

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 529**

51 Int. Cl.:

H01F 1/11 (2006.01)

H01F 1/06 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10171044 .0**

96 Fecha de presentación: **19.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2244270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2010**

54 Título: **Microesferas con propiedades fluorescentes y magnéticas**

30 Prioridad:
20.01.2005 US 645549 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

73 Titular/es:
LUMINEX CORPORATION (100.0%)
12212 Technology Boulevard
Austin TX 78727, US

72 Inventor/es:
CHANDLER, DON J. y
BEDRE, JASON

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 529 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

Microesferas con propiedades fluorescentes y magnéticas

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de las microesferas para su uso en aplicaciones basadas en la fluorescencia. Determinadas formas de realización se refieren a una microesfera que incluye un material magnético acoplado a una superficie de una microesfera central y a una capa de polímero que rodea el material magnético y la microesfera central. En particular, la invención se refiere a una microesfera de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1, al uso de dicha microesfera y a un procedimiento para formar dichas microesferas.

10 2. Descripción de la técnica relacionada

La descripción y los ejemplos que siguen no se consideran como técnica anterior en virtud de su inclusión en la presente sección.

15 Las microesferas magnéticas son utilizadas en la actualidad en una amplia variedad de aplicaciones entre las que se incluyen: el tratamiento hipertérmico de tumores; la administración dirigida de sustancias terapéuticas sobre zonas seleccionadas en sistemas de seres vivos; el aislamiento de células, polinucleótidos y de proteínas; el análisis químico de biomoléculas. Las microesferas indicadas para dichos fines se encuentran disponibles en diversas fuentes comerciales en una pluralidad de configuraciones diferentes. Estas microesferas a menudo incluyen una sustancia magnéticamente susceptible y un material matricial esférico, como por ejemplo un polímero orgánico o sílice. Las microesferas pueden presentar diversas configuraciones, como por ejemplo un núcleo magnético rodeado por una matriz; pequeñas partículas magnéticas dispersas por toda la matriz; y un revestimiento magnético dispuesto sobre el exterior de una matriz esférica. Cada una de estas configuraciones microesféricas presenta ventajas e inconvenientes, y la selección de la configuración apropiada depende del uso final de las microesferas.

25 En muchas aplicaciones, las microesferas de referencia muestran paramagnetismo o superparamagnetismo, más que ferromagnetismo. Dichas microesferas presentan un magnetismo desdeñable en ausencia de un campo magnético, pero la aplicación de un campo magnético induce a la alineación de los dominios magnéticos dentro de las microesferas, lo que se traduce en la atracción de las microesferas hacia la fuente del campo. Cuando el campo es suprimido, los dominios magnéticos vuelven a una orientación aleatoria de forma que no hay atracción o repulsión magnética interparticular. En el caso del superparamagnetismo, este retorno a la orientación aleatoria de los dominios es casi instantánea, mientras que los materiales paramagnéticos retendrán la alineación de los dominios durante algún tiempo después de la supresión del campo magnético. Esta retención de la alineación de los dominios puede conducir a una agregación de las microesferas en ausencia de un campo magnético externo, lo cual a menudo no es deseable. Los materiales ferromagnéticos presentan unos dominios permanentemente alineados, de manera que las microesferas que incluyen dichos materiales magnéticos fácilmente se agregarán.

35 El material matricial asociado con el material magnético varía también dependiendo del destino final de las microesferas, siendo el sílice y el látex de polímero los materiales matriciales más habitualmente utilizados. Ambos materiales pueden ser utilizados para crear microesferas magnéticas sustancialmente uniformes en una amplia gama de diámetros. Las microesferas magnéticas de sílice son a menudo más rentables en una gama más amplia de temperaturas que las microesferas hechas de polímeros orgánicos como por ejemplo polistireno, y ambos materiales se pueden descomponer en determinados entornos, como por ejemplo disolventes ácidos o aromáticos. Así mismo, las microesferas de sílice son a menudo más densas que las microesferas de látex, lo cual puede constituir un factor importante en la elección de las matrices de las microesferas magnéticas.

40 Un uso considerable y en aumento de las microesferas magnéticas es el desarrollado en el campo de los ensayos biológicos. Los ensayos de proteínas y de oligonucleótidos pueden llevarse a cabo sobre la superficie de las microesferas, las cuales pueden, a continuación, ser separadas magnéticamente de la mezcla de reacción antes de que se midan las características de las microesferas. El aislamiento de las microesferas de ensayos antes de la medición reduce la interferencia de las moléculas no seleccionadas como objetivo produciendo de esta manera unas mediciones con unos resultados más precisos.

45 Paralelamente con el interés en auge en las microesferas magnéticas para ensayos biológicos, encontramos el desarrollo de ensayos llevados a cabo en microesferas fluorescentes. El uso de marcas fluorescentes o de material fluorescente acoplado a una superficie de las microesferas o incorporado dentro de las microesferas hace posible la preparación de numerosos conjuntos de microesferas que pueden ser distinguidos en base a los diferentes espectros de la emisión de los tintes y / o a la intensidad de las señales. En un ensayo biológico, la fluorescencia y la difusión de la luz de estas microesferas pueden ser medidas por un citómetro de flujo o por un sistema de formación de imágenes, y los resultados de la medición pueden ser utilizados para determinar el tamaño y la fluorescencia de las microesferas así como la fluorescencia asociada con el sistema del ensayo que está siendo estudiado (por ejemplo, un anticuerpo marcado de modo fluorescente dentro de un ensayo de "sándwich de captura"), tal y como se describe en la Patente estadounidense No. 5,948,627 de Lee et al.

Mediante la modificación de las concentraciones de los múltiples tintes incorporados en las microesferas, cientos, o incluso miles de conjuntos de microesferas distinguibles pueden ser obtenidos en un ensayo, pudiendo cada conjunto de microesferas ser asociado con un objetivo diferente, haciendo posible con ello se lleven a cabo numerosas pruebas respecto de una sola muestra dentro de un único recipiente, tal y como se describe en la Patente estadounidense No. 5,981,180 de Chandler et al.

Las microesferas distinguibles por su fluorescencia pueden ser mejoradas haciendo que estas microesferas sean magnéticamente sensibles.

Ejemplos de procedimientos para la formación de microesferas magnéticas fluorescentes se describen en la Patente estadounidense No. 6,283,079 de Wang et al. Los procedimientos descritos por Wang et al. incluyen el revestimiento de una microesfera central fluorescente con magnetita y un polímero general o la mezcla de una microesfera central con magnetita, con monómeros polimerizables y el inicio de una polimerización para obtener una microesfera revestida. Estos procedimientos constituyen unos sistemas relativamente sencillos relacionados con la síntesis de microesferas magnéticas fluorescentes, pero no son adecuados para la creación de grandes números de microesferas teñidas con precisión utilizadas en análisis en múltiplex como los descritos en la Patente estadounidense No. 5,981,180 de Chandler et al.

Esta limitación de los procedimientos de Wang et al. es debida al hecho de que la mayoría de las moléculas de tinción fluorescentes son extremadamente sensibles al ataque por parte de especies radicales generadas durante las polimerizaciones de iniciación por radicales. Si estos radicales desactivan incluso un número relativamente pequeño de moléculas de tinción no pueden conseguirse cantidades precisas de tinte dentro de las microesferas. Así mismo, si los procedimientos de Wang et al. son utilizados para sintetizar microesferas magnéticas no fluorescentes, y la tinción de las microesferas se intenta utilizando el procedimiento de hinchado en un disolvente descrito en la patente estadounidense No. 6,514,295 de Chandler et al., se liberará de las microesferas una cantidad relativamente considerable del material magnético durante la tinción, dado que el material magnético no queda típicamente ligado con las microesferas. En particular, el atrapamiento físico del material magnético de las microesferas resultará alterado por el proceso de hinchado, y el material magnético será liberado dentro de la solución.

Las microesferas magnéticas fluorescentes, se describen, así mismo, en la Patente estadounidense No. 6,268,222 de Chandler et al.. En este procedimiento, unas nanoesferas están acopladas a una microesfera central polimérica y los materiales fluorescentes y magnéticos están asociados, o bien con la microesfera central o con las nanoesferas. Este procedimiento produce unas microesferas con unas características deseables, pero la unión de nanoesfera - microesfera puede ser susceptible de descomposición bajo condiciones de reacción severas. Un revestimiento que rodea las microesferas y la nanoesfera unidas a aquella puede ser utilizado para mejorar esta asociación pero, una vez más, el uso de los iniciadores radicales para formar este revestimiento puede comprometer el perfil de la emisión de fluorescente de la microesfera.

Una configuración más conveniente de una microesfera magnética fluorescente es una microesfera magnéticamente sensible que puede ser teñida utilizando técnicas establecidas, como por ejemplo las descritas en la Patente estadounidense No. 6,514,295 de Chandler et al. En general, este procedimiento utiliza disolventes para hinchar la microesfera permitiendo de este modo la migración del material fluorescente dentro de la microesfera. Estos disolventes de tinción incluyen uno o más disolventes orgánicos. Por tanto, las microesferas deben ser capaces de tolerar los disolventes orgánicos sin perder su integridad compositiva. Así mismo, la magnetita libre interfiere con una serie de reacciones biológicas. Por tanto, las microesferas que son susceptibles de pérdida de incluso una cantidad relativamente pequeña de magnetita no son aceptables. En cuanto tales, las microesferas magnéticas deben estar estructuradas de tal manera que el material magnético esté firmemente unido a las microesferas impidiendo de esta manera la pérdida del material magnético durante el proceso de hinchado.

Las microesferas magnéticas se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 5,091,206 de Wang et al., 5,648,124 de Sutor, y 6,013,531 de Wang et al. Sin embargo, las microesferas obtenidas mediante los procedimientos divulgados en estas patentes de Wang et al. pueden perder material magnético cuando se disponen dentro de disolventes orgánicos, dado que el material magnético no está químicamente inmovilizado. En cada una de estas patentes, las partículas esencialmente pequeñas de material magnético están revestidas sobre una microesfera central polimérica, con una carcasa polimérica como revestimiento exterior. Las partículas magnéticas son sintetizadas y procesadas para reducir al mínimo el tamaño de las partículas. Algunos materiales magnéticos, como por ejemplo el Fe_3O_4 , evolucionan del ferromagnético al paramagnético y al superparamagnético a medida que se reduce el tamaño de las partículas. Por tanto, las partículas de magnetita que presentan el tamaño más pequeño posible fueron utilizadas para formar las microesferas, de tal manera que la microesfera de producto muestre escasa retentividad magnética.

Sin embargo, si la microesfera de producto está, así mismo, configurada para emitir una señal fluorescente a partir de las sustancias de tinción en la microesfera central, el grosor de la capa de partículas magnéticas dispuestas sobre la superficie del núcleo de la microesfera constituye un factor importante. Por ejemplo, dado que la mayoría de las sustancias magnéticas son opacas desde el punto de vista óptico, un revestimiento relativamente grueso de partículas magnéticas sobre la superficie del núcleo de la microesfera provocará una difusión o bloqueo de luz

excesivo de transmisión de fotones. Utilizando los procedimientos de estas patentes, en los cuales el componente magnético está diseñado para que presenta el tamaño de partícula mínimo, el contenido magnético tendría que ser limitado para permitir la transmisión de la luz a través del componente magnético. De hecho, para poder contar con una microesfera magnética que presente un diámetro de 7 μm y un 5% en contenido magnético, la totalidad de la superficie de la microesfera central tendría que estar revestida con una capa de magnetita que tuviera un grosor de 15 nm. Este grosor se traduce en una señal fluorescente considerablemente baja. Incluso si parte de las partículas magnéticas son mayores, tal y como se describe por Sutor, la presencia de un número relativamente amplio de partículas magnéticas más pequeñas incidirá de forma acusada en el perfil de emisión de la microesfera. Un objetivo de la invención de Sutor es proporcionar unas micropartículas magnéticamente sensibles que incorporen más unidades electromagnéticas (EMUs) por gramo de material que las micropartículas conocidas.

El documento US 5,200,270 divulga un sistema de depósito de un polvo magnéticamente sensible sobre la superficie de una perla de resina termoplástica. El polvo magnéticamente sensible tiene un grosor de 2 μm a 30 μm . A modo de ejemplo, un polvo magnéticamente sensible con un tamaño de partícula medio de 0,3 μm es depositado como una carcasa con un grosor de 5 a 15 μm . Por tanto, el revestimiento presenta al menos aproximadamente 16 capas de polvo que rodean la perla de resina termoplástica, protegiendo de esta forma de la luz la perla de resina termoplástica.

El documento WO 19/09141 se refiere a un procedimiento para obtener partículas de polímero fluorescentes magnéticamente sensibles con núcleos poliméricos. Las partículas magnéticas son tratadas con un monómero, el cual es a continuación revestido de manera uniforme sobre las partículas de los núcleos poliméricos fluorescentes y polimerizadas.

Los procedimientos anteriormente utilizados utilizan, así mismo, agentes tensoactivos y estabilizadores en la preparación de los revestimientos exteriores. Para muchas aplicaciones, la presencia de estas moléculas sobre la superficie de la microesfera es aceptable. Sin embargo, cuando se utilizan en bioensayos, los agentes tensoactivos pueden provocar interferencias y cambios no deseados en cuanto a la eficiencia de la unión de las biomoléculas con la superficie de la microesfera. Los procedimientos de lavado pueden reducir la cantidad de agentes tensoactivos y de estabilizadores asociados con la superficie de la microesfera, pero suprimir de modo completo los agentes tensoactivos y los estabilizadores es extremadamente difícil.

Por tanto, constituiría una mejora considerable respecto de las técnicas existentes contar con unos procedimientos para formar una microesfera que contuviera más de aproximadamente un 2% en peso de un material magnéticamente sensible, sin perjudicar de modo significativo la transmisión de la luz hacia dentro y hacia fuera de la microesfera. Constituiría una mejora adicional si este material magnéticamente sensible estuviera fuertemente asociado con la microesfera reduciendo con ello la actividad que el material magnéticamente sensible durante la tinción y estuviera rodeado por un polímero para impedir en lo sustancial del material magnéticamente sensible interactuara con las biomoléculas de interés. Así mismo, los procedimientos usados con anterioridad pueden ser mejorados si la capa de polímero más externa estuviera formada sin la presencia de agentes tensoactivos y estabilizadores.

Sumario de la invención

El objetivo expuesto se consigue mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Formas de realización ventajosas constituyen los objetos de las respectivas reivindicaciones dependientes.

La descripción que sigue de las diversas formas de realización de las microesferas, de las poblaciones de microesferas, y de los procedimientos para formar microesferas, no debe interpretarse en modo alguno como limitativa de la materia objeto de las reivindicaciones adjuntas.

Una forma de realización se refiere a una microesfera configurada para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas. La microesfera incluye una microesfera central y un material magnético acoplado a una superficie de la microesfera central. Aproximadamente un 50% o menos de la superficie de la microesfera central está cubierto por el material magnético. Asimismo, la microesfera incluye una capa de polímero que rodea el material magnético y la microesfera central.

En una forma de realización, la microesfera central incluye uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie de la microesfera central. En otra forma de realización, la microesfera incluye uno o más fluorocromos. En una forma de realización diferente, la microesfera incluye dos o más fluorocromos diferentes. En algunas formas de realización, el (los) fluorocromo(s) incluido(s) en la microesfera está(n) incorporado(s) dentro de la capa de polímero así como en la microesfera central.

El material magnético incluye unas partículas con un tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm. En una forma de realización preferente, el material magnético incluye unas partículas con un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 300 nm. En algunas formas de realización, el material magnético incluye cristales simples de magnetita. En una forma de realización adicional, el material magnético incluye agregados de partículas. Por ejemplo, el material magnético puede consistir en agregados de partículas más pequeñas que las descritas con anterioridad, de tal manera que los agregados tengan un tamaño de uno de los

márgenes expuestos con anterioridad. En otra forma de realización, el material magnético incluye un material magnético con mezcla de metales. En una forma de realización adicional, la microesfera incluye uno o más grupos funcionales acoplados a una superficie exterior de la capa de polímero.

5 En una forma de realización, la microesfera incluye un material magnético adicional acoplado a una superficie exterior de una capa polímero y una capa de polímero adicional que rodea el material magnético adicional. Fácilmente se advertirá que las capas alternadas de material magnético y polímero pueden ser repetidas en la microesfera hasta que se consiga el contenido magnético deseado de la microesfera. De esta manera, la microesfera puede incluir una o más capas de material magnético / de polímero, cada una de las cuales esté configurada de tal manera que menos de aproximadamente el 50% de la superficie de la microesfera central esté cubierta con el material magnético.

10 En una forma de realización del tipo indicado, el material magnético y el material magnético adicional presentan sustancialmente la misma composición. En una forma de realización diferente, el material magnético y el material magnético adicional presentan diferentes composiciones. En una forma de realización adicional, al menos un material entre el material magnético y el material magnético adicional incluye un material magnético con mezcla de metales. En otra forma de realización del tipo indicado, la capa de polímero y la capa de polímero adicional están formadas sustancialmente con el mismo material polimerizable. En otras formas de realización, la capa de polímero y la capa de polímero adicional están formadas con diferentes materiales polimerizables. En algunas formas de realización, la microesfera incluye uno o más grupos funcionales agrupados a una superficie inferior de la capa de polímero adicional. Cada una de las formas de realización de la microesfera descritas con anterioridad puede estar, así mismo, configurada, de acuerdo con lo descrito con la presente memoria y formada de acuerdo con las formas de realización de los procedimientos descritas en la presente memoria.

15 Las formas de realización de las microesferas descritas con anterioridad proporcionan diversas ventajas respecto de las microesferas actualmente utilizadas que presentan propiedades magnéticas y fluorescentes. Por ejemplo, la microesfera descrita en las líneas anteriores puede incluir más de aproximadamente un 2% en peso del material magnético sin perturbar de manera significativa la transmisión de la luz hacia dentro y hacia fuera de la microesfera. En particular, se ha determinado que, cuando más de aproximadamente un 50% de la superficie de la microesfera central está oscurecido por el material magnético la emisión fluorescente de la microesfera resulta influenciada de manera considerable (esto es, la emisión fluorescente es considerablemente menor). Así mismo, el material magnético puede estar fuertemente asociado con la microesfera, tal y como se describe con mayor detenimiento más adelante, de tal manera que el material magnético no es liberado de la microesfera durante la tinción. La microesfera central magnetizada está, así mismo, revestida, con una capa de polímero, la cual impide sustancialmente la interacción entre el material magnético y las biomoléculas de interés. Así mismo, la capa de polímero puede ser formada sin la presencia de agentes tensoactivos y estabilizadores.

20 Otra forma de realización se refiere a una población de microesferas configuradas para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas. La población incluye dos o más subconjuntos de microesferas configurados para manifestar diferentes propiedades fluorescentes, diferentes propiedades magnéticas, o diferentes propiedades fluorescentes y magnéticas. Microesferas individuales dentro de los dos o más conjuntos incluyen una microesfera central y un material magnético acoplado a una superficie de la microesfera central. Aproximadamente un 50% o menos de la superficie de la microesfera central está cubierto por el material magnético. Las microesferas individuales incluyen, así mismo, una capa de polímero que rodea el material magnético y la microesfera central. Las microesferas individuales y la población descritas con anterioridad pueden ser por sí mismo, configuradas de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

25 Una forma de realización adicional se refiere a un procedimiento para la formación de microesferas que muestran propiedades magnéticas. El procedimiento incluye la combinación de microesferas centrales con un material magnético, de forma que el material magnético se acopla a una superficie de las microesferas centrales para formar microesferas centrales magnetizadas. Aproximadamente un 50% o menos de la superficie de las microesferas centrales está cubierto por un material magnético. El procedimiento incluye, así mismo, la combinación de las microesferas centrales magnetizadas con uno o más materiales polimerizables, de tal manera que los uno o más materiales polimerizables forman una capa de polímero que rodea las microesferas centrales polimerizadas formando de esta manera las microesferas que manifiestan propiedades magnéticas.

30 En una forma de realización, el procedimiento incluye la separación de las partículas magnéticas por tamaños en un primer grupo y un segundo grupo. Una porción sustancial de las partículas magnéticas del primer grupo tienen un tamaño de aproximadamente 10 nm o mayor. Una porción sustancial de las partículas magnéticas del segundo grupo tienen un tamaño de aproximadamente 10 nm o inferior. En una forma de realización, el material magnético combinado con las microesferas centrales incluye el primer grupo de partículas magnéticas. En otra forma de realización, el procedimiento incluye la combinación de las microesferas formadas por un material magnético adicional, de tal manera que el material magnético adicional se acopla con una superficie superior de la capa de polímero y formando una capa de polímero adicional que rodea el material magnético adicional.

35 En algunas formas de realización, el procedimiento incluye el hinchado de las microesferas formadas en un disolvente que contiene fluorocromo, de tal manera que el fluorocromo migra hacia el interior de las microesferas

5 formadas. Dicho procedimiento incluye, asimismo, la modificación de una o más propiedades del disolvente que tiene fluorocromo, de tal manera que las microesferas formadas se contraen atrapando con ello el fluorocromo existente en las microesferas formadas. En una forma de realización preferente, el procedimiento incluye la incorporación de uno o más fluorocromos dentro de las microesferas centrales antes de combinar las microesferas centrales con el material magnético. En otra forma de realización, el procedimiento incluye el acoplamiento de uno o más grupos funcionales con una superficie exterior de la capa de polímero. Cada una de las formas de realización del procedimiento descrito con anterioridad puede incluir cualquier etapa descrita incluida en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

10 Ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes a los expertos en la materia con la ayuda de la descripción detallada subsecuente de las formas de realización preferentes y tras la referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de un sistema que puede ser utilizado para llevar a cabo mediciones, experimentos y ensayos con las formas de realización de las microesferas y poblaciones descritas en la presente memoria;

15 la Fig. 2 es un diagrama esquemático que ilustra una vista en sección transversal de una forma de realización de una microesfera central magnetizada que incluye un material magnético acoplado a una superficie de una microesfera central;

20 la Fig. 3 es un diagrama esquemático que ilustra una vista en sección transversal de una forma de realización de una microesfera que incluye la microesfera central magnetizada de la Fig. 2 rodeada por una capa de polímero;

la Fig. 4 es un diagrama esquemático que ilustra una vista en sección transversal de una forma de realización de la microesfera de la Fig. 3, la cual incluye un material magnético adicional acoplado a una superficie exterior de la capa de polímero, y

25 la Fig. 5 es un diagrama esquemático que ilustra una vista en sección transversal de una forma de realización de la microesfera de la Fig. 4, la cual incluye una capa de polímero adicional que rodea el material magnético adicional.

30 Aunque la invención es susceptible de modificaciones y formas alternativas, sus formas de realización específicas se muestran a modo de ejemplo en los dibujos y pueden ser descritas con detalle en la presente memoria. Los dibujos pueden no ser a escala. Debe entenderse, sin embargo, que los dibujos y la descripción detallada de ellos no pretenden limitar la invención a la forma concreta divulgada, sino que, por el contrario, la intención es abarcar todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que se incluyan en el alcance de la presente invención de acuerdo con lo definido por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las formas de realización preferentes

35 Las formas de realización de la microesfera descritas en la presente memoria pueden servir como vehículos para reacciones moleculares. Ejemplos de dichas reacciones moleculares y de experimentos, mediciones y ensayos en los cuales las formas de realización de la microesfera descritos en la presente memoria pueden ser utilizadas se describen en las Patentes estadounidenses No. 5,736,330 de Fulton, 5,981,180 de Chandler et al., 6,449,562 de Chandler et al., 6,524,793 de Chandler et al., 6,592,822 de Chandler, y 6,939,720 de Chandler et al. El término "microesfera", tal y como se utiliza en la presente memoria se define, en términos generales, como una estructura de material compuesto que puede o puede no tener forma esférica. Los términos "microesfera", "partícula" y "perla" son habitualmente utilizados de manera intercambiable por parte del experto en la materia. Por consiguiente, el término "microesfera", tal y como se utiliza en la presente memoria, puede ser sustituido por el término "partícula" o "perla" sin alterar el alcance de las formas de realización descritas en la presente memoria.

45 La Fig. 1 ilustra un ejemplo de un sistema que puede ser utilizado para llevar a cabo mediciones, experimentos y ensayos con las formas de realización descritas en la presente memoria de las microesferas y poblaciones. Debe destacarse que las figuras descritas en la presente memoria no están trazadas a escala. En particular, la escala de algunos de los elementos de las figuras está exagerada en gran medida para destacar las características de los elementos. Así mismo, las mismas referencias numerales se utilizan en las figuras para indicar elementos que pueden estar configurados de manera similar.

50 En la Fig. 1, el sistema se muestra a lo largo de un plano a través de la sección transversal de una cubeta 12 a través de la cual fluyen las microesferas 10. La cubeta puede ser una cubeta de cuarzo o de sílice fundido, como por ejemplo la que se utiliza en citómetros de flujo. Sin embargo, cualquier otro tipo apropiado de cámara de visualización o suministro puede, así mismo, ser utilizado para suministrar la muestra para efectuar la medición. Las microesferas 10 pueden estar configuradas de acuerdo con las formas de realización descritas en la presente memoria.

El sistema incluye una fuente 14 de luz. La fuente 14 de luz puede incluir cualquier fuente de luz apropiada conocida en la técnica, como por ejemplo un láser. La fuente de luz puede estar configurada para emitir una luz que presente una o más longitudes de onda, como por ejemplo luz azul o luz verde. La fuente 14 de luz está configurada para iluminar las microesferas cuando fluyen a través de la cubeta. La iluminación puede provocar que las microesferas emitan una luz fluorescente con una o más longitudes de onda o con bandas de longitudes de onda. En algunas formas de realización, el sistema puede incluir una o más lentes (no mostradas) configuradas para focalizar la luz procedente de la fuente de luz sobre las microesferas o sobre la trayectoria del flujo. El sistema puede, así mismo, incluir más de una fuente de luz. En una forma de realización, las fuentes de luz pueden estar configuradas para iluminar las microesferas con una luz que tenga longitudes de onda o bandas de longitudes de onda diferentes (por ejemplo luz azul y luz verde). En algunas formas de realización, las fuentes de luz pueden estar configuradas para iluminar las microesferas en diferentes direcciones.

La luz difundida hacia delante a partir de las microesferas es dirigida hacia un sistema de detección 16 mediante un espejo abatible 18 u otro componente apropiado de dirección de la luz. Como alternativa, el sistema de detección 16 puede ser situado directamente en la trayectoria de la luz difundida hacia delante. De esta manera, el espejo abatible u otros componentes de dirección de la luz pueden no estar incluidos en el sistema. En una forma de realización, la luz difundida hacia delante es una luz difundida por las microesferas en un ángulo de aproximadamente 180° desde la dirección de la iluminación por la fuente 14 de luz, tal y como se muestra en la Fig. 1. El ángulo de la luz difundida hacia delante puede no ser exactamente de 180° desde la dirección de iluminación, de tal manera que la luz incidente desde la fuente de luz puede no incidir sobre la superficie fotosensible del sistema de detección. Por ejemplo, la luz difundida hacia delante puede ser una luz difundida por las microesferas por ángulos inferiores a o mayores de 180° desde la dirección de iluminación (por ejemplo, una luz difundida en un ángulo de aproximadamente 170° , de aproximadamente 175° , de aproximadamente 185° o de aproximadamente 190°).

La luz difundida por las microesferas en un ángulo de aproximadamente 90° desde la dirección de iluminación puede así mismo ser recogida. En una forma de realización, esta luz difundida es separada en más de un haz de luz mediante uno o más separadores del haz o espejos dicróicos. Por ejemplo, la luz difundida en un ángulo de aproximadamente 90° en la dirección de iluminación puede ser separada en dos haces de luz diferentes por el divisor del haz 20. Los dos diferentes haces de luz pueden ser separados de nuevo por los divisores del haz 22 y 24 para producir cuatro haces de luz diferentes. Cada uno de los haces de luz puede ser dirigido hacia un sistema de detección diferente, el cual puede incluir uno o más detectores. Por ejemplo, uno de los cuatro haces de luz puede ser dirigido hacia el sistema de detección 26. El sistema de detección 26 puede estar configurado para detectar la luz difundida por las microesferas.

La luz difundida detectada por el sistema de detección 16 y / o por el sistema de detección 26 puede, en general, ser proporcional al volumen de las microesferas que son iluminadas por la fuente de luz. Por consiguiente, las señales de salida del sistema de detección 16 y / o del sistema de detección 26 pueden ser utilizadas para determinar un diámetro o tamaño de las microesferas. Así mismo, las señales de salida del sistema de detección 16 y / o del sistema de detección 26 pueden ser utilizadas para identificar más de una microesfera que estén pegadas entre sí o que estén pasando a través de la zona de iluminación aproximadamente al mismo tiempo. Por consiguiente, dichas microesferas pueden ser distinguidas de otras microesferas de muestra y de microesferas de calibrado.

Los otros tres haces de luz pueden ser dirigidos a los sistema de detección 28, 30 y 32. Los sistemas de detección 28, 30 y 32 pueden estar configurados para detectar la fluorescencia emitida por las microesferas. Cada uno de los sistemas de detección puede estar configurado para detectar la fluorescencia de una longitud de onda diferente o de una gama diferente de longitudes de onda. Por ejemplo, uno de los sistemas de detección pueden estar configurado para detectar una fluorescencia verde. Otros de los sistemas de detección puede estar configurado para detectar una fluorescencia amarillo – naranja, y otro sistema de detección puede estar configurado para detectar una fluorescencia roja.

En algunas formas de realización, unos filtros espectrales 34, 36 y 38 están acoplados a los sistemas de detección 28, 30 y 32, respectivamente. Los filtros espectrales pueden estar configurados para bloquear la fluorescencia de longitudes de onda distintas de las que los sistemas de detección están configurados para detectar. Así mismo una o más lentes (no mostradas) pueden estar ópticamente acopladas a cada uno de los sistemas de detección. Las lentes pueden estar configuradas para focalizar la luz difundida o la fluorescencia emitida sobre una superficie fotosensible de los detectores.

La corriente de salida del detector es proporcional a la luz fluorescente que incide sobre este y se traduce en un impulso de corriente. El impulso de corriente puede ser convertido en un impulso de tensión filtrado en paso bajo y, a continuación, digitalizado por un convertidor analógico a digital (A / D). Un procesador 40, como por ejemplo un procesador digital de la señal (DSP) integra el área sometida al impulso para proporcionar un número que representa la magnitud de la fluorescencia. Tal y como se muestra en la Fig. 1, el procesador 40 puede estar acoplado al sistema de detección 26 a través de un medio de transmisión 42. El medio de transmisión 42 puede incluir cualquier medio de transmisión apropiado conocido en la técnica. El procesador 40 puede, así mismo, estar acoplado al sistema de detección 26 de forma indirecta a través del medio de transmisión 42 y a uno o más

componentes distintos (no mostrados) como por ejemplo un convertidor de A / D. El procesador puede estar acoplado a otros sistemas de detección del sistema de forma similar.

5 En algunas formas de realización, las señales de salida que son sensibles a la fluorescencia emitida por las microesferas son utilizadas para determinar una identidad de las microesferas y una información acerca de una
 10 reacción que está teniendo o que ha tenido lugar sobre la superficie de las microesferas. Por ejemplo, las señales de salida de dos de los sistemas de detección pueden ser utilizadas para determinar una identidad de las microesferas, y las señales de salida del otro sistema de detección pueden ser utilizadas para determinar una reacción que está
 15 teniendo o que ha tenido lugar sobre la superficie de las microesferas. Por consiguiente, la selección de los sistemas de detección y de los filtros espectrales puede variar dependiendo del tipo de tintes incorporados dentro o unidos a las microesferas y / o la reacción que está siendo medida (esto es, el (los) tinte(s) incorporado(s) dentro o unido(s) a los reactivos implicados en la reacción).

Los sistemas de detección que son utilizados para determinar una identidad de las microesferas de muestra (por ejemplo, los sistemas de detección 28 y 30) pueden ser fotodiodos de avalancha (APDs), tubos fotomultiplicadores (PMTs), u otros fotodetectores. El sistema de detección que es utilizado para identificar una reacción que está
 15 teniendo o ha tenido lugar sobre la superficie de las microesferas (por ejemplo, el sistema de detección 32) puede ser un PMT, un APD, u otra forma de fotodetector. El sistema puede, así mismo, estar configurado de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

Aunque el sistema de la Fig. 1 se muestra incluyendo dos sistemas de detección que incorporan dos ventanas de
 20 detección diferentes para la distinción entre microesferas que presentan características de tinción diferentes, debe entenderse que el sistema puede incluir más de dos ventanas de detección del tipo indicado (esto es, 3 ventanas de detección, 4 ventanas de detección, etc.) En dichas formas de realización, el sistema puede incluir divisores del haz adicionales y sistemas de detección adicionales que incorporen otras ventanas de detección. Así mismo, los filtros
 25 espectrales y / o las lentes pueden estar acoplados a cada uno de los sistemas de detección adicionales.

En otra forma de realización, el sistema incluye dos o más sistemas de detección configurados para distinguir entre
 30 diferentes materiales que reaccionan sobre la superficie de las microesferas. Los diferentes materiales reactivos pueden presentar características de tinción que sean diferentes de las características de tinción de las microesferas.

El sistema mostrado en la Fig. 1 puede, así mismo, incluir una pluralidad de componentes distintos (no mostrados) que pueden ser utilizados para medir una o más propiedades magnéticas de las microesferas. Por ejemplo, el sistema puede estar configurado para excitar las microesferas de forma magnética así como óptica. Las
 35 microesferas pueden ser excitadas de forma magnética mediante la aplicación de un campo magnético externo a las microesferas. El campo magnético externo puede ser aplicado a las microesferas utilizando cualquier dispositivo apropiado conocido en la técnica. El sistema puede así mismo, incluir cualquier detector magnético apropiado conocido en la técnica que pueda ser utilizado para detectar el campo magnético de las microesferas. El campo magnético provocado por la magnetización inducida de una microesfera que es detectada por el detector magnético
 40 es proporcional a la magnetización de la microesfera, la cual a su vez, es proporcional al campo magnético aplicado. Los campos magnéticos detectados de las microesferas pueden ser utilizados para determinar una identidad de las microesferas y / o una reacción que está teniendo o que ha tenido lugar sobre la superficie de las microesferas.

Las microesferas que manifiestan propiedades magnéticas de medición proporcionan ventajas respecto de
 45 microesferas no magnéticas. Por ejemplo, las propiedades magnéticas de las microesferas pueden ser sustancialmente estables a lo largo del tiempo especialmente cuando el material magnético está protegido de la exposición a otros materiales, como por ejemplo reactivos (por ejemplo, por una capa de polímero de acuerdo con lo descrito en la presente memoria) y dado que las etiquetas magnéticas no están sometidas a fotoblanqueo por los sistemas de medición. Así mismo, un fondo magnético sustancial no está generalmente presente en una muestra que está siendo analizada utilizando las microesferas. De esta manera, la muestra no contribuirá al ruido a las
 50 mediciones de las propiedades magnéticas de las microesferas. Así mismo, la aplicación y la detección magnética no están bloqueadas por reactivos o biomateriales acuosos. Así mismo, el magnetismo puede ser utilizado para manipular a distancia las microesferas (por ejemplo, para el aislamiento de analitos concretos de una muestra). Así mismo, una pluralidad de dispositivos de detección del campo magnético relativamente sensibles apropiados para aplicaciones biotecnológicas se encuentran comercialmente disponibles y pueden ser incorporados en cualquiera de los sistemas descritos en la presente memoria.

Ejemplos adicionales del sistema que pueden ser utilizados para llevar a cabo mediciones, experimentos y ensayos con formas de realización de microesferas y poblaciones descritas en la presente memoria se ilustran en las patentes estadounidenses Nos. 5,981,180 de Chandler et al., 6,046,807 de Chandler, 6,139,800 de Chandler, 6,366,354 de Chandler, 6,411,904 de Chandler, 6,449,562 de Chandler et al., y 6,524,793 de Chandler et al.

55 El sistema descrito en la presente memoria puede estar, así mismo, configurado de acuerdo con lo descrito en estas patentes. Así mismo, los sistemas que pueden ser utilizados para llevar a cabo las mediciones de las formas de realización de las microesferas y de las poblaciones descritas en la presente memoria incluyen los sistemas descritos e ilustrados en las solicitudes de Patente estadounidenses con los Números de serie 60/719,010 de Roth depositada el 21 de septiembre de 2005 y 11/305,805 de Phillips depositada el 16 de diciembre de 2005. Los

sistemas descritos en estas Patentes y solicitudes de Patentes pueden incluir componentes con los descritos con anterioridad de manera que, los sistemas pueden medir una o más propiedades magnéticas de las microesferas.

De acuerdo con una forma de realización, un procedimiento para la formación de microesferas que muestran propiedades magnéticas incluye la combinación de microesferas centrales con un material magnético, de manera que el material magnético se acopla a una superficie de las microesferas centrales para formar microesferas centrales magnetizadas (o "que responden magnéticamente"). Microesferas centrales apropiadas para su uso en las formas de realización descritas en la presente memoria se encuentran disponibles en una pluralidad de fuentes comerciales y pueden estar hechas de cualquier material que ligue con el material magnético seleccionado. La ligazón entre las microesferas centrales y el material magnético puede ser covalente, iónico, electrostático o cualquiera otro tipo de ligazón apropiado conocido en la técnica. Algunos materiales apropiados que pueden ser utilizados para las microesferas centrales incluyen, pero no se limitan a, polímero de estireno, divinil benceno, sílice o acrilamida. El tamaño de las microesferas centrales (por ejemplo, un diámetro en el caso de microesferas centrales esféricas) puede ser seleccionado en base al sistema de medición y / o al procedimiento en el cual serán utilizadas las microesferas. Tamaños apropiados para las microesferas centrales oscilan entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 100 μm de diámetro, pero también funcionarán otros tamaños. Así mismo, debe destacarse que una uniformidad mayor del tamaño de las microesferas centrales conduce a una mayor uniformidad en cuanto a la absorción del tinte (por ejemplo, el tinte fluorescente o fluoróforo) y a la ligazón del material magnético.

En una forma de realización, las microesferas centrales incluyen uno o más grupos funcionales acoplados a las superficies de las microesferas centrales. Las funcionalidades de la superficie pueden ser seleccionadas entre una pluralidad de diferentes mitades reactivas, como por ejemplo aminas, tioles, ácidos carboxílicos, hidracina, haluros, alcoholes, aldehídos y cualquier combinación de éstos. Esta lista de funcionalidades no se pretende que sea una lista de funcionalidades completa, y las funcionalidades de las microesferas pueden incluir cualquier otra conocida en la técnica. Los uno o más grupos funcionales pueden estar acoplados a las superficies de las microesferas centrales durante la formación de las microesferas centrales (por ejemplo, mediante polimerización con uno o más materiales polimerizables que incluyan uno o más grupos funcionales). Como alternativa, los uno o más grupos funcionales pueden ser fijados a la superficie de las microesferas centrales después de que se hayan formado las microesferas centrales. Dicha fijación de los uno o más grupos funcionales puede llevarse a cabo utilizando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica.

En una forma de realización, la combinación de las microesferas centrales con un material magnético, de acuerdo con lo descrito con anterioridad, incluye el tratamiento de una solución de microesferas centrales con una solución que contenga un material que responde magnéticamente. En una forma de realización, el procedimiento incluye la separación de las partículas magnéticas por tamaños en un primer grupo y en un segundo grupo. Una porción sustancial de las partículas magnéticas del primer grupo tiene un tamaño de aproximadamente 10 nm o mayor. Una porción sustancial de las partículas magnéticas del segundo grupo tiene un tamaño de aproximadamente 10 nm o menor. En una forma de realización del tipo indicado, el material magnético combinado con las microesferas centrales incluye el primer grupo de partículas magnéticas. En dicha forma de realización, el material magnético combinado con las microesferas centrales no incluye el segundo grupo de partículas magnéticas. De esta manera, el material que responde magnéticamente puede ser tratado antes del tratamiento de las microesferas centrales para eliminar de la solución que se utiliza para tratar las microesferas centrales las partículas relativamente finas.

La selección del tamaño de las partículas magnéticas puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una digestión ácida parcial del material magnético (aunque esta etapa es opcional) seguida por una filtración o una centrifugación para separar las partículas de mayor tamaño de las partículas de menor tamaño. Las partículas de mayor tamaño son retenidas para su acoplamiento con las microesferas centrales, y las partículas más finas son desechadas. Se ha mostrado que el lavado repetido de las partículas magnéticas es ventajoso dado que el lavado repetido elimina de manera más eficiente las partículas más finas del grueso de la solución de magnetita. Pueden ser utilizados otros procedimientos para eliminar solo las partículas más finas. Por ejemplo, partículas menores de aproximadamente 10 nm o partículas menores de aproximadamente 20 nm), pueden, así mismo, ser utilizadas para obtener partículas magnéticas apropiadas para las formas de realización descritas en la presente memoria. Las partículas magnéticas lavadas pueden ser a continuación resuspendidas, de modo preferente en un disolvente alcohólico antes de su combinación con las microesferas centrales. Los disolventes alcohólicos son preferentes con relación a la resuspensión, dado que la reactividad de los disolventes acuosos y de los materiales magnéticos pueden generar hidróxidos u otras especies reducidas sobre la superficie del material magnético, algunas de las cuales se sabe que fluorescen, lo que no sería deseable para muchas aplicaciones en las cuales las formas de realización de las microesferas y de las poblaciones descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas.

Algunas ventajas de las formas de realización descritas en la presente memoria se obtienen mediante el tratamiento del material magnético después de su síntesis y antes de su acoplamiento con las microesferas centrales. Los procedimientos de la técnica anterior, como por ejemplo los descritos en las Patentes estadounidenses Nos.5,283,079 de Wang et al. y 5,648,124 de Sutor utilizan técnicas para reducir al mínimo el tamaño de las partículas y aislar las partículas más finas. Por ejemplo, la magnetita bruta a menudo es parcialmente digerida con un ácido y la magnetita es aislada por una solución mediante una decantación magnética, la cual retiene todos los tamaños de partícula, o mediante centrifugación o retención del sobrenadante, lo cual asegura la retención de solo

los tamaños de partícula más pequeños. Sin embargo, el material magnético utilizado en las formas de realización descritas en la presente memoria no incluye, de modo preferente, dichas partículas finas.

La eliminación sustancial de estas partículas magnéticas de tamaño más pequeño hace posible la formación de una microesfera que presenta un contenido en magnetita relativamente alto mientras se reduce al mínimo la cubierta de superficie de la microesfera nuclear por parte del material magnético. Por ejemplo, si partículas magnéticas relativamente pequeñas son acopladas a las superficies de la microesfera central, las partículas constituyen con eficacia una capa relativamente delgada a través sustancialmente de la entera superficie de la microesfera central lo que se traduce en una microesfera con una sensibilidad magnética relativamente baja y una escasa capacidad de emisión de luz desde el núcleo debido a la absorción de luz por las partículas. En un ejemplo concreto, revistiendo completamente la superficie de una microesfera con un diámetro de 7 μm con una magnetita de 5 nm de diámetro se obtiene una microesfera con un contenido en magnetita de solo un 1%. Así mismo, se impediría en gran medida, a causa de la magnetita, la transmisión hacia dentro y hacia fuera de esta microesfera.

En una forma de realización preferente, por tanto, partículas de mayor tamaño, o conglomerados (esto es, agregados) de partículas son dispersadas a través de la superficie de la microesfera central, de tal manera que toda la superficie de la microesfera central no quede cubierta por las partículas magnéticas. Por tanto, la microesfera puede tener un contenido magnético relativamente alto debido al tamaño relativamente grande de las partículas y una transmisión de luz relativamente elevada debido al recubrimiento parcial de la superficie de la microesfera central por parte de las partículas magnéticas. Por ejemplo, mediante el tratamiento de la magnetita de forma que se excluyan de manera sustancial las partículas más pequeñas y se retengan las partículas o los conglomerados que tengan un tamaño que oscile entre aproximadamente 10 nm y 100 nm y, de modo más preferente entre 50 nm y aproximadamente 300 nm, es posible formar una microesfera que presente un contenido de magnetita de aproximadamente un 5% con un recubrimiento de la superficie de solo aproximadamente un 20% en la microesfera central por parte del material magnético. Las microesferas formadas de acuerdo con las formas de realización descritas en la presente memoria, por tanto, de modo ventajoso presentan un contenido magnético más alto y una transmisión de luz más elevada que las microesferas formadas mediante procedimientos del tipo de los divulgados por Wang et al. y Sutor, en los cuales el objetivo consiste en potenciar al máximo el contenido magnético sin tener en cuenta el grado de recubrimiento u obstrucción de luz de la superficie por parte de las partículas magnéticas.

El tratamiento de las microesferas centrales, tal y como se ha descrito con anterioridad, produce unas microesferas centrales magnetizadas, las cuales, tal y como se muestra en la Fig. 2, incluyen un material magnético 44 acoplado a una superficie de una microesfera 46 central. De modo preferente, aproximadamente un 50% o menos de la superficie de la microesfera central está cubierto por el material magnético 44. En otras palabras, el material magnético está acoplado solo a una porción de la superficie de la microesfera central lo que se traduce en un recubrimiento parcial de la superficie por parte del material magnético. Dicho acoplamiento del material magnético a la microesfera central es ventajoso, dado que un recubrimiento de la superficie de la microesfera central por parte del material magnético que sobrepase, de modo aproximado, un 50% se ha demostrado que incide de manera considerable (esto es, reduce) la emisión fluorescente procedente de la microesfera central teñida de manera fluorescente.

El material magnético 44 puede incluir partículas. En una forma de realización, el material magnético 44 incluye unas partículas que presentan un tamaño (por ejemplo, un diámetro) de aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 1000 nm. En una forma de realización preferente, el material incluye unas partículas que presentan un tamaño de aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 300 nm. El tamaño de las partículas magnéticas puede ser seleccionado en base al tamaño de la microesfera central, en base al recubrimiento de la superficie seleccionada de la microesfera central por parte de las partículas magnéticas, y en parte al contenido magnético seleccionado de la microesfera. En general, las partículas magnéticas pueden tener un tamaño mayor que el tamaño de la microesfera central, de tal manera que las partículas magnéticas puedan ser acopladas a la superficie de la microesfera central sin completar el recubrimiento de la superficie por parte de las partículas magnéticas.

En algunas formas de realización, el material magnético incluye cristales simples de magnetita. En una forma de realización diferente, el material magnético incluye agregados de partículas. Las partículas que forman los agregados pueden ser más pequeñas que los cristales simples de magnetita. Así mismo, las partículas que forman los agregados pueden tener unos tamaños tales que los propios agregados tengan unos tamaños que alcancen los de los descritos con anterioridad. En una forma de realización adicional, el material magnético incluye un material magnético con mezcla de metales.

El material magnético puede adoptar una pluralidad de formas, como por ejemplo ferromagnéticas, diamagnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas. De estas formas, las dos últimas son las más útiles para las formas de realización descritas en la presente memoria y, dado que, el superparamagnetismo es una subclase del paramagnetismo serán tratados de la misma forma en el presente análisis. Un material magnético habitualmente utilizado es la magnetita de óxido de hierro, Fe_3O_4 . Cuando dicha magnetita es preparada mediante procedimientos que producen tamaños de partículas relativamente pequeños, la magnetita es paramagnética. Un procedimiento de este tipo produce el calentamiento de una solución de sales de hierro con una base relativamente fuerte, como por ejemplo hidróxido de sodio. Uno o más metales divalentes distintos, como por ejemplo cobalto y manganeso, pueden ser añadidos a las sales de hierro para formar un material magnético de metales mezclados con

propiedades diferentes. Muchos de estos compuestos de metales mezclados pueden ser utilizados para formar microesferas magnéticas. Otros óxidos metálicos magnéticos están indicados para su uso en las formas de realización descritas en la presente memoria. Aunque muchas formas de realización se describen en la presente memoria con respecto a la magnetita, cualquier otro material magnético apropiado puede ser utilizado en las formas de realización descritas en la presente memoria.

La forma de realización del procedimiento incluye, así mismo, la combinación de las microesferas centrales magnetizadas con uno o más materiales polimerizables de tal manera que uno o más materiales polimerizables formen una capa de polímero que rodee las microesferas centrales magnetizadas formando de esta manera las microesferas que manifiestan propiedades magnéticas. Por ejemplo, después del acoplamiento de la magnetita en la superficie de la microesfera central, puede constituirse una capa protectora de polímero sobre la esfera central magnetizada. De esta manera, las microesferas centrales magnéticamente "revestidas" quedan esencialmente revestidas con un material polimérico. La capa de polímero puede estar configurada para proporcionar una barrera para impedir (o al menos reducir de modo sustancial) el contacto del material magnético con el entorno exterior, como por ejemplo disolventes, reactivos, analitos, etc. a las que pueden quedar expuestas las microesferas formadas en las etapas posteriores (por ejemplo, la tinción) o durante su uso, por ejemplo, ensayos. Por ejemplo, tal y como se muestra en la Fig. 3, una capa 48 de polímero rodea el material magnético 44 y la microesfera central 46. Aunque la capa 48 de polímero se muestra en la Fig. 3 rodeando completamente el material magnético y la microesfera central, en la práctica la capa de polímero puede no rodear de modo completo la microesfera central magnetizada. Sin embargo, la capa de polímero está, de modo preferente, constituida de tal manera que la capa de polímero impide de modo sustancial el contacto entre el material magnético y otros materiales que contactan con la superficie exterior de la capa de polímero.

La capa de polímero puede estar constituida mediante la suspensión de las microesferas centrales magnetizadas en un disolvente apropiado, como por ejemplo agua o alcohol, y añadiendo a la suspensión uno o más monómeros, como por ejemplo estireno, ácido acrílico u otras moléculas polimerizables apropiadas conocidas en la técnica junto con un iniciador de la polimerización y, posiblemente, otras moléculas que se consideren apropiadas. Es preferente, aunque no se requiere, que la mezcla de monómeros incluya una especie capaz de su coordinación con la magnetita así como capaz de copolimerizar con los demás monómeros como pueden ser, aunque no se limiten a, el ácido acrílico o la vinilperidina. Esta coordinación de la capa de polímero con la magnetita formará un acoplamiento más fuerte entre la capa de polímero y la microesfera central magnetizada. El iniciador puede ser un metal que forme un compuesto, un par redox, o cualquier otro iniciador apropiado conocido en la técnica. En ausencia de un iniciador, la polimerización puede ser inducida mediante cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica, como por ejemplo, la iniciación ultrasónica o fotoquímica. La capa de polímero está constituida, de modo preferente, en ausencia de agentes tensoactivos y estabilizadores poliméricos, aunque ello no constituye una exigencia de las formas de realización descritas en la presente memoria.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, uno o más grupos funcionales (no mostrados) pueden ser acoplados a la superficie de la microesfera central 46. Así mismo, o como alternativa, las microesferas pueden incluir uno o más grupos funcionales (no mostrados) acoplados a una superficie exterior de la capa 48 de polímero. En particular, en algunas formas de realización, el procedimiento incluye el acoplamiento de uno o más grupos funcionales a una superficie exterior de la capa de polímero. Los uno o más grupos funcionales pueden ser acoplados a la superficie exterior de la capa de polímero durante la polimerización de los uno o más materiales polimerizables (por ejemplo, mediante la utilización de uno o más materiales polimerizables que incluyan uno o más grupos funcionales). Como alternativa, los uno o más grupos funcionales pueden ser fijados a la superficie exterior de la capa de polímero después de que la capa de polímero haya sido formada. Dicha fijación puede ser empleada llevando a cabo cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa de polímero pueden incluir cualquiera de los grupos funcionales descritos con anterioridad. Así mismo, si uno o más grupos están acoplados a la superficie de la microesfera central y a la superficie exterior de la capa de polímero, los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie de la microesfera central pueden ser sustancialmente los mismos que o diferentes de los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa de polímero.

En una forma de realización, las microesferas incluyen uno o más fluorocromos (no mostrados). En otra forma de realización, las microesferas incluyen uno o más fluorocromos diferentes (no mostrados). Ejemplos de fluorocromo(s) apropiado(s) para las formas de realización de las microesferas descritas en la presente memoria se describen en las Patentes citadas. El (los) fluorocromo(s) puede(n) estar contenido(s) en la microesfera central, la capa de polímero, o tanto en la microesfera central como en la capa de polímero.

En una forma de realización, el procedimiento incluye la incorporación de uno o más fluorocromos dentro de las microesferas centrales antes de la combinación de las microesferas centrales con el material magnético. Por tanto, el (los) fluorocromo(s) se incorpora(n) dentro de la microesfera central antes de que se constituya la capa de polímero. Así mismo, o como alternativa, uno o más fluorocromos pueden ser fijados a la superficie de la microesfera central. El (los) fluorocromo(s) puede(n) ser fijado(s) a la superficie de la microesfera central antes de que se constituya la capa de polímero.

Así mismo, o como alternativa, el (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s) dentro de la capa de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero. De esta manera, los fluorocromos pueden ser incorporados dentro de la microesfera después de que se haya constituido la capa de polímero. El (los) fluorocromo(s) incorporado(s) dentro de la capa de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero puede(n) ser el (los) mismos que o diferentes del (de los) fluorocromos que se incorpora(n) dentro de la microesfera central y / o fijado(s) a la superficie de la microesfera central. Pro ejemplo, diferentes fluorocromos pueden ser fijados a la superficie de la microesfera central y a la superficie exterior de la capa de polímero en diferentes etapas. En otro ejemplo, el (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s), en la misma etapa, dentro de la microesfera central y de la capa de polímero. El (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s) dentro y / o fijado(s) a la superficie de la microesfera y / o de la capa de polímero utilizando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica.

En una forma de realización, el procedimiento incluye el hinchado de las microesferas formadas dentro de un disolvente que contiene fluorocromo, de tal manera que el fluorocromo migra hacia el interior de las microesferas formadas. Dicho procedimiento incluye, así mismo, la modificación de una o más propiedades del disolvente que contiene el fluorocromo, de tal manera que las microesferas formadas se contraen atrapando de esta manera el fluorocromo dentro de las microesferas formadas. Ejemplos de procedimientos que pueden ser utilizados de acuerdo con lo descrito con anterioridad se ilustran en las Patentes estadounidenses No. 6,514,295 de Chandler et al., 6,599,331 de Chandler et al., 6,632,526 de Chandler et al., y 6,929,859 de Chandler et al. El disolvente que contiene fluorocromo puede incluir uno o más fluorocromos o uno o más fluorocromos diferentes. El (los) fluorocromo(s) puede(n) quedar atrapado(s) dentro de las microesferas centrales y posiblemente de la capa de polímero. Por ejemplo, quede(n) atrapado(s) o no el (los) fluorocromo(s) dentro de la capa de polímero puede variar dependiendo de las características del (de los) fluorocromo(s) (el (los) cuál (es) puede(n) ser seleccionado(s) en base a las características de las microesferas centrales y a los sistemas de medición y / o a los procedimientos en los cuales las microesferas formadas van a ser utilizadas), de las características del disolvente de tinción y de las características de la capa de polímero.

En algunas formas de realización, el procedimiento incluye la combinación de las microesferas formadas con un material magnético adicional, de tal manera que el material magnético adicional se acople con una superficie exterior de la capa de polímero. Dicha forma de realización puede, así mismo, incluir la formación de una capa de polímero adicional que rodee el material magnético adicional. En una forma de realización del tipo indicado, el material magnético adicional 50 es acoplado a una superficie exterior de la capa 48 de polímero, tal y como se muestra en la Fig. 4. En una forma de realización del tipo indicado, tal y como se muestra en la Fig. 5, la capa 52 de polímero puede rodear el material magnético adicional 50. La capa 52 de polímero puede "rodear" el material magnético adicional de acuerdo con lo descrito con anterioridad. De esta manera, las microesferas pueden, de manera opcional, ser recubiertas con el material magnético 50 acoplado a una superficie exterior de la capa 48 de polímero, tal y como se muestra en la Fig. 4 seguido por otro recubrimiento de polímero (por ejemplo, la capa adicional 52 de polímero mostrada en la Fig. 5) para incrementar el contenido magnético de las microesferas formadas. Este proceso puede ser repetido las veces que sea necesario para obtener las microesferas formadas con los niveles deseados de transmisión de luz / fluorescencia y las propiedades magnéticas.

El material magnético 50 puede incluir cualquiera de los materiales magnéticos descritos con anterioridad. Así mismo, el material magnético 50, puede ser formado de acuerdo con lo descrito con anterioridad. Así mismo, los materiales magnéticos 44 y 50 pueden tener sustancialmente la misma composición o composiciones diferentes. La capa adicional 52 de polímero puede ser constituida a partir de cualquiera de los materiales polimerizables descritos con anterioridad. La capa adicional 52 de polímero puede, asimismo estar constituida de acuerdo con lo descrito con anterioridad. Así mismo, la capa 48 de polímero y la capa adicional 52 de polímero pueden constituirse a partir de sustancialmente el mismo material polimerizable o a partir de materiales polimerizables diferentes. Así mismo, tal y como se muestra en las Figs. 4 y 5, la superficie exterior de la capa 48 de polímero está solo en parte cubierta por el material magnético 50. Por ejemplo, aproximadamente un 50% o menos de la capa 48 de polímero está cubierta por el material magnético adicional, de tal manera que las propiedades de transmisión de luz / emisión de fluorescente de las microesferas formadas no resulta reducido en lo sustancial por el material magnético adicional 50.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, uno o más grupos funcionales (no mostrados) pueden ser acoplados a la superficie de la microesfera central 46 y / o a la superficie exterior de la capa 48 de polímero. Así mismo, o como alternativa, las microesferas pueden incluir uno o más grupos funcionales (no mostrados) acoplados a una superficie exterior de la capa adicional (52) de polímero. En particular, en algunas formas de realización, el procedimiento incluye el acoplamiento de uno o más grupos funcionales con una superficie exterior de la capa adicional de polímero. Los uno o más grupos funcionales pueden estar acoplados a la superficie exterior de la capa adicional de polímero durante la polimerización de los uno o más materiales polimerizables (por ejemplo, mediante la utilización de uno o más materiales polimerizables que incluyan uno o más grupos funcionales). Como alternativa, los uno o más grupos funcionales pueden ser fijados a la superficie exterior de la capa adicional de polímero después de que la capa adicional de polímero se haya formado. Dicha fijación de uno o más grupos adicionales puede llevarse a cabo utilizando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa adicional de polímero pueden incluir cualquiera de los grupos funcionales descritos con anterioridad. Así mismo, si uno o más grupos funcionales son acoplados a la superficie de la microesfera central y a la superficie exterior de la capa adicional de polímero, los uno o más grupos funcionales

acoplados a la superficie de la microesfera central pueden ser sustancialmente los mismos que o diferentes de los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa adicional de polímero. Si uno o más grupos adicionales son acoplados a las superficies exteriores de la capa de polímero y a la capa adicional de polímero, los uno o más grupos funcionales acoplados a las superficies exteriores de la capa de polímero y de la capa adicional de polímero, los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa de polímero pueden ser sustancialmente los mismos que o diferentes de los uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie exterior de la capa adicional de polímero.

De acuerdo con lo descrito con anterioridad, el (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s) dentro de la microesfera central y / o de la capa 48 de polímero y / o puede(n) ser fijado(s) a la superficie de la microesfera central y / o a la superficie exterior de la capa 48 de polímero. Así mismo, o como alternativa, el (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s) dentro de la capa adicional de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero. El (los) fluorocromo(s) incorporado(s) dentro de la capa adicional de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero puede(n) ser el (los) mismo(s) que o diferente(s) del (de los) fluorocromo(s) que es (son) incorporado(s) dentro de la superficie central y / o fijado(s) a la superficie de la microesfera central. El (los) fluorocromo(s) incorporado(s) dentro de la capa adicional de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero puede(n), así mismo, ser el (los) mismo(s) que o diferente(s) del (de los) fluorocromo(s) que es (son) incorporado(s) dentro de la capa de polímero y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero. El (los) fluorocromo(s) puede(n) ser incorporado(s) dentro de y / o fijado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero adicional utilizando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Cada una de las formas de realización del procedimiento descrito con anterioridad puede incluir cualquier otra o cualesquiera otras etapas de cualquier procedimiento o de cualesquiera procedimientos descritos en la presente memoria.

La Fig. 3 ilustra una forma de realización de una microesfera que está configurada para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas. La microesfera incluye una microesfera central 46, la cual puede ser configurada de acuerdo con lo descrito con anterioridad. En una forma de realización, la microesfera central incluye uno o más grupos funcionales (no mostrados) acoplados a la superficie de la microesfera central. Los uno o más grupos funcionales pueden incluir cualquiera de los grupos funcionales descritos en la presente memoria.

La microesfera incluye, así mismo, el material magnético 44 acoplado a la superficie de la microesfera central 46. El material magnético puede incluir cualquiera de los materiales magnéticos descritos en la presente memoria y puede estar configurado de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, de acuerdo con una forma de realización, el material magnético incluye unas partículas que presentan un tamaño (por ejemplo, un diámetro) de aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 1000 nm. En una forma de realización preferente, el material magnético incluye unas partículas que presentan un tamaño de aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 300 nm. En otra forma de realización, el material magnético incluye unos cristales simples de magnetita. En una forma de realización adicional, el material magnético incluye agregados de partículas. En algunas formas de realización el material magnético incluye un material magnético de metales mezclados. De modo preferente, aproximadamente un 50% o menos de la superficie de la microesfera central está cubierto por el material magnético.

La microesfera incluye, así mismo, la capa 48 de polímero que rodea el material magnético y la microesfera central. La capa de polímero puede ser configurada de acuerdo con lo descrito con anterioridad. En una forma de realización, la microesfera incluye uno o más grupos funcionales (no mostrados) acoplados a una superficie exterior de la capa de polímero. Estos uno o más grupos funcionales pueden incluir cualquiera de los grupos funcionales descritos en la presente memoria. Así mismo, si el (los) grupo(s) funcional(es) está(n) acoplado(s) a la superficie de la microesfera central y a la superficie exterior de la capa de polímero, el (los) grupo(s) funcional(es) acoplado(s) a la superficie de la microesfera central puede(n) ser el (los) mismo(s) que o diferente(s) del (de los) grupo(s) funcional(es) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero.

En una forma de realización, la microesfera incluye un material magnético adicional acoplado a una superficie exterior de la capa de polímero y una capa adicional de polímero que rodea el material magnético adicional. Por ejemplo, tal y como se muestra en la Fig. 5, la microesfera puede incluir el material magnético adicional 50 acoplado a una superficie exterior de la capa 48 de polímero y a la capa adicional 52 de polímero que rodea el material magnético adicional. El material magnético adicional puede incluir cualquiera de los materiales magnéticos descritos en la presente memoria. Así mismo, el material magnético adicional puede ser configurado de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, de modo preferente, la combinación del material magnético y del material magnético adicional cubre aproximadamente el 50% o menos de la superficie de la microesfera central. En una forma de realización, el material magnético y el material magnético adicional presentan sustancialmente la misma composición. En una forma de realización alternativa, el material magnético y el material magnético adicional presentan configuraciones diferentes. En una forma de realización adicional, al menos un material entre el material magnético y el material magnético adicional incluye un material magnético de metales mezclados.

La capa adicional 52 de polímero puede ser formada a partir de cualquiera de los materiales polimerizables descritos en la presente memoria. Así mismo, la capa adicional de polímero puede ser configurada de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. Así mismo, en una forma de realización preferente, la capa de polímero y la capa adicional de polímero son formadas a partir sustancialmente del mismo material polimerizable. En una forma de realización

alternativa, la capa de polímero y la capa adicional de polímero son formadas a partir de materiales polimerizables diferentes.

En una forma de realización, la microesfera incluye uno o más grupos funcionales (no mostrados) acoplados a una superficie exterior de la capa adicional de polímero. Estos uno o más grupos funcionales pueden incluir cualquiera de los grupos funcionales descritos en la presente memoria. Así mismo, si el (los) grupo(s) está(n) acoplado(s) a la superficie de la microesfera central y a la superficie exterior de la capa adicional de polímero, el (los) grupo(s) funcional(es) acoplado(s) a la superficie de la microesfera central puede(n) ser el (los) mismo(s) que o diferente(s) del (de los) grupo(s) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero. Así mismo, si el (los) grupo(s) funcional(es) está(n) acoplado(s) a las superficies exteriores de la capa de polímero y a la capa adicional de polímero, el (los) grupo(s) funcional(es) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero, puede(n) ser el (los) mismo(s) que o diferente(s) del (de los) grupo(s) funcional(es) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero.

En algunas formas de realización, la microesfera incluye uno o más fluorocromos. En otra forma de realización, la microesfera incluye dos o más fluorocromos diferentes. Por ejemplo, en una forma de realización, uno o más fluorocromos (no mostrados) o dos o más diferentes fluorocromos (no mostrados) pueden estar acoplados a una superficie de la microesfera central y / o incorporados dentro de la microesfera central. El (los) fluorocromo(s) acoplado(s) a la superficie de la microesfera central y / o incorporado(s) dentro de la microesfera central puede(n) incluir cualquiera de los fluorocromos descritos en la presente memoria. En otra forma de realización, uno o más fluorocromos (no mostrados) o dos o más fluorocromos diferentes (no mostrados) pueden ser acoplados a una superficie exterior de la capa de polímero y / o incorporado(s) dentro de la cámara de polímero. El (los) fluorocromo(s) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa de polímero y / o incorporado(s) dentro de la capa de polímero puede(n) incluir cualquiera de los fluorocromos descritos en la presente memoria. En una forma de realización adicional, uno o más fluorocromos (no mostrados) o dos o más diferentes fluorocromos (no mostrados) pueden ser acoplados a la capa adicional de polímero y / o incorporados dentro de la capa adicional de polímero. El (los) fluorocromo(s) acoplado(s) a la superficie exterior de la capa adicional de polímero y / o incorporado(s) dentro de la capa adicional de polímero puede(n) incluir cualquiera de los fluorocromos descritos en la presente memoria. Así mismo, el (los) fluorocromo(s) pueden ser fijados a la superficie y / o incorporados dentro de la microesfera central, de la capa de polímero, de la capa adicional de polímero o de alguna combinación de éstas. Cada una de las formas de realización de la microesfera descritas con anterioridad pueden, así mismo, ser configuradas de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

Las formas de realización de las microesferas descritas con anterioridad proporcionan diversas ventajas respecto de otras microesferas actualmente utilizadas. Por ejemplo, la microesfera descrita en las líneas anteriores puede incluir más de aproximadamente un 2% en peso del material magnético sin afectar de manera significativa a la transmisión de la luz hacia dentro y hacia fuera de la microesfera. En particular, se ha determinado que, cuando más de aproximadamente un 50% de la superficie de la microesfera central está oscurecida por el material magnético, la emisión fluorescente de la microesfera resulta significativamente afectada (esto es, la emisión fluorescente es significativamente menor). Así mismo, el material magnético puede estar fuertemente asociado con la superficie de la microesfera central tal y como se describe con mayor detenimiento en la presente memoria de tal manera que el contenido magnético de la microesfera no se reduce en el curso de las operaciones de tinción. La microesfera central magnetizada está, así mismo, sustancialmente rodeada por una capa de polímero, la cual sustancialmente impide que el material magnético interactúe con las biomoléculas de interés y otros materiales que contactan con la microesfera formada. Así mismo, la capa de polímero puede estar formada en ausencia de agentes tensoactivos y estabilizadores. Por tanto, cuando las formas de realización de la microesfera descritas en la presente memoria son utilizadas en bioensayos, se eliminan la interferencia y las modificaciones no deseadas respecto de la eficiencia de la aglutinación de las biomoléculas con la superficie de la microesfera, las cuales pueden estar ocasionadas por los agentes tensoactivos o los estabilizadores. Las formas de realización de las microesferas descritas con anterioridad presentan, así mismo, todas las ventajas de otras formas de realización descritas en la presente memoria.

Las microesferas descritas en la presente memoria pueden estar incluidas en una población de microesferas configurada para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas. Por ejemplo, una forma de realización de una población de microesferas, configurada para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas incluye dos o más subconjuntos de microesferas. Los dos o más subconjuntos de microesferas están configurados para manifestar diferentes propiedades fluorescentes, diferentes propiedades magnéticas, o diferentes propiedades fluorescentes y magnéticas. Las propiedades fluorescentes y / o magnéticas de los subconjuntos son, de modo preferente, diferentes en la medida suficiente a través de los subconjuntos y lo suficientemente uniformes dentro de los subconjuntos, de tal manera que las propiedades fluorescentes y / o magnéticas, cuando son medidas, pueden ser utilizadas para distinguir unos de otros los subconjuntos (por ejemplo, para determinar el subconjunto al cual pertenece una microesfera).

Las microesferas individuales de los dos o más subconjuntos, pueden ser configuradas de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, una microesfera individual incluye una microesfera central. Un material magnético está acoplado a una superficie de la microesfera central. De modo preferente, aproximadamente un 50% o menos de la superficie de la microesfera central está cubierto por el material magnético. La microesfera individual incluye, así mismo, una capa de polímero que rodea el material magnético y la microesfera central. Las microesferas

individuales y la población pueden, así mismo, ser configuradas de acuerdo con lo descrito en la presente memoria. La presente forma de realización de una población de microesferas presenta todas las ventajas de otras formas de realización descritas en la presente memoria.

5 Los ejemplos que siguen no deben ser considerados como formas de realización limitativas de la invención y se incluyen únicamente en la presente memoria a modo de ejemplo.

Ejemplo 1: preparación de la magnetita

10 0,2 moles de cloruro de hierro hexahidratado (III) y 0,1 moles de de cloruro de hierro tetrahidratado (II) fueron disueltos en 400 ml de agua desionizada en un matraz de fondo redondo con tres cuellos removiendo desde arriba. Esta mezcla fue calentada a 90° C sin dejar de agitar. 520 ml de 6N NaOH fueron añadidos gota a gota durante 1 hora. Se mantuvo la reacción durante 24 horas.

Ejemplo 2: revestimiento de magnetita y polímero

15 10,2 g de microesferas centrales de polistireno comercialmente disponibles con una modificación de la superficie carboxilada funcionalizada fueron suspendidas en un volumen total de 100 ml de metanol. 12,4 ml de la solución de magnetita preparada fueron lavados con agua desionizada, seguido por dos lavados en HCL de 1M, y finalmente dos lavados con metanol. Cada etapa de lavado fue seguida de una centrifugación a aproximadamente 4000 x g para separar las partículas de magnetita de mayor tamaño de las partículas de magnetita de menor tamaño. La magnetita fue resuspendida dentro de un volumen total de 100 ml de metanol. La magnetita y las microesferas
20 centrales fueron combinadas dejando que se mezclaran durante 3 horas. Esta mezcla fue, a continuación, lavada cuatro veces con agua desionizada y, a continuación, resuspendida dentro de un volumen total de 375 ml de agua y cargada en un matraz de fondo redondo con tres cuellos de 500 ml. Se preparó una mezcla de 12,6 g de estireno estilado, 0,768 g de divinilbenceno, 0,173 g de peróxido de benzoilo y 1,47 g de ácido acrílico y cargándola en un matraz de fondo redondo con tres cuellos de 500 ml. La mezcla de la reacción fue, a continuación, calentada a 60° C durante 24 horas. Las microesferas revestidas fueron lavadas con metanol, tetrahidrofurano seguido por tres lavados adicionales con metanol, una vez con agua y por último resuspendidas en agua desionizada.

25 Modificaciones adicionales y formas de realización alternativas de los diversos aspectos de la invención pueden resultar evidentes a los expertos a la materia a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, se obtienen microesferas y poblaciones de microesferas que son configuradas para manifestar propiedades fluorescentes y magnéticas. De acuerdo con ello, la presente descripción debe ser interpretada solo como ilustrativa consistiendo su finalidad la enseñanza a los expertos en la materia de la forma general de llevar a la práctica la invención. Debe
30 entenderse que las formas de realización mostradas y descritas en la presente memoria deben considerarse como las formas de realización actualmente preferentes. Los elementos y los materiales pueden ser sustituidos por los ilustrados y descritos en la presente memoria, las partes y los procesos pueden ser invertidos, y determinadas características de la invención pueden ser utilizadas de manera independiente, todo ello tal y como resultaría evidente a los expertos en la materia después de haber tenido acceso a la descripción de la invención. Pueden
35 llevarse a cabo modificaciones en los elementos descritos en la presente memoria sin apartarse del alcance de la invención tal y como se describe en las reivindicaciones subsecuentes.

REIVINDICACIONES

1.- Una microesfera (10) que comprende:

- una microesfera central (46),
- un material magnético (44) acoplado a una superficie de la microesfera central (46), y
- una capa (48) de polímero que rodea el material magnético (44) y la microesfera central (46).

caracterizada porque

un 50% o menos de la superficie de la microesfera central (46) está cubierto por el material magnético (44) y **porque** el material magnético comprende partículas o agregados de partículas que tienen un tamaño de 10 nm a 1000 nm.

2.- La microesfera (10) de la reivindicación 1,

caracterizada porque

la microesfera central (46) comprende uno o más grupos funcionales acoplados a la superficie de la microesfera central (46).

3.- La microesfera (10) de la reivindicación 1,

caracterizada porque

comprende así mismo un material magnético adicional acoplado a una superficie exterior de la capa de polímero y una capa adicional (52) de polímero que rodea el material magnético adicional.

4.- Una población de microesferas que comprende dos o más subconjuntos de microesferas configurados para manifestar diferentes propiedades magnéticas,

caracterizada porque

las microesferas individuales de los dos o más subconjuntos comprenden una cualquiera de las microesferas (10) de las reivindicaciones 1 a 3.

5.- El uso de las microesferas individuales de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende así mismo uno o más fluorocromos dentro de dos o más subconjuntos para un procedimiento de análisis de un ensayo, comprendiendo el procedimiento:

el suministro de una muestra para la medición que comprende una población de microesferas con los dos o más subconjuntos de microesferas dentro de una cámara de visualización de un sistema para llevar a cabo las mediciones,

donde los dos o más subconjuntos están configurados para manifestar propiedades fluorescentes distintas, propiedades magnéticas distintas, o propiedades fluorescentes y magnéticas distintas;

- la iluminación de dos o más subconjuntos de microesferas dentro de la cámara de visualización;

- la detección de la fluorescencia emitida por las microesferas (10) por parte de unos sistemas de detección (28, 30, 32) y / o la detección de la luz difundida por las microesferas (10) por parte de un sistema de detección (26);

- la determinación de una identidad de las microesferas en base a las señales de salida que responden a la fluorescencia emitida por las microesferas (10), y

- la determinación de una reacción que está teniendo o ha tenido lugar sobre la superficie de las microesferas en base a las mediciones de la fluorescencia de las microesferas.

6.- El uso de la reivindicación 5,

caracterizado porque la etapa de depósito del ensayo dentro de la cámara del sistema de medición de ensayos comprende el depósito del ensayo dentro de una cubeta de un citómetro de flujo.

7.- El uso de la reivindicación 5,

caracterizado porque

la etapa de iluminación de los dos o más subconjuntos de microesferas dentro de la cámara de visualización comprende la iluminación de los dos o más subconjuntos de microesferas (10) con múltiples fuentes (14) de luz.

8.- El uso de la reivindicación 5,

caracterizado porque

comprende así mismo la detección de la luz difundida por las microesferas (10) y la determinación de un diámetro o tamaño de las microesferas (10).

5 9.- El uso de la reivindicación 5,

caracterizado porque

comprende así mismo la detección de la luz difundida por las microesferas (10) y la identificación de más de una microesfera (10) que estén pegadas entre sí o que pasen por una zona de iluminación aproximadamente al mismo tiempo.

10 10.- El uso de la reivindicación 5,

caracterizado porque

la etapa de depósito del ensayo dentro de la cámara del sistema de medición de ensayos comprende el depósito del ensayo dentro de una cámara de visualización dentro de un sistema de formación de imágenes estático.

11.- Un procedimiento para la formación de microesferas que manifiesta propiedades magnéticas, que comprende:

15 - la combinación de microesferas centrales (46) con un material magnético (44), de tal manera que el material magnético (44) se acopla a una superficie de las microesferas centrales (46) para formar unas microesferas centrales magnetizadas (46); y

20 - la combinación de las microesferas centrales magnetizadas (46) con uno o más materiales polimerizables, de tal manera que los uno o más materiales polimerizables forman una capa (48) de polímero que rodea las microesferas centrales magnetizadas (46) formando de esta manera las microesferas (10) que manifiestan propiedades magnéticas,

caracterizado porque un 50% o menos de la superficie de las microesferas centrales (46) está cubierto por el material magnético (44) que comprende partículas o agregados de partículas que tienen un tamaño de 10 nm a 1000 nm y **porque** comprende así mismo la separación de las partículas magnéticas por tamaños en un primer grupo y en un segundo grupo, en el que una porción sustancial de las partículas magnéticas del primer grupo tiene un tamaño de 10 nm o mayor, en el que una porción sustancial de las partículas magnéticas del segundo grupo tiene un tamaño de 10 nm o menor, y en el que el material magnético (44) combinado con las microesferas centrales (46) comprende el primer grupo de partículas magnéticas.

12.- El procedimiento de la reivindicación 11,

30 **caracterizado porque**

comprende así mismo la combinación de las microesferas formadas (10) con un material magnético adicional (44), de tal manera que el material magnético adicional (44) se acopla con una superficie exterior de la capa (48) de polímero y forma una capa adicional (52) de polímero que rodea el material magnético adicional.

13.- El procedimiento de la reivindicación 11,

35 **caracterizado porque**

comprende así mismo el hinchado de las microesferas formadas (10) dentro de un disolvente que contiene fluorocromo, de tal manera que el fluorocromo migra hacia el interior de las microesferas formadas (10) y la modificación de una o más propiedades del disolvente que contiene fluorocromo de tal manera que las microesferas formadas (10) se contraen atrapando de esta forma el fluorocromo dentro de las microesferas formadas (10).

40 14.- El procedimiento de la reivindicación 11,

caracterizado porque

comprende así mismo la incorporación de uno o más fluorocromos dentro de las microesferas centrales (46) antes de la combinación de las microesferas centrales (46) con el material magnético (44).

15.- El procedimiento de la reivindicación 11,

45 **caracterizado porque**

comprende así mismo el acoplamiento de uno o más grupos funcionales con una superficie exterior de la capa (48) de polímero.

16.- El procedimiento de la reivindicación 11,

caracterizado porque

5 la capa de polímero se forma en ausencia de agentes tensoactivos y estabilizadores.

10

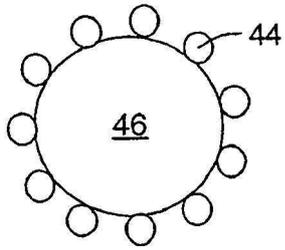


Fig. 2

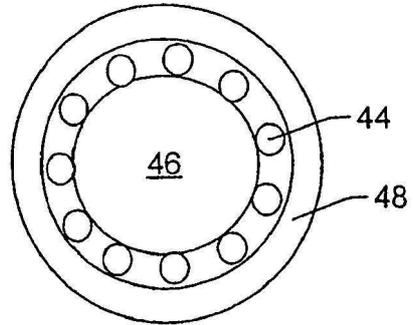


Fig. 3

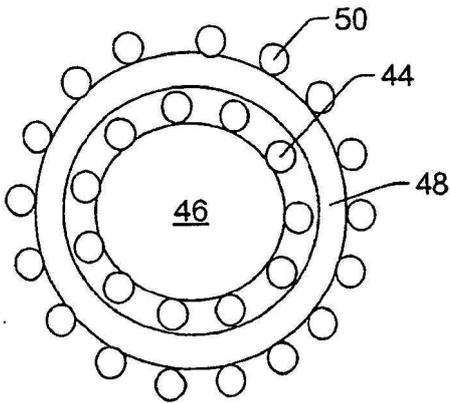


Fig. 4

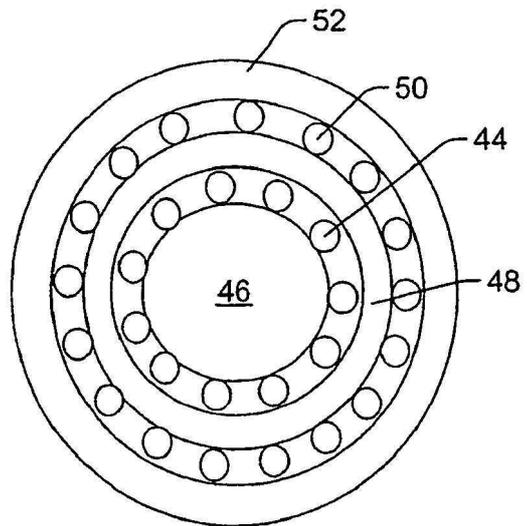


Fig. 5