



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 257 968**

② Número de solicitud: 200500205

⑤ Int. Cl.:  
**B01J 13/04** (2006.01)  
**B05B 7/06** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

- ⑫ Fecha de presentación: **28.01.2005**
- ⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2006**
- Fecha de la concesión: **14.06.2007**
- ⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2007**
- ⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente: **01.07.2007**

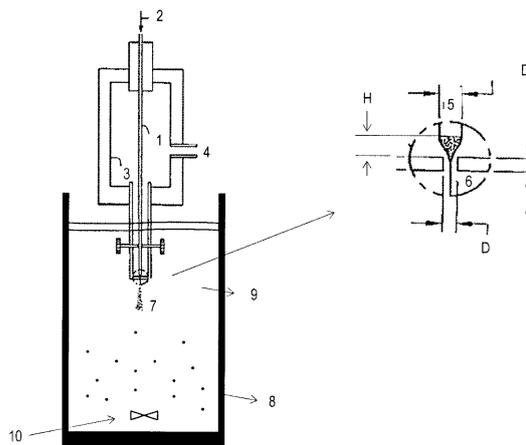
- ⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla  
Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41012 Sevilla, ES**
- ⑱ Inventor/es: **Gañán Calvo, Alfonso M.;  
Martín Banderas, Lucía;  
Flores Mosquera, María;  
Rodríguez Gil, Alfonso;  
Chávez de Diego, Sebastián y  
Cebolla Ramírez, Ángel**
- ⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento y dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro y nanométrico.**

㉑ Resumen:

Procedimiento y dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro y nanométrico.

La presente invención está relacionada con la obtención de partículas poliméricas de tamaño micro y nanométrico de una forma controlable y reproducible. Las partículas tienen forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y homogénea. Más particularmente, la presente invención describe un nuevo método de formación de emulsiones y su aplicación a técnicas de micro y nanoencapsulación mediante extracción/evaporación del disolvente. Especialmente, la presente invención se refiere a la encapsulación de compuestos fluorescentes y su posterior aplicación.



ES 2 257 968 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro y nanométrico.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención está relacionada con la obtención de partículas poliméricas de tamaño micro y nanométrico de una forma controlable y reproducible. Las partículas tienen forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y homogénea. Más particularmente, la presente invención describe un nuevo método de formación de emulsiones y su aplicación a técnicas de micro y nanoencapsulación mediante extracción/evaporación del disolvente. Especialmente, la presente invención se refiere a la encapsulación de compuestos fluorescentes y su posterior aplicación.

**Estado de la técnica**

15 Actualmente, la utilización de micropartículas se ha extendido de forma considerable en campos como el farmacéutico, biomédico, cosmético, alimentario, agrícola, veterinario, textil, químico, etc. Entre otras aplicaciones, las que demuestran más interés son la posibilidad de usar micropartículas como método de estabilización y protección de un producto de su entorno y/o como procedimiento para optimizar la distribución del compuesto encapsulado hasta el punto de aplicación/interacción.

20 Uno de los campos en los que está adquiriendo gran importancia la utilización de micropartículas como nuevo sistema de estudio de las interacciones entre biomoléculas es en genómica y proteómica. A pesar de los grandes avances que están teniendo lugar en la fabricación y utilización de microarrays de diferente naturaleza, los microarrays tradicionales presentan algunas desventajas que no se han resuelto. Algunos de los problemas más importantes son la complejidad de los protocolos de preparación de las muestras que resultan además algo lentos, y el encarecimiento que supone la tecnología que se utiliza para el análisis de los resultados. La reproducibilidad de los resultados obtenidos y su propia fiabilidad son objetivos aún no conseguidos plenamente con los arrays tradicionales.

25 En la actualidad la utilización de arrays de micropartículas fluorescentes con la superficie modificada se está imponiendo al uso de los microarrays tradicionales en 2D. En general, las micropartículas permiten realizar múltiples ensayos en paralelo, son más baratas, fáciles de almacenar incluso en grandes cantidades y poseen una gran cantidad de superficie útil por unidad de volumen para la unión de analitos. Además, las microesferas pueden prepararse de distintos tamaños y composición química, lo que les confiere una gran versatilidad para utilizarlas en ensayos biológicos con moléculas de diferente naturaleza.

30 Otra de las grandes ventajas que presenta el uso de "arrays" de micropartículas es la posibilidad de utilizar la citometría de flujo como técnica de detección de las interacciones moleculares que tengan lugar. La citometría de flujo es una técnica muy extendida que está experimentando una gran evolución en los últimos tiempos aumentando considerablemente la velocidad de detección, sensibilidad, y fiabilidad de los análisis por lo que se está imponiendo en el análisis de ensayos de muestras complejas. El desarrollo de instrumentos de análisis cada vez más sofisticados y con gran sensibilidad, unido a la mejora en las técnicas de fabricación de micropartículas cada vez más versátiles, han generado numerosas expectativas de futuro tanto dentro de la investigación básica como del diagnóstico clínico.

35 Por otro lado, la utilización de fluoróforos encapsulados presenta muchas ventajas frente al uso de moléculas orgánicas o nanocristales fluorescentes independientes. Los fluoróforos se encuentran en el interior de una matriz que los protege de los efectos de los disolventes, el pH, la fuerza iónica, photobleaching, etc, estabilizando la intensidad de la emisión. La partícula mantiene libre toda la superficie en la que se encuentran los grupos funcionales necesarios para su conjugación con proteínas, ácidos nucleicos u otro tipo de biomoléculas, que al encontrarse en el exterior no afectan a las propiedades fluorescentes del marcador. Por lo tanto, la utilización de micropartículas fluorescentes bioconjugadas permite aumentar significativamente la sensibilidad de la detección eliminando los problemas de agregación o inactivación debido al exceso de marcadores fluorescentes.

40 Existen numerosas técnicas de encapsulación que pueden variar según el material fluorescente que se pretenda encapsular. Entre ellas las más utilizadas son: ■ la absorción/difusión de fluoróforos orgánicos o nanocristales fluorescentes hacia el interior de la micropartícula a través de la matriz polimérica (p. ej. Han, M.Y.; Gao, X.; Su, J.Z.; Nie, S. "Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules" *Nat Biotechnol* **2001**, 19 631-635; US Pat N° 6680211, Biocrystal Ltd.; US Pat N° 5723218, Molecular Probes; L.B. Bangs, Uniform Latex Particles, Seragen Diagnostics Inc, **1984**; US Pat N° 6649414, Luminex Corp. en la que describen además la unión covalente de nanopartículas fluorescentes obtenidas por absorción de los fluoróforos, a micropartículas de mayor tamaño); ■ la incorporación del material fluorescente durante la formación de la micropartícula en el proceso de polimerización y/o recubrimiento, etc (p. ej. US Pat N° 5073498, Caribbean Microparticles Corp.; WO0113119, Luminex Corp.); ■ la deposición una a una de capas de polímero sobre el material fluorescente (layer-by-layer) (p. ej. Wang, D.; Rogach, A.; Carusso, F. Semiconductor quantum dot-labeled microsphere bioconjugates prepared by stepwise self-assembly. *Nano Lett* **2002**, 2 857-861).

45 La deposición de capas de polímero sobre el material fluorescente implica la generación de la partícula "in situ" y precisa de un gran control sobre cada paso del proceso para poder obtener partículas del tamaño requerido con un alto grado de homogeneidad. Se trata de un proceso laborioso que implica numerosos pasos.

En el caso en el que el material fluorescente se introduce en el interior de la partícula por difusión, la partícula ya está generada pero es necesario tener un gran control sobre la homogeneidad de la disolución de fluoróforos y los tiempos requeridos para obtener la carga deseada de cada fluoróforo. Una de las mayores desventajas de este método es la falta de homogeneidad en la distribución final de los fluoróforos en el interior de la micropartícula, de forma que la concentración final del material fluorescente en la superficie es bastante elevada y disminuye de forma gradual al acercarnos al núcleo. Además, aunque los fluoróforos se encuentran protegidos por la matriz, en el caso de las partículas preparadas por difusión, hay un alto porcentaje de fluoróforos que se encuentran en la superficie (aproximadamente un 30%) y presentan propiedades diferentes a aquellos que se encuentran embebidos en el interior de la matriz, llegándose a producir aglomerados y pérdida de fotoluminiscencia de las micropartículas finales.

Por último, la incorporación del material fluorescente durante la formación de la micropartícula es un proceso que, en general, implica el crecimiento de una partícula inicial mediante la polimerización de un monómero en presencia de un fluoróforo, por lo que no es una alternativa que mejore las anteriores.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se hace necesario la utilización y optimización de nuevos métodos de encapsulación que den lugar a la obtención de partículas codificadas de forma sencilla, permitiendo controlar de forma exhaustiva tanto la estructura y homogeneidad de la partícula, como la distribución de los materiales fluorescentes utilizados para su codificación.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de fabricación de partículas basado en la generación de emulsiones mediante un sistema de enfocamiento capilar (Flow Focusing), que combina la utilización de fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica del sistema. Tras la solidificación de las gotas se obtienen las partículas que son de tamaño nano y micrométrico, tienen forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y reproducible.

El sistema de fabricación de partículas al que se refiere la presente invención, está constituido por un dispositivo de enfocamiento capilar que se encuentra sumergido en un líquido que constituirá la fase externa de la emulsión generada. En concreto, el dispositivo de enfocamiento capilar consta (Fig 1) de una cámara que se encuentra presurizada mediante la entrada constante de un fluido. En el interior de esta cámara se inyecta un segundo fluido a través de un punto de alimentación que se encuentra enfrentado a un orificio practicado en la pared de la cámara. La corriente del fluido que presuriza la cámara rodea al segundo fluido y lo impulsa hacia el exterior de la cámara a través del orificio generando un microchorro fino de forma controlada.

El microchorro capilar que se encuentra en el seno de un flujo laminar, debido a la inestabilidad capilar se rompe en el interior del líquido en el que se encuentra sumergido el dispositivo, formando una emulsión homogénea de gotas de tamaño controlado. Una vez generada la emulsión y, tras la solidificación de las gotas, se obtienen las partículas secas con forma esférica. En este procedimiento los dos fluidos que se describen son, preferentemente, líquidos suficientemente diferentes entre si de forma que permita la generación de un microchorro estable. Generalmente el fluido interno es una disolución de uno o más componentes, un sólido licuado, una suspensión y/o una emulsión de componentes de distinta naturaleza.

En un primer procedimiento, un único fluido es inyectado a través de una única punta de alimentación en el interior de la cámara presurizada por el segundo fluido y dirigido hacia el exterior a través de un orificio alineado con el punto de alimentación existente en la pared de la cámara.

En un segundo procedimiento incluido en esta invención, el fluido que se inyecta está constituido por fluidos diferentes que se introducen a través de canales concéntricos. En el interior de la cámara, estos fluidos se ponen en contacto dando lugar a un microchorro capilar formado por diferentes capas concéntricas de fluidos. Este microchorro capilar es presurizado y dirigido hacia el exterior por el líquido que presuriza la cámara, a través del orificio que se encuentra enfrentado al punto de alimentación de los fluidos.

Es un objeto de la presente invención la utilización de múltiples puntas de alimentación de fluidos en el interior de una cámara presurizada, generando múltiples microchorros que salen al exterior a través de los orificios realizados enfrente de cada punta de alimentación. Constituye un objeto de la invención el dispositivo y los procedimientos para la generación de múltiples microchorros capilares para la obtención de emulsiones y posteriormente partículas en grandes cantidades.

Opcionalmente, se encuentra incluida en esta invención la posibilidad de aplicar a alguno o varios de los fluidos perturbaciones externas periódicas y controladas (p.e. mecánicas, acústicas, etc.), de forma que favorezcan aun más la obtención de partículas con una distribución de tamaño homogénea.

Es un objeto de esta invención proporcionar un nuevo método de obtención de partículas secas de tamaño predecible y controlado con un grado de dispersión muy bajo. Está incluido en esta invención un proceso de encapsulación de distintas sustancias en el interior de partículas. Preferentemente se encuentra incluido en esta invención un proceso de encapsulación de materiales fluorescentes de forma controlada en un único paso.

## ES 2 257 968 B1

Además está incluido en esta invención un método de obtención de partículas que posean moléculas de interés biológico expuestas hacia el exterior.

Otro objeto de esta invención es la obtención de partículas que puedan ser utilizadas como estándares de calibración (tamaño, fluorescencia, etc.), en la obtención de arrays de micropartículas, en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (encapsulación y liberación de fármacos, encapsulación de células y microorganismos, diagnóstico y análisis clínicos), etc.

Las principales características innovadoras y ventajosas de esta combinación de geometría y efecto hidrodinámico frente a cualquier otra metodología existente son:

- a) Pueden generarse partículas de tamaño mucho más pequeño que cualquier otra dimensión del dispositivo (orificio, punto de alimentación, etc.), cosa que no es posible mediante las otras técnicas de extrusión existentes que imponen el tamaño mediante el orificio de inyección.
- b) El tamaño de partícula es controlable y predecible.
- c) La distribución de tamaños de las partículas es muy estrecha sin necesidad de recurrir a otros mecanismos más complejos de excitación del chorro ni llevar a cabo un proceso de selección posterior.
- d) Es un proceso totalmente reproducible.
- e) No existe contacto entre el fluido interno y el orificio de salida, con lo cual se evitan los problemas de los grandes esfuerzos de cortadura asociados a la extrusión directa. Se evitan asimismo los problemas de obturación.
- f) La formación de las partículas tiene lugar en el seno de la fase externa de la emulsión generada evitándose los problemas de deformación de la geometría final de la partícula.
- g) Permite el uso de una gran combinación de fluidos con distintas propiedades físico- químicas (viscosidad, composición química, etc).
- h) La composición final y la estructura de las partículas es totalmente controlable desde el momento inicial del proceso.
- i) Es un sistema de obtención de partículas de forma continua que permite la realización de controles de calidad exhaustivos de cada proceso de producción.

### Descripción de las figuras

Figura 1: esquema general de los componentes básicos de un dispositivo de formación de partículas mediante la inyección de un único fluido según el procedimiento descrito.

Figura 2: esquema general de los componentes básicos de un dispositivo de formación de partículas mediante la inyección de dos fluidos de forma concéntrica.

Figura 3: gráfico en el que se representan  $d_{50}$  part/ $d_0$  frente a  $Q/Q_0$  de algunos experimentos realizados y su concordancia con la predicción de Flow Focusing.

Figura 4a: Fotografía del microscopio electrónico de partículas de poliestireno de 5 micras obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención.

Figura 4b: Fotografía del microscopio electrónico de partículas de poliestireno de 9 micras obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención.

Figura 5a-c: Fotografías del microscopio de fluorescencia de una mezcla de partículas fluorescentes de poliestireno de 51  $\mu\text{m}$  con dos concentraciones distintas y diferenciables de rodamina obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención. Fig. 5a: concentraciones de rodamina 0,006 mM y 0,6 mM, Fig. 5b: concentraciones de rodamina 0,06 mM y 0,6 mM, Fig. 5c: concentraciones de rodamina 0,006 mM y 0,06 mM.

Figura 6: Fotografía del microscopio de fluorescencia de una mezcla de partículas fluorescentes de poliestireno de 5  $\mu\text{m}$  con concentraciones de fluoresceína (1 mM) y rodamina B (0,6 mM). Fig. 6a, se utiliza un filtro (L5) en el que se ven las dos poblaciones de partículas. Fig. 6b, se utiliza un filtro (N3) en el que solo se ven las partículas que contienen rodamina B.

Figura 7: Gráfico del análisis por citometría de flujo de una mezcla de partículas de poliestireno sin fluorescencia, con rodamina B y con fluoresceína, obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

Previo a la descripción del método y dispositivo objeto de esta invención hay que aclarar que ésta no está limitada a los componentes específicos ni a los procedimientos particulares que se describen, ya que éstos obviamente pueden variar. En principio, se entiende que toda la terminología que se emplea aquí se utiliza para describir los distintos aspectos de la invención y en ningún caso pretende ser limitante.

Dispositivos utilizados para la realización de esta invención se encuentran descritos en los documentos WO9930833 (“Device and method for creating dry particles”), WO9930834 (“Device and method for creating aerosols for drug delivery”), US6234402 (“Stabilized capillary microjet and devices and methods for producing the same”).

En general y salvo que se indique otra cosa, todos los términos científicos y técnicos que se emplean en este documento tienen el mismo significado que lo que se entiende habitualmente cuando se utilizan en entornos relacionados.

### Definiciones

Indicamos aquí que los términos en singular *un, una, el, la*, y, pueden también indicar plurales a menos que el contexto indique lo contrario. Así por ejemplo cuando se escribe “una partícula” se incluye un conjunto de partículas y cuando se refiere a “un fluoróforo” se encuentra incluida una combinación de fluoróforos, etc.

En esta invención los términos *esferas, partículas y cápsulas* se utilizan de forma intercambiable para describir las micro- y nano-partículas descritas en la patente, independientemente de si son sólidas, huecas, porosas, con diferentes capas o multi-capas, etc. Estas partículas pueden estar constituidas por cualquier material dependiendo de la aplicación final.

Con el término *material fluorescente* nos referimos a cualquier tipo de material que emita una señal fluorescente, ya sean compuestos orgánicos, biomoléculas, nanocristales, nanopartículas, líquidos, sólidos, etc, de forma individual o como mezcla de varios.

Con la denominación *superficie reactiva* nos referimos a la superficie de las partículas que, con cualquier composición, contienen una serie de grupos funcionales susceptibles de reaccionar con cualquier tipo de molécula que contenga una funcionalidad química adecuada que le permita formar uno o varios enlaces covalentes entre la partícula y dicha molécula.

En esta invención el término *fluido* se utiliza indistintamente para la denominación de gases o líquidos. En el caso de líquidos se encuentran incluidos líquidos simples, mezclas, disoluciones, suspensiones, emulsiones, sólidos licuados, etc.

Con el término *microchorro* nos referimos al filamento capilar que se obtiene del enfocamiento del fluido interno en el interior de la cámara presurizada y que sale al exterior a través de un orificio realizado en ella. En este término se incluyen chorros con un diámetro nano- y micrométrico y de composición diversa.

### Descripción de los componentes de la invención

El objeto de la presente invención es la obtención de partículas basado en una nueva metodología para la generación de emulsiones. Este nuevo procedimiento está basado en un sistema de enfocamiento capilar, denominado Flow Focusing, que combina la utilización de fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica del sistema y que tiene lugar en el seno de la fase externa de la futura emulsión. Una vez obtenida dicha emulsión y tras la solidificación de la gota se obtienen las partículas que son de tamaño nano y micrométrico, tienen forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y reproducible.

La tecnología básica de la invención consiste en un sistema de introducción de un primer fluido en el interior de una cámara presurizada mediante un segundo fluido. El primer fluido puede ser un líquido o un gas y el segundo fluido es un líquido. Preferentemente ambos fluidos son líquidos suficientemente diferentes entre sí de forma que permita la generación de un microchorro estable del primer fluido moviéndose desde el punto de alimentación en dirección al punto de salida de la cámara presurizada al exterior. Teniendo en cuenta las dos combinaciones posibles gas-líquido y líquido-líquido, en la presente invención se va a describir de forma general el procedimiento para la combinación líquido-líquido.

La formación del microchorro, su aceleración y en última instancia la formación de las partículas está basada en la abrupta disminución de presión asociada a la brusca aceleración que experimenta el primer fluido que presuriza la cámara al pasar por el orificio de salida de dicha cámara. Esto provoca una elevada diferencia de presiones entre los dos fluidos, que da lugar a la generación de una zona de alta curvatura en la superficie del segundo fluido cercana al orificio y a la obtención de un punto cúspide del que fluirá un microchorro estacionario si se suministra la misma cantidad de líquido que el orificio succiona. De este modo, el fluido de la cámara presurizada rodea al primer fluido enfocándolo, generando un microchorro estable cuyo diámetro es considerablemente más pequeño que el diámetro del orificio de salida de la cámara presurizada e impidiendo la obturación del orificio de salida.

## ES 2 257 968 B1

Se utiliza una ventana paramétrica (propiedades de los fluidos, caudales suministrados, diámetro de la punta de alimentación, tamaño del orificio de salida, relación de presiones, etc.) suficientemente amplia como para poder aplicarla a casi cualquier líquido (viscosidades dinámicas de  $10^{-4}$  a  $1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), de tal forma que el microchorro capilar que surge del extremo de la fuente de alimentación es absolutamente estable y las perturbaciones del proceso de rotura del chorro no pueden evolucionar aguas arriba. Aguas abajo el microchorro se rompe en gotas de forma regular por simple inestabilidad capilar (p.ej. Rayleigh "On the instability of jets" *Proc. London Math. Soc.*, 4-13, 1878).

El microchorro es generado en el seno de un fluido en movimiento de tal forma que en el momento en que se produce la ruptura del microchorro en gotas similares y del tamaño predicho se obtiene una emulsión. Tras la extracción/evaporación del disolvente por cualquiera de los métodos conocidos se obtienen las partículas de tamaño nano- y micrométrico con forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y reproducible, según la predicción de la teoría Flow Focusing.

Constituye un objeto de la presente invención un sistema compuesto por un dispositivo mediante el que se generan las gotas y un recipiente de recogida de dichas gotas que contiene la fase externa de la emulsión. El sistema está compuesto por (Fig 1):

1. El tubo de alimentación, también llamado fuente o punta o punto de alimentación.
2. Principio del tubo de alimentación que se utiliza para introducir el fluido interno.
3. Cámara presurizada.
4. Orificio de entrada del fluido que presuriza la cámara.
5. Final del tubo de alimentación que introduce el primer fluido en la cámara presurizada.
6. Orificio a través del cual sale el microchorro de la cámara presurizada.
7. Microgotas.
8. Recipiente en el que se recogen las gotas generadas.
9. Líquido en el que se sumerge el nebulizador para la generación de las gotas y que constituirá la fase externa de la emulsión.
10. Sistema externo de agitación de la emulsión que se va generando.

$D_0$  es el diámetro del tubo de alimentación;  $D$  es el diámetro del orificio de salida de la cámara;  $e$  es la longitud axial del orificio de salida de la cámara;  $H$  es la distancia entre el final del tubo de alimentación al orificio de salida de la cámara;  $P_0$  es la presión en el interior de la cámara;  $P_a$  es la presión atmosférica.

Este dispositivo incluido en la invención puede ser diseñado de múltiples formas, de manera que siga conteniendo los componentes esenciales que se muestran en la Fig. 1, o componentes que realicen la misma función obteniéndose los resultados deseados. Específicamente el dispositivo debe contener una fuente de alimentación (1) para el fluido interno que esté abierta por ambos lados, uno (2) para introducir el fluido interno y el otro (5) para sacarlo introduciéndolo en la cámara presurizada (3) con un diámetro interno de 0,002- 2 mm, preferiblemente 0,01-0,4 mm. El tubo de alimentación (1) o al menos el extremo de salida (5) ha de estar en el interior de la cámara presurizada (3). Esta cámara (3) debe tener un orificio (4) que permita la introducción del fluido presurizante y un orificio de salida (6) con un diámetro interno de 0,002-2 mm, preferiblemente 0,01-0,25 mm, a través del cual se producirá el paso del microchorro capilar. El extremo de salida (5) del tubo de alimentación (3) debe estar enfrentado al orificio de salida de la cámara y a una distancia de 0,01-2 mm, preferiblemente 0,2-0,5 mm.

Adicionalmente es objeto de la presente invención un dispositivo en el que el diámetro del extremo de salida de la fuente de alimentación, el diámetro del orificio de salida de la cámara y la distancia entre ambos puede ser variada y ajustable con el objeto de obtener unas condiciones de interacción entre los fluidos que de lugar a un microchorro capilar estable en el seno de un flujo laminar.

La introducción de los fluidos tendrá lugar mediante cualquier método que permita el suministro continuo de fluidos sin oscilaciones en los caudales (compresores, depósitos a presión, bombas volumétricas, etc).

En la Fig. 1, la fuente de alimentación y la cámara presurizada están diseñadas para obtener emulsiones en las que el tamaño de gota es pequeño y de distribución uniforme. Según la presente invención, la extracción/evaporación del disolvente tiene lugar de forma que únicamente se produce una disminución de volumen de la partícula debido a la eliminación del disolvente. Ésta ocurre rápidamente sin que se produzcan fenómenos de coalescencia de gotas, agregación o similares por lo que se mantiene la distribución relativa de tamaños de las gotas y las partículas finales. El tamaño de partícula obtenido se ajusta al predicho por la teoría Flow Focusing (Fig. 3). En algunos casos se obtienen tamaños de partícula algo superiores a los predichos, ya que se produce una ralentización y ensanchamiento

## ES 2 257 968 B1

del microchorro del fluido enfocado antes de su ruptura como consecuencia de la deceleración que sufre el chorro externo del fluido enfocado.

5 Preferentemente las partículas finales deben tener diámetros entre 0,01 y 1000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 0,01-200  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente entre 0,01-80  $\mu\text{m}$ . Las partículas finales obtenidas deben ser iguales en tamaño con una desviación estándar relativa del 10 al 30%, más preferiblemente del 3 al 10% y más preferiblemente del 3% o menor.

10 Opcionalmente, se encuentra incluida en esta invención la posibilidad de aplicar a alguno o varios de los fluidos perturbaciones externas periódicas y controladas (p.e. mecánicas, acústicas, etc.) de forma que favorezcan aun más la obtención de partículas con una distribución de tamaño homogénea. Las perturbaciones deben ser uniformes y controladas y su frecuencia vendrá determinada por las características del microchorro generado y el tamaño final de partícula requerido.

15 Es un objeto de la presente invención un dispositivo Flow Focusing para la generación de múltiples microchorros capilares mediante la utilización de múltiples puntas de alimentación de fluidos enfrentada cada una de ellas a uno de los múltiples orificios situados en la pared de una cámara presurizada. Para la obtención de resultados óptimos en el caso de los dispositivos múltiples, el caudal del fluido a inyectar deberá ser lo más homogéneo posible en todos los puntos, pudiéndose llevar a cabo la impulsión del fluido mediante múltiples agujas capilares, medios porosos o  
20 cualquier otro medio capaz de distribuir un caudal homogéneo entre diferentes puntos de alimentación.

Los materiales de que puede estar fabricado este atomizador son múltiples (metal, plástico, cerámica, vidrio, etc) dependiendo fundamentalmente de la aplicación específica en la que vaya a emplearse el dispositivo.

25 Constituye otro objeto de la presente invención un dispositivo cuyo diseño incluya distintos puntos de alimentación dispuestos de forma concéntrica entre sí generando en última instancia un único microchorro capilar (Fig.2) y que se compone de:

21. La fuente de alimentación, también llamado tubo o punta o punto de alimentación.

30

22. Principio del tubo de alimentación que se utiliza para introducir los fluidos en la fuente de alimentación.

23. Cámara presurizada.

35

24. Orificio de entrada del fluido que presuriza la cámara.

25. Final del tubo de alimentación que introduce los fluidos en la cámara presurizada.

40

26. Orificio a través del cual sale el microchorro de la cámara presurizada.

27. Microgotas.

28. Fluido que constituirá el núcleo de la partícula.

45

29. Fluido que constituirá la corteza de la partícula.

30. Fluido de presurización de la cámara.

31. Capilar interno de la fuente de alimentación.

50

32. Capilar externo de la fuente de alimentación.

33. Recipiente en el que se recogen las gotas generadas.

55

34. Líquido en el que se sumerge el nebulizador para la generación de las gotas y que constituirá la fase externa de la emulsión.

35. Sistema externo de agitación de la emulsión que se va generando.

60

$D_i$  es el diámetro del capilar interno del tubo de alimentación;  $D_o$  es el diámetro del capilar externo del tubo de alimentación;  $D$  es el diámetro del orificio de salida de la cámara;  $e$  es la longitud axial del orificio de salida de la cámara;  $H$  es la distancia entre el final del tubo de alimentación al orificio de salida de la cámara;  $P_o$  es la presión en el interior de la cámara;  $P_a$  es la presión atmosférica.

65

Este dispositivo incluido en la invención puede estar diseñado de múltiples formas de manera que siga conteniendo los componentes esenciales que se muestran en la Fig.2 o componentes que realicen la misma función obteniéndose los resultados deseados.

El sistema descrito en la Fig. 2 se utiliza cuando se quiere obtener una partícula de una sustancia recubierta por otra u otras diferentes. Este sistema está compuesto por los mismos elementos que el descrito en la Fig. 1 excepto en lo que se refiere a la fuente de alimentación que está constituida por dos capilares concéntricos. El capilar externo puede estar rodeado a su vez por nuevos capilares dispuestos de forma concéntrica alrededor de los anteriores.

El procedimiento de formación de la emulsión es el mismo que el anterior de forma que los fluidos se inyectan por separado a través de una fuente de alimentación especial (21) constituida por capilares concéntricos. En el caso en el que las partículas estén formadas por dos materiales, a través del capilar interno (31) se inyecta el material que constituirá el núcleo de la partícula y a través del capilar externo (32) se introduce el material que recubrirá dicha partícula. Los diámetros internos de ambos tubos de alimentación tienen de 0,002-2 mm (preferiblemente de 0,01 a 0,4 mm), siendo  $D_i < D_o$ . Además la distancia relativa entre los puntos de salida de los tubos concéntricos puede variar teniendo en cuenta que el tubo interno (31) no debe introducirse en el interior del externo (32) una distancia superior al valor del diámetro interior de dicho tubo externo (32); y que el tubo interno (31) no debe sobresalir del tubo externo (32) una distancia superior al doble del valor de su diámetro interior. Estos mismos criterios son válidos si se utilizan más de dos capilares concéntricos manteniendo dichas disposiciones relativas entre tubos consecutivos.

En la salida de la fuente de alimentación (25) los fluidos se juntan dentro de la cámara presurizada, son acelerados por el fluido que presuriza la cámara generando un microchorro de dos o más capas concéntricas de fluidos diferentes que no se mezclan entre sí por difusión al menos durante el proceso de formación y ruptura del microchorro. La fuente de alimentación está enfrentada al orificio de salida de la cámara que tiene un diámetro interno de 0,002-2 mm (preferiblemente 0,01-0,25 mm) y a una distancia de 0,01-2 mm (preferiblemente 0,2-0,5 mm) de dicho orificio. Preferiblemente la distancia entre la punta de alimentación del capilar interno y el orificio de la cámara estará comprendida entre cero y tres veces el valor del diámetro interior del capilar externo. Una vez generado el microchorro y debido a la inestabilidad capilar, éste se rompe generando gotas esféricas de tamaños similares de forma homogénea y que estarán formadas por capas más o menos concéntricas de los distintos fluidos. El tamaño y grosor de las distintas capas que forman la micropartícula y su distribución relativa vienen determinados por la relación de caudales de los distintos fluidos y la relación de los diámetros internos de sus capilares de alimentación y su disposición relativa y pueden ser ajustados con precisión.

Adicionalmente es objeto de la presente invención un dispositivo Flow Focusing en el que los diámetros del extremo de salida de la fuente de alimentación, el diámetro del orificio de salida de la cámara y la distancia entre ambos puede ser variada y ajustable con el objeto de obtener unas condiciones de interacción entre los fluidos que de lugar a un microchorro capilar estable en el seno de un flujo laminar.

La introducción de los fluidos tendrá lugar mediante cualquier método que permita el suministro continuo de fluidos sin oscilaciones en los caudales (compresores, depósitos a presión, bombas volumétricas, etc).

En la Fig. 2, la fuente de alimentación y la cámara presurizada están diseñadas para obtener emulsiones en las que el tamaño de gota es pequeño y de distribución uniforme. Según la presente invención, la extracción/evaporación del disolvente tiene lugar de forma que únicamente se produce una disminución de volumen de la partícula debido a la eliminación del disolvente. No se producen fenómenos de coalescencia de gotas, agregación o similares por lo que se mantiene la distribución relativa de tamaños de las gotas y las partículas finales. Preferentemente las partículas finales deben tener diámetros entre 0,01 y 1000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 0,01-200  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente entre 0,01-80  $\mu\text{m}$ . Las partículas finales obtenidas deben ser iguales en tamaño con una desviación estándar relativa del 10 al 30%, más preferiblemente del 3 al 10% y más preferiblemente del 3% o menor.

Opcionalmente, se encuentra incluida en esta invención la posibilidad de aplicar a alguno o varios de los fluidos perturbaciones externas periódicas y controladas (p.e. mecánicas, acústicas, etc.) de forma que favorezcan aun más la obtención de partículas con una distribución de tamaño homogénea. Las perturbaciones deben ser uniformes y controladas y su frecuencia vendrá determinada por las características del microchorro generado y el tamaño final de partícula requerido.

Es un objeto de la presente invención un dispositivo para la generación de múltiples microchorros capilares mediante la utilización de múltiples puntas de alimentación de fluidos, cada una de ellas constituida por dos o más capilares concéntricos, enfrentada cada una de ellas a uno de los múltiples orificios situados en la pared de una cámara presurizada. Para la obtención de resultados óptimos en el caso de los dispositivos múltiples, el caudal del fluido a inyectar deberá ser lo más homogéneo posible en todos los puntos, pudiéndose llevar a cabo la impulsión del fluido mediante múltiples agujas capilares, medios porosos o cualquier otro medio capaz de distribuir un caudal homogéneo entre diferentes puntos de alimentación.

Los materiales de que puede estar fabricado este atomizador son múltiples (metal, plástico, cerámica, vidrio, etc.) dependiendo fundamentalmente de la aplicación específica en la que vaya a emplearse el dispositivo.

La naturaleza y composición de los fluidos a los que se refiere la presente invención dependerán de la composición y estructura de las partículas y la aplicación final para la que se obtienen dichas partículas. En esta invención el término *fluido* se utiliza indistintamente para la denominación de gases o líquidos. En el caso de líquidos se encuentran incluidos líquidos simples, mezclas, disoluciones, suspensiones, emulsiones, sólidos licuados, etc.

Teniendo en cuenta la composición final y estructura de la partícula debe utilizarse una combinación de fluidos que: - posea las propiedades necesarias para la generación de un microchorro capilar estable mediante la utilización de alguno de los dispositivos de enfocamiento capilar incluidos en esta patente, y - que genere un microchorro capilar cuya ruptura dé lugar a una emulsión estable que permita, tras la solidificación de la gota, obtener las partículas del tamaño predicho y con una distribución homogénea del mismo. Por ejemplo y sin intención de limitarlo, para la obtención de partículas simples de un material hidrofóbico, tanto el fluido presurizante como la disolución donde se produce la formación de las gotas serán soluciones hidrofílicas no miscibles con el fluido enfocado de forma que se genere una emulsión que tras la extracción/evaporación del disolvente dé lugar a las partículas esperadas.

Las partículas pueden fabricarse de distintos materiales, incluyendo pero no limitado a polímeros, sílica, metal, cerámica, etc. Preferentemente se encuentran incluidos en esta invención los materiales poliméricos. Los polímeros pueden ser sintéticos o naturales, solubles en agua o en disolventes orgánicos. Son objeto de la presente invención fluidos que contienen materiales poliméricos entre los que se pueden incluir sin limitar la presente invención: polialcoholes, poliacetales, poliéteres, poliésteres (como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli(caprolactona) y similares y sus copolímeros), poliortoésteres, polianhidridos (como el ácido polisebácico, ácido polifumárico, poli(carboxifenoxi propano), poli(carboxifenoxi hexano) y similares y sus copolímeros), polialdehidos, policetonas, policarbonatos, poli(iminocarbonatos), poliamidas, poliimidias, poliacrilatos y sus derivados y copolímeros, poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poliestirenos, policloruros, polifluoruros, derivados polivinílicos, poliolefinas, polifosfatos, poli(organo)fosfazenos, poli(anhídridos-co- imidas), polisacáridos y derivados de carbohidratos, poli(aminoácidos), polímeros derivados de macromoléculas, y todos los derivados de los anteriores y sus copolímeros.

Constituye un objeto de esta invención que los materiales poliméricos que se utilizan en la formación de partículas presenten grupos funcionales reactivos susceptibles de reaccionar con cualquier tipo de molécula que contenga una funcionalidad química adecuada que le permita formar uno o varios enlaces covalentes entre la partícula y dicha molécula. Preferentemente constituye un objeto de esta invención que dichos grupos reactivos se encuentren en la superficie de la partícula dirigidos hacia el exterior de la misma. Está contenido en esta invención que entre las moléculas que se unen a la superficie están incluidas, sin que se consideren limitantes, moléculas de interés biológico, preferentemente péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNA's, LNA's, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.

Asimismo está incluido en esta invención un método de obtención de partículas en el que es posible incorporar en un solo paso durante el proceso de fabricación moléculas de interés biológico expuestas hacia el exterior.

Además de los componentes principales que constituirán la matriz o matrices (en el caso de las cápsulas multicapa) de la partícula, los fluidos pueden estar compuestos de otras sustancias entre las que se incluyen sin pretensión de limitarlas: fármacos y compuestos con actividad terapéutica y/o profiláctica, proteínas, microorganismos, células, biomoléculas, sustancias con actividad biológica en el mundo animal, metales, sustancias con propiedades magnéticas, colorantes, fluoróforos, etc.

Preferentemente está incluido en esta invención cualquier tipo de sustancia que emita una señal fluorescente, ya sean compuestos orgánicos, biomoléculas, nanocristales, nanopartículas, líquidos, sólidos, etc, de forma individual o como mezcla de varios. Predominantemente está incluido en esta invención cualquier tipo de material fluorescente que además de poder ser utilizado de forma individual, puede usarse en combinación con otros en la misma partícula de tal forma que se cumple que: - tienen un espectro de excitación en el mismo rango de longitudes de onda y, - poseen un espectro de emisión que permite distinguirlos cuando se utilizan simultáneamente. De forma explícita están contenidos en esta invención aquellos materiales fluorescentes que constituyen una mezcla (solución, suspensión, emulsión, etc.) homogénea con el fluido en el que van a ser inyectados durante todo el proceso de formación de la emulsión. El control de la composición del material fluorescente de la mezcla de inyección y las condiciones de generación de las gotas permite obtener partículas del tamaño deseado y con unas propiedades fluorescentes requeridas, predecibles y diferenciables. Las partículas fluorescentes codificadas pueden ser analizadas y diferenciadas utilizando la tecnología habitual (espectrómetros, microscopios de fluorescencia, etc.), y preferentemente la citometría de flujo.

Además constituye un objeto de la presente invención que las partículas que contienen material fluorescente en su interior posean en su superficie grupos funcionales reactivos capaces de formar enlaces covalentes entre la partícula fluorescente y otras moléculas.

Es objeto de la presente invención que durante el proceso de generación de la emulsión el dispositivo de formación de las gotas se encuentre sumergido en el interior de un fluido que constituirá la fase externa de la emulsión de forma que las gotas no sufren ningún proceso de deformación durante la formación de la emulsión. Este fluido es un líquido que puede ser de naturaleza acuosa u orgánica, con propiedades suficientemente diferentes al fluido o fluidos constituyentes de las gotas como para que tenga lugar la formación de una emulsión de tamaño de gota igual al generado por la ruptura del chorro capilar. Además, el fluido en el que se encuentra sumergido el dispositivo puede contener en disolución sustancias que favorezcan la formación y mantenimiento de la uniformidad y homogeneidad de la emulsión durante el proceso de solidificación de la gota para la obtención de la partícula (surfactantes, emulsificantes, tensioactivos, etc). Adicionalmente, el fluido en el que se genera la emulsión está en movimiento.

Se encuentra incluido en esta invención un procedimiento mediante el cual se obtienen emulsiones de características muy diferentes según la naturaleza de los fluidos que se utilicen (p.e. w/o, o/w, o/o, w/o/w, w/o/o, etc.).

Además están incluidos en esta invención los métodos de extracción/evaporación de disolvente habitualmente utilizados para la obtención de partículas a partir de emulsiones sin pérdida de sus características iniciales, sin que haya procesos de coalescencia, aglomeración, etc. que modifiquen la morfología y distribución de tamaños de las partículas.

Adicionalmente, la presente invención tiene como un procedimiento preferente aquel mediante el cual se lleva a cabo la generación de la partícula con la superficie reactiva y la encapsulación del material fluorescente en un único paso, utilizando alguno de los dispositivos descritos e incluidos en la presente invención. La formación de las partículas fluorescentes tiene lugar mediante la inyección de la mezcla homogénea, constituida por el material encapsulante y el fluoróforo o combinación de fluoróforos, a través de una punta de alimentación en el interior de una cámara presurizada, la generación de un microchorro capilar estable debido a la succión que tiene lugar por el cambio de presión que sufre el fluido presurizante al salir al exterior de la cámara presurizada a través del orificio existente en dicha cámara y que se encuentra situado enfrente del punto de alimentación del fluido inyectado, la ruptura axilimétrica del microchorro capilar en el seno del fluido en el que se encuentra sumergido el dispositivo generando una emulsión y por último, la extracción/evaporación del disolvente para obtener las partículas fluorescentes. A la superficie de dichas partículas fluorescentes codificadas se le unen covalentemente moléculas de interés biológico.

Otro objeto de esta invención es la obtención de partículas que puedan ser utilizadas como estándares de calibración (tamaño, fluorescencia, etc.), en la obtención de arrays de micropartículas, en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (encapsulación y liberación de fármacos, encapsulación de células y microorganismos, diagnosis y análisis clínicos), etc. Preferentemente está incluida en esta invención la obtención de arrays de partículas fluorescentes codificadas y modificadas superficialmente para utilizarlas en ensayos biológicos múltiplex.

### Modo de realización de la invención

#### Ejemplo 1

##### *Obtención de Micropartículas de Poliestireno de 5 micras (Fig 4a)*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de obtención de micropartículas de poliestireno de 5 micras utilizando la metodología descrita en la presente invención. La formación de la emulsión se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de enfocamiento capilar ( $D = 100 \mu\text{m}$ ) con un punto de alimentación simple ( $D_0 = H = 150 \mu\text{m}$ ). El dispositivo de enfocamiento capilar se encuentra sumergido en una disolución acuosa de PVA al 1% w/v en agitación. A través de la punta de alimentación se inyecta una disolución al 4% w/v de poliestireno (Aldrich,  $M_w = 4.000-200.000$ ) en acetato de etilo (Panreac Química) con un caudal de 1 mL/h. La cámara está presurizada mediante la introducción de un caudal continuo de agua de 3 mL/min. La emulsión o/w generada se mantiene en agitación durante 16h a temperatura ambiente para que tenga lugar la extracción/evaporación del disolvente. Las partículas sólidas se centrifugan (Orto Alresa mod. Digicen 20, 4.000 rpm, 10 min), se lavan con agua tres veces, se liofilizan y se guardan a 4°C.

El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes ( $d_{\text{medio}} 5,29 \mu\text{m}$ , DS 0,509) y un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30) (Fig.4a).

#### Ejemplo 2

##### *Obtención de Micropartículas de Poliestireno de 9 micras (Fig 4b)*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de obtención de micropartículas de poliestireno de 9 micras utilizando la metodología descrita en la presente invención. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar que en el ejemplo 1. El procedimiento de obtención de las micropartículas y la composición de los fluidos son los mismos que los que se describen en el ejemplo 1, variando únicamente las condiciones de inyección de los fluidos. La disolución de polímero se inyecta a 2 mL/h y el caudal del agua es 2 mL/min.

El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes ( $d_{\text{medio}} 9,28 \mu\text{m}$ , DS 0,86) y un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30) (Fig.4b).

#### Ejemplo 3

##### *Obtención de Micropartículas de Poliestireno de 13 micras*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de obtención de micropartículas de poliestireno de 13 micras utilizando la metodología descrita en la presente invención. La formación de la emulsión se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de enfocamiento capilar ( $D = 200 \mu\text{m}$ ) con un punto de alimentación simple ( $D_0 = H = 150 \mu\text{m}$ ). El dispositivo de enfocamiento capilar se encuentra sumergido en una disolución acuosa de PVA al 1% w/v en agitación. A través de la punta de alimentación se inyecta una disolución al 4% w/v de poliestireno (Aldrich,  $M_w = 4.000-200.000$ ) en diclorometano (Aldrich) con un caudal de 3 mL/h. La cámara está presurizada mediante la introducción de un caudal continuo de agua de 4 mL/min. La emulsión o/w generada se mantiene en agitación durante 16 h a temperatura ambiente para que tenga lugar la extracción/evaporación del disolvente. Las partículas sólidas se

## ES 2 257 968 B1

centrifugan (Orto Alresa mod. Digicen 20, 4.000 rpm, 10 min), se lavan con agua tres veces, se secan al baño maría (T = 65°C, 4 h) y se guardan a 4°C.

El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes ( $d_{\text{medio}}$  13,58  $\mu\text{m}$ , DS 1,65) y un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30).

### Ejemplo 4

#### *Obtención de Micropartículas Fluorescentes de Poliestireno y Rodamina B*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de obtención de micropartículas fluorescentes de poliestireno de 5 micras utilizando la metodología descrita en la presente invención. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar y las mismas condiciones experimentales que en el ejemplo 1. En este caso los fluidos a inyectar son mezclas homogéneas de una disolución al 4% w/v de poliestireno (Aldrich, Mw = 4.000-200.000) en acetato de etilo (Panreac Química) con distintas concentraciones de Rodamina B.

El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (Tabla I), un microscopio de fluorescencia (Leica DMR) (Fig. 5), un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) y un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30).

En la tabla I se puede observar la reproducibilidad del método.

TABLA I

*Distribución de tamaños de las partículas de PS con rodamina B*

[Rodamina B] mM	$D_{\text{medio}} \pm DS$ ( $\mu\text{m}$ )	CV (%)
0.006	$5.29 \pm 0.50$	9.45
0.06	$5.46 \pm 0.61$	11.23
0.6	$5.29 \pm 0.56$	10.66

### Ejemplo 5

#### *Obtención de Micropartículas Fluorescentes de Poliestireno y Fluoresceína*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de obtención de micropartículas fluorescentes de poliestireno de 5 micras utilizando la metodología descrita en la presente invención. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar y las mismas condiciones experimentales que en el ejemplo 4 cambiando el fluoróforo utilizado. En este caso los fluidos a inyectar son mezclas homogéneas de una disolución al 4% w/v de poliestireno (Aldrich, Mw = 4.000-200.000) en acetato de etilo (Panreac Química) con distintas concentraciones de fluoresceína.

El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (Tabla II), un microscopio de fluorescencia (Leica DMR), un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) y un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30).

En la tabla II se puede observar la reproducibilidad del método.

TABLA II

*Distribución de tamaños de las partículas de PS con fluoresceína*

[Fluoresceína] mM	$D_{\text{medio}} \pm DS$ ( $\mu\text{m}$ )	CV (%)
0.01	$5.21 \pm 0.55$	9.99
0.1	$5.32 \pm 0.69$	13.04
1	$5.63 \pm 0.64$	11.38

Ejemplo 6

*Análisis y caracterización de una mezcla de micropartículas fluorescentes diferentes obtenidas en los ejemplos anteriores*

5 En este ejemplo se pone de manifiesto que es posible distinguir poblaciones de micropartículas fluorescentes diferentes, obtenidas mediante el procedimiento de enfocamiento capilar descrito en esta invención, utilizando las técnicas habituales de análisis de fluorescencia.

10 Una mezcla de micropartículas de 5  $\mu\text{m}$  de poliestireno, poliestireno con fluoresceína 1 mM y poliestireno con rodamina B 0,6 mM preparadas según los ejemplo anteriores, se suspenden en agua, se sonicán durante 5 minutos y se analizan en un microscopio de fluorescencia (Leica DMR) utilizando diferentes filtros (fig. 6) y en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) (fig. 7). Utilizando ambas técnicas se pueden diferenciar con claridad todas las poblaciones de partículas de la mezcla simultáneamente.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 257 968 B1

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro y nanométrico **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:

- introducción de dos o más fluidos en un dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing.
- inmersión del dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing en el seno de otro fluido igual o distinto a los introducidos en el paso anterior en dicho dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing.
- generación de una emulsión en la cual la fase continua contiene al menos el fluido en cuyo seno se ha introducido el dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing, estando la fase dispersa constituida por el fluido o fluidos enfocados a través del dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing.
- formación de las partículas de tamaño micro y nanométrico a partir de la fase dispersa de la emulsión generada en la etapa anterior, manteniéndose en dichas partículas, respecto a las gotas de la emulsión inicial generada: a) la misma morfología de la distribución estadística de tamaños, es decir, manteniéndose los mismos momentos de orden superior a la media normalizados con la media, pudiendo variar dicha media debido al proceso de formación de la partícula a partir de la gota; y b) la misma estructura y morfología referida a la estructuración interna relativa de los distintos componentes.

2. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque al menos uno de los fluidos enfocados en el dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing contiene como mínimo un disolvente susceptible de ser eliminado mediante extracción/evaporación para formar dichas partículas de tamaño micro y nanométrico.

3. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-2 **caracterizado** porque la introducción de los fluidos tiene lugar mediante cualquier método que permita el suministro continuo de fluidos sin oscilaciones en los caudales (en particular mediante compresores, depósitos a presión y bombas volumétricas).

4. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-3 **caracterizado** porque el diámetro de las gotas que forman la fase dispersa de la emulsión está comprendida entre 0,01 y 1000 micras, preferentemente entre 0,01 y 200 micras y aun más preferentemente entre 0,01 y 80 micras.

5. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 4 **caracterizado** porque las gotas que forman la fase dispersa de la emulsión tiene una distribución de tamaños cuya desviación estándar está comprendida entre el 10 y el 30%, preferentemente entre el 3 y el 10% y aun más preferentemente menor del 3%.

6. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-5 **caracterizado** porque durante la introducción de los fluidos en el dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing se aplican a alguno o varios de los fluidos perturbaciones externas periódicas y controladas (en particular mecánicas y acústicas) para favorecer la formación de gotas con una distribución de tamaños más homogénea.

7. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-6 **caracterizado** porque los fluidos que se utilizan pueden ser líquidos o gases.

8. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 7 **caracterizado** porque todos los fluidos son líquidos.

9. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 8 **caracterizado** porque los fluidos líquidos pueden ser líquidos simples, mezclas, disoluciones, suspensiones, emulsiones, sólidos licuados, etc, elegidos de forma que permitan la generación de un microchorro estable del fluido o fluidos enfocados por el fluido enfocante.

10. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el fluido introducido incluye materiales poliméricos, silica, metales o cerámicas, que constituyen la matriz de dichas partículas, y adicionalmente otras sustancias.

11. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 10 **caracterizado** porque dichas sustancias adicionales quedan encapsuladas en las partículas que se obtienen.

12. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 10-11 **caracterizado** porque el fluido enfocado es preferentemente una disolución, mezcla, suspensión y/o emulsión homogénea de un material polimérico.

## ES 2 257 968 B1

13. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 12 **caracterizado** porque el material polimérico inyectado puede ser sintético o natural, soluble en agua o en disolventes orgánicos.
- 5 14. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el material polimérico se selecciona preferentemente de entre los siguientes: polialcoholes, poliacetales, poliéteres, poliésteres (como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli(caprolactona) y similares y sus copolímeros), poliortoésteres, polianhidridos (como el ácido polisebácico, ácido polifumárico, poli(carboxifenoxi propano), poli(carboxifenoxi hexano) y similares y sus copolímeros), polialdehidos, policetonas, policarbonatos, poli(iminocarbonatos), poliamidas, poliimidas, poliacrilatos, poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poliestirenos, policloruros, polifluoruros, derivados polivinílicos, poliolefinas, polifosfatos, poli(organofosfazenos), poli(anhídridos-co-imidas), polisacáridos y derivados de carbohidratos, poli(aminoácidos), polímeros derivados de macromoléculas, y todos los derivados de los anteriores y sus copolímeros.
- 10 15. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el material polimérico es preferentemente poliestireno y sus derivados y copolímeros.
- 15 16. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 12 **caracterizado** porque los materiales poliméricos utilizados presentan grupos funcionales reactivos susceptibles de reaccionar con cualquier tipo de molécula que contenga una funcionalidad química adecuada que le permita formar uno o varios enlaces covalentes entre la partícula y dicha molécula.
- 20 17. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 16 **caracterizado** porque los grupos reactivos de los materiales utilizados se disponen en la superficie de las gotas dirigidos hacia el exterior de las mismas.
- 25 18. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 10-11 **caracterizado** porque las sustancias encapsuladas incluyen preferentemente material fluorescente.
- 30 19. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 18 **caracterizado** porque en el material fluorescente encapsulado está incluido cualquier tipo de sustancia que emita una señal fluorescente, ya sean compuestos orgánicos, biomoléculas, nanocristales, nanopartículas, líquidos o sólidos, de forma individual o como mezcla de varios.
- 35 20. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 19 **caracterizado** porque el material fluorescente se encapsula de forma individual o en combinación con otros dentro de la misma partícula de forma que se cumpla:
- 40 - que tienen un espectro de excitación en el mismo rango de longitudes de onda,  
- poseen un espectro de emisión que permite distinguirlos cuando se utilizan simultáneamente.
- 45 21. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 18-20 **caracterizado** porque el fluido con el material fluorescente que se inyecta constituye una mezcla (solución, suspensión, emulsión, etc) homogénea de composición conocida durante todo el proceso de formación de la emulsión.
- 50 22. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 10 **caracterizado** porque las sustancias adicionales presentes en los fluidos incluyen moléculas de interés biológico, preferentemente péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.
- 55 23. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-22 **caracterizado** porque el fluido en el que está sumergido el dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing es un líquido de naturaleza acuosa u orgánica que permite la formación de la emulsión con el fluido o fluidos constituyentes de la fase dispersa manteniendo un tamaño de gota de la emulsión igual al generado por la ruptura del chorro capilar.
- 60 24. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 23 **caracterizado** porque el fluido en el que está sumergido el dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing es un líquido que puede contener opcionalmente en disolución sustancias que favorezcan el mantenimiento de la uniformidad y homogeneidad de la emulsión durante todo el proceso de formación y extracción/evaporación del disolvente, en particular emulsificantes o tensioactivos.
- 65 25. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1-24 **caracterizado** porque las partículas obtenidas pueden ser sólidas, huecas o porosas.
26. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 25 **caracterizado** porque las partículas tienen una matriz homogénea.

## ES 2 257 968 B1

27. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 25 **caracterizado** porque las partículas presentan distintas capas.

5 28. Procedimiento de obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 1- 27 **caracterizado** porque las partículas presentan en la superficie grupos funcionales reactivos que pueden formar enlaces covalentes con moléculas de interés biológico, preferentemente péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.

10 29. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-28 **caracterizado** porque es un dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing constituido por: - una cámara que se encuentra presurizada mediante la entrada constante de un fluido y tiene en la pared un orificio de salida al exterior y, - una fuente de alimentación de fluidos situada en el interior de dicha cámara.

15 30. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 29 **caracterizado** porque la fuente de alimentación de fluidos situada en el interior de la cámara está constituida por un único tubo capilar enfrentado al orificio existente en la pared de dicha cámara.

20 31. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-28 **caracterizado** porque es un dispositivo de enfocamiento capilar Flow Focusing constituido por: - una cámara que se encuentra presurizada mediante la entrada constante de un fluido y tiene en una pared una pluralidad de orificios de salida al exterior y, - una fuente de alimentación de fluidos constituida por múltiples puntas de alimentación situadas en el interior de una cámara presurizada, y cada una de ellas constituida por un único tubo capilar enfrentado a uno de los múltiples orificios situados en la pared de dicha cámara.

25 32. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 29 **caracterizado** porque la fuente de alimentación de fluidos situada en el interior de la cámara está constituida por un conjunto de tubos capilares situados de forma concéntrica entre si enfrentados al orificio de salida de dicha cámara.

30 33. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicación 31 **caracterizado** porque cada una de las múltiples puntas de alimentación situadas en el interior de una cámara presurizada está constituida por un conjunto de capilares concéntricos enfrentados a uno de los múltiples orificios situados en la pared de dicha cámara.

35 34. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 31 y 33 **caracterizado** porque cada una de las puntas de alimentación se encuentra enfrentada a un único orificio de salida de los situados en la pared de la cámara.

40 35. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 32-33 **caracterizado** porque el extremo de salida del capilar interno que forma parte de la fuente de alimentación situada en el interior de la cámara, y el orificio de salida de dicha cámara, se encuentran preferentemente a una distancia comprendida entre cero y tres veces el valor del diámetro interior del capilar externo contiguo que forma parte de la fuente de alimentación.

45 36. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 32- 33 y 35 **caracterizado** porque la distancia relativa entre los extremos de salida de los tubos concéntricos que forman parte de la fuente de alimentación es variable, y preferentemente el extremo de salida del tubo capilar interno no se introduce en el interior del tubo capilar externo contiguo una distancia superior al valor del diámetro interior de dicho tubo externo.

50 37. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según la reivindicación 36 **caracterizado** porque preferentemente el extremo de salida del tubo capilar interno no sobresale del tubo capilar externo contiguo una distancia superior al doble del valor de su diámetro interior.

55 38. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29- 37 **caracterizado** porque los capilares que forman el extremo de la fuente de alimentación que se encuentra en el interior de la cámara presurizada tienen preferentemente un diámetro interno comprendido entre 0,002 y 2 mm, y más preferentemente entre 0,01 y 0,30 mm.

60 39. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29- 38 **caracterizado** porque los orificios de salida de la cámara tiene preferentemente un diámetro interno comprendido entre 0,002 y 2 mm, y más preferentemente entre 0,01 y 0,25 mm.

65 40. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29- 39 **caracterizado** porque cada orificio de salida de la cámara y su correspondiente extremo de salida de la fuente de alimentación de fluidos situada en el interior de la cámara se encuentra a una distancia comprendida entre 0,01 y 2 mm, preferentemente entre 0,2-0,6 mm.

## ES 2 257 968 B1

41. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29-40 **caracterizado** porque las fuentes de alimentación son preferentemente tubos capilares, medios porosos o cualquier otro medio capaz de distribuir un caudal homogéneo entre diferentes puntos de alimentación.

5 42. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29-41 **caracterizado** porque los diámetros internos de los tubos capilares que componen la fuente de alimentación, el diámetro del orificio de salida de la cámara y la distancia entre ambos puede ser variada y ajustable con el objeto de obtener unas condiciones de interacción entre los fluidos que dé lugar a un microchorro capilar estable en el seno de un flujo laminar.

10 43. Dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro- y nanométrico según las reivindicaciones 29-42 **caracterizado** porque puede estar fabricado de diferentes materiales, preferentemente metal, plástico, cerámica, vidrio.

15 44. Utilización de partículas obtenidas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-28 como estándares de calibración.

20 45. Utilización de partículas obtenidas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-28 en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, preferentemente encapsulación y liberación de fármacos, encapsulación de células y microorganismos, y diagnóstico y análisis clínicos.

25 46. Utilización de partículas obtenidas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-28 para formar de arrays de partículas, preferentemente para formar arrays de partículas codificadas con material fluorescente y la superficie modificada con compuestos de interés biológico.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

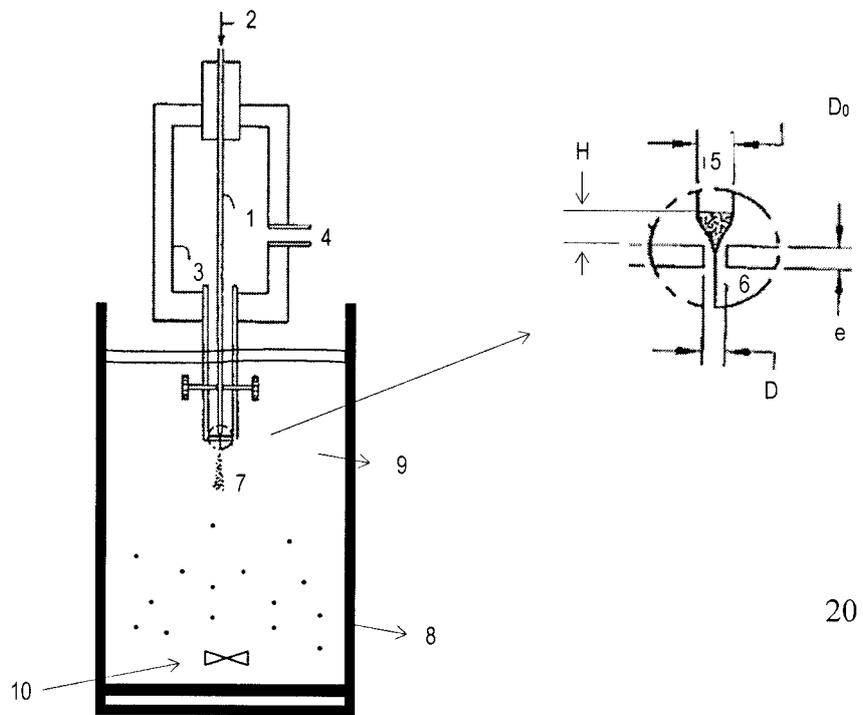


Figura 1

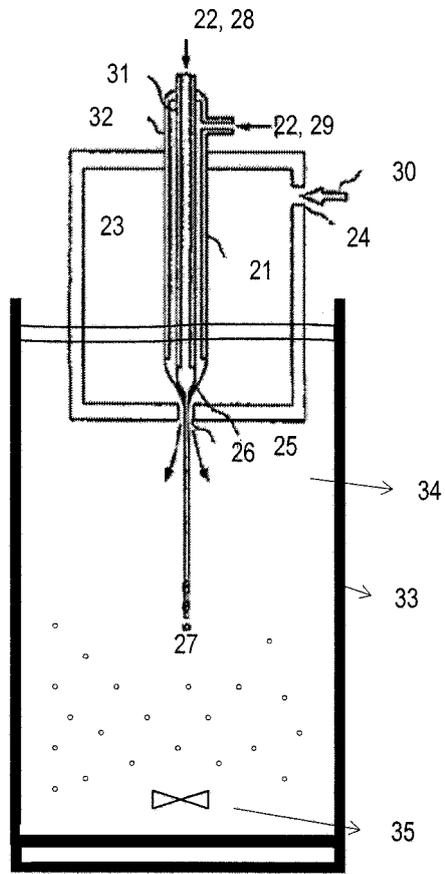


Figura 2

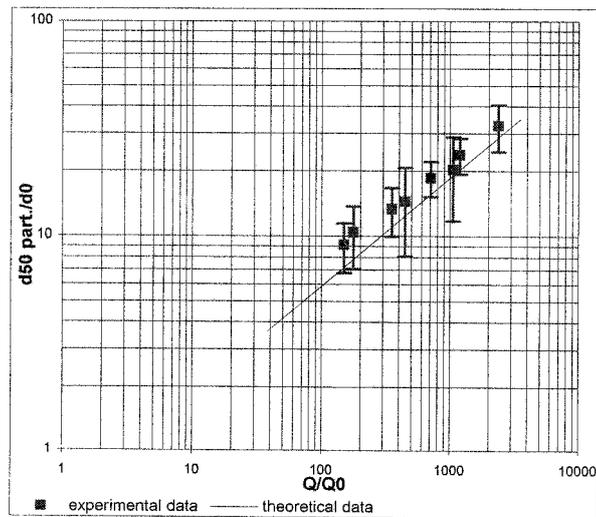


Figura 3

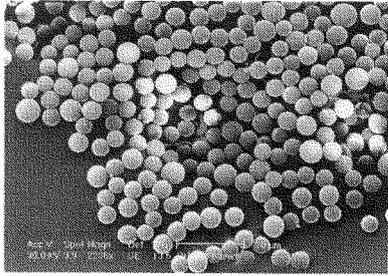


Figura 4a

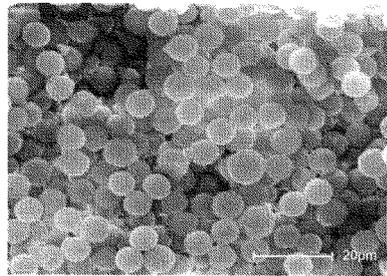


Figura 4b

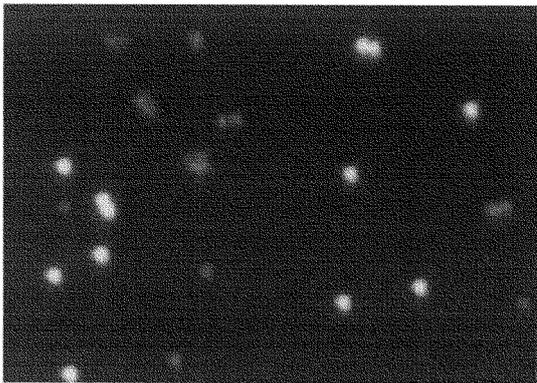


Figura 5a

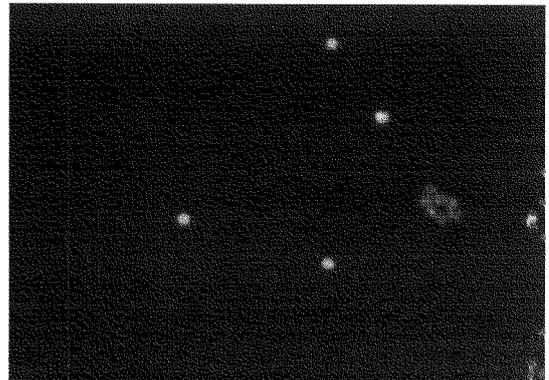


Figura 5b

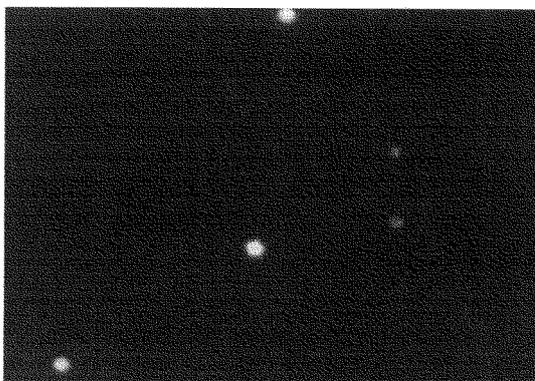


Figura 5c

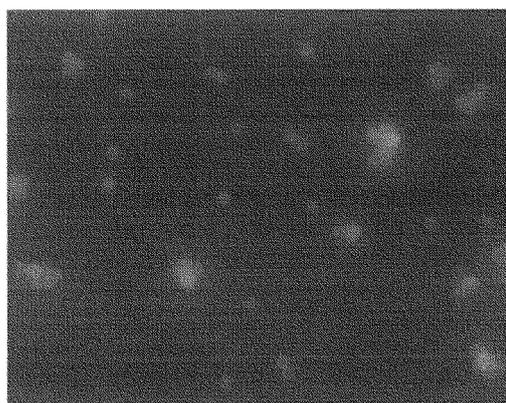


Figura 6a

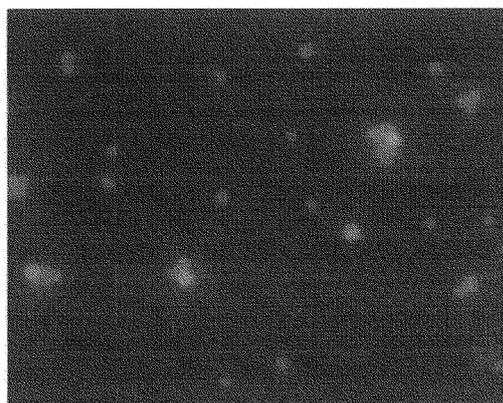


Figura 6b

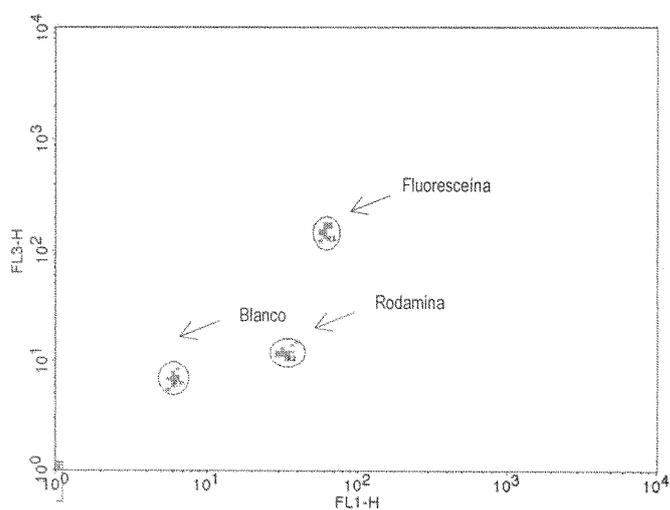


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 257 968

② Nº de solicitud: 200500205

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2175828 T3 (UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 27.09.2000, todo el documento.	1-46
A	US 4162282 A (FULWYLER et al.) 24.07.1979, columnas 2-4; figura 1.	1-46
A	US 3790492 A (FULWYLER) 05.02.1974, ejemplos 1-3; figura 1.	1-46
A	US 4422985 A (MORISHITA et al.) 27.12.1983, figura 1; columnas 2-3.	1-46
A	SHELLEY et al. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. Applied Physics Letters (2003), Vol.82, Nº3, páginas 364-366.	1-46
A	CH 563807 A5 (BATELLE-INST EV) 15.07.1975, todo el documento.	1-46
A	ES 2199048 B1 (UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 01.02.2004, columnas 1-3.	1-46

#### 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

30.05.2006

Examinador

A. Rúa Agüete

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**B01J 13/04** (2006.01)

**B05B 7/06** (2006.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)