

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 227**

51 Int. Cl.:

B01J 13/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2019** **PCT/EP2019/063521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2019** **WO19224375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2019** **E 19725378 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3801867**

54 Título: **Procedimiento de preparación de partículas coloidales funcionalizadas de forma homogénea por biomoléculas**

30 Prioridad:

24.05.2018 FR 1854366

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2024

73 Titular/es:

PARIS SCIENCES ET LETTRES (33.3%)
60, rue Mazarine
75006 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE(CNRS) (33.3%) y
SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%)

72 Inventor/es:

FATTACCIOLI, JACQUES;
PINON, LÉA y
MONTEL, LORRAINE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 985 227 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

Procedimiento de preparación de partículas coloidales funcionalizadas de forma homogénea por biomoléculas

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un coloide compuesto por partículas coloidales líquidas funcionalizadas.

- 5 Caracterizadas por una interfaz fluida y deformable, los glóbulos (también llamados partículas) coloidales líquidos son interesantes desde varios puntos de vista: es posible variar su tamaño, su composición en volumen y en superficie, y sobre todo hacerlos funcionar con motivos moleculares que pueden ser fluorescentes o reconocidos por los receptores de membrana de las células.
- 10 Recientemente, se han utilizado gotas de emulsión en funcionamiento como superficies biomiméticas para modelar la adhesión celular [1-3] o como sondas celulares para estudiar la fagocitosis [4].
- En la literatura, las gotas de emulsión que funcionan con lípidos se obtienen generalmente mediante la disolución directa de los lípidos en un aceite, seguida de la fabricación de las gotas [1, 5-6], utilizando un disolvente de soporte insoluble en agua, como el cloroformo, para mezclar los lípidos con el agua antes de proceder a la emulsificación [4, 7], o disolviendo los lípidos en agua en presencia de gotas después de la fragmentación [8].
- 15 BEN M'BAREK KALTHOUM ET AL: "Phagocytosis of immunoglobulin-coated emulsion droplets", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 51, 20 febrero 2015 (2015-02-20), páginas 270-277 describe un procedimiento de obtención de una emulsión que comprende la dispersión de aceite de soja que comprende un tensioactivo.
- 20 Pocos estudios se han centrado en la medición de la homogeneidad de la inserción de los lípidos en la superficie de las gotas a nivel de toda la suspensión, pero los que lo han hecho han puesto de manifiesto una variación importante de una gota a otra dentro de una misma emulsión cuando los lípidos se disuelven en la fase hidrofóbica antes de la emulsificación. En el caso de los lípidos que se disuelven directamente en el agua, su escasa solubilidad y la tendencia a formar agregados metastásicos, como los liposomas, también suponen una limitación en cuanto a la eficacia de su funcionamiento.
- 25 Con el fin de resolver estos problemas, los inventores han desarrollado un nuevo protocolo de funcionamiento de las gotitas que permite mejorar la homogeneidad y la cinética de inserción de los lípidos en la superficie de las gotitas dentro de una emulsión donada.
- 30 En lugar de disolver los lípidos en el aceite, con o sin un disolvente portador, antes de la emulsificación, el proceso objeto de la presente invención implica la fabricación previa de las gotas, seguida de la inserción de los lípidos en la superficie de las gotas. en un segundo paso (Fig. 1). Se basa en la utilización de un co-solvente polar que favorece la disolución de los lípidos en la fase acuosa continua, y permite obtener gotitas que se distinguen por una gran homogeneidad y rapidez de funcionamiento.
- Estas gotitas pueden utilizarse para calibrar citómetros en flujo.
- 35 En un citómetro en flujo, objetos individuales como células, tallos o bacterias se iluminan con un láser de haz concentrado y se registran varios parámetros para cada uno de ellos: intensidades de difusión en ángulos pequeños (en inglés "Forward Scatter Chanel", FSC) y de difusión lateral (en inglés "Side Scatter Chanel", SSC), que proporcionan información sobre el tamaño y la forma de los objetos, y las intensidades de fluorescencia. Los parámetros relacionados con la fluorescencia se utilizan para cuantificar, clasificar y evaluar los objetos en presencia de compuestos fluorescentes intrínsecos o extrínsecos.
- 40 Un citómetro en flujo requiere una alineación óptica rigurosa de sus componentes y una calibración precisa de las fuentes luminosas y los detectores para proporcionar mediciones fiables. La calibración se realiza en gran medida utilizando micrométricas fluorescentes. Se caracterizan por una fuerte monodispersidad en tamaño, obtenida gracias a su modo de síntesis, y una variación muy débil de fluorescencia dentro de una misma muestra. Sin embargo, estas partículas sólidas tienden a aumentar durante el tiempo de almacenamiento, lo que dificulta la realización de las mediciones.
- 45 Más recientemente, se propuso utilizar emulsiones calibradas en tamaño y fluorescentes disolviendo un fluoróforo en el volumen de la fase hidrofóbica o funcionalizando la superficie de las gotas con moléculas o biomoléculas fluorescentes. El hecho de que los protocolos tradicionales no permitan obtener una buena homogeneidad de fluorescencia constituye, sin embargo, un obstáculo tecnológico que la presente invención permite resolver.
- 50 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un coloide compuesto de partículas coloidales líquidas funcionalizadas que comprende las etapas siguientes:
- a) la dispersión de un aceite 1 en una solución acuosa 2 que contenga un tensioactivo de fragmentación, que conduzca a la obtención de una emulsión 3 que contenga gotas de aceite en suspensión en una fase acuosa;

b) la disolución de lípidos destinados a funcionalizar dichas gotas de aceite en un disolvente aprótico polar, que permita obtener una solución de funcionalización 4;

c) la preparación de una mezcla de funcionalización 5, que comprenda la emulsión 3 y la solución de funcionalización 4, siendo la fracción volumétrica del disolvente aprótico polar en dicha mezcla de funcionalización 5 de entre el 1 y el 15 %, preferentemente de entre el 5 y el 15 %, preferentemente de entre el 8 y el 15 %;

d) la incubación de la mezcla de funcionalización 5, durante la cual al menos una parte de los lípidos inicialmente presentes en la solución de funcionalización 4 se adsorben en la superficie de las gotas de aceite inicialmente presentes en la emulsión 3; y

e) la eliminación de los lípidos no adsorbidos durante la etapa d);

permitiendo así obtener un coloide compuesto por partículas coloidales líquidas funcionalizadas consistentes en las gotas de aceite obtenidas en la etapa a) en cuya superficie se adsorben los lípidos en la etapa d).

Se puede utilizar durante la etapa a) cualquier aceite conocido del hombre de negocios para formar emulsiones de aceite en agua. En particular, el aceite 1 dispersado en la solución acuosa 2 puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal como el aceite de soja, un aceite de silicona, un aceite halógeno (especialmente un aceite fluorado, un aceite yodado o un aceite bromado), un aceite animal como el escualeno o una mezcla de ambos.

El contenido líquido de las gotas de aceite puede contener uno o varios agentes activos, elegidos entre los agentes cosméticos, farmacéuticos, comestibles o lubricantes, que pueden ser hidrófilos o hidrófobos. El líquido puede contener partículas sólidas en suspensión, como nanopartículas metálicas, partículas minerales o partículas compuestas, por ejemplo. Ventajosamente, cuando están presentes, el tamaño de estas partículas oscila entre 10 nm y 10 µm. En el coeficiente líquido puede haber partículas líquidas en suspensión, como gotitas de emulsión de tipo agua de manantial, cuyo tamaño oscila entre 10 nm y 10 µm.

En una realización particular, el aceite 1 corresponde a un aceite vegetal, en particular un aceite de soja.

En una realización particular, el aceite 1 corresponde a un aceite mineral que contiene opcionalmente nanopartículas de Fe_2O_3 en suspensión.

Por "tensoactivo de fragmentación" se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier molécula conocida por los expertos en la técnica que facilite la dispersión del aceite 1 en la solución acuosa 2. Puede tratarse de un tensoactivo aniónico, catiónico, zwitteriónico o no iónico, de origen natural o sintético.

Entre los tensoactivos aniónicos, se pueden citar, en particular, los sulfatos de sodio (por ejemplo, sodio) de alcohol graso lineal o ramificado, saturado o insaturado, de 8 a 20 átomos de carbono, como el laurilsulfato de sodio (también llamado dodecilsulfato de sodio o SDS).

Entre los tensoactivos catiónicos, podemos citar el bromo o el cloro de cetrimonio (también llamados bromo y cloro de hexadeciltrimetilamonio o CTAB y CTAC).

Entre los tensoactivos zwitteriónicos, se pueden citar principalmente las betaínas como la betaína de coco (también llamada cocoamidopropil betaína o CAPB).

Entre los tensoactivos no iónicos, cabe citar los ésteres de sorbitano polioxietilénicos (conocidos con el nombre comercial "Tween"), los éteres de polietilenglicol (en particular las series comerciales "Brij" y "Triton"), los poloxámeros (conocidos con el nombre comercial "Pluronic"), como Pluronic F68.

En una realización particular, el tensoactivo de fragmentación es un poloxámero como el Pluronic F68.

La etapa a) es una etapa de emulsificación que puede realizarse siguiendo todos los procedimientos bien conocidos por el hombre de negocios. La dispersión del aceite 1 en la solución acuosa 2 puede realizarse mediante emulsificación manual, con ayuda de membranas, de un emulsificador de Couette o de un dispositivo microfluídico, o según el procedimiento descrito por Obey et Vincent [J. Colloid interface Sci. 163, 454 (1994)].

Al final de la etapa a), las gotas de aceite obtenidas en suspensión en la fase acuosa de la emulsión 3 tienen un diámetro comprendido entre 1 y 20 µm, en particular entre 2 y 15 µm, ventajosamente entre 3 y 10 µm..

El diámetro de las gotitas se determina mediante microscopía y análisis de imagen, como se describe en los Ejemplos.

Entendemos por "disolvente aprótico polar", en el sentido de la presente invención, un disolvente que posee un momento dipolar no nulo y que no contiene ningún átomo de hidrógeno ácido, es decir, ningún átomo de hidrógeno ligado a un heteroátomo como N, O o S. Puede tratarse, por ejemplo, de una cetona, de un sulfóxido, de una amida N,N-disustituida, de un éster, de una amina N,N-disustituida, de un éster, de una amina N,N-disustituida o de un éster. Puede tratarse, por ejemplo, de una cetona, un sulfóxido, una amida N,N-disustituida, un éster, una amina terciaria o un heterociclo.

Por "cetona", en el sentido de la presente invención, se entiende un compuesto $R_1\text{-CO-R}_2$, en el que R_1 y R_2 son grupos alquilo ($C_1\text{-C}_6$), idénticos o diferentes. Como ejemplo podemos citar la propanona y la butanona.

Por "sulfóxido", se entiende en el sentido de la presente invención un compuesto $R_3\text{-SO-R}_4$, en el que R_3 y R_4 son grupos alquilo ($C_1\text{-C}_6$), idénticos o diferentes. Como ejemplo, se puede citar el dimetilsulfóxido. (DMSO).

- 5 Por "amida N,N-disustituida", se entiende en el sentido de la presente invención un compuesto $R_5\text{-CO-NR}_6\text{R}_7$, en el que R_5 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ($C_1\text{-C}_6$), y R_6 y R_7 son grupos alquilo ($C_1\text{-C}_6$), idénticos o diferentes. Como ejemplo, se puede citar N,N-dimetilformamida (DMF).

- 10 Por "éster", se entiende en el sentido de la presente invención un compuesto $R_9\text{-COO-R}_{10}$, en el que R_9 y R_{10} son grupos alquilo ($C_1\text{-C}_6$), idénticos o diferentes. El éster puede ser un acetato, es decir, un compuesto $\text{CH}_3\text{COO-R}_{10}$. Como ejemplo, se puede citar el acetato de etilo.

Por "amina terciaria", se entiende en el sentido de la presente invención un compuesto $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}\text{R}_{13}$, en el que R_{11} , R_{12} y R_{13} son grupos alquilo ($C_1\text{-C}_6$), idénticos o diferentes. Como ejemplo, se puede citar la trietilamina.

- 15 Por grupo "alquilo ($C_1\text{-C}_6$)", se entiende, en el sentido de la presente invención, una cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que contiene de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4, átomos de carbono. A título de ejemplo, podemos citar los grupos metilo, étilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o incluso hékilo.

Por "heterociclo" se entiende, en el sentido de la presente invención, un ciclo saturado o no, aromático o no, y que contiene uno o más heteroátomos, como por ejemplo átomos de sulfuro, nitrógeno u oxígeno. Puede tratarse de un hidrociclo de 5 ó 6 cadenas que contenga de 1 a 4, o incluso 1 ó 2, heteroátomos. Como ejemplo, podemos citar la piridina.

- 20 En particular, el disolvente aprótico polar se selecciona en el grupo constituido por DMSO, acetato de etilo, acetonitrilo, piridina, butanona, trietilamina, N,N-dimetilformamida (DMF) y sus mezclas. Preferentemente, se trata de un sulfóxido como el DMSO.

Cualquier lípido anfifílico conocido por los expertos en la materia, natural o sintético, puede utilizarse durante la etapa b) que conduce a la obtención de la solución de funcionalización 4.

- 25 Se puede tratar o no de un lípido fluorescente. Entre los lípidos fluorescentes, cabe destacar la 1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina carboxifluoresceína (también denominada DOPE CF).

En una realización, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfoglicéridos, esfingolípidos fosforilados o fosfatidilinositoles.

- 30 Entre los fosfoglicéridos, se pueden citar las fosfatidiletanolaminas, como la 1,2-dioléoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y la 1,2-distéaroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE); las fosfatidilcolinas y las fosfatidilserinas.

Entre los esfingolípidos fosforilados, se puede citar la esfingosina-1-fosfato.

Entre los fosfatidilinositoles, se pueden citar los glicofosfatidilinositoles (GPI).

Ventajosamente, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfatidiletanolaminas como DOPE o DSPE.

- 35 En una realización particular, los lípidos contienen al menos un grupo fluoróforo y/o al menos una biomolécula, que puede ser injertado(a) mediante un enlazador.

Este enlazador puede estar inicialmente presente en el lípido utilizado en la etapa b), o bien puede injertarse posteriormente.

Puede incluir, por ejemplo, una cadena de polietilenglicol (PEG), o un grupo de nitriloacetato (NTA) opcionalmente formando complejo con níquel (Ni-NTA). Ventajosamente, se trata de una cadena PEG.

- 40 Como fluoróforo de grupo, se pueden citar, por ejemplo, la 6-carboxifluoresceína (CF), la fluoresceína, la rodamina, los fluoróforos de las gamas comerciales "Alexa Fluor" y "DyLight", y en particular la 6-carboxifluoresceína.

La biomolécula puede ser, por ejemplo, una vitamina, como la biotina, un péptido, como el ácido arginilglicílico aspártico (RGD), una proteína, como la estreptavidina, una enzima, un anticuerpo, en particular una inmunoglobulina de tipo G (IgG) o una asociación de éstas.

- 45 Puede ser fluorescente o no, y su fluorescencia puede ser intrínseca o deberse a la presencia de un grupo fluoróforo.

Puede incluirse inicialmente en el lípido utilizado en la etapa b), o injertarse posteriormente como se describe a continuación.

Ventajosamente, la biomolécula es una biotina. Según la descripción, un lípido injertado con biotina mediante una cadena PEG puede denominarse "lípido biotinilado".

5 En otro modo de realización particular, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfatidiletanolaminas como DOPE o DSPE, eventualmente injertadas por al menos un grupo fluoróforo y/o por al menos una biomolécula, opcionalmente por medio de un enlazador.

En particular, los lípidos se seleccionan dentro del grupo constituido por DOPE-CF, DSPE-PEG-RGD, DSPE-PEG-Biotina y sus mezclas. Ventajosamente, los lípidos se seleccionan en el grupo formado por DOPE-CF, DSPE-PEG-Biotina y sus mezclas.

En una realización, se añade un tensioactivo de dispersión a la etapa c).

10 Por "tensioactivo de dispersión" se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier molécula anfifílica que permita evitar la formación de agregados.

De preferencia, el tensioactivo de dispersión opcionalmente añadido en la etapa c) es no desnaturizante frente a las proteínas.

15 En particular, se trata de un tensioactivo no iónico, como un éster de sorbitano polioxietilénico o un éter de polietilenglicol (serie "Tween" o "Brij"), o de un poloxámero, o de un tensioactivo zwitteriónico, como el sulfobetano.

Ventajosamente, el tensioactivo de dispersión añadido en la etapa c) es el Tween 20 o el Pluronic F68.

Cuando se añade un tensioactivo de dispersión en la etapa c), su concentración en la mezcla de funcionalización 5 es inferior a 5 veces su concentración micelar crítica (CMC), preferentemente inferior a 2 veces su CMC, especialmente inferior a 1,5 veces su CMC, o incluso inferior o igual a su CMC.

20 En una realización, una solución tampón 6 se añade a la etapa c). Preferiblemente, su pH está comprendido entre 5 y 9, en particular entre 6 y 8, por ejemplo su pH es aproximadamente 7. Puede ser en particular un tampón fosfato.

La fracción volumétrica del disolvente aprótico polar en la mezcla de funcionalización 5 obtenida en la etapa c) está comprendida entre el 1 y el 15 %, preferentemente entre el 5 y el 15 %, ventajosamente entre el 8 y el 15 %.

25 En una realización, la etapa d) de incubación se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 °C y 40 °C, preferentemente entre 20 °C y 30 °C, y preferentemente durante un tiempo comprendido entre 10 min y 10 h, preferentemente entre 30 min y 5 h, preferentemente entre 1 h y 3h.

En una realización particular, el aceite 1 dispersado en la solución acuosa 2 contiene nanopartículas de Fe₂O₃ en suspensión. La puesta en práctica de este procedimiento según la invención permite obtener un coloide compuesto por partículas coloidales líquidas que funcionan magnéticamente.

30 En esta realización, el aceite 1 es preferiblemente un aceite mineral.

En una realización particular, el aceite 1 disperso en la solución acuosa 2 tiene una densidad superior a 1. La puesta en práctica de este procedimiento según la invención permite obtener un coloide compuesto por partículas coloidales líquidas funcionalmente más densas que la fase acuosa del coloide.

En esta realización, el aceite 1 es preferentemente un aceite halogenado.

35 En una realización, el procedimiento según la invención comprende después de la etapa e) una etapa suplementaria f) de injerto de biomoléculas sobre los lípidos adsorbidos en la superficie de las gotas de aceite.

Las biomoléculas injertadas durante esta etapa f) pueden ser, entre otras, vitaminas, péptidos, proteínas, como la estreptavidina, enzimas, anticuerpos y, en particular, inmunoglobulinas de tipo G (IgGs).

Pueden ser fluorescentes o no, y su fluorescencia puede ser intrínseca o deberse a la presencia de un grupo fluoróforo.

40 En particular, cuando los lípidos adsorbidos en la superficie de las gotitas de hule son lípidos biotinilados, las moléculas de estreptavidina, avidina, avidina monomérica, neutravidina o IgGs anti-biotina pueden injertarse durante la etapa f).

Un objeto de la presente divulgación se refiere a un coloide que comprende partículas coloidales líquidas funcionalizadas que pueden obtenerse mediante el procedimiento descrito anteriormente.

45 Por otra parte, la presente divulgación también tiene por objeto un coloide compuesto por partículas coloidales líquidas que funcionan en suspensión en un líquido,

- que dicho líquido esté constituido por una solución acuosa que contenga un disolvente aprótico polar, comprendiendo la fracción volumétrica de dicho disolvente aprótico polar en dicho líquido entre el 1 y el 15 %, preferentemente entre el 5 y el 15 %, preferentemente entre el 8 y el 15 %; y

5 • dichas partículas coloidales líquidas funcionalizadas consisten en gotas de aceite en cuya superficie se adsorben lípidos.

En particular, el disolvente aprótico polar es el definido anteriormente y seleccionado ventajosamente en el grupo constituido por DMSO, acetato de etilo, acetonitrilo, piridina, butanona, trietilamina, N,N-dimetilformamida (DMF) y sus mezclas. Preferentemente, se trata de un sulfóxido como el DMSO.

10 El aceite puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal tal como aceite de soja, un aceite de silicona, un aceite halogenado (incluido un aceite fluorado, un aceite yodado o un aceite bromado), o una mezcla de los mismos.

En una realización particular, las gotas de aceite son gotas de aceite mineral y contienen nanopartículas de Fe_2O_3 en suspensión.

En otra realización particular, el aceite tiene una densidad superior a 1. Preferiblemente, es un aceite halogenado.

15 Todos los lípidos anfífilos conocidos en el mercado, naturales o sintéticos, pueden adsorberse a la superficie de las gotas de aceite.

Puede ser o no un lípido fluorescente. Entre los lípidos fluorescentes, es posible detectar la carboxifluoresceína 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada DOPE CF).

En una realización, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfoglicéridos, esfingolípidos fosforilados o fosfatidilinositoles.

20 Entre los fosfoglicéridos, se pueden citar las fosfatidiletanolaminas, como la 1,2-dioléoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y la 1,2-distéaroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE); las fosfatidilcolinas y las fosfatidilserinas.

Entre los esfingolípidos fosforilados, se puede citar la esfingosina-1-fosfato.

Entre los fosfatidilinositoles, se pueden citar los glicofosfatidilinositoles (GPI).

Ventajosamente, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfatidiletanolaminas como DOPE o DSPE.

25 En una realización particular, los lípidos contienen al menos un grupo fluoróforo y/o al menos una biomolécula, que puede ser injertado(a) mediante un enlazador.

Este enlazador puede incluir una cadena de polietilenglicol (PEG) o un grupo de nitriloacetato (NTA) opcionalmente formando complejo con níquel (Ni-NTA). Ventajosamente, es una cadena PEG.

30 Como fluoróforo de grupo, se pueden citar, por ejemplo, la 6-carboxifluoresceína (CF), la fluoresceína, la rodamina, los fluoróforos de las gamas comerciales "Alexa Fluor" y "DyLight", y en particular la 6-carboxifluoresceína.

La biomolécula puede ser, por ejemplo, una vitamina, como la biotina, un péptido, como el ácido arginilglicílico aspártico (RGD), una proteína, como la estreptavidina, una enzima, un anticuerpo, en particular una inmunoglobulina de tipo G (IgG) o una asociación de éstas.

Puede ser fluorescente o no, y su fluorescencia puede ser intrínseca o deberse a la presencia de un grupo fluoróforo.

35 Ventajosamente, la biomolécula es una biotina, típicamente injertada por medio de una cadena PEG.

El fragmento PEG-biotina también puede representar un enlazador, sobre el que se puede injertar una biomolécula que presente afinidad por la biotina, como la estreptavidina, la avidina, la avidina monomérica, la neutravidina o una IgG antibiotina.

40 En otro modo de realización particular, los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfatidiletanolaminas como DOPE o DSPE, eventualmente injertadas por al menos un grupo fluoróforo y/o por al menos una biomolécula, opcionalmente por medio de un enlazador.

En particular, los lípidos se seleccionan en el grupo constituido por DOPE-CF, DSPE-PEG-RGD, DSPE-PEG-Biotina y sus mezclas. Ventajosamente, los lípidos se seleccionan en el grupo formado por DOPE-CF, DSPE-PEG-Biotina y sus mezclas.

45 En una realización particular, el coloide es tal que, dentro de una subpoblación de partículas con un diámetro igual a $d \pm 15\%$, el coeficiente de variación de la cantidad de lípidos adsorbidos en la superficie de las gotitas es inferior o igual al 20 %.

La presente divulgación se refiere a la utilización de un coloide como el descrito anteriormente para la calibración de un citómetro en flujo.

La presente divulgación se refiere principalmente a la utilización de un coloide compuesto de partículas coloidales líquidas funcionalizadas que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención para calibrar un citómetro en flujo.

La presente divulgación se refiere además a la utilización de un coloide como el descrito anteriormente para el estudio de su ingestión por células, como la fagocitosis por macrófagos. Ventajosamente, la densidad del hule constitutivo de las partículas coloidales líquidas funcionalizadas es también superior a 1. Normalmente, se trata de un aceite halogenado.

La presente divulgación se refiere sobre todo a la utilización de un coloide compuesto de partículas coloidales líquidas funcionales susceptibles de ser obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención para el estudio de su ingestión por células, tales como la fagocitosis por macrófagos. Ventajosamente, la densidad del hule constitutivo de las partículas coloidales líquidas funcionalizadas es también superior a 1. Normalmente, se trata de un aceite halogenado.

Figuras

- La Figura 1 es una representación esquemática del prototipo de obtención de gotas de emulsión que funcionan con lípidos según la invención.
- Las Figuras 2A y 2B muestran las distribuciones de los tonos de las gotas en las emulsiones A (Fig. 2A) y B (Fig. 2B). Las muestras tienen un diámetro igual, respectivamente, de $8 \pm 20 \text{ } \mu\text{m}$ y de $5,3 \pm 20 \text{ } \mu\text{m}$.
- La Figura 2C corresponde a la distribución del tamaño de una submuestra de diámetro $8 \pm 1 \text{ } \mu\text{m}$ (emulsión C).
- La Figura 3A corresponde a la imagen de las gotitas activadas por DOPE-CF registrada mediante microscopía confocal de disco giratorio (barra de nivel = $15 \text{ } \mu\text{m}$).
- La figura 3B representa el perfil de fluorescencia de una gota de la figura 3A (véase el trazo punteado, Fig. 3A).
- La Figura 3C corresponde a la imagen de la emulsión afuncionalizada por DOPE-CF tomada por microscopía de fluorescencia de campo amplio con un objetivo 40x. Las gotitas muestran una fluorescencia homogénea debido a la profundidad de campo del objetivo (barra de escala = $20 \text{ } \mu\text{m}$).
- La figura 3D muestra la distribución de la fluorescencia de una submuestra de una emulsión de diámetro igual a $8 \pm 1 \text{ } \mu\text{m}$ (emulsión C) funcionalizada por DOPE-CF. Los datos experimentales se miden por epifluorescencia en campo amplio y siguen una distribución normal ($\text{CV} = 8 \text{ } \%$). Las intensidades de fluorescencia se normalizan en relación con el valor medio del subgrupo.
- La Figura 3E muestra la intensidad de fluorescencia integrada de las gotas de emulsión fundidas por DOPE-CF (5 eq.) en función del cuadrado del radio de las gotas (R^2) y medida por microscopía de epifluorescencia. Los datos experimentales siguen un funcionamiento lineal.
- La Figura 4 corresponde a la curva de valoración de las gotas que funcionan con DOPE-CF. La densidad de fluorescencia de las gotas, es decir, la fluorescencia total por objeto dividida por su superficie en las imágenes, se representa en función de la concentración en DOPE-CF, expresada en equivalente de superficie respecto a una monocapa.
- La Figura 5 corresponde a la curva de valoración de las gotas que funcionan con DSPE-PEG-biotina en relación con la concentración de lípidos biotinilados. Después de insertar el lípido biotinilado no fluorescente, se añaden igGs fluorescentes a la fase acuosa a una concentración de saturación de 5 eq.
- Las figuras 6A y 6B muestran las distribuciones de fluorescencia obtenidas para las gotas de la emulsión C procesadas con DSPE-PEG-biotina-estreptavidina (fig. 6A) o DSPE-PEG-biotina-igG (fig. 6B). Los coeficientes de variación son del 14 % y el 16 %, respectivamente.
- Las figuras 7A y 7B corresponden a las curvas de valoración obtenidas para el injerto de la estreptavidina (Fig. 7A) y de la igG anti-biotina (Fig. 7B) en gotas funcionalizadas por DSPE-PEG-biotina.
- Las Figuras 8A y 8B muestran las cinéticas de injerto de la estreptavidina (Fig. 8A) y de la IgG anti-biotina (Fig. 8B) en las gotas biotiniladas, determinadas por medidas de fluorescencia realizadas con un citómetro en flujo. Las gotas se biotinilaron con una solución de DSPE-PEG-biotina (100 equivalentes) que contenía un

10 % v/v de DMSO. Las barras de error corresponden al tipo de error calculado a partir de N = 3 experiencias independientes. Los datos experimentales corresponden a películas de primer orden en ambos casos.

- 5
 - Las Figuras 9A y 9B muestran la intensidad total de fluorescencia medida por citometría en flujo para gotas funcionalizadas con DOPE-CF (Fig. 9A) o DSPE-PEG-biotina (Fig. 9B) sobre las que a continuación se injertan igGs fluorescentes, en función del momento dipolar del disolvente utilizado en la solución de funcionalización.
- 10
 - La Figura 10A muestra la intensidad total de fluorescencia medida para las gotas que funcionan con DOPE-CF, en función del tiempo, para fracciones volumétricas en DMSO en la fase continua durante la etapa de adsorción de la variante de lípidos entre 0 y 15 % v/v. Para cada punto indicado en el gráfico, las boquillas han funcionado con una concentración de DOPE-CF de 2,5 equivalentes.
 - La Figura 10B muestra la intensidad total de fluorescencia medida para las gotas que funcionan con una concentración de DOPE-CF de 2,5 equivalentes, en función de la fracción volumétrica en DMSO en la fase continua durante la etapa de adsorción de los lípidos que varía entre 0 y 15% v/v, para tiempos de reacción de 15, 30, 60 y 120 minutos. La fluorescencia de las gotas se midió mediante citometría en flujo.
- 15
 - La Figura 11 muestra una imagen clara del dispositivo de focalización de microfluidos utilizado para la producción de gotitas magnéticas monodispersas.
 - Las figuras 12A y 12B representan las distribuciones de tonos (figura 12A) y de fluorescencia (figura 12B) de las gotas magnéticas biotiniladas injertadas con IgGs anti-biotina fluorescentes obtenidas por el dispositivo anterior. Las gotitas tienen un diámetro igual a $14,7 \mu\text{m} \pm 2 \%$ y un CV de fluorescencia igual al 10 %.
- 20
 - Las figuras 13A y 13B muestran la distribución de gotas magnéticas biotiniladas conjugadas con igGs fluorescentes anti-biotina sin (figura 13A) o con aplicación de un campo magnético (figura 13B) (barra de nivel: 30 μm).
- 25
 - La Figura 14A corresponde al diagrama de densidad FL vs. SS obtenido por citometría en flujo en el caso de gotas que funcionan con DSPE-PEG-biotina según el procedimiento de la invención y que han sido injertadas con IgGs fluorescentes anti-biotina.
 - La Figura 14B corresponde al diagrama de densidad FL vs. SS obtenido por citometría en flujo en el caso de gotas que funcionan con DSPE-PEG-biotina según un protocolo anterior (en el que los lípidos se diluyen en el agua antes de la emulsificación) y se injertan con igGs fluorescentes anti-biotina.
- 30
 - La Figura 15A corresponde a una imagen obtenida por microscopía de epifluorescencia de campo amplio de gotas (de un diámetro máximo de 8 μm) que funcionan con DSPE-PEG-biotina según el protocolo anterior (en el que los lípidos se diluyen en el agua antes de la emulsificación) y se injertan con IgG fluorescentes anti-biotina (barra de escala: 20 μm).
 - La Figura 15B representa la distribución de fluorescencia normalizada de gotas anteriores (Fig. 15A). Los datos experimentales corresponden a una distribución log-normal ($\mu = -0,31$; $\sigma = 0,78$; CV = 92 %). Las intensidades de fluorescencia se normalizan en relación con el valor medio del conjunto de la población.
- 35
 - La Figura 16A corresponde a una representación esquemática del dispositivo utilizado durante las experiencias de fagocitosis. Las células se depositan sobre una placa de Pétri con fondo de vidrio óptico. Las gotitas funcionales se dispersan en el medio de cultivo, se sedimentan por efecto de la gravedad, entran en contacto con las células y finalmente se interiorizan.
- 40
 - La Figura 16B corresponde a una imagen de microscopía de fondo claro que representa una experiencia de fagocitosis de gotas de aceite más densas que el medio de cultivo por IgG cuando se ponen en contacto con macrófagos de línea. La figura 16C representa la experiencia de control realizada con gotas que no presentaban IgG en la superficie.

Ejemplos

45 Se utilizaron las siguientes abreviaturas:

BSA:	albumine sérique bovine
CF:	6-carboxifluoresceína
CMC:	concentración micelar crítica
CV:	coeficiente de variación

DMEM:	medio Eagle modificado Dulbecco
DMF:	N,N-dimetilformamida
DMSO:	diméthylsulfoxyde
DOPE-CF:	1,2-dioléoyl-sn-glicero-3-fosfoéanolamina-N-(carboxifluoresceína)
5 DSPE-PEG- biotina:	1,2-distéaroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[biotinil (polietilenglicol)-2000]
IgG:	inmunoglobulina G
PB:	tampón fosfato
PBS:	tampón fosfato salino
PDMS:	polidimetilsiloxano

10 Materiales y procedimientos

A) Materiales

Aceite de soja (Nº CAS 8001-22-7), aceite mineral (Nº CAS 8042-47-5), Pluronic F68 (Nº CAS 9003-11-6), Tween 20 (Nº CAS 9005-64-5), ácido oleico (Número CAS 112-80-1), alginato de sodio (Nº CAS 9005-38-3), DMSO, acetonitrilo, el DMF, piridina, butanona, acetato de etilo y trietilamina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia).

15 DOPE-CF y DSPE-PEG-biotina se adquirieron de Avanti Polar Lipids.

IgG anti-biotina de ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (Ref. 200-542-211) se adquirió en Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, EE.UU.).

La estreptavidina FluoProbes 488 se adquirió en Interchim.

B) Fabricación de la emulsión con un emulsionador de Couette

20 El aceite de soja se dispersó y emulsionó a mano en una fase acuosa continua que contenía 15% en peso del tensioactivo de copolímero en bloque Pluronic F68 (CMC = 0,03 g.l⁻¹) y 1% en peso de alginato de sodio hasta una fracción de aceite final igual al 75% en peso.. La emulsión bruta se sometió a un cizallamiento en un aparato de célula de Couette siguiendo el procedimiento desarrollado por Mason *et al.* [9] para fabricar dos botellas de emulsiones casi monodispersas con diámetros medios de $8 \pm 2 \mu\text{m}$ (emulsión A, Fig. 2A) y $5,5 \pm 2 \mu\text{m}$ (emulsión B, Fig. 2B),
25 respectivamente. Para el almacenamiento y la manipulación, las emulsiones se diluyeron hasta alcanzar una fracción de aceite del 60 % en peso con un 1 % en peso de Pluronic F68 en la fase continua y se almacenaron a 12 °C en una cámara de refrigeración Peltier durante varias semanas.

C) Preparación de soluciones de funcionamiento

30 Después de la evaporación del cloroformo en el que se obtienen los fosfolípidos, los lípidos se disuelven en un disolvente polar a una concentración de 1 mg/mL para DOPE-CF y de 10 mg/mL para DSPE-PEG-Biotina. Se prepararon soluciones de funcionalización con DMSO, acetonitrilo, DMF, piridina, butanona, acetato de etilo y trietilamina.

D) Protocolo de funcionamiento de las gotitas con fosfolípidos

35 Las gotas en emulsión se diluyen en un microtubo hasta una concentración de aproximadamente $5 \cdot 10^6$ gotas. μL^{-1} en 200 μL de un tampón fosfato (pH = 7,2, 20 mM) completado con Tween 20 a su CMC = 0,006 g.L⁻¹ [10]. La suspensión se centrifuga y se lava 4 veces con el tampón de fosfato para disminuir la cantidad de Pluronic F68 en la fase continua. Tras la última etapa de aclarado, se elimina la mayor parte de la solución acuosa del microtubo para obtener 10 μL de emulsión. A continuación, se añade entre 0 y 10% v/v de solución de funcionalización, y para finalizar el tampón fosfato con Tween 20 (CMC) para alcanzar un volumen final de 200 μL de suspensión.

40 Las gotitas se incuban durante 90 minutos a temperatura ambiente en presencia de lípidos en la fase continua, y finalmente se lavan varias veces con la mezcla PB/Tween 20 CMC para eliminar de la solución los fosfolípidos no adsorbidos.

45 La cantidad de fosfolípidos disponibles inicialmente en la fase continua se ajusta diluyendo la solución de funcionalización con ayuda de su co-solvente de manera que la fracción volumétrica del co-solvente sea la misma en todas las experiencias. En la mayoría de los casos, se utilizó DMSO como co-solvente, en una fracción volumétrica del 10 % v/v.

La concentración de lípidos en la fase continua se expresa en equivalentes de superficie de gotitas en relación con el número de moléculas necesarias para cubrir la interfaz de las gotitas con una monocapa compacta de lípidos. La superficie por tejido lipídico es de 12 nm² para el DSPE-PEG-Biotina [11] y de 0,5 nm² para el DOPE-CF [12], lo que corresponde respectivamente a un volumen de solución de funcionalización igual a 0,04 µL y 3,55 µL para alcanzar un equivalente de superficie de fosfolípidos para una suspensión de gotitas de 8 µm que contiene unas 5.10⁶ gotitas.

E) Injerto de IgG anti-biotina en gotas biotiniladas

El acoplamiento de IgGs a biotinas presentes en la superficie de las gotas se obtuvo tras una incubación de 30 minutos de la suspensión de gotas (200 µL, 5. 10⁶ gotas) con una cantidad variable de una solución madre de IgG anti-biotina de ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (0,8 mg/mL). 10⁶ gotas) con una cantidad variable de una solución madre de IgG anti-biotina de ratón conjugada con Alexa Fluor 488 (0,8 mg/mL) a temperatura ambiente en un tampón fosfato (PB, pH = 7,2, 20 mM, Tween 20 a la CMC). Para gotitas de 8 µm, el volumen de solución madre a utilizar para obtener una concentración correspondiente a una superficie equivalente de igG en las gotitas es igual a 2,5 µL si se considera una superficie molecular de 120 nm² por igG [13]. Las gotas se enjuagan varias veces en el mismo tampón para eliminar los gérmenes que no se hayan replicado y se observan al microscopio.

F) Injerto de estreptavidina en gotas biotiniladas

Las estreptavidinas se adsorben específicamente en la superficie de las gotas funcionales mediante lípidos biotinilados. El acoplamiento se obtuvo tras una incubación de 30 minutos de la suspensión de gotas (200 µL, 5.10⁶ gotas) con una cantidad variable de una solución madre de estreptavidina FluoProbes 488 (1 mg/mL) a temperatura ambiente en un tampón de fosfato (PB, pH = 7,2, 20 mM, Tween 20 a la CMC). En el caso de gotitas de 8 µm, el volumen de solución madre que debe utilizarse para obtener una concentración correspondiente a una superficie equivalente de estreptavidina en las gotitas es igual a 5,78 µL si se considera una superficie molecular de 16,6 nm² por estreptavidina [13].

Las gotas se enjuagan varias veces en el mismo tampón para eliminar la estreptavidina que no se ha replicado y se observan al microscopio.

G) Microscopía y análisis de imágenes

Las imágenes claras y fluorescentes se obtuvieron con un microscopio Zeiss Axio Observer Z1 (Oberkochen, Alemania) conectado a una cámara PCO Edge 4.2 sCMOS (PCO, Alemania). La epiluminación se ha realizado con un sistema Lumencor Spectra X LED. La distribución de las partículas y la fluorescencia de las gotas en la emulsión se midieron mediante microscopía y análisis de imagen. Todos los cálculos se han realizado con los programas Fiji / ImageJ [5] y R [6]. Las gotitas se observan con un objetivo Zeiss x40. Los registros de microscopía de disco giratorio se han realizado con un microscopio Leica SD AF, con un objetivo x40.

H) Citometría de flujo

Las gotas de emulsión se caracterizaron mediante un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences, New Jersey, USA).

I) Fabricación del dispositivo de microfluidos

El dispositivo está fabricado en PDMS, utilizando técnicas estándar de litografía blanda. [14]. Se fabricó un máster SU-8 (SU-8 20XX, Microchem) sobre una placa de silicio con ayuda de un dispositivo de mascarilla láser de escritura directa (Kloe Dilase 650), y a continuación se realizó el moldeado PDMS (RTV 615, relación 1.10 para el agente reticulante, RTV 615, Momentive Performance Materials), seguido de un tratamiento térmico a 80 °C durante dos horas: 10 para el agente reticulante, RTV 615, Momentive Performance Materials), seguido de un tratamiento térmico a 80 °C durante dos horas. Las superficies de PDMS y la lámina de vidrio (VWR, 50 × 24 mm) que forman el canal se trataron con plasma O₂ (Cute Plasma, Corée) antes de esparcir las dos partes del conjunto de color rojo. Las dimensiones del canal de focalización del flujo son: anchura (l) = 10 µm, altura (h) = 12 µm y longitud (L) = 10 µm.

J) Síntesis del ferrofluido

El ferrofluido está constituido por nanopartículas de maghemita (Fe₂O₃) producidas por coprecipitación en una fase acuosa de Fe (II) y Fe (III) en condiciones alcalinas, siguiendo el procedimiento desarrollado por Massart [15]. El tamaño de las nanopartículas oscila entre 5 y 20 nm y depende de la cinética de la reacción. Para los ensayos descritos a continuación se utilizaron partículas con una distribución de cola de 7 ± 1,6 nm. Tras la síntesis, la fase acuosa se cambia con cloroformo utilizando un exceso de ácido oleico que actúa como tensioactivo y estabilizador. La concentración de hierro en el producto final se ha calculado y es de 1,57 M.

Resultados

1. Distribución de fluorescencia de las gotas.

Un fosfolípido fluorescente, la DOPE carboxifluorescente (CF), se disolvió en 10 % v/v de DMSO en el agua según el protocolo descrito en la sección "Materiales y procedimientos", sección D), para estudiar su inserción en la superficie de gotas de aceite de soja de 8 µm. La figura 3A muestra una imagen de gotitas en microscopía confocal con disco giratorio. Las gotitas presentan una interfaz fluorescente homogénea y una parte central prácticamente negra, lo que indica que los fosfolípidos fluorescentes sólo están presentes en la superficie (véase también la Fig. 3B). Después de medir la distribución de la fluorescencia de las gotas con un microscopio de epifluorescencia de fondo claro sobre varios miles de objetos, la figura 3D muestra la distribución de la fluorescencia de un manchón de emulsión (emulsión C, Fig. 2C) con un diámetro de 8 ± 1 µm. La fluorescencia es muy homogénea y presenta una distribución normal con un tipo de escarcha del 9 %.

2. Intensidad de fluorescencia en función del tamaño de las gotas.

Utilizando un software de análisis de imágenes en las imágenes de epifluorescencia de las gotas, con el umbral binario apropiado, es posible representar la intensidad de fluorescencia integrada en toda el área plana de las gotas I_{Total} . La figura 3E muestra también que I_{Total} varía linealmente con el radio de las gotitas. Dado que la fluorescencia, que se supone proporcional a la cantidad de lípidos en las gotitas, sólo se encuentra en la superficie de las emulsiones, la fluorescencia media por objeto se expresa según la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\langle I \rangle = \frac{I_{Total}}{R^2}$$

y es proporcional a la densidad molecular de superficie Γ los lípidos por unidad de superficie.

3. Titulación de la adsorción de DOPE-CF en la superficie de las gotas

Para medir y caracterizar el equilibrio de adsorción de fosfolípidos fluorescentes modélicos en la interfaz de emulsión, se funcionalizaron gotas de aceite de soja de 8 µm (emulsión C) en una solución acuosa que contenía DMSO al 10% v/v y una concentración de lípidos DOPE-CF que oscilaba entre 0,1 y 20 equivalentes de superficie, siguiendo el protocolo resumido en la sección Materiales y procedimientos, sección D). La figura 4 representa la intensidad de fluorescencia media por gota, que está directamente relacionada con la densidad de superficie en lípidos, en función de la concentración en lípidos. Se expresa en número de equivalentes en relación con la cobertura de la superficie por una monocapa de lípidos. La curva corresponde a una isoterma de Langmuir que cumple la siguiente ecuación (Ec.2):

$$\langle I \rangle = \langle I_0 \rangle \frac{1}{1 + \frac{1}{KC}}$$

donde $\langle I_0 \rangle$ es el valor de intensidad media máxima, C la concentración de lípidos expresada en equivalentes y K la constante de afinidad aparente. Según los resultados obtenidos, la constante de afinidad entre DOPE-CF y las gotitas es igual a $K_{DOPE-CF} = 0,6 \pm 0,25 \text{ eq}^{-1}$.

4. Titulación de la adsorción de lípidos biotinilados en la superficie de las gotas

Los inventores han demostrado que las gotas de emulsión pueden funcionar con proteínas adhesivas como la estreptavidina [2] o las inmunoglobulinas [4]. Para ello, normalmente se introducen moléculas de DSPE-PEG-biotina en la interfase agua/agua y, a continuación, se injertan con antibiotina-igGs o estreptavidina de forma específica.

Gotas de aceite de soja de 8 µm se pusieron en suspensión en un tampón PB / Tween 20 CMC con 10% v / v de DMSO y una concentración inicial de DSPE-PEG-biotina de 0 a 200 equivalentes de superficie. Después de 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, las gotitas se incrustan según el protocolo indicado en la sección Materiales y procedimientos, apartado D).

Para comprobar la presencia de DSPE-PEG-biotina no fluorescente y construir la escala de valoración, se añade a la suspensión una cantidad saturada de IgGs anti-biotina fluorescentes (5 equivalentes de superficie). Después de 30 minutos de incubación, las gotas se enjuagan (Materiales y procedimientos, sección F) y se cuantifica su fluorescencia mediante microscopía. La figura 5 muestra que la curva de titulación, representada por la densidad de fluorescencia en relación con la concentración en lípidos biotinilados, se ajusta a una isoterma de Langmuir con una constante de equilibrio aparente $K_{DSPE-PEG-biotina} = 0,03 \pm 0,015 \text{ eq}^{-1}$.

5. Distribución de la fluorescencia de las gotitas biotiniladas sobre las que se injertan las proteínas

Se biotinilaron gotas de 8 µm mediante incubación con 100 eq. de DSPE-PEG-biotina y 10% v/v de DMSO en fase continua. A continuación se incuban con 5 equivalentes de estreptavidina o 10 equivalentes de igGs antibiotina. Las figuras 6A (DSPE-PEG-biotina-estreptavidina) y 6B (DSPE-PEG-biotina-igG) muestran los histogramas de fluorescencia normalizados obtenidos. El CV es del 14 % y el 16 %, respectivamente.

6. Valoración del injerto de proteínas en las gotitas biotiniladas

Teniendo en cuenta la constante de asociación aparente para la DSPE-PEG-biotina, se determinaron las curvas de titulación relacionadas con el injerto específico de la estreptavidina y de las IgGs anti-biotina en las gotas biotiniladas. En primer lugar, se biotinilan las gotas de aceite de soja (8 μm , emulsión C) con una solución tampón PB/Tween 20 CMC que contiene DMSO al 10 % v/v y 100 equivalentes de DSPE-PEG-biotina, concentración 3 veces mayor que la correspondiente a la constante de asociación de estos lípidos biotinilados. Las gotas se incuban durante 30 minutos (mucho más que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio según los estudios cinéticos de las figuras 8A y 8B) en soluciones de estreptavidina e IgG con concentraciones respectivas de 0 a 5 y de 0 a 20 equivalentes de superficie en proteínas. Las figuras 7A y 7B muestran que la cantidad de proteínas en la superficie es inferior a 1 equivalente de estreptavidina y 10 equivalentes de IgGs, respectivamente. Utilizando una isoterma de Langmuir como ecuación de ajuste, se determinan las siguientes constantes de afinidad aparente de las proteínas con las gotitas biotiniladas: $K_{\text{estreptavidina}} = 6,9 \pm 2,3 \text{ eq}^{-1}$ y $K_{\text{IgG}} = 0,5 \pm 0,18 \text{ eq}^{-1}$.

7. Influencia de la naturaleza y la concentración del tensioactivo

Como se describe en la sección D, Materiales y Procedimientos, la fabricación de gomas funcionales implica el uso de dos tensioactivos, el primero (Pluronic F68) se utiliza durante la etapa de emulsificación, mientras que el segundo (Tween 20) se utiliza durante la etapa de funcionalización. Antes de su utilización, el Pluronic F68 suele eliminarse para alcanzar una concentración inferior a su CMC. Para estudiar la influencia de la presencia de tensioactivos durante el proceso de biotinilación, se midió la intensidad media de fluorescencia de las gotas injertadas con IgG, para las que se variaron los tipos y las concentraciones de tensioactivos en presencia de DSPE-PEG-biotina durante el proceso de funcionalización. En la tabla 1 se muestra la fluorescencia media y la desviación típica medidas para gotas de IgGs que se han hecho funcionar con DSPE-PEG-Biotina en ausencia de tensioactivo en la solución de fosfolípidos (muestra 1), en presencia de Pluronic F68 o de Tween 20 a concentraciones iguales a su CMC respectiva (fracciones 2 y 4) o mucho más elevadas que su CMC (fracciones 3 y 5). Tras la incubación y el aclarado, en todos los casos se realizó el injerto de los IgG con un tampón PB/Tween 20 CMC.

Tabla 1: Influencia de la naturaleza y concentración del tensioactivo utilizado durante la etapa de biotinilación en la distribución de fluorescencia de las gotas injertadas de IgG. (diámetro = $5,3 \pm 1 \mu\text{m}$). Las concentraciones máximas de Pluronic F68 y Tween 20 se expresan en función de su concentración micelar crítica (CMC). Se ha elegido el número 3 como referencia para facilitar la comparación de los resultados.

Muestra	Tensioactivo	Conc.	Fluorescencia media (en relación con la muestra 3)	Desviación típica	CV (%)
1	ninguno	-	13,90	2,47	17,8 %
2	Plurónico F68	CMC	13,15	2,58	19,6 %
3	Plurónico F68	15xCMC	1,00	0,09	9,1 %
4	Entre 20	CMC	14,81	2,48	16,8 %
5	Entre 20	10xCMC	2,86	0,56	19,5 %

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de un tensioactivo de alta concentración, ya sea Pluronic F68 o Tween 20, es perjudicial para el funcionamiento de la interfaz de las gotas por los lípidos biotinilados. En cambio, con concentraciones bajas de tensioactivos, las intensidades de fluorescencia son máximas, no dependen de la naturaleza del tensioactivo utilizado y son similares a las medidas en ausencia de tensioactivo (tampón PB solo).

8. Influencia de la naturaleza del cosolvente en la adsorción de lípidos

Para estudiar la influencia de la naturaleza del co-solvente en la adsorción de los lípidos en la superficie de las gotitas, se utilizaron varios solventes apróticos polares para preparar las soluciones de funcionalización: acetato de etilo, piridina, butanona, DMF, acetónitrilo, trietilamina y DMSO. Todas las experiencias se realizaron diluyendo DOPE-CF o DSPE-PEG-biotina en los co-solventes en bruto, y luego trabajando con una fracción volumétrica de co-solvente del 10 % v/v en la mezcla de funcionalización. A excepción de la trietilamina, cuya presencia conduce rápidamente a la desestabilización de la emulsión, todos los demás cosolventes no tienen ninguna influencia visible sobre la estabilidad de las gotas durante la incubación a temperatura ambiente. Las concentraciones en lípidos se eligieron en 2,5 eq. para DOPE-CF y 10 eq. para DSPE-PEG-biotina respectivamente. Se utilizaron IgG fluorescentes al 5 % para demostrar la presencia del lípido biotinilado. Las figuras 9A y 9B muestran que para los dos lípidos considerados, la utilización de un co-solvente aprótico polar permite un aumento importante de la adsorción de los lípidos, y este aumento depende en gran medida del valor del momento dipolar del co-solvente.

9. Influencia de la concentración en DMSO sobre la inserción de lípidos

Para el caso particular del DMSO utilizado como co-solvente, se evaluó el efecto del aumento de su fracción volumétrica en la fase continua sobre la adsorción de lípidos (DOPE-CF, 2,5 eq.) en la superficie de las gotitas (8 μm). La figura 10 muestra que la fluorescencia total de las gotas que funcionan con DOPE-CF, medida por citometría en flujo, aumenta con la fracción volumétrica de DMSO y la cantidad inferior al 10 % v/v de cosolvente en la fase continua.

5 10. Preparación de una emulsión magnética

Se preparó una emulsión que contenía gotitas funcionalizadas por IgGs y que contenían un nodo magnético, utilizando una fase dispersa compuesta por un ferrofluido de nanopartículas de Fe_2O_3 en suspensión en aceite mineral.

10 Dado que el cloroformo es muy volátil, las nanopartículas se redispersan en una fase hidrófoba no volátil que se emulsiona en mayor medida. Después de haber examinado visualmente varios aceites (vegetales, minerales, siliconas), diferentes concentraciones de nanopartículas y ácido oleico, se determinó una formulación óptima de ferrofluido estable en el tiempo, compuesta de aceite mineral, 10 % v/v de ferrofluido inicial (1,57 M) y 5 % v/v de ácido oleico. Las gotitas magnéticas se produjeron a continuación con ayuda de un dispositivo de focalización de flujo microfluídico, controlado por presión, con canales de sección transversal rectangular uniforme de $10 \times 12 \mu\text{m}$, representado en la figura 11.

15 Después de la emulsificación, las gotas se manipulan con fosfolípidos biotinilados e IgGs fluorescentes según los protocolos descritos en la sección Materiales y Procedimientos, secciones D) y E). La homogeneidad de la fluorescencia dentro de la muestra es muy alta (Fig. 13A), con un CV cercano al 10% como se muestra en la Figura 12B. Al aplicar un campo magnético estático mediante un imán permanente comercial, las gotas se alinean (Fig. 13B) gracias a la naturaleza superparamagnética de su núcleo, que es el comportamiento esperado para este tipo de objetos.

20 11. Citometría de flujo: diagrama FL-SSC

Se ha trazado un diagrama de densidad que representa la fluorescencia (FL) en función de la difusión lateral (SSC) para gotas funcionalizadas con DSPE-PEG-biotina, sobre las que a continuación se injertaron IgG fluorescentes según los protocolos descritos en la sección Materiales y Procedimientos, secciones D) y E).

25 Se constata (Fig. 14A) que para un valor de SSC dado, la gama de fluorescencia medida es estrecha.

Resultados comparativos

12. Preparación de gotas funcionalizadas siguiendo un protocolo del estado de la técnica

30 A fines comparativos, se prepararon gotas de emulsión utilizando un protocolo descrito en la técnica anterior [4], durante el cual los lípidos se introducen en el agua antes de la emulsificación: Se preparó una solución de DSPE-PEG-biotina en el cloroformo, y la cantidad necesaria para alcanzar una concentración en lípidos de $0,05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ se añadió al aceite de soja. Tras la evaporación del cloroformo del aceite por lavado y sonicación, se generaron gotas monodispersas con el aparato de Couette, y se injertaron a su superficie IgG fluorescentes antibiotina.

13. Citometría de flujo: diagrama FL-SSC

35 Se ha trazado un diagrama de densidad que representa la fluorescencia (FL) en función de la difusión lateral (SSC) para las gotitas que funcionan según el protocolo descrito en la técnica anterior (véase la sección 12).

Se observa (Fig. 14B) que la señal óptica fluorescente es mucho más difusa que la obtenida al funcionar las gotitas según el procedimiento de la invención.

14. Distribución de la fluorescencia de las gotas.

40 La comparación de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia de campo amplio para las gotitas que funcionan según el protocolo anterior (Fig. 15A) con las obtenidas para las gotitas que funcionan según el procedimiento de la invención (Fig. 3C) muestra que esta última permite lograr una mayor homogeneidad de funcionamiento.

45 Esto se confirma por el histograma de fluorescencia de las gotas que funcionan según el protocolo anterior (Fig. 15B), que se ajusta a una distribución log-normal, con un factor de aproximadamente diez entre la gota menos fluorescente y la más fluorescente.

En comparación, la distribución de fluorescencia obtenida con el procedimiento de la invención es más exacta y se ajusta a una distribución normal, con un CV siempre inferior al 20 % (Fig. 6B).

Aplicación al estudio de la fagocitosis de gotas de emulsiones halogenadas funcionalizadas.

Etapas 1: Preparación de las células

Los macrófagos murinos RAW 264.7 adquiridos en la ECACC se cultivan en frascos sin tratamiento T-80 (VWR) rellenos de DMEM 4,5 g/L de L-glucosa suplementado con 10 % v/v de suero fetal y 1 % de penicilina-estreptomicina, en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. 24 horas antes de la exposición, se separaron con TryPLE y agitación mecánica, y se colocaron en placas de Petri de vidrio óptico (Fluorodish F35-100, WPI) a razón de 10⁶ células por placa. En la figura 16A se muestra una representación esquemática de estas placas de Pétri.

Etapa 2: Preparación del objetivo

Se utilizaron gotas de aceite vegetal halogenado, más denso que la fase acuosa continua.

2. 1: *Preparación de las gotas de aceite*

Los fosfolípidos biotinilados DSPE-PEG2000-biotina se disuelven en aceite de soja a 0,05 mg/mL. La fase acuosa de la emulsión se compone de 15% p/p de F68, y 0,5%-2% p/p de alginato de sodio según el tamaño de las gotas que se desee. El aceite halogenado se añade gota a gota en la fase acuosa agitando suavemente la espátula para obtener una emulsión espesa, hasta alcanzar un 75 % de aceite en masa. A continuación, esta emulsión se cisa en un rodillo de Couette a 5000 s⁻¹, lo que permite reducir la distribución del tamaño de las gotas. La emulsión cizallada se diluye para alcanzar una fracción másica de huile del 5 % y de F-68 del 1 %. Esta suspensión se decantó varias veces con una solución de F-68 al 1% para eliminar los pequeños grumos residuales.

2.2: *Funcionalización de objetivos*

Se optó por utilizar 2.10⁶ dianas/placa.

Las dianas se lavan y se centrifugan 3 veces con tampón fosfato Tween 20 0,007 %. A continuación se incuban con anticuerpos antibiotina Alexa 488, a razón de 1 anticuerpo por 1 DSPE-PEG2000-biotina presente en la superficie de las gotas durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se vuelven a lavar 3 veces con el tampón fosfato 0,007 % Tween20, antes de volver a una suspensión final de 2.10⁵ dianas/μL.

Etapa 3: Puesta en contacto de dianas y células.

Inmediatamente antes de la puesta en contacto, se suspenden 10 μl de micropartículas con una concentración de 2.10⁵ micropartículas/μl en 30 μl de DMEM 4,5 g/L de L-glucosa sin colorante fénico a 37 °C por cada lámina celular. Las láminas de células ensambladas 24 horas después se lavaron con 1 mL de DMEM 4,5 g/L de L-glucosa sin colorante fénico a 37 °C.

La suspensión de dianas se inyecta en la cámara. Las cámaras se calientan a 37 °C y 5% de CO₂ durante 45 minutos. En el caso de las gotitas de aceite, la lámina de células debe estar hacia abajo para que las gotitas menos densas estén en contacto, mientras que en el caso de las bolas de poliestireno, la lámina debe estar hacia abajo para que las bolas estén en contacto.

Después de 45 minutos, las cámaras se enjuagaron con PBS para eliminar las gotas que no se internalizaron y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 4: Fijación

Las láminas se incuban con 50 mM de NH₄Cl durante 2 minutos, después se estabilizan con Triton X-100 0,1% v/v durante 10 minutos, y se saturan con una solución de albúmina de suero bovino 4% p/p. Se incuban con 1 μg/lamela de anticuerpos de rata anti-Cd16/Cd32 de ratón durante 15 minutos, y después se inyectan en solución al 4% de BSA.

Etapa 5: Observación

Las muestras fijadas se observan en un microscopio confocal Leica TCS SP8, con un objetivo de inmersión en aceite de 40x, y la imagen es tomada por 2 detectores híbridos Leica. Los láseres de 405, 488, 552 y 638 nm permiten aclarar los fluoróforos presentes; la luz emitida por la muestra no se filtra, sino que se separa mediante un prisma. Los márgenes de longitud de las ondas recogidas se determinan caso por caso en función de los fluoróforos presentes para minimizar las interferencias entre las señales.

Las figuras 16B y 16C muestran dos imágenes representativas de experiencias de fagocitosis de gotas de emulsión cuyo protocolo de funcionamiento se describe a continuación. Las gotitas funcionan con lípidos biotinilados (Fig. 16B) y con anticuerpos antibiotina (Fig. 16C) reconocidos como receptores de macrófagos implicados en la fagocitosis. Le nombre de gouttes internalisées est plus important dans la Fig. 16C que dans la Fig. 16B qui constitue l'expérience contrôle.

Referencias

[1] L.-L. Pontani, I. Jorjadze, V. Viasnoff, J. Brujic, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 9839.

[2] J. Fattaccioli, J. Baudry, N. Henry, F. Brochard-Wyart, J. Bibette, Soft Matter 4 (2008) 2434.

- [3] N. Bourouina, J. Husson, F. Waharte, R.B. Pansu, N. Henry, *Materia blanda* 7 (2011) 9130.
- [4] K. Ben M'Barek, D. Molino, S. Quignard, M. Plamont, Y. Chen, P. Chavrier, J. Fattaccioli, *Biomaterials* 51 (2015) 270.
- 5 [5] M. Hadorn, E. Boenzli, K.T. Sorensen, H. Fellermann, P. Eggenberger Hotz, M.M. Hanczyc, P. Eggenberger, M.M. Hanczyc, P. Eggenberger Hotz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 20320.
- [6] L. Feng, L.-L. Pontani, R. Dreyfus, P. Chaikin, J. Brujic, *Soft Matter* 9 (2013) 9816.
- [7] A.R. Thiam, N. Bremond, J. Bibette, *Langmuir* 28 (2012) 6291.
- [8] O. Campés, T. Mammoto, S. Hasso, R. a Sperling, D. O'Connell, A.G. Bischof, R. Maas, D. a Weitz, L. Mahadevan, D.E. Ingber, *Nat. Methods* 11 (2013) 183.
- 10 [9] T. Mason, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3481.
- [10] K.L. Mittal, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 1334.
- [11] N.V. Efremova, B. Bondurant, D.F. O'Brien, D. Leckband, *Biochemistry* 39 (2000) 3441.
- [12] D.S. Banks, C. Fradin, *Biophys. J.* 89 (2005) 2960.
- [13] T.C. Werner, J.R. Bunting, R.E. Cathou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 (1972) 795.
- 15 [14] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angew. Chemie Int. Ed.* 37 (1998) 550.
- [15] R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un coloide que comprende partículas coloidales líquidas funcionalizadas que comprende las siguientes etapas:
 - a) la dispersión de un aceite 1 en una solución acuosa 2 que comprende un tensioactivo de fragmentación, que da como resultado la obtención de una emulsión 3 que contiene gotas de aceite en suspensión en una fase acuosa;
 - b) la disolución de lípidos destinados a funcionalizar dichas gotas de aceite en un disolvente aprótico polar, que da como resultado la obtención de una solución de funcionalización 4;
 - c) la preparación de una mezcla de funcionalización 5, que comprende la emulsión 3 y la solución de funcionalización 4, siendo la fracción volumétrica del disolvente aprótico polar en dicha mezcla de funcionalización 5 de entre el 1 y el 15 %, preferentemente de entre el 5 y el 15 %, preferentemente de entre el 8 y el 15 %;
 - d) la incubación de la mezcla de funcionalización 5, durante la cual al menos una parte de los lípidos inicialmente presentes en la solución de funcionalización 4 se adsorben en la superficie de las gotas de aceite inicialmente presentes en la emulsión 3; y
 - e) la eliminación de los lípidos no adsorbidos durante la etapa d);

permitiendo así obtener un coloide que comprende partículas coloidales líquidas funcionalizadas consistentes en las gotas de aceite obtenidas en la etapa a) en cuya superficie se adsorben los lípidos durante la etapa d).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el disolvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, acetonitrilo, piridina, butanona, trietilamina, N,N-dimetilformamida (DMF), y sus mezclas, preferentemente DMSO.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el aceite 1 dispersado en la solución acuosa 2 durante la etapa a) es un aceite mineral, un aceite vegetal tal como aceite de soja, un aceite de silicona, un aceite halogenado o una mezcla de los mismos.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** los lípidos comprenden al menos un grupo fluoróforo y/o al menos una biomolécula, tal como una biotina, opcionalmente injertado(a) mediante un enlazador tal como una cadena de polietilenglicol (PEG).
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** los lípidos son fosfolípidos, en particular fosfatidiletanolaminas como la 1,2-diateroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o la 1,2-disteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), eventualmente injertados con al menos un grupo fluoróforo y/o con al menos una biomolécula, opcionalmente por medio de un enlazador, especialmente seleccionados en el grupo que consiste en 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina carboxifluoresceína (DOPE-CF), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina polietilenglicol biotina (DSPE-PEG-Biotina) y mezclas de los mismos.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** en la etapa c), se añade un tensioactivo de dispersión.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** en la etapa c) se añade una solución tampón 6 que tiene un pH comprendido entre 5 y 9.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la etapa d) de incubación se realiza a una temperatura comprendida entre 15 °C y 40 °C, preferentemente entre 20 °C y 30 °C, y tiene una duración de entre 10 minutos y 10 horas, preferentemente entre 30 minutos y 5 horas, ventajosamente entre 1 hora y 3 horas.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el aceite 1 dispersado en la solución acuosa 2 comprende nanopartículas de Fe_2O_3 en suspensión, lo que permite obtener un coloide que comprende partículas coloidales líquidas funcionalizadas magnéticas.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** comprende después de la etapa e) una etapa adicional f) de injerto de biomoléculas en los lípidos.

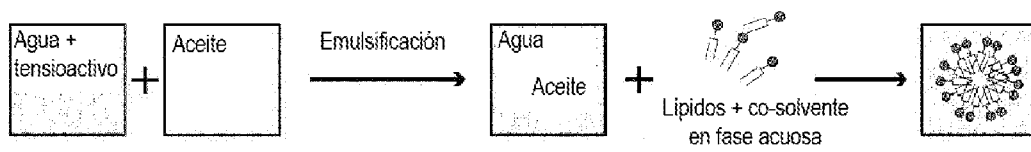


Fig. 1

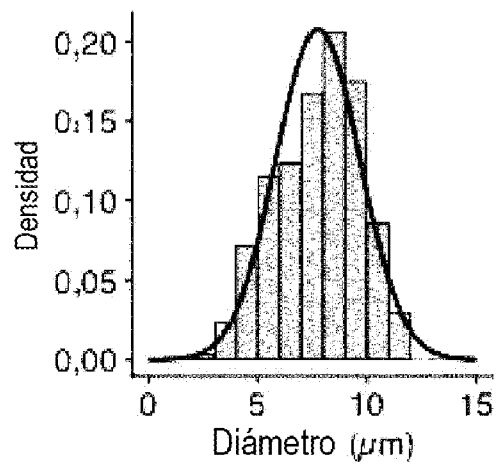


Fig. 2A

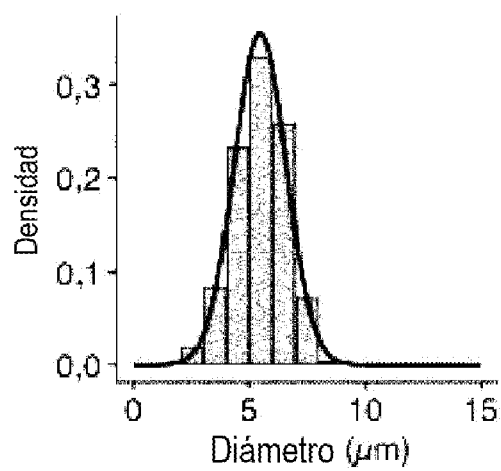


Fig. 2B

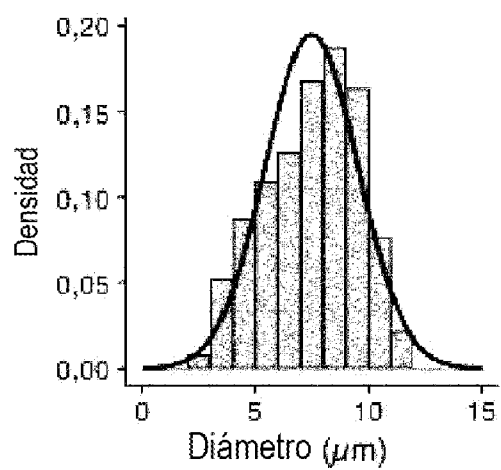


Fig. 2C

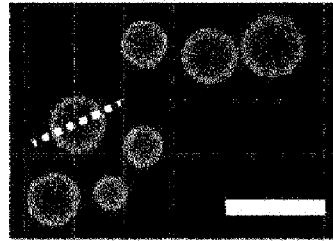


Fig. 3A

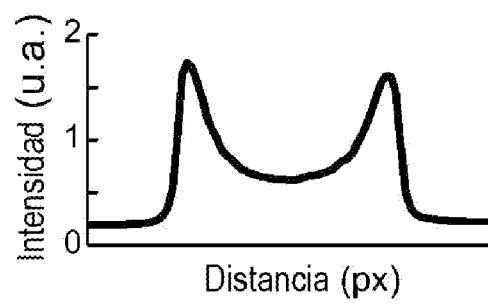


Fig. 3B

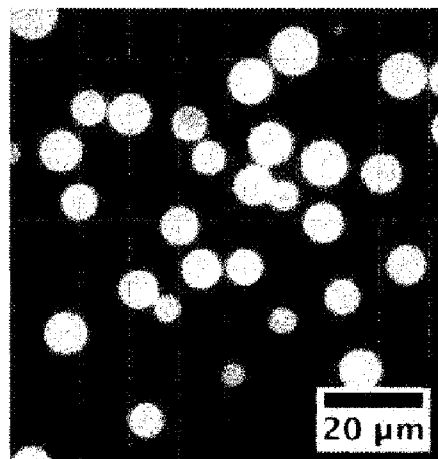


Fig. 3C

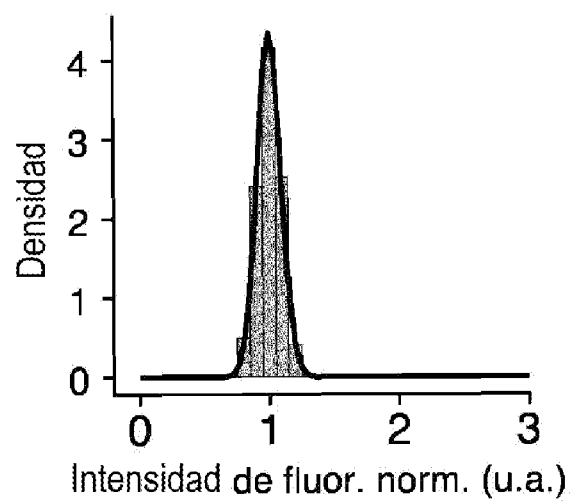


Fig. 3D

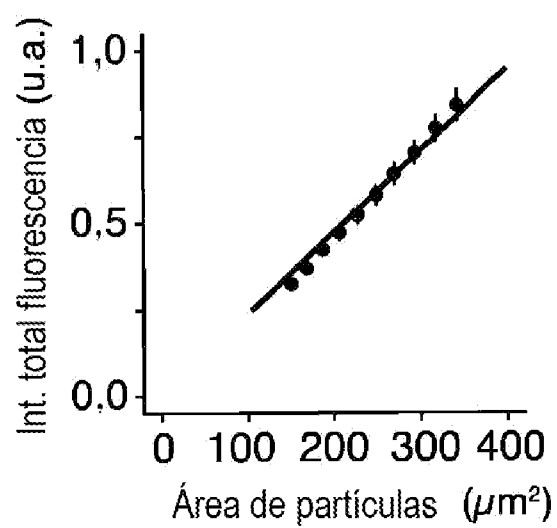


Fig. 3E

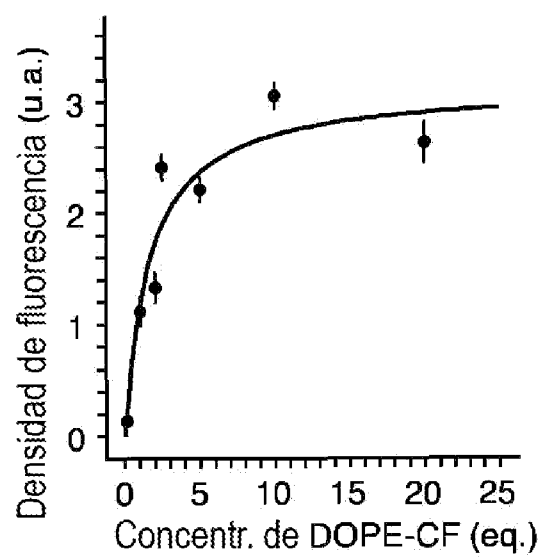


Fig. 4

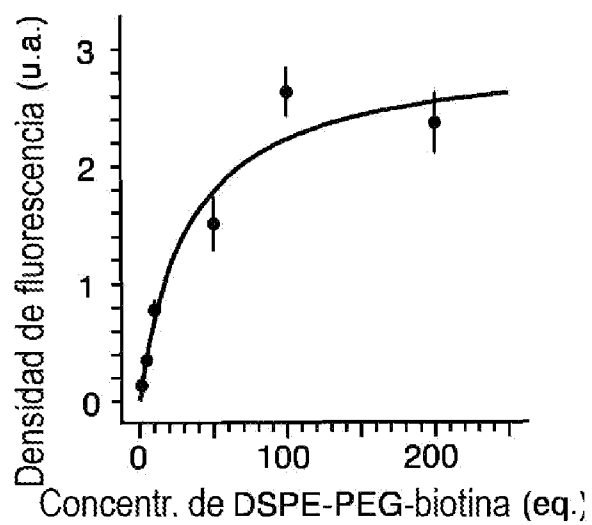


Fig. 5

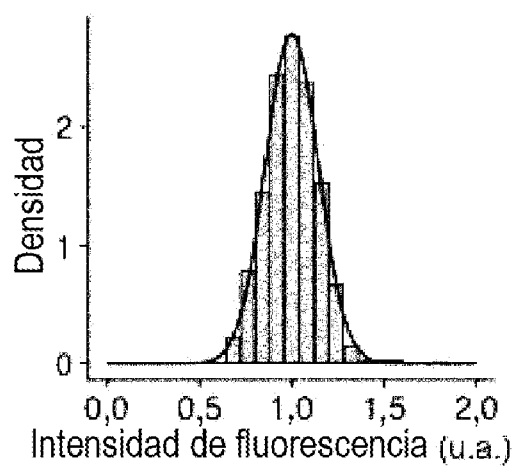


Fig. 6A

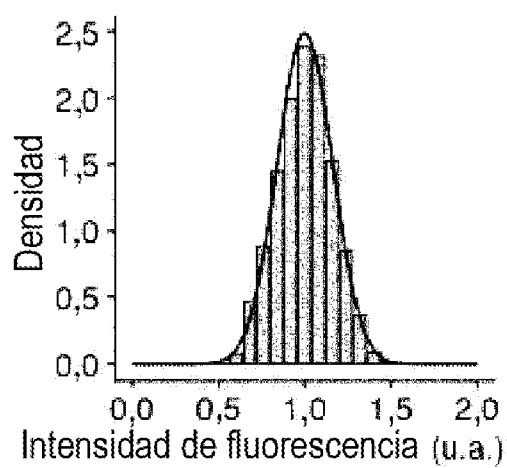


Fig. 6B

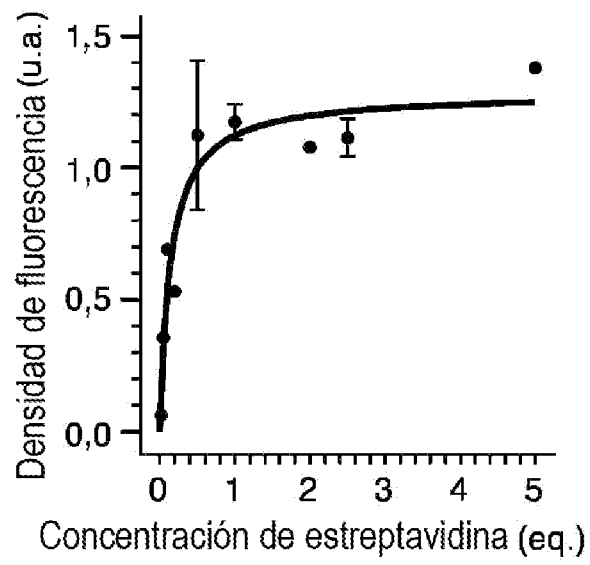


Fig. 7A

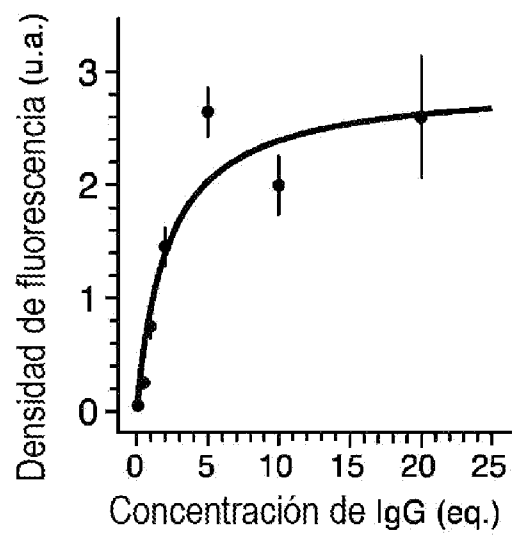


Fig. 7B

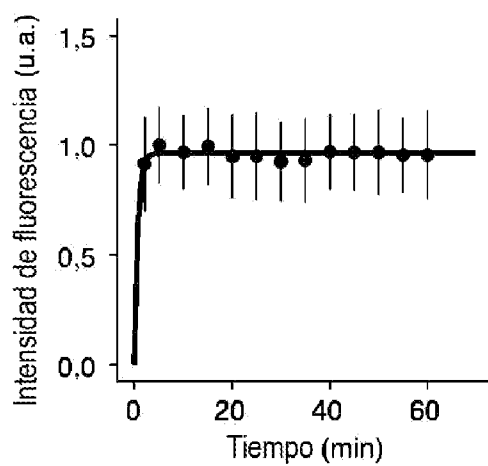


Fig. 8A

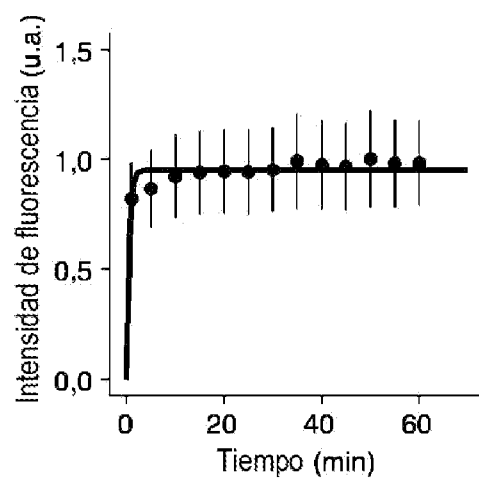


Fig. 8B

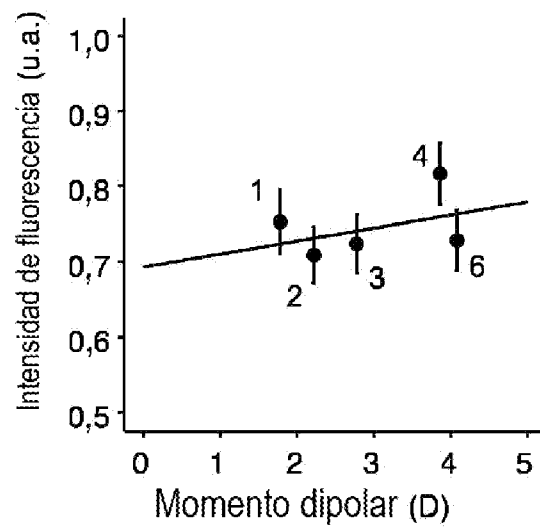


Fig. 9A

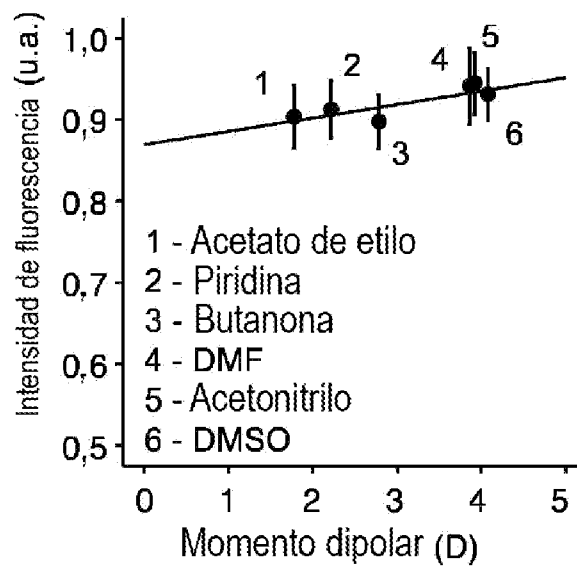


Fig. 9B

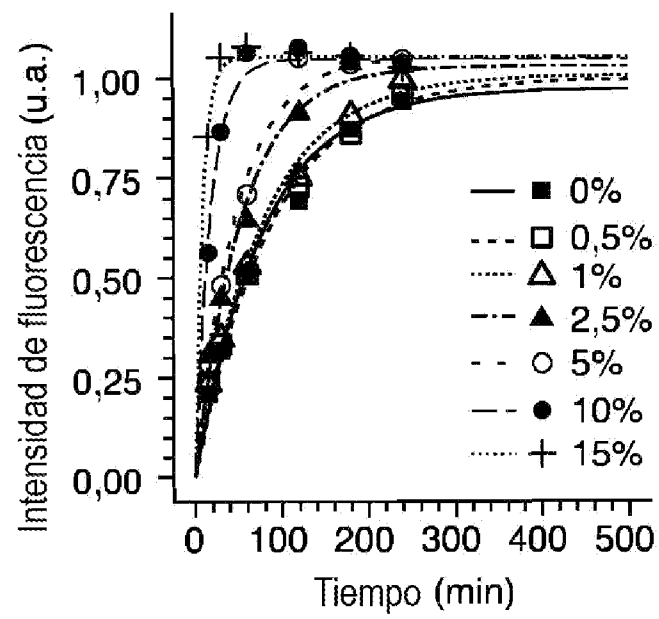


Fig. 10A

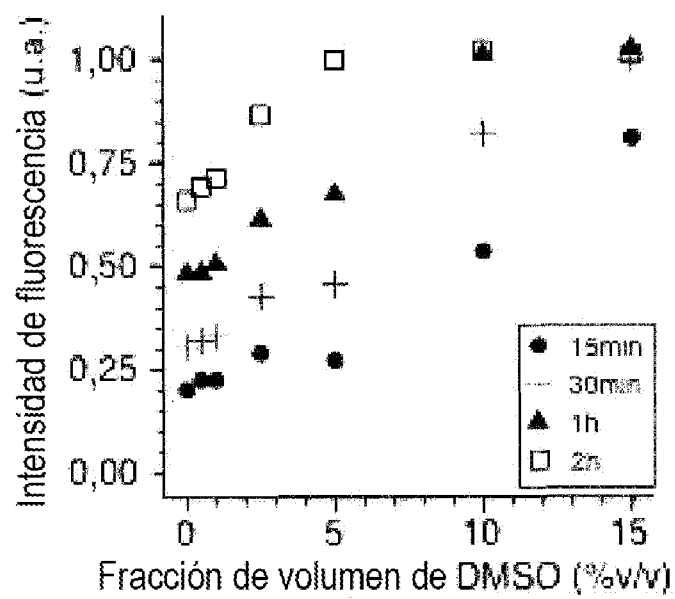


Fig. 10B

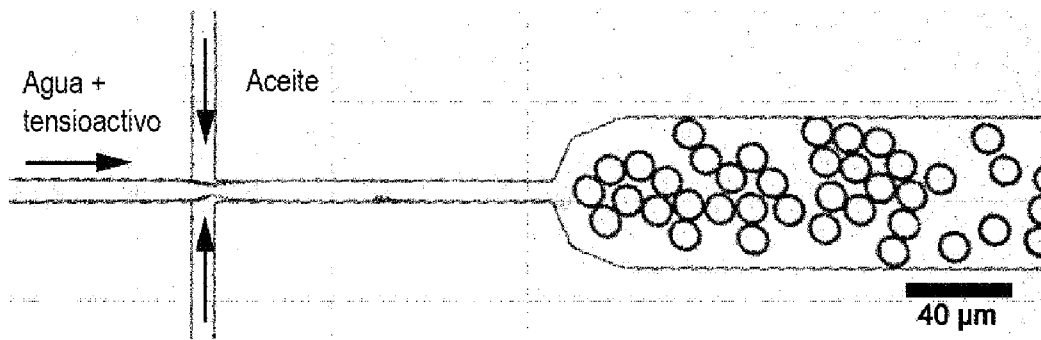


Fig. 11

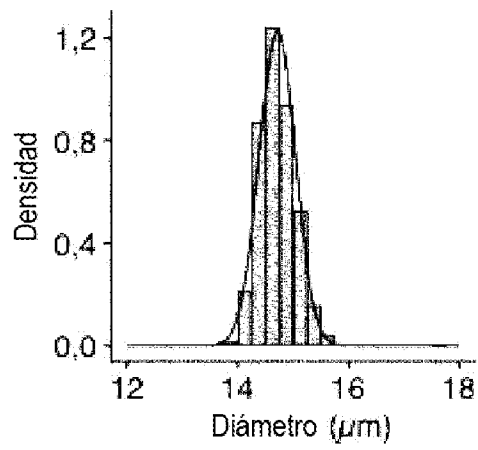


Fig. 12A

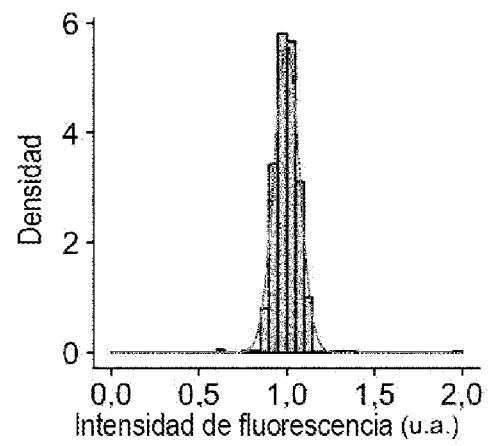


Fig. 12B

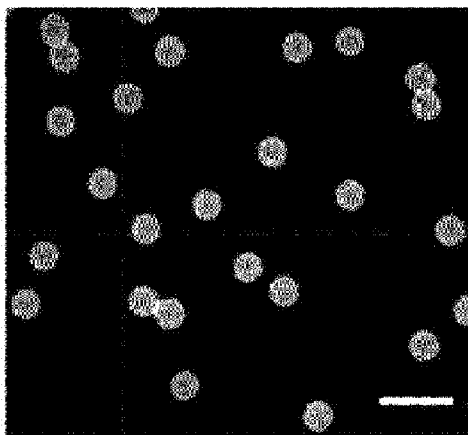


Fig. 13A

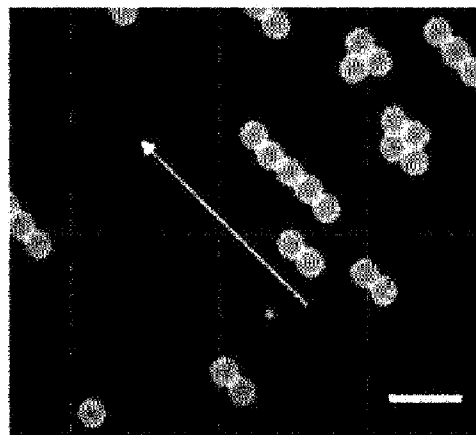


Fig. 13B

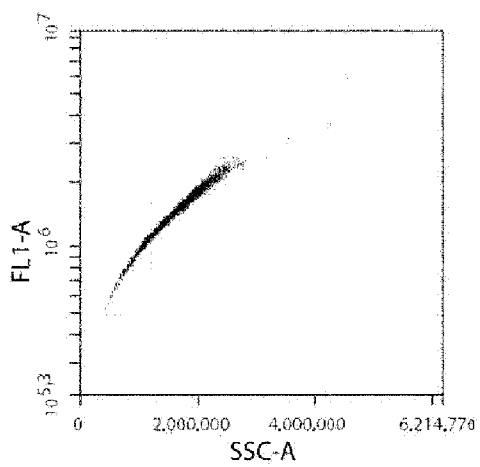


Fig. 14A

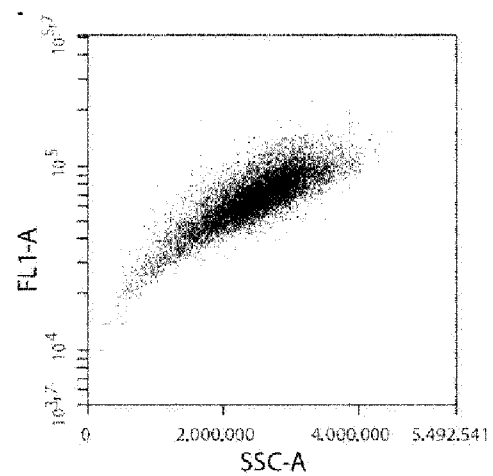


Fig. 14B

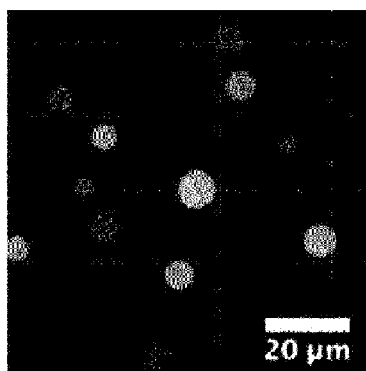


Fig. 15A

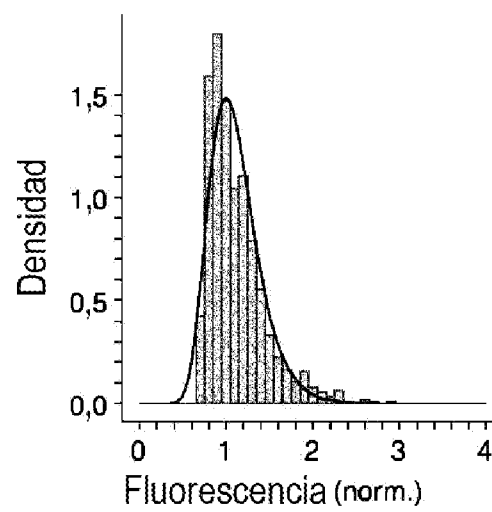


Fig. 15B

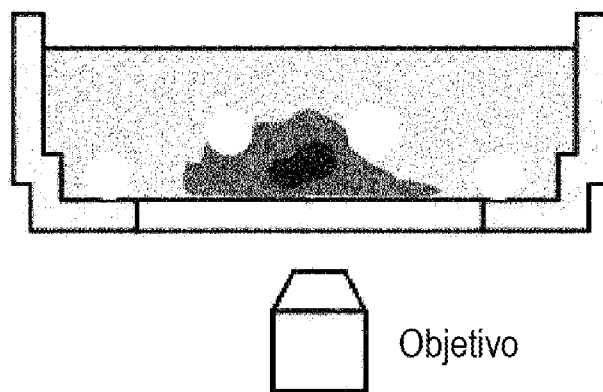


Fig. 16A

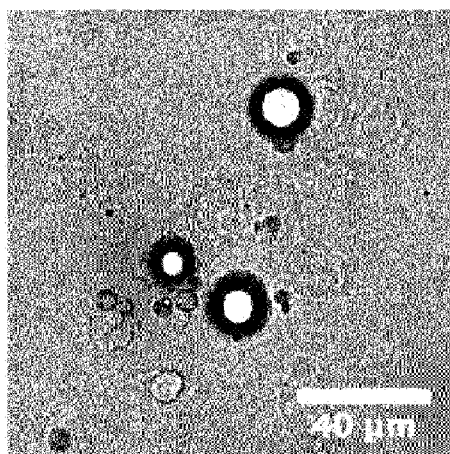


Fig. 16B

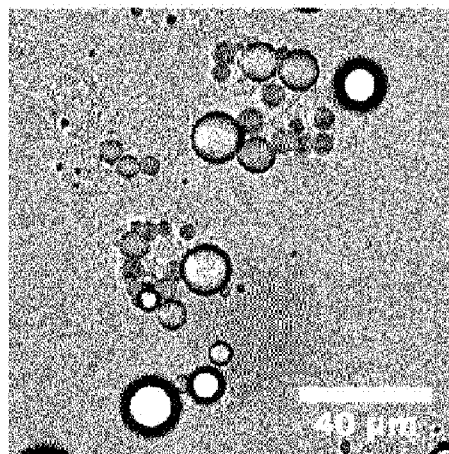


Fig. 16C