

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

| | | | |
|-------|----|-----------------------|-------|
| 19 ES | 11 | NUMERO | 10 A1 |
| | 21 | 478.056 | |
| | 22 | FECHA DE PRESENTACION | |
| | | 24.2.1979 | |

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|-----------------|------------------------|----------------|
| 30 PRIORIDADES: | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 31 NUMERO | | |
| 881.116 | 24 de Febrero de 1.978 | ESTADOS UNIDOS |

| | | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| | A61J | |

| |
|---|
| 64 TITULO DE LA INVENCION |
| "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE CAPSULAS LIPIDICAS QUE CONTIENEN UNO O VARIOS MATERIALES BIOLOGICAMENTE ACTIVOS" |

| |
|---|
| 71 SOLICITANTE (ES) |
| Demetrios P. PAPAHAJIOPOULOS y Francis, Charles SZOKA Jr. |

| |
|--|
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE |
| 3170 Condit Street, Lafayette, California 74549, U.S.A. 375 Leroy Avenue, Buffalo, New York 14214, U.S.A. |

| |
|------------------|
| 72 INVENTOR (ES) |
| los solicitantes |

| |
|------------------|
| 73 TITULAR (ES) |
| los solicitantes |

| |
|------------------|
| 74 REPRESENTANTE |
| VICTOR GIL VEGA |

CADUCADO

MEMORIA DESCRIPTIVA

Entorno de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se relaciona con vesículas
5 lípidas sintéticas y con el método para su fabricación,
el encapsulado de materiales biológicamente activos y
su empleo.

2. Breve descripción de la técnica anterior

10 Antes de la presente invención, se ha dispuesto
de varios métodos para producir liposomas sintéticas,
con encapsulado de materiales biológicamente activos.
Por ejemplo, Robinson, Trans. Farady Soc., 56 : 1260-
1264 (1960) y Papahadjopoulos y colaboradores (Biochim.
15 Biophys. Acta, 135, 639, 1967) describían un método de
formación de dispersiones fosfolípidas a partir de un
sistema bifásico acuoso éter-lípido que implicaba la
evaporación del éter mediante burbujeo de nitrógeno a
través de la mezcla. No se intentó usar este procedi-
20 miento para atrapar materiales orgánicos ni se investi-
gó con detalle la eficacia del atrapamiento. Chowhan y
colaboradores describieron en Biochim. Biophys. Acta ,
266 : 320-342 (1972) una técnica de evaporación similar
a partir de un sistema bifásico clorofórmico-acuoso. E
25 ste procedimiento implicaba también el uso de un exceso
de fase acuosa y la lenta separación de la fase cloro-
fórmica para producir una población uniforme de vesicu-
las fosfolípidas. No se intentó elevar al máximo el ma-
terial acuoso capturado ni se investigó la eficacia de
30 atrapamiento de este procedimiento.

Dangham y colaboradores describieron en J.Mol.

Biol., 13:238-252 (1965) unas vesículas lípidas multilaminares que podían caracterizarse por poseer un pequeño volumen de atrapamiento, una baja eficacia del mismo (del 10%) y un espacio acuoso confinado (15 a 35 Å).

5 Las pequeñas vesículas unilaminares producidas por aplicación de ultrasonidos, descritas inicialmente por D. Papahadjopoulos y N. Miller (Biochim. Biophys. Acta, 135:624-638 (1967)) y por muchos otros desde entonces, tienen muy poca eficacia de captura y son inadecuadas para encapsular grandes macromoléculas, debido a su pequeño compartimiento acuoso (250 Å).

10 .Batzri y Korn (Biochim. Biophys. Acta, 298:1015 (1973)) describieron vesículas lípidas preparadas por inyección de los lípidos en fase orgánica en una solución acuosa, usando etanol, y Deamer y Bangham describieron lo mismo, pero con el uso de éter. Estos métodos producen vesículas unilaminares o escasamente laminares, pero tampoco consiguen elevadas eficiencias de encapsulamiento. En el caso de la inyección de etanol, esta baja eficiencia se debe al gran volumen acuoso en que se dispersa el etanol y al pequeño tamaño de las vesículas producidas por la técnica. En el caso de la técnica de inyección de éter, se debe a una combinación del gran volumen de espacio acuoso en el que se inyecta el éter, las pequeñas cantidades de lípido empleadas en el método y la manera en que se forman las vesículas.

25 Papahadjopoulos y sus colaboradores describen en Biochim. Biophys. Acta, 394:483-491 (1975) una preparación de grandes vesículas unilaminares, que implica un cambio estructural único inducido por calcio en la vesí

30

cula lípida, pero esta técnica queda restringida a un solo fosfolípido (fosfatidilserina) y presenta también una eficacia de encapsulado relativamente baja debido debido al método de reconstitución de las vesículas.

5 En la patente alemana nº 2.532.317 se ha descrito otra preparación de vesículas lípidas que implica el centrifugado de una emulsión de lípido-agua-éter a una fase acuosa. La desventaja de esta técnica consiste en que se requiere una centrifugación a elevada velocidad y una gran cantidad de la emulsión lípido-acuosa queda atrapada en la interfase y no entra en la fase acuosa. Esto reduce el porcentaje de atrapamiento de material.

15 La patente estadounidense nº 3.804.776 es digna de destacarse por su exposición de un método de producción de aminoácidos o polipéptidos encapsulados en aceites y grasas mediante dispersión de polvos del material deseado para su encapsulado en una mezcla fundida de la grasa o aceite y el ulterior vertido de esta mezcla fundida en agua. El material encapsulado queda contenido dentro de gotas relativamente grandes de lípido, lo cual restringe su uso a una administración oral a animales. El método es en cierto modo restrictivo, en el sentido de que se limita evidentemente al encapsulado de polvos y el lípido no forma una capa de -

20 ble.

 Finalmente, puede hacerse mención de la patente estadounidense nº 4.016.100, que describe el atrapamiento de ciertos productos farmacéuticos en vesículas lípidas mediante congelación de la dispersión fosfolí-

25

30

pida acuosa del producto farmacéutico y del lípido. Los compuestos farmacéuticos señalados para su encapsulado por el método de referencia muestran generalmente un elevado coeficiente de separación en una fase orgánica a partir de agua. Por consiguiente, cabría esperar que el material a encapsular penetrase en las capas dobles fosfolípidas de las vesículas producto. Teóricamente, esto proporcionaría un alto grado de encapsulamiento, pero subsiste la duda respecto a la bio-disponibilidad del material total encapsulado. Cabría esperar igualmente que no se obtuviesen unos ritmos relativamente elevados de encapsulamiento si se aplicase la técnica al encapsulado de productos farmacéuticos que sean de naturaleza más polar y menos susceptibles de penetrar en las capas dobles de las vesículas.

Por el método de la presente invención, pueden construirse vesículas lípidas oligolaminares (liposomas sintéticos) rápida y convenientemente, bajo condiciones suaves, con elevados rendimientos y de tal manera que incorporen un elevado porcentaje de una amplia variedad de materiales biológicamente activos procesados con ellas. Ejemplos representativos de materiales que pueden ser encapsulados por el método de la invención, son compuestos farmacéuticamente activos y composiciones de los mismos, hidratos de carbono, nucleótidos, polinucleótidos (tanto naturales como sintéticos), pesticidas, incluyendo fungicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas y moluscicidas, fertilizantes y nutrientes agrícolas solubles en agua, péptidos, proteínas, enzimas, virus y similares. Muchos de estos materiales no penetran normal

mente en la membrana plásmica de células y pueden ser inactivados en su circulación dentro de un organismo vivo o por contacto con tejidos y cultivos orgánicos. En el caso de pesticidas y nutrientes agrícolas o fertilizantes, pueden ser retirados de la zona de aplicación por la lluvia o irrigación. El encapsulado de tales materiales les protege contra su inactivación o arrastre, es decir, mantiene su biodisponibilidad. Células bacterianas, tales como *C. parvum* y *E. coli* y similares, pueden ser encapsuladas también por el método de la invención para su protección y biodisponibilidad.

El método de la invención puede emplearse también para encapsular preparados cosméticos que pueden usarse útilmente como se describe en la patente estadounidense nº 3.957.971.

Resumen de la invención

La invención comprende un método de encapsulamiento de materiales biológicamente activos en vesículas lípidas oligolaminares sintéticas, que comprende la provisión de una mezcla de un compuesto formador de paredes de vesículas en un disolvente orgánico y una mezcla del material biológicamente activo a encapsular, siendo la relación entre la fase orgánica y la fase acuosa aquella que produzca una emulsión del tipo de agua en aceite; la formación de una emulsión homogénea de la citada mezcla, del carácter producido por radiación ultrasónica; la separación del disolvente orgánico de la emulsión, de modo que se obtenga una mezcla dotada de un carácter similar a un gel; y la conversión de esta mezcla similar a un gel en vesículas oligolaminares sintéticas

que encapsulen el material biológicamente activo.

La invención comprende también el material intermedio similar al gel, el producto vesículas lípidas sintéticas, su uso y composiciones de soporte que incluyen las vesículas sintéticas como sus ingredientes activos.

El término "material biológicamente activo", tal como se emplea a lo largo de la memoria y de las reivindicaciones, significa un compuesto o composición que cuando se halla presente en una cantidad efectiva, reacciona con células y organismos vivos y/o les afecta.

El término "vesículas lípidas (liposomas) oligolaminares sintéticas", tal como aquí se usa, significa vesículas lípidas artificiales, creadas en el laboratorio y caracterizadas en parte por unas pocas o una sola capa lípida bimolecular que forman las paredes de las vesículas.

El método de la invención es útil para producir vesículas lípidas oligolaminares o unilaminares sintéticas que, a su vez, se emplean útilmente en una amplia variedad de procesos. Por ejemplo, las vesículas lípidas preparadas por el método de la invención pueden usarse para acentuar la biodisponibilidad de medicamentos, para acentuar la sustitución enzimática, suministro de drogas orales y tópicas, etc. Las vesículas lípidas producidas por el método de la invención pueden emplearse también para encapsular preparados cosméticos, pesticidas, compuestos para una liberación lenta y mantenida destinados al desarrollo de plantas, etc.

Descripción detallada de las versiones preferidas de la

invención.

En un sentido amplio, el método de la invención se destina a la formación, en primer lugar, de "micelas invertidas" en una fase orgánica y luego la separación de la fase orgánica. El sistema revierte entonces espontáneamente a una estructura bioestratificada o en dos capas, con una gran cantidad de fase acuosa encapsulada en grandes vesículas oligolaminares. La ventaja de este método consiste en que proporciona elevadas eficiencias de captura de fase acuosa y grandes vesículas estables. Los fosfolípidos son excelentes moléculas para la formación de las "micelas invertidas" y posteriormente de la subsiguiente capa doble de las vesículas. Más específicamente, el método de la invención se lleva a cabo del siguiente modo.

La primera operación del mismo consiste en proporcionar una mezcla de una composición formadora de paredes de vesículas lípidas en un disolvente orgánico y una mezcla acuosa del material biológicamente activo a encapsular en el vehículo. Los compuestos formadores de paredes de vesículas son generalmente bien conocidos, como asimismo sus métodos de preparación. Por ejemplo, puede usarse cualquier número de fosfolípidos o compuestos lípidos para formar las paredes de las vesículas. Ejemplos representativos de tales compuestos formadores de paredes son la fosfatidilcolina (en adelante denominada "PC"), tanto natural como sintética, el ácido fosfatídico (en adelante denominado "PA"), la lisofosfatidilcolina, la fosfatidilserina (en adelante denominada "PS"), la fosfatidiletanolamina (en adelante de-

nombrada "PE"), los esfingolípidos, el fosfatidilglicero-
rol (en adelante denominado "PG"), la esfingomielina,
cardiolipina, los glicolípidos, gangliósidos, cerebró-
sidos y similares, usados aisladamente o entremezcla-
5 dos, tal como en fosfolípidos de habas de soja (asoleg-
tin, Associated Concentrates). Además, pueden entremez-
clarse otros lípidos, tales como esteroides, coleste-
rol, aminas alifáticas, tales como aminas alifáticas de
cadena larga y ácidos carboxílicos, sulfatos y fosfatos
10 de cadena larga, fosfato dicetílico, hidroxitolueno bu-
tilado, tocofenol, retinol y compuestos isoprenoides,
con los componentes fosfolípidos para conferir ciertas
propiedades deseadas y conocidas a las vesículas forma-
das. Además, pueden emplearse en su lugar fosfolípidos
15 sintéticos que contengan porciones alifáticas altera-
das, tales como grupos hidroxilos, cadenas de carbono
ramificadas, cicloderivados, derivados aromáticos, éte-
res, amidas, derivados poliinsaturados, derivados halo-
genados o porciones hidrofílicas alteradas que contien-
20 gan grupos hidratos de carbono, glicoles, fosfatos,
fosfonatos, aminos cuaternarios, sulfatos, sulfonatos,
carboxilos, aminos, sulfhidrilos, imidazoles y combina-
ciones de tales grupos o entremezclarse con los fosfo-
lípidos antes mencionados, y utilizarse en el proceso
25 de la invención. Se apreciará por lo que antecede que
la composición química del componente lípido de las ve-
sículas preparadas por el método de la invención puede
variar grandemente sin apreciable disminución del por-
centaje de captura, aunque el tamaño de la vesícula pue-
30 da ser afectado por la composición lípida. Una mezcla

conveniente que hemos usado profusamente y que es representativa de mezclas lípidas ventajosamente empleadas en el método de la invención, está compuesta por PS y PC ó por PG y PC, tal como anteriormente quedan
5 identificados (ventajosamente en una relación molar de 1:4 en cada caso). El PC, PG, PA y PE pueden derivar de yema de huevo purificada. También pueden usarse PC y PG sintéticos saturados, tales como el dipalmitoilo. Otros lípidos anfipáticos que pueden usarse, ventajosa
10 mente también en relaciones molares 1:4 con PC, son los gangliósidos, globósidos, ácidos grasos, estearina, mina, alcoholes de cadena larga y similares.

La composición formadora de paredes de los liposomas puede proporcionarse inicialmente disuelta en
15 cualquier disolvente inerte que pueda separarse sustancialmente del compuesto lípido o fosfolípido cuando se desee. Ejemplos representativos de tales disolventes son una amplia variedad de éteres, ésteres, alcoholes, cetonas, hidrocarburos (aromáticos y alifáticos, inclu
20 yendo fluorocarburos) y siliconas en los que una fase acuosa no tenga una solubilidad apreciable. Los disolventes pueden usarse solos o en mezcla. Sin embargo, para cada disolvente o mezcla de ellos, la relación óptima de lípido, espacio acuoso y disolvente es diferen
25 te y ha de determinarse en cada caso mediante técnicas de tanteo, como comprenderán los expertos en la materia. El término "disolvente inerte", tal como aquí se usa, significa un disolvente para el lípido o fosfolípido que no interfiera o afecte adversamente de otra
30 manera el curso deseado del método de la invención.

El fosfolípido o lípido, junto con cualesquiera aditivos solubles en aquéllos, son ventajosamente evaporados de su disolvente hacia los lados de un adecuado recipiente de reacción. La fase orgánica, en la que se formarán las "vesículas de evaporación de fase invertida" de la invención, se añade luego al recipiente; es decir, un disolvente orgánico inerte para los lípidos y fosfolípidos, como se describe anteriormente. Con el mezclado, se obtiene la disolución del componente lípido de las vesículas a formar, previamente depositado sobre las paredes del recipiente. Son preferibles una serie de disolventes orgánicos inertes para formar la fase orgánica de acuerdo con el método de la invención, dependiendo de las siguientes condiciones del método empleado. Para unas condiciones de bajas temperaturas, es decir, subsiguiente retirada de la fase orgánica a temperaturas relativamente bajas, encontramos muy ventajoso al éter dietílico, aunque también pueden usarse ventajosamente cloroformo o tetrahidrofurano. Para un procesamiento a superiores temperaturas, el éter isopropílico es un preferido disolvente orgánico inerte, particularmente para preparar vesículas lípidas que contengan fosfolípidos saturados como componente lípido. Después de la disolución del fosfolípido o lípido para formar la fase orgánica, se añade una fase acuosa para obtener una mezcla bifásica heterogénea. La fase acuosa contiene en disolución/suspensión los compuestos o composiciones a encapsular en las vesículas lípidas sintéticas producidas por el método de la invención. Preferiblemente, la fase acuosa se neutraliza a un pH adecuado

para mantener la estabilidad del material a encapsular. La concentración iónica de la fase acuosa influye sobre la eficiencia de encapsulado obtenida en el método de la invención. Por regla general, cuanto mayor sea la concentración iónica de la fase acuosa, menor será el porcentaje de atrapamiento. Por ejemplo, con la presencia de 15 mM de cloruro sódico, puede encapsularse aproximadamente un 60% de la fase acuosa, mientras que con la presencia de 500 mM de dicho cloruro, sólo puede encapsularse aproximadamente un 20% de la fase acuosa. Así, para elevar al máximo el encapsulado de macromoléculas, se emplea preferiblemente un neutralizador de baja concentración iónica (inferior a 0,3). La eficacia de encapsulado depende también en cierto grado de la concentración de lípido o fosfolípido presente en el sistema bifásico. Preferiblemente, la proporción de componente lípido o fosfolípido es del orden de 0,5 a 50 mg/ml del disolvente orgánico inerte, aproximadamente. Preferiblemente, la relación entre fase orgánica y fase acuosa es del orden de 2:1 a 20:1 aproximadamente, en volumen, y más preferiblemente de 4:1, para formar una emulsión del tipo de agua en aceite.

La mezcla bifásica heterogénea obtenida como anteriormente se describe se emulsiona luego para obtener una emulsión del carácter producido por radiación ultrasónica. Preferiblemente esto se consigue con el uso de un aplicador de ondas sónicas (o "sonicador") del tipo de baño o, para preparados de gran volumen, en un emulsionador de tamaño industrial. Generalmente, la mezcla bifásica se trata sónicamente durante unos 3 a 5 minu -

tos o hasta que se forma una mezcla monofásica clara o una emulsión homogénea. Esto se consigue colocando simplemente el recipiente en el baño sonicador a un nivel óptimo. La emulsificación puede efectuarse a una amplia

5 gama de temperaturas, concretamente desde -10 a $+50^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, y mejor aún a una temperatura de 0 a 20°C . Las condiciones óptimas bajo las cuales se realiza la emulsificación dependen del disolvente, del fosfolípido y del volumen de fase acuosa usados en la preparación. Se comprenderá que pueden emplearse técnicas de

10 tanteo para determinar las condiciones óptimas para la emulsificación. Luego se trata la mezcla en emulsión para separar una porción sustancial del disolvente orgánico inerte. Esto puede efectuarse convenientemente mediante uso de un evaporador rotatorio, a una temperatura

15 de 20 a 60°C aproximadamente y bajo una presión reducida, es decir, en vacío (10 a 50 mm Hg). La temperatura empleada para la evaporación del disolvente orgánico de la emulsión depende del punto de ebullición del particular disolvente orgánico usado en la emulsión y de

20 la estabilidad del material biológicamente activo a encapsular. Durante la evaporación, la emulsión se torna primeramente en un gel viscoso, que es un producto intermedio. El gel es estable y puede almacenarse en este estado durante cortos períodos de tiempo, hasta una semana (por lo menos), a 4°C , bajo una atmósfera inerte, tal como de gas nitrógeno. Luego puede añadirse una pequeña cantidad de agua o neutralizador al gel y evaporarse la mezcla resultante durante un período adicional

25 (15 minutos aproximadamente) para facilitar la separa-

30

ción de vestigios del disolvente orgánico y para acelerar la conversión del gel en una suspensión de vesículas lípidas oligolaminares de aspecto homogéneo. El gel puede convertirse por agitación o por dispersión en un medio acuoso, tal como una solución neutralizadora. Las vesículas obtenidas varían en su diámetro entre 2.000 y 4.000 angstroms (promedio). Una notable proporción de las drogas, productos químicos, macromoléculas y otros compuestos y materiales biológicos a encapsular contenidos en el neutralizador acuoso es capturada dentro de las vesículas lípidas (hasta el 60% aproximadamente, dependiendo de la cantidad de lípido, del volumen de la fase acuosa, de la relación entre las fases orgánica y acuosa en el lípido, del tipo de disolvente o disolventes orgánicos y del tipo de lípido o lípidos usados en el proceso). El material acuoso no incorporado puede separarse en caso necesario mediante técnicas adecuadas y conocidas, tales como por centrifugaciones repetidas, cromatografía en columna, cromatografía por cambio iónico, diálisis y procedimientos análogos. Las vesículas lípidas con su contenido encapsulado pueden suspenderse luego en cualquier neutralizador isotónico para su uso. Las vesículas pueden esterilizarse mediante paso a través de un filtro de 0,4 micra (núcleoporo) cuando se desee una esterilización.

Ejemplos representativos de materiales y compuestos que pueden encapsularse por el método de la invención incluyen, pero sin carácter limitativo, drogas tales como el arabinósido de citosina y sus derivados fos

forilados; productos químicos tales como el monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico, sacarosa, antibióticos tales como la penicilina y estreptomina, hormonas polipéptidas tales como insulina, oxitocina y vasopresina, macromoléculas tales como dextrano, proteínas tales como albúmina, ferritina e inmunoglobulina G; enzimas tales como fosfatasa alcalina; ácidos nucleicos tales como el ácido poliadenílico (poli A), ácidos ribonucleicos, ácidos deoxirribonucleicos, virus y bacterias tales como la C. parvum, y materiales análogos.

Ventajosamente, el método de la invención se lleva a cabo bajo una atmósfera inerte. El término "atmósfera inerte", tal como aquí se usa, se refiere a una atmósfera no oxidante, tal como una de gas nitrógeno, argón y gases inertes similares.

Se observará por lo que antecede que el método de nuestra invención difiere de los de la técnica anterior en diversos aspectos. Por ejemplo, de acuerdo con nuestro método, el material a encapsular se añade a la fase orgánica con el lípido en el que queda totalmente encapsulado. Además, la fase orgánica es sustancialmente separada antes de que se añada un exceso de una fase acuosa. La emulsificación de la fase acuosa inicial en la fase orgánica y la separación de esta fase orgánica antes de la adición de cualquier exceso de fase acuosa son esenciales para un elevado porcentaje de captura en este método y constituye una diferencia crítica entre el proceso de nuestra invención y todos los métodos anteriores hasta ahora descritos. El método de la invención produce grandes vesículas oligolaminares

de muchos lípidos diferentes, tanto solos como en combinaciones. Una ventaja del método de la invención es la de que la evaporación de la fase orgánica se realiza bajo temperaturas suaves y vacío para evitar el potencial necesario para la inactivación de moléculas sensibles.

Los siguientes ejemplos describen la manera y el proceso de producción y uso de la invención y representan el mejor modo considerado por los inventores, pero no deberán considerarse como limitativos. En todos los procedimientos descritos a continuación, puede incluirse de 0,5 a 1 mol de un análogo fosfolípido fluorescente, tal como NBD-PE (Avanti Biochemicals), con el componente lípido o fosfolípido, a fin de poder seguir visualmente la separación de las vesículas en una columna.

Ejemplo 1. Encapsulado de enzimas

Se aplica a un matraz de fondo redondo de 50 ml dotado de un cuello de gran extensión, un racor 24/40 para su conveniente acoplamiento a un evaporador instantáneo. El matraz está dotado también de medios para una purga continua con gas nitrógeno. Se carga con 10 μ -moles de fosfatidilglicerol, 40 μ -moles de fosfatidilcolina y 50 μ -moles de colesterol disueltos en cloroformo. Con evaporación rotatoria, se evapora el disolvente, quedando una delgada capa lípida sobre las paredes internas del matraz. Se purga entonces éste con gas nitrógeno y se añaden 5 ml de éter dietílico con agitación para disolver los lípidos. Luego se añaden al matraz 1,5 ml de una mezcla acuosa de 10 mM de

cloruro sódico neutralizada a un pH de 7,4 con 4 mM de histidina/ácido 2-((tris(hidroximetil)metil)amino) etanosulfónico (en adelante denominado "TES") y 10 mg/ml de fosfatasa alcalina, para formar una mezcla bi

5 fásica heterogénea. Seguidamente se emulsiona la mezcla mediante tratamiento sónico durante 5 minutos a 0° C en depurador ultrasónico del tipo de baño (modelo T-80-80-IRS, Laboratory Supplies, Hicksville, Nueva York) Se evapora luego la emulsión resultante en un evaporador rotatorio (Duchi) a una temperatura de 25° C y bajo presión reducida (10 a 50 mm Hg aproximadamente), usando un aspirador de agua, hasta que se forma un gel viscoso. Este gel es un precursor intermedio de los liposomas sintéticos a preparar. El gel es estable y puede

10 almacenarse durante períodos de una semana por lo menos, a una temperatura de 4° C aproximadamente, bajo una atmósfera inerte.

Al gel anteriormente obtenido se añaden 1,5 ml del neutralizador de cloruro sódico/histidina/TES antes descrito y se gira suavemente el matraz para obtener una suspensión acuosa del gel. La resultante mezcla se evapora a 30° C bajo una presión de 10 a 50 mm Hg aproximadamente durante 15 minutos adicionales, para obtener una suspensión opaca de vesículas fosfolípidas (liposomas sintéticas) de diámetros medios de 0,2 a 0,6 micra. Una evaporación prolongada sin adición de

25 neutralizador extra tendrá por resultado unas suspensiones similares. Un examen con microscopio electrónico muestra que las vesículas son sustancialmente oligolaminares.

30

La suspensión opaca de vesículas se pasa a través de una columna de agarosa Bio-gel A 1,5 para separar las vesículas oligolaminares de la mezcla de fosfatasa alcalina sin encapsular. El porcentaje de encapsulamiento se calcula en un 34%. Las vesículas separadas pueden suspenderse en cualquier neutralizador isotónico y emplearse como material inicial para un reactivo enzimático.

10 Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa alcalina usada en aquél por 10 mg/ml de L-asparaginasa, se obtienen vesículas sintéticas que encapsulan ésta última. Las vesículas son útiles para inhibir ciertos desarrollos tumorales en mamíferos; véase Chang, T., Nature 229, 117-118 (1971), para la técnica de empleo.

15 Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa alcalina usada en el mismo por 10 mg/ml de varias glicosidasas, se obtienen vesículas sintéticas que encapsulan las enzimas. Tales vesículas producto son útiles en la terapia de sustitución enzimática; véase "Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases", Tager, Hooghwinkel y Daems; North-Holland Publ. Co., (1974) para la técnica de empleo.

25 Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa alcalina usada en el mismo por 84 mg/ml de 1- β -D-arabinofuranosilcitosina, se obtienen vesículas sintéticas que encapsulan la arabinofuranosilcitosina a emplear en la inhibición de ciertos desarrollos tumorales en

30

mamíferos; véase Mayhew y colaboradores, "Cancer Research", 36: 4406-4411, diciembre de 1976, para la técnica de empleo. De modo similar, pueden encapsularse análogos nucleósidos de ara-C, metotrexato o similares antimetabolitos, para su uso en la inhibición de ciertos desarrollos tumorales en mamíferos.

Similarmente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa alcalina usada en el mismo por 0,6 mg/ml de actinomicina, se encapsula este compuesto. La actinomicina D encapsulada por el procedimiento anteriormente descrito puede administrarse a pacientes que sufren de cánceres que responden a aquélla, siguiendo el método de Gregoriadis y colaboradores, Lancet, junio 29 de 1974, páginas 131-1316; véase también D. Papahadjopoulos y colaboradores, "Cancer Research", 36: 2988-2994, septiembre de 1976.

Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa usada en el mismo por la sal sódica de heparina disuelta en salina neutralizada con fosfato, se obtienen vesículas sintéticas que encapsulan la heparina. Las vesículas pueden suspenderse en solución neutralizadora y administrarse intravenosamente a un mamífero como anticoagulante de liberación sostenida, para tratar afecciones que respondan a aquéllas.

Similarmente, pueden encapsularse drogas tales como antimonioato de meglumina por el mismo procedimiento del Ejemplo 1. El antimonioato de meglumina encapsulado por el procedimiento anteriormente descrito puede

usarse en mamíferos contra organismos parásitos tales como la Leishmaniasis. Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento del Ejemplo 1, pero sustituyendo la fosfatasa usada en el mismo por compuestos queladores metálicos tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), penicilamina y similares, se obtienen vesículas sintéticas que pueden usarse en el tratamiento de pacientes que sufren de intoxicaciones metálicas, problemas de almacenamiento de metales o ciertas anemias; véase la patente estadounidense nº 4.016.290.

Ejemplo 2. Encapsulado de ácidos nucleicos

Se carga el matraz de fondo redondo descrito en el anterior Ejemplo 1 con 10 μ -moles de fosfatidilglicerol, 40 μ -moles de fosfatidilcolina y 50 μ -moles de colesterol disueltos en cloroformo. Se evapora la carga en un evaporador rotatorio para depositar una delgada capa lipídica sobre las paredes internas del matraz. Se purga éste con gas nitrógeno y se le añaden 5 ml de éter dietílico con agitación para redissolver los lípidos. Luego se agregan 1,5 ml de una mezcla acuosa de 10 mM de cloruro sódico neutralizado a un pH de 7,4 con 4 mM de histidina/Tris y 1 mg/ml de ácido ribonucleico (RNA) (ácido poliadenílico ó 25S tetrahimena ribosomal RNA). Se emulsiona la resultante mezcla por tratamiento sónico durante 5 minutos a una temperatura de 0°C en el depurador ultrasónico del tipo de baño (Laboratory Supplies, antes indicados). Luego se evapora la emulsión a una temperatura de 0°C y bajo una presión de 10 a 50 mm Hg en el evaporador instantáneo, hasta que se forma un gel. A este gel se añaden 1,5 ml de la solu

ción neutralizadora de cloruro sódico/histidina/TES antes descrita y se continúa la evaporación durante 15 minutos más. La resultante suspensión opaca es de vesículas sintéticas que encapsulan el ácido ribonucleico.

5 Después de reposar a una temperatura de 20°C durante unos 30 minutos, se centrifuga la suspensión a 100.000 XG durante 30 minutos. Luego se separa el material sobrenadante, quedando como sedimento las vesículas encapsuladoras sintéticas. Se calcula el porcentaje de

10 encapsulamiento de RNA en un 40 a un 43%. Las vesículas son útiles para insertar el RNA a través de membranas celulares.

Análogamente, pueden emplearse otros polirribonucleótidos, tales como el ácido polinosinicopolicitosínico, u otros polinucleótidos sintéticos, en lugar

15 del ácido ribonucleico en el procedimiento del Ejemplo 2, para formar vesículas lípidas sintéticas, que encapsulen estos compuestos para su empleo como agentes antivirales. Las técnicas de uso de tales vesículas

20 son bien conocidas.

Ejemplo 3. Encapsulado de insulina

Se carga el matraz de fondo redondo descrito en el anterior Ejemplo 1 con 50 μ -moles de fosfatidilcolina de dipalmitoilo y 50 μ -moles de colesterol en cloroformo. Se evapora la carga en un evaporador rotatorio

25 para depositar la mezcla lípida en las paredes internas del matraz. Luego se purga éste con gas nitrógeno y se añaden 7,5 ml de éter isopropílico y 7,5 ml de cloroformo con agitación para redissolver los lípidos.

30 Se añaden a la solución 1,5 ml de una mezcla acuosa de

insulina (bovina, 20 mg/ml en 7 M de urea) en neutralizador acuoso (10 mM de hidrocioruro de trietilamina, pH 7,9). Luego se emulsiona la mezcla resultante mediante tratamiento sónico durante 5 minutos a una temperatura de 45°C en un baño sonicador (Laboratory Supplies, antes indicado). Seguidamente se evapora la emulsión a una temperatura de 45°C y bajo una presión de 10 a 50 mm Hg en un evaporador instantáneo, hasta que se forma un gel. Se añaden a éste 1,5 ml del neutralizador de cloruro sódico/TES antes descrito, con agitación. Luego se continúa la evaporación durante 15 minutos más. Se deja reposar la resultante suspensión opaca durante 30 minutos a una temperatura de 45°C. Luego se pasa la suspensión a través de una columna de Sephadex G-75 a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) para separar vesículas lípidas sintéticas, que encapsulan la solución de insulina. Se calcula el porcentaje de encapsulamiento de insulina en un 34%. Las vesículas pueden suspenderse en salina neutralizada con fosfato y administrarse oralmente o intramuscularmente a niveles de dosificación convencionales a pacientes que sufran de diabetes controlada por insulina. Puede repetirse el anterior procedimiento a temperaturas inferiores durante la sonicación y evaporación (0 a 20°C) si se usan fosfolípidos flúidos para la formación de vesículas, en lugar de dipalmitoilfosfatidilcolina.

Análogamente, repitiendo el anterior procedimiento, pero sustituyendo la insulina por otras hormonas péptidas solubles en agua, tales como vasopresina, somatostatina o sus derivados y análogos sintéticos, se

obtienen vesículas lípidas sintéticas que encapsulan dicho material, para su empleo en aplicaciones terapéuticas a mamíferos que sufren de enfermedades que respondan a aquél.

5 Como se indica anteriormente, la concentración iónica de la mezcla acuosa a encapsular es un factor determinante del grado de encapsulamiento obtenido en el método de la invención. Al aumentar la concentra -
10 ción iónica de la mezcla acuosa a encapsular, disminu -
 yon tanto el porcentaje de encapsulamiento como el vo -
 lumen de espacio acuoso encapsulado por μ -mol de fos -
 folípido. Unas elevadas concentraciones de sacarosa ,
 glicerol, urea y similares no ejercen el mismo efecto
15 que el incremento de la concentración de especies ióni -
 cas en la mezcla a encapsular. Este efecto se muestra
 en el siguiente Ejemplo 5.

Ejemplo 5.

 Se repite el anterior Ejemplo 1 seis veces, pe -
 ro en cada caso la fosfatasa alcalina usada en dicho
20 ejemplo se sustituye por 0,84 mg/ml de 1- β -arabinofura -
 nosilcitosina (ara-C) y se varía la proporción de clo -
 ruro sódico en cada repetición para variar la concen -
 tración iónica de la mezcla de ara-C a encapsular. La
 proporción de cloruro sódico presente y el resultante
25 grado de encapsulamiento obtenido se muestran en la si -
 guiente Tabla 1.

TABLA 1

| <u>Prueba nº</u> | <u>Moles de ClNa</u> | <u>Porcentajes de Encapsulamiento</u> | |
|------------------|----------------------|---------------------------------------|------|
| 1 | 0,50 | 15,0 | |
| 5 | 2 | 0,15 | 37,5 |
| | 3 | 0,10 | 42,5 |
| | 4 | 0,04 | 47,5 |
| | 5 | 0,02 | 62,3 |
| | 6 | 0,00 | 62,5 |

10 La concentración lipídica en la mezcla bifásica a emulsionar tiene también influencia sobre el porcentaje de encapsulamiento obtenido por el método de la invención. Por ejemplo, el porcentaje de encapsulamiento de ara-C disminuye al reducirse las concentraciones de lípidos totales. Sin embargo, el volumen acuoso encapsulado por mol de fosfolípido aumenta.

15 Se encapsula un volumen acuoso de 11,2 litros aproximadamente por mol de fosfolípido cuando el lípido totaliza aproximadamente 100 μ -moles por 5 ml de disolvente y aumenta a unos 22,5 litros por mol de fosfolípido cuando se reduce el lípido total a 20 μ -moles. Es preferible el nivel de 20 a 100 μ M/5 ml, produciendo más de 100 μ M unos números incrementados de vesículas multilaminares. El siguiente Ejemplo 6 ilustra el porcentaje de encapsulamiento de ara-C obtenido bajo 25 varias concentraciones lipídicas.

Ejemplo 6

30 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 anterior cinco veces, pero en cada caso la fosfatasa alcalina usada en aquél se sustituye por 84 mg/ml de 1-⁴-

D-arabinofuranosilcitosina (ara-C) y se varía la concentración lípida total por cada repetición (mientras se mantiene la misma relación de PG:PC:colesterol). En la siguiente Tabla 2 se muestran la proporción total de lípido usada en cada repetición y el porcentaje de encapsulamiento obtenido.

TABLA 2

| 10 | Prueba nº | Lípido total (μ moles) | Porcentaje de encapsulamiento |
|----|-----------|--------------------------------|----------------------------------|
| | 1 | 20 | 15 |
| | 2 | 40 | 25 |
| | 3 | 60 | 30 |
| | 4 | 80 | 31,2 |
| 15 | 5 | 100 | 37,5 |

La naturaleza del lípido o lípidos empleados en el método de la invención no parece ser crítica; con la excepción de lípidos negativamente cargados, cuando se usan solos, tales como PS, PG, cardiolipina o ácido fosfatídico, unas diferentes composiciones lípidas en proporciones similares de lípido/disolvente/neutralizador ejercen sólo un efecto moderado sobre el grado de encapsulamiento obtenido. El siguiente Ejemplo 7 ilustra esta conclusión.

25 Ejemplo 7

Se repite el procedimiento del anterior Ejemplo 1 varias veces, con la excepción de que la fosfatasa alcalina que se usa en el mismo es sustituida por 0,84 mg/ml de ara-C ó 0,01 M de cloruro sódico en 1/10 de salina neutralizada con fosfato de Dulbecco, en lugar de

TES, y se varía el componente lípido en cada repetición. En la prueba n° 4 se emplearon 3,5 ml de éter dietílico y 1,05 ml de salina de Dulbecco (PBS); en la prueba n° 5, se emplearon 7,5 ml de éter isopropílico con 7,5 ml de cloroformo en lugar del éter dietílico y se realizó la segunda evaporación a 45°C; en la prueba n° 6 se usó una mezcla de 7,5 ml de éter isopropílico y 7,5 ml de etanol, en lugar del éter dietílico; en las pruebas Nos. 7 y 8 se usó una mezcla de 5 ml de éter dietílico con 1 ml de metanol, en lugar del éter dietílico solo. Los lípidos usados, la concentración de los mismos empleada y el porcentaje de encapsulamiento conseguido en cada caso, se muestran en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3

| Prueba n° | Composición lípida | Lípido total (μ-moles) | Porcentaje encapsulam. ara-C sodio | |
|-----------|---------------------------------------|------------------------|------------------------------------|------|
| 1 | PG/PC/Chol [*] (1:4:5) | 100 | 62 | 47,5 |
| 20 | 2 PG/PC (1:4) | 50 | -- | 34,3 |
| | 3 PS/PC/Chol (1:4:5) | 100 | 61 | ---- |
| | 4 Stam ^{**} /PC/Chol (1:4:3) | 56 | -- | 44,6 |
| | 5 DPPC | 50 | -- | 40,6 |
| | 6 Esfingomielina | 66 | 24 | ---- |
| | 7 PG | 50 | -- | 18,6 |
| 25 | 8 PS | 50 | -- | 22 |

* Chol representa colesterol

** Stam representa estearilamina

Las vesículas preparadas por el método de la invención funcionan como vehículos para el material biológicamente activo encapsulado que permanece biodisponible.

Las paredes de las vesículas son impermeables a los materiales encapsulados, como se muestra en el Ejemplo 8.

Ejemplo 8

5 Se separan tres porciones de 10 ml de las vesículas preparadas en el Ejemplo 5, prueba nº 5, y se dializaron durante toda la noche para retirar el material sin encapsular presente en la suspensión de vesículas encapsuladas con ara-C. Luego se colocó cada porción dializada en una bolsa dialítica y se dializó con
10 tra tres porciones consecutivas de 10 ml de salina de Dulbecco neutralizada con fosfato, durante 1 hora cada una, a varias temperaturas. Luego se observó el porcentaje de ara-C que se difundía a través de la bolsa dialítica por hora. Las observaciones, temperaturas empu
15 das y duración de la diálisis se muestran en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

Porcentaje de material atrapado que se libera por hora.

| <u>Tiempo</u> | <u>Temperatura °C</u> | | |
|---------------|-----------------------|-----------|-----------|
| | <u>10</u> | <u>20</u> | <u>37</u> |
| 1 hora | 0,376 | 0,697 | 1,97 |
| 2 horas | 0,221 | 0,613 | 1,69 |
| 3 horas | 0,195 | 0,649 | 1,54 |

Ejemplo 9. Encapsulado de bacterias

25 Se carga el matraz de fondo redondo descrito en el anterior Ejemplo 1 con 50 μ -moles de PG:PC (1:4) y 50 moles de colesterol disueltos en cloroformo. Con evaporación rotatoria, se evapora el disolvente, quedando una película de la mezcla lípida sobre las paredes
30 internas del matraz. Luego se purga éste con gas

nitrógeno y se añaden 5 ml de éter dietílico con agita-
 ción para redissolver los lípidos. Se añaden a la solu-
 ción 1,5 ml de una suspensión acuosa de la bacteria
 termodestruible *C. parvum* en salina de Dulbecco* neu-
 5 tralizada con fosfato. Se emulsiona la resultante mez-
 cla mediante tratamiento sónico durante 5 minutos a
 0°C en un sonicador (Laboratory Supplies, antes indica-
 do). Seguidamente se evapora la emulsión a una tempera-
 tura de 20°C y bajo una presión reducida de 10 a 50 mm
 10 Hg en un evaporador instantáneo, hasta que se forma un
 gel. A éste se añaden 1,5 ml de salina de Dulbecco neu-
 tralizada con fosfato y se continúa la evaporación du-
 rante 15 minutos más. El *C. parvum* encapsulado se sepa-
 ra del no encapsulado mediante centrifugación en un
 15 gradiente de sacarosa. Se encapsula un 30% del *C. par-*
vum presentado. Las vesículas así obtenidas pueden em-
 plearse como coadyuvante en la inmunoterapia contra
 ciertos cánceres, tal como se detalla en Seminars On -
 col. 1:367-378, 1974.

20 Análogamente, repitiendo el anterior procedi-
 miento del Ejemplo 9, pero sustituyendo el *C. parvum*
 usado en el mismo por otros inmunoestimulantes tales
 como BCG, células cancerosas intactas, o fracciones de
 25 purificación de las mismas, se obtienen vesículas sin-
 téticas que encapsulan dicho material. Estas vesículas

30 NOTA: * Salina de Dulbecco neutralizada con fosfato
 (ClNa, 0,137 M; PO₄INa, 8,2 x 10⁻³ M;
 ClK, 2,7 x 10⁻³ M; PO₄H₂K, 1,9 x 10⁻³ M;
 Cl₂Mg, 1,1 x 10⁻³ M; Cl₂Ca, 0,9 x 10⁻³ M).

deberán ser útiles en inmunoterapia al administrarse a un mamífero que sufra una afección que responda a aquéllas.

5 El ejemplo 9 demuestra también una particular
ventaja del método de la invención, en el sentido de
que proporciona un medio no sólo para encapsular mate-
riales en solución, sino también materiales en suspen-
sión en un medio acuoso. El material a encapsular pue-
de disolverse en la fase acuosa si es soluble. Como
10 variante, el material puede dividirse finamente y sus-
penderse en el medio acuoso o bien puede consistir en
macromoléculas en suspensión, tal como en el caso de
virus o materiales celulares. Parece ser que si hay es-
pacio para el material suspendido en la vesícula pro-
15 ducto, puede encapsularse por el método de la inven-
ción. Esto constituye una ventaja de este método, pues-
to que muchos de los métodos de la técnica anterior de
encapsulamiento no resultan factibles para el encapsu-
lado de materiales que no estén disueltos.

20 Las vesículas producto preparadas por el método
de la invención han demostrado encapsular grandes volú-
menes y materiales relativamente grandes dotados de ac-
tividad biológica. Según sea la naturaleza de los ma-
teriales encapsulados, las vesículas presentan una ga-
25 ma muy amplia de utilización. Por ejemplo, con antibió-
ticos encapsulados, pueden usarse in vivo e in vitro
para tratar elementos patógenos resistentes a los anti-
bióticos, incluyendo el *P. aeruginosa*, *H. influenzae*,
E. coli gram-negativos y similares. Se ha expuesto la
30 teoría de que la resistencia a las drogas desarrollada

por organismos bacterianos es resultado de la creación de impermeabilidad en la pared de las células. El suministro de un adecuado antibiótico al organismo se facilita cuando se efectúa a través de vesículas lípidas, puesto que éstas parecen penetrar fácilmente en la pared de las células bacterianas, liberando el antibiótico encapsulado dentro del elemento patógeno.

Análogamente, tal como se describe antes brevemente, mediante el encapsulado de compuestos antiparasitarios, puede suministrarse el material encapsulado al sistema reticuloendotelial de un huésped mamífero. La vesícula lípida puede suministrar el medicamento eficientemente para neutralizar el parásito, con un efecto tóxico mínimo sobre el citado huésped.

El encapsulamiento de agentes virales y bacterianos, tales como virus de polio inactivados ó *P. aeruginosa*, proporciona una vacuna que puede administrarse a un mamífero para darle inmunización contra la enfermedad causada por el agente, con una reducción de potencial de toxicidad asociado a tales vacunas no encapsuladas por el método de la invención.

La forma en que está redactada esta memoria, debe tomarse en sentido amplio, no limitativo.

REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de DEMETRIOS P. PAPANADJOPOULOS, y FRANCIS CHARLES SZOKA Jr., domiciliados en Estados Unidos, lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

1.^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, caracterizado porque:

se prepara una mezcla en un disolvente orgánico de un compuesto formador de paredes de cápsulas y una mezcla acuosa del material biológicamente activo destinado a encapsularse, siendo la relación entre la fase orgánica y la fase acuosa de un valor adecuado para proporcionar una emulsión del tipo de agua en aceite,

se forma una emulsión homogénea de la citada mezcla, del tipo de la producida por exposición a ondas ultrasonoras,

se extrae el disolvente orgánico de la emulsión con lo que se obtiene una mezcla del carácter de un gel y

se transforma la mezcla análoga a un gel en una suspensión de cápsulas oligolaminares sintéticas que contienen el material biológicamente activo, ya sea agitando dicha mezcla con carácter de gel, ya sea dispersando la misma en un medio acuoso.

2.^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1.^a, caracterizado en que los compuestos formadores de paredes están constituidos por un fosfolípido.

3.^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas li-

pidicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 2ª, caracterizado en que el fosfolípido comprende fosfatidilcolina en mezcla con un segundo fosfolípido y colesterol.

5 4ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 3ª, caracterizado en que la proporción de fosfatidilcolina está en una relación de 4:1 respecto al segundo fosfolípido.

10 5ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el compuesto formador de paredes se dispone inicialmente en un disolvente inerte y luego se deposita sobre la pared lateral de un recipiente de reacción por evaporación del disolvente inerte.

15 6ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el disolvente orgánico es seleccionado entre el grupo consistente en éter dietílico, cloroformo, tetrahidrofurano y éter isopropílico.

20 7ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la mezcla acuosa es neutralizada a un pH adecuado para mantener la estabilidad del material biológicamente activo.

30 8ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas

lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 7ª, caracterizado en que el neutralizador es un compuesto iónico de una concentración inferior a 0,3.

5 9ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la proporción del compuesto formador de paredes es del orden de 0,5 a 50 mg por ml del disolvente orgánico, aproximadamente.

10 10ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que se efectúa el emulsionado con radiación ultrasónica a una temperatura de 10 a 50°C aproximadamente.

15 11ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la separación del disolvente orgánico se lleva a cabo por evaporación de una porción de tal disolvente de la emulsión hasta que se obtiene una mezcla del tipo gel, añadiéndose luego agua a esta mezcla en una proporción suficiente para convertir el gel y evaporándose seguidamente el resto del disolvente.

20 12ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 11ª, caracterizado en que el agua añadida a la mezcla de tipo

25

30

gel es neutralizada a un pH adecuado para mantener la estabilidad del material biológicamente activo.

13^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que se realiza bajo una atmósfera inerte.

14^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que la dispersión se efectúa en agua neutralizada a un pH adecuado para mantener la estabilidad del material biológicamente activo.

15^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que se separan luego vesículas oligolaminares de materiales biológicamente activos no encapsulados.

20^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que el material biológicamente activo es una enzima.

25^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que el material biológicamente activo es un antibiótico.

30^a.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1^a, caracterizado en que el material biológicamente activo es un fármaco.

gicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el material biológicamente activo es un ácido nucleico.

5 19ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 18ª, caracterizado en que el ácido nucleico es un ácido deoxi-rribonucleico.

10 20ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el material biológicamente activo es un pesticida.

15 21ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el material biológicamente activo es un polipéptido.

20 22ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 21ª y caracterizado en que el polipéptido es insulina.

25 23ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el material biológicamente activo es un organismo bacteriano.

30 24ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracte-

terizado en que el material biológicamente activo es un virus.

25ª.- Procedimiento de fabricación de cápsulas lipídicas que contienen uno o varios materiales biológicamente activos, según la reivindicación 1ª, caracterizado en que el compuesto formador de paredes es una mezcla de colesterol, fosfatidiglicerol y fosfatidilcolina en una relación en peso de 5:1:4.

26ª.- "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE CAPSULAS LIPIDICAS QUE CONTIENEN UNO O VARIOS MATERIALES BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de treinta y cinco hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 24 de febrero de 1979

P.A. de DEMETRIOS P. PAPHALJOPOULOS, y
FRANCIS CHARLES SZOKA Jr.

Victor Gil Vega



POOR
QUALITY