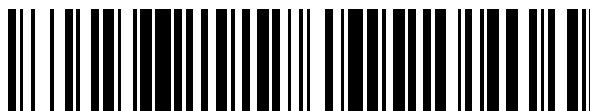


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 640**

51 Int. Cl.:

**C08J 3/215** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2004 E 04703983 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1594628**

54 Título: **Procedimiento para controlar la carga de soluto de micropartículas poliméricas**

30 Prioridad:

**21.01.2003 US 348165**

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

**31.10.2013**

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD (100.0%)  
35 TECHNOLOGY DRIVE, SUITE 100  
WARREN, NEW JERSEY 07059, US**

72 Inventor/es:

**BANERJEE, SUKANTA;  
GEORGESCU, CECILIA y  
SEUL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 427 640 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

**PROCEDIMIENTO PARA CONTROLAR LA CARGA DE SOLUTO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a un procedimiento para modular la carga de tinte de micropartículas poliméricas.

**Antecedentes de la invención**

10 Las partículas poliméricas que contienen un soluto retenido, por ejemplo tinte, se usan ampliamente como marcadores para biomoléculas y como referencia interna y patrones de calibración para procedimientos de detección de ensayo tales como citometría de flujo. Se han descrito cuatro procedimientos generales en la técnica anterior para producir partículas poliméricas fluorescentes: (A) copolimerización de tinte y monómero; (B) reparto de tintes hidrosolubles u oleosolubles en partículas preformadas; (C) funcionalización superficial de partículas preformadas y (D) encapsulación de gotitas de tinte. Además, se han usado también procedimientos de polimerización para preparar partículas de núcleo y cubierta, es decir, micropartículas compuestas por un núcleo polimérico y una cubierta polimérica.

15

A. Procedimientos basados en la copolimerización

20 Las micropartículas fluorescentes pueden sintetizarse mediante la polimerización de unidades monoméricas formando micropartículas en presencia de tintes fluorescentes. La patente de EE.UU. 4.326.008 de Rembaum (1982) describe la síntesis de micropartículas fluorescentes mediante la copolimerización de un monómero acrílico funcionalizado con un comonómero fluorescente polimerizable. El procedimiento requiere generalmente una molécula de tinte polimerizable. Dichos procedimientos padecen generalmente el inconveniente de la posible inhibición de la polimerización por el tinte fluorescente y/o el apagamiento de la fluorescencia por los constituyentes reactivos de la reacción de polimerización.

25 El documento US 5.244.630 A describe un dispositivo desechable adecuado para efectuar ensayos de diagnóstico en fase sólida automatizados que emplea micropartículas para complejar un analito.

El documento US 5.288.577A hace referencia a un revelador de tipo seco que está compuesto por partículas de tóner sustancialmente esféricas eléctricamente aislantes y partículas portadoras.

30 El documento US 6.503.680 B1 da a conocer un proceso que utiliza una composición de látex estándar (universal) y que implica el reparto de agente de transferencia de drenaje y la polimerización en emulsión, que proporcionan un polímero de látex con un amplio intervalo de propiedades moleculares.

35 El documento US 5.301.044 A se refiere a materiales, procedimientos y sistemas de copia en los que se obtiene información mediante al menos un identificador contenido en materiales de marcado que forman una imagen que se escanea por un sistema de copia.

El documento US 6.494.924 B1 da a conocer colorantes precipitados no hidrosolubles en forma dispersa coloidal.

40 El documento US 2002/0032252 A1 hace referencia a una dispersión de partículas coloreadas, a tinta para registro por inyección de tinta usando la misma y a un procedimiento de registro por inyección de tinta.

La patente de EE.UU. 4.267.235 de Rembaum (1981) describe la síntesis de microesferas de poliglutaraldehído usando polimerización en suspensión. Se usa isotiocianato de fluoresceína (FITC) cosolubilizado para crear microesferas

fluorescentes. La polimerización por condensación en suspensión del monómero con moléculas de tinte cosolubilizadas, aunque evita en gran medida la destrucción del tinte y la inhibición de la polimerización, genera una distribución amplia de tamaño de partícula y por tanto no es una vía adecuada para la producción de microesferas fluorescentes monodispersadas.

5 La patente de EE.UU. 5.073.498 de Schwartz y col. (1991) describe un proceso para preparar micropartículas fluorescentes mediante polimerización por siembra. Se disuelven uno o más tintes fluorescentes hidrófobos en una disolución que contiene monómero e iniciador. Se añade la disolución a micropartículas prehinchadas. La patente da a conocer procedimientos que permiten la introducción de tres tintes diferentes en una partícula. El procedimiento padece el inconveniente de la posible inhibición de la polimerización por el tinte fluorescente, o a la inversa el apagamiento de la fluorescencia por el proceso de polimerización.

10

La polimerización en emulsión multietapa se ha empleado para preparar partículas de núcleo y cubierta sin grupos funcionales superficiales. La patente de EE.UU. 5.952.131 de Kumaceheva y col. da a conocer un procedimiento para preparar partículas de núcleo y cubierta teñidas. El procedimiento está basado en múltiples etapas de polimerización semicontinua de una mezcla de dos monómeros (metacrilato de metilo y dimetacrilato de etilenglicol) y un tinte fluorescente (metacrilato de metilo marcado con 4-amino-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol). Las partículas se encapsulan entonces con una cubierta externa mediante la copolimerización de metacrilato de metilo y metacrilato de butilo en presencia de un agente de transferencia de cadena, dodecilmercaptano. Kumaceheva y col. no preparan ni tienen como objeto la inclusión de un producto polimérico de núcleo y cubierta con grupo funcional superficial.

15

20 La patente de EE.UU. 4.613.559 de Ober y col. da a conocer un procedimiento para preparar tóner coloreado por hinchamiento. Se preparan partículas de poliestireno (de 5,5  $\mu\text{m}$ ) mediante polimerización en dispersión de estireno en presencia de etanol, poli(ácido acrílico), Methylcellosolve y peróxido de benzoílo. El hinchamiento se efectúa dispersando el poliestireno en una disolución acuosa de dodecilsulfato de sodio y acetona. Las partículas coloreadas se obtienen añadiendo una disolución de tinte emulsionado (Passaic Oil Red 2144 en cloruro de metileno emulsionado con una disolución acuosa de dodecilsulfato de sodio) a la dispersión de partículas.

25

Se han empleado procedimientos de polimerización para preparar partículas de núcleo y cubierta que contienen grupos funcionales superficiales. La patente de EE.UU. 5.395.688 de Wang y col. da a conocer partículas poliméricas fluorescentes magnéticamente sensibles que comprenden un núcleo polimérico recubierto con una capa de polímero que contiene óxido metálico magnéticamente sensible. La cubierta polimérica final se sintetiza con un monómero funcional para facilitar el acoplamiento covalente con materiales biológicos. El procedimiento de Wang y col. está basado en tres etapas: (1) preparación de partículas de núcleo fluorescentes; (2) encapsulación de óxido metálico en una cubierta de poliestireno formada sobre el núcleo fluorescente mediante polimerización de radicales libres en ausencia de emulsionante pero con un exceso de iniciador y (3) recubrimiento de las partículas fluorescentes magnéticas con una capa de polímero funcional. El polímero funcional tiene grupos carboxilo, amino, hidroxilo o sulfónico. Wang y col. no describen un procedimiento para obtener el núcleo coloreado y tampoco se enfrentan al problema de la destrucción del tinte durante el proceso de polimerización por radicales libres.

30

35

La patente de EE.UU. 4.829.101 de Kraemer y col. da a conocer partículas fluorescentes de 2  $\mu\text{m}$  obtenidas mediante polimerización de núcleo y cubierta. El núcleo se obtiene a 80 °C mediante la polimerización de una mezcla de metacrilato de isobutilo, metacrilato de metilo y dimetacrilato de etilenglicol mediante iniciación con persulfato de amonio. La cubierta se sintetiza sobre el núcleo mediante adición semicontinua, en una primera etapa, de una mezcla de los mismos monómeros que contienen un tinte fluorescente (verde flúor-dorado). Hacia el final de la reacción, se añaden dos mezclas monoméricas diferentes durante un periodo de una hora: una primera mezcla que contiene

40

metacrilato de metilo, bismetacrilato de etilenglicol y metacrilato de glicidilo, y una segunda mezcla que contiene metacrilamida e iniciador. Se inicia la polimerización con ácido 4,4'-azobis(cianoaléxico).

Okubo y col., *Colloid Polym. Sci.* 269: 222-226 (1991), Yamashita y col., *Colloids and Surfaces A.*, 153: 153-159 (1999) y la patente de EE.UU. 4.996.265 describen la producción de partículas poliméricas monodispersadas de tamaño micrométrico mediante polimerización por dispersión con siembra. Las partículas de siembra de polímero se prehinchan con grandes cantidades de monómero antes de la polimerización por siembra. El hinchamiento se lleva a cabo mediante la adición gota a gota lenta y continua de agua a una mezcla de etanol-agua que contiene las partículas de siembra, monómeros, estabilizador e iniciador. La adición de agua reduce la solubilidad del monómero en la fase continua, conduciendo a la precipitación y posterior absorción del monómero sobre o en las partículas poliméricas de siembra. El monómero absorbido en la partícula polimérica de siembra se polimeriza entonces, produciendo grandes partículas poliméricas monodispersadas.

#### B. Reparto de tintes hidrosolubles u oleosolubles

Las partículas fluorescentes pueden producirse permitiendo a moléculas de tinte repartirse en micropartículas prehinchadas según una técnica descrita originalmente por L.B. Bangs (*Uniform Latex Particles*; Seragen Diagnostics Inc., 1984, pág. 40). El proceso implica la disolución de una molécula de tinte o mezcla de molécula de tinte en un disolvente o mezcla de disolventes de elección que contienen micropartículas poliméricas. La absorción del disolvente por las micropartículas conduce al hinchamiento, permitiendo que las micropartículas absorban una porción del tinte presente en la mezcla de disolventes. El proceso de tinción se termina habitualmente retirando el disolvente. El nivel de reparto de tinte se controla ajustando la concentración de tinte, y en el caso de una pluralidad de tintes, la abundancia relativa de los tintes individuales. Las micropartículas teñidas de esta manera son bastante estables y uniformes. Sin embargo, en muchos casos, dependiendo de la elección del sistema disolvente, se requiere un gran exceso de tinte para alcanzar el reparto deseado, conduciendo a una pérdida significativa de material de tinte costoso.

La patente de EE.UU. 5.723.218 de Haugland y col. (1998), la patente de EE.UU. 5.786.219 de Zhang y col. (1998), la patente de EE.UU. 5.326.692 de Brinkley y col. (1994) y la patente de EE.UU. 5.573.909 de Singer y col. (1996) describen protocolos para producir diversas partículas coloreadas fluorescentemente mediante hinchamiento y reparto de tinte en disolvente orgánico y mezclas de disolventes orgánicos. Se describen diversos tipos de partículas fluorescentes, por ejemplo, partículas fluorescentes que contienen múltiples tintes, partículas que exhiben desplazamientos de Stokes controlables y potenciados y partículas que ostentan zonas esféricas de fluorescencia.

La solicitud de patente internacional WO 99/19515 de Chandler y col. (1997) describe un procedimiento mejorado para la producción de una serie de microesferas codificadas ratiométricamente con dos tintes. Se reseña un protocolo para la producción de 64 microesferas codificadas diferentemente. Se da a conocer también una composición de baño de hinchamiento que usa una mezcla de disolvente orgánico y alcohol (en condiciones anhidras).

La patente de EE.UU. 5.266.497 de Matsudo y col. (1993) describe un procedimiento para generar una partícula polimérica marcada con tinte que usa un tinte hidrófobo disuelto en un disolvente orgánico emulsionado en agua. Las partículas teñidas se usaban con fines inmunocromatográficos.

La patente de EE.UU. 4.613.559 de Ober y col. (1986) describe la síntesis de partículas poliméricas coloreadas usando tintes oleosolubles. El procedimiento dado a conocer usa una emulsión de una disolución de tinte en diclorometano en una mezcla de agua y acetona para colorear las partículas.

### C. Funcionalización de superficies internas o externas de micropartículas

La producción de partículas fluorescentes por funcionalización superficial implica la unión covalente de uno o más tintes con grupos reactivos sobre la superficie de una micropartícula preformada. Esto deja las moléculas de tinte expuestas al entorno, lo que puede acelerar la descomposición del tinte. Además, la funcionalización superficial a menudo vuelve la superficie de la partícula muy hidrófoba, invitando a una adsorción no específica indeseable y, en algunos casos, a la pérdida de actividad de las biomoléculas colocadas en o cerca de la superficie de la partícula. Estos problemas pueden evitarse uniendo una partícula pequeña teñida, en lugar de una molécula de tinte, a la superficie de una partícula portadora. La eficacia de este procedimiento para generar grandes conjuntos de partículas codificadas a partir de un pequeño número de tintes (codificación por relación) no está clara.

La patente de EE.UU. 4.487.855 de Shih (1984), la patente de EE.UU. 5.194.300 de Cheung (1993) y la patente de EE.UU. 4.774.189 de Schwartz (1988) dan a conocer procedimientos para la preparación de microesferas coloreadas o fluorescentes mediante la unión covalente de uno cualquiera o una pluralidad de tintes con grupos reactivos sobre la superficie de la partícula preformada. Battersby y col., "Toward Larger Chemical Libraries: Encoding with Fluorescent Colloids in Combinatorial Chemistry" *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 2138-2139; Grondahl y col., "Encoding Combinatorial Libraries : A Novel Application of Fluorescent Silica Colloids", *Langmuir* 2000, 16, 9709-9715 y la patente de EE.UU. 6.268.222 de Chandler y col. (2001) describen un procedimiento de producción de microesferas fluorescentes mediante la unión a la superficie de una micropartícula portadora de un conjunto de partículas poliméricas menores que están teñidas.

### D. Procedimientos de encapsulación

La formación de partículas fluorescentes por encapsulación utiliza una disolución de un polímero preformado y uno o más tintes. En un enfoque, se dispensa la disolución en forma de una gotita usando una boquilla vibradora o inyección y se retira el disolvente, produciendo partículas poliméricas que encapsulan el tinte. Este proceso requiere un equipo de procesamiento especializado y ostenta solo un rendimiento limitado. Como alternativa, se emulsiona una mezcla de tintes poliméricos en un disolvente de alto punto de ebullición y se evapora la disolución, proporcionando partículas de tinte encapsuladas en polímero. Este proceso genera a menudo partículas no esféricas de distribución de tamaño amplia.

La patente de EE.UU. 3.790.492 de Fulwyler y col. (1974) da a conocer un procedimiento para producir microesferas fluorescentes uniformes a partir de un polímero predisuelto y una disolución de tinte usando inyección. La patente de EE.UU. 4.717.655 de Fulwyler y col. (1988) da a conocer un proceso que incluye dos tintes en relaciones predesignadas en una micropartícula polimérica para producir cinco partículas bicolors distinguibles.

Los diversos procedimientos de la técnica anterior para producir micropartículas fluorescentes padecen ciertas desventajas. Cuando se usan disolventes de fuerte hinchamiento, las micropartículas deben estar reticuladas para evitar que se disgreguen y deformen en la disolución de tinte. Este condicionante representa una grave limitación, puesto que la mayoría de tintes requiere para su disolución a cualquier concentración razonable sistemas disolventes en que la mayoría de partículas poliméricas de interés, notablemente partículas de poliestireno, se disuelvan también. Estas consideraciones han restringido la aplicación del hinchamiento por disolvente en la técnica anterior a micropartículas estabilizadas químicamente ("reticuladas"). Esta restricción introduce una dificultad y coste adicionales a la síntesis de micropartículas; las partículas altamente reticuladas son a menudo muy difíciles de sintetizar. También la restricción a partículas reticuladas limita el grado de hinchamiento de la micropartícula y por tanto el grado de incorporación del tinte. Específicamente, la aplicación de protocolos de hinchamiento por disolvente de la técnica anterior realizada con

5 micropartículas reticuladas limita generalmente la penetración del tinte a la capa externa de la micropartícula, imposibilitando así la tinción uniforme de todo el volumen interior de las partículas individuales e imposibilitando también generalmente la consecución de altos niveles de incorporación de tinte. Lo que se necesita es un proceso que pueda utilizar partículas no reticuladas así como reticuladas. Lo que se necesita es un procedimiento que proporcione micropartículas poliméricas no reticuladas cargadas con tinte que puedan usarse, por ejemplo, para preparar colecciones de micropartículas teñidas que tengan diferentes tintes y/o diferentes cantidades de tinte.

10 El grado de hinchamiento de partícula en los procedimientos basados en el hinchamiento por disolvente de la técnica anterior determina el índice de transporte de tinte a las partículas. Las barreras de difusión conducen a una distribución de tinte no uniforme en las micropartículas. Por esta razón, se requiere un micromezclado intenso (causado por un mezclado mecánico eficaz o por sonicación) para producir poblaciones de micropartículas teñidas uniformemente. Estos procedimientos de mezclado vigoroso, aunque eficaces para preparación a escala de laboratorio, no se adaptan fácilmente a mayores escalas. Por ejemplo, la sonicación requiere a menudo un equipo especializado tal como sonificadores de sonda, y limita la terminación en paralelo de reacciones de tinción múltiples. Lo que se necesita es un proceso de fabricación de partículas teñidas que requiera un mezclado menos vigoroso o sin mezclado, y que permita efectuar reacciones de tinción en paralelo.

20 Las micropartículas teñidas mediante los procedimientos de hinchamiento de la técnica anterior son vulnerables a la exposición posterior a disolventes, que puede causar una pérdida sustancial de tinte y puede imposibilitar la ejecución de protocolos que proporcionan etapas de incorporación de tinte secuenciales múltiples.

25 En los procedimientos de la técnica anterior, el grado de reparto de tinte en la matriz polimérica está controlado por la variación explícita de la concentración inicial de tinte en la disolución de tinte. Este enfoque, aunque permite la realización de múltiples niveles distintos de inclusión de tinte, padece una serie de desventajas. Por ejemplo, frecuentemente no son alcanzables altos niveles de tinción debido a la solubilidad limitada del tinte en el baño. Incluso cuando la solubilidad no es un problema, los bajos coeficientes de reparto de muchos tintes requieren un gran exceso de tinte en disolución, introduciendo el riesgo de efectos dañinos sobre los ensayos bioanalíticos posteriores. De hecho, cuando se preparan perlas modificadas con carboxilato mediante procedimientos de hinchamiento por disolvente de la técnica anterior, la función carboxilo puede volverse inoperante, y puede no estar ya disponible para funcionalización por acoplamiento covalente con otros grupos químicos. Además, se pierde valioso material de tinte en cantidades significativas. Lo que se necesita es un proceso para preparar micropartículas teñidas, y micropartículas fluorescentes en particular, que consiga la incorporación de tinte incluso a partir de formulaciones de tinte poco soluble/disolvente. Lo que se necesita es un proceso que permita un control preciso del nivel de carga del soluto (tinte) en micropartículas poliméricas durante el proceso de tinción.

35

### **Resumen de la invención**

Según una realización, se proporciona un procedimiento para modular la carga de un tinte en micropartículas poliméricas.

La invención se describe mediante las siguientes realizaciones:

- 40 1. Un procedimiento para modular la carga de tinte de micropartículas poliméricas que comprende:
- a) proporcionar:
    - i. al menos un primer disolvente en el que sean solubles el tinte y el polímero de micropartícula;

- 5
- ii. al menos un segundo disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dichos primer y segundo disolventes inmiscibles o como máximo parcialmente miscibles;
  - iii. al menos un tercer disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dicho tercer disolvente miscible con el primer y segundo disolventes;
- b) formar una suspensión de dichas micropartículas poliméricas en un volumen designado de una mezcla que comprende al menos un segundo disolvente y al menos un tercer disolvente;
- c) añadir a dicha suspensión de micropartículas poliméricas una disolución que comprende un tinte disuelto en dicho primer disolvente, con lo que el soluto se capta por las micropartículas;
- 10 d) añadir de forma continua o semicontinua el segundo disolvente a la suspensión de micropartículas para modular de forma continua o semicontinua la concentración de tinte en la micropartícula y controlar así la captación y concentración final de tinte en las micropartículas.
2. El procedimiento según la realización 1 que incluye adicionalmente la etapa de retirar al menos una porción de dichas micropartículas de la suspensión en un intervalo de tiempo durante el transcurso de dicha adición del segundo disolvente, proporcionando conjuntos de micropartículas que difieren en la concentración de tinte.
3. Un procedimiento de producción de micropartículas poliméricas teñidas que comprende:
- a) proporcionar:
- 20 i. al menos un primer disolvente en el que sean solubles el tinte y el polímero de micropartícula;
  - ii. al menos un segundo disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dichos primer y segundo disolventes inmiscibles o como máximo parcialmente miscibles;
  - 25 iii. al menos un tercer disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dicho tercer disolvente miscible con el primer y segundo disolventes;
- b) formar una suspensión de dichas micropartículas poliméricas en un volumen designado de una mezcla que comprende al menos un segundo disolvente y al menos un tercer disolvente;
- c) añadir a dicha suspensión de micropartículas poliméricas una disolución que comprende el tinte disuelto en dicho primer disolvente, con lo que el tinte se capta por las micropartículas proporcionando una suspensión de mezcla maestra de micropartículas caracterizada por una primera concentración de dicho tinte en las micropartículas;
- 30 d) crear dos o más alícuotas a partir de dicha suspensión de mezcla maestra de micropartículas que contengan cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente para cambiar la cantidad de reparto de tinte en micropartículas poliméricas en dichas alícuotas; y
- 35 e) incubar las alícuotas de suspensión de micropartículas durante un periodo de tiempo de modo que la cantidad de reparto de tinte en las micropartículas, para una concentración de tinte inicial dada en la disolución de tinte, se determine por la cantidad del segundo disolvente añadida a las alícuotas de suspensión de micropartículas.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de creación de dichas dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente comprende dividir la mezcla maestra de suspensión de micropartículas en dos o más alícuotas, y añadir cantidades seleccionadas del segundo disolvente a dichas alícuotas.
5. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de creación de dichas dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente comprende

añadir de forma continua o semicontinua el segundo disolvente a la mezcla maestra de suspensión de micropartículas y retirar al menos una porción de dicha mezcla maestra en un intervalo de tiempo durante el transcurso de dicha adición del segundo disolvente, formando dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente.

- 5 6. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el tinte es un tinte fluorescente.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tinte es un tinte hidrófobo.
8. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tinte se selecciona del grupo consistente en tintes de estirilo, tintes de pirrometano, tintes de cumarina y combinaciones de los mismos.
9. El procedimiento según la realización 7, en el que las micropartículas comprenden un polímero hidrófobo.
- 10 10. El procedimiento según la realización 9, en el que el polímero es un homopolímero o copolímero que comprende un monómero que contiene vinilo.
11. El procedimiento según la realización 9, en el que el polímero se selecciona del grupo consistente en homopolímeros o copolímeros de poliestireno, poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), polietilenglicol, poli(metacrilato de hidroxietilo), poliviniltolueno, polidivinilbenceno y combinaciones de los mismos.
- 15 12. El procedimiento según la realización 11, en el que el polímero es poliestireno o un copolímero del mismo que contiene al menos un 50 % en peso de unidades de monómero de estireno.
13. El procedimiento según la realización 12, en el que el polímero es un copolímero de estireno/ácido metacrílico.
14. El procedimiento según la realización 10, en el que el polímero está reticulado.
15. El procedimiento según la realización 9, en el que las micropartículas tienen un diámetro de aproximadamente
- 20 0,1 a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .
16. El procedimiento según la realización 15, en el que las partículas están monodispersadas.
17. El procedimiento según la realización 9, en el que la concentración de tinte presente en la suspensión de micropartículas formada poniendo en contacto las micropartículas con dicha disolución de tinte es de aproximadamente 10  $\mu\text{g/g}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{g/g}$ , basado en el peso de la suspensión de micropartículas.
- 25 18. El procedimiento según la realización 9, que comprende un disolvente en el que el primer disolvente se selecciona del grupo consistente en cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, dioxano, ciclohexano, benceno, tolueno, acetato de butilo, hidrocarburos alifáticos clorados inferiores y combinaciones de los mismos; el segundo disolvente es agua y el tercer disolvente se selecciona del grupo consistente en acetona, alcoholes inferiores y combinaciones de los mismos.
- 30 19. El procedimiento según la realización 18, en el que el primer disolvente es cloruro de metileno o diclorometano, y el segundo disolvente es un alcohol.
20. El procedimiento según la realización 16, en el que el tercer disolvente es alcohol.
21. El procedimiento según la realización 3, en el que la micropartícula es una micropartícula de núcleo y cubierta que comprende un núcleo central que comprende uno o más polímeros de núcleo rodeado por una cubierta que
- 35 comprende uno o más polímeros de cubierta.
22. El procedimiento según la realización 21, en el que el polímero de núcleo comprende un copolímero de estireno y un monómero más hidrófilo que el estireno.
23. El procedimiento según la realización 21, en el que el polímero de núcleo comprende ácido metacrílico.
24. El procedimiento según la realización 3, en el que al menos una porción de las micropartículas es
- 40 magnéticamente sensible.
- (e) incubar las alícuotas de suspensión de micropartículas durante un periodo de tiempo para que la cantidad de tinte que se reparte en las micropartículas, para una concentración inicial de tinte dada en la disolución de tinte, se controle por la cantidad de segundo disolvente añadido a las alícuotas de suspensión de micropartículas.



Se proporciona también un procedimiento automatizado para producir micropartículas poliméricas teñidas. El procedimiento comprende:

- 5 (a) proporcionar una suspensión de mezcla maestra de micropartículas que comprende micropartículas caracterizada por una primera concentración de tinte en las micropartículas, suspendidas en una disolución de tinte que comprende al menos un tinte y un sistema disolvente que comprende:
- (i) al menos un primer disolvente en el que sean solubles el tinte y el polímero de micropartícula;
- (ii) al menos un segundo disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dichos primer y segundo disolventes inmiscibles o como máximo parcialmente miscibles;
- 10 (iii) al menos un tercer disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dicho tercer disolvente miscible con el primer y segundo disolventes;
- (b) crear dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas a partir de dicha suspensión de mezcla maestra, estando caracterizada cada alícuota de suspensión por micropartículas de dicha primera concentración de tinte suspendidas en dicha disolución de tinte;
- 15 (c) ejecutar, al menos una vez por cada alícuota creada, la siguiente secuencia de etapas para transformar el estado del tinte de micropartícula en cada alícuota a partir de dicha primera concentración de tinte en una segunda concentración de tinte seleccionada:
- (i) calcular, para la segunda concentración de tinte seleccionada:
- 20 (1) la cantidad de tinte disuelta en dicho primer disolvente, y
- (2) la cantidad del segundo disolvente que se requiere añadir a dicha alícuota para alcanzar dicha segunda concentración de tinte de micropartícula seleccionada; y

### **Descripción de las figuras**

25 La Fig. 1(a) es una representación esquemática de una disolución de disolventes ternaria para uso en la presente invención.

La Fig. 1(b) es un diagrama de la secuencia de etapas del procedimiento dado a conocer.

30 La Fig. 2 es una gráfica tridimensional del nivel de incorporación de tinte a las micropartículas poliméricas en un baño de disolvente según la presente invención en función de tres variables. (X) es la masa de tinte en el baño (representada como la concentración de tinte,  $C^{(s)}$ , multiplicada por el volumen de tinte añadido al baño  $V^{(s)}$ ) dividida entre el volumen de las micropartículas  $V^{(p)}$ . (Y) es la fracción volumétrica de las micropartículas en el baño,  $\varphi^{(p)}$ , dividida entre la fracción volumétrica del disolvente,  $\varphi^{(s)}$ . (Z) es la concentración de tinte contenida en las micropartículas,  $C^{(p)}$ . Por tanto, el eje

35 (Z) representa la masa de tinte repartida en las micropartículas dividida entre el volumen de las micropartículas. La fracción volumétrica de las partículas,  $\varphi^{(p)}$ , se da por la ecuación  $\varphi^{(p)} = (1 - \varphi^{(s)})$ . La línea (P<sub>0</sub>) en el plano (X, Z) representa el reparto de tinte en función de X en las micropartículas en ausencia de disolvente regulador. La línea (P<sub>1</sub>) representa el reparto de tinte en las micropartículas en función de la masa de tinte en el baño (X) en presencia de una fracción volumétrica,  $\varphi$ , de disolvente regulador.

40 La Fig. 3(a) es un diagrama esquemático de un procedimiento de procesamiento en paralelo para la producción de n subpoblaciones ( $F_n(S_n)$ ) de micropartículas teñidas fluorescentemente a partir de n sistemas de disolvente/suspensiones de micropartículas  $B_n$ . Cada suspensión contiene una cantidad designada  $S_n$  de disolvente regulador.

5 La Fig. 3(b) es un diagrama esquemático de un procedimiento de procesamiento en serie para producir n subpoblaciones de micropartículas teñidas fluorescentemente a partir de una sola reacción. [B] representa una mezcla maestra preincubada de sistema disolvente/suspensión de micropartículas a la que se alimenta una corriente continua de disolvente regulador.  $F_n(S_n)$  representa fracciones de la suspensión de micropartículas retiradas de la mezcla maestra a tiempos  $t = t_{Fn}$ . Las fracciones contienen cantidades  $S_n$  de disolvente regulador.

10 La Fig. 3(c) es un diagrama esquemático de un procedimiento para producir n subpoblaciones  $F_n(S_n)$  de micropartículas teñidas fluorescentemente mediante una combinación de procesamiento en serie y en paralelo. [B] representa una mezcla maestra preincubada de sistema de disolvente/suspensión de micropartículas a la que se alimenta una cantidad conocida de disolvente regulador,  $S(t_F)$ . Se divide entonces la mezcla maestra en n alícuotas diferentes,  $B_n$ , a las que se añaden n cantidades diferentes designadas de disolvente regulador  $\delta S_n$ .

15 La Fig. 3(d) es un diagrama esquemático de un procedimiento para producir  $m \times n$  subpoblaciones  $F_m(S_m, D_n)$  de micropartículas teñidas fluorescentemente mediante procesamiento en serie seguido de en paralelo, usando una combinación de ajuste por disolvente y adición de tinte.  $S_m$  indica las cantidades de disolvente regulador, y  $D_n$  las cantidades de tinte fluorescente añadidas a las diversas subpoblaciones  $F_m(S_m, D_n)$ .

La Fig. 4 es una gráfica de la fluorescencia de la recolección de partículas preparada según el ejemplo 1 siguiente.

20 La Fig. 5. es una gráfica de la fluorescencia de la recolección de partículas preparadas según el ejemplo 2 siguiente.

La Fig. 6(a) es una curva de calibración de fluorescencia que representa la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 512 nm frente a la concentración de tinte para el tinte fluorescente verde éster succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-pentanoico disuelto en etanol.

25

La Fig. 6(b) es una gráfica de la variación de la cantidad calculada de tinte fluorescente verde atrapado en las partículas en función de la fracción volumétrica de agua utilizada en la preparación de las partículas de los Ejemplos 3-6.

30 La Fig. 6(c) es una gráfica de la variación de la cantidad calculada de tinte fluorescente verde atrapada en las partículas en función de la intensidad de tinte fluorescente verde para las partículas de los Ejemplos 3-6.

La Fig. 6 (d) es una gráfica de la variación del coeficiente de reparto del tinte fluorescente verde en función de Y (en que  $Y = (1 - \varphi_s) / \varphi_s$ ).

35 La Fig.7 es una gráfica de la fluorescencia de la recolección de partículas preparada según el Ejemplo 26.

La Fig. 8 es una gráfica de la fluorescencia emitida por las partículas producidas según el Ejemplo 30.

La Fig. 9 es una gráfica de la fluorescencia emitida por las partículas producidas según el Ejemplo 31.

40 **Descripción detallada de la invención**

La distribución de un soluto entre dos fases inmiscibles designadas 1 y 2 está regida por el coeficiente de reparto K, que representa la relación de las cantidades en equilibrio de soluto (N) en las dos fases, es decir,  $K = [N_1/N_2]$ .

La presente invención proporciona procedimientos para regular el coeficiente de reparto, K, que rige la distribución de un tinte entre dos fases sustancialmente inmiscibles, es decir, la distribución entre una fase líquida continua y una fase sólida dispersada que comprende partículas sólidas dispersadas en la fase líquida continua. Por tanto, la invención proporciona la introducción controlada de tintes en micropartículas poliméricas en sistemas de disolventes.

5

La invención se ilustra de aquí en adelante por el reparto de tinte (solute) entre dos fases sustancialmente inmiscibles, a saber una población de micropartículas poliméricas preformadas (fase 1) y una mezcla de disolventes ternaria homogénea (fase 2). Las micropartículas comprenden una fase sólida. La mezcla de disolventes comprende una fase líquida. El tinte puede ser cualquier sustancia capaz de conferir un color deseado o fluorescencia deseada a una micropartícula polimérica. Por tanto, el tinte puede comprender un cromóforo o un fluoróforo. La cantidad de tinte incorporada a las micropartículas se controla precisamente mediante el ajuste, para la concentración de tinte inicial dada, de la composición de la mezcla de disolventes ternaria. Como se ilustra a continuación, el procedimiento puede producir poblaciones de micropartículas teñidas con tinte distinguibles que contienen niveles predeterminados reproducibles de tinte, concretamente "codificación por tinte", con una variación intramuestral mínima del contenido de tinte.

15

El procedimiento de la presente invención introduce por tanto la composición de disolvente como un parámetro de control novedoso para la preparación de micropartículas teñidas al proporcionar una regulación cuantitativa, en un amplio intervalo, del coeficiente de reparto que rige la distribución de tinte entre el baño de tinte y las micropartículas. Específicamente, el coeficiente de reparto, K, del tinte con ajuste por disolvente obedece a la siguiente relación:  $K = a \exp(bY)$  en que  $Y = (1-\varphi_s)/\varphi_s$ ;  $\varphi_s$  indica la fracción volumétrica del disolvente y (a) y (b) son constantes.

20

La codificación por tinte según la presente invención es el resultado de la variación de la carga de tinte de las partículas. Se entiende por "carga" con respecto al tinte contenido en una micropartícula la cantidad y/o carácter del tinte incorporado a la micropartícula. La carga puede variar por tanto al menos una propiedad seleccionada de (i) la cantidad de tinte incorporada y (ii) la identidad del tinte incorporado. La codificación puede tomar por tanto la forma de variar la cantidad de un único tinte entre diferentes conjuntos de micropartículas, variar la naturaleza química del tinte (usando tintes diferentes o combinaciones de tintes diferentes) o ambos.

25

Se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1(a) una mezcla de disolventes ternaria homogénea según la presente invención para la preparación de micropartículas teñidas, particularmente micropartículas teñidas fluorescentemente. El disolvente n.º 1 es un disolvente fuerte tanto para el tinte como para el polímero del que se forman las micropartículas. El disolvente n.º 2, al que se hace referencia también en la presente memoria como "disolvente regulador", es un disolvente débil o no disolvente para tinte y polímero. El disolvente n.º 2 puede ser un disolvente acuoso, preferiblemente agua. Los disolventes n.º 1 y n.º 2 son inmiscibles o parcialmente miscibles entre sí. Un tercer disolvente, el disolvente n.º 3, es un disolvente débil o no disolvente para tinte y polímero, pero sirve como codisolvente con respecto a los disolventes n.º 1 y n.º 2 porque es miscible tanto con el disolvente n.º 1 como n.º 2. El disolvente n.º 3 puede ser un alcohol.

35

Los procedimientos de "hincharse" de la técnica anterior de incorporación de tinte a micropartículas están limitados por el estrecho intervalo de elecciones de disolventes adecuados para los tintes de interés, requiriendo generalmente el uso de partículas reticuladas. Estos procedimientos de la técnica anterior implican identificar un disolvente de elección en que el tinte sea soluble en un intervalo de concentraciones, y preparar una disolución de tinte de la concentración

40

deseada. Se pone en contacto entonces la disolución de tinte con las micropartículas poliméricas durante un periodo de tiempo que permita al tinte penetrar en las micropartículas.

5 Los procedimientos de hinchamiento de la técnica anterior de producción de partículas fluorescentes padecen una solubilidad de tinte limitada en el baño de tinte. Incluso cuando la solubilidad de tinte no es un problema, el bajo coeficiente de reparto de muchos tintes para el polímero requiere un gran exceso de valioso tinte fluorescente, que se pierde. En contraposición, la presente invención produce micropartículas de muy alto contenido de tinte, incluso a partir de formulaciones de tinte poco soluble/disolvente. Este aspecto de la invención refleja el hecho de que el tinte en el

10 En contraposición con los procedimientos basados en hinchamiento con disolvente de la técnica anterior, el procedimiento de incorporación de tinte de la presente invención puede usarse con igual eficacia para la tinción de partículas no reticuladas así como reticuladas. Se entiende por "reticulada", al describir una micropartícula que comprende un polímero, un polímero en que las cadenas se unen entre sí formando una estructura de red tridimensional. La reticulación puede llevarse a cabo durante el proceso de polimerización mediante el uso de un agente reticulante, es decir, un agente que tiene dos o más grupos capaces de reaccionar con grupos funcionales en la cadena polimérica. Los polímeros reticulados pueden prepararse también mediante la polimerización de monómeros con una funcionalidad media mayor de 2.

20 La invención proporciona por tanto, por primera vez, micropartículas cargadas con tinte que están compuestas por un polímero no reticulado. Esta es una mejora significativa, porque las partículas altamente reticuladas son a menudo muy difíciles de sintetizar. Además, al contrario que muchos procedimientos de tinción de partículas de la técnica anterior que se basan en el mezclado intenso para conseguir uniformidad en la tinción con tinte de las micropartículas, el presente procedimiento requiere solo una agitación suave. Se requiere la agitación suave simplemente para mantener

25 las partículas suspendidas. Esta es una mejora significativa frente a los procedimientos de la técnica anterior, porque el mezclado intenso de esos procedimientos requiere un equipo especializado y es difícil de aumentar de escala.

La reticulación polimérica restringe generalmente el hinchamiento de las micropartículas formadas a partir de polímeros reticulados, y evita también la penetración del tinte en la partícula. Como resultado, el tinte se restringe a una capa exterior fina de la micropartícula, y limita la carga de tinte. La capacidad de utilizar polímeros no reticulados como

30 material de micropartículas permite, por primera vez, la producción de micropartículas poliméricas teñidas que se caracterizan por una distribución de tinte sustancialmente uniforme por todo el volumen de la micropartícula. Se entiende por "sustancialmente uniforme" que la partícula teñida produce un perfil de intensidad fluorescente simétrico unimodal en condiciones de formación de imágenes fluorescentes. En contraposición, una partícula teñida en superficie (cuando el agente fluorescente está confinado a la superficie o a una región poco profunda cercana a la superficie)

35 produce un perfil de intensidad fluorescente simétrico pero bimodal.

En algunas circunstancias, puede ser deseable obtener una distribución de tinte no uniforme controlada en la micropartícula. Puede conseguirse una penetración de tinte menos que completa retirando las micropartículas del baño de tinción antes de que el tinte en la fase de micropartículas haya alcanzado el equilibrio con el tinte en la fase líquida. La extensión de la penetración del tinte se determina por el tiempo de incubación de las micropartículas en el baño de tinción. La retirada de las partículas del baño antes del equilibrado da como resultado un perfil de intensidad de fluorescencia simétrico pero bimodal. La forma del perfil de intensidad fluorescente de partícula, en particular la localización de los picos de intensidad, es función del tiempo de incubación de preequilibrado. Por tanto, el tiempo de

incubación de micropartículas en el baño de tinción proporciona una dimensión adicional para la codificación de micropartículas. Pueden producirse conjuntos de micropartículas de perfiles de intensidad de fluorescencia variados usando el mismo tinte pero variando los tiempos de incubación de micropartículas en el baño de tinción. Pueden utilizarse múltiples tintes para proporcionar una codificación aún mayor.

5

Según la presente invención, la cantidad de tinte incorporada a las micropartículas se controla ajustando la relación de tinte con respecto al polímero, y ajustando la composición del baño de tinte. En particular, y en contraposición con los procedimientos de la técnica anterior, la fracción volumétrica de un constituyente del sistema de disolventes ternario, a saber el disolvente regulador, se varía convenientemente para controlar el reparto del tinte entre el disolvente y el polímero que comprende las micropartículas. Al contrario que los procedimientos de la técnica anterior, la invención proporciona una flexibilidad considerablemente mayor en la selección de tintes y la formulación del sistema de disolventes. Se consigue un control considerablemente mayor del reparto de tinte usando un sistema de disolventes multiconstituyente. Como se desarrolla a continuación, el procedimiento de la invención aprovecha la dependencia exponencial del coeficiente de reparto  $K$  de la composición de disolvente y alcanza así un mayor control de la incorporación de tinte de la conseguida por los procedimientos de "hinchamiento" de la técnica anterior. En lugar de regular el coeficiente de reparto, los procedimientos de la técnica anterior varían simplemente la concentración de tinte inicial en el baño y consiguen así una variación proporcional del contenido de tinte de la micropartícula (siendo la constante de proporcionalidad el coeficiente de reparto  $K$ ).

10

15

20

La Fig. 2 compara el procedimiento de regulación por disolvente de la presente invención en el contexto de la variación del reparto de tinte en micropartículas poliméricas con el procedimiento de hinchamiento de la técnica anterior. Los puntos  $X_1^{(1)}$ ,  $X_2^{(1)}$  y  $X_3^{(1)}$  representan cada uno la masa de tinte en el sistema disolvente dividida entre el volumen de las micropartículas contenidas en el sistema. Los puntos  $Z_1^{(1)}$ ,  $Z_2^{(1)}$  y  $Z_3^{(1)}$  representan cada uno la correspondiente concentración de tinte incorporado a las micropartículas. El nivel de incorporación de tinte a las micropartículas está linealmente relacionado (línea  $P_0$ ) con la masa de tinte en el sistema de disolventes, siendo la pendiente de la línea función del coeficiente de reparto  $K$ . Se apreciará por tanto que los procedimientos de hinchamiento por disolvente de la técnica anterior confinan las trayectorias disponibles para la preparación de micropartículas teñidas al plano  $XZ$ . Se obtienen múltiples subpoblaciones de micropartículas teñidas variando explícitamente solo la concentración de tinte inicial en el baño de disolvente (para un número dado de micropartículas para teñir), produciendo una correspondiente variación proporcional en el nivel de tinte incorporado a la carga de las partículas.

25

30

En contraposición, la presente invención introduce la composición de disolventes como una nueva variable para controlar el proceso de producción de una multiplicidad de micropartículas teñidas. Puede apreciarse por la consideración de la Fig. 2 que la presente invención proporciona una dimensión adicional completa del espacio paramétrico ( $Y$ ) para la preparación de micropartículas teñidas al permitir trayectorias en el espacio paramétrico tridimensional ( $XYZ$ ). Por ejemplo, partiendo de las composiciones  $Z_1^{(1)}$ ,  $Z_2^{(1)}$  y  $Z_3^{(1)}$ , se preparan distintas subpoblaciones de partículas que indican niveles bien definidos y predecibles de incorporación de tinte  $Z_1^{(2)}$ ,  $Z_2^{(2)}$ ,  $Z_3^{(2)}$  siguiendo las curvas operativas no lineales mostradas en la Fig. 2. A cualquier composición de disolvente fija ( $Y$  fija),  $Z$  y  $X$  están relacionados entre sí de forma lineal (línea  $OP_1$ , para una composición de disolventes con la fracción volumétrica de disolvente regulador =  $\varphi$ ).

35

40

Por consiguiente, puede aproximarse a cualquier punto del espacio paramétrico tridimensional  $XYZ$  de la Fig. 2 a lo largo de una multiplicidad de trayectorias. A su vez, cada trayectoria permite la preparación de múltiples subpoblaciones de micropartículas teñidas de manera predecible. Los procedimientos de la presente invención, al funcionar en un

régimen regido por el equilibrio termodinámico y proporcionar expresiones cuantitativas para estas trayectorias, permite un diseño racional de los protocolos para la preparación de múltiples subpoblaciones de partículas teñidas.

5 Sin desear ligarse a teoría alguna, la operación de la presente invención para controlar el reparto de un soluto (tinte) entre una fase líquida continua y una fase sólida dispersada (micropartículas) puede describirse mediante las siguientes relaciones matemáticas.

10 La ecuación  $Z = G(X, Y)$  rige la transformación del sistema desde un primer estado,  $\{X_1, Y_1, Z_1\}$  hasta un segundo estado deseado  $\{X_2, Y_2, Z_2\}$ , en el que la concentración de soluto (tinte) en la fase dispersada (micropartículas) ( $Z$ ) es una función de la concentración de soluto ( $X$ ) y de la composición de disolvente ( $Y$ ). El segundo estado deseado  $\{X_2, Y_2, Z_2\}$  se selecciona de una multiplicidad de posibles dichos segundos estados accesibles desde el primer estado dado ajustando  $X$  e  $Y$  de la forma prescrita de acuerdo con la ecuación  $Z = G(X, Y)$ . La relación está regida por las variables ( $X$ ), ( $Y$ ) y ( $Z$ ), que se definen como sigue:

15 
$$X = C^{(S)} \{ \varphi^{(S)} / \varphi^{(P)} \}$$
  

$$Y = \{ \varphi^{(P)} / \varphi^{(S)} \}$$
  

$$Z = C^{(P)}$$

en las que

20 
$$\varphi^{(P)} = \{ V^{(P)} / (V^{(P)} + V^{(S)}) \} = \text{fracción volumétrica de la fase de partícula}$$
  

$$\varphi^{(S)} = (1 - \varphi^{(P)}) = \text{fracción volumétrica de la fase de disolvente}$$
  

$$C^{(S)} = \text{concentración de soluto en la fase de disolución en el equilibrio}$$
  

$$C^{(P)} = \text{concentración de soluto en la fase de partícula en el equilibrio}$$
  

$$V^{(P)} = \text{volumen de la fase de partícula}$$
  

$$V^{(S)} = \text{volumen de la fase de disolvente.}$$

25 La distribución del soluto (tinte) entre la fase de partícula ( $P$ ) y la fase de disolvente ( $S$ ) está regida por el coeficiente de reparto,  $K$ :

$$K = \{ N^{(P)} / N^{(S)} \}$$

en la que  $N^{(P)}$  es el número de moléculas de soluto en la fase de partícula en el equilibrio y  $N^{(S)}$  es el número de moléculas de soluto en la fase de disolvente en el equilibrio.

30 Por tanto, el valor del coeficiente de reparto  $K$  en el estado 1 se da como

$$K_1 = N^{(P)}_1 / N^{(S)}_1$$

y el valor del coeficiente de reparto  $K$  en el estado 2 se da como

$$K_2 = N^{(P)}_2 / N^{(S)}_2.$$

35 Aplicando las siguientes ecuaciones de balance de masa

$$N^T_1 = N^T_2 \quad \text{para la cantidad total de soluto} \quad (1)$$

$$N^{(P)}_1 + N^{(S)}_1 + \Delta N^{(S)}_1 = N^T_1 \quad \text{para el número total de solutos en el estado 1} \quad (2)$$

$$N^{(P)}_2 + N^{(S)}_2 = N^T_2 \quad \text{para el número total de solutos en el estado 2} \quad (3)$$

40 en las que  $N^T_i$  es la cantidad total (número) de moléculas de soluto en estado  $i$  y  $\Delta N^{(S)}_i$  es el número de moléculas de soluto adicionales añadidas a la fase de disolvente en el estado  $i$ , dando como resultado las siguientes ecuaciones iterativas:

$$X_2 = \{ (1+K_1) / (1+K_2) \} X_1 + \{ 1 / (1+K_2) \} \Delta X_1 \quad (4)$$

$$Y_2 = Y_1 + \Delta Y_1 \quad (5)$$

$$Z_2 = \{ (1+K_1^{-1}) / (1+K_2^{-1}) \} Z_1 + \{ 1 / (1+K_2^{-1}) \} \Delta Z_1 \quad (6)$$

En el caso especial de mantener la variable Y constante, es decir, transformar el estado 1 en el estado 2 únicamente mediante la adición de soluto de modo que  $K_1 = K_2$ , se obtiene la siguiente ecuación:

$$Z_2 = Z_1 + \{1/(1+K^{-1})\}\Delta X_1 \quad (7)$$

5

Adicionalmente, la dependencia de Z de X y Y se obtiene en la forma  $Z = K(Y)X$ . La dependencia del coeficiente de reparto K de Y refleja el hecho de que la adición de disolvente regulador a la fase de disolvente reduce la capacidad del disolvente de disolver el soluto y por lo tanto causa la redistribución del soluto en la fase dispersada disponible.

Específicamente, los datos y análisis experimentales apoyan la siguiente fórmula funcional:

10

$$K = a \exp(bY) \quad (8)$$

en que a y b son constantes determinadas a partir del análisis de datos tales como los presentados en la Fig. 6d.

15

Por consiguiente, la presente invención proporciona un conjunto explícito de prescripciones para efectuar la transformación de estado deseada. Específicamente, puede producirse una serie completa de segundos estados mediante la transformación de un solo primer estado.

20

Las ecuaciones de transformación anteriores, particularmente en su forma iterativa como se proporciona en la presente memoria, facilitan la producción automatizada de recolecciones de micropartículas modificadas por tinte usando un ordenador personal y un instrumento de pipeteado automatizado estándar ("robot") para dispensar las alícuotas medidas necesarias de tinte u otro soluto así como disolvente regulador. Se usa una aplicación de software, desarrollada en cualquier lenguaje de programación tal como BASIC o C, para evaluar las ecuaciones de transformación iterativas. El programa calcula las alícuotas necesarias de tinte y disolvente regulador. El robot de pipeteado se controla por consiguiente para medir y dispensar estas alícuotas necesarias usando una interfase de control de instrumento de laboratorio estándar tal como un protocolo GPIB y un entorno de desarrollo de software estándar tal como LabView (National Instruments). Por ejemplo, usando una mezcla maestra como se da a conocer en la presente memoria, se preparan fácilmente conjuntos de micropartículas teñidas mediante dicho sistema de ejecutar las etapas de dispensación de una o más alícuotas de la mezcla maestra produciendo un primer estado de la suspensión, calcular las cantidades necesarias de tinte y disolvente de tinte para alcanzar un segundo estado deseado de la suspensión, dispensar dichas cantidades necesarias de soluto y disolventes de tinte y permitir que ocurra la transformación. Estas etapas se repiten según se desee.

25

30

35

La tinción de micropartículas de grupo funcional modificado mediante procedimientos de hinchamiento de la técnica anterior puede afectar adversamente a la integridad del grupo funcional. Como se demuestra por el Ejemplo 28 siguiente, las partículas con grupo funcional modificado pueden teñirse según la práctica de la presente invención sin pérdida de la integridad del grupo funcional.

40

Puede apreciarse que un especialista en la materia puede utilizar fácilmente la información disponible para seleccionar las químicas de micropartículas, disolventes y tintes de acuerdo con los parámetros de solubilidad descritos en la presente memoria para la práctica de la presente invención.

Será también evidente a partir de la descripción del proceso de la invención que puede usarse cualquier polímero para proporcionar las partículas poliméricas a condición de que estén disponibles partículas poliméricas o puedan prepararse. El material puede comprender un homopolímero o copolímero, significando el último término incluir no solo polímeros formados por dos unidades monoméricas, sino también polímeros formados por tres o más unidades

- monoméricas, a veces denominados “terpolímeros”. Se prefieren polímeros hidrófobos. Los polímeros que comprenden monómeros de la clase vinílica, es decir, monómeros que contiene el grupo vinilo, son particularmente preferidos, lo más particularmente el grupo estireno. Un grupo de polímeros preferidos incluye poliestireno o copolímeros de poliestireno que contengan de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % en peso de unidades de monómero estireno. El polímero puede estar opcionalmente reticulado o no reticulado. La micropartícula puede estar formada por poliestireno reticulado con 1 % de divinilbenceno, basado en el peso de la micropartícula. La micropartícula puede comprender copolímero de estireno/ácido metacrílico que contiene de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 1 % de ácido metacrílico, basado en el peso de la micropartícula.
- 5
- 10 Los materiales poliméricos adecuados incluyen, a modo de ejemplo y no a modo de limitación, polímeros de los siguientes monómeros:
- ácido acrílico o cualquier éster del mismo tal como acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de butilo, acrilato de 2-etilhexilo o acrilato de glicidilo;
  - ácido metacrílico o cualquier éster del mismo tal como metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, metacrilato de butilo, metacrilato de laurilo, metacrilato de cetilo, metacrilato de estearilo, dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de tetraetilenglicol, metacrilato de glicidilo o *N,N*-(metacriloxihidroxipropil)(hidroxialquil)aminoetilamidazolidinona;
  - ésteres de alilo tales como metacrilato de alilo;
  - ácido itacónico o ésteres del mismo;
  - 20 ácido crotonico o ésteres del mismo;
  - ácido maleico o ésteres del mismo tales como maleato de dibutilo, maleato de dioctilo, maleato de dioctilo o maleato de dietilo;
  - estireno o derivados sustituidos del mismo tales como etilestireno, butilestireno o divinilbenceno;
  - unidades monoméricas que incluyen una funcionalidad amina tales como metacrilato de dimetilaminoetilo o metacrilato de butilaminoetilo;
  - unidades monoméricas que incluyen una funcionalidad amida tales como acrilamida o metacrilamida;
  - monómeros que contienen vinilo tales como viniléteres, vinilioéteres, vinilalcoholes, vinilcetonas, haluros de vinilo tales como cloruros de vinilo, ésteres de vinilo tales como acetato de vinilo o versatato de vinilo, vinilnitrilos tales como acrilonitrilo o metacrilonitrilo;
  - 30 haluros de vinilideno tales como cloruro de vinilideno y fluoruro de vinilideno;
  - tetrafluoroetileno;
  - monómeros diénicos tales como butadieno e isopreno; y
  - aliléteres tales como alilglicidiléter.
- Los homopolímeros y copolímeros particularmente preferidos que comprenden monómeros que contienen vinilo incluyen poliestireno, poli(metacrilato de metilo), poliacrilamida, polietilenglicol, poli(metacrilato de hidroxietilo), poliviniltolueno y polidivinilbenceno.
- 35

Los materiales poliméricos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y no a modo de limitación, los siguientes polímeros: polióxidos tales como poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno), poliésteres tales como poli(tereftalato de etileno), poliuretano, polisulfonato, polisiloxanos tales como polidimetilsiloxano, polisulfuro, poliacetileno, polisulfona, polisulfonamida, poliamidas tales como policaprolactama y polihexametilendipamida, poliimina, poliurea, polímeros heterocíclicos tales como polivinilpiridina y polivinilpirrolidinona, polímeros de origen natural tales como caucho natural, gelatina, celulosa, policarbonato, polianhídridos y polialquenos tales como polietileno, polipropileno y copolímeros de etileno-propileno.

40



El material polimérico puede contener grupos funcionales tales como carboxilatos, ésteres, aminas, aldehídos, alcoholes o haluros que proporcionan sitios para la unión de restos químicos o biológicos deseables para potenciar la utilidad de las partículas en análisis químicos o biológicos. Los procedimientos para preparar micropartículas a partir de dichos polímeros son bien conocidos en la técnica. Se exponen procedimientos representativos para preparar micropartículas, así como micropartículas reticuladas, en los ejemplos preparativos siguientes.

Los procedimientos dados a conocer pueden aplicarse también a la tinción de micropartículas de núcleo y cubierta. Las micropartículas de núcleo y cubierta comprenden un núcleo central de uno o más polímeros de núcleo y una cubierta de uno o más polímeros de cubierta que contiene el núcleo. La cubierta polimérica puede formarse mediante cualquier técnica de recubrimiento polimérico. La morfología de núcleo y cubierta está termodinámicamente favorecida si el polímero formador de cubierta exhibe una mayor polaridad, o una menor tensión interfásica, que el polímero formador de núcleo. La morfología de núcleo y cubierta se favorece también si la fracción volumétrica del polímero formador de cubierta es mayor que la del polímero formador de núcleo. Por tanto, se efectúa la síntesis de partículas de núcleo y cubierta a una relación en peso de cubierta/núcleo mayor de 1. El polímero de núcleo es hidrófobo y el polímero de cubierta es relativamente hidrófilo y porta grupos funcionales de interés.

Se prefieren copolímeros de estireno y un monómero más hidrófilo que el estireno (por ejemplo, ácido metacrílico) para el polímero de núcleo frente al homopolímero de poliestireno. El comonómero sirve para reducir la hidrofobicidad del núcleo y volverlo más compatible con las composiciones de polimerización de cubierta hidrófilas.

Dentro de estos condicionantes, puede seleccionarse cualquier monómero o combinación de monómeros como polímero de cubierta. Se prefiere una mezcla de monómeros de vinilo. Se usa una mezcla de monómeros de metacrilato de metilo como constituyente mayoritario y metacrilato de hidroxietilo y ácido metacrílico como constituyentes minoritarios para formar una cubierta sobre un núcleo de poliestireno o poliestireno modificado. Una de dichas mezclas monoméricas está compuesta por, en peso, aproximadamente 6 % de metacrilato de hidroxietilo y de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % de ácido metacrílico, siendo el resto metacrilato de metilo. Estos monómeros son más hidrófilos que el poliestireno.

El tamaño de micropartícula puede elegirse apropiadamente para el uso final pretendido. Típicamente, las partículas estarán en el intervalo de tamaño de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, más típicamente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , aún más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, las micropartículas están "monodispersadas", es decir, las micropartículas de un conjunto tienen un intervalo de tamaño estrecho, preferiblemente que ostenta un coeficiente de variación del diámetro medio ("CV") de no más de aproximadamente un 5 %.

Las micropartículas pueden volverse magnéticamente sensibles mediante la incorporación de un material magnético apropiado, antes o después de la tinción, según procedimientos bien conocidos. Según uno de dichos procedimientos, se impregnan las partículas con un ferrofluido, tal como un ferrofluido preparado según el Ejemplo 19. Se entiende por "magnéticamente sensible" la capacidad de cambiar la localización u orientación en respuesta a la aplicación de un campo magnético.

El tinte puede comprender cualquier tinte que confiera un color o fluorescencia observable visual o instrumentalmente. El color o fluorescencia puede ser detectable a simple vista o con la ayuda de un microscopio u otro instrumento óptico. Los tintes fluorescentes preferidos son tintes de estirilo, tales como p-bis(o-metilestiril)benceno, tintes de pirometano

tales como el tinte fluorescente verde éster succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoico y el tinte fluorescente naranja éster succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno-3-propiónico y tintes de cumarina tales como metoxicumarina. Se prefieren aquellos tintes fluorescentes que tienen longitudes de onda de emisión en el intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1000 nm. Cuando se usa más de un tinte, los tintes pueden seleccionarse de modo que tengan espectros de absorción, espectros de emisión o vidas útiles de emisión sustancialmente diferentes.

La micropartícula comprende un polímero o copolímero de poliestireno y el tinte es un tinte hidrófobo. Los posibles disolventes se seleccionan, por ejemplo, de la Tabla 1.

10

Tabla 1: Candidatos a disolventes para la combinación de micropartículas de poliestireno y tinte hidrófobo

<b>Disolvente n.º 1:</b> Buen disolvente para tinte hidrófobo y micropartículas de poliestireno (disolvente de tinte)	<b>Disolvente n.º 2:</b> Disolvente débil o no disolvente para tinte hidrófobo y micropartículas de poliestireno (disolvente regulador)	<b>Disolvente n.º 3:</b> Disolvente débil o no disolvente para tinte hidrófobo y micropartículas de poliestireno (codisolvente)
Cloruro de metileno Cloroformo Tetrahidrofurano Dioxano Ciclohexano Benceno Tolueno Acetato de butilo Hidrocarburos alifáticos clorados inferiores	Agua	Acetona Alcoholes inferiores, especialmente metanol, etanol e isopropanol

Un sistema representativo que utiliza un tinte polar hidrosoluble está compuesto por micropartículas de poli(óxido de etileno) en un sistema de disolventes ternario que comprende agua como disolvente n.º 1, hexano como disolvente n.º 2 y dioxano como disolvente n.º 3.

A partir de los disolventes enumerados en la tabla anterior y un cuadro de miscibilidad de disolventes estándar, pueden diseñarse varios sistemas de disolventes ternarios para una combinación de polímero o copolímero de poliestireno y tinte hidrófobo de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, puede disolverse un soluto de tinte hidrófobo en una fase líquida consistente en una mezcla ternaria homogénea de agua (disolvente regulador, disolvente n.º 2), alcohol (codisolvente, disolvente n.º 3) y diclorometano (disolvente de tinte, disolvente n.º 1) y ponerse en contacto con una fase polimérica sólida consistente en micropartículas de poliestireno o copolímero de poliestireno. El coeficiente de reparto de tinte, K, que rige la abundancia relativa de tinte en la fase polimérica frente a la de la mezcla de disolventes ternaria, aumenta a medida que aumenta la fracción volumétrica de disolvente regulador en la fase líquida, y se reduce correspondientemente a medida que se reducen las fracciones volumétricas de disolvente de tinte o codisolvente. Además del sistema ternario de agua/alcohol/diclorometano dado a conocer, otros sistemas ternarios representativos incluyen, por ejemplo, agua/acetona/cloruro de metileno.

La invención se ha descrito con fines de ilustración que contiene uno de cada uno de disolvente n.º 1, disolvente n.º 2 y

disolvente n.º 3, cuyas características se han descrito anteriormente. Sin embargo, es posible practicar la invención incluyendo más de un disolvente en cada categoría. Por ejemplo, la mezcla de disolventes puede contener un solo disolvente de tipo n.º 1, dos disolventes de tipo n.º 2 y un solo disolvente de tipo n.º 3.

5 Las micropartículas de la invención pueden funcionalizarse para incluir entidades químicas o biológicas tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, incluyendo aptámeros, proteínas, péptidos y moléculas orgánicas pequeñas. La unión de dichas moléculas puede efectuarse usando procesos conocidos en la materia, por ejemplo, una reacción de acoplamiento covalente. Véanse, por ejemplo G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, 1996) y L. Illum, P. D. E. Jones, *Methods in Enzymology* 112, 67-84 (1985). Estas entidades pueden  
10 seleccionarse dependiendo del ensayo de interés. Se dan a conocer ejemplos de dichos ensayos en el documento PCT/US01/20179 y en la patente de EE.UU. n.º 6.251.691.

En la Fig. 1(b) se resume en forma de diagrama un procedimiento. Se incuban en primer lugar las micropartículas con una disolución de disolventes que comprende disolvente n.º 2 y disolvente n.º 3 en presencia de estabilizadores  
15 opcionales, formando una suspensión. La función del estabilizador es evitar la desestabilización de la suspensión de micropartículas. Los estabilizadores representativos incluyen polímeros, particularmente alcoholes poliméricos tales como polivinilalcohol, óxidos poliméricos tales como poli(óxido de etileno), polímeros polivinílicos tales como polivinilpirrolidona y poliácidos tales como poli(ácido acrílico). Otros estabilizadores representativos incluyen  
20 tensioactivos iónicos tales como dodecilsulfato de sodio y Aerosol OT y tensioactivos no iónicos tales como monolaurato de polioxietilensorbitán y polietilenglicol-*terc*-octilfeniléter. La concentración del estabilizador puede estar en el intervalo de aproximadamente 0 % a aproximadamente 2 % en peso de la suspensión de disolvente/micropartículas.

La suspensión se somete preferiblemente a agitación lenta. La incubación se realiza típicamente a temperatura ambiente, pero pueden utilizarse temperaturas mayores o menores a condición de que la integridad de las  
25 micropartículas no sea afectada adversamente y la composición de disolventes permanezca estable. Se realiza la incubación para permitir que el estabilizador opcional se adsorba sobre las micropartículas. El tiempo de preincubación necesario variará según la composición de los disolventes y micropartículas, y puede seleccionarse por consiguiente.

Después de la primera etapa de incubación anterior, se añade entonces tinte solubilizado en disolvente de tinte  
30 (disolvente n.º 1) a la suspensión de micropartículas. Debería añadirse suficiente tinte para asegurar la incorporación del tinte al nivel deseado para generar una señal de tinte detectable. La incubación se lleva a cabo típicamente a temperatura ambiente, pero pueden usarse temperaturas mayores o menores. La segunda incubación se realiza para permitir al disolvente de tinte (disolvente n.º 1) penetrar en las micropartículas.

35 Se ha encontrado que la combinación de una primera etapa de incubación de partículas con una mezcla de disolvente n.º 2 y disolvente n.º 3 y estabilizante o estabilizantes adicionales, seguido de una segunda etapa de adición de tinte disuelto en disolvente n.º 1, reduce sustancialmente la necesidad de un mezclador mecánico intenso o acústico durante la etapa de tinción, como es necesario para los protocolos de la técnica anterior. Las partículas requieren solo una agitación suave durante el proceso de tinción para mantenerlas suspendidas. Esto es una mejora significativa, porque el  
40 mezclador intenso requiere un equipo especializado y es difícil de aumentar de escala.

La concentración de tinte en la suspensión de micropartículas puede seleccionarse del intervalo de aproximadamente 1 µg/g de partículas a aproximadamente 100 µg/g de partículas, basado en el peso de la suspensión de partículas. Las

concentraciones por debajo y por encima de este intervalo pueden ser apropiadas en algunas aplicaciones, dependiendo de la composición de la disolución de disolventes y micropartículas.

5 Se añade lentamente entonces una cantidad de disolvente regulador para favorecer el reparto de tinte en las micropartículas, mientras la suspensión se agita lentamente. Se selecciona la fracción volumétrica,  $\phi$ , del disolvente regulador para alcanzar una composición de criterio de valoración deseada a lo largo de una trayectoria de la Fig. 2.

10 El disolvente regulador debería añadirse a una velocidad controlada para mantener la estabilidad de fase en la suspensión. Se entiende por "estabilidad de fase" una condición caracterizada por la presencia de una mezcla esencialmente homogénea de soluto (tinte) y fase líquida. En condiciones de estabilidad de fase, el tinte permanece disuelto en la fase de disolución mientras se incorpora a las micropartículas. El tinte no precipita del disolvente. La estabilidad de fase se caracteriza adicionalmente por la ausencia de separación de fase líquida-líquida.

15 Según los procedimientos de la técnica anterior, debe obtenerse la captación completa del tinte en la fase de micropartículas para que la carga de tinte de las micropartículas pueda derivarse con certeza, basándose en la cantidad de tinte inicial en el baño de disolvente y el volumen de micropartículas. En dichos procedimientos, el nivel preciso de carga de tinte debería conocerse para asegurar que la señal de tinte emitida está dentro del intervalo dinámico de los instrumentos utilizados para detectar esa señal. Una determinación exacta de la carga de tinte es particularmente importante cuando ha de construirse una colección de partículas, y han de distinguirse diferentes conjuntos de  
20 partículas por las diferentes cargas del mismo tinte. Por tanto, el nivel de incorporación de tinte debe monitorizarse hasta que no aparezca más tinte en la fase continua en suspensión, señalando que sustancialmente todo el tinte introducido en el sistema se ha captado por la fase de micropartículas.

25 Según la presente invención, la cantidad de tinte incorporada a las micropartículas se controla precisamente modulando la cantidad de disolvente regulador añadido a la suspensión de micropartículas, como se determina por las ecuaciones iterativas discutidas anteriormente. Puede suministrarse un nivel preseleccionado de carga de tinte con certeza incluso en ausencia de reparto completo del tinte en la fase de micropartículas. Se entiende por "reparto completo" con respecto a un soluto (por ejemplo, tinte) el estado caracterizado por la captación completa del soluto de la fase líquida a la fase de micropartículas, y la ausencia esencialmente completa de tinte en la fase líquida. Por tanto, no es necesario  
30 monitorizar el estado de migración de tinte desde la fase líquida de la suspensión de micropartículas hasta la fase de micropartículas para asegurar que todo el tinte en el sistema se ha captado por las micropartículas, ya que la captación de tinte completa no es crítica para el control de la carga de tinte.

35 La suspensión de micropartículas en el baño de tinción debería incubarse durante un periodo de tiempo para proporcionar un reparto sustancialmente uniforme del tinte en las micropartículas.

40 Para completar el proceso, se centrifuga la suspensión de micropartículas y opcionalmente las micropartículas se lavan y resuspenden en un tampón adecuado, típicamente un tampón acuoso que contiene tensioactivos opcionales. Las micropartículas resultantes comprenden un conjunto de partículas teñidas que contienen una cantidad predeterminada específica de tinte que permite la identificación de las partículas de un conjunto dado.

Pueden producirse de forma paralela subpoblaciones de micropartículas poliméricas que contienen diferentes niveles de tinte incorporado. Se añaden cantidades precalculadas de disolvente regulador a alícuotas separadas de la suspensión de micropartículas preincubadas en disolución de tinte. De acuerdo con la presente invención, el nivel de reparto de tinte

en las micropartículas se determina mediante la fracción volumétrica final de disolvente regulador y la concentración de tinte inicial en la suspensión. Este enfoque se ilustra en la Figura 3(a), en que se designan las diversas alícuotas preincubadas como  $B_n$ . Las cantidades respectivas de disolvente regulador introducidas en cada alícuota se representan como  $S_n$ , y las correspondientes subpoblaciones de partículas en cada lote se designan como  $F_n(S_n)$ .

5

Pueden producirse en serie subpoblaciones de micropartículas poliméricas que contienen diferentes niveles de tinte. A partir de una mezcla maestra de suspensión de micropartículas en disolución de tinte, se extraen alícuotas a diferentes tiempos transcurridos durante la adición continua o semicontinua del disolvente regulador a la suspensión de micropartículas en disolución de tinte. En la adición "semicontinua" de disolvente regulador, el proceso de interrumpe momentáneamente, por ejemplo, para permitir la operación de retirar una muestra de micropartículas del lote. Las fracciones de suspensión  $F_n(S_n)$  recogidas a tiempos transcurridos sucesivamente ( $t_{Fn}$ ) contienen correspondientemente cantidades diferentes de disolvente  $S_n$  y proporcionan múltiples subpoblaciones de partículas teñidas a partir de la misma mezcla maestra. Estas subpoblaciones correspondientes a niveles de incorporación de tinte producirán correspondientemente intensidades de fluorescencia diferentes. Este enfoque se ilustra en la Fig. 3(b), en la que [B] designa la mezcla maestra preincubada a la que se alimenta una corriente continua de disolvente regulador.  $F_n(S_n)$  son las fracciones de suspensión de micropartículas recogidas a partir de la mezcla maestra a los tiempos transcurridos sucesivos,  $t_{Fn}$ , respectivamente.

10

15

20

25

Como alternativa, cuando ha transcurrido un tiempo especificado ( $t_F$ ), se interrumpe la adición continua de disolvente regulador y se divide la suspensión de micropartículas teñidas en dos o más alícuotas para el ajuste del contenido de tinte final por regulación por disolvente. Se añade una cantidad seleccionada de disolvente de regulación ( $\delta S_n$ ) a cada alícuota para producir diferentes niveles de incorporación de tinte en al menos dos alícuotas, estando determinado cada nivel por la cantidad total de disolvente regulador añadida durante la regulación por disolvente y por la concentración de tinte inicial. Puede apreciarse que la cantidad seleccionada de disolvente regulador añadida a cada alícuota puede comprender 0 en una o más alícuotas, a condición de que se añada una cantidad distinta de 0 de disolvente regulador al menos a una de las alícuotas. Este enfoque de procesamiento en serie seguido de en paralelo se ilustra en la Fig. 3(c).

30

35

Son posibles otras variaciones del procesamiento en serie y en paralelo. La Fig. 3(d) ilustra un proceso que combina procesamiento en serie y en paralelo, empleando tanto regulación por disolvente como ajuste directo de la concentración de tinte. Como se muestra en la Figura 3(d), se alimenta una corriente continua de disolvente regulador a la mezcla maestra [B]. Se recogen las fracciones de suspensión de micropartículas  $F_n(S_n)$ , que contienen respectivamente cantidades  $S_n$  de disolvente regulador. Se somete entonces cada fracción a una etapa de marcado separada iniciada, por ejemplo, por la adición de un tercer tinte,  $D_n$ , que permite la discriminación de las micropartículas en alícuotas previamente idénticas. Las etapas de marcado que implican respectivamente los tintes  $D_1, D_2, \dots, D_n$  producen subpoblaciones distinguibles  $F_m(S_m, D_n)$  a partir de cada alícuota.

Las micropartículas de cada alícuota comprenden un conjunto de partículas que contienen una cantidad predeterminada específica de uno o más fluoróforos (o cromóforos) que permite la identificación de partículas de un conjunto dado.

40

El procedimiento de la presente invención puede adaptarse para proporcionar una colección de micropartículas codificadas combinatoriamente mediante la adición secuencial de disoluciones de tintes fluorescentes distinguibles. Las micropartículas se codifican de acuerdo con uno cualquiera de una variedad de códigos disponibles, incluyendo códigos binarios. Preferiblemente, las micropartículas se codifican con un procedimiento de codificación binario que permite la decodificación *in situ*, tal como el procedimiento del documento WO 98/53093.

La práctica de la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

**Ejemplo preparativo 1: Partículas de homopolímero de poliestireno no reticuladas**

5 Se dispuso un matraz de vidrio de fondo redondo de 100 ml, equipado con condensador de reflujo, adaptador de entrada-salida de N<sub>2</sub> y un agitador, en un baño de aceite encamisado. Se cargó el matraz con una disolución de 0,9475 g de polivinilpirrolidona (Aldrich, peso molecular medio de aproximadamente 29.000) en 43,3 ml de alcohol etílico (Aldrich, absoluto, anhidro, al 99,5 %) y 18,95 g de estireno. Para retirar el oxígeno libre, se purgó el sistema con N<sub>2</sub> durante media hora con agitación suave (50-70 rpm). Se elevó entonces la temperatura a 70 °C y la velocidad del  
10 agitador a 350 rpm. Se inició la polimerización del monómero de estireno añadiendo 10 ml de una disolución al 2,4 % en peso de 2,2-azobisisobutironitrilo en etanol. Después de 17 horas de reacción, se enfrió el sistema a temperatura ambiente. Se obtuvieron partículas de poliestireno monodispersadas con un diámetro volumétrico medio de 4,1 µm. La eficacia de conversión de monómero fue de 96,4 % y el contenido de sólidos del látex final de 27,9 %.

15 **Ejemplo preparativo 2: Partículas copoliméricas no reticuladas**

Se usó el mismo procedimiento que en el Ejemplo preparativo 1 para preparar un copolímero de poliestireno que contenía 3 % de ácido metacrílico, haciendo reaccionar 10,5 g de una mezcla de monómeros de estireno y ácido metacrílico (3 % en peso de monómero de ácido metacrílico, basado en el peso total de monómero). Se obtuvieron partículas monodispersadas. La conversión final fue de 95,7 %, el diámetro de partícula de 3,2 µm y el látex contenía  
20 15,9 % de sólidos. La partícula de copolímero tenía un área de estacionamiento de 2,45 µm<sup>2</sup>/grupo COOH.

**Ejemplo preparativo 3: Partículas copoliméricas reticuladas**

Se dispuso un matraz de vidrio de fondo redondo de 100 ml, equipado con condensador de reflujo, adaptador de entrada-salida de N<sub>2</sub> y agitador, en un baño de aceite encamisado. Se cargó el matraz con 1,5 g de polivinilpirrolidona (como en el Ejemplo preparativo 1), 0,475 g de dioctilsulfosuccinato de sodio (Aldrich, al 98 %), 53,5 ml de alcohol etílico (Aldrich, absoluto, anhidro, al 99,5 %), 9,405 g de estireno y 0,095 g de divinilbenceno (Aldrich, mezcla de isómeros, 80 % de pureza). Después de retirar el oxígeno libre purgando con N<sub>2</sub> durante 30 min, se elevó la temperatura a 70 °C. Se  
25 inició la polimerización añadiendo 0,095 g de ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléico) (Aldrich, al 75 %) disuelto en 10 ml de etanol. Después de 27 horas, se detuvo la reacción enfriando a temperatura ambiente. Se obtuvieron partículas monodispersadas. La conversión de monómero fue de 93 % y el diámetro volumétrico medio de partícula fue de 1,6 µm.  
30

**Ejemplo preparativo 4: Partículas de núcleo y cubierta no reticuladas**

Se dispuso un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml, equipado con un agitador mecánico, una purga de N<sub>2</sub> de entrada-salida y un condensador, en un baño de agua termostatzado a 70 °C. Se añadieron al matraz 5,48 g de un látex que contenía 12,3 % en peso de partículas de poliestireno monodispersadas con un diámetro de 3,15 µm. Se  
35 añadió a este látex una disolución de 0,009 g de dodecilsulfato de sodio y 0,007 g de bicarbonato de sodio disuelta en 43,3 ml de agua desionizada destilada. Se agitó la suspensión a 100 rpm y se dejó alcanzar los 70 °C bajo purga de N<sub>2</sub>. Cuando la temperatura de la mezcla de reacción fue estable, se añadieron 0,0068 g de persulfato de potasio en 0,5 ml de agua desionizada destilada. Inmediatamente después de esto, se inició la reacción alimentando una mezcla de 0,676 g de una mezcla de 74 % de metacrilato de metilo, 6 % de metacrilato de hidroximetilo y 20 % de ácido metacrílico a una velocidad de 0,01 ml/min con una bomba de jeringa. Después de la terminación de la alimentación (1,2 h), se dejó proseguir la reacción con agitación durante 2 horas adicionales a 70 °C. Se inactivó entonces la reacción añadiendo 0,0068 g de hidroquinona en 1 ml de agua y se enfrió rápidamente a temperatura ambiente. Se obtuvo un látex de 2,75  
40

% en peso de sólidos que tenía partículas de núcleo y cubierta monodispersadas de 3,32  $\mu\text{m}$  de diámetro. El área de estacionamiento del grupo carboxilo de superficie era de 1,52  $\text{\AA}^2/\text{grupo}$ .

**Ejemplo 1: Síntesis de micropartículas no reticuladas con verde fluorescente (tinte/polímero= 0,334 mg/g)**

5 Se cargó un matraz de vidrio de fondo redondo de tres bocas de 25 ml con 0,05 g de etanol limpio (1 ml, tres rondas de centrifugación (6500 rpm a temperatura ambiente) y redispersión) y partículas copoliméricas no reticuladas, añadidas como 0,312 ml de látex como se prepara en el Ej. preparativo 2. Se añadieron a la suspensión de partículas 1 ml de disolución de dodecilsulfato de sodio ("SDS") (0,75 % en peso), 1,5 ml de polivinilalcohol (Aldrich, peso molecular 85.000-146.000, pureza hidrolizado 87-89 %) en forma de una disolución acuosa al 0,1 % y 4,75 ml de etanol. Se  
10 añadieron a esta mezcla 0,0835 ml de una disolución de diclorometano (Aldrich, al 99,9 %) que contenía 0,0167 mg de tinte fluorescente verde, Bodipy FL C5, SE (éster succinimidolo del ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoico, Pm= 417,22, Molecular Probes). Finalmente, se añadieron 10,6 ml de agua desionizada destilada y se agitó la mezcla durante otras 2 horas. Se transfirió toda la mezcla a un tubo de centrífuga de plástico de 50 ml y se centrifugó a 4500 rpm durante 1 min. Se retiró el sobrenadante, se lavó el sedimento que contenía las perlas  
15 coloreadas tres veces con 2 ml de etanol y finalmente se resuspendió en 2 ml de disolución de SDS al 0,2 %. La relación de tinte verde a polímero fue de 0,334 mg/g. Se determinaron la intensidad y uniformidad de la fluorescencia verde usando un microscopio de fluorescencia Nikon con una cámara de dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) y software de adquisición de imágenes. Se muestran los resultados como una gráfica de dispersión en la Fig. 4. La ordenada de cada punto representa la intensidad de fluorescencia verde asociada a una única partícula; los datos no se  
20 corrigieron para la señal/ruido de fondo.

**Ejemplo 2: Preparación de micropartículas reticuladas fluorescentes verdes (tinte/polímero= 1,667 mg/g)**

Este ejemplo es similar al Ejemplo 1, excepto porque las partículas poliméricas tenían una estructura reticulada y la escala del experimento se aumentó 4 veces. Se limpió de emulsionante una emulsión de látex de 2 ml que contenía 0,2  
25 g de partículas de núcleo y cubierta reticuladas (Bangs Laboratories, Inc., 3,2  $\mu\text{m}$ , 10 % de sólidos, 12,5 % de divinilbenceno) añadiendo 1 ml de etanol y centrifugando a 6500 rpm durante 2 min. Se repitió esta operación 3 veces. Se transfirieron las partículas poliméricas limpiadas a un matraz de fondo redondo de 100 ml relleno con 6 ml de una disolución acuosa de polivinilalcohol al 1,0 % en peso, 4 ml de una disolución acuosa de SDS al 0,75 % en peso y 19 ml de etanol. Se añadieron a esta mezcla 1,5 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  que contenían 0,3334 mg de tinte fluorescente verde, Bodipy  
30 FL C5, SE. Después de esto, se añadieron 53 ml de agua desionizada destilada. Se transfirió entonces la suspensión de partículas a un rotavapor y se retiraron los disolventes a vacío (89,74 kPa) mientras se aumentaba gradualmente la temperatura a 40  $^\circ\text{C}$ , después a 56  $^\circ\text{C}$  y finalmente a 63  $^\circ\text{C}$  para la retirada de los disolventes orgánicos. Se recogió la suspensión coloreada concentrada, se centrifugó a 6500 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Se lavó el sedimento de micropartículas con tres rondas de centrifugación y se resuspendió con 5 ml de etanol. Finalmente, se  
35 resuspendieron las perlas coloreadas limpiadas en 2 ml de SDS al 0,2 % en peso a una concentración de aproximadamente 10 % en sólidos. La relación de tinte verde a polímero fue de 1,667 mg/g. Se determinaron la intensidad y uniformidad de la fluorescencia verde usando un microscopio de fluorescencia Nikon con una cámara de CCD unida y software de adquisición de imágenes. Se muestran los resultados como una gráfica de dispersión en la Fig. 5. La ordenada de cada punto representa la intensidad de fluorescencia verde asociada a una única partícula; los  
40 datos no se corrigieron para la señal/ruido de fondo.

**Ejemplo 2A: Colección de micropartículas reticuladas codificadas por tinte fluorescente verde (concentración de tinte inicial/polímero= 0,833 mg/g)**

Se siguió el procedimiento del Ej. 1, excepto porque la cantidad de tinte fluorescente verde en la disolución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> era de 166,67 mg y la velocidad de alimentación de agua era de 21 ml/h. Durante el transcurso de la adición de agua, se extrajeron cuatro fracciones separadas en intervalos de tiempo separados 30 minutos. La operación en serie generó así cinco poblaciones diferentes de partículas coloreadas (una fracción se recogió antes, partiendo de la alimentación de agua), teniendo cada población una intensidad de fluorescencia media distinta que era función de la cantidad de agua añadida a la fracción, que se extrajeron. Se analizaron las partículas según el procedimiento descrito en el Ej. 1. El valor de intensidad de fluorescencia verde medido para cada tipo de partículas coloreadas se presenta en la Tabla 1a. En la Tabla 1a, y en otros lugares de la presente memoria, "u.a." significa unidades arbitrarias.

10 **Tabla 1a: Valores de intensidad de fluorescencia verde para muestras extraídas del Ej. 2A.**

N.º de fracción	Agua/polímero añadido (ml/g)	Intensidad de fluorescencia de partícula (u.a.)
1	52,5	283,4
2	105,0	1396
3	157,5	3623
4	210,0	13061
5	262,5	14658

**Ejemplo 2B: Colección de micropartículas no reticuladas bicolores codificadas con tintes fluorescentes verde y naranja (concentración inicial de tinte/polímero: tinte verde/polímero= tinte naranja/polímero=0,75 mg/g)**

Se produjo un conjunto de partículas no reticuladas bicolores distinguibles codificadas con tintes fluorescentes verde y naranja recurriendo al procedimiento de regulación por disolvente en serie de la presente invención, usando las siguientes concentraciones de tinte inicial: tinte fluorescente verde/polímero= 0,75 mg/g; tinte fluorescente naranja/polímero= 0,75 mg/g. Se recogieron tres fracciones separadas según la metodología del Ejemplo 2A anterior, excepto porque estaban presentes dos tintes fluorescentes en la suspensión de preincubación inicial. Las cantidades de agua añadidas hasta el momento de extracción de la fracción y las intensidades medias de las diferentes fracciones de micropartículas recogidas se muestran en la Tabla 1b.

20 **Tabla 1b: Intensidades de fluorescencia verde y naranja del Ej. 2B (velocidad de alimentación de agua de 26,5 ml/h)**

N.º de fracción	[Verde]/polímero		[Naranja]/polímero		Agua/ polímero alimentado ml/g	Intensidad de fluorescencia verde (u.a.)	Intensidad de fluorescencia naranja (u.a.)
	mg/g	mmol/g x 10 <sup>-3</sup>	mg/g	mmol/g x 10 <sup>-3</sup>			
1	0,75	1,79	0,75	1,69	265,0	1220	1388
2	0,75	1,79	0,75	1,69	265,0	7082	7798
3	0,75	1,79	0,75	1,69	265,0	11698	15479

25 **Ejemplos 3-6: Análisis del reparto de tinte en la preparación de micropartículas reticuladas fluorescentes verdes**

Se prepararon 4 preparaciones de partículas teñidas con fluorescencia verde mediante un protocolo como en el Ej. 2, pero a escala menor, comparable con la escala del Ej. 1. Las cantidades respectivas de agua añadidas fueron: 0,833 ml, 1,74 ml, 5,31 ml y 10,59 ml, correspondientes a fracciones volumétricas de agua de 0,398, 0,463, 0,623 y 0,738, respectivamente. Después de la terminación de la incorporación de tinte, se centrifugaron las partículas coloreadas. Se



guardó el sobrenadante para determinar el tinte verde restante en disolución. Por consiguiente, se diluyeron cantidades iguales de cada una de las 4 disoluciones sobrenadantes (24x) con alcohol y se registraron los espectros de fluorescencia. Se usaron los valores de intensidad de emisión (véase la Tabla 2) para calcular la concentración de tinte verde restante en cada disolución según la curva de calibración de la Fig. 6(a). Se calculó la concentración de tinte verde incorporado a las partículas como la diferencia entre la cantidad inicial total de tinte verde en la reacción y la restante en el sobrenadante. Estos valores se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2: Detalles de reparto de tinte**

N.º de Ej.	Fracción volumétrica de agua en el baño de tinte	Intensidad de fluorescencia en el sobrenadante (u.a.)	Conc. de tinte en el sobrenadante (de la curva de calibración) (µg/ml)	Conc. inicial de tinte (µg/ml)	Tinte incorporado a las partículas (µg/ml) (calculado)	Intensidad de fluorescencia de partícula medida
3	0,39806	580,4	1,808	1,929	0,0208	135
4	0,4629	494,15	1,539	1,72	0,0348	539
5	0,6227	270,1	0,841	1,205	0,0997	2909
6	0,73823	54,34	0,169	0,834	0,2639	7581

La Figura 6(b) muestra la variación no lineal del contenido de tinte incorporado en función de la fracción volumétrica de agua.

El contenido de tinte verde incorporado calculado se correlacionaba también con la intensidad de fluorescencia verde registrada por microscopía de fluorescencia de partículas teñidas. Los resultados de la Fig. 6(c) indican una correlación lineal.

La Fig. 6(d) muestra el coeficiente de reparto del tinte, K, representado frente a Y. La curva exhibe una dependencia exponencial característica que ilustra la regulación fina de la incorporación de tinte mediante la modulación de la composición de disolventes de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 7: Partículas reticuladas que contienen tinte fluorescente verde (tinte/polímero= 0,833 mg/g)**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2, excepto porque la disolución de tinte verde en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> añadida a la suspensión de partículas tenía una concentración de 0,1 mg/ml, y el experimento se realizó a la mitad de escala en un matraz de 50 ml. Por consiguiente, la cantidad de agua añadida después de la adición de la disolución de tinte fue de 1,765 ml. Se recuperaron las partículas coloreadas y se lavaron por centrifugación repetida y redispersión.

**Ejemplo 8-10: Partículas reticuladas que contienen tinte fluorescente verde**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 7 para generar tres conjuntos de partículas adicionales, excepto porque las cantidades de agua fueron de 5,3 ml, 10,6 ml y 21,2 ml, respectivamente.

**Ejemplo 11: Partículas reticuladas que contienen tinte fluorescente naranja (tinte/polímero= 0,334 mg/g)**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 7, excepto porque el tinte era naranja Bodipy 558/568, SE (éster succinimidilo del ácido 4,4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico, Pm= 443,23, Molecular Probes). La concentración de tinte naranja en la disolución de cloruro de metileno era de 0,045 mg/ml. La cantidad de agua añadida

después de la adición de la disolución de tinte era de 1,765 ml. La relación de tinte naranja a polímero era de 0,833 mg/g. La concentración de tinte naranja en la disolución de cloruro de metileno era de 0,045 mg/ml.

**Ejemplos 12-14: Partículas reticuladas que contienen tinte fluorescente naranja**

5 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 11 para generar tres conjuntos de partículas adicionales, excepto porque las cantidades respectivas de agua añadida eran de 5,3 ml, 10,6 ml y 21,2 ml.

**Ejemplo 15: Partículas reticuladas que contienen una relación molar 1:1 de tintes fluorescentes verde y naranja (tinte verde/polímero= 0,150 mg/g; tinte naranja/polímero= 0,153 mg/g).**

10 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 7, excepto porque en lugar de un tinte, se usó una mezcla equimolar de los tintes verde y naranja de los Ejemplos 7-14.

Específicamente, la disolución de cloruro de metileno con los dos tintes tenía una concentración de 0,20 mg/ml del tinte verde y de 0,212 mg/ml del tinte naranja.

15 **Ejemplos 16-17: Partículas reticuladas que contienen cantidades diferentes de tintes fluorescentes verde y naranja**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 15 para generar dos conjuntos de partículas adicionales, excepto porque las cantidades respectivas de agua añadidas eran de 5,3 ml y 21,2 ml.

20 **Ejemplo 18: Partículas reticuladas que contienen una relación molar 1:0,5 de tintes fluorescentes verde y naranja (tinte verde/polímero= 0,150 mg/g; tinte naranja/polímero= 0,765 mg/g).**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 15, excepto porque se usaron tintes verde y naranja en una relación molar de 1:0,5. Específicamente, la disolución de cloruro de metileno que contenía los dos tintes tenía una concentración de 0,20 mg/ml del tinte verde y de 0,10 mg/ml del tinte naranja.

25

**Ejemplos 19-21: Partículas reticuladas que contienen tintes fluorescentes verde y naranja**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 18 para generar tres conjuntos de partículas adicionales, excepto porque las cantidades respectivas de agua añadidas eran de 5,3 ml, 10,6 ml y 21,2 ml.

30 **Ejemplo 22: Partículas reticuladas que contienen una relación molar 0,5:1 de tinte fluorescente verde y naranja (tinte verde/polímero= 0,150 mg/g; tinte naranja/polímero= 0,765 mg/g).**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 15, excepto porque (a) se usaron los tintes verde y naranja en una relación molar de 0,5:1 y (b) la cantidad de agua añadida era de 1,5 ml. La disolución de cloruro de metileno que contenía los dos tintes tenía una concentración de 0,10 mg/ml del tinte verde y de 0,212 mg/ml del tinte naranja.

35

**Ejemplos 23-25: Partículas reticuladas que contienen tintes fluorescentes verde y naranja**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 22 para generar tres conjuntos adicionales de partículas, excepto porque las cantidades respectivas de agua añadida eran de 5,3 ml, 10,6 ml y 21,2 ml.

40 Se muestran en la Tabla 3 las intensidades de fluorescencia de los conjuntos de partículas teñidas preparados de acuerdo con los Ejemplos 7-25.

**Tabla 3: Intensidades verde y naranja en función de las concentraciones iniciales de tinte y la cantidad de agua añadida**

N.º de ejemplo	Cant. de tinte (mg/g de polímero)	Fracción volumétrica de agua	Intensidad de naranja (media)	Intensidad de verde (media)
7	0,833	0,2626	-	980,184
8	0,833	0,5168	-	2638,53
9	0,833	0,6815	-	7251,29
10	0,833	0,8106	-	13175,8
11	0,333	0,2626	655, 519	-
12	0,333	0,5168	1676,34	-
13	0,333	0,6815	6518,44	-
14	0,333	0,8106	12434,9	-
15	0,303	0,2626	1118,73	851,539
16	0,303	0,5168	2707, 29	1989,1
17	0,303	0,8106	7296	5575,43
18	0,227	0,2626	196,022	326,917
19	0,227	0,5168	537,007	740,114
20	0,227	0,6815	1175,03	1686,59
21	0,227	0,8106	3140,37	5008,65
22	0,228	0,2324	261,14	176,635
23	0,228	0,5168	1087,38	439,545
24	0,228	0,6815	3469,4	1162,34
25	0,228	0,8106	8659,33	2974,67

**Ejemplo 26: Construcción de una colección de micropartículas codificadas por fluorescencia**

Se construyó una colección que contenía los diecinueve conjuntos de micropartículas fluorescentes según los Ejemplos 7-25. Se combinaron diez de los diecinueve conjuntos y se registró una imagen de fluorescencia de la mezcla usando un microscopio de fluorescencia Nikon con una cámara de CCD y software de adquisición de imágenes, permitiendo el registro de la fluorescencia verde y naranja. Resultan evidentes en la gráfica de dispersión (mapa de agregados) de la Fig. 7 diez agregados correspondientes a los diez conjuntos en el agrupamiento empleando unidades logarítmicas de intensidades naranja y verde en abscisas y ordenadas, respectivamente. Se resumen en la Tabla 4 los resultados del análisis de los agregados.

**Tabla 4: Intensidades medias de agregado y los correspondientes coeficientes de variación**

N.º de agregado	Detalles del agregado			
	Intensidad naranja (media)	CV ( %)	Intensidad verde (media)	CV ( %)
11	211,363	10,27	541,50	8,65
12	584,10	6,74	1309,52	6,93
13	1300,47	5,66	3154,83	6,49
14	3369,32	4,75	9083,26	5,47
15	1228,41	5,81	1515,42	6,61
16	7699,52	4,53	9973,90	5,40
17	2868,52	5,28	3511,96	6,0

18	1242,01	5,95	825,846	6,93
19	4077,29	4,60	2386,0	5,54
20	9546,03	4,92	5627,64	5,79

### Ejemplo 27: Preparación de partículas magnéticas codificadas

#### A. Síntesis de ferrofluido acuoso

Se prepararon disoluciones madre de  $\text{FeCl}_3$  1 M en HCl 1 N y  $\text{FeCl}_2$  en HCl 1 N. En una botella de vidrio de 100 ml, se combinaron 4 ml de  $\text{FeCl}_3$  1 M y 1 ml de disolución de  $\text{FeCl}_2$  2 M con 400 ml de agua desionizada destilada y se mezclaron con 100 ml de una disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 30 % en peso, dando 500 ml de una disolución aproximadamente 1,7 M de  $\text{NH}_3$  en agua. Se añadieron lentamente 50 ml de disolución de amoníaco a la botella de vidrio que contenía las disoluciones de sal de hierro con agitación vigorosa. Después de la terminación de esta etapa, se añadieron 2 ml de una disolución al 25 % en peso de hidróxido de tetrametilamonio y se sonicó la disolución durante aproximadamente 1 h. Después de esto, se dejó asentar durante una noche el ferrofluido bajo la influencia de un campo magnético. A continuación, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con agua destilada. Se homogeneizó la suspensión de nanopartículas de óxido de hierro en agua desionizada y se dejó asentar durante una noche bajo la influencia de la gravedad. Después del asentamiento, se desechó el precipitado y se recogió el sobrenadante de color oscuro como suspensión de ferrofluido final.

#### 15 B. Síntesis de partículas magnéticas codificadas

Se prepararon micropartículas poliméricas coloreadas de idéntico contenido de tinte y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de diámetro según los procedimientos descritos en la presente memoria que comprenden un núcleo de poliestireno y una cubierta de metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de hidroxietilo (HEMA) y ácido metacrílico (MAA). Se dispersaron las partículas en agua desionizada, dando 1 ml de una suspensión aproximadamente al 1 %. Se añadió entonces a la suspensión una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de ferrofluido. Se mezclaron las suspensiones con agitación rotatoria durante 48 horas a temperatura ambiente. Se centrifugó la disolución resultante a aproximadamente 200 g durante 10 minutos. Se separó un sedimento de partículas coloreadas tostadas del sobrenadante de color rojo amarronado que contiene las nanopartículas en exceso. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en disolución de SDS al 1 % y se centrifugó de nuevo. Se repitió esta etapa dos veces y se redispersó finalmente el sedimento en tampón PBS con 0,5 % de Tween-20. Se tomó 1 ml de suspensión de partículas en un tubo estándar Eppendorf estándar de 1,5 ml y se montó el tubo en un Promega Multitube Magnetic Stand. La separación completa de las partículas suspendidas (como sedimento sobre la pared del tubo) tuvo lugar en aproximadamente 10 minutos.

### 30 Ejemplo 28: Acoplamiento de avidina a la superficie de micropartículas funcionalizadas con carboxilo codificadas por fluorescencia

Se volvieron fluorescentes según el procedimiento del Ejemplo 1 las micropartículas poliméricas funcionalizadas con carboxilato preparadas según el Ejemplo Preparativo 4, proporcionando micropartículas fluorescentes verdes (tinte/polímero= 0,334 mg/g). Se mezcló en un vial de 2 ml una alícuota que contenía 10 mg de micropartículas fluorescentes verdes con 1 ml de tampón borato 10 mM (pH= 8,5). Se separaron entonces las partículas mediante centrifugación y se succionó el sobrenadante. Después de esto, se lavó el sedimento separado dos veces con tampón MES 0,1 M (pH= 4,5) y se resuspendió finalmente en 600  $\mu\text{l}$  del mismo. Se disolvieron en un vial separado 3 mg de NeutrAvidin (una proteína de unión a biotina, Pierce Chemicals, Rockford, IL) en 300  $\mu\text{l}$  de tampón MES y se añadió lentamente la disolución a la suspensión de micropartículas poliméricas. Se sonicó brevemente la suspensión usando un sonicador de sonda. Después de esto, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de disolución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (Aldrich-Sigma, Milwaukee, WI) (EDAC) (200 mg/ml) a la disolución de partículas. Se dejó reaccionar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente, después de lo cual se separaron las micropartículas

poliméricas funcionalizadas con NeutrAvidin, se lavaron una vez con tampón de acoplamiento, dos veces con tampón borato, se resuspendieron finalmente y se almacenaron en tampón de almacenamiento (PBS, pH= 7,4, 0,1 % (p/v) de BSA, 0,5 % (p/v) de Tween 20, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM y 0,02 % (p/v) de  $\text{NaN}_3$  a 2-8 °C.

5 **Ejemplo 29: Acoplamiento de avidina con la superficie de micropartículas funcionalizadas con tosilo codificadas por fluorescencia**

Se usaron en este ejemplo micropartículas de núcleo y cubierta fluorescentes funcionalizadas con tosilo reticuladas comercialmente disponibles (Bangs Laboratories, Inc., 3,2  $\mu\text{m}$ , 10 % de sólidos, 12,5 % de divinilbenceno). Las micropartículas contenían una carga de tinte fluorescente verde de aproximadamente 0,3 mg de tinte/g de micropartícula. Se lavaron tres veces 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión que contenía un 1 % de las micropartículas con 500  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) y se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de ese tampón. Después de esto, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de NeutrAvidin 5 mg/ml y se dejó proseguir la reacción durante una noche a 37 °C. Después de la terminación de la incubación, se lavaron una vez las partículas funcionalizadas con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (pH 7,4) que contenían BSA 10 mg/ml, se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de ese tampón y se hicieron reaccionar durante 1 h a 37 °C para bloquear los sitios no reaccionados sobre la superficie de las micropartículas. Después de la etapa de bloqueo, se lavaron las micropartículas tres veces con 500  $\mu\text{l}$  de PBS (pH 7,4) que contenía BSA 10 mg/ml y se almacenaron en 200  $\mu\text{l}$  de PBS (pH 7,4) con BSA 10 mg/ml.

20 **Ejemplo 30: Ensayo de unión de NeutrAvidin-biotina usando micropartículas fluorescentes**

Se dispusieron 100  $\mu\text{l}$  de micropartículas fluorescentes funcionalizadas con NeutrAvidin que contenían un 1 % en sólidos de Ejemplo 28 en un vial de 1,5 ml y se diluyó la suspensión con 900  $\mu\text{l}$  de PBS que contenía un 0,01 % (p/v) de Tween-20 (PBST). Se mezclaron las micropartículas mediante agitación con vórtex y se separaron entonces por centrifugación. Se separó el sobrenadante por aspiración y se resuspendió el sedimento en 980  $\mu\text{l}$  de PBS, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de biotina-oligo(dT)<sub>5</sub>-CY5.5 (oligonucleótido marcado con un tinte fluorescente Cy5.5) (IDT, Coralville, IA) a una concentración de 26,7 ng/ml y se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se separaron las micropartículas, se lavaron dos veces con PBST y se resuspendieron en 1 ml de PBST. Se ensamblaron entonces las micropartículas en un chip y se determinó su fluorescencia de superficie como una medida directa de la cantidad de biotina-oligo(dT)<sub>5</sub>-CY5.5 unida a las partículas funcionalizadas con NeutrAvidin. Los resultados indicados en la Figura 8 muestran la eficacia de captura por sonda biotinilada de dos partículas diferentes (marcadas como muestras) teñidas usando el procedimiento de la presente invención y la eficacia de captura de una micropartícula no teñida que se usó como control positivo.

35 **Ejemplo 31: Ensayo de hibridación usando micropartículas fluorescentes**

Se unieron oligonucleótidos biotinilados de secuencia de bases conocida a micropartículas codificadas por fluorescencia funcionalizadas con NeutrAvidin (como se prepara en el Ejemplo 30) como sigue. Se dispusieron 50  $\mu\text{l}$  de una disolución que contenía un 1 % de las micropartículas funcionalizadas con NeutrAvidin en 0,1 ml de tampón de reacción (NaCl 150 mM, EDTA 0,05 M, 0,5 % de seroalbúmina bovina, Tris-HCl 0,5 mM y fosfato de sodio 100 mM, pH 7,2) que contenía oligonucleótidos biotinilados 0,4  $\mu\text{M}$  y aproximadamente  $7 \times 10^5$  micropartículas. Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación con vórtex. Tras la terminación de la reacción, se recogieron las partículas por centrifugación, se lavaron tres veces con PBST (NaCl 150 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7,2 con 0,05 % de Tween 20) y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS (NaCl 150 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7,2). El procedimiento anterior puede utilizarse para acoplar cualquier oligonucleótido biotinilado de interés con partículas funcionalizadas con NeutrAvidin.

Se diluyó 1 µl de una disolución 10 µM de una diana sintética (5'-/CY5.5/SEQ ID NO: 1/-3') en agua desionizada con 19 µl de 1 x TMAC (cloruro de tetrametilamonio 4,5 M, Tris 75 mM, pH 8,0, EDTA 3 mM, 0,15 % de SDS) hasta un volumen final de 20 µl. Se ensamblaron dos tipos de micropartículas fluorescentes funcionalizadas con oligonucleótido en matrices planas sobre sustratos de silicio. Se funcionalizó el primer tipo de micropartícula con una secuencia de sonda coincidente 5'-biotina/(espaciador TEG)/SEQ ID NO:2/-3'. El segundo tipo de micropartícula se funcionalizó con una secuencia de sonda no coincidente biotina/(espaciador TEG)/SEQ ID NO:3/-3'. Se añadieron 20 µl de la diana sintética a la superficie del sustrato y se dispuso el sustrato en un calentador a 53 °C durante 15 minutos con agitación a 30 rpm. Se retiró entonces el portaobjetos del calentador y se aspiró la disolución diana. Se lavó el sustrato una vez con 1 x TMAC a temperatura ambiente. Después de esto, se dispusieron 10 µl de 1 x TMAC sobre la superficie del sustrato, se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio y se registró la intensidad de fluorescencia de la matriz usando la instrumentación descrita anteriormente. Los resultados de la Fig. 9 muestran que la hibridación era específica.

### **Ejemplo 32: Inmunoensayo usando micropartículas fluorescentes**

Se usaron en este ejemplo micropartículas de núcleo y cubierta fluorescentes funcionalizadas con tosilo reticuladas comercialmente disponibles (Bangs Laboratories, Inc., 3,2 µm, 10 % de sólidos, 12,5 % de divinilbenceno). Las micropartículas contenían una carga de tinte fluorescente verde de aproximadamente 0,3 mg de tinte/g de micropartícula. Se combinaron 1 ml de PBST (PBS a pH 7,4 que contiene 0,1 % de Tween-20) y 50 µl de una suspensión al 1 % de micropartículas funcionalizadas con tosilo teñidas (0,5 mg) en un tubo Eppendorf y se mezclaron bien mediante vórtex. Después de esto, se centrifugó la suspensión a 7500 rpm durante 2 min y se decantó el sobrenadante. Se repitió la operación una vez con 1 ml de PBST y una vez con 1 ml de PBS. Se resuspendieron finalmente las micropartículas en 1 ml de PBS. Se añadió una cantidad precalculada de anticuerpo anti-TNF-α (R&D Systems), a una concentración de 50 µg de micropartículas de proteína/mg y se incubó la suspensión durante una noche a temperatura ambiente con agitación rotativa. Se lavaron entonces las micropartículas y se resuspendieron en 1 ml de tampón de bloqueo/almacenamiento (PBS 0,1 M, pH 7,4 que contiene 0,1 % de BSA, 0,1 % de Tween 20 y 0,1 % de NaN<sub>3</sub>). Se dispusieron 10 µl de suspensión de micropartículas funcionalizadas con anticuerpo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se lavaron las partículas dos veces con 1 ml de PBST y una vez con 1 ml de PBS (pH 7,2). Se diluyeron 30 µl de una disolución madre de IgG de cabra anti-ratón marcada con Cy5.5-1 añadiendo 1470 µl de PBS (1:50). Se transfirieron 500 µl de esta disolución a la suspensión de micropartículas y se incubó la reacción de unión a anticuerpo durante 60 min a temperatura ambiente con agitación rotativa. Después de la incubación, se lavaron las partículas dos veces con 1 ml de PBST y se resuspendieron entonces en 10 µl de PBS. Se ensambló entonces una matriz plana de micropartículas sobre sustrato de silicio para análisis como en el Ejemplo 31. Se registró una intensidad media de Cy5.5 de 6.500 usando las condiciones e instrumentación descritas anteriormente.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BioArray Solutions, Ltd.  
 Banerjee, Sukanta  
 Georgescu, Cecilia  
 Seul, Michael  
 <120> PROCEDIMIENTO PARA CONTROLAR LA CARGA DE SOLUTO DE MICROPARTÍCULAS  
 POLIMÉRICAS  
 <130> 42970-2 PC  
 <150> US 10/348.165  
 <151> 21-01-2003  
 <160> 3

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0  
 <210> 1  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia aleatoria  
 <400> 1  
**ccgctcgtct tccaggatgt ccttctg** **27**

10 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

15 <223> Complemento de la SEQ ID NO: 1  
 <400> 2  
**aaggacatcc tggaagac** **18**

20 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> No coincidente con respecto a la SEQ ID NO:1  
 <400> 3  
**ataaccagga ggagttcg** **18**

25

**REIVINDICACIONES**

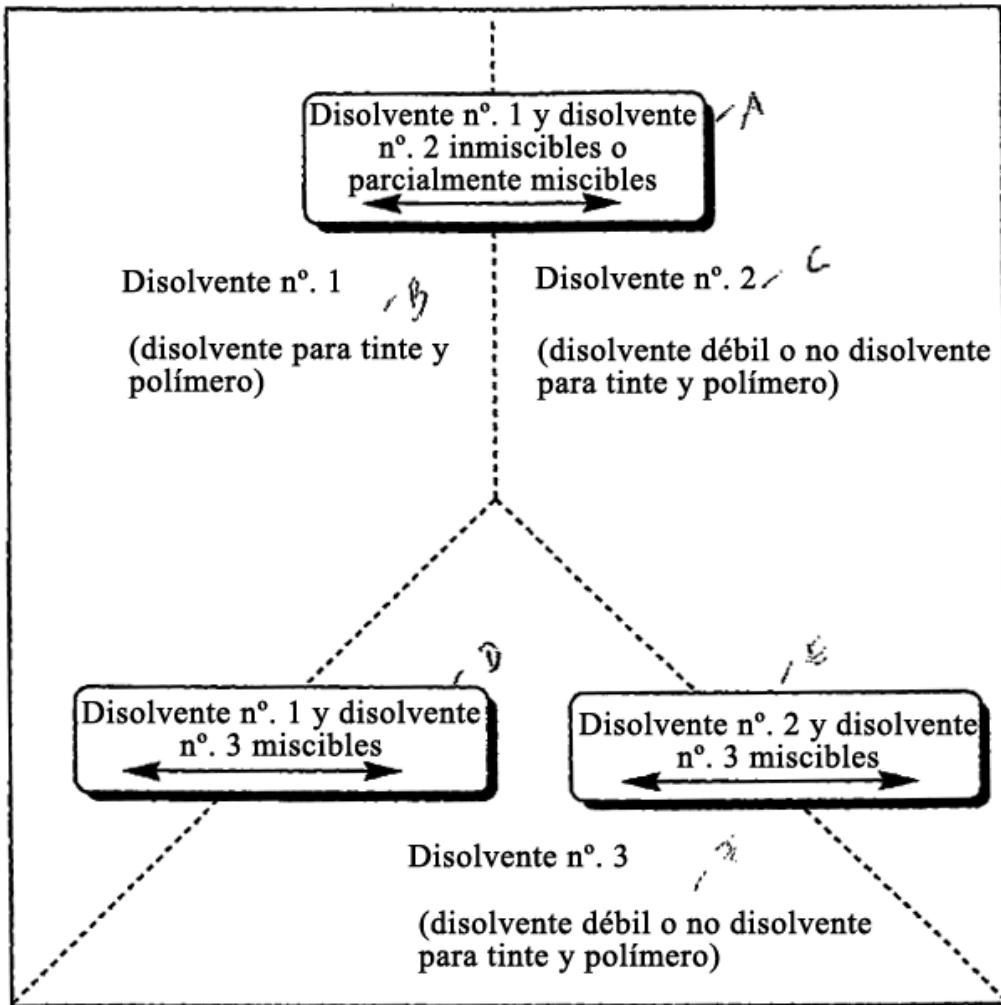
1. Un procedimiento para modular la carga de tinte de micropartículas poliméricas que comprende:
- 5 a) proporcionar:
- 10 i. al menos un primer disolvente en el que sean solubles el tinte y el polímero de micropartícula;
- ii. al menos un segundo disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dichos primer y segundo disolventes inmiscibles o como máximo parcialmente miscibles;
- 10 iii. al menos un tercer disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dicho tercer disolvente miscible con el primer y segundo disolventes;
- b) formar una suspensión de dichas micropartículas poliméricas en un volumen designado de una mezcla que comprende al menos un segundo disolvente y al menos un tercer disolvente;
- c) 15 añadir a dicha suspensión de micropartículas poliméricas una disolución que comprende un tinte disuelto en dicho primer disolvente, con lo que el soluto se capta por las micropartículas;
- d) añadir de forma continua o semicontinua el segundo disolvente a la suspensión de micropartículas para modular de forma continua o semicontinua la concentración de tinte en la micropartícula y controlar así la captación y concentración final de tinte en las micropartículas.
- 20 2. El procedimiento según la reivindicación 1 que incluye adicionalmente la etapa de retirar al menos una porción de dichas micropartículas de la suspensión en un intervalo de tiempo durante el transcurso de dicha adición del segundo disolvente, proporcionando conjuntos de micropartículas que difieren en la concentración de tinte.
3. Un procedimiento de producción de micropartículas poliméricas teñidas que comprende:
- 25 a) proporcionar:
- 30 i. al menos un primer disolvente en el que sean solubles el tinte y el polímero de micropartícula;
- ii. al menos un segundo disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dichos primer y segundo disolventes inmiscibles o como máximo parcialmente miscibles;
- 30 iii. al menos un tercer disolvente en que no sean solubles o solo débilmente el tinte y el polímero de micropartícula, siendo dicho tercer disolvente miscible con el primer y segundo disolventes;
- b) formar una suspensión de dichas micropartículas poliméricas en un volumen designado de una mezcla que comprende al menos un segundo disolvente y al menos un tercer disolvente;
- 35 c) añadir a dicha suspensión de micropartículas poliméricas una disolución que comprende un tinte disuelto en dicho primer disolvente, con lo que el soluto se capta por las micropartículas proporcionando una suspensión de mezcla maestra de micropartículas caracterizada por una primera concentración de dicho tinte en las micropartículas;
- d) 40 crear dos o más alícuotas a partir de dicha suspensión de mezcla maestra de micropartículas que contengan cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente para cambiar la cantidad de reparto de tinte en micropartículas poliméricas en dichas alícuotas; y
- e) incubar las alícuotas de suspensión de micropartículas durante un periodo de tiempo de modo que la cantidad de reparto de tinte en las micropartículas, para una concentración de tinte inicial dada en la



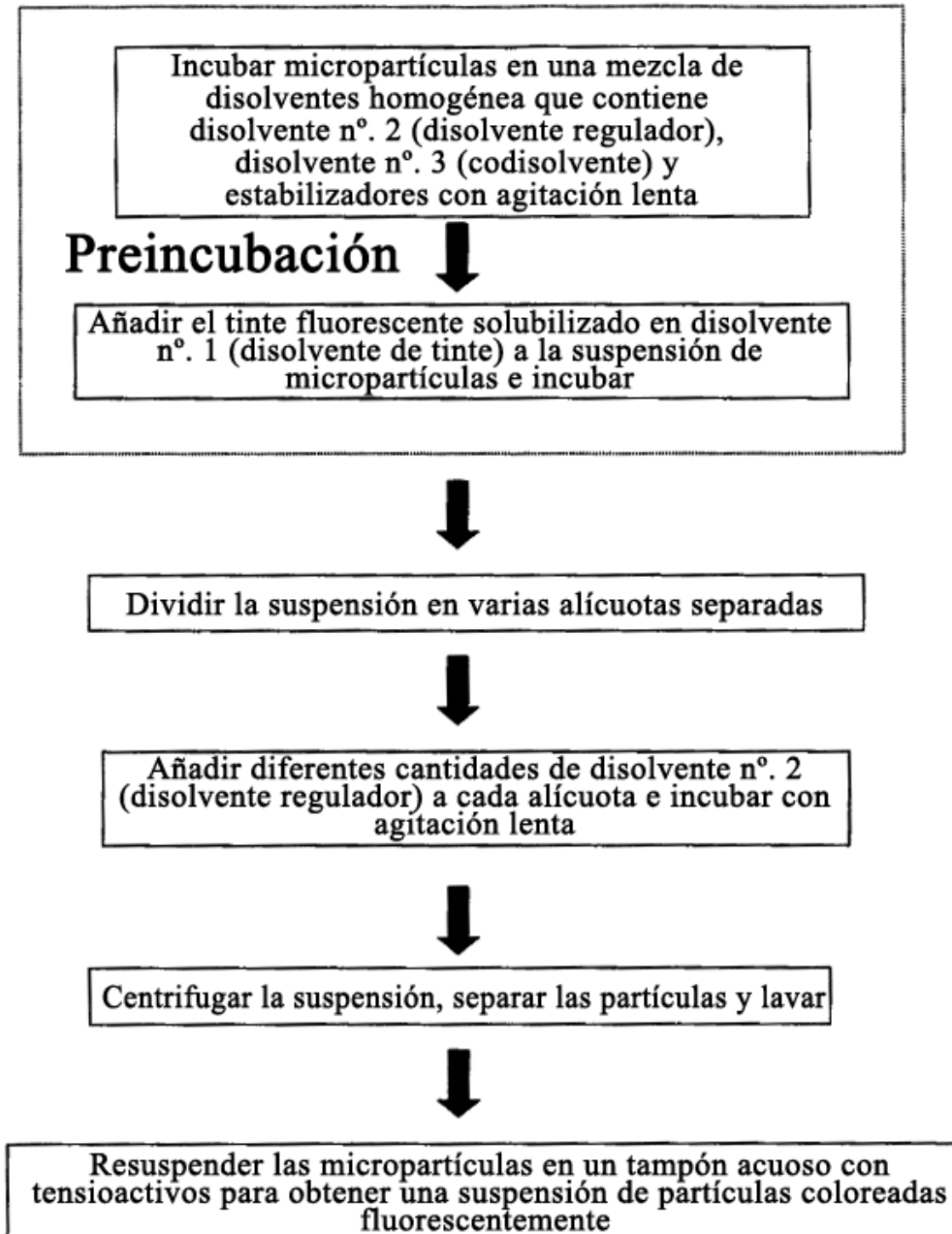
disolución de tinte, se determine por la cantidad del segundo disolvente añadida a las alícuotas de suspensión de micropartículas.

- 5 4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de creación de dichas dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente comprende dividir la mezcla maestra de suspensión de micropartículas en dos o más alícuotas, y añadir cantidades seleccionadas del segundo disolvente a dichas alícuotas.
- 10 5. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la etapa de creación de dichas dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente comprende añadir de forma continua o semicontinua el segundo disolvente a la mezcla maestra de suspensión de micropartículas y retirar al menos una porción de dicha mezcla maestra en un intervalo de tiempo durante el transcurso de dicha adición del segundo disolvente, formando dos o más alícuotas de suspensión de micropartículas que contienen cantidades añadidas seleccionadas del segundo disolvente.
- 15 6. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el tinte es un tinte fluorescente.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tinte es un tinte hidrófobo.
- 20 8. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tinte se selecciona del grupo consistente en tintes de estirilo, tintes de pirrometano, tintes de cumarina y combinaciones de los mismos.
9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que las micropartículas comprenden un polímero hidrófobo.
- 25 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el polímero es un homopolímero o copolímero que comprende un monómero que contiene vinilo.
- 30 11. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el polímero se selecciona del grupo consistente en homopolímeros o copolímeros de poliestireno, poli(metacrilato de metilo), poliacrilamida, polietilenglicol, poli(metacrilato de hidroxietilo), poliviniltolueno, polidivinilbenceno y combinaciones de los mismos.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el polímero es poliestireno o un copolímero del mismo que contiene al menos un 50 % en peso de unidades de monómero de estireno.
- 35 13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que el polímero es un copolímero de estireno/ácido metacrílico.
14. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el polímero está reticulado.
- 40 15. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que las micropartículas tienen un diámetro de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que las partículas están monodispersadas.

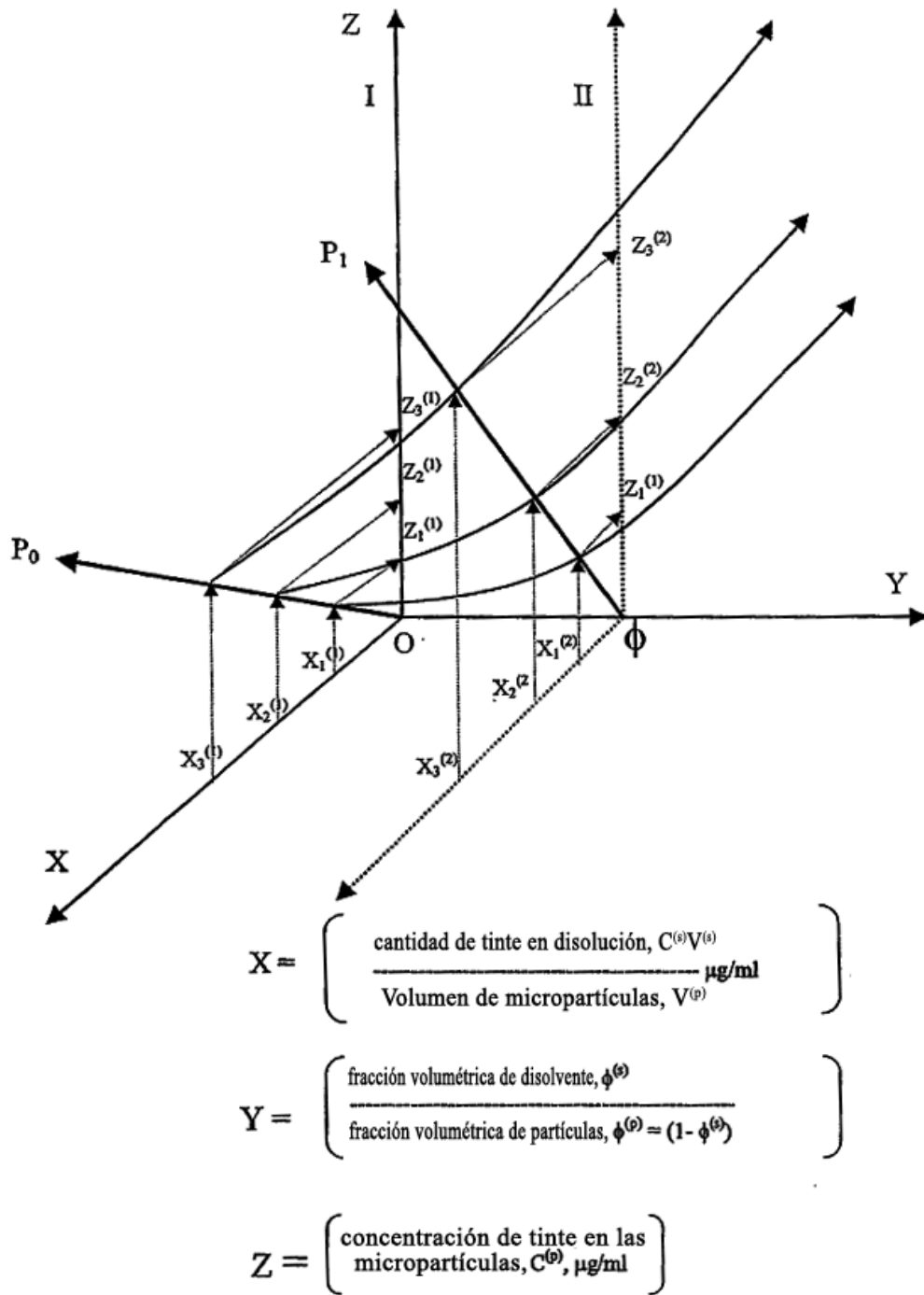
17. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la concentración de tinte presente en la suspensión de micropartículas formada poniendo en contacto las micropartículas con dicha disolución de tinte es de aproximadamente 10 µg/g a aproximadamente 100 µg/g, basado en el peso de la suspensión de micropartículas.
- 5 18. El procedimiento según la reivindicación 9, que comprende un disolvente en el que el primer disolvente se selecciona del grupo consistente en cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, dioxano, ciclohexano, benceno, tolueno, acetato de butilo, hidrocarburos alifáticos clorados inferiores y combinaciones de los mismos; el segundo disolvente es agua y el tercer disolvente se selecciona del grupo consistente en acetona, alcoholes inferiores y combinaciones de los mismos.
- 10 19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que el primer disolvente es cloruro de metileno o diclorometano, y el segundo disolvente es un alcohol.
20. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que el tercer disolvente es alcohol.
- 15 21. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la micropartícula es una micropartícula de núcleo y cubierta que comprende un núcleo central que comprende uno o más polímeros de núcleo rodeado por una cubierta que comprende uno o más polímeros de cubierta.
- 20 22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que el polímero de núcleo comprende un copolímero de estireno y un monómero más hidrófilo que el estireno.
23. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que el polímero de núcleo comprende ácido metacrílico.
- 25 24. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que al menos una porción de las micropartículas es magnéticamente sensible.



**Fig. 1(a)**

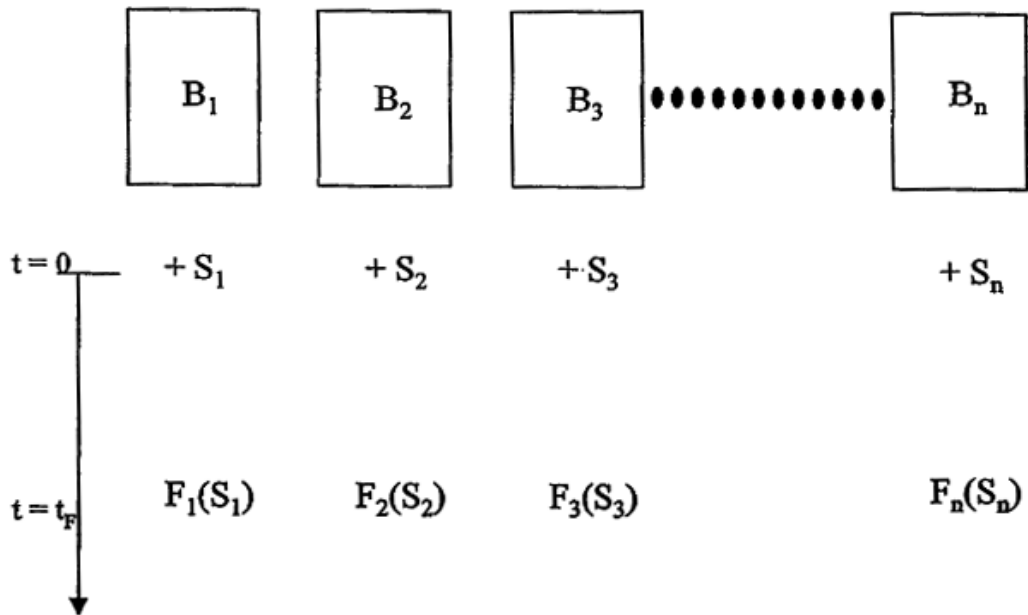


**Fig. 1(b)**



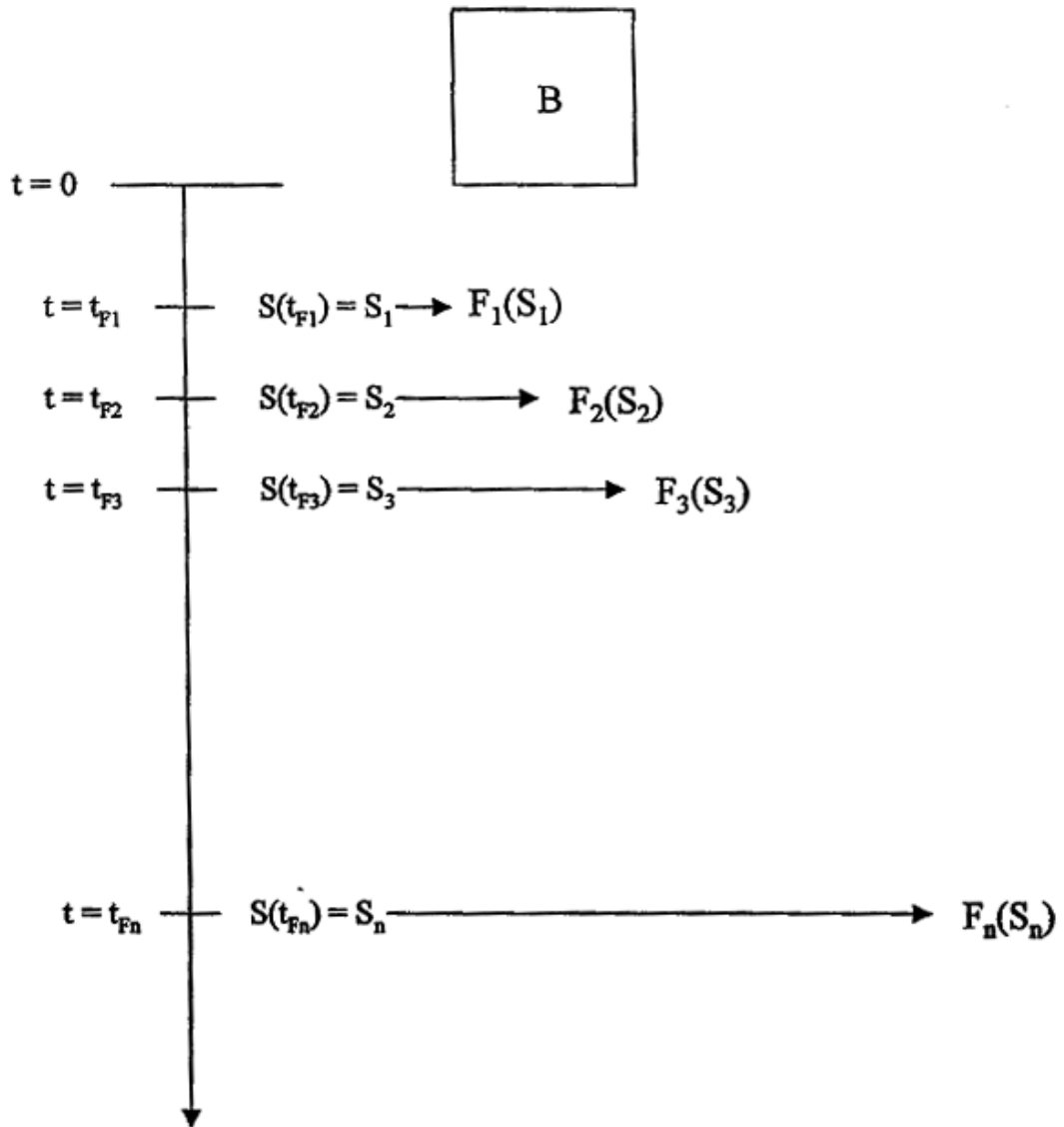
**Fig. 2**

## Procesamiento en paralelo



**Fig. 3(a)**

**Procesamiento en serie**



**Fig. 3(b)**

En serie seguido de en paralelo

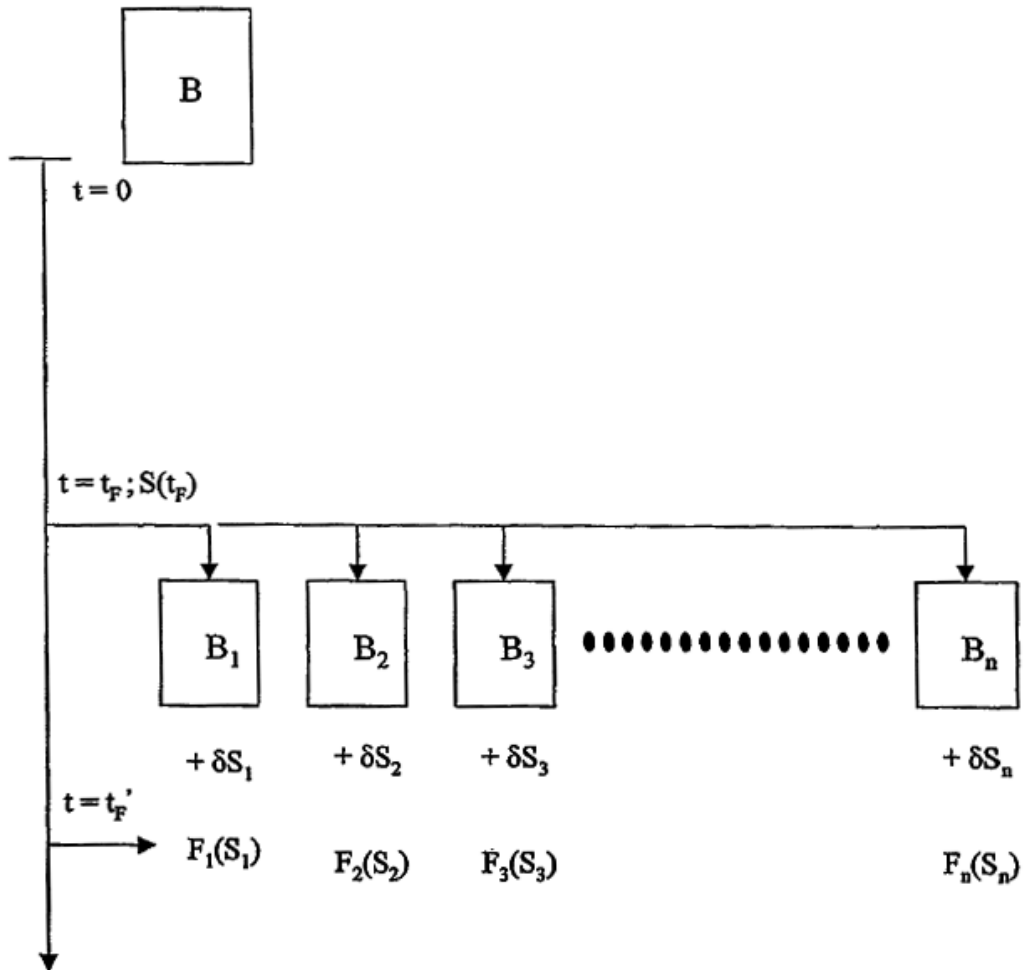
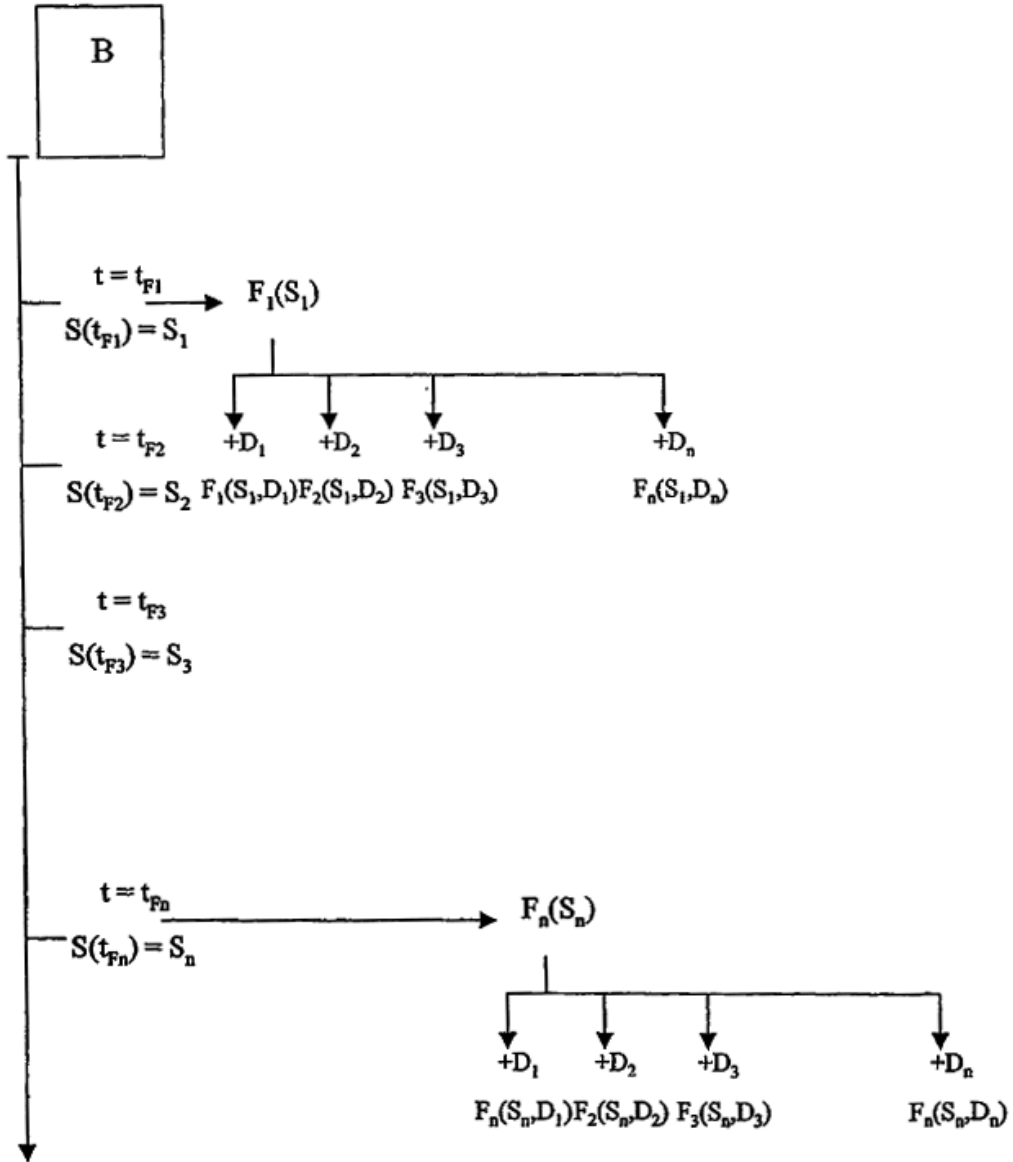


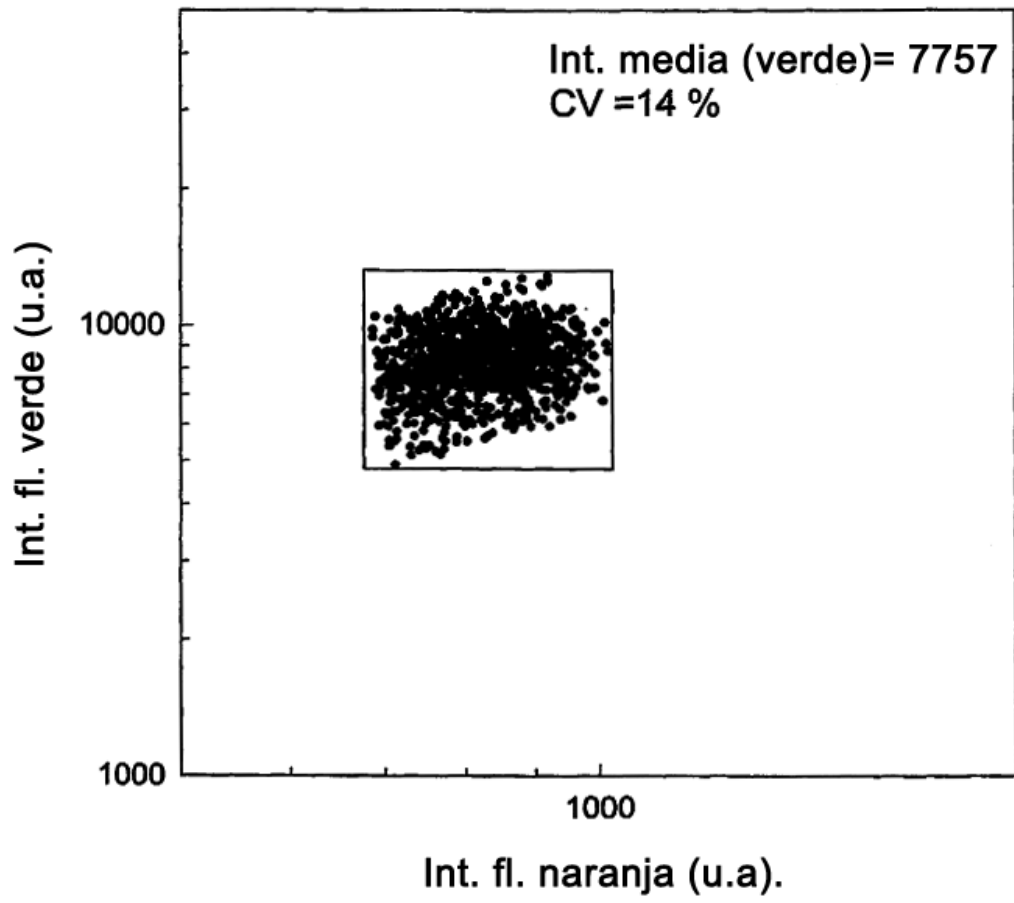
Fig.3(c)



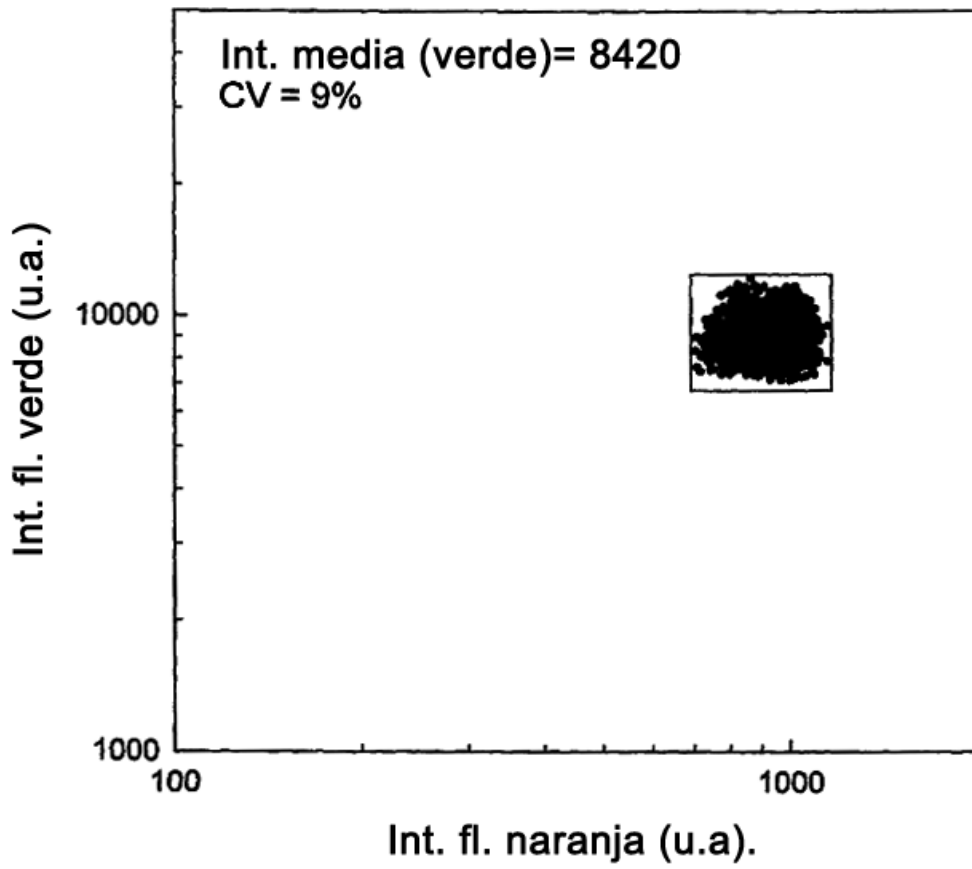
**Procesamiento en serie seguido de en paralelo usando una combinación de regulación por disolvente y adición de tinte**



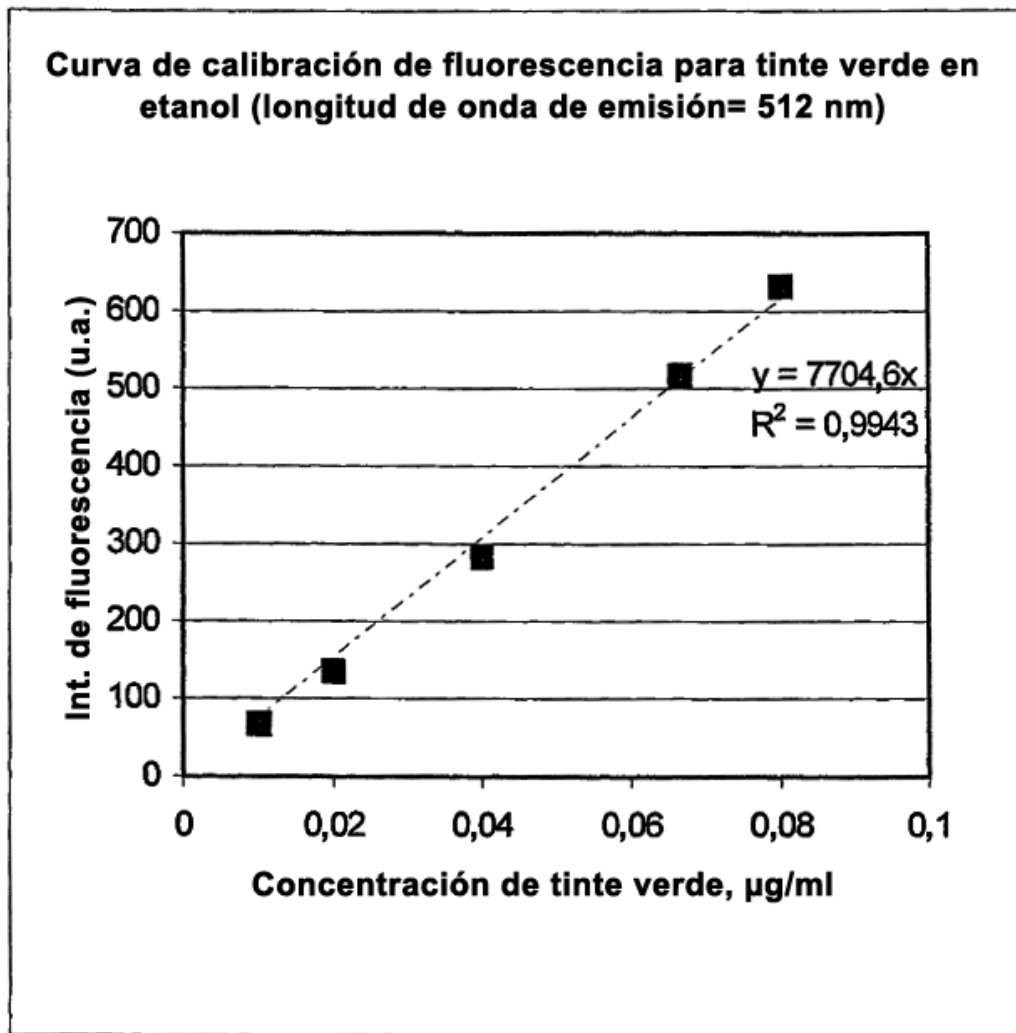
**Fig. 3(d)**

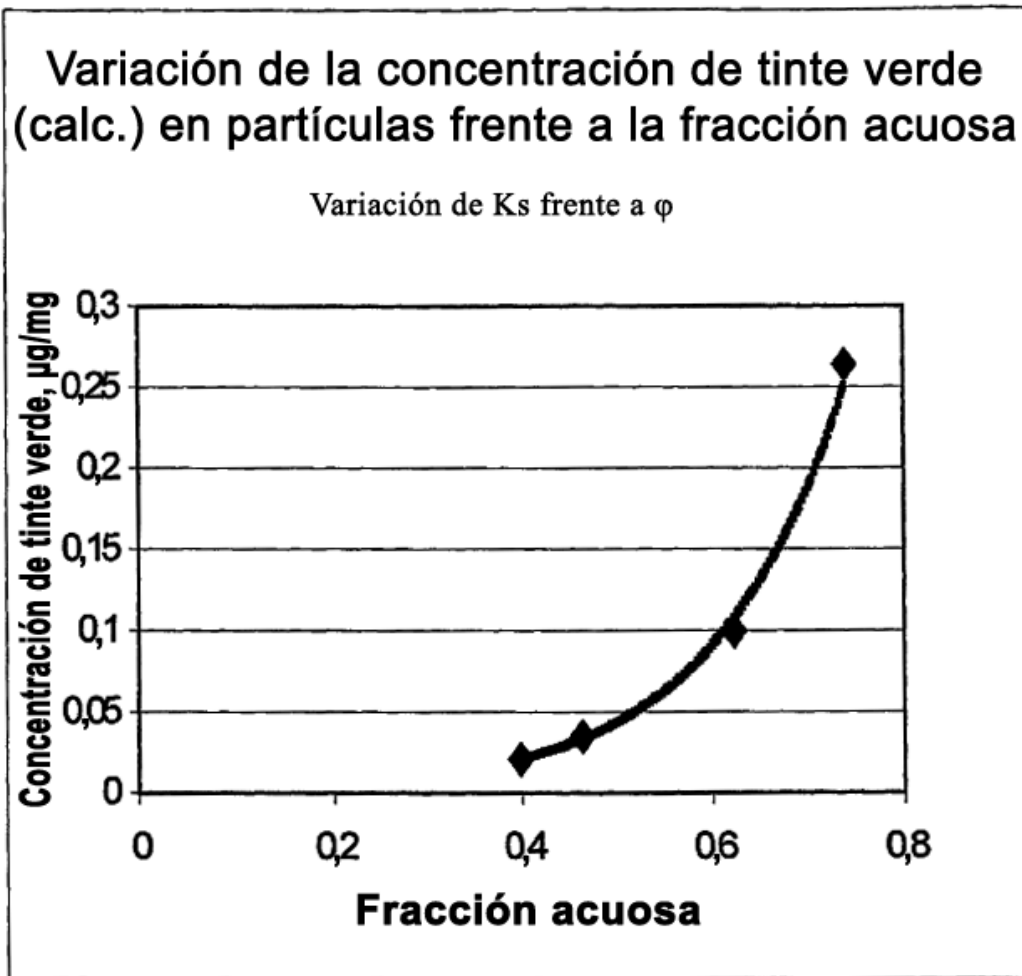


**Fig. 4**

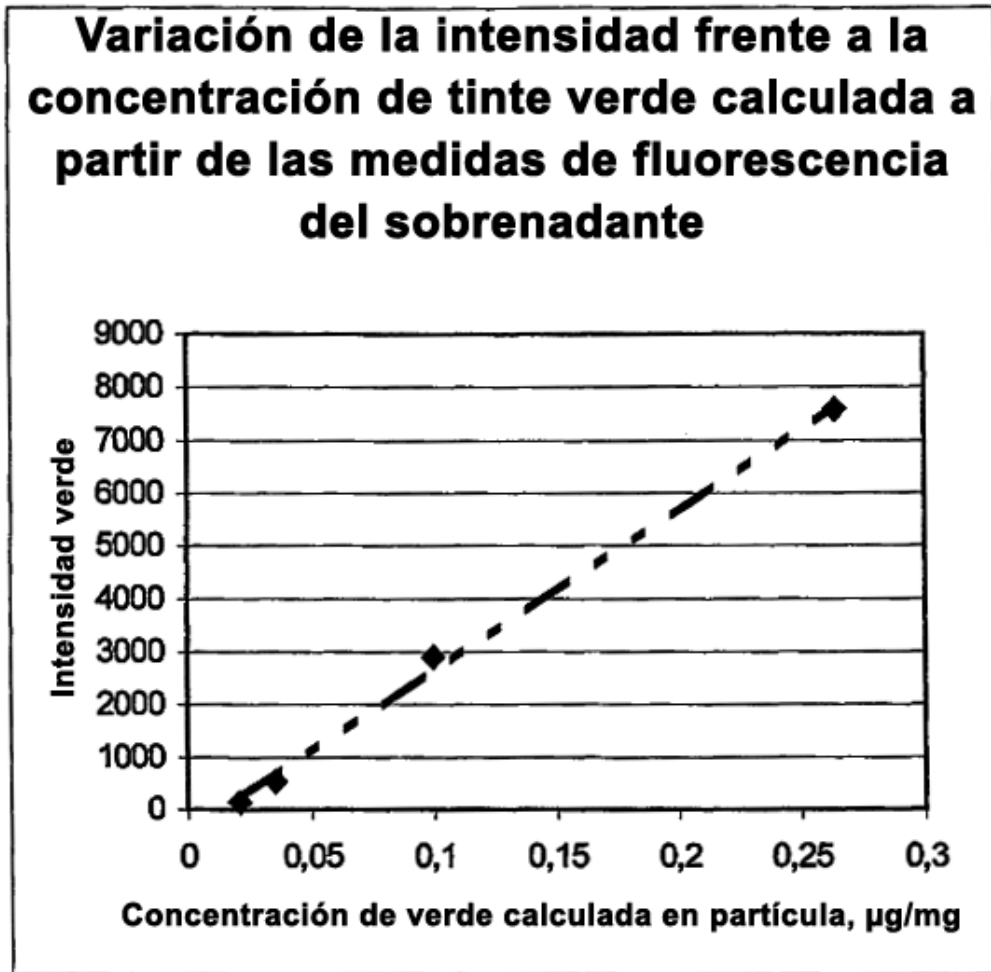


**Fig. 5**

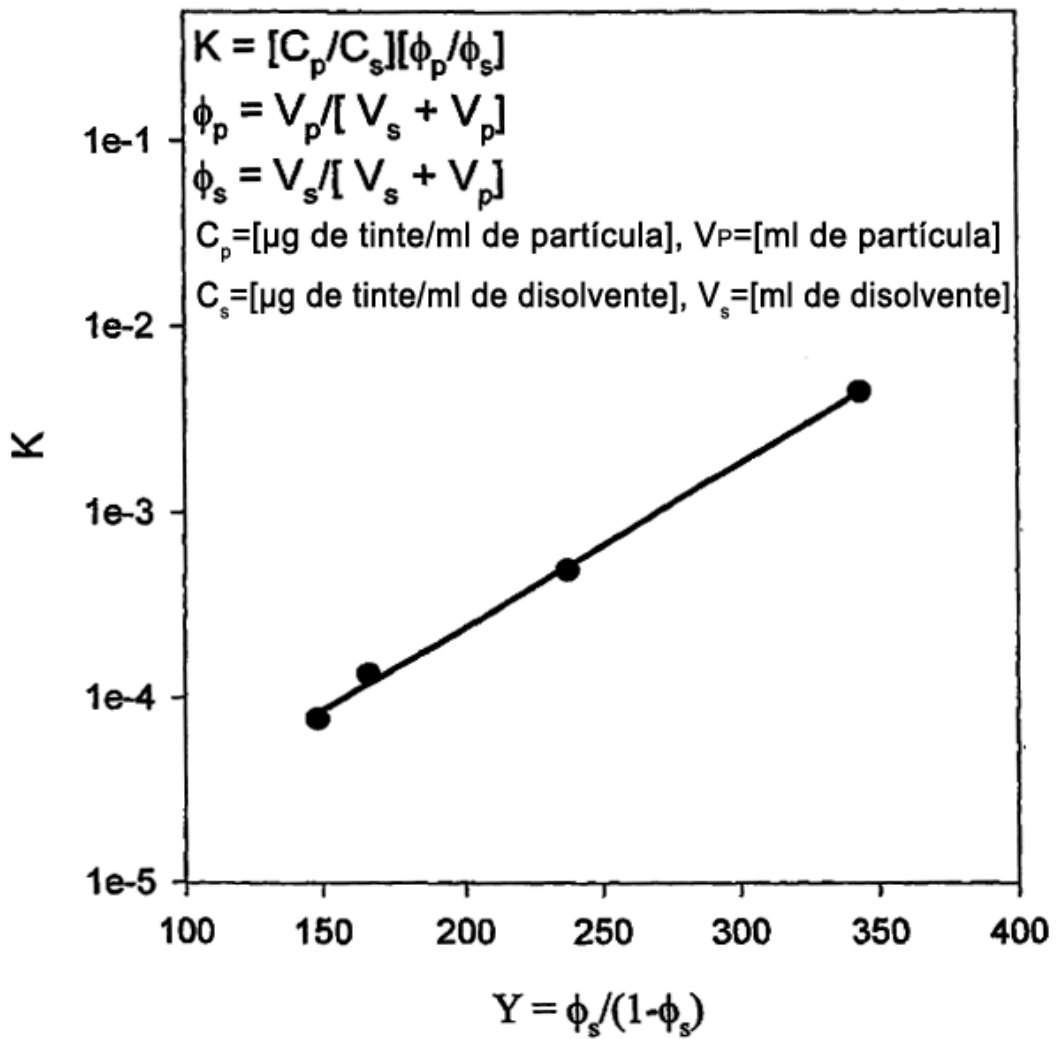
**Fig. 6(a)**



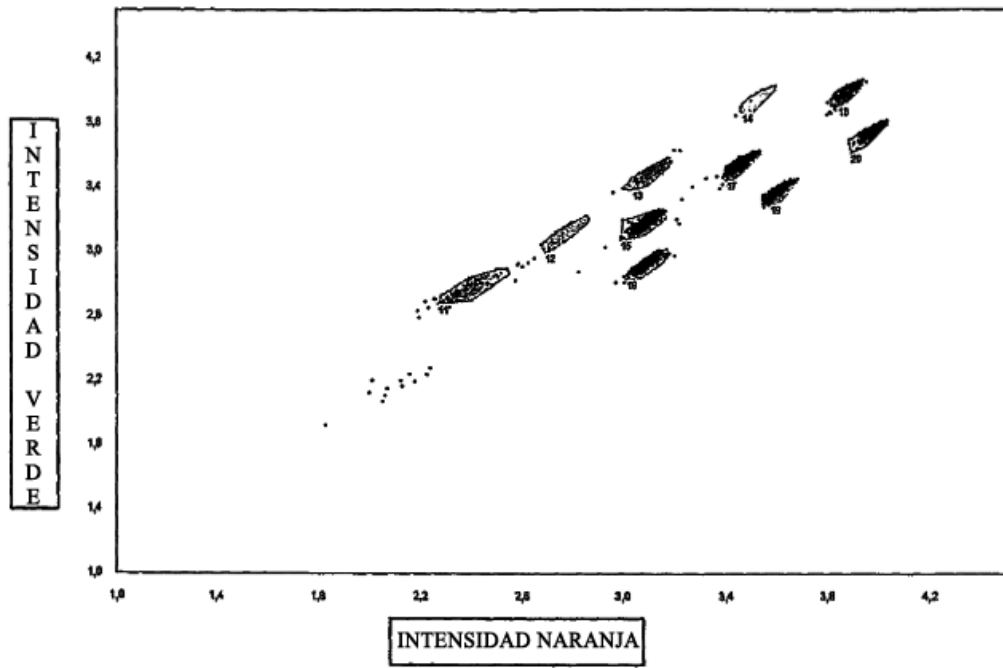
**Fig. 6(b)**



**Fig. 6(c)**

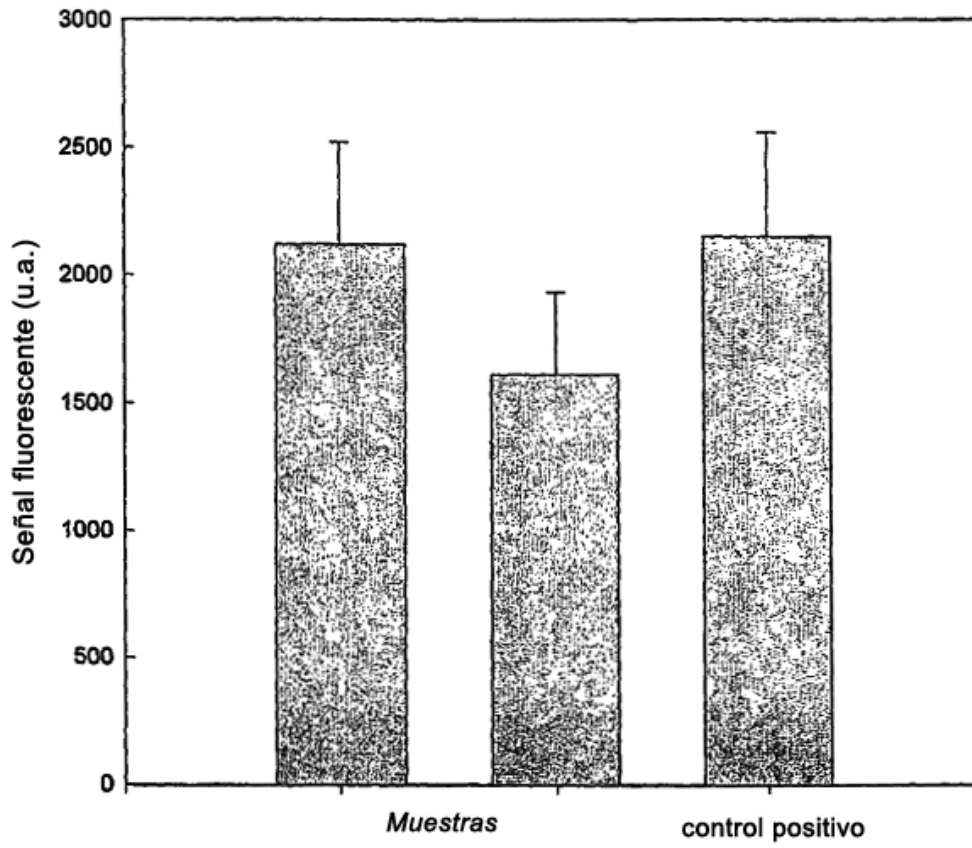


**Fig. 6(d)**

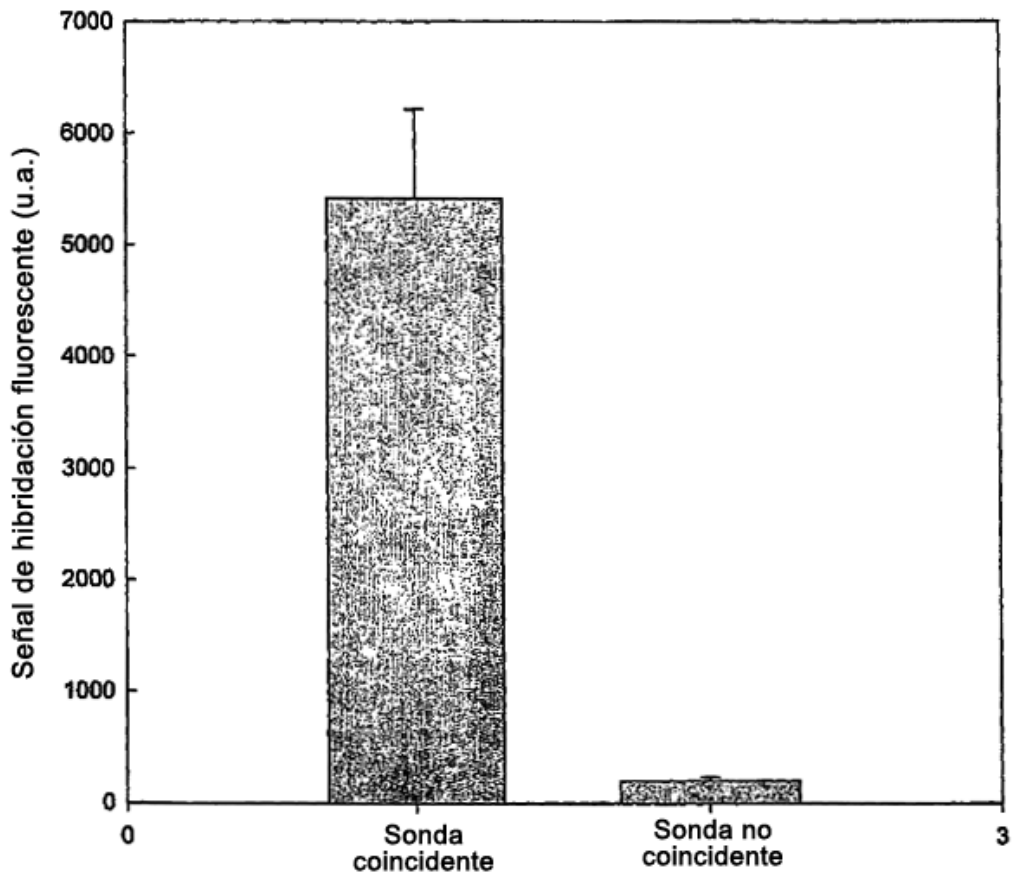


**Fig. 7**





**Fig. 8**



**Fig. 9**