



(19) ES	(11) NUMERO (21) 452.603	(10) A 1
(22) FECHA DE PRESENTACION 22-10-1976		

P.- 64.196
DAH-290

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
----------------------------------	------------	-----------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL B65D, A61J	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	------------------------------------------------	----------------------------------------

(64) TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA ENCAPSULAR UN MATERIAL DE NUCLEO QUIMICAMENTE ACTIVO EN UNA MEMBRANA SEMIPERMEABLE SINTETIZADA"

(71) SOLICITANTE (S) DAMON CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 115 Fourth Avenue, Needham Heights, Massachusetts, Estados Unidos de América

(72) INVENTOR (ES) Franklin Lim y Richard D. Moss

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

Fundamentos de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para encapsular sustancias químicamente activas, y particularmente para encapsular sustancias biológicas lábiles tales como enzimas y hemoglobina, en una membrana semipermeable que retendrá al material encapsulado, pero que permitirá libremente que las moléculas menores atraviesen la membrana para reaccionar con el material encapsulado, y que salgan los productos de reacción. También se refiere a un método para controlar el tamaño de los poros de las membranas semipermeables de las cápsulas.

La tecnología de la microencapsulación ha crecido rápidamente en los años recientes, y ha hallado muchas aplicaciones. Se han hecho intentos, con grados de éxito variables, para encapsular sustancias biológicamente activas tales como hemoglobina, anhidrasa carbónica, ureasa, asparginasa, lactato-deshidrogenasa (LDH), glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT), materiales químicamente activos tales como resinas intercambiadoras de iones y carbón orgánico activado, y diversas otras enzimas y sustancias químicamente activas. Las microcápsulas de esta naturaleza ya han mostrado tener gran utilidad, por ejemplo en riñones artificiales y sistemas de enzimas fijas, y son muy prometedoras en un cierto número de otras áreas. Como ejemplo, la patente de los EE.UU. nº 3.522.345, de Thomas M.S. Chang, expone microcápsulas no trombógenas que se pueden utilizar, cuando se fabrican alrededor de enzimas o desintoxicantes y se disponen en paralelo extracorporalmente, para introducir oxígeno, medicamentos, sustancias enzimáticas y similares en la corriente sanguínea, a velocidades

1 controladas.

En "Células artificiales" (Artificial Cells), por Thomas M. S. Chang (Charles C. Thomas, editor; Springfield, Ill., 1972) se expone un procedimiento para encapsular materiales biológicamente activos en una membrana semipermeable. La técnica implica disolver el material a encapsular y un monómero en agua, y formar una emulsión con el agua como fase discontinua. Cuando se disuelve en la fase continua de la emulsión un segundo monómero capaz de polimerización con el primero, tiene lugar una polimerización en la interfase de las dos fases, y se forma una membrana alrededor de las gotitas de solución, típicamente de tamaño coloidal.

Este procedimiento tiene inconvenientes y limitaciones que merman su aplicabilidad y éxito comercial, potencialmente amplios. Dado que muchas sustancias biológicamente activas, p.ej. enzimas, son extremadamente lábiles, las condiciones de reacción, relativamente duras, necesarias para la polimerización dan a menudo como resultado un rendimiento muy bajo de material encapsulado utilizable. La encapsulación de enzimas incluso relativamente resistentes, tales como ureasa, está caracterizada por unos rendimientos entre 35 y 40 por ciento en el mejor de los casos. En una o más etapas del procedimiento se desnatura mucho del material encapsulado.

La patente de los EE.UU nº 3.522.346 (T.M.S. Chang) se refiere a microcápsulas de permeabilidad controlada. El procedimiento expuesto en ella implica encapsular composiciones acuosas en membranas de tamaño, espesor y permeabilidad controlados. Las gotitas de una composición

1 acuosa se dispersan en un medio líquido orgánico inmisci-
ble con ellas, y a la dispersión así producida se añade un
componente soluble en el medio líquido orgánico, y capaz
de reaccionar con un componente de la composición hidrófi-
5 la, para formar una membrana macromolecular por coacerva-
ción, polimerización o condensación interfacial en la super-
ficie de las gotitas. Típicamente se añade al líquido orgá-
nico un polímero, producto de condensación, o un componen-
te del mismo, y la membrana se forma alrededor de las goti-
10 tas por interacción del polímero, producto de condensación
o componente con un componente de las gotitas dispersadas,
que puede ser un precipitador, un catalizador de condensa-
ción o polimerización, o un compuesto del eventual produc-
to de condensación. El tamaño de poro efectivo de la mem-
15 brana de encapsulación es función no solo de la composi-
ción de la membrana, sino también del espesor de la membra-
na, y se elige según el uso a que se destinen las cápsu-
las. Por elección adecuada de las condiciones de trabajo se
puede variar el tamaño de poro, pero las condiciones de
20 reacción necesarias para asegurar unas membranas suficien-
temente fuertes pero aún selectivamente permeables son en
cualquier caso difíciles de controlar, y en algunos casos
desconocidas. Además, el método produce cápsulas que tie-
nen generalmente membranas con uniformidad y porosidad
25 erráticas, muchas de las cuales son inservibles para el
fin a que se destinan.

Por tanto, un objeto de la presente invención
es proporcionar un procedimiento por el que una gran va-
riedad de enzimas, otro material biológico lábil, y muchas
30 sustancias químicas activas, se pueden encapsular en su es

1 tado activo, y proporcionar mayor rendimiento de sustancia
actuante cuando está encapsulada así.

Otro objeto de la invención es proporcionar
un método para formar membranas semipermeables muy fuertes
5 alrededor de cualquiera de un gran número de materiales
biológicos lábiles.

Aún otro objeto de la invención es proporcio
nar un método para manufacturar microcápsulas que contie-
nen enzimas, donde la membrana de la microcápsula tiene un
10 grado de semipermeabilidad más uniforme, es decir, propor-
cionar cápsulas con paredes uniformes sin defectos porosos,
y con un intervalo de tamaño de poro tal que el material en
capsulado no puede escapar del interior de la cápsula, pe-
ro puede reaccionar fácilmente con sustancias del ambiente
15 en que se colocan las cápsulas.

Otro objeto de la invención es proporcionar
un procedimiento para encapsular una gran variedad de sus-
tancias químicamente activas, en una membrana semipermeable
de gran calidad, utilizando una variedad de diferentes sis-
20 temas polímeros y diferentes técnicas de polimerización in-
terfacial. Aún otro objeto de la invención es proporcionar
un procedimiento general que tiene algunos parámetros va-
riables, para los que se pueden elegir valores para que
sean adecuados a una sustancia concreta a encapsular, para
25 variar la naturaleza de la membrana de la cápsula y para
hacer máximo el rendimiento del material encapsulado ac-
tuante.

Aún otro objeto de la invención es proporcio
nar un método para encapsular una concentración alta de he-
30 moglobina en una cápsula permeable al oxígeno, dióxido de

1 carbono y otras moléculas pequeñas.

Aún otro objeto de la invención es proporcionar un método para controlar el tamaño de poro de la membrana de la cápsula en una magnitud perfeccionada, teniendo el método amplia aplicabilidad a gran variedad de técnicas de encapsulación.

Aún otro objeto de la invención es proporcionar fuertes microcápsulas semipermeables, con membranas que tienen tamaños de poro comprendidos dentro de cualquiera de un cierto número de intervalos de tamaño, siendo por tanto selectivamente permeables a moléculas que tengan dimensiones menores que el límite superior del intervalo elegido.

Resumen de la invención

En general, la invención se caracteriza por un procedimiento de polimerización en dos etapas usando al menos dos monómeros que polimerizarán, uno de los cuales es soluble en un disolvente hidrófobo, y el otro de los cuales es soluble en un disolvente hidrófilo o agua. Primero se prepara una solución hidrófila, preferiblemente con agua, disolviendo el material a encapsular en el agua, junto con un primer monómero. Dado que muchas soluciones de monómero tienen un pH que desnaturalizaría muchas sustancias biológicas lábiles, la solución de monómero se ha de tamponizar a menudo a un intervalo de pH entre 5 y 9, antes de añadir material biológico lábil.

Luego se prepara un líquido orgánico hidrófobo que tiene las siguientes propiedades. Primero, la solubilidad del segundo monómero que se ha de usar en la polimerización debe ser muy alta en este líquido orgánico

1 hidrófobo. Segundo, el líquido hidrófobo debe tener una li-
gera afinidad hacia el primer monómero. Tercero, el disol-
vente hidrófobo ha de ser tal que el disolvente hidrófilo,
cuando se le añade, forme una emulsión buena.

5 Luego se añaden juntos los dos disolventes
y se emulsifican, siendo típicamente el disolvente hidrófi-
lo la fase discontinua. La emulsificación se puede efec-
tuar por cualquiera de varias técnicas bien conocidas,
usualmente con ayuda de un agente emulgente. El tamaño de
10 las gotitas producidas dicta el tamaño de las microcápsu-
las formadas.

 Cuando se ha conseguido el intervalo dese-
do de tamaño de las gotitas se añade el segundo monómero a
la emulsión, y la polimerización, condensación o poliadi-
15 ción tiene lugar en la interfase del sistema de dos fases.
Debido a que el primer monómero, disuelto primordialmente
en la fase discontinua, es ligeramente soluble en la fase
orgánica hidrófoba continua, hay algo de difusión a la fa-
se continua. La membrana de la microcápsula se forma a tra-
20 vés de esta zona de interfase, a medida que transcurre la
polimerización. La membrana en formación limita la conti-
nuación de la difusión del primer monómero a la fase conti-
nua, dependiendo mucho las características de la membrana
de la secuencia detallada de encuentros al azar entre los
25 monómeros.

 Generalmente, las membranas producidas has-
ta este punto son macroporosas, dándose las membranas semi-
permeables de éxito solo bajo condiciones excepcionales que
son difíciles de controlar. Se cree que el problema resul-
30 ta de la presencia de defectos en las membranas, que tie-

1 nen como resultado unos agujeros macroporosos a través de
las membranas tras detener la reacción y lavar las cápsu-
las. En la técnica anterior esto solo se supera continuan-
do la polimerización, condensación o poliadicción durante
5 un tiempo bastante largo para cerrar esos defectos gran-
des, lo que simultáneamente cierra los poros menores. Así,
se cree que las cápsulas aceptables solo resultan en un
estrecho intervalo de formación de polímero, en el que se
cierran los defectos y los poros menores están aún abier-
10 tos.

Sin embargo, se ha descubierto que si tales
microcápsulas crudas se separan de la fase continua, se
vuelven a suspender en una cierta cantidad de un líquido
hidrófugo diferente en el que la solubilidad del primer mo-
15 número esté muy reducida, y luego se vuelven a exponer al
segundo monómero, la misma reacción de polimerización tie-
ne lugar a una velocidad mucho más lenta en una zona de in-
terfase mucho más estrecha, que se da solo dentro de los
intersticios de la membrana de la cápsula cruda. Esto da
20 como resultado el "parcheado" de los defectos macroporosos
en la pared de la cápsula, disminuyendo el tamaño de poro
y reforzando las membranas.

Se cree que esta segunda reacción de poli-
merización puentea selectivamente más a través de los po-
25 ros más grandes, mientras que el primer monómero se difunde
más próximo a la fase continua, y que este "parcheado" trans-
curre sustancialmente sin aumento significativo del espesor
de pared de la cápsula. En contraste, el uso continuado del
primer disolvente aumenta el espesor de pared, disminuyendo
30 la permeabilidad de la mayoría de la membrana, en aras de

1 cerrar los defectos.

Según otro aspecto de la invención, se ha hallado que esta técnica de polimerización secundaria se puede usar con gran número de procedimientos de encapsulación conocidos, para formar cápsulas semipermeables y controlar los tamaños de poro de las mismas.

Según otro aspecto del presente procedimiento de polimerización en dos etapas, se puede elegir el segundo monómero para uso en la fase continua, lo que, en métodos usuales, desnaturaría rápidamente los materiales biológicos lábiles que se pretende encapsular. La técnica para evitar tal desnaturalización implica controlar la concentración relativa de solutos en la fase continua y discontinua, de manera que la concentración del segundo monómero en la fase continua se mantenga en menos que los valores óptimos, y los solutos en la fase discontinua estén en alta concentración. En esta situación, la difusión del segundo monómero a la fase discontinua está inhibida, y la desnaturalización del material biológico lábil se minimiza, pero se produce una membrana de cápsula macroporosa, pobremente formada, y claramente no satisfactoria. Sin embargo, en la segunda etapa de polimerización, la concentración del segundo monómero en la fase continua de la nueva suspensión se puede aumentar sin riesgo (ya que el material encapsulado está ahora protegido por la membrana de cápsula cruda) para reforzar las membranas de las cápsulas y hacerlas semipermeables.

Según otro aspecto de la invención, el segundo monómero se añade a la emulsión en la primera etapa de polimerización, no todo a la vez para iniciar la polimeri-

1 zación, sino más bien en fracciones, a intervalos regula-
res de tiempo, durante toda la duración de la polimeriza-
ción. Esta técnica mantiene la concentración del segundo
monómero en la interfase a un nivel óptimo más constante
5 en todo momento durante la formación de la primera membra-
na basta, y por tanto inhibe la difusión del segundo monó-
mero a la fase discontinua y aumenta el rendimiento de ma-
terial biológico lábil utilizable. Esta técnica es también
muy útil para sistemas en los que la hidrólisis del segun-
10 do monómero elegido es una reacción en competencia con la
polimerización.

En una realización importante, el primer mo-
nómero es una diamina y el segundo monómero es un haluro
de diácido; el disolvente hidrófobo inicial es una solución
15 que comprende 80% de ciclohexano y 20% de cloroformo; y en
la nueva suspensión, el líquido hidrófobo es ciclohexano
puro. La diamina es esencialmente insoluble en ciclohexano,
y ligeramente soluble en cloroformo.

20 Cuando se encapsula hemoglobina, se ha des-
cubierto que si los glóbulos rojos de la sangre se deshi-
dratan por exposición a solución salina hipertónica se pue-
de preparar una solución de hemoglobina con concentraciones
de hasta 30 g/dl, y la gran concentración de sal inhibe la
difusión de moléculas de agua a la fase discontinua, donde
25 reaccionan con moléculas del segundo monómero, haciendo que
no funcionen.

Dado que es bien sabido que muchos materia-
les biológicos lábiles se desnaturalizan rápidamente en am-
biente muy ácidos o básicos, en todas las etapas del nuevo
30 procedimiento de encapsulación se debe mantener al menos

1 dentro del intervalo de 5 a 9 el pH del ambiente inmediato
a todo el material que se pretende encapsular. Cuando se
usa una diamina como primer monómero, esto se efectúa bur-
bujando CO₂ a través de la solución de diamina antes de
5 añadirla al material biológico lábil. La solución de diami-
na, que tiene típicamente un pH del orden de 11,5, se con-
vierte en carbonato de diamina, con un pH típico de aproxi-
madamente 8,6-8,7. Si se satura con CO₂ y se almacena bajo
100% de CO₂ gaseoso, esta solución se puede llevar hasta
10 un pH de aproximadamente 8,4.

En contraste, la técnica anterior utilizaba
el sistema de tampón débil NaHCO₃-Na₂CO₃, es decir, las sa-
les de una base fuerte y ácido débil, donde la presente in-
vención ha usado el propio ácido débil. El pH resultante en
15 la solución tamponizada de diamina-hemolizado, de la técni-
ca anterior, es pH 11.

Una ventaja de principio de la presente téc-
nica para la inmovilización de materiales biológica y/o
químicamente activos para formar reaccionantes sólidos o
20 pseudosólidos, es que los materiales se encapsulan a granel,
sin competencia directa con impurezas para los puntos de
unión disponibles. Así se pueden hacer cápsulas muy activas
a partir de materiales relativamente poco purificados. Ade-
más, los materiales activos están protegidos del ataque por
25 microorganismos, a menudo responsables de la desactivación
o inhibición de tales componentes de reacción.

Descripción de la realización preferida

Un primer aspecto de la presente invención
utiliza una nueva variación del bien conocido procedimien-
30 to para microencapsulación conocido generalmente como "po-

1 limerización interfacial". Se eligen dos disolventes mutua-
mente inmiscibles, siendo uno hidrófobo y siendo el otro
hidrófilo o, preferiblemente, agua. El material a encapsu-
lar y un primer monómero se disuelven en agua, se mezclan
5 los dos disolventes, y luego se emulsifica la mezcla, sien-
do el disolvente hidrófobo la fase continua. El tamaño de
las gotitas coloidales determina el tamaño de las microcáps-
ulas a producir. La emulsificación se puede efectuar por
cualquiera de las bien conocidas técnicas de emulsificación,
10 tales como, por ejemplo, usar un mezclador, y usualmente
se hace con adición de un agente emulgente. Dado que el ta-
maño de las gotitas producidas en cualquier técnica dada
variará dentro de un intervalo específico, se puede usar un
filtro para separar las cápsulas demasiado grandes hechas
15 en cualquier tanda dada, para minimizar las diferencias en
diámetro de cápsula. Para una exposición más detallada del
método para variar el tamaño de cápsula se debe hacer refe-
rencia a Thomas M.S. Chang, "Células artificiales" (Artifi-
cial Cells), capítulo 2.

20 Cuando se han producido gotitas de tamaño su-
ficiente se introduce en la suspensión un segundo monómero
capaz de formar un polímero con el primer monómero, por po-
licondensación o poliadición. La polimerización solo tiene
lugar en la interfase del sistema de dos fases. Evidente-
25 mente, el monómero se ha de elegir de entre aquellos que
presentan propiedades adecuadas de solubilidad en los di-
solventes elegidos.

30 Para hacer máximo el rendimiento de material
biológico utilizable encerrado dentro de las cápsulas, las
condiciones de reacción se han de controlar cuidadosamente

1 de manera que el material, en general sensible, no se des-
naturalice en magnitud significativa durante la polimeriza-
ción. Por tanto, se ha descubierto que un factor muy críti-
co para obtener gran rendimiento de material encapsulado
5 utilizable es el pH de la fase discontinua. Para asegurar-
se contra la desnaturalización del material lábil, el pH se
ha de controlar en todo momento durante el procedimiento,
generalmente dentro del intervalo de 5 a 9. Los disolven-
tes, especialmente el hidrófilo que disuelve al material
10 encapsulador, se han de elegir de entre aquellos que no
desnaturalicen rápidamente al material a encapsular. La
elección estará bien dentro de la capacidad de los exper-
tos en la técnica, tras haber leído la exposición. Para fa-
cilitar la dispersión y separación apropiadas, los dos di-
15 solventes deben tener densidades relativas ligeramente di-
ferentes entre sí.

Las polimerizaciones que tienen lugar en un
ambiente de pH que sea hostil para la sustancia químicamen-
te activa concreta que se pretenda encapsular no se deben
20 usar para esa sustancia. Sin embargo, muchos monómeros que
en solución tienen un pH natural capaz de desnaturalizar
a la mayoría de los materiales biológicos lábiles se pueden
tamponizar dentro del intervalo de pH antes expuesto, sin
afectar a su actividad. Otros monómeros se pueden usar sin
25 tamponizar, dependiendo de su pH natural y de la naturale-
za del material que se pretende encapsular. Para monómeros
muy alcalinos el paso de CO₂ gaseoso a través de la solu-
ción es un método preferido para llevar el pH dentro del
intervalo no desnaturalizador.

30 Según un segundo aspecto de la invención,

1 se ha descubierto que por polimerización en dos etapas se
puede producir una membrana de cápsula mucho más fuerte,
que tiene menos imperfecciones, y usando un grado mínimo
de polimerización. Respecto a esto, se ha descubierto que
5 las membranas de cápsula producidas por el procedimiento
en etapa única antes descrito son a menudo macroporosas, de
siguales, y varían considerablemente en resistencia y espe-
sor. Sin embargo, si la polimerización en la interfase del
sistema emulsificado se interrumpe por retirada de la fase
10 continua, y luego se vuelven a suspender las cápsulas en
disolvente nuevo con solubilidad reducida para el primer
monómero, una porción adicional del segundo monómero añadi-
da a la nueva suspensión hará que siga la polimerización,
lo que reforzará las membranas, hará que los poros más gran-
15 des de las membranas se rellenen preferentemente, y así
evitará el estado macroporoso. Por tanto, el procedimiento
produce una membrana semipermeable de gran calidad por uso
de una segunda cantidad, mínima, de polimerización, usán-
dose esta última, para máxima ventaja adicional, para re-
20 llenar las imperfecciones de la membrana.

Más refinamientos de este procedimiento de
polimerización en dos etapas permitieron controlar la re-
sistencia, espesor y porosidad de las membranas, hasta un
grado perfeccionado. Si el disolvente hidrófobo que consti-
25 tuye la fase continua de la emulsión se elige de modo que
el primer monómero sea ligeramente soluble en él, el monó-
mero de las gotitas se difunde ligeramente a la fase conti-
nua. Esto da como resultado un límite de fases relativamen-
te grueso, y una membrana igualmente gruesa y usualmente
30 porosa, formada siempre que los dos monómeros entran en

1 contacto. Generalmente, cuanto mayor es la solubilidad del
primer monómero en la fase continua más macroporosa es la
membrana producida. Por otra parte, si el primer monómero
es mucho menos soluble en la fase continua hidrófoba el lí
5 mite entre las fases es nítido, y resulta usualmente una
membrana microporosa. Cuando las cápsulas parcialmente for
madas se vuelven a suspender se usa un disolvente diferen
te que tiene una solubilidad diferente, para el primer mo
nómero, que el disolvente usado como fase discontinua en
10 la primera polimerización. Cuando se ha producido una mem
brana macroporosa en la primera polimerización se usa en
la segunda polimerización un disolvente en el que el pri
mer monómero sea esencialmente insoluble, y tiene el efecto
de endurecer las membranas. Se cree que en la segunda eta
15 pa de polimerización los dos precursores del polímero solo
coinciden dentro de los puntos débiles de la membrana im
perfecta producida hasta ese momento, es decir, donde hay
difusión preferente del primer monómero hacia el disolven
te. Así se forma más polímero para rellenar los poros más
20 grandes.

Según otro aspecto de la invención, las con
centraciones de los monómeros en sus respectivos disolven
tes se pueden controlar, para mayor ventaja. Por ejemplo,
si el segundo monómero, disuelto en la fase hidrófoba con
25 tinua de la emulsión, tiene la propiedad de desnaturalizar
el material que se pretende encapsular, el primer monómero,
disuelto en la fase discontinua, se puede introducir en al
ta concentración en relación al segundo, del orden de 100
a 1, para impedir cualquier migración del monómero desnatu
30 ralizador a las gotitas de solución durante la primera po

1 limerización. Esta técnica produce a menudo una microcápsu
la muy porosa, pero en la segunda etapa de polimerización
se puede aumentar sin riesgo la concentración del segundo
monómero, y si se usa un disolvente apropiado las cápsulas
5 se reforzarán y se harán microporosas por puenteo selecti-
vo a través de los poros más grandes con una membrana más
delgada, como se ha explicado antes, sin afectar seriamen-
te al material encapsulado.

Según otro aspecto de la invención, se ha
10 hallado que la concentración de hemoglobina encapsulada se
puede aumentar significativamente si los glóbulos rojos usa
dos para preparar hemolizado de hemoglobina se lavan a fon
do en solución salina hipertónica. Además, la relativamen-
te alta concentración de sal en la fase acuosa discontinua
15 de la emulsión ayuda a la polimerización interfacial del
primer monómero, limitando la solubilidad del agua en la
fase orgánica que contiene el segundo monómero, que, típi-
camente, se descompone rápidamente por exposición al agua.
Se cree que los productos de reacción de tal hidrólisis
20 del segundo monómero contribuyen a las imperfecciones de
la membrana, si no se eliminan en la etapa de separación.

La invención se aclarará y entenderá más me
diante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

25 Los glóbulos rojos de sangre humana entera
de un banco de sangre caducada fueron separados y lavados
dos veces en el doble de su volumen de solución salina hi-
pertónica (1,5 g/dl), por centrifugación en una centrifuga
refrigerada a 2800 x g durante cinco minutos. Se usó solu-
30 ción salina hipertónica para eliminar agua de las células,

1 para producir la mayor concentración posible de hemoglobina
tras la lisis de las células. Una tercera centrifugación
durante 15 minutos a 2800 x g sirvió para empaquetar las
células. Se eliminó lo más posible de la solución salina de
5 las células empaquetadas, que luego se sometieron a lisis
por agitación enérgica con un ml de éter anhidro por cada
10 ml de células empaquetadas. Esta mezcla se centrifugó
a 1000 x g durante 20 minutos, y los residuos de células
y el éter que se elevan a la superficie se eliminaron. Se
10 comprobó la concentración de hemoglobina midiendo la ab-
sorbancia de 10 μ l del hemolizado en 4,0 ml de solución sa-
lina isotónica, a una longitud de onda de 540 nm. Las lec-
turas de absorbancia de todas las soluciones de hemolizado
preparadas apropiadamente eran entre 0,7 y 0,8, lo que co-
15 rresponde a una concentración de 28 a 32 g/dl. Las concen-
traciones de hemoglobina mayores que 30 g/dl cristalizaron
y precipitaron por almacenamiento a la temperatura del re-
frigerador (4°C). El hemolizado se pudo usar durante al me-
nos una semana, si estuvo refrigerado.

20 Se preparó una solución de carbonato de hexa-
nodiamina burbujeando dióxido de carbono en una solución
3M de 1,6-hexanodiamina (Eastman Kodak Co.), hasta que el
pH alcanzó 8,5. Esto requirió aproximadamente 15 gramos de
CO₂ por 100 ml de solución.

25 Se preparó ácido 4,4'-diamino-bifenil-2,2'-
disulfónico (ADBDS) (calidad técnica, Eastman Kodak Co.)
añadiendo aproximadamente 50 gramos de ADBDS a 800 ml de
agua desionizada que contenían 50 ml de NaOH 6M. La solu-
ción se filtró para eliminar cualquier sólido restante, y
30 el ADBDS precipitó por adición de 70 ml de HCl al 50% v/v.

1 Tras haber sedimentado los cristales se retiró por vertido
lo más posible del líquido púrpura; luego se añadieron 500
ml de HCl al 10% v/v. Los cristales se recogieron en un em-
budo Buchner y se lavaron tres veces con agua desionizada;
5 luego se lavaron dos veces con acetona y se secaron. El pro-
ducto era cristales blancos o rosa claro, y se almacenó en
una botella de color pardo protegida de la luz. Este com-
puesto se usó para formar un copolímero de membrana que te-
nía una carga negativa, para evitar agregaciones.

10 Diez mililitros de solución de hemolizado,
que contenían 30 g/dl de hemoglobina, se mezclaron con 10
ml de solución de carbonato de hexanodiamina 3M, que conte-
nían 2,88 g de ADBDS. Esos dos monómeros, cuando se mezcla-
ron, constituyeron el primer reaccionante en este ejemplo.
15 Esta solución acuosa se añadió luego a 125 ml de líquido
orgánico hidrófobo previamente enfriado, hecho con 100 ml
de mezcla de 20% de cloroformo-80% de ciclohexano y 25 ml
de un agente emulgente, SPAN-85^R (trioleato de sorbitán).

20 Luego se empezó la emulsificación en un
mezclador previamente enfriado, y se continuó durante 1 a
2 minutos.

25 El cloruro de tereftaloílo, segundo monómero,
requirió purificación preliminar. Se saturó ciclohexano ca-
liente (casi hirviendo) con cloruro de tereftaloílo (cali-
dad práctica, Eastman Kodak Co.), y la solución se filtró
rápidamente. El líquido transparente se recogió y se dejó
enfriar y cristalizar en un recipiente cerrado. Los crista-
les se recogieron con la menor exposición posible a la at-
mósfera, y se secaron bajo vacío, ya que este compuesto
30 reacciona con la humedad atmosférica. La solución de reser-

1 va de cloruro de tereftaloílo se preparó disolviendo 10,15
gramos de cloruro de tereftaloílo purificado en 95 ml de
20% CHCl_3 -80% C_6H_{12} , v/v. Resultó una solución 0,5M. Esta
solución se debe mantener en un recipiente herméticamente
5 cerrado, y se puede usar durante al menos un mes, o hasta
que empieza a formarse un precipitado.

Luego se añadieron a la emulsión tres ml del
cloruro de tereftaloílo 0,5M en solución orgánica con 20%
de cloroformo-80% de ciclohexano, mientras se mezclaba a
10 baja velocidad. La proporción real entre concentraciones
de diamina/haluro de diácido fué 128 a 1, aunque es tolera-
ble alguna variación. Al cabo de tres minutos la primera
reacción de polimerización estuvo completa, y la suspensión
se centrifugó durante 15 a 20 segundos a 400 a 500 x g. El
15 líquido orgánico que sobrenadaba se eliminó luego por aspi-
ración.

Luego se volvieron a suspender las cápsulas
en un segundo líquido consistente en 100 ml de ciclohexano
y 10 ml de trioleato de sorbitán. Mientras se mezclaba len-
20 tamente se añadieron 7 ml de cloruro de tereftaloílo 0,5M
en solución orgánica de 20% de cloroformo y 80% de ciclohe-
xano. Este líquido hidrófobo contiene solo 1,0 a 1,5% de
cloroformo, frente a 20% en la primera etapa orgánica. El
contenido reducido de cloroformo corta la solubilidad de
25 diamina en el disolvente, haciendo una membrana más delgada
y parcheando agujeros de la original, más basta. La propor-
ción entre concentraciones de diamina/haluro de diácido era
50 a 1. Se continuó la agitación durante 3 minutos, momento
en que la reacción se interrumpió por adición de 30 ml de
30 TWEEN-20 (monohalurato de sorbitán) al 50%, tamponizado a

1 pH neutro con NaHCO_3 0,3M.

Obsérvese que la solución de hemolizado de hemoglobina-enzimas no estuvo en ningún momento expuesto a un pH menor que 5 ni mayor que 9. La solución de hexanodiamina tiene un pH natural de 11,5, y un pH de aproximadamente 11 cuando se mezcla con hemoglobina. El burbujeo de CO_2 a través de ella hace que se produzca H_2CO_3 y carbonato de hexanodiamina. El CO_2 actúa como tampón, y se prefiere a las sales sódicas o ácidos débiles. Antes de tamponizar, el monolaurato de sorbitán usado tenía un pH típico de aproximadamente 4,5. La exposición extensa a este ambiente ácido desnaturizaría la hemoglobina y enzimas. Esto se puede evitar tamponizando el monolaurato de sorbitán para que tenga un pH próximo a 7. El objeto del monolaurato de sorbitán es facilitar la transferencia de las microcápsulas a un medio acuoso tal como solución salina (véase "Células artificiales", capítulo 2). Se debe observar que en esta etapa el monolaurato de sorbitán tiende a reaccionar lentamente con el cloruro de tereftaloilo, produciendo un revestimiento polímero pegajoso y, además, el crenado de las microcápsulas. Un método alternativo superior es eliminar lo más posible del disolvente por centrifugación, y continuar luego con la anterior adición de TWEEN-20 y subsiguiente separación.

25 Las microcápsulas producidas por este procedimiento no permitieron fugas de enzimas o hemoglobina. Los tiempos mitad de equilibrio ($t_{1/2}$) para solutos de diversos pesos moleculares se dan en la TABLA I.

30

TABLA I

PERMEABILIDAD DE MICROCAPSULAS - TIEMPOS MITAD DE EQUILIBRIO

Sustancia	Peso molecular	t 1/2 \pm ENM (seg)
Glicerina	92	1,75 \pm 0,1
Diacetona-alcohol	116	2,5 \pm 0,2
Glucosa	180	4,9 \pm 0,1
Sacarosa	342	10,6 \pm 0,2
Tris ^a	121	2,8 \pm 0,1
Bicine ^b	163	6,1 \pm 0,3
CAPS ^c	221	8,0 \pm 0,5
Pipes ^d	302	13,0 \pm 0,5

^a Tris-(hidroximetil)-aminometano, pH 8

^b N,N-bis-(2-hidroxietil)-glicina, pH 8

^c Acido ciclohexilaminopropanosulfónico, pH 8

^d Piperazino-N,N'-bis-(ácido 2-etanosulfónico), pH 8

La actividad de cuatro enzimas, lactato-deshidrogenasa (LDH), glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT), ureasa, y β -glucuronidasa, se midió antes y después de la encapsulación. La LDH y GOT se hallaron naturalmente en el hemolizado de glóbulos rojos. La ureasa y β -glucuronidasa se añadieron al hemolizado en forma de enzima parcialmente purificada, liofilizada, disponible de fuentes comerciales. Los resultados de las comparaciones para LDH, GOT y ureasa se exponen en la TABLA II. La actividad se midió en unidades internacionales (UI) por litro de muestra, bajo condiciones de la reacción de ensayo. Los resu-

1 dimientos determinados para la β -glucuronidasa estuvieron uniformemente por encima del 50%.

TABLA II

5

Enzima	Actividad (UI/l) \pm ENM	Actividad conservada ^a (%)
LDH	4120 \pm 90	55
GOT	1200 \pm 80	66
10 Ureasa	234000 \pm 8000	68

^a Actividad enzimática de las microcápsulas dividida por la actividad enzimática del hemolizado usado para preparar las microcápsulas (% de rendimiento) (ENM = error normal de la media)

15

La TABLA III muestra una comparación del tanto por ciento de la saturación de oxígeno en la solución de hemolizado usada para preparar las microcápsulas con hemoglobina encapsulada, a diversas presiones de O₂.

20

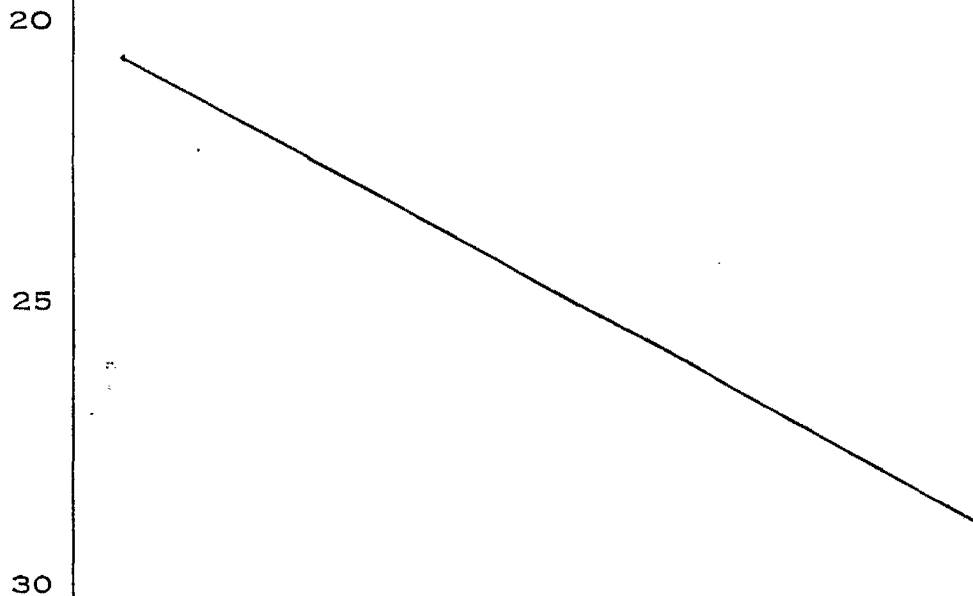


TABLA III

Presión de O ₂	Tanto por ciento de saturación	
	Hemoglobina de hemolizado	Hemoglobina encapsulada
5	7%	5%
10	21%	10%
15	46%	20%
20	62%	32%
25	74%	45%
30	82%	58%
35	89%	68%
40	92%	74%
50	97%	83%
60	99%	89%
70	99%+	92%
80	99%+	94%
90	99%+	96%
100	99%+	97%
110	99%+	98%
120	99%+	99%

La Tabla IV muestra el efecto de variar la cantidad del haluro de ácido en la fase discontinua de cada polimerización, sobre la porosidad de las microcápsulas preparadas en una serie de ensayos, midiéndose la porosidad indirectamente por observación de si el material encapsula-

1 do fugaba o no a través de la membrana. Como indica clara-
 mente la tabla, la concentración del segundo monómero en
 cada etapa de polimerización es muy importante para la bue
 na formación de la cápsula. Los expertos en la técnica ten
 5 drán poca dificultad para determinar la proporción óptima
 entre concentraciones a usar con otros sistemas polímeros.
 Las cápsulas de la Tabla IV se prepararon por el método an
 tes esquematizado, excepto en que la emulsificación se efec
 tuó solo en SPAN 85, antes de añadir el disolvente orgáni-
 10 co mixto. Los resultados de otras variantes del método son
 cualitativamente similares.

TABLA IV

15 MICROCAPSULAS PREPARADAS CON 10 ML DE HEMOLIZADO Y CANTIDA-
 DES DIVERSAS DE CLORURO DE TEREFTALOILO 0,5M

	Primera reacción	Segunda reacción	Estado de la cápsula
	Cloruro de tereftaloílo	Cloruro de tereftaloílo	
20	1 2 ml	4 ml	Muchas fugas
	2 2 ml	8 ml	Muchas fugas
	3 3 ml	7 ml	Ninguna fuga
	4 3 ml	7 ml	Ninguna fuga
25	5 4 ml	7 ml	Ninguna fuga
	6 4,5 ml	7,5 ml	Fugas moderadas
	7 4,5 ml	7,5 ml	Fugas moderadas
	8 5 ml	8 ml	Muchas fugas
30	9 5,5 ml	8 ml	Muchas fugas

1 Las microcápsulas separadas del disolvente
orgánico tras la primera reacción eran rojas, lo que indi-
ca que hubo poco o nada de desnaturalización, pero fugaban
y estaban pobremente formadas. El aumento de la concentra-
5 ción de cloruro de tereftaloilo bajo esas condiciones pro-
dujo microcápsulas que eran marrones, lo que indica desna-
turalización de la hemoglobina, y que fugaban. El aumento
del tiempo de reacción de la primera reacción, hasta cinco
minutos, tuvo poco efecto aparente sobre las microcápsulas,
10 pero el aumento del tiempo de la segunda reacción hasta
más de cuatro minutos hizo que las microcápsulas se volvie-
ran pardas, lo que indica desnaturalización de la hemoglo-
bina. La disminución de cualquiera de los tiempos de reac-
ción, un minuto o más, tuvo como resultado microcápsulas
15 que fugaban. La presencia de pequeñas cantidades de etanol,
comúnmente usado como estabilizador del cloroformo, puede
exigir el reajuste de los volúmenes óptimos. Para conseguir
la mayor repetibilidad, y la formación de cápsulas de más
confianza, se debe eliminar el etanol. El cloroformo usado
20 en la Tabla IV contenía algo de etanol. Al extraer el eta-
nol, el volumen óptimo para la segunda reacción es típica-
mente 3-4 ml, en vez de 7. La disminución de la cantidad
de TWEEN-20 usada en la etapa de separación tuvo como re-
sultado una pobre separación entre las microcápsulas y el
25 disolvente orgánico. Las microcápsulas que se dejaron per-
manecer en el TWEEN-20 durante tiempos excesivos (> 1/2 ho-
ra) se volvieron pardas. Las microcápsulas almacenadas en
solución salina sin tamponizar, que tiene un pH de 5,5, se
volvieron pardas tras varios días, mientras que las almace-
30 nadas en una solución tamponizada a pH 7,4 permanecieron ro

1 jas durante meses.

Más estudios de las cápsulas preparadas en este ejemplo indican que tienen una proporción entre volumen de pared y volumen de cápsula del orden de 0,028. Cuando t es el espesor de pared y D es el diámetro, la proporción entre el volumen de pared y el volumen de cápsula está dada por:

$$R = \frac{V_{\text{pared}}}{V_{\text{cápsula}}} \approx \frac{\pi D^2 t}{\pi/6 D^3} = 6 t/D$$

Las cápsulas tenían un espesor medio de pared (t) de 700 Å ó 0,07 μ , y un diámetro medio (D) de 15 μ . Por tanto, $R \approx 6 \times 0,07/15$, ó 0,028. Dado que el nylon tiene una densidad aproximadamente igual a 1, se necesitarían 28 mg de nylon para formar las membranas sólidas, por ml de cápsula producido. La cantidad total de diamina presente, como se puede calcular por la concentración usada, es 1,5 mM/ml o 174 mg/ml. Dado que la pared de nylon tiene 46% en peso de diamina, se necesitarían 12,9 mg de diamina, o aproximadamente 7,5% del total, para formar una pared de nylon maciza. Sin embargo, dado que el cloruro de ácido es el constituyente que limita la reacción, y que la proporción entre diamina/cloruro de diácido era 50/1 en el mejor de los casos, el límite superior de nylon producido es del orden de 2,0% de la diamina total. Esto indica que las membranas producidas son, lo más probablemente, tipo esponja, con una estructura de celdas abiertas.

Estas cápsulas fueron impermeables a la hemoglobina ($p_m \approx 68.000$) pero permeables a la insulina ($p_m \approx 12.000$, tiempo mitad de equilibrio entre 2 y 3 minutos).

1 Una comparación del tiempo mitad para la insulina con los
de sustancias de bajo peso molecular tales como las dadas
en la Tabla I, indica una relación no lineal. Se cree que
este fenómeno está causado por las propiedades estéricas
5 o estado de carga de las moléculas de insulina.

Ejemplo 2

El método fué el mismo dado en el Ejemplo 1,
10 excepto en que en la solución de hemolizado se sustituyó
la diamina-ADBDS por una solución consistente en una parte
de ácido 4,4'-diaminoestilbeno-2,2'-disulfónico 1M (Pfalz
and Bauer, Inc.) en tampón fosfato isotónico, pH 7,4, más
15 10 partes de carbonato de hexanodiamina 3M, añadidos a un
volumen igual de hemolizado. Las cápsulas producidas pre-
sentaron propiedades similares a las del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

20 El método es el mismo dado en el Ejemplo 1,
excepto por lo siguiente. No se incluye ADBDS en la solu-
ción de hemolizado, y la cantidad de cloruro de ácido usa-
da en ambas etapas de polimerización, es decir, 0,35 ml
de cloruro de ácido por ml de solución de hemolizado-diami-
25 na, es la misma. El haluro de ácido se añade en incrementos
iguales durante cada polimerización, a intervalos de 30 se-
gundos, en vez de todo a la vez al principio de la polimeri-
zación. Este método mantiene baja la concentración local
del cloruro de ácido, y produce una membrana de gran cali-
30 dad. El tanto por ciento de rendimiento de la enzima es com

1 parable con el descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

5 Se prepararon cápsulas con cloruro de tereftaloílo y hexanodiamina que contenía ácido 2,5-diaminobencenosulfónico, usando el mismo método expuesto en el Ejemplo 1, excepto en que el ácido 2,5-diaminobencenosulfónico se añadió a la hexanodiamina en vez de al ADBDS. Las cápsulas producidas presentaron propiedades similares a las del Ejemplo 1.

10 Ejemplo 5

Se produjeron microcápsulas de cloruro de sebacilo-carbonato de hexanodiamina usando el método del Ejemplo 1, excepto en que el cloruro de tereftaloílo se substituyó por cloruro de sebacilo, y no se usó ADBDS. Este método produjo microcápsulas con propiedades similares a las de las microcápsulas del Ejemplo 1.

Ejemplo 6

20 Se prepararon cápsulas de cloruro de sebacilo-lisina por el método dado en el Ejemplo 5, excepto en que el carbonato de hexanodiamina 3M se substituyó por lisina 3M o por una solución consistente en un volumen igual de carbonato de hexanodiamina 3M y lisina 3M. Unas pocas microcápsulas producidas por este método fugaban y no eran satisfactorias. Otras presentaron propiedades similares a las producidas en el Ejemplo 1.

Ejemplo 7

30 Se añaden 1,5 ml de albúmina bovina (30%) a 1 ml de la solución de ADBDS-carbonato de hexanodiamina del Ejemplo 1, junto con 0,4 ml de KCl al 36% y 0,1 ml de tetraetilenpentamina 2,9M (previamente ajustada a pH 9,5 con

1 HCl). Luego se añaden a la mezcla 4,0 ml de SPAN 85 y 10 ml
del disolvente de hexano-cloroformo del Ejemplo 1, y se pro
duce una emulsión, en 1-2 minutos, agitando enérgicamente
usando una barra agitadora magnética. Se añaden 0,4 ml de
5 solución de cloruro de tereftaloílo (0,5M en el disolvente
de hexano-cloroformo del Ejemplo 1) en incrementos de 0,1
ml cada 30 segundos, seguidos por adiciones adicionales de
0,1 ml cada minuto durante los 6 minutos siguientes.

Tras centrifugar para separar las cápsulas
10 se desprecia lo que sobrenada, y las microcápsulas crudas
se vuelven a suspender en ciclohexano que contiene 5% de
SPAN 85. Se añaden 0,7 ml de cloruro de tereftaloílo y la
suspensión se agita durante 3 minutos. Tras separar las fa-
ses por centrifugación, las microcápsulas se lavan una vez
15 en ciclohexano puro y se someten a lavado final y recupera-
ción como se indica en el Ejemplo 1.

Los materiales biológicos lábiles, incluyendo
enzimas, se pueden disolver en la solución de albúmina se-
gún se desee. La tetraetilenpentamina ayudó a reticular el
20 polímero para formar membranas semipermeables fuertes, de
tamaño de poro uniforme.

Aunque los ejemplos anteriores se limitan a
sistemas de policondensación en los que se incluyen un ha-
luro de diácido y una diamina para producir un polímero o
25 copolímero de poliamida, será evidente para los expertos
en la técnica que el procedimiento de polimerización en dos
etapas, y otras enseñanzas aquí expuestas, serán útiles en
otros muchos procedimientos de encapsulación de la técnica
anterior. Por selección astuta de disolventes, elegidos se-
30 gún las enseñanzas de la presente invención para que sean

1 adecuados a sistemas concretos de polímeros y a los mate-
riales concretos a encapsular, los expertos en la técnica
tendrán poca dificultad para producir membranas de cápsu-
la de gran calidad de, por ejemplo, poliéster a partir de
5 un poliol y un diácido (HOOC-R-COOH) o haluro de diácido
(ClOC-R-COCl), otras poliamidas a partir de una diamina
(H₂N-R-NH₂) y un diácido, poliurea a partir de una diamina
y un diisocianato, policarbonato a partir de un diol y un
haluro de ácido, polisulfonamida a partir de un haluro de
10 sulfonilo multifuncional y una diamina, así como una pro-
teína reticulada, poliftalamina, y otras policondensacio-
nes bien conocidas.

Los métodos de encapsulación usando reaccio-
nes de poliadición tales como el tipo expuesto en, por
15 ejemplo, la patente de los EE.UU. nº 3.864.275, de Kan y
otros, también están dentro del ámbito de la presente in-
vención. Los expertos en la técnica tendrán poca dificul-
tad en adaptar el procedimiento antes expuesto a sistemas
que utilizan aminas polifuncionales y, por ejemplo, epiclora-
20 hidrina o poliésteres que contienen grupos epoxídicos.

La invención se puede realizar en otras for-
mas específicas sin salir del espíritu y características
esenciales de la misma. La realización y ejemplos presentes
se han de considerar, por tanto, en todos los sentidos, co-
25 mo ilustrativos y no restrictivos, estando indicado el ám-
bito de la invención por las reivindicaciones adjuntas, más
que por la descripción anterior, y por tanto se destinan a
estar abarcados en ella todos los cambios que caigan dentro
del significado y gama de equivalencia de las reivindicacio-
30 nes.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Procedimiento para encapsular un material de núcleo químicamente activo en una membrana semipermeable sintetizada por una reacción de polimerización interfacial, estando caracterizado dicho procedimiento por las etapas de: disolver dicho material de núcleo en un primer disolvente elegido del grupo que consta de agua, disolventes hidrófilos y mezclas de ellos; disolver un primer monómero en dicho primer disolvente; añadir disolvente hidrófobo a dicho primer disolvente; emulsificar el sistema de dos fases así producido, constituyendo dicho primer disolvente la fase discontinua de la emulsión; y añadir un segundo monómero a dicha emulsión, siendo capaz dicho segundo monómero de formar un polímero con dicho primer monómero y siendo soluble en dicho disolvente hidrófobo, para formar una membrana alrededor de los miembros de dicha fase discontinua en la interfase de dichas fases, en el que la mejora comprende: añadir dicho segundo monómero a dicha emulsión en fracciones, a intervalos durante la duración de la polimerización.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, donde dicho primer monómero es una poliamina.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación

30
m

1 2a, donde dicho segundo monómero es un haluro de diácido.

4a.- Procedimiento según la reivindicación
1a, donde dicho material de núcleo es una sustancia biológica lábil.

5 5a.- Procedimiento según la reivindicación
1a, donde dicha sustancia biológica lábil es una enzima.

6a.- Procedimiento según la reivindicación
1a, donde el pH de la fase discontinua se mantiene entre
5 y 9.

10 7a.- Procedimiento según la reivindicación
1a, donde dicha reacción de polimerización interfacial se
elige del grupo que consta de reacciones de policondensación,
poliadición y coacervación.

15 8a.- Procedimiento según la reivindicación
1a, donde dicho primer monómero es ligeramente soluble en
dicho disolvente hidrófobo, y dicho procedimiento se caracteriza
además por las etapas de: detener la reacción
de polimerización en una etapa en que se haya formado una
membrana de cápsulas macroporosa muy permeable, separando
20 dicho disolvente hidrófobo de dicha emulsión; volver a sus-
pender las cápsulas en un líquido, siendo dicho segundo mo-
nómero muy soluble en dicho líquido, siendo dicho primer
monómero menos soluble en dicho líquido que en dicho disol-
vente hidrófobo; añadir una segunda porción de dicho segun-
25 do monómero a la nueva suspensión, para causar más polime-
rización en dichas membranas de cápsula, para reforzarlas y
para hacerlas impermeables a dicho material de núcleo; e
interrumpir dicha polimerización.

30 9a.- "PROCEDIMIENTO PARA ENCAPSULAR UN MATE-
RIAL DE NUCLEO QUIMICAMENTE ACTIVO EN UNA MEMBRANA SEMIPER-

me

1 MEABLE SINTETIZADA".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de treinta y tres hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 04. NOV. 1976

P. A. Fernando de Elizaburu
Por Poder.

10

15

20

25

ME
30
JMM/.