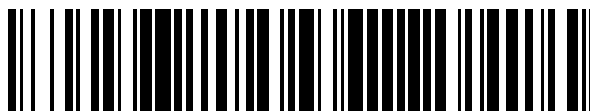


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 987**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2013 PCT/KR2013/010457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14077645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2013 E 13855838 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2905304**

54 Título: **Micropartículas de polímero codificadas**

30 Prioridad:

16.11.2012 KR 20120130096

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

01.03.2018

73 Titular/es:

**QUANTA MATRIX CO., LTD. (100.0%)
105ho, 106ho, 107ho, 108ho, 109ho, B1, Center
for medical innovation, 71, Daehak-ro, Seoul
National University Hospital, Jongno-gu
Seoul 03082, KR**

72 Inventor/es:

**KWON, SUNGHOON;
KIM, MIRA;
JANG, JISUNG;
BAE, HYUNGJONG y
KIM, NARI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 987 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

Micropartículas de polímero codificadas

Campo de la divulgación

5 La presente divulgación se refiere a micropartículas poliméricas codificadas. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a micropartículas poliméricas codificadas que tienen una estabilidad química y física superior y pueden producirse a gran escala, a un procedimiento para la producción de las micropartículas poliméricas codificadas y a un bioensayo multiplexado usando las micropartículas poliméricas codificadas.

Antecedentes

10 En los últimos años, se usan ampliamente micropartículas poliméricas codificadas para detectar bioanalitos (por ejemplo, ADN o proteínas) debido a sus procedimientos de fabricación sencillos y a sus capacidades de codificación numerosas. Sin embargo, las micropartículas poliméricas codificadas pueden dañarse fácilmente debido a la mala durabilidad física/química de los materiales poliméricos constituyentes y puede absorber analitos, provocando errores de análisis. Además, las bioconjugaciones de micropartículas poliméricas con biomateriales se limitan a unos pocos procedimientos químicos especiales y no son capaces de aplicar una química de conjugación diversa. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar micropartículas que puedan codificarse, que tengan una estabilidad química y física superior, se funcionalicen con diversos grupos funcionales y puedan producirse a gran escala.

15 El documento WO 2008/084243 A1 desvela microesferas codificadas y un procedimiento para preparar estas microesferas. Aunque el Ejemplo 4 también desvela la aplicación de un recubrimiento protector a base de nanopartículas de sílice, no existe ninguna divulgación en el documento WO 2008/084243 A1 de que el núcleo de micropartícula polimérica codificada esté conectado a la cubierta de sílice a través de enlaces Si-O-Si.

20 El documento WO 2008/084247 A1 desvela un procedimiento para la codificación de una microesfera que comprende las etapas de i) proporcionar una capa de un polímero poli iónico a la microesfera, ii) recubrir la capa con puntos cuánticos y, opcionalmente, repetir estas etapas iii) proporcionar una o más capas protectoras de un polímero poli iónico transparente y iv) proporcionar a la microesfera obtenida de este modo un sobrerrecubrimiento de un material transparente que incluye un resto capaz de reconocer una molécula diana o que se adapta, o puede adaptarse, para la fijación de una molécula capaz de reconocer una molécula diana. Además, el documento WO 2008/084247 A1 no comprende ninguna divulgación de que el núcleo de micropartícula polimérica codificada esté conectada a la cubierta de sílice a través de enlaces -Si-O-Si-.

25 El documento KR 101 101 310 B1 desvela múltiples partículas codificadas que pueden eliminarse con un procedimiento de pipeteo y auto-ensamblado dentro de un pocillo de una placa de análisis, en el que las partículas tienen códigos que son distinguibles entre sí.

Sumario

35 Una realización de la presente divulgación proporciona micropartículas poliméricas codificadas, cada una de las cuales comprende un núcleo de micropartícula polimérica codificada y una cubierta de sílice que rodea el núcleo de micropartícula, en las que el núcleo de micropartícula polimérica codificada se conecta a la cubierta de sílice a través de enlaces -Si-O-Si-. Una realización adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para la producción de micropartículas poliméricas codificadas, comprendiendo el procedimiento: mezclar un material fotocurable con un engarce que tiene un grupo funcional polimerizable con el material fotocurable y un grupo alcoxisililo; aplicar energía diseñada para curar la mezcla, seguido de la codificación para obtener núcleos de micropartículas poliméricas codificadas; y tratar los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas con un precursor de sílice para formar una cubierta de sílice en cada núcleo de micropartícula polimérica codificada, en la que los grupos alcoxisililo injertados sobre la superficie de los núcleos de micropartículas reaccionan con el precursor de sílice para formar enlaces -Si-O-Si- en las superficies de contacto entre los núcleos y las cubiertas de sílice.

Breve descripción de los dibujos

45 Las anteriores y otras realizaciones y ventajas de la divulgación se harán evidentes y se apreciarán más fácilmente a partir de la siguiente descripción de las realizaciones, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, de los cuales:

50 La FIG. 1 muestra micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

La FIG. 2 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para la producción de micropartículas poliméricas codificadas;

La FIG. 3 muestra un procedimiento para la producción de micropartículas poliméricas codificada de acuerdo con una realización de la presente divulgación;

55 La FIG. 4 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) que muestran el crecimiento de una cubierta de sílice sobre la superficie de una micropartícula de copolímero;

La FIG. 5 muestra espectros de microanálisis de sonda de electrones (MASE) de una micropartícula recubierta con sílice y de una micropartícula sin recubrir;

La FIG. 6 muestra imágenes de micropartículas poliméricas en forma de estrella que no incluyen cubiertas de

sílice y micropartículas poliméricas en forma de círculo que incluyen cubiertas de sílice;

La FIG. 7 muestra un ensayo de hibridación de ADN multiplexado usando oligonucleótidos inmovilizados sobre la superficie de una micropartícula polimérica recubierta con sílice;

5 La FIG. 8 muestra un genotipado de VPH multiplexado usando micropartículas poliméricas codificadas recubiertas con sílice; y

La FIG. 9 muestra la fabricación y la manipulación de micropartículas "magnéticas" codificadas recubiertas con sílice.

Descripción detallada

10 Se describirán ahora realizaciones de la presente divulgación en más detalle haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Estas realizaciones se proporcionan de manera que la presente divulgación transmitirá completamente el ámbito de la divulgación a los expertos en la materia. En consecuencia, la presente divulgación puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como que se limita a las realizaciones de ejemplo que se exponen en el presente documento. En los dibujos, las dimensiones de los elementos, tales como los anchos, las longitudes y los espesores, pueden estar exageradas para mayor claridad. Se entenderá que cuando un elemento se denomina como que está "sobre" otro elemento, puede estar directamente sobre el otro elemento o también pueden estar presentes uno o más elementos intermedios entre los mismos.

15 La FIG. 1 muestra micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la FIG. 1, las vistas inferiores de A, B y C muestran secciones transversales tomadas a lo largo de las líneas A-A', B-B' y C-C', respectivamente. Haciendo referencia a A de la FIG. 1, una micropartícula polimérica codificada 100 incluye un núcleo de micropartícula polimérica codificada 110 y una cubierta de sílice 120 que rodea el núcleo de micropartícula. El núcleo 110 puede estar codificado por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el núcleo de micropartícula polimérica codificada 110 puede incluir un código gráfico, fluorescente o de color.

20 El núcleo de micropartícula polimérica 110 se compone preferentemente de un polímero fotocurable que puede diseñarse de diversas maneras mediante litografía óptica. El polímero fotocurable puede contener un material acrílico curable como componente principal. Preferentemente, el polímero fotocurable contiene un material de engarce que tiene un grupo funcional fotocurable capaz de reaccionar con el material fotocurable y un grupo funcional capaz de formar sílice, además del material acrílico fotocurable.

25 El núcleo de micropartícula polimérica 110 fabricado por fotocurado puede tener diversas formas tales como formas similares a discos y esféricas. El núcleo 110 puede tener un tamaño en el intervalo de varios micrómetros a varios milímetros.

30 La micropartícula polimérica codificada 100 puede incluir adicionalmente materiales magnéticos. Específicamente, el núcleo de micropartícula 110 puede contener adicionalmente nanopartículas magnéticas 130 en el mismo (B de la FIG. 1). Como alternativa, puede interponerse una capa de nanopartículas magnéticas 130 entre el núcleo de micropartícula 110 y la cubierta de sílice 120 (C de la FIG. 1). En este caso, se requiere un campo magnético fuerte durante el control posterior de la micropartícula 100 debido a una cantidad relativamente pequeña de las nanopartículas magnéticas 130, pero no se da ninguna influencia al diseño por fotocurado porque las nanopartículas magnéticas 130 no provocan ninguna dispersión de la luz, siendo por tanto ventajosas en el diseño de microestructuras en comparación con el caso anterior. La presencia de las nanopartículas magnéticas en la micropartícula polimérica codificada 100 permite el control de la micropartícula 100 mediante un campo magnético externo. Como resultado, la micropartícula 100 puede usarse eficientemente para un intercambio de soluciones de un bioensayo posterior y la separación de la micropartícula 100 es posible, conduciendo a una alta precisión y una conveniencia mejorada del bioensayo.

35 La cubierta de sílice 120 rodea y protege el núcleo de micropartícula 110 y evita la absorción de materiales de detección externos en el polímero del núcleo de micropartícula 110 provocando errores de análisis. La cubierta de sílice 120 transmite estabilidad química y mecánica a la micropartícula polimérica codificada 100 y ayuda a usar la micropartícula 100 en una amplia diversidad de entornos y soluciones. El núcleo de micropartícula polimérica codificada 110 puede conectarse a la cubierta de sílice 120 a través de enlaces -Si-O-Si-. Los enlaces químicos fuertes entre el núcleo 110 y la cubierta 120 pueden asegurar una estructura estable de la micropartícula 100. La presencia de la cubierta de sílice 120 reduce la unión de materiales inespecíficos a la superficie de la micropartícula polimérica 100 y asegura propiedades de unión mejoradas con biomateriales. Pueden introducirse grupos funcionales tales como grupos carboxilo o amina sobre la superficie de la cubierta de sílice 120. Los grupos funcionales pueden formar enlaces covalentes con diferentes biomoléculas para diversas aplicaciones biomédicas o diagnósticos clínicos. Por ejemplo, puede introducirse un biomaterial seleccionado entre el grupo que consiste en 40 antígenos, anticuerpos, ADN, ARN y oligonucleótidos sobre la superficie de la cubierta de sílice 120.

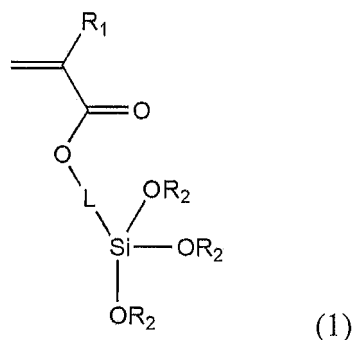
45 Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con la realización de la presente divulgación puede producirse mediante el siguiente procedimiento. La FIG. 2 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para la producción de las micropartículas poliméricas codificadas. Haciendo referencia a la figura. 2, en la etapa S1, un material fotocurable se mezcla con un engarce que tiene un grupo funcional polimerizable con el material

fotocurable y un grupo alcoxisililo.

El material fotocurable se cura por aplicación de energía posterior para fabricar un esqueleto básico de las micropartículas. Los ejemplos de materiales fotocurables adecuados incluyen triacrilato de trimetilolpropano etoxilado, metacrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de metilo, acrilamida, alil amina, óxido de polietileno, diacrilato de polietilenglicol, diacrilato de polipropilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y poliacrilato. Estos materiales fotocurables pueden usarse solos o en combinación de los mismos. Por ejemplo, el diacrilato de polietilenglicol como material fotocurable puede reticularse en un hidrogel tridimensional a través de polimerización por radicales libres debido a la presencia de grupos acrilato en ambos extremos del polietilenglicol. El material fotocurable puede ser cualquier material que pueda cambiarse de un líquido a un sólido mediante luz externa.

El engarce reacciona con el material fotocurable para formar un copolímero como un esqueleto de las micropartículas y, al mismo tiempo, permite que se injerten grupos alcoxisililo sobre la superficie de núcleos de micropartículas codificadas. Si las micropartículas se componen del material fotocurable solo, las cubiertas de sílice no son fáciles de formar a través del recubrimiento con sílice posterior. Por el contrario, cuando la mezcla del material fotocurable y el engarce se cura para obtener núcleos de micropartículas en la etapa posterior del procedimiento de acuerdo con la realización de la presente divulgación, se injertan grupos alcoxisililo sobre la superficie de los núcleos de micropartículas y, después de ello, pueden aplicarse como recubrimiento cubiertas de sílice sobre los núcleos de micropartículas a través de los grupos alcoxisililo.

Por ejemplo, el engarce puede ser un compuesto representado por la Fórmula 1:



en la que R_1 es hidrógeno, metilo o etilo, cada R_2 es alquilo lineal o ramificado C_1-C_8 y L es alquileo C_1-C_{12} , arileno o cualquier combinación de los mismos. Específicamente, el engarce de Fórmula 1 puede ser acrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSPA).

La mezcla puede incluir adicionalmente un iniciador. El iniciador puede inducir la polimerización por radicales libres de la mezcla mediante una fuente de energía externa. El iniciador puede ser un compuesto a base de azo o un peróxido. La mezcla puede incluir adicionalmente un agente de reticulación apropiado. Los ejemplos de dichos agentes de reticulación incluyen N,N' -metilenbisacrilamida, metilenbismetacrilamida y dimetacrilato de etilenglicol.

Si es necesario, el procedimiento puede incluir adicionalmente la adición de nanopartículas magnéticas a la mezcla para controlar las micropartículas poliméricas codificadas. Como resultado, las nanopartículas magnéticas pueden introducirse en los núcleos de micropartículas poliméricas.

En la etapa S2, se aplica energía diseñada para curar la mezcla, seguida de la codificación para la obtención de núcleos de micropartículas poliméricas codificadas. La energía diseñada no está limitada y puede ser, por ejemplo, luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja o haz de electrones. Por ejemplo, la luz ultravioleta como energía diseñada puede irradiarse a través de una máscara física o un dispositivo de microespejos digital (DMD).

La codificación puede realizarse mediante diversos procedimientos. En una realización, los núcleos de micropartículas pueden codificarse, por ejemplo, mediante la realización de un procedimiento de litografía óptica para el diseño de códigos gráficos. Los códigos gráficos pueden tener la forma (por ejemplo, forma de estrella o de círculo) de las micropartículas y pueden ser códigos binarios grabados sobre las micropartículas. La codificación de los códigos gráficos puede realizarse mediante la aplicación del polímero fotocurable a la producción de las partículas y el diseño de las partículas mediante un procedimiento de litografía óptica, como se ha descrito anteriormente.

Las micropartículas pueden diseñarse mediante diversos procedimientos de litografía conocidos en la técnica, por ejemplo, la litografía optofluídica, que se describe en la Patente Coreana N.º 1004769, y una combinación de litografía de flujo y polimerización, que se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 7.709.544. Por ejemplo, los núcleos de micropartículas pueden codificarse mediante marcadores de diseño que representan '1' y '0' en el polímero fotocurable. Los marcadores se distinguen entre sí dependiendo del grado de fotocurado. Por ejemplo, puede emplearse un dispositivo de microespejos digital sin usar ninguna máscara para la litografía óptica. En este caso, pueden formarse ventajosamente sobre las partículas que incluyen la sustancia diana diversos tipos de

códigos, por ejemplo, tantos como un millón de tipos de códigos.

En una realización adicional, la codificación de los núcleos de micropartículas puede conseguirse mediante la incorporación de materiales fluorescentes con diversos colores distinguibles entre sí en los núcleos de micropartículas. Pueden aplicarse diversas técnicas conocidas para la incorporación de materiales fluorescentes en los núcleos de micropartículas.

En otra realización, puede usarse una tinta magnética para formar códigos de color sobre los núcleos de micropartículas. Por ejemplo, un procedimiento para la formación de códigos de color usando una tinta magnética se desvela en la Solicitud de Patente Coreana N.º 10-2010-0029613. De acuerdo con este procedimiento, se aplica un campo magnético externo a un material fotocurable que incluye nanopartículas magnéticas para alinear las nanopartículas magnéticas en el material fotocurable, y se aplica luz externa para el curado del material fotocurable. En respuesta a la intensidad del campo magnético externo, la matriz de las nanopartículas magnéticas se varía para emitir diferentes colores. Mediante la aplicación de dichas técnicas, las nanopartículas magnéticas pueden disponerse de manera que se distingan entre sí en los núcleos de micropartículas compuestas del polímero fotocurable, de modo que puedan formarse códigos de color sobre los núcleos de micropartículas.

En una realización, el procedimiento puede incluir además la fijación de las nanopartículas magnéticas recubiertas con un polímero hidrófilo a los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas para el control de las micropartículas poliméricas codificadas.

A continuación, en la etapa S3, los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas se tratan con un precursor de sílice para formar una cubierta de sílice sobre cada núcleo de micropartícula polimérica codificada, completando la producción de las micropartículas poliméricas codificadas. La formación de cubiertas de sílice puede realizarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, a través de un procedimiento de Stöber modificado.

En primer lugar, las micropartículas injertadas con grupos alcoxisililo se añaden a una solución de agua destilada, etanol y NH_4OH . A continuación, se inyecta tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor de sílice en la solución para la reacción con los grupos alcoxisililo injertados sobre la superficie de los núcleos de micropartículas. Como resultado de la reacción, se forman cubiertas de sílice y enlaces $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ en las superficies de contacto núcleo-cubierta.

Las micropartículas poliméricas son flexibles, blandas y fáciles de fabricar con diversas estructuras y formas, pero también pueden dañarse fácilmente, ya sea mecánica o químicamente. Además, las moléculas pequeñas pueden absorberse en la matriz polimérica provocando errores de detección. Por el contrario, los materiales inorgánicos, tales como sílice o titania, normalmente son mucho más duros que los polímeros orgánicos y tienen una buena estabilidad química, pero también son frágiles y difíciles de producir con diversas estructuras. Por tanto, las células de sílice de recubrimiento sobre microestructuras poliméricas podrían producir una combinación de sus propiedades beneficiosas, dando como resultado micropartículas duras, resistentes, químicamente estables y duraderas que aún son fáciles de producir con diversas formas.

Las micropartículas poliméricas codificadas recubiertas con sílice pueden aplicarse a bioensayos multiplexados. En los enfoques actuales para bioensayos multiplexados, se usan micropartículas poliméricas codificadas para analizar biomoléculas tales como ADN o proteínas. Estos enfoques son muy potentes y versátiles, puesto que permiten códigos casi ilimitados y un análisis de alto rendimiento. La superficie de las cubiertas de sílice puede modificarse para introducir grupos carboxilo o amina en las mismas. Esta modificación de la superficie permite la aplicación de las micropartículas poliméricas codificadas a bioensayos multiplexados. Dichos grupos funcionales pueden formar enlaces covalentes con diversos biomateriales. El procedimiento puede incluir adicionalmente biomateriales de unión a la superficie de las cubiertas de sílice.

La FIG. 3 muestra un procedimiento para la producción de micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con una realización de la presente divulgación. Haciendo referencia a la FIG. 3, se fabrican micropartículas poliméricas que tienen códigos gráficos mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se mezclan triacrilato de trimetilpropano etoxilado (ETPTA) como material fotocurable, acrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (TMSPA) como engarce y 2-hidroxi-2-metilpropiofenona como fotoiniciador, en una relación apropiada de 10:1:1 para preparar una mezcla fotocurable. El grupo acrilato del TMSPA puede participar en la reacción de fotocurado de la matriz de acrilato. Además, el TMSPA sirve como una semilla para el recubrimiento con sílice posterior porque tiene un grupo silano con centro de silicio que puede formar sílice. Puede irradiarse luz UV diseñada sobre la mezcla mediante diversos procedimientos de litografía conocidos en la técnica, incluyendo la litografía sin máscara optoflúidica que se muestra en la FIG. 3, para fabricar micropartículas de copolímero que contienen alcoxisilano que tienen códigos gráficos. De acuerdo con la litografía sin máscara optoflúidica (LSMOF), las materias primas se introducen a través de canales microfluídicos y se aplica energía diseñada para inducir la fotopolimerización in situ de las materias primas. Como resultado de la fotopolimerización, pueden producirse continuamente partículas que flotan libremente. Además, el procedimiento sin máscara usando un dispositivo de microespejos digital (DMD) permite la producción de partículas codificadas con diversas formas de una manera simple, en comparación con otros procedimientos de litografía usando máscaras.

El recubrimiento de sílice sobre las micropartículas de copolímero se realiza a través de un procedimiento de Stöber modificado para formar cubiertas de sílice. Este procedimiento de recubrimiento simple es muy rápido, lo que permite el recubrimiento directo y eficiente con sílice sobre micropartículas que contiene un grupo silano. Además, el procedimiento permite que se produzcan millones de micropartículas recubiertas con sílice en una sola etapa. El espesor de las cubiertas de sílice puede controlarse de varios cientos de nanómetros a varios micrómetros mediante la variación de la velocidad de reacción o la concentración del precursor de sílice. Las cubiertas de sílice resultantes de las micropartículas pueden funcionalizarse con distintos grupos funcionales a través de una química de superficie de sílice bien establecida.

La FIG. 4 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) que muestran el crecimiento de una cubierta de sílice sobre la superficie de la micropartícula de copolímero. Haciendo referencia a la FIG. 4, la cobertura de la sílice varía dependiendo del grado de recubrimiento. Inicialmente, las nanopartículas de sílice semilla se forman sobre la superficie de la micropartícula de copolímero. Después, las nanopartículas semilla comienzan a coalescer, hasta que puede observarse la formación completa de una cubierta de sílice continua sobre la superficie del copolímero. La cubierta de sílice completa se muestra en (D) de la FIG. 4. El recuadro muestra que el espesor de la capa de sílice es de aproximadamente 150 nm.

La FIG. 5 muestra espectros de microanálisis de sonda de electrones (MA-SE) de una micropartícula recubierta con sílice y una micropartícula sin recubrir. Haciendo referencia a la FIG. 5, la micropartícula polimérica sin recubrir se generó usando ETPTA y un fotoiniciador sin TMSPA como material semilla. En el espectro de MASE de la micropartícula sin recubrir, se detectaron picos fuertes de C y picos débiles de S, lo que indica la presencia de un polímero orgánico desnudo. Se detectó un pico de Pt porque las partículas se recubrieron con Pt mediante bombardeo iónico. Se confirmó que la cubierta de sílice pura se crea sobre la micropartícula polimérica como se muestra en los espectros de la parte inferior de la FIG. 5. Se detectaron tres picos, los de Si, O y C, siendo la señal de O mucho más fuerte que la de C como se esperaba a partir de la presencia de sílice (SiO_2). La profundidad de penetración de haz del MASE fue de 1 μm . Por tanto, se detectó la señal de C, puesto que el espesor de la cubierta de sílice estaba por debajo de 1 μm .

La FIG. 6 muestra imágenes de micropartículas poliméricas en forma de estrella que no incluyen cubierta de sílice y micropartículas poliméricas en forma de círculo que incluyen cubiertas de sílice.

Se usó solución acuosa 0,1 M de rodamina B (fluorescencia roja) se utilizó para someter a ensayo la resistencia química de las partículas recubiertas con sílice. La FIG. 6A muestra la absorción de las moléculas de colorante dentro de micropartículas poliméricas sin recubrir (en forma de estrella) y recubiertas con sílice (en forma de estrella). Como se muestra claramente en las imágenes fluorescentes, la solución acuosa de rodamina se absorbe bien en el hidrogel de polímero que constituye las micropartículas. Es bien sabido que los hidrogeles de polímero absorben fácilmente soluciones líquidas sin ningún tratamiento químico o físico. Sin embargo, la cubierta de sílice formada sobre la superficie de la micropartícula en forma de círculo inhibe la absorción de la solución acuosa de rodamina en el hidrogel de polímero. Por tanto, el uso de las micropartículas recubiertas con sílice para bioensayos puede proporcionar resultados fiables y precisos, puesto que la absorción de biomateriales tales como antígenos u oligonucleótidos que provocan errores de análisis en la matriz de polímero puede prevenirse. La ausencia de señales fluorescentes de las imágenes de las partículas recubiertas también muestra que no hay absorción detectable del colorante sobre la superficie de sílice, debido a la capacidad de unión no específica baja de la sílice.

También se examinaron los comportamientos de hinchamiento o de encogimiento de las micropartículas recubiertas con sílice y sin recubrir mediante la colocación de las partículas en agua y en aire. En general, los hidrogeles poliméricos se hinchan en agua, puesto que absorben grandes cantidades de agua. Después de la evaporación del agua, las micropartículas sin recubrir se encogieron considerablemente, mientras que las micropartículas recubiertas con sílice mantuvieron su estructura y volumen en condición seca, como se muestra en B de la FIG. 6.

Con el fin de investigar la estabilidad química de las micropartículas recubiertas con sílice y sin recubrir, las micropartículas se sumergieron en una solución acuosa de ácido acético 1 M con agitación. Después de 24 horas, las partículas recubiertas con sílice permanecieron estables, mientras que las partículas sin recubrir se dañaron gravemente en la solución de ácido como se muestra en C de la FIG. 6. En general, los hidrogeles de polímero son sensibles a parámetros externos tales como el pH y la temperatura. Por el contrario, los materiales de sílice normalmente son mucho más duros que los polímeros orgánicos y tienen una buena estabilidad química. Por tanto, esta micropartícula recubierta con sílice robusta está menos limitada a la introducción de grupos funcionales, puesto que puede soportar diversas reacciones químicas incluso en disolventes orgánicos o en condición seca.

La funcionalización de la superficie de la micropartícula polimérica recubierta con sílice proporciona grupos funcionales específicos que pueden fijarse covalentemente a biomateriales con una alta estabilidad y una propiedad de unión no específica baja.

La FIG. 7 muestra un ensayo de hibridación de ADN multiplexado usando oligonucleótidos inmovilizados sobre la superficie de la micropartícula polimérica recubierta con sílice. Haciendo referencia a la FIG. 7, la micropartícula recubierta con sílice reacciona fácilmente con aminas primarias usando 3-aminopropiltriétoxilano (APTES) a través de condensación de grupos hidroxilo terminales. Las aminas se hacen reaccionar posteriormente con ácido

succínico, dando como resultado una superficie carboxilada capaz de reaccionar con grupos amino sobre los ADN. Se usan ADN terminados en amino en 5' para inmovilizar los ADN sobre la superficie de sílice carboxilada. Se forma un enlace amida entre el grupo carboxílico de la superficie de la sílice y un grupo amino de un ADN terminado en amino mediante un procedimiento de reticulación usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS).

Las micropartículas poliméricas codificadas ofrecen beneficios útiles para bioensayos multiplexados. Para aclarar las ventajas de las micropartículas, se demostró un genotipado de virus de papiloma humano (VPH) 10-plex *in vitro* usando las micropartículas recubiertas con sílice. Se prepararon genes de VPH diana con el procedimiento de PCR de 2 etapas. La FIG. 8 muestra un genotipado del VPH multiplexado usando las micropartículas poliméricas codificadas recubiertas con sílice. La FIG. 8A muestra esquemáticamente la PCR de amplificación y marcado. Después de la PCR de amplificación, la PCR de marcado se realiza para marcar secuencias de genes de VPH complementarias a sondas usando dCTP fijado a biotina. La FIG. 8B muestra esquemáticamente el genotipado de VPH 10-plexado usando micropartículas fijadas a sondas. Se acoplan 10 tipos de sondas de oligonucleótidos específicas de tipo de VPH, a la superficie de sílice de las micropartículas. Cada uno de los genes de VPH diana es complementario a una de las diferentes sondas. Los códigos gráficos que son agujeros sin polimerizar en las estructuras de las micropartículas indican la identidad de tipos de sonda sobre la superficie de sílice de las micropartículas. La capacidad de multiplexación de las partículas podría aumentarse fácilmente mediante la modificación de los códigos gráficos. Después del ensayo de hibridación con la secuencia de VPH diana, se introducen estreptavidinas marcadas con colorante fluorescente para obtener señales fluorescentes.

Cuando se incorporan materiales magnéticos dentro de las micropartículas, el uso de un campo magnético permite la separación fácil de los contenidos deseados de una solución de vehículo. La FIG. 9 muestra la fabricación y la manipulación de las micropartículas "magnéticas" codificadas recubiertas con sílice. La FIG. 9A muestra etapas de fabricación para la micropartícula magnética recubierta con sílice. La FIG. 9B muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (MEB-EC) de las micropartículas magnéticas antes (B1) y después (B2) del procedimiento de recubrimiento con sílice. Las micropartículas magnéticas se obtienen mediante la fijación de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con poli(ácido acrílico) (PAA) sobre la superficie de micropartículas injertadas con silano. Por ejemplo, las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con PAA pueden tener un tamaño de 80 ± 10 nm.

La FIG. 9C muestra un procedimiento de intercambio de soluciones a través de la separación magnética de los vehículos. Mediante la aplicación de un campo magnético externo a una solución, una mezcla que contiene partículas magnéticas recubiertas con sílice, así como las biomoléculas unidas a esas partículas magnéticas recubiertas con sílice, puede clasificarse selectivamente de la mezcla de solución.

La FIG. 9D muestra imágenes de microscopía óptica que muestran la manipulación magnética de la partícula magnética. La micropartícula magnética de flotación libre se mueve fácilmente en la dirección del campo magnético externo aplicado. Por tanto, la manipulación magnética de las micropartículas magnéticas de flotación libre es útil para bioensayos que implican un intercambio de soluciones. Además, la separación magnética facilita el lavado y la concentración de la diana aislada que se ha unido a partículas.

Como es evidente a partir de lo anterior, en el procedimiento de acuerdo con la realización de la presente divulgación, un material fotocurable se mezcla con un engarce que tiene un grupo funcional polimerizable polimerizable con el material fotocurable y un grupo alcoxisililo para obtener núcleos de micropartículas poliméricas codificadas, y se sumergen los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas en una solución de precursor de sílice para la producción de millones de micropartículas poliméricas codificadas. De acuerdo con el procedimiento, el recubrimiento con sílice puede realizarse en una sola etapa mediante un procedimiento simple. La incorporación de nanopartículas magnéticas dentro de las micropartículas poliméricas facilita la manipulación de las partículas para bioensayos. La presencia de cubiertas de sílice en las micropartículas codificadas de acuerdo con la realización de la presente divulgación asegura una buena estabilidad química y física y previene la absorción de biomoléculas externas, permitiendo un análisis preciso. Por tanto, las micropartículas poliméricas codificadas pueden ser útiles en diversas aplicaciones, incluyendo diagnósticos basados en ADN y proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Micropartículas poliméricas codificadas, cada una de las cuales comprende un núcleo de micropartícula polimérica codificada y una cubierta de sílice que rodea el núcleo de la micropartícula, en las que el núcleo de micropartícula polimérica codificada está conectado a la cubierta de sílice a través de enlaces -Si-O-Si-.
- 5 2. Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con la reivindicación 1, en las que el polímero es un polímero fotocurable.
3. Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con la reivindicación 1, en las que el núcleo de las micropartículas comprende adicionalmente materiales magnéticos.
- 10 4. Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con la reivindicación 1, en las que una capa de nanopartículas magnéticas se interpone entre el núcleo de la micropartícula y la cubierta de sílice.
5. Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con la reivindicación 1, en las se introducen grupos carboxilo o amina sobre la superficie de la cubierta de sílice.
- 15 6. Las micropartículas poliméricas codificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que se introduce un biomaterial seleccionado entre el grupo que consiste en antígenos, anticuerpos, ADN, ARN y oligonucleótidos sobre la superficie de la cubierta de sílice.
7. Un procedimiento de producción de micropartículas poliméricas codificadas, comprendiendo el procedimiento:
 - mezclar un material fotocurable con un engarce que tiene un grupo funcional polimerizable con el material fotocurable y un grupo alcoxisililo;
 - 20 aplicar energía diseñada para curar la mezcla, seguido de la codificación para obtener núcleos de micropartículas poliméricas codificadas; y
 - tratar los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas con un precursor de sílice para formar una cubierta de sílice sobre cada núcleo de micropartícula polimérica codificada, en el que los grupos alcoxisililo injertados sobre la superficie de los núcleos de micropartículas reaccionan con el precursor de sílice para formar enlaces -Si-O-Si- en las superficies de contacto entre los núcleos y las cubiertas de sílice.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas se obtienen mediante litografía sin máscara optofluídica.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la adición de nanopartículas magnéticas a la mezcla.
- 30 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la fijación de nanopartículas magnéticas recubiertas con un polímero hidrófilo a los núcleos de micropartículas poliméricas codificadas.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la superficie de las cubiertas de sílice se modifica para introducir grupos carboxilo o amina en la misma.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende adicionalmente unir biomateriales a la superficie de las cubiertas de sílice.

35

FIG. 1

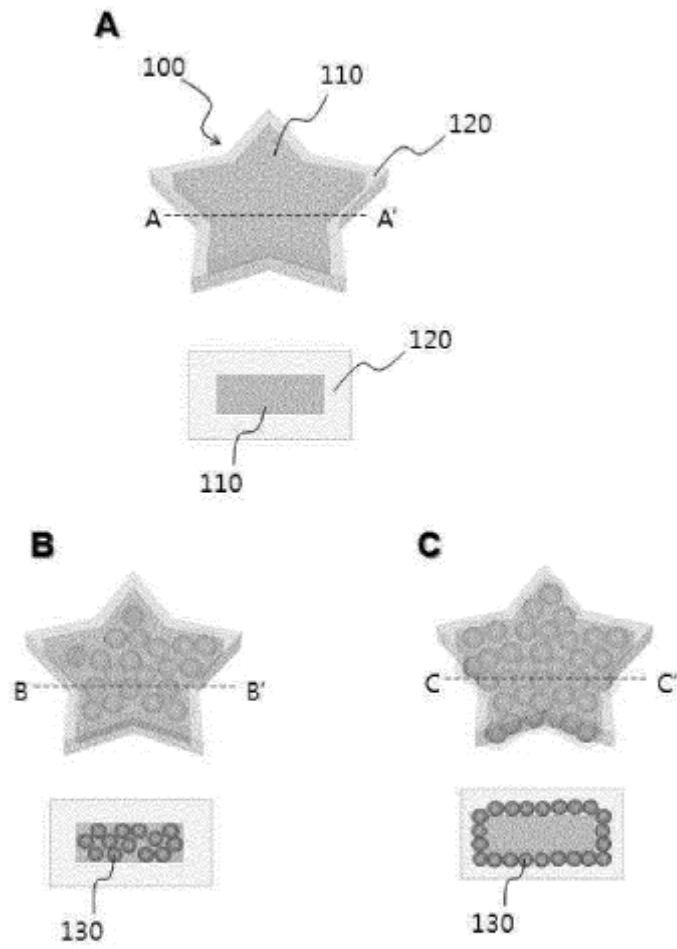


FIG. 2

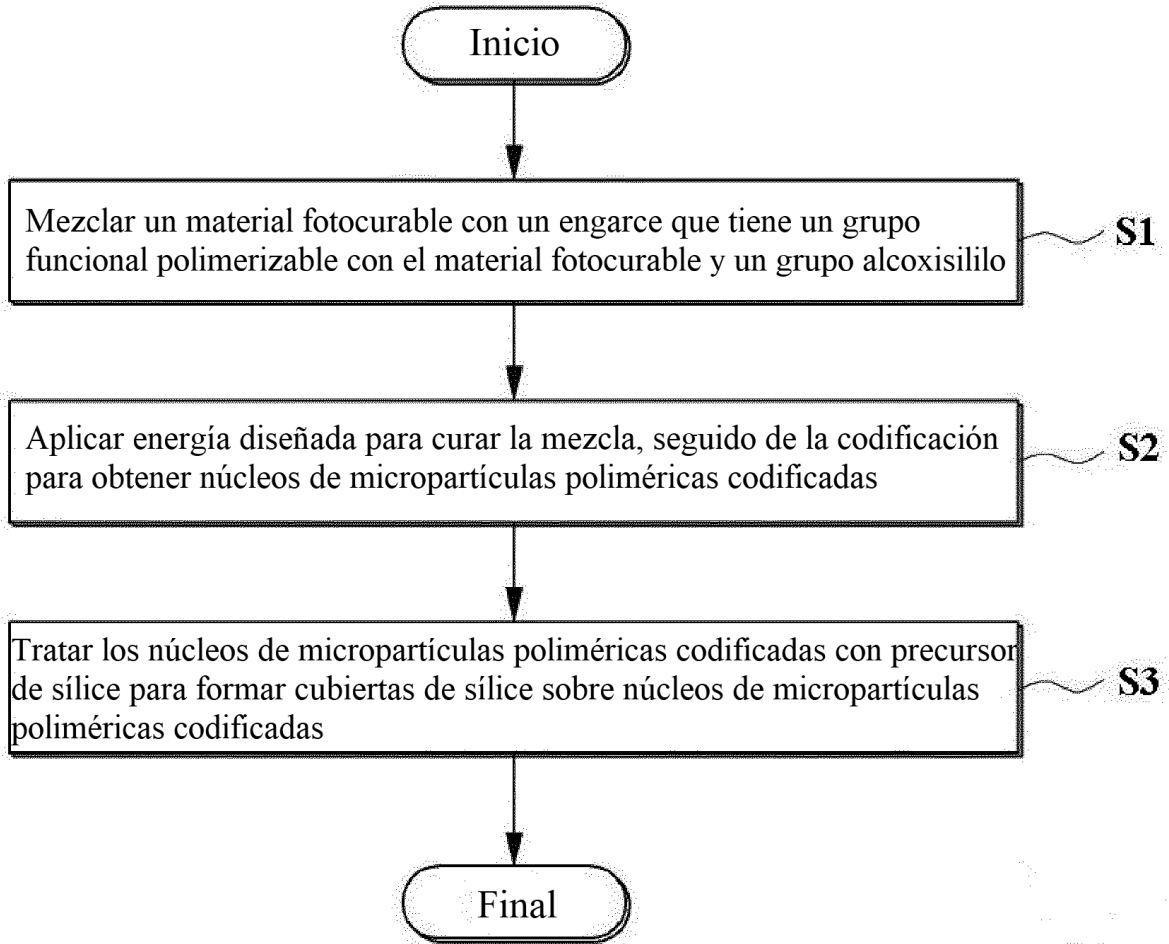


FIG. 3

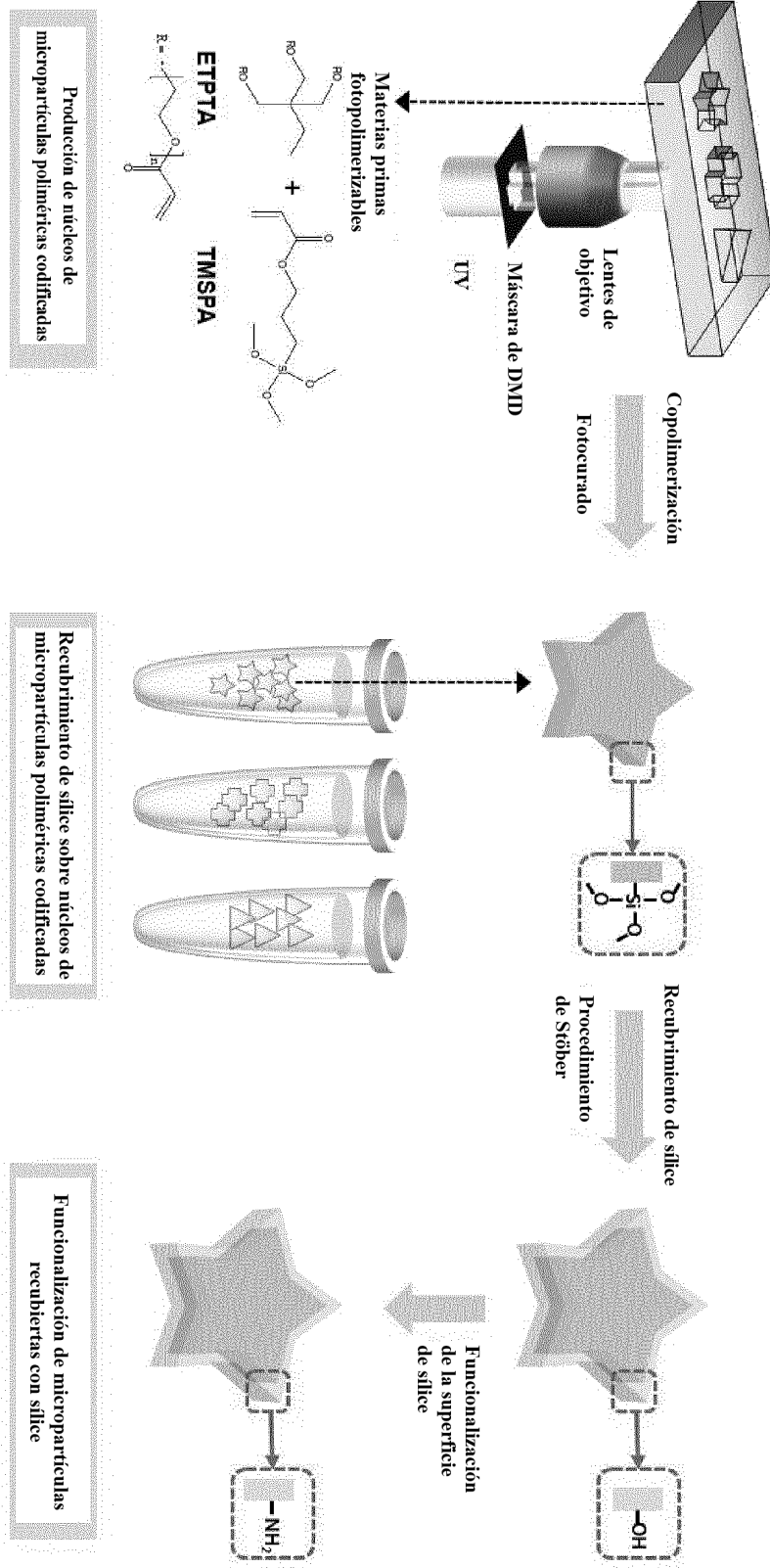
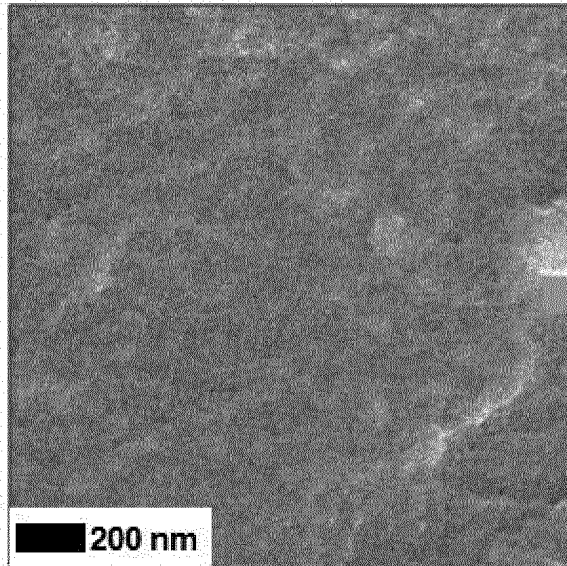
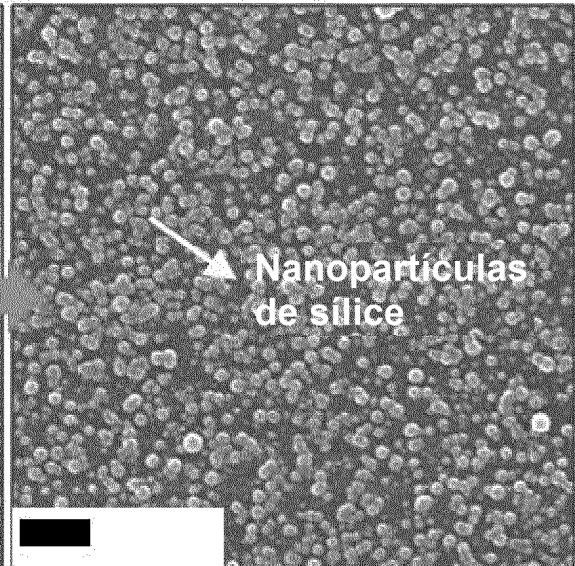


FIG. 4

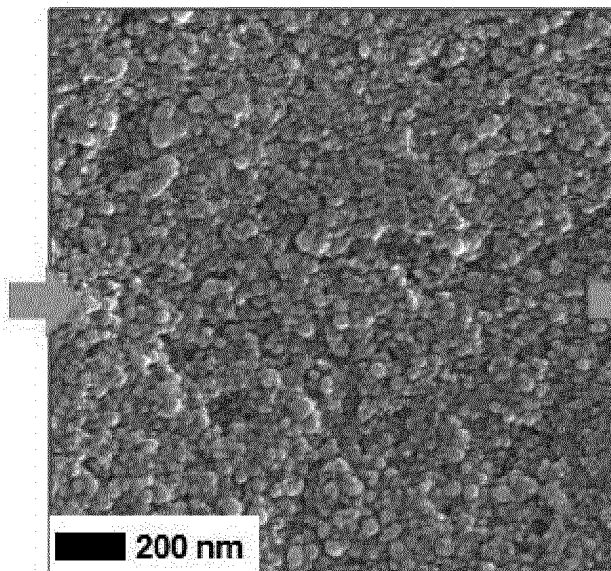
(A) Superficie de polímero



(B) Formación de partículas de sílice sobre superficie de polímero



(C) Coalescencia de partículas de sílice



(D) Terminación de cubierta de sílice

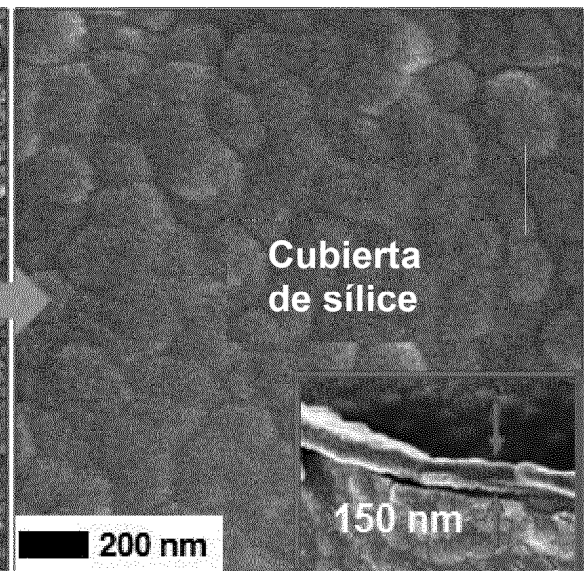
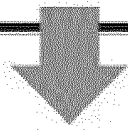
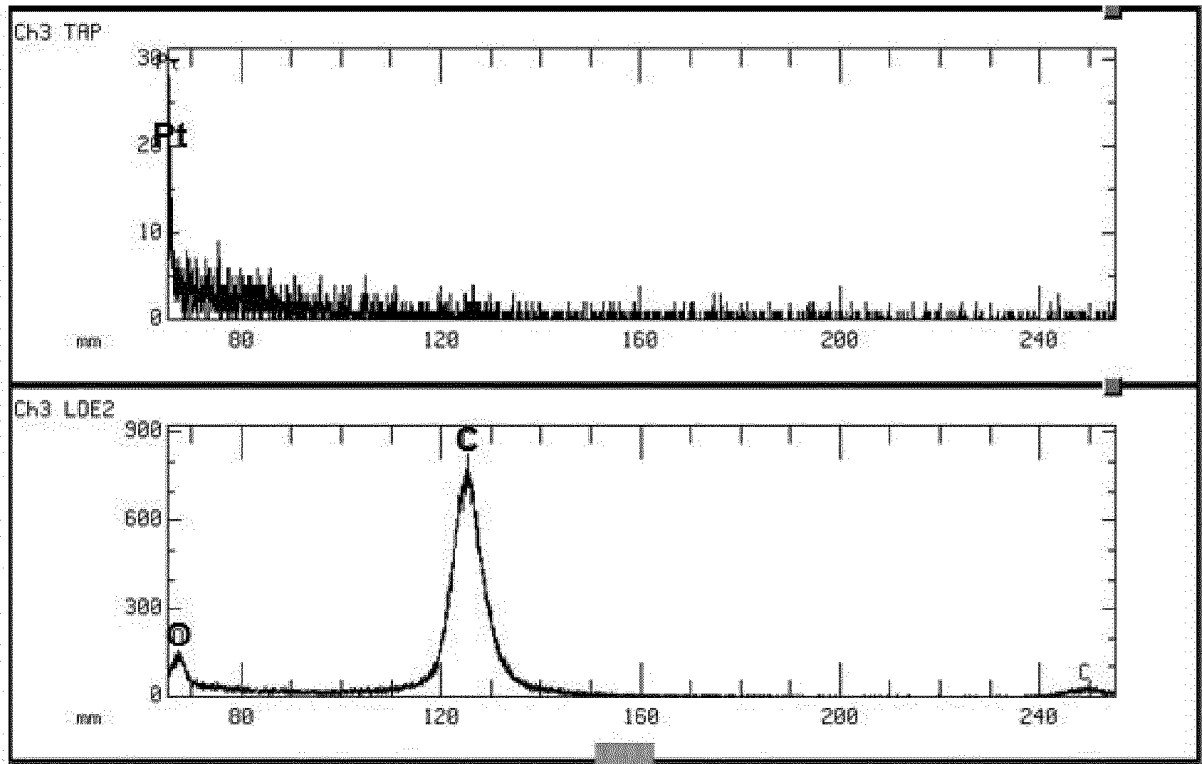


FIG. 5



Micropartícula de polímero recubierta con sílice

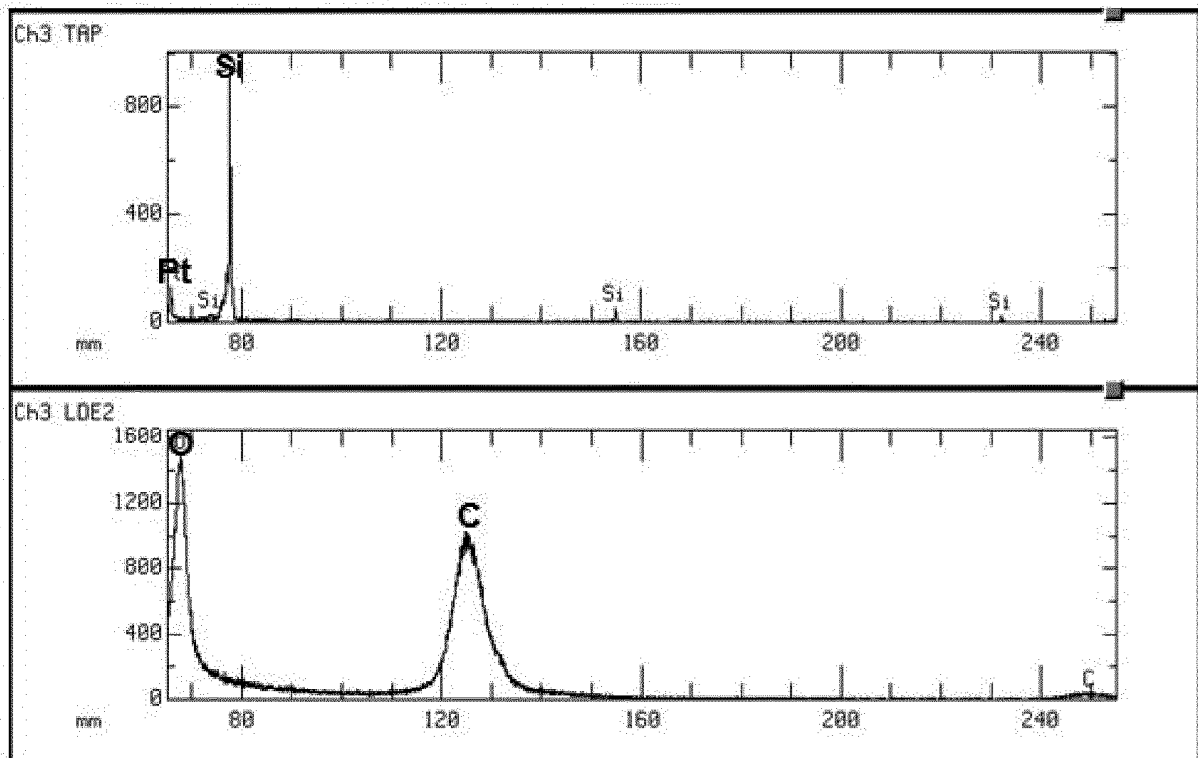


FIG. 6

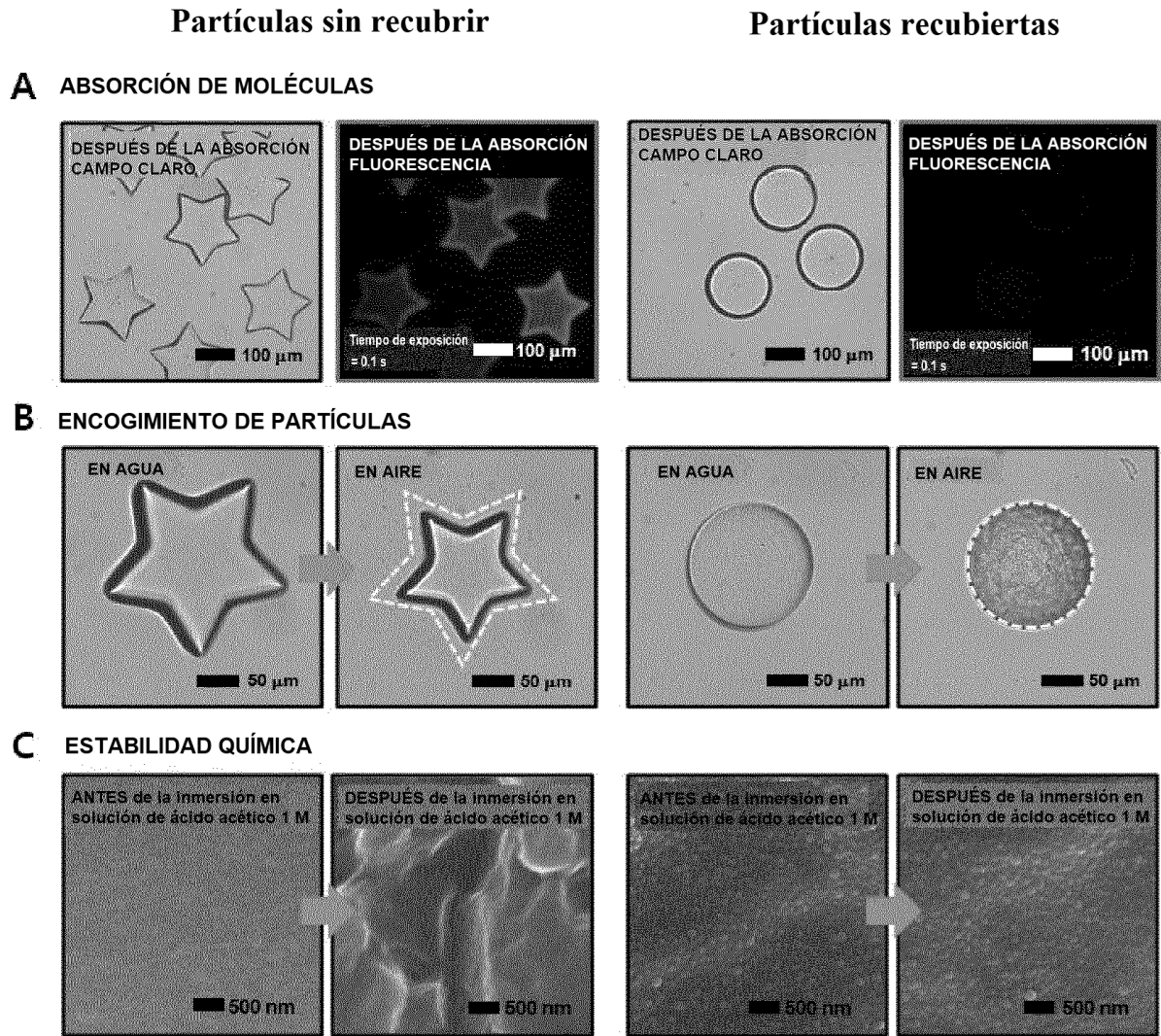


FIG. 7

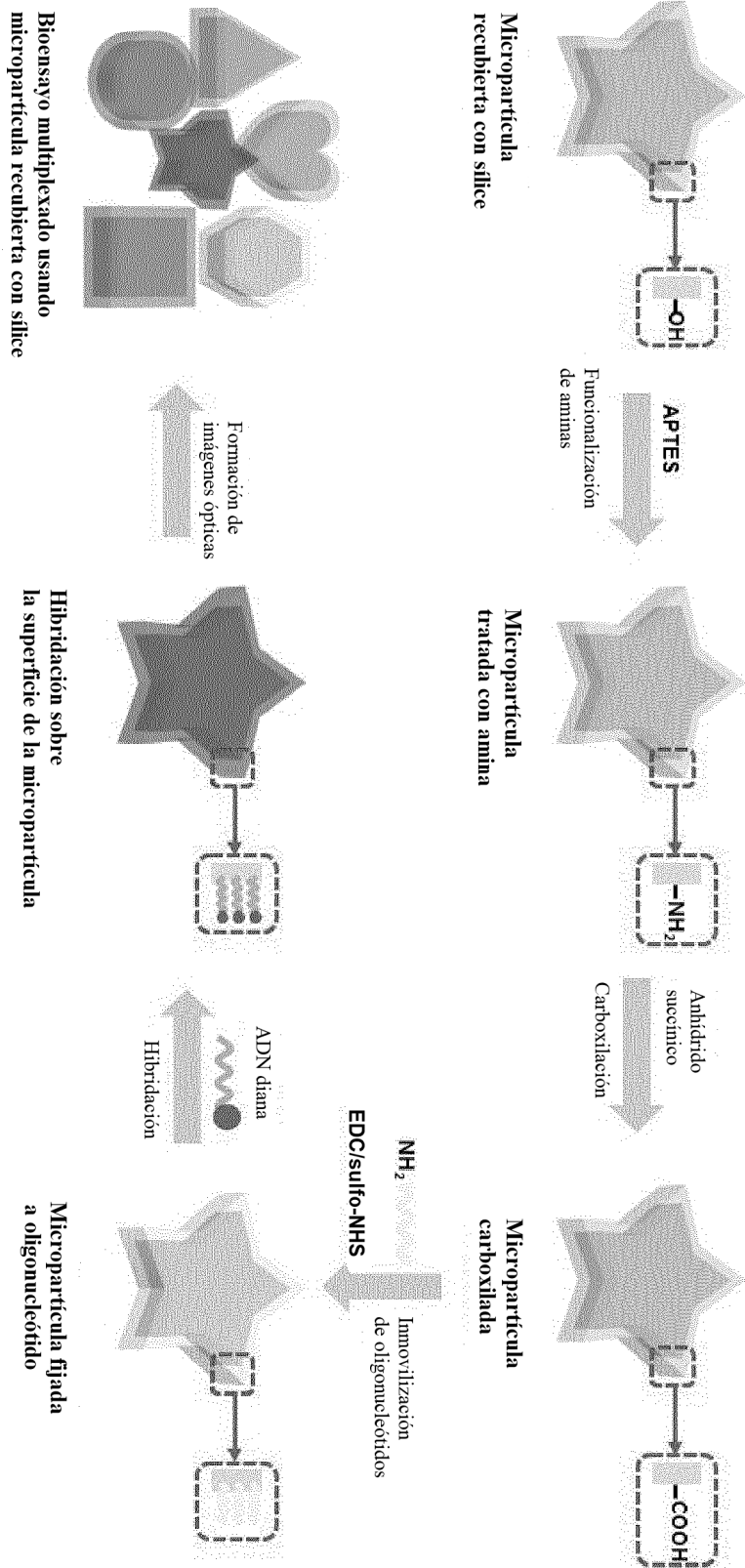


FIG. 8

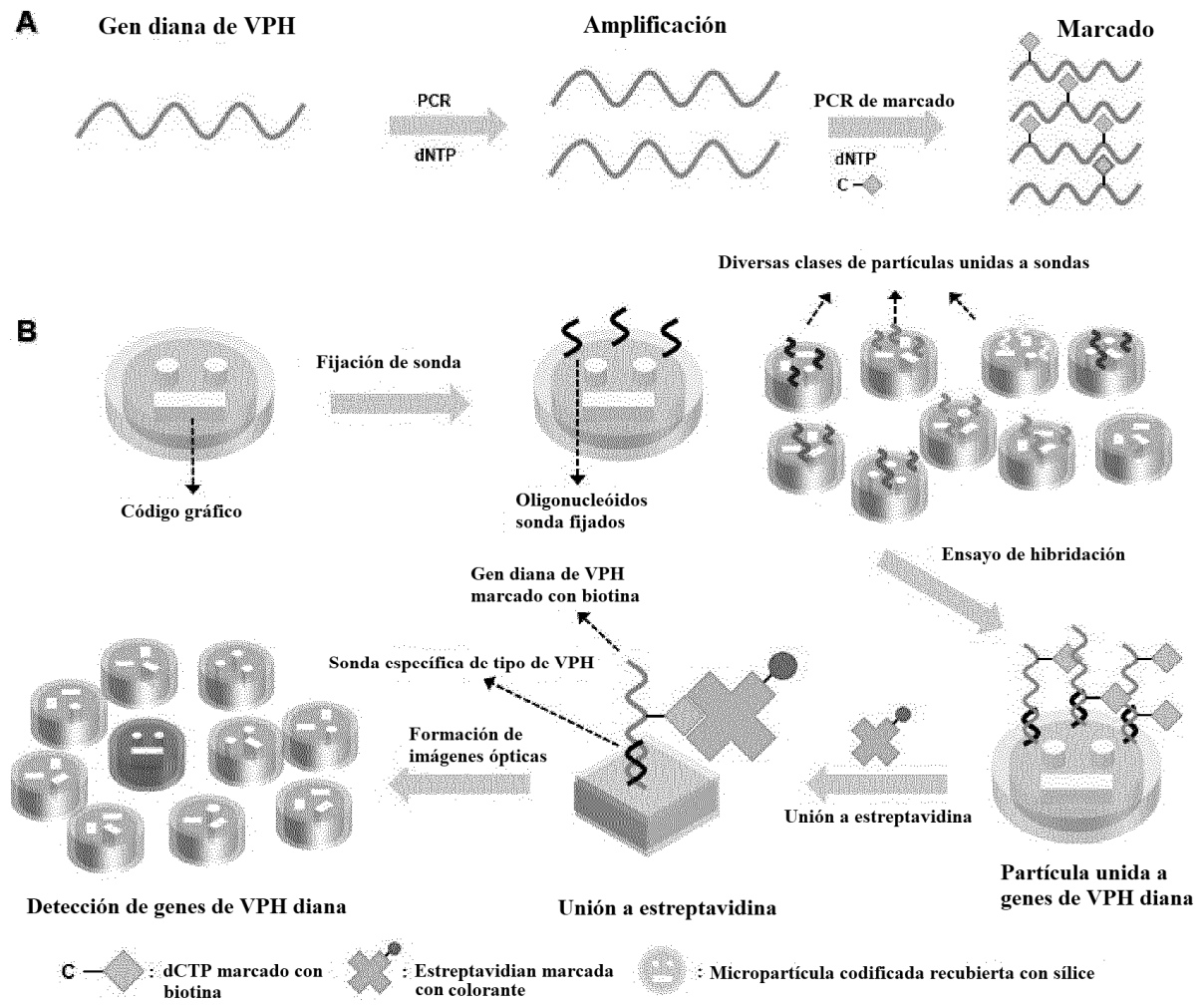


FIG. 9

