(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 641 512**

(51) Int. Cl.:

C09K 11/77	(2006.01)
B41M 3/06	(2006.01)
G01N 21/63	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
G07D 7/12	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
G07D 7/00	(2006.01)
G07D 7/20	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/029487**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14144892**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14724576 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 2970767**

(54) Título: **Códigos de barras espaciales/espectrales de micropartículas de tierras raras para la marcación de objetos y tejidos**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361801351 P
15.03.2013 US 201361800995 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

(73) Titular/es:

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (100.0%)
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139, US

(72) Inventor/es:

BISSO, PAUL;
SWISTON, ALBERT;
LEE, JISEOK y
DOYLE, PATRICK, S.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 641 512 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

Códigos de barras espaciales/espectrales de micropartículas de tierras raras para la marcación de objetos y tejidos

Declaración de interés del gobierno

Esta invención se hizo con el apoyo gubernamental bajo el Contrato No. FA8721-05-C-0002 concedido por la Fuerza Aérea de los Estados Unidos. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/801.351, presentada el 15 de marzo de 2013, y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/800.995, presentada el 15 de marzo de 2013.

Antecedentes de la invención

Muchas industrias (por ejemplo, farmacéuticas, bancos, arte fino) están interesadas en la marcación de objetos con marcas que son resistentes a la "suplantación" o falsificación. Actualmente hay muchas tecnologías diferentes para marcar objetos con códigos, tales como códigos de barras unidimensionales (por ejemplo, códigos de barras UPC), códigos bidimensionales (por ejemplo, códigos QR) y marcas de identificación por radiofrecuencia (RFID). Sin embargo, existe la necesidad de un marcación más pequeña y más discreta que sea resistente a la "suplantación" o falsificación.

La patente estadounidense No. 5.674.698 A describe métodos, composiciones y aparatos para llevar a cabo la detección de analitos, tales como macromoléculas biológicas y otros analitos, marcando una molécula sonda con una marca de conversión ascendente. La marca de conversión ascendente absorbe la radiación de una fuente de iluminación y emite radiación en una o más frecuencias más altas, proporcionando una relación señal-ruido mejorada. Los métodos, composiciones y aparatos son adecuados para la detección sensible de múltiples analitos y para diversas técnicas de muestreo clínico y ambiental.

Breve divulgación de los dibujos

La Figura 1 representa esquemáticamente de un ejemplo de micropartícula, de acuerdo con una realización.

La Figura 2 es una gráfica de un espectro de emisión de ejemplos de nanocristales de conversión ascendente (UCN) marcados "UCN1", de acuerdo con una realización.

La Figura 3 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN2", de acuerdo con una realización.

La Figura 4 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN3", de acuerdo con una realización.

La Figura 5 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN4", de acuerdo con una realización.

La Figura 6 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN5", de acuerdo con una realización.

La Figura 7 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN6", de acuerdo con una realización.

La Figura 8 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN7", de acuerdo con una realización.

La Figura 9 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN8", de acuerdo con una realización.

La Figura 10 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN9", de acuerdo con una realización.

La Figura 11 es un gráfico de un espectro de emisión de ejemplos de UCN marcados "UCN10", de acuerdo con una realización.

La Figura 12 es un gráfico de capacidad de respuesta espectral de canales RGB de un sensor de imágenes CCD con franjas de emisión UCN superpuestas, de acuerdo con una realización.

La Figura 13 es un gráfico del espectro de emisión de UCN6 que superpone la capacidad de respuesta espectral de canales RGB de un sensor de imágenes CCD, de acuerdo con una realización.

La Figura 14 es un gráfico que muestra espectros de emisión de conversión ascendente únicos producidos mediante diversas concentraciones de dopante, de acuerdo con una realización.

La Figura 15 es una imagen de diferentes tipos de UCN bajo iluminación NIR, de acuerdo con una realización.

La Figura 16 es una micrografía electrónica de transmisión de diferentes tipos de UCN, de acuerdo con una realización.

La Figura 17 incluye gráficos de espectros de emisión para diferentes lotes de UCN, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 18 incluye imágenes luminiscentes de UCN en líquido con y sin campo magnético externo aplicado, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 19 es un gráfico de magnetización frente al campo magnético aplicado para UCN4, de acuerdo con una realización.

La Figura 20 es un diagrama de bloques que representa esquemáticamente un método para formar una micropartícula contigua, de acuerdo con una realización.

La Figura 21 representa esquemáticamente un método litográfico de flujo de parada para formar una micropartícula contigua, de acuerdo con una realización.

La Figura 22 es una imagen de luminiscencia de micropartículas que tienen números diferentes de regiones codificadas, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 23 incluye gráficos de valores de intensidad integrados para micropartículas, cada uno incluyendo un tipo diferente de UCN, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 24 es un diagrama de dispersión de datos de intensidad integrados para micropartículas que incluyen diferentes tipos de nanocristales, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 25 es un gráfico de los datos medidos de intensidad integrada media y los datos de intensidad integrada esperada para el canal rojo frente al canal verde que muestra contornos de confianza de cinco sigma, de acuerdo con una realización.

La Figura 26 muestra datos de intensidad integrados para diferentes lotes de micropartículas, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 27 es un gráfico de los espectros de emisión de UCN4 después de cada etapa en la modificación química de la superficie de los UCN, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 28 muestra la intensidad de emisión de micropartículas en función del tiempo durante la intensa irradiación NIR sostenida, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 29 muestra gráficos de intensidad frente a la edad de las micropartículas para micropartículas con UCN terminado en carboxilo y para micropartículas con UCN acrilado, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 30 es un gráfico de intensidad integrada para diferentes canales de color para micropartículas, de acuerdo con una realización.

La Figura 31 es una imagen de luminiscencia de micropartículas que marcan un empaque blíster, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 32 es un primer plano de una imagen de luminiscencia de micropartículas que marcan un empaque blíster, de acuerdo con alguna realización.

La Figura 33 es un gráfico de datos de intensidad integrados para porciones o franjas de las micropartículas codificadas sobre el empaque blíster, de acuerdo con una realización.

La Figura 34 es un gráfico de los datos de intensidad integrados en canales rojos y verdes para porciones o franjas de micropartículas de PUA codificadas y micropartículas de PEG codificadas, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 35 es una imagen de luminiscencia de micropartículas codificadas después del procesamiento de PET simulado, de acuerdo con una realización.

La Figura 36 incluye gráficos de intensidad integrada para las micropartículas codificadas antes y después del procesamiento de PET simulado, de acuerdo con una realización.

La Figura 37 muestra imágenes de luminiscencia de micropartículas que marcan una rosca, de acuerdo con una realización.

La Figura 38 muestra imágenes de micropartículas para marcación de papel moneda, de acuerdo con una realización.

La Figura 39 es una imagen de micropartículas codificadas incrustadas en la mayor parte de una llave de PVA, de acuerdo con una realización.

La Figura 40 es una imagen de micropartículas codificadas incrustadas en la mayor parte de una llave de ABS, de acuerdo con una realización.

La Figura 41 incluye imágenes de micropartículas usadas para marcar un empaque blíster, papel moneda, tarjeta de crédito, cerámica tridimensional, una obra de arte y un objeto fundido a alta temperatura, de acuerdo con una realización.

La Figura 42 incluye imágenes de un proceso de lectura de códigos espectrales a partir de una imagen de luminiscencia de una micropartícula, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 43 incluye imágenes utilizadas para distinguir dos códigos diferentes de micropartículas, de acuerdo con una realización.

La Figura 44 representa esquemáticamente un sistema de litografía y decodificación de flujo para la síntesis de partículas, de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 45 es una imagen del sistema para la síntesis de partículas de la Figura 44.

Las características, funciones y ventajas adicionales de los métodos divulgados, sistemas y medios descritos serán evidentes a partir de la divulgación que sigue, particularmente cuando se lee junto con las Figuras adjuntas.

Descripción detallada

Hay muchos desafíos para marcar objetos con marcas que sean resistentes a falsificación o suplantación. Por ejemplo, la codificación única de unidades individuales dentro de procesos intensivos de información como empacado farmacéutico puede implicar capacidades de codificación de 10^5 -10^{12} y síntesis de partículas de alto rendimiento. Como otro ejemplo, la exposición a ambientes ásperos para algunas aplicaciones requiere insensibilidad térmica, biocompatibilidad y/o resistencia química. La complejidad y el costo de los sistemas de lectura para algunas tecnologías de marcación pueden limitar la implementación. Algunas aplicaciones de marcación requieren una lectura con bajo error en presencia de factores causantes de confusión (por ejemplo, fondo complejo, oscurecedores, ruido), lo cual es un reto técnico difícil.

Las realizaciones incluyen micropartículas de polímero para el marcado de artículos y/o tejidos, métodos para producir las micropartículas y métodos de marcación usando las micropartículas. Cada micropartícula de hidrogel incluye una región codificada. La región codificada incluye múltiples porciones con una o más de las porciones que incluyen una pluralidad asociada de nanocristales de conversión ascendente (UCN) con una firma espectral distinta. Las múltiples porciones de la región de codificación permiten la codificación espacial de la micropartícula. La pluralidad asociada de UCN para cada región se selecciona de un conjunto de UCN distinguibles espectralmente, lo que permite la codificación espectral para cada porción de la micropartícula. Mediante la combinación de la codificación espacial y espectral, las micropartículas tienen capacidades de multiplexación masiva con capacidad de escalado superior.

Las escalas de codificación exponencialmente como C^s para partículas asimétricas y como $C^s/2$ para partículas simétricas, donde C es el número de firmas espectrales distinguibles ('colores' de UCN) y S es el número de características espaciales (por ejemplo, 'franjas' de micropartículas). Por ejemplo, para una micropartícula simétrica con porciones de codificación S y un conjunto de nanocristales distinguibles espectralmente diferentes de C, la siguiente ecuación enumera el número de códigos o identificadores únicos que estarían disponibles:

$$\sum_{x=0}^{S-1} C^{(S-x)}$$

Por ejemplo, se pueden generar aproximadamente 20.000 identificadores/códigos únicos para un sistema en el que la región de codificación de micropartículas simétricas tiene seis porciones y cada porción incluye una pluralidad de los UCN seleccionados a partir de un conjunto de cinco tipos diferentes de nanocristales espectralmente distintos. Como otro ejemplo, pueden generarse aproximadamente 500.000 identificadores/códigos únicos para un sistema en el que la región de codificación de la micropartícula simétrica tiene seis porciones y cada porción incluye una pluralidad de los UCN seleccionados de un conjunto de nueve tipos diferentes de nanocristales espectralmente distintos. Por lo tanto, un número modesto de colores puede estar acoplado con un número similarmente modesto de franjas para producir capacidades de codificación considerables que escalan rápidamente con cambios incrementales a cualquiera cantidad. Para aumentar la capacidad de marcación, podrían emplearse micropartículas asimétricas. Por ejemplo, una micropartícula asimétrica con seis porciones con cada porción que incluye uno de nueve tipos diferentes de nanocristales espectralmente distintos produciría más de un millón de identificadores/códigos únicos. Para aumentar la capacidad de marcación, se podría usar una combinación de múltiples micropartículas para marcar un objeto.

Algunas realizaciones combinan patrones espaciales con nanocristales de conversión ascendente (UCN) de tierras raras, excitación de longitud de onda de infrarrojo cercano y decodificación basada en un dispositivo de carga acoplada (CCD) portátil para distinguir partículas sintetizadas mediante litografía de flujo. Algunas realizaciones exhiben grandes capacidades de codificación exponencialmente escalables (> 10^6), una tasa de falsa alarma de decodificación ultrabaja (<10^{-9}), la capacidad de manipular partículas aplicando campos magnéticos y una insensibilidad dramática tanto a la química de partículas como a condiciones de procesamiento severas. Los experimentos llevados a cabo por los inventores muestran un acuerdo cuantitativo entre la decodificación observada y la predicha para una gama de aplicaciones prácticas con requisitos ortogonales, incluyendo un código de barras multipartícula encubierto de empaques farmacéuticos (concordancia de índice de refracción), detección de microARN multiplexada (biocompatibilidad) y marcación incrustada de objetos fundidos a alta temperatura (resistencia a la temperatura).

Algunas realizaciones emplean un método de codificación robusto para la compatibilidad con la síntesis de partículas de alto rendimiento y la decodificación basada en CCD portátil. En algunas realizaciones, las partículas resultantes y el sistema de decodificación exhiben insensibilidad dramática a la química de las partículas, permitiendo la sintonización de la capacidad de codificación y la tasa de error de decodificación independientemente de las propiedades del material de partícula, así como la capacidad para manipulación magnética directa. En el ejemplo descrito a continuación, los inventores demuestran una decodificación cuantitativamente predecible tanto de las partículas resistentes a la temperatura como de las partículas biocompatibles en ambientes desafiantes y realistas. Con capacidades de codificación de una sola partícula superiores a 1 millón y tasas de error inferiores a 1 parte por billón (ppb), algunas realizaciones expanden el número prácticamente accesible de códigos para aplicaciones como la marcación de productos forenses y bioensayos multiplexados por órdenes de magnitud. Los métodos descritos en la presente memoria pueden emplearse para extender el uso de partículas codificadas a un amplio y evolutivo rango de aplicaciones industriales previamente no exploradas. Se pueden emplear realizaciones para producir marcas encubiertas y duraderas contra la falsificación con una capacidad de codificación masiva a partir de pequeños conjuntos de partículas codificadas de forma única.

La Figura 1 representa esquemáticamente un ejemplo de una micropartícula 10 que puede ser usada para marcar un artículo o un tejido, de acuerdo con una realización. La micropartícula 10 tiene un cuerpo 12 que incluye un polímero. El cuerpo 12 tiene una región 30 codificada que incluye múltiples porciones diferentes (por ejemplo, porciones 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36) con cada porción (31-36 que tiene una pluralidad asociada de nanocristales de conversión ascendente (UCN), (por ejemplo, UCN 41)) seleccionada de un conjunto de UCN distinguible espectralmente (véase la discusión que acompaña a las Figuras 2-11 a continuación). En algunas realizaciones, una o más porciones pueden no incluir ningún nanocristal y pueden servir como un "blanco" o porción nula para codificación.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una primera pluralidad de UCN con una primera firma espectral está dispuesta en una primera porción 31 de la región codificada. Una segunda porción 32 de la región codificada incluye una segunda pluralidad de UCN con una segunda firma espectral diferente de la primera firma espectral. En algunas realizaciones, la región codificada de la micropartícula también incluye una tercera porción 33 que tiene una tercera pluralidad de UCN. En algunas realizaciones, la región codificada de la micropartícula también incluye una cuarta porción 34 que tiene una cuarta pluralidad de UCN. En algunas realizaciones, la región codificada de la micropartícula también incluye una quinta porción 35 que tiene una quinta pluralidad de UCN. La pluralidad de micropartículas en cada porción (31-36) de la región codificada se selecciona de un conjunto de UCN distinguibles espectralmente.

Un experto en la técnica en vista de la presente divulgación reconocerá que cada micropartícula puede incluir una región de codificación con menos de seis porciones y las pluralidades asociadas de UCN (por ejemplo, cinco porciones, cuatro porciones, tres porciones, dos porciones) o más de seis porciones y las pluralidades asociadas de UCN (por ejemplo, seis porciones, siete porciones, ocho porciones, nueve porciones, diez porciones, etc.).

La firma espectral asociada con una pluralidad de UCN dispuestos en una porción de la región codificada se denomina aquí también como la firma espectral de la porción de la región codificada. En algunas realizaciones, dos o más porciones de la región codificada pueden tener la misma firma espectral. En algunas realizaciones, dos o más porciones de la región codificada con la misma firma espectral pueden ser adyacentes entre sí. En algunas realizaciones, cualquier porción de la región codificada con la misma firma espectral debe estar separada de las demás por una o más porciones de la región codificada que tiene distinta o distintas firmas espectrales. En algunas realizaciones, cada porción de la región codificada debe tener una firma espectral distinta de la de cualquier otra porción de la región codificada. En algunas realizaciones, una o más porciones de la región codificada no incluyen nanocristales de modo que la porción o porciones están "en blanco" sin una firma espectral. La firma espectral de un UCN incluye información asociada con el espectro de emisión del UCN que la distingue de otro tipo de nanocristal. En algunas realizaciones, la firma espectral de un UCN o de una pluralidad de UCN similares puede incluir la intensidad integrada de emisión de una franja espectral (o emisión en un rango espectral) en comparación con otra franja espectral (o emisión en otro intervalo espectral). Una firma espectral o información relativa a una firma espectral se puede denominar en la presente memoria como un código espectral.

Las Figs. 2-10 muestran espectros de emisión para un conjunto de ejemplo de nueve tipos de UCN distinguibles espectralmente, marcados UCN1-UCN9 respectivamente, cuando se excitan con luz de infrarrojo cercano (NIR) (por ejemplo, luz de 980 nm desde un láser de diodo de NIR). Los UCN en el conjunto de ejemplo luminescen en múltiples franjas estrechas (por ejemplo, franjas de menos de 70 nm de ancho a todo el ancho medio máximo (FWHM)) en el

rango visible cuando se exponen a luz de menor frecuencia (por ejemplo, infrarrojo cercano (NIR)). Específicamente, el conjunto de ejemplo de UCN espectralmente distinguibles (por ejemplo, UCN1-UCN10) emite en dos o más franjas centradas alrededor de 470 nm (por ejemplo, 445-500 nm), centradas alrededor de 550 nm (por ejemplo, 520-560 nm) y centradas alrededor de 650 nm (por ejemplo, 640-670 nm). Para simplificar, la franja de 445-500 nm se denomina aquí franja azul, la franja de 520-560 nm se denomina aquí franja verde y la franja de 640-670 nm se denomina aquí franja roja.

Un experto en la técnica en vista de la presente divulgación reconocería que el conjunto de UCN puede incluir menos de nueve (por ejemplo, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos) o más de nueve (por ejemplo, diez, once, doce, etc.) tipos diferentes de UCN distinguibles espectralmente. Además, un experto en la técnica en vista de la presente divulgación reconocería que los UCN que tienen diferentes espectros que los mostrados, y los UCN que emiten en diferentes franjas que las mostradas, también caen dentro del alcance de las realizaciones. Por ejemplo, la Figura 11 muestra un espectro de emisión para un UCN marcado UCN10 que puede usarse en el conjunto como una alternativa a cualquiera de UCN1-UCN9 o además de UCN1-UCN9. Para aumentar la capacidad de codificación, la paleta de UCN espectralmente distintos puede ampliarse adicionalmente ajustando las relaciones Yb-Er-Tm con un impacto despreciable en la tasa de error de decodificación.

La firma espectral de una pluralidad de UCN puede incluir información relacionada con la relación o relaciones de las intensidades integradas emitidas en varias franjas (por ejemplo, la relación de la franja roja a la franja verde o viceversa, la relación de la franja roja a la franja azul o viceversa, la relación de la franja azul a la franja verde o viceversa, o cualquier combinación de los anteriores). Estas relaciones se pueden definir con respecto a los espectros de emisión de los UCN. Sin embargo, en algunas realizaciones, la firma espectral de una pluralidad de UCN puede incluir tanto información con respecto a la intensidad de luz emitida en diversas franjas como incluir información relativa a la capacidad de respuesta del detector o sensor de imagen a utilizar. Se puede emplear cualquier detector, sensor de imagen o dispositivo de formación de imágenes. Por ejemplo, el detector o dispositivo de formación de imágenes puede ser un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), un dispositivo con base en un tubo fotomultiplicador (PMT), un sensor de formación de imágenes compuesto por semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), un dispositivo de formación de imágenes compuesto de un arreglo de fotodiodos de avalancha (APD), etc. En algunas realizaciones, puede emplearse un sensor de formación de imágenes con más de un canal de color.

La Figura 12 muestra la capacidad de respuesta espectral de los canales rojo 61, verde 62 y azul 63 para un dispositivo CCD RGB típico que puede utilizarse como detector en algunas realizaciones. Como se muestra, las franjas de emisión de rojo 71, verde 72 y azul 73 del ejemplo del conjunto de UCN que se superponen a las capacidades de respuesta espectrales de las respectivas curvas de capacidad de respuesta de los canales rojo 61, verde 62 y azul 63. Por ejemplo, la Figura 13 muestra el espectro de emisión de UCN6 que se superpone a la capacidad de respuesta espectral de canales de un dispositivo RGB típico. Una convolución del espectro de emisión con la capacidad de respuesta espectral esperada para cada canal sensor de imágenes produce curvas correspondientes a la respuesta espectral esperada para cada canal del sensor de imagen del CCD a cada tipo de UCN. La firma espectral para un tipo de UCN puede incluir información relativa a la respuesta espectral esperada de un sensor de imagen a un espectro de emisión de UCN específico, tal como una relación de la intensidad integrada esperada detectada para dos canales de color.

Por ejemplo, la Tabla 1 a continuación muestra la respuesta espectral esperada de un dispositivo CCD a los espectros de emisión de los tipos UCN3-UCN7 y UCN10 de UCN (véanse las Figuras 4-8 y 11 anteriores para los espectros de emisión). La respuesta espectral esperada es una convolución del espectro de emisión para el tipo de UCN con la capacidad de respuesta espectral del canal del sensor de imagen mostrada en la Figura 12. Específicamente, la Tabla 1 muestra la intensidad total integrada esperada para cada canal de color debido a la emisión de los UCN. La Tabla 1 también incluye las relaciones para la intensidad total esperada para el canal verde al canal rojo, para el canal azul al canal rojo y para el canal azul al canal verde. Expresar las intensidades integradas como relaciones para diferentes canales de color reduce o elimina la necesidad de calibración para determinar la intensidad absoluta para cualquier canal de color o franja de emisión en particular.

Tabla 1

Tipo	Intensidad integrada esperada*	Intensidad integrada esperada*	Intensidad integrada esperada *	Relación de canales	Relación de canales	Relación de canales
	Canal R	Canal G	Canal B	G/R	B/R	B/G
UCN3	163,4	86,3	0	0,528	0	0
UCN4	225,4	197,5	0	0,876	0	0
UCN5	91,9	164,5	0	1,790	0	0
UCN7	24,7	52,1	219,9	2,109	8,9	4,220

Tipo	Intensidad integrada esperada*	Intensidad integrada esperada*	Intensidad integrada esperada *	Relación de canales	Relación de canales	Relación de canales
UCN6	138,5	158,1	120,4	1,141	0,869	0,7609
UCN10	161,6	131,5	0	0,814	0	0

Las tecnologías recientes han empleado micropartículas que incluyen codificación fluorescente para ensayos bioquímicos o químicos. Los inventores han descubierto que el empleo de UCN para identificar diferentes regiones codificadas de una micropartícula tiene muchos beneficios cuando se compara con otras técnicas utilizadas actualmente para codificar micropartículas. Por ejemplo, algunas otras técnicas emplean variaciones de espesor unidimensionales o bidimensionales o agujeros en una región codificada en forma fluorescente de una micropartícula para su identificación.

En contraste con los UCN que tienen múltiples franjas de emisión estrecha, las moléculas fluorescentes de marcación comúnmente usadas (por ejemplo, fluoróforos) tienden a emitir en una única franja ancha (por ejemplo, el colorante fluorescente DAPI tiene una franja de emisión única que es de aproximadamente 100 nm de ancho FWHM). En micropartículas que utilizan fluoróforos para la codificación, las franjas de emisión amplias de los fluoróforos limitan el número de fluoróforos diferentes que pueden emplearse sin tener solapamiento significativo entre franjas de emisión y la ambigüedad resultante en la identificación. Además, la ausencia de franjas de emisión múltiple para un único fluoróforo puede requerir el uso de un estándar de calibración externa. Por el contrario, los UCN tienen múltiples franjas de emisión estrecha en diferentes porciones del espectro visible (por ejemplo, separadas por decenas hasta cientos de nm). La relación de intensidad de emisión en varias franjas se puede utilizar para distinguir entre diferentes nanocristales, y también actúa como un estándar de calibración interna, evitando la necesidad de calibración externa.

Las micropartículas que usan UCN para la codificación pueden experimentar menos reducción de la relación señal a ruido debido a autoluminiscencia que las micropartículas que usan fluoróforos para la codificación. Los UCN luminiscentes absorben luz en un intervalo de longitudes de onda y emiten luz en un intervalo más corto de longitudes de onda (por ejemplo, se absorben en el intervalo NIR y se emiten en el intervalo visible). Por el contrario, los fluoróforos comúnmente usados y los puntos cuánticos usualmente absorben luz en un intervalo de longitud de onda y emiten luz en un intervalo de longitud de onda más larga (por ejemplo, absorbiéndose en el intervalo ultravioleta y emitiéndose en el intervalo visible). Por ejemplo, el fluoróforo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de uso común tiene un máximo de absorción alrededor de 370 nm (UV) y un máximo de emisión alrededor de 450 nm (azul). La iluminación de los fluoróforos para su identificación (por ejemplo, con luz UV) puede dar como resultado una autofluorescencia no deseada de los materiales y disolventes en las longitudes de onda visibles que disminuye la relación señal a ruido, lo cual puede ser un problema significativo con muestras biológicas. Debido a que los nanocristales descritos en la presente memoria son de conversión ascendente, la luz NIR usada para excitar los nanocristales generalmente no produce autoluminiscencia en las longitudes de onda más cortas del intervalo visible. Por lo tanto, el uso de UCN puede mejorar la relación señal a ruido para una región codificada.

Las micropartículas que utilizan diferentes tipos de UCN para la codificación pueden requerir solamente una única fuente de excitación de franja estrecha en oposición a las micropartículas que utilizan diferentes tipos de fluoróforos, que pueden requerir múltiples fuentes de luz para proporcionar excitación en diferentes franjas de longitudes de onda. Por ejemplo, se puede utilizar una fuente de luz de 980 nm con una densidad de potencia inferior a 10 W/cm^2 (por ejemplo, un diodo láser de infrarrojo cercano (NIR)) como única fuente de excitación para múltiples tipos diferentes de UCN. Por el contrario, las micropartículas que utilizan fluoróforos comunes para porciones del espectro de luz visible, tales como DAPI (azul), Oregon green 500 (verde) y ALEXA FLUOR 633 (rojo) con máximos de absorción a 350 nm, 503 nm y 632 nm, respectivamente, pueden requerir múltiples fuentes de excitación diferentes, tales como un láser UV, un láser de iones de argón y un láser de helio-neón rojo.

En algunas realizaciones, los UCN son nanocristales de tierras raras que son emisores de brillo anti-Stokes con propiedades espectrales ajustables. Los UCN individuales absorben la luz NIR de onda continua (CW) a una sola longitud de onda y emiten en múltiples franjas estrechas del espectro visible. Los grandes desplazamientos anti-Stokes reducen la interferencia espectral de la autofluorescencia de la muestra y conducen a mejores relaciones señal-ruido. En contraste con la tinta M (un colorante ópticamente activo en el que los materiales magnéticos nanoestructurados reflejan diferentes longitudes de onda de la luz) o puntos cuánticos, estos beneficios persisten incluso en presencia de oscurecedores o un complejo de fondo reflectante. El ajuste de las intensidades de emisión en múltiples franjas mediante el ajuste de las estequiometrias relativas de los dopantes lantánidos permite una codificación espectral logométricamente única, en la que la relación de intensidades integradas en dos o más franjas sirve como código, en lugar de la intensidad absoluta. En algunas realizaciones, pueden ser innecesarias las lecturas de los estándares espectrales externos (por ejemplo, como se requiere para los cristales de silicio porosos), la carga precisa de tinte (por ejemplo, como se utiliza con puntos cuánticos y luminex), instrumentaciones sensibles (por ejemplo, como se requiere para tinta M) y calibración frecuente, permitiendo el uso de formación de imágenes de CCD estándar para la decodificación.

Ejemplo de síntesis de UCN

Los UCN de NaYF4 dopados con lantánidos se prepararon mediante una síntesis hidrotérmica discontinua escalable, que es sólo uno de los numerosos protocolos conocidos para la síntesis de los UCN de $NaYF_4$.

Las sales acuosas de cloruro de tierras raras, hidróxido de sodio, fluoruro de amonio, etanol y ácido oleico se calentaron en un recipiente a presión de acero inoxidable recubierto con TEFLON. Específicamente, se añadieron 2 mL de $ReCl_3$ (0,4 M, RE = Y, Yb, Er, Gd, Tm) y 2 mL de NH_4F (2 M) a una mezcla de 3 mL de NaOH (0,6 M), 10 mL de etanol y 10 mL de ácido oleico. La solución se transfirió a un autoclave revestido con TEFLON de 50 mL y se calentó a 200ºC durante 2 horas. Los productos resultantes se centrifugaron para recoger los nanocristales, que luego se lavaron repetidamente con etanol y agua desionizada, y después se dispersaron de nuevo en ciclohexano.

Durante la síntesis, los inventores utilizaron la concentración de diversos dopantes de lantánidos y el tiempo y la temperatura de reacción para mejorar la intensidad de la luminiscencia de los nanocristales y para alterar el espectro de conversión ascendente de los nanocristales.

El procedimiento de síntesis descrito anteriormente puede producir UCN de $NaYF_4$ en dos fases diferentes que tienen estructuras cristalinas diferentes: una fase α con una estructura cristalina cúbica y una fase β con una estructura cristalina hexagonal. En términos generales, la intensidad de la luminiscencia es significativamente mayor en los cristales de fase β que en los cristales de fase α debido a la menor relación de defectos de superficie con el volumen del cristal en la fase β. Sin altos niveles de dopado con gadolinio, se deben mantener temperaturas relativamente altas durante tiempos relativamente largos (por ejemplo, 350ºC durante 24 horas) para inducir la transición de fase $\alpha \rightarrow \beta$ en los nanocristales. Por el contrario, los inventores doparon con 30% en moles de gadolinio (Gd) para inducir la transición de fase $\alpha \rightarrow \beta$ a una temperatura inferior (200ºC) mantenida durante un tiempo más corto (2 horas). El Gd tiene poco o ningún efecto sobre la forma del espectro de emisión de conversión ascendente generado debido a la presencia de los otros dopantes.

El aumento del tiempo de reacción y el aumento de la temperatura de reacción tienden a aumentar la intensidad de la luminiscencia de los UCN debido al aumento del tamaño de los nanocristales. El aumento del tamaño del nanocristal disminuye la relación entre el área superficial y el volumen de los nanocristales, disminuyendo así la relación de defectos superficiales con respecto al volumen del cristal. Además, la luminiscencia para nanocristales más grandes era menos probable que fuera desplazada al rojo debido a la extinción preferencial de la emisión de alta frecuencia, que puede ocurrir en nanocristales más pequeños.

Las concentraciones de dopantes distintos de Gd se usaron para cambiar el espectro de emisión de conversión ascendente. Los UCN espectralmente distintos se produjeron ajustando las estequiometrias relativas de los iones lantánidos Yb^{3+}, Er^{3+} y Tm^{3+} en la premezcla de reacción de UCN. Las estequiometrias con dopantes de lantánidos tienen relativamente poco impacto en la nanoestructura de UCN y la química de superficie, control de desacoplamiento del espectro de emisión de la química de las partículas y propiedades de los materiales resultantes. El yterbio (Yb^{3+}) es un importante dopante para la emisión multicolor brillante, ya que actúa como un agente de absorción y transferencia de energía de sección transversal de alta absorción de NIR para emisión de conversión ascendente. El aumento del porcentaje de Yb tiende a "desplazar hacia el rojo" el espectro de conversión ascendente, aumentando la relación de la intensidad de emisión en la franja roja (640-670 nm) con respecto a la intensidad de emisión en la franja verde (520-560 nm) en cristales dopados al mismo tiempo con Erbio (Er^{3+}). La Figura 14 ilustra cómo el aumento de la concentración de Yb desplaza el espectro de emisión y desplaza el color total de emisión de verde a naranja. El dopado con Er^{3+} a niveles bajos (2% o menos) conduce a picos estrechos centrados en 550 nm y 650 nm. El color de emisión total para los materiales dopados con Yb^{3+} y Er^{3+} puede variar de verde a rojo, dependiendo de la concentración de Yb. El dopaje con Tulio (Tm^{3+}) a niveles muy bajos (~0,2%) conduce a la emisión en la franja azul (445-500 nm) y un pico más intenso a 800 nm.

Se produjeron diez tipos diferentes de UCN de $NaYF_4$ dopados con lantánidos espectralmente distinguibles marcados UCN1-UCN10. Los espectros de los diferentes tipos de UCN de $NaYF_4$ dopados con lantánidos aparecen en las Figs. 2-11. Los colores totales de los tipos UCN1-UCN9 cuando se irradian con un diodo láser NIR se muestran en la Figura 15, que incluye una imagen de luminiscencia de suspensiones de UCN1-UCN9 en ciclohexano tras excitación en el cercano infrarrojo (NIR) a 980 nm. Como se ilustra en la Figura 15, los colores de los UCN pueden distinguirse fácilmente a simple vista. La composición del dopante utilizado para cada tipo de nanocristales se muestra en la Tabla 2 a continuación. La concentración de Y, que constituye el faltante de cada concentración de dopante, está entre corchetes porque no es un dopante activo.

Tabla 2

Marcador	Gd (% en moles)	Yb (% en moles)	Er (% en moles)	Tm (% en moles)	[Y (% en moles)]	Descripción del color general
UCN2	30	69,7	0,1	0,2	[0]	Violeta

Marcador	Gd (% en moles)	Yb (% en moles)	Er (% en moles)	Tm (% en moles)	[Y (% en moles)]	Descripción del color general
UCN2	30	69,9	0,1	-	[0]	Rojo
UCN3	30	68	2	-	[0]	Naranja
UCN10	30	40	2	-	[28]	Amarillo oscuro
UCN4	30	30	2	-	[38]	Amarillo
UCN5	30	18	2	-	[50]	Verde
UCN6	30	20	0,1	0,2	[49,7]	Cobalto
UCN7	30	18	-	0,2	[51,8]	Azul
UCN8	30	18	0,03	0,2	[51,77]	Azul cielo
UCN9	30	31,7	0,1	0,2	[38]	Gris

La Figura 16 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los tipos UCN1-UCN9 de los UCN producidos por el procedimiento descrito anteriormente, así como una imagen ampliada de los nanocristales UCN6. En la Figura 16, las barras de escala son de 100 nm. Las muestras de TEM se prepararon colocando una gota de los UCN en ciclohexano sobre la superficie de una rejilla de cobre. En general, los nanocristales producidos tenían forma de varilla con un tamaño medio de 250-450 nm de longitud y 40-60 nm de ancho.

Los inventores elaboraron varios lotes diferentes del mismo tipo de nanocristales para confirmar que los espectros de emisión eran consistentes de lote a lote. Los espectros de luminiscencia de la conversión ascendente de los UCN se midieron en una solución de prepolímero de poli(acrilato de uretano) (PUA) (9/1 PUA/PI (v/v)) con un espectrómetro de fluorescencia con un láser de diodo CW de 1 W (980 nm) utilizado como la fuente de excitación. La Figura 17 muestra los espectros de emisión normalizados para tres lotes diferentes de nanocristales del tipo UCN7. Como se muestra, los espectros de emisión para los tres lotes diferentes son prácticamente indistinguibles en el gráfico combinado.

El alto contenido en Gd de UCN1-UCN10 hace que los UCN sean paramagnéticos y sujetos a manipulación física a través de campos magnéticos externos. Los inventores confirmaron esto manipulando los nanocristales suspendidos en viales usando ferromagnetos externos. La Figura 18 incluye imágenes luminiscentes de los UCN en líquido en un vial (a) colocado en el fondo del vial sin campo magnético aplicado, y (b) con un campo magnético aplicado desde un material ferromagnético sacando los UCN al lado izquierdo del vial. La Figura 19 es un gráfico de datos para magnetización como una función del campo magnético aplicado para UCN4, que se obtuvo utilizando un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID).

Ejemplo de modificaciones de superficies de los UCN

El proceso de síntesis descrito anteriormente produjo nanocristales protegidos con ácido oleico, un ácido graso con una cola hidrocarbonada de 17 carbonos. Como resultado de la protección con ácido oleico, los nanocristales resultantes eran insolubles en medios acuosos, lo que creó problemas con la dispersión de los nanocristales en materiales originales acuosos o hidrofílicos. Además, los nanocristales con colas de ácido oleico sólo exhibieron luminiscencia en forma brillante únicamente en medios hidrófobos. La exposición de los UCN protegidos con ácido oleico al agua causó una agregación significativa y un alto grado de atenuación reversible de la luminiscencia debido a la extinción mediada por defectos superficiales.

Los inventores utilizaron un método para modificar la cola de ácido oleico en los UCN para mejorar su solubilidad en agua y aumentar su luminiscencia en medios hidrofílicos. El doble enlace del ácido oleico se oxidó para formar un alcohol, y luego se escindió, liberando de este modo la parte hidrófoba hacia afuera de la cadena de ácido oleico y formando un grupo de ácido carboxílico.

El procedimiento específico empleado para modificar la cola de ácido oleico de los UCN implicó añadir 0,1 gramos de UCN a una mezcla de ciclohexano (100 mL), terc-butanol (70 mL), agua (10 mL) y solución al 5% en peso de K_2CO_3 (5 mL) y agitando durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron gota a gota 20 mL de reactivo de Lemieux-von Rudloff ($KMnO_4$ 5,7 mM y solución acuosa de $NaIO_4$ 0,1 M) a la solución. La mezcla resultante se agitó durante 48 horas. El producto se centrifugó y se lavó con agua desionizada, acetona y etanol. Posteriormente, los UCN se dispersaron en ácido clorhídrico (50 mL) de pH 4 y se agitaron durante 1 hora formando nanocristales terminados en carboxilo, que se lavaron 5 veces con agua desionizada y se recogieron por centrifugación. Los nanocristales resultantes terminados en carboxilo se dispersaron sin agregación en medio acuoso y presentaron

fuerte luminiscencia en medio hidrofílico. La modificación superficial es útil si se utilizan materiales hidrofílicos para el cuerpo de las micropartículas; sin embargo, puede no ser necesario para materiales hidrófobos como PUA.

Los inventores desarrollaron un método para modificar los UCN terminados en carboxilo para formar UCN terminados en acrilato que podrían ser entrecruzados con el material polimérico de la micropartícula. El método incluyó mezclar 200 µl de EDC (20 mg/mL) y 200 µl de sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) (20 mg/mL) con 200 µl de UCN terminados en carboxilo en regulador de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) (0,1 M, pH 6,0, 40 mg/mL) y agitando durante dos horas a temperatura ambiente para activar la superficie como grupos de ácido carboxílico. Los UCN activados con NHS se centrifugaron y se lavaron con agua. El precipitado se dispersó nuevamente en 200 µl de regulador PBS (0,1 M, 5 mL, pH 7,2) que contenía 2-hidroxietilacrilato (20 mg/mL). La mezcla se agitó entonces durante 24 horas a temperatura ambiente. Los UCN acrilados resultantes se purificaron mediante centrifugación repetida (3000 rpm, 5 min, 5 veces) y se resuspendieron en agua desionizada.

La Figura 20 es un diagrama 110 de flujo de un método para fabricar una micropartícula de polímero para marcar un objeto o tejido. Se proporciona un primer material (112) de base de región codificada. El primer material de base de región codificada incluye un polímero y una primera pluralidad de UCN que tienen una primera firma espectral. Por ejemplo, la primera pluralidad de UCN pueden ser los nanocristales descritos anteriormente y marcados UCN3. La firma espectral de la primera pluralidad de UCN (tipo UCN3) se puede describir como el espectro mostrado en la Figura 4, o puede describirse por la relación de la intensidad integrada en un canal de detección con respecto a otro canal de detección (por ejemplo, la relación de la intensidad integrada del canal de detección verde con respecto a la intensidad integrada del canal de detección de color rojo como se muestra en la Tabla 1), o por múltiples relaciones de intensidad integradas diferentes (por ejemplo, de verde con respecto a rojo, de azul con respecto a rojo, de rojo con respecto a verde). También se proporciona un segundo material (114) fuente de región codificada. El segundo material de base de región codificada incluye una segunda pluralidad de UCN que tienen una segunda firma espectral diferente de la primera firma espectral. La segunda pluralidad de los UCN puede ser los UCN descritos anteriormente y marcados UCN4. La firma espectral de la segunda pluralidad de los UCN (tipo UCN4) se puede describir como el espectro mostrado en la Figura 5, o puede describirse por la relación de la intensidad integrada en un canal de detección con respecto a otro canal de detección (por ejemplo, la relación de la intensidad integrada del canal de detección verde con respecto a la intensidad integrada del canal de detección de color rojo como se muestra en la Tabla 1), o por múltiples relaciones de intensidad integradas diferentes (por ejemplo, de verde con respecto a rojo, azul con respecto a rojo, rojo con respecto a verde). Aunque el diagrama de flujo sólo especifica un primer material de base de región codificada y un segundo material de base de región codificada, el número de materiales originales de región codificada requeridos corresponde al número de porciones de la región codificada deseada en la micropartícula resultante.

El primer material de base de región codificada y el segundo material de base de región codificada están entrecruzados formando la primera porción de una región 31 codificada y la segunda porción de la región 32 codificada. En realizaciones con más de dos porciones de la región codificada, cada porción está entrecruzada con una o más de otras porciones de la región codificada que forma la micropartícula contigua.

En algunas realizaciones, los UCN para al menos algunas de las porciones de la región codificada tienen una superficie hidrofílica. En algunas realizaciones, los UCN para al menos algunas de las porciones de la región codificada tienen un ligando hidrofílico. En algunas realizaciones, proporcionar el primer material de base de la región codificada y proporcionar el segundo material de base de la región codificada puede incluir la modificación de la primera pluralidad de nanocristales y la segunda pluralidad de nanocristales para que tengan una superficie hidrofílica y/o un ligando hidrofílico. Tener una superficie hidrofílica y/o un ligando hidrofílico puede ayudar a dispersar los UCN en un material de base acuoso o hidrofílico. Por ejemplo, en algunas aplicaciones de marcación de tejidos, se puede usar un material de hidrogel para el cuerpo.

En algunas realizaciones, los UCN para al menos algunas de las porciones de la región codificada tienen ligandos acrilados para el entrecruzamiento con los polímeros de la matriz de hidrogel. En algunas realizaciones, proporcionar el primer material de base de la región codificada y proporcionar el segundo material de base de la región codificada puede incluir la modificación de la primera pluralidad de nanocristales y la segunda pluralidad de nanocristales para incluir ligandos acrilados. En algunas realizaciones, la pluralidad de los UCN está unida al material polimérico en el momento de la síntesis de partículas a través de un grupo acrilato.

En otras realizaciones, podría hacerse otro tipo de enlace covalente entre los UCN y la matriz polimérica. Los UCN pueden unirse a la matriz polimérica usando cualquier cantidad de mecanismos de unión covalentes (por ejemplo, enlaces amida, disulfuros, ésteres, éteres, aldehídos/cetonas, cicloadiciones, química clic, azidas y carbamatos).

En algunas realizaciones, el cuerpo incluye un material polimérico hidrófobo tal como PUA. En esta realización, los nanocristales empleados pueden tener una superficie hidrófoba o un ligando hidrófobo. Los nanocristales protegidos con ácido oleico no necesitan ser modificados para dispersarse en un material hidrófobo tal como PUA.

En algunas realizaciones, al menos algunos de los UCN están dopados con metales de tierras raras. En algunas realizaciones, al menos algunos de los UCN están dopados con una composición que incluye al menos 30% en moles de Gd. En algunas realizaciones, al menos algunos de los UCN son paramagnéticos.

En algunas realizaciones, el material para cada porción de la región codificada es el mismo material. En algunas realizaciones, el material para algunas porciones de la región codificada es diferente del material para las otras porciones de la región codificada.

Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones los UCN tienen una superficie hidrofílica. En algunas realizaciones, los UCN tienen un ligando hidrofílico. Tener una superficie hidrofílica y/o un ligando hidrofílico puede ayudar a dispersar los UCN en el material de base.

En algunas realizaciones, el método también incluye hacer fluir conjuntamente el material de base para cada región codificada a un área para el entrecruzamiento. Por ejemplo, se puede emplear una técnica de litografía de flujo de parada (SFL) para formar las micropartículas. En SFL, las soluciones viscosas prepoliméricas sensibles a los UV (que pueden denominarse en la presente memoria como materiales originales) experimentan un flujo laminar combinado en un pequeño dispositivo microfluídico, que puede estar hecho de polidimetilsiloxano (PDMS). Para la síntesis orgánica, el dispositivo microfluídico puede estar hecho de perfluoropoliéter (PFPE). El flujo de las soluciones de prepolímero se detiene durante un breve período en el que las soluciones de prepolímero en el dispositivo se exponen a luz ultravioleta patronizada con fotomáscara. La luz UV provoca el entrecruzamiento, la polimerización o ambas en milisegundos en la región delineada por la fotomáscara que forma partículas poliméricas de tamaño micro. La forma de cada partícula se define por la fotomáscara. La composición de cada porción en franjas de la partícula está determinada por la composición de las corrientes de flujo combinado laminar (por ejemplo, los materiales originales). La técnica SFL es particularmente adecuada para la codificación espacial y espectral de micropartículas que utilizan nanocristales debido a la capacidad de controlar tanto la forma total de la partícula en micropartículas como la composición de diferentes porciones en franjas de la micropartícula.

La Figura 21 representa esquemáticamente SFL que se utiliza para fabricar una micropartícula de hidrogel con una región de codificación que incluye porciones diferentes que tienen UCN con firmas espectrales distinguibles. En el diagrama, los materiales originales de la región codificada (ERSM) se denominan ERSM1-ESRM6. Cada uno de los materiales originales de la región codificada incluyen un prepolímero 142 y una pluralidad de UCN, que pueden ser UCN144 acrilados en algunas realizaciones. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término prepolímero incluye monómeros y cadenas de polímero que pueden estar entrecruzadas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término entrecruzamiento se refiere ampliamente a la formación de enlaces entre cadenas poliméricas, a la formación de enlaces entre un polímero y una nanopartícula y a la polimerización de monómeros. Los uno o más materiales originales de la región codificada ERSM1-ERSM6 fluyen a un área 150 dentro de un dispositivo microfluídico. Cuando los flujos combinados se detienen brevemente, una fuente 160 de luz (por ejemplo, una fuente de luz UV de 350 nm) una fotomáscara 162 y una óptica de enfoque (por ejemplo, un lente 164 objetivo) proporcionan luz patronizada y enfocada en el área 150 para entrecruzamiento/polimerización del prepolímero 142. El entrecruzamiento 146 de los materiales originales de prepolímero forma la micropartícula 170 contigua creando una red polimérica. Como se muestra, los UCN 144 pueden incluir ligandos acrilados, lo que permite que los UCN 144 entrecrucen 146 con la red polimérica 148. Cada material de base de la región codificada ERSM1-ERSM6 forma una porción correspondiente 171-176 de la región codificada de la micropartícula 170. En algunas realizaciones, los UCN no están entrecruzados con la red polimérica, sino que son físicamente arrastrados por el tamaño de poro de la matriz de la red 148 polimérica.

Aunque la fotomáscara 162 se muestra con un patrón que forma cuatro micropartículas simultáneamente, en algunas realizaciones, la fotomáscara puede tener un patrón para formar más de cuatro micropartículas simultáneamente. En algunas realizaciones, sólo se puede formar una micropartícula a la vez. En algunas realizaciones, una fotomáscara puede tener un patrón que produce micropartículas que tienen formas diferentes simultáneamente. En algunas realizaciones, la fotomáscara puede producir partículas asimétricas y/o partículas que tienen formas no rectangulares.

Aunque la micropartícula 170 se muestra con seis regiones codificadas, en otras realizaciones, puede haber más o menos de seis regiones codificadas. Por ejemplo, la Figura 22 muestra imágenes de luminiscencia de varias micropartículas que tienen cada una entre dos a seis regiones codificadas. Las micropartículas con una región de codificación adicional (por ejemplo, siete franjas en lugar de seis) reforzarían las capacidades de codificación de partículas individuales a más de 10 millones, mientras que requieren poco más que un puerto de entrada adicional en el dispositivo de síntesis microfluídico.

Para más detalles con respecto a la técnica de SFL para formar micropartículas poliméricas contiguas, véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2012/0316082 A1, publicada el 13 de diciembre de 2012, y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2012/0003755 A1, publicada en enero 5, 2012, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. A continuación, se describe un ejemplo de un sistema de litografía de flujo con respecto a las Figs. 44 y 45.

Ejemplo de producción de micropartículas de hidrogel de PEG-DA con los UCN

Los inventores produjeron micropartículas poliméricas de polietilenglicol diacrilato (PEG-DA) por litografía de flujo de parada. Inicialmente, los inventores elaboraron conjuntos de micropartículas, con cada conjunto que incluye sólo un tipo de nanocristal para determinar si la incorporación de los nanocristales en micropartículas cambia el espectro de emisión de los nanocristales. Para cada uno de los tipos de nanocristales UCN1-UCN10, se produjeron cincuenta micropartículas de hidrogel de PEG-DA. Se utilizó un dispositivo CCD para obtener una imagen de tres colores (canal

rojo, canal verde y canal azul) de cada micropartícula mientras se iluminaba con luz NIR produciendo una imagen de canal rojo, una imagen de canal verde y una imagen de canal azul. Para cada imagen de canal, se integró la intensidad (valor de píxel) dentro de los límites de cada micropartícula produciendo un "valor de píxel" para cada canal para cada micropartícula. La Figura 23 incluye histogramas de los "valores de píxeles" integrados para los canales rojo, verde y azul de cincuenta micropartículas para los tipos UCN1-UCN9. Los histogramas para algunos de los tipos incluyen también una imagen de inserción de una micropartícula representativa iluminada con NIR. Como se muestra por las imágenes de inserción, un proceso de litografía de flujo de parada se puede utilizar para elaborar diferentes formas de micropartículas.

Los valores medios de intensidad integrada medidos de cincuenta micropartículas para cada tipo de los UCN se compararon entonces con los datos de intensidad integrada esperados obtenidos a partir de una convolución de los datos de emisión de UCN y las curvas de respuesta del sensor de imagen. La Tabla 3 a continuación incluye datos medidos de intensidad integrada medidos, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad para los UCN en micropartículas. También se incluyen para comparación los datos esperados de intensidad integrada basados en espectros de emisión de los UCN en solución. Como se muestra en la tabla, la intensidad integrada media y los valores de intensidad integrada esperados son consistentes. El coeficiente medio de variación entre todas las partículas y los colores de UCN fue del 2%. Esto corresponde a una desviación estándar media de 2,1 unidades RGB (en una escala de 255) para imágenes adquiridas por separado de partículas sintetizadas separadamente, lo que indica una excelente reproducibilidad de partícula a partícula. Además, las elipses de error no se superponen mejor que 6 sigma, lo que indica que se esperan tasas de error de decodificación inferiores a 1 ppb. Por lo tanto, si se conoce el espectro de emisión de un tipo de nanocristales, la intensidad integrada para la detección en un canal de color puede predecirse con confiabilidad.

Tabla 3

Tipo	Intensidad integrada esperada	Media de la Intensidad integrada ± desviación estándar	Cv	Intensidad integrada esperada	Media de la intensidad integrada	Cv	Intensidad Integrada esperada ± desviación estándar	Media de la intensidad integrada ± desviación estándar	Cv
Canal	R	R	R	G	G	G	B	B	
UCN1	130,3	126,34 ± 1,43	0,02	68,5	65,30 ± 2,29	0,03	103,7	100,74 ± 2,48	0,02
UCN2	103,3	109,34 ± 1,87	0,01	44,8	42,70 ± 1,39	0,03	10,2	17,37 ± 1,43	0,08
UCN3	164,5	164,29 ± 2,26	0,01	91,9	91,73 ± 2,73	0,02	0	0	0
UCN10	161,6	160,86. ± 1,3	0,01	131,5	130,97 ± 1,3		0	0	0
UCN4	225,4	225,89 ± 2,29	0,01	197,5	194,71 ± 2,01	0,01	0	0	0
UCN5	91,9	86,10 ± 1,42	0,01	164,5	161,77 ± 1,89	0,01	0	0	0
UCN6	120,4	123,52 ± 2,15	0,01	158,1	163,40 ± 2,04	0,01	138,5	132,29 ± 2,54	0,02
UCN7	24,7	23,54 ± 2,02	0,08	55,1	63,22 ± 1,93	0,03	219,9	222,36 ± 2,9	0,01
UCN8	83,2	78,37 ± 2,59	0,01	132,6	128,58 ± 2,63	0,02	182,2	189,61 ± 1,89	0,01
UCN9	158,9	151,34 ±2,02	0,01	131,1	127,62 ± 1,93	0,02	120,6	125,73 ± 2,92	0,02

La Figura 24 es un diagrama de dispersión que muestra los valores de intensidad integrada del canal rojo, el canal verde y el canal azul para cada micropartícula que incorpora los nanocristales del tipo UCN1-UCN9. Todos los tipos de nanocristales UCN1-UCN9 tienen intensidad de emisión de canal rojo y de canal verde. Los tipos de nanocristales UCN1, UCN2, UCN6, UCN7, UCN8 y UCN9 tienen intensidades de emisión en el canal azul, así como en los canales rojo y verde. Las elipses alrededor de cada grupo de puntos de datos son los contornos de tres sigma, cuatro sigma y cinco sigma derivados de ajustar un modelo de mezcla gaussiana a los datos. Como se muestra por la separación entre los grupos apretados, el tipo UCN para cada micropartícula se puede distinguir claramente usando las intensidades integradas del canal rojo, el canal verde y el canal azul para la micropartícula. La Figura 25 muestra una comparación del valor de intensidad integrado medio (cuadrados del valor medido) y el valor de intensidad integrado esperado (círculos de valor complejo) en el canal verde frente al canal rojo para partículas que integran tipos de nanocristales UCN1-UCN9. Las elipses representan los contornos de confianza de cinco sigma.

De este modo, los inventores demostraron una discriminación espectral robusta de seis tipos diferentes de los UCN integrados en partículas de polímero iluminadas usando un láser de diodo NIR y formando imágenes utilizando una cámara de CCD estándar. Además, como se muestra por el gráfico de canal verde frente a canal rojo, la intensidad integrada de canal rojo y la intensidad integrada de canal verde son suficientes para distinguir entre los seis tipos diferentes de nanocristales. Los gráficos de dispersión de las Figura 24 y 25 revelan que la superposición de las agrupaciones ocurre sólo después de seis desviaciones estándar de la media, lo que implica una tasa de error esperada de menos de 1 parte por billón (ppb).

Los inventores también compararon diferentes lotes de micropartículas producidas en momentos diferentes para determinar la confiabilidad y la previsibilidad de las intensidades integradas de micropartículas de diferentes lotes. Se produjeron cinco lotes separados de cincuenta micropartículas, incluyendo cada lote los mismos nanocristales de tipo UCN4. Las micropartículas se iluminaron con una fuente de luz NIR y se obtuvieron imágenes en color usando una cámara de CCD. Se generaron datos de intensidad integrados para las micropartículas en los cinco lotes y se compararon los valores medios de intensidad integrada para cada lote. La Figura 26 es un gráfico que compara las intensidades integradas promedio para el canal verde y para el canal rojo para cada lote de cincuenta micropartículas. Las intensidades integradas en los canales rojo y verde fueron consistentes en los cinco lotes. Como era de esperar, no hubo señal detectada en el canal azul. La Tabla 4 siguiente enlista los valores de intensidad integrados de los canales rojo y verde medidos para cada lote que muestra la consistencia y reproducibilidad de la firma espectral para diferentes lotes de micropartículas.

Tabla 4

Tipo	Intensidad integrada media del canal rojo ± desviación estándar	Intensidad integrada media del canal verde ± desviación estándar
1	225,89 ± 2,29	194,71 ± 2,01
2	226,51 ± 2,97	195,46 ± 3,14
3	226,35 ± 3,42	195,36 ± 3,34
4	226,36 ± 3,01	194,22 ± 2,46
5	224,65 ± 2,05	194,68 ± 2,77

Los inventores confirmaron que el proceso de oxidación y acrilación no cambia un espectro de emisión de los UCN. La Figura 27 es un gráfico de los espectros de emisión de nanocristales de tipo UCN4 después de cada etapa en la modificación química superficial de los UCN (por ejemplo, antes del procesamiento en ciclohexano, después de la oxidación, después de la acrilación y en la solución de prepolímero PUA). Los espectros se superponen entre sí estableciendo que las modificaciones químicas superficiales de los UCN antes de su incorporación en micropartículas no afectan significativamente los espectros de emisión de las partículas resultantes.

Los inventores también confirmaron que no había atenuación de la respuesta de luminiscencia de los nanocristales integrados en micropartículas de hidrogel tras una intensa irradiación NIR prolongada debida al fotoblanqueo. La Figura 28 es un gráfico de intensidad en función del tiempo para micropartículas de hidrogel que incluyen nanocristales de tipo UCN7 tras exposición continua a una luz NIR de 980 nm desde un láser de 1 W. Esto está en contraste con muchos fluoróforos comúnmente usados que exhiben atenuación debido al fotoblanqueo.

Los inventores también compararon la estabilidad de micropartículas de hidrogel elaboradas con los UCN terminados en carboxilo, en donde los nanocristales están atrapados en poros en la matriz de hidrogel, y partículas de hidrogel elaboradas con los UCN acrilados, en donde los nanocristales están unidos a la matriz de hidrogel mediante acrilatos. La Figura 29 incluye gráficos que comparan la intensidad en función de la edad de las micropartículas incluyendo nanocristales de tipo UCN7 acrilado y micropartículas que incluyen nanocristales del tipo UCN7 terminados en carboxilo

sin acrilación. Como se muestra, hay una reducción en la intensidad de emisión de las micropartículas incluyendo los UCN terminados en carboxilo sin acrilación durante 30 días, presumiblemente debido a que los UCN se difunden fuera de las micropartículas. Por el contrario, las micropartículas con los UCN acrilados no mostraron ninguna atenuación durante 30 días de envejecimiento. De este modo, la acrilación de los UCN y la adhesión subsiguiente a la matriz de hidrogel mejora la estabilidad de la luminiscencia (por ejemplo, la vida útil) de las micropartículas.

Ejemplo de formación de micropartículas contiguas con codificación espectral y espacial

Después de establecer la predictibilidad y reproducibilidad del método para formar los UCN y la predictibilidad y reproducibilidad de los espectros a partir de partículas de hidrogel que incluyen cada una solo un tipo de los UCN, los inventores produjeron micropartículas de hidrogel de PEG-DA y micropartículas de acrilato de poliuretano (PUA) con codificación espectral y espacial. Las micropartículas de PUA son térmica y químicamente resistentes. Las micropartículas de PEG-DA son biocompatibles y mesoporosas permitiendo la difusión de macromoléculas biológicas grandes. Para las partículas de PUA más densamente entrecruzadas, la química hidrófoba superficial de UCN y la gran nanoestructura de UCN de tipo bastón permitieron el arrastre físico homogéneo e irreversible de los UCN en la micropartícula. Por el contrario, la integración estable de UCN en micropartículas implicó el uso de química superficial hidrofílica con un grupo funcional activo al UV en los UCN para una incorporación covalente fuerte como se ha descrito anteriormente.

Específicamente, se produjeron micropartículas poliméricas alargadas, incluyendo cada una, una región de codificación dividida en múltiples porciones (por ejemplo, múltiples franjas), incluyendo cada porción una pluralidad de nanocristales que tienen firma espectral distinguible. Aunque las micropartículas producidas incluyen dos, tres, cuatro, cinco o seis porciones de una región codificada, en algunas realizaciones, cada micropartícula puede tener una región codificada con más de seis porciones. En algunas realizaciones, algunas partículas pueden tener un número diferente de porciones que otras micropartículas. Aunque las micropartículas de hidrogel producidas son rectangulares y alargadas, en algunas realizaciones, las micropartículas de hidrogel pueden tener una relación de aspecto diferente y/o una forma diferente. Además, las micropartículas producidas pueden ser simétricas o asimétricas.

Las micropartículas fueron producidas por SFL usando materiales originales de la región de codificación. Para un material de base de micropartículas de hidrogel de PEG-DA, los UCN acrilados se dispersaron en una disolución de premezcla de PEG-DA produciendo una mezcla de 45% en volumen de PEG-DA (Mn = 700), 40% en volumen de UCN (0,5 mg/µL), 10% en volumen de poli(estirenosulfonato) PSS, y 5% en volumen de fotoiniciador (PI) DAROCUR 1173). Para un material de base de micropartículas de PUA, se dispersaron 150 mg de los UCN en 300 µL de una solución de PUA/PI en proporción en volumen de 9:1. Los materiales originales se usaron para formar micropartículas contiguas usando SFL como se ha descrito anteriormente con respecto a la Figura 21.

Se fabricó un dispositivo microfluídico a partir de poli-dimetilsiloxano (PDMS) para el sistema SFL. PDMS se mezcló con un agente de curado en una proporción de 10:1 y se desgasificó al vacío durante 30 min. El PDMS desgasificado se vertió sobre un molde maestro SU-8 y se curó durante la noche a 65ºC. Después se cortaron los canales del molde y se unieron con una lámina de vidrio revestida con PDMS parcialmente curado para asegurar la permeabilidad al oxígeno. El dispositivo ensamblado se curó completamente durante la noche a 65ºC. El canal microfluídico en el dispositivo microfluídico del sistema SFL tenía 300 µm de ancho y 36 µm de alto.

Se diseñó una fotomáscara para el SFL utilizando un programa de dibujo añadido por ordenador y se imprimió con una impresora de alta resolución. La máscara se colocó en el campo de detención de un microscopio antes de la síntesis. Se fabricó un dispositivo microfluídico a partir de poli-dimetilsiloxano (PDMS) para el sistema SFL. PDMS se mezcló con un agente de curado en una proporción de 10:1 y se desgasificó al vacío durante 30 min. El PDMS desgasificado se vertió en un molde maestro SU-8.

El canal microfluídico del sistema SFL se cargó con la solución de monómero compuesta, se alineó en un portaobjeto del microscopio y se sometió a un flujo accionado por presión. En cada ciclo de síntesis se detuvo el flujo de monómero (350 ms) y se fotopolimerizaron las partículas en el dispositivo usando luz UV filtrada a través de un conjunto de filtros dicroicos (luz de longitud de onda de 365 nm durante una exposición de 100 ns). Las partículas polimerizadas se colocaron a continuación en un tubo de recolección durante 500 ms. La síntesis se produjo a una velocidad de ~ 5 partículas por segundo. Después de la síntesis, se lavaron las partículas. Las partículas de PUA se enjuagaron 8 veces con etanol: PEG200 (1/1 (v/v)) y se almacenaron en etanol. Las partículas de PEG se lavaron 3 veces con 1X TET (1xTE con Tween 20 al 0,05% (v/v)).

Aunque se usaron PEG-DA y PUA para las micropartículas en los ejemplos descritos en la presente memoria, se pueden usar cualquier monómero diacrilado que se haya usado en litografía de flujo de parada para la región codificada. Además, pueden emplearse cualesquiera monómeros diacrilados en los que puedan dispersarse bien los UCN (ya sean nanocristales con superficies modificadas o ligandos o nanocristales con superficies o ligandos no modificados).

En un lote inicial de micropartículas de hidrogel codificadas utilizadas para ensayo, cada porción de la región codificada incluye una pluralidad de nanocristales seleccionados del conjunto de tipos UCN3, UCN4, UCN5 y UCN7, cuyas características se describen más arriba. Como se usa en la presente memoria, las micropartículas codificadas se refieren a micropartículas que tienen cada una, una o más porciones de la región codificada y que cada una tiene uno o

más tipos de UCN distinguibles espectralmente. Se iluminaron ocho micropartículas codificadas con el láser de diodo NIR y se formaron imágenes utilizando un sensor de imagen de CCD estándar. La intensidad integrada se calculó para los canales rojo y verde del sensor de imagen. La Figura 30 es un gráfico de la intensidad integrada del canal verde frente a la intensidad integrada del canal rojo para cada porción de la región codificada en las ocho micropartículas. Como se muestra, las intensidades integradas para las porciones de las regiones codificadas se agrupan en grupos correspondientes a los tipos de nanocristales UCN3, UCN4, UCN5 y UCN7. Las elipses son los ajustes gaussianos de cinco sigma a los datos de las partículas que tienen solamente un tipo de nanocristales, que pueden considerarse los "datos de entrenamiento". Todos los puntos de datos para las partículas codificadas cayeron dentro del ajuste gaussiano de cinco sigmas para los datos de entrenamiento.

Las micropartículas codificadas se pueden usar para muchos tipos diferentes de aplicación de marcación. En algunas realizaciones, una población representativa de partículas cubre una gran parte de la superficie empacada. En algunas realizaciones, un código individual que consiste en una secuencia o agrupación de múltiples partículas colocadas en una posición bien definida. Una secuencia o agrupación de partículas sobre una superficie puede ser utilizada para identificar de forma única un objeto con una capacidad de codificación de $(C^S)^N$ para partículas asimétricas y $(C^S/2)^N$ para partículas simétricas, donde N es el número de partículas depositadas. La inclusión aleatoria de 10 partículas de un conjunto de sólo 1.000 partículas asimétricas únicas produce una capacidad de codificación de ~ $(1.000)^{10}$, o 10^{30}, lo suficiente para un código de barras único para cada producto fabricado en la Tierra.

Los inventores utilizaron una combinación de micropartículas codificadas de dos porciones (dos franjas), tres porciones (tres franjas) y cuatro porciones (cuatro franjas), incluyendo cada franja uno de los tipos de nanopartículas UCN1-UCN9 para marcar un material de empaque blíster de cloruro de polivinilo (PVC) como se muestra en la Figura 31. Las partículas codificadas se dispersaron en una solución de laminado, específicamente, 9:1 por solución en volumen de PUA/fotoiniciador. Dos microlitros de solución de prepolímero se dejaron caer sobre el empaque blíster. Después de diez minutos, el PUA se entrecruzó con luz UV de 365 nm durante 30 s.

La Figura 31 muestra el empaque blíster iluminado con un láser NIR de 1W a 980 nm. Las partículas de PUA y el laminado circundante tienen índices de refracción idénticos, haciéndolos invisibles a menos que estén iluminados con la fuente NIR apropiada. La vista en detalle de la Figura 31 muestra la formación de imágenes de las micropartículas usando un microscopio bajo una iluminación láser de 980 nm. En la imagen, el color total de cada porción es fácilmente distinguible. La Figura 32 es otra imagen de luminiscencia de partículas de PUA codificadas laminadas sobre un empaque blíster farmacéutico. En la Figura 32, cada una de las micropartículas tiene entre 2 a 6 porciones de codificación.

Además, la Figura 33 incluye un gráfico de la intensidad integrada de cada porción de cada micropartícula para los canales de color rojo y verde. El agrupamiento ajustado establece que las firmas espectrales de cada porción o franja son fácilmente distinguibles. Además, todos los datos están dentro del límite de incertidumbre de cinco sigma determinado a partir del conjunto de entrenamiento de micropartículas de hidrogel de un solo color. A pesar del fondo complejo de la superficie del empaque blíster, todos los espectros decodificados cayeron dentro de 5 sigma de los centroides de entrenamiento. No es de extrañar que los datos de entrenamiento RGB basados en PUA no sean necesarios, como lo demuestra el uso exitoso de datos de entrenamiento basados en PEGDA para los UCN 3-5 y 7 (Figura 33).

La Figura 34 es un gráfico de la intensidad integrada de cada porción de cada micropartícula para los canales de color rojo y verde para las micropartículas de PEG-DA utilizadas para un bioensayo y las micropartículas de PUA utilizadas para el marcado de un empaque blíster. Como se muestra, los datos encajan dentro de los contornos de cinco sigma para ambos tipos de micropartículas, estableciendo que la confiabilidad de la identificación se aplica a través de diferentes materiales de micropartículas.

Las micropartículas de PUA soportan la exposición a fundición a alta temperatura hasta 260ºC en plásticos fundidos que se encuentran en todas partes como poli(tereftalato de etileno) (PET) sin ningún impacto en la decodificación, aplicaciones de desbloqueo en las que se utilizan códigos de barras duraderos e incrustados. Los inventores demostraron experimentalmente que las micropartículas de PUA pueden soportar el procesado de tereftalato de polietileno (PET) convencional. Para simular el procesamiento de PET, se cargaron las micropartículas codificadas con PUA en un vial que contenía gránulos de PET. El vial que contenía la mezcla de micropartículas de PUA y virutas de PET se calentó a 260ºC hasta que se fundieron completamente los gránulos de PET. La micropartícula fundida y la solución de PET se dejó caer sobre un portaobjetos de vidrio inferior y luego se emparedaron por un portaobjetos de vidrio superior. Las láminas de vidrio emparedadas se recalentaron hasta que la disolución emparedada se dispersó para producir una película de PET uniforme. Se obtuvieron imágenes de luminiscencia antes y después del proceso de fusión. La Figura 35 es una imagen de luminiscencia de dos micropartículas codificadas por PUA iluminadas con luz NIR después de un procesamiento simulado de PET. La Figura 36 incluye gráficos de la intensidad integrada para diversos códigos de color en 10 micropartículas después del procesamiento de PET. Como se muestra en los gráficos de la Figura 36, la emisión de las micropartículas codificadas no parecía afectada por el procesamiento simulado de PET, lo que significa que las micropartículas de PUA podrían usarse en material de base de PET que se somete a procesamiento de PET.

Las micropartículas de PUA son también insensibles a la iluminación repetitiva y a la luz ambiente, una ventaja distinta sobre las partículas marcadas en forma fluorescente que deben ser almacenadas en la oscuridad.

Un estudio de los riesgos técnicos restantes podría llevarlo a uno a sospechar una necesidad de empaque de partículas densas y una exactitud de acompañamiento debido a la superposición potencial de partículas. Sin embargo, el pequeño número de partículas requeridas elimina este desafío. Por ejemplo, para la deposición de 10 partículas con dimensiones de ~ 250 x 70 micrómetros y un campo de visión de aproximadamente 10 mm, se necesitaría una separación entre partículas de 300-500 micras a lo sumo para proporcionar un regulador confortable en los bordes del campo. En comparación, las impresoras de inyección de tinta de bajo consumo pueden almacenar de manera confiable puntos individuales de tinta a razón de 300 puntos por pulgada, o un punto cada 80 micras, lo que permite una correcta deposición de partículas.

Las micropartículas de PUA pueden usarse para la marcación superficial de muchos tipos diferentes de artículos. Por ejemplo, los inventores recubrieron un hilo de poliéster con micropartículas. Las partículas se mezclaron en una solución en proporción 9:1 de PUA con respecto a PI, que se usó para recubrir el hilo. La solución se fotopolimerizó después usando una lámpara UV de 365 nm. La Figura 37 incluye imágenes de las micropartículas recubiertas sobre el hilo bajo iluminación normal en la imagen superior y bajo iluminación NIR en las imágenes inferiores. Las imágenes bajo iluminación normal muestran que las micropartículas no son visibles. Las micropartículas también se aplicaron a papel moneda como se muestra en la Figura 38.

Las micropartículas pueden ser particularmente adecuadas para la marcación para evitar la falsificación porque las micropartículas forman imágenes en forma relativamente fácil y es relativamente fácil obtener información espectral cuantitativa de la imagen, pero sería difícil para un falsificador "suplantar" las micropartículas con firmas espaciales/espectrales y la disposición de micropartículas que tienen las mismas propiedades.

Los inventores también utilizaron las micropartículas para marcar la mayor parte de objetos. Por ejemplo, la Figura 39 muestra una llave de alcohol polivinílico (PVA) formada con impresión tridimensional. La mayor parte de la llave de PVA incluye aproximadamente 12 micropartículas. Como se muestra en el detalle a la izquierda, las micropartículas no son visibles bajo iluminación normal. Sin embargo, bajo iluminación NIR, las micropartículas pueden distinguirse claramente.

La Figura 40 muestra una llave de acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) formada con impresión tridimensional que incluye aproximadamente 12 micropartículas en la mayor parte de la llave. Como se muestra en la vista detallada a la izquierda, bajo iluminación normal las micropartículas no son visibles. Sin embargo, la micropartícula se puede distinguir claramente bajo iluminación NIR. Los inventores también incorporaron micropartículas en la mayor parte de una llave de ácido poliláctico (PLA).

En las llaves de PVA, ABS y PLA, las micropartículas fueron incrustadas en la mayor parte de la llave recubriéndolas sobre filamentos plásticos que se pasaron a través del elemento de extrusión de la impresora tridimensional. Sin embargo, en otras realizaciones, las micropartículas podrían añadirse la mayor parte de un material antes de formar o moldear el material (por ejemplo, mediante moldeo por inyección o moldeo por soplado).

Por ejemplo, se moldeó una llave de poliestireno a alta temperatura con micropartículas en la mayor parte del material (véase la Figura 41). El material moldeado de silicona se vertió sobre una llave y se curó durante 24 horas para generar un molde. Las partículas de PUA integradas a UCN en una solución de PUA/PI en una relación de 9:1 (v/v) se dejaron caer en el molde y se curaron durante 30 s usando una lámpara UV manual a 365 nm. El molde con forma de llave se llenó con gránulos de poliestireno (PM = 280.000) y se calentó a 260ºC durante 90 minutos. El molde de silicona se enfrió a temperatura ambiente y el objeto fundido se retiró del molde. Las imágenes de luminiscencia se tomaron entonces utilizando un decodificador portátil personalizado bajo excitación de un láser NIR de 1W a 980 nm.

En aplicaciones en las que es importante que las micropartículas no puedan observarse bajo iluminación ordinaria con luz visible, el material polimérico para la micropartícula puede seleccionarse para que coincida con el índice de refracción del material al que se unirá la micropartícula. Para las aplicaciones de marcación de superficie, el material polimérico de la micropartícula puede seleccionarse para que coincida con el índice de refracción de un material de recubrimiento usado para unir las micropartículas al objeto subyacente. Para marcación dentro del cuerpo de un objeto, el material polimérico de la micropartícula puede seleccionarse para que coincida con el índice de refracción del cuerpo del objeto.

En algunas realizaciones, podrían usarse diversos tipos de micropartículas como marcas incrustadas para tejidos.

Tal como se ilustra en las imágenes de la Figura 41, se pueden usar micropartículas para marcar la superficie y/o la mayor parte de diversos tipos de objetos. Las micropartículas son no visibles u "ocultas" bajo iluminación normal, pero claramente visibles bajo iluminación NIR. En particular, la decodificación no se limita a la instrumentación basada en un microscopio. La Figura 41 ilustra una adquisición de imágenes para un decodificador portátil que emplea un aparato portátil que consiste en una cámara de teléfono móvil equipada con un objetivo. Específicamente, se montó un decodificador de microscopio portátil utilizando los siguientes componentes: un teléfono móvil con una cámara incorporada, un Objetivo DIN con un montaje de tubo ocular 10X, un Objetivo de 20X (distancia de trabajo larga (LWD) Ampliación 20X/Apertura numérica (0.30)), y un adaptador de teléfono móvil a un ocular de microscopio. La Figura 41

incluye imágenes de micropartículas usadas para marcar un empaque blíster farmacéutico, papel moneda, una tarjeta de crédito, objetos de cerámica tridimensionales, obras de arte y una llave de poliestireno fundido a alta temperatura.

La Figura 42 ilustra un método de lectura de los códigos espectrales de una micropartícula de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. Inicialmente, se identifica un máximo o mínimo a lo largo del eje x o y (etapa 1). Se identifican un centro y puntos extremos de la partícula (etapa 2). Se determina una orientación de partícula y, en el caso de una partícula asimétrica, se determina una dirección de la partícula y se identifica el centro de cada franja (etapa 3). Se calcula un valor RGB promedio dentro de un área muestreada alrededor de cada franja (etapa 4).

Específicamente, las imágenes de partículas con 6 franjas se tomaron a través de un decodificador de CCD y se cargaron en un software de procesamiento y análisis de imágenes (por ejemplo, MATLAB por Mathworks of Natick, MA). Los límites de las partículas se definieron utilizando un algoritmo de detección de bordes basado en la intensidad de la escala de grises. Se promediaron los valores x y y del pixel del contorno para determinar el centroide de la partícula. Se anotaron píxeles de contorno con valores mínimos y máximos de x y y (cuatro puntos en total), y las distancias entre puntos adyacentes utilizados para determinar el punto final de la partícula o el píxel situado en el segundo borde más corto del contorno de la partícula y su eje longitudinal. El píxel del extremo y el píxel del centroide se utilizaron entonces para determinar tanto la orientación del código como un director para el eje longitudinal de la partícula. El centroide de cada región de franja de la partícula se determinó segmentando la partícula en seis regiones (el número de franjas se supuso conocido a priori) a lo largo de su director longitudinal. En otras realizaciones, se pueden emplear algoritmos de segmentación de imágenes de k medios para definir regiones de la partícula basadas en color, sin tener conocimiento previo del número de franjas de partículas. Los valores de RGB se midieron promediando los píxeles dentro de cada una de las seis regiones de franjas de las partículas bajo ensayo en comparación con los valores RGB de entrenamiento y las desviaciones estándar, como se determinó a partir de un conjunto de entrenamiento de partículas. Si un conjunto medio de valores RGB caía dentro de 3,5 desviaciones estándar de un valor RGB de entrenamiento, se determinó que los valores coincidían. De esta manera, las secuencias RGB 'análogas' se tradujeron en secuencias 'digitales' de firmas espectrales.

Para probar la identificación, se generaron micropartículas múltiples con un "código verdadero" y algunas con un "código falso" diferente, como se muestra en la Figura 43. Un sistema de decodificación automatizado que emplea el procedimiento descrito anteriormente con respecto a la Figura 42 distingue correctamente las micropartículas de "código verdadero" que coinciden un "código auténtico" proporcionado de las micropartículas de "código falso" que no coinciden con el código auténtico proporcionado usando imágenes de luminiscencia. En la Figura 43, las imágenes de "código falso" identificadas se indican con una caja alrededor de la imagen.

Más detalles sobre un ejemplo de sistema de síntesis de partículas se proporcionan a continuación. La Figura 44 representa esquemáticamente un sistema de litografía y decodificación de flujo para la síntesis de partículas que incluye una configuración de microscopio de litografía de flujo, una configuración de microscopio de decodificación y una configuración de espectrómetro. La Figura 45 es un sistema de litografía y decodificación de flujo de imágenes para la síntesis de partículas. La configuración de microscopía de litografía de flujo incluye una fuente de luz LED UV, un objetivo 10X (óptica de Edmund), una cámara CMOS, un cubo de jaula dicroica, un espejo dicroico, espejos de prisma giratorios montados en cubos de jaula, una etapa de muestra XYZ, tubos de lente de Ø1", un convertidor XY, una carcasa de zoom de alta precisión para óptica de Ø1", una jaula de 30 mm, postes, un LED y un relé de control de válvula, que fueron controlados con hardware y software de control de instrumentos, adaptador de cámara y una cámara CCD. La configuración del microscopio de decodificación incluía un láser de 1 W de 980 nm, un filtro de corte de 950 nm, un colimador, un adaptador de cámara CCD y una cámara CCD. La configuración del espectrómetro incluía un espectrómetro, una etapa de traslación del láser, una montura de lente de translación X, Y, pares de dobletes acromáticos NIR, un colimador, un filtro de corte de 950 nm, una jaula de 30 mm y postes.

Los sistemas versátiles de litografía de flujo de parada (SFL) de alto rendimiento y técnicas descritas aquí son un proceso de alto rendimiento para sintetizar partículas. En un proceso semicontinuo, múltiples corrientes laminares que fluyen combinadas - cada una que contiene una sola fracción o molécula sonda de UCN ópticamente activa - se mueven en un microcanal (por ejemplo, formado a partir de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) o una resina a base de tioleno no hinchable para uso con disolventes orgánicos), se detienen y se fotopolimerizaron en su lugar a través de una luz ultravioleta patronizada con forma de máscara (365 nm) para formar partículas de código de barras a una velocidad de 18.000 partículas/hora, que se desplazan luego cuando el flujo se reanuda. Esta velocidad de síntesis de ~ 10^4 partículas/hora no es de ninguna manera limitante; se ha utilizado el enfoque de flujo hidrodinámico para aumentar la velocidad de síntesis de partículas similares a más de 10^5 partículas/h. La plataforma de síntesis también se puede construir utilizando piezas comerciales en existencia y óptica de pie. La paralelización en un entorno industrial, sin más optimización, podría aumentar fácilmente el rendimiento de síntesis a escala de instalaciones por órdenes de magnitud para satisfacer la demanda industrial.

REIVINDICACIONES

1. Una micropartícula (10) para la marcación, comprendiendo la micropartícula (10):

un cuerpo (12) que comprende un material polimérico e incluye una región (30) codificada;

una primera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente dispuestos en una primera porción (31) de la región (30) codificada, teniendo la primera pluralidad de nanocristales (41) de conversión ascendente una primera firma espectral; y

una segunda pluralidad de nanocristales (41) de conversión ascendente dispuestos en una segunda porción (32) de la región (30) codificada separada espacialmente de la primera porción (31) de la región (30) codificada, teniendo la segunda pluralidad de nanocristales de conversión ascendente una segunda firma espectral.

2. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde la segunda firma espectral es diferente de la primera firma espectral.

3. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde la primera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente incluye un primer material dopado con uno o más elementos de tierras raras y la segunda pluralidad de nanocristales de conversión ascendente incluye un segundo material dopado con uno o más elementos de tierras raras.

4. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde la primera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente están unidos covalentemente al material polimérico o están unidos al material polimérico en el momento de la síntesis de partículas a través de un grupo acrilato.

5. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde la primera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente se distribuyen a lo largo del cuerpo de la primera porción (31) o se dispersan sin agregación en el cuerpo.

6. La micropartícula de la reivindicación 1, que comprende además una tercera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente dispuestos en una tercera porción (33) de la región (30) codificada separada espacialmente de la primera porción (31) de la región (30) codificada y separada espacialmente de la segunda porción (32) de la región (30) codificada, teniendo la tercera pluralidad de nanocristales de conversión ascendente una tercera firma espectral.

7. La micropartícula de la reivindicación 1, en la que al menos una porción de la región (30) codificada no incluye nanocristales.

8. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde cada firma espectral incluye luminiscencia en múltiples bandas distintas dentro de un intervalo de 400-800 nm.

9. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde el material polimérico comprende al menos uno de una sustancia biocompatible, acrilato de poliuretano (PUA) o diacrilato de polietilenglicol (PEG-DA).

10. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde los nanocristales de conversión ascendente son paramagnéticos.

11. La micropartícula de la reivindicación 1, en donde al menos algunos de los nanocristales de conversión ascendente comprenden gadolinio.

12. Un método de elaboración de una micropartícula (10, 170) para marcación, comprendiendo el método:

proporcionar un primer material de base de la región codificada que incluye un polímero (142) y una primera pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente que tienen una primera firma espectral;

proporcionar un segundo material de base de región codificada que incluye un polímero (142) y una segunda pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente que tienen una segunda firma espectral distinta de la primera firma espectral; y

formar una micropartícula (10, 170) contigua mediante entrecruzamiento, formando el primer material de base de región codificada una primera porción (31, 171) de una región (30) codificada de la micropartícula (10, 170) y con el segundo material de base de región codificada que forma una segunda porción (32, 172) de la región (30) codificada.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el proceso incluye además la etapa de flujo combinado del primer material de base de región codificada y el segundo material de base de región codificada a un área (150) para entrecruzamiento.

14. El método de la reivindicación 12, en donde cada uno de la primera pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente y cada uno de la segunda pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente tiene al menos uno de una superficie hidrofílica, un ligando hidrofílico, una superficie hidrófoba, o un ligando hidrófobo.

15. El método de la reivindicación 12, en donde la primera pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente se distribuye a través del cuerpo de la primera porción (31, 171) de la región (30) codificada de la

micropartícula (10, 170) y en donde la segunda pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente está distribuida a lo largo del volumen de la segunda porción (32, 172) de la región (30) codificada.

16. El método de la reivindicación 12, en donde el método comprende además proporcionar un tercer material de base de región codificada que incluye un hidrogel y una tercera pluralidad de nanocristales (41, 144) de conversión ascendente que tienen una tercera firma espectral distinta de aquella de la primera firma espectral y en donde el tercer material de base de región codificada forma una tercera porción (33, 173) de la región (30) codificada de la micropartícula (10, 170).

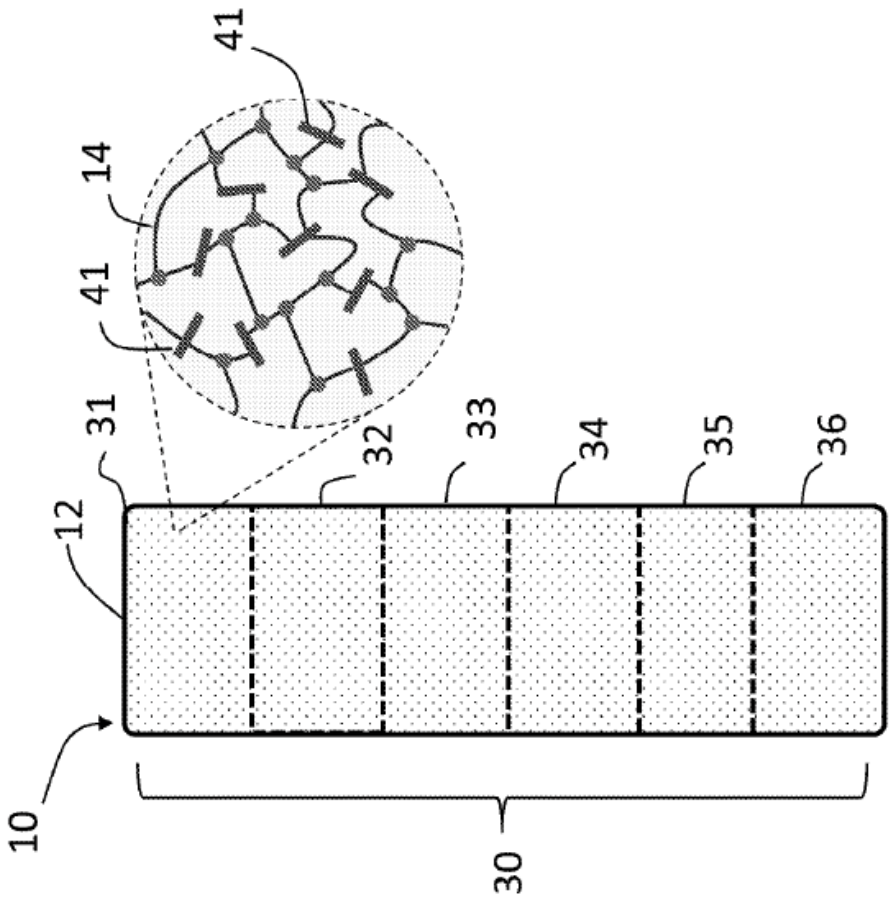


Fig. 1

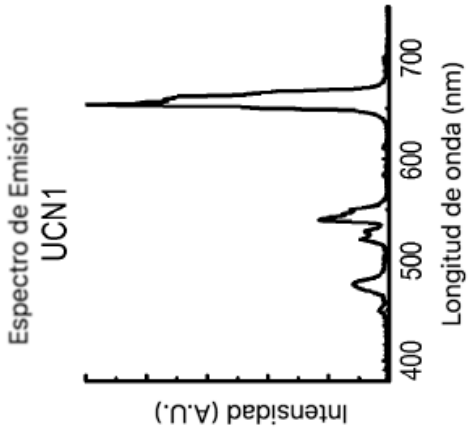


Fig. 2

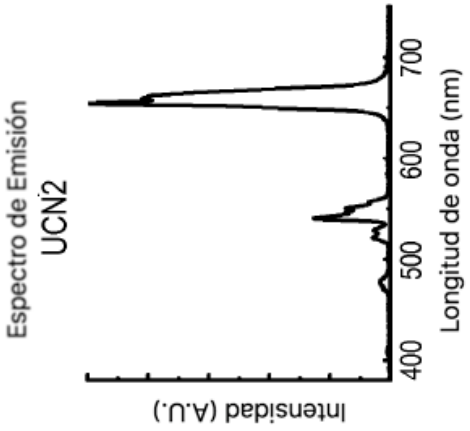


Fig. 3

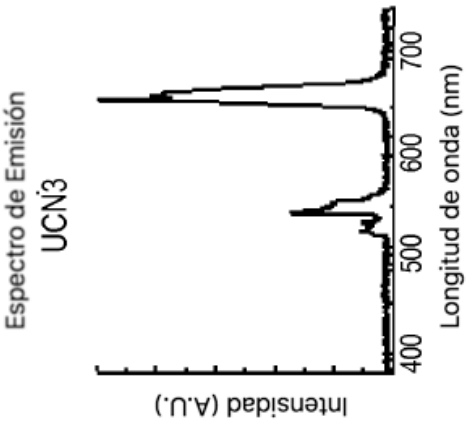


Fig. 4

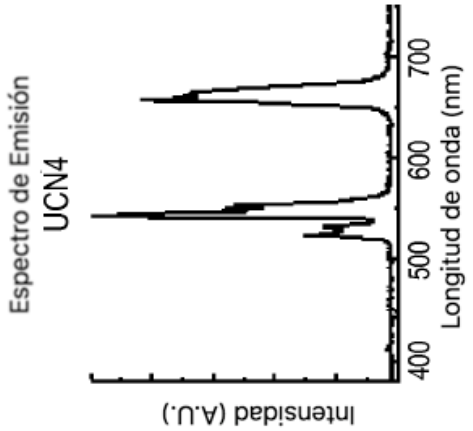


Fig. 5

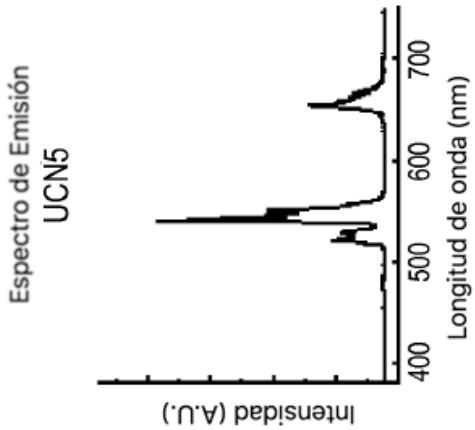


Fig. 6

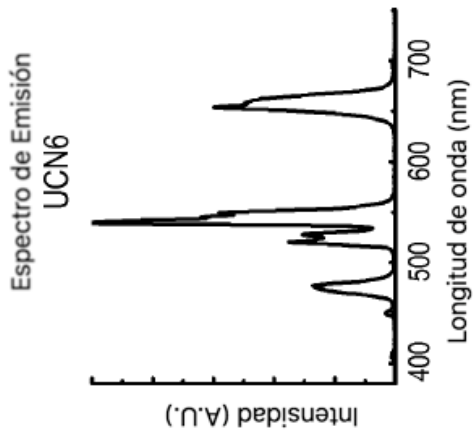


Fig. 7

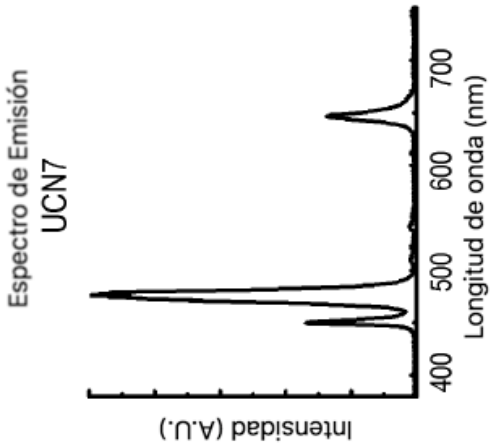


Fig. 8

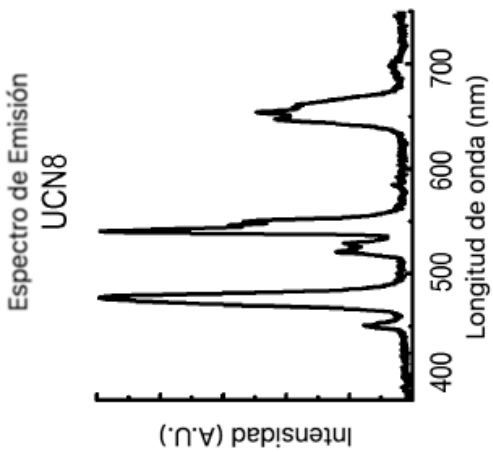


Fig. 9

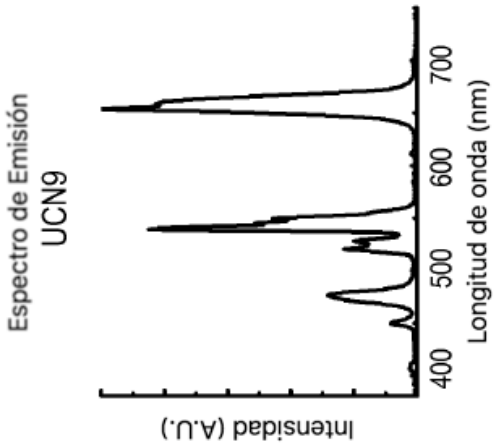


Fig. 10

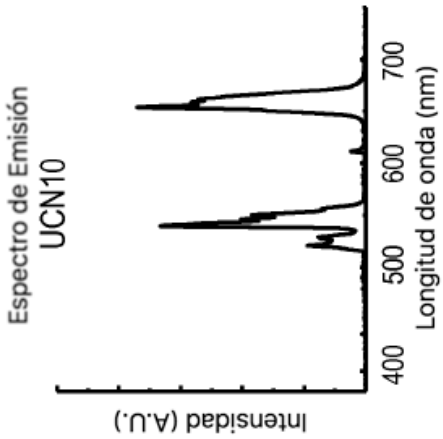


Fig. 11

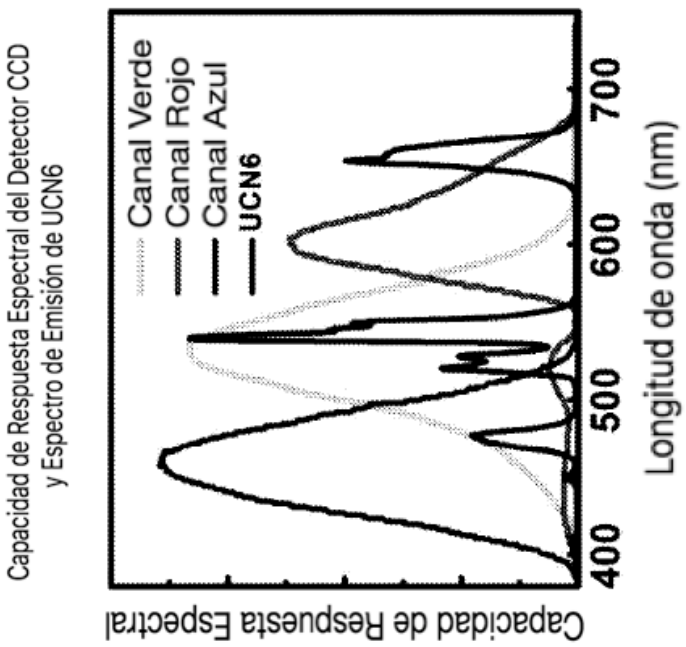

Capacidad de Respuesta Espectral del Detector CCD
y Espectro de Emisión de UCN6
Canal Verde
Canal Rojo
Canal Azul
UCN6
Capacidad de Respuesta Espectral
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)

Fig. 13

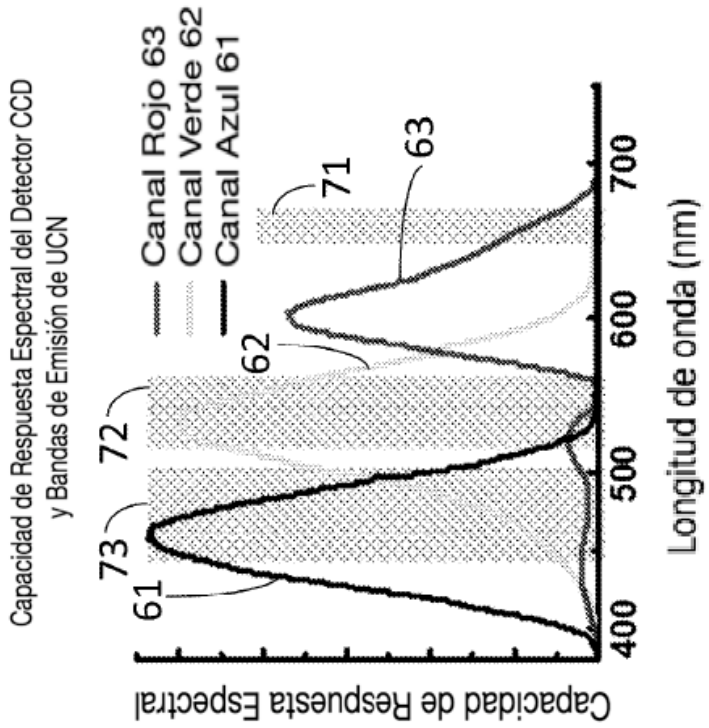

Capacidad de Respuesta Espectral del Detector CCD
y Bandas de Emisión de UCN
Canal Rojo 63
Canal Verde 62
Canal Azul 61
61
62
63
71
72
73
Capacidad de Respuesta Espectral
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)

Fig. 12

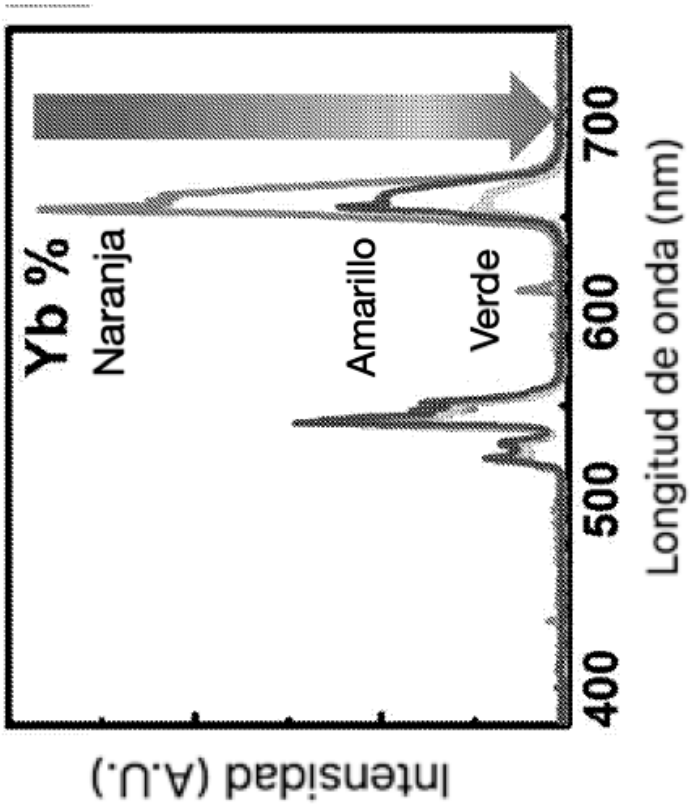

Yb %
Naranja
Amarillo
Verde
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)
Intensidad (A.U.)

Fig. 14

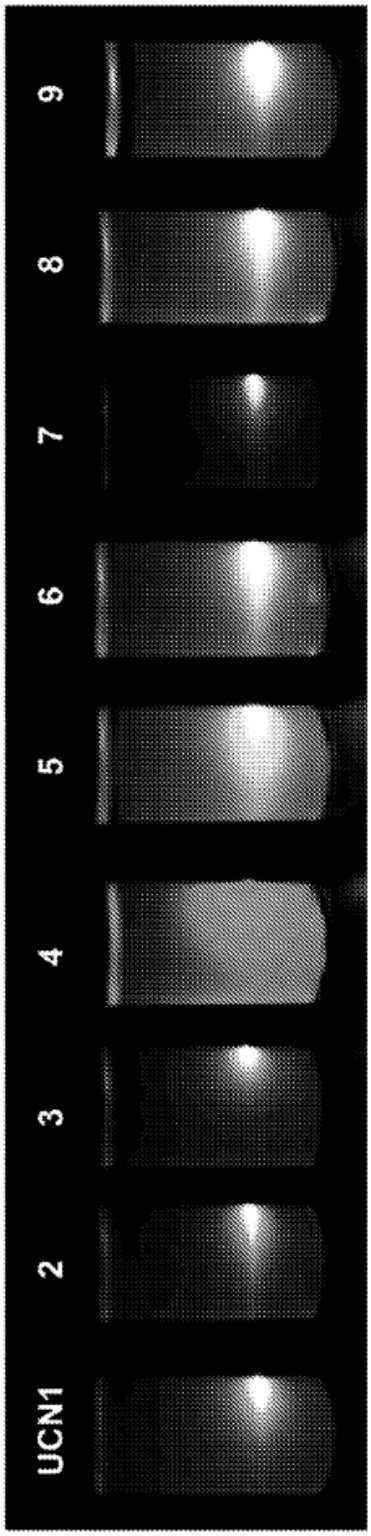


Fig. 15

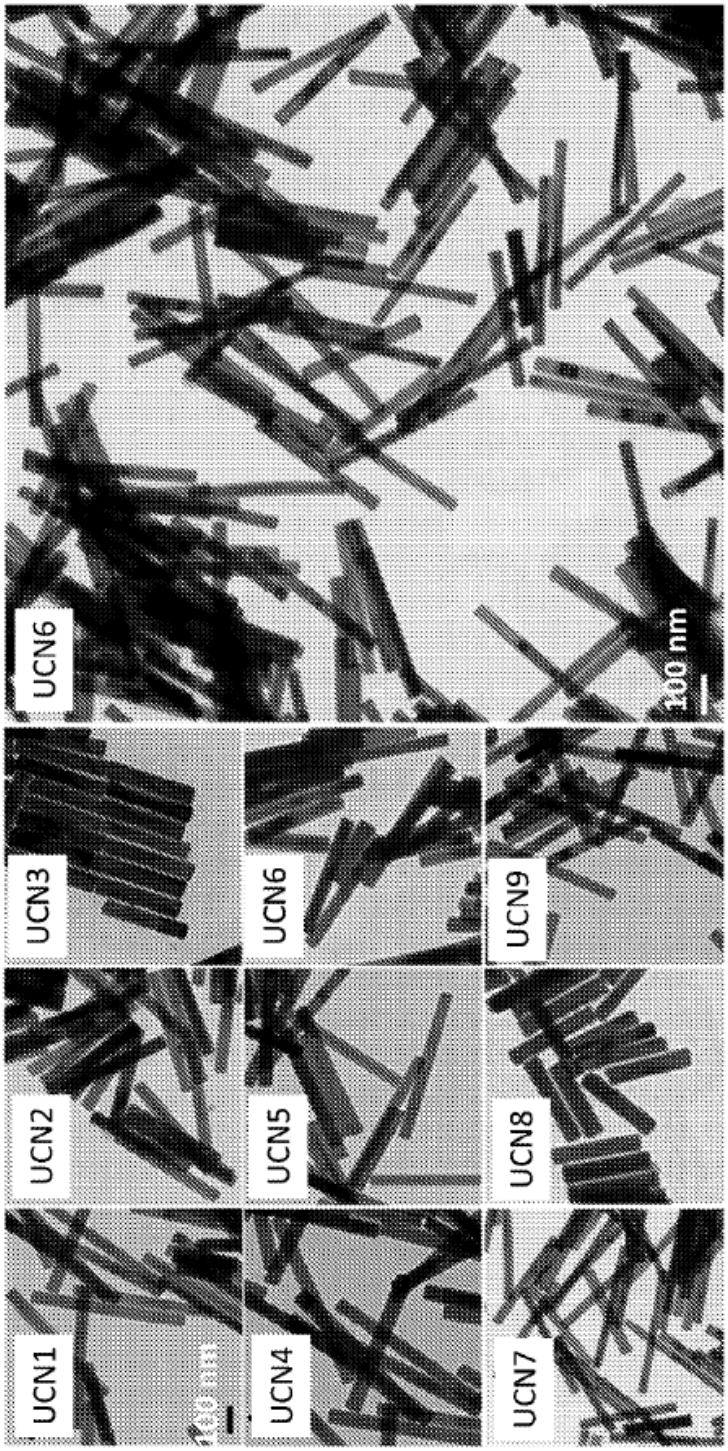
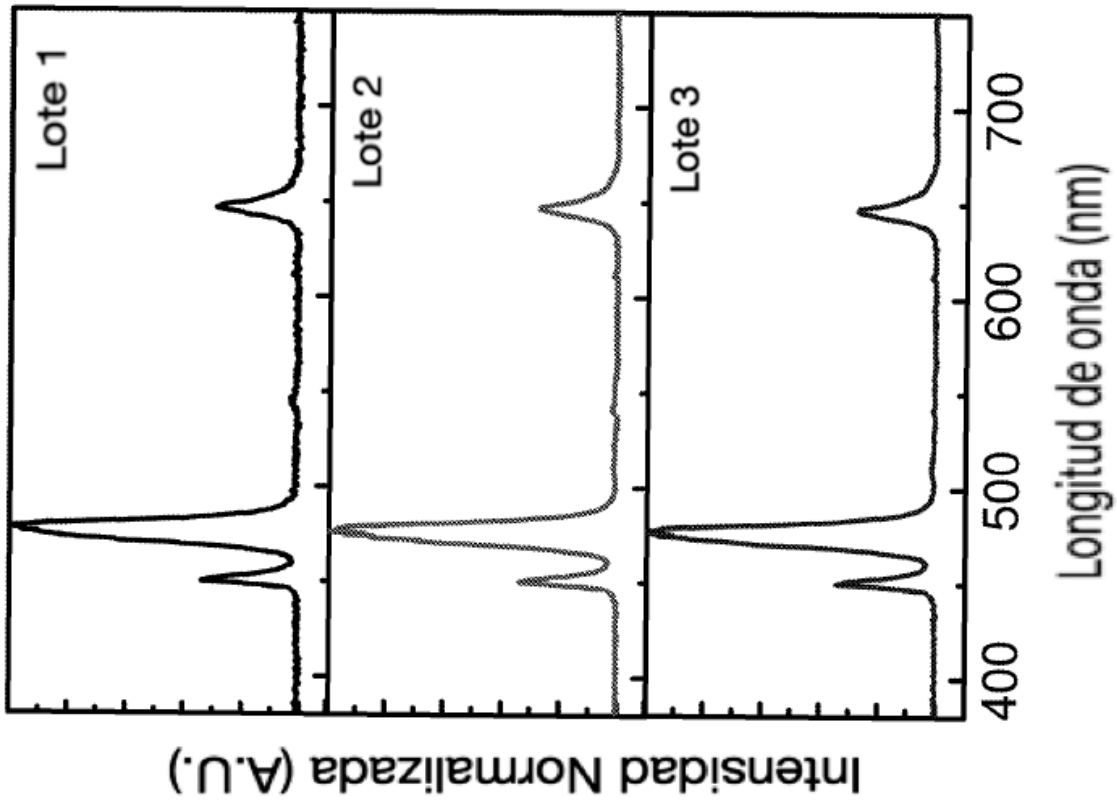

UCN1
100 nm
UCN2
UCN3
UCN4
UCN5
UCN6
UCN7
UCN8
UCN9
UCN6
100 nm

Fig. 16


Lote 1
Lote 2
Lote 3
Intensidad Normalizada (A.U.)
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)

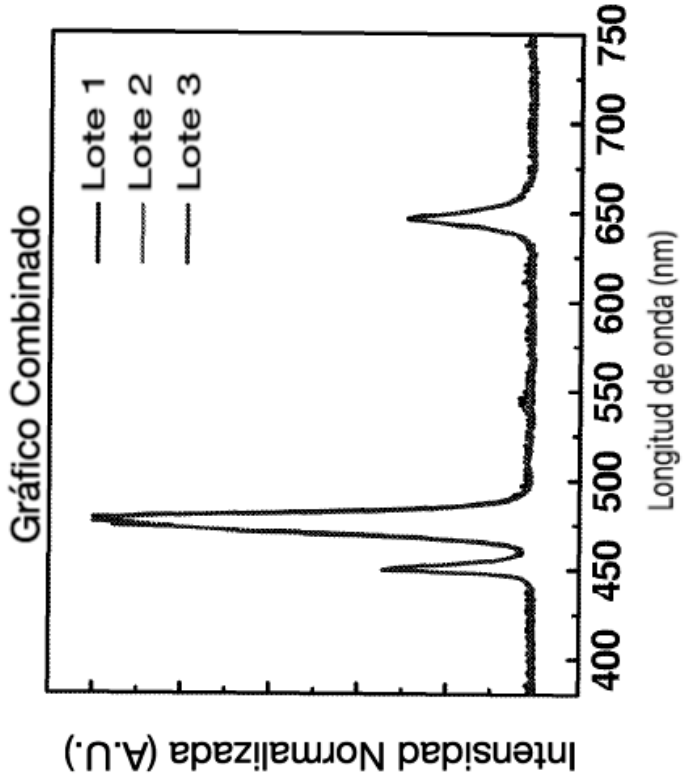


Gráfico Combinado
Lote 1
Lote 2
Lote 3
Intensidad Normalizada (A.U.)
400
450
500
550
600
650
700
750
Longitud de onda (nm)

Fig. 17

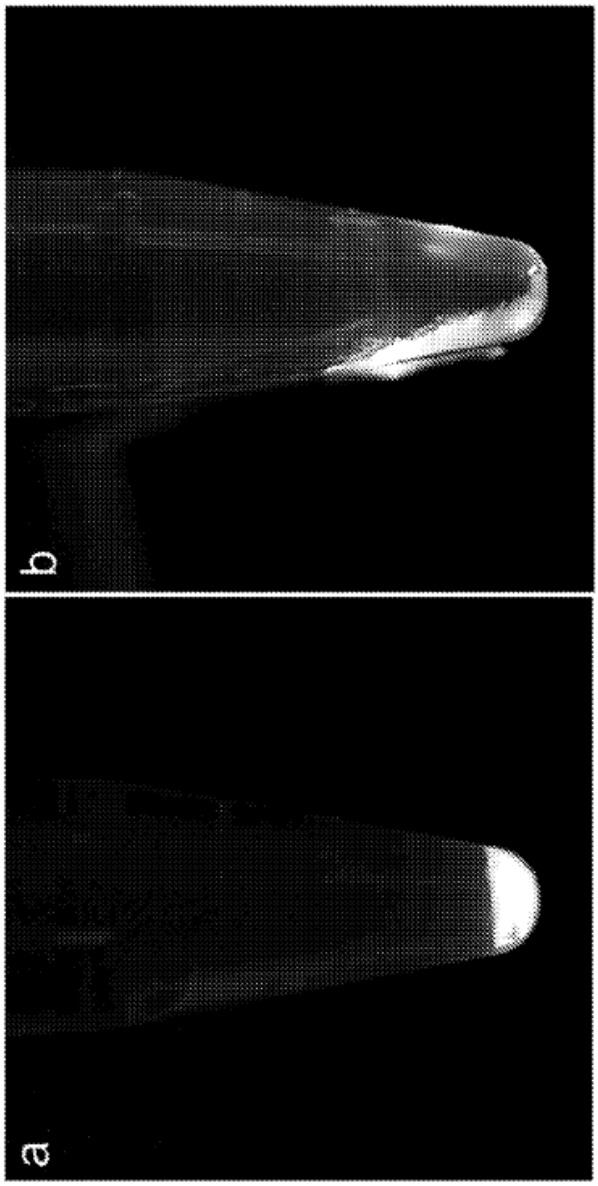


Fig. 18

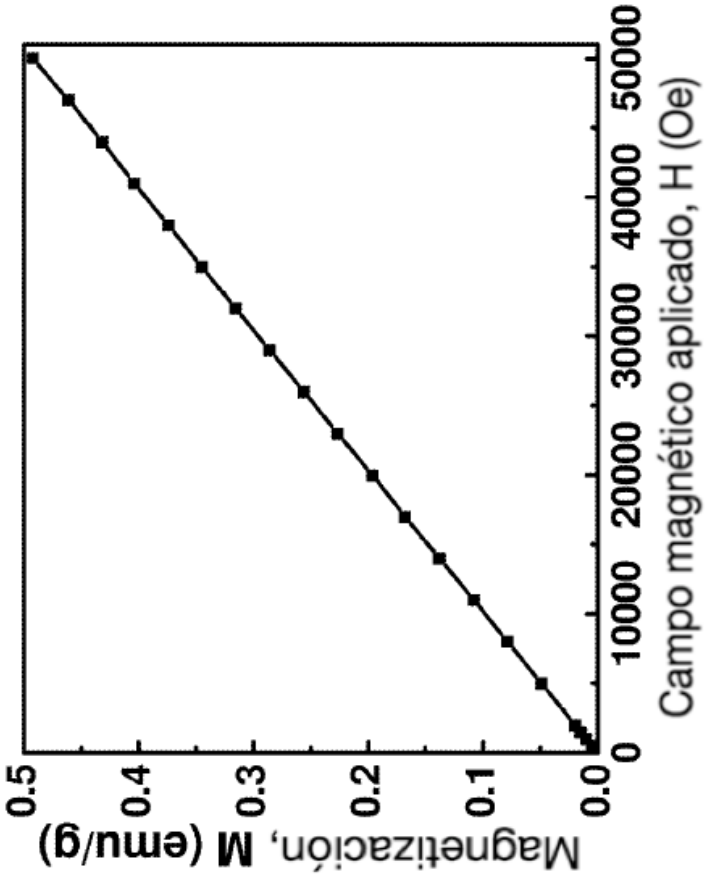

Magnetización, M (emu/g)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
10000
20000
30000
40000
50000
Campo magnético aplicado, H (Oe)

Fig. 19

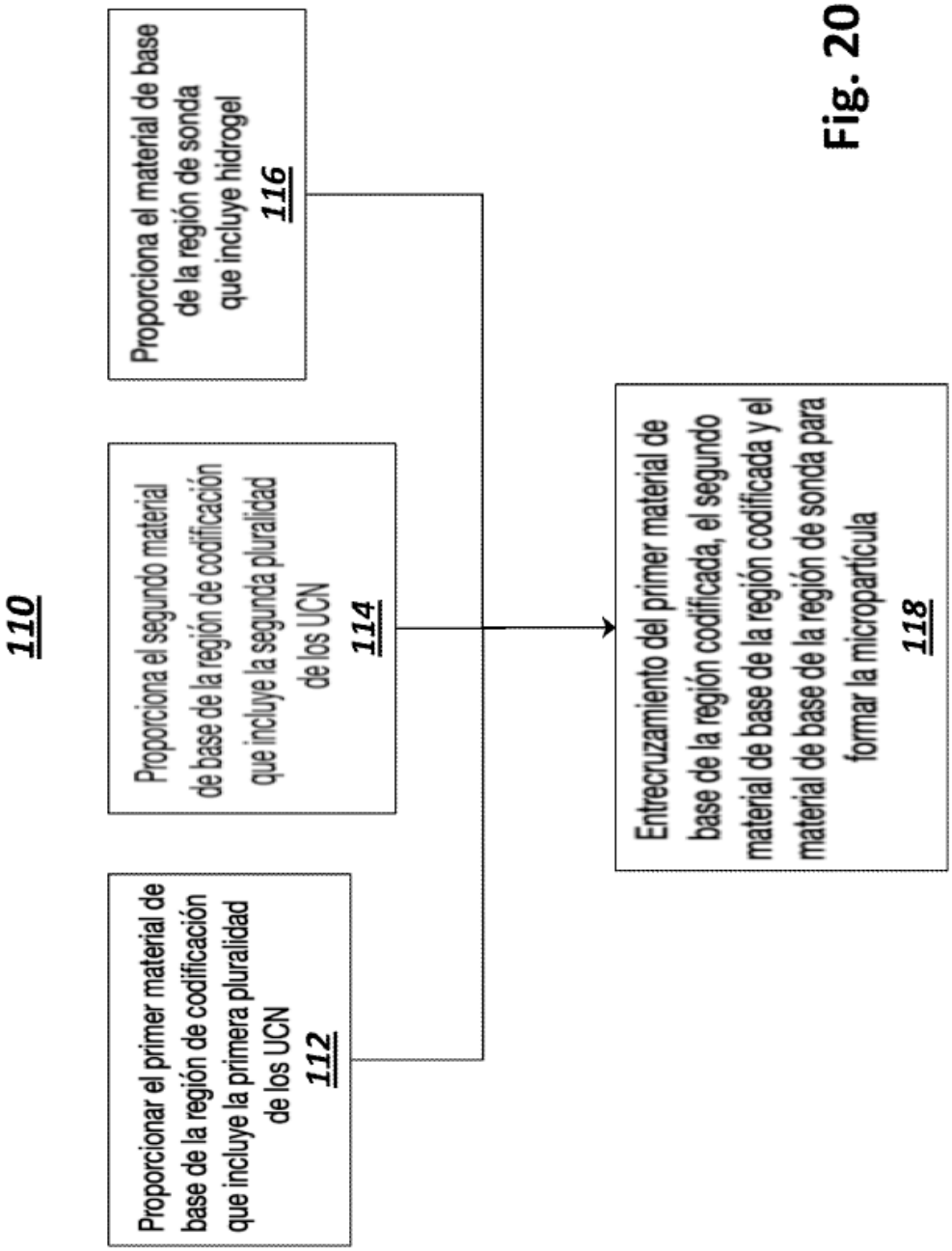

110
Proporcionar el primer material de base de la región de codificación que incluye la primera pluralidad de los UCN
112
Proporciona el segundo material de base de la región de codificación que incluye la segunda pluralidad de los UCN
114
Proporciona el material de base de la región de sonda que incluye hidrogel
116
Entrecruzamiento del primer material de base de la región codificada, el segundo material de base de la región codificada y el material de base de la región de sonda para formar la micropartícula
118

Fig. 20

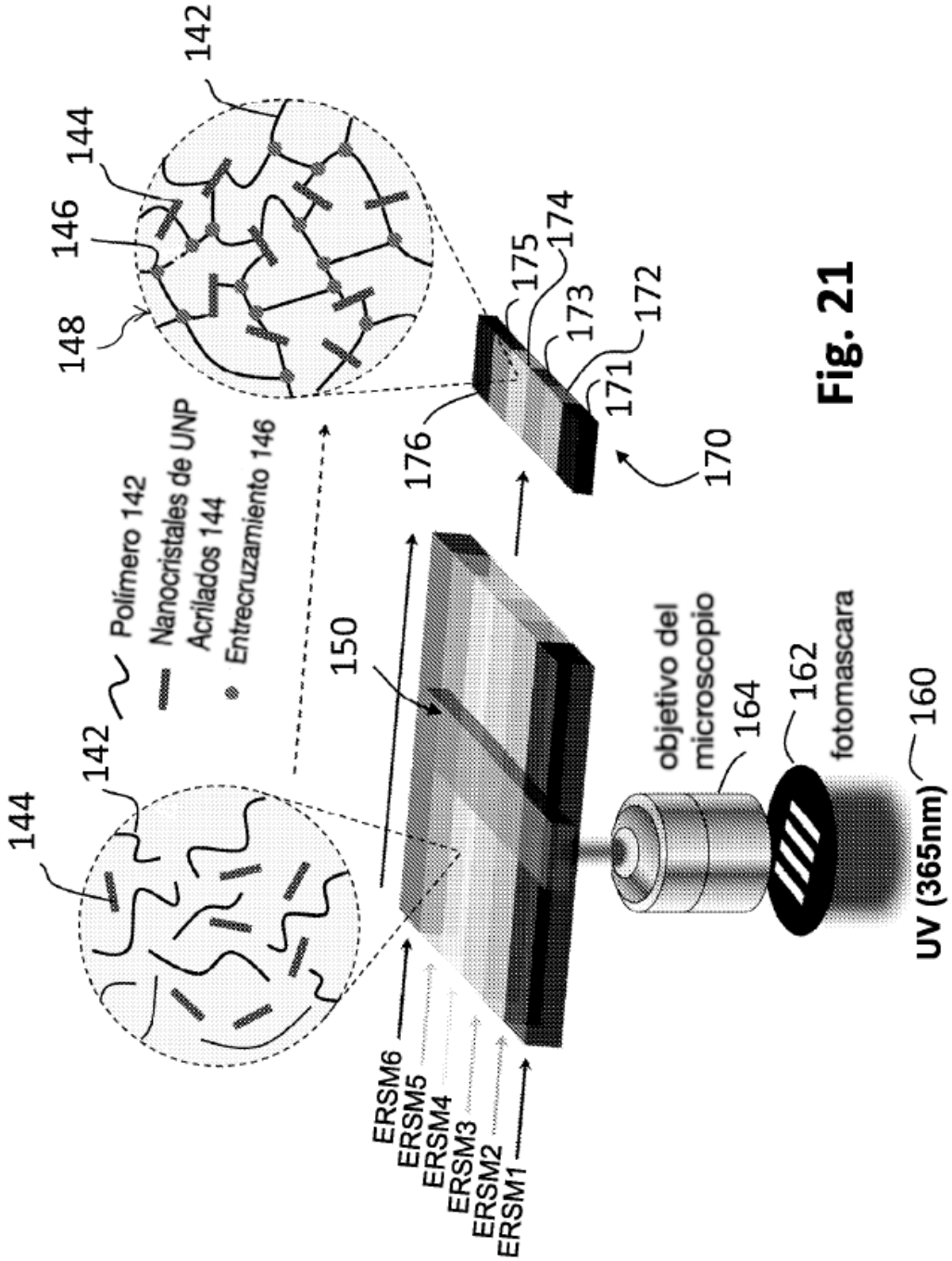

142
144
146
148
Polímero 142
Nanocristales de UNP
Acrilados 144
Entrecruzamiento 146
150
176
175
174
173
172
171
170
objetivo del microscopio
164
162
fotomascara
160
UV (365nm)
ERSM6
ERSM5
ERSM4
ERSM3
ERSM2
ERSM1

Fig. 21

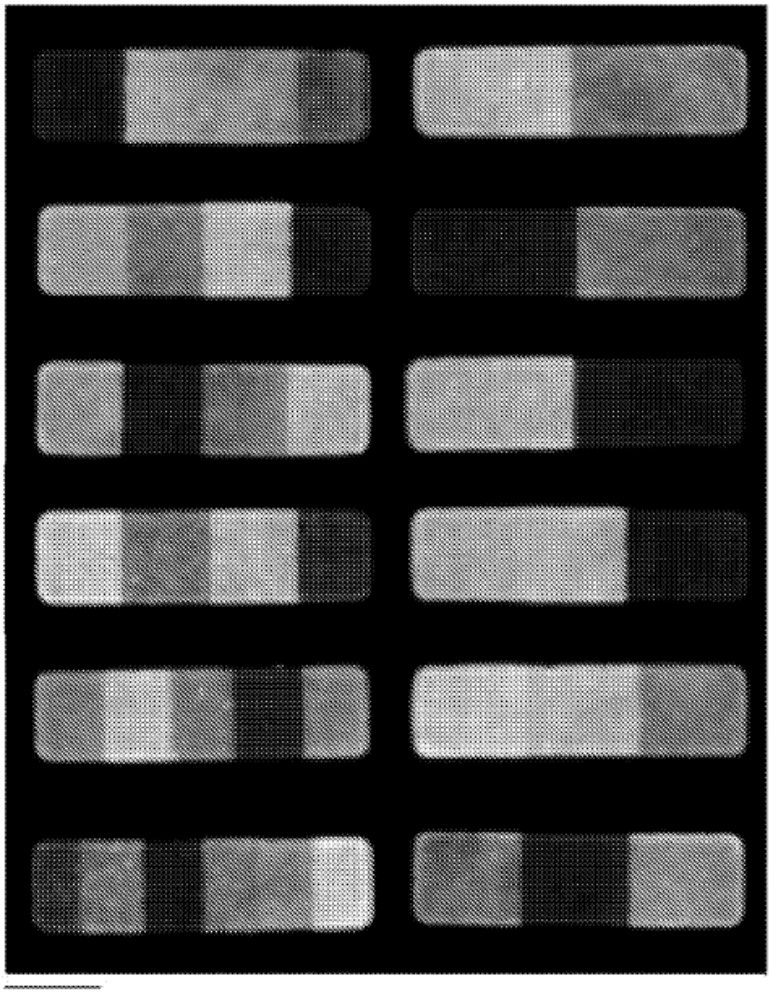


Fig. 22

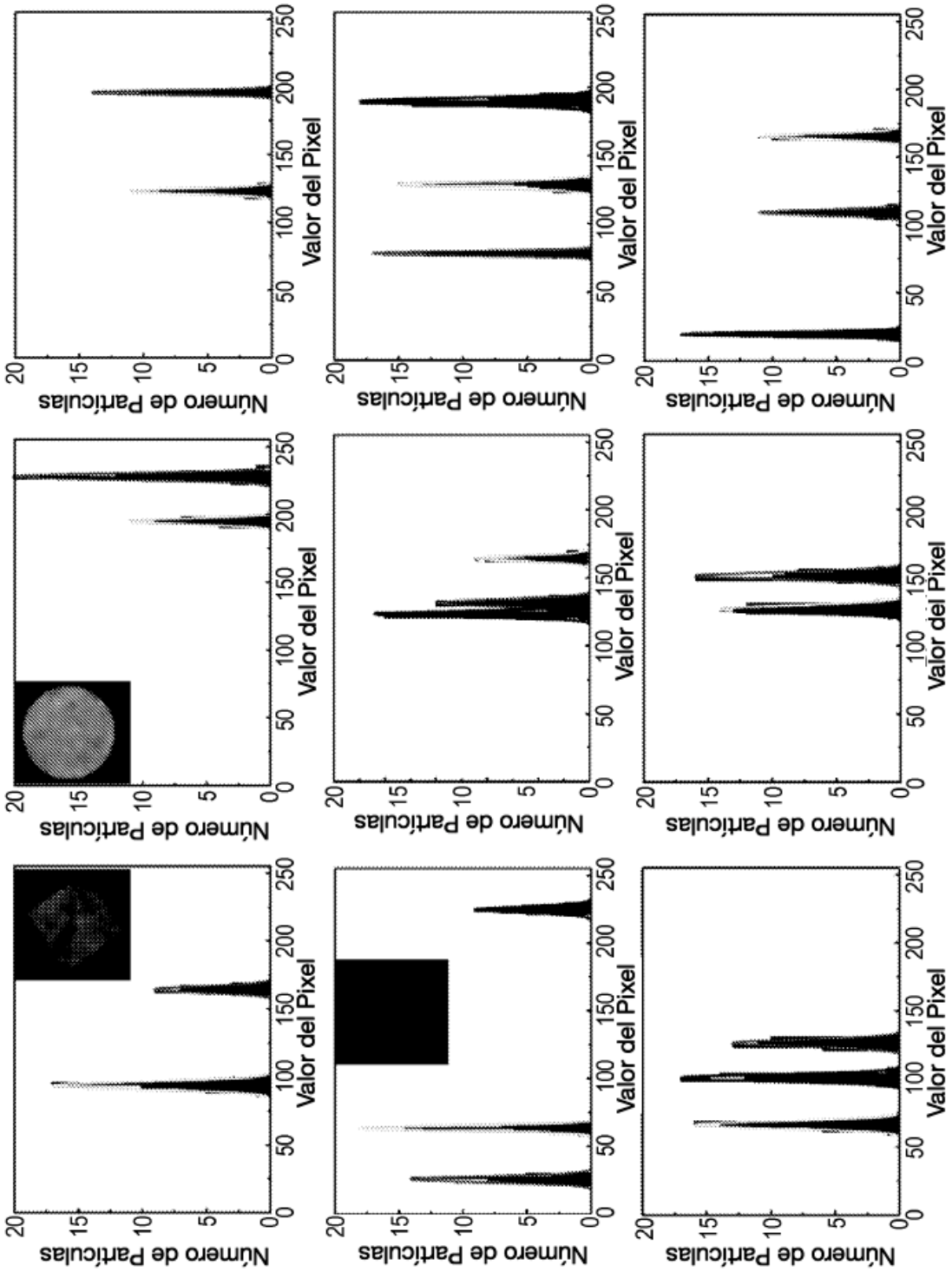

Número de Partículas
Valor del Pixel
0
5
10
15
20
0
50
100
150
200
250

Fig. 23

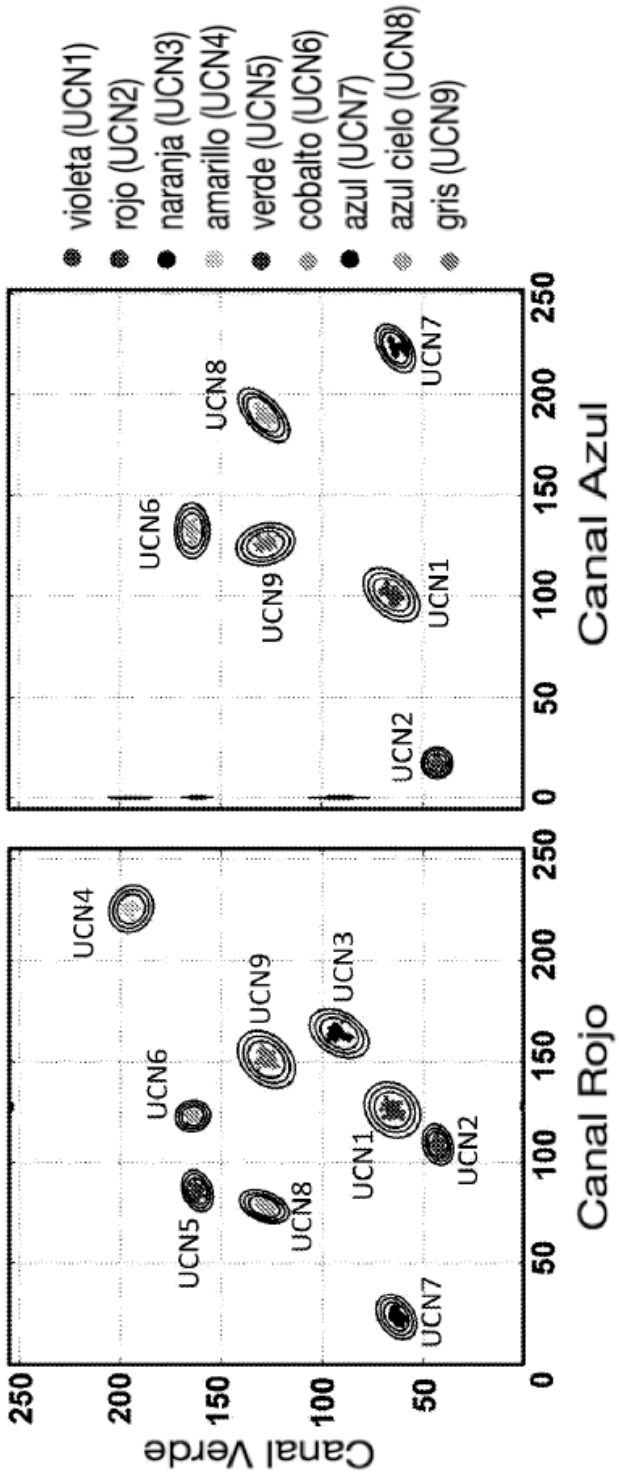

violeta (UCN1)
rojo (UCN2)
naranja (UCN3)
amarillo (UCN4)
verde (UCN5)
cobalto (UCN6)
azul (UCN7)
azul cielo (UCN8)
gris (UCN9)
Canal Verde
Canal Rojo
Canal Azul
0
50
100
150
200
250
UCN1
UCN2
UCN3
UCN4
UCN5
UCN6
UCN7
UCN8
UCN9

Fig. 24

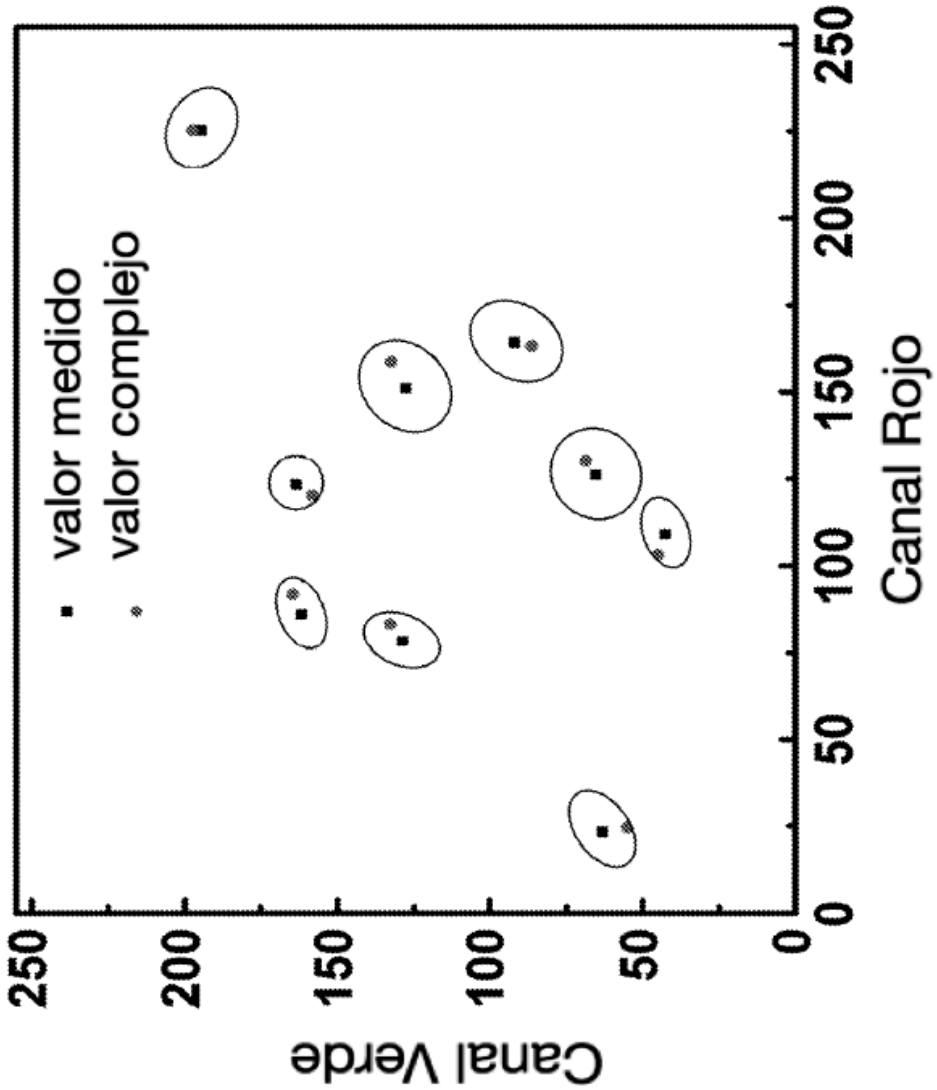

valor medido
valor complejo
Canal Verde
Canal Rojo
0
50
100
150
200
250

Fig. 25

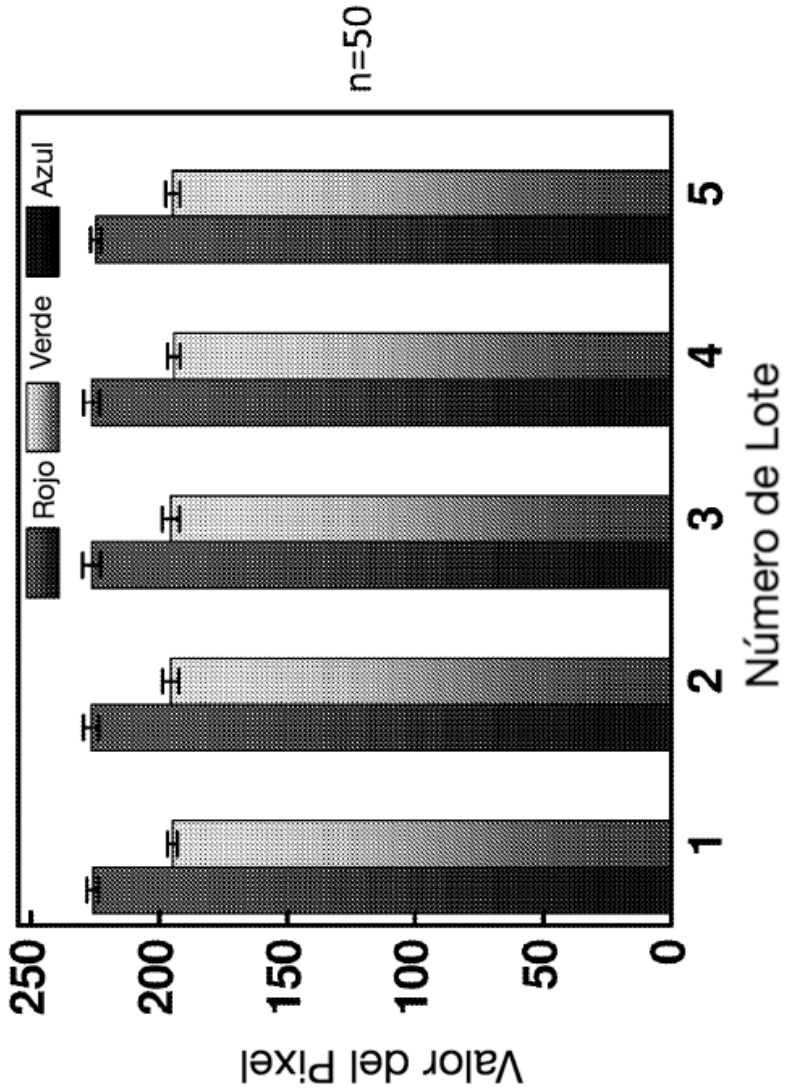

n=50
Rojo
Verde
Azul
250
200
150
100
50
0
Valor del Pixel
1
2
3
4
5
Número de Lote

Fig. 26

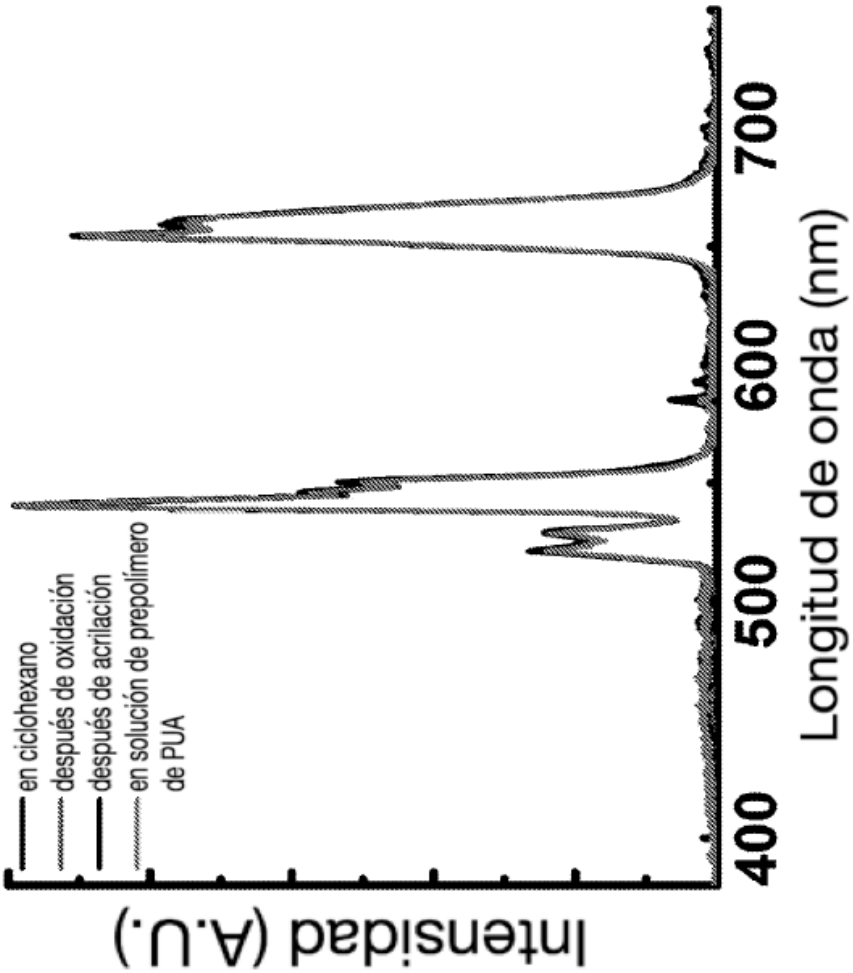

en ciclohexano
después de oxidación
después de acrilación
en solución de prepolímero de PUA
Intensidad (A.U.)
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)

Fig. 27

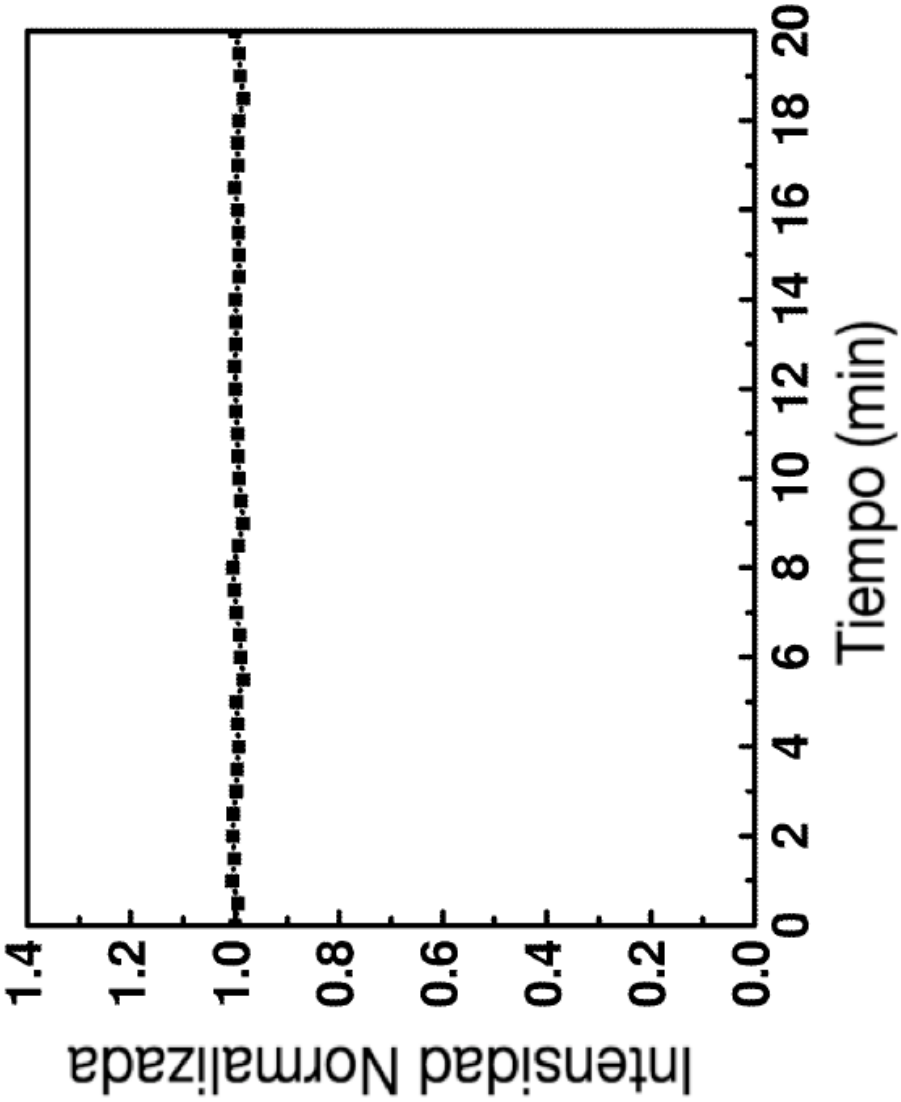

Intensidad Normalizada
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Tiempo (min)

Fig. 28

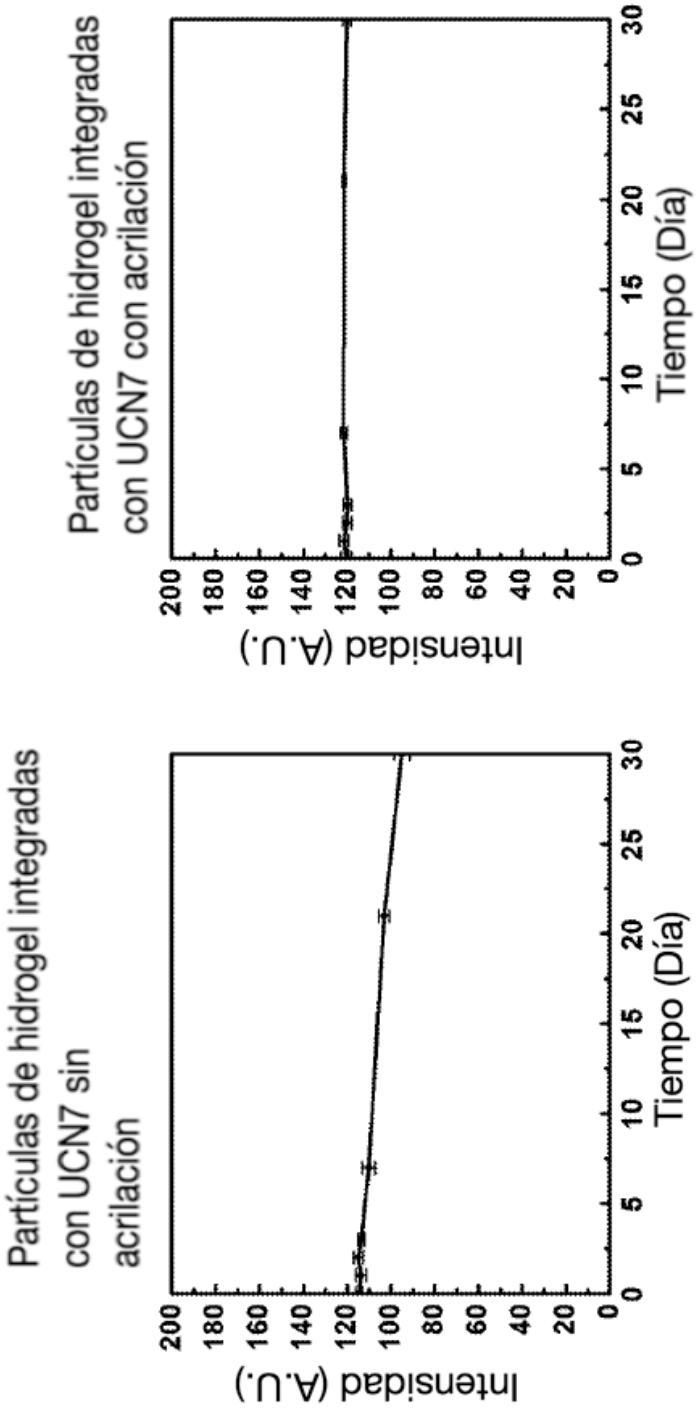

Partículas de hidrogel integradas con UCN7 sin acrilación
Intensidad (A.U.)
Tiempo (Día)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
0
5
10
15
20
25
30
Partículas de hidrogel integradas con UCN7 con acrilación
Intensidad (A.U.)
Tiempo (Día)

Fig. 29

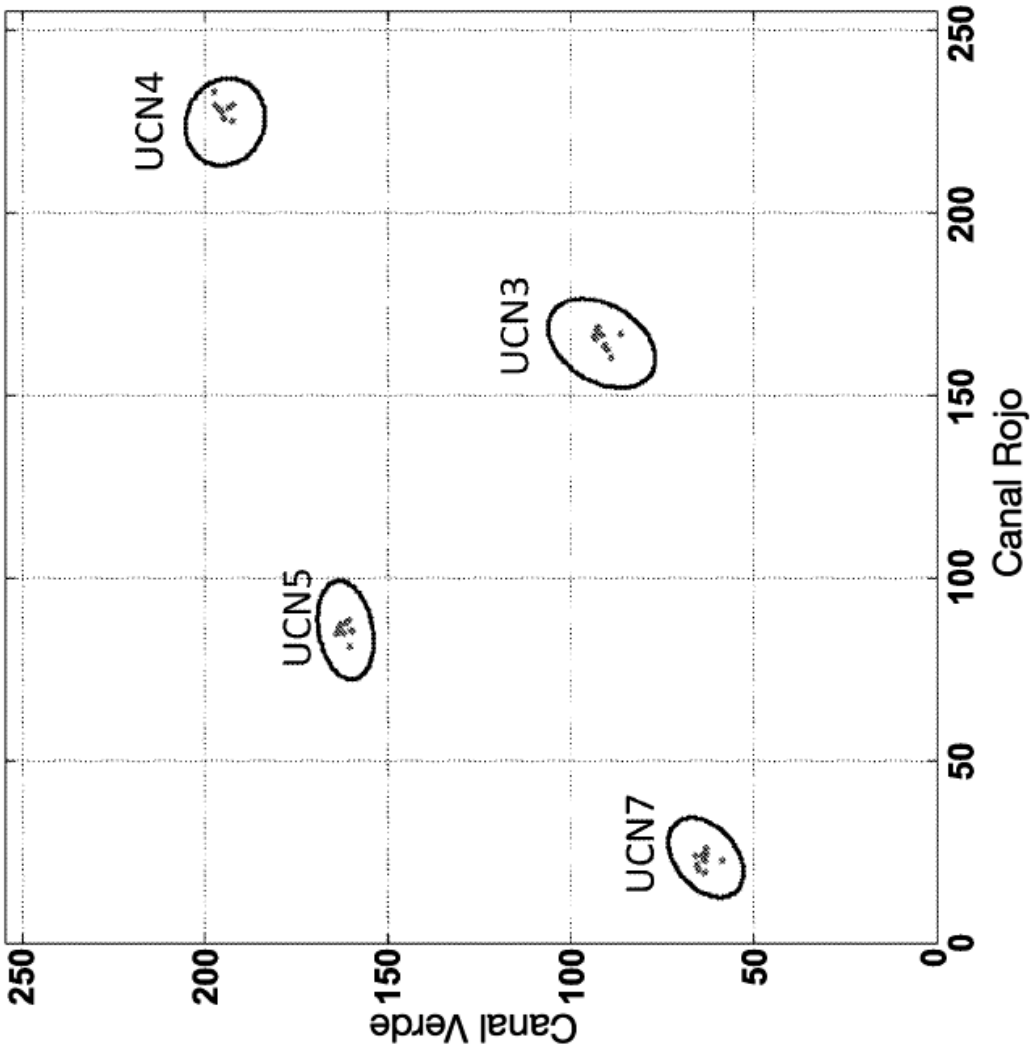

UCN4
UCN3
UCN5
UCN7
Canal Verde
Canal Rojo
0
50
100
150
200
250

Fig. 30

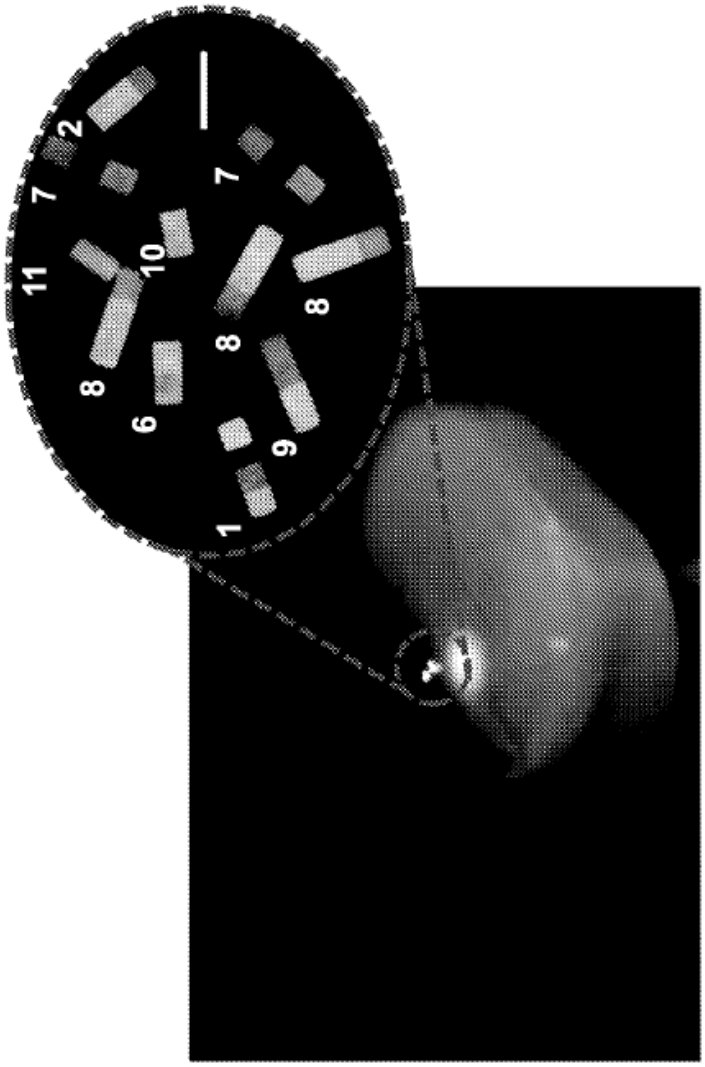


Fig. 31

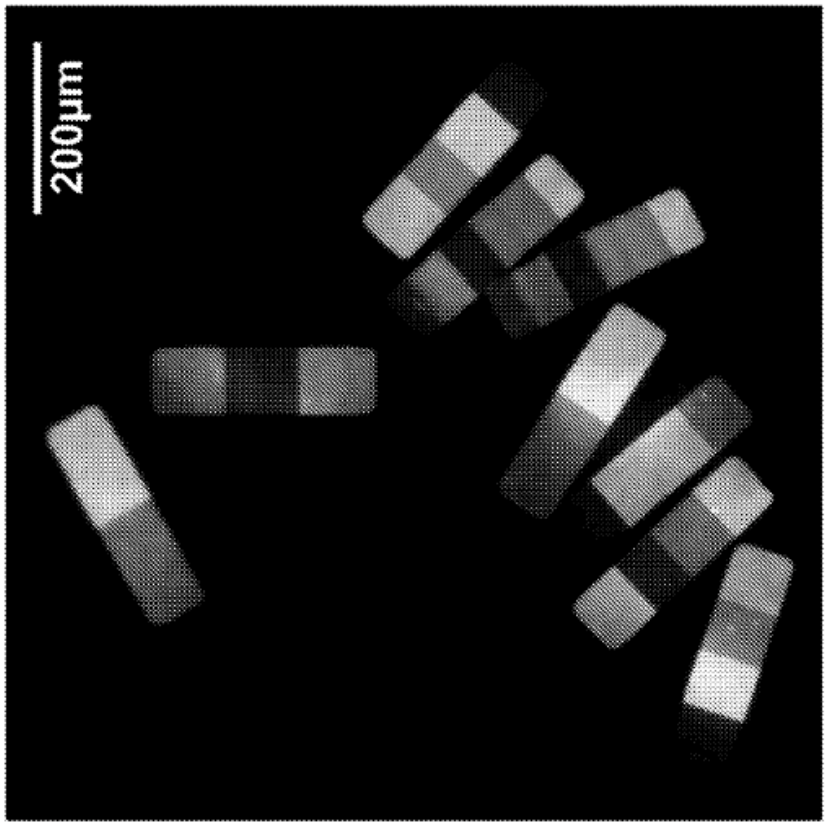


Fig. 32

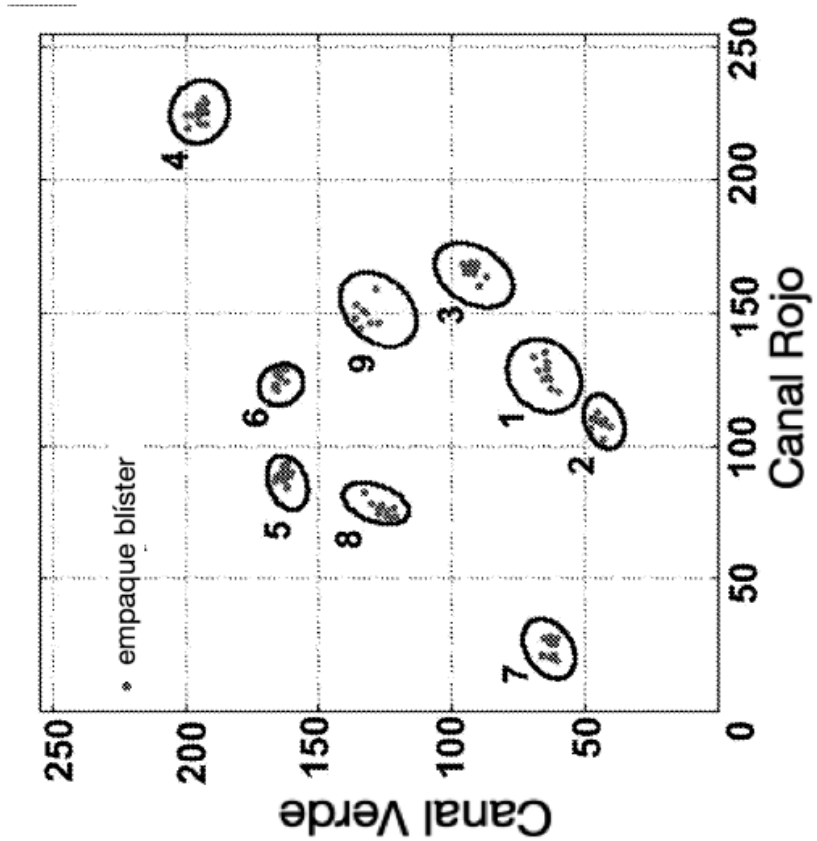

Canal Verde
250
200
150
100
50
0
50
100
150
200
250
Canal Rojo
empaque blíster
1
2
3
4
5
6
7
8
9

Fig. 33

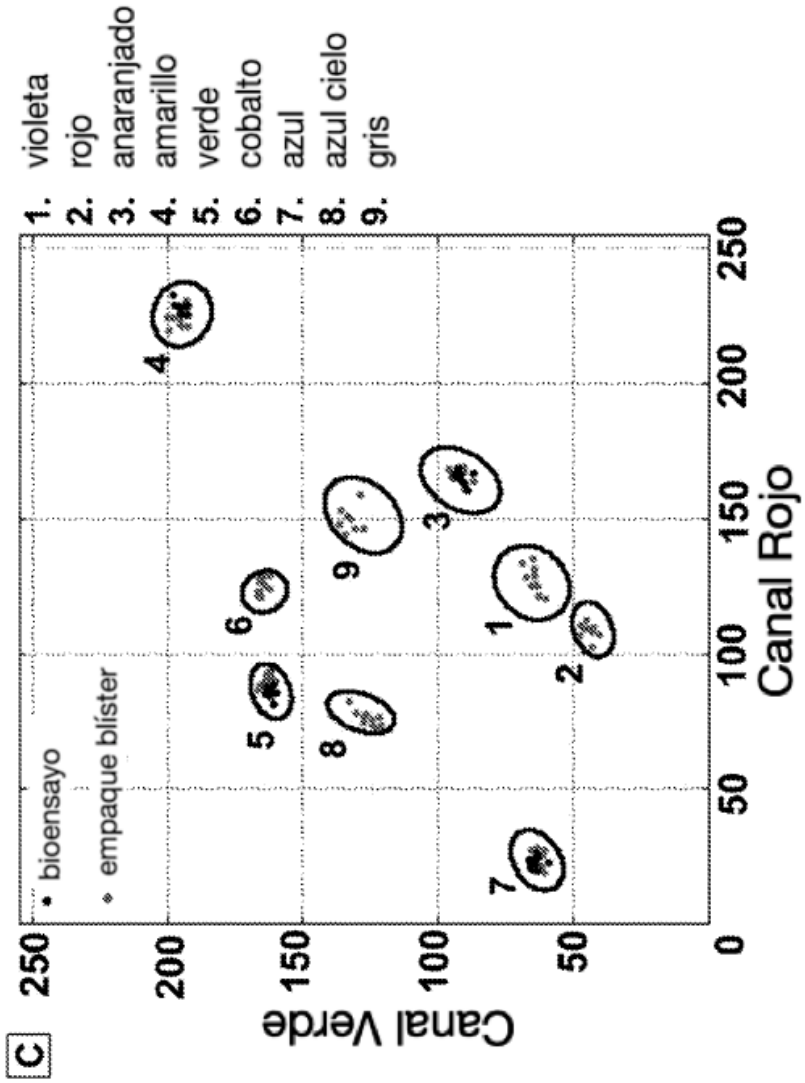

C
bioensayo
empaque blíster
Canal Verde
Canal Rojo
0
50
100
150
200
250
1. violeta
2. rojo
3. anaranjado
4. amarillo
5. verde
6. cobalto
7. azul
8. azul cielo
9. gris

Fig. 34

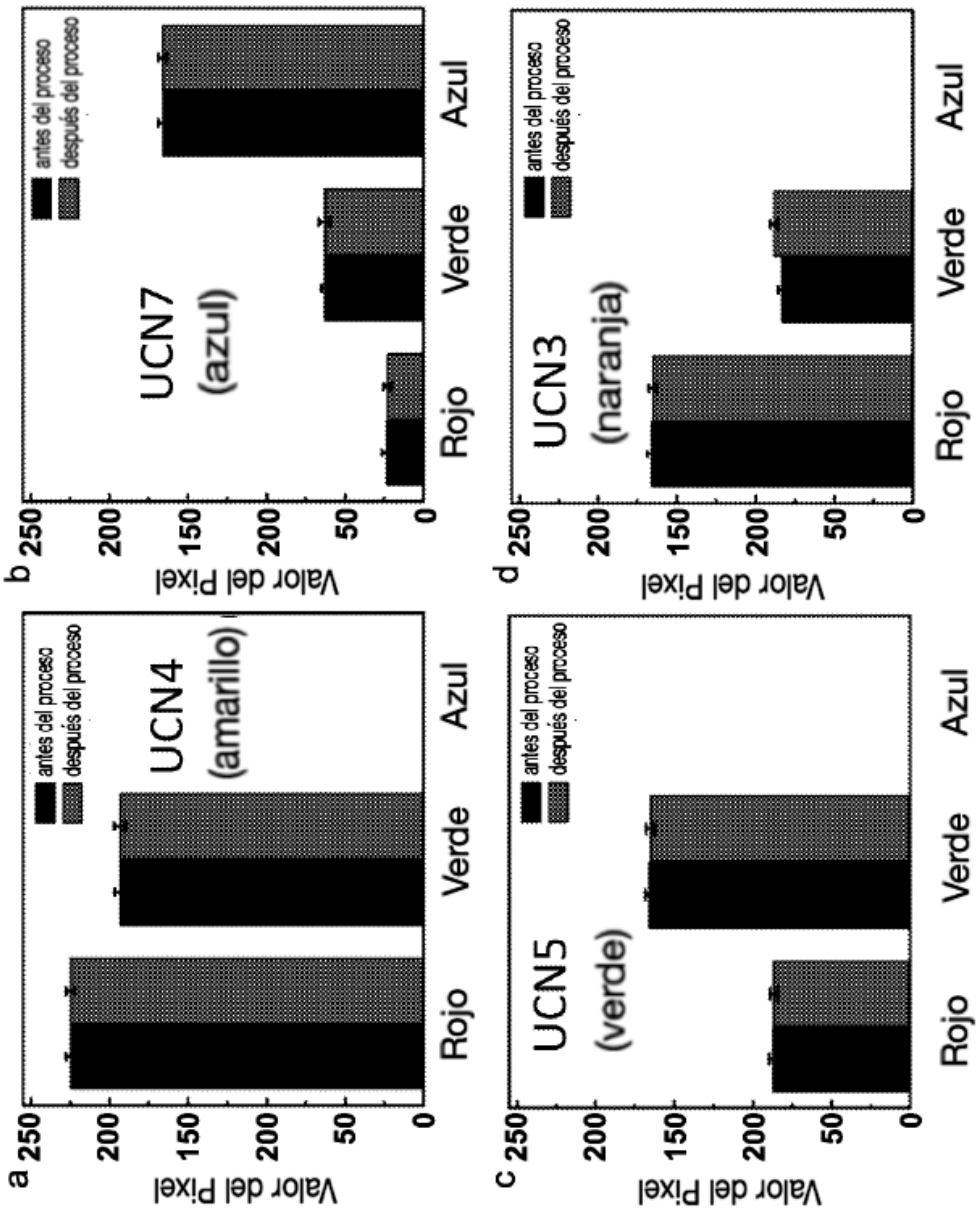

a
b
c
d
Valor del Pixel
250
200
150
200
50
0
antes del proceso
después del proceso
UCN4
(amarillo)
UCN7
(azul)
UCN5
(verde)
UCN3
(naranja)
Rojo
Verde
Azul

Fig. 36

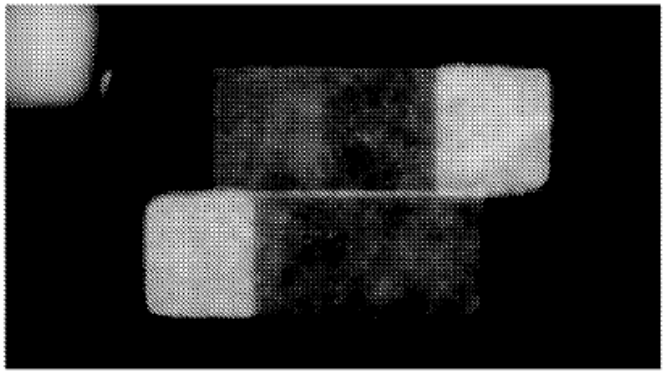


Fig. 35

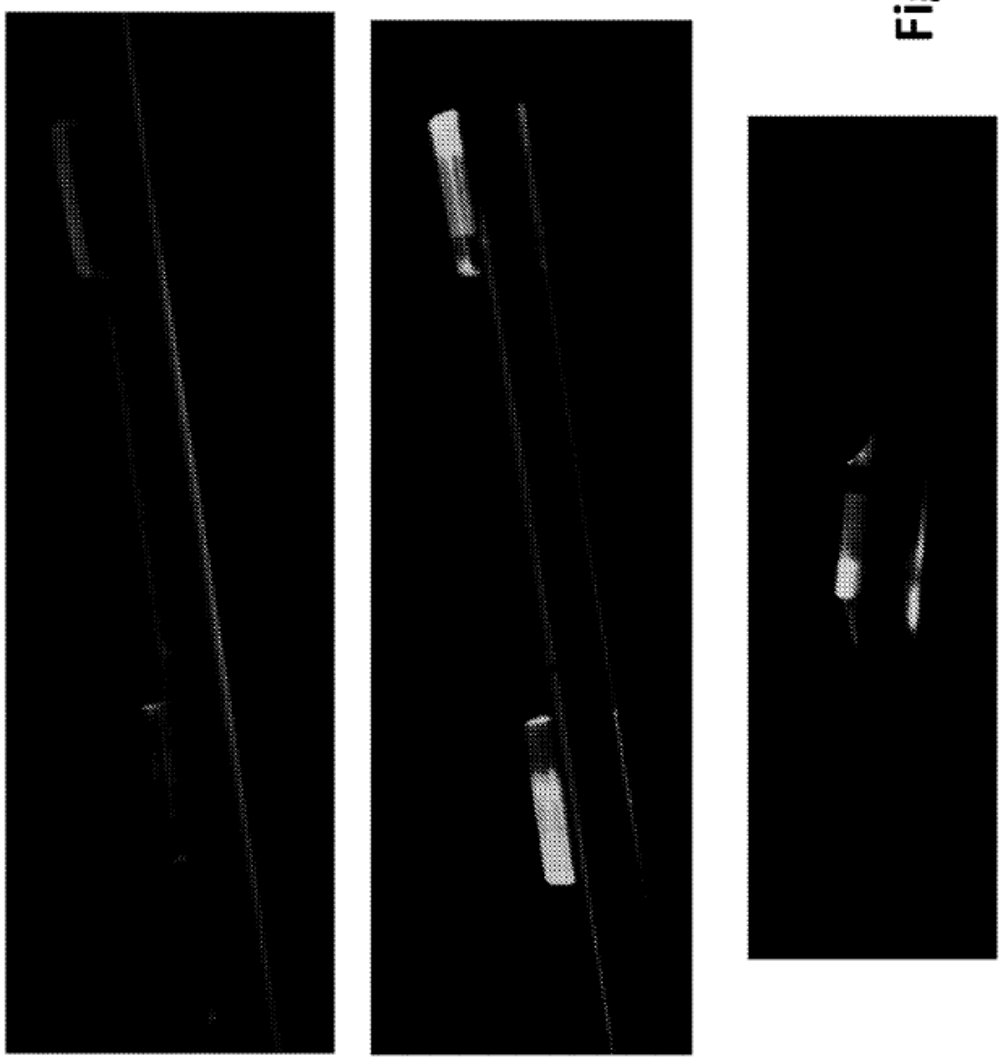


Fig. 37

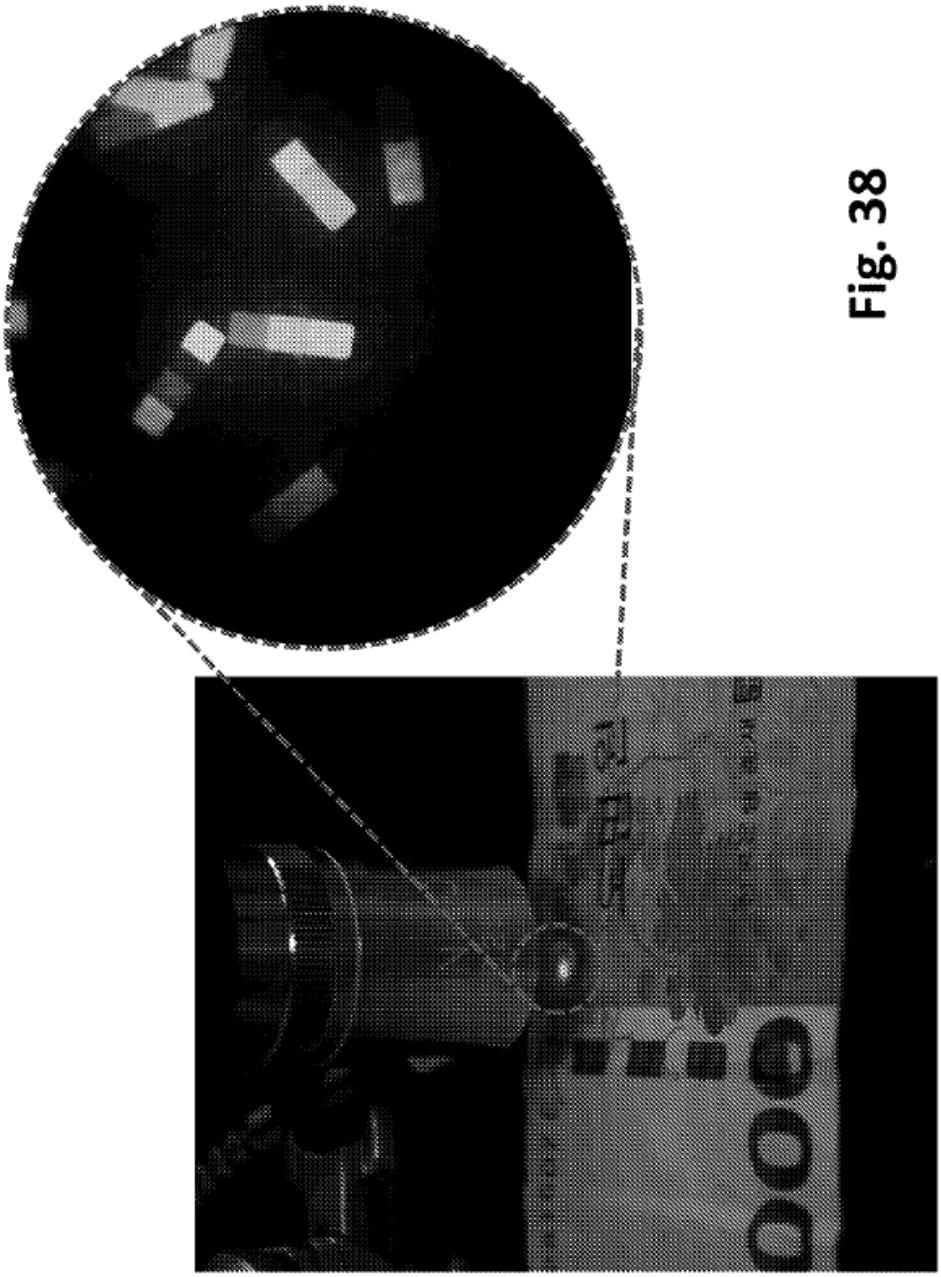
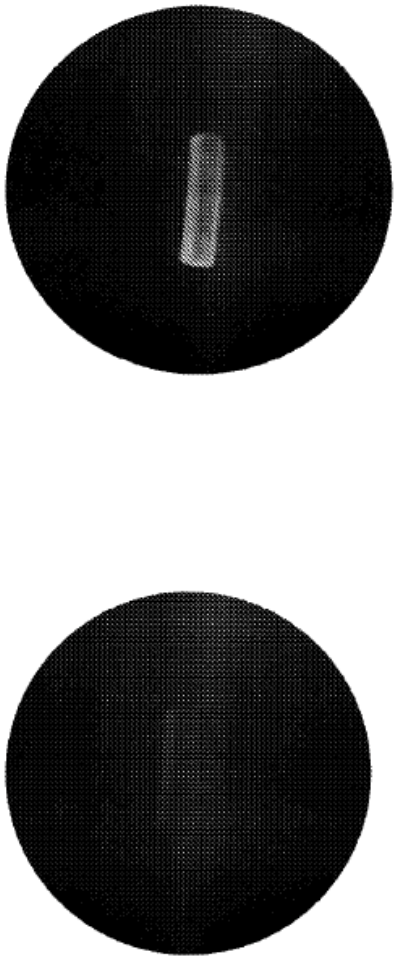


Fig. 38



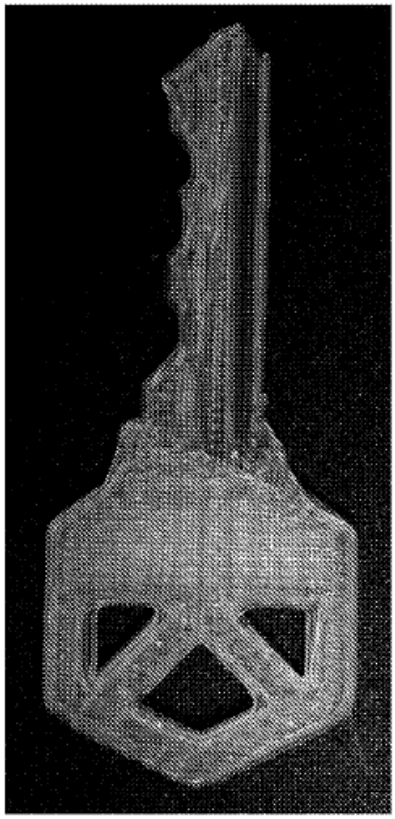


Fig. 39

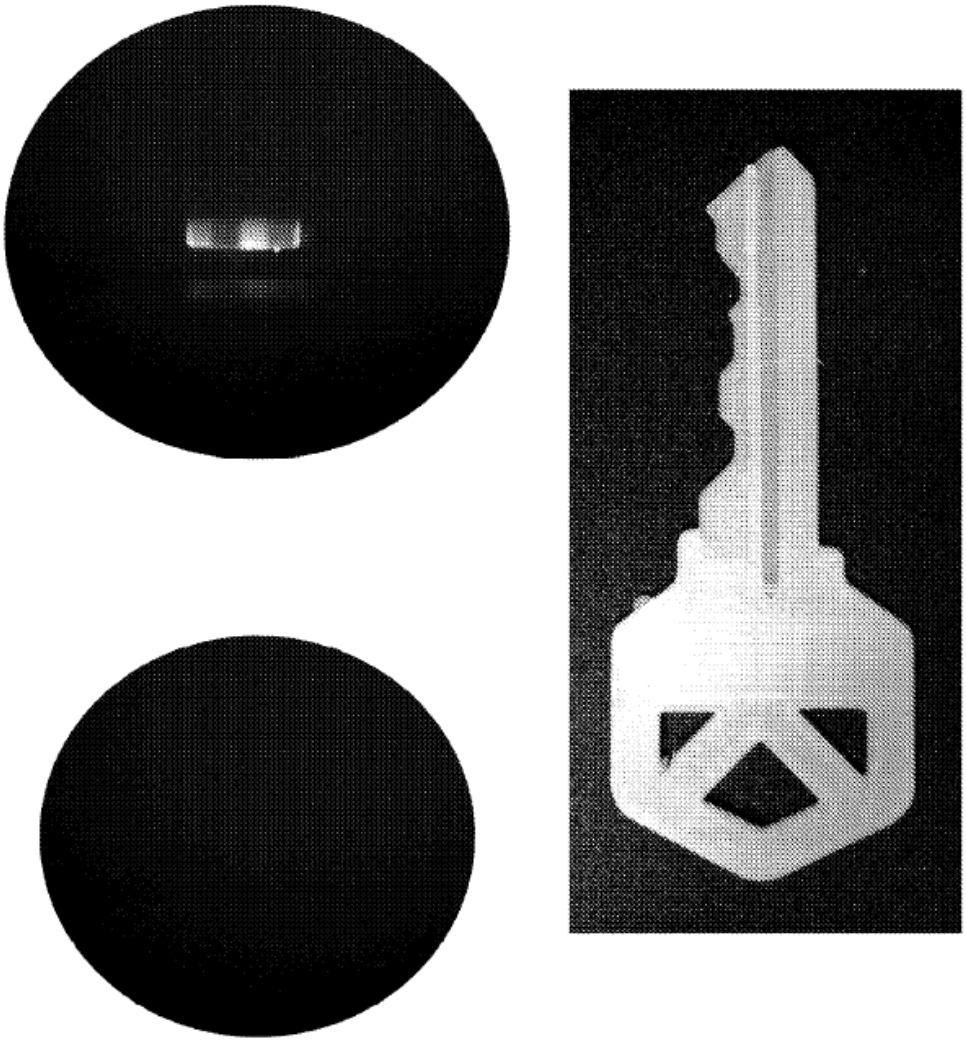


Fig. 40

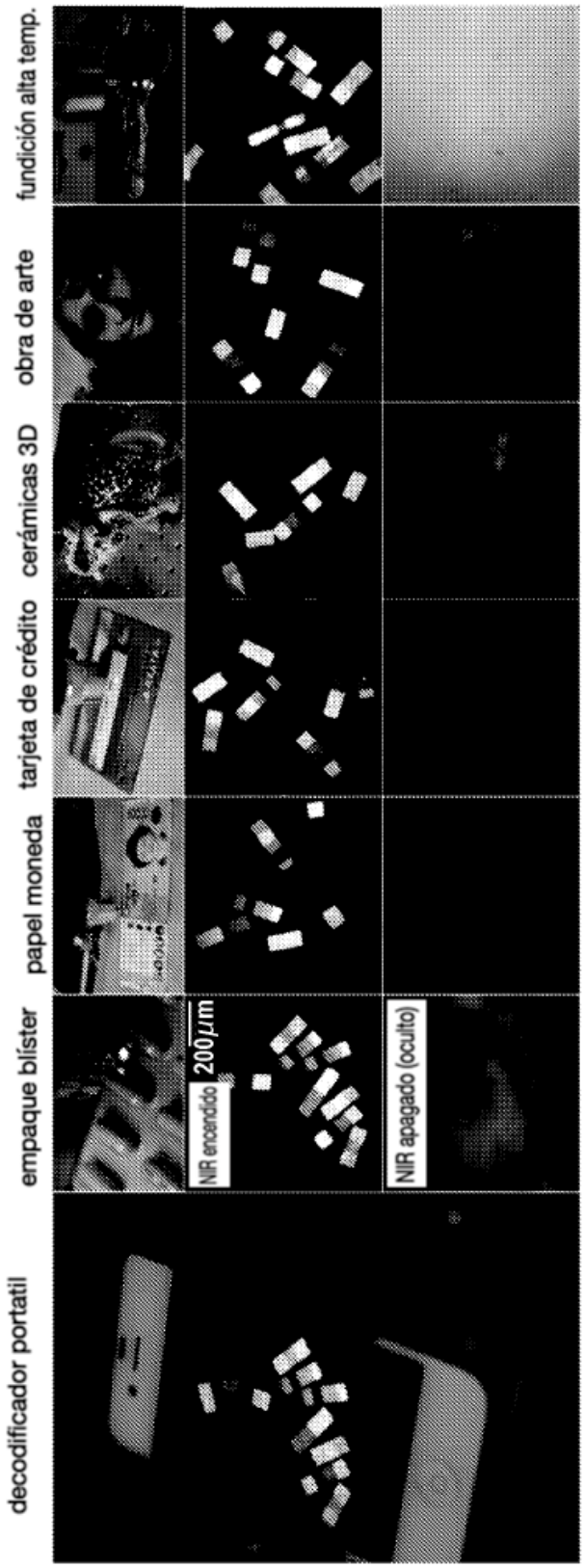

decodificador portatil
empaque blíster
papel moneda
tarjeta de crédito
cerámicas 3D
obra de arte
fundición alta temp.
NIR encendido
200μm
NIR apagado (oculto)

Fig. 41

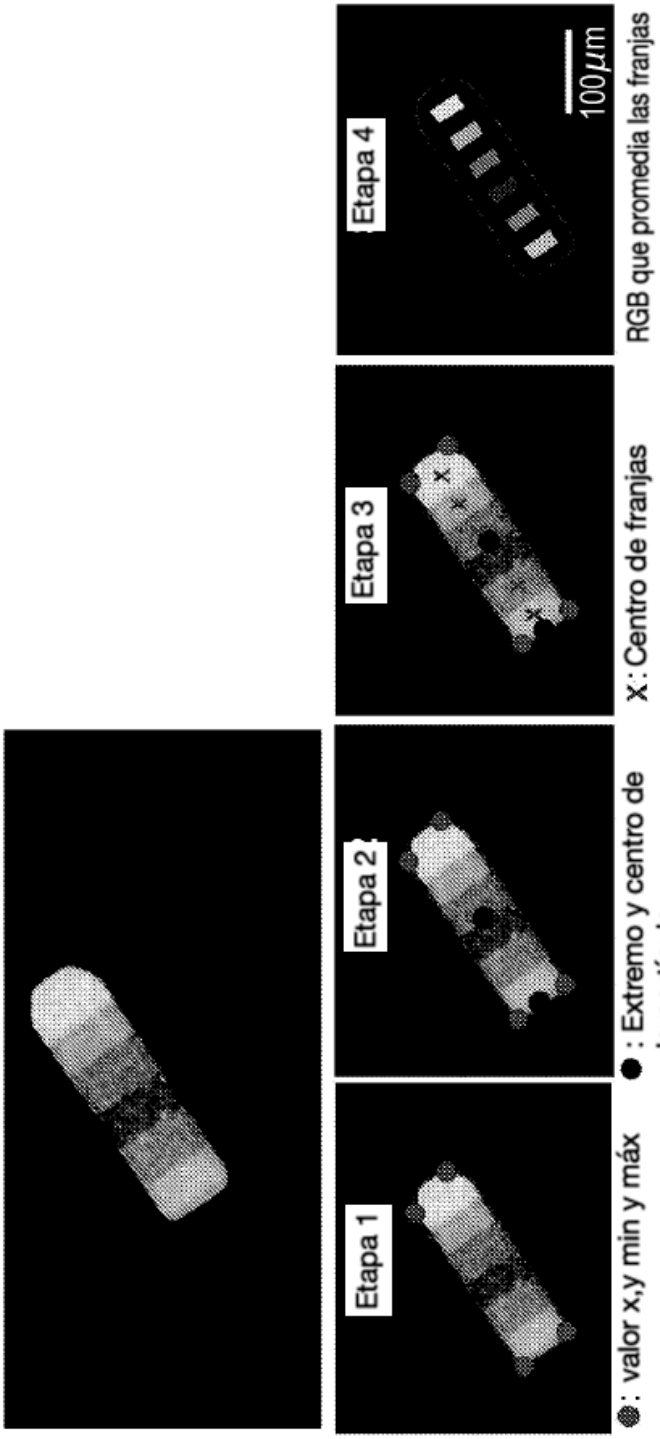

Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
Etapa 4
100μm
●: valor x,y min y máx
●: Extremo y centro de la partícula
x: Centro de franjas
RGB que promedia las franjas

Fig. 42

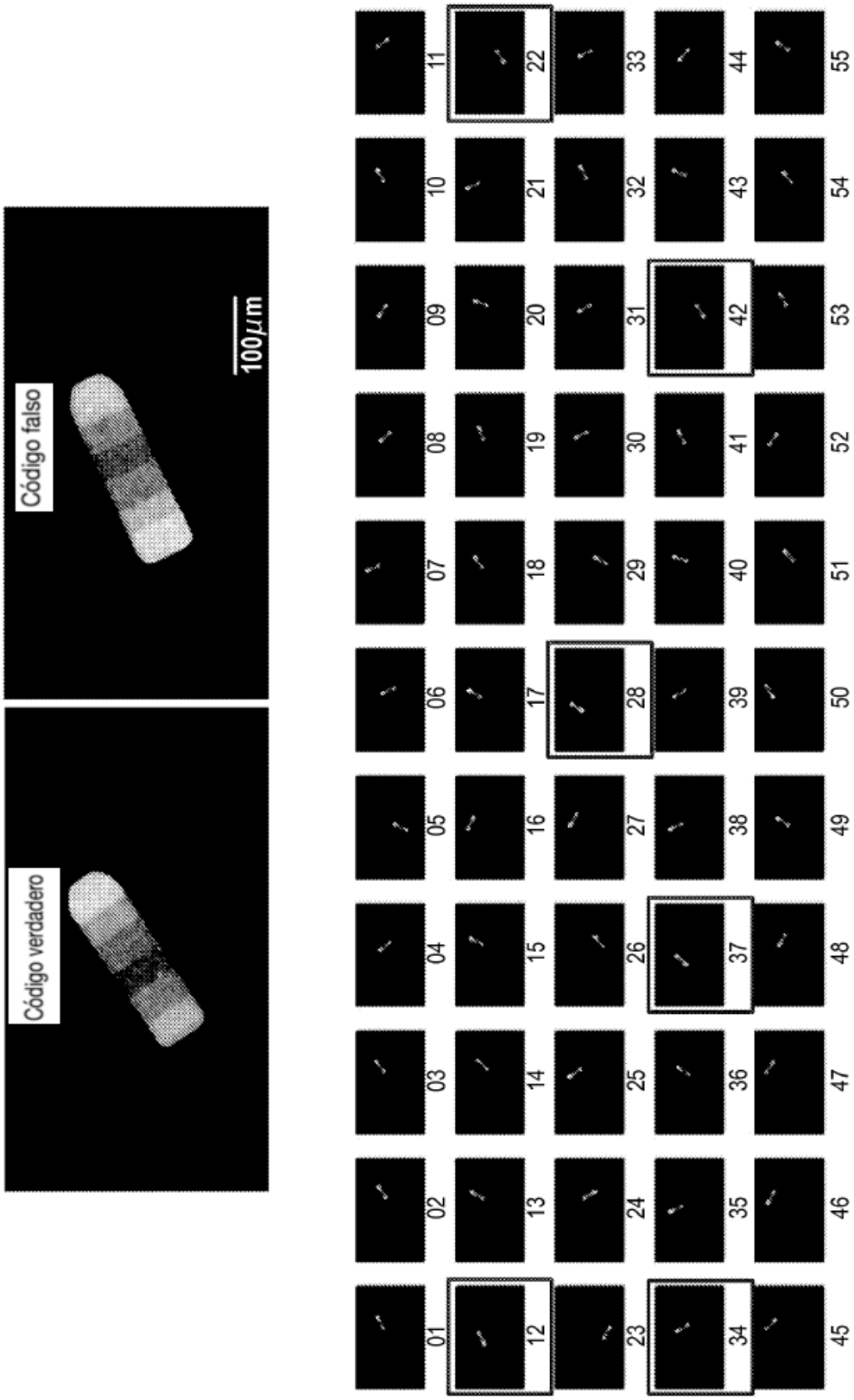

Código verdadero
Código falso
100μm
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

Fig. 43

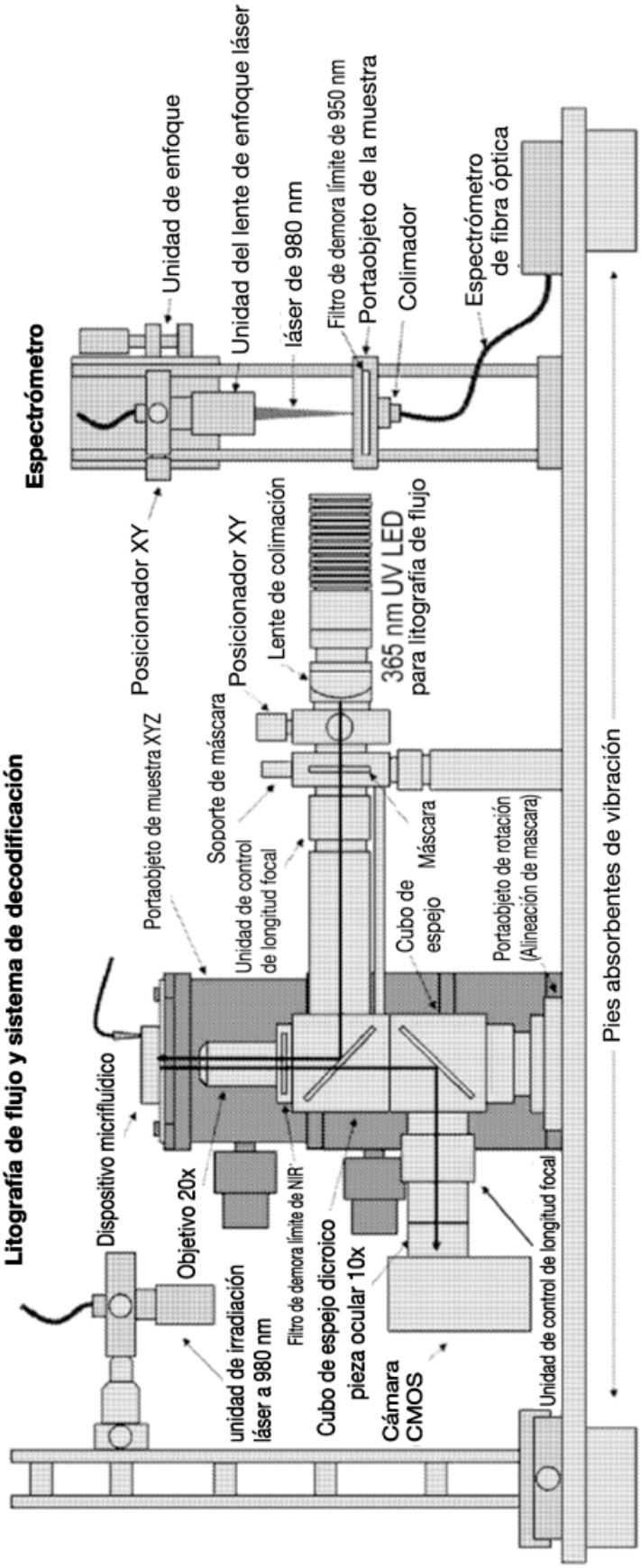

Espectrómetro
Unidad de enfoque
Unidad del lente de enfoque láser
láser de 980 nm
Filtro de demora límite de 950 nm
Portaobjeto de la muestra
Colimador
Espectrómetro de fibra óptica
Posicionador XY
Posicionador XY
Lente de colimación
365 nm UV LED para litografía de flujo
Soporte de máscara
Portaobjeto de muestra XYZ
Unidad de control de longitud focal
Máscara
Cubo de espejo
Portaobjeto de rotación (Alineación de mascara)
Pies absorbentes de vibración
Litografía de flujo y sistema de decodificación
Dispositivo microfluídico
Objetivo 20x
Filtro de demora límite de NIR
Cubo de espejo dicroico
pieza ocular 10x
Cámara CMOS
unidad de irradiación láser a 980 nm
Unidad de control de longitud focal

Fig. 44

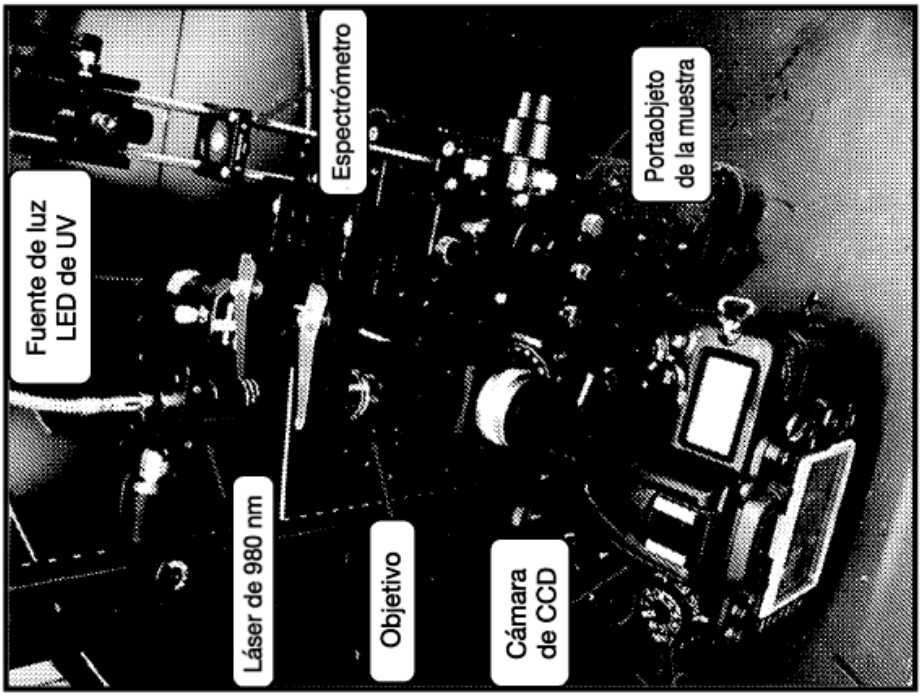

Fuente de luz
LED de UV
Láser de 980 nm
Espectrómetro
Objetivo
Cámara
de CCD
Portaobjeto
de la muestra

Fig. 45