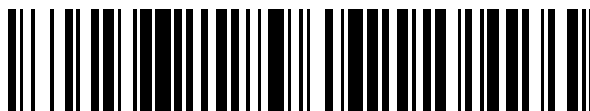


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 646**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2010.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 49/22 (2006.01)
B01F 11/02 (2006.01)
B01F 15/06 (2006.01)
B01F 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2014** **E 14165339 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 2799087**

54 Título: **Método y dispositivo para producir micro/nano-burbujas a base de lípidos optimizadas**

30 Prioridad:

03.05.2013 TW 102115967

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

29.09.2020

73 Titular/es:

**TRUST BIO-SONICS INC. (100.0%)
No. 101, Sec. 2, Guangfu Road, East District
Hsinchu City 300, TW**

72 Inventor/es:

WANG, CHUNG-HSIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 784 646 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 producir micro/nano-burbujas a base de lípidos optimizadas

Antecedentes de la divulgación

Campo de la divulgación

- 5 La divulgación se refiere a un método para producir micro/nano-burbujas a base de lípidos, y en particular, a un método para preparar micro/nano-burbujas a base de lípidos con un diámetro controlado de una manera de utilización óptima de material con una concentración de burbujas óptima.

Técnica relacionada

- 10 Las microburbujas se aplican comúnmente para funcionar como agente de contraste de ultrasonidos en forma de burbujas finas con un diámetro de 1-5 μm encapsuladas por un material biodegradable. Tal agente de contraste de ultrasonidos a base de microburbujas puede circular bien en el torrente sanguíneo y proporcionar una mejora de eco significativa de la perfusión en la obtención de imágenes por ultrasonidos. Las microburbujas tienen un alto grado de ecogenicidad debido a su densidad mucho menor (en comparación con los tejidos humanos) y al interior comprimible. Estas características permiten que las burbujas reflejen las ondas de ultrasonidos y además oscilen con estas ondas. 15 La diferencia de ecogenicidad entre el gas en las microburbujas y las estructuras de tejidos blandos del cuerpo es tan significativa que la intensidad de la señal de ultrasonidos puede aumentarse en 20-40 dB. Por lo tanto, el agente de contraste de ultrasonidos a base de microburbujas puede usarse para obtener imágenes de la perfusión sanguínea en los órganos, medir la velocidad de flujo sanguíneo en el corazón y otros órganos. Los estudios también muestran que las microburbujas tienen características similares a los medios de contraste de otros sistemas médicos de 20 obtención de imágenes para el diagnóstico de tumores.

- Otra aplicación médica para el agente de contraste de ultrasonidos a base de microburbujas es la obtención de imágenes moleculares por ultrasonidos. Al dirigir microburbujas conjugadas con ligandos a biomarcadores específicos en tejidos diana, la obtención de imágenes por ultrasonidos puede utilizarse para resaltar esos tejidos, tales como 25 áreas de tumor, isquemia e inflamación, ayudando a los médicos a lograr la detección temprana de diversas enfermedades. La aplicación similar a la obtención de imágenes moleculares por ultrasonidos es la terapia dirigida. El fármaco se encapsula en las microburbujas para inyectarse en el vaso sanguíneo. Una vez que las microburbujas se acumulan notablemente en los tejidos diana, el ultrasonido focalizado desencadena activamente la liberación del fármaco. El ultrasonido provoca la destrucción de burbujas, lo que reduce el umbral de cavitación, dando como resultado microcorrientes y una permeabilidad aumentada de las membranas celulares. En otras palabras, las 30 microburbujas sirven como vehículo para transportar el fármaco antitumoral y liberarlo localmente cuando se expone a ultrasonidos terapéuticos, lo que se denomina liberación de fármacos desencadenada por ultrasonidos. Varios estudios también mostraron la posibilidad de utilizar micro/nano-burbujas para administrar genes a células vivas.

- Sin embargo, ya que las microburbujas utilizadas actualmente son relativamente mayores en diámetro e inestables en la circulación sanguínea. Resulta difícil que esas microburbujas alcancen una acumulación suficiente en el tejido diana 35 en un tiempo tan limitado. La falta de un método de preparación con una eficacia óptima de utilización del material (denominada razón de conversión de lípido a burbuja) también ralentiza los desarrollos de microburbujas funcionales, tales como microburbujas conjugadas con ligandos, encapsuladas con fármacos y cargadas de nanopartículas. La baja eficacia en la utilización del material da como resultado una gran pérdida de esos costosos compuestos funcionales que dificulta la comercialización de microburbujas funcionales. Por lo tanto, sería muy deseable tener 40 microburbujas que puedan controlarse bien en diámetro, estabilidad y eficacia de utilización de material (eficacia óptima de utilización de material).

El documento US 2012/175305 A1 describe un sistema de generación de microburbujas que comprende:

- un miembro sonicador; una cámara de flujo, un extremo del miembro sonicador que está dispuesto para administrar 45 energía ultrasónica a una superficie de contacto entre la disolución lipídica y el gas en el volumen de reacción; y un sensor de nivel configurado para detectar el nivel de la disolución lipídica en la cámara de flujo; un controlador configurado para controlar el flujo de la disolución lipídica en la primera entrada en respuesta a una salida del sensor de nivel para mantener una ubicación de dicha superficie de contacto con respecto a dicho extremo del miembro sonicador de modo que el miembro sonicador se sumerja en disolución lipídica hasta un nivel que está por encima de un extremo del miembro sonicador por no más de tres veces un espacio entre el extremo del miembro sonicador y una 50 pared de la cámara de flujo directamente opuesta al extremo del miembro sonicador.

J A Feshitan *et al* ("Engineering Lipid-stabilized Microbubbles for Surgery", <http://academiccommons.columbia.edu/catalog/ac:175647>, (20141222)) describen microburbujas estabilizadas con lípidos, que son microesferas llenas de gas encapsuladas con una cubierta de monocapa de fosfolípidos.

- 55 El documento US 5.922.304 A describe un método para diagnosticar la presencia de un tejido o región enfermos en un paciente que comprende (i) administrar al paciente una microesfera llena de precursor gaseoso, en donde dicha microesfera no contiene sustancialmente enlaces de sulfuro y consiste esencialmente en uno o más lípidos, uno o

más lípidos que portan polímeros, o combinaciones de los mismos, (ii) permitir que el precursor gaseoso experimente una transición de fase de líquido a gas en el paciente, y (iii) escanear al paciente usando obtención de imágenes de resonancia magnética para obtener imágenes visibles de cualquier tejido o región enfermas en el paciente.

5 Yin Tinghui *et al.* ("Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors"; INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, (2012), vol. 7, páginas 895-904), describen la preparación de un agente de ultrasonidos potenciado con contraste de lípidos NBs y su evaluación con respecto a la capacidad de focalización pasiva *in vivo*.

10 Vangala Anil *et al.* ("Preparation and characterization of gas-filled liposomes: can they improve oil recovery?", JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH 2007, (200712), vol. 17, n.º 3-4, doi: 10.1080/08982100701528377, ISSN 0898-2104, páginas 263-272) describen la optimización de la composición lipídica de los liposomas llenos de gases preparados usando una técnica de homogeneización simple e investigaron características fisicoquímicas clave (tamaño y estabilidad física) y su eficacia como sondas de presión.

15 MA Borden *et al.* ("Ultrasound Contrast Agents", People's Medical Publishing House, Molecular Imaging: Principles and Practice, MOLECULAR IMAGING: PRINCIPLES AND PRACTICE, (20111101), People's Medical Publishing House, URL: http://www.pmph-usa.com/assets/media/9781607950059/Chapter28_FINAL_NOV_2_2011.pdf, página 433) describen agentes de contraste de ultrasonido.

20 El documento US 5.874.062 describe un método para proporcionar una imagen de una región interna de un paciente que comprende (i) administrar al paciente una composición acuosa que comprende microesferas lipídicas llenas de precursor gaseoso, (ii) permitir que dicho precursor gaseoso experimente una transición de fase de líquido a gas, y (iii) escanear al paciente usando tomografía computarizada para obtener imágenes visibles de dicha región, en donde dicho precursor gaseoso comprende un perfluorocarbono y dichas microesferas se formulan a partir de uno o más fosfolípidos que no contienen sustancialmente enlaces disulfuro.

25 Xing *et al.* ("Novel ultrasound contrast agent based on microbubbles generated from surfactant mixtures of Span 60 and polyoxyethylene 40 stearate"; ACTA BIOMATERIALIA, ELSEVIER, NL; vol. 6, n.º 9, 1 de septiembre de 2010, páginas 3542-3549,) describen microburbujas llenas de PEC recubiertas con tensioactivo saturado (Span 60) y un emulsionante (PEG40S).

Compendio de la divulgación

30 En vista de los problemas anteriores, la divulgación describe un método para producir micro/nano burbujas a base de lípidos (incluyendo también microburbujas de contraste de ultrasonidos), en el que la fluidez de la membrana lipídica y la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico se determina mediante la composición de la mezcla lipídica, y el recipiente cerrado que contiene el portador lipídico se agita mecánicamente a la temperatura alrededor de la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico, formando así las microburbujas de una manera con eficacia óptima de utilización del material. La distribución de tamaño y la estabilidad de circulación de las micro/nano burbujas pueden mejorarse mediante la regulación de la fluidez al mismo tiempo.

La invención se refiere a un método para producir micro/nano burbujas a base de lípidos, que comprende etapas de:

35 preparar una mezcla lipídica que comprende (1) uno o más primeros lípidos con diferente temperatura de transición de fase principal, (2) un segundo lípido que se une con un resto polimérico hidrófilo, y (3) opcionalmente una o más moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas; en donde cada uno de los uno o más primeros lípidos incluye un extremo hidrófobo C8-C30, y dicho resto polimérico hidrófilo tiene una cadena larga con un peso molecular de 200-200.000; en donde el uno o más primeros lípidos se seleccionan del grupo que consiste en 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano, bromuro de dimetildioctadecil amonio, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminopentaacético, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminopentaacético, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, tocoferoles, tocotrienoles, palmitato de ascorbilo, SPAN®, Loxiol®, Atlas™, y la combinación de los mismos o polímeros derivados de los mismos, y en donde el segundo lípido se selecciona del grupo que consiste en:

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000],

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000],

55 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000],

1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000],

1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000],

5 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], estearatos de polioxietileno, estearatos de polietilenglicol, TWEEN®, Myrj™, succinato de d-alfa tocoferil polietilenglicol 1000, lípido PEGilado conjugado con anticuerpos, lípido PEGilado conjugado con péptidos, lípido PEGilado conjugado con ADN, lípido PEGilado conjugado con ARN, lípido PEGilado modificado con biotina, lípido PEGilado modificado con maleimida, lípido PEGilado modificado con aminas, y la combinación de los mismos;

emulsionar la mezcla lipídica con un disolvente por medios mecánicos para formar una disolución transparente de portador lipídico y luego ajustar la temperatura del portador lipídico transparente hasta 20 grados Celsius;

10 colocar la disolución transparente de portador lipídico en un recipiente cerrado que comprende un gas predeterminado o una molécula hidrófoba; y

manipular la temperatura de manipulación de la disolución transparente de portador lipídico para que esté cerca de la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico

15 y agitar de manera mecánica el recipiente cerrado que contiene la disolución transparente de portador lipídico a la temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico para formar dichas micro/nano burbujas dentro del recipiente cerrado.

20 Se describe un dispositivo para producir micro/nano-burbujas a base de lípidos donde se usa una mezcla lipídica como producto de partida para que se disuelva en agua destilada, solución salina o solución salina tamponada, comprendiendo la mezcla lipídica uno o más primeros lípidos con diferentes temperaturas de transición de fase principal, y un segundo lípido que se une con un resto polimérico hidrófilo o moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas; en donde cada uno de los primeros lípidos incluye una cadena de alquilo C8-C30, la cadena de alquilo C8-C30 seleccionada del grupo que consiste en cadena de alquilo lineal, cadena de alquenoilo, cadena de alquinoilo, una cadena de fluoroalquilo, cadena de alquilo ramificada, y la combinación de las mismas; y el segundo lípido incluye una cadena de alquilo como la de los primeros lípidos y además se une con un resto polimérico de cadena larga hidrófilo de peso molecular de 200-200.000.

25 El dispositivo anterior incluye: (a) una unidad de control de temperatura, para manipular la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico para que esté cerca de la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico; y (b) un agitador mecánico, para proporcionar agitaciones mecánicas en la disolución transparente de portador lipídico; en donde el dispositivo está dispuesto de tal manera que el agitador mecánico se usa para agitar un recipiente cerrado que contiene la disolución transparente de portador lipídico que tiene una temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal para formar las micro/nano burbujas a base de lípidos en el recipiente cerrado.

30 Esta divulgación es ventajosa particularmente porque el coste para fabricar las micro/nano burbujas puede reducirse enormemente manipulando la composición de la mezcla lipídica y agitando mecánicamente el recipiente que contiene el portador lipídico a una temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico. Además, el tamaño o diámetro de las micro/nano burbujas también puede determinarse según se requiera modificando la composición de la mezcla lipídica y la temperatura a la cual el portador lipídico se agita mecánicamente. Una vez que la composición se incorpora con materiales de alta temperatura de transición de fase, también puede mejorarse la estabilidad de circulación o el tiempo de retención del fármaco encapsulado. Por lo tanto, esta divulgación puede contribuir significativamente a aplicaciones de obtención de imágenes de contraste de ultrasonidos no lineales, obtención de imágenes moleculares de ultrasonidos y terapia dirigida donde están implicadas micro/nano-burbujas. Además, un agente de micro/nano burbujas con una concentración óptima puede mostrar su utilidad en aplicaciones de administración transdérmica debido a sus características finas en las capacidades de extenderse sobre la piel y oscilar con ondas de ultrasonidos para mejorar la permeabilidad de cutículas. Un agente de burbujas optimizado fabricado mediante tensioactivos lipídicos diseñados podría aplicarse ampliamente a aplicaciones de limpieza tales como lavado de ropa, lavado de dientes o procesos de lavado de semiconductores.

Las características, la realización y las funciones de la divulgación se describen en la siguiente descripción con referencia a las realizaciones ejemplificadas preferidas y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

50 Esta divulgación se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación en el presente documento, en donde:

la figura 1 es la distribución de tamaños de micro/nano burbujas a base de DSPC de esta divulgación a partir de un analizador contador de partículas Coulter (conforme a USP);

la figura 2 es una vista esquemática de un dispositivo para producir micro/nano burbujas a base de lípidos;

la figura 3 es una vista superior en sección transversal del dispositivo de la figura 2;

la figura 4 es una vista esquemática de un agitador mecánico de esta divulgación;

la figura 5 es una vista esquemática que muestra la situación en la que el agitador mecánico se incorpora al dispositivo para producir micro/nano burbujas a base de lípidos;

5 la figura 6 es una vista frontal de una unidad de control de temperatura;

la figura 7 es una vista inferior del dispositivo para producir las micro/nano burbujas a base de lípidos de esta divulgación; y

la figura 8 es una vista frontal del dispositivo para producir las micro/nano burbujas a base de lípidos donde se ilustran el flujo de aire de entrada y el flujo de aire de salida.

10 La figura 9 es una vista esquemática que muestra el movimiento de reciprocidad de la abrazadera.

Descripción detallada de la divulgación

En esta divulgación la agitación mecánica está implicada en un método de producción de micro/nano burbujas a base de lípidos. Se agita una mezcla lipídica que tiene una membrana lipídica para romper la estructura original de la membrana, seguido de reformar la membrana para encapsular el gas introducido en la capa más interna para formar micro/nano burbujas. La fluidez de la membrana de las membranas lipídicas indica la capacidad de los lípidos que se mueven en la membrana (se refiere a la facilidad de ruptura/reforma de la membrana), lo que influye en gran medida en las micro/nano burbujas formadas mediante la agitación mecánica en el rendimiento, el tamaño y la distribución de tamaños. En la práctica, las microburbujas de contraste de ultrasonidos por encima de 8 µm de tamaño obstruirán los capilares pulmonares. Por lo tanto, es importante controlar el tamaño de las microburbujas correctamente. Sin embargo, es difícil manipular tanto el tamaño como la distribución de tamaños de las microburbujas de contraste de ultrasonidos, por lo que las burbujas por encima de un diámetro de tamaño predeterminado tienen que eliminarse finalmente como en la técnica anterior. Varios productos clínicos que tienen alrededor del 2~5% de microburbujas de más de 10 µm han generado problemas de cuestiones de seguridad en usos clínicos.

En una realización, el método para producir micro/nano burbujas de contraste de ultrasonidos incluye las etapas a continuación.

Como etapa inicial, se prepara una mezcla lipídica. Téngase en cuenta que la mezcla lipídica puede prepararse con un procedimiento de fabricación verde que utilice solo glicerol (propano-1,2,3-triol) o propilenglicol (propano-1,2-diol) como disolvente inicial para mezclar y dispersar todos los materiales lipídicos (la temperatura de la disolución debe manipularse hasta la temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal de la mezcla lipídica). En comparación con las técnicas anteriores, este procedimiento de fabricación limpio evita el uso de disolventes orgánicos tóxicos tales como metanol, tolueno y cloroformo.

La mezcla lipídica incluye (1) uno o más primeros lípidos con diferente temperatura de transición de fase principal tal como se define en las reivindicaciones, (2) un segundo lípido que se une con un resto polimérico hidrófilo, y (3) opcionalmente una o más moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas. La una o más moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas pueden añadirse para regular la temperatura de transición de fase principal de la mezcla lipídica o reemplazarse adicionalmente por el segundo lípido. Además, también puede añadirse un disolvente que excluya agua, es decir, un disolvente no acuoso, para reducir las interacciones entre lípidos con el mismo propósito de regular la temperatura de transición de fase principal de la mezcla lipídica. El uno o más primeros lípidos se seleccionan del grupo que consiste en:

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DMPG),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DMPS),

45 1,2- dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato (DMPA),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (DPPA),

2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DPPS),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DPPG),

- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE),
 5 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato (DSPA),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DSPS),
 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE),
 10 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato (DOPA),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DOPS),
 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP),
 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP),
 15 bromuro de dimetildiocadecilamonio (DMDDA),
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminpentaacético (DPPE-DTPA),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminpentaacético (DSPE-DTPA),
 ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, tocoferoles, tocotrienoles, palmitato de ascorbilo,
 SPAN (marca registrada), Loxiol (marca registrada), Atlas (TM), Arlachel (TM), Emcol (marca registrada) o una
 20 combinación de los mismos o polímeros derivados de los mismos.
 Entre otros, la combinación de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG) se utiliza como el primer lípido en esta realización.
 Debe entenderse que la temperatura de transición de fase principal (sólido a líquido) de DPPC es de 41 grados Celsius,
 25 mientras que la de DSPG es de 55 grados Celsius. El lípido con mayor temperatura de transición de fase es ventajoso para reducir el tamaño (diámetro) y aumentar la estabilidad de las micro/nano burbujas resultantes. El segundo lípido tiene una estructura de cadena carbonada similar (C8-C30, estructura principal) con respecto al primer lípido anterior y el segundo se une adicionalmente con un resto polimérico de cadena larga hidrófilo de peso molecular de 200-200000. El resto polimérico de cadena larga hidrófilo puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxietileno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y copolímeros relacionados, y péptido, ácido desoxirribonucleico (ADN), o ácido ribonucleico (ARN) o una combinación de los mismos.
 30 El segundo lípido se selecciona del grupo:
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DPPE-PEG2000),
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000] (DPPE-PEG3000),
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (DPPE-PEG5000),
 35 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000] (DSPE-PEG3000),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (DSPE-PEG5000),
 40 estearatos de polioxietileno, estearatos de polietilenglicol, TWEEN (marca registrada), Myrj (TM), Atlas (TM), succinato de d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 (vitamina E TPGS), lípido PEGilado conjugado con anticuerpos, lípido PEGilado conjugado con péptidos, lípido PEGilado conjugado con ADN, lípido PEGilado conjugado con ARN, lípido PEGilado modificado con biotina, lípido PEGilado modificado con maleimida, lípido PEGilado modificado con aminas, y la combinación de los mismos o los polímeros derivados de los mismos. En esta realización, se emplean estearatos de polietilenglicol 40 (PEG40S).

La molécula, que es capaz de atravesar la membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas, puede ser pero no se limita a, polietilenglicol, péptido, albúmina, aminoácido, alcoholes de azúcar, butano-1,3-diol, propano-1,2,3-triol, propano-1,2-diol, propano-1,3-diol, propan-1-ol, etano-1,2-diol, etanol, metanol y dimetilsulfóxido, o una combinación de los mismos. En esta realización se usa propano-1,2,3-triol (glicerol) para mejorar la fluidez de la membrana y la capacidad de la membrana lipídica para reconstruirse. En particular, algunos de los productos químicos enumerados anteriormente, como el metanol y el etanol, pueden aumentar en gran medida el rendimiento final de las microburbujas a temperatura muy inferior a la temperatura de transición de fase principal original (determinada en agua) de la mezcla lipídica, incluso con una concentración del intervalo del 0,1 al 2% en peso.

Como segunda etapa, la mezcla lipídica que incluye DSPG, DPPC y PEG40S se mezcló con un disolvente tal como solución salina normal o solución salina tamponada. Por ejemplo, la mezcla de DSPG, DPPC y PEG40S se mezcla con un disolvente de solución salina tamponada con fosfato que contiene el 1% en peso de glicerol y se formará una membrana lipídica bicapa. En particular, dado que PEG40S funciona para aumentar la fluidez de membrana de la membrana lipídica, la membrana lipídica bicapa puede romperse y reconstruirse más fácilmente durante la agitación seguida para formar una estructura monocapa, encapsulando así el gas introducido y aumentando el rendimiento final de las micro/nano burbujas. La molécula capaz de atravesar la membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas, es decir, el glicerol en esta realización, funciona de manera similar a PEG40S. Además, el DSPG con la mayor temperatura de transición de fase principal en el primer lípido sirve para disminuir la fluidez de membrana de la membrana lipídica y estabilizar las microburbujas resultantes.

Como tercera etapa, la disolución resultante formada al mezclar esos materiales lipídicos con el disolvente se emulsiona entonces mecánicamente hasta que se forma una disolución transparente de portador lipídico. Puede emplearse sonicación, agitación a alta velocidad, homogeneización a alta presión o filtración por membrana para emulsionar mecánicamente la mezcla lipídica dentro del disolvente. En esta realización, para la sonicación se utiliza un sonicador de baño, y la disolución transparente de portador lipídico se ajusta para que tenga una concentración del portador lipídico de 3 mg/ml y una temperatura de 20 grados Celsius. Esta etapa está dirigida a dispersar los materiales lipídicos en la disolución transparente de portador lipídico y disminuir el tamaño de partícula del portador lipídico, facilitando así la preparación posterior de las micro/nano burbujas. Téngase en cuenta que la concentración lipídica para fabricar nanoburbujas (burbujas con un tamaño de menos de 1 μm) debe ser normalmente mayor de 0,5 mg/ml. Como cuarta etapa, se coloca la disolución transparente de portador lipídico utilizada como portador lipídico en un recipiente cerrado con un tamaño adecuado. En este ejemplo, se añade 1 ml de la disolución transparente de portador lipídico al recipiente cerrado de 1,8 ml. Preferiblemente, se usan 0,5-1,0 ml de la disolución transparente de portador lipídico.

Como quinta etapa, se realiza vacío en el recipiente cerrado y se llena con un gas predeterminado tal como hidrocarburo sustituido con halógeno (perfluorocarbono), gas inerte, hexafluoruro de azufre, nitrógeno, oxígeno, aire, o una combinación de los mismos. También puede introducirse el gas predeterminado en el recipiente sellando el recipiente en un sistema o entorno cerrados que contenga el gas predeterminado o descargando/purgando el recipiente con el gas predeterminado. Pueden añadirse adicionalmente moléculas hidrófobas con funcionalidades específicas al recipiente cerrado en esta etapa junto con el gas predeterminado. Las moléculas hidrófobas pueden ser, pero no se limitan a, fármaco(s) específico(s) para incorporarse en la membrana lipídica de micro/nano burbujas para aplicaciones médicas, tales como liberación de fármacos accionada por ultrasonidos, terapia tumoral asistida por ultrasonidos y ruptura de la barrera hematoencefálica a base de microburbujas. Se apreciará que un experto en la técnica puede comprender la manera de llenar el gas predeterminado y no se abordará particularmente en la presente memoria para evitar confusiones innecesarias.

Como sexta etapa, se manipula la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico para que sea aproximada a la temperatura de transición de fase principal de la misma mediante un baño de agua, por ejemplo, mejorando así la fluidez de membrana, la capacidad de la membrana lipídica para reconstruirse, y el rendimiento de la microburbujas. Por ejemplo, dada la disolución transparente de portador lipídico con la temperatura de transición de fase principal de 46 grados Celsius compuesta por DPPC, DSPG y PEG40S en una razón de 1:1:1 (p/p/p), la temperatura de reacción de 43 grados Celsius en la siguiente etapa dará como resultado un rendimiento de micro/nano burbujas tres veces mayor que la de 20 grados Celsius. En resumen, manipular la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico es favorable para preparar las micro/nano burbujas de una manera que tenga una eficacia óptima de utilización del material. Sin embargo, se observa que la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico puede manipularse hasta una temperatura cerrada pero mayor que su temperatura de transición de fase principal, en caso de una temperatura disminuida de la disolución transparente de portador lipídico durante el proceso de agitación posterior de manera mecánica. Por ejemplo, si la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico compuesta por DSPC, DSPE-PEG2000 en una razón de menos de 10:4 (p/p) es de 56 grados Celsius, dado que la temperatura durante el proceso de agitación posterior de manera mecánica solo puede mantenerse a aproximadamente 50 grados Celsius, la disolución transparente de portador lipídico se calienta de manera deseable hasta 60 grados Celsius por adelantado para obtener las micro/nano burbujas de alto rendimiento de manera que tenga una eficacia óptima de utilización del material (el rendimiento de las micro/nano burbujas pueden ser de hasta $4\text{E}+10$ burbujas/ml). Mediante el uso de un material de alta temperatura de transición, tal como DSPC, puede reducirse el tamaño promedio hasta el intervalo de 400 a 700 nm (depende de las composiciones).

Figura 1, la distribución de tamaños de micro/nano burbujas a base de DSPC de esta divulgación del analizador contador de partículas Coulter (conforme a USP).

Como séptima etapa, el recipiente cerrado que contiene la disolución transparente de portador lipídico se agita de manera mecánica para formar micro/nano burbujas de contraste de ultrasonidos dentro del recipiente cerrado. La agitación mecánica se realiza, por ejemplo, mediante sonicación, agitación manual, agitación mecánica a alta velocidad, dispositivo microfluídico/enfoque en T o microburbujeo de atomización electrohidrodinámica coaxial (CEHDA). En esta realización, se usa un agitador mecánico a 4550 rpm durante 45 segundos, por el cual el 99,9% de las microburbujas resultantes tienen un diámetro de menos de 8 μm . Preferiblemente, el diámetro varía de desde 0,2 μm hasta 8 μm . La forma de agitación mecánica a alta velocidad es favorable porque el tamaño y la distribución de tamaño de las microburbujas pueden controlarse de manera eficaz. La tabla I enumera el diámetro promedio (promedio del intervalo de 0,7 a 18 μm) de las microburbujas con diferentes composiciones de la disolución transparente de portador lipídico. Los diámetros pico de varias composiciones enumeradas pueden ser mucho más pequeños que los diámetros promedio determinados a partir del intervalo de medición de 0,7 a 18 μm .

Tabla I

N.º	DPPC:DSPG:PEG40S (p/p/p)	Diámetro promedio (μm)
1	10:4:1	0,931 \pm 0,007
2	10:4:2	1,083 \pm 0,006
3	10:4:3	1,171 \pm 0,114
4	14:0:2	1,814 \pm 0,015
5	14:0:4	2,368 \pm 0,061
6	14:0:6	2,861 \pm 0,046

Alternativamente, la mezcla lipídica incluye (a) uno o más primeros lípidos con diferente temperatura de transición de fase principal, en donde cada uno de los primeros lípidos incluye una cadena de alquilo C8-C30 tal como se define en las reivindicaciones; (b) un segundo lípido tal como se define en las reivindicaciones que se une con un resto polimérico hidrófilo, en donde el segundo lípido incluye una cadena de alquilo como la de los primeros lípidos; y (c) al menos una categoría de moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas.

Además, los primeros lípidos se seleccionan de:

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DMPG),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DMPS),

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato (DMPA),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (DPPA),

2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DPPS),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DPPG),

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE),

1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC),

1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG),

1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE),

- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato (DSPA),
 1,2- diestearoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DSPS),
 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC),
 5 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato (DOPA),
 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG),
 1,2-dioleoil-sn-gliceron-3-fosfoserina (DOPS),
 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP),
 10 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP),
 bromuro de dimetildiocadecilamonio (DMDDA),
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminpentaacético (DPPE-DTPA),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminpentaacético (DSPE-DTPA),
 15 ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, tocoferoles, tocotrienoles, palmitato de ascorbilo, SPAN (marca registrada), Loxiol (marca registrada), Atlas (TM), Arlacel (TM), Emcol (marca registrada) o una combinación de los mismos o polímeros derivados de los mismos.
- El segundo lípido tiene una estructura de cadena carbonada similar (C8-C30, estructura principal) con respecto al primer lípido anterior y se une con un resto polimérico de cadena larga hidrófilo de peso molecular de 200-200.000. El resto polimérico de cadena larga hidrófilo puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxietileno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y copolímeros relacionados, y péptido, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o una combinación de los mismos.
- El segundo lípido se selecciona de:
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DPPE-PEG2000),
 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000] (DPPE-PEG3000),
 25 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (DPPE-PEG5000),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000] (DSPE-PEG3000),
 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (DSPE-PEG5000),
 30 estearatos de polioxietileno, estearatos de polietilenglicol, TWEEN (marca registrada), Myrj (TM), Atlas (TM), succinato de d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 (vitamina E TPGS), lípido PEGilado conjugado con anticuerpos, lípido PEGilado conjugado con péptidos, lípido PEGilado conjugado con ADN, lípido PEGilado conjugado con ARN, lípido PEGilado modificado con biotina, lípido PEGilado modificado con maleimida, lípido PEGilado modificado con aminas, y la combinación de los mismos o los polímeros derivados de los mismos.
- La molécula que puede pasar a través de la membrana lipídica y funciona para disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas puede ser, pero no se limita a, polietilenglicol, péptido, albúmina, aminoácido, alcoholes de azúcar, butano-1,3-diol, propano-1,2,3-triol, propano-1,2-diol, propano-1,3-diol, propan-1-ol, etano-1,2-diol, etanol, metanol y dimetilsulfóxido, o una combinación de los mismos.
- Al manipular la composición de la mezcla lipídica, la fluidez de membrana de la disolución transparente de portador lipídico y la capacidad de la membrana lipídica para reconstruirse es capaz de manipularse mediante la manipulación de la razón de mezcla de las moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica en la mezcla lipídica. Posteriormente, la disolución de portador lipídico se somete a emulsión o agitación mecánica a una temperatura menor que la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico para formar las micro/nano burbujas con tamaño deseado de un diámetro que varía de desde 0,2 hasta 8 µm (no se limita a) de una manera con eficacia óptima de utilización del material; en donde la temperatura bajada es una temperatura que varía de desde 10 grados Celsius hasta 60 grados Celsius.

Para obtener las micro/nano burbujas de manera que tengan eficacia óptima de utilización del material a la temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico mediante el uso de agitación mecánica tal como sonicación, agitación manual, agitación mecánica de alta velocidad, dispositivo microfluídico/enfoque en T, o microburbujeo de atomización electrohidrodinámica coaxial (CEHDA), la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico puede aumentarse antes de la agitación mecánica, por ejemplo, mediante un baño de agua, calor seco o agitaciones mecánicas en sí mismas, y luego disminuirse hasta la temperatura alrededor de la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico, seguido de agitación mecánica de toda la disolución transparente de portador lipídico. Alternativamente, por ejemplo, puede combinarse un sistema calentador/enfriador con un agitador mecánico para facilitar la manipulación de la temperatura del portador lipídico.

5 La figura 2 es una vista esquemática de un dispositivo 100 para producir micro/nano burbujas a base de lípidos según una primera realización de esta divulgación.

15 La mezcla lipídica como materia prima que va a colocarse en el dispositivo 100 incluye (a) uno o más primeros lípidos con diferente temperatura de transición de fase principal, teniendo cada uno una o dos cadenas de alquilo con 8-30 átomos de carbono de longitud (cadena de alquilo C8-C30) y (b) un segundo lípido que se une con un resto polimérico hidrófilo, o moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas. El segundo lípido tiene una estructura de cadena carbonada similar (C8-C30, estructura principal) con respecto al primer lípido anterior, y el segundo lípido se une adicionalmente con un resto polimérico de cadena larga hidrófilo de peso molecular de 200-200.000. La mezcla lipídica se usa como producto de partida que va a disolverse en agua destilada.

20 La figura 3 es una vista superior en sección transversal del dispositivo 100 de la figura 2. El dispositivo 100 incluye un agitador mecánico 110 para generar agitaciones mecánicas y una unidad de control de temperatura 120 para manipular la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico para que sea cercana a la temperatura de transición de fase principal de la misma.

25 Si actúan agitaciones adicionales del agitador mecánico 110 sobre el portador lipídico colocado que se ha sometido a agitaciones preliminares en un recipiente cerrado 200 sujeto por una abrazadera (no mostrada), se forman así micro/nano burbujas en el mismo.

30 La figura 4 es una vista esquemática del agitador mecánico 110 de esta divulgación. El agitador mecánico 110 incluye una abrazadera 111 que sirve para sujetar el recipiente cerrado 200, una palanca 112 conectada a y que se permite que se agite junto con la abrazadera 111, un motor 113 conectado con la palanca 112 y que proporciona integralmente la abrazadera 111 y la palanca 112 con potencia para vaivén, y un pasador (no mostrado) conectado a un extremo de la palanca 112 para restringir el movimiento de la misma. La palanca 112 junto con la abrazadera 111 puede someterse a vaivén suavemente para lograr las agitaciones mecánicas o emulsión mencionadas anteriormente cuando se accionan por el motor 113 con la restricción del pasador. La figura 5 muestra esquemáticamente la situación en la que el agitador mecánico 110 se incorpora con el dispositivo 100 para producir micro/nano burbujas a base de lípidos. En este ejemplo, la abrazadera 111 se dispone por encima de la unidad de control de temperatura 120 para hacer que la manipulación de la unidad de control de temperatura 120 al recipiente cerrado 200 que contiene la mezcla lipídica y sujeto por la abrazadera 111 sea más conveniente. En otras palabras, incluso la abrazadera 111 agita en vaivén horizontalmente (ya sea lineal o en forma de figura 9 tal como se muestra en la figura 9) junto con la palanca 112 cuando se acciona por el motor 113, el recipiente cerrado 200 sujeto por la abrazadera 111 siempre permanece por encima de la unidad de control de temperatura 120 en posición, independientemente del vaivén. De esta manera, puede obtenerse un rendimiento satisfactorio a temperatura controlada.

35 Además, tal como se muestra en las figuras 2 y 3, el dispositivo 100 puede incluir una carcasa 130 para encerrar y acomodar todos los elementos junto con la mezcla lipídica. Puede proporcionarse una tapa 131 a la carcasa 130 para facilitar la entrada o salida o la sustitución de los elementos. La figura 6 es una vista frontal de la unidad de control de temperatura 120 según una realización de esta divulgación. La unidad de control de temperatura 120 dispuesta dentro de la carcasa 130 incluye un primer conjunto de ventiladores 121, un segundo conjunto de ventiladores 122, una bobina de calentamiento 123 y un sensor (no mostrado). Como alternativa, la unidad de control de temperatura 120 puede incorporarse en la abrazadera 111 o la palanca 112. La figura 7 es una vista inferior del dispositivo 100 para producir las micro/nano burbujas a base de lípidos de esta divulgación. En la figura 7, la unidad de control de temperatura 120 se encuentra en la parte inferior de la carcasa 130 como puede observarse a partir de ella.

40 El primer conjunto de ventiladores 121 está configurado para generar un flujo de aire de entrada 310 que fluye hacia el interior de la carcasa 130, mientras que el segundo conjunto de ventiladores 122 está configurado para generar un flujo de aire de salida 320 que fluye hacia el exterior de la carcasa 130. La bobina de calentamiento 123 está configurada para calentar el flujo de aire de entrada 310, y el sensor está configurado para detectar la temperatura dentro de la carcasa 130.

55 Cuando la temperatura dentro de la carcasa 130 va a aumentarse hasta una temperatura objetivo, se inician el primer conjunto de ventiladores 121 y la bobina de calentamiento 123. Sin embargo, opcionalmente puede iniciarse el segundo conjunto de ventiladores 122 para potenciar la convección térmica en esta condición. Por el contrario, cuando la temperatura dentro de la carcasa 130 tiene que reducirse hasta otra temperatura objetivo, el segundo conjunto de

ventiladores 122 se inicia con el primer conjunto de ventiladores 121 opcionalmente. La figura 8 es una vista frontal del dispositivo 100 para producir las micro/nano burbujas a base de lípidos de esta divulgación donde se ilustran el flujo de aire de entrada 310 y el flujo de aire de salida 320 para una mejor comprensión.

- 5 En otra realización, el dispositivo 100 puede incluir una pieza de calentamiento en seco (no mostrada) incorporada en la abrazadera 111 o la palanca 112. La pieza de calentamiento ayuda al recipiente cerrado 200 con un aumento rápido de temperatura. Además, debe observarse que el recipiente cerrado 200 que contiene la disolución transparente de portador lipídico como el portador lipídico posiblemente tendrá una temperatura aumentada debido a una fuerte agitación impartida por el agitador mecánico. Por lo tanto, por ejemplo, si la temperatura aumentada es mayor que la temperatura objetivo, la agitación mecánica puede detenerse por un tiempo.
- 10 En esta divulgación, la fluidez de la membrana lipídica y la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico están determinadas por la composición de la mezcla lipídica. El recipiente 200 que contiene el portador lipídico se agita mecánicamente a la temperatura alrededor de la temperatura de transición de fase principal del portador lipídico, formando así las microburbujas con eficacia óptima de utilización del material. Por lo tanto, esta divulgación es ventajosa particularmente porque el coste para fabricar las micro/nano burbujas puede
- 15 reducirse enormemente.

Además, el tamaño o el diámetro de las micro/nano burbujas también puede determinarse según lo requiera la composición de la mezcla lipídica y la temperatura a la cual el portador lipídico se agita mecánicamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir micro/nano burbujas a base de lípidos, que comprende etapas de:

preparar una mezcla lipídica que comprende (1) uno o más primeros lípidos con diferente temperatura de transición de fase principal, (2) un segundo lípido que se une con un resto polimérico hidrófilo, y (3) opcionalmente una o más moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre bicapas lipídicas; en donde cada uno de los uno o más primeros lípidos incluye un extremo C8-C30 hidrófobo, y dicho resto polimérico hidrófilo tiene una cadena larga con peso molecular de 200-200.000; en donde el uno o más primeros lípidos se seleccionan del grupo que consiste en 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano, bromuro de dimetildiocadecilamonio, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminopentaacético, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-ácido N-dietilentriaminopentaacético, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, tocoferoles, tocotrienoles, palmitato de ascorbilo, SPAN®, Loxiol®, Atlas™, y la combinación de los mismos o polímeros derivados de los mismos, y en donde el segundo lípido se selecciona del grupo que consiste en: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], estearatos de polioxietileno, estearatos de polietilenglicol, TWEEN®, Myrj™, succinato de d-alfa tocoferil polietilenglicol 1000, lípido PEGilado conjugado con anticuerpos, lípido PEGilado conjugado con péptidos, lípido PEGilado conjugado con ADN, lípido PEGilado conjugado con ARN, lípido PEGilado modificado con biotina, lípido PEGilado modificado con maleimida, lípido PEGilado modificado con aminas, y la combinación de los mismos;

emulsionar la mezcla lipídica con un disolvente por medios mecánicos para formar una disolución transparente de portador lipídico y luego ajustar la temperatura del portador lipídico transparente hasta 20 grados Celsius;

colocar la disolución transparente de portador lipídico en un recipiente cerrado que comprende un gas predeterminado o una molécula hidrófoba; y

manipular la temperatura de la disolución transparente de portador lipídico para que esté cerca de la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico

y agitar de manera mecánica el recipiente cerrado que contiene la disolución transparente de portador lipídico a la temperatura cercana a la temperatura de transición de fase principal de la disolución transparente de portador lipídico para formar dichas micro/nano burbujas dentro del recipiente cerrado.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el extremo C8-C30 hidrófobo se selecciona de los grupos de cadena de alquilo lineal, cadena de alquenoilo, cadena de alquinoilo, una cadena de fluoroalquilo, cadena de alquilo ramificada, y la combinación de los mismos.

3. El método según la reivindicación 1, en donde la cadena larga del resto polimérico hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en:

polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxietileno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, péptido, ADN, ARN, y una combinación de los mismos.

4. El método según la reivindicación 1, en donde la una o más moléculas capaces de atravesar una membrana lipídica y disminuir las fuerzas de van der Waals entre lípidos se selecciona del grupo que consiste en:

polietilenglicol, péptido, albúmina, aminoácido, alcoholes de azúcar, butano-1,3-diol, propano-1,2,3-triol, propano-1,2-diol, propano-1,3-diol, propan-1-ol, etano-1,2-diol, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, y la combinación de los mismos.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el disolvente acuoso es agua, o solución salina normal, o solución salina tamponada.

6. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de emulsionar la mezcla lipídica con el disolvente acuoso se realiza mediante sonicación, agitación a alta velocidad, homogeneización a alta presión, o filtración por membrana.

7. El método según la reivindicación 1, en donde el gas predeterminado se selecciona del grupo que consiste en: hidrocarburo sustituido con halógeno, gas inerte, hexafluoruro de azufre, nitrógeno, oxígeno, y aire, o una combinación de los mismos.
- 5 8. El método según la reivindicación 1, en donde el uno o más primeros lípidos se seleccionan del grupo que consiste en 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoserina y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol).
- 10 9. El método según la reivindicación 8, en donde el uno o más primeros lípidos se seleccionan del grupo que consiste en 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol).
- 15 10. El método según la reivindicación 1, en donde el segundo lípido se selecciona del grupo que consiste en: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000], estearatos de polioxietileno, Myrj™ y estearatos de polietilenglicol.
- 20 11. El método según la reivindicación 10, en donde el segundo lípido es 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000], Myrj™ o estearatos de polietilenglicol.

Distribución de tamaños

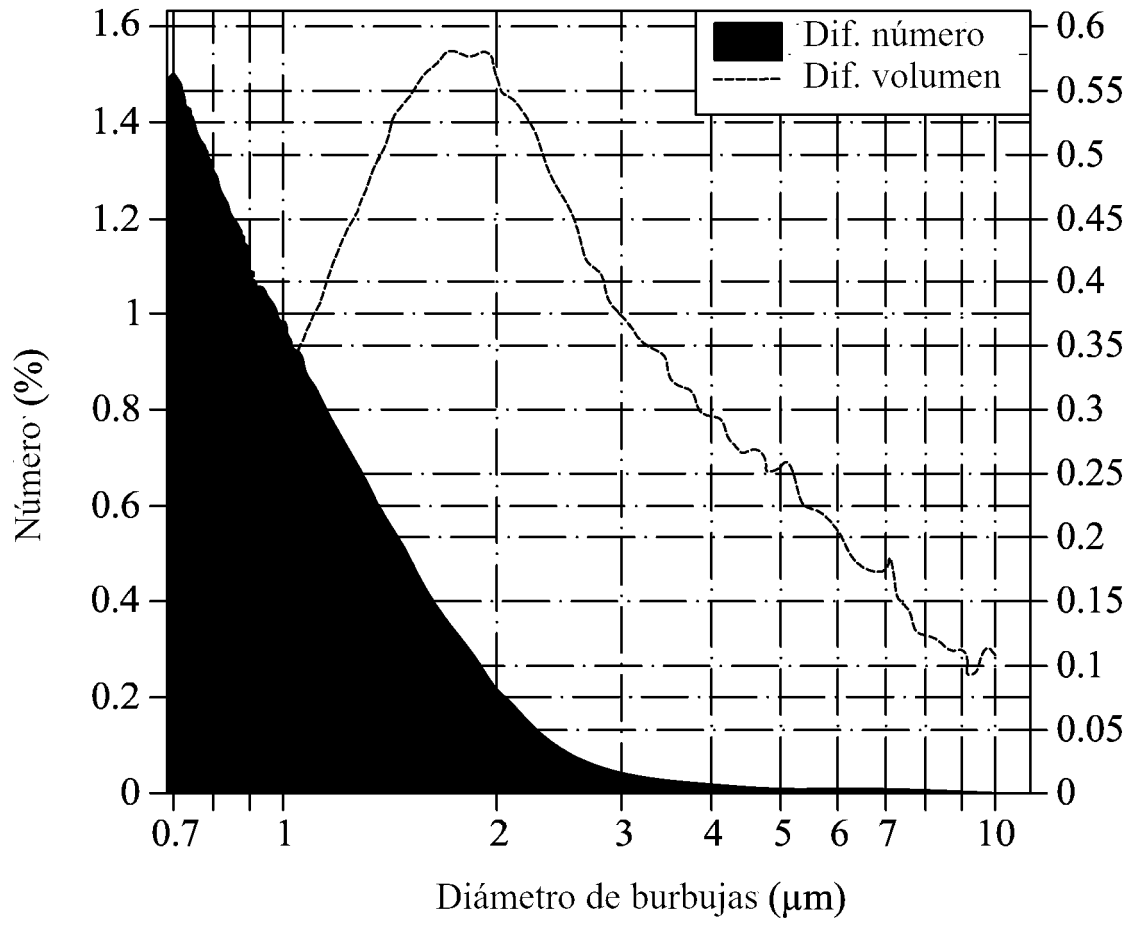


FIG. 1

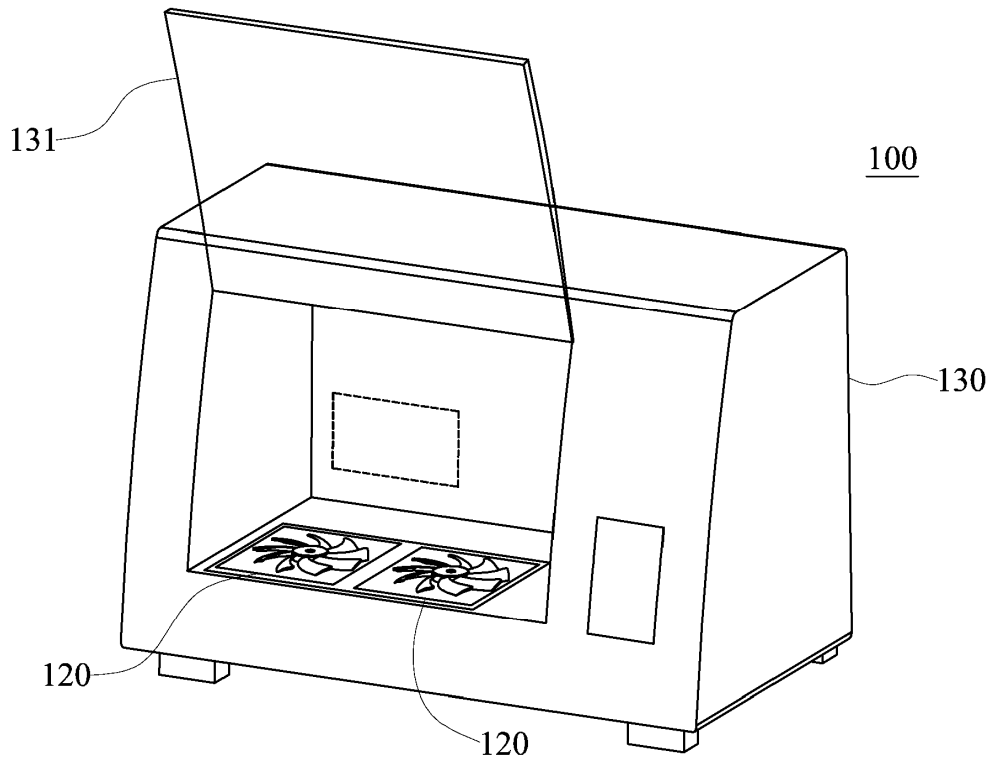


FIG. 2

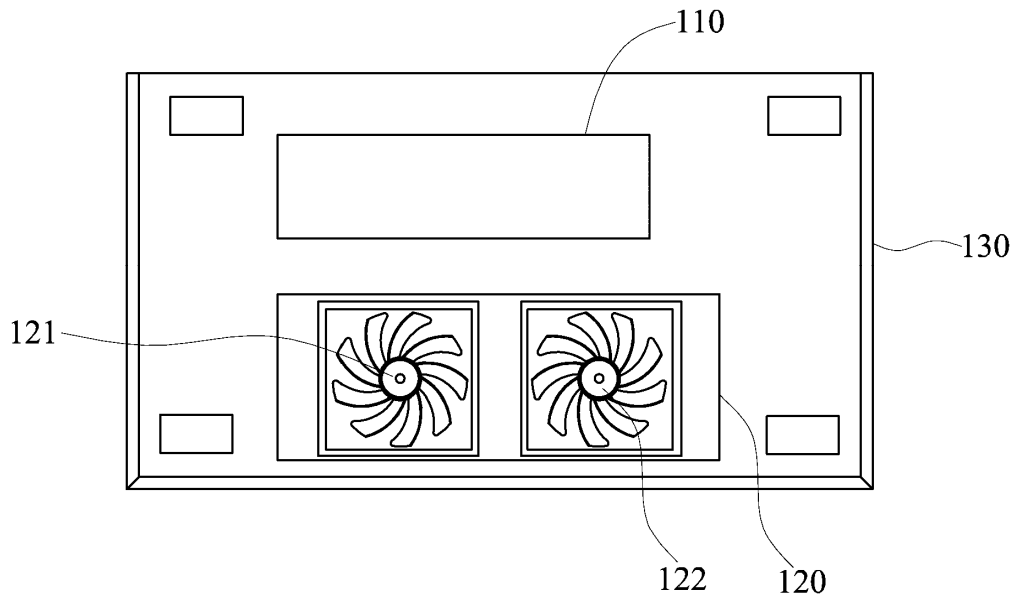


FIG. 3

110

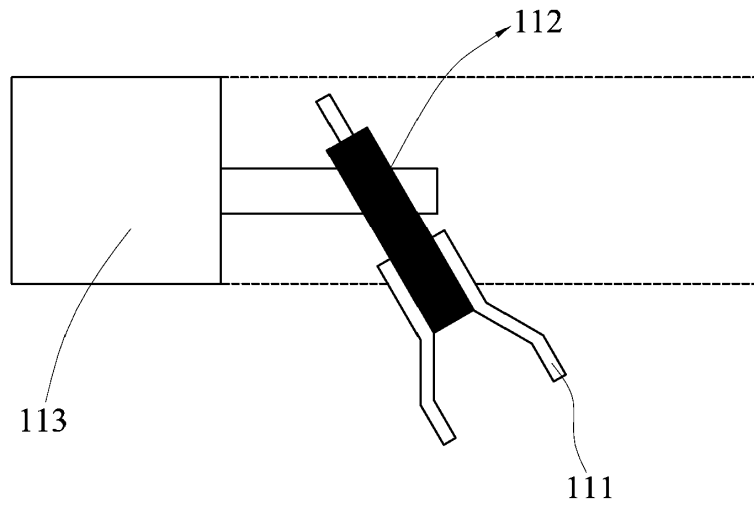


FIG. 4

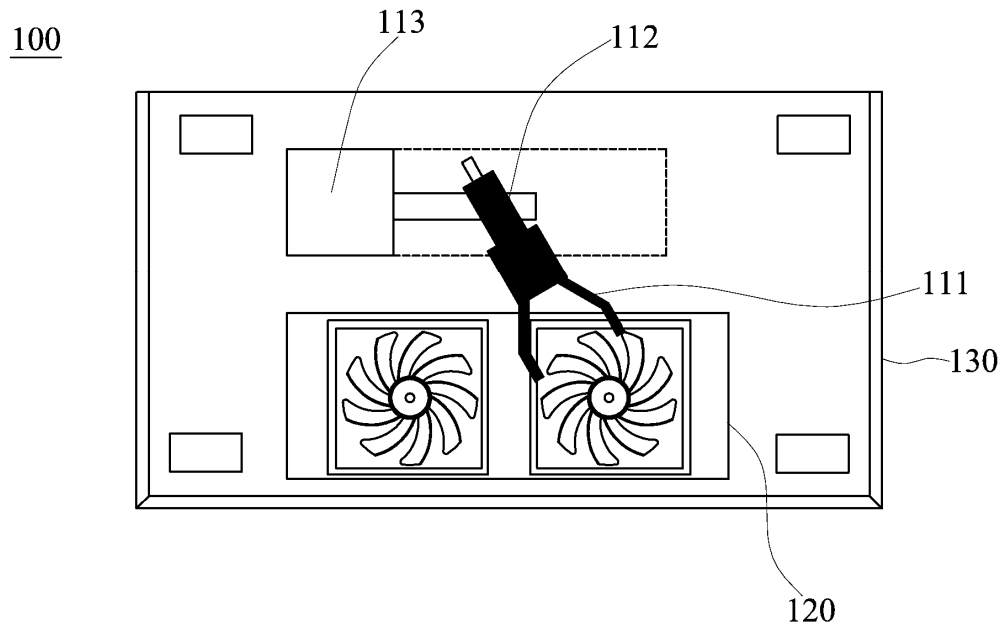


FIG. 5

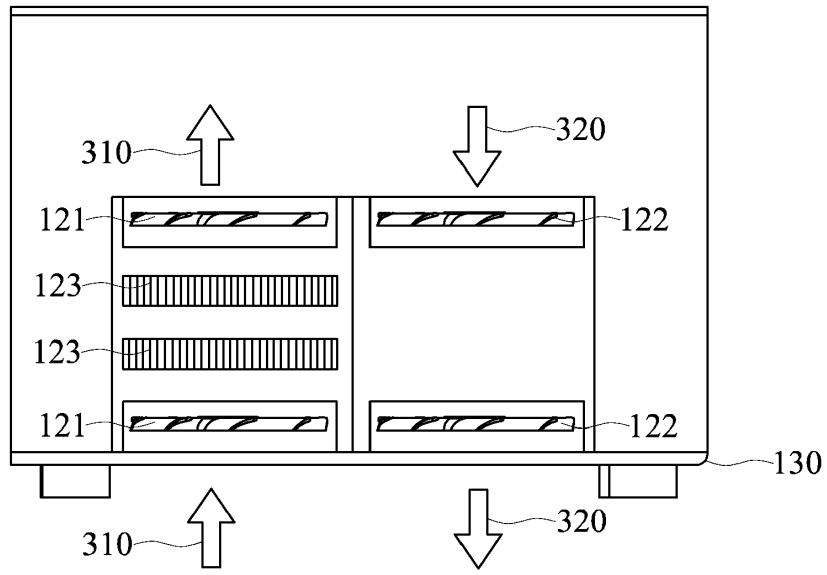


FIG. 6

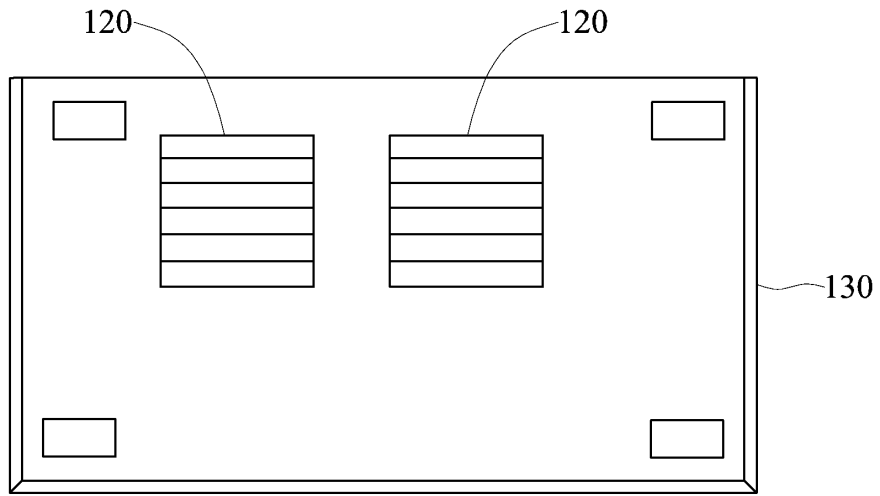


FIG. 7

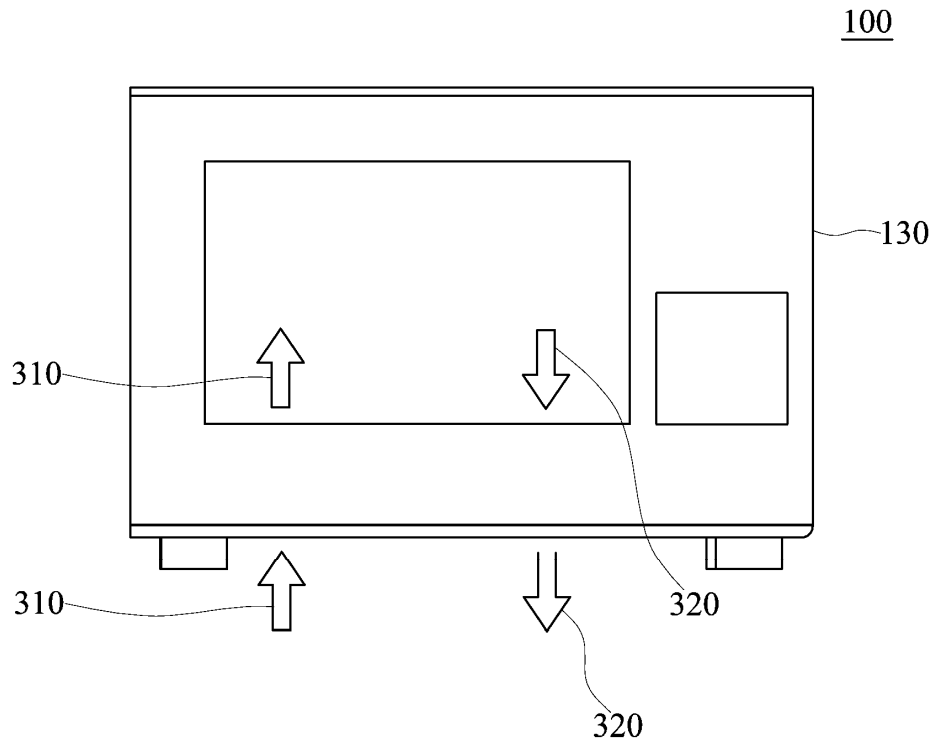


FIG. 8

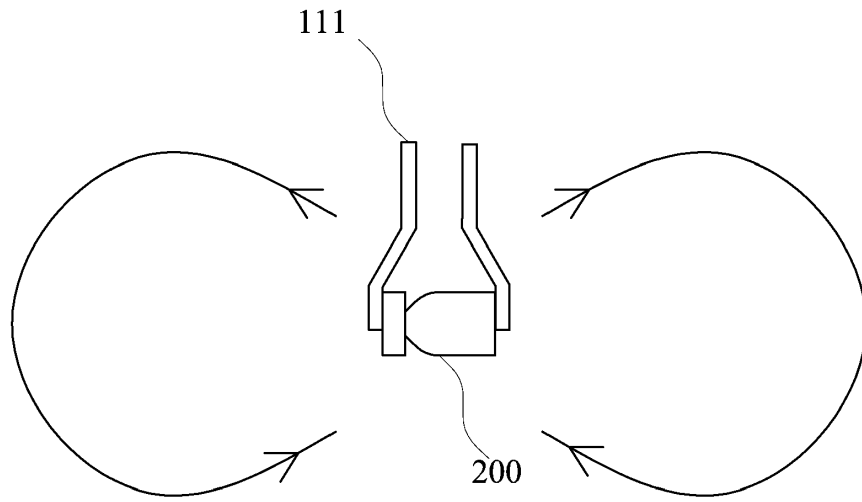


FIG. 9