

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 343**

21 Número de solicitud: 201330086

51 Int. Cl.:

B01J 13/16 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/17 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.01.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.07.2014

71 Solicitantes:

ECOPOL TECH, S.L. (100.0%)
Parc Empresarial El Foix, Indústria 7
43720 L'Arboç (Tarragona) ES

72 Inventor/es:

ROCAS SOROLLA, Josep y
ROCAS ALONSO, Pau

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de un microencapsulado y compuesto anfifílico reactivo, microencapsulado y composición correspondientes**

57 Resumen:

Procedimiento para la fabricación de un microencapsulado y compuesto anfifílico reactivo, microencapsulado y composición correspondientes. Procedimiento para la fabricación de un microencapsulado/nanoencapsulado polimérico y anfifílico, altamente funcionalizable y versátil, que comprende 2 etapas: dispersar una primera fase líquida en una segunda fase líquida formando una emulsión, de manera que dicha primera fase quede dispersa en dicha segunda fase, y polimerizar un polímero que forma la pared del microencapsulado. Entre ambas fases se forma una interfase con un compuesto anfifílico reactivo, que es un prepolímero del polímero. El compuesto anfifílico tiene dos o más grupos funcionales principales que reaccionan en la posterior polimerización para la formación del polímero. Estos dos grupos funcionales principales están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones. El compuesto anfifílico tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo o hidrófobo en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales.

ES 2 480 343 A1

PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACIÓN DE UN MICROENCAPSULADO Y
COMPUESTO ANFIFÍLICO REACTIVO, MICROENCAPSULADO Y
COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTES

5

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un
10 microencapsulado que comprende las etapas de: [a] dispersar una primera fase
líquida en una segunda fase líquida formando una emulsión, de manera que la
primera fase quede dispersa en la segunda fase, y [b] polimerización de un
polímero que forma la pared del microencapsulado.

15 La invención se refiere también a un compuesto anfifílico reactivo con por lo menos
dos grupos funcionales aptos para reaccionar en una posterior polimerización.

La invención se refiere asimismo a un microencapsulado y a una composición
cosmética o farmacéutica que comprende un microencapsulado.

20

Estado de la técnica

Son conocidos diversos métodos de encapsulación. Sin embargo la mayoría de
25 ellos requieren altas agitaciones, elevadas concentraciones de emulsionantes
externos o disolvente para conseguir tamaños de cápsulas inferiores a la micra,
etc.

Es conocido el empleo de emulsionantes que sean, simultáneamente, prepolímeros
30 del polímero que formará la pared del microencapsulado. Unos ejemplos se pueden
encontrar en los documentos US 6.262.152, US 7.199.185 y US 2007/0270508.

En general, las emulsiones pueden ser de dos grandes tipos: de aceite en agua (normalmente indicadas O/W, del inglés Oil/Water) o de agua en aceite (normalmente indicadas W/O, del inglés Water/Oil). En general la presente invención es adecuada para ambos casos, si bien los más habituales son las emulsiones O/W por lo que la mayoría de los ejemplos serán de este tipo, pero en ningún momento debe entenderse que la invención se refiere únicamente a emulsiones de aceite en agua. En la presente descripción y reivindicaciones se ha empleado la expresión "primera fase" para indicar la que será la fase dispersa, y la expresión "segunda fase" para indicar la que será la fase continua.

10

En la presente descripción y reivindicaciones se emplea la expresión microcápsulas y/o micropartículas de una forma amplia, de manera que se incluyan también cápsulas y/o partículas que, por su tamaño, podrían haber sido clasificadas más bien, como nanocápsulas y/o nanopartículas.

15

Sumario de la invención

La invención tiene por objeto un nuevo procedimiento que permita la obtención de microencapsulados de pequeño tamaño, y en concentraciones relativamente elevadas. Esta finalidad se consigue mediante un procedimiento de acuerdo con la invención del tipo indicado al principio caracterizado porque entre la primera fase y la segunda fase se forma una interfase que comprende un compuesto anfifílico reactivo, donde el compuesto anfifílico es un prepolímero del polímero que formará la pared del microencapsulado, y el compuesto anfifílico tiene por lo menos dos grupos funcionales principales que reaccionan en la posterior polimerización para la formación del polímero que formará la pared del microencapsulado, donde los dos grupos funcionales principales están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones, y donde el compuesto anfifílico tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo o hidrófobo en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales.

Efectivamente el procedimiento de acuerdo con la invención emplea unos compuestos anfifílicos que actúan como dispersantes y que autoemulsionan la emulsión pero que, al mismo tiempo, son reactivos, lo que permite que luego sirvan directamente para encapsular, formando la pared del microencapsulado. Estos

5 compuestos anfifílicos comprenden una cadena principal "corta" y tienen por lo menos una de las funciones hidrófila e hidrófoba en cadenas laterales. Efectivamente este es un concepto muy interesante ya que permite obtener unos compuestos anfifílicos particularmente adecuados para la invención. Debe tenerse en cuenta que en la presente descripción y reivindicaciones se ha denominado

10 como "cadena principal" aquella que tiene en sus extremos los dos grupos funcionales (denominados grupos funcionales principales) que posteriormente polimerizarán para formar el polímero de la pared del microencapsulado. De esta manera, el compuesto anfifílico se coloca en la interfase entre las dos fases y se orienta de manera que tiene las funciones hidrófobas dirigidas hacia la fase

15 orgánica y las funciones hidrófilas dirigidas hacia la fase acuosa. Esto permite obtener una serie de ventajas. Entre los grupos funcionales principales hay poca separación, ello favorece la polimerización, mejora el efecto barrera para evitar la difusión del material encapsulado hacia el exterior de la cápsula, y permite obtener una encapsulación estable. Por su parte, las cadenas laterales son relativamente

20 flexibles y adaptables. Por cadena principal "corta" debe entenderse que los dos grupos funcionales principales del compuesto anfifílico están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones, preferentemente entre 5 y 10 eslabones. En general, los eslabones serán del tipo $-CH_2-$, pero podrían ser de otro tipo (por ejemplo, sustituyentes como O, N, S etc.). Efectivamente, si hay más grupos CH_2 entre los

25 grupos funcionales principales, entonces la propia cadena principal tendría ya un efecto hidrófobo significativo, lo que contrarrestaría el concepto de "anfifilia lateral" y, además, tendría un efecto negativo sobre la rigidez (reduciéndola), ya que una mayor cantidad de grupos CH_2 en la cadena principal reduce la temperatura de transición vítrea parcial (T_g). Por ello interesa tener una cadena principal corta (con

30 elevada rigidez y efecto barrera) y tener unas cadenas laterales con las funciones hidrófilas e hidrófobas de mayor longitud.

Así, por ejemplo en el caso de emulsiones O/W, la microcápsulas correspondiente tendrá una fase orgánica en su interior. El compuesto anfifílico se habrá ordenado de manera que sus cadenas laterales hidrofóbicas están hacia el interior hidrofóbico de las cápsulas, y sus cadenas laterales hidrófilas están hacia el exterior de la microcápsula y, al polimerizar, esta estructura se ha “congelado” así. Esto permite
5 obtener posteriormente unas dispersiones de microencapsulados muy estables, que no se agregan, ni siquiera en presencia de líquidos salinos o biológicos que pudieran afectar o promocionar su agregación.

10 El prepolímero deberá tener por lo menos dos grupos funcionales principales que reaccionen en la posterior polimerización para la formación del polímero que formará la pared del microencapsulado, sin embargo puede tener más de dos grupos funcionales, con lo que se conseguiría una mayor reticulación. Asimismo puede haber una mezcla de compuestos anfifílicos con diferente número de grupos
15 funcionales principales, de manera que la mezcla permita obtener el grado de reticulación deseado.

Preferentemente el polímero (que forma la pared del microencapsulado) es insoluble en las dos fases, lo que es particularmente relevante para conseguir un
20 buen efecto barrera. En este sentido, una solución particularmente ventajosa es que el polímero tenga grupos tipo urea y/o uretano, así como el hecho de que estos grupos estén próximos entre sí.

Como puede verse, el concepto básico de la invención consiste en generar una
25 dispersión a partir de una primera fase y una segunda fase, donde la interfase se forma gracias a un compuesto anfifílico. El compuesto anfifílico es un compuesto reactivo. Gracias a ello, tras la formación de la dispersión, el compuesto anfifílico reacciona formando un polímero que conforma la pared de las microcápsulas. Por lo tanto, el compuesto anfifílico es realmente un prepolímero del polímero que forma
30 la pared de las microcápsulas. Este procedimiento permite la formación de microencapsulados de tamaño muy pequeño (incluso de orden nanométrico) y a concentraciones relativamente elevadas. Debe tenerse en cuenta que, generalmente, cuando se preparan microcápsulas, si éstas no están bien

- estabilizadas y diluidas, tienen tendencia a aglomerarse, y cuando se secan tienen tendencia a unirse y la pared de las cápsulas tiende a romperse debido a la fuerza de la propia aglomeración y de la delgada pared de las mismas. Las microcápsulas de acuerdo con la invención se pueden secar al aire aglomerándose relativamente poco a concentraciones relativamente elevadas. Además, las dispersiones se forman con agitaciones moderadas, lo que permite el encapsulado de principios activos "sensibles" a la agitación y, a la vez, permite una fabricación industrial a gran escala con menor energía y equipos de agitación menos costosos.
- 10 En los procedimientos de microencapsulación conocidos, en la primera fase se añade un prepolímero que posteriormente formará el polímero que conforma la pared de las microcápsulas. Por ejemplo, es conocido el empleo de poliisocianatos en la fabricación de microcápsulas a partir de una solución O/W. Sin embargo, estos prepolímeros (como los poliisocianatos empleados habitualmente) no son anfifílicos ni son autoemulsionantes. Por ejemplo, un poliisocianato empleado es el isofofon diisocianato (IPDI). El IPDI no se puede considerar que sea anfifílico ya que no tiene una parte soluble en agua y una parte soluble en aceite. Además, el IPDI no migra a la interfase, ya que es soluble en aceite mientras que su solubilidad en agua es despreciable. Por ello, es necesario añadir, usualmente en la fase
- 15 20 continua (que usualmente es la fase acuosa) unos agentes dispersantes y/o emulsionantes externos al prepolímero. Estos agentes dispersantes y/o emulsionantes, por su parte, pueden ser anfifílicos, pero no son reactivos, por lo que no forman parte del polímero que conforma la pared de las cápsulas. Sin embargo, estos agentes pueden entorpecer el proceso de formación de la pared.
- 25 En general, en los procedimientos conocidos, hay más espacios entre los retículos del polímero, hay más dificultad para autoordenarse en la interfase y hay interferencias entre los reactivos y los restantes agentes presentes en la interfase. En la presente invención el mismo compuesto anfifílico que es emulsionante y forma la emulsión es el que además es reactivo y es, por lo tanto, un prepolímero
- 30 del polímero que formará la pared de las microcápsulas. De esta manera se consigue una pared con un efecto barrera mejorado.

A partir de este concepto básico, el procedimiento de acuerdo con la invención contempla diversas variantes. Efectivamente:

- el compuesto anfifílico puede ser añadido en la primera fase ya formado, antes de
5 formar la emulsión.
 - el compuesto anfifílico es formado en la primera fase mediante la reacción de unos precursores en la primera fase, antes de formar la emulsión.
 - el compuesto anfifílico se forma "in situ" en la interfase de la emulsión, a partir de unos precursores que están en la primera fase y en la segunda fase, y que se
10 encuentran y reaccionan en la interfase.
 - el polímero se forma por la polimerización del compuesto anfifílico consigo mismo, bien de una forma directa o bien al reaccionar con el solvente de la segunda fase (por ejemplo, en el caso de una solución O/W en la que haya isocianatos en la fase dispersa, los isocianatos pueden reaccionar con el agua (formando una amina) y
15 posteriormente pueden reaccionar con otro isocianato formando una urea).
 - el polímero se forma por la polimerización del compuesto anfifílico con un segundo compuesto, añadido en la segunda fase, o bien añadido en la dispersión ya formada.
- 20 Además, puede haber procedimientos en los que concurren varias de las alternativas anteriores.

En el caso de tener el compuesto anfifílico formado antes de hacer la emulsión, el compuesto anfifílico es tal que, siendo anfifílico, es menos soluble en la primera
25 fase que en la segunda fase. De esta manera, el compuesto anfifílico tiene una tendencia a ir a la interfase debido a su afinidad con la segunda fase. De esta manera el compuesto anfifílico hace de emulsionante (autoemulsionante) y, además, ya se posiciona adecuadamente para la posterior reacción de polimerización.

30

Preferentemente el compuesto anfifílico, que es el prepolímero reactivo que formará posteriormente el polímero que conforma la pared del microencapsulado es el agente emulsionante principal de la emulsión y, muy preferentemente, es el único

agente emulsionante. Este aspecto es particularmente importante ya que se evitan emulsionantes externos, que muchas veces pueden precipitar al contactar con las microcápsulas en medios salinos o líquidos biológicos (como la sangre o líquido linfático), llegando a agregarse, lo que podría causar daños en los organismos biológicos por obturación de arterias o venas, etc.

Ventajosamente el compuesto anfifílico y/o el producto derivado de su polimerización es el agente estabilizante principal, preferentemente es el único agente estabilizante de la emulsión.

10

Preferentemente no se añade ningún agente emulsionante y/o estabilizante adicional. En particular, la fase acuosa (en particular, cuando es la segunda fase, es decir la fase continua) está exenta de emulsionantes del grupo formado por alquilcarboxilatos, alquilsulfonatos, alquiletoxilados (como los productos comercializados bajo los nombres Tween ® y Span ®) y polímeros anfifílicos no reactivos con las cadenas hidrófilas e hidrófobas en la cadena principal (como el polipropilenglicol y el polietilenglicol, comercializados bajo el nombre Pluronic ®).

Como ya se ha comentado anteriormente una alternativa es que la primera fase sea la fase orgánica y la segunda fase sea la fase acuosa. En este caso es ventajoso que el compuesto anfifílico tenga un valor HLB (Hydrophilic lipophilic balance- Balance hidrófilo lipófilo) mayor que 10, preferentemente mayor que 15. Por el contrario, en el caso de que la primera fase sea la fase acuosa y la segunda fase sea la fase orgánica, entonces es ventajoso que el compuesto anfifílico tenga un valor HLB menor que 10. En general, cambiando la proporción de grupos funcionales lipófilos frente a hidrófilos del prepolímero se pueden conseguir emulsiones tipo agua en aceite o aceite en agua. Dependiendo de tipo de principios activos que se quieran encapsular se utilizará un método u otro. En el caso de sistemas aceite en agua los grupos funcionales hidrófilos superan a los lipófilos en el prepolímero que luego formará la pared de las cápsulas al reaccionar. Y viceversa, en el caso de emulsiones agua en aceite los grupos funcionales lipófilos superan a los hidrófilos en el prepolímero que sirve para emulsionar y formar la pared posteriormente.

Preferentemente los grupos funcionales principales del compuesto anfifílico son grupos funcionales isocianato (NCO), aptos para formar enlaces tipo uretano y/o tipo urea al reaccionar con grupos funcionales alcohol (OH) y amina (NH),
5 respectivamente. Sin embargo, el concepto general de la invención se podría hacer también con otros grupos funcionales principales. Así, por ejemplo, otra alternativa interesante consiste en tener unos grupos funcionales principales que sean silanos en lugar de isocianatos. Estos silanos se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la reacción de unos isocianatos terminales con grupos aminopropiltrialquilsilanos o
10 alquilaminopropiltrialquilsilanos (como el AMEO, aminopropiltrimetoxisilano por ejemplo, o con el compuesto Dynasytan ® 1189 comercializado por Evonik Industries, que es un N-(n-butil)-3-aminopropiltrimetoxisilano. Estos grupos funcionales incluidos en estructuras denominadas híbridas al estar introducidos en un poliuretano-poliurea de base forman prepolímeros híbridos orgánico-inorgánicos
15 de poliurea y/o poliuretano (considerados orgánicos) con silanos (considerados inorgánicos). Estos tipos de prepolímeros híbridos reaccionan por catálisis (ácida, básica o organometálica o combinada) a través de los grupos funcionales silano para dar estructuras reticuladas vítreas (ya que se forma en una parte de la molécula una estructura tipo vidrio Si_xO_y). Es decir, la reticulación en este caso
20 sería del silano consigo mismo y no requeriría de poliaminas. Estas son muy estables a la hidrólisis y pueden ser interesantes en algunas aplicaciones. De hecho, el compuesto anfifílico podría ser, en general, mixto, en el sentido que sus grupos funcionales principales pueden ser diferentes entre sí. Así, por ejemplo, en este caso concreto, la sustitución de los grupos NCO por silanos podría ser
25 parcial, con lo que se obtendría una pared del micro encapsulado que sería híbrida.

El compuesto anfifílico que se acumula en la interfase puede ser un compuesto que es añadido a la primera fase líquida, o bien puede ser un compuesto que se forma en la primer fase líquida a partir de un primer precursor y de un segundo precursor que se hacen reaccionar entre sí, es decir, el compuesto anfifílico puede ser
30 añadido a la primera fase líquida ya formado o puede ser formado "in situ". De hecho, podría haber un tercer precursor (o incluso más precursores). El primer precursor sería el que conforma la "cadena principal" del compuesto anfifílico y el

segundo y tercer precursor son los que aportan las cadenas laterales hidrófila e hidrófoba, respectivamente. De hecho, el tercer precursor puede ser incluido en la primera fase o puede ser incluido en la segunda fase (tanto antes de hacer la emulsión como después de haberla hecho). En el caso de que el tercer precursor
5 esté en la segunda fase, es ventajoso que, aun siendo soluble en la segunda fase, tenga una mayor afinidad con la primera fase. Ello favorecerá que migre hacia la interfase, donde podrá reaccionar con el producto de la reacción entre el primer precursor y el segundo precursor, formando así el compuesto anfifílico directamente en la propia interfase.

10

Para la formación del polímero, el prepolímero puede polimerizar consigo mismo. Así, por ejemplo, en el caso de que los grupos funcionales principales sean isocianato (NCO), el prepolímero podría reaccionar con el agua de la fase acuosa y podría polimerizar consigo mismo. Sin embargo, en determinados casos, es
15 ventajoso que esto no sea así, lo que se puede conseguir, siguiendo con el ejemplo de que los grupos funcionales principales sean isocianato, manteniendo la emulsión a una temperatura lo suficientemente baja como para que el isocianato no reaccione con el agua (o, al menos, no reaccione significativamente). A cambio, es ventajoso que la segunda fase comprenda un segundo compuesto, donde el
20 segundo compuesto comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con los grupos funcionales principales del compuesto anfifílico, para formar el polímero que conforma la pared del microencapsulado. Así, por ejemplo, en el caso de que los grupos funcionales principales sean isocianatos, el segundo compuesto puede ser un diol o una diamina (o un poliol o una poliamina si se desea
25 una mayor reticulación). De esta forma se formaría el polímero, que sería un poliuretano o una poliurea. Una alternativa ventajosa es que el segundo compuesto sea también anfifílico, de manera que también tenga una tendencia a migrar hacia la interfase, de manera que se encuentre con el compuesto anfifílico. Por otro lado, en el caso que el compuesto anfifílico se forme "in situ", es decir, en la propia
30 interfase, es ventajoso que este segundo compuesto haga las funciones del segundo precursor indicado anteriormente. En este mismo sentido, podría haber un tercer compuesto que hiciese las funciones del tercer precursor y, además, podría haber un compuesto adicional que fuese únicamente responsable de polimerizar

con el compuesto anfifílico formado (es decir, un compuesto que no incluya una función hidrófila o hidrófoba).

Preferentemente el primer precursor es un isocianato del grupo formado por isofocon diisocianato (IPDI), hexametileno 1,6-diisocianato (HDI) y difenilmetano 4,4'-diisocianato hidrogenado (HMDI). De hecho, el isocianato ideal sería un diisocianato muy pequeño como podría ser un etano o un propano con una función NCO en cada uno de sus extremos, si bien son unos compuestos que no se usan a nivel industrial. Algunos de los diisocianatos tienen la facultad de combinarse entre ellos formando dímeros o trímeros, como por ejemplo en el caso de HDI. En general, la presente invención puede emplear cualquier diisocianato o triisocianato de los indicados anteriormente así como cualquier dímero, trímero, tetramero, pentamero, etc. que se derive de los mismos. Unos ejemplos de los mismos pueden ser dímeros de uretdiona de HDI, trímero trimetilolpropano de HDI, trímeros de isocianurato de HDI o IPDI, trímeros de biuret de HDI o IPDI, alofanatos de HDI, etc.

Muy preferentemente el isocianato es un isocianato alifático, que es más estable. Es particularmente interesante que el isocianato sea IPDI, o los dímeros o trímeros de HDI, por su menor reactividad.

Una alternativa diferente, para tener compuestos anfifílicos con un carácter graso más acusado, con HLB bajos, para conseguir emulsiones agua en aceite y cápsulas en este medio, sería un isocianato graso comercializado por Cognis como DDI1410 disocianato.

Ventajosamente el segundo precursor es un compuesto hidrófilo, y, preferentemente, el segundo precursor comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales del primer precursor. El segundo precursor tiene preferentemente su función hidrófila en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une los dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales de dicho primer precursor, ya que, de esta manera, la "cadena principal" del compuesto anfifílico se formará a partir de la

“cadena principal” del primer precursor y la “cadena principal” del segundo precursor, y la función hidrófila quedará en una posición lateral. El segundo precursor puede ser un compuesto no ionomérico, en cuyo caso preferentemente es un compuesto polietoxilenado con un peso molecular superior a 100, muy
5 preferentemente superior a 500. En principio, para que un compuesto polietoxilenado tenga solubilidad acuosa y equivalga a un compuesto ionomérico debe tener un peso molecular relativamente elevado (preferentemente superior a 500). Sin embargo, el compuesto anfifílico puede incluir más de un precursor hidrófilo, de manera que se suma el efecto hidrófilo de ellos. Ventajosamente el
10 compuesto polietoxilenado tiene un peso molecular inferior a 5.000, ya que con pesos moleculares mayores probablemente sea difícil de ajustar con el monómero hidrófobo. En el caso que el primer precursor sea un isocianato, entonces este segundo precursor puede ser ventajosamente un mono- o polialcohol (por ejemplo el diol comercializado bajo el nombre de YMER N120 ®) o una mono- o poliamina
15 (por ejemplo la monoamina comercializada bajo el nombre JEFFAMINE M1000 ®). Así, por ejemplo, preferentemente, se usaría el YMER N120 ® cuando el poliisocianato es un diisocianato, para crear así un prepolímero lineal difuncional con dos grupos isocianato funcionales terminales (para lo cual hay que hacer que la reacción tenga lugar siempre con exceso de diisocianato respecto del diol);
20 mientras que preferentemente se empleará Jeffamine M1000 ® cuando el poliisocianato tiene una funcionalidad mayor de 2. Alternativamente, el segundo precursor puede ser de tipo ionomérico, preferentemente con un grupo funcional carboxílico o sulfónico. En este caso, es ventajoso que tenga este grupo funcional en una cadena lateral. Ventajosamente puede ser un diol (o una diamina) alquil
25 carboxílico o sulfónico, como por ejemplo el ácido dimetilolpropiónico (DMPA). Otros compuestos aniónómeros o cationómeros también son posibles. El segundo precursor puede ser también una mezcla de compuestos ionómeros y no ionómeros.

30 Preferentemente el tercer precursor es un compuesto C8-C22 hidrófobo, y comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales del primer precursor. Así, si el primer precursor es un isocianato, el tercer precursor es preferentemente un alcohol (o un poliol) o una amina (o una

poliamina). El tercer precursor tiene preferentemente su función hidrófoba en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une los dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales del primer precursor. La función hidrófoba se puede conseguir asimismo mediante fluoropolímeros dioles o polisiloxanos dioles.

Ventajosamente la reacción del primer precursor con el segundo precursor y el tercer precursor se hace en presencia de un exceso del primer precursor, para evitar que el prepolímero crezca excesivamente y para conseguir que el prepolímero quede reactivo con grupos funcionales reactivos libres.

Preferentemente el tercer precursor es un compuesto del grupo formado por dioles o diaminas grasos C10-C22, y muy preferentemente es un gliceril monoglicérido, como los gliceril monooleatos o monoestearatos, un dimerdiol o una cocopropilendiamina. También puede ser ventajosa una tallow oil propilendiamina, o una dimer diamina (Priamine). Como se verá más adelante, otra posibilidad sería que sea una monoamina grasa o monoalcohol graso si el isocianato inicial tiene más de funcionalidad 2. Lo que sobra de funcionalidad 2 es lo que se captaría con monoaminas o monoalcoholes grasos y monoaminas o monoalcoholes hidrofílicos, para al final tener un prepolímero reactivo con anfifilia y funcionalidad controlada en 2, para evitar reticulaciones previas e insolubilidad mientras se forma el prepolímero, ya que podrían haber subreacciones al poner en contacto triisocianatos con triaminas o con trioles antes de formar la emulsión. Es decir no interesa que haya reticulación antes de hora ya que se insolubilizarían los prepolímeros (precipitarían) y no se podrían emulsionar. La trifuncionalización y reticulación debe sobrevenir después de autoemulsionar el prepolímero reactivo anfifílico (en principio lineal y de funcionalidad 2 o menor de 2) y soluble en su fase.

Ventajosamente tras la reacción de formación del prepolímero se añade un principio activo a dicha primera fase líquida. Esta adición "a posteriori" permite proteger al principio activo de cualquier "agresión" que podría sufrir durante la fabricación del prepolímero. En el caso de una fase dispersa orgánica, el principio activo será hidrófobo, y preferentemente puede ser un principio activo del grupo formado por

vitaminas lipófilas (como retinol, o tocoferol), coenzima Q10, aceites esenciales, aceites medicinales y fragancias. En el caso que la fase dispersa sea acuosa, el principio activo es preferentemente un péptido hidrófilo, o una proteína hidrosoluble. De hecho, en general, puede serlo cualquier principio activo soluble en la fase dispersa (sea orgánica o agua, o incluso puede constituir la fase dispersa él mismo) y que no interfiera con la reacción de formación interfásica de la pared de las micropartículas.

Muy preferentemente el principio activo es un fármaco antitumoral como el paclitaxel, o la plitidepsina (comercializada por Pharmamar). Estos fármacos antitumorales (citotóxicos) son hidrófobos y poco funcionalizados y no interfieren con la reacción interfásica.

Ventajosamente el segundo compuesto, es decir, el compuesto que se añade en la segunda fase, es una poliamina, preferentemente una diamina, triamina, tetraamina o pentaamina y muy preferentemente es una poliamina del grupo formado por etilendiamina (EDA), dietilentriamina (DETA) y trietilentetraamina (TETA). Sin embargo, también podría ser una guanidina, o una diamina (o poliamina) sulfonada o carboxilada, que puede dar más hidrofilia superficial aparte de reticular y cerrar el principio activo dentro del polímero final.

Preferentemente se añade un cuarto precursor que, ventajosamente, comprende un grupo ácido (como sulfonato, carboxilato o fosfato), un disulfuro o un éster lábil en la cadena principal. A continuación se analizan estos casos con más detalle:

- Una primera opción es que este cuarto precursor comprenda un grupo ácido (sulfonato o carboxilato o fosfato) que se incluiría, por ejemplo, en forma de diaminoalquilsulfonato (tipo EPS® de Raschig o PolyEPS520® de Raschig). Este cuarto precursor se introduciría después de la introducción del segundo precursor y del tercer precursor. Alternativamente, en lugar de introducir este cuarto precursor para la fabricación del prepolímero (el compuesto anfifílico), se puede introducir este compuesto en la fase continua, o después de hecha la emulsión. Podría ser antes o después de que el prepolímero reaccione con el segundo compuesto o

incluso juntos. En general, es ventajoso la inclusión de cualquier compuesto con un grupo funcional que acelerará la hidrólisis en medio acuoso en presencia de enzimas tipo esterasas. Esta alternativa, que introduce grupos ionoméricos (en principio aniónómeros, aunque podrían ser cationómeros también) tiene una doble
5 influencia, puede mejorar la emulsión y estabilidad en agua e inhibir la adhesión de las nano o microcápsulas entre sí, y además puede favorecer o acelerar la hidrólisis de la pared en función del tiempo. El agua ataca más la pared en presencia de ionómeros. De hecho, una mayor parte hidrófila en comparación con la parte hidrófoba también aceleraría la hidrólisis de la pared de la cápsula. También
10 ayudaría probablemente a que la paredes de la microcápsula fuesen hidrolizadas, por ejemplo, por unas esterasas u otras enzimas hidrolíticas, que se expresen en las cercanías de una inflamación (sea tumoral o de otra índole), lo que permitiría liberar selectivamente el contenido del principio activo en una zona determinada inflamada del organismo.

15

- Una segunda opción es que este cuarto precursor comprenda un disulfuro, lo que se puede realizar a partir de diaminodiaquil disulfuros (incluidos al final) o de dioldialquil disulfuros (incluidos en el prepolímero junto con el diol hidrofílico). El disulfuro aumenta la capacidad de degradación de la pared de las cápsulas a las
20 enzimas con tioles en su centro activo o glutatona (que es un péptido sobreexpresado en tumores e inflamaciones). En ambos casos, probablemente haya una sobreexpresión de los mismos en los alrededores del tumor o en el interior del citoplasma de las células afectadas (tumoraes) debido a la actividad reductora exacerbada por la gran cantidad de material orgánico en el tumor.

25

- Una tercera opción es que este cuarto precursor comprenda un éster lábil. En este caso, se refiere a la presencia de grupos éster especialmente sensibles a la hidrólisis en el prepolímero. La presencia de ésteres, que son grupos funcionales más hidrolizables que el uretano o urea, modularía la hidrólisis de la pared
30 dependiendo de su cantidad presente, ayudando de nuevo a las esterasas o tioles u otros nucleófilos presentes en la zona tumoral o inflamada a hidrolizar las paredes de la cápsula y liberar el fármaco o activo.

- También, en general, la presencia de este tipo de grupos funcionales haría el conjunto más biodegradable.

La pared del microencapsulado debe cumplir diversas propiedades. Por un lado, debe ser una “buena pared”, en el sentido de que debe ser hermética, pero, por otro lado, debe permitir la liberación del contenido cuando sea conveniente. También debe tenerse en cuenta que la pared es realmente una superficie tridimensional y que suele estar formada por una pluralidad de capas de polímero. Así, el polímero que conforma la pared debe presentar un cierto equilibrio entre rigidez y flexibilidad que, además, deberá ser ajustado para cada caso particular. Sin embargo, en general, se puede decir que una gran reticulación no es aconsejable. En este sentido, el compuesto anfifílico (es decir, el prepolímero del polímero que forma la pared) es mayoritariamente difuncional (en el sentido de los grupos funcionales principales, que son los que participarán en la formación del polímero). Podrá haber un cierto grado de trifuncionalidad (o incluso una funcionalidad mayor), pero el compuesto anfifílico será “mayoritariamente difuncional”. Lo mismo se puede decir respecto del segundo compuesto (que es el que está presente en la otra fase). Un exceso de trifuncionalidad (o, en general, de polifuncionalidad) en el momento de formar el polímero puede llevar a problemas estéricos y la formación de huecos o cavidades que perjudiquen el efecto barrera que debe ejercer la pared de la microcápsula. Teniendo en cuenta esto, se pueden plantear dos estrategias preferentes para la fabricación del compuesto anfifílico:

- el compuesto anfifílico puede obtenerse a partir de precursores que sean todos ellos también mayoritariamente difuncionales. Esta es la filosofía de las alternativas preferentes indicadas en los párrafos anteriores. De esta manera, se pueden obtener compuestos anfifílicos que, por ejemplo, pueden ser del siguiente tipo:

diisocianato-diol-diisocianato-diamina-diisocianato

30

el diisocianato puede ser un diisocianato “pequeño” (como el IPDI que, por sí solo, no es anfifílico), el diol puede tener una cadena lateral hidrófila (como el YMER N120 ®) y la diamina puede tener una cadena lateral hidrófoba (como el Duomeen

C[®] de Akzo Nobel, que es una diamina grasa C12). El IPDI con el YMER N120 es demasiado hidrófilo, de manera que se mejora su comportamiento anfifílico con la adición de Duomeen C o dimer diol (ambos tienen sus grupos funcionales (las dos aminas o los dos OH) bastante próximos, por lo que no se alarga excesivamente la cadena principal). Como ya se ha comentado, puede haber variantes, incluyendo algún precursor con una funcionalidad mayor (por ejemplo, por ser una mezcla de compuestos difuncionales y trifuncionales) o también menor. En definitiva, lo que interesa es un prepolímero anfifílico reactivo con cierta linealidad y algo (pero poco) de trifuncionalidad, para que sea autoemulsionable. En general, es ventajoso que el espacio entre la parte hidrófila e hidrófoba no sea grande. También es interesante que en el polímero que conforma la pared tenga grupos resistentes al agua y al aceite o solvente orgánico usado, como es el caso de las ureas y los uretanos.

- otra estrategia diferente para obtener el compuesto anfifílico es partir de un primer precursor (que, preferentemente es un isocianato) con una funcionalidad elevada (mayor que 3) y formar el compuesto anfifílico a base de unir los restantes precursores directamente al primer precursor, y no formando una cadena como en el caso anterior. En este caso, los restantes precursores tienen una funcionalidad baja (menor que 2) para evitar una excesiva reticulación del conjunto. En general, una determinada molécula ha de tener un grado de funcionalidad que debe ser necesariamente un número entero. Sin embargo muchos compuestos son realmente una mezcla de moléculas similares pero no idénticas. Estos compuestos pueden tener unos valores de funcionalidad que no son números enteros, ya que son, en realidad, el valor promedio de las funcionalidades de cada uno de los componentes. En este sentido se deben entender las funcionalidades indicadas en la presente descripción y reivindicaciones. Una forma preferente de realizar esta alternativa es mediante el uso de un poliisocianato (como un tetrámero, o alofanato de trímero de hexametilendiisocianato, como por ejemplo el compuesto Bayhydur VPLS2319[®] (que es un poliisocianato basado en el hexametilendiisocianato, y es comercializado por Bayer), que tiene una funcionalidad de 3,8 y ya está hidrofiliado) al que se añade una amina o alcohol graso monofuncional (preferentemente C10-C22 lineales o ramificados, y muy preferentemente C12-C18 lineales) (para aportar la función hidrófoba) y una amina o alcohol polietoxilados

monofuncionales (como por ejemplo Jeffamine M1000) (para aportar la función hidrófila), si bien también son posibles otros precursores, como el glicólico, la glicina, la taurina, monometil éteres de alcoholes polietoxilados, etc. El compuesto anfifílico resultante aun tendrá dos (o entre 2 ó 3) isocianatos libres con los que
5 podrá formar el polímero que conforma la pared de las microcápsulas.

Preferentemente se añade un segundo prepolímero a la primera fase, donde el segundo prepolímero tiene por lo menos dos grupos funcionales principales que reaccionan en la posterior polimerización para la formación del polímero, donde el
10 segundo prepolímero es más hidrófobo que el compuesto anfifílico si dicha primera fase es orgánica, o el segundo prepolímero es más hidrófilo que el compuesto anfifílico si dicha primera fase es acuosa. Efectivamente, de esta manera, este segundo prepolímero tenderá a distribuirse como una segunda capa interna de la pared de las microcápsulas, dada su mayor afinidad a la primera fase. Este
15 segundo prepolímero reaccionará también con el segundo compuesto formando así una pared con dos capas, lo que le da más robustez ante posibles procesos posteriores de liofilización, redispersión, etc., y, además, se consigue un mayor poder de encapsulación de los principios activos incluidos en su interior. La estructura de dos capas permite también un mejor control de la cantidad de
20 funcionalizaciones y de la degradabilidad de la partícula. Este segundo prepolímero puede ser, a su vez, una mezcla de dos o más componentes, por ejemplo, en el caso de una emulsión O/W son preferentemente un diisocianato (como isoforon diisocianato) y un poliisocianato (como Bayhydur 3100 ®, que es un poliisocianato alifático hidrófilo basado en hexametildiisocianato comercializado por Bayer).

25 Preferentemente el polímero comprende un péptido, que puede ser incorporado directamente al compuesto anfifílico. El péptido está preferentemente en la cadena principal y, en el caso que la pared tenga dos capas, está preferentemente en la capa externa o entre las dos capas, ya que ha de poder interactuar con el medio
30 exterior. Efectivamente, una solución particularmente interesante de la invención es cuando este péptido es capaz de interactuar con proteínas sobreexpresadas en el exterior de células tumorales (las alfa beta integrinas). En este sentido, es particularmente ventajoso que el péptido sea c-(RGDfK). Otra estrategia de

interactuación preferente entre partículas y células cancerosas se lleva a cabo mediante ácido fólico (FA) incorporado de la misma forma que c-(RGDfK). El FA interacciona con proteínas receptoras de folato que se encuentran sobreexpresadas en numerosos tipos de cáncer.

5

Preferentemente, el péptido se hace reaccionar con un di o poliisocianato (como por ejemplo Bayhydur 3100 ®) y el producto de reacción se añade a la primera fase, que es la fase orgánica. Usualmente la cantidad de agua presente en la solución acuosa del péptido no es suficiente para provocar la emulsión completa, incluyendo
10 la inversión de fase. En estos casos, posteriormente se añade más agua hasta que tiene lugar la inversión de fase y a continuación se sigue añadiendo una solución acuosa con el segundo compuesto (que preferentemente es una diamina y muy preferentemente es DETA).

15

En general, es ventajoso añadir el segundo compuesto una vez que la emulsión ya se ha formado, incluyendo la inversión de fase. Efectivamente, cuando se inicia la adición del segundo compuesto se inicia ya la formación de la pared de las microcápsulas. Por lo tanto, es interesante que las microcápsulas ya estén totalmente formadas cuando se añade el segundo compuesto. Esto es
20 particularmente importante cuando la reactividad del segundo compuesto es elevada, como por ejemplo en el caso de DETA con isocianatos.

25

Una forma ventajosa de realización del procedimiento de acuerdo con la invención cuando la emulsión es una emulsión O/W, comprende una etapa de adición de un
solvente orgánico polar volátil a la primera fase, previa a la etapa [a], y una fase de evaporación del solvente, posterior a la etapa [b]. Ello permite obtener microencapsulados de muy pequeño tamaño y en concentraciones relativamente elevadas. Preferentemente el solvente es acetona o metiletilcetona, y muy preferentemente es acetona. En el caso de ser acetona, ventajosamente la cantidad
30 de acetona añadida es menor al 20% en peso de la cantidad de agua de la segunda fase, mientras que en el caso de la metiletilcetona ventajosamente la cantidad de metiletilcetona añadida es menor al 15% en peso de la cantidad de agua de la segunda fase.

La invención también tiene por objeto un compuesto anfifílico reactivo con por lo menos dos grupos funcionales principales aptos para reaccionar en una posterior polimerización, caracterizado porque tiene un valor HLB mayor que 10
5 (preferiblemente mayor que 15), donde los dos grupos funcionales principales del compuesto anfifílico están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones y tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo y otro grupo funcional hidrófobo cada uno de ellos en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales. La invención tiene asimismo por objeto un compuesto
10 anfifílico reactivo igual que el anterior, pero que tiene un valor HLB menor que 10. En ambos casos, preferentemente los grupos funcionales principales del compuesto anfifílico son grupos funcionales NCO, aptos para formar enlaces tipo uretano y/o tipo urea.

15 La invención tiene asimismo por objeto un microencapsulado caracterizado porque su pared comprende un compuesto anfifílico reactivo de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención es un microencapsulado caracterizado porque el polímero que conforma su pared comprende, en su cadena principal, un grupo
20 ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil, o caracterizado porque el polímero que conforma su pared comprende un péptido.

25 Preferentemente el microencapsulado comprende, en su interior, un principio activo antitumoral que, ventajosamente, es paclitaxel o plitidepsina.

Finalmente, la invención también tiene por objeto una composición cosmética o farmacéutica caracterizada porque comprende un microencapsulado de acuerdo
30 con la invención.

Breve descripción de los dibujos

Otras ventajas y características de la invención se aprecian a partir de la siguiente descripción, en la que, sin ningún carácter limitativo, se relatan unos modos
5 preferentes de realización de la invención, haciendo mención de los dibujos que se acompañan. Las figuras muestran:

Figs. 1 a 4, distribución del tamaño de las cápsulas de los ejemplos 1, 2, 3 y 4,
10 respectivamente.

Figs. 5 a 9, imágenes SEM de las cápsulas del ejemplo 4.

Figs. 10 y 11, imágenes SEM y TEM, respectivamente, de las cápsulas del ejemplo
15 13.

Figs. 12 y 13, imágenes SEM y TEM, respectivamente, de las cápsulas del ejemplo
14.

Figs. 14 y 15, imágenes TEM de una degradación de las cápsulas del ejemplo 19,
20 filtradas 0,22 μm .

Figs. 16 y 17, imágenes TEM de una degradación de las cápsulas del ejemplo 19,
filtradas 0,45 μm .

25 Figs. 18 y 19, imágenes TEM de otra degradación de las cápsulas del ejemplo 19,
filtradas 0,22 μm .

Figs. 20 y 21, imágenes TEM de una degradación de las cápsulas del ejemplo 18,
30 filtradas 0,22 μm .

Fig. 22, imagen TEM de las cápsulas del ejemplo 28.

Fig. 23, imagen TEM de las cápsulas del ejemplo 31.

Fig. 24, imagen TEM de las cápsulas del ejemplo 35.

5 Figs. 25 y 26, distribución del tamaño de las cápsulas de los ejemplos 18 y 34, respectivamente.

Fig. 27, estudio de citotoxicidad de nanocápsulas relativas al ejemplo 28.

10 Fig. 28, estudio de biodistribución en ratones atímicos sin tumor de las nanocápsulas del ejemplo 28 cargadas con DiR.

Fig. 29, esquema de reacción y representación teórica de la estructura ideal de la nanocápsula del ejemplo 28 cargada y funcionalizada siguiendo los ejemplos 31-33.

15

Ejemplos

Productos utilizados.

20 Isoforon diisocianato (IPDI), Ymer N120 ® (polietilenglicol monometil éter lineal difuncional) de Perstorp, Pripol 2033 ® (Dimerdíol) de Uniqema, Crodamol GTCC® de CRODA, aceite de oliva, fragancias Lavandín ® y Aromatic Meadow ®, aceite del árbol de té (en inglés Tea Tree Oil), Retinol 10S ® de Bayer (retinol al 10% en aceite de soja), Paclitaxel de Fujian South Pharmaceutical, Plitidepsina de Pharmamar, c-(RGDfK) de PCB, Ácido fólico (FA) de Aldrich, Etilendiaminopropilsulfonato (EPS) de Raschig, NaOH de Panreac, BYK-028 ® de BYK, Dietilentriamina (DETA), Trietilentatramina (TETA) de Huntsman, Hexametilendiamina (HMDA) de Panreac, Duomeen C ® (dodecilaminopropilamino (de coco)) de Akzo Nobel, Duomeen T ® (C16-C18 aminopropilamino) de Akzo
25 Nobel, Desmodur N3600, Jeffamine, Triameen C, LAP 100D (dodecilaminopropilamino (de coco), de Clariant, es equivalente al Duomeen C de Akzo Nobel), Triameen T, Priamine 1074 (dímero diamina proveniente del ácido dímero C36) de Croda, DDI1410 disocianato de Cognis (isocianato graso),
30

Bayhydur 3100 ® (poliisocianato alifático hidrofílico basado en hexametileno diisocianato) de Bayer, Trietilamina de Aldrich, 2,2-ditiodietanol (DEDS) de Aldrich, dihidrocloruro de cistamina de Aldrich.

5

Ejemplo 1. Encapsulación de aceite de oliva.

En un reactor de 700 ml se cargan 10,53 g de IPDI (que hace la función del primer precursor), 6,38 g de Dimerdiol (que hace la función del segundo precursor), 20,38 g de aceite de oliva y 20,83 g de Ymer (que hace la función del tercer precursor). La reacción se realiza a 160 rpm, a 85°C y con nitrógeno.

Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C y se añaden 3 gotas de antiespumante BYK-028, se realiza la emulsión a 400 rpm con 250,00 g de agua, añadiéndola lentamente sobre el prepolímero anfifílico.

Una vez finalizada la emulsión, se añaden 3,28 g de EPS (que hace la función del cuarto precursor), 0,36 g de NaOH y 10,20 g de agua. A los 20 minutos se añaden 0,43 g de DETA (que hace la función del segundo compuesto). El EPS se añade para que se combine el prepolímero y lo haga más hidrófilo, pero sobre todo se hace para incluir un sulfonato que será un punto débil en la cadena. También permite disminuir un poco el tamaño de partícula. Como ya se ha comentado anteriormente, en general se pueden añadir grupos disulfuro o éster lábil expresamente, para que sean un punto débil para romper (por ejemplo, por las estearasas). En las cercanías de los tumores hay mucha materia reductora que rompe el puente disulfuro. (Ver también ejemplo 19).

Se obtiene una buena emulsión blanca azulada. Mediante microscopio óptico se observan cápsulas de un tamaño inferior a 4 µm. Mediante Light Scattering (DLS, Dynamic Light Scattering), se confirma que las cápsulas tienen un tamaño entre 0,4 y 4 µm.

Ejemplo 2. Encapsulación de la fragancia Aromatic Meadow C55593P de Lucta.

En un reactor de 700 ml se cargan 10,53 g de IPDI (primer precursor), 6,40 g de Dimerdiol (segundo precursor), 20,36 g de Aromatic Meadow y 15,52 g de Ymer (tercer precursor). La reacción se realiza a 160 rpm, a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C y se añaden 3 gotas de antiespumante BYK-028, se realiza la emulsión a 400 rpm con 200,00 g de agua. Una vez finalizada la emulsión, se añaden 3,17 g de EPS (cuarto precursor), 0,35 g de NaOH y 10,00 g de agua. A los 20 minutos se añaden 0,79 g de DETA (segundo compuesto).

Se obtiene una buena emulsión blanca azulada. Mediante microscopio óptico se observan cápsulas de un tamaño inferior a 4 µm. Mediante Light Scattering, se observa que las cápsulas tienen un tamaño entre 0,2 y 3 µm. Hay una distribución de población entre 0,2 y 0,4 µm y otra entre 1 y 3 µm.

Ejemplo 3. Encapsulación de Retinol 10S.

Se repite el ejemplo 1 sustituyendo los 20,38 g de aceite de oliva por 20,34 g de Retinol 10S.

En este caso también se obtiene una buena emulsión pero con cápsulas de un tamaño inferior a 10 µm. Mediante Light Scattering, se observa que las cápsulas tienen un tamaño entre 0,15 y 10 µm. La mayoría de la población está entre 1 y 3 µm.

Ejemplo 4. Encapsulación de la fragancia Aromatic Meadow C55593P de Lucta.

Se repite el ejemplo 2 con TETA en lugar de DETA. Al usar YMER y DIMERDIOL, ambos conjuntamente forman la pared de la cápsula muy blanda. En este caso, el

empleo de TETA permite una reticulación más intensa. En aquellos casos en los que con TETA la reticulación es excesiva se puede emplear DETA.

5 En un reactor de 700 ml se cargan 10,52 g de IPDI, 6,57 g de Dimerdiol, 20,29 g de Aromatic Meadow y 15,37 g de Ymer. La reacción se realiza a 160 rpm, a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C y se añaden 3 gotas de antiespumante BYK-028, se realiza la emulsión a 400 rpm con 200,00 g de agua. Una vez finalizada la emulsión, se añaden 3,50 g de EPS, 0,39 g de NaOH y 10,50 g de agua. A los 20 minutos se añade 1,00 g de
10 TETA.

Se obtiene una buena emulsión con cápsulas de un tamaño inferior a 4 µm. Mediante Light Scattering, se observa que las cápsulas tienen un tamaño entre 0,3 y 4 µm. La mayoría de la población está entre 0,3 y 1 µm.
15

Ejemplo 5. Encapsulación de la fragancia Lavandín 80101 de Chemir.

Se repite el ejemplo 4 sustituyendo los 20,29 g de Aromatic Meadow por 20,66 g de
20 fragancia Lavandín.

En este caso también se obtiene una buena emulsión con cápsulas de un tamaño inferior a 4 µm.

25

Ejemplo 6. Encapsulación de Tea Tree Oil.

Se repite el ejemplo 4 sustituyendo los 20,29 g de Aromatic Meadow por 20,45 g de
30 Tea Tree Oil.

En este caso también se obtiene una buena emulsión con cápsulas de un tamaño inferior a 4 µm.

Ejemplo 7. Encapsulación de Tea Tree Oil.

Se repite el ejemplo 6 pero con la mitad de polímero.

5

En un reactor de 700 ml se cargan 5,28 g de IPDI, 3,26 g de Dimerdiol, 20,45 g de Tea Tree Oil y 7,77 g de Ymer. La reacción se realiza a 160 rpm, a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C y se añaden 3 gotas de antiespumante BYK-028, se realiza la emulsión a 400 rpm con 155,00 g de agua. Una vez finalizada la emulsión, se añaden 1,68 g de EPS, 0,19 g de NaOH y 5,00 g de agua. A los 20 minutos se añaden 0,49 g de TETA.

10

Se obtiene una buena emulsión y la distribución del tamaño de las cápsulas está entre 4 y 0,1 µm.

15

Ejemplo 8. Encapsulación de Tea Tree Oil.

Se repite el ejemplo 7 pero aumentando el reticulante (de 0,49 g de TETA se pasa a 0,72 g de TETA).

20

En este caso también se obtiene una buena emulsión pero las cápsulas no son tan esféricas, el diámetro de las cápsulas está entre 5 y 0,1µm.

25

Ejemplo 9. Encapsulación de Paclitaxel.

En un reactor de 700 ml se cargan 10,53 g de IPDI, 6,58 g de Dimerdiol, 20,00 g de Crodamol GTCC y 15,39 g de Ymer. La reacción se realiza a 160 rpm, a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C y se añaden 0,64 g de Paclitaxel, 3 gotas de antiespumante BYK-028 y se realiza la emulsión a 400 rpm con 200,00 g de agua. Una vez finalizada la emulsión, se

30

añaden 3,10 g de EPS, 0,68 g de NaOH y 10,00 g de agua. A los 20 minutos se añade 1,00 g de TETA.

Se obtiene una buena emulsión con cápsulas entre 2 y 0,1 μm .

5

Ejemplo 10. Encapsulación de Crodamol GTCC.

En un reactor de 700 ml se cargan 10,54 g de IPDI, 6,57 g de Dimerdiol, 20,29 g de
10 Crodamol GTCC y 19,95 g de Ymer. La reacción se realiza a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor por debajo de 25°C. La emulsión se realiza a 15.000 rpm añadiendo el prepolímero sobre 200,00 g de agua, una vez terminada la emulsión, se añaden 2,64 g de EPS, 0,29 g de NaOH y 10,50 g de agua a 5 000 rpm. Después de unos 3 minutos, se añaden 0,75 g de
15 TETA.

Se obtiene una buena emulsión, en el microscopio óptico se observan cápsulas de entre 0,1 y 4 μm . También se observa que hay menos cantidad de cápsulas grandes que en otros ejemplos.

20

Ejemplo 11. Encapsulación de Crodamol GTCC.

Este producto es igual al ejemplo 10 pero con EDA en lugar de EPS. La EDA es
25 menos hidrofílica que el EPS.

Se cargan 10,78 g de IPDI, 6,67 g de Dimerdiol, 21,13 g de Crodamol GTCC y 20,36 g de Ymer. La reacción se realiza a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor hasta 25°C, se añaden 2 gotas de antiespumante BYK-028 y se hace la emulsión con 200,00 g de agua en el ultraturrax a 15.000 rpm. Una vez terminada la emulsión, se añaden 0,39 g de EDA en 10,00 g de agua con agitación mecánica. Después de 30 minutos se añaden
30 0,52 g de TETA.

Se obtiene una buena emulsión blanca azulada, en el microscopio óptico se observan cápsulas de 0,9 μm pero también algunas cápsulas aglomeradas. Mediante Light Scattering, se observa que las cápsulas tienen un tamaño inferior a 0,9 μm . La mayoría de la población tiene 246 nm.

Ejemplo 12. Encapsulación de Crodamol GTCC.

Este producto es igual al ejemplo 11 pero con menos polímero.

Se cargan 5,85 g de IPDI, 3,35 g de Dimerdiol, 21,20 g de Crodamol GTCC y 10,17 g de Ymer. La reacción se realiza a 85°C y con nitrógeno. Después de 2 horas de reacción, se enfría el reactor hasta 25°C, se añaden 2 gotas de antiespumante BYK-028 y se hace la emulsión con 200,00 g de agua en el ultraturrax a 15.000 rpm. Una vez terminada la emulsión, se añaden 0,39 g de EDA en 10,00 g de agua con agitación mecánica. Después de 30 minutos se añaden 0,52 g de TETA.

Se obtiene una buena emulsión blanca azulada, en el microscopio óptico se observan cápsulas de 0,9 μm pero también algunas cápsulas aglomeradas.

Ejemplo 13. Encapsulación de Crodamol GTCC.

En este ejemplo se usa el sistema de crear el polímero anfifílico al mismo tiempo que se realiza la emulsión.

En un vaso de precipitados se mezclan:

- 5,26 g de IPDI (primer precursor)
- 11,45 g de Ymer (segundo precursor)
- 6,05 g Crodamol GTCC

En otro vaso de precipitados se mezclan:

3,15 g de Duomeen C (tercer precursor)

210,00 g de agua

5 Se añade la solución orgánica sobre la acuosa y se agita a 15.000 rpm durante 30 minutos.

Se obtiene una buena emulsión blanca azulada, en el microscopio óptico se observan cápsulas inferiores a 450 nm. Se filtra el producto con jeringa y filtro de 0,45 μm , un 88,2% de las cápsulas son más pequeñas de 450 nm.

10

El Duomeen, a pesar de ser hidrofóbico, tiene suficiente dispersabilidad en agua para ponerlo en la fase acuosa continua. Sin embargo, al ser más hidrofóbico que hidrofílico, acaba yendo a la fase dispersa oleosa y allí reacciona y se incorpora al prepolímero. Ello permite hacer la reacción de introducción de la parte hidrofóbica después de hacer la emulsión de la parte prepolímero hidrofílico IPDI-YMER, para formar el prepolímero anfifílico justo en la interfase. Luego se acaba de cerrar (reticular) la cápsula con las poliaminas que gastan los NCO que quedan del prepolímero anfifílico formado en la propia interfase. En general, este Duomeen deberá introducirse en el prepolímero como en el caso del dimer diol, pero hace falta un solvente ya que sino no funciona bien por su insolubilidad en el medio aceite que se usa. El Duomeen, al ser una diamina, forma una diurea. Es un caso diferente del dimer diol, que forma dos uretanos. En ciertos casos es suficientemente sólido, tiene una Tg suficientemente alta, hace un efecto barrera suficiente y es suficientemente estable como para aguantar el contenido de la cápsula, cosa que es más difícil de conseguir con un prepolímero basado en poliuretanos de dimer diol-Ymer-IPDI. En este caso no se añade DETA ni ninguna diamina o poliamina pequeña hidrofílica, sino que se deja reaccionar con el agua.

Alternativamente se podría haber introducido el Duomeen en el prepolímero con un disolvente adecuado como en el caso del dimer diol. Y también es posible usar una pequeña cantidad de DETA para cerrar (reticular) y asegurar la resistencia del sistema. Sin embargo, los resultados parecen ser más repetibles que con el sistema interfásico del presente ejemplo. En el caso del Dimer diol-IPDI-YMER, la pared

formada de la cápsula es más sensible ya que el prepolímero tiene una dureza menor (T_g más baja) y es más soluble en las fases, por tanto es bueno añadir poliaminas tipo DETA o TETA para darle dureza y efecto barrera, etc.

5

Ejemplo 14. Encapsulación de Crodamol GTCC.

En este ejemplo se usa el sistema de crear el polímero anfifílico al mismo tiempo que se realiza la emulsión.

10

Se cargan 1,71 g de IPDI, 5,04 g de Ymer N120 y 2,64 g de Crodamol GTCC. La reacción se realiza a 85°C y con nitrógeno. Cuando se llega a NCO=1,372%, se enfría el reactor y se añaden 211,60 g de acetona. En otro reactor se cargan 0,31 g de Duomeen C en 422,98 g de agua. Se añade la fase acetónica sobre la fase acuosa a 400 rpm. Finalmente, se añaden 0,08 g de DETA en 5,00 g de agua y se evapora la acetona.

15

Se obtiene una muy buena emulsión, en el microscopio óptico se observan cápsulas con un diámetro inferior a 0,5 μm . %sólidos=2,00%

20

Se filtra el producto con jeringa y filtro de 0,45 μm , un 81,5% de las cápsulas son más pequeñas de 450 nm.

25 ***Ejemplos 1 a 14 - Análisis y resultados***

En todos los ejemplos se ha utilizado un titrador Titromatic 2S de Crison para comprobar el porcentaje de NCO del prepolímero. También se ha comprobado la finalización de la reacción mediante IR, observando las señales características de las poliureas (1650-1500 cm^{-1}) y la ausencia de señal debida al NCO (2270 cm^{-1}).

30

La morfología y tamaño de las cápsulas obtenidas en los ejemplos se han estudiado por microscopía óptica y SEM.

La distribución del tamaño de las cápsulas se ha estudiado mediante Light Scattering.

- 5 En todos los ejemplos se han obtenido emulsiones estables con el tiempo con cápsulas de tamaños inferiores a 5 μm excepto en el ejemplo 3 que se obtienen cápsulas inferiores a 10 μm y en los ejemplos 13 y 14 que se obtienen cápsulas inferiores a 0,45 μm .
- 10 En los gráficos de las Figs. 1 a 4 se muestra la distribución del tamaño de las cápsulas de los ejemplos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

En estos gráficos se puede observar que la mayoría de las cápsulas está por debajo de la micra (exceptuando el ejemplo 3) ya que el % de volumen es mucho mayor en esta zona. Mediante filtración, se pueden separar las cápsulas más grandes y obtener emulsiones aún más estables y con una distribución más uniforme.

15

Mediante SEM se estudió la morfología y el tamaño de las cápsulas obtenidas en el ejemplo 4 (ver Figs. 5 a 7). Las imágenes de las cápsulas han sido obtenidas tras diluirlas con agua Millipore 1/100 y recubrirlas con oro.

20

Con filtros de 0,45 μm se filtraron las cápsulas diluidas para obtener imágenes más nítidas y eliminar las cápsulas de un tamaño superior a 0,45 μm (ver Figs. 8 y 9).

25

En las Figs. 10 y 11 se muestran las imágenes de las cápsulas obtenidas por SEM (Scanning Electron Microscope) y TEM (Transmission Electron Microscope) respectivamente del ejemplo 13, y en las Figs. 12 y 13 se muestran las imágenes de las cápsulas obtenidas por SEM y TEM respectivamente del ejemplo 14.

30

Ejemplos 1 a 14 - Conclusiones

Con este sistema anfifílico y con diversos tipos de proceso, se pueden encapsular varios compuestos obteniendo cápsulas de diámetro inferior a 5 µm en el caso de utilizar el sistema en el cual se forma el polímero anfifílico antes de formar la emulsión o/w. En general, preferentemente se crea la emulsión por inversión de fase añadiendo agua al prepolímero (en general, la fase continua a la fase dispersa). Con estabilidad y sin uso de emulsionantes externos, e inferiores a 450 nm en el caso de utilizar el sistema en el cual se forma el polímero anfifílico durante la emulsión.

En ambos casos las emulsiones obtenidas son muy estables con el tiempo, las cápsulas no se unen entre sí, son estables frente a fluidos biológicos, etc.

Se comprueba la estabilidad de los productos obtenidos en los ejemplos 11, 13 y 14 en distintos medios: suero salino, PBS (Phosphate Buffered Saline – tampón salino de fosfato) y plasma sanguíneo. Los resultados son los siguientes:

Nanocápsulas	Estabilidad después de 1 semana			Estabilidad después de 1 mes		
	SS	PBS	Plasma Sanguíneo	SS	PBS	Plasma Sanguíneo
Ejemplo 11	estable	estable	estable	estable	estable	inestable
Ejemplo 13	estable	estable	estable	estable	estable	estable
Ejemplo 14	estable	estable	estable	estable	estable	inestable

Debe tenerse en cuenta que los productos conocidos en el estado de la técnica, con emulsionantes normales externos a la pared, no son estables en estos medios y precipitan

Ejemplo 15.

En un vaso de precipitados se añaden 19,02 g de Crodamol GTCC + 7,56 g Desmodur N3600 + 10 g metiletilcetona (MEK). Se adicionan, lentamente, en
5 agitación magnética 50%, primero 8,34 g Jeffamine + 5 g MEK, después 2,13 g DuomeenT + 5 g MEK a 75% agitación. A partir de aquí se realizan cuatro pruebas con este prepolímero:

15-1 → Se añaden 15 g del producto sobre 90 g de agua a 75% agitación, gota a
10 gota. El agua contiene 0,16 g de EDA.

15-2 → Se añaden gota a gota, 88 g de agua sobre 15 g de producto. Cuando se realiza la inversión de fase, se añaden 2 g de agua + 0,16 g de EDA.

15-3 → Se repite 15-1, pero por inyección, no por adición gota a gota.

15-4 → Imitación método cetónico, se cogen 0,6 g de prepolímero en 20 ml
15 acetona, y se inyectan en 80 ml agua + 0,22 g EDA.

Resultados:

15-1 → Las cápsulas están abolladas. Parece que hay cápsulas dentro de cápsulas. Tamaño 2-16 micras.

20 15-2 → Las cápsulas tienen una forma mucho más regular. La emulsión es estable. Tamaño de cápsula aprox 2-6 micras.

15-3 → Sale igual que 15-1, parece que la inyección no es un punto vital, siempre que se haga la adición lentamente.

25 15-4 → Se obtiene una emulsión transparente, de tonos azulados. No se observan cápsulas en el microscopio óptico. En imágenes SEM salen cápsulas con una amplia distribución de tamaño, de 7 a 100 nm, con promedio 20 nm. (*Amphil HLB12*)

30 **Ejemplo 16.**

Experimento similar al anterior, pero utilizando MDI polimérico (difenilmetandiisocianato (o metilendifenildiisocianato) polimérico).

Sobre 21 g Crodamol GTCC + 4,90 g MDI polimérico + 5 g MEK se añade en primer lugar una mezcla de 9,73 g Jeffamine + 10 g MEK, y posteriormente, 2,13 g Duomeen T + 5 g MEK, todos gota a gota, con agitación magnética 50%.
5 Posteriormente, se añaden 0,6 g de este producto por inyección en 20 ml acetona sobre 40 g agua + 1 gota de DETA, la inyección dura 1'. La emulsión es blanca-azulada y muy estable (no se separa ni espuma). Las cápsulas no se ven en microscopio óptico.

10

Ejemplo 17.

Encapsulación utilizando diisocianato aromático/alifático con triamina.

15 Se pesan 16,67 g Crodamol GTCC + 4,89 g TMXDI ((tetrametilxililen diisocianato) + 5 g MEK.

Se añaden, gota a gota, a 50% agitación magnética, 2,19 g TriameenC + 5 g MEK.

Posteriormente, se añaden 6,95 g Jeffamine + 8 g MEK.

Se realizan 3 pruebas con este prepolímero con la metodología del ejemplo 14, por
20 inyección:

A → 2,2% de sólidos, 4 gotas de DETA en H₂O.

B → 2,2% de sólidos, 1 gota de DETA en H₂O.

C → 10% de sólidos, 0,5 g de DETA en H₂O.

25 **Resultados:**

A → Cápsulas de 2 micras, distribución del tamaño muy estrecha. Forma de cápsulas regular.

B → Igual que A, pero la forma de las cápsulas es mucho más irregular.

C → Salen agregados, pero la distribución y el tamaño es igual a A.

30

Ejemplo 18. Encapsulación de Crodamol GTCC

Similar al ejemplo 14 pero el procedimiento se realiza en dos etapas:

- 5 1) Se cargan 6,01 g de Crodamol GTCC, 11,79 g de Ymer N120 y 5,72 g de IPDI. Se pone el baño a 85°C y pasando corriente de N₂. Se deja reaccionar dos horas y media. Cuando se llega al nivel de NCO teórico, se enfría el reactor a 50°C y se disuelve su contenido con 12,67 g MEK seca.
- 10 2) Se disuelven 1,66 g de Duomeen C en 25,50 g de MEK y se añaden al reactor. Cuando se llega al segundo NCO teórico, se enfría el sistema con un baño de agua y gel y se hace la emulsión añadiendo agua fría gota a gota. A continuación se añade 0,42 g DETA disueltos en 3,76 g de agua. Finalmente se evapora MEK.

15 *Aspecto del producto:*

Líquido blanco y cápsulas muy pequeñas mayoritariamente con un tamaño menor de una micra. El producto se filtra con mucha facilidad con microfiltros de poros de 0,450 y de 0,200 µm.

20

Se observa el producto TEM y SEM y se observaron nanocápsulas de hasta 20 nm de tamaño. También se realizaron varias repeticiones de este producto y los resultados son aproximadamente repetibles en cuanto a los tamaños de partícula. Se hizo análisis de DLS y se observó una población mayoritaria de 100 nm de tamaño como media. . En la Fig. 21 se muestra una imagen obtenida con el SEM donde se pueden observar aglomerados de nanocápsulas con un tamaño menor de 100 nm.

30

Ejemplo 19. Encapsulación de Crodamol GTCC

5 En este ejemplo se incorpora un puente disulfuro en la pared capsular. El hecho de tener un disulfuro en la cadena favorece la degradación de la pared con la glutatona y otros reductores del interior o alrededor de las células tumorales.

10 Se añade al reactor 5,562 g IPDI + 10,338 g Crodamol GTCC + 12,5256 g Ymer seco a una temperatura interna del reactor de 63 ° C. Cuando se llega al %NCO teórico se añaden con micropipeta 520 µl (0,655g) de 2,2-ditiodietanol. Se observa que el 2,2-ditiodietanol es más denso y la agitación debe ser óptima para que no se formen diferentes fases durante la reacción. Cuando se llega al %NCO teórico se baja la temperatura a 50 °C y se añaden 1,4368 g LAP 100D solubilizados en 20 g de MEK seca. Pasados 20 minutos se refrigera el reactor a 10 °C. Se observa un claro espesamiento de la muestra. Se añaden 3 gotas de antiespumante BYK-028.

15 Seguidamente se inicia la adición gota a gota de 230 ml de agua refrigerada a 15 °C. Al producirse la inversión de fase se añade en el embudo de adición 155 µl (0,1479 g) de DETA prosiguiendo con la adición gota a gota con mayor frecuencia del resto de agua milliQ + DETA.

20 Se ha hecho IR antes de la emulsificación para comprobar presencia de NCO en reacción. Se deja en agitación y refrigeración a 10 °C durante 2h más después de la emulsificación.

25 Aspecto blanco-azulado, homogéneo. Estable en el tiempo, se almacena en nevera. Se filtra fácilmente en el filtro de 450 nm y también en el de 220 nm.

30 *Pruebas de degradación del polímero funcionalizado con puente disulfuro frente del agente reductor glutatona (GSH)*

- Se realiza una incubación de 100µL de GSH 10mM + 100µL del ejemplo 19 filtrado 0,22 µm durante 30 min a 37°C. Ver Figs. 14 y 15. Se observa una degradación parcial. Aún se observan zonas con nanocápsulas.

- Se realiza una incubación de 100µL de GSH 10mM + 100µL del ejemplo 19 filtrado 0,45 µm durante 30 min a 37°C. Ver Figs. 16 y 17. Se observa una degradación parcial o ínfima.

5

- Se realizan 2 nuevas incubaciones con glutatona. 100µL de GSH 10mM + 50µL de ejemplo 19 (filtrado 0,22 µm) durante 24h a 37°C. Se hacen 2 repeticiones y en los dos casos se ve una gran degradación de la muestra. Aparecen agregados de tamaños superiores al filtrado realizado debido a la rotura de la pared capsular y posterior desestabilización de la anfifilia de la misma. Ver Figs. 18 y 19.

10

- Se realiza una nueva incubación con glutatona. Se realiza la prueba para concluir si las cápsulas sintetizadas sin disulfuro en la pared también se degradan en medio reductor (glutatona). 100µL de GSH 10mM + 50µL de ejemplo 18 (filtrado 0,22 µm) durante 24h a 37°C. No se observa aparentemente degradación de la pared por glutatona.

15

En todas pruebas de degradación se realizan las caracterizaciones por TEM

20

Pruebas de degradación - Conclusiones

- El tratamiento de 30 min en GSH realizado al ejemplo 19 no es suficiente para degradar la pared.

25

- Se concluye que en el ejemplo 19 la pared polimérica capsular está funcionalizada con disulfuro y que ésta es degradable frente un medio reductor de concentración parecida al que se puede encontrar en el medio intracelular de células tumorales después de una incubación de 24h a 37°C.

30

- Se concluye también, que la pared nanocapsular no funcionalizada con disulfuro del ejemplo 19 sin péptido no se degrada después de un tratamiento idéntico al realizado con el ejemplo 19.

Ejemplo 20.

Este ejemplo es igual al ejemplo 18 pero incorporando un péptido en la pared de las
5 nanocápsulas.

Etapa 1: Se prepara el prepolímero como en el ejemplo 18.

Se cargan 5,98 g de Crodamol GTCC, 11,87 g de Ymer, 5,43 g de IPDI y se
10 calienta hasta 85°C bajo atmósfera de N₂. La reacción se lleva a cabo durante dos
horas y media. Acabada la reacción (valorando el %NCO) se enfría el reactor hasta
50 °C y se disuelve el contenido con 13,08 g de MEK. A continuación se añaden
1,64 g de Duomeen C disueltos en 25,05 g de MEK y se deja reaccionar una hora
más. Se comprueba el fin de la reacción valorando el nivel de NCO. El prepolímero
15 se descarga y se guarda en nevera.

Etapa 2. Se coge una décima parte del prepolímero preparado y se continúa
trabajando con ella.

20 En un reactor adecuado, se cargan 6,25 g de prepolímero y mediante un embudo
de adición se añaden 25,64 g de agua, gota a gota. El proceso se lleva a cabo a
temperatura ambiente con agitación magnética. Una vez hecha la emulsión, se
añade el péptido c-(RGDfK) previamente disuelto en 5,31 g de agua y neutralizado
con 100 µl de NaOH 1N. Se deja reaccionar unos 10 minutos y se añaden 0,0618 g
25 de DETA disuelta en 2,00 g de agua. Finalmente se evapora la MEK.

Se obtiene un líquido blanco y fluido.

30 Cuando se deja reposar se observa la separación de dos fases, dando lugar a una
capa sólida de color blanco y dejando el líquido un poco transparente. Observando
el producto al microscopio óptico se vean cápsulas imperfectas con gran variedad
de tamaño (1-15 µm). Se filtran las cápsulas con microfiltros de 0,45 µm y mediante

Light Scattering se observa que mayoritariamente las cápsulas tienen un tamaño de 6 nm las poblaciones más abundantes se concentran entre 4 y 12 nm.

5 **Ejemplo 21.**

Se empieza preparando el prepolímero exactamente como en el ejemplo anterior.

Prepolímero:

10

Se cargan 5,99 g Crodamol GTCC, 11,68 g Ymer y 5,92 g IPDI, se somete bajo atmósfera inerte de N₂ y se calienta a 85°C, se deja reaccionar durante 2h 30min. Cuando acaba de reaccionar todo el Ymer (valoración del exceso de NCO), se enfría a 50°C y se disuelve el contenido con 12,53 g de MEK. A continuación se
15 añade 1,65 g Duomeen C disuelto en 27,29 g de MEK seca. Se hace una segunda valoración de NCO para comprobar la total reacción del NCO.

Incorporación del péptido:

20

Del prepolímero preparado se coge una parte de 6,2668 g y se le añade la solución del péptido c-(RGDfK) preparada con 0,054 g de éste disuelto en 7,4168 g de DMSO (dimetilsulfóxido) y neutralizado con 0,0104 g de trietilamina. Pasado unos 15 minutos se adicionan 70 g de agua y se hace la emulsión. A continuación se
añaden 0,034 g de DETA disuelta en 4,73 g de agua. Finalmente se evapora la
25 MEK y se filtra el producto.

30

Líquido blanco bastante fluido. Las cápsulas observadas por microscopio óptico son más grandes que en el ejemplo anterior, tamaño entre 1 y 5 micras. Se ven esferas perfectas y estables. No se ve aceite sin encapsular ni restos de polímero. El
producto se filtra con facilidad con microfiltros de 0,450 µm.

Los resultados de DLS demuestran que la emulsión está formada por dos grupos de cápsulas principalmente (de 2 y 5 nm).

Ejemplo 22.

- 5 Se usa el mismo método que en el ejemplo 18 pero substituyendo parte de MEK por acetona.

Prepolímero:

- 10 Bajo atmósfera inerte de N₂ y a 85 °C se cargan 11,6267 g de Ymer, 5,92 g Crodamol GTCC y 5,29 g IPDI. Se deja reaccionar durante 2 horas. Terminada la reacción (NCO real= 3,863% y NCO teórico= 4,335%), se enfría el reactor hasta 50°C y se disuelve el contenido con 15,32 g de MEK. A continuación se añaden 1,5950 g de Duomeen C disueltos en 16,70 g de MEK.

15

Se comprueba que todo el Duomeen C haya reaccionado haciendo una valoración del NCO en exceso (NCO real= 0,030%, NCO teórico= 0,883%). Finalmente, se añaden 12,00 g de acetona a temperatura inferior a 15°C. Se descarga el producto y se guarda bien cerrado en nevera.

20

Del prepolímero preparado se cogen varias partes y se hacen las siguientes pruebas.

Blanco:

- 25 Se toma una parte de 6,8090 g y se pasa al reactor con atmósfera inerte y a temperatura ambiente.

- Bajo agitación magnética se añaden 25,13 g de agua para hacer la emulsión. La adición de agua tiene lugar gota a gota y enfriando el reactor con una mezcla de agua-hielo. A continuación se añaden 0,0430 g DETA disueltos en 5,03 g de agua. Finalmente se evaporan los disolventes y se filtra el producto. Se obtiene una emulsión blanca y fluida observándose una separación de dos fases, una fase líquida transparente y una segunda sólida flotando sobre la superficie.
- 30

En el microscopio se observan cápsulas bien definidas con un tamaño menor de una micra. También se observan aglomerados de cápsulas.

5 Sobre una parte de 6,8794 g del prepolímero sintetizado anteriormente se añaden 0,054 g de péptido c-(RGDfK) disuelto en 0,70 g de agua y neutralizado con 0,0280 g de trietilamina. La adición del péptido tiene lugar a temperaturas inferiores de 15°C y con agitación magnética, se deja reaccionar unos 15 minutos. Pasado este tiempo se emulsiona el producto con 26,44 g de agua que se añade poco a poco
10 subiendo la agitación magnética. A continuación se añaden 0,0507 g DETA disueltos en 5,66 g de agua a temperatura ambiente. Finalmente, se evaporan los disolventes y se filtra el producto.

El producto obtenido es blanco y fluido, que es inestable ya que se separa en dos
15 fases; una capa sólida flotando sobre la superficie de una fase líquida transparente. Este producto se filtra en microfiltro de 0,45 micras y la parte filtrada transparente se observa por SEM. Se obtienen cápsulas perfectas, bien definidas y estables al observarlas secas por SEM. Ello demuestra su estabilidad estructural a pesar de su pequeño tamaño.

20

Ejemplo 23.

Se sigue el ejemplo 18 pero se le incorpora el agente antitumoral plitidepsina.

25

Bajo atmosfera de N₂ se cargan 11,5949 g Ymer, 6,03 g Crodamol GTCC y 6,21 g IPDI y se lleva a cabo la reacción a 75°C durante 2 horas. Se valora el NCO para comprobar que todo el Ymer ha reaccionado (NCO_{teórico} =5,624%, NCO_{real} =5,624%). Se baja la temperatura a 50°C y se disuelve la mezcla con 14,08 g de
30 MEK. A continuación se añaden 1,6431 g Duomeen C disueltos en 25,08 g de MEK.

Después de una hora se hace otra valoración de NCO para comprobar el fin de reacción ($NCO_{teórico} = 1,304\%$, $NCO_{real} = 0,770\%$). Se para la reacción, se descarga el prepolímero y se guarda en la nevera bien cerrado.

5 *Encapsulación de la Plitidepsina*

Del prepolímero preparado se toma una parte de 6,9108 g se pasan a un reactor adecuado evitando, el máximo posible, la entrada del aire pasando corriente de nitrógeno. A continuación se añaden, cuidadosamente, 0,0108 g de plitidepsina (fármaco) con agitación magnética. Una vez disuelto el fármaco se hace la emulsión con 20,68 g de agua añadida lentamente a través de un embudo de adición. Finalmente se introducen 0,0303 g DETA disueltos en 5,02 g de agua y se deja en agitación durante una hora aproximadamente.

15 Se obtiene una emulsión blanca que se separa en dos fases. Al microscopio óptico se observan cápsulas bien redondas y perfectas entre 0,5 y 2 micras de tamaño.

Tras filtración la emulsión es transparente y estable, no se separa en diferentes fases.

20

Por el SEM se observaron nanocápsulas con tamaño medio entre 6 y 10 nm. Mediante el DLS se detectaron dos poblaciones de distribución de tamaño, una población de tamaño medio alrededor de 13 nm y otra de tamaño medio de 350 nm.

25

Ejemplo 24.

Se hace igual que el ejemplo 13 reduciendo la cantidad de los reactivos y diluyendo los sólidos hasta la mitad.

30

Se disuelven 0,5056 g Duomeen C en 75,31 g de agua. Por separado se prepara otra solución mezclando 1,7825 g de Ymer, 0,9470 g de Crodamol GTCC, 0,82 g de IPDI y para fluidificar esta mezcla se añaden 2 g aproximadamente de acetona.

A temperatura ambiente se añade la segunda mezcla sobre la primera y se agita con el Ultraturrax a 15.000 rpm durante 30 min.

- 5 La emulsión obtenida es estable y se trata de un líquido blanco y fluido. Las cápsulas observadas al microscopio óptico son cápsulas bien definidas y estables con un tamaño entre 0,5 y 1,5 micras.

Después del proceso de filtración y secado se pueden observar nanocápsulas de
10 alrededor de 150 nm de diámetro.

Ejemplo 25.

- 15 Este producto se sintetiza igual que el ejemplo 24 anterior substituyendo parte de Duomeen C con péptido c-(RGDfK) y Triameen C para compensar la funcionalidad.

Se mezclan 0,9340 g de Crodamol GTCC, 1,7699 g Ymer y 0,83 g IPDI. Se diluye la mezcla con 2 g de acetona y se le añade otra mezcla preparada disolviendo
20 0,4192 g Duomeen C, 0,0808 g péptido y 0,0330 g de Triameen C en 75,12 g de agua. Se agita a 15.000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se obtiene una emulsión blanca y estable. Las cápsulas observadas por microscopio óptico tienen un tamaño entre 0,5 y 1 micra

25

Ejemplo 26.

- Se sintetiza igual que el producto del ejemplo 23 substituyendo parte del aceite,
30 Crodamol GTCC, por el fármaco.

Se mezclan 1,7696 g Ymer con 0,9043 g Crodamol GTCC y 0,0229 g de fármaco (plitidepsina). Esta mezcla se fluidifica con 2 g de acetona.

Por separado se disuelven 0,4871 g Duomeen C en 75,65 g de agua y se le añade la mezcla previamente preparada. Se deja reaccionar media hora con las mismas condiciones de temperatura y agitación.

5

La emulsión tiene el mismo aspecto que las de los dos ejemplos anteriores y las cápsulas son menores de una micra.

10 **Ejemplo 27.**

En este ejemplo se hace una combinación de los dos ejemplos anteriores partiendo de la misma filosofía del ejemplo 23. Es decir se sigue la misma metodología del ejemplo 23 substituyendo, a la vez, parte del aceite y parte del Duomeen C por los componentes correspondientes.

15

Se mezclan 0,9085 g de Crodamol GTCC, 1,7744 g Ymer, 0,8109 g IPDI y 0,0250 g de fármaco (plitidepsina). La mezcla obtenida se disuelve con 2,5 g de acetona. Por separado se disuelven 0,081 g de péptido c-(RGDfK), 0,4186 g Duomeen C y 0,0491 g Triameen C en 75,26 g de agua. Se añade la mezcla orgánica sobre la acuosa y se deja reaccionar durante 30 minutos agitándose a 15.000 rpm.

20

Se obtiene una buena emulsión estable de color blanco y se observen cápsulas menores de una micra.

25

Ejemplo 28.

En este ejemplo se introduce un segundo prepolímero hidrófobo para aumentar el poder de encapsulación así como la resistencia de las partículas.

30

Se introducen 6,7632 g de IPDI, 5 g de Crodamol GTCC y 520 µl (0,655 g) de 2,2-ditiodietanol (DEDS), previamente agitados en un vórtex, simultáneamente en un

reactor a 50°C. Se arrastran los restos con dietiléter. Se observa que el 2,2-ditiodietanol es más denso y la agitación ha de ser la adecuada para que no se formen fases durante la reacción. Cuando inicia la reacción, el medio de reacción se enturbia.

5

Una hora más tarde se añaden 7,5 g de YMER N-120 seco, se arrastra con 1 ml de acetona seca. La acetona seca se puede substituir preferentemente por dietiléter, que siempre tiene un contenido de agua menor y se evapora más rápidamente del medio de reacción.

10

Cuando se alcanza el NCO teórico (aproximadamente tras 4-5h de reacción) se retira el baño calefactor y se añaden 3,75 g de LAP 100D solubilizados en 8g de MEK seco.

15

Tras 45 min se refrigera el reactor a unos 5-10°C y se añaden 1,9425 g de IPDI y 1,8075 g de Bayhydur 3100 en 16 ml de MEK seco. Estos dos isocianatos son el segundo prepolímero, que formarán la segunda capa, interna, de la pared. Se observa un claro espesamiento de la muestra. Se añaden 2 gotas de antiespumante BYK-028 (como máximo puede haber 40g totales de MEK).

20

Antes de emulsionar se comprueba la presencia de NCO en la reacción mediante IR.

25

A continuación se adiciona, gota a gota 260 ml de agua milliQ basificada a un pH comprendido entre 11 y 12 y refrigerada a una temperatura comprendida entre 5 y 10 °C.

30

Al producirse la inversión de fase (bastante viscosa) se añade en el embudo de presión compensada 1024 µl (1,1461 g) de DETA mientras se prosigue con la adición gota a gota del resto de agua con la DETA a mayor velocidad.

Se mantiene la agitación y la refrigeración a 10°C hasta que la señal de NCO desaparece del espectro IR.

Se obtiene un producto de aspecto blanco azulado, homogéneo. Se elimina la MEK en el rotavapor. Se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se diluye al 10% de sólidos.

- 5 Se obtiene una emulsión estable que se almacena en nevera. Se diluye al 1% para observar por microscopía electrónica de transmisión. Se liofiliza fácilmente congelándolo con nitrógeno líquido, obteniéndose un polvo blanco. Se redispersa en agua desionizada o en PBS sin dificultades agitando durante 3 min. A veces es conveniente dejar reposar durante 24 h para que la emulsión se reconstituya
10 plenamente.

Este ejemplo es una forma particularmente ventajosa de realización de la invención. En la Fig. 22 se muestra una imagen TEM de las partículas obtenidas.

- 15 La Fig. 27 muestra un estudio de citotoxicidad de nanocápsulas relativas al ejemplo 28 por MTT en células con sobreexpresión de luciferasa (HCT-116.Fluc2.C9; HT-29.Fluc.C4), tras 72 h de incubación con nanocápsulas en medios de cultivo sin antibiótico (RPMI).

- 20 La concentración máxima testada es de 10 μM de equivalentes de plitidepsina para las nanocápsulas vacías, y 1 μM de plitidepsina para las nanocápsulas cargadas, realizando 8 diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Para cada concentración, en cada ensayo, se testan 6 réplicas. Los ensayos se repiten un mínimo de 3 veces.

- 25 Las nanocápsulas vacías no son tóxicas a la concentración de uso terapéutico.

La Fig. 28 muestra un estudio de biodistribución en ratones atímicos sin tumor de las nanocápsulas del ejemplo 28 cargadas con DiR.

- 30 Las emulsiones administradas se han dado a la máxima solubilidad y han sido las siguientes:

- NC-DiR_0,5 mg DiR/mL (20% sólidos)_2,5 mg DiR/kg_n (número ratones utilizados)=4
- NC-DiR_0,25 mg DiR/mL (20% sólidos)_1,25 mg DiR/kg_n=3
- NC-DiR_0,13 mg DiR/mL (20% sólidos)_0,65 mg DiR/kg_n=4

5

Todos los ratones sobreviven a las inyecciones mostrando una prolongada fotoluminiscencia.

10 **Ejemplo 29.**

Este ejemplo es igual que el ejemplo 28 anterior pero en vez de utilizar LAP 100D se utiliza Priamine 1074.

15 Se introducen 4,5506 g de IPDI, 5 g de Crodamol GTCC y 0,6039 g de 2,2-ditiodietanol (DEDS), previamente agitados en un vórtex, simultáneamente en un reactor a 50°C. Se arrastran los restos con dietiléter. Se observa que el 2,2-ditiodietanol es más denso y la agitación ha de ser la adecuada para que no se formen fases durante la reacción. Cuando inicia la reacción, el medio de reacción
20 se enturbia.

Una hora más tarde se añaden 6,91 g de YMER N-120 seco, se arrastra con 1ml de acetona seca.

25 Cuando se alcanza el NCO teórico (aproximadamente tras 4 h de reacción) se retira el baño calefactor y se añaden 1,5625 g de Priamine 1074 solubilizados en 8 g de MEK seco y se activa con 2 gotas de trietilamina.

Tras 45 min se refrigera el reactor a unos 5-10°C y se añaden 1,77 g de IPDI y 1,25
30 g de Bayhydur 3100 en 16 ml de MEK seco. Estos dos isocianatos son el segundo prepolímero, que formarán la segunda capa, interna, de la pared. Se observa un claro espesamiento de la muestra. Se añaden 2 gotas de antiespumante BYK-028 (como máximo puede haber 40 g totales de MEK).

Antes de emulsionar se comprueba la presencia de NCO en la reacción mediante IR.

5 A continuación se adiciona, gota a gota 260 ml de agua milliQ basificada a un pH comprendido entre 11 y 12 y refrigerada a una temperatura comprendida entre 5 y 10 °C.

Al producirse la inversión de fase (bastante viscosa) se añade en el embudo de presión compensada 1237 µl (1,1778 g) de DETA mientras se prosigue con la adición gota a gota del resto de agua con el DETA a mayor velocidad.

Se mantiene la agitación y la refrigeración a 10°C hasta que la señal de NCO desaparece del espectro IR.

15

Se obtiene un producto de aspecto blanco azulado, homogéneo. Se elimina la MEK por rotoevaporación. Se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se diluye al 10% de sólidos.

20 Se obtiene una emulsión estable que se almacena en nevera. Se diluye al 1% para observar por microscopía electrónica de transmisión. Se liofiliza fácilmente congelándolo con nitrógeno líquido, obteniéndose un polvo blanco. Se redispersa en agua desionizada o en PBS sin dificultades agitando durante 3 min. A veces es conveniente dejar reposar durante 24 h para que la emulsión se reconstituya plenamente.

Este ejemplo es una forma particularmente ventajosa de realización de la invención.

30 **Ejemplo 30.**

Este ejemplo es una variante del ejemplo 29 anterior, en el que se reticula con hidrocloreuro de cistamina en vez de con DETA.

Se introducen 4,5506 gr de IPDI, 5g de Crodamol GTCC y 0,6039g de 2,2-ditiodietanol (DEDS), previamente agitados en un vórtex, simultáneamente en un reactor a 50°C. Se arrastran los restos con dietiléter. Se observa que el 2,2-
5 ditiodietanol es más denso y la agitación ha de ser la adecuada para que no se formen fases durante la reacción. Cuando inicia la reacción, el medio de reacción se enturbia.

Una hora más tarde se añaden 6,91 g de YMER N-120 seco, se arrastra con 1ml de
10 acetona seca.

Cuando se alcanza el NCO teórico (aproximadamente tras 4 h de reacción) se retira el baño calefactor y se añaden 1,5625 g de Priamine 1074 solubilizados en 8 g de MEK seca y se activa con 2 gotas de trietilamina.
15

Tras 45 min se refrigera el reactor a unos 5-10°C y se añaden 1,77 g de IPDI y 1,25 g de Bayhydur 3100 en 16 ml de MEK seco. Estos dos isocianatos son el segundo prepolímero, que formarán la segunda capa, interna, de la pared. Se observa un claro espesamiento de la muestra. Se añaden 2 gotas de antiespumante BYK-028
20 (como máximo puede haber 40 g totales de MEK).

Antes de emulsionar se comprueba la presencia de NCO en la reacción mediante IR.

25 A continuación se adiciona, gota a gota 260 ml de agua milliQ basificada a un pH comprendido entre 11 y 12 y refrigerada a una temperatura comprendida entre 5 y 10 °C.

Al producirse la inversión de fase (bastante viscosa) se añade en el embudo de
30 presión compensada 3,825 g de dihidrocloruro de cistamina previamente disueltos en la mínima cantidad posible de agua milliQ, se basifica a pH 11 y se prosigue con la adición gota a gota del resto de agua con cistamina a mayor velocidad.

Se mantiene la agitación y la refrigeración a 10°C hasta que la señal de NCO desaparece del espectro IR.

5 Se obtiene un producto de aspecto blanco azulado, homogéneo. Se elimina la MEK por rotoevaporación. Se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se diluye al 10% de sólidos.

10 Se obtiene una emulsión estable que se almacena en nevera. Se diluye al 1% para observar por microscopía electrónica de transmisión. Se liofiliza fácilmente congelándolo con nitrógeno líquido, obteniéndose un polvo blanco. Se redispersa en agua desionizada o en PBS sin dificultades agitando durante 3 min. A veces es conveniente dejar reposar durante 24 h para que la emulsión se reconstituya plenamente.

15 Este ejemplo es una forma particularmente ventajosa de realización de la invención.

Ejemplo 31. Procedimiento de encapsulación de plitidepsina

20 A partir de un prepolímero formado a 50°C con IPDI, DEDS, Crodamol GTCC y YMER N-120 (ver, por ejemplo, los ejemplos 28, 29 y 30) se apaga la calefacción del baño y se añade la cantidad necesaria de LAP 100D en 10 g de MEK. Se deja reaccionar durante 45 min y se controla mediante IR la formación de la poliurea.

25 Seguidamente se refrigera el reactor a 10°C y se añade el resto de MEK y el exceso de isocianato. Se homogeneiza el medio de reacción y se toma la parte proporcional de prepolímero + MEK. Se añade esta parte proporcional de prepolímero sobre la cantidad de plitidepsina necesaria para estar al 1% respecto del prepolímero + la amina reticulante (DETA) (no se tiene en cuenta la cantidad de
30 MEK para hacer este cálculo). De este modo, cuando se emulsione para que esté al 10% de sólidos, se tendrá un 0,01% de plitidepsina.

En la Fig. 23 se muestra una imagen TEM de las partículas obtenidas.

Ejemplo 32. *Procedimiento de derivatización de un péptido vehiculizador a la pared de la nanocápsula.*

5

Se mezclan 122 mg de Bayhydur 3100 con 36,3 mg de c-(RGDfK) disueltos en 0,9 ml de agua milliQ a 5°C y basificada a un pH 11,5. Se deja reaccionando durante 90 minutos, agitando en vórtex cada 10-15 minutos.

10 Se emulsiona un prepolímero (ver, por ejemplo, el prepolímero del ejemplo 28) + MEK + plitidepsina añadiendo, gota a gota, la mezcla acuosa ya reaccionada del Bayhydur 3100 con el c-(RGDfK). Antes de iniciar la emulsión se comprueba, mediante IR, que todavía queda una gran cantidad de isocianatos libres. Si no tiene lugar la inversión de fase, se añade más agua hasta que tiene lugar la inversión de
15 fase. Una vez realizada la inversión de fase se añade el resto de agua fría y basificada junto con el segundo compuesto (la amina reticulante).

La MEK se elimina en el rotavapor, quedando el producto libre de solventes orgánicos y apto para ser liofilizado y posteriormente redispersado en PBS.

20

Ejemplo 33. *Procedimiento de encapsulación de fluoróforo hidrófobo.*

En un balón de 100 ml previamente tarado se añaden el prepolímero + MEK y
25 plitidepsina, si es el caso. Se añaden 5 mg de DIR (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina ioduro) disueltos en la mínima cantidad de acetona seca. Se agita la mezcla y está lista para ser emulsificada siguiendo, por ejemplo, el procedimiento del ejemplo 28.

30 La Fig. 29 muestra un esquema de reacción y una representación teórica de la estructura ideal de la nanocápsula del ejemplo 28 cargada y funcionalizada siguiendo los ejemplos 31-33.

Ejemplo 34.

En este ejemplo se sintetiza una variante del ejemplo 28 sustituyendo el DEDS por
5 1,6-hexanodiol. De esta forma se obtiene un producto análogo sin disulfuro en la
membrana.

Se introducen 6,7124 g de IPDI, 6,6363 g de Crodamol GTCC y 0,4765 g de 1,6-
hexanodiol, simultáneamente en un reactor a 55-60°C bajo corriente de gas inerte y
10 se deja reaccionar agitándose a 265 rpm durante una hora. Pasada la hora se
añaden 10,2568 g de YMER N-120 seco.

Cuando se alcanza el NCO teórico (aproximadamente tras 4 h de reacción) se retira
el baño calefactor y se añaden 3,0670 g de LAP 100D solubilizados en 16.7756 g
15 de MEK seca.

Una hora más tarde se refrigera el reactor a unos 5-10°C y se añaden 2.0836 g de
IPDI y 1,8408 g de Bayhydur 3100 en 23 ml de MEK seco. Estos dos isocianatos
son el segundo prepolímero, que reforzarán la pared formando una segunda capa
20 interna.

Antes de emulsionar se comprueba la presencia de NCO en la reacción mediante
IR.

25 A continuación se adiciona, gota a gota 250 ml de agua milliQ basificada a un pH
comprendido entre 11 y 12 y refrigerada a una temperatura comprendida entre 5 y
10 °C. Se lleva la agitación hasta 400 rpm.

Al producirse la inversión de fase se añade en el embudo de presión compensada
30 1100 µl (1,1589 g) de DETA mientras se prosigue con la adición gota a gota del
resto de agua con la DETA.

Se mantiene la agitación y la refrigeración a 10°C hasta que la señal de NCO desaparece del espectro IR.

5 Se obtiene un producto de aspecto blanco azulado, homogéneo. Se evapora la MEK. Se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se diluye al 10% de sólidos.

Se obtiene una emulsión estable que se almacena en nevera. Por microscopía electrónica (SEM) se observan aglomerados de cápsulas con diámetros inferiores de los 200 nm.

10

Ejemplo 35.

Variante del ejemplo 28 donde se introduce un segundo prepolímero muy hidrófobo que formará una pared interna con mayor poder de encapsulación para moléculas muy hidrófobas. No obstante se reticula con hidrocloreuro de cistamina en vez de DETA para que la pared sea altamente degradable en un medio rico en Glutathiona (GSH).

15

20 Se introducen 6,7632 g de IPDI, 5 g de Crodamol GTCC, 520 µl (0,655g) de 2,2-ditiodietanol (DEDS) y 8 g de YMER N-120, previamente agitados en un vórtex, simultáneamente en un reactor a 50°C. Se arrastran los restos con dietiléter. La agitación ha de ser vigorosa para que no se formen fases durante la reacción. Cuando inicia la reacción, el medio de reacción se enturbia.

25 Alcanzado el NCO teórico (aproximadamente tras 4h de reacción) se retira el baño calefactor y se añaden 3,6265 g de LAP 100D solubilizados en 8 g de MEK seco.

Paralelamente, en un balón de 100 mL, se añaden 1,9425 g de IPDI y 1,8075 g de Bayhydur 3100 disueltos en 20 ml de MEK seca. Seguidamente, bajo atmósfera inerte se añaden gota a gota 3,34 g de Priamine disuelta en 8 mL de MEK/acetona. Por FT-IR se sigue la reacción.

30

Tras 45 min se refrigera el reactor a unos 5-10°C y se añade el prepolímero hidrofóbico de IPDI-PRIAMINE-B3100 disueltos en MEK/ACETONA. Estos dos isocianatos y la Priamine son el segundo prepolímero, que reforzarán la pared formando una segunda capa interna muy hidrofóbica. Se añaden 2 gotas de
5 antiespumante BYK-028.

Antes de emulsionar se comprueba la presencia de NCO en la reacción mediante FT-IR.

A continuación se adiciona, gota a gota 270 ml de agua milliQ basificada a un pH
10 comprendido entre 11 y 12 y refrigerada a una temperatura comprendida entre 5 y 10 °C.

Al producirse la inversión de fase se añaden en el embudo de presión compensada 2,343 g de hidrocloruro de cistamina basificados con trietilamina mientras se
15 prosigue con la adición gota a gota del resto de agua con cistamina a mayor velocidad.

Se mantiene la agitación y la refrigeración a 10°C hasta que la señal de NCO desaparece del espectro IR.

20

Se obtiene un producto de aspecto blanco azulado, homogéneo. Se eliminan disolventes en el rotavapor. Se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se diluye al 10% de sólidos.

25 Se obtiene una emulsión estable que se almacena en nevera. Se diluye al 1% para observar por microscopía electrónica de transmisión. Se liofiliza fácilmente congelándolo con nitrógeno líquido, obteniéndose un polvo blanco. Se redispersa en una mezcla 80:20 de agua/acetona agitando durante 3 min. A veces es conveniente dejar reposar durante 24 h para que la emulsión se reconstituya
30 plenamente.

Este ejemplo es una forma particularmente ventajosa de realización de la invención. En la Fig. 24 se muestra una imagen TEM de las partículas obtenidas.

REIVINDICACIONES

1 - Procedimiento para la fabricación de un microencapsulado que comprende las
5 etapas de: [a] dispersar una primera fase líquida en una segunda fase líquida
formando una emulsión, de manera que dicha primera fase quede dispersa en
dicha segunda fase, y [b] polimerización de un polímero que forma la pared de
dicho microencapsulado, caracterizado porque entre dicha primera fase y dicha
10 segunda fase se forma una interfase que comprende un compuesto anfifílico
reactivo, donde dicho compuesto anfifílico es un prepolímero de dicho polímero, y
dicho compuesto anfifílico tiene por lo menos dos grupos funcionales principales
que reaccionan en la posterior polimerización para la formación de dicho polímero,
donde dichos dos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico
15 están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones, y donde dicho compuesto anfifílico
tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo o hidrófobo en una cadena que es
lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales.

2 – Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto
anfifílico es el agente emulsionante principal de dicha emulsión y, preferentemente,
20 es el único agente emulsionante.

3 – Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto
anfifílico y/o el producto derivado de su polimerización es el agente estabilizante
principal, preferentemente es el único agente estabilizante de la emulsión.
25

4 – Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque no
se añade ningún agente emulsionante y/o estabilizante adicional.

5 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado
30 porque dicha primera fase es una fase orgánica y dicha segunda fase es una fase
acuosa y porque dicho compuesto anfifílico tiene un valor HLB mayor que 10,
preferentemente mayor que 15.

- 6 - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha primera fase es una fase acuosa y dicha segunda fase es una fase orgánica y porque dicho compuesto anfifílico tiene un valor HLB menor que 10.
- 5 7 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichos dos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico están separados entre sí entre 5 y 10 eslabones.
- 8 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado
10 porque dichos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico son grupos funcionales NCO, aptos para formar enlaces tipo uretano y/o tipo urea.
- 9 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado
15 porque por lo menos uno de dichos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico es un grupo funcional silano, aptos para formar enlaces tipo Si_xO_y .
- 10 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado
20 porque se añade dicho compuesto anfifílico a dicha primera fase líquida.
- 11 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado
25 porque dicha segunda fase comprende un segundo compuesto, donde dicho segundo compuesto comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con dichos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico, para formar dicho polímero.
- 12 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado
30 porque se añade a dicha primera fase líquida un primer precursor y un segundo precursor de dicho compuesto anfifílico, y se hacen reaccionar dichos primer y segundo precursores entre sí.
- 13 – Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque se añade a dicha primera fase líquida un tercer precursor de dicho compuesto anfifílico, y se

hace reaccionar con el producto de la reacción entre dicho primer y/o segundo precursores.

14 – Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque se añade a dicha segunda fase líquida un tercer precursor de dicho compuesto anfifílico, y se hace reaccionar con el producto de la reacción entre dicho primer y/o segundo precursores.

15 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque dicho primer precursor es un isocianato del grupo formado por IPDI, HDI y HMDI, y preferentemente es IPDI.

16 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, caracterizado porque dicho segundo precursor es un compuesto hidrófilo, donde dicho segundo precursor comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales de dicho primer precursor, dicho segundo precursor teniendo preferentemente su función hidrófila en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une los dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales de dicho primer precursor.

17 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, caracterizado porque dicho segundo precursor es un compuesto hidrófilo del grupo formado por compuestos polietoxilenados con un peso molecular superior a 100, preferentemente superior a 500.

18 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, caracterizado porque dicho segundo precursor es un diol o una diamina con una función carboxílica o una función sulfónica en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une los dos grupos funcionales alcohólicos o aminos, y preferentemente es DMPA (ácido dimetilolpropiónico).

19 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizado porque dicho tercer precursor es un compuesto C8-C22 hidrófobo, donde dicho

tercer precursor comprende por lo menos dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales de dicho primer precursor, dicho tercer precursor teniendo preferentemente su función hidrófoba en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une los dos grupos funcionales aptos para reaccionar con grupos funcionales de dicho primer precursor.

20 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, caracterizado porque la reacción de dicho primer precursor con dicho segundo precursor, o con dichos segundo y tercer precursor, se hace en presencia de un exceso de dicho primer precursor, para evitar que dicho prepolímero crezca excesivamente.

21 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, caracterizado porque dicho tercer precursor es un compuesto del grupo formado por dioles o diaminas grasos C10-C22, preferentemente es un gliceril monoglicérido, un dimerdíol o una cocopropilendiamina.

22 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, caracterizado porque dicho primer precursor tiene un grado de funcionalidad superior a 3, y porque dicho segundo precursor y/o tercer precursor tienen un grado de funcionalidad menor que 2.

23 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, caracterizado porque tras la reacción de formación de dicho prepolímero se añade un principio activo a dicha primera fase líquida.

24 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 23, caracterizado porque dicho segundo compuesto es una poliamina, preferentemente una diamina, triamina, tetraamina o pentaamina y muy preferentemente es una poliamina del grupo formado por etilendiamina, dietilentriamina y trietilentetraamina.

25 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24, caracterizado porque se añade un cuarto precursor, donde dicho cuarto precursor comprende un grupo ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente

un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil.

26 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque dicho polímero comprende, en su cadena principal, un grupo ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil.

27 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque dicho compuesto anfifílico comprende, en la cadena que une ambos grupos funcionales principales, un grupo ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil.

28 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado porque se añade un segundo prepolímero a dicha primera fase, donde dicho segundo prepolímero tiene por lo menos dos grupos funcionales principales que reaccionan en la posterior polimerización para la formación de dicho polímero, donde dicho segundo prepolímero es más hidrófobo que dicho compuesto anfifílico si dicha primera fase es orgánica, o dicho segundo prepolímero es más hidrófilo que dicho compuesto anfifílico si dicha primera fase es acuosa.

29 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado porque dicho polímero comprende un péptido.

30 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado porque dicho compuesto anfifílico comprende un péptido.

31 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dicha emulsión es una emulsión O/W, caracterizado porque comprende una etapa de adición de por lo menos un solvente orgánico polar volátil a dicha primera fase, previa a dicha etapa [a], y una fase de evaporación de dicho solvente, posterior a dicha etapa [b].

32 – Procedimiento según la reivindicación 31, caracterizado porque dicho solvente es un solvente del grupo formado por acetona y metiletilcetona, y preferentemente es acetona.

5

33 – Procedimiento según la reivindicación 32, caracterizado porque la cantidad de acetona añadida es menor al 20% en peso de la cantidad de agua de la segunda fase.

10

34 - Procedimiento según la reivindicación 32, caracterizado porque la cantidad de metiletilcetona añadida es menor al 15% en peso de la cantidad de agua de la segunda fase.

15

35 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, caracterizado porque comprende las etapas de:

[i] se añade, a dicha primera fase líquida, dicho primer precursor y dicho cuarto precursor y se deja reaccionar,

20

[ii] posteriormente se añade, a dicha primera fase líquida, dicho segundo precursor y se deja reaccionar,

[iii] posteriormente se añade dicho tercer precursor a dicha primera fase líquida,

25

[iv] posteriormente se enfría la primera fase líquida obtenida de la etapa [iii] hasta una T inferior a 15°C y se añade más cantidad de dicho primer precursor y/o de otro primer precursor y se deja reaccionar,

30

[v] dicho solvente orgánico polar volátil se añade a dicha primera fase en una de las etapas anteriores o repartido entre más de una de dichas etapas anteriores,

[vi] se añade una parte de dicha segunda fase a dicha primera fase hasta que se forma la inversión de fase, donde dicha segunda fase es agua, y está a un pH básico y a una temperatura inferior a 15°C,

5 [vii] se añade la parte restante de dicha segunda fase, que incluye dicho segundo compuesto, y se deja reaccionar manteniendo la temperatura por debajo de los 15°C.

36 – Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque dicho cuarto
10 precursor es un dioldialquil disulfuro, y preferentemente es 2,2-ditiodietanol.

37 – Procedimiento según una de las reivindicaciones 35 ó 36, caracterizado porque dicho primer precursor es IPDI, y dicha etapa [i] se realiza a una T superior a 40°C.

15

38 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, caracterizado porque dicho segundo precursor es un polietilenglicol monometil éter lineal difuncional.

20 39 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, caracterizado porque dicho tercer precursor es una diamina hidrófoba, y preferentemente es N1-dodecil- 1,3 –propanodiamina o el dimero diamina proveniente del ácido dímero C36.

25 40 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, caracterizado porque en dicha etapa [iv] se añade un segundo prepolímero que comprende una mezcla de un diisocianato, preferentemente IPDI, y un poliisocianato con más de dos grupos NCO, preferentemente poliisocianato alifático hidrofílico basado en hexametildiisocianato.

30

41 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, caracterizado porque dicho solvente orgánico polar volátil es metiletilcetona.

- 42 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, caracterizado porque en dicha etapa [vi] el pH está comprendido entre 11 y 12.
- 43 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42, caracterizado porque dicho segundo compuesto es dietilentriamina.
- 44 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42, caracterizado porque dicho segundo compuesto es una diamina que incluye un disulfuro en la cadena que une ambos grupos amino, y preferentemente es cistamina o dihidrocloruro de cistamina.
- 45 – Compuesto anfifílico reactivo con por lo menos dos grupos funcionales principales aptos para reaccionar en una posterior polimerización, caracterizado porque tiene un valor HLB mayor que 10, dichos dos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones y tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo y otro grupo funcional hidrófobo cada uno de ellos en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales.
- 46 - Compuesto anfifílico reactivo con por lo menos dos grupos funcionales principales aptos para reaccionar en una posterior polimerización, caracterizado porque tiene un valor HLB menor que 10, dichos dos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico están separados entre sí entre 4 y 12 eslabones y tiene por lo menos un grupo funcional hidrófilo y otro grupo funcional hidrófobo cada uno de ellos en una cadena que es lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales.
- 47 – Compuesto según una de las reivindicaciones 45 ó 46, caracterizado porque dichos grupos funcionales principales de dicho compuesto anfifílico son grupos funcionales NCO, aptos para formar enlaces tipo uretano y/o tipo urea.
- 48 – Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 47, caracterizado porque por lo menos uno de dichos grupos funcionales principales de dicho

compuesto anfifílico es un grupo funcional silano, aptos para formar enlaces tipo Si_xO_y .

- 5 49 – Compuesto según cualquiera de la reivindicaciones 45 a 48, caracterizado porque comprende, en la cadena que une ambos grupos funcionales principales, un grupo ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil.
- 10 50 – Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado porque comprende un péptido, preferentemente c-(RGDfK).
- 15 51 – Microencapsulado caracterizado porque su pared comprende un compuesto anfifílico reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 50.
- 20 52 – Microencapsulado caracterizado porque el polímero que conforma su pared comprende, en su cadena principal, un grupo ácido, un disulfuro o un éster, donde dicho grupo ácido es preferentemente un sulfonato, carboxilato o fosfato y/o donde dicho éster es preferentemente un éster lábil.
- 25 53 – Microencapsulado caracterizado porque el polímero que conforma su pared comprende un péptido, preferentemente c-(RGDfK).
- 54 – Microencapsulado según cualquiera de las reivindicaciones 51 a 53, caracterizado porque comprende, en su interior, un principio activo antitumoral.
- 30 55 – Microencapsulado según la reivindicación 54, caracterizado porque dicho principio antitumoral es paclitaxel o plitidepsina.
- 56 – Microencapsulado según cualquiera de las reivindicaciones 51 a 55, caracterizado porque comprende, en su interior, un fluoróforo hidrófobo fotosensible.

57 – Composición cosmética o farmacéutica caracterizada porque comprende un microencapsulado según cualquiera de las reivindicaciones 51 a 56.

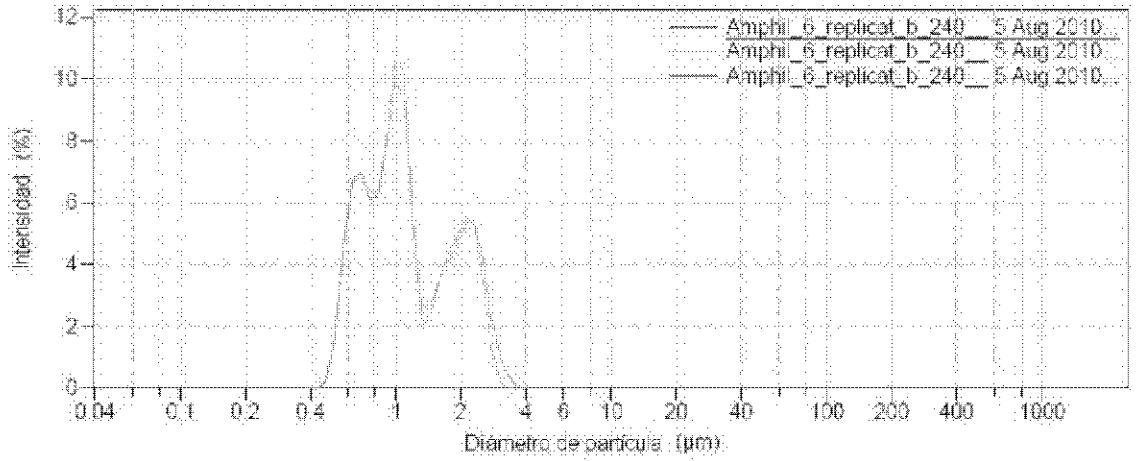


Fig. 1

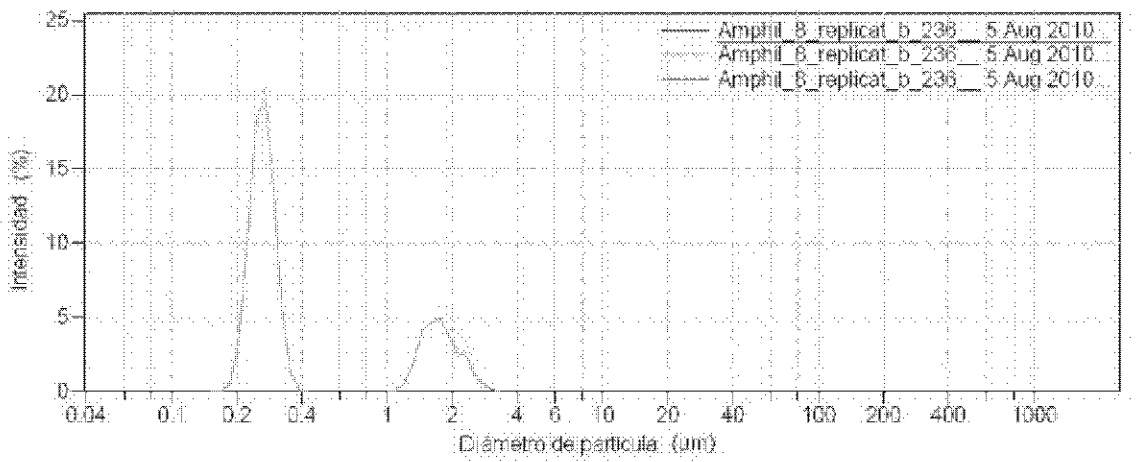


Fig. 2

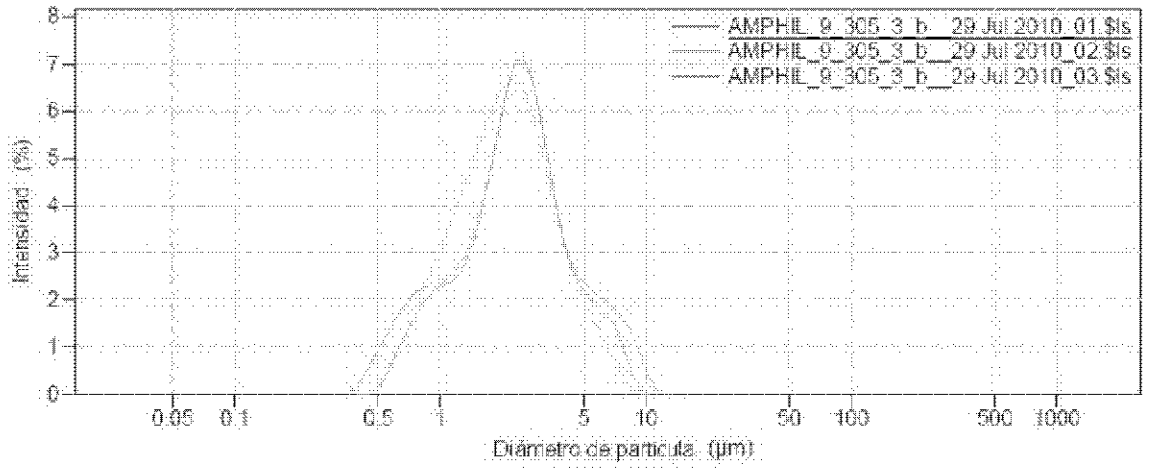


Fig. 3

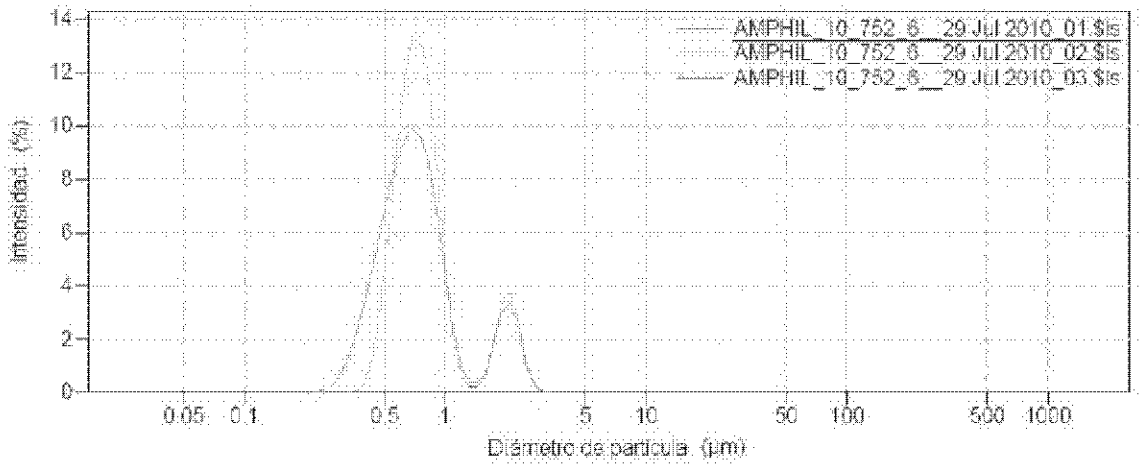


Fig. 4

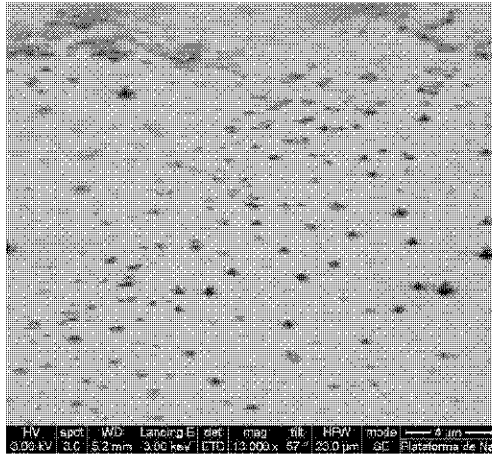


Fig. 5

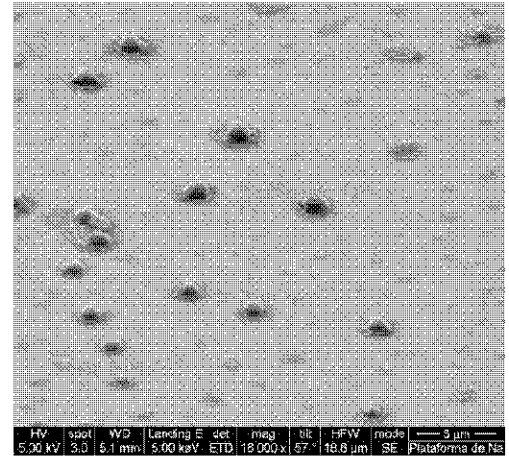


Fig. 6

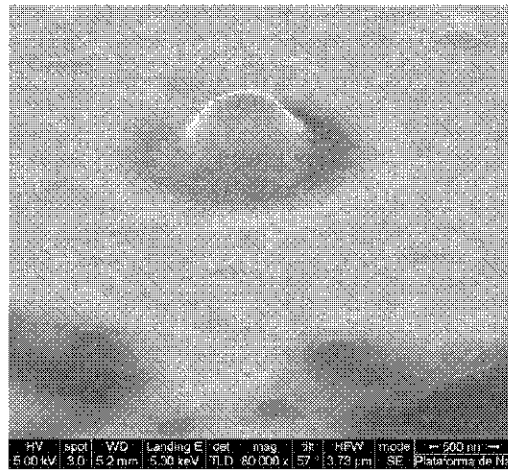


Fig. 7

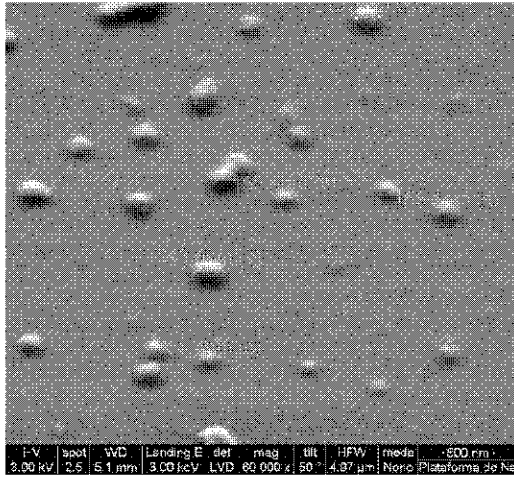


Fig. 8

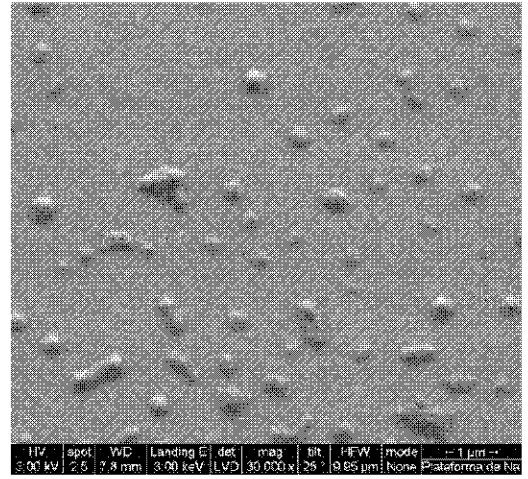


Fig. 9

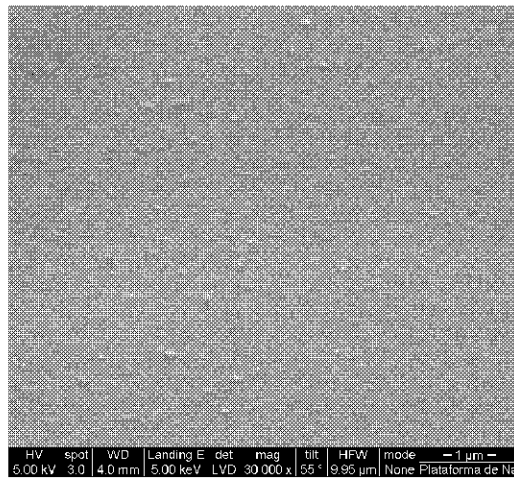


Fig. 10

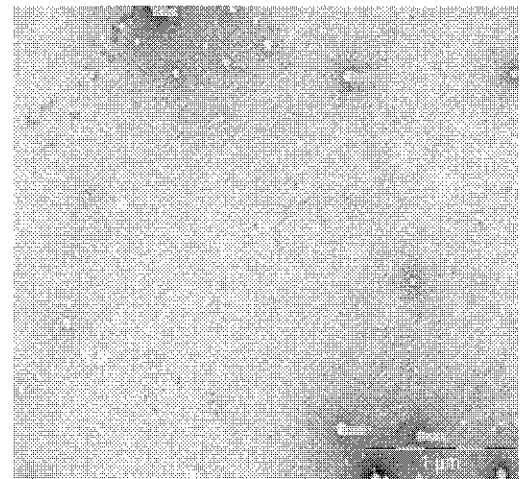


Fig. 11

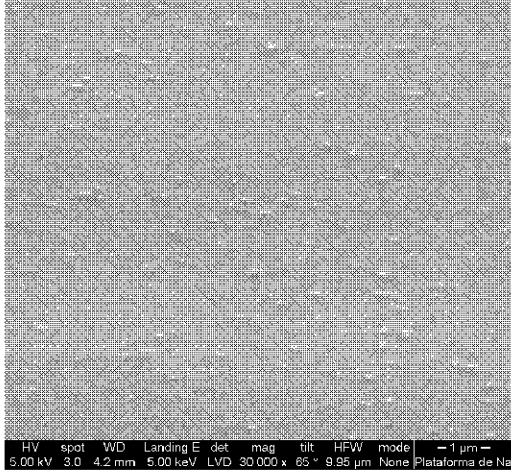


Fig. 12

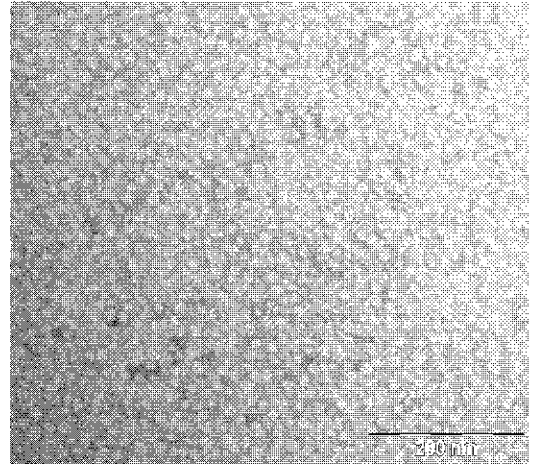


Fig. 13

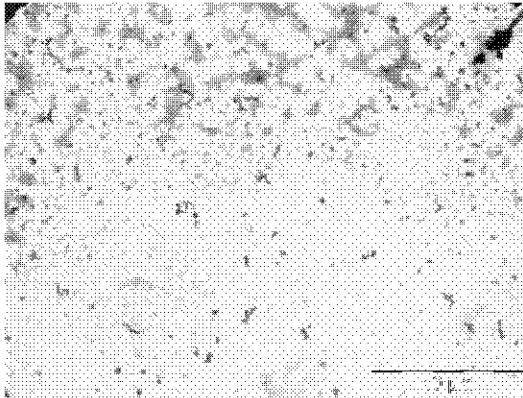


Fig. 14

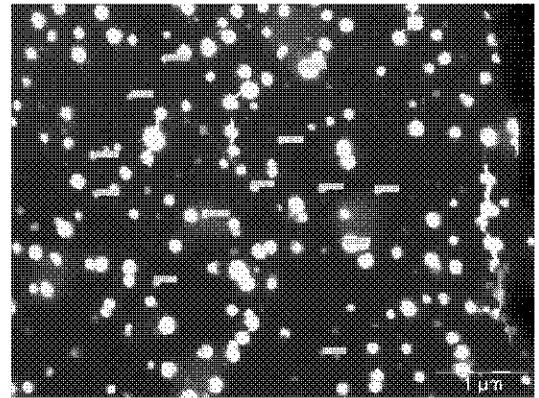


Fig. 15

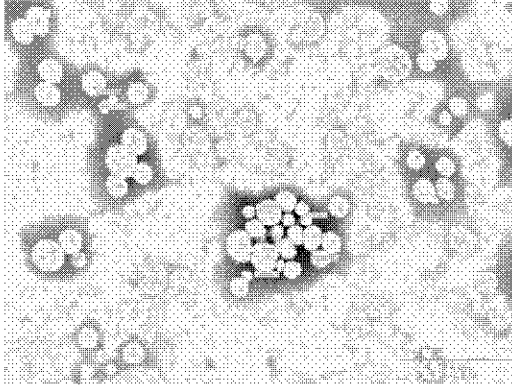


Fig. 16

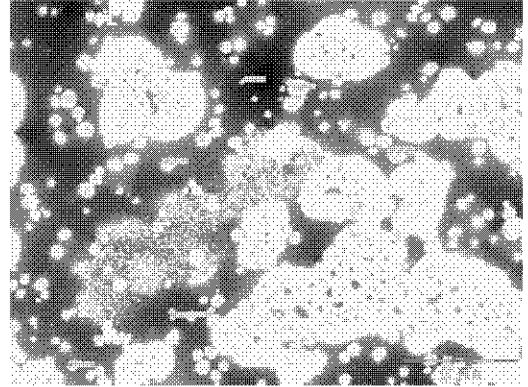


Fig. 17

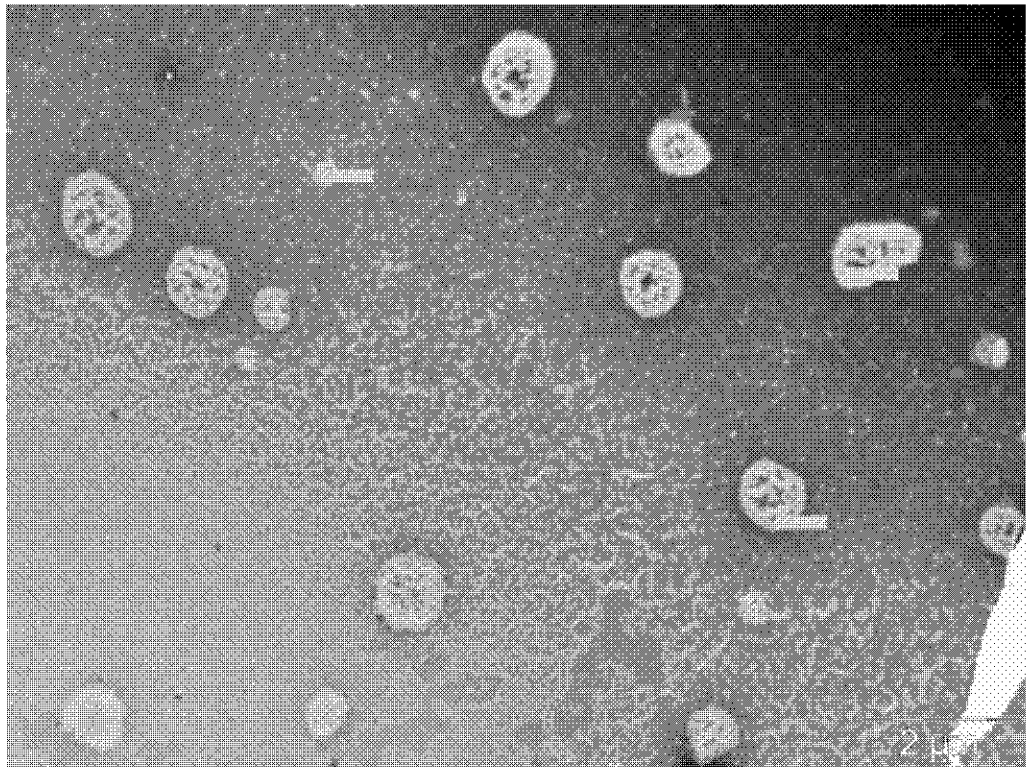


Fig. 18

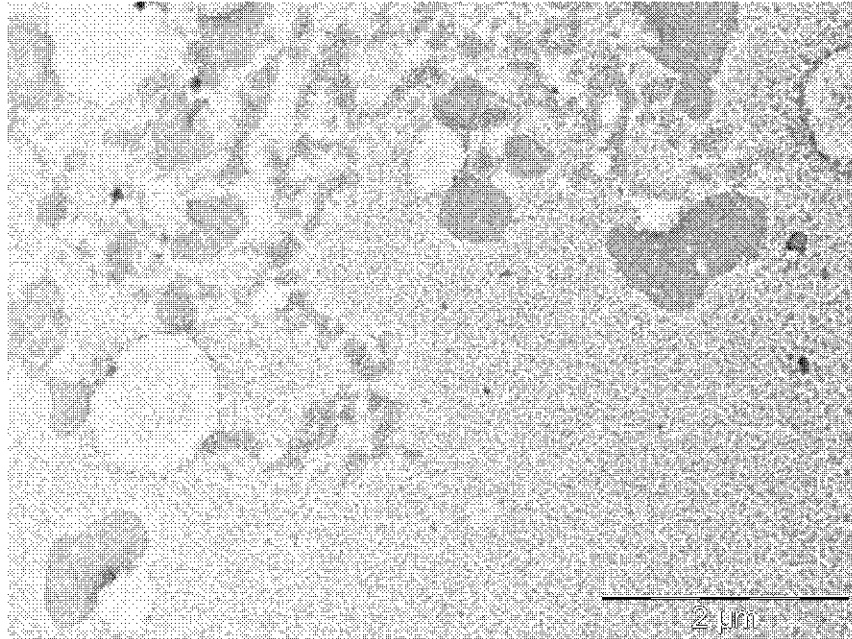


Fig. 19

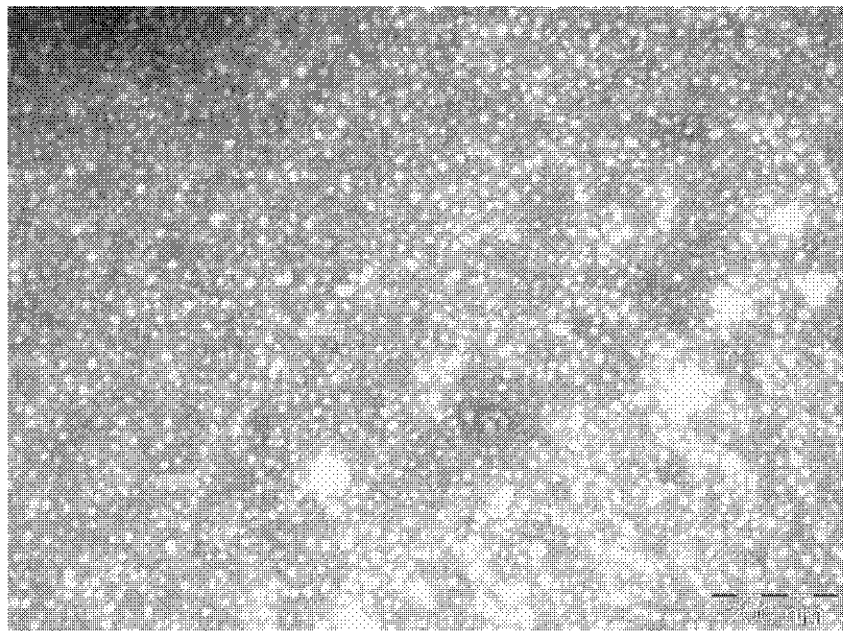


Fig. 20

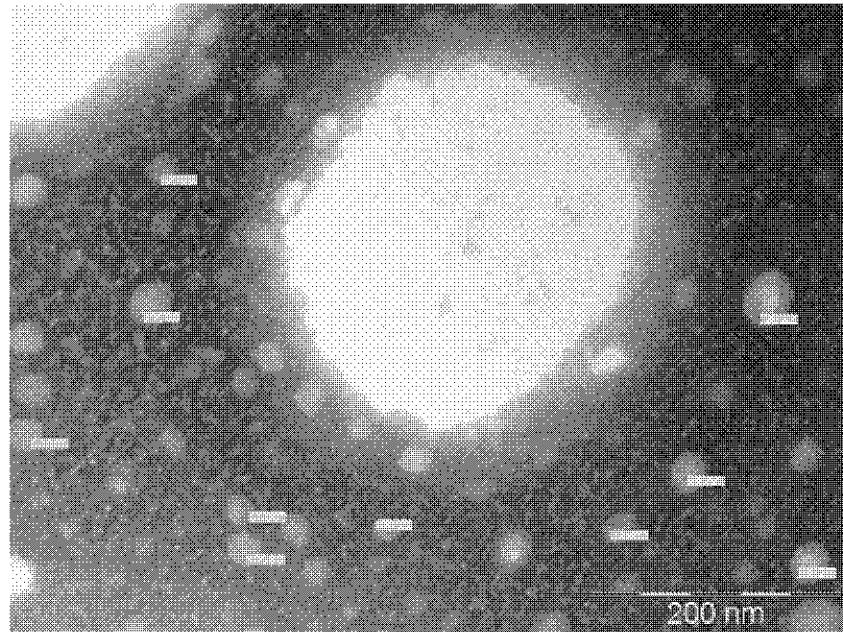


Fig. 21

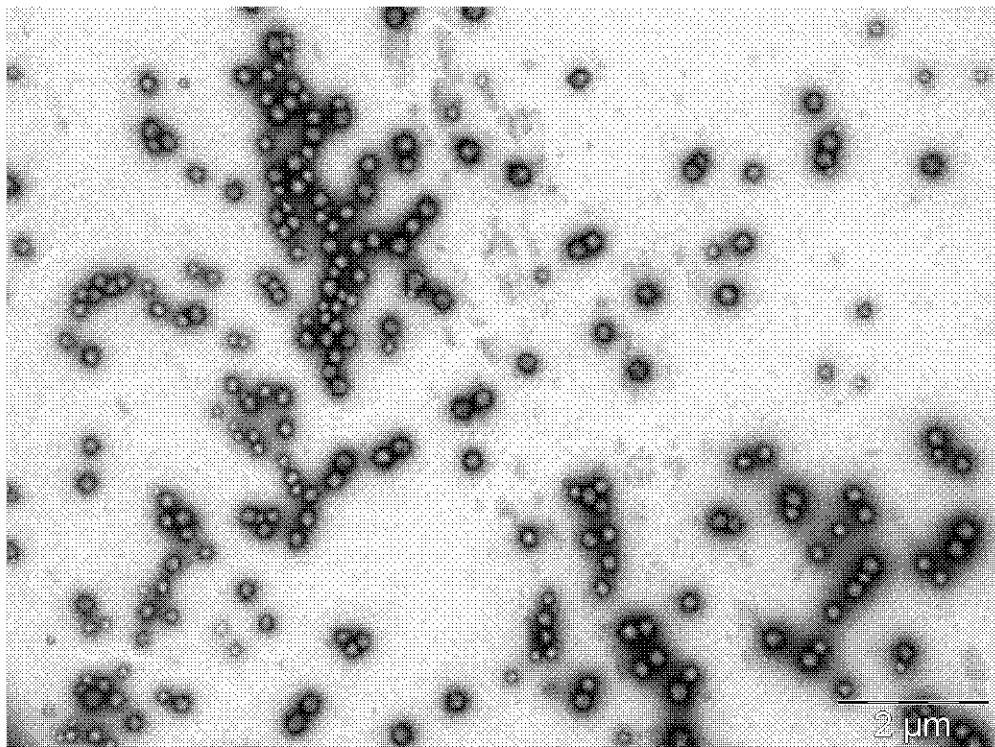


Fig. 22

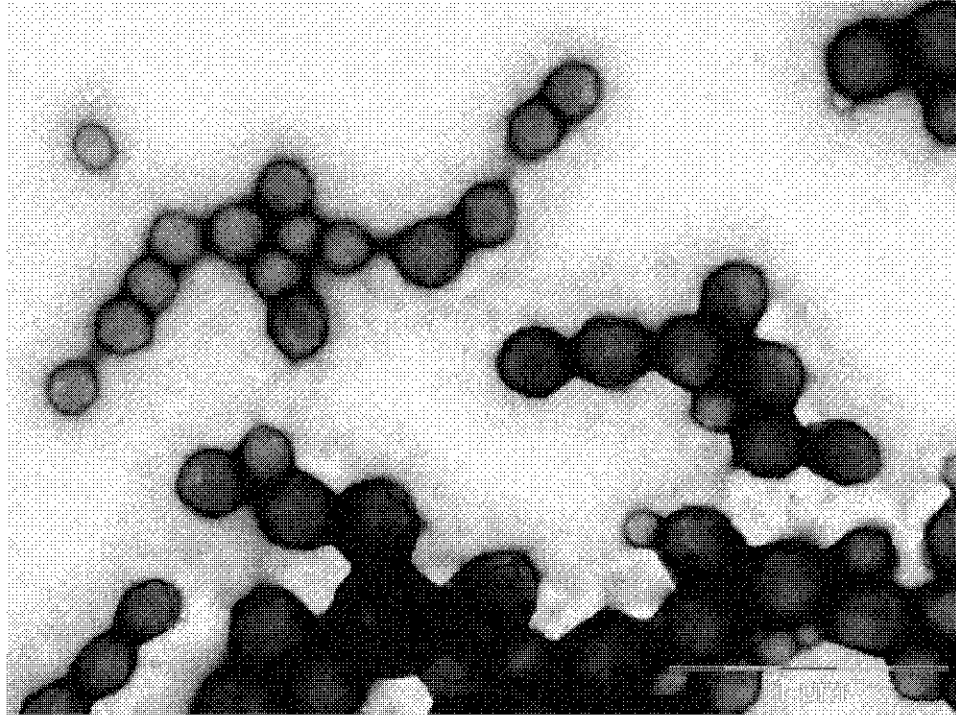


Fig. 23

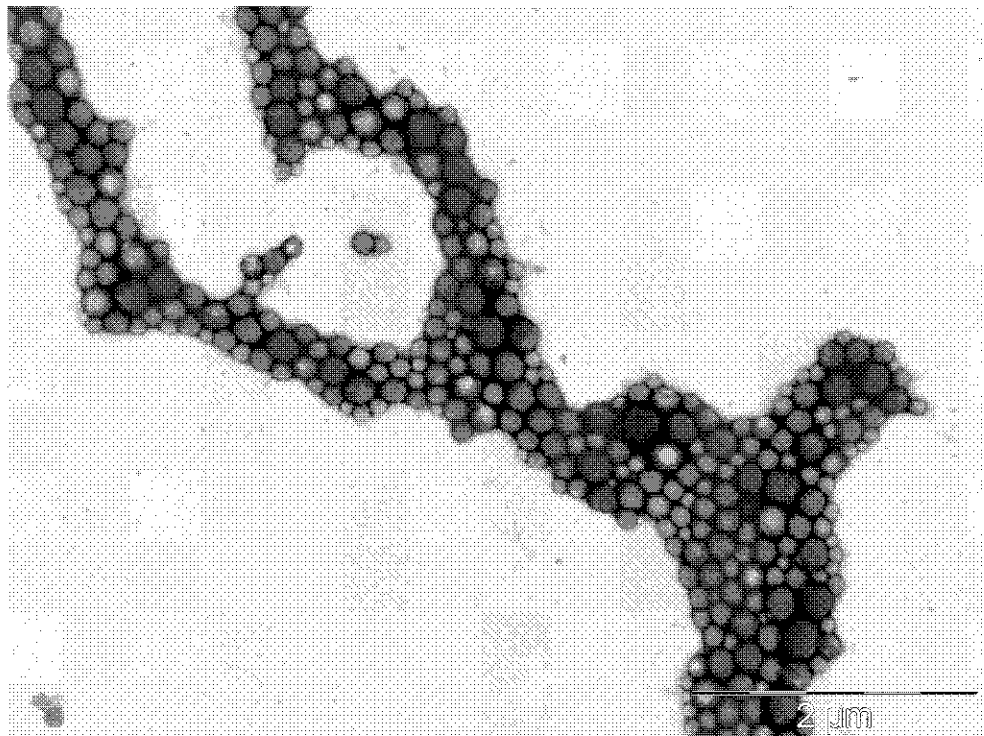


Fig. 24

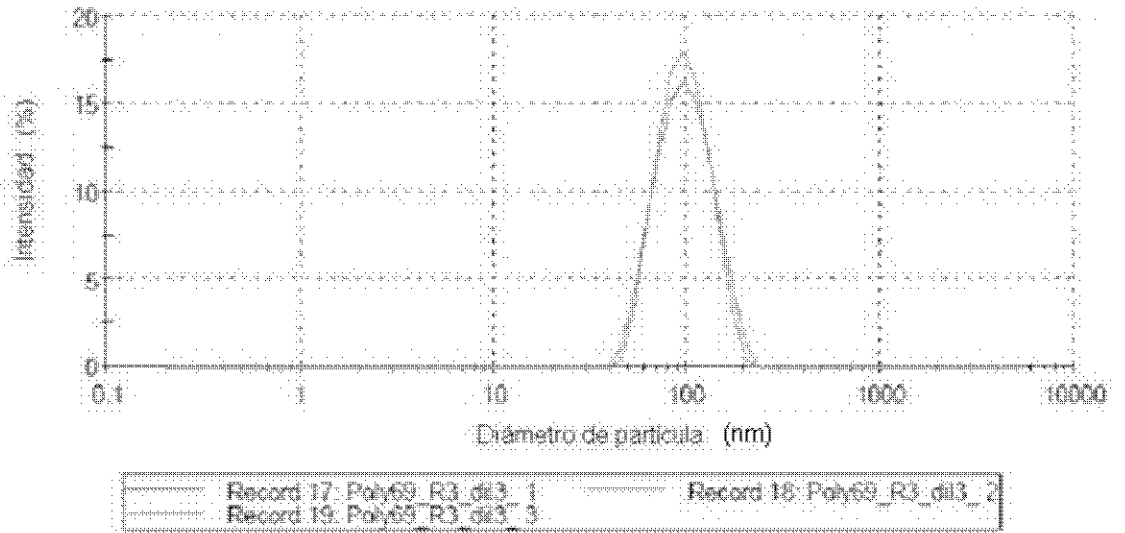


Fig. 25

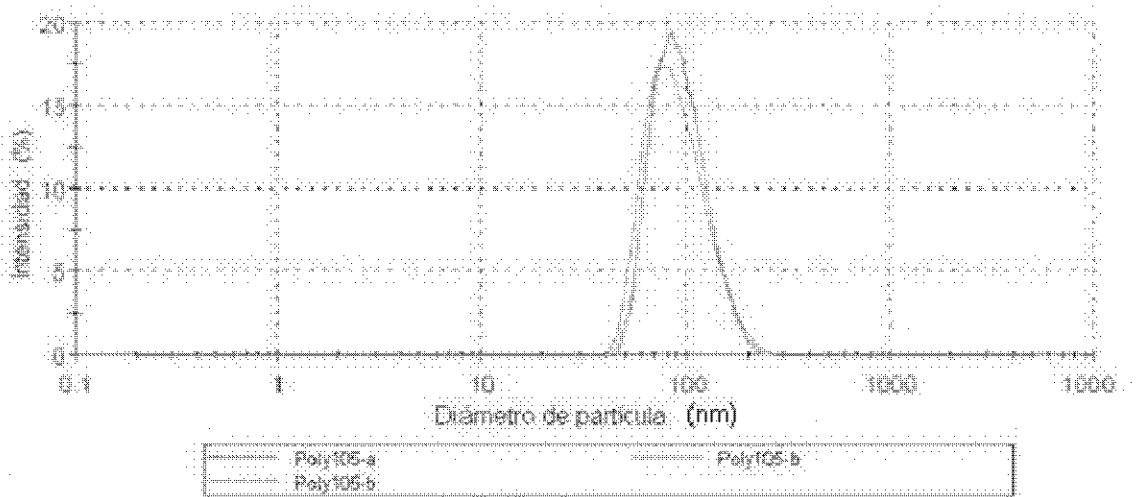


Fig. 26

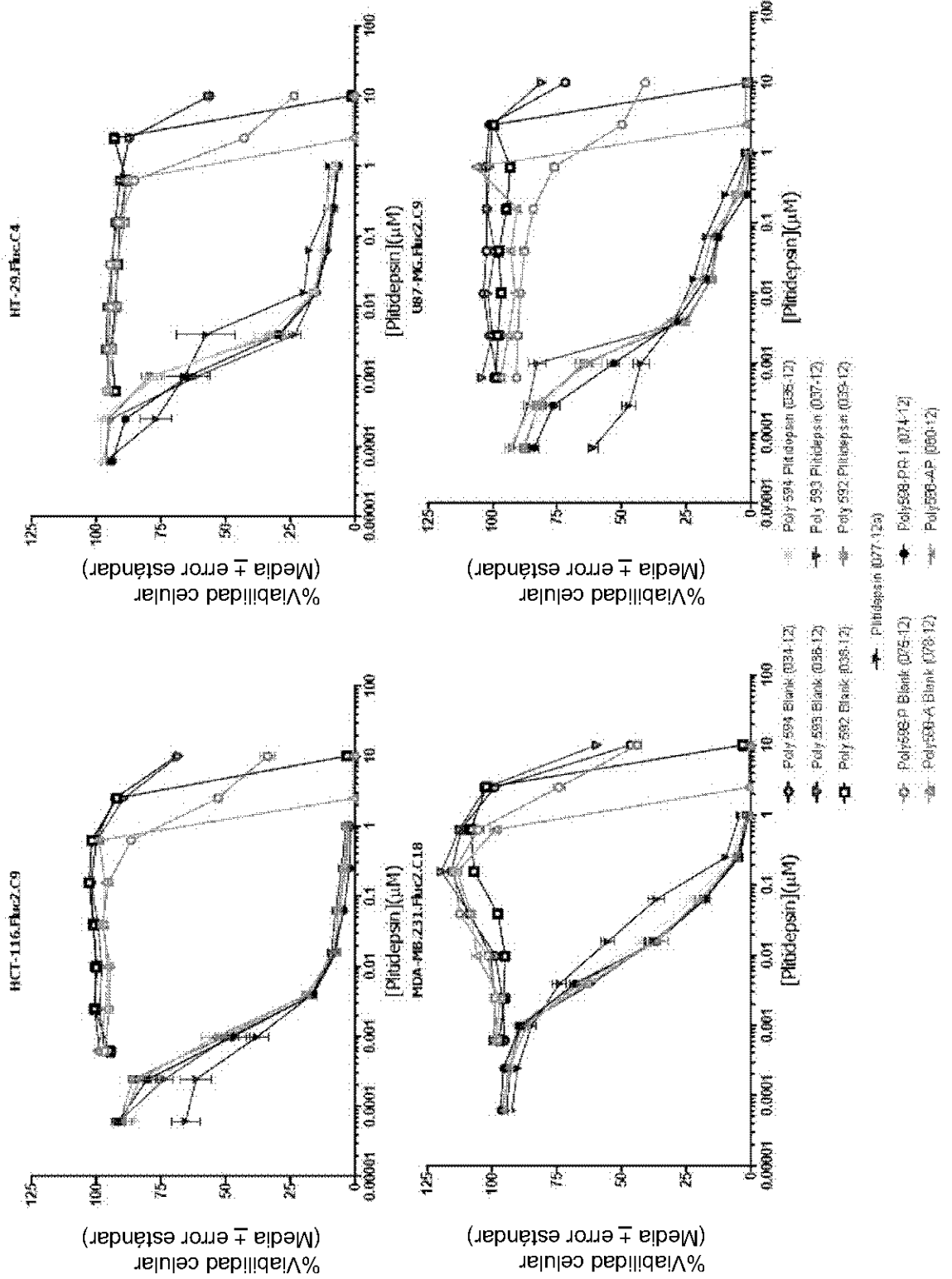


Fig. 27

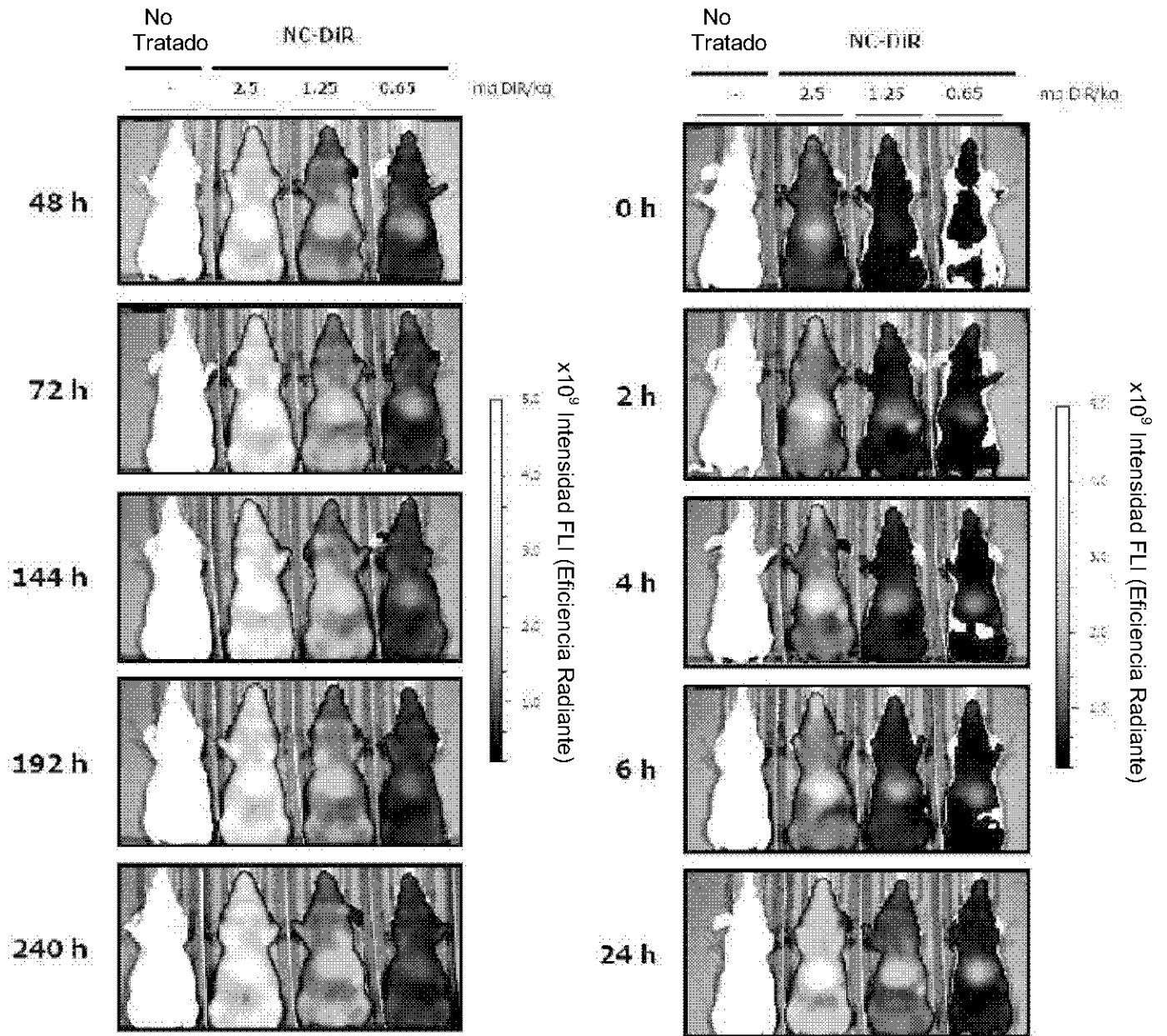


Fig. 28

POLY 598 ESQUEMA DE REACCIÓN

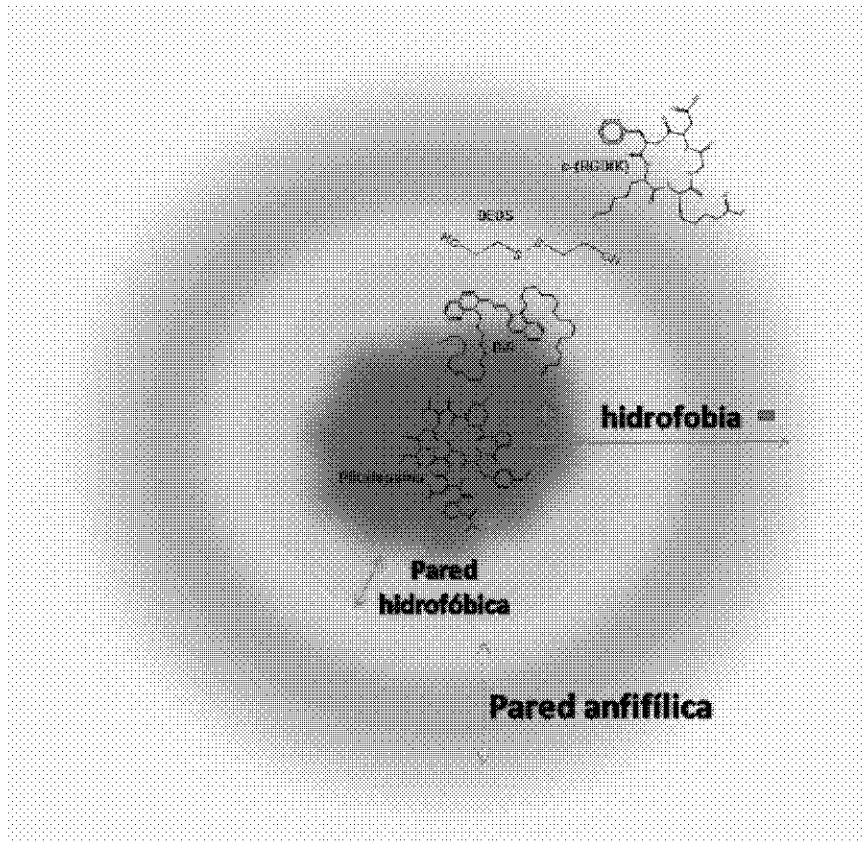
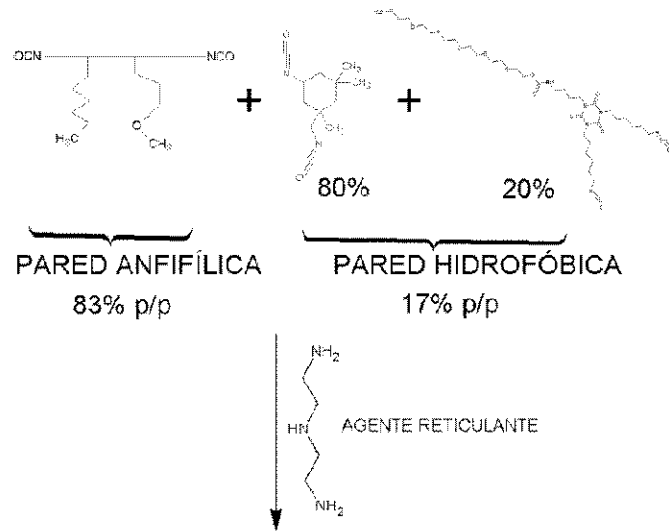


Fig. 29



- ②① N.º solicitud: 201330086
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.01.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2361311 A1 (ECOPOL TECH.) 16.06.2011, todo el documento.	1-57
A	WO 20117084106 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 14.07.2011, páginas, 2-6,12,14-16; reivindicaciones 1-20,23-28.	1-57
A	WO 02100525 A2 (SYNGENTA) 19.12.2002, páginas 8-11; reivindicaciones 1-3,6-8,13-16,32-34.	1-57

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.09.2013

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01J13/16 (2006.01)

A61K9/50 (2006.01)

A61K31/17 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

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

B01J, B82B, A61K

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

INVENES, EPODOC, CAPLUS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NLP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.09.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-57	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-57	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2361311 A1 (ECOPOLE TECH.)	16.06.2011
D02	WO 20117084106 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH)	14.07.2011
D03	WO 02100525 A2 (SYNGENTA)	19.12.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un microencapsulado que comprende las etapas de formación de una emulsión con una primera fase líquida dispersa en una segunda fase líquida, y polimerización en la interfase de un prepolímero que forma la pared del microencapsulado. Dicho prepolímero es un compuesto anfifílico reactivo con dos grupos funcionales principales separados entre sí por una cadena entre 4 y 12 eslabones y cuenta con al menos un grupo funcional hidrófobo o hidrófilo en una cadena lateral respecto de la cadena que une ambos grupos funcionales principales. La invención también se refiere al compuesto anfifílico reactivo que forma la pared del microencapsulado, al microencapsulado así formado que contienen en su interior un principio activo antitumoral o un fluoróforo hidrófobo fotosensible y, por último, a la composición farmacéutica que comprende dicho microencapsulado.

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo a la invención y divulga un procedimiento para la fabricación de un micro encapsulado que contiene un principio activo hidrófobo y que cuenta con un 90% de las partículas de tamaño inferior a 5 micras. El procedimiento consiste en la preparación de una primera solución de 5% de polivinilalcohol en agua, una segunda solución del principio activo y 5-50% de un poliisocianato (dímero o trímero de hexametileno diisocianato, isoforona diisocianato y mezclas), se mezclan la primera y segunda soluciones hasta formar una dispersión acuosa y, a continuación, se mezcla con una tercera solución de una poliamina (etilendiamina, dietilendiamina) en una proporción fase hidrófoba:fase acuosa entre 1:1 y 1:4 y se deja reaccionar. La diferencia entre lo divulgado en D01 y el objeto de la invención es que en D01 el prepolímero que forma la pared del microencapsulado no es un compuesto anfifílico con una cadena hidrófila y/o una cadena hidrófoba en su estructura.

El documento D02 divulga unos compuestos anfifílicos capaces de autoensamblarse y formar vesículas o microestructuras que se utilizan para encapsular sustancias solubles en agua (p. ej. antitumorales o compuestos para radioterapia o diagnóstico por imagen). Los compuestos descritos en D02 contienen fragmentos urea o tiourea (fórmula general A) formados por reacción de grupos iso(tio)cianato con aminas y también contienen cadenas laterales (R^2, R^3) hidrófilas y/o hidrófobas. La diferencia con los compuestos anfifílicos de la invención radica en que en este caso los grupos funcionales (tio)urea de la cadena principal están separados por una estructura rígida aromática ($R^1=1,4$ -fenileno).

El documento D03 divulga un procedimiento para la obtención de una emulsión que se utiliza para la fabricación de un microencapsulado. Se trata de una emulsión aceite-en-agua que comprende una fase continua líquida y una fase discontinua líquida que contienen una serie de monómeros o prepolímeros vinílicos con un resto funcional hidrófilo y un resto funcional hidrófobo capaces de formar microcápsulas estables en emulsiones acuosas. Mediante polimerización interfacial se forman polímeros en bloque o injertados que constituyen la pared de las microcápsulas, las cuales pueden contener uno o más materiales encapsulados (se dan ejemplos con ingredientes activos agroquímicos). En este caso se trata de monómeros vinílicos distintos a los de la invención.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que recojan procedimientos de fabricación de microencapsulados en los que se utilice un compuesto anfifílico con dos grupos funcionales principales reactivos separados entre sí entre 4 y 12 eslabones y con al menos un fragmento hidrófilo o hidrófobo en una cadena lateral para formar la pared de dicho microencapsulado mediante polimerización en la interfase entre una primera y una segunda fase líquidas que conforman la emulsión. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir el uso de dicho compuesto anfifílico reactivo, con las características definidas en la invención, para la formación de la pared de un microencapsulado de pequeño tamaño que contenga en su interior un principio activo.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1-57 se consideran nuevas y con actividad inventiva y aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.