

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 273 572**

② Número de solicitud: 200501107

⑤ Int. Cl.:
B01J 13/02 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A23P 1/04 (2006.01)
B05B 7/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **04.05.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2007**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2007

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Sevilla
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES**

⑱ Inventor/es: **Gañán Calvo, Alfonso M.;
Chávez de Diego, Sebastián;
Cebolla Ramírez, Ángel;
Flores Mosquera, María y
Castro Hernández, Elena de**

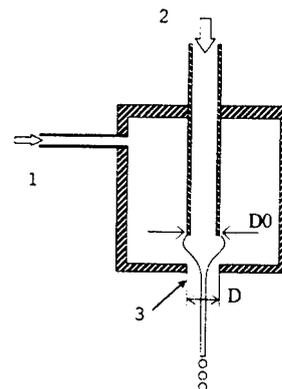
⑳ Agente: **No consta**

④ Título: **Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles y partículas obtenidas.**

⑦ Resumen:

Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles y partículas obtenidas.

La presente invención esta 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. Mas particularmente, la presente invención describe el use y utilización de un método suave de formación de partículas y su aplicación a la encapsulación de compuestos frágiles de interés biológico, incluyendo desde péptidos y proteínas hasta células y microorganismos.



ES 2 273 572 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles y partículas obtenidas.

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. Mas particularmente, la presente invención describe el use y utilización de un método suave de formación de partículas y su aplicación a la encapsulación de compuestos frágiles de interés biológico, incluyendo desde péptidos y proteínas hasta células y microorganismos.

10

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 manteniendo su actividad.

20

La utilización de micropartículas adquiere mayor importancia cuando los compuestos que se utilizan, como pueden ser moléculas lábiles, péptidos y proteínas, células, microorganismos, etc., son inestables o requieren condiciones específicas para mantener su viabilidad durante todo el proceso de formulación, distribución, almacenamiento y liberación de los mismos. Por lo tanto, la inmovilización de compuestos lábiles en el interior de matrices poliméricas es una metodología cada vez más utilizada en la investigación medica, farmacéutica, bioingeniería, alimentación, etc. El tamaño de partícula adquiere además especial relevancia para que pueda ser factible utilizarlos en alguno de estos campos, i.e. alimentación, desarrollo de nuevos fármacos, encapsulación celular, etc.

25

Los diferentes métodos de microencapsulación pueden clasificarse en tres grandes grupos: fisicoquímicos, químicos y mecánicos. El método de microencapsulación lo define el material de recubrimiento y las propiedades fisicoquímicas del principio activo, sin embargo, no existe un procedimiento determinado para un material y un principio activo dados, en numerosos casos es posible elegir entre varias posibilidades (S. Gouin, "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies", *Trends Food. Sci Technol.* **2004**; V. R. Sinha, A. Trehan, "Biodegradable microspheres for protein delivery", *J. Control. Rel.* **2003**, 90, 261-280). En general, los procedimientos más habituales de encapsulación de compuestos frágiles están basados en técnicas de emulsificación-gelación iónica del material encapsulante y/o evaporación del disolvente, y/o atomización de las mezclas mediante la extrusión de las mismas a través de un capilar. Sin embargo estos métodos presentan algunos problemas todavía sin resolver. Entre ellos hay que destacar la baja viabilidad o actividad final de los compuestos encapsulados debido a la agresividad de las técnicas utilizadas habitualmente (Brynjelsen S. *et al*, US6835396 "Preparation of submicron sized nanoparticles via dispersion lyophilization"; Kyekyoon K. *et al*, US5344676, "Method and apparatus for producing nanodrops and nanoparticles and thin film deposits therefrom"); y la imposibilidad de obtener partículas monodispersas de pequeño tamaño ($d \leq 300 \mu\text{m}$), ya que este viene dado por el diámetro del capilar de atomización que suele ser especialmente grande para evitar obturaciones (Pacífico C.J. *et al*, W00145835, "Sensitive substance encapsulation"; Pluess-Wenzinger R. *et al*, W09944735, "Method and device for capsuling microbial, plant and animal cells or biological and chemical substances").

30

35

40

45

Por lo tanto, la posibilidad de disponer de métodos de fabricación que combinen tanto el control del tamaño de partículas como el tratamiento no agresivo de las moléculas de naturaleza biológica supondría un gran avance en el desarrollo de la microencapsulación de compuestos lábiles. Teniendo en cuenta las características de la tecnología Flow Focusing, se han desarrollado nuevos procedimientos utilizando dispositivos que se encuentran descritos en los documentos siguientes y en los que en ellos se incluyen: WO9743048 ("Liquid atomization process") WO9930833 ("Device and method for creating dry particles"), WO9930833 ("Device and method for creating aerosols for drug delivery"), WO03066231 ("Device for the production of capillary jets and micro- and nanometric particles") US6234402 ("Stabilized capillary microjet and devices and methods for producing the same"), P200500205 ("Procedimiento y dispositivo para la obtención de partículas de tamaño micro y nanométrico").

50

55

Descripción de la invención

Previo a la descripción detallada de la invención hay que aclarar que esta no está limitada a los componentes específicos ni a los procedimientos particulares que se describen, ya que estos 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.

60

La presente invención se refiere a la utilización de un método de fabricación de partículas que contienen compuestos lábiles, mediante la utilización de un sistema de enfocamiento capilar (Flow Focusing), que combina la utilización de fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica del sistema para dar lugar a gotas con las propiedades deseadas; y la posterior solidificación de las gotas para obtener las partículas que son de tamaño nano y micrométrico, tienen forma esférica y una distribución de tamaño muy estrecha y reproducible.

65

ES 2 273 572 A1

El sistema de fabricación de partículas al que se refiere la presente invención este constituido por un dispositivo de enfocamiento capilar cuya geometría se muestra en la Fig. 1. Este dispositivo consta de una cámara que se encuentra presurizada mediante la entrada constante de un fluido (1) que sale al exterior por el único orificio de salida que tiene la cámara (D). En el interior de la cámara se introducen uno o mas fluidos (2) a través de un punto de alimentación que se encuentra enfrente al único orificio de salida que tiene la cámara. La corriente del fluido que presuriza la cámara rodea al segundo fluido que se inyecta por D0 y lo impulsa hacia el exterior de la cámara a través del orificio, generando un microchorro fino de forma controlada.

La producción de este microchorro capilar se realiza en condiciones de caudal y presión tales que dicho chorro se encuentra en el seno de un flujo laminar y cuando se produce la rotura debido a la inestabilidad capilar distribuciones obtienen gotas de tamaño controlado y distribución homogénea. Una vez generadas las gotas, estas son sometidas a un proceso de secado y/o endurecimiento incluyendo procesos de difusión-extracción- evaporación del disolvente, gelificación iónica, evaporación por calor, enfriamiento, etc. Dicho endurecimiento da lugar a la obtención de partículas secas con forma esférica y una distribución homogénea igual a la de las gotas generadas inicialmente.

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 fluido enfocante y dirigido hacia el exterior a través de un orificio alineado con el punto de alimentación existente en la pared de la cámara. En este caso, se obtienen gotas iguales que, al ser sometidas al proceso de solidificación, dan lugar a micro y nanopartículas de composición homogénea a lo largo de toda la matriz que las componen.

En un segundo procedimiento incluido en esta invención, el fluido que se inyecta este 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 liquido que presuriza la cámara, a través del orificio que se encuentra enfrente al punto de alimentación de los fluidos. Utilizando este segundo procedimiento, se obtienen gotas estructuradas formadas por capas de naturaleza y composición diferentes que, al ser sometidas al proceso de solidificación, dan lugar a cápsulas verdaderas con un núcleo y una corteza diferenciados.

Es un objeto de la presente invención la utilización de dispositivos que contengan múltiples puntas de alimentación de fluidos en el interior de una cámara presurizada, de forma que se generan múltiples microchorros que salen al exterior a través de los orificios realizados enfrente de cada punta de alimentación. Estos microchorros rompen en gotas con las mismas propiedades, de manera que, tras el proceso de solidificación, permiten obtener partículas iguales en grandes cantidades en poco tiempo.

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 mas la obtención de partículas con una distribución de tamaño homogénea.

En todos los procedimientos descritos los fluidos que se describen son líquidos o gases. Cuando se utilizan dos o mas líquidos simultáneamente, éstos son suficientemente diferentes entre si de forma que es posible la generación de un microchorro estable. Generalmente el fluido interno es una disolución de uno o mas componentes, un sólido licuado, una suspensión y/o una emulsión de componentes de distinta naturaleza.

Es un objeto de esta invención proporcionar un nuevo método de encapsulación de moléculas lábiles, péptidos y proteínas, DNA, compuestos biológicamente activos, células, microorganismos, etc., en el que las condiciones de trabajo son muy suaves y permiten tanto la viabilidad y funcionalidad final del compuesto encapsulado, como el diseño y control de la estructura interna de la micropartícula y su tamaño.

Además esta incluido en esta invención, que los productos lábiles encapsulados puedan encontrarse tanto en el interior de las micropartículas finales, como estar expuestas hacia el exterior con posibilidad de interactuar con el medio.

Las principales características ventajosas para la encapsulación de compuestos frágiles que presenta este procedimiento, es:

- a) Se utilizan condiciones experimentales muy suaves (muy bajas presiones, ausencia de esfuerzos de cortadura, secciones de paso del material a encapsular muy grandes, etc) por lo que los productos encapsulados no sufren modificaciones durante el proceso manteniendo su funcionalidad y/o viabilidad.
- b) Es posible reducir el tamaño de partícula ($500 \text{ nm} \leq d \leq 1000 \text{ }\mu\text{m}$) manteniendo el control sobre su distribución y composición sin utilizar condiciones experimentales agresivas (elevadas presiones) ni fuerzas externas (electrostáticas, ultrasónicas, filtración, etc) que afecten a la viabilidad/funcionalidad de los compuestos lábiles encapsulados.
- c) Es un procedimiento de obtención de micropartículas muy versátil: Una vez obtenidas las gotas es posible adecuar el proceso de solidificación según la naturaleza del producto a encapsular y el polímero utilizado,

pudiendo adaptar el procedimiento a cualquiera de los requerimientos de los materiales de partida y el producto final.

- d) Es posible diseñar y controlar, desde el momento inicial del proceso, tanto la estructura interna de las gotas como la composición de cada una de las fases, lo que permite la distribución de los compuestos de interés en la posición mas adecuada para la aplicación final.
- e) 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: (1) Fluido enfocante, (2) fluido enfocado, (3) menisco.

Figura 2: esquema general de los componentes básicos de un dispositivo de formación de partículas mediante la inyección de dos fluidos de forma concéntrica: (1) Fluido enfocante, (2) fluidos enfocados, (3) menisco.

Figura 3a: Fotografía de microscopio de partículas de alginato con BSA-Flu.

Figura 3b: Fotografía del microscopio de fluorescencia de partículas de alginato con BSA sin marcar.

Figura 3c: Fotografía del microscopio de fluorescencia de partículas de alginato con BSA marcada con fluoresceína.

Figura 4a: Fotografía del microscopio de fluorescencia de las partículas de alginato.

Figura 4b: Fotografía de microscopio de partículas de alginato con GFP.

Figura 4c: Fotografía del microscopio de fluorescencia de partículas de alginato con GFP de la Fig. 4b.

Figura 5a: Fotografía del microscopio de fluorescencia de partículas de poliestireno.

Figura 5b: Fotografía del microscopio de fluorescencia de partículas de poliestireno con BSA marcada con fluoresceína.

Figura 6a-c: Fotografía del microscopio de fluorescencia de las micropartículas de alginato con distintas concentraciones de una cepa modificada de *E. Coli* productora de GFP: a) $2 \cdot 10^8$ cfu/gr, b) $8 \cdot 10^8$ cfu/gr, c) $1,3 \cdot 10^9$ cfu/gr.

Figura 7a y 7c: Fotografía del microscopio confocal de las micropartículas de alginato con distintas concentraciones de una cepa modificada de la levadura *saccharomyces cerevisiae* productora de GFP: a) $2 \cdot 10^8$ levadura/gr, c) $4,8 \cdot 10^9$ levadura/gr.

Figura 7b y 7d: Fotografía del microscopio óptico de las micropartículas de alginato con distintas concentraciones de una levadura modificada productora de GFP de la Fig.7a y de la Fig.7c respectivamente.

Descripción detallada de la invención

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* compuesto” se encuentra incluida una combinación de compuestos, 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 la denominación *superficie reactiva* nos referimos a la superficie de las partículas susceptible de entrar en contacto con el medio externo, incluyendo además de la superficie de la esfera externa la de los poros y canales que se crean, 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.

5 Con el termino *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 la invención

10 El objeto de la presente invención es un procedimiento para la obtención de partículas con moléculas lábiles, péptidos y proteínas, células, microorganismos, etc., en su interior. Este procedimiento este basado en un sistema de enfocamiento capilar, que combina la utilización de fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica del sistema, de forma que se produce la formación de un microchorro capilar en el seno de un flujo laminar que, por inestabilidad
15 capilar, se rompe en gotas de tamaño controlado y con una distribución muy estrecha y reproducible. Tras la solidificación de la gota se obtienen las partículas que son de tamaño nano y micrométrico, tienen forma esférica y mantienen la distribución de las gotas iniciales generadas.

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 de forma que se genere un chorro estable del primer fluido, que es el que rompe en gotas homogéneas. El primer fluido puede ser un líquido o un gas y el segundo fluido puede ser un gas o un líquido. Cuando ambos fluidos son líquidos, éstos deben ser suficientemente diferentes entre si 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.

25 Es un objeto de la presente invención la utilización de un dispositivo Flow Focusing de forma que el fluido inyectado a través del capilar sea un líquido y el fluido que presuriza la cámara sea un líquido o un gas. Asimismo se encuentra incluida en esta invención la utilización de un dispositivo Flow Focusing para la generación de múltiples microchorros capilares, de forma que el fluido inyectado a través de las múltiples puntas de alimentación sea un líquido y el fluido que presuriza la cámara sea un líquido o un gas.

30 Constituye otro objeto de la presente invención la utilización de un dispositivo cuyo diseño incluya distintos puntos de alimentación dispuestos de forma concéntrica entre si, de tal manera que entre los fluidos inyectados a través de dichos puntos de alimentación al menos uno sea un líquido, y el fluido que presuriza la cámara sea un líquido o un gas, generando en ultima instancia un único microchorro capilar que dará lugar a las partículas. Se encuentra incluida en la presente invención la utilización de 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, de tal manera que entre los fluidos inyectados a través de ellas al menos uno de cada punta de alimentación sea un líquido, y el fluido que presuriza la cámara sea un líquido o un gas, generando en última instancia un conjunto de microchorro capilar que dará lugar a las partículas.

35 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.

40 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 de lugar a un sistema estable que permita, tras la solidificación de la gota, obtener las partículas del tamaño predicho y con una distribución homogénea del mismo.

45 Igualmente se encuentra incluida en esta invención la utilización de un procedimiento de obtención de partículas en el que 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. 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. Esta
50 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. En algunos casos se obtienen tamaños de partícula algo superiores a los predichos, ya que se produce una ralentización y ensanchamiento del microchorro del fluido enfocado antes de su ruptura como consecuencia de la deceleración que sufre el chorro externo del fluido enfocante.

65 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

ES 2 273 572 A1

controladas y su frecuencia vendrá determinada por las características del microchorro generado y el tamaño final de partícula requerido.

Se encuentra incluido en la presente invención la utilización de cualquiera de los sistemas habituales que permiten la solidificación de las gotas generadas sin que tenga lugar la pérdida de las características iniciales de las gotas, y sin que haya procesos de coalescencia, aglomeración, etc. que modifiquen la morfología y distribución de tamaños de las partículas. Entre estos sistemas de solidificación de las gotas se incluyen la eliminación de disolvente, gelificación iónica, gelificación térmica, etc.

Es objeto de la presente invención que en el caso en el que tiene lugar la generación de una 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.).

Preferentemente las partículas finales que se obtengan deben tener diámetros entre 0,01 y 1000 μm , más preferiblemente entre 0,01-200 μm y más preferiblemente entre 0,01-80 μm . 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.

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, polianhídridos (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(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.

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. Este 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, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.

Asimismo esta incluido en esta invención un método de obtención de partículas en el que el fluido que conformará la matriz de la partícula puede llevar unido covalentemente moléculas de interés biológico que quedaran expuestas hacia la superficie de las partículas.

Además de los componentes principales que constituirán la matriz o matrices (en el caso de las cápsulas multicapa) de la partícula, los fluidos van a estar compuestos de otras compuestos y sustancias lábiles que necesiten ser protegidos durante todos o alguno de los siguientes pasos: formulación, distribución, almacenamiento y/o liberación de los mismos. Entre estas sustancias se incluyen sin pretensión de limitarlas: fármacos y compuestos con actividad terapéutica y/o profiláctica, moléculas y compuestos inestables, péptidos y proteínas, microorganismos, células, biomoléculas, etc., de forma individual o como mezcla de varios.

Además constituye un objeto de la presente invención que las partículas que contienen material lábil en su interior posean en su superficie grupos funcionales reactivos capaces de formar enlaces covalentes entre la partícula y otras moléculas. 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 frágil en un único paso, utilizando alguno de los dispositivos descritos e incluidos en la presente invención.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1

5 *Encapsulación de BSA marcada con fluoresceína en micropartículas de alginato (Fig 3)*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de encapsulación de BSA marcada con fluoresceína. (BSA-Flu) en micropartículas de alginato de 11 micras utilizando la tecnología Flow Focusing en configuración líquido-gas. La formación de las partículas se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de enfocamiento capilar (D = 350 μm) con un punto de alimentación simple ($D_0 = 200 \mu\text{m}$; $H = 125 \mu\text{m}$). El dispositivo de enfocamiento capilar se encuentra integrado en un spray-dryer LabPlant SD-Basic. A través de la punta de alimentación se inyecta una disolución acuosa de BSA-Flu (0.17% w/v) en alginato sódico (Sigma) al 1,7% w/v con un caudal de 10 mL/h. La cámara este presurizada a 300 mbar mediante la entrada de una corriente continua de gas. Las gotas se secan en el spray dryer a una temperatura de 87°C, recogándose secas al final del proceso.

15 El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (d_{medio} 10,75 μm , DS 0,71) y un microscopio de fluorescencia (Leica DMR), (Fig. 3a, 3c).

Ejemplo 2

20 *Encapsulación de GFP en micropartículas de alginato (Fig 4)*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de encapsulación de proteína verde fluorescente (GFP) en micropartículas de alginato de 11 micras utilizando la tecnología Flow Focusing en configuración líquido-gas. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar que en el ejemplo 1. Se prepara una disolución acuosa de GFP (0,04% w/v) en alginato sódico al 1,7% w/v y se lleva a cabo el mismo procedimiento de obtención de las micropartículas que el descrito en el ejemplo 1.

30 El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando el microscopio óptico y un programa de tratamiento de imágenes (d_{medio} 11.16 μm , DS 1,36) y el microscopio de fluorescencia (Fig. 4b, Fig. 4c).

Ejemplo 3

35 *Encapsulación de BSA marcada con fluoresceína en micropartículas de poliestireno*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de encapsulación de BSA marcada con fluoresceína. en micropartículas de poliestireno de 13 micras utilizando la tecnología Flow Focusing en configuración líquido-líquido. 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. Sobre una 2 mL de una disolución de poliestireno (Aldrich, $M_w = 4.000-200.000$) al 4% w/v en diclorometano (Aldrich) se añade gota a gota y en constante agitación 0.140 mL de una disolución al 0.5% w/v de BSA marcada con Fluoresceína en EtOH (Panreac Quimica). Esta disolución se inyecta a través de la punta de alimentación con un caudal de 1 mL/h. La cámara esta presurizada mediante la introducción de un caudal continuo de agua de 3 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 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.

50 El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (d_{medio} 13.27 μm , DS 4.57) y un microscopio electrónico de barrido (Eclipsar XL30) (Fig. 5b).

Ejemplo 4

55 *Encapsulación de bacterias E. Coli en micropartículas de alginato*

El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de encapsulación de una cepa modificada *E. Coli* que expresa GFP en micropartículas de alginato de 11 micras utilizando la tecnología Flow Focusing en configuración líquido-gas. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar que en el ejemplo 1. A 15 mL de una disolución acuosa de alginato sódico al 2% w/v se le añaden distintas cantidades de una suspensión de *E. Coli* (4E8 c.f.u/mL) en NaCl (Sigma, 1% w/v) para obtener suspensiones con distintas concentraciones de bacteria (Tabla 1). La suspensión se homogeneiza durante 5 minutos) y se lleva a cabo el mismo procedimiento de obtención de las micropartículas que el descrito en el ejemplo 1 pero secando las gotas a 99°C.

65 El análisis de las micropartículas se llevo a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (Tabla 1) y un microscopio electrónico de barrido (Eclipsar XL30) (Figuras 6a-c).

ES 2 273 572 A1

TABLA 1

Distribución de tamaños de las micropartículas con E. Coli en función de la concentración inicial de bacteria

	Concentración de <i>E. Coli</i>	d _{medio} (μm)	DS (μm)
5			
	2·10 ⁸ cfu/gr	10,3	1,16
10	8·10 ⁸ cfu/gr	11,15	1,48
	1,3·10 ⁹ cfu/gr	11,51	1,60

15 **Ejemplo 5**

Encapsulación de levaduras en micropartículas de alginato (fig 7)

20 El ejemplo siguiente presenta el procedimiento de encapsulación de una levadura modificada que expresa GFP en micropartículas de alginato de 12 micras utilizando la tecnología Flow Focusing en configuración líquido-gas. Se utiliza el mismo dispositivo de enfocamiento capilar que en el ejemplo 1. A 10 mL de una disolución acuosa de alginato sódico al 2% w/v se le añaden 2 ml de una suspensión acuosa de levadura con distintas concentraciones de la misma (Tabla 2). La suspensión se homogeneiza durante 5 minutos y se lleva a cabo el mismo procedimiento de obtención de las micropartículas que el descrito en el ejemplo 1 pero secando las gotas a 87°C.

25 El análisis de las micropartículas se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico (Leica DM LS) y un programa de tratamiento de imágenes (Tabla 2) y un microscopio confocal (Leica TCS SP2) (Figuras 7a-d).

30 style="text-align: center;">TABLA 2

Distribución de tamaños de las micropartículas con levadura en función de la concentración inicial de la misma

	Concentración de levadura	d _{medio} (μm)	DS (μm)
35			
	2·10 ⁸ lev/gr	11,32	1,34
40	4,8·10 ⁹ lev/gr	12,36	1,66

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados **caracterizado** por llevarse a cabo en dos etapas: una primera de enfocamiento capilar flow focusing de al menos un fluido líquido, seguida de una etapa de solidificación para convertir las gotas en partículas.
2. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según las reivindicaciones 1 **caracterizado** porque los fluidos líquidos enfocados pueden ser líquidos simples, mezclas, disoluciones, suspensiones, emulsiones, sólidos licuados, elegidos de forma que permitan la generación de un micro chorro estable del fluido o fluidos enfocados por el fluido enfocante.
3. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según las reivindicaciones 1-2 **caracterizado** porque al menos uno de los fluidos líquidos enfocados que se utilizan debe contener los compuesto lábiles, que quedan encapsulados en las partículas que los contienen.
4. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según las reivindicaciones 1-3 **caracterizado** porque al menos uno de los fluidos líquidos enfocados que se utilizan incluye materiales poliméricos., sílica, metales o cerámicas, que constituyen la matriz de dichas partículas.
5. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 4 **caracterizado** porque al menos uno de los fluidos líquidos enfocados es preferentemente una disolución, mezcla, suspensión y/o emulsión homogénea de un material polimérico.
6. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos Miles encapsulados según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el material polimérico. inyectado puede ser sintético o natural, soluble en agua o en disolventes orgánicos.
7. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 6 **caracterizado** porque el material polimérico. se selecciona preferentemente de entre los siguientes: polialcoholes, poliacetales, poliéteres, poliéster es (como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli (caprolactona) y similares y sus copolímeros), poliortoésteres, polianhídridos (como el ácido polisemias, ácido polifumárico, poli(carboxifenoxi propano), poli(carboxifenoxi hexano) y similares y sus copolímeros), polialdehidos, policetonas, policarbonatos, poli(iminocarbonatos), poliamidas, poliimididas, poliacrilatos, poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poliestirenos, policloruros, polifluoruros, derivados polivinílicos, poliolefinas, polifosfatos, poli(organofosfazenos), poli(anhídridos-co-imidas), polisacáridos y derivados de carbohidratos, poli(aminoácidos), y polímeros derivados de macromoléculas.
8. Procedimiento de preparación de partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 7 **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.
9. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados obtenidas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-4 **caracterizado** porque los productos son lábiles incluidos en la invención tienen inestabilidad térmica, fotosensibilidad, sensibilidad enzimática, microbiológica y química.
10. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 9 **caracterizado** porque los productos lábiles son moléculas orgánicas, fármacos y compuestos con actividad terapéutica y/o profiláctica, péptidos, proteínas y complejos proteicos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNA, LNAs, DNA, RNA, virus y afines, orgánulos, células, microorganismos y mezclas de los mismos.
11. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según las reivindicaciones 9-10 **caracterizado** porque la matriz de dichas partículas incluye materiales poliméricos., sílica, metales o cerámicas.
12. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la matriz es preferentemente una disolución, mezcla, suspensión y/o emulsión homogénea de un material polimérico.
13. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 12 **caracterizado** porque el material polimérico puede ser sintético o natural, soluble en agua o en disolventes orgánicos.
14. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el material polimérico. se selecciona preferentemente de entre los siguientes: polialcoholes, poliacetales, poliéteres, poliéster es (como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli(caprolactona) y similares y sus copolímeros), poliortoésteres, polianhídridos (como el ácido polisebácico, ácido polifumárico, poli(carboxifenoxi propano), poli(carboxifenoxi hexano) y similares y sus copolímeros), polialdehidos, policetonas, policarbonatos, poli(iminocarbonatos), poliamidas, poliimididas, poliacrilatos, poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poliestirenos, policloruros, polifluoruros, derivados polivinílicos, poliolefinas, polifosfatos, poli(organofosfazenos), poli(anhídridos-co-imidas),

ES 2 273 572 A1

polisacáridos y derivados de carbohidratos, poli(aminoácidos), polímeros derivados de macromoléculas, y todos los derivados de los anteriores y sus copolímeros.

5 15. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según las reivindicaciones 12-14 **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.

10 16. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicación 15 **caracterizado** porque los grupos reactivos de los materiales utilizados se disponen en la superficie de las partículas dirigidos hacia el exterior de las mismas.

15 17. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 11-14 **caracterizado** porque el material que conformara la matriz de la partícula puede llevar unido covalentemente moléculas de interés biológico que quedaran expuestas hacia la superficie de la partículas, preferentemente péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.

20 18. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-17 **caracterizado** porque el diámetro de dichas partículas está comprendido entre 0,01 y 1000 micras, preferentemente entre 0,01 y 200 micras y aun más preferentemente entre 0,01 y 80 micras.

25 19. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-18 **caracterizado** porque dichas partículas tiene una distribución de tamaños cuya desviación estándar esta comprendida entre el 10 y el 30%, preferentemente entre el 3 y el 10% y aun más preferentemente menor del 3%.

30 20. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-19 **caracterizado** porque las partículas obtenidas pueden ser sólidas, huecas o porosas.

35 21. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-20 **caracterizado** porque las partículas tienen una matriz homogénea.

40 22. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-20 **caracterizado** porque las partículas presentan una matriz no homogénea constituida por distintas capas concéntricas.

45 23. Partículas de tamaño micro y nanométrico con productos lábiles encapsulados según la reivindicaciones 9-22 **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.

50

55

60

65

FIGURAS

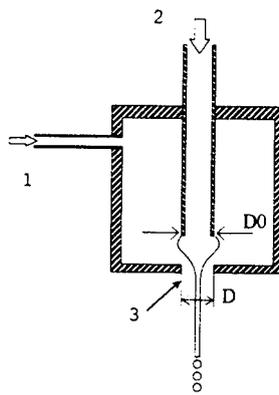


Figura 1

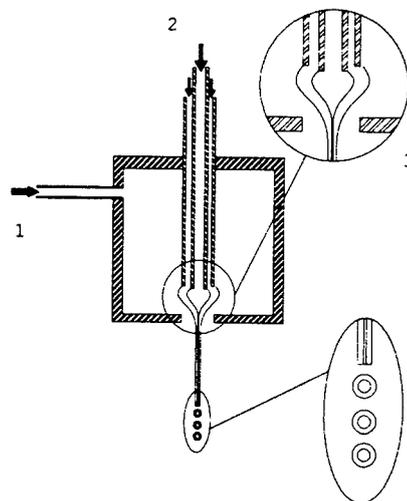


Figura 2

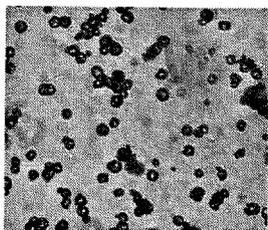


Figura 3a



Figura 3b

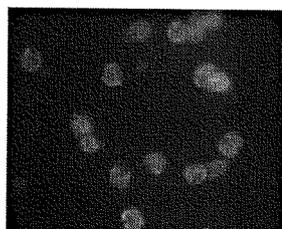


Figura 3c



Figura 4a

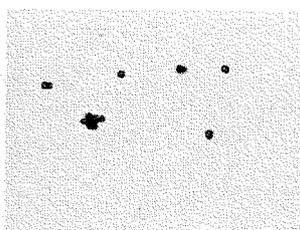


Figura 4b



Figura 4c

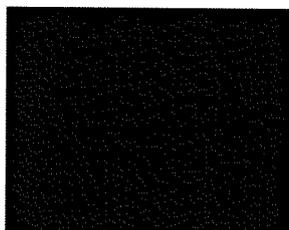


Figura 5a

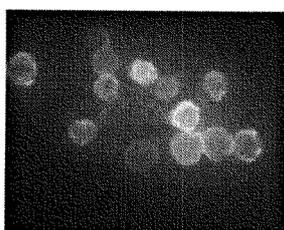


Figura 5b

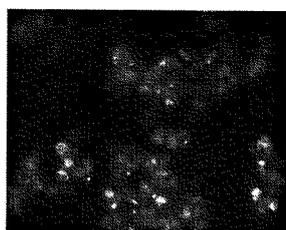


Figura 6a

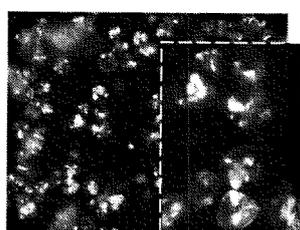


Figura 6b

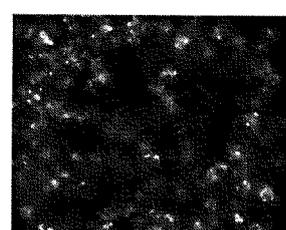


Figura 6c

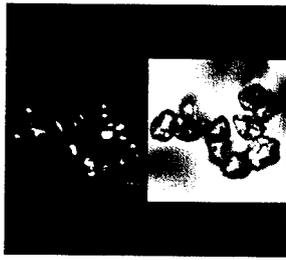


Figura 7a y 7b

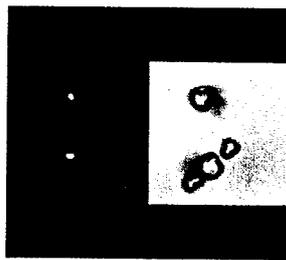


Figura 7c y 7d



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 273 572

② Nº de solicitud: 200501107

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.05.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2001036495 A1 (GANAN-CALVO) 01.11.2001, resumen; párrafos [8-24],[52-83],[110-179],[214-249]; figuras 1-4.	1-23
X	CH 563807 A5 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 15.07.1975, todo el documento.	1-23

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

11.04.2007

Examinador

A. Figuera González

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B01J 13/02 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A23P 1/04 (2006.01)

B05B 7/06 (2006.01)