



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 477**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06769440 .6**  
96 Fecha de presentación : **10.07.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1904841**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Partículas multicolor.**

30 Prioridad: **11.07.2005 NO 20053373**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.04.2011**

73 Titular/es: **Rikshospitalet HF**  
**Sognsvannsveien 20**  
**0027 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Lund-Johansen, Fridtjof**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 357 477 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

Partículas multicolor.

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas con subconjuntos de partículas que emiten una combinación única de luz fluorescente y que llevan un reactivo de  
 10 captura particular; teñidas con al menos dos colorantes fluorescentes; donde se pueden resolver al menos 16 subconjuntos de partículas basándose en la emisión variable de los al menos dos colorantes fluorescentes, donde la emisión de al menos un colorante procede de un colorante fluorescente unido covalentemente a la superficie de la  
 15 partícula; todas las partículas en dicho conjunto de partículas poliméricas pueden unir una cantidad uniforme de un reactivo de captura; los colorantes fluorescentes se seleccionan del grupo constituido por excitables por luz UV/violeta, excitables a 488 nm, excitables a 532 nm (YAG), excitables a 595 nm (Krypton), excitables a 633 nm, excitables por luz  
 infrarroja, conjugados en tándem de PE y APC excitables a 488 nm y a 633 nm, conjugados en tándem de colorantes reactivos (por ejemplo, colorantes Alexa) excitables a 488 nm y/o puntos cuánticos; y todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas están marcadas uniformemente con un reactivo  
 de captura; con la condición de que los colorantes fluorescentes no sean nanopartículas coloreadas; donde dichas partículas primero se tiñen y a continuación se acoplan a un reactivo de captura en un momento posterior. La invención también se refiere a un kit que comprende dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas y los usos de dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Se admite que para incrementar el número de permutaciones de combinaciones únicas de colorantes en una sola partícula se podrían usar dos o más colorantes en proporciones variables. Las longitudes de onda de emisión únicas y las intensidades de fluorescencia podrían ser útiles para análisis multiparamétricos o multiplex de una pluralidad de analitos en la misma muestra.

25 Se han descrito tres procedimientos de preparación de perlas fluorescentes coloreadas, incluyendo: (a) unión covalente de colorantes sobre la superficie de la partícula (por ejemplo, patente de EE.UU. N° 4.774.189 de Schwartz, patente de EE.UU. N° 5.194.300 de Cheung), (b) incorporación interna de colorantes durante la polimerización de las partículas (por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.073.498 de Schwartz, patente de EE.UU. N° 4.717.655 de Fulwyler), y (c) coloración de la partícula después de que ya se haya polimerizado (por ejemplo, L.B. Bangs, Uniform Latex J Particles; Seragen Diagnostics Inc. 1984).

30 El documento de EE.UU. 5.194.300 de Cheung y de EE.UU. 4.774.189 de Schwartz describen microesferas fluorescentes que se recubren uniendo covalentemente uno o una pluralidad de colorantes fluorescentes a su superficie. No obstante, las características de las partículas no cumplen las especificaciones necesarias para el análisis multiplex: en el documento de EE.UU. 4.774.189 de Schwartz, se acoplan proteínas fluorescentes a partículas para generar patrones para el análisis por citometría de flujo usando proteínas fluorescentes similares. Se describe que se pueden  
 35 generar partículas con intensidades de fluorescencia diferentes uniendo covalentemente proteínas fluorescentes a partículas. No obstante, puesto que estas partículas se diseñaron para su uso como patrones, no se ha tratado de acoplar simultáneamente dos fluorocromos a las partículas. Además, no se han llevado a cabo intentos para unir una molécula de reactivo de captura a las propias partículas. Las sondas fluorescentes usadas son proteínas que se desnaturalizan en condiciones rigurosas como las utilizadas para la hibridación de ADN en tampones usados en la  
 40 inmunoprecipitación que contienen detergentes desnaturalizantes como el SDS. Además, la unión de proteínas fluorescentes a partículas comprenderá la unión de reactivos de captura, tales como anticuerpos, a las propias partículas. Por tanto, su procedimiento no es aplicable para generar partículas multicolores para análisis multiplex. El documento de EE.UU. 5.194.300 de Cheung informa de partículas fluorescentes pequeñas (300 Angstrom) que se podrían usar para aumentar las señales para su detección. Los inventores muestran que fue posible generar partículas que tienen una intensidad de fluorescencia única y un reactivo de captura unido a su superficie. No se informó de si la unión de los colorantes interfiere con la unión posterior de biomoléculas. Además, no se han hecho intentos de generar partículas con varias intensidades de fluorescencia diferentes o para acoplar dos colores a la misma partícula.

45 La segunda aproximación a la coloración de partículas está representada por la patente de EE.UU. N° 5.073.498 de Schwartz y la patente de EE.UU. N° 4.717.655 de Fulwyler. Esta última describe la adición de dos o más colorantes fluorescentes durante el proceso de polimerización y su dispersión aleatoria dentro del cuerpo de la partícula. No obstante, cuando estas partículas se exponen a una única longitud de onda de excitación, sólo se observa una señal fluorescente cada vez, y así, estas partículas no son útiles para análisis multiparamétricos, especialmente en un aparato de citometría de flujo con una sola fuente de luz de excitación. La patente de EE.UU. N° 4.717.655 de Fulwyler describe dos colorantes mezclados en cinco relaciones diferentes y copolimerizados en una partícula. Aunque se reivindica que se obtienen cinco poblaciones de perlas, no se proporcionan las propiedades fluorescentes de estas perlas. En  
 50 conclusión, tanto la patente de EE.UU. N° 5.073.498 de Schwartz como la patente de EE.UU. N° 4.717.655 de Fulwyler representan procedimientos complejos y costosos para la producción de partículas multicolor que comprenden la incorporación interna de colorantes.

El principio del tercer procedimiento, es decir, la incrustación o la difusión interna de un colorante después de que ya se haya polimerizado la partícula fue descrito originalmente por L. B. Bangs (Uniform Latex J Particles; Seragen Diagnostics Inc. 1984, p. 40) y consiste en la adición de un colorante hidrófobo o soluble en aceite a micropartículas agitadas y el aclarado del colorante después de la incubación. Las microesferas usadas en este procedimiento son de naturaleza hidrófoba. Esto permite la adopción del fenómeno de dilatación de estas partículas en un disolvente hidrófobo, que también puede contener colorantes fluorescentes hidrófobos. Una vez dilatadas, estas partículas absorberán los colorantes presentes en la mezcla disolvente de una manera que recuerda a la absorción del agua por parte de una esponja. El nivel y el grado de dilatación están controlados por el tiempo de incubación, la cantidad de agente de reticulación que evita la desintegración de la partícula, y la naturaleza y la cantidad del disolvente(s). Variando estos parámetros uno puede difundir un colorante a través de la partícula u obtener capas o zonas esféricas del tamaño y la forma deseados que contienen el colorante fluorescente. La retirada del disolvente finaliza el proceso de tinción. Las micropartículas teñidas de esta forma no "exudarán" el colorante en las disoluciones acuosas o en presencia de disolventes o tensioactivos con base acuosa como tensioactivos aniónicos, no iónicos, catiónicos, anfóteros, y bipolares. La patente de EE.UU. Nº 5.723.218 de Haugland describe la tinción de micropartículas por difusión con uno o más colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro usando un procedimiento, que esencialmente es similar al método de Bangs. No obstante, cuando las perlas teñidas internamente con dos colorantes de dipirrometenoboro diferentes se excitan a longitudes de onda de 490 nm, presentan un solapamiento en el espectro de emisión. Por tanto, las perlas eran monocromáticas, y no multicolor. La patente de EE.UU. Nº 5.326.692 de Brinkley y col.; la patente de EE.UU. Nº 5.716.855 de Lerner y col., y patente de EE.UU. Nº 5.573.909 de Singer y col., describen la tinción fluorescente de micropartículas con dos o más colorantes fluorescentes. No obstante, los colorantes usados en estos procedimientos presentan un solapamiento en el espectro de excitación y emisión, que permite la transferencia de energía desde el primer colorante excitado al siguiente colorante y a lo largo de una serie de colorantes, que da como resultado la emisión de luz procedente del último colorante de la serie. Este procedimiento pretendía crear un desplazamiento de Stokes extendido, es decir, una mayor separación entre la longitud de onda de excitación y de emisión, y no la emisión de fluorescencia desde cada colorante simultáneamente. Así, debido a diversas razones como la interacción colorante-colorante, el solapamiento del espectro, los perfiles de emisión no gaussianos y la transferencia de energía entre colorantes vecinos, no se satisfizo la demanda de perlas multicolor que emitan fluorescencia simultáneamente en varios picos.

La patente de EE.UU. Nº 5.786.219 de Zhang crea microesferas con "anillos" o microesferas fluorescentes de dos colores que contienen un "disco" esférico fluorescente combinado con un anillo fluorescente. No obstante, esas perlas, diseñadas para fines de calibración, no se pueden usar en análisis multiparamétricos puesto que los dos colorantes sólo se mezclan en una relación fija. No obstante, el número más alto de relaciones de colorantes intentado hasta la fecha con al menos dos colorantes nunca supera los cinco.

Chandler y col. (patente de EE.UU. Nº 6.599.331) describe un procedimiento que es esencialmente similar al descrito por Bangs y posteriormente aplicado por Haugland, Brinkley y Lerner. La diferencia principal es la elección de los colorantes fluorescentes. Los inventores fueron capaces de encontrar una combinación de colorantes que resultó en la emisión dual de las partículas. No obstante, este procedimiento puede estar limitado a unos pocos colorantes seleccionados, puesto que resultados previos de Haugland, Brinkley y Lerner demuestran que la transferencia de energía da como resultado una emisión monocromática. En la patente de EE.UU. 6.649.414, Chandler y col. describen un procedimiento donde las nanopartículas se tiñen según el mismo procedimiento que se describe en la patente 6.599.331. A continuación, estas nanopartículas se unen a la superficie de partículas poliméricas más grandes para generar una nueva partícula que consta de una partícula central y una capa de un número variable de nanopartículas sobre la superficie. No obstante, estas partículas tendrán una superficie irregular y, por tanto, propiedades de dispersión de luz muy variables y, muy probablemente, una elevada tendencia a la agregación en disolución. Además, la unión no específica de proteínas procedentes de, por ejemplo, un lisado celular, tenderá a incrementarse cuando la superficie sea irregular.

La solicitud internacional WO 00/39335 describe un conjunto de partículas poliméricas (página 10, último párrafo) teñidas con al menos dos colorantes fluorescentes, donde se pueden resolver al menos 16 subconjuntos de partículas basándose en la emisión variable procedente de los, al menos, dos colorantes fluorescentes (véase página 15: 25 perlas 1A a 4I, pero pueden ser más, página 11, párrafo 2, reivindicaciones 10-18), donde la emisión de al menos un colorante procede de un colorante fluorescente unido covalentemente a la superficie de la partícula (página 4, línea 31 a página 6, línea 14).

No obstante, el documento WO 00/39335 no describe que dichas partículas se puedan teñir primero y a continuación acoplarse a un reactivo de captura en un momento posterior, dando partículas poliméricas que se marcan uniformemente con un reactivo de captura.

Los siguientes aspectos difíciles son importantes cuando se desarrolla una partícula multicolor:

1. Puesto que el marcaje de la superficie se produce a través de grupos reactivos sobre la partícula, los colorantes fluorescentes y los reactivos de captura competirán por la unión a los grupos reactivos sobre la partícula. Así, las partículas que se marcan primero con cantidades diferentes de colorantes no se espera que unan niveles similares de reactivo usado para unir el analito. Por otra parte, se espera que las partículas que han unido primero el reactivo usado para unir el analito tengan pocos grupos disponibles para los grupos reactivos de los colorantes fluorescentes.

2. Se podría esperar que el marcaje de la superficie con múltiples compuestos fluorescentes diera lugar a una gran cantidad de transferencia de energía de fluorescencia entre los colorantes. Esto estaría enormemente limitado por el número de códigos que se pueden generar. La codificación por colores basada en dos o más sondas fluorescentes implica que el espectro de emisión y/o de absorción de las sondas son suficientemente diferentes para permitir la detección simultánea e independiente de las dos sondas. Cuando dos sondas están muy próximas se puede producir la transferencia de la energía de fluorescencia. Esto implica que la luz emitida por una de las sondas es absorbida por la segunda y, así, es inactivada. Este fenómeno es muy conocido y se puede producir incluso entre sondas que presentan grandes diferencias en los espectros de emisión y absorción. Un ejemplo es la ficoeritrina y el Cy5, donde el espectro de emisión de la ficoeritrina y el espectro de absorción del Cy5 está separado por >100 nm. En este caso, la fluorescencia de la ficoeritrina es completamente inactivada por el Cy5. Cuando los colorantes se incorporan al polímero, se distribuyen por todo el volumen de las partículas. El área superficial de la partícula es un área de distribución mucho más pequeña para las sondas. Por tanto, sería de esperar que las sondas estuvieran muy próximas. Esto podría limitar el número de códigos de color medibles hasta un grado en el que sería imposible una verdadera codificación por colores multiplex.
3. Sería de esperar que los colorantes fluorescentes unidos a la superficie de partículas puedan interferir con señales de fluorescencia procedentes del analito debido a la transferencia de la energía de fluorescencia. Así, si la sonda fluorescente usada para detectar el analito puede transferir energía al colorante usado para la codificación por colores o viceversa, sería de esperar que la señal del analito fuera diferente en partículas con códigos de color diferentes.
4. Además, sería de esperar que el marcaje de la superficie no fuera suficientemente estable para permitir la discriminación de pequeñas diferencias en la fluorescencia cuando las partículas se someten a almacenamiento o a reacciones que requieren condiciones rigurosas como temperaturas elevadas.
5. Por último, los colorantes fluorescentes pueden experimentar cambios en las características espectrales tras la unión a esferas de látex monodispersas.

En nuestra opinión, aún no se han descrito poblaciones o subconjuntos de microesferas fiables que, tras su exposición a una sola longitud de onda de excitación, emitan múltiples señales fluorescentes de intensidad variable y a longitudes de onda espaciadas ópticamente distantes a partir de colorantes unidos a la superficie o a una combinación de colorantes internos y unidos a la superficie. En particular, existe una necesidad de partículas con dichas características que además permitan el uso de una amplia variedad de formas reactivas de colorantes fluorescentes disponibles en el mercado, que se producen con un procedimiento simple y rentable y que se pueden teñir después del marcaje con niveles uniformes de un reactivo de captura.

La presente invención describe un nuevo conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas con subconjuntos de partículas que emiten una combinación única de luz fluorescente y que llevan un reactivo de captura particular; teñidas con al menos dos colorantes fluorescentes; donde se pueden resolver al menos 16 subconjuntos de partículas basándose en la emisión variable de los al menos dos colorantes fluorescentes, donde la emisión de al menos un colorante procede de un colorante fluorescente unido covalentemente a la superficie de la partícula; todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas pueden unir una cantidad uniforme de un reactivo de captura; los colorantes fluorescentes se seleccionan del grupo constituido por excitables por luz UV/violeta, excitables a 488 nm, excitables a 532 nm (YAG), excitables a 595 nm (Krypton), excitables a 633 nm, excitables por luz infrarroja, conjugados en tándem de PE y APC excitables a 488 nm y a 633 nm, conjugados en tándem de colorantes reactivos (por ejemplo, colorantes Alexa) excitables a 488 nm y/o puntos cuánticos; y todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas están marcadas uniformemente con un reactivo de captura; con la condición de que los colorantes fluorescentes no sean nanopartículas coloreadas; donde dichas partículas primero se tiñen y a continuación se acoplan a un reactivo de captura en un momento posterior.

Sorprendentemente, la presente invención demuestra que es posible generar en primer lugar al menos 100 códigos de color diferentes sobre partículas, y a continuación obtener niveles muy uniformes de un reactivo de captura. Además, los datos descritos muestran que los 100 códigos de color diferentes (subconjuntos de partículas) se pueden generar usando partículas que primero se hayan hecho reaccionar con una única concentración de un reactivo de captura.

La presente invención demuestra que (1) a pesar de que se produce la transferencia de la energía de fluorescencia, aún es posible generar 100 códigos de color diferentes (subconjuntos de partículas) mediante el marcaje de la superficie; (2) que no se produce la transferencia de la energía de fluorescencia entre la sonda usada para la detección y la usada para la codificación por colores. Así, partículas con codificación por colores mediante marcaje de la superficie con cantidades diferentes de colorantes fluorescentes Alexa 647 y Alexa 488 presentaban la misma intensidad de fluorescencia de ficoeritrina cuando se incuban con la misma cantidad de un analito marcado con ficoeritrina. Esto es un hallazgo inesperado puesto que se sabe que el Alexa 647 es un aceptor muy efectivo para la ficoeritrina. (3) Los presentes datos demuestran que las propiedades de fluorescencia de las partículas con códigos por colores quedan inalteradas al someter a las partículas a ebullición; (4) que los colorantes, como el Alexa 647, experimentan cambios drásticos en sus propiedades espectrales que dependen del tiempo tras la unión a esferas de látex monodispersas. De manera bastante inesperada, este colorante del rojo lejano presenta una fluorescencia considerable en el verde después

del almacenamiento de las partículas a 4°C. (5) Por último, la presente invención demuestra que se pueden evitar cambios en las características espectrales mediante el uso de derivados maleimida de los colorantes y con el almacenamiento de las partículas teñidas a 20°C en un medio de criopreservación que consiste en PBS con el 50% de trehalosa.

5 Por tanto, los inventores creen que la presente invención cumple con las necesidades anteriormente mencionadas proporcionando un conjunto de partículas de superficie multicolor, así como sus usos, permitiendo que una pluralidad de subconjuntos definidos de micropartículas coloreadas teñidas sean distinguibles por una variación muy sutil en la señal de fluorescencia que resulta de la combinación de diversos colorantes de distintos colores y con una intensidad variable de emisión del color. El presente marcaje de la superficie permite el uso de una amplia variedad de formas reactivas de colorantes fluorescentes disponibles en el mercado. El proceso de marcaje está enormemente simplificado comparado con la incorporación de colorantes al polímero. Además, es posible teñir partículas ya marcadas con niveles uniformes de un reactivo de captura.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 **Figura 1** Unión del agente de reticulación a las perlas, cebado de anticuerpos, y unión del anticuerpo a la partícula a través de un agente de reticulación.
- Figura 2** Partículas
- Figura 3** Partículas
- Figura 4** Procedimiento de producción de partículas de la invención mediante el empleo de biotina en lugar de un agente de reticulación
- 20 **Figura 5** Análisis Multiplex por citometría de flujo
- Figura 6** Las partículas teñidas con Alexa 647 maleimida se mezclaron como se describe, se dividen en 16 alícuotas iguales y se marcan con Alexa 488 maleimida.
- Figura 7** Una mezcla de partículas teñidas con Alexa 488 y Alexa 647 se dividieron en dos, una se incubó con la Fc de IgG de cabra anti-ratón modificada con SMCC, y la otra no. Las dos se mezclaron una vez más, se bloquearon con PBS que contenía el 10% de FCS y el 1% de Tween 20 y se incubaron con un anticuerpo IgG de ratón marcado con PE. Los resultados muestran una tinción uniforme de las partículas con el anticuerpo independientemente de sus propiedades de fluorescencia.
- 25 **Figura 8** La mezcla de partículas se lleva a ebullición durante 5 minutos con SDS al 10% para probar la estabilidad de las señales fluorescentes.
- Figura 9** Microesferas amino-terminales se incubaron con SPDP, se redujeron con TCEP y a continuación se incubaron con diluciones a la mitad de Alexa 647 maleimida. Las partículas se lavaron cinco veces. La intensidad de fluorescencia de las partículas se midió con un citómetro de flujo FACSCalibur.
- Figura 10** Cuantificación de los niveles de proteína.
- Figura 11** Análisis de los complejos moleculares y de las proteínas de fusión.
- 30 **Figura 12** Análisis de la fosforilación de las proteínas.
- Figura 13** Verificación de que las señales para las partículas representan las dianas previstas de los anticuerpos en las moléculas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La presente invención comprende un conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas con subconjuntos de partículas que emiten una combinación única de luz fluorescente y que llevan un reactivo de captura particular; teñidas con al menos dos colorantes fluorescentes; donde se pueden resolver al menos 16 subconjuntos de partículas basándose en la emisión variable de los al menos dos colorantes fluorescentes, donde la emisión de al menos un colorante procede de un colorante fluorescente unido covalentemente a la superficie de la partícula; todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas pueden unir una cantidad uniforme de un reactivo de captura; los colorantes fluorescentes se seleccionan del grupo constituido por excitables por luz UV/violeta, excitables a 488 nm, excitables a 532 nm (YAG), excitables a 595 nm (Krypton), excitables a 633 nm, excitables por luz infrarroja, conjugados en tándem de PE y APC excitables a 488 nm y a 633 nm, conjugados en tándem de colorantes reactivos (por ejemplo, colorantes Alexa) excitables a 488 nm y/o puntos cuánticos; y todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas están marcadas uniformemente con un reactivo de captura; con la condición de que los colorantes fluorescentes no sean nanopartículas coloreadas; donde dichas partículas primero se tiñen y a continuación se acoplan a un reactivo de captura en un

momento posterior.

Dicho subconjunto de partículas poliméricas se define en el presente documento como un grupo de partículas poliméricas que tiene un código de color único que se puede resolver basándose en su emisión variable de los al menos dos colorantes fluorescentes. La emisión variable se define en el presente documento para que también incluya la ausencia de emisión.

Dichos al menos 16 subconjuntos de partículas preferentemente son al menos 25 ó 36 subconjuntos de partículas, e incluso más preferentemente son al menos 48 subconjuntos de partículas.

El número de subconjuntos de partículas que se puede resolver basándose en la emisión variable de dichos al menos dos colorantes fluorescentes se puede verificar directa y positivamente sin experimentación innecesaria, por ejemplo, usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

Cantidad uniforme y/o uniformemente marcado se define en el presente documento como una cantidad o un marcaje que no varía significativamente entre partículas dentro del conjunto, sino que es constante y regular en todo él.

La presente invención también se refiere a dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas, donde dichos colorantes están unidos en concentraciones definidas. Concentraciones definidas se define en el presente documento como la cantidad de cada colorante que está unido a las partículas en un subconjunto específico de partículas. La cantidad de cada colorante se define en el presente documento para que también incluya la ausencia de colorante.

La presente invención también se refiere a dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas, donde dicho al menos un colorante fluorescente que está unido covalentemente a la superficie de la partícula está unido covalentemente a través de un agente de reticulación bifuncional o directamente a cada partícula.

La presente invención también se refiere a dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas, donde todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas contienen sitios de unión suficientes para la unión uniforme covalente del reactivo de captura. Dichos sitios de unión preferentemente son grupos -SH o grupos amino libres.

La presente invención también se refiere a dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas, donde todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas se pueden marcar uniformemente con un reactivo de captura, donde el reactivo de captura tiene unidos opcionalmente colorantes fluorescentes. Dicho reactivo de captura puede estar unido no covalentemente a las partículas. Preferentemente, dicho reactivo de captura puede estar unido covalentemente a través de un agente de reticulación bifuncional o directamente a cada partícula. Dicho reactivo de captura puede ser cualquier molécula capaz de interactuar con una molécula de interés, por ejemplo, una proteína en un ensayo biológico. Dicho reactivo de captura puede ser una proteína, por ejemplo, una molécula basada en anticuerpos o un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN.

El agente de reticulación bifuncional puede ser cualquier agente de reticulación adecuado, preferentemente los agentes de reticulación según la Tabla 1, más preferentemente, un agente de reticulación basado en la química de la maleimida-tiol. El agente de reticulación puede ser homo- o heterobifuncional, no obstante, se prefieren los agentes de reticulación heterobifuncionales. En una forma de realización de la presente invención el agente de reticulación es SPDP.

Los colorantes fluorescentes o fluorocromos adecuados, en lo sucesivo denominados colorantes, son conocidos en la técnica y en la Tabla 2 se listan algunos ejemplos. En una forma de realización preferida, los colorantes fluorescentes pueden ser formas hidrófilas de colorantes de cianina tales como las formas reactivas de Alexa 488 y 647.

Las partículas poliméricas adecuadas como material de partida para la presente invención son conocidas en la materia y se pueden obtener de fabricantes comerciales. Las partículas iniciales pueden estar formadas de, por ejemplo, cloruro de polivinilo, poliviniltolueno, estireno, o metilmetacrilato con poliviniltolueno y las partículas preferentemente tienen un diámetro inferior a 100  $\mu\text{m}$ .

Otros ejemplos de microesferas son poliestireno bromado, ácido poliacrílico, poliácridonitrilo, poliácridamida, poliácroleína, polibutadieno, polidimetilsiloxano, poliisopreno, poliuretano, polivinilacetato, cloruro de polivinilo, polivinilpiridina, cloruro de polivinilbencilo, poliviniltolueno, cloruro de polivinilideno, polidivinilbenceno, polimetilmetacrilato, o sus combinaciones.

La presente invención también se refiere a dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas, donde las partículas pueden ser partículas monodispersas. Partícula monodispersa se define en el presente documento como una partícula con una única masa molecular.

El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de la invención comprende adicionalmente varios colorantes fluorescentes o fluorocromos, preferentemente al menos dos colorantes fluorescentes

o fluorocromos, y más preferentemente dos colorantes fluorescentes o fluorocromos.

Las nanopartículas teñidas no se consideran fluorocromos en la presente descripción.

La superficie de las partículas, no el núcleo, se deben teñir en concentraciones definidas. Se puede producir una cierta absorción del colorante radialmente dentro de la superficie de la partícula. Las partículas anteriores hacen posible el conjunto heterogéneo de partículas poliméricas con subconjuntos de partículas que emiten una combinación única de luz fluorescente y que llevan un reactivo de captura particular, por ejemplo, un anticuerpo.

El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de la invención se puede usar para la unión específica de biomoléculas, incluyendo formas nativas y modificadas de polipéptidos y polinucleótidos, y permite el análisis en paralelo de una multitud de analitos. Por ejemplo, se puede valorar en paralelo el estado de fosforilación de una multitud de proteínas por medio de las partículas de la invención y un citómetro de flujo. Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención es el uso del conjunto multicolor de partículas de superficie heterogénea según la invención en análisis multiplex y/o en el ámbito diagnóstico.

Un aspecto adicional de la presente invención es el conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas según la invención para su uso en análisis multiplex y/o para uso diagnóstico.

Un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende el conjunto multicolor de partículas de superficie heterogénea según la invención.

## EJEMPLOS

### 1. Consideraciones generales

#### 1.1 Fijación de un reactivo de captura a las partículas

Esto se lleva a cabo incubando las partículas con la misma concentración de un reactivo de captura. La unión covalente se consigue mejor incubando primero las partículas con un agente de reticulación (Tabla 1). El procedimiento preferido es el uso de la química de la maleimida-tiol. El agente de reticulación heterobifuncional SPDP se fija a las partículas derivadas con grupos amino y el grupo piridildisulfuro se reduce con TCEP o DTT. Se fija un grupo maleimida al reactivo de captura (por ejemplo, un anticuerpo o proteína A o proteína G) mediante la incubación con otro agente de reticulación heterobifuncional tal como SMCC (Tabla 1). A continuación, el reactivo modificado se incubó con las partículas a pH 5.

Alternativamente, los grupos maleimida se pueden añadir a las partículas con el agente de reticulación SMCC. En este caso, la proteína se reduce (modificada con SPDP, o no) con TCEP a pH 5,0 para generar grupos -SH libres. Los resultados son similares. Se han descrito otros tipos de agentes de reticulación homo- y hetero-bifuncionales y se espera que proporcionen resultados similares (Tabla 1).

Por último, proteínas tales como anticuerpos, se pueden unir a las partículas mediante adsorción física. Esto no proporciona un acoplamiento covalente. No obstante, para varias aplicaciones, la unión obtenida por adsorción física es suficientemente estable. Esto se usa de forma rutinaria para acoplar proteínas al látex en ensayos tales como ELISA.

#### 1.2. Codificación por colores

La codificación por colores se lleva a cabo incubando las partículas con concentraciones definidas de formas reactivas de dos o más colorantes fluorescentes. El colorante unido se separa del colorante no unido mediante la centrifugación de las partículas, la eliminación del sobrenadante y las partículas se suspenden en un nuevo tampón. La codificación por colores se puede llevar a cabo después de la unión de un reactivo de captura general tal como IgG anti-ratón. Alternativamente, las partículas se pueden teñir en primer lugar y a continuación se pueden acoplar a un reactivo de captura en algún momento posterior. En la mayoría de los casos son necesarias concentraciones de colorante más elevadas cuando la codificación por colores se lleva a cabo después de la unión de un reactivo de captura.

#### Ejemplo 2

El procedimiento preferido es el uso de derivados maleimida de colorantes. Estos colorantes se unen a los grupos -SH libres que quedan después de la fijación del reactivo de captura (Figura 2). Las combinaciones preferidas son colorantes con grandes diferencias en el espectro de emisión tales como Alexa 647 y Alexa 488. Los colorantes se disuelven a diluciones 1:1,75 en tampón MES a pH 6,0, normalmente que comienza a 100-1000 ng/ml de colorante. Las partículas con grupos -SH libres (véase procedimiento para la fijación de reactivos de captura) se resuspenden en tampón MES a pH 6. Se siguió este procedimiento y el lote primero se separó en 12 alícuotas iguales. Cada una se incubó con una concentración diferente de un colorante de maleimida a 37°C con mezcla frecuente durante 15 minutos y, a continuación, se enfrió a 4°C y se lavó. A continuación cada alícuota se separó en otras 8 alícuotas. Cada una de estas nuevas alícuotas se incubó con concentraciones diferentes del segundo colorante fluorescente. La Figura 6 muestra que se prepararon 96 códigos de color diferentes mediante este procedimiento. La Figura 7 muestra que todas las partículas unen cantidades similares de un reactivo de captura.

**Ejemplo 3**

El procedimiento se puede extender a otras formas reactivas de colorantes fluorescentes. Las formas amino-reactivas tales como los ésteres de N-hidroxi-succinimido (ésteres NHS) se unen a aminas libres sobre el reactivo de captura o a aminas que no se usaron para la fijación del agente de reticulación (Figura 3). La reacción se lleva a cabo a pH 7,4 o superior.

**Ejemplo 4**

El procedimiento se puede extender usando biotina en lugar de un agente de reticulación sobre la partícula (Figura 4). Las partículas se incuban en primer lugar con formas reactivas de biotina, a continuación con concentraciones variables de un conjugado de estreptavidina-fluoróforo tal como estreptavidina-ficoeritrina, y a continuación con concentraciones variables de un segundo conjugado de estreptavidina-fluoróforo, tal como Streptavidin PerCP. Por último, las partículas se hacen reaccionar con concentraciones saturantes de estreptavidina sin marcar. Finalmente las partículas se hacen reaccionar con un reactivo de captura biotinilado.

**Ejemplo 5**

Descripción detallada del procedimiento para generar un multiplex con IgG anti-ratón como agente de captura general

**a. Procedimiento para el acoplamiento de anticuerpos y colorantes a perlas de amina.****Acoplamiento de la proteína:**

Materiales:

Perlas de amina, 7,74  $\mu\text{m}$  o 3,69  $\mu\text{m}$  de Bangs Laboratories. Disolución madre: 10% en sólidos almacenados a 4°C. Las perlas tienen grupos amino libres en la superficie.

Agentes de reticulación: SPDP: un brazo de NHS que reacciona con las perlas de amina, un brazo disulfuro que se puede reducir y proporcionar así grupos -SH libres sobre las perlas.

Sulfo-SMCC: un brazo de NHS que se une a grupos amino sobre los anticuerpos, un brazo maleimida que se une a tioles sobre las perlas. Ambos agentes de reticulación se almacenan a -70°C en DMSO. La concentración de la disolución madre es de 10 mg/ml.

TCEP: agente reductor fuerte, preparar una solución 100 mM en agua antes de cada experimento. (Polvo almacenado a temperatura ambiente, junto con productos químicos secos en nuestro laboratorio). Normalmente se pesan 3 mg en un tubo Eppendorf y se añaden 100  $\mu\text{l}$  de agua, mezclar bien. Tampones: PBS con el 1% de Tween y EDTA 5 mM, MES 100 mM a pH 5,2, MES 100 mM a pH 6 con el 1% de Tween y EDTA 5 mM.

Tubos: tubos de polipropileno de 15 ml, tubos Eppendorf de 1,5 ml.

Geles para el tampón de intercambio de proteínas: Sepharose G50 fina, añadir 3,5 g de polvo a un tubo de 50 ml, completar con cada tampón. Mezclar bien y dejar reposar antes de su uso para evitar burbujas.

Columnas para el tampón de intercambio de proteínas:

Columnas Microspin: se puede tomar 1 ml de gel, uso para muestras con menos de 100  $\mu\text{l}$ ;

Columnas Biospin: se pueden tomar 2 ml de gel, uso para muestras de hasta 200  $\mu\text{l}$ ;

Columnas PD-10: se pueden tomar 10 ml de gel y se utilizan hasta 1,5 ml de muestra.

Uso de las columnas:

Microspin: añadir el gel, colocar la columna sobre un tubo Eppendorf, cortar la tapa, centrifugar en primer lugar durante 10 segundos en la microcentrífuga, desechar el líquido del tubo Eppendorf. Colocar de nuevo la columna sobre el tubo Eppendorf y centrifugar de nuevo durante 30 segundos. La columna está lista para su uso.

Biospin: añadir el gel, colocar la columna sobre un tubo de citometría de flujo, centrifugar durante 5 min a 1600 rpm. Extraer el líquido del tubo sobre vacío. La columna está lista para su uso.

PD-10: Añadir el gel, colocar la columna sobre un tubo Eppendorf dentro de un tubo de 50 ml, centrifugar durante 5 min a 1600 rpm. Desechar los tubos, y colocar la columna en un nuevo Eppendorf/tubo de 50 ml. Ahora está lista para su uso.

Añadir la muestra en el centro del gel. Añadir un 10% más de volumen en la parte superior con el tampón deseado. Centrifugar 5 minutos a 1600 rpm para Biospin y PD10, 30 segundos en microcentrífuga para Microspin. La proteína se encuentra en el tubo en la parte inferior en el nuevo tampón.



**b. Procedimiento para la preparación de una matriz a partir de 1 ml de perlas de amina.**

Parte 1. Acoplamiento de las proteínas a las perlas.

- 5 1. Tomar 0,5 mg de proteína, si está en PBS, usar tal como está, si no: intercambio del tampón en G-50 PBS, añadir 10 µl de disolución madre SMCC por 1 ml de disolución de proteína. Mezclar bien y dejar sobre la poyata durante 30 minutos-1 hora (básicamente hasta que todas las otras etapas de la parte 1 se haya llevado a cabo).
2. Añadir 1,5 ml de perlas de amina a un tubo de 15 ml relleno con 13 ml de PBS-Tween EDTA, centrifugar durante 3 minutos a 1200 rpm.
- 10 2. Desechar el sobrenadante, mezclar bien los sedimentos con agitador magnético y añadir 0,5 ml de PBS-Tween. Resuspender con una pipeta de 1 ml. Ajustar el volumen a 10 ml y añadir 100 µl de disolución madre SPDP, mezclar bien y agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar dos veces con PBS-Tween, ajustar el volumen a 2 ml.
4. Añadir 20 µl de TCEP 100 mM, mezclar bien e incubar durante 15 minutos en un baño de agua a 37°C, agitar cada 5 minutos. Lavar con MES a pH 5,2.
- Resuspender las perlas añadiendo 0,5 ml de MES a pH 5,2 y agitar, ajustar el volumen a 1 ml, sonicar, de una sola vez.
- 15 5. Tampón de intercambio de proteínas en MES a pH 5,2.
6. Disolver la proteína en 5 ml de MES a pH 5,2 para obtener una concentración de 100 µg/ml.

Añadir las perlas a la disolución de anticuerpo y agitar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Después de 24 horas de acoplamiento:

- Lavar las perlas tres veces en MES a pH 5,2
- 20 Resuspender en 1 ml de MES a pH 6
- Proceder con el protocolo de codificación por colores.

**c. Protocolo para la codificación por colores**

Materiales:

- 25 Alexa 488 maleimida, disolución madre de 10 mg/ml en DMSO almacenado a -70°C
- Alexa 647 maleimida, disolución madre de 10 mg/ml en DMSO almacenado a -70°C
- Tampones: MES a pH 6,0 con EDTA 5 mM y Tween 20 al 1%. PBS con EDTA 5 mM y Tween 20 al 1%.
- Tubos: tubos de polipropileno de 15 ml, tubos Eppendorf de 1,5 ml, tubos de titulación de Bio-Rad de 1 ml en formato de placa de 96 pocillos.

**PROCEDIMIENTO**

- 30 Perlas con los grupos tiol activados (véase parte 1 del protocolo) se suspendieron en 1-1,5 ml al 10% de sólidos en MES a pH 6 con EDTA y Tween antes de comenzar.
- Primera parte: hallar la concentración de partida para Alexa 647 (se consumen cantidades variables de grupos -SH cuando se acoplan proteínas, por tanto, primero necesitamos determinar cuánto colorante maleimida tenemos que añadir para conseguir una reducción lineal de la fluorescencia con diluciones seriadas del colorante).
- 35 1. Preparar una disolución de Alexa 647 de 10 µg/ml añadiendo 1 µl de disolución madre a 1 ml de MES a pH 6.
2. Preparar diluciones de 10 veces, es decir, 1 µg, 100 ng, 10 ng y 1 ng, en tubos Eppendorf.
3. Añadir 1 µl de la suspensión de perlas a cada tubo, incubar durante 10 minutos en baño de agua, mezclar al menos dos veces durante el periodo de incubación.
4. Centrifugar los tubos, añadir MES y realizar la citometría de flujo.
- 40 5. Seleccionar la concentración de partida para Alexa 647 que se debe usar sobre las partículas. La concentración de partida debe ser la más elevada, cuando se puede esperar una señal lineal. Así, si hay una diferencia de 10 veces en la fluorescencia de 0,1 y 1 µg, y sólo de 2 veces entre 1 y 10 µg, la señal lineal comienza a 1 µg. Habitualmente, ir un poco más abajo, por ejemplo, a 200 ng.

Segunda parte: Determinar exactamente qué concentraciones son útiles para la codificación por colores.

6. Preparar 16 tubos de 15 ml. Etiquetarlos entre 1 y 20. Añadir 14 ml de MES a pH 6 al primer tubo con una pipeta de 50 ml y 6 ml al resto.
  7. Ajustar la concentración de Alexa 647 del tubo 1 a la concentración de partida seleccionada.
  - 5 8. Añadir 8 ml del tubo 1 al tubo 2, poner el tapón y mezclar bien.
  9. Repetir esto para el tubo 15, dejar el tubo 16 sin colorante. Dejar los tubos en hielo mojado.
  10. Añadir 1  $\mu$ l de la suspensión de perlas a cada uno de los 16 tubos Eppendorf de 1,5 ml.
  11. Añadir 100  $\mu$ l de cada dilución del colorante a cada tubo. Mezclar bien e incubar durante 15 minutos a 37°C, mezclando cada 5 minutos.
  - 10 12. Realizar la citometría de flujo.
  13. Seleccionar 11 concentraciones diferentes que proporcionan señales de fluorescencia que se pueden resolver y un blanco.
  14. Asegurarse de que las perlas están suspendidas en al menos 1250  $\mu$ l. Añadir 100  $\mu$ l a cada uno de los 12 tubos de 15 ml seleccionados. Mezclar el tubo inmediatamente después de añadir las perlas.
  - 15 15. Colocar los tubos en un baño de agua a 37°C. Mezclar cada 5 minutos, incubar durante 20 minutos.
  16. Colocar los tubos en agua helada, dejar durante 5 minutos para que se enfríen. Centrifugar en una centrífuga refrigerada a 4°C.
  17. Lavar dos veces en MES a pH 6. Resuspender en 900  $\mu$ l de MES a pH 6.
- Las perlas ya se pueden dejar en el frigorífico durante toda la noche, si es necesario.
- 20 Segundo colorante: Normalmente Alexa 488 maleimida.
  1. Preparar una disolución de 10  $\mu$ g/ml de Alexa 488 maleimida en MES a pH 6 añadiendo 1  $\mu$ l de una disolución madre a 1 ml de tampón en un tubo Eppendorf. Hacer cuatro diluciones de 10 veces, es decir, 1  $\mu$ g, 100 ng, 10 ng, y 1 ng.
  2. Preparar una mezcla de las 12 perlas que se marcaron con Alexa 647 añadiendo 10  $\mu$ l de cada una a un tubo Eppendorf.
  - 25 3. Ajustar el volumen a 200  $\mu$ l.
  4. Añadir 10  $\mu$ l a cada una de las 4 diluciones de Alexa 488 en tubos Eppendorf, mezclar y poner en un baño de agua durante 15 minutos con agitación cada 5 minutos.
  5. Centrifugar, resuspender en MES a pH 6 y realizar FACS, hallar la dilución de partida para Alexa 488 (véase sección previa para Alexa 647).
  - 30 6. Preparar 15 tubos de 15 ml. Añadir 15 ml de MES al primer tubo y 5 ml al resto.
  7. Ajustar el Alexa 488 a la concentración de partida en el primer tubo.
  8. Tomar 10 ml y añadirlo al tubo nº 2 y proseguir hasta el tubo 15.
  9. Dejar los tubos en hielo.
  10. Añadir cada una de las 12 alícuotas de perlas de Alexa 647 a tubos de titulación, colocar los tubos 1, 3, 5, 7, 9, 11 en la primera placa y los tubos 2, 4, 6, 8, 10, 12 en la segunda. A esto se denomina filas (es decir, todos los tubos de cada fila tiene la misma concentración de Alexa 647).
  - 35 11. Rellenar las filas hasta un total de 8 columnas en cada placa.
  11. Usando una pipeta de 8 vías, tomar 50  $\mu$ l y añadir a cada uno de los 8 tubos de titulación de la placa.
  12. Dejar las placas en hielo.
  - 40 13. Usando un repetidor Eppendorf, añadir 500  $\mu$ l de dilución de Alexa 488 maleimida enfriada en hielo a cada uno. Dilución de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 para la primera placa, diluciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y blanco para la segunda.
  14. Agitar los tubos individualmente, volver a ponerlos en hielo después de la agitación.

15. Poner las placas en una caja de espuma de poliestireno con agua a 37°C en el fondo de manera que el interior de la placa esté rellena de agua (¡con cuidado!).

16. Mezclar los tubos de manera casi continua durante 15 minutos. Tener cuidado para no derramar.

5 17. Después de 15 minutos, centrifugar las placas y lavar cuatro veces con MES frío. Finalmente resuspender en PBS-Tween (determinaremos si es útil añadir NEM 1 mM durante la última etapa de lavado con MES para inactivar los sulfhidrilos libres).

### Ejemplo 6

10 Se pueden usar partículas acopladas a anticuerpos para detectar diferencias en la expresión de proteínas entre células cancerígenas y células normales. Esta aplicación podría tener utilidad diagnóstica, por ejemplo, en la detección de proteínas oncogénicas reguladas hacia arriba en células cancerígenas.

### Cuantificación de los niveles de proteína

15 Lisados celulares procedentes de la línea celular de eritroleucemia (K562) y leucocitos normales se marcaron con formas amino-reativas de biotina y digoxigenina, respectivamente. Los lisados se mezclaron y se incubaron con una mezcla de partículas codificadas por colores que estaban acopladas con anticuerpos a proteínas celulares. La representación de la izquierda en la Figura 10 ilustra la unión de moléculas marcadas procedentes de los dos tipos celulares a una partícula. En este caso, los leucocitos (gris) expresan la proteína dos veces más que las células leucémicas (gris oscuro). La gráfica de la citometría de flujo junto a las representaciones de los datos de la Figura 10 se obtuvo con anticuerpos para marcadores superficiales de leucocitos (los dos diagramas de la izquierda). Las partículas que capturan principalmente proteínas de las células leucémicas están representadas como puntos de color gris oscuro, mientras que las que las capturan de leucocitos son grises. Las posiciones de la matriz se muestran a la derecha de la Figura 10. Los dos diagramas a la derecha de la Figura 10 muestran un análisis similar para anticuerpos para la señalización de proteínas. Los puntos de color gris claro representan partículas que unen proteínas de los dos tipos celulares.

### Análisis de complejos moleculares y de proteínas de fusión.

25 La detección de complejos moleculares puede tener utilidad diagnóstica, por ejemplo, al revelar vías de señalización celular desreguladas.

30 Primero se incubó una mezcla de partículas con anticuerpos para la señalización de proteínas con proteínas celulares sin marcar y a continuación se marcó con anticuerpos para la proteína adaptadora grb-2 (representación en la Figura 11). El anticuerpo anti-grb-2 se une a partículas que hayan capturado grb-2 directamente con un anticuerpo específico o indirectamente mediante moléculas que se asocian a grb-2. La medición de la citometría de flujo mostró que la grb-2 estaba asociada a 6 de 96 proteínas (poblaciones a la derecha de la gráfica en la Figura 11), entre éstas se encuentran la SHC, la PI3-quinasa y la paxilina, todas conocidas por estar asociadas a la grb-2. Se puede usar el mismo principio para detectar proteínas de fusión tales como la proteína de fusión bcr-abl en leucemia mieloide crónica. Esto demuestra que las asociaciones de proteínas se pueden analizar mediante el uso de partículas codificadas por colores.

### 35 Análisis de fosforilación de proteínas

40 La fosforilación de proteínas desempeña un papel clave en la biología celular y es fundamental para el crecimiento de las células cancerígenas. La Figura 12 muestra la unión de un anticuerpo anti-fosfotirosina (eje de abscisas) a partículas codificadas por colores que se incubaron en primer lugar con un lisado de células de eritroleucemia K562 estimuladas. Las poblaciones de partículas que se muestran a la derecha de la línea vertical capturan proteínas que estaban fosforiladas sobre la tirosina. Las moléculas incluyen varias tirosina-quinasas conocidas (c-abl, lck, ntk, yes, fak).

### Verificación de que las señales de partículas representan las dianas de los anticuerpos previstas sobre las moléculas

45 Partículas codificadas por color con anticuerpos para proteínas superficiales de leucocitos se incubaron con lisados de leucocitos marcados por fluorescencia. Las partículas se sometieron a ebullición y las proteínas capturadas se resolvieron por SDS-PAGE. El gel se analizó con un escáner de fluorescencia. Los resultados muestran bandas únicas con pesos moleculares que corresponden a las dianas de los anticuerpos previstas (Figura 13). Estos resultados demuestran que la tecnología mide correctamente las dianas de los anticuerpos previstas.

Tabla 1

## Química del agente de reticulación homobifuncional

Acronimo	N° Prod.	Longitud del brazo (Å)	Enlaces	Escindible por	Soluble en agua	Membrana permeable
EGS	<u>21565</u>	16.1 Å	Aminas a aminas	Hidroxilamina	no	si
Sulfo-EGS	<u>21566</u>	16.1 Å	Aminas a aminas	Hidroxilamina	si	no
BSOCOES	<u>21600</u>	13 Å	Aminas a amini		no	si
DSP	<u>22585</u>	12 Å	AminaBase a aminas	Tioles	no	si
DTSSP	<u>21578</u>	12 Å	Aminas a aminas	Tioles	si	no
DTBP	<u>20665</u>	11.9 Å	Aminas a aminas	Tioles	si	si
DSS	<u>21555</u>	11.4 Å	Aminas a aminas	no	no	si
BS <sup>2</sup>	<u>21580</u>	11.4 Å	Aminas a aminas	no	si	no
DMS	<u>20700</u>	11 Å	Aminas a aminas	no	si	si
DMP	<u>21666</u>	9.1999998 Å	Aminas a aminas	no	si	si
DMA	<u>20663</u>	8.6000004 Å	Aminas a aminas	no	si	si
DSG	<u>20593</u>	7.6999998 Å	Aminas a aminas	no	no	si
MSA	<u>22605</u>	7.1999998 Å	Aminas a aminas	no	no	si
Sulfo-DST	<u>20591</u>	6.4000001 Å	Aminas a aminas	Peryodato	si	no
DST	<u>20589</u>	6.4000001 Å	Aminas a aminas	Peryodato	no	si
DFDNB	<u>21525</u>	3 Å	Aminas a aminas	no	no	si

## Química del tiol-maleimida

Acronimo	N° Prod.	Longitud del brazo (Å)	Enlaces	Escindible por	Soluble en agua	Membrana permeable
SMPT	<u>21558</u>	20 Å	Aminas a sulfhidrilos	Tioles	no	si
Sulfo-LC-SMPT	<u>21568</u>	20 Å	Aminas a sulfhidrilos	Tioles	si	no
LC-SMCC	<u>22362</u>	16.1 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
KMUA	<u>22211</u>	15.7 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	nd
Sulfo-KMUS	<u>21111</u>	15.7 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
Sulfo-LC-SPDP	<u>21650</u>	15.6 Å	Aminas a sulfhidrilos	Tioles	si	no
LC-SPDP	<u>21651</u>	15.6 Å	Aminas a sulfhidrilos	Tioles	no	si
SMPB	<u>22416</u>	14.5 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
Sulfo-SMPB	<u>22317</u>	14.5 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	no
SMPH	<u>22363</u>	14.3 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	nd
Sulfo-SMCC	<u>22322</u>	11.6 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
SMCC	<u>22360</u>	11.6 Å	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si

SIAB	<u>22329</u>	10.6 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
Sulfo-SIAB	<u>22327</u>	10.6 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
Sulfo-GMBS	<u>22324</u>	10.2 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
GMBS	<u>22309</u>	10.2 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
MBS	<u>22311</u>	9.8999996 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
Sulfo-MBS	<u>22312</u>	9.8999996 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
Sulfo-EMCS	<u>22307</u>	9.3999996 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
EMCA	<u>22306</u>	9.3999996 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
EMCS	<u>22308</u>	9.3999996 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
BMPS	<u>22298</u>	6.8000001 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	nd
SPDP	<u>21857</u>	6.8000002 A	Aminas a sulfhidrilos	Tioles	no	si
SBAP	<u>22339</u>	6.1999998 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
BMPA	<u>22296</u>	5.9000001 A	Aminas a sulfhidrilos	no	si	no
AMAS	<u>22295</u>	4.4000001 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	no
SATP	<u>26100</u>	4.0999999 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	si
SIA	<u>22349</u>	1.5 A	Aminas a sulfhidrilos	no	no	nd

#### Química de la carbonildiimida

Acronimo	N° Prod.	Longitud del brazo (A)	Entlaces	Escindible por	Soluble en agua	Membrana permeable
AEDP	<u>22101</u>	9.5 A	Aminas a carboxilos	Tioles	si	no
EDC	<u>22980</u>	0 A	Aminas a carboxilos	no	si	no

#### Química de fotoafinidad

Acronimo	N° Prod.	Longitud del brazo (A)	Entlaces	Escindible por	Soluble en agua	Membrana permeable
SASD	<u>27716</u>	18.9 A	Aminas a no selectivo	Tioles	si	no
SAND	<u>21549</u>	18.5 A	Aminas a no sele	no	si	no
SANPAH	<u>22600</u>	18.200001 A	Aminas a no sele	Tioles	no	si
Sulfo-SANPAH	<u>22589</u>	18.200001 A	Aminas a no selectivo	no	si	no
Sulfo-NHS-LC-ASA	<u>27735</u>	18 A	Aminas a no selectivo	no	si	no
SADP	<u>21533</u>	13.9 A	Aminas a no selectivo	Tioles	no	si
Sulfo-SADP	<u>21553</u>	13.9 A	Aminas a no selectivo	Tioles	si	no
Sulfo-HSAB	<u>21563</u>	9 A	Aminas a no selectivo	no	si	no
NHS-ASA	<u>27714</u>	8 A	Aminas a no selectivo	no	no	si
ANB-NOS	<u>21451</u>	7.6999998 A	Aminas a no selectivo	no	no	no
TFCS	<u>22299</u>	7.6999998 A	Aminas a no selectivo	no	si	nd

Sulfo-SBED	33033	A	Aminas a no selectivo	Tioles	si	no
SPB(NHS-Psoralen)	23013	A	Aminas a no selectivo	no	no	si

**Química de la hidracina-benzaldehído**

SANH
SHTH
SFB

Conversión de aminas a aldehídos  
 Conversión de aminas a aldehídos  
 Conversión de aminas a benzaldehídos

**Química de la biotina**

Derivados de Biotina
Biotina-NHS
Biotina-maleimida
Éster de Biotina-TFP
Biotina-BMCC
Biotina-HPDP
Biotina activada por PEO-Maleimida
Yodoacetil-LC-Biotina
PEO-yodoacetil-Biotina

Sulfhidrilo	32.599998A	no	no	si
Sulfhidrilo	29.200001A	si	no	si
Sulfhidrilo	29.1A	no	si	no
Sulfhidrilo	27.1A	no	no	si
Sulfhidrilo	24.700001A	no	si	no

Nombre del producto	Reactividad química	Longitud del brazo	Escindible	Soluble en agua	Membrana permeable
Biotina-PEO-LC-Amina	Carboxilo	22.9A	no	si	no
Biotina-PEO-Amina	Carboxilo	20.4A	no	si	no
5-(Biotinamido)-pentilamina	Carboxilo	A	no	si	no

**Tabla 2: Fluorocromos usados habitualmente**

Excitable por luz UV/violeta Excitable a 488 Excitable a 532 (YAG)	Alexa 350, Alexa 405, Alexa 430, cascade blue, cascade yellow, fluoresceína, alexa 488, bodipy, R-Phycoerythrin, PerCP, Cy3, Alexa 547, dylight 547, R-phycoerythrin, B-phycoerythrin, Oyster 550, Oyster 556, Atto 520, Atto 532, atto
Excitable a 595 (Krypton) Excitable a 633	Texas red, Alexa 610, Cy5, Cy5.5, Alexa 610, Alexa 633, Alexa 647, Alexa 680, Allophycocyanin, Oyster 645, Oyster 650, Oyster 656
Excitable por luz infrarroja	Alexa 700, Alexa 750, atto 680,
Conjugados en tándem de PE y APC excitables a 488 excitables a 633	(PE = ficoeritrina, APC = alofococianina)  PE-Cy5, PE, Cy5.5, PE Alexa 610, PE Texas red, PE-Alexa 680, PE Alexa 633, PerCP Cy5-5  APC, APC-Cy7,
Conjugados en tándem de colorantes Alexa excitables a 488	DyeMer 488-605, DyeMer 488-615, DyeMer 488-630
Puntos cuánticos	Lake placid Blue, Adirondack green, Catskill green, Hops Yellow, Birch Yellow, Fort Orange, Adams Apple red

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas con subconjuntos de partículas que emiten una combinación única de luz fluorescente y que llevan un reactivo de captura particular; teñidas con al menos dos colorantes fluorescentes; donde se pueden resolver al menos 16 subconjuntos de partículas basándose en la emisión variable de los al menos dos colorantes fluorescentes, donde la emisión de al menos un colorante procede de un colorante fluorescente unido covalentemente a la superficie de la partícula; todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas pueden unir una cantidad uniforme de un reactivo de captura; los colorantes fluorescentes se seleccionan del grupo constituido por excitables por luz UV/violeta, excitables a 488 nm, excitables a 532 nm (YAG), excitables a 595 nm (Krypton), excitables a 633 nm, excitables por luz infrarroja, conjugados en tándem de PE y APC excitables a 488 nm y a 633 nm, conjugados en tándem de colorantes reactivos (por ejemplo, colorantes Alexa) excitables a 488 nm y/o puntos cuánticos; y todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas están marcadas uniformemente con un reactivo de captura; con la condición de que los colorantes fluorescentes no sean nanopartículas coloreadas; donde dichas partículas primero se tiñen y a continuación se acoplan a un reactivo de captura en un momento posterior.
2. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de la reivindicación 1, en donde los colorantes se unen en concentraciones definidas.
3. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho al menos un colorante fluorescente que está unido covalentemente a la superficie de la partícula está unido covalentemente a través de un agente de reticulación bifuncional o directamente a cada partícula.
4. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde todas las partículas en dicho conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas contienen suficientes sitios de unión para la unión covalente uniforme del reactivo de captura.
5. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de la reivindicación 1, en donde el reactivo de captura está unido covalentemente a través de un agente de reticulación bifuncional o directamente a cada partícula.
6. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho reactivo de captura es una proteína o un ácido nucleico.
7. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas según la reivindicación 6, en donde dicha proteína es una molécula basada en anticuerpos.
8. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tamaño de cada partícula es inferior a 100 µm de diámetro.
9. El conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las partículas son partículas monodispersas.
10. El uso del conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en análisis multiplex.
11. El uso del conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el campo del diagnóstico.
12. Un kit que comprende un conjunto heterogéneo de superficie multicolor de partículas poliméricas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

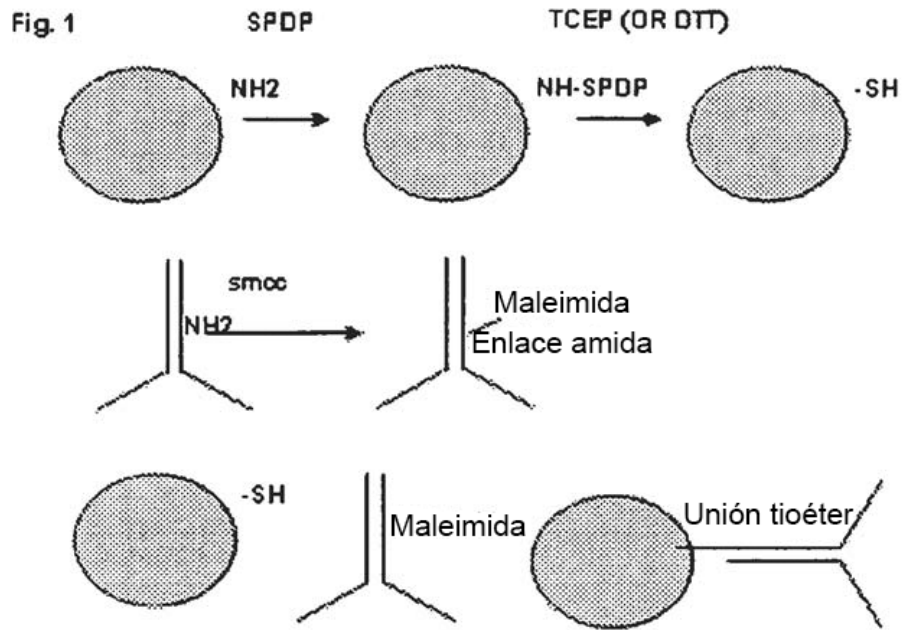




Fig. 2

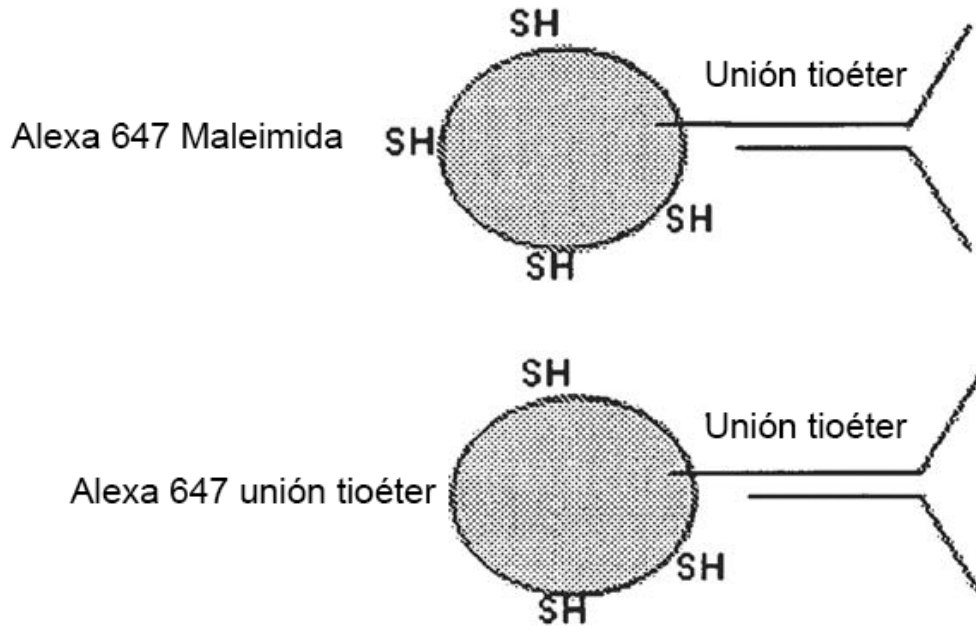
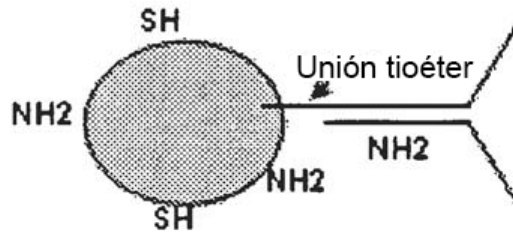


Fig. 3



Alexa 647 NHS

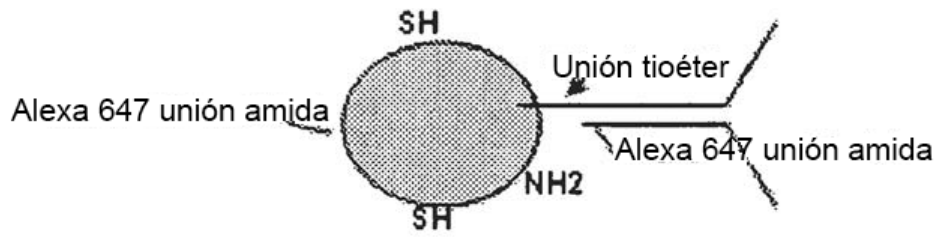


Fig. 4

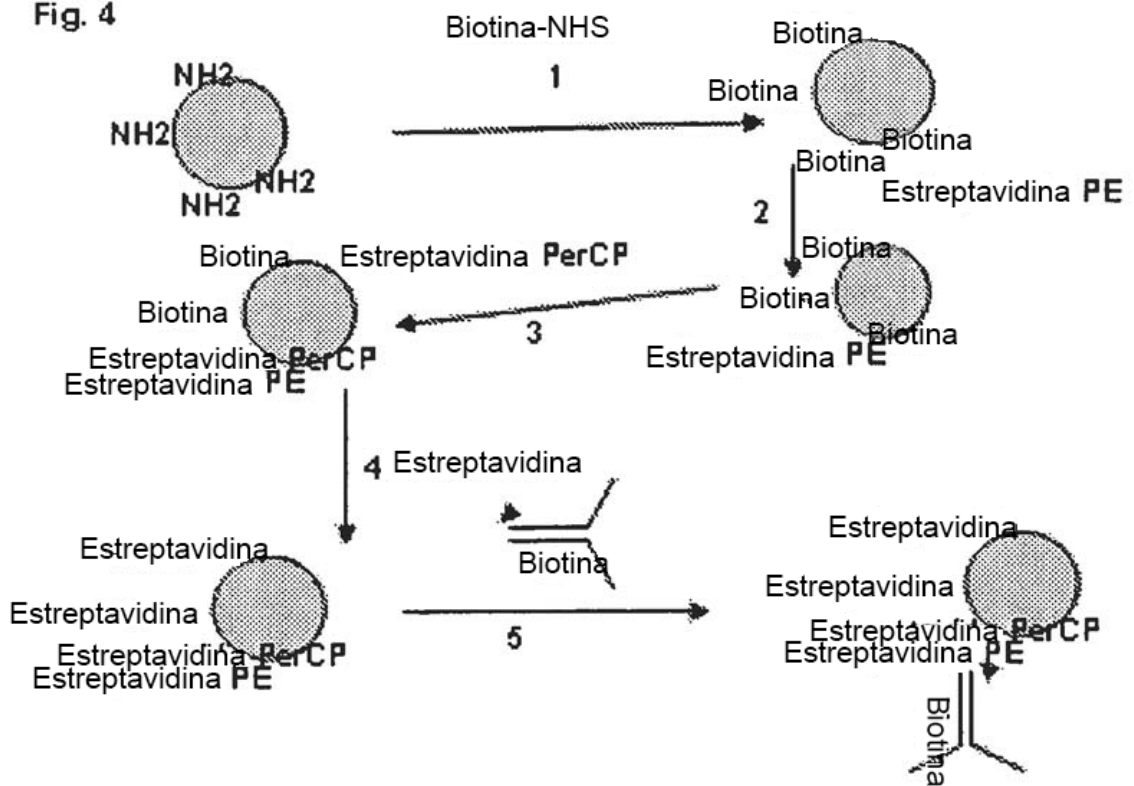


Figura 5

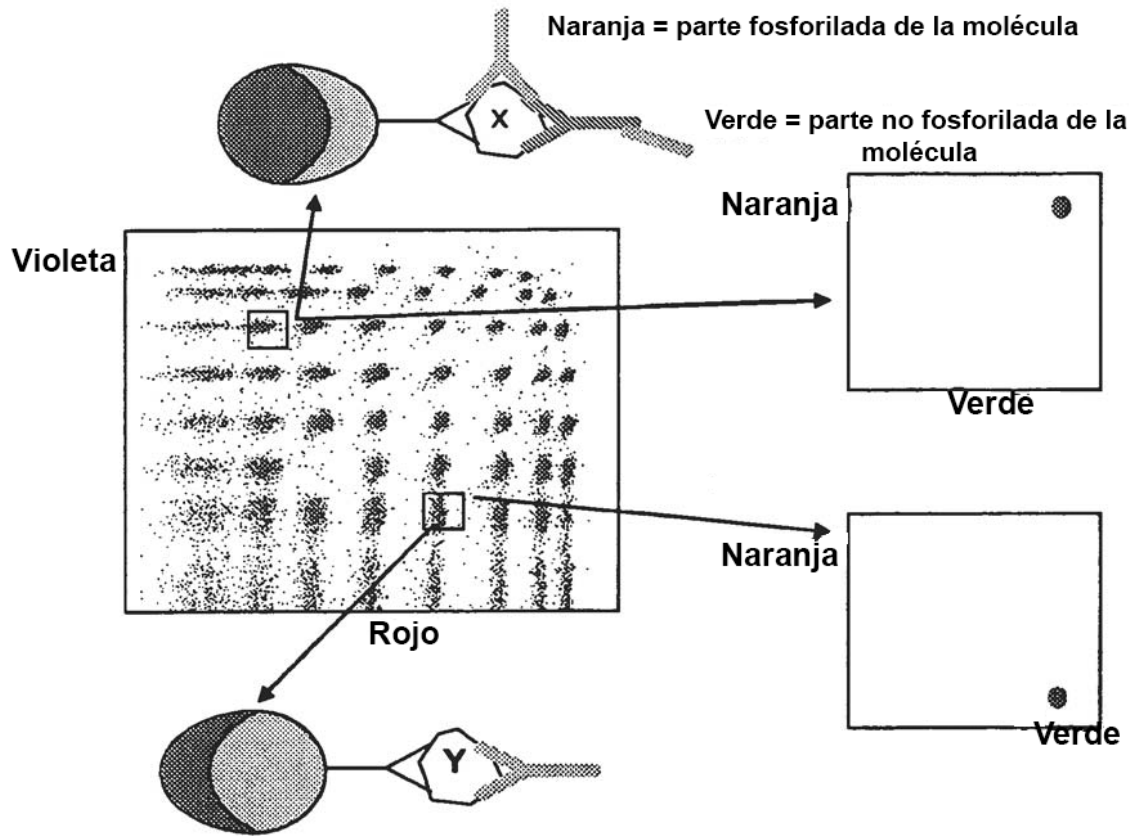


Figura 6

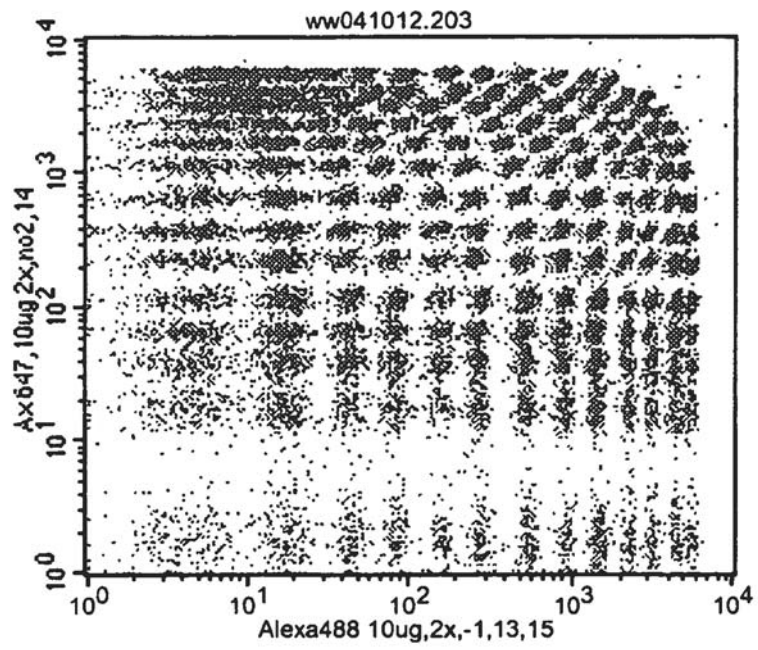


Figura 7

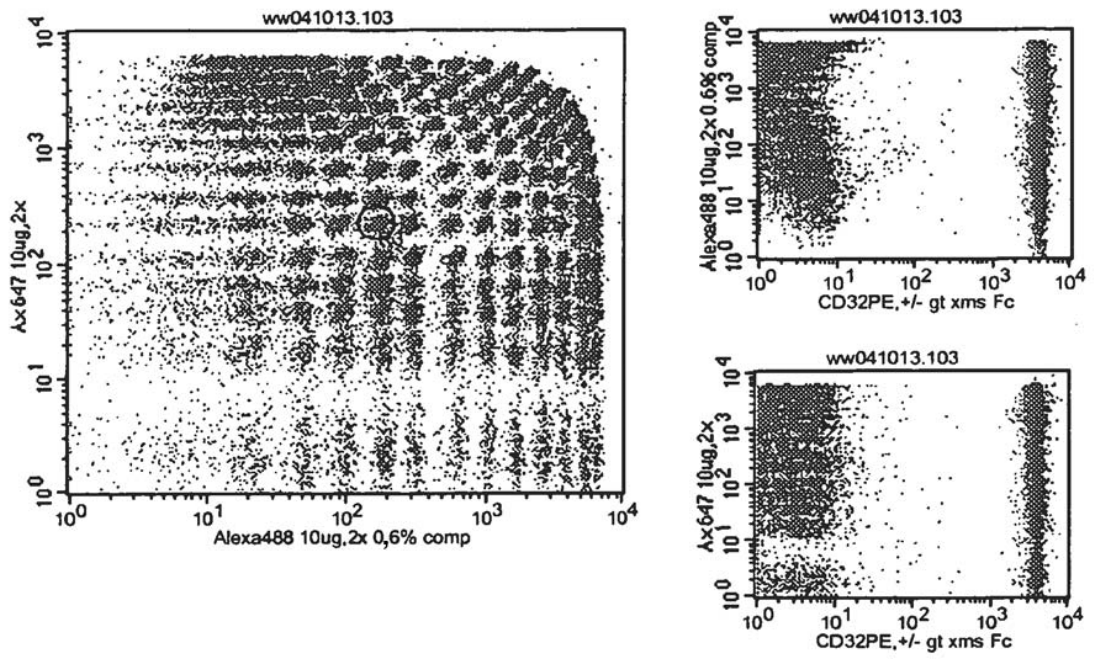


Figura 8

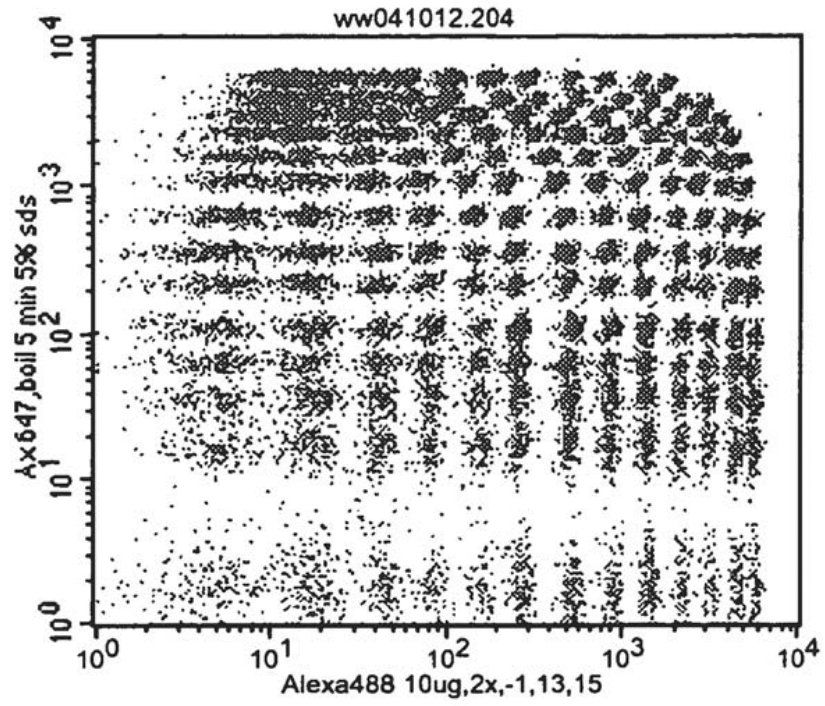


Figura 9

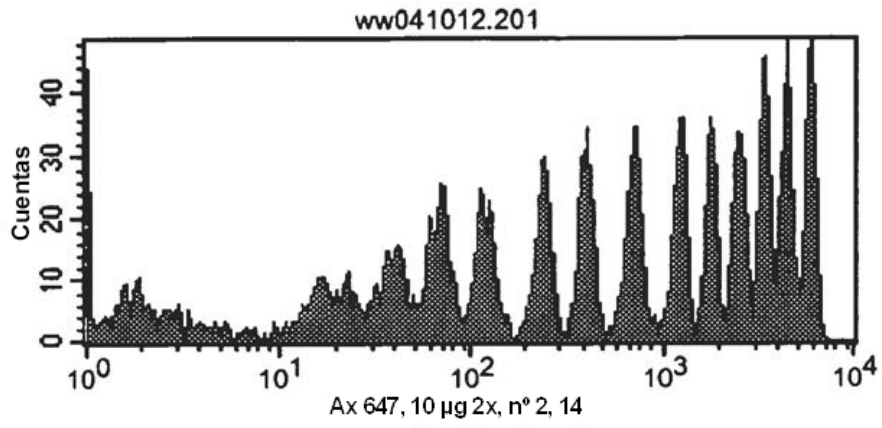




Figura 10



Figura 11

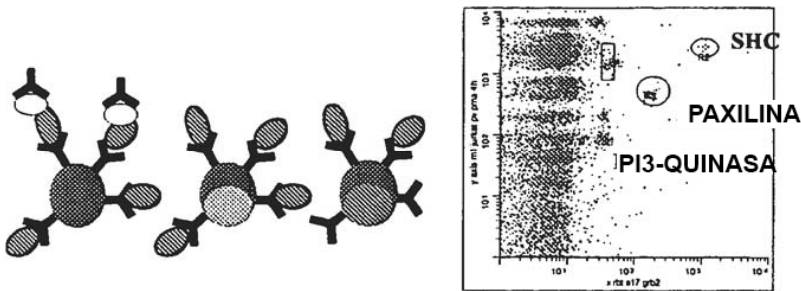
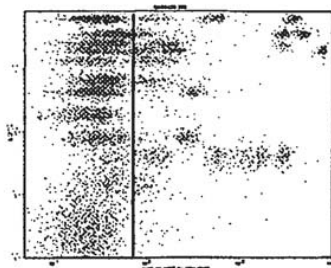


Figura 12



**Figura 13**

