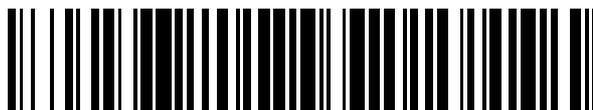


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 979**

51 Int. Cl.:

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2009 E 09750532 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2292752**

54 Título: **Cápsula sin uniones**

30 Prioridad:

19.05.2008 JP 2008131114

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.10.2015

73 Titular/es:

**MORISHITA JINTAN CO., LTD. (100.0%)
2-40, Tamatsukuri 1-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8566, JP**

72 Inventor/es:

**YOSHIKADO, MASATOMO;
NAKATSUJI, MASAOKI;
ASADA, MASAOKI;
KAMAGUCHI, RYOSEI;
TAKADERA, TAKAHIDE y
MURAMATSU, TOSHIMITSU**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 548 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cápsula sin uniones

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a una cápsula sin uniones que contiene un biocatalizador tal como una enzima o una célula viva y que es aplicable a un biorreactor y similares.

10 Antecedentes de la técnica

Desde 1950, con el fin de reducir las cargas ambientales, han aumentado los catalizadores biológicos o biocatalizadores, tal como una enzima derivada de un organismo, un microorganismo, o una célula o tejido de origen animal o vegetal, que se colocan en un recipiente de reacción para producir una sustancia, tal como se le denomina, la producción de una sustancia mediante un reactor biológico o biorreactor. Las técnicas del sector de la bioingeniería y del sector de la biociencia se aplican al biorreactor. Por ejemplo, para la utilización efectiva de un biocatalizador, se utiliza una técnica para inmovilizar el biocatalizador en un biorreactor.

Por ejemplo, se pueden utilizar procedimientos entre los que se incluyen la unión a un portador, la reticulación, atrapamiento, y las combinaciones de los mismos para la inmovilización de biocatalizador. En particular, el atrapamiento (específicamente, el atrapamiento utilizando un gel macromolecular tal como agar, carragenato, alginato, resina fotocurable, o poliacrilamida) se utiliza para la inmovilización de microorganismos, células o tejidos de animales o plantas.

En detalle, de forma convencional, los microorganismos y las células vivas se suspenden en un sol de macromoléculas en el que no se ha formado un gel, y el sol se gelifica a continuación para el atrapamiento. Por lo tanto, sólo se utilizan con eficacia las células vivas cerca de la superficie del gel, y la reactividad por célula viviente es pobre. Además, algunas células vivas pueden desprenderse de la matriz de gel.

Se han propuesto varios procedimientos de atrapamiento para solucionar estos problemas (por ejemplo, la solicitud de Patente europea EP 1407678 A1 y los documentos de patente 1 a 3).

La solicitud de Patente europea EP 1407678 A1 da a conocer cápsulas que contienen líquido en el que células o tejidos vitales se suspenden y en las que estas células o tejidos se pueden hacer crecer. El documento de patente 1 da a conocer una microcápsula hueca con una cubierta exterior porosa y la encapsulación de microorganismos o similares en la microcápsula. Específicamente, se da a conocer que una fase orgánica, que contiene partículas de alginato cálcico en las que se atrapa una levadura, se dispersa en una fase acuosa para preparar una emulsión O/W (aceite en agua), y esta emulsión se seca para proporcionar una microcápsula (procedimiento de coacervación), y el alginato cálcico incluido en la microcápsula se disuelve y se elimina lavando con ácido clorhídrico para encerrar la levadura en la microcápsula hueca. Sin embargo, para esta microcápsula, dado que se utiliza principalmente poliestireno en la cubierta de la cápsula, se puede utilizar un disolvente orgánico perjudicial durante la formación de la cápsula. Las microcápsulas obtenidas por este procedimiento de coacervación no son uniformes en el diámetro de la cápsula y el espesor de la cubierta y, por lo tanto, la reactividad de las levaduras en el núcleo de la cápsula puede ser incontrolable.

El documento de patente 2 da a conocer una cápsula sin uniones en la que se encapsulan células y tejidos vivos. El documento de patente 3 da a conocer una cápsula de tres capas sin uniones que tiene una cubierta de resina fotocurable. Para las cápsulas sin uniones tal como las que se dan a conocer en estos documentos, dado que el agua está en el núcleo y el fluido que contiene las células vivas que se van a encapsular es un fluido acuoso, se debe tener cuidado para evitar la contaminación. Además, para la producción de las cápsulas sin uniones se puede requerir un tiempo prolongado para el secado, un proceso complicado y un aumento de coste.

El documento de patente 4 da a conocer un procedimiento para producir un microorganismo inmovilizado, mediante la preparación en proporciones específicas de una suspensión que contiene un prepolímero que tiene un peso molecular de 3500 a 20000, un agente de reticulación que tiene un peso molecular de 71 o mayor y que tiene una proporción de su peso molecular al del prepolímero de 0,045 o menos, y un microorganismo, y la polimerización de la suspensión para producir el microorganismo incluido e inmovilizado en el polímero reticulado. Para el microorganismo incluido e inmovilizado (micropartículas) obtenido por este procedimiento, es problemático que el aumento de los microorganismos en la superficie con el avance de la reacción se transfiera a la solución de reacción provocando nebulosa ("cloud").

Completamente alejado del atrapamiento, el documento de patente 5 da a conocer una preparación bacteriana viva estable caracterizada porque un polvo seco que contiene una bacteria viva que tiene una acción de control de la función intestinal se suspende en una grasa o aceite, para la estabilidad de almacenamiento de la bacteria viva, y también da a conocer que la preparación bacteriana viva se introduce en una cápsula blanda para su utilización. El documento de patente 6 da a conocer una cápsula de dos capas en la que un aceite que contiene enterobacterias

beneficiosas dispersadas se introduce en una cápsula que tiene un diámetro de 3 mm o menos, para la administración de las enterobacterias beneficiosas vía ingestión oral al intestino.

5 Aparte de lo descrito anteriormente, existe demanda de cápsulas aplicables a un biorreactor en las que se inmovilice un biocatalizador.

Documentos de la técnica anterior

10 Documentos de patente

Documento de Patente 1: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2003-88747

Documento de Patente 2: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2001-245660

15 Documento de Patente 3: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2003-325638

Documento de Patente 4: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2006-61097

Documento de Patente 5: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. S56-2908

Documento de Patente 6: Publicación de Patente japonesa abierta a inspección pública No. S62-201823

Características de la invención

20

Problemas a resolver por la invención

Es un objetivo de la presente invención el dar a conocer una cápsula sin uniones aplicable a un biorreactor.

25 Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a una cápsula sin uniones que puede almacenarse de forma estable durante un periodo de tiempo largo en forma de una cápsula de dos capas sin uniones, que comprende una capa interior que comprende una composición en suspensión, y una capa exterior de cubierta y que tiene permeabilidad al agua, en la que la composición en suspensión de la capa interior comprende un biocatalizador suspendido en una sustancia oleosa, y la composición de cubierta de la capa exterior comprende una sustancia permeable al agua, en la que la cápsula de dos capas sin uniones forma una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, cuando se introduce en un fluido acuoso; en la que el biocatalizador es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende microorganismos, células animales, células vegetales y tejidos vegetales.

35

La presente invención se refiere además a un biorreactor que comprende la mencionada cápsula sin uniones.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de la cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende sumergir en un fluido acuoso una cápsula de dos capas sin uniones, que comprende una capa interior que comprende una composición en suspensión, y una capa exterior que comprende una composición de cubierta y que tiene permeabilidad al agua, en la que la composición en suspensión de la capa interior comprende un biocatalizador suspendido en una sustancia oleosa, y la composición de cubierta de la capa exterior comprende una sustancia permeable al agua.

40

45 Finalmente, la presente invención se refiere además a la utilización de las cápsulas sin uniones anteriores como biorreactor.

Los presentes inventores han llevado a cabo una extensa investigación para resolver los problemas descritos anteriormente, y han descubierto que una cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa (véase la figura 1(b)) es aplicable a un biorreactor. La cápsula se obtiene por inmersión, en un fluido acuoso, de una cápsula de dos capas sin uniones (véase la figura 1(a)) compuesta de una capa interior de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa y una capa exterior de una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua, y contiene un fluido acuoso encerrado en la misma. Es decir, dado que la cápsula de dos capas sin uniones tiene una capa exterior con permeabilidad al agua, por ejemplo, mediante inmersión de la cápsula sin uniones que tiene un microorganismo (biocatalizador) encapsulado en un fluido acuoso tal como un medio líquido, el medio líquido puede ser incorporado en la cápsula a través de la capa exterior al tiempo que conserva el microorganismo en la cápsula, lo que conduce a una cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa tal como se muestra en la figura 1(b). En la cápsula sin uniones que tiene la pseudo estructura de tres capas, el microorganismo puede utilizar los componentes del medio para producir un metabolito (sustancia útil) y el metabolito producido (sustancia útil) se puede liberar desde el interior de la cápsula hacia el exterior de la misma.

55

60

De acuerdo con la presente invención, una cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, obtenida por inmersión en un fluido acuoso de una cápsula de dos capas sin uniones, que comprende una capa interior que comprende una composición en suspensión que comprende un

65

biocatalizador suspendido en una sustancia oleosa y una capa exterior que comprende una composición de cubierta que comprende una sustancia permeable al agua.

5 En una realización, el biocatalizador es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende enzimas, microorganismos, células animales, células vegetales y tejidos vegetales.

10 En una realización, el biocatalizador es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende microorganismos, células animales, células vegetales, y tejidos vegetales, y el biocatalizador se activa por la pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa.

15 En una realización, la composición de cubierta comprende, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende carragenato, agar, glucomanano, alginato, oligómeros basados en acrilato, oligómeros basados en poliéster insaturados, oligómeros basados en epoxi, oligómeros basados en éter de vinilo, oligómeros basados en polieno-tiol, y oligómeros basados en cinamato.

20 En una realización, la sustancia oleosa es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende aceite de oliva, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de colza, manteca de cerdo, sebo de vaca, aceite de ballena, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de arroz, aceite de germen de arroz, aceite de coco, aceite de palma, aceite de semilla de cacao, aceite de aguacate, aceite de nuez de macadamia, escualano, aceite de visón, aceite de tortuga, hidrocarburos que tienen de 8 a 30 átomos de carbono, cera de abejas, cera de carnauba, cera de arroz, lanolina, parafina líquida, vaselina, ácidos grasos que tienen 4 a 30 átomos de carbono, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y sacarosa, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y glicerol, alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, y ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono.

25 La presente invención da a conocer un biorreactor que comprende la cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa.

30 La presente invención da a conocer un procedimiento para producir una cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, que comprende:

35 sumergir en un fluido acuoso una cápsula de dos capas sin uniones que comprende una capa interior que comprende una composición en suspensión que comprende un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa y una capa exterior que comprende una composición de cubierta que comprende una sustancia permeable al agua.

En una realización, se obtiene la cápsula de dos capas sin uniones

40 utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica que tiene, desde la parte más interior, una primera tobera y una segunda tobera,

mediante un procedimiento que comprende:

45 extruir simultáneamente la composición en suspensión que comprende un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa desde la primera tobera y la composición de cubierta que comprende una sustancia permeable al agua desde la segunda tobera en un fluido.

Efectos de la invención

50 La cápsula sin uniones de la presente invención se obtiene mediante la inmersión en un fluido acuoso de una cápsula de dos capas sin uniones compuesta de una capa interior de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa y una capa exterior de una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua. En la cápsula de dos capas sin uniones, el biocatalizador se suspende en la sustancia oleosa en la capa interior, y está adecuadamente aislado del agua (es decir, está en un estado seco). Por lo tanto, el biocatalizador rara vez se contamina y es estable durante un largo período de tiempo. Además, la capa exterior que permite que un fluido acuoso penetre sólo permite que un líquido acuoso se transfiera entre el interior y el exterior de la cápsula, sin permitir que el biocatalizador salga hacia el exterior. Por lo tanto, según la presente invención, por ejemplo, mediante la inmersión de la cápsula de dos capas sin uniones que tiene un microorganismo (biocatalizador) encapsulado en un medio líquido, el medio líquido se incorpora en la cápsula a la vez que conserva el microorganismo (biocatalizador) en la cápsula, proporcionando por lo tanto una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, y posteriormente se puede liberar un metabolito (componente útil) producido por el microorganismo desde el interior hacia el exterior de la cápsula. De este modo, la cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa de la presente invención es útil porque es aplicable a un biorreactor como material para la inmovilización de un biocatalizador. Además, según la presente invención, una cápsula de dos capas sin uniones se prepara y un sustrato líquido (un fluido acuoso tal como un medio líquido) penetra desde la capa exterior a la capa

interior de la cápsula tal como se ha descrito anteriormente y, por lo tanto, no es necesario encapsular el sustrato líquido con antelación. La cápsula sin uniones de la presente invención se puede almacenar de manera más estable en forma de una cápsula de dos capas sin uniones en la que un biocatalizador se encapsula a un nivel elevado, hasta que esté listo para ser utilizado, en comparación con biocatalizadores inmovilizados convencionales. Por lo tanto, la cápsula sin uniones de la presente invención es más eficiente que biocatalizadores inmovilizados convencionales en los que un biocatalizador se mezcla en un gel. Además, a diferencia de las cápsulas sin uniones de tres capas convencionales, en la cápsula sin uniones de la presente invención no se requiere enfriar la suspensión acuosa que contiene el biocatalizador de la capa más interior a fin de evitar la inactivación del biocatalizador. Además, aunque las cápsulas de tres capas sin uniones que se pueden obtener mediante procedimientos de producción convencionales tienen limitaciones para reducir su diámetro, es posible que la cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa de la presente invención sea estable en un diámetro más reducido, ya que se basa en una cápsula de dos capas sin uniones.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra ilustraciones esquemáticas en sección transversal de cápsulas sin uniones.

La figura 2 es una ilustración esquemática que muestra un ejemplo de un dispositivo de producción de cápsulas para la producción de la cápsula sin uniones de la presente invención.

La figura 3 proporciona fotografías que muestran el cambio de estado de la cápsula durante el proceso de producción de la cápsula sin uniones de la presente invención.

25 Modo de llevar a cabo la presente invención

La cápsula sin uniones de la presente invención se obtiene mediante la inmersión en un fluido acuoso de una cápsula de dos capas sin uniones que tiene la capa interior y la capa exterior especificadas. La cápsula sin uniones de la presente invención tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa.

30 Cápsula de dos capas sin uniones

Una cápsula de dos capas sin uniones para su utilización en la presente invención se compone de una capa interior de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa y una capa exterior de una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua.

35 (1) Capa interior (composición en suspensión)

La capa interior se compone de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa. El biocatalizador no está particularmente limitado. El biocatalizador puede activar la reacción en presencia de un fluido acuoso, es decir, en la pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, y los ejemplos incluyen los que se utilizan como elemento de reacción en reactores biológicos y similares. Específicamente, las enzimas, microorganismos (tales como bacterias ácido lácticas), células animales (tales como islotes de Langerhans y células adiposas), células vegetales (tales como callos indiferenciados), tejidos vegetales (tales como embrioides, yemas adventicias, brotes múltiples, puntas de brotes, puntos de crecimiento, cuerpos de tipo protocormo, raíces adventicias y raíces peludas) y similares. Los biocatalizadores se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más.

El biocatalizador, por ejemplo, en forma de polvo (tal como polvo de enzima o de bacterias), está contenido en la composición en suspensión en una proporción de 0,001 a 30% en peso y, preferentemente, de 0,01 a 20% en peso. El biocatalizador, en forma de células vivas, entre las que se incluyen microorganismos, células animales, células vegetales, tejidos vegetales, y similares, está contenido desde, aproximadamente, 1 célula/ml hasta 5×10^{11} células/ml y preferentemente desde, aproximadamente, 1×10^3 células/ml hasta 1×10^{11} células/ml en la composición en suspensión.

La sustancia oleosa no está particularmente limitada, siempre que sea líquida durante la producción de la cápsula de dos capas sin uniones. Es preferente utilizar una sustancia oleosa que tiene un punto de fusión de -30°C a 60°C para evitar la inactivación del biocatalizador. Entre los ejemplos de estas sustancias oleosas se incluyen el aceite de oliva, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de colza, manteca de cerdo, sebo de vaca, aceite de ballena, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de arroz, aceite de germen de arroz, aceite de coco, aceite de palma, aceite de semilla de cacao, aguacate petróleo, aceite de nuez de macadamia, escualano, aceite de visón, aceite de tortuga, hidrocarburos con 8 a 30 átomos de carbono, cera de abejas, cera de carnauba, cera de arroz, lanolina, parafina líquida, vaselina, ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y sacarosa (ésteres de ácidos grasos de sacarosa), ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y glicerol (monoglicéridos de ácidos grasos, diglicéridos de ácidos grasos, o triglicéridos de ácidos grasos), alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4

a 30 átomos de carbono y alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, y similares. Los ácidos grasos constituyentes de los hidrocarburos, glicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de sacarosa y ácidos grasos, tal como los que se han mencionado anteriormente pueden ser ácidos grasos saturados o ácidos grasos insaturados. Además, los grupos hidrocarbonados que constituyen los alcoholes grasos pueden ser grupos hidrocarbonados saturados o grupos hidrocarbonados insaturados. Las sustancias oleosas se pueden utilizar solas o en una combinación de dos o más. La viscosidad o la densidad de la sustancia oleosa no están particularmente limitadas y pueden ser ajustadas de forma adecuada.

En la utilización de un éster de un ácido graso que tiene de 4 a 30 átomos de carbono y glicerol (en particular, un triglicérido de ácido graso) o un aceite o grasa que contiene un éster como sustancia oleosa, se puede añadir lipasa a la capa interior (composición en suspensión) para degradar el aceite o la grasa después de la preparación de la cápsula de dos capas sin uniones. Mediante la inmersión de la cápsula de dos capas sin uniones en el agua, la cápsula se hincha de manera que se permite que el agua penetre en el interior de la cápsula. La lipasa empieza a actuar con el agua permeada, por lo que se hidroliza el aceite o la grasa. El producto hidrolizado del aceite o la grasa es soluble en el agua permeada y se puede liberar desde el interior hacia el exterior de la cápsula. Por lo tanto, el volumen de aceite o grasa en la cápsula se reduce, y correspondientemente un fluido acuoso se puede incorporar fácilmente en la cápsula, haciendo más eficiente el contacto del biocatalizador con el componente acuoso (sustrato).

La composición en suspensión se obtiene suspendiendo el biocatalizador en la sustancia oleosa. El procedimiento para la suspensión puede ser cualquiera de los procedimientos comúnmente utilizados por los expertos en la técnica, tales como agitación.

(2) Capa exterior (composición de capa exterior)

La capa exterior se compone de una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua, y que puede contener otros componentes si es necesario. Por lo tanto, la capa exterior permite que un fluido acuoso se permee a través de la misma y tiene una capacidad de expansión tal que la cápsula de dos capas sin uniones obtenida puede incorporar un fluido acuoso cuando se sumerge en el fluido acuoso. La sustancia permeable al agua es preferentemente, como mínimo, uno elemento de agentes gelificantes y resinas fotocurables, y una cubierta obtenida a partir de los mismos exhibe una gran permeabilidad a un líquido acuoso. Aunque el hinchamiento de la propia cubierta con agua no es muy grande, la cubierta tiene tal capacidad de expansión que la cápsula sin uniones puede incorporar fácilmente en su interior el fluido acuoso. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el fluido acuoso se refiere a agua o una solución acuosa que contiene un componente acuoso. El componente acuoso se refiere a un material soluble en agua que puede servir como un sustrato de un biocatalizador y se selecciona adecuadamente dependiendo del tipo de biocatalizador. Entre los ejemplos de componentes acuosos se incluyen los componentes del medio (incluyendo fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales, y similares).

(2-1) Agente gelificante

Entre los ejemplos de agentes gelificantes se incluyen polisacáridos tales como carragenato, agar, glucomanano, alginato, goma gelana, goma xantana, goma de garrofin, pectina, goma de semilla de psillium, goma guar, furcellarano, arabinogalactano, arabinoxilano, goma arábica, dextrina, dextrina modificada, almidón, almidón modificado, pululano, sales de carboximetilcelulosa, y similares. Son preferentes carragenato, agar, glucomanano, y alginato. Preferentemente, el agente gelificante está contenido en la composición de cubierta en un contenido de sólidos de 0,1 a 40% en peso y, más preferentemente, de 0,3 a 30% en peso.

(2-2) Resina fotocurable

Una resina fotocurable se refiere a una resina que utiliza una reacción provocada por fotorradiación. Por lo general, se utiliza un monómero fotopolimerizable, un oligómero fotopolimerizable, o un polímero de adición de un monómero fotopolimerizable o un oligómero fotopolimerizable. Las resinas fotocurables se pueden utilizar solas o en una combinación de dos o más. Es preferente utilizar una resina fotocurable en combinación con un iniciador de polimerización.

Entre los ejemplos del oligómero fotopolimerizable se incluyen oligómeros que utilizan la polimerización por radicales libres y oligómeros que utilizan la reacción de polimerización catiónica. El peso molecular promedio en número del oligómero fotopolimerizable está en el intervalo de 300 a 30000 y, preferentemente, de 500 a 20000.

El oligómero fotopolimerizable que utiliza la polimerización por radicales libres tiene un grupo o grupos funcionales, tales como un grupo (met)acrilóilo, un grupo vinilo, o similares, ejemplos de los cuales incluyen oligómeros basados en (met)acrilato de uretano, oligómeros basados en (met)acrilato de epoxi, oligómeros basados en ésteres de (met)acrilato, oligómeros basados en (met)acrilato, oligómeros basados en poliésteres insaturados, oligómeros basados en polieno tiol y oligómeros basados en cinamato. Los ejemplos específicos incluyen resinas que tienen un grupo etilénicamente insaturado fotopolimerizable en cada extremo terminal de un polialquilenglicol (tales como di(met)acrilato de polietilenglicol, di(met)acrilato de polipropilenglicol, di(met)acrilato de polialquilenglicol en los que

el número de átomos de carbono de la cadena de alquilo es de 4 a 10, tetra(met)acrilato de pentaeritritol, y hexa(met)acrilato de dipentaeritritol), poliésteres insaturados de índice de acidez elevado, poliepóxidos insaturados de índice de acidez elevado, resinas acrílicas insaturadas aniónicas, resinas acrílicas insaturadas catiónicas, poliamidas insaturadas, y similares. El término "(met)acrilato" se refiere a, como mínimo, un elemento de acrilato y metacrilato. Por ejemplo, el "di(met)acrilato de polietilenglicol" se refiere a, como mínimo, un elemento de diacrilato de polietilenglicol y dimetacrilato de polietilenglicol.

El oligómero fotopolimerizable que utiliza la reacción de polimerización por cationes tiene un grupo o grupos funcionales, tales como un grupo epoxi, un grupo éter de vinilo, o similares, ejemplos de los cuales incluyen oligómeros basados en epoxi y oligómeros basados en éter de vinilo.

En particular, entre los oligómeros fotopolimerizables, se utilizan preferentemente los oligómeros basados en acrilato, oligómeros basados en poliéster insaturados, oligómeros basados polieno-tiol, oligómeros basados en cinamato, oligómeros basados en epoxi, y oligómeros basados en éter de vinilo.

En particular, entre las resinas fotocurables, se utilizan de manera adecuada resinas que contienen un grupo o grupos iónicos y/o no iónicos hidrófilos, tales como un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo fosfato, un grupo sulfonato o un enlace éter, suficientes para la dispersión homogénea en un medio acuoso. Estas resinas fotocurables se dan a conocer, por ejemplo, en la publicación de Patente japonesa No. S55-40, la publicación de Patente japonesa No. S55-20676, y la publicación de Patente japonesa No. S62-19837. Específicamente, se utilizan de manera adecuada compuestos de resina hidrófilos que tienen, como mínimo, dos enlaces etilénicamente insaturados dentro de una molécula, poliésteres insaturados de índice de acidez elevado, epóxidos insaturados de índice de acidez elevado, resinas acrílicas insaturadas aniónicas, poliamida insaturada, y similares. Entre estos ejemplos, se utilizan preferentemente compuestos de resina hidrófilos que tienen, como mínimo, dos enlaces etilénicamente insaturados dentro de una molécula.

Entre los compuestos de resina hidrófilos que tienen, como mínimo, dos enlaces etilénicamente insaturados dentro de una molécula se incluyen resinas que tienen un grupo etilénicamente insaturado fotopolimerizable en cada extremo terminal de un polialquilenglicol. Por ejemplo, (1) di(met)acrilatos de polietilenglicol que se obtienen tratando polietilenglicol que tiene un peso molecular de 400 a 6000 con 2 moles de ácido (met)acrílico para esterificar los grupos hidroxilo en ambos extremos terminales del polietilenglicol; (2) di(met)acrilatos de polipropilenglicol que se obtienen tratando polipropilenglicol que tiene un peso molecular de 200 a 4000 con 2 moles de ácido (met)acrílico para esterificar los grupos hidroxilo en ambos extremos terminales del polipropilenglicol; (3) derivados de uretano que tienen grupos insaturados y polietilenglicol que se obtienen mediante el tratamiento de 1 mol de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 400 a 6000 con 2 moles de un compuesto diisocianato (tal como toliilen diisocianato, xililen diisocianato e isoforona diisocianato), de modo que los grupos hidroxilo se convierten en grupos uretano en ambos extremos terminales del polietilenglicol, y añadiendo posteriormente a los mismos 2 moles de un compuesto monohidroxilo insaturado (tal como (met)acrilato de 2-hidroxietilo, (met)acrilato de 2-hidroxipropilo, (met)acrilato de 3-hidroxipropilo, (met)acrilato de 4-hidroxibutilo, di(met)acrilato de trimetilolpropano, y tri(met)acrilato de pentaeritritol); y (4) derivados de uretano que tienen grupos insaturados y polipropilenglicol que se obtienen por tratamiento de 1 mol de polipropilenglicol que tiene un peso molecular de 200 a 4000 con 2 moles de un compuesto de diisocianato, de modo que los grupos hidroxilo se convierten en grupos uretano en ambos extremos terminales del polipropilenglicol, y añadiendo posteriormente a los mismos 2 moles de un compuesto monohidroxilo insaturado.

Entre los ejemplos de poliéster insaturado con índice de acidez elevado que se han mencionado anteriormente se incluyen sales de poliésteres insaturados que tienen un valor ácido de 40 a 200, obtenidos mediante la esterificación de ácidos policarboxílicos que tienen un enlace insaturado con polialcoholes, y similares.

Entre los ejemplos del epóxido insaturado con índice de acidez elevado que se ha mencionado anteriormente se incluyen resinas epoxi insaturadas que tienen un valor de acidez de 40 a 200 y similares. Una resina de este tipo es una resina que se obtiene, por ejemplo, preparando un aducto de una resina epoxi con un compuesto carboxílico insaturado (tal como un (met)acrilato) y añadiendo un anhídrido de ácido al grupo hidroxilo restante en el aducto.

Entre los ejemplos de la resina acrílica insaturada aniónica que se ha mencionado anteriormente se incluyen resinas en las que un grupo etilénicamente insaturado fotopolimerizable se introduce en un copolímero derivado de, como mínimo, dos monómeros basados en (met)acrilato de ácido (met)acrílico y ésteres (met)acrílicos y que tienen un grupo carboxilo, un grupo fosfato y/o un grupo sulfonato y similares.

La poliamida insaturada que se ha mencionado anteriormente es, por ejemplo, la obtenida mediante la adición de aductos de un diisocianato (tales como toliilen diisocianato y xililen diisocianato) y un compuesto hidroxilo etilénicamente insaturado (tal como acrilato de 2-hidroxietilo) a una poliamida soluble en agua tal como gelatina.

Entre estas resinas fotocurables, se pueden utilizar particularmente de forma ventajosa en la presente invención resinas que tienen un grupo etilénicamente insaturado polimerizable en cada extremo terminal de un polialquilenglicol, y los ejemplos típicos están disponibles comercialmente de Kansai Paint Co., Ltd., con los nombres comerciales de ENT-1000, ENT-2000, ENT-3400, ENT-4000, ENTG-2000, ENTG-3800 y similares.

La resina fotocurable está contenida en la composición de cubierta con un contenido de sólidos de, preferentemente, 10 a 99% en peso, más preferentemente, de 20 a 90% en peso y, aún más preferentemente, de 40 a 90% en peso.

5 (2-3) Otros componentes

Entre los ejemplos de otros componentes que pueden estar contenidos en la composición de cubierta se incluyen coadyuvantes de gelificación, compuestos solubles en agua que tienen un enlace insaturado, iniciadores de polimerización, fotosensibilizadores, agentes colorantes, y agentes formadores de poros. En la utilización de un agente gelificante, es preferente utilizar un coadyuvante de gelificación. En la utilización de una resina fotocurable, es preferente utilizar un iniciador de polimerización, especialmente un iniciador de fotopolimerización.

Un coadyuvante de gelificación se utiliza para mejorar la resistencia de una cubierta que contiene un agente gelificante. El coadyuvante de gelificación puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de agente gelificante. Entre los ejemplos de coadyuvantes de gelificación se incluyen polialcoholes solubles en agua tales como sorbitol, manitol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, manosa, ramnosa, maltosa, rafinosa, sacarosa, eritritol, maltitol, trehalosa, lactosa, xilosa, y similares; sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, y sales de amonio. Los coadyuvantes de gelificación se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más. En particular, cuando están contenidos alginato, goma gelana, pectina, carragenato o como un agente gelificante, es preferente utilizar de forma simultánea una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, una sal de amonio o similar, como un coadyuvante de gelificación. El coadyuvante de gelificación está contenido en la composición de cubierta en un contenido de sólidos de, preferentemente, 0,1 a 30% en peso y, preferentemente, de 0,5 a 20% en peso.

Un compuesto soluble en agua que tiene un enlace insaturado se utiliza para mejorar la resistencia de una cubierta que contiene una resina fotocurable. Para evitar la polimerización independiente de las especies activas generadas a partir de un iniciador fotopolimerizable, se utilizan con especial preferencia sustancias solubles en un disolvente acuoso a 80°C o inferior. Entre los ejemplos específicos se incluyen ácido itacónico, N,N'-metilbisacrilato, metacrilato de hidroxietilo, metacrilato de hidroxipropilo, N,N'-metilbisacrilamida, N-isopropilacrilamida, N-vinilpirrolidona, acrilato de morfina, N,N'-dimetilacrilamida, N-vinilformamida, (met)acrilatos, y similares. Los compuestos solubles en agua que tienen un enlace insaturado se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más. El compuesto soluble en agua que tiene un enlace insaturado está contenido en la composición de cubierta en un contenido de sólidos de 0,01 a 30% en peso y, preferentemente de 0,1 a 25% en peso.

Un iniciador de la polimerización no está particularmente limitado, y se utiliza preferentemente un iniciador de fotopolimerización. El iniciador de fotopolimerización es un compuesto que genera una especie de polimerización inicial y acelera la polimerización o la reticulación con fotoirradiación. Entre los ejemplos típicos de los mismos se incluyen benzoína, acetoína, benzoína metil éter, benzoína etil éter, benzoína isopropil éter, benzofenona, bencilo, cetona de Michler, xantonas, clorotioxantona, isopropiltioxantona, dimetil bencil acetal, naftol, antraquinona, hidroxiantraceno, acetofenona dietil acetal, α -hidroxiciclohexil fenilcetona, 2-hidroxi-2-metilfenilpropano, sales de yodonio aromáticos, sales de sulfonio aromáticos, sales de yodonio, sales de sulfonio, sales de triarilsulfonio, sales de trifluorocarbonosulfonio, y similares. Los iniciadores de polimerización se pueden utilizar solos o en una combinación de dos o más. El iniciador de polimerización está contenido en la composición de cubierta en un contenido de sólidos de 0,001 a 20% en peso y, preferentemente, de 0,1 a 10% en peso.

Un fotosensibilizador está contenido, con una resina fotocurable como sustancia permeable al agua. Entre los ejemplos de fotosensibilizadores se incluyen complejos de rutenio, compuestos basados en porfirina, y similares. Un fotosensibilizador de este tipo da suficiente sensibilidad a la luz de la región visible.

El agente colorante no está particularmente limitado, y se utilizan adecuadamente agentes colorantes naturales, agentes colorantes artificiales y similares según sea necesario.

Entre los ejemplos de agentes formadores de poros se incluyen almidón, almidón modificado (tal como almidón alquilado y almidón eterificado), y macromoléculas, tales como dextrina, celulosa y proteínas, que tienen un peso molecular promedio de 1000 o mayor. Un agente formador de poros se utiliza para mejorar aún más la permeabilidad de la cubierta para una cápsula sin uniones resultante. Por ejemplo, la cápsula está formada con un agente formador de poros, y a continuación el agente formador de poros se elimina de la cubierta de la cápsula mediante tratamiento enzimático, o tratamiento con ácido o con álcali, o similares (por ejemplo, para la escisión, la degradación, disolución de macromolécula), de modo que los poros se pueden formar o el diámetro de los poros se puede ampliar en la cubierta de la cápsula, lo que da como resultado cápsulas con una permeabilidad de la cubierta muy elevada.

(3) Preparación de la cápsula de dos capas sin uniones

La cápsula de dos capas sin uniones (figura 1(a)) se prepara mediante, por ejemplo, un procedimiento de goteo en el líquido utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica, o un

procedimiento similar. En concreto, se utiliza el dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica que tiene, desde la parte más interior, una primera tobera y una segunda tobera y el procedimiento incluye una etapa de extrusión de forma simultánea de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa desde la primera tobera y una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua desde la segunda tobera en un fluido. Para este fluido, se puede utilizar una sustancia líquida oleosa (aceite líquido) tal como una sustancia oleosa como la que se ha descrito anteriormente que sea líquida de 0 a 40°C. Este fluido se utiliza preferentemente con enfriamiento.

La cápsula de dos capas sin uniones se produce mediante, por ejemplo, un procedimiento de goteo en el líquido utilizando un dispositivo para la producción, tal como el que se muestra en la figura 2. En el dispositivo, una tobera doble concéntrica -1- está dispuesta en un fluido portador -2- que fluye hacia abajo a velocidad constante, con la salida de la tobera orientada hacia abajo. Cuando el contenido -32- a encapsular (una composición en suspensión que contiene un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa) y una composición -31- de la capa exterior (composición de cubierta) se extruyen simultáneamente (se inyectan) a una velocidad constante en un fluido desde la tobera más interior (tobera interior -11-) y la tobera exterior (tobera exterior -12-) de la tobera doble concéntrica -1-, respectivamente, la tensión superficial que actúa entre el fluido portador -2- y la composición de la capa exterior -31- forma un chorro que tiene una estructura de dos capas, que luego se convierte en gotitas esféricas. Se pueden aplicar vibraciones a la corriente de chorro para mejorar la uniformidad en el tamaño de las cápsulas sin uniones resultantes.

A continuación, las gotitas se enfrían en el fluido portador -2-, o las gotitas se fotoirradian en el fluido portador -2- o después de aislarse del fluido portador -2- para formar una cubierta en la superficie de las gotitas. Cuando la composición de cubierta contiene un agente gelificante, la cubierta se forma por una transición sol-gel con enfriamiento. Cuando la composición contiene una cubierta de resina fotocurable, la cubierta se forma por fotoirradiación. En la utilización de alginato, goma gelana, pectina, carragenato o similares un agente gelificante, la recogida de las gotitas puede llevarse a cabo en una solución de un ion de metal divalente o de valencia superior. De este modo, se obtiene una cápsula de dos capas sin uniones -3-.

Cuando la composición de cubierta contiene un agente gelificante, la temperatura de solidificación está configurada para situarse en el intervalo de -10 a 30°C y, preferentemente, de 0 a 20°C.

Cuando la composición de cubierta contiene una resina fotocurable, la longitud de onda de la luz de activación necesaria para el curado de la resina fotocurable está comprendida generalmente en el intervalo de, aproximadamente, 200 nm hasta, aproximadamente, 600 nm, y es ventajoso realizar la irradiación utilizando una fuente de luz que emite luz que tiene una longitud de onda de este tipo. Entre las fuentes de luz de este tipo se incluyen lámparas de mercurio, lámparas fluorescentes, lámparas de xenón, lámparas de arco de carbono, lámparas de halógenos metálicos, y similares. Es preferente que la composición de cubierta anterior contenga además un fotosensibilizador para dar suficiente sensibilidad a la región de luz visible. Dependiendo del tipo de resina fotocurable, se puede utilizar también para el curado rayos activos que tienen una longitud de onda corta en la región del ultravioleta. Aunque el tiempo para la irradiación varía dependiendo de la intensidad de la fuente de luz y la distancia desde la misma, éste está generalmente en el intervalo de 0,05 segundos a 10 minutos y, preferentemente, de 0,5 segundos a 2 minutos.

De forma habitual, el intervalo de diámetros de la cápsula de dos capas sin uniones es de 0,1 mm a 10 mm y, preferentemente, de 0,3 mm a 8 mm. Dependiendo de la aplicación, la cápsula preparada se puede utilizar aunque quede agua restante en la cápsula sin secado o se puede secar por secado a presión atmosférica o por secado al vacío antes de su utilización.

La cápsula de dos capas sin uniones no tiene fisuras y son uniformes en tamaño y grosor de la cubierta. Se puede utilizar una variedad de aditivos, tales como un agente colorante, en la composición de la cubierta de la cápsula de dos capas sin uniones para preparar una cápsula que tiene las características deseadas como con las cápsulas convencionales.

Cápsula sin uniones de la presente invención

La cápsula sin uniones de la presente invención se obtiene por inmersión de la cápsula de dos capas sin uniones tal como la que se ha descrito anteriormente en un fluido acuoso. Por ejemplo, se utiliza para el fluido acuoso agua o una solución acuosa que contiene un componente acuoso, tal como un medio líquido tal como se ha mencionado anteriormente. La cantidad de líquido acuoso no está particularmente limitada siempre y cuando permita que la cápsula sin uniones se sumerja. Además, las condiciones para la inmersión tampoco están particularmente limitadas. Para evitar la inactivación del biocatalizador contenido en la cápsula sin uniones, se lleva a cabo la inmersión, por ejemplo, de 4 a 60°C durante 1 hora hasta 60 días. La inmersión se lleva a cabo preferentemente con agitación de modo que el fluido acuoso se pueda encapsular de manera eficiente.

En cuanto a un ejemplo de producción de la cápsula sin uniones de la presente invención, la figura 3 muestra el cambio de estado de la cápsula de dos capas sin uniones durante la inmersión de la cápsula en un fluido acuoso.

Cuando la cápsula de dos capas sin uniones seca tal como la que se muestra en la figura 3 (a) se sumerge en, por ejemplo, agua a temperaturas ordinarias (aproximadamente 20°C) durante aproximadamente 20 minutos, se forma una cápsula esférica deprimida tal como la que se muestra en la figura 3(b), lo que demuestra que la capa exterior (de cubierta) se expande parcialmente de manera que el fluido acuoso se incorpora dentro de la cápsula y se forma una capa del fluido acuoso dentro de la cápsula. Posteriormente, la inmersión se continúa (por ejemplo, inmersión de 6 horas), con lo que la cubierta de la capa exterior se expande aún más para reducir gradualmente la depresión de la cápsula, lo que conduce a una cápsula esférica sin uniones tal como la que se muestra en la figura 3(c). La cápsula sin uniones se prepara utilizando, por ejemplo, la sustancia oleosa de la capa interior que se ha coloreado previamente con un agente colorante o similar, y se forma una capa coloreada en forma de esfera, tal como se muestra en la figura 1(b) en la cápsula sin uniones esférica. Por lo tanto, es evidente que se forma una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa en la cápsula sin uniones de la presente invención.

En cuanto a la cápsula sin uniones de la presente invención, un biocatalizador y un fluido acuoso se ponen en contacto, y el biocatalizador se activa para producir una sustancia útil. Por ejemplo, una cápsula de dos capas sin uniones que tiene un biocatalizador, tal como un microorganismo encapsulado, se sumerge en un medio líquido para incorporar el medio líquido su interior, dando de este modo la cápsula sin uniones de la presente invención. En esta cápsula sin uniones, el microorganismo crece y produce un metabolito (componente útil) mediante la utilización de los componentes del medio. Este metabolito posteriormente pasa a través de la capa exterior para ser liberado desde el interior hacia el exterior de la cápsula. Por consiguiente, la cápsula sin uniones de la presente invención se puede utilizar como un biorreactor.

Además, la cápsula sin uniones de la presente invención se puede utilizar como un fármaco de liberación sostenida. Por ejemplo, se puede administrar la cápsula sin uniones que tiene islotes de Langerhans encapsulados a un paciente que ha desarrollado diabetes para hacer que el nivel de azúcar en sangre que se mantenga dentro de un intervalo normal durante un largo período de tiempo.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: Investigación de la permeabilidad de la cubierta (capa exterior) 1

Se preparó como composición de cubierta una mezcla de 60 partes en peso de ENTG-3800 40% (fabricado por Kansai Paint Co., Ltd.) en solución acuosa, 0,6 partes en peso de acetoina, y 20 partes en peso de poval al 0,5% (peso molecular promedio de aproximadamente 9000) en solución acuosa. Se preparó como una sustancia oleosa una mezcla de 100 partes en peso de aceite de soja y 20 partes en peso de parafina líquida, y se suspendieron 20 partes en peso de dextrina que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 1000 en la sustancia oleosa para preparar una composición en suspensión.

Se dispuso un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica tal como el que se muestra en la figura 2, con circulación de aceite vegetal con enfriamiento a 15°C como fluido portador. La composición de cubierta (composición de la capa exterior) y la composición en suspensión se inyectaron desde la tobera exterior y desde la tobera interior, respectivamente, de este dispositivo en el fluido portador, de manera que se formó el chorro combinado de dos capas a una velocidad específica (540 mm/segundo), dando de este modo gotitas (cápsulas sin uniones).

Las gotitas (cápsulas sin uniones) en el fluido portador se irradiaron con rayos ultravioleta utilizando una lámpara de mercurio de alta presión (longitud de onda de 320 a 400 nm) para polimerizar la resina fotocurable (ENTG-3800). El diámetro de las cápsulas sin uniones resultantes fue de 4 mm.

Se recogieron veinte de las cápsulas sin uniones obtenidas de este modo en un vaso de 50 ml. A continuación, se añadieron 30 ml de agua destilada al vaso de precipitados para sumergir las cápsulas sin uniones en la misma y se agitó a 20°C durante 20 horas, y se midió la concentración de dextrina en agua con el tiempo utilizando el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico. La tabla 1 muestra los resultados. No hubo cápsulas sin uniones rotas cuando la agitación se dio por terminada.

Tabla 1

Tiempo (h)	Concentración de dextrina (en términos de glucosa) (mM)
0	0
5	1,9
10	7,5
20	10,9

Tal como se observa en los resultados presentados en la tabla 1, la concentración de dextrina en agua aumentó con

el tiempo, lo que demuestra que la dextrina, que tenía un peso molecular promedio de aproximadamente 1000, en la cápsula sin uniones se disolvió en agua que había penetrado a través de la cubierta (capa exterior) desde el exterior de las cápsulas y había entrado en las cápsulas, y posteriormente se liberó desde el interior de las cápsulas a través de la cubierta hacia el exterior.

5

Ejemplo de referencia 2: Investigación de la permeabilidad de la cubierta (capa exterior) 2

Se obtuvieron cápsulas sin uniones con un diámetro de 4 mm de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto en que se utilizó povidona (que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 1.300.000) en lugar de poval para preparar una composición de cubierta y se utilizó pululano que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 120.000, en lugar de dextrina que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 1000 para preparar una composición en suspensión. Además, la concentración de pululano se midió con el tiempo de la misma manera que en el ejemplo 1. La tabla 2 muestra los resultados. No hubo cápsulas sin uniones rotas cuando la agitación se dio por terminada

10

15

Tabla 2

Tiempo (h)	Concentración de pululano (en términos de glucosa) (mM)
0	0
5	1,1
10	3,9
20	6,7

Tal como se observa en los resultados presentados en la tabla 2, la concentración de pululano en agua aumentó con el tiempo, lo que demuestra que el pululano, que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 120.000, en las cápsulas sin uniones se disolvió en el agua que había penetrado a través de la cubierta (capa exterior) desde el exterior de las cápsulas y había entrado en las cápsulas, y posteriormente se liberó desde el interior de las cápsulas a través de la cubierta hacia el exterior. Incluso una macromolécula de este tipo puede pasar a la capa exterior.

20

Ejemplo de referencia 3: Investigación de la permeabilidad de la cubierta (capa exterior) 3

Se preparó como una composición de cubierta una mezcla de 80 partes en peso de ENT-3400 40% (fabricado por Kansai Paint Co., Ltd.) en solución acuosa y 0,6 partes en peso de benzoina isobutil éter. Se preparó como una sustancia oleosa una mezcla de 100 partes en peso de aceite de soja y 20 partes en peso de parafina líquida, y se suspendieron 20 partes en peso de dextrina que tenía un peso molecular promedio de, aproximadamente, 1000 en la sustancia oleosa para preparar una composición en suspensión.

30

La composición de la cubierta y la composición en suspensión se inyectaron utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1, dando de este modo las gotitas (cápsulas sin uniones).

35

Las gotitas (cápsulas sin uniones) se irradiaron con rayos ultravioleta utilizando una lámpara de mercurio de alta presión (longitud de onda de 320 a 400 nm) para polimerizar la resina fotocurable (ENT-3400). El diámetro de las cápsulas sin uniones resultantes fue de 4 mm. Las cápsulas sin uniones se secaron a continuación para dar cápsulas sin uniones secas que tienen un diámetro de 3,5 mm.

40

Veinte de las cápsulas sin uniones secas obtenidas de este modo se recogieron en un vaso de 100 ml. A continuación, se añadieron 50 ml de agua destilada al vaso de precipitados para sumergir las cápsulas sin uniones en la misma y las cápsulas se dejaron reposar a 20°C durante 6 horas. Se retiraron diez de las cápsulas sin uniones sumergidas, se midieron el espesor de la cubierta y el diámetro de las cápsulas, y se determinaron sus promedios. Además, se calculó el volumen de la cubierta sobre la base de los valores de medición del espesor de la cubierta y el diámetro de las cápsulas. La tabla 3 muestra los resultados.

45

Tabla 3

	Espesor de la cubierta (µm)	Tamaño de la cápsula (mm)	Volumen de la cubierta (mm ³)
Antes de la inmersión en agua	144	3,5	5,1
Después de la inmersión en agua	152	5,0	7,0

50

Tal como se observa en los resultados presentados en la tabla 3, las cápsulas sin uniones después de la inmersión

en agua tenían un diámetro mucho mayor, mientras que no diferían en gran medida en el espesor o el volumen de la cubierta, en comparación con las cápsulas sin uniones antes de la inmersión en agua, lo que demuestra que mediante la inmersión de la cápsula sin uniones en agua, la cubierta en sí misma apenas se había hinchado con el agua y el agua se había transferido al interior de las cápsulas sin uniones.

5

Ejemplo 1

Bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 7638) se sometieron a cultivo estacionario en medio de cultivo de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (fabricado por Oxoid Limited) con mármol a 37°C durante 15 horas. El recuento de células viables en la suspensión de cultivo resultante fue de $1,5 \times 10^{10}$ ufc/ml. Las "ufc" es una abreviatura de unidades formadoras de colonias y denota un recuento de células viables. La suspensión de cultivo se centrifugó en condiciones de $10000 \times g$ a 4°C durante 20 minutos, y el precipitado resultante se liofilizó para preparar un polvo de bacterias ácido lácticas.

10

Veinte partes en peso de PEG1000 (polietilenglicol que tenía un peso molecular medio de, aproximadamente, 1000) se añadieron a 180 partes en peso de un agar al 2% en solución acuosa mantenido a 80°C para preparar una composición de cubierta. El polvo de bacterias ácido lácticas se suspendió en una mezcla de 85 partes en peso de un triglicérido de cadena larga y 15 partes en peso de un éster de sacarosa de ácido graso para preparar una composición en suspensión.

15

Se preparó un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica tal como el que se muestra en la figura 2 con circulación de aceite vegetal con enfriamiento a 9°C como fluido portador. La composición de cubierta (composición de la capa exterior) y la composición en suspensión se inyectaron desde la tobera exterior y la tobera interior, respectivamente, de este dispositivo, en el fluido portador, de modo que se formó el chorro combinado de dos capas a una velocidad específica (555 mm/segundo), dando con ello cápsulas de dos capas sin uniones con un diámetro de 4 mm.

20

Veinte partes en peso de las cápsulas de dos capas sin uniones, después de aislarse del fluido portador (aceite vegetal) y lavarse con solución salina fisiológica estéril, se sometieron a cultivo con agitación en condiciones de 100 cpm a 37°C utilizando 100 partes en peso de medio líquido MRS (pH 6,5, concentración de glucosa de 0,3 M), para dar de este modo cápsulas sin uniones que tienen una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa. Se midieron con el tiempo la concentración de ácido láctico y la concentración de glucosa en el medio de MRS líquido. La concentración de ácido láctico se midió utilizando kit de ensayo de lactato (fabricado por Funakoshi Corporation) y la concentración de glucosa se midió utilizando el procedimiento de Somogyi-Nelson. La tabla 4 muestra los resultados. El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas en total.

25

30

35

Tabla 4

Tiempo (h)	Concentración de glucosa (M)	Concentración de ácido láctico (M)
0	0,30	0
12	0,15	0,13
24	0,09	0,20
36	0,01	0,28
48	0	0,29

Tal como se observa en los resultados presentados en la tabla 4, durante el proceso del cultivo, la concentración de glucosa se redujo y la concentración de ácido láctico aumentó en el medio MRS líquido.

40

Después del cultivo, se recogieron 10 de las cápsulas sin uniones cultivadas y se lavaron con agua para eliminar el medio. Cada cápsula sin uniones se aplastó y se determinó el recuento de células viables en el contenido de las cápsulas sin uniones utilizando un medio de agar MRS (fabricado por Oxoid Limited) que fue de $2,3 \times 10^{10}$ ufc/cápsula, que fue mayor que antes del cultivo ($8,1 \times 10^8$ ufc/cápsula). Por otra parte, el diámetro de las cápsulas sin uniones resultantes aumentó de 4 mm a 4,5 mm.

45

Mientras tanto, se determinó el recuento de células viables y el pH en el medio MRS líquido utilizado para el cultivo en agitación. Los resultados mostraron que el recuento de células viables estaba por debajo del límite de detección y el pH fue de 4,0, que era inferior al pH de 6,5 antes del cultivo. Podría entenderse a partir del resultado del recuento de células viables que las bacterias ácido lácticas no escaparon de las cápsulas sin uniones. Además, dado el resultado de pH y el aumento en el tiempo de la concentración de ácido láctico, tal como se presenta en la tabla 4, parece que el ácido láctico producido por las bacterias ácido lácticas se liberó a través de la cubierta de las cápsulas sin uniones hacia el exterior de las cápsulas.

50

55

Se ha demostrado a partir de los resultados proporcionados anteriormente que la cápsula sin uniones de la presente invención es útil como un biorreactor.

Ejemplo 2

Se preparó una mezcla de 60 partes en peso de ENT-3400 al 40% (fabricado por Kansai Paint Co., Ltd.) en solución acuosa, 0,6 partes en peso de benzoína isobutil éter y 20 partes en peso de acrilil morfolina al 1% (fabricado por Kohjin Co., Ltd.) en solución acuosa como una composición de cubierta. Se preparó una mezcla de 100 partes en peso de aceite de soja y 20 partes en peso de parafina líquida como una sustancia oleosa, y se suspendieron 20 partes en peso de levadura de panadero comprimida (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.) en la sustancia oleosa para preparar una composición en suspensión. La composición de cubierta y la composición en suspensión se inyectaron utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1, dando así gotitas (cápsulas de dos capas sin uniones).

Las gotitas (cápsulas de dos capas sin uniones) se irradiaron con rayos ultravioleta utilizando una lámpara de mercurio de alta presión (longitud de onda de 320 a 400 nm) para polimerizar la resina fotocurable (ENT-3400). El diámetro de las cápsulas sin uniones resultantes fue de 4 mm.

Veinte partes en peso de las cápsulas de dos capas sin uniones, después de aislarse del fluido portador (aceite vegetal) y lavarse con solución salina fisiológica estéril, se sometieron a cultivo con agitación en condiciones de 100 cpm a 37°C durante 48 horas utilizando 100 partes en peso de medio YM líquido (preparado disolviendo 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 2 g de extracto de malta, y 2 g de peptona de soja en 1 l de agua destilada, ajustado el pH a 6,2), dando de este modo cápsulas sin uniones que tienen una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa. Se observó que se generaba dióxido de carbono en la superficie de la cubierta durante el cultivo.

Después del cultivo, se recogieron 10 de las cápsulas sin uniones y se lavaron con agua para eliminar el medio. Cada cápsula sin uniones se aplastó y se determinó el recuento de células viables en el contenido de las cápsulas sin uniones utilizando un medio de agar YM (preparado mediante la suspensión de 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 2 g de extracto de malta, 2 g de peptona de soja, y 20 g de agar en 1 l de agua destilada, se ajustó el pH a 6,2, se calentó a 121°C durante 15 minutos y se enfrió para solidificar). El resultado fue $9,3 \times 10^8$ ufc/cápsula, que fue mayor que antes del cultivo ($8,1 \times 10^7$ ufc/cápsula).

Mientras tanto, se determinó el recuento de células viables en el medio YM líquido utilizado para el cultivo con agitación. El resultado mostró que el recuento de células viables estaba por debajo del límite de detección.

Por otra parte, después de que las cápsulas sin uniones cultivadas en el medio YM líquido se lavaran con agua para eliminar el medio, 50 partes en peso de las cápsulas sin uniones se sometieron a cultivo con agitación en condiciones de 20 cpm a 30°C utilizando el medio de glucosa líquida (preparado disolviendo 54 g de glucosa en tampón de fosfato 0,1 mol/l (pH 6,0)). Se midieron con el tiempo la concentración de etanol y la concentración de glucosa en el medio de glucosa líquida. La concentración de etanol se midió por cromatografía de gases realizada en las condiciones especificadas a continuación. La concentración de glucosa se midió utilizando el procedimiento de Somogyi-Nelson. La tabla 5 muestra los resultados. El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas en total.

Condiciones de cromatografía de gases

Patrón interno: Acetona
 45 Columna: Columna de vidrio con un diámetro interior de 3 mm y longitud de 2 m
 Fase estacionaria: Polietilenglicol 1000 (10%, pasado a través de malla 60-80)
 Temperatura de inyección: 200°C
 Temperatura de la columna: 100°C
 50 Detector: detector de ionización de llama de hidrógeno
 Temperatura del detector: 150°C
 Gas portador: nitrógeno
 Caudal: 30 a 40 ml/min

Tabla 5

Tiempo (h)	Concentración de glucosa (M)	Concentración de etanol (M)
0	0,30	0
12	0,24	0,03
24	0,15	0,07
36	0,10	0,11
48	0,04	0,13

55 Tal como se observa en los resultados presentados en la Tabla 5, durante el proceso del cultivo, la concentración de glucosa se redujo y la concentración de etanol se incrementó en el medio de glucosa líquido. Podría entenderse que

la glucosa se había consumido y el etanol se produjo por la levadura.

Ejemplo 3

5 Se prepara una mezcla de 60 partes en peso de un diacrilato de nona(etilenglicol) al 40% en solución acuosa, 0,6 partes en peso de benzoína isobutil éter, y 20 partes en peso de un acrilato cálcico 30% en solución acuosa como una composición de cubierta. De forma separada, se cultivaron células de islotes de Langerhans de ratón al 80% de confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (fabricado por Difco), se trataron con tripsina, y se centrifugaron en condiciones de 5000 x g a 4°C. Se preparó una mezcla de 60 partes en peso de aceite de soja y 60 partes en peso de parafina líquida como una sustancia oleosa, y las células de islotes de Langerhans resultantes se suspendieron en la sustancia oleosa a 5×10^3 células/ml para preparar una composición en suspensión. La composición de la cubierta y la composición en suspensión se inyectaron utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1, dando de este modo gotitas (cápsulas de dos capas sin uniones).

15 Las gotitas (cápsulas de dos capas sin uniones) se irradiaron con rayos ultravioleta utilizando una lámpara de mercurio de alta presión (longitud de onda de 320 a 400 nm) para polimerizar la resina fotocurable (diacrilato de nona etilenglicol)). El diámetro de las cápsulas sin uniones resultante fue de 4 mm.

20 Se administró de forma intraperitoneal estreptozotocina a un ratón DDY que tenía un peso corporal de 20 g (macho, 6 semanas de edad) a una dosis de 200 mg/kg. A continuación, se midió el nivel de glucosa en la sangre del ratón en 422 mg/dl, y se confirmó que el ratón había desarrollado diabetes (nivel de glucosa en sangre de 300 mg/dl o mayor).

25 A continuación, tres días después de haber medido el nivel de glucosa en sangre, se implantó de forma intraperitoneal la cápsula sin uniones que tienen islotes de Langerhans encapsulados tal como la que se ha descrito anteriormente en el ratón diabético. El nivel de glucosa en sangre se midió a tiempos dados. La tabla 6 muestra los resultados.

30 Tabla 6

Días después de la implantación de la cápsula sin uniones (Día)	Nivel de glucosa en sangre (mg/dL)
0	460
3	150
6	88
12	102
18	132
27	145
36	200

Los resultados presentados en la Tabla 6 muestran que después de la implantación de la cápsula sin uniones en el ratón diabético, se observaron que los niveles de glucosa en sangre estuvieron a niveles normales durante un largo período de tiempo, exhibiendo efectos terapéuticos sobre la diabetes. La cápsula sin uniones implantada se eliminó, y la cápsula eliminada tenía una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa. Téngase en cuenta que no se observó rechazo a la cápsula sin uniones durante el período de ensayo.

Ejemplo comparativo 1

40 Se preparó una mezcla de 60 partes en peso de ENTG-3800 al 40% (fabricado por Kansai Paint Co., Ltd.) en solución acuosa, 0,6 partes en peso de benzoína isobutil éter, 20 partes en peso de acrilato morfolina al 1% (fabricado por Kohjin Co., Ltd.) en solución acuosa, y 20 partes en peso de polvo de bacterias ácido lácticas liofilizadas, obtenido en el ejemplo 1, como una composición de cubierta.

45 Se dispuso un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica tal como el que se muestra en la figura 2 con circulación de aceite vegetal con enfriamiento a 9°C como fluido portador. La composición de cubierta (composición de la capa exterior) se inyectó desde la tobera interior del dispositivo en el fluido portador de tal manera que se formó el chorro a una velocidad específica (555 mm/segundo), dando de este modo micropartículas que tienen un diámetro de 4 mm.

50 Las micropartículas se aislaron a partir del fluido portador (aceite vegetal) y se lavaron con solución salina fisiológica estéril. Diez de las micropartículas resultantes se aplastaron, y se determinó el recuento de células viables utilizando medio de agar MRS, que fue $3,5 \times 10^9$ ufc/micropartícula. Veinte partes en peso de micropartículas se colocaron en 100 partes en peso de medio MRS líquido (pH 6,5, concentración de glucosa de 0,3 M) y se sometieron a cultivo con 55 agitación en condiciones de 100 rpm a 37°C durante 48 horas.

Después del cultivo, se recogieron 10 de las micropartículas cultivadas y se lavaron con agua para eliminar el medio. Cada micropartícula se aplastó y se determinó el recuento de células viables en las micropartículas utilizando medio de agar MRS. Como resultado, el recuento de células viables fue $9,1 \times 10^9$ ufc/micropartícula y fue mayor que antes de cultivo ($3,5 \times 10^9$ ufc/micropartícula). Además, se determinó el recuento de células viables en el medio que fue $5,5 \times 10^7$ ufc/ml. Estos resultados muestran que las bacterias ácido lácticas se escaparon fuera de las micropartículas.

Tal como puede entenderse claramente a partir de los resultados de los ejemplos y el ejemplo comparativo anterior, la cápsula sin uniones de la presente invención es útil como biorreactor.

Aplicabilidad Industrial

Según la presente invención, una cápsula sin uniones que tiene una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa se obtiene sumergiendo en un fluido acuoso una cápsula de dos capas sin uniones compuesta de una capa interior de una composición en suspensión que contiene un biocatalizador, tal como una enzima y una célula viva, en suspensión en una sustancia oleosa y una capa exterior de una composición de cubierta que contiene una sustancia permeable al agua. En la cápsula de dos capas sin uniones, el biocatalizador se suspende en la sustancia oleosa en la capa interior, y es estable durante un largo periodo de tiempo. Además, la capa exterior que permite que un fluido acuoso penetre, sólo permite que un líquido acuoso se transfiera entre el interior y el exterior de la cápsula sin permitir que el biocatalizador salga hacia el exterior. Por lo tanto, cuando la cápsula de dos capas sin uniones se sumerge en un fluido acuoso, el fluido acuoso se incorpora en el interior (capa interior) de la cápsula y se forma una capa de fluido acuoso, dando de este modo una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa. A continuación, el biocatalizador en la cápsula se activa por el fluido acuoso incorporado para producir una sustancia útil. Por ejemplo, mediante la inmersión en un medio líquido de una cápsula sin uniones que tiene un microorganismo (biocatalizador) encapsulado, el medio líquido puede ser incorporado en la cápsula, mientras que el microorganismo está inmovilizado en la cápsula y un metabolito (sustancia útil) producido por el microorganismo se puede liberar desde el interior hacia el exterior de la cápsula. Por lo tanto, la cápsula sin uniones de la presente invención es útil como un biorreactor.

Descripción de los numerales

- 1- Tobera doble concéntrica
- 2- Fluido portador
- 3- Cápsulas sin uniones
- 11- Tobera interior
- 12- Tobera exterior
- 31- Composición de la capa exterior
- 32- Contenido

REIVINDICACIONES

1. Cápsula sin uniones que se puede almacenar de forma estable durante un largo periodo de tiempo en forma de cápsula de dos capas sin uniones, que comprende
- 5 - una capa interior que comprende una composición en suspensión, y
 - una capa exterior que comprende una composición de cubierta que tiene permeabilidad al agua,
- 10 en la que la composición en suspensión de la capa interior comprende un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa, y la composición de cubierta de la capa exterior comprende una sustancia permeable al agua,
- 15 en la que la cápsula de dos capas sin uniones forma una pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa, cuando se sumerge en un fluido acuoso; en la que el biocatalizador es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende enzimas, microorganismos, células animales, células vegetales, y tejidos vegetales.
2. Cápsula sin uniones, según la reivindicación 1, en la que el biocatalizador es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende microorganismos, células animales, células vegetales y tejidos vegetales, y el biocatalizador se activa mediante la pseudo estructura de tres capas con capa exterior/capa oleosa/capa acuosa.
- 20 3. Cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la composición de cubierta comprende, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende carragenato, agar, glucomanano, alginato, oligómeros basados en acrilato, oligómeros basados en poliéster insaturado, oligómeros basados en epoxi, oligómeros basados en éter de vinilo, oligómeros basados en polieno-tiol y oligómeros basados en cinamato.
- 25 4. Cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la sustancia oleosa es, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende aceite de oliva, aceite de jojoba, aceite de maíz, aceite de colza, manteca de cerdo, sebo de vaca, aceite de ballena, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de arroz, aceite de germen de arroz, aceite de coco, aceite de palma, aceite de semilla de cacao, aceite de aguacate, aceite de nuez de macadamia, escualano, aceite de visón, aceite de tortuga, hidrocarburos con 8 a 30 átomos de carbono, cera de abejas, cera de carnauba, cera de arroz, lanolina, parafina líquida, vaselina, ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y sacarosa, ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y glicerol, alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, y ésteres de ácidos grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono y alcoholes grasos que tienen de 4 a 30 átomos de carbono.
- 30 5. Biorreactor que comprende la cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Procedimiento para producir una cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende sumergir en un fluido acuoso una cápsula de dos capas sin uniones que comprende
- 40 - una capa interior que comprende una composición en suspensión, y
 - una capa exterior que comprende una composición de cubierta que tiene permeabilidad al agua,
- 45 en la que la composición en suspensión de la capa interior comprende un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa y la composición de cubierta de la capa exterior comprende una sustancia permeable al agua.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la cápsula de dos capas sin uniones se obtiene utilizando un dispositivo de producción de cápsulas equipado con una tobera doble concéntrica que tiene, desde la parte más interior, una primera tobera y una segunda tobera, mediante un procedimiento que comprende extruir simultáneamente la composición en suspensión que comprende un biocatalizador en suspensión en una sustancia oleosa desde la primera tobera y la composición de cubierta que comprende una sustancia permeable al agua desde la segunda tobera en un fluido.
- 50 8. Utilización de la cápsula sin uniones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como biorreactor.
- 55

Figura 1

(a)

(b)

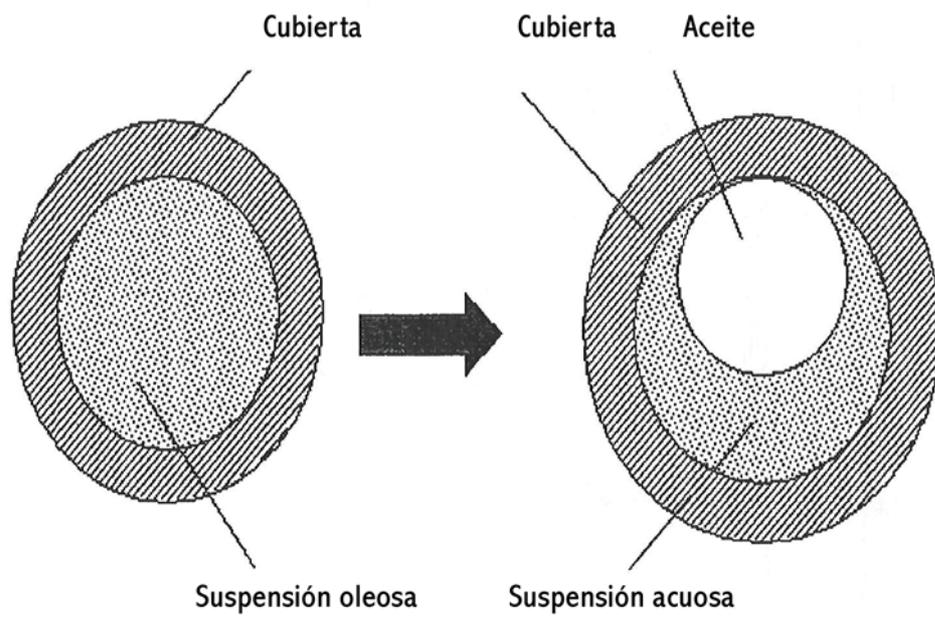


Figura 2

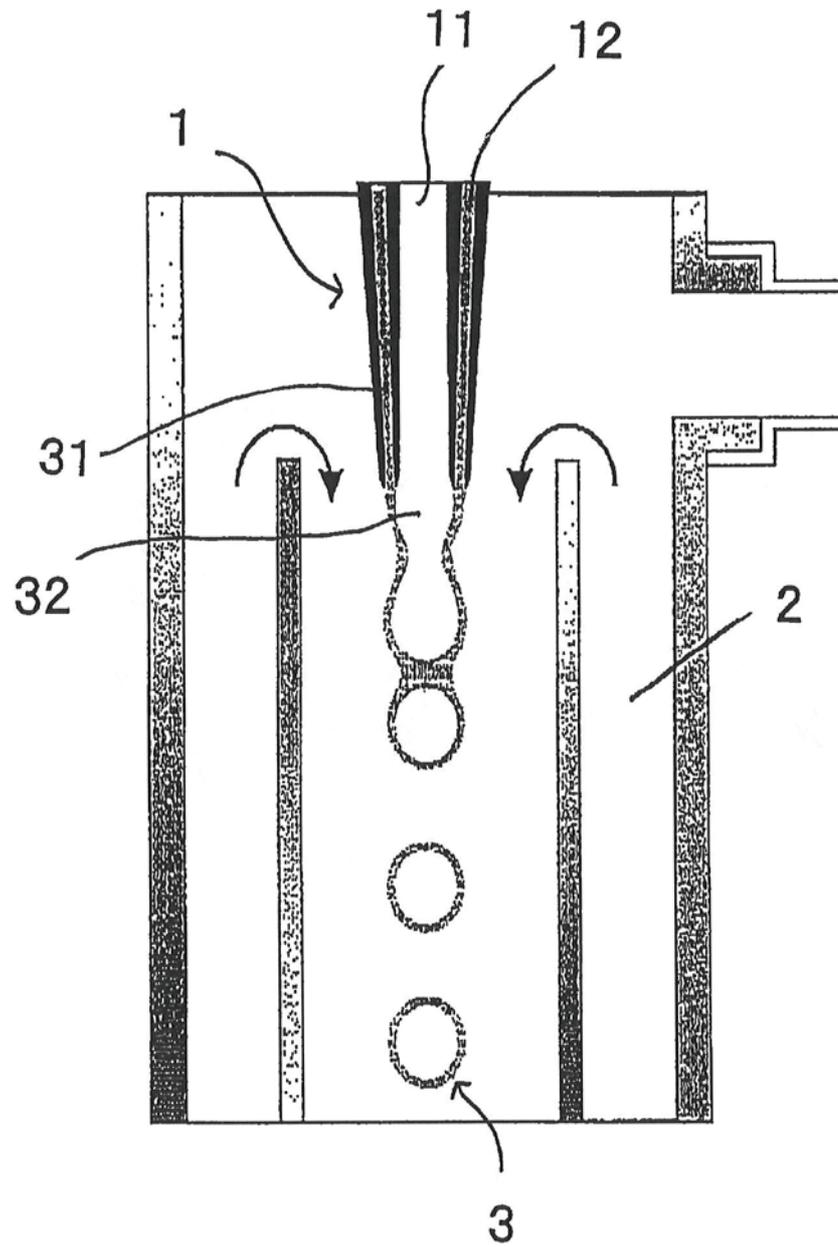


Figura 3

(a)



(b)



(c)



↔
2 mm