donde el monómero generalmente insoluble en agua es emulsionado en fase acuosa, no efectuándose sin embargo la polimerización propiamente dicha en las gotitas del monómero sino en la fase acuosa, obteniéndose al final una dispersión acuosa de partículas de polímero de forma esférica (partículas de latex) con un diámetro de aproximadamente 100 hasta varios miles de nanómetros (Fikentscher et al, *Angewandte Chemie* 72, páginas 856-864 (1960); Harkins, *Journal of Polymer Science*, Vol. V, No. 2, páginas 217-251 (1950)). - - - - -

15.

20.

25.

Las partículas obtenidas mediante la polimerización de suspensión ni las obtenidas mediante la polimerización



28 NOV. 1973

de emulsión son suficientemente pequeñas para ser coloido-
solubles en el agua, mientras que en cambio las microcápsu-
las del orden de magnitud micelar pueden formar en el agua
una solución coloidal estable. - - - - -

- 5. En virtud de la ciencia y de los descubrimientos de la polimerización de emulsión, se ha desarrollado ahora un nuevo método de polimerización dirigido hacia el orden de magnitud micelar, el cual conduce a las microcápsulas según la invención, las cuales son de un material polímero, preferentemente un gel hidrófilo de acrilamida polimerizada, ácido acrílico y/o sus derivados y que presentan un diámetro en el orden de magnitud nanométrico de 20 - 200 nm preferentemente inferior a los 80 nm y son coloidalmente solubles en agua y contienen sustancias activas en forma incluida y/o adsorbida. El polímero posee preferentemente una estructura porosa. - - - - -
- 10.
- 15.

Estas cápsulas micelares pueden fabricarse porque se disuelven auténticamente en agua o por lo menos coloidalmente de manera conjunta moléculas hidrosolubles en condiciones de poderse polimerizar y el material que debe incluirse en las mismas, por ejemplo la sustancia biológicamente o farmacodinámicamente activa. Esta solución acuosa se distribuye mediante agitación en un líquido hidrófobo, el cual forma una fase, dentro de la cual los monómeros de materia plástica y las sustancias activas son difícilmente solubles o insolubles, con ayuda de sustancias auxiliares

- 20.
- 25.



28 NOV

5. tensoactivas (agentes tensioactivos). Diminutas micelas, que contienen los monómeros en condiciones de polimerización, las sustancias activas y eventualmente otras sustancias auxiliares, se encuentran solubilizados entonces en un volumen relativamente grande de la fase hidrófoba y forman los más pequeños espacios de reacción para la subsiguiente polimerización de los monómeros. La polimerización puede iniciarse mediante métodos de por sí conocidos, como los descritos por ejemplo en la patente alemana Nº 1.081.228 o en las patentes americanas Nº 2.880.152 y 2.880.153. La polimerización se encuentra predominantemente limitada en este caso a los espacios micelares, debido a que la fase principal hidrófoba no contiene material polimerizable, estando también ampliamente evitada una difusión de monómeros en esta fase y a través de la misma. - - - - -

20. Para el recubrimiento de sustancias que no sean hidrosolubles, el sistema puede modificarse de tal manera que una fase lipófila es solubilizada con el material disuelto y monómeros solubles en aceite dentro de un líquido hidrófilo, generalmente agua. En este caso, la difusión de monómeros resulta ampliamente evitada por la fase hidrófila. - -

25. Al contrario de la polimerización de emulsión, en la que en la mayoría de los casos se polimerizan en agua monómeros que no son hidrosolubles, y en la que las gotitas de emulsión polimerizantes con contenido de radical pueden hincharse hasta alcanzar un múltiple de su tamaño original



- debido a la difusión de monómeros almacenados en las gotitas de emulsión presentes en las partículas crecientes de polímero-monómero (partículas de latex) - la "polimerización micelar" según la invención está limitada estrictamente a
5. los monómeros contenidos en las micelas. Por este motivo, las partículas permanecen extremadamente pequeñas. Mediante la variación de monómeros y reticulantes, cuya concentración corresponde a la clase de polimerización y catalizadores en proporción a la fase hidrófoba respecto a la fase acuosa, y
10. mediante la elección de los agentes tensioactivos como formadores de micelas, puede conseguirse dentro de las micelas una reticulación controlada, una estructura variable de polímero y con ello un influjo sobre el encapsulado específico del material activo. - - - - -
15. Después de haberse terminado la polimerización se diluye el residuo sólido mediante un disolvente adecuado - generalmente con un alcohol acuoso, por ejemplo metanol - por la eliminación o la condensación de la fase externa, por ejemplo mediante destilación, ultrafiltraje o centrifugación,
20. precipitándose debido a ello por lo general las partículas de polimerizado formadas, las cuales se separan y se obtienen a continuación mediante filtrado o centrifugación de las sustancias acompañantes solubles y del emulgente. - - - - -
25. Alternativamente, después de ajustar la solución separada por polimerización a un contenido adecuado de disolvente, la suspensión que se ha producido puede ultrafiltrarse



28 NOV.

también directamente y aislarse el polimerizado. El producto obtenido muestra en los dos casos en disolventes adecuados nuevamente un comportamiento coloidal. Consiste, tal como se desprende de imágenes obtenidas mediante óptica electrón-

- 5. nica y de ensayos de liberación con globulina gamma como material de trabajo, marcada radiactivamente e introducida por polimerización, de bolitas de polímero con unas dimensiones inferiores a los 200 nanómetros, preferentemente inferiores a los 80 nanómetros, en donde el material activo es
- 10. incluido y/o adsorbido. - - - - -

El nuevo procedimiento para la fabricación de las microcápsulas dentro del orden de magnitud nanométrico, las cuales contienen sustancias biológicamente o farmacodinámicamente activas o técnicamente utilizables, está caracterizado según la invención por las siguientes etapas de procedimiento: - - - - -

- 15.
- 1. Las sustancias auxiliares tensioactivas con acción emulgente, las cuales posibilitan la solubilización de agua y de soluciones acuosas o de material lipófilo - en disolventes adecuados, en su caso - en un líquido hidrófobo, o en un líquido hidrófilo, respectivamente, se disuelven en el líquido correspondiente que debe formar la fase hidrófoba o hidrófila. - - - - -
- 20.
- 25. 2. A la solución obtenida se adiciona mediante agitación agua y el material activo a incluir o la solución acuosa del material activo o el material lipófilo activo, y a



- continuación se introducen los monómeros del polímero polimerizador. En este caso se utilizan para su empleo en la terapia monómeros de los que resulta un polímero de buena tolerancia. Como monómeros hidrosolubles pueden utilizarse particularmente acrilamida y N,N'-metilen-bis-acrilamida y como monómeros liposolubles preferentemente ácido acrílico + éster metílico del ácido acrílico. En esta etapa del procedimiento puede procederse también, en su caso, de manera que se introduce primero mediante agitación solamente agua y monómeros en el líquido hidrófobo con contenido de emulgente o se introduce un disolvente lipófilo y monómeros lipófilos en el líquido hidrófilo con contenido de emulgente, y sólo después se añade a la solución obtenida la solución concentrada, coloidal, acuosa u oleosa, en su caso, del material activo que se desea incluir. - - -
5. 3. Los monómeros disueltos en las micelas solubilizadas con contenido acuoso u oleoso se polimerizan a continuación de modo de por sí conocido - según la técnica de polimerización a emplear -, pudiendo controlarse el curso de la polimerización mediante el titraje del contenido de monómero. - - - - -
10. 4. Terminada la polimerización, el polimerizado obtenido con el material activo encerrado y adsorbido es aislado, en su caso después de eliminar la parte principal del líquido de la fase exterior, es decir, de la fase
15. 25.



continua, por ejemplo mediante separación por destilación en vacío, mediante ultrafiltraje o centrifugación. Mediante el adiconamiento de disolventes adecuados, preferentemente de alcohol acuoso, o por precipitación mediante sales, también puede separarse el producto por el método de precipitación.-

5.

Se ha observado que como líquidos para la fase hidrófoba los más adecuados son n-alcános de cadena relativamente corta. Son prácticamente insolubles en agua, óptimos para la solubilización del agua y no representan por sí mismos ningún disolvente para los monómeros elegidos y las sustancias biológicamente activas en cuestión, como fármacos o el otro material activo, que hay que incluir. Son además inertes, atóxicos y pueden volver a separarse fácilmente del producto obtenido. - - - - -

10.

Son particularmente adecuados los n-alcános que presentan bajo vacío un punto de ebullición inferior a 0°C; son sobre todo n-hexano y n-heptano. - - - - -

15.

Punto de ebullición en 20 a:

	10 Torr	40 Torr	100 Torr
n-hexano	- 25	- 2,3	15,8
20. n-heptano	- 2,1	+ 22,3	41,8
agua	+ 11,3	34,1	51,6

Se ha observado, además, que la combinación de un emulgente adecuado no ionógeno con un emulgente ionógeno conduce a una solubilización substancialmente mejor de la fase acuosa.

25. Con ayuda de la combinación puede solubilizarse una cantidad



substancialmente mayor de agua con un contenido total inferior de emulgente en la fase hidrófoba orgánica. - - - - -

5. Como emulgentes no ionógenos se han acreditado los poliglicoléteres de alcoholes grasos, por ejemplo polietilena-lauriléter con un promedio de 4 etilénóxido en la cadena, y como emulgente ionógeno las sales alcalinas de los ésteres bis-alquilos altos del ácido sulfosuccínico, por ejemplo la sal sódica del éster bis-2-etilhexilo del ácido sulfosuccínico. - - - - -

10. Para incluir sustancias activas lipófilas se ha acreditado una mezcla solubilizada de Tween 80, es decir, polioxietilensorbitanmonocoleato, en por ejemplo etiloleato, parafina, aceite de ricino u otros ésteres de ácidos grasos con derivados del ácido acrílico como monómeros, preferentemente ácido acrílico o éster metílico del ácido acrílico, así como, en su caso, por ejemplo derivados de vinilo en agua. - - - - -

20. La polimerización de los monómeros se lleva a cabo mediante métodos de por sí conocidos, después del adición de catalizadores o de iniciadores de polimerización o mediante radiación o mediante la combinación de métodos físicos con métodos químicos, como los descritos por ejemplo en las patentes americanas N° 2.875.047, 2.880.152 y 2.880.153 y en la patente alemana N° 1.081.228. - - - - -

25. En la elección del procedimiento de polimerización y particularmente en la dosificación de las medidas corres-



28 NOV 1957

- pondientes hay que tener en cuenta, sin embargo, el material que se desea incluir. Este material no debe resultar perjudicado en una extensión notable por el procedimiento empleado. Para este fin hay que efectuar determinadas adaptaciones del procedimiento en casos individuales. Así hay que tener en cuenta que el material biológico, por ejemplo antígenos, consiste de proteínas sensibles, las cuales pueden ser destruidas al calentarlas por encima de los 55°C, a un pH inferior al 2,5 o por la acción de oxidantes de que consisten los catalizadores corrientes de polimerización. - - -
- 5.
- 10.

- Se ha observado, además, que en estos casos las proteínas solamente resultan dañadas de manera mínima si la polimerización se efectúa potestativamente según uno de los procedimientos que se indican a continuación. Un método adecuado es la radiación γ , por ejemplo mediante una fuente de ^{60}Co , siendo suficientes por regla general 0,3 grados. En este caso, si se trata de material no sensible a la oxidación, se puede utilizar también un formador de radical hidrosoluble, por ejemplo un persulfato, como catalizador de polimerización. Entonces, la radiación con luz visible conduce a la polimerización, siendo adecuada, por ejemplo, una bombilla incandescente de 300 wattios durante 7 horas aproximadamente y adición de riboflavina (0,01% aproximadamente) como sensibilizador y en su caso el adición de persulfato sódico. En el caso de tolerancia a los rayos ultravioletas también puede polimerizarse con luz ultravioleta; en este caso la proteína solubilizada hasta actúa como acelerador respecto al tiempo de polimerización. La dura-
- 15.
- 20.
- 25.



ción de la radiación ultravioleta con lámpara de inmersión de 70 vatios con una longitud de onda predominante de 366 nanómetros es de 45 minutos aproximadamente en la presencia de proteína, en caso contrario 3 horas aproximadamente. Todas estas clases de polimerización exigen una atmósfera de nitrógeno y pueden efectuarse a $30^{\circ} \pm 5^{\circ}$ y con pH a elegir.

5. Cuando se ha efectuado la polimerización, el líquido de la fase hidrófoba puede eliminarse mediante destilación bajo vacío, en el caso de que la presencia de la misma representase un inconveniente en la ulterior elaboración. Se forma un azeotropo del líquido hidrófobo utilizado, por ejemplo de n-hexano y agua, el cual permite una destilación muy cuidadosa a la temperatura ambiente interior o según el vacío ya a 0°C . La obtención de las cápsulas de micelas con material activo incluido en las mismas se efectúa en los casos de sustancias activas no sensibles generalmente de manera directa mediante separación por precipitación con disolventes orgánicos, mezclables con agua, como por ejemplo metanol, y a continuación ultrafiltraje o filtraje a través de filtros de membrana y, en caso deseado, secado bajo vacío del residuo filtrado. Alternativamente también es posible la separación del producto mediante centrifugación. - -

10. En la presencia de por ejemplo proteínas inestables se efectúa la separación en frío con metanol acuoso (40 % V/V) y a continuación se efectúa mediante un filtro de membrana un ultrafiltraje bajo sobrepresión. Hacia el final del filtraje - después de la eliminación completa de los emulgen-

15. 20. 25.



tes, de la fase hidrófoba y de la mayor parte de la solución metanólica - se diluye el residuo filtrado con agua a un contenido de metanol del 5% aproximadamente y a continuación se efectúa la liofilización. - - - - -

5. Las ventajas del procedimiento según la invención estriban sobre todo en que en comparación con los procedimientos conocidos se obtiene un producto que presenta cápsulas con un tamaño de partículas 100 a 10.000 veces menor. El producto muestra la más estrecha distribución de diámetros de las partículas y presenta bajo el microscopio electrónico la imagen de una acumulación de partículas de materia plástica homogéneas, de forma esférica, de unas dimensiones aproximadamente iguales. El diámetro de las partículas polímeras (vaporizados con oro para el procedimiento Electron-Scanning) se encuentra por término medio en los 800 Å (80 nm) tal como muestran las fotografías del scanning. El límite inferior del diámetro de las partículas es de 350 - 200 Å (30 - 20 nm) tal como ha mostrado un filtraje de prueba mediante filtros de membrana del tipo Sartorius SM 11530, Membranfilter GmbH, 34 Göttingen, con un diámetro medio de poros de 350 - 200 Å. Las partículas consisten de la estructura del polímero, la cual rodea mecánicamente las sustancias activas y/o las retiene por adsorción, en cuyo caso - según la polaridad, constante dieléctrica y circunstancias estéricas de los elementos de reacción - se obtiene una estructura más o menos en forma de envoltura del polímero o empero también partículas llenadas pero porosas. De-
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



- bido a las dimensiones extremadamente pequeñas de las partículas, las cápsulas de micelas obtenidas con el material activo incluido y adsorbido son coloidosolubles en agua. Esto abre perspectivas completamente nuevas en la aplicación de sustancias terapéuticamente activas. Este método permite particularmente una administración parenteral exenta de peligro, inclusive bajo las circunstancias de la inyección intravenosa, de material biológicamente y farmacodinámicamente activo, en cuyo caso, según la elección de las
5. proporciones de las cantidades entre la substancia portadora y el material activo, una parte más o menos grande del material activo es incluido y adsorbido con mayor o menor intensidad en la estructura reticular de las micelas polimerizadas, o puede encontrarse también parcialmente libre y por
10. lo tanto con actividad inmediata. Con ello se posibilita una terapia controlada de larga duración mediante una sola aplicación, en cuyo caso el organismo se carga siempre solo con un mínimo de producto biológicamente o farmacodinámicamente activo. Además, bajo determinadas condiciones, el material
15. recubierto de forma reticular puede actuar también directamente; esto rige particularmente para los antígenos. De este modo puede conseguirse muy particularmente en vacunas un efecto adyuvante óptimo. Al organismo se le ofrece durante un tiempo muy largo una cantidad extremadamente pequeña de
20. antígenos, mediante lo cual el sistema reticuloendotelial es estimulado continuamente para la formación de anticuerpos. De ello resulta una titración estable elevada de anti-
25. cuerpos y como efecto final una inmunidad de larga duración.



- No todos los materiales activos discretionales - proteina, fármacos, insecticidas, fertilizantes, colorantes - son adecuados del mismo modo para su inclusión en las estructuras reticulares de micelas obtenidas según la invención. Son condición previa para ello un determinado tamaño molecular y especialmente la capacidad de poder formar soluciones por lo menos coloidales, acuosas u oleosas, debido a que en la fabricación la inclusión se efectúa en las microcápsulas cuando las substancias activas se encuentran en las micelas. Son bien adecuadas substancias que sean todavía por lo menos coloidalmente hidrosolubles u oleosolubles con pesos moleculares hasta 150.000 aproximadamente. - - -
- 5.
- 10.

- In vitro pudo observarse para el caso de globulina gamma humana en cápsulas micelares durante una duración de 50 días en una solución tampón de fosfato agitada a 37°C una liberación invariable desde el comienzo de la medición de solamente el 20% aproximadamente de la globulina gamma, lo cual demuestra que la mayor parte de la substancia activa estaba bien encapsulada. - - - - -
- 15.

- Por otra parte, los resultados obtenidos con globulina gamma en el ensayo de inmunización in vivo con cobayos demuestran que se obtienen muy pronto titraciones de anticuerpos muy elevadas y de duración relativamente larga. - - - -
- 20.

- En las tablas que siguen a continuación, se muestran los resultados de ensayos comparativos con adyuvante corriente de óxido de aluminio (Tabla 1) y con adyuvante completo
- 25.



de Freund (Tabla 2) mediante la utilización de globulina gamma humana. La Tabla 3 muestra titraciones de antitoxina como las conseguidas después de la inmunización de cobayos con diferentes preparados de toxoide de tétanos. - - - - -

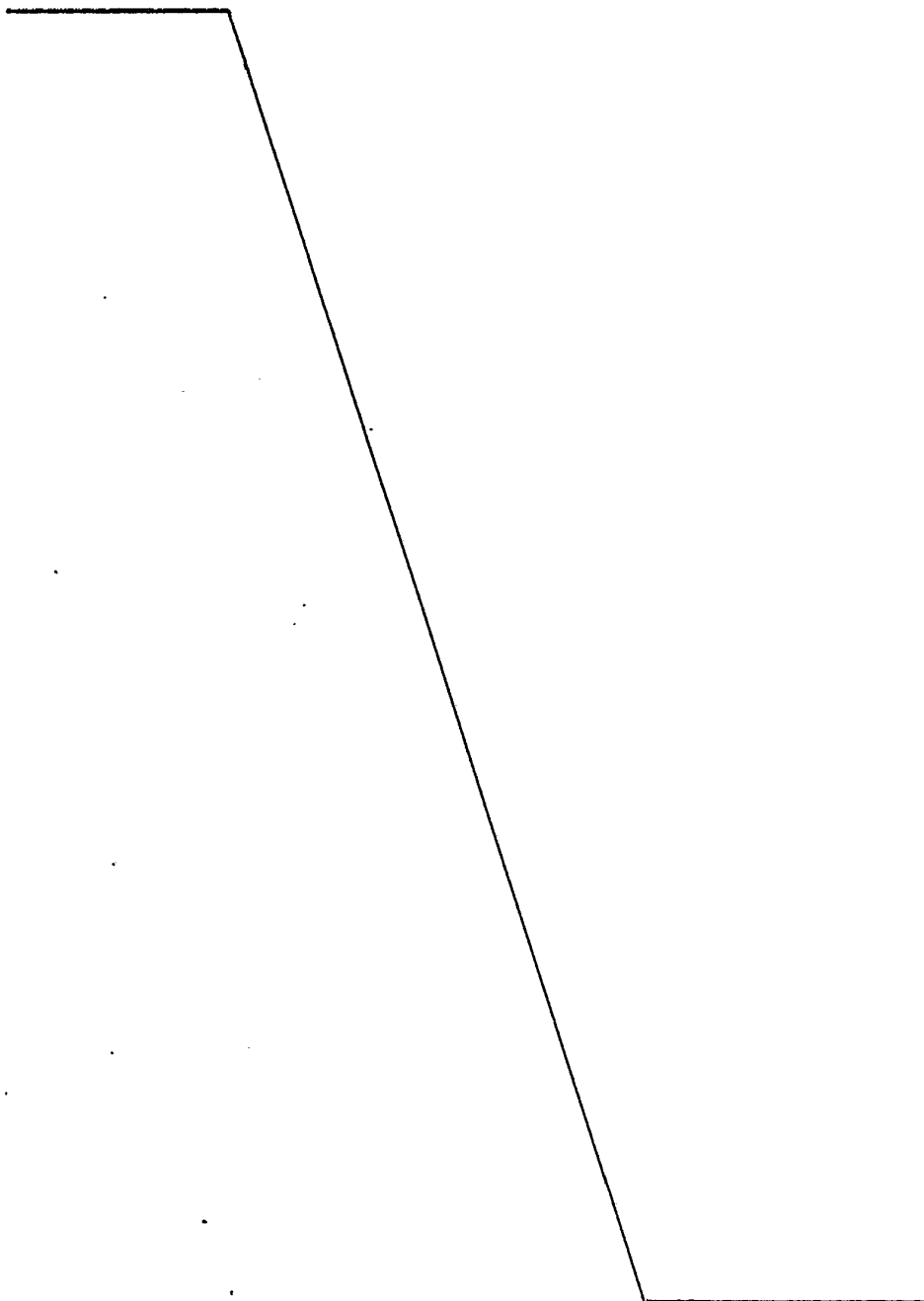


Tabla 1

Grupo	Preparado	Dosificación (en relación con IgG)	Esquema de vacunación (vacunación stage)		Titulación media (microtécnica de hemaglutinación) Número de animales / desviación standard					Comentario	
			0	14	22	72	1ª hemorragia	2ª hemorragia	3ª hemorragia		4ª hemorragia
1	Material inicial IgG	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 2,2 8 /	I : 6,4 8 / 40	I : 1,2 8 / 61	I : 6,1 8 / 736	Booster 1-3 como vacunación primaria
2	Material inicial IgG	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 2 10 /	I : 9,1 10 / 1,6	I : 1,4 7 / 1,2	I : 4,4 7 / 56	
3	Material inicial IgG + óxido de aluminio (4 mg/ml)	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 32 8 /	I : 3,6 7 / 46	I : 2,1 6 / 11	I : 113 6 / 5,6	
4	IgG introducido por polimerización	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 3,5 4 /	I : 3,4 3 / 1,5	I : 3,4 3 / 1,5	I : 170 3 / 1,7	
5	IgG introducido por polimerización	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 3,3 4 /	I : 81 3 / 8,4	I : 8 1 /	I : 571 1 /	1. Booster como vacunación primaria
6	IgG introducido por polimerización	0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 2,4 5 /	I : 88 5 / 13	I : 8,2 5 / 7,6	I : 256 2 / 0	1. Booster con material inicial IgG
7	IgG introducido por polimerización	1 mg/kg	+	+	+	+	I : 95 5 /	I : 37 5 / 25	I : 26 5 / 6,3	I : 1740 4 / 6,0	
8	IgG introducido por polimerización	1 mg/kg	+	+	+	+	I : 64 5 /	I : 320 5 / 1,3	I : 16 4 / 1,4	I : 85 4 / 23	1. Booster como vacunación primaria
9	IgG introducido por polimerización	1 mg/kg	+	+	+	+	I : 128 5 /	I : 287 4 / 13	I : 27 3 / 1,5	I : 512 1 /	1. Booster 0,3 mg/kg material inicial
10	IgG introducido por polimerización Material inicial IgG	1 mg/kg 0,3mg/kg	+	+	+	+	I : 256 9 /	I : 23 8 / 1,4	I : 16 6 / 1,1	I : 324 7 / 8,8	

Inmunización de cobayos (subcutánea) con preparados de IgG. Hemorragias los días 14, 21, 35, 56 y 83, inyección Booster a continuación = || , inyección Booster el día 72 con 1 mg/Kg de material inicial IgG.



28 NOV. 1973

Tabla 2

Grupo	Preparado	Dosis (en relación con IgG)	Esquema de vacunación (vaccination stage)	Titulación media (microtécnica de hemaglutinación) Número de animales / desviación standard				Comentario
				1ª hemorragia	2ª hemorragia	3ª hemorragia	4ª hemorragia	
11	Material inicial IgG	1 mg/kg	0 + 21 +	I : 2,5 15 / 9,0	I : 6,5 14 / 6,4	I : 31 13 / 5,8	I : 7 9 / 4,4	Booster 1mg/kg material inicial
12	Material inicial IgG + completo de Freund 1:1	1 mg/kg	0 + 21 +	I : 51 20 / 60	I : 272 17 / 5,3	I : 1954 14 / 4,8	I : 930 10 / 4,6	Booster 1mg/kg material inicial
13	Polímeros de micelas (116 mg) Material inicial IgG	1 mg/kg	0 + 21 +	I : 3 15 / 3,6	I : 3,7 13 / 6,0	I : 33 12 / 2,0	I : 2 11 / 13	Booster 1mg/kg material inicial

Inmunización de cobayos (intramuscular) con preparados IgG. Hemorragias el día 10, 20, 30 y 60, a continuación inyección Booster = 1.

28 NOV



Tabla 3

Grupo	Preparado	Dosisificación (toxoide)	Titración de antitoxina IE/ml (determinación de la dosis L+ en ratones) (número de los animales en el pool)		
			1ª hemorragia	2ª hemorragia	3ª hemorragia
14	Toxoide de tétanos in- troducido por polime- rización	5 Lf	>0,01 <0,05 (5) >0,05 <0,1 (4) >0,05 <0,1 (5) >0,01 <0,05 (5)	>2,0 <5,0 (5) >5,0 <10,0 (5) >1,0 <5,0 (4)	ca. 2,0 (5) >2,0 <5,0 (4) >2,0 <5,0 (4)
15	Toxoide de tétanos in- troducido por polime- rización	50 Lf	>2,0 <5,0 (4) >2,0 <5,0 (5) >5,0 <10,0 (4) >2,0 <5,0 (4)	ca. 10,0 (5) >10,0 <20,0 (4) >5,0 <10,0 (4)	>5,0 <10,0 (6) >5,0 <10,0 (5)
16	Toxoide de tétanos in- troducido por polime- rización + toxoide inicial	5 Lf 5 Lf	>0,05 <0,1 (4) >0,01 <0,05 (5)	>2,0 <5,0 (5)	>2,0 <5,0 (5) ca. 2,0 (4)
17	Toxoide de tétanos in- troducido por polime- rización + toxoide inicial	50 Lf 50 Lf	>0,5 \geq 1,0 (5)	>2,0 <5,0 (4) >5,0 <10,0 (4)	>5,0 <10,0 (4) >5,0 <10,0 (4) 5,0 (5)
18	Toxoide de tétanos junto a fosfato de aluminio	5 Lf	>1,0 <2,0 (5) >0,5 <1,0 (5) >1,0 <2,0 (5) ca. 1,0 (4)	>5,0 <10,0 (5) ca. 5,0 (5) >5,0 <10,0 (5)	>5,0 <10,0 (5) >2,0 <5,0 (4) >2,0 <5,0 (7)
19	Toxoide de tétanos junto a fosfato de aluminio	50 Lf	>1,0 \geq 2,0 (5) >2,0 <5,0 (5)	>2,0 <5,0 (5) ca. 10,0 (6)	>5,0 <10,0 (5) 11,0 (5) >5,0 <10,0 (8)

Inmunización de cobayos (intramuscular) con preparados de toxoide de tétanos.
Hemorragias después de 3, 6, 12 y 20 semanas, ninguna inyección Booster.





28 NOV. 1960

A continuación se explica más detalladamente la invención mediante algunos ejemplos de ejecución; los mismos están divididos en las 3 operaciones siguientes: a) Solubilización, b) polimerización y c) aislamiento y purificación. - - - - -

5. Ejemplo 1

10. a) 12,0 g de bis-2-éster etilhexílico del ácido sulfosuccínico como sal sódica (Aerosol OT[®]) y 6,0 g de polioxietilen(4)lauriléter con un promedio de 4 etilenoóxido en la cadena (tensioactivo LA-55-4, de la empresa Hefti AG, Zürich) se disuelven en 20,0 g de n-hexano; la solución se somete a un filtraje contra gérmenes; bajo agitación se adiciona - a continuación bajo condiciones estériles - 15. 10,0 g de solución acuosa de toxoide (toxoide de difteria o de tétanos con 100 IU/ml) cuidando de que con un adiciónamiento lento y una agitación constante quede conservada una solución clara. Después de introducir 20,0 g más de n-hexano, los monómeros se introducen mediante 20. agitación, a saber: 0,250 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida y 2,000 g de acrilamida. Cuando los componentes cristalinos están completamente disueltos, se completa entonces con n-hexano hasta un peso total de 110,0 g. - - - - -
25. b) La solución se recubre con nitrógeno, se cierra herméticamente y se somete a unos 20 - 30°C de manera continua a las radiaciones de una fuente de cobalto 60. Para la polimerización es suficiente una dosis de 0,3 Mrad. El final de la polimerización, es decir, la desaparición de los monómeros, puede comprobarse mediante un método



de titración de color acidimétrica para la determinación de compuestos no saturados de α, β mediante reacción con morfolina (F.E. Critchfield, G.L. Funk, J.B. Johnson; *Analyt. Chem.* 28, 76-79, 1956). - - - -

5. c) Después de haberse efectuado la polimerización, la fase hidrófoba, es decir el n-hexano, se elimina mediante destilación efectuada con cuidado a la temperatura ambiente interior y bajo vacío de chorro de agua. La solución acuosa concentrada remanente del producto y de la
10. substancia tensioactiva se purifica mediante ultrafiltraje con agua destilada (membrana: Amicon PM 30) y sobrepresión de nitrógeno (2 - 4 atmósferas, aproximadamente) para eliminar las sustancias tensioactivas. Se obtiene una solución acuosa coloidal del producto, la
15. cual se liofiliza. - - - - -

Ejemplo 2

20. a) 12,0 g de Aerosol OT ^(R) y 6,0 g de LA-55-4 se disuelven de manera clara en 80,0 g de n-hexano, se solubilizan gota a gota en esta solución 5,0 g de agua destilada y se disuelven en ella los monómeros cristalinos de 0,250 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida y 2,000 g de acrilamida. La solución se somete a un filtraje contra gérmenes. Gota a gota se añaden bajo condiciones estériles 5,0 g de toxoide de tétanos con 3.100 lf/ml.
25. b) La polimerización se efectuó con radiación γ , tal como se ha descrito en el ejemplo 1. - - - - -



- c) Después de haberse efectuado la polimerización, el producto polimero con el antígeno incluido en el mismo puede precipitarse cuidadosamente a -5°C con metanol acuoso al 40%. La centrifugación o el ultrafiltraje a -5°C que sigue a continuación produce la separación de las sustancias tensioactivas. La liofilización (el contenido de metanol ajustado preferentemente con agua por debajo del 5%) o el ultrafiltraje con agua elimina otros disolventes y proporciona el producto deseado.
- 5.
10. Ejemplo 3
- a) 45,0 g de Aerosol OT ^(H) y 25,0 g de IA-55-4 se disuelven en 215,0 g de n-hexano. En el siguiente orden se continúan introduciendo y se disuelven de manera clara: 2,5 g de etanol, 2,5 g de metanol, 40,0 g de agua destilada, 1.000 g de N,N-metilen-bis-acrilamida y 8.000 g de acrilamida. La solución solubilizada es sometida a un filtraje contra los gérmenes, y el peso se lleva mediante n-hexano hasta 340,0 g. Mediante agitación y a continuación bajo condiciones estériles se solubilizan entonces gota a gota 10,0 g de una solución de globulina gamma humana (exenta de compuestos en Tris-HCl + NaCl 0,100 g; aproximadamente 1,4% de Human IgG). - - - - -
 - 15. b) La polimerización se efectúa mediante radiación γ , tal como se ha descrito en el ejemplo 1. - - - - -
 - 20. c) El aislamiento de las cápsulas micelares puede efectuarse según el ejemplo 1 o el ejemplo 2. - - - - -
 - 25.



Ejemplo 4

5. a) 12,0 g de Aerosol OT[®] y 6,0 g de LA-55-4 se disuelven en 80,0 g de n-hexano, bajo agitación se solubilizan lentamente 35,0 g de agua destilada y en la solución se disuelven los monómeros cristalinos 0,500 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida y 4.000 g de acrilamida. La solución se somete a un filtraje contra los gérmenes y se disuelven 0,300 g de ureasa (producto liofilizado, hidrosoluble, "Merck") de modo micelar. - - - - -
10. b) La solución obtenida se somete en el recipiente de reacción cilíndrico mediante agitación y con una temperatura constante de $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y una corriente de nitrógeno que burbujea constantemente a través de la solución, a una radiación desde el interior mediante una lámpara de inmersión de rayos ultravioletas (quemador de cuarzo, 70 W) durante 45 minutos hasta que desaparecen los monómeros. - - - - -
15. c) Después de haberse efectuado la polimerización, la solución se mezcla en exceso con metanol con un contenido de alcohol no inferior al 80%. El producto se precipita y puede separarse por centrifugación o puede separarse mediante filtraje bajo presión y purificarse. - - - - -
- 20.

Ejemplo 5

25. a) A una solución de 5,0 g de tolueno, 50 mg de dietil-p-nitrofenil-monotiofosfato y 10,0 g de polioxietilen-sorbitan-mono-oleato (Tween 80) se adicionaron mediante agi-



tación 50 g de agua. En esta solución se introdujeron mediante agitación 1,5 g de éster metílico del ácido acrílico. - - - - -

- 5. b) En la solución se disuelven en un recipiente de reacción de forma cilíndrica, termostatzable, de doble pared, de vidrio Pyrex (diámetro interior 6 cm) bajo agitación 0,2 mg de 5'-sulfato sódico de riboflavina y 0,2 mg de $K_2S_2O_8$. Mediante agitación continua y una temperatura constante de $35 \pm 5^\circ C$ y con una corriente de nitrógeno que burbujea constantemente a través de la solución, la solución es sometida a radiaciones desde fuera a la altura media de la columna del líquido a una distancia de 15 cm mediante una bombilla Osram (300 W) durante 7 horas hasta que desaparecen los monómeros. - - - - -
- 10. c) El aislamiento de las cápsulas micelares con la sustancia insecticida activa se efectuó según el ejemplo 4. - - - - -
- 15.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

20. R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- procedimiento de fabricación de microcápsulas de material polimérico, con sustancias activas incluidas y/o adsorbidas, caracterizado porque

- 25. a) se disuelven sustancias auxiliares tensioactivas con acción de emulgente en un líquido hidrófobo o hidrófilo,



con el fin de formar cámaras interiores micelares de
reacción, luego - - - - -

- 5. b) se añade bajo agitación a la solución de sustancias auxiliares en el caso de la utilización de un líquido hidrófobo como fase externa agua y la sustancia activa a incluir o una solución acuosa de la sustancia activa, respectivamente, o en el caso del líquido hidrófilo como fase exterior un disolvente hidrófobo y la sustancia activa o la solución de la sustancia activa, respectivamente, y se solubiliza, a continuación de lo cual
- 10. c) se introducen bajo agitación los monómeros solubles en el interior de las micelas, - - - - -
- d) se polimerizan de modo de por sí conocido los monómeros disueltos de manera micelar, en su caso con ayuda de iniciadores o de catalizadores, y luego, - - - - -
- 15. e) se aíslan mediante ultrafiltraje o centrifugación las microcápsulas obtenidas con la sustancia activa incluida y adsorbida, después de que, en su caso, se ha eliminado por destilación bajo vacío la parte principal del líquido hidrófobo y/o las microcápsulas se hayan precipitado mediante el adicionamiento de disolventes orgánicos o de sales, - - - - -
- 20.

25.
G

actuándose de manera que las cápsulas tengan un diámetro del orden de magnitud micelar de 20 - 200 nanómetros y sean coloidalmente solubles en agua. - - - - -



28 NOV 1953

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se introducen primero solamente monómeros con disolvente en la solución de sustancias auxiliares del líquido hidrófilo o hidrófobo y se añade entonces a esta solución solubilizada una solución de la sustancia activa, a continuación de lo cual se efectúa la polimerización y se aíslan las microcápsulas. - - - - -

5.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se utilizan como monómeros acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, ácido acrílico o éster metílico del ácido acrílico. - - - - -

10.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1 a 3, caracterizado porque se utilizan como líquido hidrófobo N-alcanos con un punto de ebullición inferior a 0°C bajo vacío, preferentemente N-hexano o N-heptano. - - - - -

15.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1 a 3, caracterizado porque se utilizan como líquido hidrófobo etiloleato de parafina, aceite de ricino u otros aceites vegetales.-

6.- "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE MICROCAPSULAS DE MATERIAL POLIMERIC". - - - - -

20.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veintinueve hojas, folia-

(



28 NOV. 1973

das y mecanografiadas por una sola de sus caras

MADRID, 28 NOV. 1973

P. A. M. CURELL SUÑOL

Man. In d.