

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 380**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2013 E 16167709 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3073266**

54 Título: **Micropartículas para el análisis de biomoléculas, procedimiento para preparar las mismas, kit para el análisis de biomoléculas y procedimiento de análisis de biomoléculas utilizando el kit**

30 Prioridad:

**24.08.2012 KR 20120093169**

**11.09.2012 KR 20120100539**

**12.09.2012 KR 20120101054**

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

**02.11.2018**

73 Titular/es:

**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION**

**FOUNDATION DANKOOK UNIVERSITY (50.0%)**

**152 Jukjeon-ro, Suji-gu, Yongin-si**

**Gyeonggi-do 448-701, KR y**

**SPECIALTY LAB SOLUTION BIO CO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIM, HEUNG BIN**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**ES 2 688 380 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 para el análisis de biomoléculas, procedimiento para preparar las mismas, kit para el análisis de biomoléculas y procedimiento de análisis de biomoléculas utilizando el kit

5

### CAMPO TÉCNICO

**[0001]** La presente invención se refiere a micropartículas para analizar de forma rápida y precisa biomoléculas tales como antibióticos o células cancerosas, un procedimiento para preparar las mismas, un kit de análisis de biomoléculas y un procedimiento para analizar biomoléculas usando el kit.

10

Antecedentes de la invención

**[0002]** Socialmente, en vista del campo de la asistencia médica y sanitaria, es muy importante analizar de forma rápida y precisa biomateriales tales como antibióticos o células cancerosas. Por ejemplo, una biomolécula como la enrofloxacin es un antibiótico que se usa ampliamente en el tratamiento de fluoroquinolonas para el tratamiento de humanos y animales, y puede causar diversos casos de efectos secundarios de débiles a muy graves según su campo de aplicación.

15

**[0003]** Debido a un peligro para la salud humana, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han impuesto una regulación sobre el uso de enrofloxacin mientras que la Unión Europea (UE) ha establecido un límite máximo de residuos de enrofloxacin. Por lo tanto, el control con cuidado de tales residuos de antibióticos en alimentos es importante para la salud humana.

20

**[0004]** Hasta ahora, diversos aparatos y procedimientos, tales como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS), la electroforesis capilar, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), etc., se han desarrollado para analizar biomoléculas. Entre ellos, HPLC y LC-MS son las técnicas de análisis más sensibles, pero el análisis requiere mucho trabajo y tiempo, lo que requiere operaciones y tratamientos previos elaborados. ELISA, aunque proporciona resultados de análisis rápidos, es de proceso complejo y relativamente pobre en sensibilidad cuantitativa.

25

30

## DESCRIPCIÓN

### PROBLEMA TÉCNICO

35

**[0005]** De acuerdo con esto, la presente invención se ha realizado teniendo en cuenta los problemas anteriores que aparecen en la técnica anterior, y un objeto de la presente invención es proporcionar una micropartícula para el análisis rápido y preciso de una biomolécula, un procedimiento para preparar la misma, un kit de análisis de biomoléculas y un procedimiento para analizar una biomolécula utilizando el kit.

40

### SOLUCIÓN TÉCNICA

**[0006]** La presente invención proporciona un kit para el análisis cualitativo y cuantitativo de una biomolécula objeto mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICPMS), que comprende:

45

una primera micropartícula que comprende:

un núcleo que incluye un material metálico que se selecciona del grupo que consiste en lantano, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, lutecio, titanio, plomo, cadmio, óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) y óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>);

50

una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y

un primer medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse específicamente a una biomolécula que se analizará, y

55 una segunda micropartícula que comprende:

un núcleo que incluye un material magnético;

una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y

un segundo medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse no específicamente a la

biomolécula a analizar, donde el segundo medio de unión es un grupo funcional que forma un enlace químico con la biomolécula objeto de análisis. El grupo funcional incluye al menos uno seleccionado de entre un grupo aldehído, un grupo éter, un grupo éster, un grupo cetona, un grupo sulfuro, un grupo tiol, un grupo arilo, un grupo amina, un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, y

5

una tercera micropartícula que incluye un tercer medio de unión que se une específicamente al primer medio de unión de la primera micropartícula y comprende una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente, donde el material metálico es un agregado de átomos de metal individuales que varía en número de  $10^4$  a  $10^6$  átomos.

10 **[0007]** De acuerdo con un aspecto del mismo, se describe una micropartícula para el análisis de una biomolécula, que comprende: un núcleo que incluye al menos uno seleccionado entre una sustancia de expresión óptica, un material metálico y un material magnético; una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y al menos un medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse a una biomolécula objeto de análisis, en el que la sustancia de expresión óptica es un fluorescente o un luminiscente.

15

**[0008]** De acuerdo con otro aspecto del mismo, se describe un kit para el análisis de una biomolécula, que comprende: una primera micropartícula que comprende: un núcleo que incluye una sustancia de expresión óptica o un material metálico; una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y un primer medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse específicamente a la biomolécula a analizar, y una segunda

20 micropartícula que comprende: un núcleo que incluye un material magnético; una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y un segundo medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse no específicamente a la biomolécula a analizar.

**[0009]** De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, se describe un procedimiento para preparar una micropartícula para el análisis de una biomolécula, que comprende: formar un núcleo que incluye al menos uno seleccionado entre una sustancia de expresión óptica, un material metálico y un material magnético; y recubrir el núcleo con una capa de revestimiento de sílice.

30 **[0010]** De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, se describe un procedimiento para el análisis de una biomolécula, que comprende: preparar una primera micropartícula que incluye un primer medio de unión que se une específicamente a la biomolécula objeto de análisis; preparar una segunda micropartícula que incluye un segundo medio de unión que se une no específicamente a la biomolécula objeto de análisis; y mezclar la primera micropartícula y la segunda micropartícula con la biomolécula objeto de análisis, donde la primera micropartícula incluye una sustancia de expresión óptica o un material metálico, y la segunda micropartícula incluye un material magnético.

35

## EFFECTOS VENTAJOSOS

40 **[0011]** Capaz de realizar simultáneamente un aislamiento y un análisis cuantitativo de una biomolécula objeto de análisis, la presente invención se mejora en términos de tiempo y coste de eficacia, y puede determinar la existencia y cantidad de biomoléculas distribuidas, de forma rápida y precisa.

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 **[0012]**

La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra la estructura de una micropartícula para analizar una biomolécula de acuerdo con un ejemplo ejemplar de la presente invención.

50

La FIG. 2 es una vista esquemática que muestra la unión de una micropartícula para el análisis de una biomolécula a una biomolécula 300, que es un objeto de análisis, de acuerdo con otra realización de la presente invención.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para preparar una micropartícula para el análisis de una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención.

55

La FIG. 4 es una vista esquemática de un kit de análisis de biomoléculas de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención.

La FIG. 5 es una vista esquemática que muestra la relación de unión entre el kit de análisis de biomoléculas de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención y una biomolécula a analizar.

La FIG. 6 es una vista estructural esquemática de un kit de análisis de biomoléculas según otra

realización ejemplar de la presente invención.

La FIG. 7 es una vista esquemática que ilustra un proceso de pretratamiento de enrofloxacin y ciprofloxacina.

5

La FIG. 8 muestra nanopartículas de núcleo-corteza adsorbidas en isotiocianato de fluoresceína en una imagen de microscopio electrónico de barrido (a), una imagen no fluorescente en ausencia de láser (b) y una imagen fluorescente en presencia de láser (c).

La FIG. 9 es una vista esquemática que ilustra un procedimiento experimental mediante el cual se analiza la biomolécula enrofloxacin usando el kit de análisis de biomoléculas según una realización ejemplar.

10

La FIG. 10 muestra curvas de calibración de enrofloxacin, extraídas usando el kit de análisis de biomoléculas según una realización de la presente invención y microscopía de fluorescencia inducida por láser (a) y ELISA (b).

La FIG. 11 es una vista esquemática que ilustra el análisis cuantitativo de anticuerpos en las nanopartículas de núcleo-corteza.

15

La FIG. 12 muestra curvas de calibración de un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (a), y de nanopartículas de núcleo-corteza revestidas con cianina (b).

La FIG. 13 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención.

20

La FIG. 14 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para analizar una biomolécula de acuerdo con otra realización ejemplar de la presente invención.

## MEJOR MODO

[0013] La invención se describirá ahora más completamente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran realizaciones a modo de ejemplo de la invención. La presente invención puede, sin embargo, realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en este documento. Por el contrario, estas formas de realización se proporcionan de modo que esta descripción será minuciosa y completa, y transmitirá completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Los mismos números de referencia se refieren a elementos similares en todas partes.

30

[0014] Se entenderá que cuando se hace referencia a un elemento como que está "conectado" a otro elemento, puede estar directamente sobre el otro elemento o pueden estar presentes elementos intermedios entre ellos. Por el contrario, cuando se hace referencia a un elemento como "directamente en" otro elemento, no hay elementos intermedios presentes. Como se usa en el presente documento, el término "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los artículos enumerados asociados.

35

[0015] Se entenderá que, aunque los términos "primero", "segundo", etc. se pueden usar aquí para describir diversos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones, estos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones no deben estar limitadas por estos términos. Estos términos solo se usan para distinguir un elemento, componente, región, capa o sección de otro elemento, componente, región, capa o sección. Por lo tanto, un primer elemento, componente, región, capa o sección comentado a continuación podría denominarse segundo elemento, componente, región, capa o sección sin apartarse de la naturaleza de la presente invención.

40

[0016] A continuación, se dará una descripción detallada de la presente invención con referencia a los dibujos.

45

[0017] La FIG. 1 es una vista esquemática que muestra la estructura de una micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con un ejemplo ejemplar de la presente invención. A continuación, la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención se explicará con referencia a la FIG. 1.

50

[0018] Como se puede ver en la FIG. 1, la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende un núcleo que incluye una sustancia de expresión óptica 112 y un material magnético en su interior; una capa de recubrimiento de sílice 113 formada en el núcleo; y al menos un medio de unión 111, unido a la capa de recubrimiento de sílice 113, para unirse a una biomolécula a analizar.

55

[0019] Como se usa en este documento, el término "biomolécula" significa una sustancia liberada o aislada de un bioorganismo, y está destinada a abarcar no solo una sustancia producida a partir de un bioorganismo sino

también una sustancia que permanece en un bioorganismo después de la introducción en el bioorganismo. Dentro del alcance de la biomolécula, pueden caer antibióticos, ácidos nucleicos, hormonas, enzimas, células, tumores, células cancerosas, bacterias, virus y aislados de los mismos. Los ejemplos de los antibióticos incluyen enrofloxacin, ciprofloxacina, salinomycin, penicilina, cefalosporina, monobactam, cabapenam, ampicilina, 5 carboxilpenicilina, neomicina, gentamicina, cefamicina, sisomicina, eritromicina, claritromicina, vancomicina, teicoplanina, licomicina, sulfatiazol, tetraciclina, oxitetraciclina y sulfamerazina.

**[0020]** Diseñada para unirse a una biomolécula de interés, la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención puede trazar o aislar la biomolécula. 10 El modo en el que la micropartícula 101 está asociada a una biomolécula puede ser versátil. En una realización ejemplar, una biomolécula puede marcarse con la micropartícula. En otra realización ejemplar, la micropartícula puede incluirse dentro de una biomolécula.

**[0021]** La micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende una sustancia de expresión óptica 112. La información sobre la existencia y/o 15 cantidad de una sustancia de expresión óptica se puede medir ópticamente. En este contexto, la sustancia de expresión óptica 112 puede ser fluorescente o luminiscente.

**[0022]** Por ejemplo, cuando la sustancia de expresión óptica 112 es fluorescente, la exposición a los rayos 20 UV permite emitir luz visual a una longitud de onda específica, permitiendo así la identificación de la existencia y cantidad de la micropartícula 101. El fluorescente puede ejemplificarse mediante isotiocianato de fluoresceína (FITC), cianina (Cy) e isotiocianato de rodamina B (RhBICT).

**[0023]** Cuando se utiliza un luminiscente como sustancia de expresión óptica 112, puede emitir luz visual al 25 entrar en contacto con un líquido iluminante, lo que permite la identificación de la existencia y cantidad de la micropartícula 101.

**[0024]** De acuerdo con otra realización ejemplar de la presente invención, el núcleo de la micropartícula para el análisis de una biomolécula puede incluir un material metálico. 30

**[0025]** Un material metálico, cuando se incluye en el núcleo, permite la identificación de la existencia y cantidad de la micropartícula usando un aparato de rayos X o una espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS). Aquí, se pueden aplicar diversos materiales metálicos que se pueden detectar ópticamente. Además, la masa isotópica intrínseca que tiene cada metal puede usarse para la detección. Además, 35 dado que la ICP-MS tiene una sensibilidad muy alta de detección, puede mejorar tanto la velocidad de detección como la sensibilidad de las biomoléculas cuando se aplica a la sustancia de expresión óptica 112 compuesta por un material metálico.

**[0026]** Para el material metálico, se puede utilizar cualquier metal en la Tabla Periódica. Los ejemplos del 40 metal incluyen, entre otros, titanio, plomo, cadmio y elementos de la serie de los lantánidos, como lantano, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y lutecio. Además, el material metálico puede ser un óxido de metal tal como óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), así como elementos metálicos. Además, pueden emplearse puntos cuánticos o nanopartículas de oro. 45

**[0027]** En otra realización ejemplar, el material metálico puede ser un único átomo de metal o un agregado de dos o más átomos metálicos. Para un solo átomo de metal, es preferible un elemento de la serie de los lantánidos. Sin embargo, cuando el material metálico está compuesto solo por un solo átomo de metal, la sensibilidad de detección puede ser pobre debido al pequeño tamaño del átomo de metal individual. Además, el pequeño tamaño 50 puede dificultar la preparación de una micropartícula. Por lo tanto, un agregado de una pluralidad de átomos metálicos individuales puede ser ventajoso en términos de sensibilidad de detección y facilidad de preparación. A este respecto, el agregado de átomos metálicos puede estar compuesto por aproximadamente  $10^4$ - $10^6$  átomos. En una realización preferida de la presente invención, el material metálico puede comprender  $7,0 \times 10^4$  ( $\pm 1,3 \times 10^3$ ) átomos de plomo o  $1,5 \times 10^5$  ( $\pm 1,6 \times 10^3$ ) átomos de cadmio. Cuando se incluye un agregado de varios átomos 55 metálicos individuales dentro de la micropartícula 101, el ICP-MS puede detectarlo con una sensibilidad muy mejorada, permitiendo así el análisis rápido y preciso de la biomolécula.

**[0028]** El núcleo puede estar compuesto de diferentes materiales. En una realización preferida de la presente invención, el núcleo puede contener una combinación de un material metálico y un fluorescente. Brevemente, el

núcleo puede estar compuesto por una combinación de plomo y FITC, o una combinación de cadmio y RhBICT. Estas combinaciones aumentan la sensibilidad de detección de biomoléculas, sin interferencia espectral. Dado que ICT-MS exhibe una alta sensibilidad de detección, un objeto real a ser medido puede ser un material metálico, con el fluorescente sirviendo solo como complementario. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de una biomolécula se puede obtener midiendo el material metálico con la ayuda de ICP-MS, mientras que una biomolécula etiquetada con la micropartícula 101 se puede rastrear detectando el fluorescente.

5 **[0029]** De acuerdo con otra realización ejemplar de la presente invención, el núcleo puede comprender dos o más fluorescentes diferentes, dos o más luminiscentes diferentes, o dos o más materiales metálicos diferentes.

10 **[0030]** En una realización preferida, el núcleo puede estar compuesto por dos fluorescentes diferentes FITC y Cy, o tres fluorescentes diferentes FITC, Cy y RhBICT. En una realización ejemplar de la presente invención, el núcleo puede estar compuesto por dos metales diferentes, plomo y cadmio, o tres metales diferentes plomo, cadmio y cerio. Como se ilustra anteriormente, el núcleo puede incluir una variedad de diferentes fluorescentes, luminiscentes, materiales metálicos o combinaciones de estos dentro del tamaño de la micropartícula 101. Por lo tanto, el núcleo se puede medir para una pluralidad de propiedades ópticas usando un aparato óptico tal como ICP-MS. Debido a que las propiedades ópticas plurales medidas pueden analizarse individualmente, la micropartícula 15 101 que comprende el núcleo puede usarse para analizar múltiples biomoléculas diferentes. En una realización ejemplar de la presente invención, un tipo de micropartícula puede marcarse con una pluralidad de biomoléculas diferentes que pueden corresponder a una de las múltiples características ópticas que tienen los materiales del núcleo, de modo que la micropartícula puede utilizarse para detectar una pluralidad de diferentes biomoléculas.

20 **[0031]** El núcleo puede tomar una forma de cuenta. Por ejemplo, una micropartícula para el análisis de biomoléculas puede consistir en un cordón. En una realización a modo de ejemplo de la presente invención, el núcleo de la micropartícula 101 puede comprender una matriz en la que se distribuye una pluralidad de perlas, tomando una forma de perlas en su totalidad. La matriz puede ser una resina polimérica, y las perlas pueden ser fluorescentes, luminiscentes, materiales metálicos o combinaciones de estos.

30 **[0032]** La micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención puede comprender un material magnético 122. El material magnético 122 se refiere a un material que puede moverse en presencia de un campo magnético. Al igual que la sustancia de expresión óptica 112, el material magnético 122 puede tomar una forma de cuenta. El material magnético 122 puede estar configurado para aislar la micropartícula 101 o la biomolécula etiquetada con la micropartícula 101. Es decir, el material magnético 122 se usa para el enriquecimiento de la micropartícula 101 o la biomolécula etiquetada con micropartícula 101, lo que aumenta la sensibilidad de detección. Al minimizar la interferencia de los materiales en lugar de la biomolécula objeto, se puede mejorar la sensibilidad de detección para la biomolécula objeto. Como se usa en el presente documento, el término "enriquecimiento" significa la separación de un material específico de otros materiales circundantes.

40 **[0033]** La micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende una capa de recubrimiento de sílice 113 aplicada a la sustancia de expresión óptica 112 y el material magnético 122. La capa de revestimiento de sílice 113 se puede formar usando un procedimiento de microemulsión inversa. Además, la capa de revestimiento de sílice 113 puede estar configurada para cubrir tanto la sustancia de expresión óptica 112 como el material magnético 122. En una realización ejemplar, como se muestra en la FIG. 1, la capa de revestimiento de sílice 113 está formada para tener una forma de círculo que cubre completamente la sustancia de expresión óptica 112 y el material magnético 122. Aunque se ve que tiene un espesor constante en la FIG. 1, la capa 113 de revestimiento de sílice puede ser de grosor no homogéneo. Además, puede ser oval o poligonal, o puede cubrir parcialmente la sustancia de expresión óptica 112 o el material magnético 122, permaneciendo la otra parte expuesta.

50 **[0034]** Como se ve en la FIG. 1, la sustancia de expresión óptica 112 y el material magnético 122 están dispuestos de manera relativamente interna mientras que la capa de revestimiento de sílice 113 es responsable del exterior de la micropartícula 101. En este contexto, la micropartícula 101 puede tener una estructura núcleo-corteza en la que la sustancia de expresión óptica 112 y el material magnético 122 existen juntos como un núcleo, con la 55 capa de revestimiento de sílice 113 que sirve como caparazón.

**[0035]** La capa de recubrimiento de sílice 113 se puede preparar a partir de un material transparente. Por ejemplo, la capa de recubrimiento de sílice 113 puede estar formada de sílice. Cubierta por la capa de recubrimiento de sílice 113, la sustancia de expresión óptica 112 y el material magnético 122 de la micropartícula 101 pueden

protegerse de diversos factores externos de manera que la propiedad óptica de la sustancia de expresión óptica 112 y el magnetismo del material magnético 122 puedan ser mantenidos. Por ejemplo, la capa de revestimiento de sílice puede evitar el fotoblanqueo de la sustancia de expresión óptica 112, por ejemplo, cuando es fluorescente, y la reducción del magnetismo cuando una sustancia extraña está unida al material magnético 122. Por lo tanto, la capa de sílice puede mejorar la sensibilidad para la medición y separación de la biomolécula.

**[0036]** Además, la micropartícula 101 puede incluir varios tipos de sustancia de expresión óptica 112 y material magnético 122. Puede ser muy oneroso tratar varios tipos de sustancia de expresión óptica 112 y material magnético 122, por separado. Cuando varios tipos de sustancia de expresión óptica 112 y material magnético 122 que pueden incluirse dentro de la micropartícula 101 se recubren con una composición constante de capa de recubrimiento de sílice 113, la micropartícula 101 tiene una superficie homogénea y, por lo tanto, es fácil de tratar.

**[0037]** La micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende un medio de unión 111 para unirse a una biomolécula a analizar. Versátil es el modo en que los medios de enlace pueden unirse a una biomolécula. Como se mencionó anteriormente, la micropartícula 101 puede marcarse con una biomolécula en una realización ejemplar o puede incluirse en una biomolécula en otra realización ejemplar. La unión de los medios de unión 111 a una biomolécula puede ser específica o no específica, como se describirá en detalle.

**[0038]** Además, los medios de unión 111 se pueden construir sobre la capa de recubrimiento de sílice 113. A este respecto, los medios de unión se pueden unir a la capa de revestimiento de sílice 113 a través de un enlace químico. Cuando los medios de unión están unidos a la capa 113 de revestimiento de sílice, la micropartícula puede tomar una forma de perla con un saliente de esta. Cuando varios tipos de sustancia de expresión óptica 112 y material magnético 122 que pueden incluirse dentro de la micropartícula 101 están recubiertos con una composición constante de capa de recubrimiento de sílice 113, la formación de los medios de unión 111 sobre la capa de recubrimiento de sílice 113 puede realizarse en un proceso uniforme, haciendo de este modo ventajosamente simple el proceso.

**[0039]** Con la ayuda de la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención, una biomolécula a analizar puede aislarse y medirse simultáneamente, de modo que se puede lograr una mejora en tiempo y rentabilidad. Además, la existencia y cantidad de la biomolécula distribuida se puede detectar rápidamente y con precisión. En detalle, en comparación con ELISA, el procedimiento es más simple con una mejora en el límite de detección y fiabilidad. Además, la micropartícula 101 se puede capturar o enriquecer usando el magnetismo del material magnético 122 para aumentar la sensibilidad de detección de la biomolécula a analizar.

**[0040]** La FIG. 2 es una vista esquemática que muestra la unión de una micropartícula 101 para el análisis de una biomolécula a una biomolécula 300, que es un objeto de análisis, de acuerdo con otra realización de la presente invención. Para la conveniencia de la descripción, los elementos que funcionan sustancialmente con los mismos roles en las FIGs. 1 y 2 están asignados con los mismos números de referencia, y una descripción de estos no se dará de forma repetida.

**[0041]** Con referencia a la FIG. 2, la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende una sustancia de expresión óptica 112, un material magnético 122 y un medio de unión 111 para unirse específicamente a una biomolécula 300 a analizar.

**[0042]** La micropartícula puede comprender al menos un medio de unión.

**[0043]** Es decir, se puede emplear una pluralidad de los medios de unión en la micropartícula. El número de los medios de unión empleados en la micropartícula 101 se puede ajustar según el sujeto y el campo de aplicación.

**[0044]** Al menos en parte, la biomolécula 300 objeto puede unirse específicamente por los medios de unión. Tal como se usa aquí, el término "unirse específicamente" entre los medios de unión y la biomolécula 300 objeto de análisis significa que los medios de unión se unen únicamente a la biomolécula 300 objeto de análisis. Por lo tanto, cuando la biomolécula 300 objeto de análisis y la micropartícula 101 se mezclan en una cierta condición, la biomolécula 300 está asociada con la micropartícula 101 a través de una interacción específica con los medios de unión.

**[0045]** Los ejemplos de interacción específica incluyen interacción antígeno-anticuerpo e interacción génica

complementaria.

**[0046]** Para una biomolécula que tiene un epítipo, a modo de ejemplo, los medios de unión pueden incluir un anticuerpo específico a los mismos. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo monoclonal es superior en términos de sensibilidad de detección no solo porque es de tamaño relativamente pequeño sino también porque es mucho menos propenso a unirse a una biomolécula que no es el objeto de análisis de interés. En una realización ejemplar, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una biomolécula objeto de análisis y que es menos probable que interacte con las otras moléculas circundantes debido a su pequeño tamaño.

**[0047]** Cuando la biomolécula incluye un polinucleótido, el medio de unión puede ser un polinucleótido complementario de cadena simple. En este documento, el polinucleótido monocatenario puede ser un oligonucleótido. Al igual que un anticuerpo monoclonal, un oligonucleótido es menos propenso a la interacción con las moléculas circundantes debido a su pequeño tamaño, mejorando así la sensibilidad de detección de la biomolécula 300 objeto de análisis.

**[0048]** Se explicará brevemente un procedimiento experimental para analizar una biomolécula con las micropartículas 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención. En primer lugar, la micropartícula 101 se mezcla en una cantidad suficiente con una biomolécula que contiene la biomolécula 300 objeto de análisis para permitir que los medios de unión de las micropartículas 101 se unan específicamente a la biomolécula 300 objeto de análisis. A continuación, un dispositivo que produce un campo magnético, por ejemplo, imán permanente, se puede usar para capturar las micropartículas 101. De las micropartículas capturadas 101, las micropartículas unidas a la biomolécula 300 se pueden separar por centrifugación debido a la masa de la biomolécula.

**[0049]** A continuación, la concentración de la biomolécula 300 objeto de análisis puede analizarse usando un aparato óptico tal como ICP-MS.

**[0050]** La FIG. 3 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para preparar una micropartícula para el análisis de una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención. Con referencia a la FIG. 3, se proporcionará el procedimiento de preparación de la micropartícula 101 para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención. Para la conveniencia de la descripción, los elementos que funcionan sustancialmente con los mismos roles en las FIGs. 1 y 2 están asignados con los mismos números de referencia, y una descripción de estos no se dará de forma repetida.

**[0051]** El procedimiento para preparar una micropartícula para el análisis de biomoléculas de acuerdo con la presente invención comprende formar un núcleo que incluye al menos una de una sustancia de expresión óptica, un material metálico y un material magnético, y recubrir el núcleo con una capa de recubrimiento de sílice 130.

**[0052]** La formación del núcleo se puede llevar a cabo colocando la sustancia de expresión óptica, material metálico y material magnético en etanol absoluto (S1), y ultrasonificando el etanol absoluto (S2). En una realización ejemplar, cloruro de metal, por ejemplo,  $\text{CdCl}_2$  o  $\text{PbCl}_2$ , un fluorescente, por ejemplo, RhBITC o FITC se mezcla con un material magnético, y se somete a ultrasonidos. Después de eso, se puede añadir 3-aminopropiltrióxido de silano (APTEOS, 99 %, Sigma-Aldrich. Co., EE. UU.) y mezclarlo en una condición hermética a la luz.

**[0053]** La etapa de recubrimiento puede utilizar un procedimiento de microemulsión inversa (S3). En una realización ejemplar, se agrega docusato de sodio y agua a heptano y se agita la disolución. Luego, la disolución se agrega con el núcleo y luego con trióxido de silano (TEOS) y 25 % de amoniaco, seguido de agitación de la disolución en condiciones de hermeticidad. Las micropartículas 100 que se sintetizan de este modo para tener una estructura núcleo-corteza pueden separarse por centrifugación. A continuación, se sumergen en acetona y se lavan con etanol antes de almacenarlos en agua desionizada.

**[0054]** Después de formarse, las micropartículas para el análisis de biomoléculas, se pueden identificar usando ICP-MS, LIFM, microscopio electrónico de barrido (SEM) o cámara CCD (MicroPublisher 5.0, Q-Imaging). En una realización a modo de ejemplo, cuando se emplea FITC o RhBITC, como la sustancia de expresión óptica de la micropartícula, la sustancia de expresión óptica puede excitarse utilizando láser DPSS de 473 nm (estado sólido bombeado por diodo) (50 mW, BL473T-050, SLOC) o 563 nm He-Láser Cd (3 mW, TriusEngineering, OK). La micropartícula para el análisis de biomoléculas puede ser generalmente esférica, con un diámetro de 34 nm – 38 nm, y específicamente 36 nm.



**[0055]** Además, el procedimiento de preparación de una micropartícula para el análisis de biomoléculas de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención puede comprender además formar en la capa de revestimiento de sílice al menos un medio de unión que se une a una biomolécula a analizar (S4). Como se describió anteriormente, los medios de unión pueden ser específicos o no específicos.

**[0056]** La FIG. 4 es una vista esquemática de un kit de análisis de biomoléculas 100 de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención, y la FIG. 5 es una vista esquemática que muestra la relación de unión entre el kit de análisis de biomoléculas según una realización ejemplar de la presente invención y una biomolécula a analizar.

**[0057]** A continuación, el kit de análisis de biomoléculas 100 de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención se explicará con referencia a las FIGs. 4 y 5.

**[0058]** Como puede verse en la FIG. 4, el kit de análisis de biomoléculas 100 de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende: una primera micropartícula 110 que comprende: un núcleo que incluye una sustancia de expresión óptica 112; una capa de recubrimiento de sílice 113 formada en el núcleo; un primer medio de unión 111, unido a la capa de recubrimiento de sílice 113, para unirse específicamente a una biomolécula a analizar, y una segunda micropartícula 120 que comprende: un núcleo que incluye un material magnético 122; una capa de revestimiento de sílice 123 formada en el núcleo; un segundo medio de unión 121, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse no específicamente a la biomolécula a analizar.

**[0059]** La primera micropartícula 110 puede comprender al menos un primer medio de unión 111. El número de los medios de unión empleados en la micropartícula 110 se puede ajustar.

**[0060]** Al menos en parte, la biomolécula 300 objeto puede unirse específicamente por los medios de unión. Como se usa aquí, el término "unirse específicamente" entre los medios de unión 111 y la biomolécula 300 objeto de análisis significa que los medios de unión 111 se unen solo a la biomolécula 300 objeto de análisis. Por lo tanto, cuando la biomolécula 300 objeto de análisis y la micropartícula 110 se mezclan en una cierta condición, la biomolécula 300 está asociada con la micropartícula 110 a través de una interacción específica con los medios de unión 111.

**[0061]** Los ejemplos de la interacción específica incluyen interacción antígeno-anticuerpo e interacción génica complementaria.

**[0062]** Para una biomolécula que tiene un epítipo, a modo de ejemplo, los primeros medios de unión 111 pueden incluir un anticuerpo específico a los mismos. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo monoclonal es superior en términos de sensibilidad de detección no solo porque es de tamaño relativamente pequeño, sino también porque es mucho menos propenso a unirse a una biomolécula que no es el sujeto de análisis de interés. En una realización ejemplar, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una biomolécula 300 objeto de análisis y que es menos probable que interaccione con otras moléculas circundantes debido a su pequeño tamaño.

**[0063]** Cuando la biomolécula incluye un polinucleótido, el medio de unión 111 puede ser un polinucleótido de cadena sencilla complementario. En este documento, el polinucleótido de cadena simple puede ser un oligonucleótido. Al igual que un anticuerpo monoclonal, un oligonucleótido es menos propenso a la interacción con las moléculas circundantes debido a su pequeño tamaño, mejorando así la sensibilidad de detección de la biomolécula 300 objeto de análisis.

**[0064]** El núcleo comprende una sustancia de expresión óptica. La información sobre la existencia y/o cantidad de una sustancia de expresión óptica puede medirse ópticamente. En este contexto, la sustancia de expresión óptica 112 puede ser fluorescente o luminiscente.

**[0065]** Por ejemplo, cuando la sustancia de expresión óptica 112 es fluorescente, la exposición a los rayos UV permite emitir luz visual a una longitud de onda específica, lo que permite la identificación de la existencia y cantidad de la primera micropartícula 110. Se puede ejemplificar la fluorescencia por isotiocianato de fluoresceína (FITC), cianina (Cy) e isotiocianato de rodamina B (RhBICT).

**[0066]** Cuando se usa un luminiscente como la sustancia de expresión óptica 112, puede emitir luz visual por

contacto con un líquido iluminante, permitiendo la identificación de la existencia y cantidad de la primera micropartícula 110.

5 **[0067]** De acuerdo con otra realización ejemplar de la presente invención, el núcleo de la micropartícula para el análisis de una biomolécula puede incluir un material metálico.

**[0068]** Un material metálico, cuando se incluye en el núcleo, permite la identificación de la existencia y cantidad de la micropartícula usando un aparato de rayos X o una espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS). Aquí, se pueden aplicar diversos materiales metálicos que son posibles de detectar ópticamente. Además, el color intrínseco que tiene cada metal se puede usar para la detección.

15 **[0069]** El núcleo puede tomar una forma de cuenta. Por ejemplo, la primera micropartícula puede consistir en un cordón. En una realización ejemplar de la presente invención, el núcleo de la primera micropartícula puede comprender una matriz sobre la cual se distribuye una pluralidad de cuentas, tomando una forma de cuenta en su totalidad. La matriz puede ser una resina polimérica, y las perlas pueden ser fluorescentes, luminiscentes, materiales metálicos o combinaciones de estos.

20 **[0070]** En otra realización ejemplar de la presente invención, la primera micropartícula 110 puede además incluir una capa de revestimiento 113 aplicada al núcleo. Como se ilustra en la FIG. 4, la capa de recubrimiento de sílice 113 está configurada para cubrir la superficie total del núcleo en forma de cuenta. Aunque se ve que tiene un espesor constante, la capa de recubrimiento de sílice 113 puede ser de grosor no homogéneo. Además, puede cubrir parcialmente el núcleo, con la otra parte expuesta.

25 **[0071]** El núcleo está dispuesto relativamente internamente mientras que la capa de revestimiento de sílice 113 es responsable del exterior de la micropartícula. En este contexto, la primera micropartícula 110 puede tener una estructura núcleo-corteza en la que la sustancia de expresión óptica 112 o el material metálico existen juntos como un núcleo, con la capa de revestimiento de sílice 113 que sirve como una envoltura.

30 **[0072]** La capa de recubrimiento de sílice 113 se puede preparar a partir de un material transparente. Por ejemplo, la capa de recubrimiento de sílice 113 puede estar formada de sílice. Al estar cubierto por la capa de recubrimiento de sílice 113, la sustancia de expresión óptica en el material magnético puede protegerse de diversos factores externos para que la sustancia de expresión óptica o el material magnético pueda mantener su propiedad intrínseca. Por ejemplo, la capa de revestimiento de sílice puede evitar el fotoblanqueo de la sustancia de expresión óptica, por ejemplo, cuando es fluorescente. Por lo tanto, la capa de recubrimiento de sílice puede mejorar la sensibilidad para la medición y separación de la biomolécula.

40 **[0073]** Además, la primera micropartícula 110 puede incluir diversos tipos de sustancias de expresión óptica o materiales metálicos. Puede ser muy oneroso tratar varios tipos de sustancias de expresión óptica o materiales metálicos, por separado. Cuando varios tipos de sustancias de expresión óptica o materiales magnéticos que pueden incluirse dentro de la primera micropartícula 110 se recubren con una composición constante de capa de recubrimiento de sílice 113, la micropartícula 101 tiene una superficie homogénea de modo que la unión de un cierto medio de unión a la capa de revestimiento de sílice 113 se puede llevar a cabo en un proceso uniforme, simplificando así el proceso de preparación de la primera micropartícula 110.

45 **[0074]** Como se usa en el presente documento, el término "unión no específica" del segundo medio de unión 121 a la biomolécula 300 objeto de unión significa que los segundos medios de unión 121 pueden unirse a una biomolécula que no es un objeto de análisis, así como a la biomolécula 300 objeto de unión. Es decir, las biomoléculas unidas por los segundos medios de unión 121 pueden incluir las biomoléculas 300 objeto de análisis y/o las biomoléculas que no son objeto de análisis.

50 **[0075]** El segundo medio de unión 121 puede ser un grupo funcional que puede unirse químicamente a la biomolécula 300 objeto de análisis. En otras palabras, los segundos medios de unión 121 y la biomolécula 300 objeto de análisis pueden asociarse químicamente a través de un grupo funcional. Los ejemplos del grupo funcional incluyen un grupo aldehído, un grupo éter, un grupo éster, un grupo cetona, un grupo sulfuro, un grupo tiol, un grupo arilo, un grupo amina, un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, con preferencia por un grupo amina, un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo gracias a su capacidad para formar un enlace con biomoléculas generales.

55 **[0076]** La segunda micropartícula 120 puede comprender al menos un segundo medio de unión 121. El número de los medios de unión 121 empleados en la segunda micropartícula 120 puede ajustarse.

**[0077]** La biomolécula 300 objeto de análisis puede tener un medio de unión correspondiente a los segundos medios de unión de la segunda micropartícula 120. Los medios de unión de la biomolécula pueden estar asociados no específicamente con los segundos medios de unión 121. A modo de ejemplo, una puede formar un enlace amida 5 entre la biomolécula 300 de análisis y la segunda micropartícula 120 cuando el grupo funcional es un grupo amina y la biomolécula 300 objeto de análisis tiene un grupo carboxilo o cuando el grupo funcional es un grupo carboxílico y la biomolécula 300 objeto de análisis.

**[0078]** La segunda micropartícula 120 puede comprender un material magnético 122. El material magnético 10 122 se refiere a un material que puede moverse en presencia de un campo magnético. El material magnético 122 puede tomar una forma de cuenta. El material 122 magnético puede estar configurado para aislar la segunda micropartícula 120 o un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120. Es decir, el material magnético 122 se usa para el enriquecimiento de la segunda micropartícula 120 o un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120 15 en la solución que contiene el mismo, aumentando así la sensibilidad de detección. Como se usa en este documento, el término "enriquecimiento" significa la separación de un material específico de otros materiales circundantes.

**[0079]** El material magnético 122 de la segunda micropartícula 120 se puede revestir con la capa de 20 revestimiento 123.

**[0080]** Al igual que la primera micropartícula 110, la segunda micropartícula 120 puede tener una estructura núcleo-corteza. La capa de revestimiento 123 aplicada al material magnético 122 puede ser sustancialmente la 25 misma que la capa de revestimiento 123 aplicada a la sustancia de expresión óptica o al material metálico de la primera micropartícula 110. En detalle, la capa de revestimiento 123 aplicada al material magnético 122 puede estar formada del mismo material que el utilizado para la capa de revestimiento 123 aplicada a la sustancia de expresión óptica o el material metálico de la primera micropartícula 110. Además, la sustancia de expresión óptica o el material metálico, y el material magnético 122 pueden estar recubiertos en el mismo proceso. Al igual que la sustancia de expresión óptica recubierta o el material metálico, el material magnético 122 de la segunda micropartícula 120 se 30 puede proteger de diversos factores externos.

**[0081]** Además, los primeros medios de unión 111 y los segundos medios de unión 121 pueden intercambiarse entre sí. Es decir, los primeros medios de unión 111 que se unen específicamente a la biomolécula 300 objeto de análisis pueden unirse a la partícula que incluye el material magnético mientras que el segundo medio 35 de unión 121 que se une a la biomolécula objeto de análisis de un modo no específico puede vincularse a la partícula que incluye la sustancia de expresión óptica 112.

**[0082]** La FIG. 13 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención. A continuación, se dará una descripción del 40 procedimiento de análisis de biomoléculas, con referencia a la FIG. 13.

**[0083]** El procedimiento para analizar una biomolécula de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención comprende preparar una primera micropartícula 110 que incluye un primer medio de unión 111 que se une específicamente a una biomolécula 300 objeto de análisis (S1); preparar una segunda micropartícula 120 45 que incluye un segundo medio de unión 121 que se une a la biomolécula 300 objeto de análisis en un modo no específico (S21) y mezclar la primera micropartícula 110 y la segunda micropartícula 120 con la biomolécula 300 objeto de análisis (S3).

**[0084]** La primera micropartícula incluye una sustancia de expresión óptica o un material metálico, mientras 50 que la segunda micropartícula incluye un material magnético.

**[0085]** Cuando la primera micropartícula 110 y la segunda micropartícula 120 se mezclan con la biomolécula 300 objeto de análisis, los primeros medios de unión 111 de la primera micropartícula 110 se unen específicamente a la biomolécula 300 objeto de análisis mientras que el segundo medio de unión 121 de la segunda micropartícula 55 120 se une no específicamente a la misma biomolécula 300 objeto de análisis para formar un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120.

**[0086]** En este documento, el número de los primeros medios de unión 111 incluidos en la primera micropartícula 110 puede ser un factor importante para la sensibilidad y el límite de detección.

- [0087]** Para medir el número de los primeros medios de unión 111 incluidos en la primera micropartícula 110, el procedimiento puede comprender además mezclar y asociar una tercera micropartícula 230 que incluye una tercera unión, lo que significa que se une de manera orgánica al primer medio de unión 111 con la primera micropartícula 110, y medir una proporción de asociación entre la primera micropartícula 110 y la tercera micropartícula 230 después de la etapa de preparación de una primera micropartícula 110 que incluye un primer medio de unión 111 que se une específicamente a una biomolécula 300 objeto de análisis (S1).
- [0088]** A continuación, la tercera micropartícula 230 y el tercer medio de unión 231 se explican con referencia a la FIG. 6 en la que se ilustra estructuralmente un kit de análisis de biomoléculas 200.
- [0089]** La tercera micropartícula 230 puede incluir una sustancia de expresión óptica o un material metálico.
- [0090]** Para la sustancia de expresión óptica, se puede usar un fluorescente o un luminiscente.
- [0091]** A diferencia de la sustancia de expresión óptica 112 de la primera micropartícula 110, la sustancia de expresión óptica 232 de la tercera micropartícula 230 no puede recubrirse con la capa de recubrimiento 113. Cuando la sustancia de expresión óptica de la tercera micropartícula es luminiscente, no necesita una capa porque un luminiscente tiene una estructura generalmente estable. Por lo tanto, la sustancia de expresión óptica de la tercera micropartícula puede marcarse con el tercer medio de unión.
- [0092]** Además, la sustancia de expresión óptica 112 de la primera micropartícula y la sustancia de expresión óptica 232 de la tercera micropartícula 230 pueden absorber o reflejar luz con diferentes longitudes de onda respectivas. Es decir, la sustancia de expresión óptica 112 de la primera micropartícula y la sustancia de expresión óptica 232 de la tercera micropartícula pueden ser materiales diferentes entre sí.
- [0093]** El tercer medio de unión 231 puede ser un anticuerpo que reconoce la primera micropartícula 110 como un antígeno, o un polinucleótido monocatenario que se une complementariamente a la primera micropartícula 110. Por ejemplo, el tercer medio de unión puede ser un anticuerpo monoclonal o un oligonucleótido, pero no se limita a esto.
- [0094]** Se mide el número de los primeros medios de unión 111 que tiene la primera micropartícula 110. A este respecto, en primer lugar, la primera micropartícula 110 y la tercera micropartícula 230 se mezclan entre sí para formar un conjugado de la primera micropartícula 110 y la tercera micropartícula 230. A continuación, cuando la luz tiene longitudes de onda, la sustancia de expresión óptica 112 de la primera micropartícula 110 y la sustancia de expresión óptica 232 de la tercera micropartícula 230, respectivamente, la absorción o el reflejo se irradia sobre un conjugado de la primera micropartícula 110 y la tercera micropartícula, se pueden extraer dos curvas de calibración. La comparación de las dos curvas de calibración permite indicar el número de los primeros medios de unión 111 que incluye la primera micropartícula 110.
- [0095]** La segunda micropartícula 120 puede incluir un material magnético 122, y el procedimiento puede comprender además capturar y enriquecer la segunda micropartícula 120 (S22) después de preparar una segunda micropartícula 120 que incluye un segundo medio de unión 121 que se une a la biomolécula 300 objeto de análisis en un modo no específico (S21). Solo la segunda micropartícula 120 se puede seleccionar y aislar de una solución que la contenga.
- [0096]** Además, el procedimiento puede comprender además capturar y enriquecer la segunda micropartícula 120 (S4) después de mezclar la primera micropartícula 110 y la segunda micropartícula 120 con la biomolécula 300 objeto de análisis (S3). En este contexto, debido a que la segunda micropartícula 120 está asociada con la biomolécula 300 objeto de análisis que también está unida por la primera micropartícula 110, la captura de la segunda micropartícula 120 recoge un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120. Es decir, solo un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120 puede extraerse de la disolución que lo contiene.
- [0097]** Usando un dispositivo magnético, por ejemplo, un imán permanente, un imán eléctrico, etc., se puede capturar la segunda micropartícula 120. Se pueden llevar a cabo ambas o cualquiera de las dos etapas de captura de la segunda micropartícula 120 (S22, S4).
- [0098]** El enriquecimiento del conjugado de la segunda micropartícula 120 o primera micropartícula 110-

biomolécula 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120, minimiza la interferencia de otros materiales, lo que aumenta la sensibilidad de detección para la biomolécula objeto de análisis.

5 **[0099]** Después de mezclar la primera micropartícula 110 y la segunda micropartícula 120 con la biomolécula objeto de análisis, el procedimiento puede comprender además medir una concentración de la biomolécula 300 objeto de análisis (S5). La concentración de la biomolécula 300 objeto de análisis se puede analizar midiendo la sustancia de expresión óptica 112 de la primera micropartícula 110 con la ayuda de microscopía de fluorescencia inducida por láser (LIFM). Además, la concentración de la biomolécula 300 objeto de análisis puede determinarse usando un procedimiento de centrifugación. Dado que un conjugado de la primera micropartícula 110-biomolécula  
10 300 objeto de análisis-segunda micropartícula 120 tiene una gran masa en comparación con los otros materiales circundantes, se puede utilizar la centrifugación.

**[0100]** Además, la concentración de la biomolécula 300 objeto de análisis se puede medir usando un aparato de rayos X o una espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS).

15 **[0101]** El kit de análisis de biomoléculas 100 según una realización ejemplar de la presente invención puede determinar rápidamente la existencia y la cantidad de las biomoléculas distribuidas. La existencia y cantidad de la biomolécula distribuida se puede detectar con precisión de una manera simple. En detalle, en comparación con ELISA, el procedimiento es más simple con una mejora en el límite de detección y fiabilidad. Además, la medición del número del primer medio de unión 111 incluido en la primera micropartícula 110, o la captura de la segunda micropartícula 120 puede aumentar la sensibilidad de detección de la biomolécula 300 objeto de análisis.

**[0102]** La FIG. 6 es una vista estructural esquemática de un kit de análisis de biomoléculas 200 según otra realización ejemplar de la presente invención. A continuación, se omite la explicación de los elementos que son  
25 sustancialmente los mismos que los del kit de análisis de biomoléculas 100 mostrado en las FIGs. 1 y 2.

**[0103]** Al igual que el kit de análisis de biomoléculas 100 según una realización ejemplar de la presente invención, el kit de análisis de biomoléculas 200 puede comprender una primera micropartícula 210 que incluye un primer medio de unión 211 que se une específicamente a una biomolécula 300 objeto de análisis y una segunda micropartícula 220 que incluye un segundo medio de unión 221 que se une no específicamente a la biomolécula objeto de análisis, y opcionalmente una tercera micropartícula 230 que incluye un tercer medio de unión 231 que se une específicamente a la primera micropartícula 210.

**[0104]** Como se describió anteriormente, la segunda micropartícula 220 puede incluir un material magnético  
35 222 que puede estar recubierto con una capa de revestimiento de sílice 223. Además, los terceros medios de unión 231 pueden ser un anticuerpo que reconoce la primera micropartícula 210 como un antígeno, o un polinucleótido de cadena simple que se une complementariamente a la primera micropartícula 210.

**[0105]** Además, la tercera micropartícula 230 puede incluir una sustancia de expresión óptica o un material metálico en el que la sustancia de expresión óptica 232 puede ser fluorescente o luminiscente. Preferentemente, la tercera micropartícula 230 puede marcarse con un luminiscente no revestido. De este modo, pueden omitirse los procesos de recubrimiento de la sustancia de expresión óptica 232 con sílice y la unión de ciertos medios de unión a la capa de revestimiento, de modo que el kit de análisis de biomoléculas 200 se puede simplificar aún más.

45 **[0106]** La existencia del tercer medio de unión 231 que incluye la sustancia de expresión óptica puede permitir que la primera micropartícula 210 consista solo en los primeros medios de unión 211. Por lo tanto, es innecesario un enlace entre los primeros medios de unión 211 y la sustancia de expresión óptica 112, lo que conduce a simplificar la preparación de la primera micropartícula 210.

50 **[0107]** En otra realización ejemplar de la presente invención, el procedimiento para analizar una biomolécula puede comprender además añadir la tercera micropartícula 230 que incluye un tercer medio de unión 231 que se une específicamente a la primera micropartícula 210 (S3') después de mezclar la primera micropartícula 110 y la segunda micropartícula 120 con la biomolécula 300 objeto de análisis (S3).

55 **[0108]** Aunque se introduce adicionalmente la etapa de añadir la tercera micropartícula 230 que incluye un tercer medio de unión 231 que se une específicamente a la primera micropartícula 210 (S3'), la biomolécula puede analizarse en un proceso más simple porque la primera micropartícula 210 y la tercera micropartícula 230 es estructuralmente simple, como se describió anteriormente.

**[0109]** La FIG. 7 es una vista esquemática que ilustra un proceso de pretratamiento de enrofloxacin y ciprofloxacina. La FIG. 8 muestra nanopartículas de núcleo-corteza adsorbidas con isotiocianato de fluoresceína en una imagen de microscopio electrónico de barrido (a), una imagen no fluorescente en ausencia de láser (b) y una imagen fluorescente en presencia de láser (c). La FIG. 9 es una vista esquemática que ilustra un procedimiento experimental mediante el cual se analiza la biomolécula con enrofloxacin usando el kit de análisis de biomoléculas 100 según una realización ejemplar. La FIG. 10 muestra curvas de calibración de enrofloxacin extraídas usando el kit de análisis de biomoléculas 100 según una realización de la presente invención y microscopía de fluorescencia inducida por láser (a) y ELISA (b). La FIG. 11 es una vista esquemática que ilustra el análisis cuantitativo de anticuerpos en las nanopartículas de núcleo-corteza. La FIG. 12 muestra curvas de calibración de un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (a), y de nanopartículas de núcleo-corteza recubiertas con cianina (b).

**[0110]** A continuación, se dará una descripción detallada de los ejemplos de preparación y los ejemplos experimentales con referencia a las FIGs. 7 a 12.

15

## **MODO DE INVENCION**

EJEMPLO DE PREPARACION 1: Preparación de enrofloxacin y ciprofloxacina pretratadas

**[0111]** Como se ilustra en la FIG. 7, se picaron 0,5 g de una muestra de carne, y se mezclaron con enrofloxacin estándar (3-13 ng/ml, pH 6-7) y ciprofloxacina (3-13 ng/ml, pH 5-6). La muestra se pretrató con 4 ml de un disolvente de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), se agitó en vórtice y se sonicó, seguido de centrifugación para formar un sedimento. Este gránulo se trató con hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) para eliminar las grasas de este. Después de agitar en un vórtice y ultrasonicar de manera adicional, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$  para obtener enrofloxacin pretratada y ciprofloxacina.

25

EJEMPLO DE PREPARACION 2: fabricación del kit para analizar la enrofloxacin y la ciprofloxacina

(1) Inmovilización del anticuerpo en nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con FITC

30

**[0112]** Se sintetizó un núcleo de las nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con FITC (isotiocianato de fluoresceína, 90 %, Sigma-Aldrich) usando una microemulsión inversa, después de lo cual la superficie se modificó como una cubierta de sílice. Dado que la estabilidad de las nanopartículas núcleo-corteza tiene una influencia directa en el rendimiento del análisis, su tamaño y distribución se controlaron para el análisis cuantitativo. Se observó que las nanopartículas de sílice con núcleo-corteza sintetizadas que tienen un grupo carboxilo en su superficie tienen un diámetro de  $62,7 \pm 6,4$  nm, medido a partir de 30 partículas de la imagen SEM (microscopía electrónica de barrido) de la FIG. 8. Las partículas son relativamente homogéneas y esféricas. La visualización de fluorescencia verde con la ayuda de LIFM demostró la existencia de FITC en el núcleo.

35

**[0113]** Las nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con FITC se funcionalizaron con un grupo amino por reacción con 3-(aminopropil) trietoxisilano 5 mM (APTEOS, 99 %, Sigma-Aldrich). Para la inmovilización, se funcionalizó un anticuerpo con un grupo carboxilo a temperatura ambiente, usando 0,01 g de anhídrido succínico (99 %, Sigma-Aldrich) en DMSO. Después de la adición de 2 ml de acetona, se realizó la centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm para obtener nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con FITC como un sedimento. La adición de 10  $\mu\text{l}$  de IgM (obtenida de plasma humano, 95 %, Abcam, Reino Unido) en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) ( $\times 10$ , Sigma-Aldrich) a las nanopartículas permitió la inmovilización del anticuerpo a las nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con FITC. Para aumentar la eficacia de la inmovilización, se activó un grupo carboxilo usando una mezcla de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (2:1) como enlazador de longitud cero. La inmovilización de ciprofloxacina se realizó de la misma manera.

50

(2) Preparación de material magnético con núcleo-corteza conjugado con amina

**[0114]** Para uso en la extracción selectiva de un antibiótico a partir de una disolución de muestra estándar o enriquecida, se preparó material magnético funcionalizado con amina (4,5  $\mu\text{m}$  de tamaño, Dynabeads M-270 Amine, Invitrogen). El material magnético se revistió con sílice como se menciona anteriormente.

55

EJEMPLO DE PREPARACION 3: construcción del kit de análisis cuantitativo con anticuerpo inmovilizado en nanopartículas con núcleo-corteza

**[0115]** Se prepararon nanopartículas con núcleo-corteza a las que se conjugó al menos un anticuerpo para enrofloxacin de la misma manera que en (1) del Ejemplo de preparación 2, con la excepción de que se usó cianina 5 (Cy5) en lugar de FITC. Mientras tanto, se añadió una mezcla de EDC y NHS (2:1) como enlazador a FITC, y se incubó con 100 ml de un anticuerpo secundario al anticuerpo anti-enrofloxacin durante 2 horas.

**[0116]** En resumen, se hicieron reaccionar 50 µl de nanopartículas con núcleo-corteza adsorbidas con Cy5 con 10 µl de IgM como un anticuerpo para enrofloxacin. Luego, se añadieron 147 µl de anticuerpo secundario marcado con FITC (Dylight 488, Abcam, Reino Unido) para la conjugación, y los anticuerpos que no habían reaccionado se eliminaron mediante lavado con PBS.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: análisis cuantitativo de enrofloxacin usando muestra de pretratamiento del Ejemplo de preparación 1 y kit de análisis del Ejemplo de preparación 2

**[0117]** Como se muestra en la FIG. 9, la muestra de enrofloxacin pretratada obtenida en el Ejemplo de preparación 1 se hizo reaccionar con el kit de análisis de enrofloxacin construido en el Ejemplo de preparación 2. La concentración del kit de análisis de enrofloxacin fue aproximadamente el doble (30 ng/ml) de enrofloxacin estándar. Después de la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, se recogieron las partículas conjugadas usando un imán permanente y se lavaron con tampón PBS.

**[0118]** Para la visualización y detección fluorescente cuantitativa, se usaron LIFM y PMT construidos en laboratorio (tubo fotomultiplicador) equipados con una cámara CCD (Micro Publisher 5.0, Q-Imaging). El FITC que se adsorbía al núcleo se excitó utilizando un láser DPSS de 473 nm (50 mW, BL473T-050, SLOC), con un filtro de interferencia 525±25 nm (FF02-525, Semrock) colocado delante de PMT. Los fotones detectados por PMT se contaron mediante un sistema de conteo de fotones (C3866 y M8784, Hamamatsu).

**[0119]** Con referencia a la FIG. 10, se obtuvo un límite de detección de 54 pg/ml ( $\pm 3$  pg/ml) a partir de la curva de calibración (a). Además, el coeficiente de regresión lineal se calculó en 0,9998. Después de la optimización, la mezcla con 3-13 ng/ml de enrofloxacin de referencia alcanzó una recuperación del 78,1-103 %.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Análisis cuantitativo de anticuerpos en nanopartículas con núcleo-corteza mediante el kit de análisis del ejemplo de preparación 3

**[0120]** Mediante el kit de análisis cuantitativo construido en el Ejemplo de preparación 3, el anticuerpo inmovilizado en las nanopartículas con núcleo-corteza se analizó cuantitativamente. Con referencia a la FIG. 11, La medición de Cy5 por LIFM se realizó utilizando un láser He-Ne de 632,8 nm como fuente de excitación, con un filtro de interferencia de 692±25 nm instalado para la selección de longitud de onda.

**[0121]** Cuando los resultados se aplicaron a las curvas de calibración de la FIG. 12, se calculó que cada una de las nanopartículas con núcleo-corteza tenía aproximadamente 0,9 IgM inmovilizadas en la misma.

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Análisis cuantitativo de anticuerpos en nanopartículas con núcleo-corteza

**[0122]** Se detectó enrofloxacin mediante un kit ELISA (MaxSignal, BIO Scientific, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. En cada pocillo, se mezclaron 50 µl de una muestra estándar o enriquecida con enrofloxacin y 100 µl de un anticuerpo para enrofloxacin. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, las placas de pocillos se lavaron y secaron. Posteriormente, se añadieron 150 µl de un anticuerpo conjugado a HRP (peroxidasa de rábano picante) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción enzimática se terminó con 100 µl de un tampón de parada en cada pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

**[0123]** De vuelta a la FIG. 10, se obtuvo un límite de detección de 1,0 ng/ml ( $\pm 0,1$  ng/ml) a partir de la curva de calibración (b). Además, el coeficiente de regresión lineal se calculó en 0,974. Después de la optimización, la mezcla con 3-13 ng/ml de enrofloxacin de referencia alcanzó una recuperación del 69,2-76,9 %.

<Descripción de los números de referencia en los dibujos>

**[0124]**

- 100, 200: kit de análisis de biomoléculas
- 101: micropartícula
- 110, 210: primera micropartícula
- 111, 211: primeros medios de unión
- 5 112, 232: sustancia de expresión óptica
- 113, 123: capa de recubrimiento
- 120: segunda micropartícula
- 121: segundo medio de unión
- 122: material magnético
- 10 230: tercera micropartícula
- 231: tercer medio de enlace
- 300: biomolécula objeto de análisis



**REIVINDICACIONES**

1. Un kit para el análisis cualitativo y cuantitativo de una biomolécula objeto mediante espectrometría de masas plasmática de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que comprende:
- 5 una primera micropartícula que comprende:
- un núcleo que incluye un material metálico que se selecciona del grupo que consiste en lantano, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, lutecio, titanio, plomo, cadmio, óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ );
- 10 una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y
- un primer medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse específicamente a una biomolécula que se analizará, y
- una segunda micropartícula que comprende:
- 15 un núcleo que incluye un material magnético;
- una capa de revestimiento de sílice formada en el núcleo; y
- un segundo medio de unión, unido a la capa de revestimiento de sílice, para unirse no específicamente a la biomolécula a analizar, donde el segundo medio de unión es un grupo funcional que forma un enlace químico con la biomolécula objeto a analizar, donde el grupo funcional incluye al menos uno seleccionado de entre un grupo
- 20 aldehído, un grupo éter, un grupo éster, un grupo cetona, un grupo sulfuro, un grupo tiol, un grupo arilo, un grupo amina, un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, y
- una tercera micropartícula que incluye un tercer medio de unión que se une específicamente al primer medio de unión de la primera micropartícula y comprende una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente,
- 25 en el que el material metálico es un agregado de átomos metálicos individuales que varían en número de 104 a 106 átomos.
2. El kit de la reivindicación 1, en el que el primer medio de unión es un anticuerpo o un polinucleótido monocatenario.
- 30 3. El kit de la reivindicación 1, en el que el enlace químico es un enlace amida.
4. El kit de la reivindicación 1, en el que el núcleo de la primera micropartícula comprende además una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente.
- 35 5. El kit de la reivindicación 4, en el que el núcleo de la primera micropartícula incluye una combinación de isotiocianato de plomo y fluoresceína (FITC) o una combinación de isotiocianato de cadmio y rodamina B (RhBICT).

FIG. 1

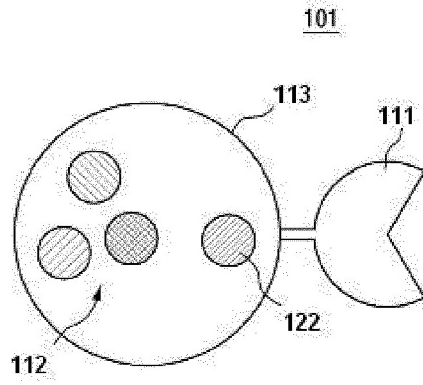


FIG. 2

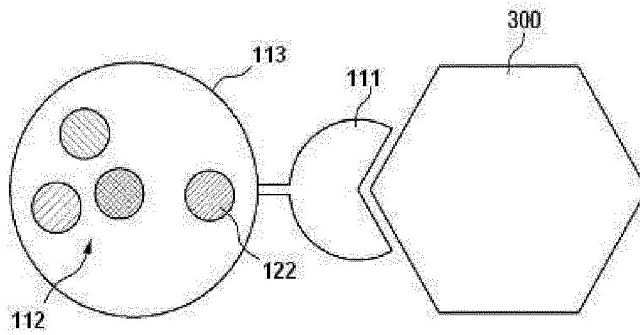


FIG. 3

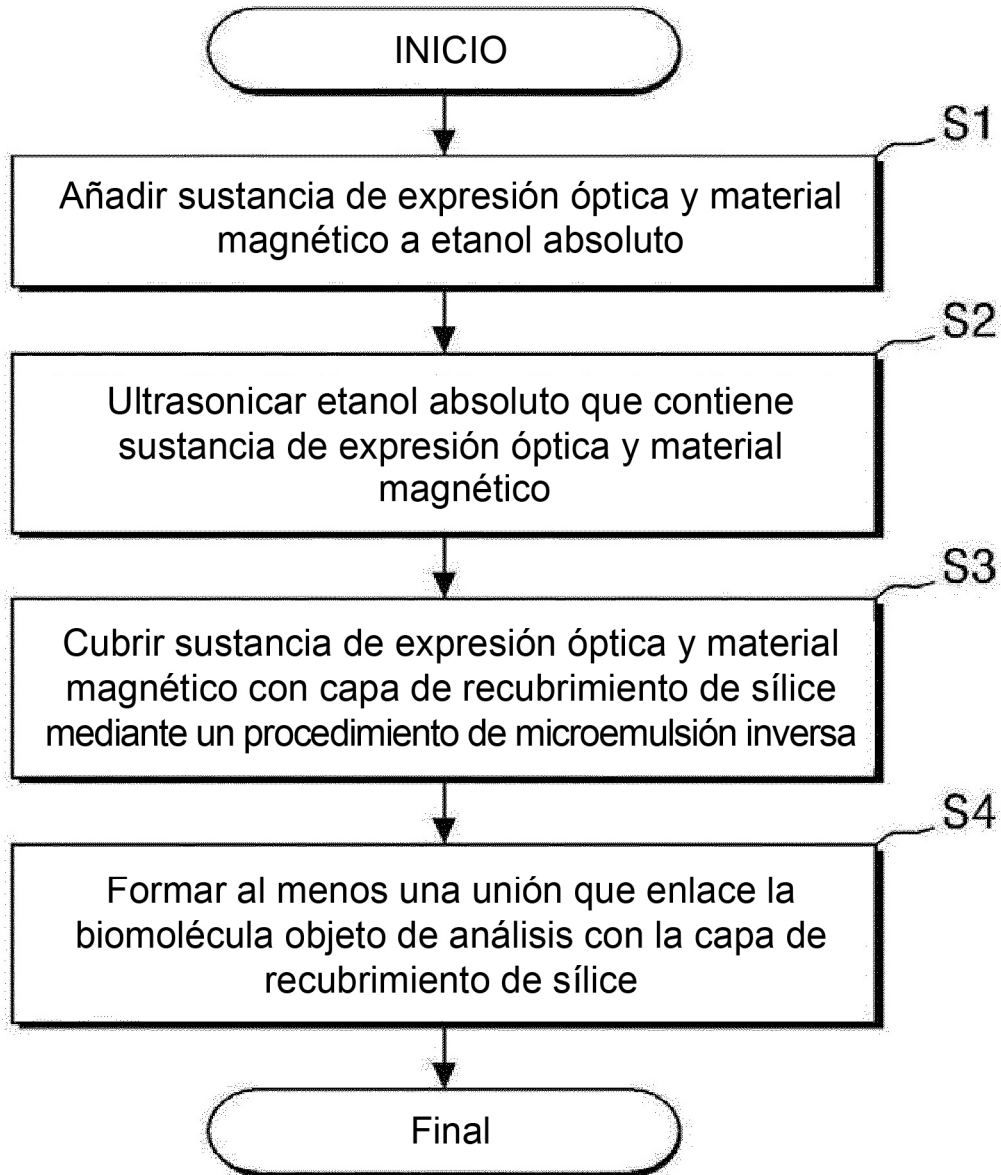


FIG. 4

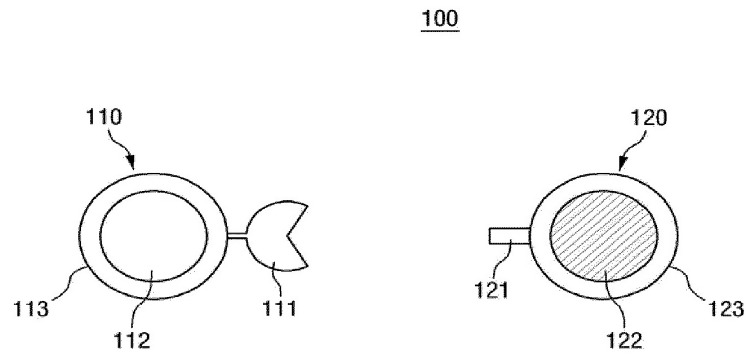


FIG. 5

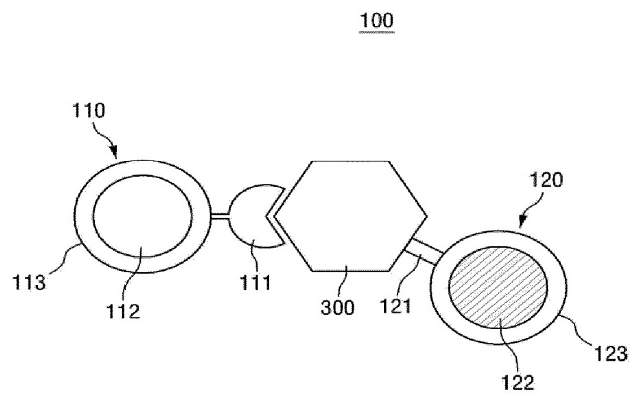


FIG. 6

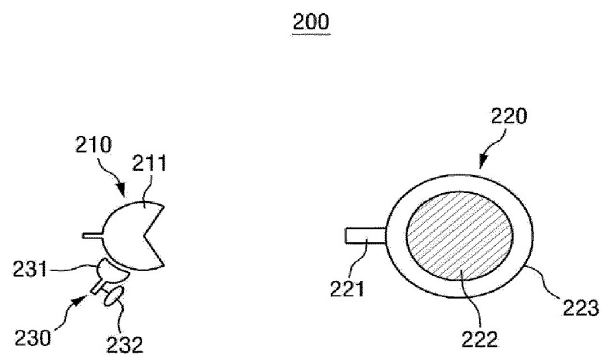


FIG. 7

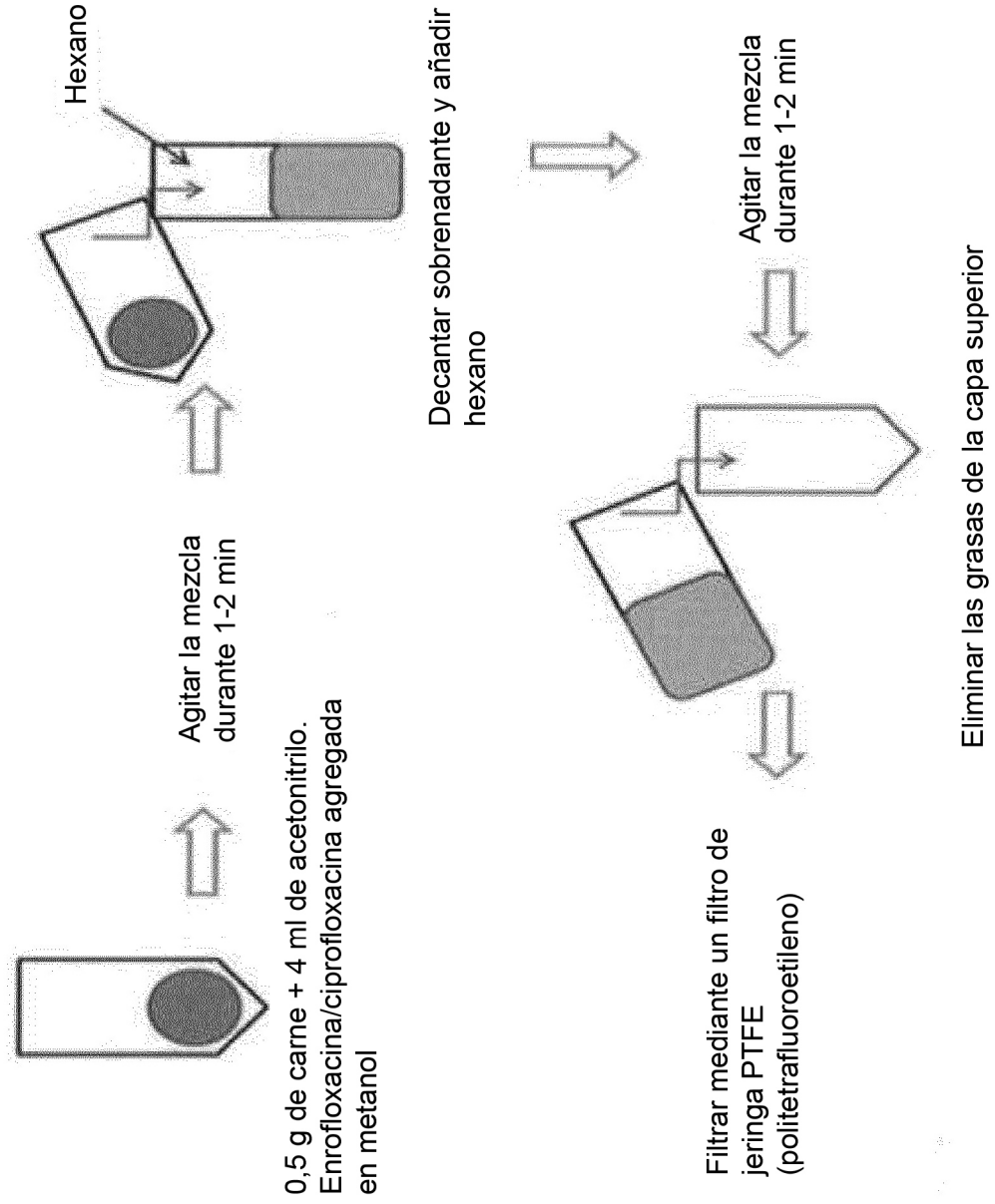


FIG. 8

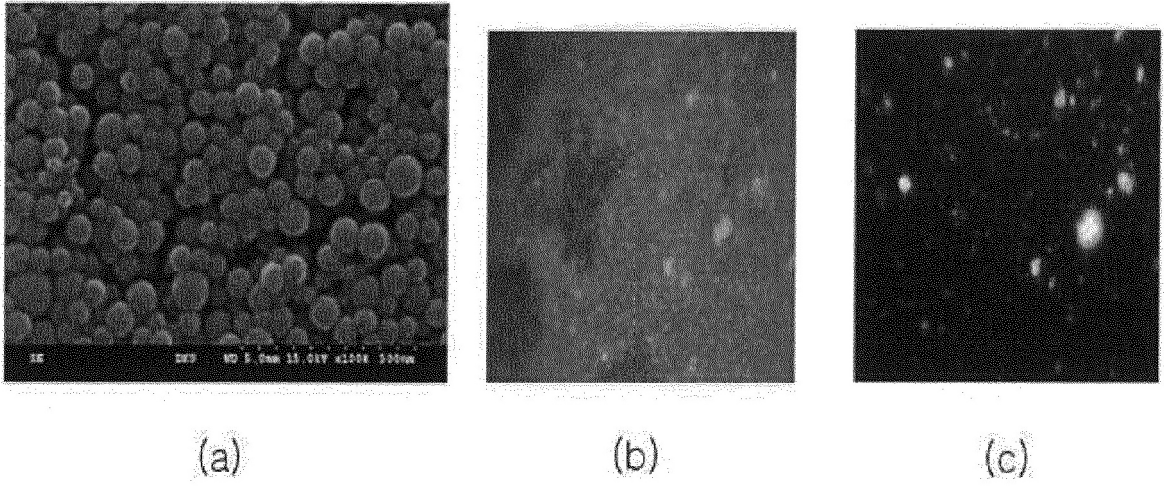


FIG. 9

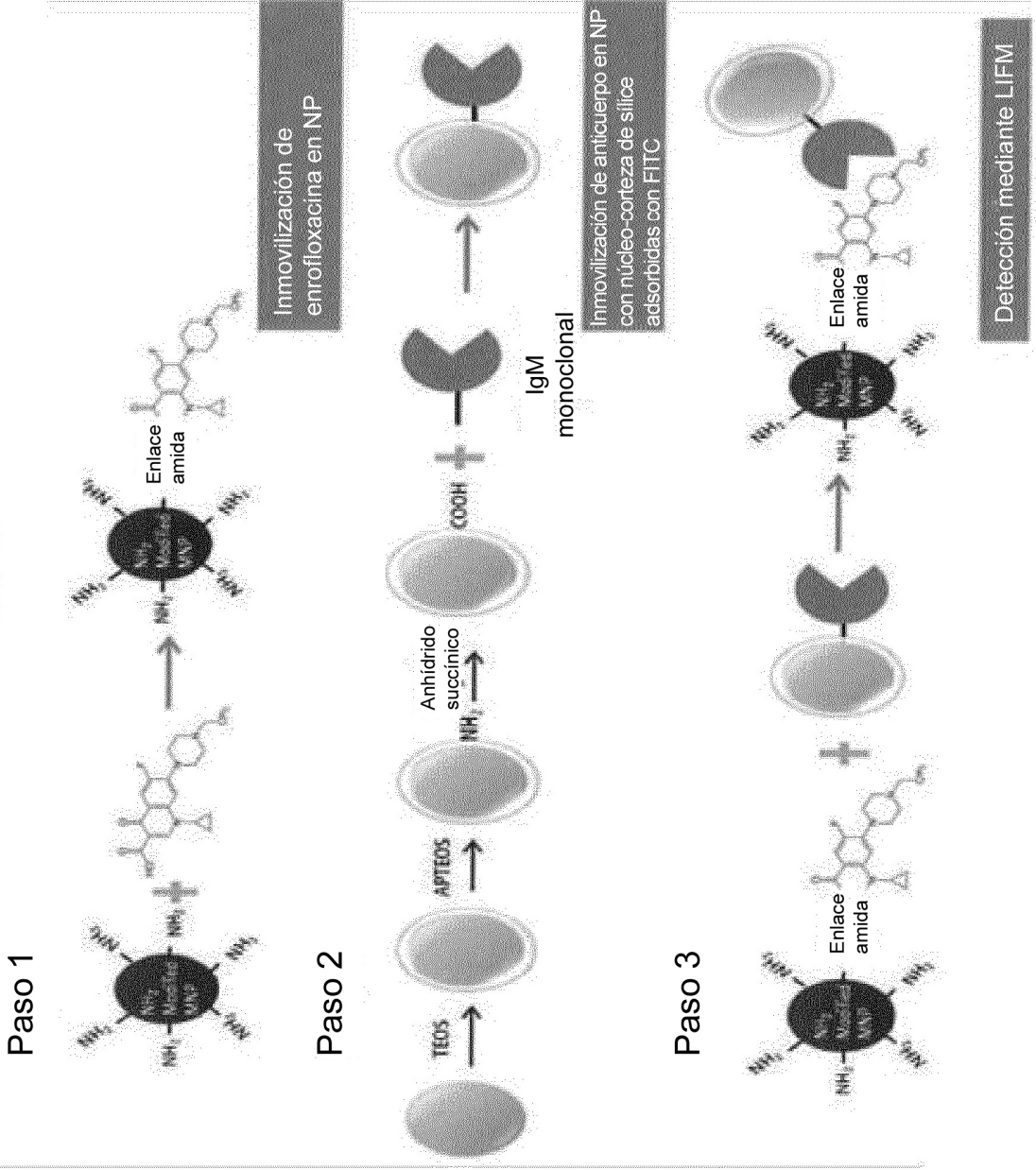
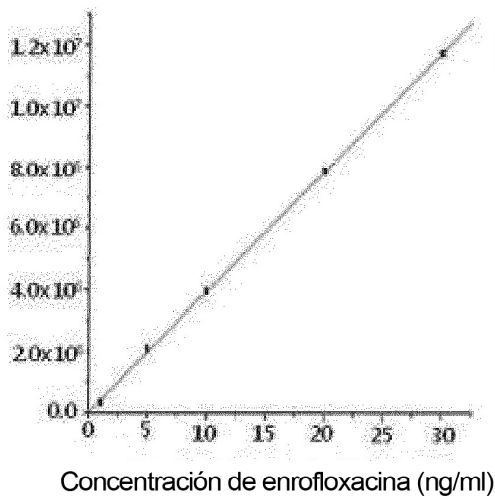
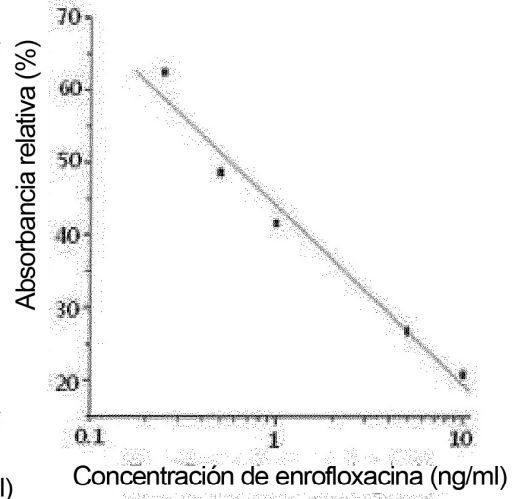


FIG. 10

Intensidad de fluorescencia



(a)



(b)

FIG. 11

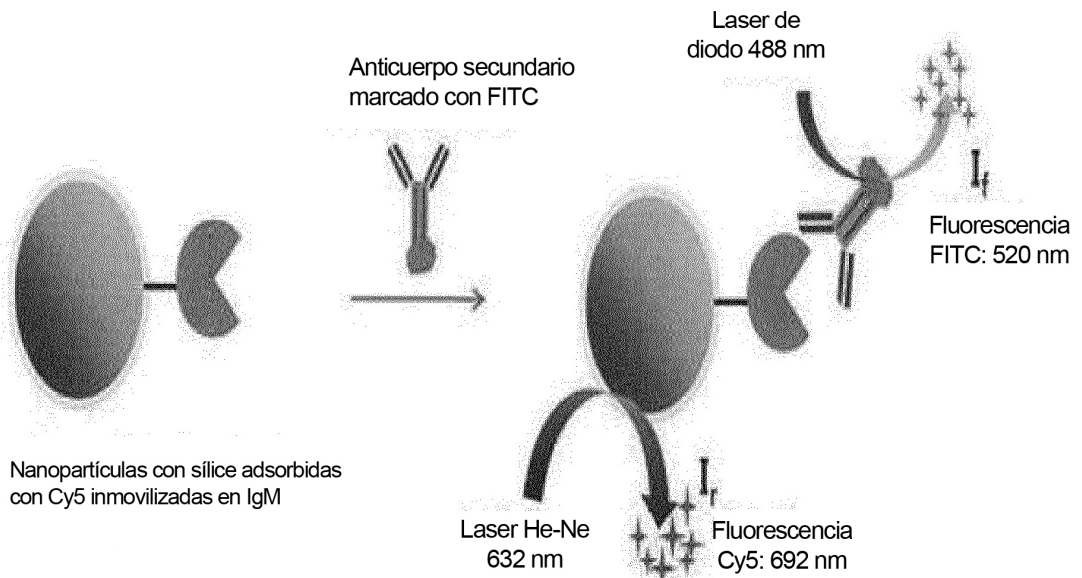
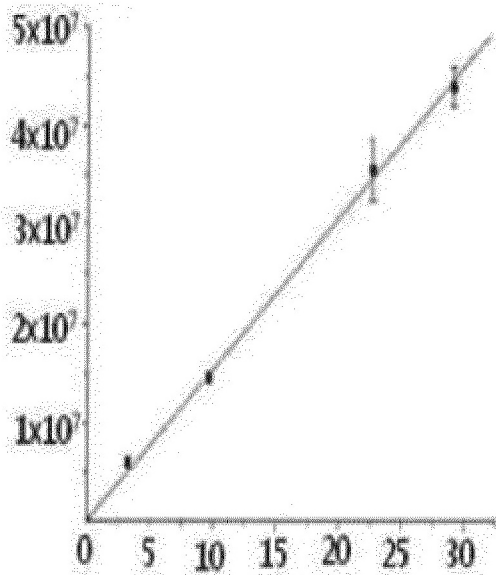




FIG. 12

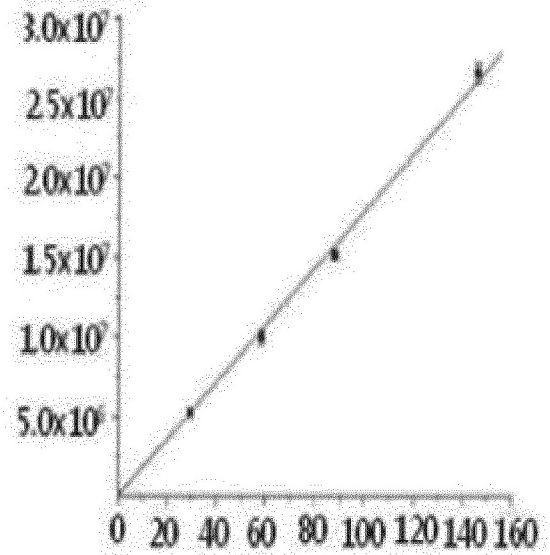
Intensidad de fluorescencia



Concentración de anticuerpo secundario marcado con FITC ( $\times 10^{11}$  ea/ml)

(a)

Intensidad de fluorescencia



Concentración de NP con sílice adsorbidas con Cy5 ( $\times 10^{11}$  ea/ml)

(b)

FIG. 13

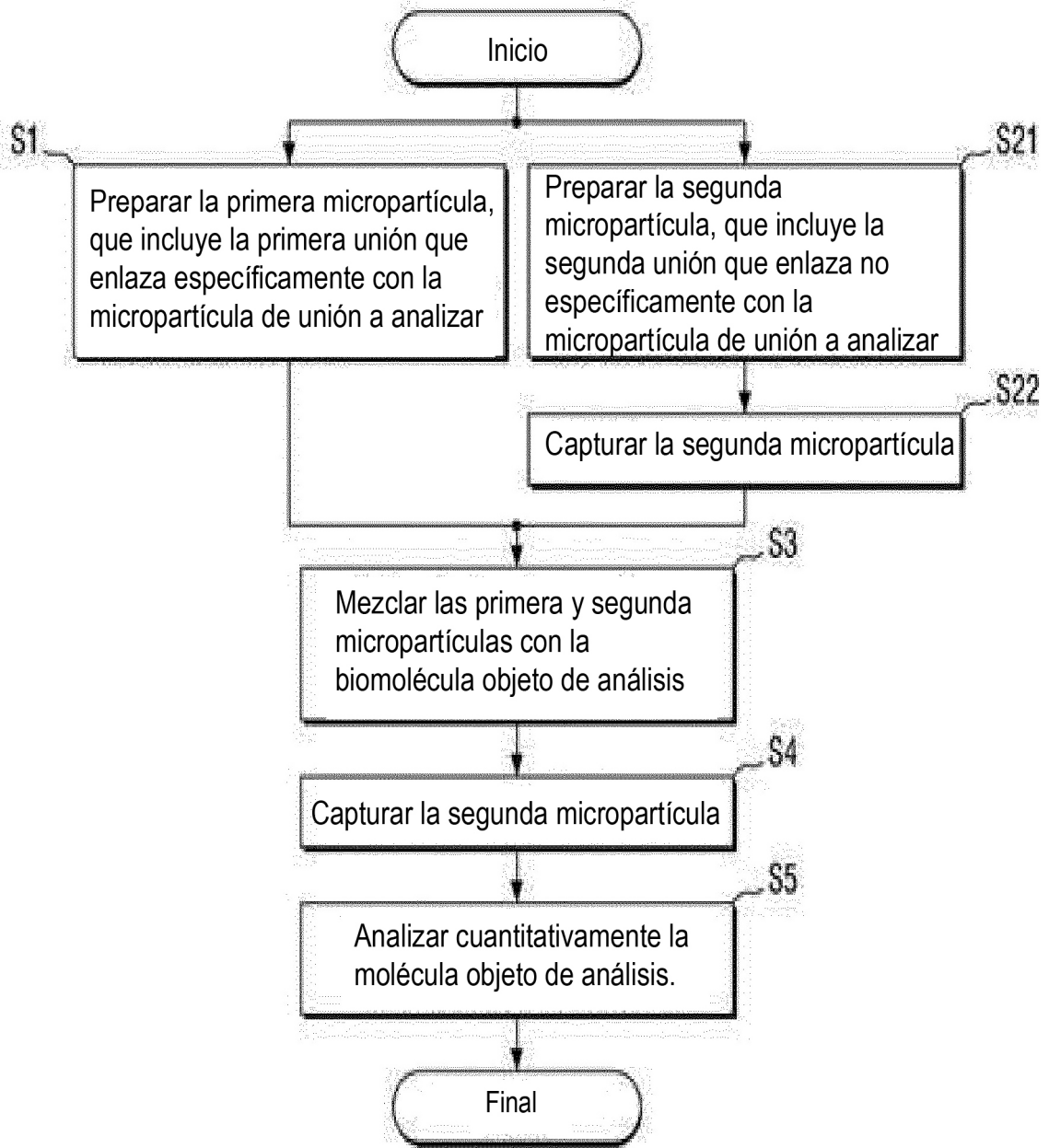


FIG. 14

