

(19):



República Argentina
Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Industria, Comercio y de la
Pequeña y Mediana Empresa
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

(11) No de publicación:

(41) Fecha de publicación:

(51) Int. Cl.:

AR 101808 A1

11.01.2017

**B01J 8/00, A61K 9/127,
B05B 9/00**

(12)

Solicitud de Patente Independiente

(22) Fecha de presentación: **10/09/2015**

(21) Número de solicitud: **P150102891**

(71) Solicitante(s):

**COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA (CNEA) ,
AV. DEL LIBERTADOR 8250, (1429) CDAD. AUT. DE
BUENOS AIRES, AR**

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) , AV. RIVADAVIA
1917, (1033) CDAD. AUT. DE BUENOS AIRES, AR**

(72) Inventor(es):

**POLICASTRO, LUCIA; MADRID, ROSSANA E.;
CABALEIRO, JUAN M.; PODHAJECER, OSVALDO;
CERDA, BELÉN; BATALLA, MILENA; CONDE, ÁLVARO
J.**

(74) Representante: **1812**

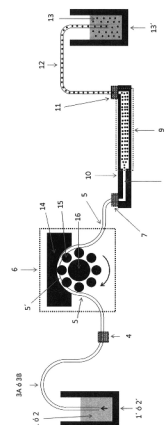
(54) Título:

**EQUIPO DE PRODUCCIÓN CONTINUA Y MÉTODO DE MICROFLUÍDICA PARA SINTETIZAR NANOVESÍCULAS
Y PARA ENCAPSULAR NANOPARTÍCULAS EN NANOVESÍCULAS**

(57) Resumen:

La solicitud trata de un equipo de producción continua de microfluídica portátil para la síntesis de nanovesículas y encapsulación de nanopartículas, que comprende una o más bombas peristálticas, que aspiran e impulsan a los fluidos en un régimen laminar, conectadas a reservorios que contienen reactivos lipídicos y reactivos acuosos correspondientemente, los cuales se conectan con los tubos flexibles de entrada de dicha bomba. Los tubos flexibles de salida de dichas bombas están conectados a un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos, denominado chip microfluídico, que posee en su interior microcanales que unen los distintos canales de entrada en una zona de reacción, en la cual se mezclan los reactivos exclusivamente por difusión y reaccionan a lo largo de un canal de focalización hidrodinámica hasta llegar a la salida, donde se conectan mediante tubos a reservorios donde se recolectan las nanovesículas. Los métodos para sintetizar nanovesículas a través del equipo de producción continua de la solicitud se lleva a cabo mediante las siguientes etapas: preparación de solución de lípidos y suspensión acuosa que contiene o no nanopartículas, etapa de bombeo peristáltico, en la que se transportan dichos reactivos en régimen laminar a través de uno o más microcanales, una etapa de focalización hidrodinámica, donde se producen distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales, una etapa de difusión, en la que se produce el auto - ensamblado de las nanovesículas, así como el encapsulado de dichas nanopartículas dentro de dichas nanovesículas y una etapa de recolección de dichas nanovesículas.

P15_2891





Fecha/Hora: 10/09/2015 14:25:12.353

Agente: FERNANDEZ, JORGE ANIBAL

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD	
--	--

I. SOLICITANTE (S)		CANTIDAD DE SOLICITANTES				
Consignar Nombre y Apellido o Denominación Social (de uno de ellos el resto en ANEXO)					C.U.I.T. / C.U.I.L. / C.D.I. :	
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA					30-54666021-0	
Personas Jurídicas: Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J.	Fecha	Número	Libro	Tomo	Nº Folio	
Personas Físicas:	D.N.I.	Estado Civil:			Nupcias	
Nombre y apellido del cónyuge:						
Domicilio Real- Calle					Nº	
Av. Del Libertador					8250	
Localidad:	Ciudad Autónoma de Buenos Aires		C. P. Nº	1429	País de Residencia:	AR
Domicilio Legal - Calle - Nº - Localidad - Provincia					Código Postal	
Av. Del Libertador 8250, Ciudad Autónoma de Buenos Aires					1429	
Dirección de e-mail:	patentes.invención@cnea.gov.ar			Teléfono:	011-4704-1241	

Título de la invención		Equipo de producción continua y método de microfluídica para sintetizar nanoveículas y para encapsular nanopartículas en nanovesículas		
Carácter de la Patente /Modelo de Utilidad		independiente		
Adicional a:	Patente N°		Divisional de la Solicitud N°	
	Solicitud N°			

[illegible]

DEPOSITO DE MICROORGANISMOS	
FECHA DE DEPOSITO	
Nº DE ACCESO AL DEPOSITO	
Nombre de la Institución Depositaria	
Domicilio de la Institución	País
Datos del Depositante	
Origen del Material Biológico y Genético	

Continúa en hoja anexa:	X
-------------------------	---

III. SOCIEDADES

SOCIEDAD REPRESENTADA POR QUIEN
DECLARA BAJO JURAMENTO QUE INVISTE EL CARÁCTER DE QUE SU
MANDATO SE ENCUENTRA VIGENTE Y LA SOCIEDAD SE HALLA INSCRIPTA EN

Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J.

Fecha:

Número

Nº Folio

Tomo:

IV. MANDATOPoder inscripto en el I.N.P.I. bajo el número **EN ESTE ACTO SE AUTORIZA A:**

- 1) DNI
- 2) DNI
- 3) DNI

☒ Para todas aquellas gestiones de mero tramite tales como practicar desgloses, retirar testimonios, certificados, títulos, copias y notificaciones en el expediente.

☒ Contestar vistas, desistir solicitud, realizar peticiones (solamente cuando el Autorizado sea Agente de la Propiedad Industrial)

SE ACOMPAÑA PODER

AGENTE N°

1812

V. DECLARACION DE DIVULGACION PREVIA

A los efectos de lo indicado en el Art. 5° de la Ley 24.481, manifiesta que el presente invento ha sido

previamente: ☒ SI En caso afirmativo en fecha: ¿por qué medio?

VI. OBSERVACIONES

Se deja constancia que los datos vertidos en el presente formulario revisten el carácter de declaración jurada; cualquier falsedad inserta en el mismo acarreará las consecuencias legales correspondientes.

NOTA: El pago del arancel correspondiente deberá concretarse al momento de la presentación o durante, las dos primeras horas de atención del subsiguiente día hábil. De no ocurrir el pago en dicho plazo, de pleno derecho de tendrá por no efectuada la presentación, la que no producirá efecto alguno.

Firma del / los autorizado / s

Firma del solicitante o su apoderado o representante legal

USO INTERNOLA PRESENTACION CONSTA DE FOJAS

CAMBIO DE DOMICILIO / CORREO ELECTRONICO / TELEFONO:

FECHA

Domicilio Real - Calle

N°

Localidad: }

C. P. N° }

País de Residencia: }

Domicilio Legal - Calle - N° - Localidad - Provincia

Codigo Postal

Dirección de e-mail: }

Teléfono: }

CAMBIO DE APODERADO / AUTORIZADO:

FECHA

Nuevo Apoderado o Autorizado:

TRANSFERENCIA O CAMBIO DE RUBRO:

INPI Exp.: **20150102891**



Trámite: 15158692 PATENTES Importe: \$828.-

Fecha/Hora: 10/09/2015 14:25:12.353

Agente: FERNANDEZ, JORGE ANIBAL

L

**ADMINISTRACION
NACIONAL DE PATENTES Y
MODELOS DE UTILIDAD**



ANEXO TITULARES

Título de la invención					
Cácter de la Patente / Modelo de Utilidad					
Consigñar Nombre y Apellido o Denominación Social					C.U.I.T. / C.U.I.L. / C.D.I.:
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas					30-54666038-5
Personas Jurídicas: Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J.	Fecha	Número	Libro	Tomo	Nº Folio
Personas Físicas:	D.N.I.	Estado Civil:		Nupcias	
Nombre y apellido del cónyuge:					
Domicilio Real- Calle					Nº
Av. Rivadavia					1917
Localidad:	Ciudad Autónoma de Buenos Aires	C. P. Nº	1033	País de Residencia:	AR
Dirección de e-mail:		Teléfono:			

[Firma manuscrita]

Firma del solicitante o su representante legal

Consigñar Nombre y Apellido o Denominación Social					C.U.I.T. / C.U.I.L. / C.D.I.:
Personas Jurídicas: Datos de Inscripción en R.P.C. / I.G.J.	Fecha	Número	Libro	Tomo	Nº Folio
Personas Físicas:	D.N.I.	Estado Civil:		Nupcias	
Nombre y apellido del cónyuge:					
Domicilio Real- Calle					Nº
Localidad:		C. P. Nº		País de Residencia:	
Dirección de e-mail:		Teléfono:			

Firma del solicitante o su representante legal

**MEMORIA DESCRIPTIVA
DE LA
PATENTE DE INVENCION**

Sobre:

**“Equipo de producción continua y métodos de
microfluídica para sintetizar nanovesículas y para
encapsular nanopartículas en nanovesículas”**

Solicitada por:

**Comisión Nacional de Energía Atómica
con domicilio en Av. Del Libertador 8250, Capital Federal**

&

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
con domicilio en Av. Rivadavia 1917, Capital Federal**

Inventores:

Álvaro J. CONDE

Milena BATALLA

Belén CERDA

Oswaldo PODHAJCER

Juan M. CABAILEIRO

Rossana E. MADRID

Lucía POLICASTRO

Por el plazo de:

20 años

DESCRIPCIÓN

Se presenta un equipo de producción continua y métodos de microfluídica para sintetizar nanovesículas y para encapsular nanopartículas en nanovesículas.

Las mezclas definidas de lípidos reconstituidas en solvente orgánico y la fase acuosa conteniendo o no las nanopartículas de interés, se inyectan al sistema de forma independiente desde reservorios con el fin de generar una combinación de flujos laminares por focalización hidrodinámica, y obtener nanovesículas y encapsulados. Las nanovesículas son monodispersas con características comparables a los obtenidos por métodos convencionales.

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de la microfluídica. En particular, la presente invención se refiere a un equipo de producción continua de microfluídica portátil para la síntesis de nanovesículas y encapsulación de nanopartículas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un equipo formado por microbombas peristálticas, motores paso a paso y un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos, denominado chip, que pueden ser utilizados para la síntesis de nanovehículos con aplicaciones industriales.

ESTADO DE LA TECNICA Y PROBLEMAS A SOLUCIONAR

Los métodos convencionales de obtención de (nanovesículas) partículas en suspensión o sistemas coloidales se basan en la mezcla de fases a granel, la química no homogénea y métodos mecánicos durante la formación; por lo tanto, las partículas sintetizadas por estos métodos son a menudo polidispersas en tamaño y lamellaridad. Los métodos convencionales tales como la hidratación de films lipídicos, la evaporación en fase reversa y las técnicas de doble emulsión, a menudo requieren de post-procesado de la muestra a través de equipamientos costosos y voluminosos para dar homogeneidad adecuada y lograr altas tasas de incorporación de agentes químicos. De los métodos mencionados, los más utilizados para la obtención de nanovehículos son las emulsiones. El rango de la escala de obtención de micro o nanopartículas a través de

este método es función del tipo de dispersores y homogeneizadores utilizados. Sin embargo en ambos casos, el proceso de emulsificación tiene dos pasos: la dispersión y los pasos de homogeneización.

i) La dispersión es obtenida por agitación mecánica en un recipiente cerrado. La fase continua se introduce en un recipiente que es agitado permanentemente (por ejemplo, Ultraturax®) posteriormente se vierte el dispersado o fase que contiene los principios activos. Este paso permite crear una dispersión aproximada o "premezcla", de dimensiones entre 10 y 100 micras de diámetro con una distribución de gran tamaño.

ii) La etapa de homogeneización es esencial para producir la suspensión fina y estable. Esto reducirá el diámetro medio y mejora la dispersión de tamaños, cada uno de estos puntos impacta significativamente en la estabilidad de la suspensión. Los equipos utilizados son los sistemas de rotor / estator (por ejemplo Ultraturax o un molino coloidal) dando dispersiones estables alrededor del micrómetro. Por otro lado, homogeneizadores de alta presión permiten disminuir el tamaño en un rango nanométrico, por debajo del micrómetro e incluso por debajo de 100 nm. El siguiente paso es la fabricación de las partículas, ya sea por precipitación del polímero preformado solubilizado en la fase dispersa (por ejemplo, desplazamiento del disolvente, evaporación etc.), o por síntesis in situ de polímeros (en este caso, fase dispersa está hecho de monómeros). Como resultado, se obtienen micro / nanopartículas que contienen los principios activos en sus interior. Si bien existen otros métodos para la fabricación de nanopartículas que se obtienen sin pasar a través de sistemas emulsionados, por ejemplo, que se basan en el secado por pulverización, granulación o extrusión / esferonización, la gran mayoría de los procesos de fabricación de nanopartículas incluyen la etapa de emulsificación. En este contexto, estos métodos convencionales presentan serios inconvenientes como la escasa flexibilidad del proceso de formulación, el corto margen de maniobra para el control del tamaño de partícula y la imposibilidad de controlar y ajustar el proceso en tiempo real. Estos métodos incluyen procesos de etapas múltiples, implican etapas de limpieza (de los contenedores, de los agitadores, etc.), en la mayoría de los casos utilizan solventes orgánicos que necesitan ser removidos, consumen energía, y finalmente no permiten la producción continua (I.U. Khan et al. Journal of Controlled Release 2013). Además, los métodos

convencionales también requieren cantidades considerables de reactivos, disminuyendo la productividad.

La tecnología de microfluidos es el estudio de fluidos que fluyen a escala microscópica y permite el control preciso y predecible de los fluidos debido al régimen laminar - debido a un bajo número Reynolds - en el que estos sistemas suelen operar. En los últimos años se han investigado técnicas novedosas basadas en microfluídica para la producción de nanovesículas (Goran T. Vladislavljević et. al. Advanced drug delivery reviews, 2013).

Las nuevas tecnologías microfluídicas ofrecen una serie de ventajas en comparación con los métodos convencionales. A través de estas es posible un mejor control de proceso y reproducibilidad, además de una muy buena uniformidad de las características de los nanomateriales y un uso eficiente de los materiales y reactivos (S. Krishnadasan et al, Advances in Chemical Engineering, 2010). (D. van Swaay and A. deMello, Lab Chip, 2013).

Entre las tecnologías microfluídicas para producción de vesículas, la técnica de focalización hidrodinámica ha tenido especial atención desde su introducción por Jahn et al 2004. El proceso implica un flujo de lípidos disueltos en un solvente orgánico que pasa entre dos flujos acuosos en un canal microfluídico. Las partículas se forman por un proceso difusivo en las interfaces líquidas, siendo posible controlar el tamaño de las mismas por una modulación de las relaciones de flujo de las fases. De esta manera, se evitan los pasos de procesamiento posterior (inherente a los métodos convencionales) especialmente la reducción de tamaño por extrusión. (Patente Nro: AU2009333177B2; A. Jahn et. al. Langmuir, 2007).

Los sistemas microfluídicos incorporan en general diversos componentes para su funcionamiento, como ser bombas, válvulas, chips de reacción de microfluidos, reservorios de reactivos, contenedores de productos, interconexiones de componentes, controladores y ordenador. En general, estos sistemas necesitan ser conectados a bombas de jeringas, lo que limita su escalabilidad y dificulta su portabilidad e incorporación dentro de otros instrumentos, por ejemplo incubadoras (D J Laser J. Micromech. Microeng. 2004). Por otra parte, los chips deben ser conectados a las

bombas a través de largos conductos que contienen grandes volúmenes muertos lo cual implica pérdida de reactivos y un pobre control transitorio del fluido (debido a grandes compliancias e inertancias), interfiriendo con la eficiencia y productividad del sistema. Además, estas bombas poseen un volumen de trabajo limitado por la jeringa que se utiliza, siendo las más grandes de 60 ml aproximadamente.

Si bien, la tecnología microfluídica para producción de vesículas ofrece ventajas en comparación con las técnicas convencionales, las limitaciones prácticas, incluyendo la fiabilidad, accesibilidad, la portabilidad, facilidad de uso y el control de los dispositivos de microfluidos, dificultan su aplicación e inserción industrial.

En esta invención se solucionan los principales problemas asociados a los sistemas microfluídicos de generación y encapsulado de nanovesículas, mencionados anteriormente.

En primer lugar, el equipo de producción continua de microfluídica de la invención utiliza una microbomba peristáltica con la que se supera la limitación del volumen de trabajo discreto dada por las bombas de jeringa. Los sistemas de bombeo peristáltico tienen un ciclo de trabajo teóricamente infinito, ya que es posible recargar indefinidamente los reservorios de manera externa sin necesidad de interrumpir el proceso de producción.

La microbomba peristáltica posee varios canales que pueden ser conectadas directamente a los chips microfluídicos. De esta manera se reducen los volúmenes muertos y el volumen de trabajo puede ser escalado simplemente cambiando el recipiente donde se alojan los reactivos. Es decir, con una misma microbomba se puede realizar producciones a baja, mediana y gran escala siendo posible trabajar con volúmenes de cientos de microlitros a litros de muestra.

Finalmente, el equipo de producción continua de microfluídica de la invención es de reducido tamaño, pudiendo ser completamente integrada en un equipo portátil, que no necesita instalaciones especiales y ocupa poco espacio en un laboratorio. Esto permite que el equipo pueda ser utilizado para la generación continua de nanovesículas

monodispersas en un ambiente sanitario cerca de la cama del paciente o en una planta industrial de producción de nanovesículas.

Del análisis de patentes, hemos considerado relevantes los siguientes documentos de los que podemos mencionar:

1) Patente/Solicitud Nro: CN1020684091) Título: “Method for preparing mono-disperse microemulsion, liposome and microsphere based on microfluidic technology”. Se trata de una patente de un método de generación de liposomas que utilizan es no microfluídico, en el mismo realizan una síntesis previa de emulsiones W/O y posterior encapsulado de la droga. Se obtienen tamaños de liposomas entre 10 -500 micrones. El método de encapsulado utilizado genera liposomas grandes.

2) Patente/Solicitud Nro: AU2009333177B2. Título: “Method of making small liposomes”. Este documento presenta un método de producción de liposomas de tamaño inferior a 200nm por métodos microfluídicos de focalización hidrodinámica no realizan encapsulado de nanopartículas, no mencionan el uso de microbombas peristálticas y ciclos de trabajo infinito o un sistema de microfluídica portátil.

3) Patente/Solicitud Nro: US2015115488. Título: “Microfluidic Liposome Synthesis, Purification and Active Drug Loading”. El dispositivo microfluídico y el método de preparación que comprende la preformación de liposomas y generación de gradiente de pH para encapsulación de droga antineoplásica por diferencia de gradiente de pH.

4) Patente/Solicitud Nro: CN103126990. Título: “Preparation method of targeting magnetic drug loaded liposome”. Este documento describe un método de producción liposomas magnéticos por el método de evaporación en rotavapor. El método utilizado no es microfluídico. La producción no es continua.

5) Patente/Solicitud Nro: US2008095705. Título: “Methods and Devices for Facile Fabrication of Nanoparticles and Their Applications”. En este documento se presenta un dispositivo y método de microfluídica que utiliza inyección secuencial o pulsada y enfocado hidrodinámico para fabricar nanopartículas con monitoreo en tiempo real con un microprocesador controlador y programador pulsátil.

6) Patente/Solicitud Nro: US2005112184. Título: "Controlled vesicle self-assembly in continuous two phase flow microfluidic channels". En este documento presentan Dispositivo y método microfluídico para fabricar nanopartículas monitoreo en tiempo real con un microprocesador controlador y programador pulsátil no describen el uso de bombas peristálticas en el sistema microfluídico.

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es solucionar los principales problemas asociados a los sistemas microfluídicos de generación y encapsulado de nanopartículas en nanovesículas, lograr superar la limitación en cuanto al escalado de la producción y problema asociado a las bombas de jeringa con un equipo microfluídica liviana y portátil que permita su utilización tanto en el ámbito sanitario como en una planta industrial.

El equipo de microfluídica de la invención utiliza microbombas peristálticas para la producción continua de nanovesículas monodispersas y el encapsulado de las mismas con nanopartículas por focalización hidrodinámica en chips microfluídicos en un mismo proceso. Con la incorporación de una microbomba peristáltica se supera la limitación en cuanto al escalado de la producción y problema asociado a las bombas de jeringa. Esto se debe a que el ciclo de trabajo asociado a los sistemas de bombeo peristáltico es infinito, lo que permite la producción desde escala prototipo a escala industrial.

Además, el reducido tamaño de la microbomba y su conexión directa con los chips microfluídicos reduce significativamente los volúmenes muertos y mejora el control de los fluidos.

Finalmente, el reducido tamaño de todos los componentes del sistema converge en un equipo liviana y portátil, lo que permite gran flexibilidad en su utilización. Por ejemplo, puede utilizarse en el ámbito sanitario cerca de la cama del paciente o en una planta industrial.

Otro objeto de la invención es el método para la síntesis de nanovesículas y encapsulación de nanopartículas, que utilizando la equipo de microfluídica de la

invención, se realiza mediante un proceso de focalización hidrodinámica, en el cual se intercalan las fases y se producen varias interfases de reacción, por un proceso difusivo, para obtener como resultado vesículas monodispersas de tamaño entre 20 nm y 1000 nm.

El sistema microfluídico para la generación y encapsulado continuo de nanovesículas que comprende un sustrato que posee dos o más canales de entrada, una región de formación de nanovesículas y una o más salidas. La región de formación de las nanovesículas comprende una o más entradas por donde fluye una solución de lípidos y una o más entradas por donde fluye una solución tipo buffer. La solución de lípidos y la solución tipo buffer interactúan en la interfase de formación y forman una población de nanovesículas. La solución tipo buffer puede contener otras sustancias además del solvente y también partículas que son posteriormente encapsuladas en las nanovesículas. Las nanovesículas obtenidas tienen un diámetro medio de 20 nm a 1000 nm. y un índice de polidispersión menor al 20%. La eficiencia de encapsulado es entre el 40% y el 100%.

En el sistema microfluídico, objeto de la invención se generan nanovesículas y se encapsulan nanopartículas, obteniéndose en la salida nanovesículas que encapsulan nanopartículas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIGURA 1** muestra un esquema del equipo de producción continua de microfluídica de la invención en vista de planta para todos los canales.

La **FIGURA 2** muestra un esquema del equipo de producción continua de microfluídica de la invención en vista lateral particularizada para un canal cualquiera, sea de fase lipídica o acuosa.

La **FIGURA 3** muestra un esquema del método de generación de las nanovesículas para un sistema de tres entradas.

La **FIGURA 4** muestra un esquema del método de generación de las nanovesículas para un sistema de cinco entradas.

La **FIGURA 5** muestra el diseño de la zona de encuentro de fases de un chip microfluídico de diez entradas. Este sistema se utiliza en los ejemplos de uso 1, 2 y 3.

La **FIGURA 6** muestra la vista tridimensional en explosión del diseño de las capas del chip microfluídico utilizado para los ejemplos de uso 1, 2 y 3.

La **FIGURA 7** muestra, a fines informativos, una fotografía de un chip microfluídico terminado. En el recuadro se observa un acercamiento de la zona de encuentro de las fases.

La **FIGURA 8** muestra una fotografía del equipo de producción continua de microfluídica terminado. La segunda fotografía es una ampliación del área encerrada en el recuadro de línea punteada de la primera fotografía

La **FIGURA 9** muestra los resultados de una simulación de realización preferida de la invención, a través del diseño, fabricación y caracterización de un chip microfluídico y el equipo de la invención.

La **FIGURA 10** muestra los resultados del ejemplo de realización del Método de Generación y encapsulado continuo de nanovesículas de la invención.

La **FIGURA 11** muestra los resultados del ejemplo de realización del Método de obtención de nanoliposomas cargados con partículas magnéticas o nanoliposomas magnéticos de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A fin de una mejor comprensión de la presente invención y mayor entendimiento de las ventajas comentadas, más las que los entendidos en la especialidad podrán agregar, se realiza a continuación la descripción detallada de un ejemplo preferido de realización del equipo de producción continua de microfluídica de la presente invención, en base a los dibujos adjuntos. En las figuras, a iguales números de referencia corresponden

iguales o equivalentes elementos constitutivos del ejemplo de realización del equipo de la invención y de su instalación.

La **FIGURA 1** muestra un esquema del equipo de producción continua de microfluídica de la invención que comprende: un sistema de bombeo conformado por al menos una bomba peristáltica (6) que aspiran e impulsan a los fluidos en un régimen laminar, conectadas a reservorios (1' y 2') que contienen reactivos lipídicos (1) y reactivos acuosos (2) correspondientemente, a través de tubos de entrada (3A) (3B), los cuales se conectan con los tubos flexibles de entrada de la microbomba (5), los cuales pueden ser parte de una cinta microfluídica o no, a través de conectores (4). Los tubos flexibles de salida (5) de dicho sistema de bombeo (6) están conectados a un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), denominado chip microfluídico, mediante conectores (7). El chip microfluídico (10) posee en su interior microcanales (8A) (8B) que unen los distintos canales de entrada en una zona de encuentro de fases (9), o zona de reacción. En esta zona de reacción se mezclan los reactivos (1) (2) exclusivamente por difusión y reaccionan a lo largo de un canal de focalización hidrodinámica (9') hasta llegar a la salida (11), donde se conectan mediante tubos (12) a reservorios (13') donde se recolecta el producto (13).

El número mínimo de microcanales de entrada (8A y 8B) del dispositivo canalizador y mezclador es tres para obtener un proceso de focalización hidrodinámica, pero debido a la flexibilidad del presente equipo dicho número puede ser mayor, llegando incluso a ser de más de 80 microcanales, dependiendo de la aplicación en particular.

En la **FIGURA 2** muestra un esquema del equipo de producción continua de microfluídica en vista lateral con la entrada particularizada para uno de los canales, sea fase lipídica, (1') o de fase acuosa (2') por razones de simplicidad. El reactivo (1 ó 2) es aspirado por la presión de vacío que genera la microbomba peristáltica (6) a través de los tubos de entrada (3A) (3B) que se conectan a los tubos flexibles de entrada de la microbomba (5) mediante conectores (4). Los tubos flexibles de la microbomba (5), que pueden formar parte o no de una cinta microfluídica que los contiene, se alojan en el cuerpo de la bomba (14). Al comprimir el elemento tubular (5) por la acción giratoria del rotor (16) y sus correspondientes rodillos (15), estos recuperan seguidamente su forma inicial creando un vacío y la consiguiente aspiración del fluido. El fluido (1 ó 2)

penetra en el espacio formado (5') entre los rodillos (15), que comprimen el tubo flexible (5) y empujan el fluido (1 ó 2) hacia la salida por el siguiente rodillo. Los tubos flexibles (5) de la microbomba peristáltica (6) están conectados a un chip microfluídico (10) mediante conectores (7), que pueden ser removibles o fijos. Los tubos flexibles (5) a la salida de la microbomba pueden ser conectados a otro tipo de tubos (distinto material y dimensiones) antes de llegar al chip microfluídico (10). Una vez que el reactivo (1 ó 2) ingresa al chip microfluídico (10), fluye por los microcanales de conexión (8A) (8B) fabricados en el mismo chip hasta llegar a la zona de reacción (9) o zona de encuentro de fases. En esta zona de reacción (9) se ponen en contacto las fases lipídicas (1) y las acuosas (2) y se produce la formación de las nanovesículas (13) y también el encapsulado de los compuestos y/o partículas si es que estaban inicialmente contenidas en el reactivo (2). Las nanovesículas en suspensión (13) egresan por la salida del chip microfluídico (11) hacia un reservorio (13') donde se recolectan los resultados (13) a través de un tubo de salida (12). Se destaca que este proceso de formación es continuo y se da mientras que los reactivos fluyan por los microcanales, siendo teóricamente posible el rellenado "infinito" de los reservorios de los reactivos.

Los tubos de entrada (3) pueden ser de cualquier material que no infrinja modificaciones a los reactivos (1 ó 2) ni sea degradado por los mismos. Los tubos flexibles (5) pueden ser de cualquier material que pueda ser deformado fácilmente de forma elástica sin daño ni histéresis y que además no infrinja modificaciones a los reactivos (1 ó 2) ni sea degradado por los mismos. El rotor (16) de la bomba peristáltica puede ser manejado por cualquier motor o sistema que sea capaz de entregar suficiente torque al rotor (16) para que la bomba funcione de acuerdo a la aplicación.

El chip microfluídico (10) puede estar fabricado en dos o más capas de material polimérico, silicio, vidrio, cuarzo, cerámica o metales. Los microcanales (8A) (8B) se maquinan por diversos métodos según el material usado: fresado, láser, corte, moldeado térmico, replicación de molde, litografía, cañón de electrones, cañón de iones, litografía de rayos x, etc. Las capas se adhieren entre sí mediante diversos métodos para formar estructuras selladas que permiten el flujo de los fluidos. Estos métodos pueden ser: laminado térmico, laminado térmico asistido por ultravioleta o plasma, laminado asistido por ultrasonido, laminados asistido por láser, laminado por adhesivos químicos y laminado por solventes químicos. La lista no es exhaustiva.

A fin de una mejor comprensión de la presente invención y mayor entendimiento de las ventajas comentadas, más las que los entendidos en la especialidad podrán agregar, se realiza a continuación una breve descripción, dividida en etapas, del método para la síntesis continua de nanovesículas y encapsulado de nanopartículas, de la presente invención.

1. Una etapa de preparación de reactivos, en la que se deposita una fase de solución de solvente orgánico (1) que contiene lípidos disueltos en un recipiente contenedor (1'), y una segunda fase de una solución acuosa (2) en otro recipiente contenedor (2'),
2. Una etapa de bombeo continuo, a través de una microbomba peristáltica, en la que se transportan dichos reactivos (1 y 2) en régimen laminar, a través de uno o más microcanales, desde los recipientes contenedores (1' y 2') de dichos reactivos (1 y 2) hacia la entrada de un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10),
3. Una etapa de focalización hidrodinámica, en la que se fuerza la dirección y el sentido de dichos flujos laminares de dichos reactivos (1 y 2) hacia una zona de reacción (9), con el fin de intercalar las fases y producir distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales,
4. Una etapa de difusión, en la que se produce el auto-ensamblado de las nanovesículas en una reacción termodinámicamente favorable,
5. Una etapa de recolección, en la que dichas nanovesículas se acumulan en un recipiente contenedor (13') conectado a dicho dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), dando por resultado vesículas monodispersas (13) de un tamaño de entre 20nm y 1000nm.

La bomba peristáltica, componente del equipo descrito, posee un ciclo de trabajo infinito, lo que posibilita recargar indefinidamente los reservorios de reactivos sin interrumpir el proceso de producción.

La **FIGURA 3(a)** muestra un esquema del método de generación de las nanovesículas para un sistema de tres entradas. Este sistema genera dos interfaces (17). El chip microfluídico posee microcanales que conducen los reactivos (1) (2) desde las entradas hacia la zona de reacción, dada por un microcanal con una determinada longitud. En esta zona se produce el encuentro de los reactivos mediante un proceso de focalización hidrodinámica, en el cual la fase orgánica que contiene los lípidos (1) es focalizada por dos flujos de fase acuosa (2) obteniéndose dos interfases de reacción para la generación de nanovesículas.

En la **FIGURA 3(b)** se observa que mediante un proceso puramente difusivo en cada interfase el flujo de lípidos en solvente orgánico es completamente solvatado por la fase acuosa que lo focaliza, produciéndose el autoensamblado de los lípidos para formar bicapas. Una bicapa de lípidos posee una energía determinada asociada a su borde, pues las colas hidrofóbicas se exponen al agua y esta energía es proporcional al perímetro de la bicapa. Esta energía se puede minimizar mediante la eliminación del borde si la bicapa se cierra para formar una vesícula esférica. La energía total de sistema disminuye a medida que los bordes de bicapa se encuentran y desaparecen. De este modo se obtienen nanovesículas (18) en una reacción termodinámicamente favorable. Las fuerzas desestabilizadoras durante la focalización hidrodinámica disminuyen la tasa de fusión de bicapas y pueden dar lugar a la fragmentación de la bicapa. Este fenómeno puede resultar en la formación de vesículas más pequeñas.

La **FIGURA 4** muestra un esquema del método de generación de las nanovesículas para un sistema de cinco entradas. Este sistema genera cuatro interfaces (17). El chip microfluídico posee cinco microcanales que conducen los reactivos desde las entradas hacia la zona de reacción, dada por un microcanal con una determinada longitud. En esta zona se produce el encuentro de los reactivos mediante un proceso de focalización hidrodinámica, en el cual cada uno de los flujos de fase orgánica que contienen los lípidos (1) son focalizados por dos flujos de fase acuosa (2), obteniéndose en este sistema cuatro interfases de reacción para la generación de nanovesículas.

El método puede incluir n interfases de generación adaptando el diseño del chip para tal fin. La FIGURA 4 es un ejemplo del incremento del número de interfases en el modelo experimental.

Para mayor comprensión, se explica a continuación un sistema de 10 entradas para la generación de 8 interfases de reacción con la configuración y disposición geométrica de canales que se muestra en la FIGURA 5. En la misma se puede observar el diseño de la zona de encuentro de fases para el chip microfluídico (10) del equipo de la invención. La FIGURA 5 muestra un esquema de la zona de microcanales donde se realiza el encuentro entre las fases lipídicas (1) y las fases acuosas (2). Los números 1 representan los lípidos en solvente orgánico y los números 2 representan la fase acuosa. De esta manera con 10 entradas (4 lipídicas y 6 acuosas) se pueden generar 8 interfases de generación de nanovesículas que aumentan el rendimiento de producción. La zona central marcada con rectángulo de línea cuadriculada es la zona de reacción (19), donde se encuentran los canales de focalización hidrodinámica (9').

Con el fin de una mejor comprensión, la FIGURA 6 muestra una vista en explosión del diseño de las capas del chip microfluídico, ad hoc para el sistema de 10 entradas que se muestra en la FIGURA 5. Los chips microfluídicos fueron fabricados utilizando una microfresadora con control numérico por computadora. Los chips constan de tres capas hechas a partir de poli-metilmetacrilato (PMMA) de 1 mm de espesor. A fin de obtener canales cerrados, las tres capas del chip se laminaron a través de un proceso de termocompresión asistido por luz UV.

A modo ilustrativo, la FIGURA 7 muestra una fotografía del chip microfluídico terminado. Con el fin visualizar los microcanales de una mejor manera, los mismos fueron llenados con una solución de colorante alimenticio y agua. En esta fotografía se observan los microcanales y el canal de focalización hidrodinámica (9'). Los números (1) y (2) representan a la fase lipídica y la fase acuosa respectivamente. En esta FIGURA también se observa una ampliación de la zona marcada en el recuadro a fin de visualizar la zona de encuentro de fases.

En el equipo de producción continua de microfluídica, el bombeo se realiza mediante el uso de dos microbombas peristálticas de 8 canales. Cada microbomba es impulsada por

un servomotor, ambas manejadas por un controlador común. Las microbombas poseen una cinta microfluídica fabricada en polidimetilsiloxano (PDMS) que contiene a los tubos flexibles y conecta directamente con el chip y a un conector de entrada. El conector de entrada se conecta a tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) (ID: 0,8 mm / OD: 1,6 mm; Bola Bohlender, Alemania) fijados al conector por cilindros de silicona (ID: 1 mm / OD: 3 mm). Los tubos de PTFE están conectados a su correspondiente reservorio que contiene los componentes necesarios para la generación de vesículas. La salida del chip microfluídico está conectada directamente a un tubo de PTFE (también fijados por un cilindro de silicona) que termina en un reservorio de recolección. Con el fin de montar todos los componentes se diseñó y fabricó una placa base hecha a medida (maquinada por CNC en PMMA) que contiene a dos microbombas, al chip microfluídico, a los motores y a los reservorios de entrada y salida. A fines aclaratorios e informativos la **FIGURA 8** muestra una fotografía de la plataforma terminada.

La parte inferior de la fotografía es una ampliación del área encerrada en el recuadro de línea punteada de la parte superior, en donde: (a) Controlador de los servomotores, (b) Servomotor, (c) Placa base fabricada en PMMA, (d) Microbomba peristáltica, (e) Tubo de PTFE que conecta el reservorio de entrada con la cinta microfluídica, (f) reservorio de entrada, (g) cinta microfluídica montada en la microbomba peristáltica, (h) Cilindro de silicona que asegura su tubo de PTFE correspondiente al conector de la cinta microfluídica, (i) Chip microfluídico, (j) tubo de PTFE de salida y (k) reservorio de salida o recolección de resultados.

A continuación se realiza la caracterización de un chip microfluídico y el equipo de la invención, a través de la demostración del flujo laminar en los microcanales y formación de las interfaces. En este sistema de flujos por focalización hidrodinámica el número de Reynolds se puede aproximar como:

$$Re = \frac{QD_h}{\nu A}$$

donde Q es el caudal volumétrico [$m^3 s^{-1}$], D_H es el diámetro hidráulico del microcanal [m], ν es la viscosidad cinemática [$m^2 s^{-1}$] y A es el área de sección transversal del microcanal [m^2]. Utilizando las dimensiones de los microcanales y considerando agua

como el fluido de trabajo se obtiene que $Re=14$, un valor que corrobora que estamos trabajando en un régimen laminar. La FIGURA 9a muestra una micrografía del chip microfluídico en la zona del encuentro de fases cuando fluye una solución acuosa de colorante alimenticio y agua, ambas a $25 \mu\text{l min}^{-1}$. En esta micrografía se confirma además visualmente que el flujo es laminar.

También se realizaron simulaciones más complejas por método de los elementos finitos considerando todos los flujos a $25 \mu\text{l min}^{-1}$ y las propiedades de difusión de etanol en agua. El resultado de esta simulación se presenta en la FIGURA 9b y se observa que coincide con el patrón de flujos real que se presenta en la FIGURA 9a.

Sin embargo, la micrografía y la simulación de la FIGURA 9a y b, respectivamente, son fotos que fueron tomadas en un tiempo específico cuando el perfil de distribución de concentraciones (PDC) es similar al del estado estacionario. Esto se debe a que la microbomba peristáltica entrega un flujo pulsátil. A fin de comparar los diferentes PDC en diferentes momentos, se muestra en la FIGURA 9c la concentración de etanol (EtOH) a lo largo de una línea perpendicular a la dirección del flujo del canal principal (doble flecha blanca en la FIGURA 9b) cuando los PDC son máximos y mínimos. En esta figura, se puede apreciar que los PDC no difieren mucho de un flujo en estado estacionario. Sin embargo movimiento peristáltico (flujo pulsátil) perpendicular a la dirección del flujo podría inducir algo de mezcla. El bombeo en nuestro sistema se hace en fase (ya que todos los servomotores trabajan en sincronía), sin embargo las diferencias de microfabricación en los dispositivos pueden dar lugar a diferencias en los flujos de hasta un 6%, incluso dentro de la misma bomba, por lo que con fines experimentales podemos considerar que nuestros flujos son ligeramente fuera de fase.

Con el objeto de observar este efecto se realiza otra simulación adicional del sistema. Se trazan los PDC a una distancia de 30 mm de la zona de encuentro de fases que se muestra en la FIGURA 9c, en la curva etiquetada como "salida". A partir de esta información, se puede observar que la mezcla es casi completa a esta distancia.

Con el fin de corroborar experimentalmente que el proceso de mezclado en el equipo de la invención es completo al finalizar el canal de focalización hidrodinámica (9'), se realizaron experimentos de fluorescencia con análisis de imágenes en condiciones

representativas de un experimento para generación de nanovesículas. Para ello, se inyectaron en los canales correspondientes a la fase acuosa (2) una solución 1,5 mM de fluoresceína en solución de buffer fosfato salino (PBS) y etanol 90% en los canales correspondientes a la fase lipídica (1). El un flujo volumétrico de todos los canales se fija en 25 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Se tomaron micrografías en distintas zonas del canal de focalización (FIGURA 9d, e y f) con un microscopio de fluorescencia con una cámara CCD digital (QIClick; Qimaging, Canadá), y las mismas fueron analizadas en ImageJ. Con el fin de comparar los diferentes perfiles de distribución de concentración, se analiza en cada posición la intensidad de los píxeles, sobre una línea (doble flecha amarilla en la FIGURA 9d, e y f, se representó gráficamente en el gráfico embebido en su figura correspondiente. En la FIGURA 9f podemos observar que la mezcla es casi completa, lo que concuerda con los resultados predichos por la simulación que se muestran en la FIGURA 9c, representados por la leyenda “salida”.

A partir de estos resultados, podemos concluir que mezcla peristáltica en nuestro sistema se puede despreciar y el PDC sería similar en condiciones de flujo en estado estacionario, es decir, al flujo que se obtendría con bombas de jeringa. De este modo el equipo supera un problema clave relacionado con la generación de los liposomas en los sistemas microfluídicos: el uso de bombas de jeringa poco escalables y voluminosas, que generalmente necesitan ser conectadas a los chips a través de largo conexiones que generan grandes volúmenes muertos y un control deficiente de líquido.

En la figura 9 se observan dichos resultados (Confirmación flujo laminar, simulaciones y análisis de difusión), a saber:

- (a) Micrografía de la zona ampliada señalada en la FIGURA 7. A fines demostrativos la fase lipídica se reemplaza por colorante alimenticio y la fase acuosa por agua destilada.
- (b) Simulación realizada por método de elemento finito de la misma zona señalada en la FIGURA 9a considerando etanol y agua como elementos activos. (c) En esta figura se muestran los perfiles de concentración a lo largo de la línea marcada con la doble flecha blanca en la FIGURA 9b. Micrografías de fluorescencia del canal microfluídico, una solución de fluoresceína en buffer PBS y etanol 90% en diferentes posiciones. Las dobles flechas amarillas indican dónde se hizo cada ajuste: (d) el punto de encuentro

final de las fases, (e) entre el punto de encuentro final y la salida (aproximadamente 15mm) y (f) en el final del canal microfluídico (la salida se puede ver a la derecha).

Para mayor aclaración de la presente invención, y la manera que la misma ha de ser llevada a la práctica, se explican a continuación dos ejemplos de realización de los métodos de la invención:

1 .- Método de Generación y encapsulado continuo de nanovesículas

Preparación:

Con el objeto de evaluar la capacidad del presente equipo para la generación de vesículas se realizó la preparación de liposomas. Para ello, una combinación en relación molar de 93:3:4 de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y [metoxi(polietilenglicol)-2000]-fosfoetanolamina (PEG2000-DSPE) se disolvieron en cloroformo y luego fueron colocadas debajo de un flujo de nitrógeno para la completa remoción del solvente. El film lipídico fue reconstituido en etanol al 90% con una concentración total de lípidos de 40 mM.

Los liposomas fueron generados inyectando 0,5 ml de la solución reconstituida de lípidos en etanol en los canales identificados previamente (1) y 0,5 ml de solución de PBS en los canales identificados previamente (2). El flujo volumétrico de todos los canales se fija en 25 μ l/min. El resultado se somete a ultrasonido por 30 segundos y luego se dializa contra HBS 20 mM pH 7 durante toda la noche.

También se preparan liposomas por hidratación de film (método estándar) con el objetivo de comparar con los obtenidos por nuestro sistema. Para ello, 20 μ moles una combinación en relación molar de 93:3:4 de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocholina (POPC), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y [methoxi(polietilenglicol)-2000]-fosfoetanolamina (PEG2000-DSPE) se disolvieron en cloroformo y luego fueron colocadas debajo de un flujo de nitrógeno para la completa remoción del solvente. El film lipídico se hidrata posteriormente en 1 ml de solución de PBS. La preparación es extruida a través de membranas de policarbonato de 800 nm,

400 nm y 200 nm de diámetro utilizando un equipo extrusor comercial. Finalmente, los liposomas se someten a 30 segundos de ultrasonido.

Caracterización:

El tamaño promedio y el índice de polidispersión de los liposomas se determinaron por dispersión dinámica de luz (DLS en inglés). Las características morfológicas se observan por microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se vierten algunas gotas de la solución conteniendo nanoliposomas sobre una grilla de cobre, se realiza una tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se observan en el microscopio electrónico de transmisión a 160 kV.

Resultados:

El tamaño promedio de los liposomas vacíos fue de 90 ± 28 nm con un índice de polidispersión de 0,165 (FIGURA 10a). Las imágenes de TEM mostraron una morfología esférica, típica de estas partículas y una buena uniformidad de tamaños (FIGURA 10b).

Estos resultados corroboran la excelente capacidad de nuestro sistema para producir nanoliposomas sin necesidad de realizar reducción de tamaño de las muestras. En la FIGURA 10, se observan los resultados de ejemplo de uso 2, generación de liposomas vacíos. a) Distribución de tamaño en número de una muestra de nanoliposomas. b) Imagen TEM de los nanoliposomas de la misma muestra teñidos con acetato de uranilo al 2%.

2.- Método de obtención de nanoliposomas cargados con partículas magnéticas o nanoliposomas magnéticos

Preparación:

Con el objeto de validar la capacidad del equipo para la generación de nanovesículas y la encapsulación simultánea de partículas en su interior se realizó la generación de

nanoliposomas magnéticos, nanoliposomas que encapsulan nanopartículas magnéticas. Para ello, una combinación en relación molar de 93:3:4 de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y [metoxi(poli(etil)en(glicol))-2000]-fosfoetanolamina (PEG2000-DSPE) se disolvieron en cloroformo y luego fueron colocadas debajo de un flujo de nitrógeno para la completa remoción del solvente. El film lipídico fue reconstituido en etanol al 90% con una concentración total de lípidos de 40 mM.

Los nanoliposomas magnéticos fueron generados inyectando 0,5 ml de la solución reconstituida de lípidos en etanol en los canales previamente identificados (1) y 0,5 ml de una solución de nanopartículas magnéticas SO-Mag5 en los canales previamente identificados (2). El método de preparación de las nanopartículas fue previamente publicado [O. Mykhaylyk et al, Pharm. Res., 2012, 29, 1344-1365.]. El flujo volumétrico de todos los canales se fija en 25 μ l/min. El producto obtenido se centrifuga a 1000 g por 15 minutos para remover las partículas que no fueron encapsuladas. Finalmente, el producto obtenido se somete a ultrasonido por 30 segundos y luego se dializa contra HBS 20 mM pH 7 durante toda la noche.

También se preparan liposomas magnéticos por hidratación de film (método estándar) con el objetivo de comparar con los obtenidos por nuestro sistema. Para ello, 20 μ moles de una combinación en relación molar de 93:3:4 de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocholina (POPC), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y [metoxi(poli(etil)en(glicol))-2000] fosfoetanolamina (PEG2000-DSPE) se disolvieron en cloroformo y luego fueron colocadas debajo de un flujo de nitrógeno para la completa remoción del solvente. El film lipídico se hidrata posteriormente en 1 ml de solución de nanopartículas magnéticas. La preparación es extruida a través de membranas de policarbonato de 800 nm, 400 nm y 200 nm de diámetro utilizando un equipo extrusor comercial. Finalmente, los liposomas magnéticos se someten a 30 segundos de ultrasonido y se centrifugan a 1000 g por 15 minutos para remover las nanopartículas que no fueron encapsuladas.

Caracterización:

El tamaño promedio y el índice de polidispersión de los liposomas magnéticos se determinaron por dispersión dinámica de luz (DLS en inglés). Las características morfológicas se observan por microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se vierten algunas gotas de la solución conteniendo liposomas magnéticos sobre una grilla de cobre, se realiza una tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se observan en el microscopio electrónico de transmisión a 160 kV.

La eficiencia de encapsulado de las nanopartículas se evalúa como la relación hierro/fosfolípidos en peso de acorde a los métodos reportados [O. Mykhaylyk, Nat. Protoc., 2, 2007, 2391-2411].

Para evaluar la respuesta magnética de los liposomas magnéticos se calcula la velocidad promedio de los liposomas magnéticos expuestos a un campo magnético definido con el método descrito en la publicación [Conde et. al / Lab Chip 2014].

Resultados:

En la FIGURA 11a y la FIGURA 11c se presentan las distribuciones de tamaños en número de las nanopartículas magnéticas y de los liposomas magnéticos respectivamente. El tamaño promedio de las nanopartículas magnéticas y de los liposomas magnéticos fue de 68 ± 11 nm (PI 0.188) y 158 ± 30 nm (PI 0.180) respectivamente. El rango de tamaños y el índice de polidispersión indican que estos liposomas magnéticos serían adecuados para aplicaciones in-vitro o in-vivo.

La morfología de las nanopartículas magnéticas y los liposomas magnéticos fueron observadas a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se muestran en la FIGURAS 11b y 11d respectivamente. Las nanopartículas magnéticas se observaron mayormente dentro de los liposomas (FIGURA 11d). Las imágenes de TEM de los liposomas magnéticos mostraron una morfología esférica, típica de este tipo de liposomas y una buena uniformidad de tamaños. Se destaca que la morfología y el tamaño de los liposomas magnéticos se mantuvieron sin alteraciones por un mes luego de su generación. La relación en peso hierro/fosfolípidos de los liposomas magnéticos obtenidos por este equipo fue de 4.1 ± 1.1 . Se destaca que los liposomas magnéticos

obtenidos por métodos tradicionales (hidratación de film) mostraron tamaños similares (145 ± 35 ; PI 0.17) y similar relación hierro/fosfolípidos (4.1 ± 1.8).

Los liposomas magnéticos presentaron buena respuesta magnética confirmando que estas nanovesículas podrían ser usadas para las mismas aplicaciones biológicas y médicas que los liposomas magnéticos producidos por métodos tradicionales (FIGURA 11e y f).

En la Figura 11, se observan los resultados del Método de generación de nanoliposomas magnéticos, donde (a) DLS nanopartículas magnéticas (b) Imagen TEM de las nanopartículas magnéticas (c) Distribución de tamaño en número de una muestra de nanoliposomas que contienen nanopartículas magnéticas en su interior (nanoliposomas magnéticos) (d) Imágenes TEM de los nanoliposomas magnéticos de la misma muestra teñidos con acetato de uranilo al 2% (e) Movilidad magnética: Evolución temporal de turbidez normalizada de la suspensión de liposomas magnéticos luego de la aplicación de un campo magnético (f) Fotografías de una suspensión de liposomas magnéticos sin campo magnético (I), y luego de la aplicación de un campo magnético por minutos (II) y horas (III).

REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y determinado la naturaleza y alcance de la presente invención, y la manera en la que la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara lo que se reivindica como invención y de propiedad exclusiva:

1. Un equipo de producción continua para sintetizar nanovesículas y/o encapsular nanopartículas en nanovesículas, comprendido por un recipiente contenedor de solución de lípidos en fase orgánica (1'), al menos un medio de transporte de fluidos (3A) para transportar dicha solución de lípidos en fase orgánica hasta la entrada de un sistema de bombeo (6), donde la salida (7) de dicho sistema de bombeo (6) está conectada a un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), un recipiente contenedor de solución o suspensión acuosa (2'), al menos un medio de transporte de fluidos (3B) para transportar dicha solución o suspensión acuosa hasta la entrada de dicho sistema de bombeo (6), donde la salida de dicho sistema de bombeo (7) está conectada a dicho dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), el cual contiene surcos que forman al menos un microcanal de entrada de solución de lípidos en fase orgánica (8A), y al menos un microcanal de entrada de solución o suspensión acuosa (8B), donde dichos microcanales de entrada de solución de lípidos en fase orgánica (8A) y de solución o suspensión acuosa (8B) están conectados a un microcanal principal (9') que desemboca en un nodo de salida de producto (11), y un medio de transporte de fluidos (12) para transportar dicho producto (13) desde dicho nodo (11) hasta un recipiente de recolección de producto (13'), caracterizado porque dicho sistema de bombeo (6) está conformado por al menos una microbomba peristáltica, y dichos microcanales de entrada solución de lípidos en fase orgánica (8A) y de solución o suspensión acuosa (8B) de dicho dispositivo canalizador y mezclador de fluidos (10) están dispuestos en un ángulo agudo con respecto a dicho microcanal principal (9').
2. Un equipo de producción continua de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos un microcanal (8C) desemboca en al menos uno de dichos microcanales de entradas de solución o suspensión acuosa (8A) y solución de lípidos en fase orgánica (8B) conformando una ramificación en forma de delta.

3. Un equipo de producción continua de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichos medios de transporte de fluidos (2) (6) (12) son tubos flexibles.
4. Un equipo de producción continua de acuerdo con la reivindicación 2, donde dichos medios de transporte de fluidos (2) (6) (12) son tubos flexibles.
5. Un equipo de producción continua de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado por que dicho dispositivo canalizador y mezclador de fluidos (4) está conformado por al menos una capa de polimetacrilato de metilo.
6. Un método para sintetizar nanovesículas a través de un equipo de producción continua según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se lleva a cabo:
 - a. Una etapa de preparación de reactivos, en la que se deposita una fase de solución de solvente orgánico (1) que contiene lípidos disueltos en un recipiente contenedor (1'), y una segunda fase de una solución acuosa (2) en otro recipiente contenedor (2'),
 - b. Una etapa de bombeo continuo, a través de una microbomba peristáltica, en la que se transportan dichos reactivos (1 y 2) en régimen laminar, a través de uno o más microcanales, desde los recipientes contenedores (1' y 2') de dichos reactivos (1 y 2) hacia la entrada de un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10),
 - c. Una etapa de focalización hidrodinámica, en la que se fuerza la dirección y el sentido de dichos flujos laminares de dichos reactivos (1 y 2) hacia una zona de reacción (9), con el fin de intercalar las fases y producir distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales,
 - d. Una etapa de difusión, en la que se produce el auto-ensamblado de las nanovesículas en una reacción termodinámicamente favorable,

- e. Una etapa de recolección, en la que dichas nanovesículas se acumulan en un recipiente contenedor (13') conectado a dicho dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), dando por resultado vesículas monodispersas (13) de un tamaño de entre 20nm y 1000nm.
7. Un método para sintetizar nanovesículas según la reivindicación 6, caracterizado porque en dicha etapa de focalización hidrodinámica, en uno o más microcanales se produce previamente una etapa de difusión en microcanales conectados a los mismos en forma de delta.
8. Un método para encapsular nanopartículas en nanovesículas a través de un equipo de producción continua según cualquiera de las reivindicaciones 1 al 5, caracterizado porque se lleva a cabo:
- a. Una etapa de preparación de reactivos, en la que se deposita una fase de solución de solvente orgánico (1) que contiene lípidos disueltos en un recipiente contenedor (1'), y una segunda fase de una suspensión acuosa (2) que contiene nanopartículas en otro recipiente contenedor (2'),
 - b. Una etapa de bombeo continuo, a través de una microbomba peristáltica, en la que se transportan dichos reactivos (1 y 2) en régimen laminar, a través de uno o más microcanales, desde los recipientes contenedores (1' y 2') de dichos reactivos (1 y 2) hacia la entrada de un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10),
 - c. Una etapa de focalización hidrodinámica, en la que se fuerza la dirección y el sentido de dichos flujos laminares de dichos reactivos (1 y 2) hacia una zona de reacción (9), con el fin de intercalar las fases y producir distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales,
 - d. Una etapa de difusión, en la que se produce el auto-ensamblado de las nanovesículas en una reacción termodinámicamente favorable, así como el encapsulado de dichas nanopartículas dentro de dichas nanovesículas,

- e. Una etapa de recolección, en la que dichas nanovesículas y dichas nanopartículas encapsuladas se acumulan en un recipiente contenedor (13') conectado a dicho dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos (10), dando por resultado vesículas monodispersas (13) de un tamaño de entre 20nm y 1000nm.
9. Un método para sintetizar nanovesículas según la reivindicación 8, caracterizado porque en dicha etapa de focalización hidrodinámica, en uno o más microcanales se produce previamente una etapa de difusión en microcanales conectados a los mismos en forma de delta.
10. Un método para encapsular nanopartículas en nanovesículas a través de un equipo de producción continua según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, donde dichas nanopartículas son nanopartículas magnéticas.



Jorge Aníbal Fernández

Agente 1812

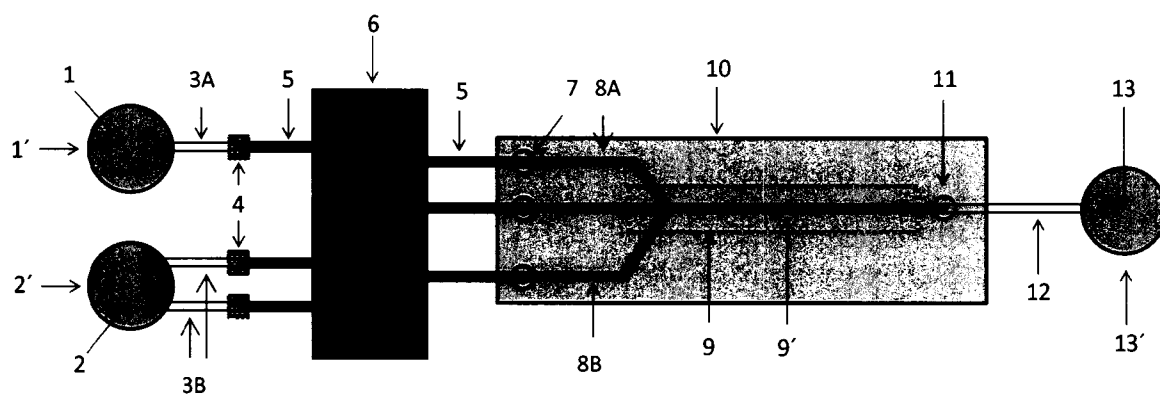


FIGURE 1

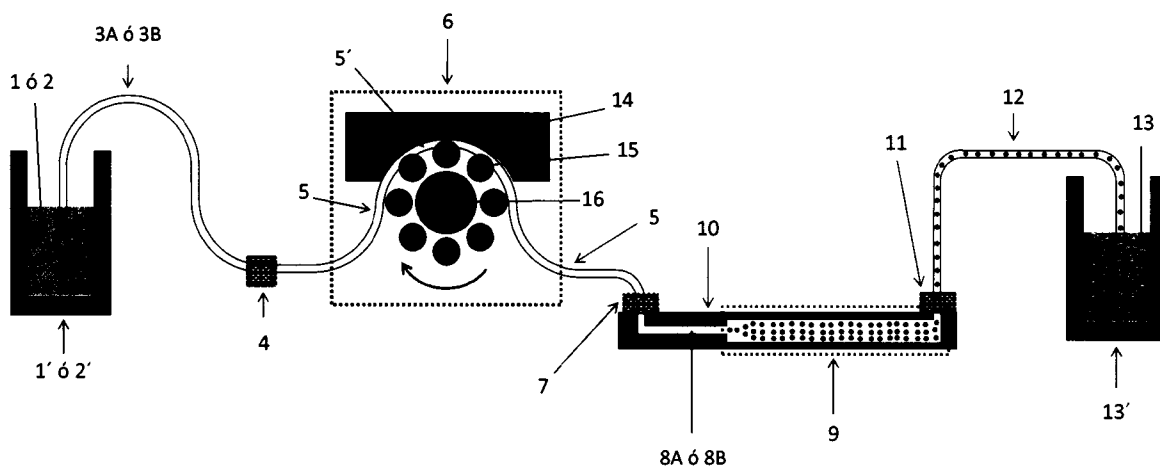


FIGURE 2

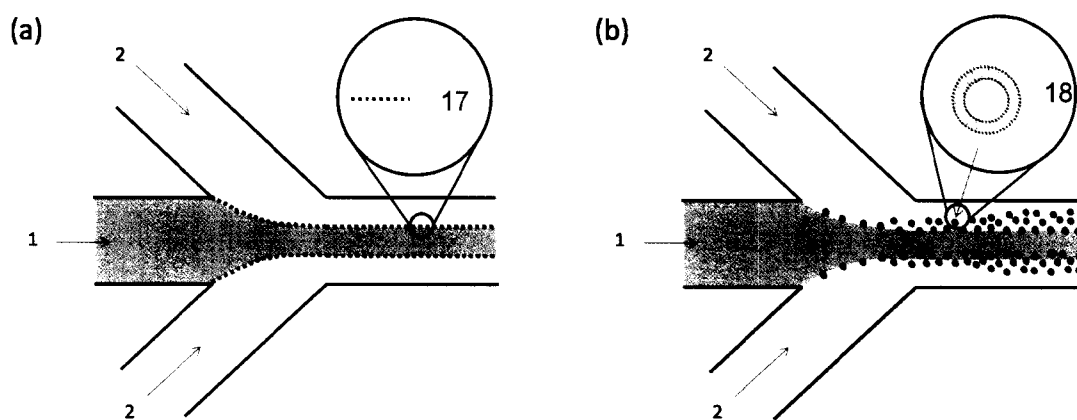


FIGURE 3

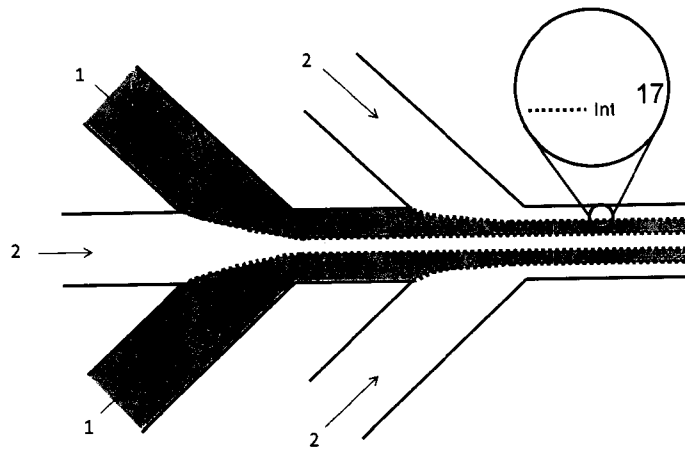


FIGURE 4

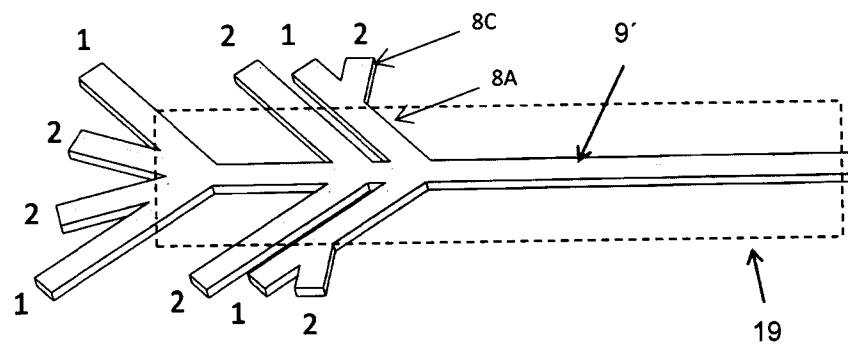


FIGURE 5

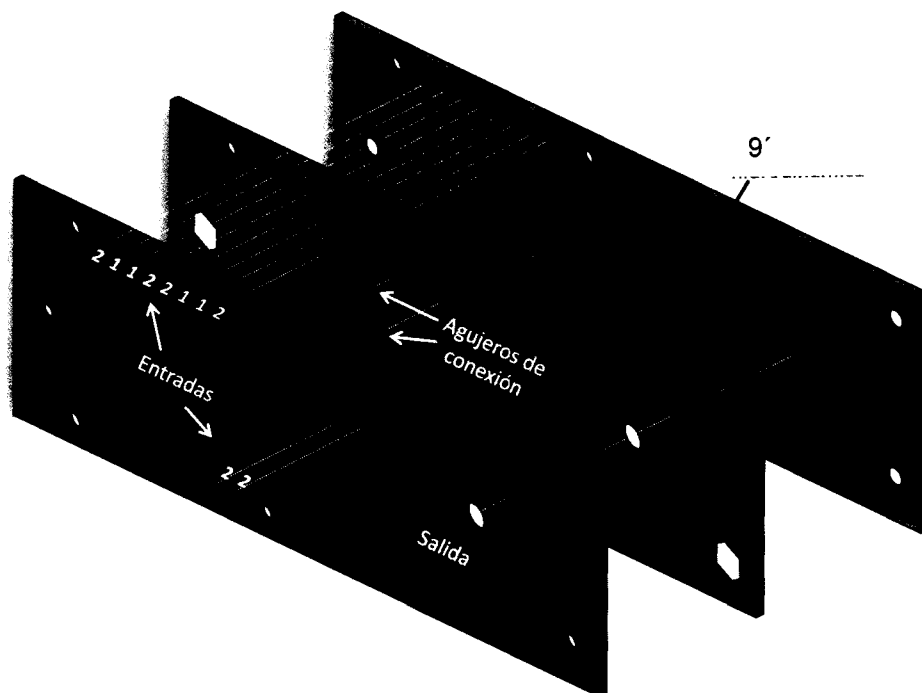


FIGURA 6

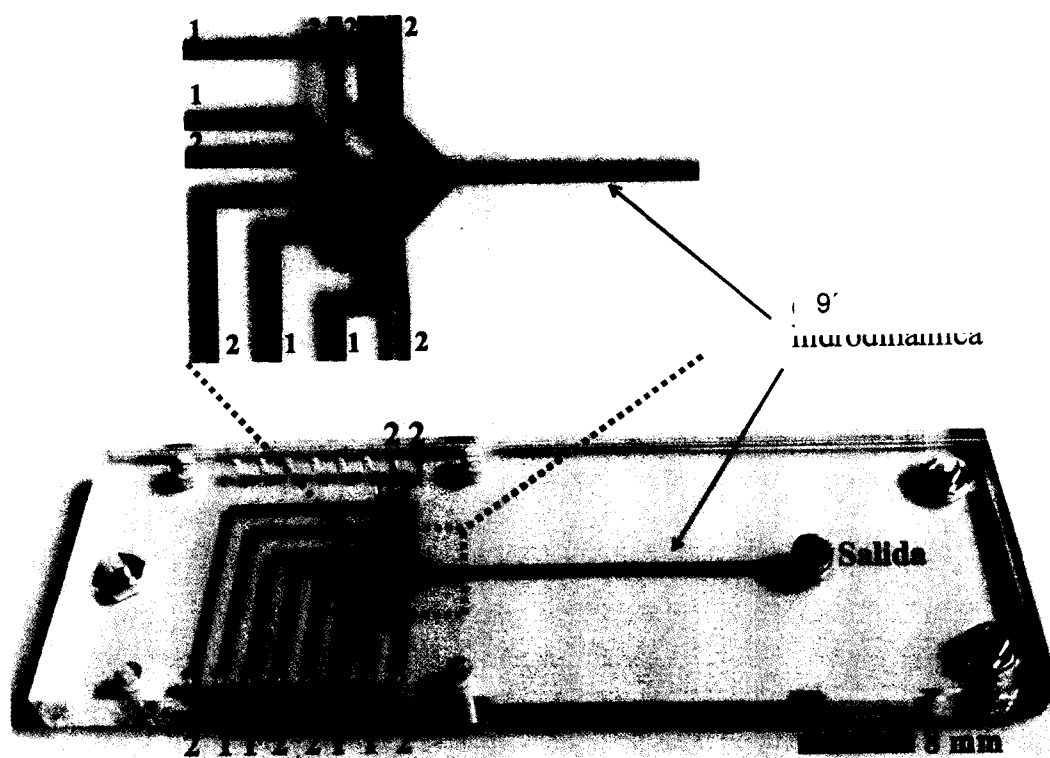


FIGURA 7

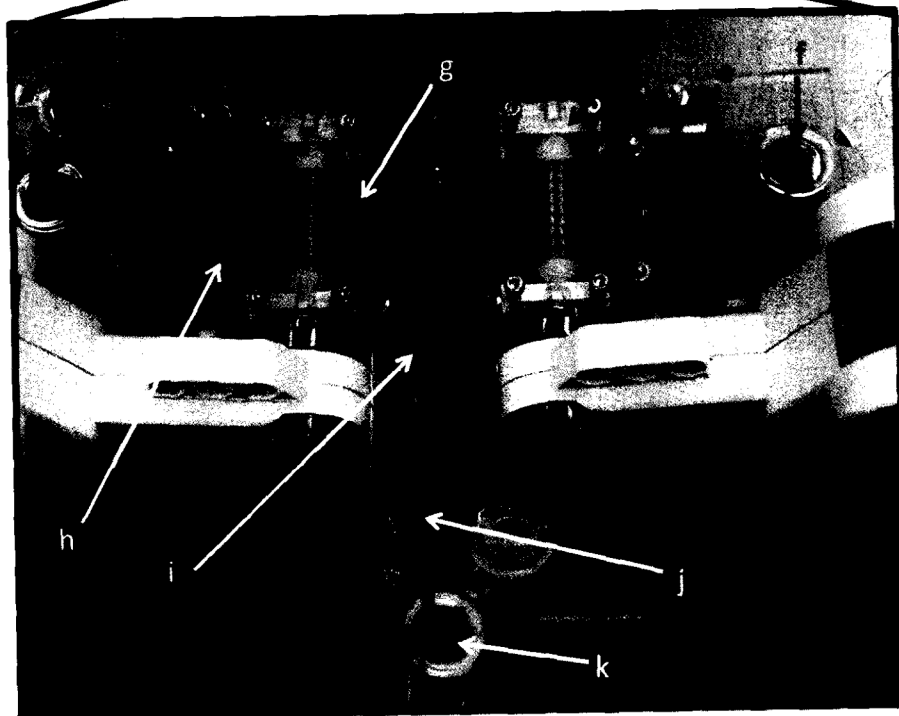
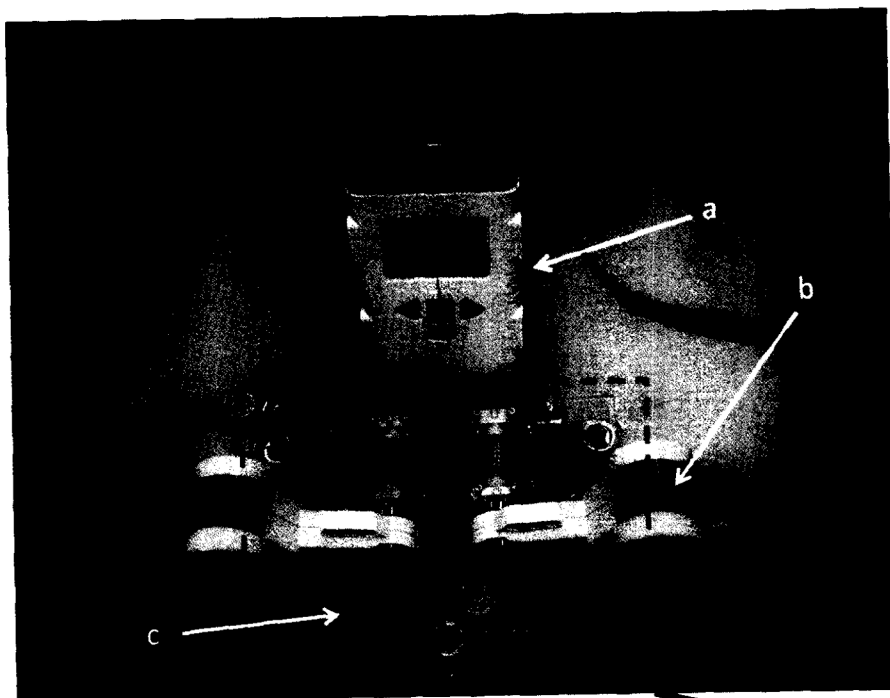


FIGURA 8

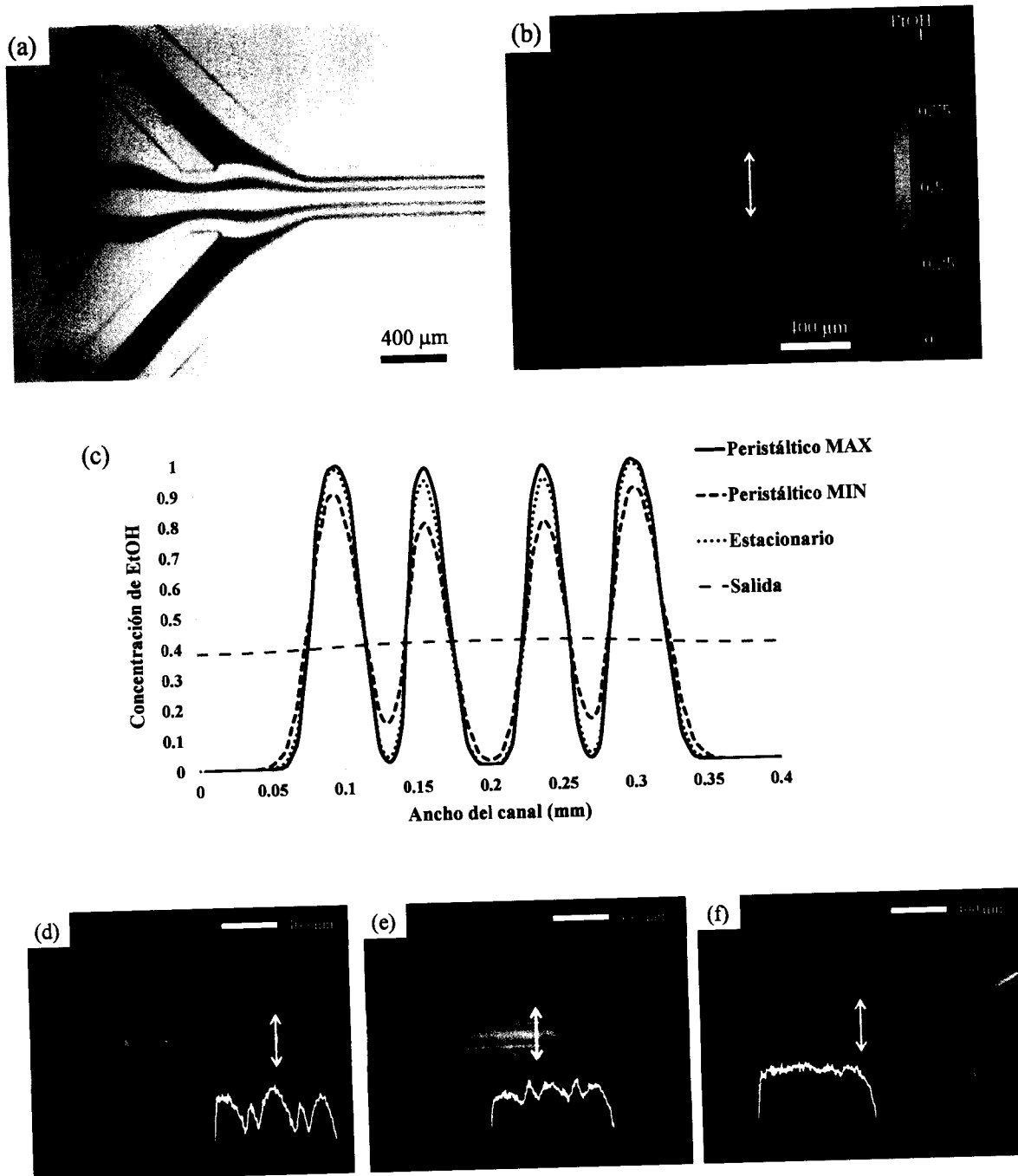


FIGURA 9

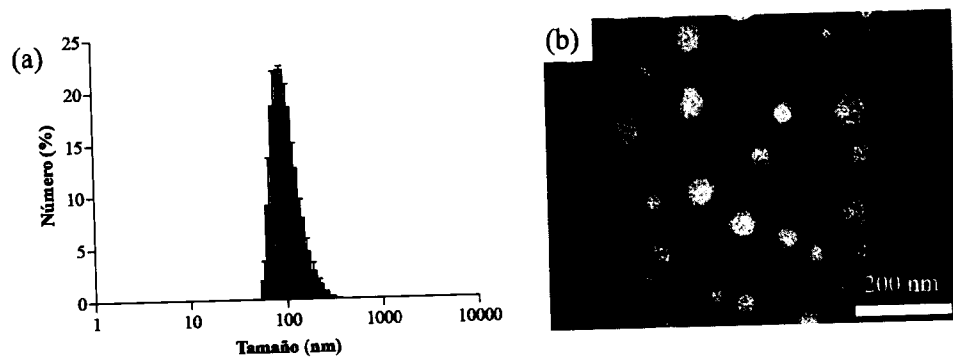


FIGURA 10

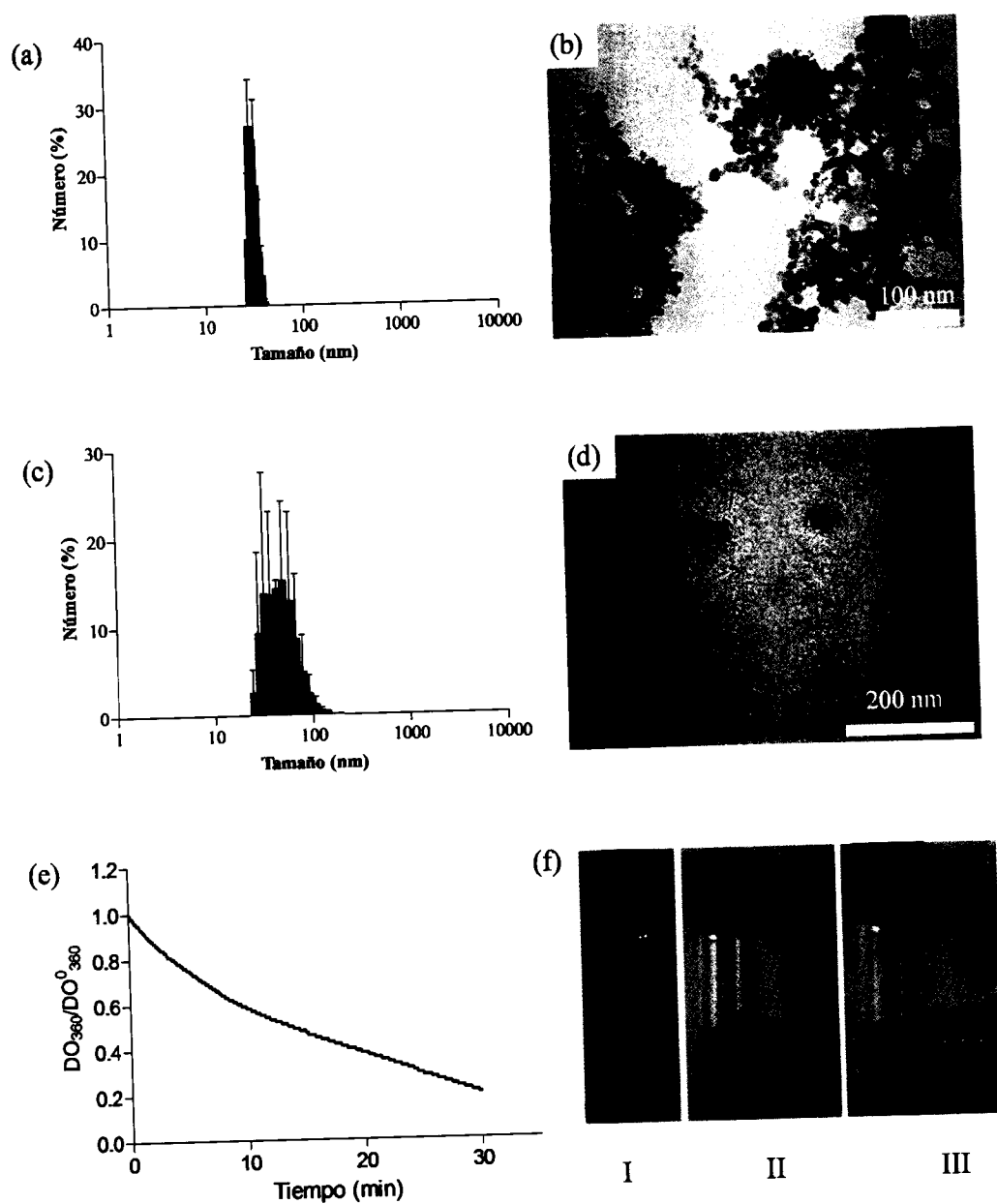


FIGURA 11

RESUMEN

La invención trata de un equipo de producción continua de microfluídica portátil para la síntesis de nanovesículas y encapsulación de nanopartículas, que comprende una o más bombas peristálticas, que aspiran e impulsan a los fluidos en un régimen laminar, conectadas a reservorios que contienen reactivos lipídicos y reactivos acuosos correspondientemente, los cuales se conectan con los tubos flexibles de entrada de dicha bomba. Los tubos flexibles de salida de dichas bombas están conectados a un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos, denominado chip microfluídico, que posee en su interior microcanales que unen los distintos canales de entrada en una zona de reacción, en la cual se mezclan los reactivos exclusivamente por difusión y reaccionan a lo largo de un canal de focalización hidrodinámica hasta llegar a la salida, donde se conectan mediante tubos a reservorios donde se recolectan las nanovesículas.

Los métodos para sintetizar nanovesículas a través del equipo de producción continua de la invención se lleva a cabo mediante las siguientes etapas: preparación de solución de lípidos y suspensión acuosa que contiene o no nanopartículas, etapa de bombeo peristáltico, en la que se transportan dichos reactivos en régimen laminar a través de uno o más microcanales, una etapa de focalización hidrodinámica, donde se producen distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales, una etapa de difusión, en la que se produce el auto-ensamblado de las nanovesículas, así como el encapsulado de dichas nanopartículas dentro de dichas nanovesículas y una etapa de recolección de dichas nanovesículas.

PARA U



Trámite: 15158692 PATENTES Importe: \$828.-

Fecha/Hora: 10/09/2015 14:25:12.353

Agente: FERNANDEZ, JORGE ANIBAL



REPUBLICA ARGENTINA

INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES

HOJA TECNICA

(10) PUBLICACION N°: AR (12) ☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD
 (21) SOLICITUD N° (51) INT. CL:

(22) FECHA DE SOLICITUD	10/09/2015	(71) SOLICITANTE (S):	Comisión Nacional de Energía Atómica Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(30) DATOS DE PRIORIDAD			
(41) FECHA DE PUBLICACION			
BOLETIN N°		(72) INVENTOR (ES):	Álvaro J. CONDE, Milena BATALLA, Belén CERDA, Osvaldo PODHAJECER, Juan M. CABALEIRO, Rossana E. MADRID, Lucia POLICASTRO.
(61) ADICIONAL A:			
(62) DIVISIONAL DE:			
(72) AGENTE N°:			
(83) DEPOSITO DE MICROORGANISMOS			

(54) TITULO DE LA INVENCION Equipo de producción continua y método de microfluídica para sintetizar nanoveículas y para encapsular nanopartículas en nanovesículas

(57) RESUMEN

La invención trata de un equipo de producción continua de microfluídica portátil para la síntesis de nanovesículas y encapsulación de nanopartículas, que comprende una o más bombas peristálticas, que aspiran e impulsan a los fluidos en un régimen laminar, conectadas a reservorios que contienen reactivos lipídicos y reactivos acuosos correspondientemente, los cuales se conectan con los tubos flexibles de entrada de dicha bomba. Los tubos flexibles de salida de dichas bombas están conectados a un dispositivo canalizador y mezclador de microfluidos, denominado chip microfluídico, que posee en su interior microcanales que unen los distintos canales de entrada en una zona de reacción, en la cual se mezclan los reactivos exclusivamente por difusión y reaccionan a lo largo de un canal de focalización hidrodinámica hasta llegar a la salida, donde se conectan mediante tubos a reservorios donde se recolectan las nanovesículas.

Los métodos para sintetizar nanovesículas a través del equipo de producción continua de la invención se lleva a cabo mediante las siguientes etapas: preparación de solución de lípidos y suspensión acuosa que contiene o no nanopartículas, etapa de bombeo peristáltico, en la que se transportan dichos reactivos en régimen laminar a través de uno o más microcanales, una etapa de focalización hidrodinámica, donde se producen distintas interfaces de reacción en cada punto de encuentro de dichos microcanales, una etapa de difusión, en la que se produce el auto-ensamblado de las nanovesículas, así como el encapsulado de dichas nanopartículas dentro de dichas nanovesículas y una etapa de recolección de dichas nanovesículas.

FIGURA MAS REPRESENTATIVA N°: