

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 359**

51 Int. Cl.:

G01N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2017 PCT/FI2017/050328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17187023**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2017 E 17725649 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3449236**

54 Título: **Método y dispositivo para la caracterización fisicoquímica de materiales**

30 Prioridad:

29.04.2016 FI 20165372

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

30.07.2024

73 Titular/es:

**THE SOLUBILITY COMPANY OY (100.0%)
Viikinkaari 4
00790 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**SVANBÄCK, SAMI;
YLIRUUSI, JOUKO;
EHLERS, HENRIK;
ANTIKAINEN, OSMO y
RÄIKKÖNEN, HEIKKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 976 359 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para la caracterización fisicoquímica de materiales

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a la caracterización de material.

5 Antecedentes de la invención

El análisis de alto contenido (HCA, por sus siglas en inglés), basado en el análisis automatizado de imágenes, se ha convertido en una técnica valiosa y ampliamente usada en las biociencias.

10 En particular, dos propiedades fisicoquímicas de los materiales determinan su destino en diferentes medios químicos: la solubilidad y la lipofilia. La solubilidad de un compuesto determina el grado en el que el compuesto estará presente en su forma molecular activa, determinando así, por ejemplo, la biodisponibilidad y el grado de efectos terapéuticos o tóxicos que exhibirá el compuesto. La solubilidad también juega un papel importante, por ejemplo, en los procesos de nucleación, siendo de gran relevancia en la síntesis y cristalización.

15 El coeficiente de partición/distribución ($\log P/\log D$) describe la naturaleza lipófila del compuesto, determinando la partición, por ejemplo, el medio y el cuerpo humano. El coeficiente de partición independiente del pH (P) o el coeficiente de distribución dependiente del pH (D) son los parámetros fisicoquímicos más usados para estimar la permeación a través de membranas biológicas y los fenómenos de absorción. También se ha demostrado que $\log P$ y $\log D$ son buenos predictores del destino ambiental y la toxicidad de los compuestos tanto en medios como a nivel celular.

20 Las técnicas estándar actuales para determinar los parámetros fisicoquímicos anteriores suelen tardar varias horas o incluso días. Los métodos de cuantificación se basan habitualmente en análisis químicos específicos de sustancias y disolventes, lo que requiere más tiempo de desarrollo y recursos. Otro inconveniente importante de los métodos estándar, además de los largos tiempos experimentales, es el elevado uso de analitos y reactivos, lo que aumenta el coste y el impacto medioambiental. También se usan modelos computacionales para estimar estos factores fisicoquímicos, pero requieren parámetros de entrada experimentales para realizar predicciones precisas. Además, los parámetros de entrada experimentales se deben adquirir bajo una variedad de condiciones experimentales relevantes que reflejen el medio del modelo, lo que puede hacer que su aplicación no sea práctica.

30 Los dispositivos actuales de caracterización de partículas determinan los tamaños promedio de partículas o las distribuciones de tamaño de partículas. En aplicaciones donde se caracterizan partículas individuales, las partículas se fijan mediante pegado, sujeción o mediante otros medios mecánicos. Las partículas individuales también se pueden colocar hidrodinámicamente, o por medios acústicos u ópticos, para obtener imágenes continuas. La fijación mecánica es laboriosa y potencialmente altera las propiedades de las partículas. El posicionamiento, por otro lado, suele ser desafiante y temporal, especialmente para partículas pequeñas.

35 La técnica anterior relacionada comprende el Documento de Patente de los EE.UU. de Número US 4 279 860 A, SVANBACK SAMI ET AL: "Optical microscopy as a comparative analytical technique for single-particle dissolution studies", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER, NL, vol. 469, núm. 1, 19 de abril de 2014 (2014-04-19), páginas 10-16, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2014.04.036; y Sami Svanback: "Toward accurate high-throughput physicochemical profiling using image-based single-particle analysis", 15 de julio de 2016 (15-07-2016), obtenido de Internet:

URL: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/164583/towardac.pdf?sequence=1>

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es aliviar al menos algunos de los problemas anteriores.

40 Otro objetivo es proporcionar un método y aparato sencillos y de bajo coste para determinar las propiedades fisicoquímicas de materia o partícula(s).

Sumario

Según un primer aspecto, se proporciona un método de caracterización que comprende:

- 45 Proporcionar (1) al menos una partícula (130) sobre una superficie (140)
- Permitir que el fluido entre en contacto con la partícula (3)
- Detectar (4) la partícula
- Analizar (5) a partir de datos adquiridos durante la detección de los cambios en la partícula; y
- Correlacionar (6) los cambios en al menos una propiedad fisicoquímica del material de la partícula (130) o del fluido;

caracterizado porque la partícula (130) se inmoviliza sobre la superficie (140), y la superficie es una capa permeable o semipermeable sobre la cual la partícula está inmovilizada por el flujo de fluido a través de la capa permeable o semipermeable.

En ciertas realizaciones, detectar comprende no detectar ningún cambio entre dos puntos de datos.

5 A medida que el fluido entra en contacto con la(s) partícula(s), por ejemplo al proporcionar la(s) partícula(s) en una corriente de fluido dentro de una cámara de reacción, la corriente de fluido puede disolver la(s) partícula(s) mientras que el perfil de la concentración alrededor de la(s) partícula(s) individual(es) cambia o permanece sin cambios. Esto puede dar como resultado una velocidad de disolución y, en consecuencia, una disminución del tamaño de la(s) partícula(s), que se puede detectar, por ejemplo obteniendo imágenes a través de por ejemplo una ventana transparente en la cámara de reacción. El análisis se puede automatizar para extraer datos de la(s) partícula(s) individual(es) en función del tiempo a partir de los datos adquiridos.

10 El método es ventajoso porque permite medir diversas propiedades fisicoquímicas de lo detectado, por ejemplo de la(s) partícula(s) fotografiada(s), o del fluido. Dependiendo de la(s) partícula(s), se debe seleccionar la propiedad fisicoquímica deseada. El método es útil por ejemplo para medir cambios en la(s) partícula(s) cuando se expone(n) a diferentes medios químicos y/o físicos, tales como temperatura, radiación, presión, fuerza iónica, pH o un agente biológicamente activo.

15 El método también puede ser útil para analizar la(s) partícula(s) con una masa de más de tres órdenes de magnitud menor que la requerida en los métodos miniaturizados del estado actual de la técnica. El rendimiento del presente método es mucho mejor que el que se puede lograr con los métodos estándar, que operan en el rango de mg y g. Por ejemplo, el método se puede usar para adquirir un perfil de estado de solubilidad-lipofiliidad-carga de compuestos en la escala de nanogramos. Como evidencia de los ejemplos proporcionados a continuación, un cambio promedio en masa entre dos puntos de detección consecutivos se puede detectar en una escala de picogramos, o incluso en una escala de femtogramos, usando una detección en tiempo real en menos de un minuto. Por lo tanto, el límite de detección del método puede estar en un nivel similar al de los métodos analíticos avanzados actuales, tales como la espectrometría de masas.

20 La solubilidad en un medio químico o físico específico se puede determinar en una realización con precisión adecuada a partir de la pendiente del área y/o radio decreciente de la partícula y/u otra propiedad cambiante de la(s) partícula(s) de la imagen como el único parámetro requerido. Esto permite, por ejemplo la caracterización fisicoquímica rápida y completa de una sustancia desconocida de composición química y física desconocida. La configuración sencilla y rentable y la amplia aplicabilidad usando, por ejemplo, la microscopía óptica convencional, da una ventaja sustancial a esta técnica.

25 La capacidad de detectar propiedades fisicoquímicas en una amplia gama de medios químicos es de gran valor en muchos campos. Sin limitarse a ninguna ventaja particular, con el presente método es posible lograr de manera rápida, eficiente, robusta y rentable al menos nueve propiedades fisicoquímicas fundamentales de la materia: velocidad de disolución, velocidad de disolución intrínseca (IDR, por sus siglas en inglés), solubilidad nativa, solubilidad intrínseca, solubilidad en equilibrio, solubilidad aparente, pKa, logP y logD. Estos parámetros se pueden determinar incluso a partir de cristales de nanogramos individuales mediante análisis de datos automatizados. El análisis basado en la detección automatizada de cantidades de nanogramos de sustancia, sin muestreo de líquido ni tratamiento de muestras ni pasos de manipulación, reduce sustancialmente el consumo y los residuos potencialmente tóxicos. Además, se reduce sustancialmente el contacto del operador con sustancias potencialmente peligrosas. También permite analizar de forma fiable compuestos de alto valor o escasa disponibilidad, tal como en el desarrollo de fármacos.

30 En una realización, el método de caracterización según el primer aspecto comprende una etapa adicional vii que comprende correlacionar los cambios con al menos una propiedad fisicoquímica del fluido. Esta realización es ventajosa porque se puede usar para caracterizar simultáneamente el material de la partícula y el fluido.

El método de caracterización se puede usar para caracterizar al menos una propiedad fisicoquímica del fluido. En una realización, los cambios en la partícula se pueden correlacionar con al menos una propiedad fisicoquímica del material de la partícula o del fluido, tal como la capacidad del fluido para disolver el material de la partícula.

35 En una realización, el fluido comprende un portador en suspensión. En una realización adicional, el portador en suspensión se usa para analizar formulaciones in vivo.

40 Sin limitarse a ninguna técnica de fijación particular, con el presente método es posible inmovilizar una o varias partículas sobre una superficie de un área de detección, permitiendo la detección de partícula(s) específica(s). La inmovilización hacia una capa permeable/semipermeable permite que la(s) partícula(s) se posicione(n) previamente o se suministre(n) manual o automáticamente por medios mecánicos o con un flujo de fluido a través y/o a través de la capa.

45 También se describe un dispositivo de análisis que comprende

Una cámara de reacción;

Al menos una primera entrada para hacer pasar un fluido hacia el interior de la cámara de reacción;

Al menos una salida para hacer pasar un fluido hacia el exterior de la cámara de reacción;

5 Una zona de inmovilización dispuesta dentro de la cámara de reacción configurada para permitir inmovilizar partículas en un fluido; y

Medios que permiten detectar la zona de inmovilización.

Según un segundo aspecto, se proporciona un sistema que comprende un dispositivo de análisis configurado para llevar a cabo el método de la reivindicación 1 y que comprende

Una cámara de reacción (20);

10 Al menos una primera entrada (120) para hacer pasar un fluido (170) hacia el interior de la cámara de reacción (20);

Al menos una salida (160) para hacer pasar el fluido (175) hacia el exterior de la cámara de reacción (20);

Una zona de inmovilización (140) dispuesta en una superficie interior de la cámara de reacción, comprendiendo la zona de inmovilización una capa permeable o semipermeable configurada para recibir al menos una partícula a través de una corriente de fluido;

15 Medios que permiten detectar la zona de inmovilización; y que además comprenden medios de manipulación de fluidos para la hacer pasar el fluido de forma controlada a través del dispositivo de análisis, medios de detección y medios computacionales para analizar datos y proporcionar resultados.

En una realización del segundo aspecto, los medios de detección son medios de obtención de imágenes.

20 En una realización del segundo aspecto, el sistema comprende medios de iluminación para iluminar la zona de inmovilización de la cámara de reacción.

Se han ilustrado o se ilustrarán diferentes aspectos y realizaciones no vinculantes de la presente invención. Las realizaciones descritas se usan simplemente para explicar aspectos, realizaciones o etapas seleccionadas que se pueden usar en las implementaciones de la presente invención. Algunas realizaciones se pueden presentar sólo con referencia a ciertos aspectos ejemplares de la invención. Se debe apreciar que las realizaciones correspondientes también se pueden aplicar a otros aspectos ejemplares. Se pueden formar cualesquiera combinaciones apropiadas de las realizaciones.

25

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 muestra un diagrama de flujo de un método según una realización ejemplar;

30 La Fig. 2 muestra una vista en sección de una realización del dispositivo de análisis.

La Fig. 3 muestra una realización de un diagrama de bloques de un sistema de control de análisis.

Descripción detallada

Definiciones

35 $\log P/\log D$ se refiere al coeficiente de partición/distribución. Describe la naturaleza lipófila del compuesto, determinando la partición, por ejemplo el medio y el cuerpo humano.

El coeficiente de partición independiente del pH, P, o el coeficiente de distribución dependiente del pH, D, describe, por ejemplo, la permeación en membranas biológicas y los fenómenos de absorción.

40 La Fig. 1 muestra un diagrama de flujo esquemático del presente método. Primero, se proporciona al menos una partícula sobre una superficie, 1. Se proporciona un fluido, 2, y se pone en contacto con la(s) partícula(s), 3. A medida que la(s) partícula(s) entra(n) en contacto con el fluido, se obtienen imágenes de la(s) partícula(s), 4. Se analizan las imágenes adquiridas durante la detección, 4. Después del análisis de las imágenes, se determina al menos una propiedad fisicoquímica de la(s) partícula(s), 6, usando la información obtenida a partir de las imágenes analizadas.

45 A medida que la(s) partícula(s) interactúa(n) con el fluido, por ejemplo se disuelve(n) cuando un disolvente como un fluido disuelve la superficie de la(s) partícula(s), se obtienen imágenes de forma secuencial de la(s) partícula(s) residual(es) para detectar su tamaño, forma, pérdida o ganancia de masa, diferencia de presión, adsorción específica y no específica, adhesión, reacción. 4. También se puede registrar el momento de la detección o el intervalo de tiempo

entre imágenes. El cambio en la forma y la pérdida o ganancia de tamaño/masa en función del tiempo se determina preferentemente usando medios de análisis de imágenes computarizados. 5. Finalmente, se determina una propiedad fisicoquímica de interés usando la información sobre el tamaño, la forma y/o la pérdida de masa o ganancia en función del tiempo.

- 5 En ciertas realizaciones, la detección de cambios puede comprender no detectar ningún cambio entre dos puntos de detección.

En una realización, el método se lleva a cabo usando un dispositivo de análisis según el sistema según el segundo aspecto.

En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) en una corriente formada por el fluido.

- 10 En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre una capa permeable o semipermeable mediante el flujo de fluido a través de la capa permeable o semipermeable.

En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre la superficie, y la superficie es una capa permeable o semipermeable sobre la cual la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) por el flujo de fluido a través de la capa permeable o semipermeable.

- 15 En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre una capa permeable/semipermeable usando una diferencia de presión del fluido sobre la capa permeable/semipermeable. La capa permeable/semipermeable se puede disponer dentro de una cámara de reacción a través de la cual fluye el fluido de manera que sustancialmente todo el fluido pase a través de la capa permeable/semipermeable.

- 20 En una realización, la(s) partícula(s) se proporciona(n) inmovilizada(s) en una zona de inmovilización sobre una superficie interior de la cámara de reacción. En una realización, la inmovilización se lleva a cabo uniendo la(s) partícula(s) sobre la superficie, por ejemplo por fusión, por adhesión, por succión. En otra realización, la inmovilización se dispone dentro de la cámara de reacción proporcionando la(s) partícula(s) dentro de una membrana o un compartimento adicional.

- 25 En una realización, la superficie interior, o la superficie sobre la que se proporcionan la(s) partícula(s), es una capa permeable/semipermeable.

En una realización se usa una capa semipermeable.

En una realización, etapa iv. comprende detectar al menos una parte de la partícula.

En una realización, la partícula se carga usando un fluido como portador. En una realización, el fluido usado como portador es un fluido inerte.

- 30 En una realización se usan más de una cámara de reacción. Las cámaras de reacción pueden estar separadas o integradas en un soporte, por ejemplo una placa de pocillos en donde cada pocillo es una cámara de reacción. El flujo de entrada y/o salida se puede controlar mediante bombas y dispositivos separados o se puede controlar mediante un dispositivo y dividirse en muchas corrientes de fluido. La(s) partícula(s) se puede(n) detectar en las cámaras usando múltiples detectores, usando un detector móvil o usando un detector grande para detectar todas las cámaras simultáneamente. Esto puede aumentar el rendimiento del análisis.

- 35 En una realización, la capa permeable/semipermeable es un filtro o una membrana de filtro, una membrana o una capa porosa. La capa permeable/semipermeable se puede disponer de manera que el fluido fluya a través de ella, inmovilizando así la(s) partícula(s) sobre la superficie de la capa permeable/semipermeable y en el fluido que fluye. En una realización, la(s) partícula(s) se dispone(n) entre dos capas porosas, tal como entre láminas de membrana.

- 40 En una realización, la(s) partícula(s) se detecta(n) a través de una ventana en la cámara de reacción. En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre la superficie, lo que se detecta a través de la ventana.

En una realización, la detección se realiza mediante el uso de una sonda o un detector dispuesto en la pared de la cámara de reacción. En una realización, el detector puede ser un sensor CCD (por sus siglas en inglés) o CMOS (por sus siglas en inglés). En una realización, la sonda puede ser una fibra óptica o más de una fibra óptica.

- 45 En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) dentro de la cámara de reacción usando un fluido como un portador. En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) usando la misma entrada y el mismo fluido, que se usa para analizar las propiedades de la(s) partícula(s). En otra realización, la(s) partícula(s) se carga(n) usando una entrada diferente y opcionalmente un fluido de carga, que puede ser igual o diferente en comparación con el fluido en el que se analizan las propiedades de la(s) partícula(s). El fluido de carga puede estar en un fluido inerte.

- 50 En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) manualmente, automáticamente, se precarga(n) o se carga(n) mecánicamente usando, por ejemplo, un micromanipulador.

En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre la superficie de la capa permeable/semipermeable permitiendo el flujo del fluido a través de la capa porosa para inmovilizar la(s) partícula(s) durante la detección.

En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) mediante succión. La succión se puede lograr usando la corriente de fluido y proporcionando una diferencia de presión.

5 En una realización, el flujo de fluido es laminar.

En una realización, el flujo de fluido es turbulento.

10 En una realización, la(s) partícula(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie permeable/semipermeable y la densidad de la(s) partícula(s) es menor que la del fluido, es decir, la(s) partícula(s) flota(n) en el fluido. Preferiblemente, en tal caso, el flujo o dispositivo se invierte, es decir, el flujo es de abajo hacia arriba para mantener la(s) partícula(s) en el lado inferior de la capa porosa. Esto es particularmente ventajoso cuando el caudal de fluido es bajo.

En otra realización, el flujo de fluido es horizontal. En tal realización, la capa permeable/semipermeable es opcionalmente vertical. Un experto puede modificar el dispositivo de análisis, que incluye cambiar la posición de las entradas y salidas en consecuencia para obtener un dispositivo de flujo horizontal.

En una realización, el fluido está en un estado homogéneo dentro de la cámara de reacción.

15 En una realización, se proporciona un gradiente en una propiedad del fluido dentro de la cámara de reacción. Por ejemplo, se puede crear un gradiente de pH, presión y/o temperatura dentro de la cámara de reacción. Esto se puede lograr usando múltiples entradas de flujo o integrando una funcionalidad termoelectrónica o de enfriamiento/calentamiento de fluidos en el dispositivo. En otra realización, se aplica un campo eléctrico o magnético sobre o dentro de la cámara de reacción.

20 En una realización, la(s) partícula(s) es(son) una(s) partícula(s) química(s), bioquímica(s) o biológica(s), tal como tejido, célula, virus, partícula(s) en polvo, cristal, pellet, gel, gránulo, grano, fibra, vesícula, liposoma, polimerosoma, una estructura polimérica o una mezcla de los mismos.

25 En una realización, se proporcionan al menos dos partículas, y las partículas están compuestas del mismo material o compuesto químico, o están compuestas de al menos dos materiales o compuestos químicos diferentes. De este modo, se pueden proporcionar sobre la superficie y caracterizar una pluralidad de partículas con diferente composición química.

En otra realización, la partícula, o al menos algunas de la pluralidad de partículas, comprende más de un material o compuesto químico. En otra realización, la partícula es una mezcla que comprende más de un compuesto, material o materia química.

30 En una realización, el fluido es transparente. En una realización, la transparencia comprende transparencia en la porción del espectro electromagnético usada para llevar a cabo la detección. En una realización, la transparencia comprende transparencia óptica.

35 En una realización, el fluido es líquido, fluido supercrítico, fluido iónico, gas, fluido biológico, fluido que contiene flora bacteriana, fluido que contiene una proteína tal como una enzima, una fase fluida que fluye, una dispersión o una mezcla de los mismos.

En una realización, el fluido es un fluido supercrítico y el método comprende opcionalmente además controlar la presión. En otra realización, la propiedad fisicoquímica es la solubilidad.

En una realización, el fluido se recicla durante el método o en el dispositivo.

En una realización, el fluido no se recicla durante el método o en el dispositivo.

40 En una realización, la detección se lleva a cabo usando detección óptica. En otra realización, la detección se realiza mediante detección por ultrasonidos; mediante espectroscopia que incluye espectroscopia UV, Raman e IR; interferometría, microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) o cualquier otro medio de detección adecuado, detección in situ o una combinación de los mismos. En una realización, la detección
45 in situ comprende detectar dentro de una cámara cerrada usando una sonda, tal como una sonda de fibra óptica, una sonda Raman, una sonda UV, una sonda IR o una sonda ultrasónica. En una realización, la detección in situ comprende detectar con un detector integrado en una estructura, tal como en una o múltiples paredes de la cámara.

Cuando se usa la detección por ultrasonidos, en una realización la sonda de ultrasonidos se proporciona en contacto directo con el fluido en la cámara de reacción. La sonda puede estar integrada en la cámara de reacción.

50 En una realización, la detección comprende adquirir una secuencia de imágenes. Las imágenes se pueden obtener a intervalos predeterminados, tales como intervalos regulares. En una realización, las imágenes son micrografías

adquiridas mediante microscopía óptica.

En una realización, cuando la detección se lleva a cabo usando ultrasonidos, el fluido no es ópticamente transparente.

5 En una realización, la detección es una detección bidimensional. En una realización, la detección es tridimensional y/o bidimensional. En una realización, la detección tridimensional se realiza usando uno o más detectores mediante microscopía confocal, o moviendo uno o más detectores u otra parte del dispositivo. En una realización, la detección tridimensional se realiza usando múltiples detectores integrados, in situ o externos. En una realización, la detección tridimensional se realiza usando un detector integrado, in situ o externo. En otra realización, la radiación se transfiere a un detector mediante uno o varios espejos, prismas y/o lentes.

10 En una realización, la(s) partícula(s) se ilumina(n). Los métodos de iluminación adecuados incluyen radiación colimada, radiación polarizada, radiación policromática, radiación monocromática, radiación coherente o incoherente, o cualquier combinación de las mismas. En una realización, la iluminación se realiza desde una dirección elegida. En una realización, la iluminación se realiza desde múltiples direcciones a la vez. En una realización, la iluminación se realiza desde múltiples direcciones en una secuencia predeterminada o aleatoria.

15 En una realización, el análisis de las imágenes implica medir al menos uno de radio, área de proyección, área superficial, volumen, intensidad, color, circunferencia, esfericidad de la(s) partícula(s), o al menos de una parte de la misma.

En una realización, la al menos una parte medida es una esquina, borde, lado, cara, parte prominente y/o saliente de la(s) partícula(s).

20 En una realización, la propiedad fisicoquímica comprende al menos una de disolución, cambio morfológico, contracción, expansión, crecimiento, combustión, oxidación, reducción, evaporación, sublimación, condensación, corrosión, adsorción, absorción, desorción, resorción, unión, humectación o cualquier proceso inverso de las propiedades antes mencionadas. En una realización, la propiedad fisicoquímica es la estabilidad o la ausencia de cambios del material detectado. En una realización, la propiedad detectada es direccional, isotrópica o anisotrópica. En una realización, la propiedad detectada está en todas las direcciones.

25 En una realización preferida la propiedad fisicoquímica es la solubilidad.

En otra realización preferida el método de caracterización comprende correlacionar los cambios con al menos una propiedad fisicoquímica del material de la partícula, y la propiedad fisicoquímica es la solubilidad.

30 En una realización, se usa una etapa de verificación para determinar un momento en el que se detiene la detección y/o el análisis está listo. En una realización preferida, la etapa de verificación es la verificación usando un método adecuado, tal como un método estadístico.

En una realización, la(s) partícula(s) tiene(n) una masa original no mayor de 100 mg, preferiblemente no mayor de 100 µg, más preferiblemente no mayor de 500 ng, más preferiblemente no mayor de 100 ng.

En una realización, el método es para determinar cambios de ng, preferiblemente pg, incluso más preferiblemente fg, lo más preferiblemente ag en la masa de la(s) partícula(s).

35 En una realización, el método comprende analizar la composición química del fluido que sale de la cámara de reacción. El análisis químico puede comprender, por ejemplo análisis cromatográfico, análisis espectroscópico o análisis de masas.

40 En una realización, el método comprende crear una diferencia de presión sobre la capa porosa. Esto puede mejorar la unión de la(s) partícula(s) sobre la superficie y mejorar el flujo a través de la capa porosa. Además, esto puede mejorar el mantenimiento del flujo laminar en la parte superior de la cámara de reacción.

En una realización, se controla la temperatura del fluido y opcionalmente la del fluido en la cámara de reacción.

En una realización, se controla el pH del fluido y opcionalmente el del fluido en la cámara de reacción.

En una realización, se controla la fuerza iónica del fluido y, opcionalmente, el fluido en la cámara de reacción.

En una realización, se controla la composición del fluido y opcionalmente la del fluido en la cámara de reacción.

45 En una realización, la composición del fluido se logra antes de entrar a la cámara de reacción. En otra realización la composición del fluido se consigue dentro de la cámara de reacción.

En una realización, se controla la presión dentro de la cámara de reacción y opcionalmente en todo el dispositivo.

En una realización, se proporciona un campo eléctrico en una región de la cámara de reacción ocupada por el fluido y, opcionalmente, sobre una región en donde se proporcionan una o más partículas.

En una realización, se proporciona un campo magnético en una región de la cámara de reacción ocupada por el fluido y, opcionalmente, sobre una región en donde se proporcionan una o más partículas.

En una realización, el fluido comprende un indicador tal como un indicador de pH, un indicador de fuerza iónica, un indicador redox, un indicador fluorescente o un indicador complexométrico.

5 La Fig. 2 muestra una representación esquemática de una realización del dispositivo de análisis 10. El dispositivo de análisis 10 comprende una cámara de reacción 20, que está definida por la pared 180, una placa superior 100 y una placa inferior 150. El dispositivo de análisis 10 comprende al menos una primera entrada 120 para hacer pasar el fluido 170 hacia el interior de la cámara de reacción 20, y al menos una salida 160 para hacer pasar el fluido 175 hacia el exterior de la cámara de reacción. Dentro de la cámara de reacción se dispone una capa permeable/semipermeable 140 sobre la placa inferior, que funciona como zona de inmovilización en esta realización. La(s) partícula(s) 130 de la(s) que se va(n) a visualizar se dispone(n) sobre la capa permeable/semipermeable 140. La al menos una ventana 110 se dispone en la pared, placa superior o placa inferior para permitir detectar la superficie de la capa porosa que mira a la placa superior. La(s) partícula(s) 130 se puede(n) visualizar a través de la ventana 110.

15 La entrada 120 puede recibir el fluido desde un depósito de fluido opcionalmente conectado a medios de control que proporcionan una corriente de fluido hacia el interior de la cámara de reacción. Los medios de control pueden comprender al menos uno de bomba, mezclador, elemento de calentamiento, elemento de enfriamiento o medios desgasificadores.

20 La cámara de reacción 20 puede ser de temperatura controlada. Esto se puede lograr usando elementos de calentamiento o enfriamiento integrados en la estructura del dispositivo de análisis 10. Dichos elementos se pueden proporcionar en la placa superior 100, en la placa inferior 150 y/o en las paredes laterales 180 del dispositivo, o se pueden proporcionar en el exterior del dispositivo de análisis 10. Cuando se desea el control de la temperatura, se usa preferiblemente material con buena conductividad térmica para fabricar el dispositivo de análisis 10.

25 La cámara de reacción 20 también puede ser de presión controlada. Cuando se usa presión por encima o por debajo de la presión ambiental dentro de la cámara, el material del dispositivo de análisis se selecciona de manera que no restrinja el funcionamiento a la presión seleccionada.

El fluido 175 que sale del dispositivo de análisis de reacción 10 se puede analizar más a fondo. Por ejemplo, la composición química del fluido 175 se puede analizar y comparar con la composición del fluido 170. Dicho análisis se puede usar para revelar sustancias disueltas o adheridas a la(s) partícula(s) 130, o los cambios que la(s) partícula(s) pueden crear en el fluido.

30 El dispositivo de análisis 10 también puede estar provisto de más de una ventana 110. En esta realización, la ventana 110 es el medio que permite detectar la zona de inmovilización. Cuando se usa más de una ventana, puede ser posible obtener imágenes de la(s) partícula(s) 130 desde una vista diferente y/o usar un método de detección diferente. También se puede proporcionar una ventana para realizar espectroscopia de la(s) partícula(s).

35 El dispositivo de análisis 10 también puede estar encerrado sin ventanas 110. En este caso, la detección de la(s) partícula(s) 130 se realiza con sondas o detectores integrados.

40 La placa superior 100 se puede desmontar del dispositivo de análisis 10 para cargar y descargar la(s) partículas 130, y opcionalmente la capa permeable/semipermeable 140. Alternativamente, la placa inferior 150 puede ser desmontable y se puede configurar para que sea desmontable con la capa porosa 140. En esta configuración, la carga y descarga de la(s) partícula(s) 130 se puede llevar a cabo abriendo la placa inferior y exponiendo la capa permeable/semipermeable 140. El dispositivo de análisis 10 también puede ser cerrado. En este caso, la carga de la(s) partícula(s) se realiza a través de uno de los canales de entrada o salida.

En una realización, la capa permeable/semipermeable 140 se configura para recibir al menos una partícula a través de una corriente de fluido.

En una realización, la cámara de reacción es cilíndrica o sustancialmente cilíndrica.

45 En una realización, la cámara de reacción es rectangular o sustancialmente rectangular.

En una realización, la cámara de reacción tiene una forma geométrica preferida, produciendo un flujo de fluido y/o un gradiente dentro de la cámara.

50 En una realización, los medios que permiten detectar la zona de inmovilización comprenden una ventana. En otra realización, dichos medios se integran en la estructura que define la cámara de reacción, tal como una placa superior, una placa inferior o la pared de la cámara de reacción. Por ejemplo, se puede integrar una sonda.

En una realización, los medios que permiten la detección comprenden una ventana dispuesta en una placa superior o en una placa inferior, o en una pared que definen la cámara de reacción. Opcionalmente la placa superior, la placa inferior o la pared son desmontables.

En una realización, la placa superior, la placa inferior o la pared es la ventana.

En una realización, la ventana se dispone en una placa superior desmontable o en una placa inferior.

5 En una realización, la ventana se proporciona disponiendo una abertura, proporcionando así un sistema abierto. La abertura puede abrir parcialmente la cámara de reacción, o se puede extender hasta la pared de la cámara de reacción, dejando así abierta toda la parte superior de la cámara de reacción. Como una realización ejemplar, se puede hacer un sistema abierto del dispositivo de análisis 10 mostrado en la Fig. 2 proporcionando el dispositivo sin la placa superior 100, o proporcionando una abertura en el lugar de la ventana 110. En una realización el diámetro de la entrada 170 se puede aumentar lo suficiente para permitir la detección a través de la abertura.

10 En una realización, los medios que permiten la detección se integran en la pared, placa superior o placa inferior del dispositivo.

En una realización del dispositivo de análisis, la zona de inmovilización comprende una capa permeable/semipermeable configurada para recibir al menos una partícula a través de una corriente de fluido.

15 En una realización, la detección es una obtención de imágenes en 3D y la cámara de reacción es transparente para permitir la detección desde más de una vista. La detección puede comprender el uso de espejos, prismas o combinaciones de los mismos.

En una realización, la placa superior o la placa inferior es una tapa para permitir cargar una o más partículas. En una realización, la capa permeable/semipermeable es intercambiable y se configura para ser cambiada a través de la tapa. En otra realización, la(s) partícula(s) se carga(n) dentro de la cámara de reacción junto con la capa porosa.

20 En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) dentro de la cámara de reacción con un flujo de fluido. En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) manualmente dentro de la cámara de reacción con un medio adecuado tal como un alfiler, una aguja, una pinza o un micromanipulador. En una realización, la(s) partícula(s) se carga(n) automáticamente dentro de la cámara de reacción con un medio adecuado.

25 El método de análisis o el sistema se pueden controlar mediante un sistema de control. En una realización ejemplar, el dispositivo de análisis es un componente de un sistema de análisis controlado por ordenador. Un programa de computadora almacenado en una memoria del sistema comprende las instrucciones que, tras su ejecución por al menos un procesador del sistema, hacen que el sistema de análisis funcione según las instrucciones. Las instrucciones pueden ser en la forma de un código de programa legible por la computadora.

30 La Fig. 3 muestra un diagrama de bloques aproximado de un sistema de control de análisis 700. En una configuración básica del sistema los parámetros del proceso se programan con la ayuda de un programa informático y las instrucciones se ejecutan con un terminal de interfaz hombre-máquina (HMI, por sus siglas en inglés) 706 y se descargan a través del bus 704 a un caja de control 702. En una realización, la caja de control 702 comprende una unidad de control lógico programable (PLC, por sus siglas en inglés) de uso general. La caja de control 702 comprende al menos un microprocesador para ejecutar el programa informático de la caja de control que comprende el código de programa almacenado en una memoria, memorias dinámicas y estáticas, módulos de I/O, convertidores A/D y D/A y relés de potencia. La caja de control 702 envía energía eléctrica a los controladores de las válvulas y bombas de la línea de fluido (no mostradas en la Fig. 4) del sistema de análisis, y tiene comunicación bidireccional con los controladores de fluido de alimentación (no mostrados en la Fig. 4), y controla el funcionamiento del control de fluidos y de la detección, así como controla de otro modo el funcionamiento del sistema de análisis. La caja de control 702 también puede controlar las válvulas y bombas necesarias cuando se usan múltiples fluidos. La caja de control 702 puede medir y transmitir las lecturas de la sonda desde el sistema de análisis al terminal HMI 706. La caja de control 702 también puede controlar el manejo de la(s) muestra(s), tal como la carga y descarga, o el análisis opcional posterior al procesamiento del fluido, tal como cromatografía o análisis de masas. Una línea de puntos 716 indica una línea de interfaz entre las partes del sistema de análisis y la caja de control 702.

Detección

45 La detección se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica adecuada capaz de obtener información sobre la deformación o estabilidad de la(s) partícula(s), o cualquier parte de esta, a medida que cambie o que no sufra cambios. Ejemplos incluyen la obtención de imágenes, microscopía óptica (que produce una imagen correspondiente a la interacción de la luz con la(s) partícula(s)), microscopía de fluorescencia (que produce una imagen correspondiente o una señal proporcional a la absorción o emisión fluorescente de la(s) partícula(s)/sustancia en condiciones adecuadas de excitación), detección ultravioleta (que produce una imagen y/o un espectro correspondiente o una señal proporcional a la luz ultravioleta absorbida y/o emitida por la(s) partícula(s)/sustancia), espectroscopía Raman (que produce un espectro y/o una imagen basada en la dispersión Raman de la(s) partícula(s)), espectroscopía infrarroja (que produce una imagen y/o un espectro correspondiente o una señal proporcional a la radiación infrarroja absorbida y/o emitida por la(s) partícula(s)/sustancia), interferometría (que produce una imagen basada en el patrón de interferencia, producido por la radiación que interactúa con la muestra), difracción y dispersión dinámica de la luz (que proporciona datos sobre el tamaño de la(s) partícula(s), determinado por la difracción y/o dispersión de la luz).

5 Las técnicas de detección son conocidas como tales y se pueden dirigir a pequeños volúmenes según lo requiere la presente invención para obtener información sobre las propiedades de al menos una partícula individual o de al menos una parte de la misma. Los dispositivos de detección adecuados están disponibles comercialmente. Lo que hay que tener en cuenta es que la pared o ventana del recipiente sea transparente a la radiación usada por el sistema de detección. Es decir, el propio recipiente no debe atenuar ni alterar significativamente la radiación que se va a registrar por el dispositivo de detección, por ejemplo, las longitudes de onda ópticas en el caso de una microscopía óptica.

En una realización, se calibra el detector. La calibración se puede lograr produciendo una curva de calibración usando compuestos de solubilidad conocida en un fluido, como el agua, a una temperatura constante.

En una realización, la calibración implica el uso de datos de densidad cristalina y/o datos de peso molecular.

10 La detección puede usar iluminación directa, iluminación de fondo, iluminación estroboscópica, fluorescente, fosforescente o autoiluminación de la muestra.

Análisis de datos

15 Las imágenes o cualquier otro dato de detección obtenido desde un dispositivo de detección se pueden almacenar en una unidad de análisis, tal como una computadora, donde se analizan, usando programas informáticos y algoritmos apropiados, para determinar la propiedad fisicoquímica, por ejemplo solubilidad, según se desee. Las imágenes o cualquier otro dato de detección también se pueden almacenar en un almacenamiento de datos externo conectado al sistema. El análisis depende de la técnica de detección usada, ya que el origen de la radiación registrada es diferente.

20 En el caso de microscopía óptica, cada una de las imágenes obtenidas comprende una "micrografía", es decir, una imagen de proyección, de la(s) partícula(s) en diferentes etapas de, por ejemplo el proceso de disolución y potencialmente en diferentes orientaciones. Se pueden obtener imágenes de diferentes orientaciones de una o más partículas, por ejemplo usando múltiples dispositivos de detección, espejos, reflectores, usando múltiples fuentes de luz, múltiples dispositivos de obtención de imágenes, prismas.

En una realización, el procesamiento de imágenes comprende al menos uno de:

25 - determinar los tamaños de la proyección del residuo de la(s) partícula(s), es decir, en función de las áreas superficiales de la sección transversal de la(s) misma(s), a partir de las imágenes sucesivas,

- determinar las formas de la proyección del residuo de la(s) partícula(s), es decir, en función de las áreas superficiales de la sección transversal de la(s) misma(s), a partir de las imágenes sucesivas,

30 - estimar la masa relativa o absoluta del residuo de la(s) partícula(s) (o la masa liberada de la(s) partícula(s) en comparación con la primera imagen, o el tamaño inicial estimado de la(s) partícula(s)) en función de los datos de las áreas superficiales de la sección transversal,

- determinar la velocidad de disolución en función de los tamaños de los residuos de la(s) partícula(s) y de la información sobre los tiempos de detección,

- determinar la velocidad de disolución intrínseca en función de los tamaños de los residuos de la(s) partícula(s), de los tiempos de detección y de la información del área superficial extraída de las imágenes,

35 - determinar la solubilidad de una sustancia en función de los tamaños de los residuos de la(s) partícula(s) y de los tiempos de detección extraídos de las imágenes.

- determinar el pKa y/o el estado de carga de una sustancia en función de los tamaños de los residuos de la(s) partícula(s) y de los tiempos de detección extraídos de las imágenes.

40 - determinar los coeficientes de partición (logP) y distribución (logD) de una sustancia en función de los tamaños de los residuos de la(s) partícula(s) y de los tiempos de detección extraídos de las imágenes.

45 Según una realización, el cálculo de la propiedad o propiedades fisicoquímicas deseadas se lleva a cabo en tiempo real a medida que avanza la detección, en función de los datos obtenidos hasta ese momento. El resultado puede ser aproximado al principio y la precisión mejora a medida que hay más datos disponibles. El análisis de datos también puede ser iterativo y la reconstrucción en 3D de la(s) partícula(s) con información topográfica y morfológica se deriva a partir de los datos de la imagen.

Según otra realización, el cálculo de la propiedad o propiedades fisicoquímicas se lleva a cabo sólo después de que el proceso de disolución haya alcanzado un punto predefinido, después del cual se puede terminar el proceso.

50 Sin limitar el alcance y la interpretación de las reivindicaciones de la patente, a continuación, se enumeran ciertos efectos técnicos de las realizaciones ejemplares descritas en la presente invención: Un efecto técnico es la posibilidad de la detección de contenido de partículas y sustancias. Otro efecto técnico es la determinación de la solubilidad de sustancias muy poco solubles. Otro efecto técnico es la determinación no invasiva de las propiedades fisicoquímicas

de la materia, tales como por ejemplo la(s) partícula(s) de materia. Otro efecto técnico es la posibilidad de usar varios fluidos por una partícula, o varias partículas por uno o más fluidos.

Ejemplos

5 La aplicabilidad amplia y no específica del método se demuestra determinando la velocidad de disolución y la solubilidad de compuestos modelo de diversas estructuras y propiedades químicas.

10 El solicitante ha usado catorce compuestos modelo: acetaminofén (Hawkins Inc., MN, EE.UU.), vidrio bioactivo S53P4 (BonAlive Biomaterials Ltd, Turku, Finlandia), celecoxib (Kemprotec, Carnforth, Reino Unido), fosfato dicálcico 2-hidrato (Chemische Fabrik Budenheim KG, Budenheim, Alemania), furosemida (TCI Europe, Zwijndrecht, Bélgica), hidrocortizida (Alfa Aesar, Lancashire, Reino Unido), ibuprofeno (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), indometacina (Hawkins, MN, EE.UU.), insulina humana recombinante (SAFC Pharma, MO, EE.UU.), itraconazol (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), ketoprofeno (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), naproxeno (ICN Biomedicals Inc., OH, EE.UU.), fenitofina (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), probenecid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) para los cuales la solubilidad es de gran relevancia.

15 La indometacina es una molécula de fármaco orgánica de carácter ácido débil, comúnmente usada como un compuesto modelo para fármacos poco solubles. La solubilidad en agua de la indometacina se presenta comúnmente como "prácticamente insoluble". Estos descriptores cualitativos, si bien tienen poco valor, se usan a menudo ya que la cuantificación de cantidades muy pequeñas de analito puede resultar complicada. Además, sólo menos del cinco por ciento de los modelos computacionales capacitados específicamente son capaces de predecir con precisión la solubilidad en un tampón acuoso simple de los compuestos estudiados de indometacina y probenecid.

20 En 1982, la insulina se convirtió en la primera proteína terapéutica recombinante introducida. Los primeros enfoques de formulación de proteínas se centraron en disminuir la solubilidad de la insulina para lograr una liberación controlada y sostenida. Ingeniería de cristales de proteínas, por ejemplo la cocrystalización sigue siendo una estrategia ampliamente usada para aumentar la estabilidad y eficacia de las terapias a base de proteínas. La detección rápida de propiedades fisicoquímicas, tales como la velocidad de disolución y la solubilidad, durante la identificación y optimización de dichas formulaciones requiere métodos de alto rendimiento fiables.

25 El fosfato dicálcico dihidrato ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD, brushita) es un material biocompatible clínicamente usado en aplicaciones ortopédicas y dentales. También ha encontrado aplicaciones en, por ejemplo la administración de fármacos, en la terapia contra el cáncer y en el desarrollo de biosensores. El DCPD tiene una ventaja única sobre otros sistemas de cemento de fosfato de calcio, a través de su capacidad para disolverse y reabsorberse en condiciones fisiológicas. Con el tiempo, el DCPD se convierte en el mineral de apatita menos soluble, según el medio de inmersión. La solubilidad y la velocidad de disolución de tales minerales fisiológicos tienen una importancia patológica, determinando, por ejemplo, la susceptibilidad al ataque por ácidos y la remineralización del esmalte dental. La sobresaturación de estos minerales, determinada por su solubilidad en diversos medios fisiológicos, es también la fuerza impulsora detrás de la formación de, por ejemplo los cálculos renales.

35 El vidrio bioactivo S53P4 es un injerto de regeneración ósea aprobado por la FDA (por sus siglas en inglés). Su bioactividad depende de la solubilidad, y se sabe que los iones de calcio y silicato liberados del vidrio promueven la formación de hueso a nivel celular. Usando el método del monocristal, los solicitantes pudieron determinar la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución de todos los compuestos modelo en condiciones fisiológicamente relevantes.

40 Además, el método se amplió para determinar un perfil fisicoquímico completo (solubilidad intrínseca, solubilidad nativa, solubilidad en equilibrio, velocidad de disolución, pKa, logP y logD) para el fármaco modelo indometacina. Se realizó un perfil de solubilidad-pH en tampones acuosos en el intervalo fisiológicamente relevante de pH 2-9. Además, la solubilidad efectiva se determinó en tres fluidos corporales simulados (fluido intestinal simulado en ayunas (pH 6,5), fluido intestinal simulado en estado de alimentación (pH 5) y fluido gástrico simulado en estado de ayuno (pH 1,6), así como en dos disolventes orgánicos de uso común (etanol y octanol). Se observó que la solubilidad del ácido débil disminuye linealmente, comenzando desde el pH más alto de 9, de acuerdo con el grado decreciente de ionización, alcanzando una meseta después de aproximadamente pH 4,5. El pKa 4,4 para la indometacina se determinó a partir de la intersección de las dos líneas de regresión de las dos fases del perfil de solubilidad. A medida que se adquirieron los datos de la solubilidad acuosa de la forma no ionizada (SO, pH 2-3), así como la solubilidad en octanol, el valor logP de la indometacina se determinó como 4,1. Además, usando datos de logP, pKa y pH, se determinó el valor de logD en función del pH. Todos los parámetros determinados usando el presente método se correlacionaron con los datos de la teoría y la literatura. Por lo tanto, al observar y caracterizar solo una variable, es decir, la disminución del tamaño de la(s) partícula(s) de un cristal individual, es posible extraer, mediante un análisis de alto contenido (HCA), un perfil fisicoquímico completo de seis características fundamentales de un material.

55 Para el análisis en tiempo real, a menudo se aplicó un análisis de prueba t a dos muestras sobre la pendiente de la línea de la regresión lineal de dos muestras consecutivas de diez. Se supuso que la pendiente había alcanzado un valor estacionario cuando el valor p del análisis de la prueba t disminuía por debajo de 0,05. Con esta verificación estadística se pueden finalizar los experimentos individuales mucho antes y con suficiente precisión. En el punto de

finalización en tiempo real, la pendiente difería como promedio en 0,21 unidades logarítmicas de la pendiente de la línea de regresión de un experimento completo. La incertidumbre está dentro de la RSD (por sus siglas en inglés) de las mediciones completas y es sustancialmente menor que la incertidumbre de los métodos estándar. Se observó que la pendiente estacionaria se alcanzaba generalmente en 0,4 minutos o después de 20 a 30 puntos de datos, independientemente de la sustancia estudiada. Por lo tanto, en lugar de depender de la sustancia, el tiempo de determinación parece estar controlado por la velocidad de adquisición de datos y, por tanto, por la velocidad de fotogramas y la resolución del sensor CCD (por sus siglas en inglés). Esto da una fuerte indicación de que el análisis de materiales basado en la detección se podría aplicar en aplicaciones de detección de alto contenido (HCS).

La masa media de los cristales individuales analizados fue de 5,0 ng. La sustancia necesaria para mediciones individuales usando la HCA en base a imágenes puede, por lo tanto, ser más de tres órdenes de magnitud menor que lo que se requiere en los métodos miniaturizados del estado actual de la técnica. La ganancia es mucho mayor en comparación con los métodos estándar, que operan en la escala de mg y g. Se pudo obtener un perfil del estado completo de solubilidad-lipofiliidad-carga del compuesto modelo indometacina a partir del análisis de menos de 400 ng de compuesto en total (n=69). Esto significa que al usar HCA de cristales individuales, la cantidad total analizada para un perfil de estado de solubilidad-lipofiliidad-carga total es superior a un orden de magnitud menor que la cantidad requerida para un experimento en un disolvente usando técnicas de última generación existentes. Además, el cambio promedio de masa entre dos puntos de detección consecutivos fue de 160 pg con una mediana de 5,4 pg y un mínimo de 4,5 fg. En el punto de detección en tiempo real de 0,4 minutos, el cambio promedio en masa desde el primer punto de datos fue en promedio 5,8 ng con una mediana de 210 pg y un mínimo de 180 fg. Esto sitúa el límite de cuantificación del análisis de imágenes al mismo nivel que el de los métodos analíticos avanzados actuales, tales como la espectrometría de masas. Sin embargo, la caracterización fisicoquímica mediante HCA se puede realizar sin necesidad de desarrollar ningún método analítico específico para sustancias o disolventes. Si es necesario, la solubilidad en un medio químico específico se puede determinar con la precisión adecuada a partir de la pendiente del vector de radio decreciente como el único parámetro requerido. Esto significa que se puede determinar un perfil fisicoquímico completo para una sustancia desconocida de composición química y física desconocida en cualquier disolvente transparente, en un minuto. La configuración simple y rentable, y la amplia aplicabilidad mediante microscopía óptica convencional, brindan una ventaja sustancial a esta técnica.

La capacidad de detectar propiedades fisicoquímicas en una amplia gama de medios químicos es de gran valor en muchos campos. Al usar HCA, esto es posible lograrlo de manera rápida, eficiente, sólida y rentable. Los inventores han demostrado que seis propiedades fisicoquímicas fundamentales de la materia, a saber, velocidad de disolución, solubilidad intrínseca, solubilidad, pKa, logP y logD, se pueden determinar a partir de cristales individuales de nanogramos mediante el análisis de imágenes automatizado. El análisis basado en la detección automatizada de cantidades de nanogramos de sustancia, sin muestreo de líquido ni tratamiento de muestras ni etapas de manipulación, reduce sustancialmente el consumo y los residuos potencialmente tóxicos. Además, se reduce sustancialmente el contacto del operador con sustancias potencialmente peligrosas. También permite analizar de forma fiable compuestos de alto valor o escasa disponibilidad, tal como en el desarrollo de fármacos.

Materiales

Partícula(s) que libera(n) solutos

En este trabajo se analizaron un total de 14 sustancias: acetaminofén (Hawkins Inc., MN, EE.UU.), vidrio bioactivo S53P4 (BonAlive Biomaterials Ltd, Turku, Finlandia), celecoxib (Kemprotec, Carnforth, Reino Unido), fosfato dicálcico 2-hidrato (Chemische Fabrik Budenheim KG, Budenheim, Alemania), furosemida (TCI Europe, Zwijndrecht, Bélgica), hidrocortizida (Alfa Aesar, Lancashire, Reino Unido), ibuprofeno (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), indometacina (Hawkins, MN, EE.UU.), insulina humana recombinante (SAFC Pharma, MO, EE.UU.), itraconazol (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), ketoprofeno (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), naproxeno (ICN Biomedichals Inc., OH, EE.UU.), fenitoína (Orion Pharma, Espoo, Finlandia), probenecid (Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Las sustancias se eligieron para representar una variabilidad máxima en solubilidad y propiedades químicas.

Fluidos como disolventes

Se usó agua desionizada ultrapura (MilliQ) para disolver 12 compuestos de solubilidad acuosa conocida para producir la curva estándar. Se prepararon disoluciones tampón de fosfato (pH 2,0, 3,0, 4,5, 5,8, 6,8, 8,0) y disolución tampón (pH 9,0) según el capítulo 4.1.3.1 de la Farmacopea Europea 8.8. Se prepararon según las instrucciones del fabricante: disolución salina tamponada con fosfato (Sigma-Aldrich, pH 7,4) así como fluido intestinal simulado en estado de alimentación (FeSSIF, por sus siglas en inglés), fluido intestinal simulado en estado de ayuno (FaSSIF, por sus siglas en inglés) y fluido gástrico simulado en estado de ayuno (FaSSGF, por sus siglas en inglés). Se usaron etanol (Altia, Rajamaki, Finlandia) y octanol (YA Kemia, Helsinki, Finlandia) como disolventes orgánicos modelo.

Dispositivo de análisis y configuración experimental.

El dispositivo de análisis se construyó como un dispositivo de flujo que consistía en dos placas metálicas planas resistentes. En su parte inferior se perforó un orificio de 1 mm a modo de canal de salida. La placa metálica superior albergaba el canal de entrada y estaba preparada con una ventana de vidrio para facilitar la detección. Se colocó un

5 filtro de membrana inorgánica de 0,2 μm (nuclepore de Whatman) sobre la placa inferior y la(s) partícula(s) a analizar se colocó(colocaron) encima de la parte del filtro de membrana que estaba por encima del canal de salida. Las dos placas de metal se sellaron herméticamente antes del inicio del experimento. Los disolventes usados como fluidos se desgasificaron y bombearon (bomba cuaternaria Agilent 1260 Infinity) con un caudal constante de 1 ml/min a través de la cámara de flujo durante todos los experimentos. La temperatura se ajustó haciendo fluir el líquido a través de un compartimento de columnas termostatzado (Agilent Serie 1200). Se obtuvieron imágenes de la(s) partícula(s) a través de la ventana con un sensor de imagen CMOS de 8 MP (Gigastone, CA, EE.UU.) en un microscopio DMLB de Leica montado con un objetivo 50x de Leica (N Plan L50X/0,50 - ∞/0/C).

Determinación de factores fisicoquímicos.

10 Solubilidad

La solubilidad de equilibrio, S, se calculó a partir de los datos del análisis de imágenes basado en una ecuación de velocidad de disolución del modelo de capa de difusión de partícula única reorganizada,

$$S = \frac{\rho h (w_0^{1/3} - w_t^{1/3})}{\left(\frac{4\pi\rho}{3}\right)^{1/3} D t}$$

15 donde ρ es la densidad de la partícula y h es el espesor de la capa de difusión, w₀ es el peso inicial de la partícula, w_t es el peso de la partícula en el momento t y D es el coeficiente de difusión. El peso del cristal se calculó en función del peso molecular de un compuesto y de la densidad verdadera del cristal, usando una aproximación esferoide para el volumen del cristal. D se aproximó a partir de una versión simplificada de la ecuación de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{2.40 \times 10^{-5}}{MW^{1/3}}$$

20 donde MW es el peso molecular de la sustancia y h se estimó en 30 μm. La densidad cristalina de todos los compuestos orgánicos e inorgánicos se adquirió de la literatura, mientras que la densidad cristalina de la insulina humana recombinante se adquirió como la inversa del volumen específico parcial del monómero proteico.

25 Para producir la curva de calibración, el valor de solubilidad de equilibrio, además de la pendiente decreciente del área y el radio de proyección de la(s) partícula(s), se compararon con los valores de solubilidad de equilibrio de la literatura. El área de proyección se adquirió directamente a partir de datos de píxeles y el radio se calculó en base a una aproximación de círculo equivalente.

El pKa del fármaco modelo indometacina se adquirió a partir de la intersección del valor de la solubilidad intrínseca promedio (pH 2 y pH 3) y del ajuste lineal de la solubilidad efectiva de la forma ionizada (Figura 2, Tablas complementarias 4 y 5). En base a los datos de pKa y pH, se calculó la función de solubilidad teórica dependiente del pH según,

30
$$S = S_0 \left(10^{-pK_a + pH} + 1 \right)$$

donde S₀ es la solubilidad intrínseca de la forma no ionizada. Además, en base a los datos de solubilidad intrínseca en octanol y agua, se determinó el coeficiente de partición (logP) según,

$$\log P_{oct: wat} = \frac{[HA_{oct}]}{[HA_{wat}]} = \frac{S_{oct}}{S_0}$$

y el coeficiente de distribución (logD) se estimó en función de los valores de logP, pH y pKa según,

35
$$\log D_{oct: wat} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right]$$

La velocidad de disolución intrínseca se puede determinar en función de la estimación del área superficial y de la velocidad de disolución de la(s) partícula(s).

REIVINDICACIONES

1. Un método de caracterización, que comprende:
 - i. Proporcionar al menos una partícula (130) sobre una superficie (140)
 - ii. Proporcionar al menos un fluido (170)
 - 5 iii. Permitir que el fluido entre en contacto con la partícula (130)
 - iv. Detectar la partícula
 - v. Analizar a partir de los datos adquiridos durante la detección, los cambios en la partícula y
 - vi. Correlacionar los cambios con al menos una propiedad fisicoquímica del material de la partícula (130) o del fluido; caracterizado porque la partícula (130) se
- 10 inmoviliza sobre la superficie (140), y la superficie es una capa permeable o semipermeable sobre la cual la partícula se inmoviliza por el flujo de fluido a través de la capa permeable o semipermeable.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la partícula (130) se inmoviliza sobre una capa permeable o semipermeable (140) usando una diferencia de presión del fluido sobre la capa permeable o semipermeable (140).
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la etapa iv. comprende detectar al menos una
- 15 parte de la partícula (130).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la partícula (130) tiene una masa original no mayor de 100 mg, preferiblemente no mayor de 100 µg, más preferiblemente no mayor de 100 ng.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para determinar cambios de ng, preferiblemente pg, incluso más preferiblemente fg, lo más preferiblemente ag en la masa de la partícula (130).
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la partícula (130) se carga sobre la superficie (140) usando un fluido (170) como portador.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde se ilumina la partícula (130).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la partícula (130) se detecta a través de una ventana (110) en la cámara de reacción (20).
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde detectar comprende no detectar cambio alguno entre dos puntos de datos.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el fluido (170) es un fluido supercrítico.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la propiedad fisicoquímica es la solubilidad.
12. Un sistema que comprende un dispositivo de análisis configurado para llevar a cabo el método de la reivindicación
- 30 1 y que comprende

Una cámara de reacción (20);

Al menos una primera entrada (120) para hacer pasar un fluido (170) hacia el interior de la cámara de reacción (20);

Al menos una salida (160) para hacer pasar el fluido (175) hacia el exterior de la cámara de reacción (20);

Una zona de inmovilización (140) dispuesta sobre una superficie interior de la cámara de reacción, comprendiendo la zona de inmovilización la capa permeable o semipermeable configurada para recibir al menos una partícula a través de una corriente de fluido;

Medios que permiten detectar la zona de inmovilización; y que además comprenden medios de manipulación de fluidos para hacer pasar de forma controlada el fluido a través del dispositivo de análisis, medios de detección y medios computacionales para analizar datos y proporcionar resultados.
- 35 13. El sistema de la reivindicación 12, en donde los medios que permiten la detección comprenden una ventana (110) dispuesta en una placa superior, una placa inferior o en una pared que define la cámara de reacción.
14. El sistema de la reivindicación 12 o 13, en donde los medios que permiten la detección se integran en la pared (180), placa superior (100) o placa inferior (150) del dispositivo.
- 40 15. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde la zona de inmovilización (140) comprende

una capa permeable o semipermeable configurada para recibir al menos una partícula a través de una corriente de fluido.

16. El sistema de la reivindicación 12, en donde los medios que permiten la detección son medios de formación de imágenes.

5 17. El sistema de la reivindicación 16, que comprende medios de iluminación para iluminar la zona de inmovilización de la cámara de reacción.

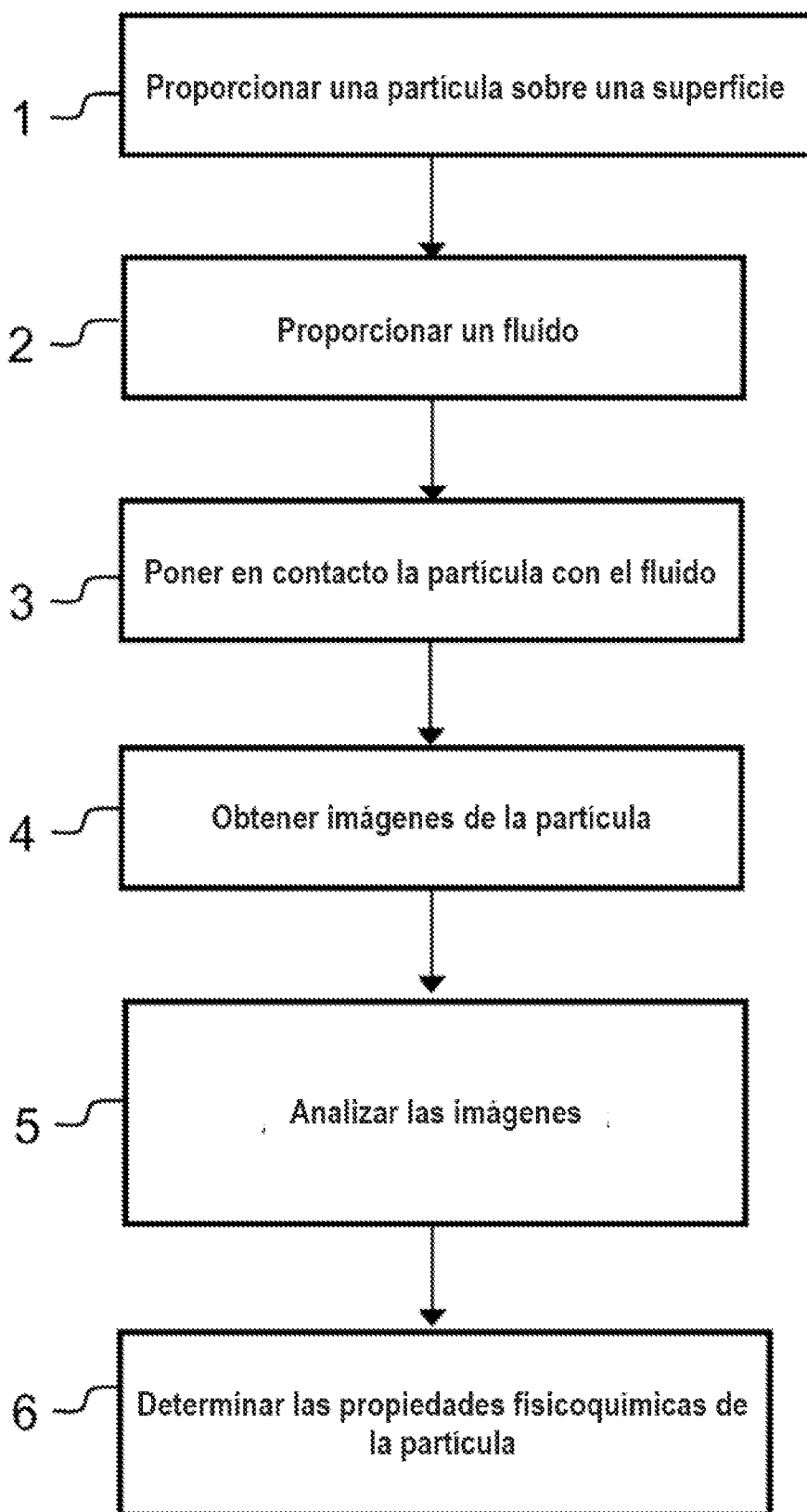
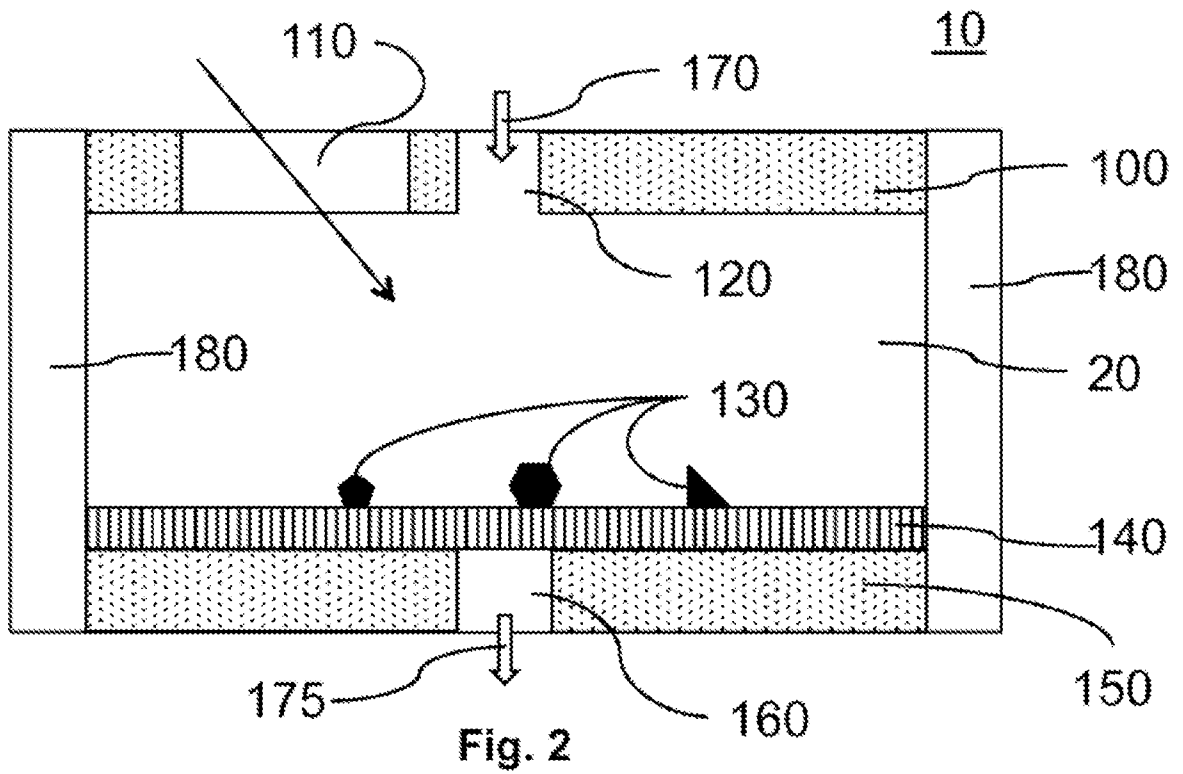


Fig. 1



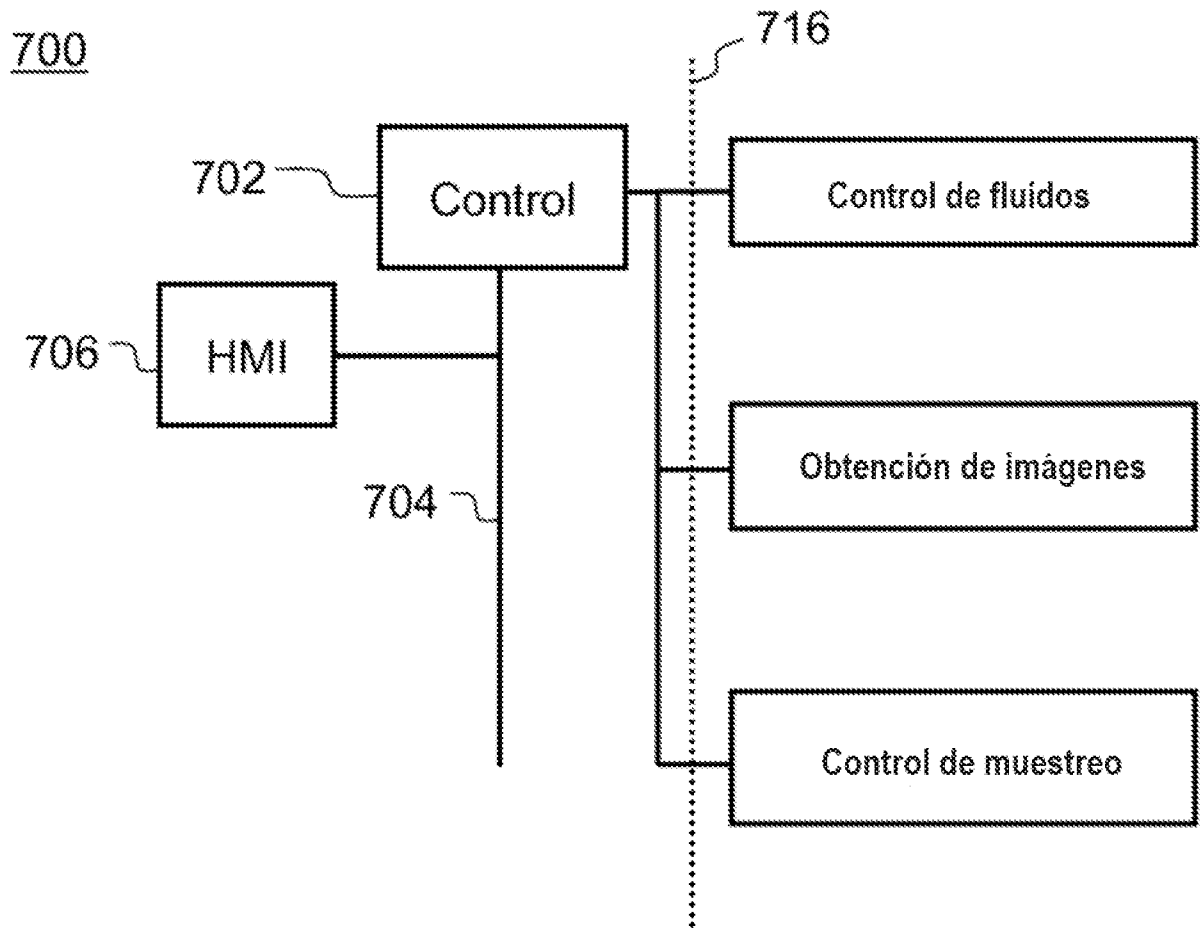


Fig. 3