

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 488**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2017 PCT/EP2017/058035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2017 E 17715712 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3440463**

54 Título: **Ingeniería de la superficie intragotas para capturar una diana molecular**

30 Prioridad:

05.04.2016 EP 16305394

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

12.05.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)

4, rue Blaise Pascal

67000 Strasbourg, FR;

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y**

**CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE AUX
FRONTIÈRES DE LA CHIMIE (33.3%)**

72 Inventor/es:

WAGNER, ALAIN;

URSUEGUI, SYLVAIN;

RYCKELYNCK, MICHAËL;

PERNOD, KETTY y

GRIFFITHS, ANDREW, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 824 488 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

Ingeniería de la superficie intragotas para capturar una diana molecular

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la química de las interfases en sistemas basados en gotas, preferentemente en sistemas de microfluidos, y en particular a las interfases que permiten interacciones específicas y la captura de una molécula de interés.

10

Antecedentes de la invención

Las microgotas en los microfluidos proporcionan un compartimento en el que se pueden aislar especies o reacciones. Típicamente, las microgotas de una fase se generan en otra fase inmiscible aprovechando las inestabilidades capilares en un flujo microfluído de dos fases. La adición de un tensioactivo a una o ambas fases estabiliza las microgotas contra la coalescencia y les permite funcionar como microrreactores separados.

15

Dentro de las microgotas acuosas se puede realizar una amplia gama de reacciones químicas y biológicas, incluida, por ejemplo, la amplificación de ADN/ARN (Mazutis y otros, A.D. Lab Chip, 2009, 9, 2665-2672; Mazutis y otros, Anal. Chem., 2009, 81(12), 4813-4821), transcripción/traducción *in vitro* (Courtois y otros, ChemBiochem., 2008, 9(3), 439-446), catálisis enzimática (Baret y otros, Lab Chip, 2009, 9(13), 1850-1858) y ensayos basados en células (Clausell-Tormos y otros, Chem. Biol., 2008, 15(8), 427-437; Brouzes y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106(34), 14195-14200). El tamaño diminuto de las microgotas (volumen de 1 picolitro a 1 nanolitro) facilita rendimientos extremadamente altos (10^4 muestras por segundo) y una gran reducción en el consumo de reactivos.

20

Recientemente, se han diseñado tensioactivos con grupos funcionales para concentrar moléculas de interés en la interfase de las gotas. La química de la unión de etiquetas His se ha implementado para diseñar un tensioactivo con grupos funcionales que permita la adsorción específica de proteínas en la interfase interna de la gota (Kreutz y otros, 2009, J. Am. Chem. Soc. 131, 6042-6043). Sin embargo, este proceso está restringido a la captura de proteínas recombinantes que portan una etiqueta His.

25

Además, incluso después de la adsorción, la caracterización de las reacciones o especies dentro de una gota puede estar limitada por la diversidad de las moléculas presentes en la gota y sus posibles interacciones.

35 Por tanto, existe la necesidad de nuevos métodos para capturar una diana molecular de interés a partir de un medio complejo, que sean adecuados para la tecnología de microfluidos.

Resumen de la invención

40 La presente invención proporciona un nuevo método para capturar una diana molecular presente en la fase acuosa de una emulsión de agua en aceite, sobre la base del uso de un sistema de unión que comprende (a) un tensioactivo que porta un resto funcional en su grupo de cabeza hidrófilo y (b) una quimiosonda.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para capturar una diana molecular, dicho método comprende

a) proporcionar gotas de emulsión de agua en aceite que comprenden un tensioactivo con grupos funcionales en la interfase de las gotas, dicho tensioactivo con grupos funcionales comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales;

50 b) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con una quimiosonda presente o añadida en la fase acuosa de las gotas, dicha quimiosonda comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales, y

55 c) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con la diana molecular presente o añadida en la fase acuosa de las gotas, capturar así la diana molecular en la interfase interna de las gotas de emulsión, y en donde las etapas b) y c) se realizan de manera simultánea o secuencial, en cualquier orden.

60 La diana molecular se captura en la interfase interna de las gotas de emulsión a través de (i) la unión directa o indirecta de la quimiosonda al tensioactivo con grupos funcionales y (ii) la unión específica de la quimiosonda a la diana molecular. El tensioactivo con grupos funcionales puede comprender uno o varios restos funcionales en un grupo de cabeza hidrófilo. La quimiosonda puede interactuar directa o indirectamente con uno o varios de los restos funcionales presentes en una cabeza hidrófila del tensioactivo con grupos funcionales.

65 Preferentemente, el método de la invención se implementa mediante el uso de un sistema de microfluidos.

El método puede comprender además invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite para producir así gotas de emulsión de aceite en agua y exponer la diana molecular capturada en la superficie externa de las gotas de emulsión.

5 El método puede comprender, además, una etapa de recuperación, detección y/o cuantificación de la diana molecular capturada.

Preferentemente, la diana molecular es una proteína o un ácido nucleico.

10 Preferentemente, el resto de captura de la quimiosonda se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un Spiegelmer, un aptámero peptídico, un aptámero, un ligando o un sustrato de la diana molecular, un ácido nucleico que puede hibridar con la diana molecular y un fragmento de receptor que puede unirse a la diana molecular.

15 En modalidades preferidas, el tensioactivo con grupos funcionales es un tensioactivo dibloque o tribloque.

La quimiosonda puede unirse al tensioactivo con grupos funcionales mediante interacciones covalentes o no covalentes, preferentemente mediante interacciones covalentes.

20 La quimiosonda puede unirse directamente al tensioactivo con grupos funcionales mediante interacciones covalentes. Preferentemente, la cabeza hidrófila con grupos funcionales del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda portan cada uno un resto químico reactivo, los cuales pueden reaccionar entre sí mediante una reacción clic o una reacción de bioconjugación.

25 Alternativamente, la quimiosonda puede unirse al tensioactivo con grupos funcionales mediante un intermediario de unión. Preferentemente, la cabeza hidrófila con grupos funcionales del tensioactivo y el intermediario de unión portan cada uno un resto químico reactivo, los cuales pueden reaccionar entre sí mediante una reacción clic o una reacción de bioconjugación.

30 En particular, la reacción clic puede seleccionarse del grupo que consiste en cicloadición dipolar de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), cicloadición de alquino-azida promovida por tensión (SPAAC), reacciones de Diels-Alder con tetrazinas y alquinos o alquenos tensionados, cicloadición de tetrazina-isonitrilo reacción clic de tiol-alqueno tal como la cicloadición de maleimida-cisteína, y una cicloadición de sidnona-alquino, preferentemente es una cicloadición de alquino-azida promovida por tensión (SPAAC).

35 La quimiosonda puede unirse al tensioactivo con grupos funcionales mediante interacciones no covalentes, directamente o mediante un intermediario de unión. En particular, la interacción no covalente entre la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales puede depender de un sistema de afinidad o etiquetas proteicas.

40 En algunas modalidades, la diana molecular es de una entidad biológica encapsulada dentro de las gotas y el método comprende opcionalmente lisar dicha entidad para liberar dicha diana molecular.

Preferentemente, cada gota de emulsión comprende un único elemento genético o entidad biológica.

45 El presente documento describe, además, un kit para capturar una diana molecular de acuerdo con el método de la invención, que comprende

- un tensioactivo con grupos funcionales que comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales; y
- una quimiosonda que comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales.

50 El kit puede comprender además un intermediario de unión que puede unirse tanto a la quimiosonda como al tensioactivo con grupos funcionales, para actuar, así como un puente entre dichas dos entidades.

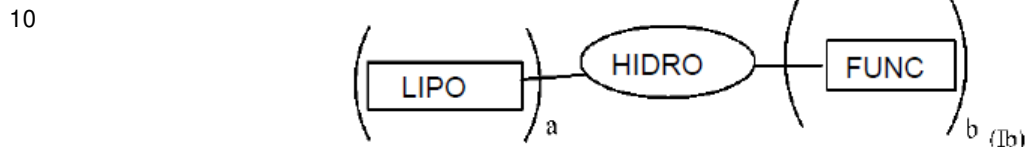
55 Además, el kit puede comprender adicionalmente

- tensioactivo(s) sin grupo(s) funcional(es); y/o
- una fase acuosa; y/o
- una fase oleosa; y/o
- un chip de microfluidos, preferentemente un chip de microfluidos que comprende un módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite o reinyectar la emulsión de agua en aceite, un módulo para crear una emulsión doble en comunicación continua y aguas abajo del módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite o reinyectar la emulsión de agua en aceite, y un módulo de inversión de fase en comunicación continua y aguas abajo del módulo para crear una emulsión doble; y/o

- un folleto con las instrucciones para el uso de dicho kit.

La presente invención se refiere, además, al uso de un kit como se describe en este documento para capturar una diana molecular de acuerdo con el método de la invención.

5 En algunas modalidades del método de la invención o del kit como se describe en este documento, el tensioactivo con grupos funcionales comprende o consiste en un resto de fórmula (Ib)

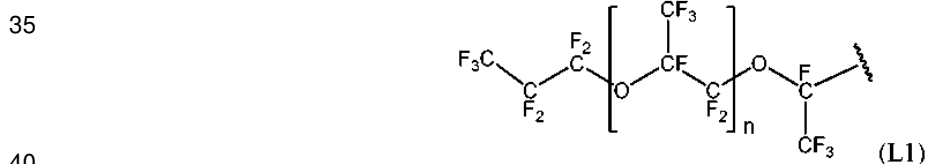


en donde:

- a y b son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 5,
- cada LIPO es una cola lipófila seleccionada independientemente del grupo que consiste en una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, opcionalmente interrumpida por uno o varios heteroátomos y opcionalmente sustituida por uno o varios grupos seleccionados de grupos alquilo C₁-C₃, halógenos tales como F, Cl o Br, -OH, -OMe, y -CF₃, una cadena de perfluoropoliéter, una cadena de perfluorocarbono y combinaciones de estos,
- cada HIDRO es una cabeza hidrófila que comprende un resto seleccionado independientemente de un grupo dimorfolinofosfato, un poliéter, una polieteramina, un poliglicerol y combinaciones de estos,
- cada FUNC es un resto funcional del tensioactivo seleccionado de un grupo alquinilo, un grupo azido, una biotina, una estreptavidina y una avidina.

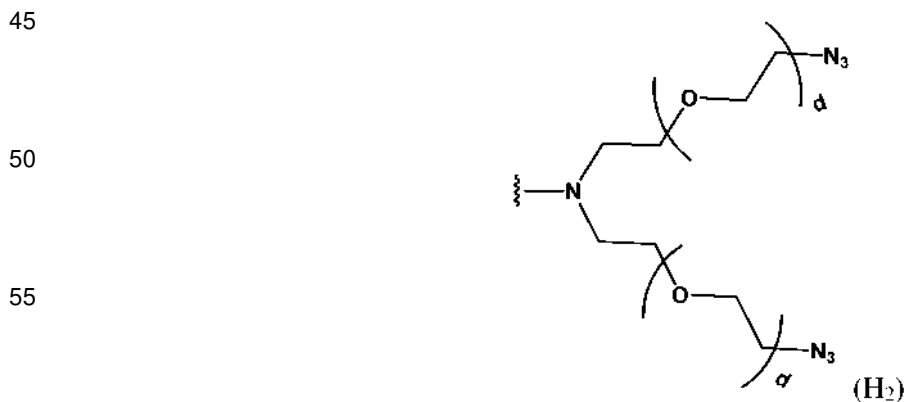
30 En algunas otras modalidades del método de la invención o del kit como se describe en este documento, el tensioactivo con grupos funcionales comprende

- una o dos colas lipófilas que comprenden, o consisten en el resto de fórmula (L1):



en donde n es un número entero de 25 a 45

- una cabeza hidrófila que porta al menos un resto (por ejemplo, 1 o 2) de fórmula (H2)



en donde d es un número entero de 1 a 12.

Breve descripción de los dibujos

65

Figura 1: Estrategia de síntesis de Krytox-pegio-alquino y Krytox-pegio-biotina.

Figura 2: Estrategia de síntesis de Krytox-peg₁₂-alquino y Krytox-peg₁₂-biotina.

Figura 3: Estrategia de síntesis de derivados de diKrytox-azida y diKrytox-biotina.

Figura 4: Síntesis del derivado de TAMRA-peg₆-BCN.

Figura 5: Síntesis del derivado de sulfoCy5-BCN.

Figura 6: Reacción de SPAAC en la superficie interna con el uso de derivados de sulfoCy5. A: Krytox-peg₁₂-azida al 2,5 %/sulfoCy5-BCN 300 nM, B: 008-F al 2,5 %/sulfoCy5-BCN 300 nM, C: Krytox-peg₁₂-azida al 2,5 %/sulfoCy5-alquino 300 nM.

Figura 7: Reacción de SPAAC en la superficie interna con el uso de Krytox-peg₁₂-azida 14 y TAMRA-peg₆-BCN 30. A: Krytox-peg₁₂-azida al 2,5 %/TAMRA-peg₆-BCN 300 nM, B: 008-F al 2,5 %/TAMRA-peg₆-BCN 300 nM, C: Krytox-peg₁₂-azida al 2,5 %/TAMRA-6-CO₂H 300 nM.

Figura 8: Doble funcionalización de la superficie de las microgotas. Fase oleosa: Krytox-peg₁₂-azida 14 al 2,5 % en Novec 7500/Fase acuosa: sulfoCy5-BCN 32 200 nM, TAMRA-peg₆-BCN 30 200 nM en Pluronic al 0,01 % (en PBS 1x).

Figura 9: Reacción de SPAAC después de la dilución de dibloque-azida 14 en el fluorotensioactivo comercial sin grupos funcionales 008-F. Fase oleosa: 2,5 % en Novec 7500 A = Krytox-peg₁₂-azida 14/008-F 80/20, B = Krytox-peg₁₂-azida 14/008-F 90/90, C = Krytox-peg₁₂-azida 14/008-F 95/5. Fase acuosa: A, B, C = sulfoCy5-BCN 32 300 nM, ACMS 1 μM en Pluronic al 0,01 % (en PBS 1x).

Figura 10: Polarización de la fluorescencia para un intervalo de concentración del dibloque-azida 14 en un fluorotensioactivo comercial (008-).

Figura 11: Polarización de la fluorescencia para un intervalo de concentración de la sonda sulfoCy5-BCN 32.

Figura 12: Reacción de SPAAC mediante el uso de diKrytox-peg₁₂-azida 23b. Fase oleosa: A, B, C = diKrytox-peg₁₂-azida 23b 2,5 % en Novec 7500. Fase acuosa: A = sulfoCy5-BCN 32 300 nM en Pluronic al 0,01 %, B = TAMRA-peg₆-BCN 30 300 nM en Pluronic al 0,01 %, C = sulfoCy5-BCN 32 200 nM + TAMRA-peg₆-BCN 30 200 nM en Pluronic al 0,01 %.

Figura 13: Principio de inversión de fase por desestabilización eléctrica.

Figura 14: Microchip para la generación de una emulsión doble e inversión de fase. (1) Entrada de la emulsión W/O. (2) Entrada de aceite espaciador. (3) Entrada de la fase acuosa externa. (4) Salida. (A) Electrodo (300 Vpp, 10 kHz). (B) Electrodo 0 V.

Figura 15: Configuración espectral para fluorescencia.

Figura 16: Fluorescencia de estreptavidina en gotas de aceite en agua con tensioactivo biotinilado (izquierda) y tensioactivo sin grupos funcionales (derecha).

Figura 17: Fluorescencia de estreptavidina en gotas de aceite en agua después de la inversión de fase.

Figura 18: Histograma que representa el valor medio de la fluorescencia de estreptavidina en las gotas de aceite.

Figura 19: Principio de la inversión de fase por electroporación.

Figura 20: Representación esquemática de la cubeta de electroporación.

Figura 21: Población de gotas después de aplicar 10, 25 o 50 V durante 100 ms.

Figura 22: Principio de la inversión de fase por desestabilización espontánea.

Figura 23: Microchip para la generación de una emulsión doble e inversión de fase por desestabilización espontánea. (1) Entrada de la emulsión W/O. (2) Entrada de aceite espaciador. (3) Entrada de la fase acuosa externa. (4) Salida.

Figura 24: Población de gotas después de la incubación durante 10 segundos, 1, 5 o 10 minutos en la línea de retardo.

Figura 25: Imágenes confocales de estreptavidina con AlexaFluor532 y fluorescencia del anticuerpo biotinilado antes de la inversión de fase.

Figura 26: Imágenes confocales de estreptavidina con AlexaFluor532 y fluorescencia del anticuerpo biotinilado después de la inversión de fase.

Figura 27: Estrategia de síntesis de fluorotensioactivos multiazidas

Figura 28: Estrategia de síntesis de reactivos de conjugación.

Figura 29: Sistema de microfluidos que comprende un módulo para reinyectar la emulsión de agua en aceite que comprende una estructura en forma de ψ, un módulo para crear una emulsión doble mediante una unión en forma de T y un módulo de inversión de fase.

Figura 30: Injerto de oligonucleótidos mediante reacción de SPAAC. Arriba: Señales obtenidas durante la reinyección de la emulsión, Rojo: láser de 642 nm, Azul: láser de 375 nm. Abajo: microscopía confocal, tamaño de la imagen: 367,83 μm x 367,83 μm, azul: láser de 405 nm, rojo: láser de 635 nm.

Figura 31: Injerto de oligonucleótidos y captura de secuencias complementarias. Microscopía confocal, tamaño de la imagen: 367,83 μm x 367,83 μm, Rojo: láser de 635 nm, Verde: láser de 488 nm.

Figura 32: Controles negativos que utilizan el fluorotensioactivo 008-F sin grupos funcionales. Microscopía confocal, tamaño de la imagen: 367,83 μm x 367,83 μm, Rojo: láser de 635 nm, Verde: láser de 488 nm.

Figura 33: Injerto de anticuerpo (trastuzumab) mediante la reacción de SPAAC. Microscopía confocal, tamaño de la imagen: 367,83 μm x 367,83 μm, Azul: láser de 405 nm, Rojo: láser de 635 nm.

Figura 34: Generador de gotas de 40 pL. Se indican las principales dimensiones del dispositivo de microfluidos. La profundidad fue de 40 μm. Los canales de los dispositivos se pasivaron con una solución al 1 % (v/v) de 1H, 1H, 2H-perfluorodecilo-triclorosilano (97 %, ABCR GmbH and Co.) en HFE7500 (3M) y posteriormente se lavaron con aire comprimido.

Figura 35: Imágenes de ARN capturado. Se obtuvieron imágenes de gotas de 40 pL que contenían ARN marcado

4, ADN de captura 5 y ácido 7-aminocumarin-4-metanosulfónico mediante excitación de la cumarina con un láser de 408 nm y detección de la luz emitida a 410-483 nm mientras que la fluorescencia verde se visualizó mediante excitación de Atto 488 con un láser de 488 nm y detección de la luz emitida a 499-553 nm.

Figura 36. Dispositivo de inversión de gotas. Se indican las principales dimensiones del dispositivo de microfluidos. La profundidad fue de 40 mm. Los canales de los dispositivos se pasivaron con tratamiento de PAH-PSS (Zinchenko y otros, 2014, Anal Chem 86: 2526-2533).

Figura 37. Imágenes de gotas antes y después del procedimiento de inversión. **A.** Esquema del proceso de inversión con el perfil de fluorescencia de las gotas registradas durante el proceso. Los electrodos se representan por las estructuras roja y azul a un lado del canal. Las gotas circulan de izquierda a derecha. **B.** Fila superior: gotas w/o/w antes del procedimiento de inversión, las gotas w/o/w (flecha blanca) se pueden distinguir fácilmente de las gotas vacías o/w (asterisco blanco) ya que solo las primeras mostraron una señal de cumarina (canal azul) dentro de las gotas. Además, el ARN capturado se materializa mediante la formación de un anillo verde dentro de las gotas ocupadas w/o/w. Fila inferior: gotas w/o/w convertidas en gotas o/w después del procedimiento de inversión. Si bien el anillo verde del ARN capturado todavía se observa en la superficie de la gota (superficie externa), la señal azul se ha eliminado por completo del interior de las gotas. En ambos conjuntos de imágenes, la fluorescencia verde libre que se observó fuera de las gotas se asignó a una interferencia de TAMRA concentrada que se excita ligeramente con el láser azul y emite ligeramente en el canal verde. Se obtuvieron imágenes de las gotas mediante excitación de la cumarina con un láser de 408 nm y detección de la luz emitida a 410-483 nm mientras que la fluorescencia verde se visualizó mediante excitación de Atto 488 con un láser de 488 nm y detección de la luz emitida a 499-553 nm y la fluorescencia naranja se visualizó mediante excitación de TAMRA con un láser de 561 nm y detección de la luz emitida a 559-735 nm.

Descripción detallada de la invención

Los inventores concibieron un nuevo método para capturar una diana molecular presente en la fase acuosa de una emulsión de agua en aceite.

El método se basa en el uso de un sistema de unión que comprende (a) un tensioactivo que porta un resto funcional en su grupo de cabeza hidrófilo y (b) una quimiosonda.

La quimiosonda comprende al menos dos dominios distintos, a saber (i) al menos un resto de captura que puede unirse específicamente a la diana molecular y (ii) al menos un dominio de unión que puede interactuar con el grupo funcional del tensioactivo a través de interacciones covalentes o no covalentes, directamente o mediante un intermediario de unión. Por tanto, la quimiosonda actúa como un elemento básico molecular entre el tensioactivo con grupos funcionales y la diana molecular, por lo que la diana molecular se captura en la superficie interna de las gotas de emulsión.

La captura de la diana molecular en la superficie interna de las gotas de emulsión tiene como objetivo promover su recuperación, detección y/o cuantificación.

El método para capturar una diana molecular desarrollado por los inventores puede usarse en varios campos biotecnológicos, en particular en el análisis proteómico de células individuales, y se adapta particularmente para implementarlo en sistemas de microfluidos.

Cabe destacar que el método de la invención no se limita a la captura de proteínas recombinantes que portan una etiqueta específica, como una etiqueta His. Puede implementarse para la captura de cualquier diana molecular de interés.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para capturar una diana molecular, dicho método comprende

a) proporcionar gotas de emulsión de agua en aceite que comprenden un tensioactivo con grupos funcionales en la interfase de las gotas, dicho tensioactivo con grupos funcionales comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales;

b) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con una quimiosonda presente o añadida en la fase acuosa de las gotas, dicha quimiosonda comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales, y

c) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con la diana molecular presente o añadida en la fase acuosa de las gotas, para capturar así la diana molecular en la interfase interna de las gotas de emulsión.

En el método de la invención, las etapas b) y c) pueden realizarse de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden.

En una modalidad, la fase acuosa de las gotas proporcionadas en la etapa a) comprende una diana molecular y una quimiosonda.

En otra modalidad, la fase acuosa de las gotas proporcionadas en la etapa a) comprende una diana molecular y después se añade una quimiosonda a la fase acuosa.

- 5 En una modalidad adicional, la fase acuosa de las gotas proporcionadas en la etapa a) comprende una quimiosonda, y después se añade una diana molecular a la fase acuosa.

10 En otra modalidad, la fase acuosa de las gotas proporcionadas en la etapa a) no comprende ni una diana molecular ni una quimiosonda. En esta modalidad, la diana molecular y la quimiosonda se añaden después a la fase acuosa de las gotas, simultánea o secuencialmente, en cualquier orden.

La adición de una quimiosonda o una diana molecular en la fase acuosa de una gota se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier método bien conocido por el experto, tal como fusión de gotas o picroinyección.

- 15 Cabe señalar que, como se detalla a continuación, cada gota puede comprender uno o varios tensioactivos con grupos funcionales, una o varias quimiosondas y una o varias dianas moleculares.

Gotas de emulsión de agua en aceite

- 20 En la etapa (a) del método, se proporcionan gotas de emulsión de agua en aceite. Estas gotas se caracterizan por comprender un tensioactivo con grupos funcionales en su interfase. En algunas modalidades, la fase acuosa de estas gotas puede comprender una diana molecular y/o una quimiosonda.

25 Como se usa en este documento, el término "gota" o "microgota" se refiere a una porción aislada de un primer fluido que está rodeada por un segundo fluido. Una gota puede ser esférica o de otras formas en dependencia del entorno externo. Típicamente, la gota tiene un volumen de menos de 1 μ l, preferentemente de menos de 1 nl, y con mayor preferencia de menos de 500 pL. Por ejemplo, una gota puede tener un volumen que varía de 10 a 500 pL, preferentemente de 10 a 250 pL, con mayor preferencia de 10 a 200 pL e incluso con mayor preferencia de aproximadamente 40 pL.

30 Los términos "gota de emulsión de agua en aceite", "gota de agua en aceite" y "gota w/o" se usan indistintamente en este documento y se refieren a una porción aislada de una fase acuosa que está completamente rodeada por una fase oleosa. El término "emulsión de agua en aceite" o "emulsión w/o" se refiere a una emulsión que comprende una fase acuosa en forma de gotas dispersas en una fase oleosa. Preferentemente, las gotas tienen una distribución homogénea de diámetros, es decir, las gotas pueden tener una distribución de diámetros de manera que no más de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,03 % o aproximadamente 0,01 % de las gotas tienen un diámetro promedio mayor que aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,03 % o aproximadamente el 0,01 % del diámetro promedio de las gotas. Preferentemente, la emulsión de agua en aceite es una emulsión monodispersa, es decir, una emulsión que comprende gotas del mismo volumen. Las técnicas para producir dicha distribución homogénea de diámetros son bien conocidas por los expertos (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/091763). Típicamente, la gota w/o tiene un volumen de menos de 1 nL y con mayor preferencia de menos de 500 pL. Preferentemente, una gota w/o tiene un volumen que varía de 10 a 500 pL, con mayor preferencia de 10 a 250 pL, incluso con mayor preferencia de 10 a 100 pL. En modalidades preferidas, una gota w/o tiene un volumen que varía de 15 a 50 pL, preferentemente de 20 pL a 40 pL.

50 La fase acuosa es típicamente agua o una solución tampón acuosa, como tampón Tris HCl, tampón Tris HCl/EDTA (TE), solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de acetato. En algunas modalidades, la fase acuosa puede contener un disolvente orgánico soluble en agua tal como etanol, metanol, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetilsulfóxido. Preferentemente, la fase acuosa es agua o una solución tampón acuosa.

55 La fase oleosa que se usa para generar las gotas w/o puede seleccionarse del grupo que consiste en aceite fluorado como aceite FC40 (3M®), FC43 (3M®), aceite FC77 (3M®), FC72 (3M®), FC84 (3M®), FC70 (3M®), HFE-7500 (3M®), HFE-7100 (3M®), perfluorohexano, perfluorooctano, perfluorodecano, aceite Galden-HT135 (Solvay Solexis), aceite Galden-HT170 (Solvay Solexis), Aceite Galden-HT110 (Solvay Solexis), aceite Galden-HT90 (Solvay Solexis), aceite Galden-HT70 (Solvay Solexis), líquidos Galden PFPE, líquidos Galden® SV o líquidos H-Galden® ZV; y aceites de hidrocarburos como aceites minerales, aceite mineral ligero, aceite de adepsina, Albolene, aceite de cable, aceite de bebé, drakeol, aceite de aislamiento eléctrico, aceite de tratamiento térmico, aceite hidráulico, aceite de lignito, parafina líquida, aceite de sello mineral, aceite de parafina, petróleo, aceite técnico, aceite blanco, aceites de silicona o aceites vegetales. Preferentemente, la fase oleosa es aceite fluorado como HFE-7500 (número CAS: 297730-93-9), aceite FC40 (número CAS: 51142-49-5), aceite Galden-HT135 (número CAS: 69991-67-9) o aceite FC77 (Número CAS: 86508-42-1), con mayor preferencia es HFE-7500 (también denominado Novec 7500). El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente una fase de aceite adecuada para implementar los métodos de la invención.

65 La emulsión de agua en aceite se puede preparar mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. En particular, la emulsión de agua en aceite se puede preparar en un sistema de microfluidos.

Dianas moleculares

En el método de la invención, el tensioactivo con grupos funcionales se pone en contacto con una diana molecular presente o añadida en la fase acuosa de las gotas.

La diana molecular puede disolverse o suspenderse en la fase acuosa.

Como se usa en este documento, el término "diana molecular" se refiere a cualquier tipo de moléculas a recuperar, detectar y/o cuantificar que puedan estar posiblemente presentes en la fase acuosa de la emulsión. La diana molecular puede ser una biomolécula, es decir, una molécula que está presente en organismos vivos, o un compuesto químico que no se encuentra de forma natural en organismos vivos como fármacos, tóxicos, metales pesados, contaminantes, etc. Preferentemente, la diana molecular es una biomolécula. Los ejemplos de biomoléculas incluyen, entre otros, ácidos nucleicos, por ejemplo, moléculas de ADN o ARN, proteínas tales como anticuerpos, enzimas o factores de crecimiento, lípidos tales como ácidos grasos, glicolípidos, esteroides o glicerolípidos, vitaminas, hormonas, neurotransmisores y carbohidratos, por ejemplo, mono, oligo y polisacáridos. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima. La proteína puede comprender cualquier modificación postraducciona tal como fosforilación, acetilación, amidación, metilación, glicosilación o lipidación. Como se usa en este documento, el término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Preferentemente, la diana molecular es una proteína o un ácido nucleico. Con mayor preferencia, la diana molecular es una proteína.

La diana molecular puede añadirse a la fase acuosa antes o después de formar la emulsión. Preferentemente, la diana molecular está presente en un medio complejo como un lisado celular, un extracto celular como un extracto de ADN, proteínas, lípidos o en forma de una célula o elemento genético, en donde dicho medio complejo se añade a la fase acuosa.

En una modalidad particular, la diana molecular se obtiene a partir de un elemento genético encapsulado dentro de las gotas. Preferentemente, cada gota contiene solo un elemento genético. Como se usa en este documento, un elemento genético puede ser una molécula o construcción molecular que comprende un ácido nucleico. El elemento genético puede comprender cualquier ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN o cualquier análogo, natural o artificial, de estos). Además, el componente de ácido nucleico del elemento genético puede estar unido, covalente o no covalentemente, a una o más moléculas o estructuras, que incluyen proteínas, entidades y grupos químicos, soportes en fase sólida tales como perlas magnéticas y similares.

En esta modalidad, las gotas pueden comprender además un sistema de transcripción y/o traducción *in vitro* o un sistema de amplificación de ácido nucleico.

Muchos sistemas adecuados de transcripción y/o traducción *in vitro* están disponibles comercialmente. Dichos sistemas típicamente combinan una ARN polimerasa de fagos de procariotas y un promotor (por ejemplo, T7, T3 o SP6) con extractos eucarióticos (por ejemplo, reticulocitos de conejo o germen de trigo) o procaríóticos (por ejemplo, *E. coli*), o sistemas de traducción libres de células reconstituidos con componentes purificados, para sintetizar proteínas a partir de plantillas de ADN. El sistema apropiado puede variar en dependencia de varios parámetros tales como la naturaleza de la diana molecular, por ejemplo, ácido nucleico o proteína, o la naturaleza del elemento genético, por ejemplo, organismo de origen, naturaleza del promotor, etc., como será evidente para el experto.

Los métodos para amplificar elementos genéticos compartimentados en gotas de emulsión son bien conocidos y ampliamente practicados por los expertos (véase, por ejemplo, Chang y otros, Lab Chip. 7 de abril de 2013; 13(7): 1225-42; Zanolí y Spoto, Biosensors 2013, 3, 18-43). En particular, la amplificación se puede realizar mediante cualquier técnica conocida, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) y la amplificación por recombinasa y polimerasa (RPA). El experto puede elegir fácilmente el método adecuado según la naturaleza del elemento genético encapsulado y la diana molecular.

En otra modalidad particular, la diana molecular es de una entidad biológica encapsulada con las gotas. Preferentemente, cada gota contiene solo una entidad biológica.

La entidad biológica puede ser cualquier organismo de interés que incluye, pero no se limita a, células procariotas, células eucariotas tales como células animales, vegetales, fúngicas o de algas, protoplastos o partículas virales tales como virus animales, vegetales o bacterianos.

La diana molecular puede ser secretada por la entidad biológica encapsulada en la gota o estar expuesta en la superficie de la entidad biológica.

La diana molecular también puede mantenerse dentro de la entidad biológica, por ejemplo, una proteína no secretada. En este caso, el método de la invención puede comprender además lisar dicha entidad biológica para liberar la diana molecular. Esta lisis puede realizarse por medios físicos, químicos o biológicos. En particular, la entidad biológica puede lisarse mediante el uso de radiación (por ejemplo, rayos UV, X o γ) o láser (véase, por ejemplo, Rau y otros, Appl. Phys. Lett. 2004. 84, 2940-2942). La lisis también puede ser inducida por choque osmótico o por la adición de un detergente o enzima (véase, por ejemplo, Kintses y otros, Chem. Biol. 2012. 19, 1001-1009; Novak y otros, Angew. Chem. Int. Ed. 50, 390-395 (2011); Brown, R. B. y Audet, J. R. Soc. Interface 5, S131-S138 (2008)). En este caso, se puede introducir un componente que altere el equilibrio osmótico o el detergente o enzima dentro de la gota mediante cualquier técnica conocida, tal como picoinyección o fusión de gotas.

Tensioactivos

La emulsión de agua en aceite comprende uno o varios tensioactivos. Dicho(s) tensioactivo(s) pueden ayudar a controlar u optimizar el tamaño, el flujo y la uniformidad de las gotas y a estabilizar las emulsiones acuosas. Los tensioactivos adecuados para preparar la emulsión de agua en aceite de la invención son típicamente no iónicos y contienen al menos una cabeza hidrófila y una o varias colas lipófilas, preferentemente una o dos colas lipófilas. Dicha(s) cabeza(s) hidrófila(s) y la(s) cola(s) pueden estar unidas directamente o mediante un resto espaciador. Como se usa en este documento, un tensioactivo dibloque se refiere a un tensioactivo que comprende una cabeza hidrófila y una cadena lipófila. Un tensioactivo tribloque se refiere a un tensioactivo que comprende una cabeza hidrófila y dos cadenas lipófilas. Los ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen, entre otros, ésteres de ácidos carboxílicos basados en sorbitán tales como monolaurato de sorbitán (Span 20), monopalmitato de sorbitán (Span 40), monoestearato de sorbitán (Span 60) y monooleato de sorbitán (Span 80); copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol, tales como el tensioactivo EA que es un copolímero tribloque (RainDance Technologies) y el tensioactivo DMP (dimorfolinofosfato) (Baret, Kleinschmidt, y otros, 2009); tensioactivos poliméricos basados en silicio tales como Abil EM 90; triton X-100; y tensioactivos fluorados tales como PFPE-PEG y poliéteres perfluorados (por ejemplo, Krytox-PEG, DuPont Krytox 157 FSL, FSM y/o ESH). En el contexto de la invención, los tensioactivos preferidos son tensioactivos fluorados, es decir, fluorotensioactivos, y en particular tensioactivos fluorados que comprenden una cadena de poliéter perfluorado.

La cantidad total de tensioactivo (incluidos los tensioactivos con grupos funcionales y sin ellos) en el aceite portador se elige preferentemente para asegurar la estabilidad de la emulsión y evitar la coalescencia espontánea de las gotas. Típicamente, el aceite portador utilizado para generar gotas comprende de 0,5 a 10 % (p/p), preferentemente de 1 a 8 % (p/p), con mayor preferencia de 1 a 5 % (p/p), e incluso con mayor preferencia de 2 a 5 % (p/p) de tensioactivo. En algunas modalidades preferidas, el aceite portador usado para generar gotas comprende de 2 a 2,5 % (p/p) de tensioactivo (incluidos tensioactivos con grupos funcionales y sin ellos).

Tensioactivos con grupos funcionales

Las gotas de emulsión de agua en aceite que se proporcionan en la etapa (a) comprenden un tensioactivo con grupos funcionales en su interfase. La interfase de estas gotas puede comprender sólo tensioactivo(s) con grupos funcionales o una mezcla de tensioactivos con grupos funcionales y sin grupos funcionales. La relación entre los tensioactivos con grupos funcionales y sin grupos funcionales puede variar de acuerdo con el uso específico del método de la invención y el experto en la técnica puede adaptarla fácilmente. Por ejemplo, el tensioactivo con grupos funcionales puede representar del 1 al 50 % (p/p) de los tensioactivos totales, preferentemente del 2 al 30 % (p/p) y con mayor preferencia del 5 al 20 % (p/p).

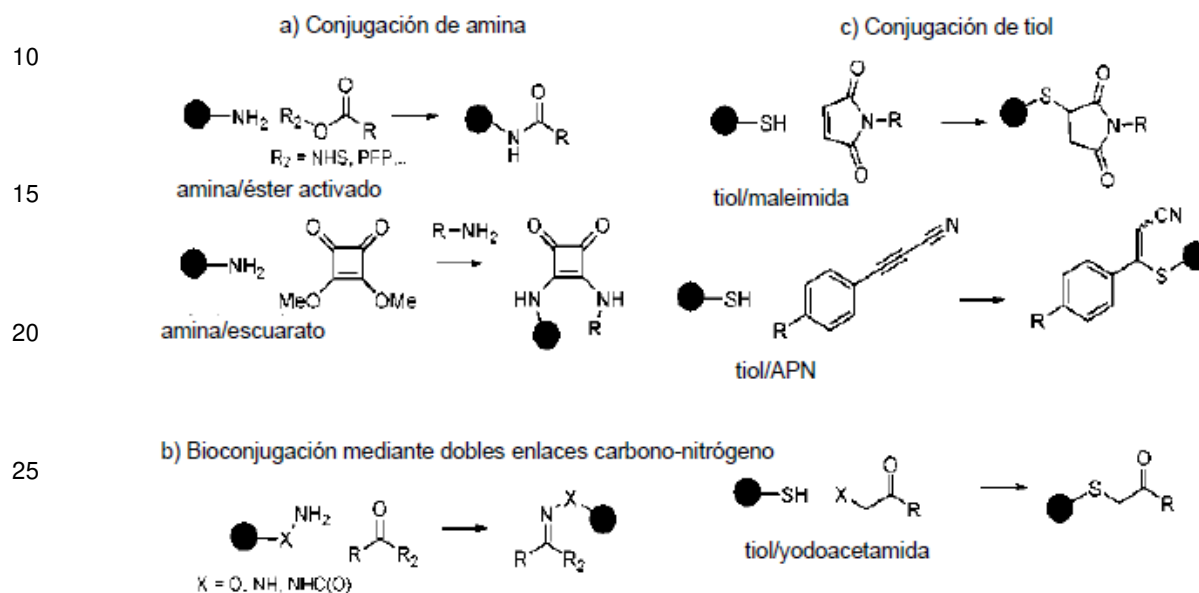
Como se usa en el presente documento, un "tensioactivo con grupos funcionales" se refiere a un tensioactivo que porta al menos un resto funcional en una de su(s) cabeza(s) hidrófila(s) o en su(s) cola(s) lipófila(s). En el contexto de la invención, el resto funcional está presente preferentemente en una cabeza hidrófila del tensioactivo. En modalidades preferidas, el término "tensioactivo con grupos funcionales" se refiere a un tensioactivo que comprende una o dos colas lipófilas, preferentemente dos colas lipófilas (es decir, un tensioactivo tribloque), unidas a una cabeza hidrófila con grupos funcionales.

El tensioactivo con grupos funcionales puede comprender uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) cabezas hidrófilas con grupos funcionales, por lo que dicho tensioactivo puede unirse a uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6)) quimiosondas (o intermediarios de unión). En modalidades en donde el tensioactivo comprende varias cabezas hidrófilas con grupos funcionales, estas cabezas pueden ser idénticas o diferentes y pueden unirse a quimiosondas (o intermediarios de unión) idénticos o diferentes.

Cada una de las cabezas hidrófilas del tensioactivo con grupos funcionales puede comprender uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) restos funcionales.

Como se usa en el presente documento, un "resto funcional" es prácticamente cualquier entidad química o biológica que proporcione una función de interés al tensioactivo. Por ejemplo, el resto funcional puede permitir crear una interacción covalente entre el tensioactivo y una entidad de interés. En otras palabras, el resto funcional puede comprender un grupo químico reactivo que puede promover la formación de un enlace covalente con la entidad de

interés. Por ejemplo, el resto funcional puede comprender un grupo químico reactivo adecuado para crear un enlace covalente mediante química clic o mediante reacción de bioconjugación. Las reacciones de bioconjugación abarcan reacciones entre aminoácidos tales como lisina, cisteína o tirosina con grupos reactivos como se detalla en Koniev, O., Wagner, A, Chem. Soc. Rev., 44, 5495 (2015). Por ejemplo, el resto funcional puede comprender un grupo maleimida o un resto escuarano, que pueden reaccionar con residuos de cisteína o tirosina, respectivamente. Las reacciones de bioconjugación se muestran, por ejemplo, en la siguiente tabla:



Alternativamente, el resto funcional puede unirse de manera selectiva y no covalente a una entidad de interés.

En la presente invención y como se explica a continuación, el tensioactivo con grupos funcionales participa en la captura de la diana molecular que está presente en la fase acuosa de la emulsión, a través de una interacción con la quimiosonda. De hecho, el tensioactivo con grupos funcionales permite inmovilizar la quimiosonda en la interfase interna de las gotas a través de su resto funcional y, por tanto, capturar la diana molecular. Por tanto, el tensioactivo con grupos funcionales debe poder unirse, directa o indirectamente (es decir, a través de un intermediario de unión), a la quimiosonda. Por tanto, el resto funcional se selecciona con respecto a la(s) pareja(s) quimiosonda(s)/tensioactivo(s) con grupos funcionales o en vista de la combinación de quimiosonda(s)/intermediario(s) de unión/tensioactivo(s) con grupos funcionales. Es evidente, en el contexto de la invención, que el resto funcional se selecciona para permitir una unión específica con la quimiosonda, incluso en presencia de un medio complejo.

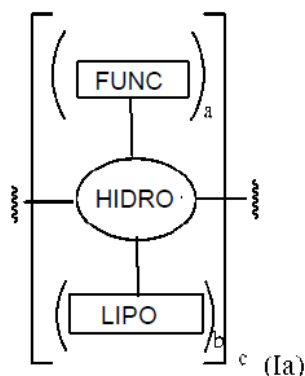
El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el resto funcional en vista de la entidad de interés que se unirá y el tipo de interacciones (interacciones covalentes o no covalentes) que se crearán entre el tensioactivo y la entidad de interés, en el presente caso la quimiosonda o un intermediario de unión.

Cada gota de la emulsión puede comprender uno o varios tensioactivos con grupos funcionales específicos de una o varias quimiosondas o intermediarios de unión.

En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales puede comprender un medio de detección, como un fluoróforo o una etiqueta MS, que puede estar presente en una de sus colas y/o cabezas.

En algunas otras modalidades o en modalidades adicionales, el tensioactivo con grupos funcionales puede comprender una o más cabezas hidrófilas con grupos funcionales, y cada cabeza hidrófila está opcionalmente unida a al menos una cola y cada cabeza hidrófila porta opcionalmente al menos un resto funcional. En otras palabras, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención puede ser un tensioactivo multibloque y/o multifuncional. Cada cabeza hidrófila, cola y resto funcional de un tensioactivo puede ser idéntico o diferente.

Por ejemplo, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención comprende, o consiste en, un resto de fórmula (Ia):



En donde

- FUNC significa un resto funcional,
- HIDRO significa una cabeza hidrófila,
- LIPO significa una cola lipófila,
- cada a y b son números enteros que se seleccionan independientemente de 0 a 20, preferentemente de 0 a 5, como 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y
- c es un número entero de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Con la condición de que dicho tensioactivo con grupos funcionales comprenda al menos un grupo LIPO unido a un resto HIDRO que porta al menos un FUNC.

Los inventores muestran que la relación de peso entre la parte hidrófila (*es decir, la(s) cabeza(s) HIDRO*) y la parte lipófila (*es decir, la(s) cadena(s) LIPO*) del tensioactivo con grupos funcionales puede tener algún efecto sobre la capacidad del tensioactivo con grupos funcionales para estabilizar la emulsión. En algunas modalidades, la relación de peso de "la parte lipófila" a "la parte hidrófila" en el tensioactivo con grupos funcionales es de 2,5 a 15, por ejemplo, de 2,5 a 7,5, de 3,0 a 7,0, de 6 a 15 o de 5,5 a 14.

Una relación de peso de 2,5 a 15 comprende una relación de peso de 2,5 a 5,0, de 5,0 a 6,0, de 6,0 a 7,0, de 7,0 a 10, de 10 a 12, de 12 a 13, de 13 a 14.

En algunas modalidades, cada cabeza HIDRO tiene un peso molecular que varía de 500 a 2500 g.mol⁻¹, por ejemplo, de 500 a 1500 g.mol⁻¹, de 600 a 1500 g.mol⁻¹, de 600 a 1000 g.mol⁻¹ o de 1000 a 1500 g.mol⁻¹. En algunas otras modalidades o en modalidades adicionales, cada cadena LIPO tiene un peso molecular de 4000 a 8500 g.mol⁻¹, por ejemplo, de 6000 a 7000 g.mol⁻¹, tal como aproximadamente 6 500 g.mol⁻¹.

En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales comprende, o consiste en, un resto de fórmula (Ia) que comprende al menos dos restos HIDRO (*es decir, c es al menos 2*), donde cada HIDRO porta al menos un resto FUNC (*es decir, cada a es en al menos 1*) y en donde b es 0 excepto para un resto HIDRO en el que b es al menos 1, preferentemente 2 o 3.

En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales comprende o consiste en un resto de fórmula (Ib)



En donde: a, b, LIPO, HIDRO y FUNC son como se definen en la fórmula (Ia).

En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales es de fórmula (Ib), en donde a es 1 o 2 y b se selecciona entre 1, 2, 3 y 4.

En algunas otras modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales es de fórmula (Ib) en donde a es un número entero de 1 a 6, con mayor preferencia 1, 2 o 3, y b es un número entero de 1 a 3, con mayor preferencia 1 o 2.

En otra modalidad, el tensioactivo con grupos funcionales comprende o consiste en un resto de fórmula (Ic)



(Ic)

- en donde a, HIDRO y FUNC son como se definen en la fórmula (Ib) o (Ia). Preferentemente, a es 1, 2 o 3.

En algunas modalidades preferidas, los restos LIPO, HIDRO y FUNC presentes en el tensioactivo con grupos funcionales, en particular como se representa en cualquiera de las fórmulas (Ia), (Ib) o (Ic) son los siguientes:

- cada LIPO es una cola lipófila seleccionada independientemente del grupo que consiste en una cadena de alquilo saturada o insaturada, opcionalmente interrumpida por uno o varios heteroátomos y opcionalmente sustituida por uno o varios grupos seleccionados de grupos alquilo C₁-C₃, halógenos tales como F, Cl o Br, -OH, -OMe, y -CF₃, una cadena de perfluoropolíéter, una cadena de perfluorocarbono y combinaciones de estos,
- cada HIDRO es una cabeza hidrófila que comprende un resto seleccionado independientemente de un grupo dimorfolinofosfato, un poliéter, una polieteramina, un poliglicerol y combinaciones de estos,
- cada FUNC es el resto funcional del tensioactivo y puede interactuar con la quimiosonda o el intermediario de unión a través de interacciones covalentes o no covalentes.

Cuando el tensioactivo comprende varios grupos LIPO, dichos LIPO pueden ser iguales o diferentes. Cuando el tensioactivo comprende varios grupos HIDRO, dichos grupos HIDRO pueden ser iguales o diferentes.

Cuando el tensioactivo comprende varios restos FUNC, dichos grupos FUNC pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades, el tensioactivo comprende al menos dos FUNC distintos. La presencia de restos FUNC distintos en los tensioactivos con grupos funcionales puede ser útil para capturar selectivamente dianas moleculares distintas.

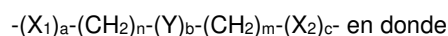
LIPO e HIDRO, por un lado, y HIDRO y FUNC, por otro lado, pueden unirse directamente o pueden unirse a través de un grupo conector o un enlazador. Un grupo conector se refiere a un resto que comprende un heteroátomo y que puede conectar dos grupos químicos. Preferentemente, el grupo conector se selecciona entre -O-, C(=O)-OC(O)-, -C(O)O-, -OC(O)O-, -S-, -SS-, -SC(O)-, -OC(S)-, -NR¹-, -NR¹C(O)-, -C(O)NR¹-, -NR¹C(S)-, -C(S)NR¹-, -OC(O)S-, -OC(S)O-, -SC(O)O-, -OC(S)S-, -SC(O)S-, -SC(S)O-, -SC(S)S-, -OC(O)NR¹-, -OC(S)NR¹-, -NR¹C(S)O-, -NR¹C(O)S-, -NR¹C(O)NR²-, -NR¹C(S)NR²-, -SC(O)S-, -SC(S)O-, -S(O)-, -S(O)₂-, -O(CR¹R²)O-, -C(O)O(CR¹R²)O-, -OC(O)O(CR¹R²)O-, -P(O)(R¹)-, -P(O)(OR¹)-, -P(O)(R¹)O-, -OP(O)(OR¹)-, -OP(O)(R¹)O-, -NR¹P(O)(R²)-, -NR¹P(O)(OR²)-, -NR¹P(O)(R²)O-, -OP(O)(OR¹)- y -OP(O)(R¹)O- en donde R¹ y R² son independientemente H o CH₃, preferentemente H o mediante un enlazador.

Como se usa en este documento, un "enlazador" se refiere a cualquier grupo químico que comprende de 2 a 40, preferentemente de 2 a 30 átomos de carbono y al menos un grupo conector como se describió anteriormente. En la tabla 4 de la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0240883 se describen ejemplos de enlazadores. Otro ejemplo de un enlazador apropiado es un resto de ácido iminodiacético.

En algunas modalidades, el enlazador comprende al menos un resto cíclico. El resto cíclico tiene típicamente de 5 a 14 átomos en el anillo y puede comprender uno o varios heteroátomos tales como O, N o S. El resto cíclico puede ser alifático o aromático. El resto cíclico puede comprender 2 o 3 anillos que están fusionados entre sí. Los restos cíclicos preferidos son anillos de 5 átomos o de 6 átomos.

Los restos cíclicos de interés abarcan, entre otros, pirrol, furano, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, triazol, fenilo, naftaleno, piridina, piperidina, piridazina, pirimidina, pirazina, oxazina, dioxina, triazina, piperazina, morfolina y tiazina.

En algunas otras modalidades, el enlazador es una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, opcionalmente interrumpida por uno o varios heteroátomos o por uno o varios ciclos o heterociclos; y opcionalmente sustituida con uno o varios grupos seleccionados entre grupos alquilo C₁-C₃, halógenos tales como F, Cl o Br, -OH, -OMe y -CF₃; y dicho enlazador tiene un grupo conector en al menos uno de sus extremos. En algunas modalidades, el enlazador puede tener la fórmula:



- a, b y c son independientemente 1 o 0,
- n y m son independientemente un número entero de 0 a 30, preferentemente de 0 a 10, tal como 1, 2, 3, 4 o 5.
- X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de los grupos conectores descritos anteriormente, en particular -O-, -NH₂, -C(=O)-, OC(=O), (C=O)O, NHC(=O), C(=O)NH, NHC(=O)NH, NHC(=O)O y OC(=O)NH,
- Y se selecciona de O, NH y anillos aromáticos o alifáticos de tres a ocho, preferentemente de cinco a seis

miembros. En algunas modalidades, Y es un heterociclo, preferentemente un heterociclo de cinco miembros, como triazol, pirrol, tiofeno o imidazol.

5 En algunas modalidades alternativas o adicionales, el tensioactivo con grupos funcionales comprende al menos un enlazador escindible. El al menos un enlazador escindible preferentemente une un resto LIPO y un resto HIDRO. Los enlazadores escindibles pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en enlazadores escindibles enzimáticamente, enlazadores sensibles a nucleófilos/bases, enlazadores sensibles a la reducción, enlazadores fotoescindibles, enlazadores sensibles a electrófilos/ácidos y enlazadores sensibles a la oxidación, por ejemplo, como se ilustra en Leriche, y otros, *Bioorg. Med. Chem.* 20, 571 (2012). Otros ejemplos de enlazadores escindibles se pueden encontrar en West y otros, *Current Drug Discovery Technologies*, 2, 123 (2005).

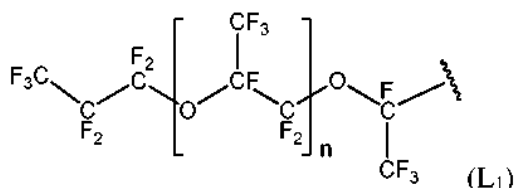
Preferentemente, los tensioactivos comprenden una o dos cadenas LIPO, que pueden ser idénticas o diferentes. En algunas modalidades, los tensioactivos comprenden dos cadenas LIPO idénticas.

15 En algunas modalidades, cada LIPO presente en el tensioactivo se selecciona independientemente de cadenas de perfluoropoliéter y cadenas de perfluorocarbono. Preferentemente, cada LIPO es una cadena de perfluoropoliéter que comprende de 10 a 50 monómeros, preferentemente de 25 a 45 monómeros.

20 Los ejemplos de cadenas de perfluoropoliéters abarcan, entre otros, poli(óxido de (per)fluorometileno), poli(óxido de (per)fluoroetileno), poli(óxido de (per)fluoropropileno) (también denominado óxido de polihexafluoropropileno) y poli(óxido de (per)fluorobutileno).

En algunas modalidades, cada LIPO es una cadena de óxido de polihexafluoropropileno que comprende de 10 a 50 monómeros. Por ejemplo, cada LIPO puede comprender el siguiente resto (L_1):

25



30

35 en donde n es un número entero de 25 a 45, preferentemente de 35 a 40.

En algunas modalidades, cada HIDRO comprende al menos una cadena de poliéter que comprende de 2 a 50 monómeros, preferentemente de 2 a 30 monómeros, con mayor preferencia de 2 a 10 monómeros, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 monómeros. HIDRO puede comprender varias cadenas de poliéter, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o 7 cadenas de poliéter, y cada cadena de poliéter comprende de 2 a 50 monómeros. Las cadenas de poliéter se conectan preferentemente de manera lineal. La conexión entre dos cadenas de poliéter consecutivas puede ser de cualquier tipo y puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de un grupo conector o un enlazador como se describió anteriormente. Cada cadena de poliéter puede portar uno o varios restos FUNC, que pueden ser iguales o diferentes.

40

45 Los ejemplos de cadenas de poliéter adecuadas incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, poli(etilenglicol) diamina y poli(propilenglicol) diamina.

Por ejemplo, HIDRO puede comprender una o varias cadenas de polietilenglicol que comprenden de 2 a 30, preferentemente de 2 a 10 monómeros, en donde dichas cadenas de polietilenglicol se conectan linealmente.

50

Como se detalla adicionalmente a continuación, cada resto funcional FUNC puede ser de cualquier tipo, con la condición de que FUNC comprenda un resto que permita crear interacciones covalentes o no covalentes con la quimiosonda o el intermediario de unión de interés.

55 Por tanto, cada FUNC se selecciona según la interacción que se desea lograr con dicha quimiosonda o intermediario de unión. Los ejemplos de FUNC se detallan más adelante en la sección titulada "Interacciones entre el tensioactivo funcional y la quimiosonda".

60 Los restos FUNC presentes en el tensioactivo pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales comprende de 1 a 4 restos FUNC, preferentemente uno o dos restos FUNC.

En algunas modalidades, cada resto FUNC tiene un peso molecular inferior a $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, preferentemente inferior a $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

65 En algunas modalidades adicionales, cada FUNC comprende un grupo químico reactivo adecuado para realizar una reacción clic, como una adición dipolar de azida-alquino y cicloadiciones de alquino tensionado con derivados de

iminosidnona o sidnona como se describe en los documentos PCT/EP2015/060805 y PCT/EP2015/063750.

Por ejemplo, cada FUNC puede comprender un grupo azido o un grupo alquino, tal como un grupo alquinilo tensionado. Los grupos alquinilo tensionados abarcan, entre otros, los soportes de ciclooctino (a) - (f):

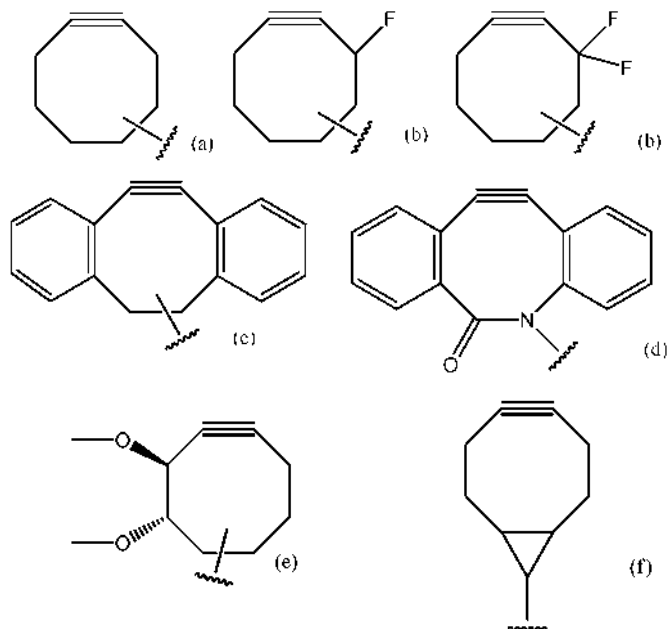
5

10

15

20

25



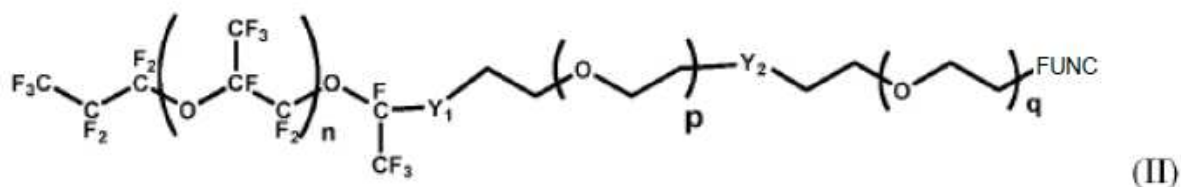
30

En algunas otras modalidades, cada FUNC permite promover interacciones no covalentes directas o indirectas con la quimiosonda. Cada FUNC puede seleccionarse del grupo que consiste en biotina, avidina y estreptavidina, preferentemente biotina.

35

En algunas modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales es de fórmula (Ic). En algunas modalidades más específicas, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención es un tensioactivo dibloque de fórmula (II):

40



45

en donde

50

- n es un número entero de 25 a 45, preferentemente de 35 a 40,
- p y q son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 10, preferentemente de 2 a 8,
- Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente de conectores y enlazadores como se describió anteriormente, en particular Y₁ e Y₂ se seleccionan del grupo que consiste en -O-, -NH₂, -C(=O)-, OC(=O), (C=O)O, NHC(=O), C(=O)NH, NHC(=O)NH, NHC(=O)O y OC(=O)NH, y
- FUNC es como se define adicionalmente a continuación y se refiere al resto funcional del tensioactivo funcional. Por ejemplo, FUNC comprende un resto seleccionado de una biotina, un grupo azido, un grupo alquinilo, en particular un grupo alquinilo tensionado como se describe a continuación.

55

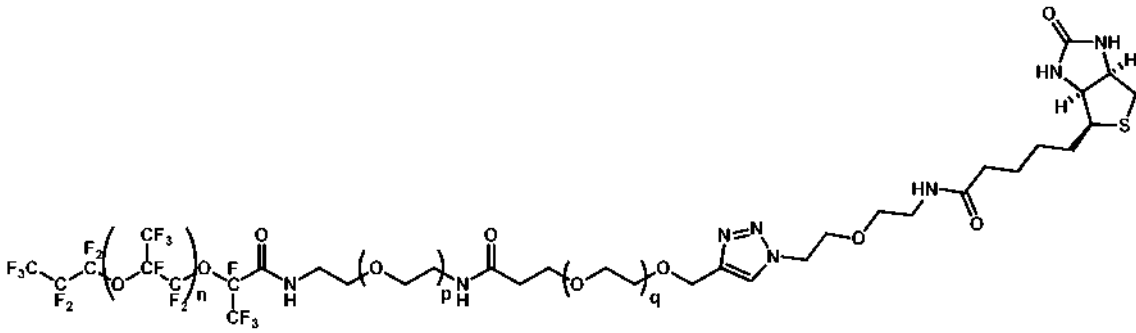
Ejemplos de tensioactivos funcionales de fórmula (II) son, por ejemplo:

60

65

5

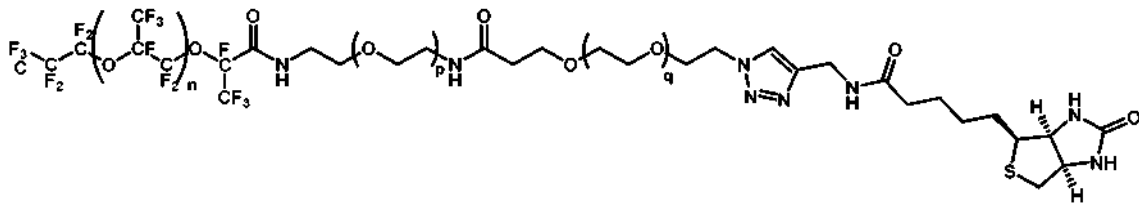
10



15

(i) con $n = 35-40$, $p = 5$ y $q = 4$,

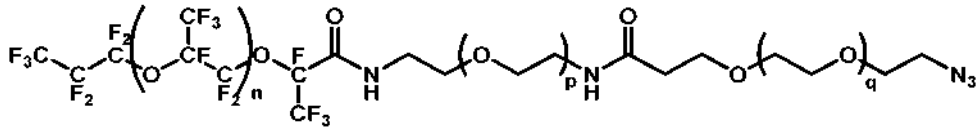
20



25

(ii) con $n = 35-40$, $p = q = 5$

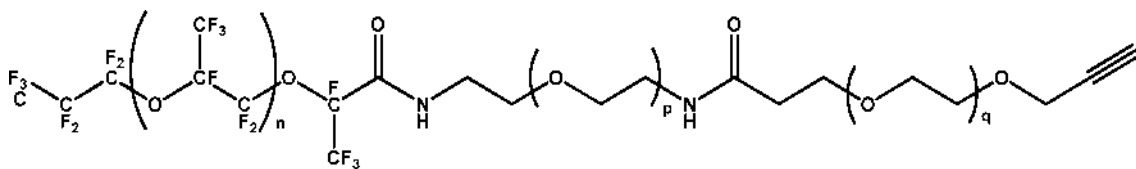
30



35

(iii) con $n = 35-40$, $p = q = 5$, y

40

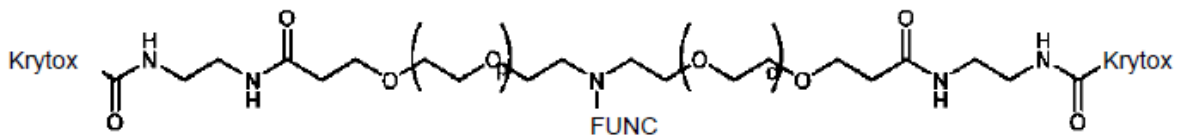


45

(iv) con $n = 35-40$, $p = 5$, $q = 4$

En algunas otras modalidades, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención es un tensioactivo tribloque de fórmula (IIIa)

50



55

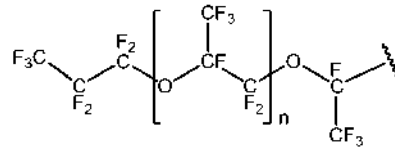
(IIIa)

en donde

60

- p y q son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 10, preferentemente de 2 a 8,
- Krytox es

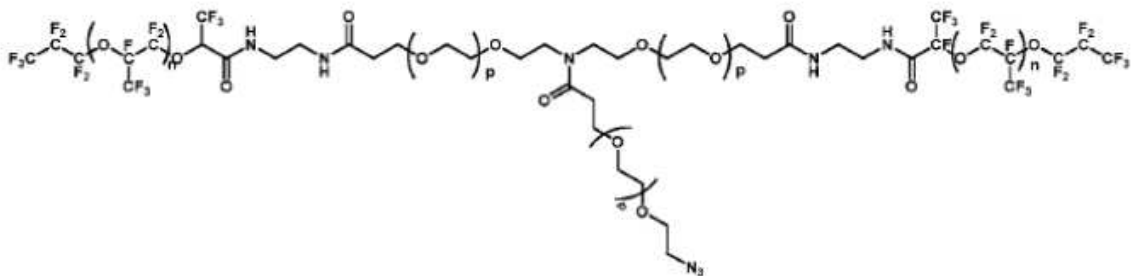
65



con n de 25 a 45, preferentemente n = 35-40,

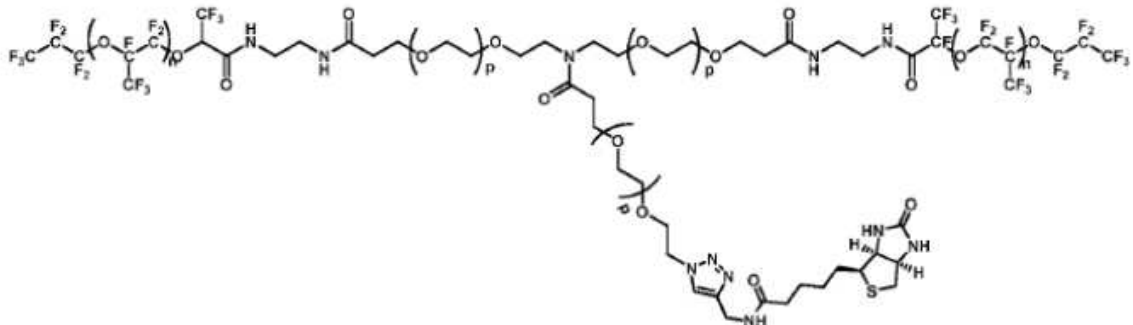
- FUNC como se define adicionalmente a continuación y se refiere al resto funcional del tensioactivo funcional. Por ejemplo, FUNC comprende un resto seleccionado de una biotina, un grupo azido, un grupo alquililo, en particular un grupo alquililo tensionado como se describe a continuación.

Ejemplos de tensioactivos con grupos funcionales de fórmula (IIIa) son, por ejemplo:



(i)

con n = 35-40 y p = 6, 5 o 4, y

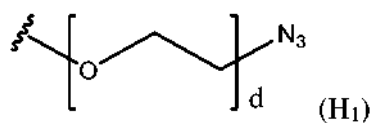


(ii)

con n = 35-40 y p = 6, 5 o 4.

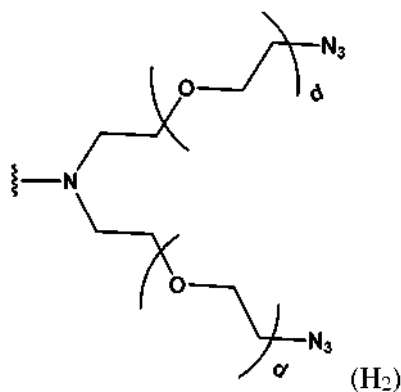
En un aspecto particular, la invención se refiere a un tensioactivo con grupos funcionales que comprende:

- una o dos colas lipófilas (LIPO), unidas a
- una cabeza hidrófila (CABEZA), dicha cabeza hidrófila porta al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 restos, de fórmula (H1):



en donde d es un número entero de 1 a 12, por ejemplo, de 2 a 6.

El LIPO es como se definió anteriormente. En una modalidad preferida, LIPO se selecciona entre cadenas de



en donde d es un número entero de 1 a 12, por ejemplo, de 2 a 6, como 3, 4 o 5.

En una modalidad particular, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención comprende:

- una o dos colas lipófilas (LIPO) que comprenden, o consisten en, un resto de fórmula (L₁), donde dichas una o dos LIPO están unidas a
- una cabeza hidrófila (CABEZA), donde dicha cabeza hidrófila comprende uno o dos restos de fórmula (H₂) como se definió anteriormente.

Por ejemplo, el tensioactivo con grupos funcionales puede comprender un resto H₂ y un resto L₁. Alternativamente, el tensioactivo con grupos funcionales puede comprender dos restos H₂ y un resto L₁. Como otro ejemplo, el tensioactivo con grupos funcionales puede comprender dos restos H₂ y dos restos L₁.

El peso molecular del tensioactivo con grupos funcionales es de 6 000 a 20 000 g.mol⁻¹, por ejemplo, de 6 500 a 16 000 g.mol⁻¹ o de 7 000 a 15 000 g.mol⁻¹.

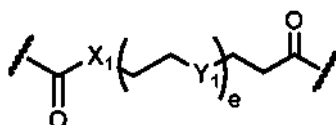
La cabeza hidrófila (CABEZA) típicamente comprende un resto central (CENTRAL). El resto central es un grupo C₂-C₄₀, preferentemente un grupo C₂-C₃₀ que puede comprender uno o varios heteroátomos tales como N, O o S. El resto central porta los restos H₁ o H₂ y se une a al menos un grupo LIPO. El resto Central es típicamente un enlazador que puede comprender opcionalmente una o varias cadenas de poliéter, por ejemplo, de 1 a 4 cadenas de poliéter. Las cadenas de poliéteres comprenden típicamente de 2 a 12 monómeros, como 2 a 6 monómeros. Una cadena de poliéter preferida es el polietilenglicol y sus derivados. El enlazador presente en el resto Central puede ser cualquier enlazador como se definió anteriormente.

Por ejemplo, el enlazador puede comprender al menos un resto cíclico que tiene de 5 a 14 átomos en el anillo. Los átomos del anillo pueden comprender uno o varios heteroátomos tales como O, N o S. El resto cíclico puede ser alifático o aromático. El resto cíclico puede comprender 2 o 3 anillos que están fusionados entre sí. Los restos cíclicos preferidos son anillos de 5 átomos o de 6 átomos. Los restos cíclicos de interés abarcan, entre otros, pirrol, furano, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, triazol, triazina, fenilo, naftaleno, piridina, piperidina, piridazina, pirimidina, pirazina, oxazina, dioxina, piperazina, morfolina y tiazina.

Los restos L₁ y/o H₂ pueden conectarse a dicho resto cíclico directamente o por medio de un conector y/o una cadena de poliéter.

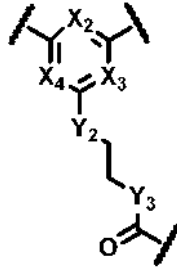
Como otro ejemplo, el enlazador puede ser una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada que tiene un grupo conector al menos en uno de sus extremos. Dicha cadena de hidrocarburo está opcionalmente interrumpida por uno o varios heteroátomos, o por uno o varios ciclos de carbono o heterociclos. Dicha cadena de hidrocarburo puede estar sustituida adicionalmente con uno o varios grupos seleccionados de grupos alquilo C₁-C₃, halógenos tales como F, Cl o Br, -OH, -OMe y -CF₃. enlazador

Por ejemplo, el resto central puede tener una de las siguientes fórmulas:



en donde e es un número entero de 1 a 12, preferentemente de 2 a 6 tal como 3, 4 o 5, X₁ e Y₁ se seleccionan independientemente de NH, CH₂ y O.

5

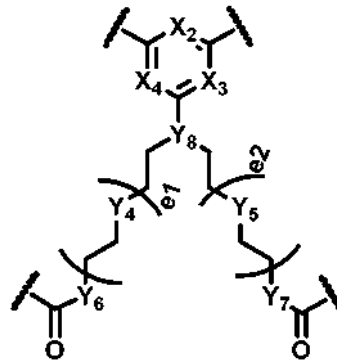


10

15

en donde Y₂ e Y₃ se seleccionan independientemente de NH, CH₂ u O y X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente de CH y N, y

20



25

30

35 en donde

- o X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente de CH y N,
- o Y₈ es CH o N,
- o Y₄, Y₅, Y₆ e Y₇ se seleccionan independientemente de NH, O y CH₂ y,
- o e₁ y e₂ son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 12, preferentemente de 2 a 6 como 2, 3, 4, 5 o 6.

40

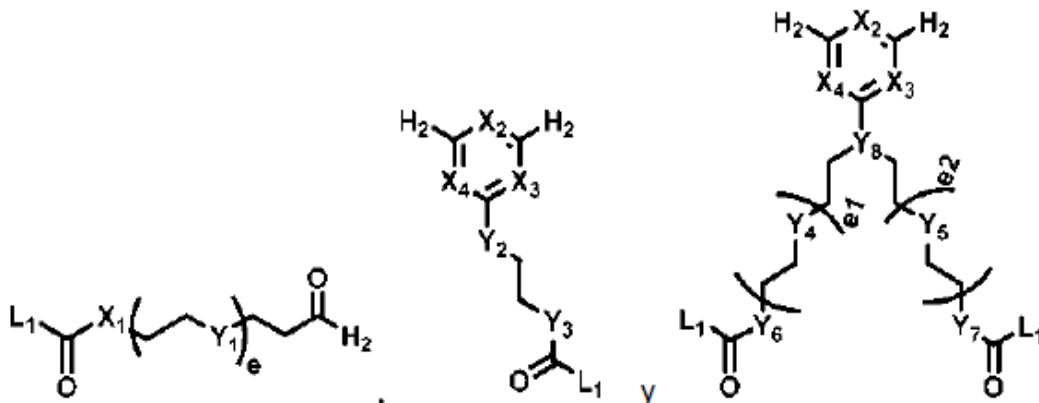
Los tensioactivos con grupos funcionales que comprenden dicho resto central son, por ejemplo:

45

50

55

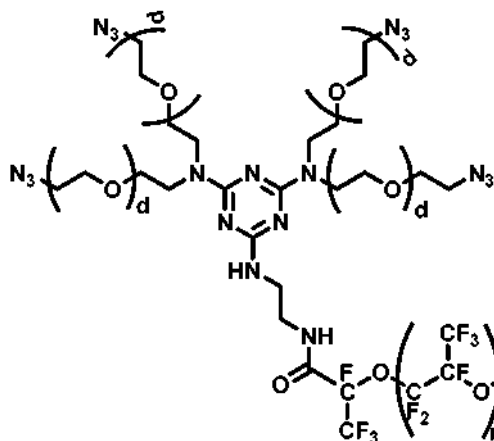
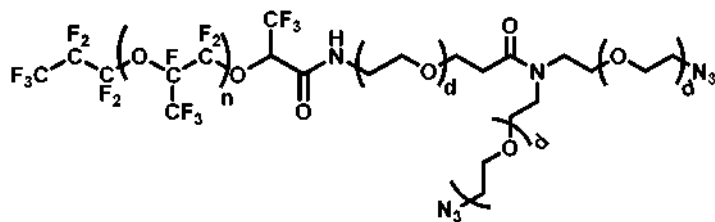
60



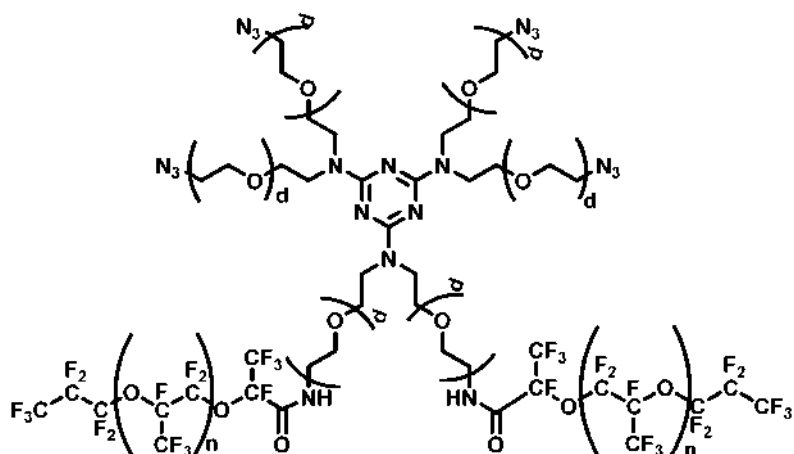
en donde L₁ y H₂ son como se definieron anteriormente.

65

A modo de ilustración, el tensioactivo con grupos funcionales de la invención se puede seleccionar entre:



y



50 en donde n es un número entero de 25 a 45, preferentemente de 35 a 40 y d es un número entero de 1 a 12, preferentemente de 2 a 6. Los tensioactivos preferidos son aquellos en donde n es un número entero de 35 a 45 y d es 3.

55 Los tensioactivos con grupos funcionales se pueden preparar mediante síntesis química. Por ejemplo, los tensioactivos dibloque de fórmula (II) se pueden preparar mediante reacciones de acoplamiento pseudopeptídico entre una cadena hidrófila basada en peg que porta una amina libre y la cadena ácida de perfluoropoliéter activada previamente como su forma de cloruro de acilo. La cadena hidrófila se puede obtener mediante acoplamiento de dos derivados de oligoetilenglicol con la adición conveniente de grupos funcionales, por ejemplo, con biotina o un grupo alquino.

60 Los tensioactivos tribloque con grupos funcionales de fórmula (IIIa) se pueden preparar a partir de un derivado peg trifuncional mediante una reacción de acoplamiento pseudopeptídico con Krytox-COCl. El derivado peg trifuncional puede prepararse mediante dimerización reductora de azida de un derivado de oligoetilenglicol que porta un resto azida y un resto amino protegido en N seguido del acoplamiento pseudopeptídico de una cadena peg ácida con la amina secundaria central.

65 La síntesis de algunos tensioactivos dibloque y tribloque se describe más adelante en la sección de "Ejemplos".

Es evidente que la invención se refiere, además, a los tensioactivos con grupos funcionales descritos per se en el presente documento, en particular los de fórmula (Ia), (Ib), (Ic), (II) y (IIIa) o los que comprenden restos H₁ o H₂ como se describió anteriormente.

5

Interacciones entre el tensioactivo funcional y la quimiosonda

Como se mencionó anteriormente, el resto funcional del tensioactivo con grupos funcionales puede promover interacciones covalentes o no covalentes con la quimiosonda. Esta interacción puede ser directa o indirecta, es decir, a través de un intermediario de unión.

10

En una modalidad, el resto funcional promueve interacciones covalentes con la quimiosonda o un intermediario de unión, preferentemente interacciones covalentes específicas con la quimiosonda o un intermediario de unión.

15

20

25

30

Como se usa en este documento, una "interacción covalente" entre el tensioactivo con grupos funcionales y la quimiosonda o el intermediario de unión, se refiere a la creación de un enlace covalente (es decir, al menos un enlace covalente) entre la cabeza hidrófila del tensioactivo con grupos funcionales y el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión. El (Los) enlace(s) covalente(s) se puede(n) formar mediante la reacción de un grupo químico reactivo presente en el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión con otro grupo químico reactivo presente en el resto funcional del tensioactivo con grupos funcionales. En una modalidad preferida, el grupo reactivo presente en la quimiosonda o el intermediario de unión y el presente en el tensioactivo con grupos funcionales se seleccionan para que reaccionen entre sí mediante una reacción clic y/o una reacción de bioconjugación, en particular como se describió anteriormente. En algunas modalidades particulares, el grupo reactivo presente en la quimiosonda o el intermediario de unión y el presente en el tensioactivo con grupos funcionales se seleccionan para que reaccionen entre sí mediante una reacción clic. El término "interacciones covalentes específicas" se usa en el presente documento para indicar que el resto funcional del tensioactivo tiene la capacidad de crear un enlace covalente (es decir, al menos un enlace covalente) con el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión, mientras que tiene relativamente poca reactividad detectable con otras estructuras presentes en la fase acuosa. Preferentemente, la interacción covalente específica es una reacción bioortogonal o biocompatible entre el resto funcional del tensioactivo y un grupo reactivo específico presente en el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión.

35

La "reacción clic" o "química clic" es un concepto introducido por Sharpless en 2001. La "química clic" se refiere generalmente a reacciones químicas caracterizadas por altos rendimientos, alta quimioselectividad, que son fáciles de realizar y que generan subproductos inofensivos. Las "reacciones clic" se pueden realizar típicamente en medios complejos con alta eficiencia. Las reacciones clic se utilizan típicamente para crear enlaces covalentes con heteroátomos (C-X-C) entre dos entidades de interés. Para una revisión sobre la química clic, se puede consultar Kolb y otros, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021) y Rudolf y otros, *Current opinion in Chemical Biology*, 2013, 17: 110-117.

40

45

Los ejemplos de reacciones clic incluyen, entre otras, cicloadiciones dipolares de azida-alquino catalizadas por cobre (CuAAC), cicloadición de alquino-azida promovida por tensión (SPAAC), reacciones de Diels-Alder con tetrazinas y alquinos o alquenos tensionados, cicloadiciones de tetrazina-isonitrilo, reacciones clic de tiol-alqueno tales como cicloadiciones de maleimida-cisteína, conjugación de azida-triarilfosfina de Staudinger y cicloadiciones de sidnona-alquino.

50

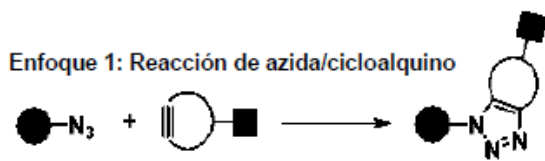
En el contexto de la invención, las reacciones clic pueden realizarse en medios acuosos. Como se mencionó anteriormente, en algunos aspectos, la reacción clic puede ser "bioortogonal" o "biocompatible", esto significa que los reactivos involucrados en la reacción clic pueden reaccionar selectiva y rápidamente entre sí en presencia de una pluralidad de entidades biológicas. En algunas modalidades, la reacción clic puede realizarse en medios que comprenden células vivas, sin interferir con el proceso celular.

55

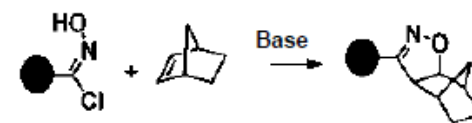
Por ejemplo, las reacciones clic biocompatibles o bioortogonales incluyen reacciones clic sin metales (es decir, que no requieren catalizadores metálicos). A continuación, se muestran ejemplos de reacciones clic sin metales:

60

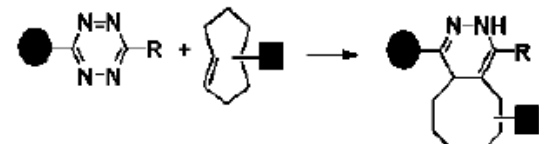
65



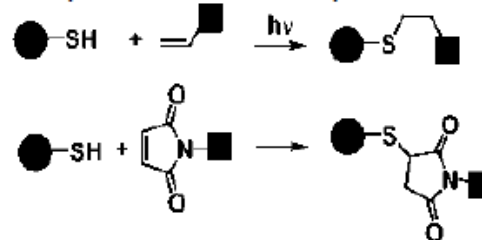
Enfoque 4: Reacción de cloro-oxima/norborneno



Enfoque 2: Reacción de tetrazina/cicloocteno



Enfoque 5: Reacción de tiol/alqueno o tiol/maleimida



Enfoque 3: Reacción de tetrazol/alqueno



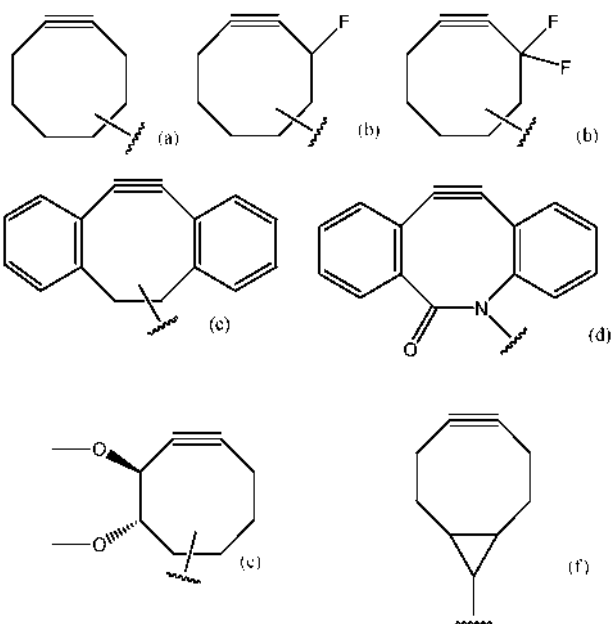
Otras reacciones clic de interés sin metales son, por ejemplo, cicloadiciones de alquino tensionado con derivados de iminosidnona o de sidnona, como se describe en los documentos PCT/EP2015/060805 y PCT/EP2015/063750.

Para una revisión sobre la química bioortogonal, incluida la química clic, véase Sletten y Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48(38): 6974-6998.

Las reacciones clic preferidas son las reacciones sin metales, es decir, reacciones clic que no requieren la presencia de un catalizador metálico como una sal de cobre.

En el contexto de la presente invención, una reacción clic sin metales preferida es la cicloadición 1,3-dipolar de alquino-azida promovida por tensión (SPAAC) que se refiere a la reacción entre un grupo azido y un resto alquino tensionado que conduce a la formación de un resto triazol. Típicamente, una reacción clic de este tipo no necesita la presencia de un catalizador para que se produzca.

Los alquinos tensionados preferidos son alquinos C₆-C₃₀ en donde el enlace triple está tensionado estéricamente, en particular en un soporte de ciclooctino. El alquino tensionado puede comprender un soporte de ciclooctino que puede estar opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes tales como halógenos y/o condensado en uno o varios ciclos, incluidos los heterociclos. Por ejemplo, el alquino tensionado puede comprender uno de los siguientes soportes de ciclooctino (a) - (f):

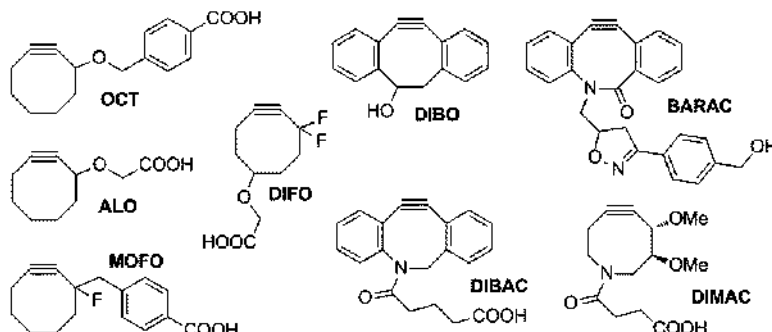


Los alquinos tensionados que contienen uno de dichos soportes se pueden preparar a partir de reactivos disponibles comercialmente como OCT, DIBO, BARAC, ALO, DIFO, MOFO, DIBAC y DIMAC:

5

10

15



20

Por consiguiente, el resto funcional del tensioactivo (es decir, FUNC) puede portar un grupo azido, mientras que el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión puede portar un soporte de alquino tensionado, y *viceversa*. Preferentemente, el grupo alquínico tensionado se selecciona de los soportes de ciclooctino (a) - (f) como se mostró anteriormente, y con mayor preferencia es el soporte de ciclooctino (f).

25

En algunas modalidades, la quimiosonda o el intermediario de unión pueden portar varios grupos químicos reactivos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos químicos reactivos. Dichos grupos químicos pueden permitir que la quimiosonda o el intermediario de unión interactúen con varios tensioactivos con grupos funcionales. Alternativamente, dichos grupos químicos pueden permitir que la quimiosonda o el intermediario de unión cree varios enlaces covalentes con un solo tensioactivo con grupos funcionales que porta varios restos funcionales, como 2, 3 o 4 restos funcionales.

30

Como se mencionó anteriormente, el (los) grupo(s) químico(s) reactivo(s) presente(s) en el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión se seleccionan preferentemente de alquinos tensionados y el grupo azido. Preferentemente, la quimiosonda o el intermediario de unión portan un solo tipo de grupos químicos reactivos. El (los) grupo(s) químico(s) reactivo(s) se puede(n) introducir mediante una reacción de bioconjugación. Solo con fines ilustrativos, el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión puede portar uno de los siguientes restos:

35

40

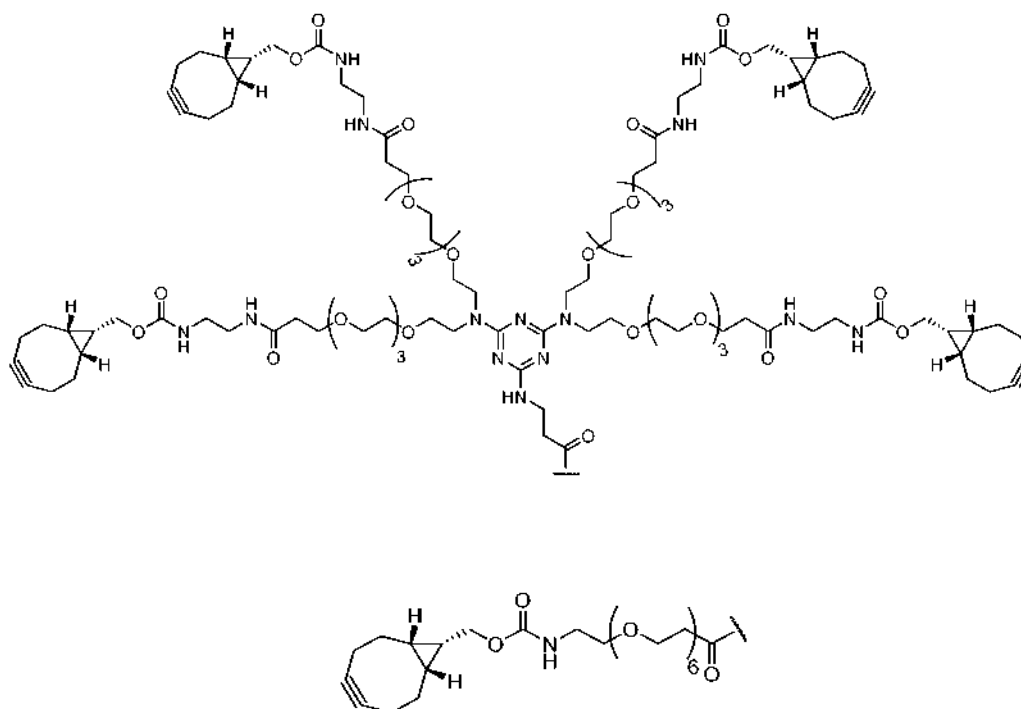
45

50

55

o

60



65

En otra modalidad, el resto funcional promueve interacciones no covalentes con la quimiosonda o un intermediario de unión.

Como se usa en este documento, una interacción no covalente entre el tensioactivo con grupos funcionales y la quimiosonda o el intermediario de unión, se refiere a la formación de un complejo que implica el resto funcional del tensioactivo y un dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión. Preferentemente, el resto funcional se une específicamente al dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión.

El término "unión específica" se usa en este documento para indicar que el resto funcional del tensioactivo tiene la capacidad de reconocer e interactuar específicamente con el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión, mientras que tiene relativamente poca reactividad detectable con otras estructuras presentes en la fase acuosa. Por lo general, existe un bajo grado de afinidad entre dos moléculas cualesquiera debido a las fuerzas no covalentes como las fuerzas electrostáticas, los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas hidrófobas, que no se restringe a un sitio particular de las moléculas y es en gran medida independiente de la identidad de las moléculas. Este bajo grado de afinidad puede resultar en una unión no específica. Por el contrario, cuando dos moléculas se unen específicamente, el grado de afinidad es mucho mayor que dichas interacciones de unión no específicas. En la unión específica, interactúa un sitio particular en cada molécula, donde los sitios particulares son estructuralmente complementarios, con el resultado de que se incrementa la capacidad de formar enlaces no covalentes. La especificidad se puede determinar relativamente mediante ensayos de unión o competitivos, por ejemplo, mediante el uso de instrumentos Biacore. La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (K_d). En modalidades preferidas, la K_d que representa la afinidad del resto funcional del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión es de $1 \cdot 10^{-6}$ M o menor, preferentemente de $1 \cdot 10^{-7}$ M o menor, e incluso con mayor preferencia de $1 \cdot 10^{-8}$ M o menor.

De acuerdo con el tipo de interacción entre el resto funcional del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión, el resto funcional puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento o derivado de este como Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, $F(ab)_3$, Fv, Fv monocatenario (ScFv), diacuerpos o VHH, un ligando, un péptido o proteína, un aptámero, un polisacárido, una molécula orgánica pequeña, una etiqueta de proteína, o un grupo de unión a cationes, mientras que el dominio de unión de la quimiosonda o el intermediario de unión comprende un grupo que se une específicamente a dicho resto funcional, o *viceversa*.

La interacción entre el tensioactivo con grupos funcionales y la quimiosonda o el intermediario de unión puede depender de varios sistemas de interacción, tales como sistemas de afinidad, parejas ligando/antiligando o etiquetas de proteínas.

Por ejemplo, la interacción entre el tensioactivo con grupos funcionales y la quimiosonda o el intermediario de unión puede depender de grupos de unión a cationes (por ejemplo, nitrilotriacetato (NTA, para unirse a etiquetas de His), iminodiacetato o triazacilonano), etiquetas de unión a proteínas o parejas ligando/antiligando (por ejemplo, anticuerpo/antígeno tal como biotina/anticuerpo anti-biotina y digoxigenina/ anticuerpo anti-digoxigenina, o ligando/receptor).

En una modalidad preferida, el resto funcional del tensioactivo comprende una etiqueta de unión a proteína mientras que la quimiosonda o el intermediario de unión comprende una proteína, un péptido o un fragmento de estos que se une específicamente a dicha etiqueta, o *viceversa*. El experto en la técnica conoce una multitud de etiquetas de proteínas (véase, por ejemplo, Young y otros, *Biotechnol. J.* 2012, 7, 620-634) que incluyen, por ejemplo, biotina (para unirse a estreptavidina o derivados de avidina), glutatión (para unirse a proteínas u otras sustancias unidas a la glutatión-S-transferasa), maltosa (para unirse a proteínas u otras sustancias unidas a la proteína de unión a maltosa), lectinas (para unirse a restos de azúcar), etiqueta c-myc, etiqueta de antígeno de hemaglutinina (HA), etiqueta de tiorredoxina, etiqueta FLAG, etiqueta de poliArg, etiqueta de poliHis, etiqueta de Strep, etiqueta de secuencia de señal OmpA, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a quitina, dominio de unión a celulosa, etiqueta S y Softag3, y similares.

En algunas modalidades, la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales interactúan directamente entre sí. Por ejemplo, el resto funcional del tensioactivo puede comprender una etiqueta de proteína, por ejemplo, biotina, mientras que el dominio de unión de la quimiosonda comprende un grupo que interactúa específicamente con dicha etiqueta, por ejemplo, estreptavidina o avidina, o *viceversa*. Alternativamente, el resto funcional del tensioactivo puede comprender un aptámero o un anticuerpo, mientras que la quimiosonda comprende el ligando de dicho aptámero o dicho anticuerpo, y *viceversa*.

En algunas otras modalidades, la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales interactúan a través de un intermediario de unión. En tal caso, el intermediario de unión puede unirse tanto a la quimiosonda como al tensioactivo y, por tanto, actúa como un puente entre dichas dos entidades. Por tanto, el intermediario de unión contiene un primer dominio de unión que puede unirse a la quimiosonda y un segundo dominio de unión que puede unirse al tensioactivo con grupos funcionales. Los dominios de unión del intermediario pueden ser de cualquier tipo y se seleccionan en función del resto funcional del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda.

Por ejemplo, el intermediario de unión puede ser una estreptavidina, mientras que el resto funcional del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda comprenden ambos una biotina. En tal modalidad, la quimiosonda puede ser

un aptámero biotinilado o un anticuerpo biotinilado específico para la diana molecular.

5 La quimiosonda puede comprender uno o varios (por ejemplo, 2, 3 o 4) dominios de unión, por lo que dicha quimiosonda puede unirse a uno o varios (por ejemplo, 2, 3 o 4) tensioactivos con grupos funcionales o intermediarios de unión. En estas modalidades, los dominios de unión de la quimiosonda pueden ser idénticos o diferentes y pueden unirse a tensioactivos con grupos funcionales o intermediarios de unión idénticos o diferentes.

Contacto de la diana molecular con la quimiosonda

10 En el método de la invención, la diana molecular presente en la fase acuosa se pone en contacto con una quimiosonda que comprende (i) al menos un resto de captura que puede unirse específicamente a la diana molecular y (ii) al menos un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales.

15 La quimiosonda puede comprender uno o varios (por ejemplo, 2, 3 o 4) restos de captura, por lo que dicha quimiosonda puede unirse a uno o varios (por ejemplo, 2, 3 o 4) dianas moleculares. En las modalidades en donde la quimiosonda comprende varios restos de captura, estos restos pueden ser idénticos o diferentes y pueden dirigirse a dianas moleculares idénticas o diferentes.

20 El resto de captura de la quimiosonda puede ser cualquier grupo que pueda unirse específicamente a la diana molecular. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, entre otros, un anticuerpo, un fragmento o derivado de un anticuerpo, un aptámero, un Spiegelmer, un aptámero peptídico, un ligando o un sustrato de la diana molecular, un ácido nucleico que puede hibridar con la diana molecular, y un receptor o fragmento de receptor que puede unirse a la diana molecular.

25 En algunas modalidades preferidas, el resto de captura de la quimiosonda es un anticuerpo dirigido contra la diana molecular, un fragmento o derivado de dicho anticuerpo que puede unirse a la diana molecular.

30 El dominio de unión de la quimiosonda, es decir, el dominio que se une al tensioactivo con grupos funcionales o al intermediario de unión, puede ser de cualquier tipo, con la condición de que comprenda un resto que permita crear interacciones covalentes o no covalentes con el tensioactivo con grupos funcionales o el intermediario de unión, como se explicó y detalló anteriormente.

35 El experto en la técnica puede elegir fácilmente el dominio de unión de la quimiosonda según la naturaleza del resto con grupos funcionales del tensioactivo o, cuando se usa un intermediario de unión, la naturaleza del dominio del intermediario de unión que interacciona con la quimiosonda.

40 En modalidades preferidas, el dominio de unión de la quimiosonda comprende un grupo seleccionado de grupos químicos reactivos para la reacción clic y etiquetas de proteínas. En particular, el dominio de unión de la quimiosonda puede comprender un resto seleccionado de un grupo azido, un grupo alquinilo, un grupo cicloalquinilo tensionado y una etiqueta de proteína tal como biotina.

45 En algunas modalidades, la quimiosonda es un anticuerpo dirigido contra la diana molecular y funcionalizado con una etiqueta de proteína, preferentemente biotina, o con un grupo químico reactivo para una reacción clic, como un grupo cicloalquinilo tensionado, un grupo azido o un derivado de iminosidnona o de sidnona.

En una modalidad particular, el resto funcional del tensioactivo comprende un grupo azido y el dominio de unión de la quimiosonda comprende un grupo cicloalquinilo tensionado, o *viceversa*.

50 En otra modalidad particular, el resto funcional del tensioactivo es biotina y el dominio de unión de la quimiosonda es estreptavidina, o *viceversa*.

En una modalidad particular adicional, el resto funcional del tensioactivo es una biotina, el intermediario de unión es estreptavidina y el dominio de unión de la quimiosonda es biotina.

55 En alguna modalidad, la quimiosonda y/o el intermediario de unión pueden comprender al menos un enlazador escindible. Dichos enlazadores escindibles pueden ser como se definieron anteriormente para los tensioactivos.

60 La quimiosonda puede encapsularse dentro de las gotas, opcionalmente con la diana molecular, durante la generación de gotas o puede añadirse a las gotas mediante cualquier método conocido por el experto como picoinyección o fusión de gotas.

65 En las modalidades en las que la quimiosonda puede interactuar directamente con el tensioactivo con grupos funcionales, la quimiosonda se une a la diana molecular y la captura en la interfase interna de las gotas al interactuar con el resto funcional del tensioactivo.

En modalidades en las que la quimiosonda interactúa con el tensioactivo con grupos funcionales a través de un

intermediario de unión, la quimiosonda se une a la diana molecular y el intermediario de unión, y captura la diana molecular en la interfase interna de las gotas a través de la unión del intermediario de unión con el resto funcional del tensioactivo.

5 En el método de la invención, las uniones entre la quimiosonda, el tensioactivo con grupos funcionales, la diana molecular y, opcionalmente, el intermediario de unión, pueden tener lugar en cualquier orden. En una modalidad, la quimiosonda se une simultáneamente a la diana molecular y al tensioactivo con grupos funcionales, opcionalmente a través de un intermediario de unión. En otra modalidad, la quimiosonda interactúa en primer lugar con la diana molecular, por lo que se forma un complejo entre la diana molecular y la quimiosonda. Después, dicho complejo se
10 une al tensioactivo con grupos funcionales a través de la entidad quimiosonda y, opcionalmente, a través de un intermediario de unión. En una modalidad adicional, la quimiosonda se une en primer lugar al tensioactivo, opcionalmente a través de un intermediario de unión, y después se une a la diana molecular.

15 Cada gota de la emulsión puede comprender una o varias quimiosondas específicas de una o varias dianas moleculares. En modalidades en las que cada gota comprende varias quimiosondas, estas quimiosondas pueden unirse a tensioactivos con grupos funcionales idénticos o diferentes.

Preferentemente, en las modalidades en las que el resto funcional del tensioactivo o del dominio de unión de la quimiosonda o del intermediario de unión comprende un grupo cicloalquilino tensionado, la fase acuosa comprende además un poloxámero, por ejemplo, Pluronic como Pluronic® F-127 (Sigma), un poloxámero (copolímero tribloque) de polipropilenglicol que es hidrófobo y se adhiere a la superficie hidrófoba, para evitar la adsorción de los grupos cicloalquilino tensionados en las matrices del chip de microfluidos, en particular los chip de PDMS.

Sistemas de microfluidos

25 En modalidades preferidas, el método de la invención se implementa mediante el uso de un sistema de microfluidos.

Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de microfluidos", "chip de microfluidos" o "sistema de microfluidos" se refiere a un dispositivo, aparato o sistema que incluye al menos un canal de microfluidos.

30 El sistema de microfluidos puede ser o comprender chips basados en silicio y puede fabricarse mediante el uso de una variedad de técnicas, que incluyen, entre otras, estampado en caliente, moldeado de elastómeros, moldeado por inyección, LIGA, litografía blanda, fabricación con silicio y técnicas relacionadas con el procesamiento de películas delgadas. Los materiales adecuados para fabricar un dispositivo de microfluidos incluyen, entre otros, copolímero de olefina cíclica (COC), policarbonato, poli(dimetilsiloxano) (PDMS), poli(metacrilato de metilo) (PMMA) y vidrio. Preferentemente, los dispositivos de microfluidos se preparan mediante técnicas de litografía blanda estándar en PDMS y unión posterior a portaobjetos de vidrio para microscopios. Debido a la naturaleza hidrófila o hidrófoba de algunos materiales, como el vidrio, que adsorbe algunas proteínas y puede inhibir ciertos procesos biológicos, puede ser necesario un agente pasivante. Los agentes pasivantes adecuados se conocen en la técnica e incluyen, entre
35 otros, silanos, fluorosilanos, parileno, *n*-dodecil- β -D-maltósido (DDM), poloxámeros tales como Pluronic.

Como se usa en este documento, el término "canal" se refiere a una característica sobre o en un artículo (por ejemplo, un sustrato) que dirige al menos parcialmente el flujo de un fluido. El término "canal de microfluidos" se refiere a un canal que tiene una dimensión de la sección transversal de menos de 1 mm, típicamente menos de 500 μ m, 200 μ m, 150 μ m, 100 μ m o 50 μ m, y una relación entre la longitud y la dimensión más grande de la sección transversal de al menos 2:1, más típicamente al menos 3:1, 5:1, 10:1 o más. Cabe señalar que los términos "canal de microfluidos", microcanal "y" canal "se utilizan indistintamente en esta descripción. La sección transversal del canal puede tener cualquier forma (circular, ovalada, triangular, irregular, cuadrada o rectangular, o similares). Preferentemente, la sección transversal del canal tiene una forma cuadrada o rectangular. El canal puede estar, total o parcialmente, cubierto o no cubierto.

Como se usa en el presente documento, el término "dimensión de la sección transversal" de un canal se mide perpendicular a la dirección del flujo de líquido.

55 Las gotas de emulsión de agua en aceite se pueden generar en el dispositivo utilizado para implementar el método de la invención ("en el chip") o en otro sistema ("fuera del chip").

En una modalidad, la producción de gotas w/o se lleva a cabo en un módulo de generación de gotas en el chip. Las gotas pueden producirse mediante cualquier técnica conocida por el experto para la generación de gotas en dispositivos de microfluidos, como la ruptura de gotas en corrientes que fluyen conjuntamente, corrientes de flujo cruzado en una unión en forma de T y el enfoque de flujo hidrodinámico (revisado por Christopher y Anna, 2007, J. Phys. D: Appl. Phys. 40, R319-R336).

65 En otra modalidad, las gotas w/o se generan en otro sistema antes de reinyectarlas en el chip. En una modalidad particular, las gotas se generan en un módulo de generación de gotas en otro sistema y después se reinyectan en el sistema que se utiliza para implementar el método de la invención a través de un módulo de reinyección de la emulsión.

Típicamente, las gotas se pueden reinyectar a través de un módulo de reinyección de la emulsión que comprende una estructura en forma de ψ donde las gotas inyectadas se separan por el aceite portador suministrado por al menos uno, preferentemente dos canales laterales conectados con el canal de reinyección.

5 En una modalidad preferida, las gotas w/o tienen una dimensión de la sección transversal que es sustancialmente igual a la dimensión más grande del canal perpendicular al flujo de fluido en el que se encuentran las gotas.

10 En una modalidad, las gotas w/o se proporcionan (se generan o reinyectan) al sistema de fluidos a una frecuencia que varía de 0,01 Hz a 10 kHz, preferentemente de 0,1 kHz a 5 kHz, con mayor preferencia de 0,5 kHz a 2,5 kHz. Una frecuencia de 1 kHz significa que las gotas se proporcionan a una velocidad de 1000 gotas por segundo. El experto en la técnica puede elegir y ajustar fácilmente esta frecuencia.

15 En una modalidad particular, el chip de microfluidos utilizado en el método de la invención comprende un módulo de generación de gotas o un módulo de reinyección de la emulsión en comunicación continua con un módulo de mezcla. Este módulo de mezcla puede asegurar una mezcla homogénea del contenido de las gotas y así optimizar la captura de las dianas moleculares en la interfase. Los módulos de mezcla ilustrativos incluyen, entre otros, mezcladores caóticos (Stroock y otros, Science, vol. 295, págs. 647-651, 2002) o módulos de mezcla en serpentina (Liu y otros, J. Microelectromech. Syst, 9, págs.190-197, 2000).

20 Alternativamente, o además, el chip de microfluidos que se usa en el método de la invención puede comprender una línea de retardo, en particular una línea de retardo que permita un tiempo de incubación confiable como se describe en la solicitud de patente núm. WO 2010/042744.

Inversión de fase

25 Los inventores han desarrollado y proporcionan en este documento sistemas y métodos para una inversión de fase fiable de gotas de emulsión de agua en aceite, en particular en sistemas de microfluidos. Demostraron que las emulsiones de agua en aceite se pueden invertir eficientemente mediante la creación de una emulsión doble y desestabilización de dicha emulsión para producir así una emulsión de aceite en agua.

30 Además, demostraron que las moléculas capturadas en la interfase interna de las gotas de agua en aceite a través de la interacción con el tensioactivo con grupos funcionales permanecen unidas después de la inversión de fase. Por tanto, estas moléculas quedan expuestas en la superficie externa de las gotas y son accesibles para una caracterización o ensayos adicionales.

35 El método de invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite comprende, por tanto

- (i) formar gotas de emulsión doble a partir de dichas gotas de emulsión de agua en aceite; y
- (ii) desestabilizar dicha emulsión para producir una emulsión de aceite en agua.

40 Como se usa en el presente documento, el término "gota de emulsión doble" se refiere a una gota de agua en aceite en agua (también denominada gota w/o/w) y consiste en una gota acuosa dentro de una gota de aceite, es decir, un núcleo acuoso y una envoltura oleosa, rodeada por un fluido portador acuoso. Preferentemente, las gotas de emulsión doble tienen una distribución homogénea de diámetros, es decir, las gotas pueden tener una distribución de diámetros tal que no más de aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,03 % o aproximadamente 0,01 % de las gotas tienen un diámetro promedio superior a aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,03 % o aproximadamente el 0,01 % del diámetro promedio de las gotas. Preferentemente, la emulsión doble es una emulsión monodispersa, es decir, una emulsión que comprende gotas del mismo volumen.

50 Típicamente, la gota w/o/w tiene un volumen de menos de 2000 pL, preferentemente de menos de 1500 pL. Preferentemente, una gota w/o/w tiene un volumen que varía de 40 pL a 1500 pL, con mayor preferencia de 40 pL a 500 pL, incluso con mayor preferencia de 40 pL a 200 pL, y en particular de 40 pL a 150 pL. En modalidades preferidas, la relación entre la envoltura oleosa y el núcleo acuoso está entre 1 y 10 (v/v), preferentemente entre 1,5 y 5 (v/v).

55 El fluido portador acuoso es típicamente agua o una solución tampón acuosa, como tampón Tris HCl, tampón Tris HCl/EDTA (TE), solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de acetato. En algunas modalidades, la fase acuosa también puede elegirse entre soluciones orgánicas tales como etanol, metanol, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetilsulfóxido. En una modalidad preferida, el fluido portador acuoso es agua. Incluso con mayor preferencia, el fluido portador acuoso es un medio tamponado de baja salinidad tal como tampones que comprenden Tris o HEPES, preferentemente a una concentración de 100 mM o menos, con mayor preferencia a una concentración de 10 mM o menos.

65 El fluido portador acuoso puede comprender uno o varios tensioactivos solubles en agua tales como Tween 20, Tween 80, SDS, Triton X-100, Pluronic, perfluorooctanol, NP40 o CHAPS. Preferentemente, el fluido portador acuoso comprende Triton X-100 y/o Tween 20. Preferentemente, dicho(s) tensioactivo(s) soluble(s) en agua está(n) presente(s) en el fluido portador acuoso a una concentración que varía de 0,05 % a 2 %, preferentemente de 0,1 a 1

% (p/p).

5 Los expertos conocen bien los métodos para producir emulsiones dobles, y en particular emulsiones dobles monodispersas, en sistemas de microfluidos. En particular, se pueden producir gotas de emulsión doble mediante el uso de una unión de enfoque de flujo (véase, por ejemplo, Yan y otros, 2013, Micromachines, 4, 402-413 y la solicitud de patente WO 2011/028764) o una unión en forma de T (ver por ejemplo Okushima y otros, 2004, Langmuir, 20, 9905-9908). En una modalidad preferida, se forman gotas de emulsión doble mediante el uso de una unión de enfoque de flujo.

10 Pueden prepararse emulsiones dobles mediante el control de la hidrofiliidad y/o hidrofobicidad de los canales que se usan para formar dicha emulsión. En particular, se pueden producir emulsiones dobles mediante el uso de dispositivos de microfluidos parcialmente hidrófilos y parcialmente hidrófobos.

15 Como demostraron los inventores en la sección experimental, la emulsión de aceite en agua puede obtenerse a partir de gotas de emulsión doble mediante desestabilización eléctrica, electroporación o desestabilización espontánea.

En una primera modalidad, las gotas de emulsión doble se desestabilizan mediante la aplicación de un campo eléctrico. En esta modalidad, el método de invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite comprende

- 20 (i) formar gotas de emulsión doble a partir de dichas gotas de emulsión de agua en aceite; y
 (ii) hacer que dichas gotas de emulsión doble se muevan dentro de un canal hidrófilo de un sistema de fluidos, preferentemente un sistema de microfluidos, donde la sección transversal de dicho canal hidrófilo es sustancialmente similar a la sección transversal de las gotas de emulsión doble, y
 25 (iii) aplicar un campo eléctrico a dichas gotas de emulsión doble de modo que la fase acuosa interna se una con la fase acuosa externa para producir así gotas de emulsión de aceite en agua.

30 El campo eléctrico se utiliza para desestabilizar y romper la cápsula oleosa de las gotas w/o/w para obtener gotas de emulsión de aceite en agua. La principal dificultad es preservar la integridad de la interfase entre la cápsula oleosa y el núcleo acuoso. En particular, es importante que las dianas moleculares capturadas permanezcan adheridas a la superficie externa de las gotas invertidas para una caracterización o ensayos adicionales.

35 Los inventores observaron que, si la sección transversal de las gotas w/o/w es sustancialmente mayor que la sección transversal del canal, las gotas son demasiado apretadas y esta geometría da como resultado la formación de dos películas delgadas cerca de las paredes del canal y dos gotas de aceite en agua en lugar de una. Por el contrario, si la sección transversal de las gotas w/o/w es sustancialmente menor que la sección transversal del canal, las gotas giran sobre sí mismas bajo el efecto del flujo de la fase continua. Esta geometría da como resultado la formación de varias películas delgadas cerca de las paredes del canal y varias gotas de aceite en agua en lugar de una. Cuando la sección transversal de la gota se ajusta a la sección transversal del canal, la ruptura de la interfase de fase ocurre en un solo punto y da como resultado solo una gota de aceite en agua. Por tanto, en la presente invención, el campo eléctrico se aplica a la emulsión doble que fluye en un canal hidrófilo que tiene una sección transversal sustancialmente similar a la sección transversal de las gotas de emulsión doble.

45 El término "sustancialmente similar", como se usa en este documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos, de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna importancia estadística dentro del contexto de la característica medida por dichos valores (por ejemplo, tamaños de las secciones transversales). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 %. Preferentemente, la sección transversal del canal hidrófilo es aproximadamente un 30 % más pequeña que la sección transversal de las gotas de emulsión doble.

50 El campo eléctrico aplicado a una gota de emulsión doble induce la coalescencia de la fase acuosa interna (es decir, el núcleo acuoso) con la fase acuosa externa (es decir, el fluido portador acuoso) para producir así una gota de emulsión de aceite en agua.

55 El campo eléctrico puede generarse a partir de un generador de campo eléctrico, es decir, un dispositivo o sistema que puede crear un campo eléctrico. El generador de campo eléctrico puede producir un campo de CA (es decir, uno que varía periódicamente con respecto al tiempo, por ejemplo, sinusoidal, diente de sierra, cuadrada, etc.), un campo de CD (es decir, uno que es constante con respecto al tiempo), un campo de pulsos, etc.

60 Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para producir un campo eléctrico adecuado (que puede ser CA, CD, etc.). En particular, se puede producir un campo eléctrico mediante la aplicación de voltaje a través de un par de electrodos, que se pueden colocar o incrustar dentro del sistema de fluidos (por ejemplo, dentro de un sustrato que define el canal o debajo del canal mediante deposición de vapor de oro o ITO), y/o colocados cerca del canal de tal manera que al menos una porción del campo eléctrico interactúe con la emulsión doble (por ejemplo, los electrodos pueden consistir en microcanales aparte de los canales de fluidos y llenos de una soldadura o una solución salina a la que se aplica el campo eléctrico). Preferentemente, el generador de campo eléctrico aplica una corriente sinusoidal o de forma cuadrada.

65

- 5 El generador de campo eléctrico puede aplicar un voltaje con una frecuencia entre 1 kHz y 1 GHz, preferentemente entre 1 kHz y 50 kHz, con mayor preferencia de una frecuencia entre 10 kHz y 30 kHz e incluso con mayor preferencia una frecuencia entre 20 kHz y 30 kHz, y una amplitud entre 100 V y 10 000 V, preferentemente de 1500 V a 3000 V, y con mayor preferencia de 2000 V a 3000 V.
- En una modalidad particular, el generador de campo eléctrico aplica un voltaje sinusoidal con una frecuencia de aproximadamente 10 kHz y una amplitud de aproximadamente 300 V.
- 10 En una modalidad preferida, el generador de campo eléctrico aplica un campo de CA, preferentemente una corriente de forma cuadrada. Preferentemente, la frecuencia es de 20 kHz a 30 kHz y la amplitud es de 2000 V a 3000 V.
- 15 En modalidades preferidas, y con el fin de proporcionar una inversión óptima de las gotas, las gotas w/o/w pasan por los electrodos a una frecuencia de 10 a 1000 gotas por segundo, preferentemente a una frecuencia de 100 a 500 gotas por segundo y con mayor preferencia a una frecuencia de 250 a 350 gotas por segundo. La frecuencia de las gotas se puede ajustar mediante inyección de un espaciador de aceite, preferentemente aceite sin tensioactivo, por ejemplo, mediante el uso de una estructura en forma de ψ .
- 20 Preferentemente, para evitar una coalescencia indeseable aguas arriba de este módulo de inversión de fase, se proporciona un apantallamiento eléctrico, típicamente mediante el uso de uno o varios electrodos de apantallamiento. Estos electrodos de apantallamiento están conectados a tierra y, por lo tanto, imponen una condición de límite de voltaje cero para el resto del chip, en particular para módulos aguas arriba como el módulo de reinyección o generación de gotas y el módulo para crear la emulsión doble, o módulos aguas abajo como el módulo de recogida de la emulsión. Estos electrodos de apantallamiento los utiliza habitualmente el experto en la técnica.
- 25 Preferentemente, la sección del canal hidrófilo entre el módulo para crear la emulsión doble, por ejemplo, la boquilla o la unión en forma de T, y el módulo de inversión de fase que aplica el campo eléctrico es de más de 4 mm, preferentemente más de 4,1, 4,2, 4,5, o 5 mm, es decir, las gotas de emulsión doble tienen que fluir más de 4 mm antes de atravesar el campo eléctrico.
- 30 En una segunda modalidad, las gotas de emulsión doble se desestabilizan por electroporación. En esta modalidad, el método de invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite comprende
- 35 (i) formar gotas de emulsión doble a partir de dichas gotas de emulsión de agua en aceite; y
(ii) aplicar un voltaje a dichas gotas de emulsión doble suficiente para romper la cápsula oleosa de las gotas de emulsión doble para producir así gotas de emulsión de aceite en agua.
- Preferentemente, en esta modalidad, la emulsión doble se genera en un chip de microfluidos antes de colocarse en una cubeta de electroporación en donde se aplica el voltaje mediante el uso de un electroporador.
- 40 El voltaje aplicado es de 20 V a 500 V durante 10 ms a 1000 ms. En una modalidad preferida, el voltaje aplicado es de aproximadamente 50 V durante aproximadamente 100 ms.
- 45 En una tercera modalidad, las gotas de emulsión doble se desestabilizan espontáneamente. En esta modalidad, el método de invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite comprende
- (i) formar gotas de emulsión doble a partir de dichas gotas de emulsión de agua en aceite; e
(ii) incubar estas gotas hasta que las cápsulas oleosas se rompan por sí mismas.
- 50 Preferentemente, las gotas de emulsión doble se incuban en un chip de microfluidos mediante el uso de una línea de retardo. Los expertos conocen bien y usan comúnmente tales líneas de retardo (véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 2 340 435).
- 55 Preferentemente, las gotas de emulsión doble se incuban durante al menos 2 min, con mayor preferencia durante al menos 5 min, e incluso con mayor preferencia durante al menos 10 min.
- Opcionalmente, las gotas no invertidas pueden eliminarse además en función de que su tamaño sea más grande que el invertido.
- 60 Opcionalmente, después de la inversión de fase, las gotas de emulsión de aceite en agua pueden estabilizarse mediante la adición de tensioactivo al fluido portador acuoso. El tensioactivo puede proporcionarse mediante entradas aguas abajo del módulo de inversión de fase.
- 65 Pueden recogerse gotas de emulsión de aceite en agua, en particular para someterlas a análisis adicionales. Preferentemente, antes de la recogida, las gotas o/w se estabilizan con tensioactivo para evitar cualquier coalescencia

durante el almacenamiento.

El sistema de microfluidos que se usa en la presente invención, en particular para la inversión de fase, puede combinar la producción de una emulsión doble (es decir, emulsión w/o/w) y su inversión. Por tanto, el sistema puede comprender un módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite (es decir, un módulo que produce gotas mediante el uso de cualquier técnica conocida, como la ruptura en corrientes que fluyen conjuntamente, ruptura en corrientes de flujo cruzado, por ejemplo en uniones en forma de T, ruptura en flujos dominados por elongación o estiramiento, como por ejemplo en el enfoque de flujo hidrodinámico), o reinyectar la emulsión de agua en aceite (por ejemplo, un módulo de reinyección de la emulsión que comprende una estructura en forma de ψ), un módulo para crear una emulsión doble (por ejemplo, mediante el uso de una unión de enfoque de flujo o una unión en forma de T) en comunicación continua y aguas abajo del módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite o reinyectar la emulsión de agua en aceite, y un módulo de inversión de fase en comunicación continua y aguas abajo del módulo para crear la emulsión doble.

En la Figura 29 se presenta un ejemplo ilustrativo de tal sistema.

Alternativamente, la producción de emulsión doble y el proceso de inversión pueden desacoplarse y realizarse en diferentes chips de microfluidos. En este caso, la emulsión doble se produce en un primer sistema de microfluidos que comprende

- un módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite o reinyectar la emulsión de agua en aceite como se definió anteriormente,
- un módulo para crear una emulsión doble como se definió anteriormente y en comunicación continua y aguas abajo del módulo para generar gotas de emulsión de agua en aceite o reinyectar la emulsión de agua en aceite, y
- un módulo de recogida de emulsión (es decir, un módulo para recoger gotas de emulsión doble) en comunicación continua y aguas abajo del módulo para crear la emulsión doble.

La emulsión doble se vuelve a inyectar después en un segundo sistema de microfluidos que comprende

- un módulo para reinyectar la emulsión doble (por ejemplo, un módulo de reinyección de la emulsión que comprende una estructura en forma de ψ), y
- un módulo de inversión de fase en comunicación continua y aguas abajo del módulo de reinyección de la emulsión doble.

Preferentemente, el módulo de inversión de fase comprende uno o más electrodos que generan un campo eléctrico dirigido a un canal hidrófilo. Como se ha especificado anteriormente, los electrodos pueden colocarse sobre o incrustarse dentro del sistema de fluidos, o colocarse cerca del canal de manera que al menos una parte del campo eléctrico interactúe con la emulsión doble.

Como se usa en este documento, el término "aguas arriba" se refiere a componentes o módulos en la dirección opuesta al flujo de fluidos desde un punto de referencia dado en un sistema de microfluidos.

Como se usa en el presente documento, el término "aguas abajo" se refiere a componentes o módulos en la dirección del flujo de fluidos desde un punto de referencia dado en un sistema de microfluidos.

En las modalidades en las que se produce una emulsión doble en el sistema de microfluidos usado para la inversión de fase, los canales de dicho sistema son parcialmente hidrófilos y parcialmente hidrófobos. La región aguas abajo del módulo para generar o reinyectar gotas de emulsión de agua en aceite y aguas arriba del módulo para crear gotas de emulsión doble es hidrófoba. Por el contrario, la región aguas abajo del módulo para crear gotas de emulsión doble es hidrófila.

Se puede crear una región hidrófila localizada en un canal de microfluido hidrófobo mediante varios métodos que conocen y aprecian los expertos en la técnica, que incluyen, entre otros, aplicar diversos tratamientos como plasma de oxígeno, aplicar un recubrimiento hidrófilo como poli(etilenglicol) o un silano activado fluorado, injertar químicamente pequeñas moléculas o polímeros en la capa dieléctrica para aumentar la hidrofilia de la superficie, y/o construir el canal de microfluidos con un material que tenga una química de superficie que pueda iniciarse con luz ultravioleta (UV), de manera que al dirigir la luz ultravioleta hacia la región localizada se induzca dicha química de superficie para producir un cambio en la propiedad de la superficie del material de la región de relativamente hidrófoba a relativamente hidrófila. El experto en la técnica conoce bien todas estas técnicas para controlar las propiedades humectantes de los dispositivos de microfluidos, las cuales se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente WO 2011/028764 y WO 2009/120254.

Por el contrario, una región localizada de un canal puede volverse más hidrófoba mediante varios métodos bien conocidos que incluyen, entre otros, aplicar materiales de recubrimiento como polisilicio y/o materiales de recubrimiento hidrófobos como una composición de polidimetilsiloxano o una composición de politetrafluoroetileno (por

ejemplo, TEFLON-AF).

En modalidades en las que la emulsión doble se produce en un sistema diferente al sistema de microfluidos utilizado para la inversión de fase, los canales del primer sistema (es decir, que produce la emulsión doble) son hidrófobos y los canales del segundo sistema (es decir, el sistema de inversión de fase) son hidrófilos.

En algunas modalidades, el módulo de inversión de fase es la región del sistema de microfluidos en donde se aplica un campo eléctrico sobre gotas de emulsión doble para obtener una emulsión de aceite en agua. Este módulo está en comunicación continua y aguas abajo del módulo de creación de la emulsión doble y comprende un canal hidrófilo y uno o más electrodos que generan un campo eléctrico dirigido a dicho canal hidrófilo en el que fluyen gotas de emulsión doble.

Típicamente, el campo eléctrico se produce mediante la aplicación de voltaje a través de un par de electrodos. Estos electrodos se pueden colocar o incrustar dentro del sistema de fluidos (por ejemplo, dentro de un sustrato que define el canal) y/o colocarse cerca del canal (por ejemplo, a aproximadamente 50 μm) de modo que al menos una parte del campo eléctrico interactúe con la emulsión doble. Los electrodos se pueden fabricar a partir de cualquier material o materiales de electrodo adecuados conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, entre otros, plata, oro, cobre, carbono, platino, cobalto, tungsteno, estaño, cadmio, níquel, óxido de indio y estaño, etc., así como combinaciones de estos. Los electrodos pueden estar formados por el mismo material o por diferentes materiales. Los electrodos también pueden ser electrodos líquidos de solución salina (por ejemplo, NaCl) moldeados alrededor del canal hidrófilo en el que fluyen las gotas.

El generador de campo eléctrico puede ser integral o estar separado del sistema de fluidos que contiene el canal hidrófilo. Como se usa en el presente documento, "integral" significa que partes de los componentes integrales entre sí están unidos de tal manera que los componentes no pueden separarse manualmente entre sí sin cortar o romper al menos uno de los componentes.

Preferentemente, se proporcionan uno o varios electrodos de apantallamiento para evitar que el campo eléctrico se extienda por todas partes. Estos electrodos están conectados a tierra y, por lo tanto, imponen una condición de límite de voltaje cero para las regiones aguas arriba y/o aguas abajo, en particular para el módulo de reinyección o generación de gotas y el módulo para generar la emulsión doble.

Preferentemente, incluso si se proporcionan electrodos de apantallamiento, la distancia entre el módulo de inversión de fase y el módulo para generar la emulsión doble es de más de 4 mm, preferentemente más de 4,1, 4,2, 4,5 o 5 mm.

El sistema de microfluidos puede comprender además un módulo espaciador en comunicación continua y aguas abajo del módulo para generar o reinyectar gotas de emulsión de agua en aceite, con el fin de cambiar el espaciado entre las gotas antes de crear la emulsión doble. Este módulo espaciador comprende uno o más canales de entrada para inyectar o eliminar fluido, preferentemente fase oleosa, entre las gotas en una corriente de fluido.

El sistema de microfluidos puede comprender además un módulo espaciador en comunicación continua y aguas abajo del módulo para crear gotas de emulsión doble, con el fin de cambiar el espaciado entre las gotas antes del módulo de inversión de fase. Este módulo espaciador comprende uno o más canales de entrada para inyectar o eliminar fluido, preferentemente fase acuosa, entre las gotas en una corriente de fluido.

El sistema de microfluidos puede comprender además un módulo de detección (por ejemplo, un módulo para detectar una señal como una señal fluorescente), un módulo de estabilización (por ejemplo, un módulo en donde se añade un tensioactivo a la fase portadora acuosa para estabilizar la emulsión inversa), un módulo de clasificación de gotas (por ejemplo, un módulo para clasificar las gotas en base a cualquier señal detectable como una señal fluorescente) y/o un módulo de recolección de gotas (un módulo para recolectar gotas, por ejemplo, para llevar a cabo un análisis adicional fuera del chip).

Detección, recuperación y/o cuantificación de las dianas moleculares capturadas

Después de la captura de la diana molecular en la interfase interna de las gotas gracias a las interacciones entre i) la diana molecular y la quimiosonda, y ii) la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales (opcionalmente a través de la interacción con un intermediario de unión), la diana molecular capturada puede ser detectada, recuperada y/o cuantificada.

Por tanto, el método de la invención puede comprender además una etapa de detección, recuperación y/o cuantificación de la diana molecular capturada.

Esta etapa se puede llevar a cabo directamente en las gotas w/o después de invertir la fase de las gotas para producir gotas de emulsión de aceite en agua y exponer los objetivos capturados en la superficie externa de las gotas como se describió anteriormente.

La elección del método utilizado para detectar, recuperar o cuantificar la diana molecular depende de varios parámetros como la naturaleza del tensioactivo con grupos funcionales, la quimiosonda o la diana molecular, y la presencia o ausencia de una etapa de inversión de la fase de emulsión.

5 En una modalidad, las dianas moleculares capturadas se detectan, recuperan y/o cuantifican después de la inversión de fase. Opcionalmente, el método puede comprender, además, antes de detectar, recuperar o cuantificar, el lavado de gotas o/w con el fin de eliminar las moléculas no capturadas.

10 En esta modalidad, las dianas moleculares capturadas pueden recuperarse de la interfase de las gotas mediante cualquier método conocido por el experto, por ejemplo, mediante interrupción de la interacción entre la quimiosonda y la diana molecular o interrupción de la interacción entre la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales y/o el intermediario de unión.

15 Alternativamente, en modalidades en las que el tensioactivo con grupos funcionales, la quimiosonda y/o el intermediario de unión comprenden un enlazador escindible, este enlazador puede escindirse para permitir la liberación y recuperación de las dianas moleculares capturadas.

20 Después de la inversión de fase, las dianas moleculares capturadas se exponen en la superficie externa de las gotas y, por lo tanto, pueden detectarse fácilmente mediante el uso de cualquier método conocido por el experto, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo u otro ligando que sea específico para la diana molecular y comprenda un medio para su detección.

25 Como se usa en el presente documento, "un medio de detección" se refiere a cualquier entidad que pueda ser útil para fines de detección, en términos de detección o calibración. Por ejemplo, el medio de detección puede ser una etiqueta MS o un fluoróforo.

30 En una modalidad particular, las dianas moleculares capturadas se detectan/cuantifican mediante el uso de uno o varios anticuerpos dirigidos contra dichas dianas y que comprenden una etiqueta MS. Se pueden usar diferentes etiquetas MS para detectar/cuantificar simultáneamente diferentes dianas. Preferentemente, en este caso, la emulsión w/o comprende un tensioactivo que comprende una cabeza hidrófila unida a una etiqueta MS. La detección o cuantificación de las dianas puede realizarse mediante análisis de espectrometría de masas después de la escisión de las etiquetas MS. La etiqueta del tensioactivo puede usarse como calibrador para el análisis de espectrometría de masas.

35 En otra modalidad, las dianas moleculares capturadas se detectan, recuperan y/o cuantifican directamente en las gotas w/o.

40 Para recuperar la diana molecular capturada en la superficie interna de las gotas, la emulsión puede romperse mediante cualquier método conocido por el experto, como los métodos descritos en Mazutis y otros, Nat. Protoc., 2013, 8, 870 o Chokka-lingam y otros, Lab Chip, 2014, 14, 2398.

45 Después de la rotura de la emulsión, las dianas moleculares capturadas pueden recuperarse mediante cualquier método conocido por el experto, por ejemplo, mediante interrupción de la interacción entre la quimiosonda y la diana molecular o interrupción de la interacción entre la quimiosonda y el tensioactivo con grupos funcionales y/o el intermediario de unión. Cuando el tensioactivo con grupos funcionales, la quimiosonda y/o el intermediario de unión comprenden un enlazador escindible, este enlazador puede escindirse para permitir la liberación y recuperación de las dianas moleculares capturadas.

50 La detección o cuantificación de la diana molecular capturada se puede llevar a cabo directamente en las gotas w/o mediante el uso de un anticuerpo u otro ligando que sea específico para la diana molecular y comprenda un medio de detección.

55 En una modalidad particular, la detección o cuantificación de la diana molecular capturada se lleva a cabo directamente en las gotas w/o mediante el uso de detección con láser/PMT de microfluidos gracias a un ligando específico para la diana molecular y detectable por láser/PMT, por ejemplo, un anticuerpo conjugado a un fluoróforo.

60 En otra modalidad particular, la detección o cuantificación de la diana molecular capturada se lleva a cabo directamente en las gotas w/o mediante el uso de un ensayo de ligación de proximidad (PLA, Gullberg y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004; Soderberg y otros, Nature Methods, 2006). Al convertir la detección de proteínas específicas en la detección de secuencias de ADN, esta técnica permite un análisis de proteínas altamente sensible. Brevemente, este método requiere un anticuerpo dirigido contra la diana molecular y un anticuerpo dirigido contra la quimiosonda, donde cada anticuerpo contiene una extensión de oligonucleótidos como sondas. Cuando la diana molecular es capturada por la quimiosonda, la proximidad de estas sondas que portan secuencias de oligonucleótidos conduce a una reacción de ligación que da como resultado la formación de una diana amplificable. La amplificación se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto, como la amplificación por círculo rodante, mediante el uso de sondas detectables como sondas fluorescentes. Con el uso de una curva de calibración, la intensidad de la señal en la interfase

65

interna de las gotas permite la detección y cuantificación de la diana molecular. El análisis de PLA se puede realizar simultáneamente en las mismas gotas para varias dianas mediante el uso de diferentes sondas detectables.

5 En una modalidad particular adicional, la diana molecular capturada es un ácido nucleico y la detección o cuantificación de dicha diana se lleva a cabo directamente en las gotas w/o mediante el uso de un sistema de transcripción y/o traducción *in vitro* y/o un sistema de amplificación de ácidos nucleicos. La detección y/o cuantificación se realizan después mediante detección o cuantificación del producto del sistema de transcripción y/o traducción o del sistema de amplificación de ácidos nucleicos. Los expertos conocen bien los métodos para llevar a cabo la transcripción y/o traducción *in vitro* o la amplificación de ácidos nucleicos en gotas.

10 El método de la invención puede comprender, además, clasificar las gotas w/o que comprenden la diana molecular capturada deseada. El experto en la técnica puede utilizar cualquier método conocido en la técnica, como los métodos revisados en el artículo de Wyatt Shields y otros (Lab Chip. 16 de febrero de 2015; 15(5): 1230-1249).

15 Usos del método de la invención

20 Gracias a la gran variedad de dianas moleculares que pueden capturarse en la interfase de las gotas mediante la unión al tensioactivo con grupos funcionales, el método de la invención puede usarse en diversas aplicaciones. Como ilustración, el método se puede utilizar en enfoques de genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, lipidómica, interactómica, secretómica y, en particular, en "ómicas" de células individuales para comprender la diversidad y heterogeneidad celulares. Una aplicación, entre otras, puede ser definir la variación normal de célula a célula, correlacionar la variación con cambios en la función biológica y los procesos de enfermedad y finalmente identificar una terapia personalizada.

25 El método de la invención también se puede utilizar para detectar, recuperar y/o cuantificar una o varias dianas moleculares de interés, en particular de importancia diagnóstica/pronóstica/teranóstica.

30 El método de la invención puede comprender, además, proporcionar una muestra de un sujeto, dicha muestra comprende una diana molecular de interés para ser capturada en la interfase de gotas de acuerdo con el método de la invención.

35 El término "muestra", como se usa en este documento, significa cualquier muestra que contiene células derivadas de un sujeto, preferentemente una muestra que contiene ácidos nucleicos. Los ejemplos de tales muestras incluyen fluidos tales como muestras de sangre, plasma, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido seminal, así como biopsias, órganos, tejidos o muestras de células. Puede ser una muestra fresca, congelada o fijada (por ejemplo, fijada con formaldehído o parafina). En algunas modalidades particulares, la muestra puede ser una muestra de una enfermedad, preferentemente una muestra de un cáncer, es decir, una muestra que contiene células tumorales derivadas de un paciente.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero, incluso con mayor preferencia a un ser humano, incluidos adultos, niños y seres humanos en la etapa prenatal.

45 Dicha muestra puede tratarse antes de ser utilizada en el método de la invención, por ejemplo, para extraer ácido nucleico, proteínas, lípidos, etc., para lavar células, para aislar células de tejidos u órganos, etc.

50 En una modalidad preferida, cada gota w/o que se usa en el método de la invención comprende una sola célula obtenida de una muestra del paciente y una o varias dianas moleculares de importancia diagnóstica/pronóstica/teranóstica pueden capturarse/detectarse y/o cuantificarse mediante el uso del método de la invención.

Kits y usos de estos

55 El presente documento describe, además, un kit para capturar una diana molecular, que comprende

- un tensioactivo con grupos funcionales que comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales; y
 - una quimiosonda que comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos
- 60 funcionales.

En particular, el kit puede comprender

- cualquiera de los tensioactivos con grupos funcionales como se definió anteriormente; en particular, como se representa en cualquiera de las fórmulas (Ia), (Ib), (Ic), (II) y (IIIa) o aquellas que comprenden restos H1 o H2 como se describió anteriormente.
- 65

- 5
- una quimiosonda como se definió anteriormente, es decir, que comprende (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a dicha diana molecular y (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente a dicho tensioactivo con grupos funcionales, es decir, al grupo FUNC de dicho tensioactivo; y
 - opcionalmente, un intermediario de unión como se definió anteriormente, es decir, que puede unirse tanto a la quimiosonda como al tensioactivo con grupos funcionales, para actuar, así como un puente entre dichas dos entidades.

10 Todas las modalidades descritas anteriormente para el método de la invención también están incluidas en el kit.

En un aspecto, el tensioactivo con grupos funcionales y el dominio de unión de la quimiosonda pueden comprender un resto funcional con un grupo químico reactivo adecuado para crear un enlace covalente mediante química clic. Preferentemente, el grupo químico reactivo adecuado para crear un enlace covalente mediante química clic se selecciona del grupo que consiste en un grupo azido y un grupo alquinilo tal como un grupo cicloalquinilo tensionado.

15 En un aspecto particular, el resto funcional del tensioactivo es un grupo azido y el dominio de unión de la quimiosonda es un grupo cicloalquinilo tensionado, o *viceversa*.

20 En otro aspecto, el kit comprende un tensioactivo con grupos funcionales con un resto funcional que comprende una etiqueta de proteína, preferentemente una biotina, y una quimiosonda con un dominio de unión que comprende un grupo que puede interactuar específicamente con la etiqueta de proteína del tensioactivo, preferentemente una estreptavidina o avidina, o *viceversa*.

25 En un aspecto particular, el kit comprende

- un tensioactivo con grupos funcionales con un resto funcional que comprende una biotina;
- una quimiosonda con un dominio de unión que comprende una biotina, y
- un intermediario de unión que es estreptavidina.

30 Preferentemente, la quimiosonda es un aptámero biotinilado o un anticuerpo biotinilado específico para la diana molecular.

Opcionalmente, el kit puede comprender, además

- 35
- tensioactivo(s) sin grupo(s) funcional(es);
 - una fase acuosa y/o una fase oleosa;
 - un chip de microfluidos como se describió anteriormente, en particular un chip de microfluidos que comprende un módulo de inversión de fase; y/o
 - un folleto con las instrucciones para el uso de dicho kit.
- 40

La presente invención se refiere, además, al uso del kit como se describe en este documento para capturar una diana molecular de acuerdo con el método de la invención.

45 Como se usa en este documento, el verbo "comprender" se usa en su sentido no limitativo para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos.

50 Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "una" típicamente significa "al menos uno".

55 Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores $\pm 10\%$ del valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 20" incluye $\pm 10\%$ de 20, o de 18 a 22. Preferentemente, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores $\pm 5\%$ del valor especificado.

Ejemplos

60

65

Abreviaturas

5	ACMS:	Ácido 7-aminocumarin-4-metanosulfónico
	ACN:	acetonitrilo
	BCN:	(1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil
	DCM:	diclorometano
	DIEA:	diisopropiletilamina
	DMF:	dimetilformamida
10	EDC:	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidas
	HBTU:	Hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio
	HOBT:	hidroxibenzotriazol
	HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
	NHS:	N-hidroxisuccinimida
15	NMR:	resonancia magnética nuclear
	PDMS:	polidimetilsiloxano
	PMA:	ácido fosfomolibdico
	PMT:	tubo fotomultiplicador
	RP:	fase inversa
20	SPAAC:	cicloaddición de alquino-azida promovida por tensión
	TAMRA:	tetrametilrodamina
	TEA:	triethylamina
	TFA:	ácido trifluoroacético
	THF:	tetrahidrofurano
25	TLC:	cromatografía en capa fina

Ejemplo 1: Síntesis química

1. Material y métodos

Procedimientos experimentales.

A menos que se indique lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de argón en cristalería secada al fuego con agitación magnética. Los líquidos sensibles al aire y/o la humedad se transfirieron mediante una jeringa. Cuando se requirieron, las soluciones se desgasificaron burbujeando argón a través de una aguja. Las soluciones orgánicas se concentraron mediante evaporación rotatoria a 25-80 °C a 15-30 torr. La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se realizó mediante el uso de placas cortadas de láminas de aluminio (ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ de Macherey-Nagel). La visualización se logró bajo una luz UV de 254 o 365 nm y por inmersión en una solución de revelación apropiada.

Materiales

Todos los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificaciones adicionales. Los disolventes anhidros utilizados en los experimentos se obtuvieron de Sigma-Aldrich o Alfa Aesar. Los disolventes fluorados (Novec 7100, Novec 7500 y FC 3283) se adquirieron de 3M. Todos los reactivos utilizados en los experimentos se adquirieron de Aldrich, Alfa Aesar, Acros o TCI y se utilizaron sin purificación adicional. Krytox157FS(H) se adquirió de Dupond. El gel de sílice para cromatografía en columna se adquirió de Merck (Geduran® Si 60, 40-63 µm). La cromatografía ultrarrápida en columna se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice G-25 (40-63 µm) de Macherey-Nagel.

Instrumentación

Espectroscopía de NMR, los espectros de NMR de ¹H y ¹³C se registraron a 23 °C en un espectrómetro Bruker 400. Los desplazamientos registrados se informan en partes por millón (δ) y se calibran mediante el uso de disolvente residual no deuterado. Los datos se representan de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete, br = ancho), constante de acoplamiento (J, Hz) e integración.

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron mediante el uso de un Q-TOF (tiempo de vuelo) 6520 de Agilent y los espectros de masas de baja resolución mediante el uso de un MSD 1200 SL (ESI/APCI) de Agilent con HPLC1200 SL de Agilent.

Los espectros de masas de baja resolución se obtuvieron mediante el uso de un MSD 1200 SL (ESI/APCI) de Agilent con un HPLC1200 SL de Agilent y un QDa (ESI) de Waters Acquity con un HPLC Alliance 2695 de Waters.

Los procedimientos de *HPLC preparativa* se realizaron en un Autoinyector Shimadzu SIL-10A para HPLC semipreparativa (bomba: Shimadzu LC-8A, detector de UV-Vis: Shimadzu SPD-10A, colector: colector de fracciones

Shimadzu FRC-10A) mediante el uso de Sunfire C18 (150 mm x 19 mm d.i., 5 μ m, Waters) a un flujo de 17 ml/min. Por muestra se inyectó 1 ml y se utilizó agua/ACN que contenía TFA al 0,05 % como sistema eluyente. El gradiente aplicado fue de ACN de 5 % a 95 % en 40 minutos y 10 minutos de reequilibrio. La detección se realizó a 550 nm para los derivados de TAMRA.

5

2. Síntesis de tensioactivos dibloque con grupos funcionales

Se sintetizaron cuatro tensioactivos dibloque con grupos funcionales para realizar la captura en la superficie interna de la microgota mediante dos estrategias diferentes. Se sintetizaron un tensioactivo alquino dibloque (Krytox-peg₁₀-alquino, **6**) y un tensioactivo azida dibloque (Krytox-peg₁₂-azida, **14**) para desarrollar la captura por química clic y se prepararon dos tensioactivos dibloque biotinilados (Krytox-pegio-biotina **10** y Krytox-peg₁₂-biotina **18**) para realizar la captura por inmuno-sándwich. Los tensioactivos dibloque se obtuvieron mediante reacciones de acoplamiento pseudo-peptídicas entre una cadena hidrófila basada en peg que porta una amina libre y la cadena ácida de perfluoropoliéter activada como su forma de cloruro de acilo (Krytox157-COCl, **5**). La cadena hidrófila se obtuvo mediante acoplamiento de dos derivados de oligoetilenglicol con adición de grupos funcionales de manera conveniente (Figura 1).

15

En primer lugar, se sintetizó un derivado de peg₁₀ **3** que porta un grupo amino protegido con *N*-boc y un alquino mediante una reacción de acoplamiento pseudo-peptídico entre las unidades estructurales **1** y **2** obtenidos de antemano, respectivamente, a partir de hexaetilenglicol y tetraetilenglicol. Este intermediario condujo a la síntesis del tensioactivo dibloque de alquino **6** después de la escisión de *N*-boc y el acoplamiento con Krytox-COCl **5**. Partiendo del producto intermedio **3** se obtuvo un tensioactivo dibloque biotinilado **10** después de la reacción clic con biotina-N₃ **7**, desprotección de *N*-Boc y acoplamiento con Krytox-COCl **5**.

20

En segundo lugar, se preparó un derivado de peg₁₂ que contenía restos azida y amino con *N*-boc mediante acoplamiento de los derivados de oligoetileno **1** y **12**, ambos obtenidos a partir de hexaetilenglicol (Figura 2). El tensioactivo dibloque de azida **14** se obtuvo después de la desprotección de *N*-boc y el acoplamiento con la cadena fluorada. Un segundo tensioactivo biotinilado **18** también se sintetizó después de la reacción clic con biotina-alquino **15**, escisión de *N*-Boc y acoplamiento con Krytox-COCl **5**.

25

N-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il)carbamato de *tert*-butilo **1** (Walton, J.G.A.; Patterson, S.; Liu, G.; Haraldsen, J.D.; Hollick, J.J.; Slawin, A.M.Z.; Ward, G.E.; Westwood, N.J. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 3049-3060), ácido 4,7,10,13,16-pentaoxonadec-18-inoico **2** (Kumar, A.; Erasquin, U.J.; Qin, G.; Li, K.; Cai, C. *Chem. Commun.*, 2010, 46, 5746-5748), (3*a*S,4*S*,6*a*R)-4-(7-(2-azidoetoxi)-5-oxoheptil)tetrahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-2(3*H*)-ona (biotina-N₃) **7** (Azagarsamy, M.A.; Yesilyurt, V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 4550-4551), *N*-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il)carbamato **11a** (Tamura, S.; Inomata, S.; Ebine, M.; Genji, T.; Iwakura, I.; Mukai, M.; Shoji, M.; Sugai, T.; Ueda, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23, 188-193) y 5-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(prop-2-in-1-il)pentanamida (biotina-alquino) **15** (Decuyper, E.; Specklin, S.; Gabillet, S.; Audisio, D.; Liu, H.; Plougastel, L.; Kolodych, S.; Taran, F. *Org. Lett.*, 2015, 17, 362-365) se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura.

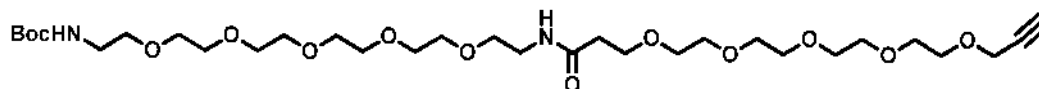
35

40

BocNH-pegio-alquino, **3**

(*N*-[17-(4,7,10,13,16-pentaoxonadec-18-inamido)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il]carbamato de *tert*-butilo)

45



C₃₁H₅₈N₂O₁₃ PM = 666,80 g/mol

50

A una solución de ácido 4,7,10,13,16-pentaoxonadec-18-inoico **2** (1,2 eq., 0,77 g, 2,54 mmol) en DCM (7 ml) en atmósfera de argón se le añadió hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida (1,5 eq., 0,61 g, 3,17 mmol) y HOBt (1,5 eq., 0,43 g, 3,17 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió una solución de *N*-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il)carbamato de *tert*-butilo **1** (1 eq., 0,81 g, 2,12 mmol) y DIEA (2,5 eq., 0,87 ml, 5,29 mmol) en DCM (7 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La solución resultante se diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con DCM (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 9/1 en 30 minutos) para producir BocNH-pegio-alquino **3** (0,905 g, 1,36 mmol, 64 %) como un aceite amarillo.

55

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,69 (brs, 1H), 5,07 (brs, 1H), 4,01 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 3,57 - 3,34 (m, 38H), 3,27 - 3,22 (m, 2H), 3,14 - 3,08 (m, 2H), 2,34 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,28 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,25 (s, 9H).

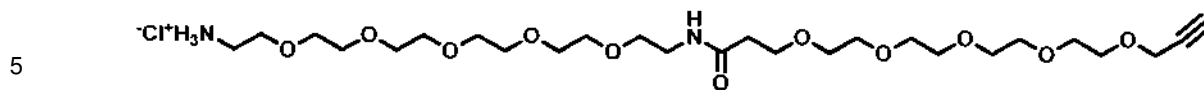
60

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,8, 156,4, 79,9, 75,0, 70,6 - 69,6, 69,1, 67,5, 66,4, 58,3, 53,1, 40,2, 39,0, 36,1, 28,7 (3C). MS (ESI) *m/z*: 667,5 [M + H]⁺.

NH₂-peg₁₀-alquino (sal de hidrócloruro), **4**

65

(Cloruro de 19-oxo-3,6,9,12,15,22,25,28,31,34-decaoxa-18-azaheptatriacont-36-in-1-amino)



$C_{26}H_{51}ClN_2O_{11}$ PM = 603,14 g/mol

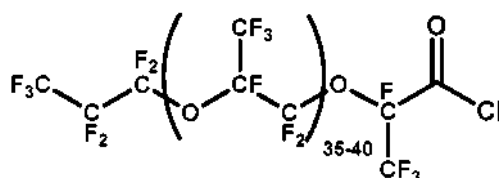
10 A una solución de BocNH-pegio-alkino **3** (0,37 g, 0,55 mmol) en DCM (6 ml) se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (6 eq., 0,83 ml, 3,33 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La evaporación del disolvente a presión reducida proporcionó NH₂-pegio-alkino **4** como un aceite amarillo (0,31 g, 0,55 mmol, cuantitativo).

15 ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,92 (brs, 3H), 4,16 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,86 - 3,92 (m, 2H), 3,77 - 3,57 (m, 36H), 3,46 - 3,40 (m, 2H), 3,14 - 3,05 (m, 2H), 2,65 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,41 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172,0, 79,7, 74,8, 70,5 - 70,0, 69,8, 69,6, 69,1, 67,4, 66,9, 58,4, 53,6, 40,3, 39,0, 36,7. HRMS (ESI) *m/z*: calculada para C₂₆H₅₂N₂O₁₁ [M + H]⁺ 567,3487, encontrada 567,3493.

Krytox-COCl, **5**

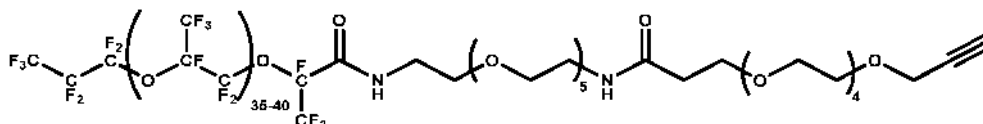
20



30 A una solución de Krytox-157FSH-CO₂H (5 g) en Novec 7100 (40 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (3,4 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 24 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro de acilo de Krytox bruto **5** obtenido se utilizó sin ninguna etapa de purificación adicional.

Krytox-pegio-alkino, **6**

35



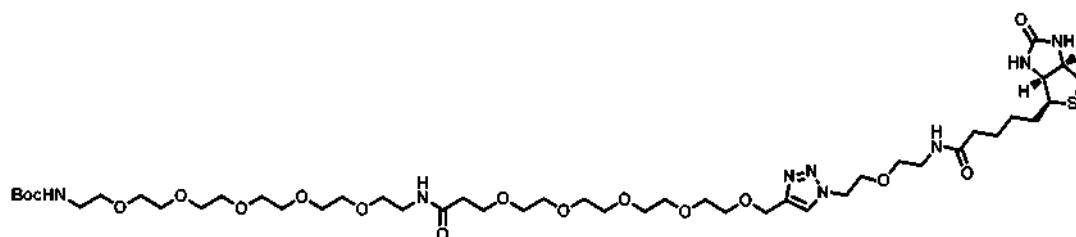
45 A una solución de Krytox-COCl **5** (1,23 g) en Novec 7100 (25 ml) se le añadió una solución de NH₂-pegio-alkino **4** (0,15 g) y TEA (92 μl) en THF (15 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto bruto obtenido después de la evaporación del disolvente se disolvió en FC 3283 (80 ml). La solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se añadió DCM (60 ml) para formar una emulsión. Después de la separación de las capas, se extrajo el compuesto deseado en la capa FC 3283. Esta última se concentró a presión reducida para producir Krytox-pegio-alkino **6** como un aceite blanco pegajoso.

BocNH-pegio-biotina, **8**

50

((17-oxo-1-(1-(2-(2-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)etoxi)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2,5,8,11,14,21,24,27,30,33-decaoxa-18-azapentatriacontan-35-il)carbamato de *terc*-butilo)

55



65 $C_{45}H_{82}N_8O_{16}S$ PM = 1023,24 g/mol

A una solución de BocNH-peg₁₀-alquino **3** (300 mg, 0,45 mmol) en THF/H₂O (10 ml, 1:1) se añadieron posteriormente (D)-biotina-N₃ **7** (1,5 eq, 240 mg, 0,67 mmol), ascorbato de sodio (0,8 eq., 71 mg, 0,36 mmol) y sulfato de cobre (II) (0,3 eq., 21 mg, 0,13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La solución resultante se diluyó con agua (50 ml), se extrajo con DCM (4 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 90/10 en 30 min) para producir BocNH-pegio-biotina **8** como un aceite incoloro (327 mg, 0,32 mmol, rendimiento del 71 %).

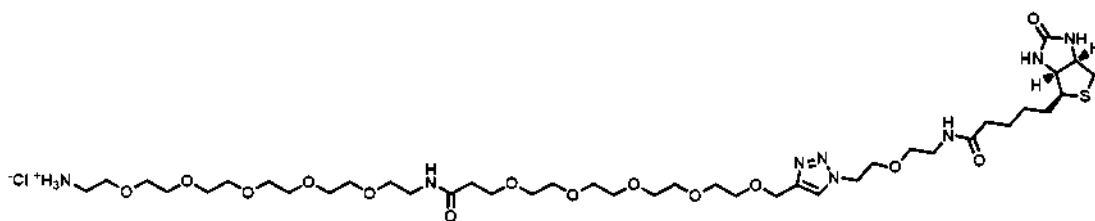
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,71 (s, 1H), 6,89 (brs, 1H), 6,64 (brs, 1H), 6,18 (brs, 1H), 5,45 (brs, 1H), 5,15 (brs, 1H), 4,64 (s, 2H), 4,49 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 4,45 (dd, *J* = 4,8 y 7,6 Hz, 1H), 4,26 (dd, *J* = 4,4 y 7,6 Hz, 1H), 3,81 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,70 - 3,55 (m, 34H), 3,51 - 3,46 (m, 6H), 3,41 - 3,31 (m, 4H), 3,28 - 3,23 (m, 2H), 3,12 - 3,06 (m, 1H), 2,85 (dd, *J* = 4,8 y 12,8 Hz, 1H), 2,68 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H), 2,42 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,16 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,74 - 1,54 (m, 4H), 1,43 - 1,34 (m, 2H), 1,39 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173,8, 171,6, 163,9, 156,2, 145,0, 124,2, 70,7 - 70,0, 69,0, 67,5, 64,7, 62,1, 60,4, 55,8, 50,4, 40,7, 40,6, 39,4, 39,2, 37,0, 35,7, 28,6, 28,2 (3C), 28,2, 25,7.

MS (ESI) *m/z*: 1023,4 [M + H]⁺, 1045,3 [M + Na]⁺.

NH₂-peg₁₀-biotina (sal de clorhidrato), **9**

(Cloruro de 17-Oxo-1-(1-(2-(2-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)etoxi)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2,5,8,11,14,21,24,27,30,33-decaoxa-18-azapentatriacontan-35-amino)



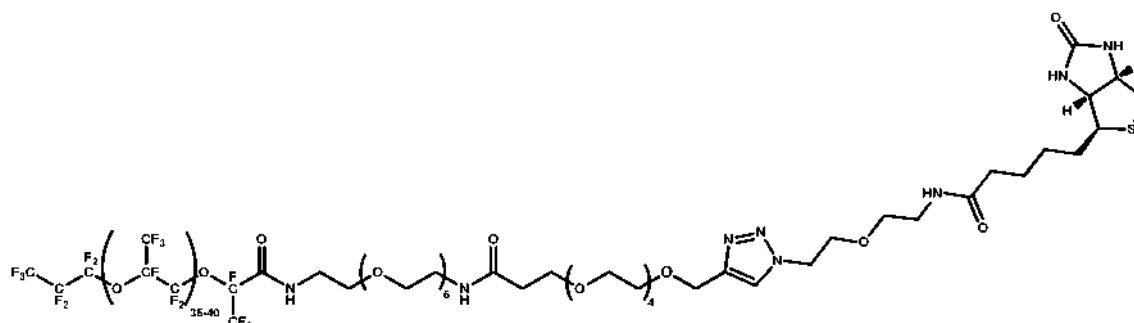
C₄₀H₇₅ClN₅O₁₄S PM = 959,59 g/mol

A una solución de BocNH-peg₁₀-biotina **8** (0,23 g, 0,22 mmol) en DCM (6 ml) se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (15 eq., 0,84 ml, 3,37 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La evaporación del disolvente a presión reducida proporcionó NH₂-peg₁₀-biotina **9** como un aceite incoloro (0,21 g, 0,22 mmol, rendimiento cuantitativo). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8,72 (s, 1H), 4,91 - 4,85 (m, 4H), 4,76 (dd, *J* = 4,8 y 8,0 Hz, 1H), 4,57 (dd, *J* = 4,4 y 8,0 Hz, 1H), 3,99 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,80 - 3,58 (m, 40H), 3,46 - 3,41 (m, 4H), 3,32 - 3,38 (m, 1H), 3,13 - 3,18 (m, 2H), 3,04 (dd, *J* = 4,8 y 13,2 Hz, 1H), 2,85 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 2,59 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,39 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,85 - 1,44 (m, 6H). Faltan las señales de NH₂ y NH.

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 176,3, 174,3, 164,1, 145,3, 126,6, 71,8 - 70,7, 70,0, 68,4, 68,1, 64,6, 63,7, 62,0, 57,1, 52,2, 41,13, 40,8, 40,5, 40,3, 37,7, 36,8, 29,9, 29,6, 27,0.

HRMS (ESI) *m/z*: calculada para C₄₀H₇₆N₈O₁₄S [M + 2H]²⁺ 462,2595, encontrada 462,2597.

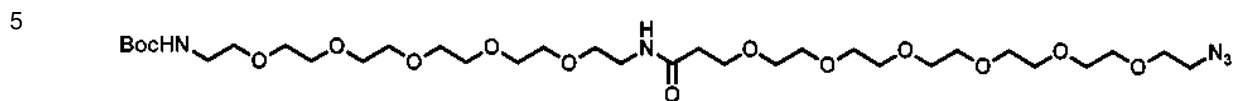
Krytox-pegio-biotina, **10**



A una solución de Krytox-COCl **5** (1,00 g) en Novec 7100 (25 ml) se le añadió una solución de NH₂-peg₁₀-biotina **9** (0,20 g) y TEA (75 μl) en THF (15 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 48 h. El material bruto obtenido después de la evaporación del disolvente se disolvió en FC 3283 (80 ml). La solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se añadió DCM (60 ml) para formar una emulsión. Después de la separación de las capas, se extrajo el compuesto deseado en la capa FC 3283. Esta última se concentró a presión reducida para producir Krytox-pegio-biotina **10** como un aceite blanco pegajoso.

BocNH-peg₁₂-azida, 12

((39-azido-19-oxo-3,6,9,12,15,22,25,28,31,34,37-undecaoxa-18-azanonatriacontil)carbamato de *tert*-butilo)



10 C₃₂H₆₃N₅O₁₄ PM = 741,87 g/mol

A una solución de ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico **11a** (1 eq., 1,00 g, 2,64 mmol) en CHCl₃ (15 ml) se le añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,5 eq., 0,76 g, 3,95 mmol) y HOBt (1,5 eq., 0,53 g, 3,95 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió una solución de *N*-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il)carbamato de *tert*-butilo **1** (1,2 eq., 1,20 g, 3,16 mmol) y DIEA (2,5 eq., 1,09 ml, 6,59 mmol) en CHCl₃ (10 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. La solución resultante se diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 95/5 en 30 minutos) proporcionó BocNH-peg₁₂-azida **12** (1,62 g, 2,19 mmol, 83 %) como un aceite amarillo.

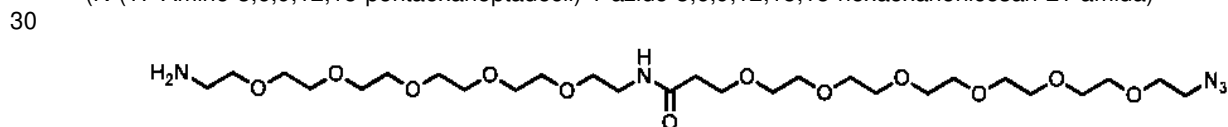
15 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,62 (brs, 1H), 5,05 (brs, 1H), 3,74(t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,70 - 3,58 (m, 38H), 3,54 (q, *J* = 5,4 Hz, 4H), 3,44 (dd, *J* = 5,4 y 10,8 Hz, 2H), 3,39 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,31 (dd, *J* = 5,0 y 10,0 Hz, 2H), 2,47 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

20 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,2, 155,8, 78,7, 70,5 - 69,7, 67,1, 50,5, 40,2, 39,0, 36,8, 28,3 (3C).

25 MS (ESI) *m/z*: 764,2 [M + Na]⁺.

NH₂-peg₁₂-azida, 13

(*N*-(17-Amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecil)-1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amida)



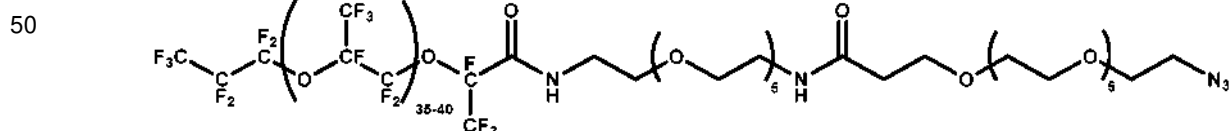
35 C₂₇H₅₅N₅O₁₂ PM = 641,75 g/mol

A una solución de BocNH-peg₁₂-azida **12** (1 eq., 0,40 g, 0,54 mmol) en DCM (15 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en dioxano (15 eq., 2,02 ml, 8,09 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de la evaporación, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 9/1,8/0,2) para producir NH₂-peg₁₂-azida **13** (0,34 g, 0,53 mmol, 98 %) como un aceite amarillo.

40 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,55 (brs, 1H), 3,82 - 3,56 (m, 46H), 3,44 (dd, *J* = 5,3 y 10,5 Hz, 2H), 3,38 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 2,55 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H).

45 ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,4, 70,4 - 70,0, 69,7, 69,6, 69,5, 69,0, 67,1, 50,4, 40,4, 38,8, 36,5.

MS (ESI) *m/z*: 664,3 [M + Na]⁺.

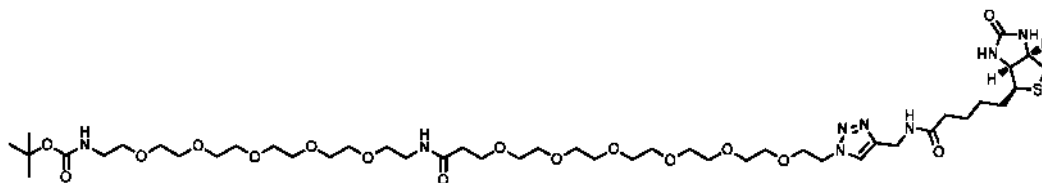
Krytox-peg₁₂-azida, 14

55 A una solución de Krytox157FSH-COCl **5** (2,30 g) en Novec 7100 (45 ml) se le añadió gota a gota una solución de NH₂-peg₁₂-azida (0,25 g) y TEA (148 μL) en DCM (25 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 36 horas. El material bruto obtenido después de la evaporación del disolvente se disolvió en FC 3283 (150 ml). La solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se añadió DCM (100 ml) para formar una emulsión. Después de la separación de las capas, se extrajo el compuesto deseado en la capa FC 3283. Esta última se concentró a presión reducida para producir Krytox-peg₁₂-azida **14** como un aceite amarillo pegajoso.

BocNH-peg₁₂-biotina, 16

65 ((19-Oxo-39-(4-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanamido)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,22,25,28,31,34,37-undecaoxa-18-azanonatriacontil)carbamato de *tert*-butilo)

5



C₄₅H₈₂N₈O₁₆S PM = 1023,24 g/mol

10

En un matraz de fondo redondo se añadió BocNH-peg₁₂-azida **12** (1 eq., 350 mg, 0,47 mmol), 5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(prop-2-in-1-il)pentanamida **15** (1,3 eq., 172 mg, 0,61 mmol), THF (6 ml) y agua (6 ml). El matraz se evacuó y se retrolavó con argón. El proceso de evacuación y lavado se repitió tres veces. Se añadieron CuSO₄·5H₂O (0,3 eq., 35 mg, 0,14 mmol) y ascorbato de sodio (0,8 eq., 75 mg, 0,38 mmol) a la mezcla y el matraz se evacuó y se retrolavó con argón. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución resultante se diluyó con agua (50 ml), se extrajo con DCM (4 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 8/2 en 30 minutos) proporcionó BocNH-peg₁₂-biotina **16** (405 mg, 0,40 mmol, 84 %) como un aceite amarillento.

15

20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 7,40 (brs, 1H), 6,76 (brs, 1H), 6,49 (brs, 1H), 5,87 (brs, 1H), 5,08 (brs, 1H), 4,62 - 4,47 (m, 4H), 4,41 (dd, *J* = 5,5 y 15,0 Hz, 1H), 4,38 - 4,32 (m, 1H), 3,86 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 3,73 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,68 - 3,57 (m, 36H), 3,54 (dd, *J* = 5,6 y 11,2 Hz, 4H), 3,43 (dd, *J* = 5,4 y 10,8 Hz, 2H), 3,35 - 3,26 (m, *J* = 4,9 Hz, 2H), 3,14 (dd, *J* = 7,2 y 11,9 Hz, 1H), 2,93 (dd, *J* = 5,0 y 12,8 Hz, 1H), 2,77 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 2,47 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,32 - 2,15 (m, 2H), 1,85 - 1,57 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,41 - 1,18 (m, 2H).

25

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173,2, 171,3, 164,4, 155,9, 144,9, 123,3, 78,8, 71,1- 68,9, 69,7, 69,2, 67,2, 61,7, 60,2, 55,8, 50,1, 40,4, 40,2, 39,0, 36,7, 35,6, 34,4, 28,3 (3C), 28,2, 28,0, 25,4.

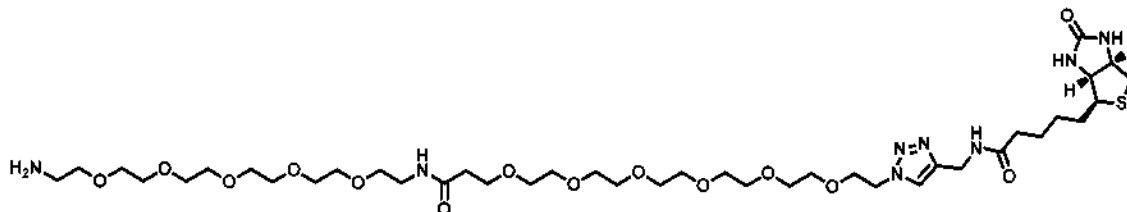
MS (ESI) *m/z*: 1023,4 [M + H]⁺.

NH₂-peg₁₂-biotina, **17**

30

(*N*-(17-Amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecil)-1-(4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amida)

35



40

C₄₀H₇₄N₈O₁₄S PM = 923,12 g/mol

45

A una solución de BocNH-peg₁₂-biotina **16** (1 eq., 370 mg, 0,36 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en dioxano (15 eq., 1,36 ml, 5,42 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la concentración, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 8/1,8/0,2) para producir NH₂-peg₁₂-biotina **17** (295 mg, 0,32 mmol, 88 %) como un aceite amarillento.

50

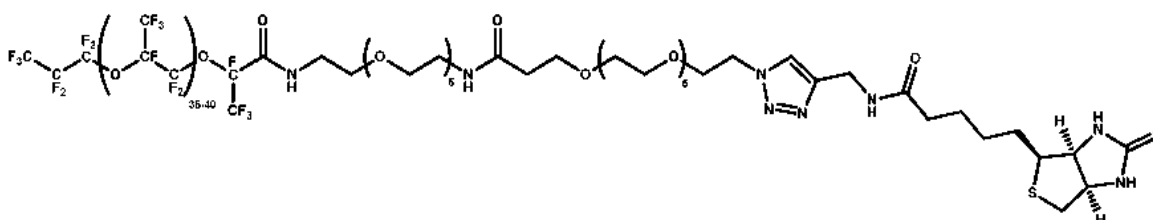
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (brt, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,03 (brs, 1H), 6,89 (brs, 1H), 6,46 (brs, 1H), 4,61 - 4,44 (m, 4H), 4,42 - 4,27 (m, 2H), 3,84 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,72 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,67 - 3,48 (m, 40H), 3,42 (dd, *J* = 5,3 y 10,7 Hz, 2H), 3,12 (dd, *J* = 7,2 y 11,7 Hz, 1H), 2,91 (dd, *J* = 4,9 y 12,8 Hz, 1H), 2,86 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,77 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 2,46 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,29 - 2,13 (m, 2H), 2,05 (s, 2H), 1,85 - 1,58 (m, 4H), 1,54 - 1,31 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173,1, 171,2, 164,2, 144,9, 123,2, 72,6, 70,5 - 69,7, 69,5, 69,1, 67,1, 61,6, 60,0, 55,6, 49,8, 41,3, 40,3, 38,9, 36,6, 35,4, 34,4, 28,2, 27,9, 25,3.

55

MS (ESI) *m/z*: 923,5 [M + H]⁺.

Krytox-peg₁₂-biotina, **18**

60

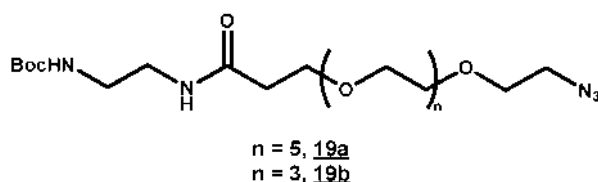


65

A una solución de Krytox157FSH-COCl **5** (1,670 g) en Novec 7100 (40 ml) se le añadió una solución de H₂N-peg₁₂-biotina **17** (0,285 g) y TEA (107 µL) en DCM (20 ml). El producto bruto obtenido después de la evaporación del disolvente se disolvió en FC 3283 (100 ml). La solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se añadió DCM (100 ml) para formar una emulsión. Después de la separación de las dos capas, el compuesto deseado se extrajo en la capa FC 3283. Esta última se concentró a presión reducida para producir Krytox-peg₁₂-biotina **18** como un aceite blanco pegajoso.

3. Síntesis de tensioactivos tribloque con grupos funcionales

Se sintetizaron tensioactivos tribloque con grupos funcionales que portan restos de azida y biotina de acuerdo con la estrategia de síntesis que se indica en la Figura 3. La etapa clave de esta síntesis consistió en la preparación de un derivado de peg trifuncional mediante dimerización reductora de azida (Lange, M., Pettersen, A. L., Undheim, K. Tetrahedron, 1998, 54, 5745-5752; An, I.-H., Seong, H.-R., Ahn, K. H. Bull. Korean Chem. Soc., 2003, 25, 420-422). Los sustratos de esta reacción se obtuvieron en primer lugar mediante acoplamiento de derivados ácidos de oligoetilenazida (**19a** y **19b**) con N-boc etilendiamina. Estos compuestos resultantes se sometieron a la dimerización reductora de azida en condiciones de hidrogenación para obtener los enlazadores de peg trifuncionales **20a** y **20b**. A partir de estos enlazadores trifuncionales, se acopló una tercera cadena de peg azida ácida a la amina secundaria central, para producir los derivados tri-peg que portan un resto azida **21a** y **21b**. Estos intermediarios condujeron a la síntesis de los tensioactivos tribloque azida **23a** y **23b** después de la escisión de N-boc seguida de una reacción de acoplamiento pseudopeptídico con Krytox-COCl **5**. Se obtuvo, además, un tensioactivo tribloque biotilado a partir del intermediario tripeg₆ azida **21a** después de la reacción clic con biotina-alquino 15, desprotección de los restos N-Boc y acoplamiento con Krytox-COCl **5**.



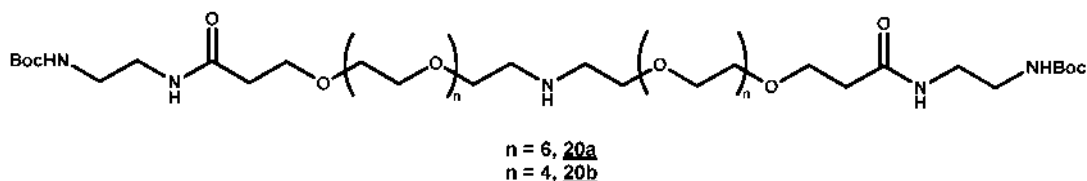
19a, (1-Azido-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azatetracosan-24-il)carbamato de *tert*-butilo, C₂₂H₄₃N₅O₉, PM = 521,6 g/mol.

19b, (1-Azido-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)carbamato de *tert*-butilo, C₁₈H₃₅N₅O₇, PM = 433,5 g/mol.

Procedimiento general: A una solución de un derivado ácido de oligoetileno (11a u 11b) en DCM (0,5 mmol/ml) se le añadieron HOBT (1,3 eq.) y EDC (1,3 eq.). La solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una solución de N-boc etilendiamina (1,1 eq.) y TEA (3 eq.) en DCM (0,5 mmol/ml de N-boc etilendiamina) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La finalización de la reacción se monitoreó mediante TLC (DCM/MeOH/HCO₂H 9/1/0,1, revelador de PMA). Después de la concentración, se añadió agua y la solución se extrajo con DCM. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice.

19a, gradiente de eluyente para cromatografía ultrarrápida: EtOAc a EtOAc/MeOH 9/1 en 30 minutos. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,87 (s, 1H), 5,24 (s, 1H), 3,75 - 3,62 (m, 24H), 3,40 (s, 4H), 3,29 - 3,20 (m, 2H), 2,46 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172,2, 156,4, 79,2, 70,8 - 70,5, 70,4, 70,3, 70,0, 67,3, 50,7, 40,7, 39,7, 37,0, 28,5. MS (ESI) m/z: 434,2 [M + H]⁺.

19b, gradiente de eluyente para cromatografía ultrarrápida: DCM a DCM/MeOH 9/1 en 30 minutos. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,92 (brs, 1H), 5,19 (brs, 1H), 3,84 - 3,58 (m, 16H), 3,45 - 3,30 (m, 4H), 3,29 - 3,18 (m, 2H), 2,46 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 1,46 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172,1, 156,4, 79,1, 77,4, 77,1, 76,8, 70,6, 70,6, 70,5, 70,5, 70,3, 70,2, 79,0, 67,2, 50,7, 40,5, 39,1, 37,0, 28,4, 28,3. MS (ESI) m/z: 522,1 [M + H]⁺.



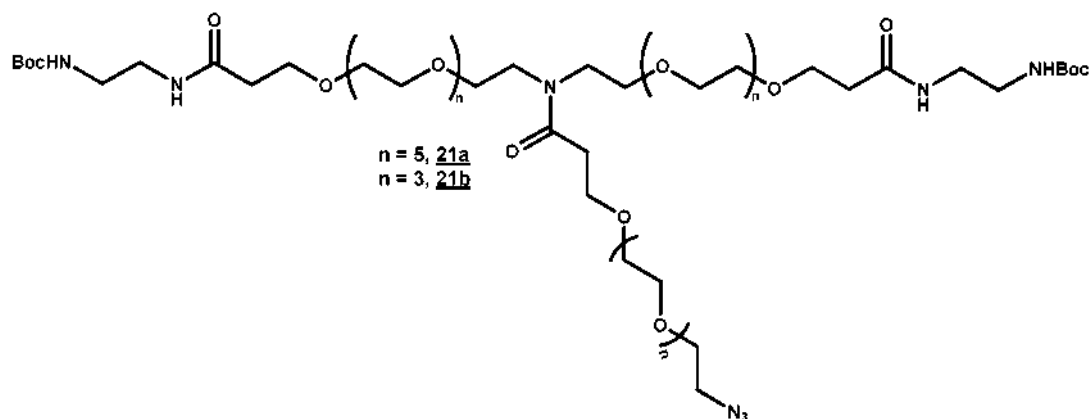
20a. (4,46-Dioxo-7,10,13,16,19,22,28,31,34,37,40,43-dodecaoxa-3,25,47-triazanonatetracontano-1,49-diil)dicarbamato de di-*terc*-butilo, C₄₄H₈₇N₅O₁₈, PM = 974,2 g/mol.

20b. (4,34-Dioxo-7,10,13,16,22,25,28,31-octaoxa-3,19,35-triazaheptatriacontano-1,37-diil)dicarbamato de di-*terc*-butilo, C₃₆H₇₁N₅O₁₄, PM = 798,0 g/mol.

Procedimiento general: A una solución de un derivado de azida (**19a** o **19b**) en dioxano desgasificado (0,5 mmol/ml) se le añadió Pd/C (0,05 eq.). La solución se agitó durante 4 horas a 60 °C en atmósfera de hidrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó en DCM y se filtró a través de un lecho de Celite®. Después de la concentración, el material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiOH previamente desactivado con una solución de DCM/MeOH/NH₄OH 9/0,9/0,1, DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 9/0,9/0,1 en 30 minutos).

20a. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,93 (s, 2H), 5,30 (s, 2H), 3,72 (t, *J* = 5,7 Hz, 4H), 3,68 - 3,54 (m, 44H), 3,38 - 3,30 (m, 4H), 3,28 - 3,18 (m, 4H), 2,81 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 2,46 (t, *J* = 5,7 Hz, 4H), 1,43 (s, 18H). Falta la señal de NH. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,7 (2C), 156,2 (2C), 78,5 (2C), 77,8 (2C), 77,5 (2C), 77,2 (2C), 70,3 - 70,0, 67,0 (2C), 48,9 (2C), 40,2 (2C), 39,5 (2C), 36,7 (2C), 28,3 (6C). MS (ESI) *m/z*: 798,4 [M + H]⁺.

20b. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,95 (s, 2H), 5,31 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H), 3,74 - 3,55 (m, 32H), 3,38 - 3,32 (m, 4H), 3,27 - 3,19 (m, *J* = 5,3 Hz, 4H), 2,80 (t, *J* = 5,3 Hz, 4H), 2,46 (t, *J* = 5,8 Hz, 4H), 1,43 (s, 18H). Falta la señal de NH. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172,2 (2C), 156,4 (2C), 79,2 (2C), 77,4 (2C), 77,2 (2C), 77,0 (2C), 76,7 (2C), 70,6 - 70,2 (6C), 67,3 (2C), 49,2 (2C), 40,6 (2C), 39,7 (2C), 37,0 (2C), 28,5 (6C). MS (ESI) *m/z*: 974,4 [M + H]⁺.



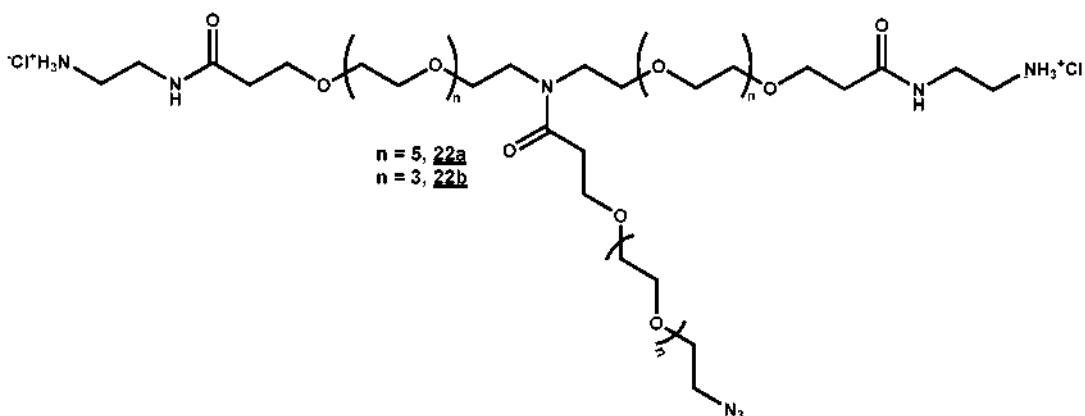
21a. (25-(1-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosa-21-ol)-4,46-dioxo-7,10,13,16,19,22,28,31,34,37,40,43-dodecaoxa-3,25,47-triazanonatetracontano-1,49-diil)dicarbamato de di-*terc*-butilo, C₅₉H₁₁₄N₈O₂₅, PM = 1335,6 g/mol.

21b. (19-(1-Azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-ol)-4,34-dioxo-7,10,13,16,22,25,28,31-octaoxa-3,19,35-triazaheptatriacontano-1,37-diil)dicarbamato de di-*terc*-butilo, C₄₇H₉₀N₈O₁₉, PM = 1071,3 g/mol.

Procedimiento general: A una solución de un derivado ácido (**11a** u **11b**, 1,05 eq.) en DCM (0,5 mmol/ml) se le añadieron HOBt (1,3 eq.) y EDC (1,3 eq.). La solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una solución de un derivado de dialquilamina (**20a** o **20b**, 1,0 eq.) y TEA (3 eq.) en DCM (0,5 mmol/ml de dialquilamina) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La finalización de la reacción se monitoreó mediante TLC (DCM/MeOH/HCO₂H 9/1/0,1, revelador de PMA). Después de la concentración, el material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/Me-OH 85/15 en 30 minutos).

21a. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,89 (s, 2H), 5,27 (s, 2H), 3,79 - 3,53 (m, 76H), 3,41 - 3,32 (m, 6H), 3,24 (d, *J* = 5,3 Hz, 4H), 2,68 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,46 (t, *J* = 5,7 Hz, 4H), 1,43 (s, 18H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172,0, 171,2, 156,3, 78,9, 77,6, 77,3, 77,0, 70,6 - 70,2, 70,1, 69,9, 69,3, 69,2, 67,4, 67,2, 50,6, 48,7, 46,1, 40,4, 39,6, 36,8, 33,4, 28,4. MS (ESI) *m/z*: 1071,4 [M + H]⁺.

21b. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,91 (s, 2H), 5,27 (s, 2H), 3,81 - 3,52 (m, 52H), 3,41 - 3,30 (m, 6H), 3,24 (s, 4H), 2,68 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,45 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 1,43 (s, 18H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,1, 171,7, 171,1, 156,1, 78,7, 70,4 - 69,9, 69,7, 69,0, 67,2, 67,0, 53,3, 50,4, 48,5, 46,0, 40,2, 39,5, 36,6, 33,3, 28,2. MS (ESI) *m/z*: 668,6 [(M + 2H)/2]²⁺.



5

10

15

22a, Cloruro de 25-(1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosa-21-ol)-4,46-dioxo-7,10,13,16,19,22,28,31,34,37,40,43-dodecaoxa-3,25,47-triazanonatetracontano-1,49-diaminio, $C_{49}H_{100}Cl_2N_8O_{21}$ PM = 1208,3 g/mol.

20

22b, Cloruro de 19-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-ol)-4,34-dioxo-7,10,13,16,22,25,28,31-octaoxa-3,19,35-triazaheptatriacontano-1,37-diaminio, $C_{37}H_{76}Cl_2N_8O_{15}$, PM = 943,9 g/mol.

Procedimiento general: A una solución de tripeg₆-azida (**21a** o **21b**, 1,0 eq.) en DCM (0,05 mmol/ml) se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (20 eq.). La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El material bruto se utilizó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional. La finalización de la reacción se comprobó mediante TLC (DCM/MeOH 9/11 PMA o revelador de ninhidrina) y ¹H NMR.

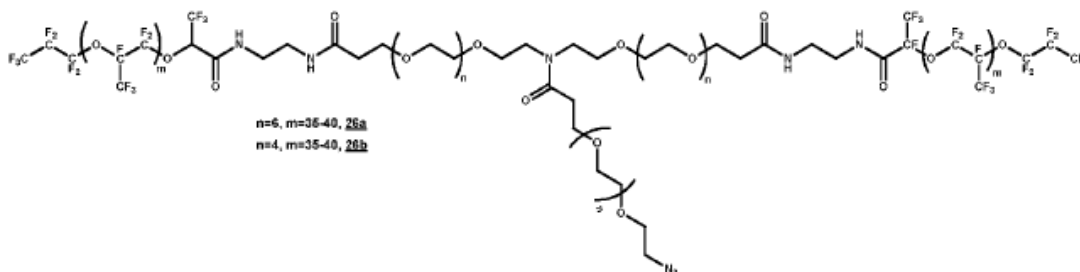
25

22a, ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ3,87 - 3,45 (m, 80H), 3,39 2H), 3,12 4H) 2,76 2H), 2,50 4H). Faltan las señales de NH₂ y NH.

30

22b, ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ3,81 - 3,59 (m, 52H), 3,50 (dd, $J = 6,3$ y $12,5$ HZ, 4H), 3,43 - 3,37 (m_r 2H), 3,09 (d, $J = 5,3$ HZ, 4H), 2,76 (t $J = 6,2$ HZ, 2H), 2,51 (t $J = 5,9$ HZ, 4H). Faltan las señales de NH₂ y NH.

35



40

45

23a, diKrytox-peg₁₈-azida

23b, diKrytox-peg₁₂-azida

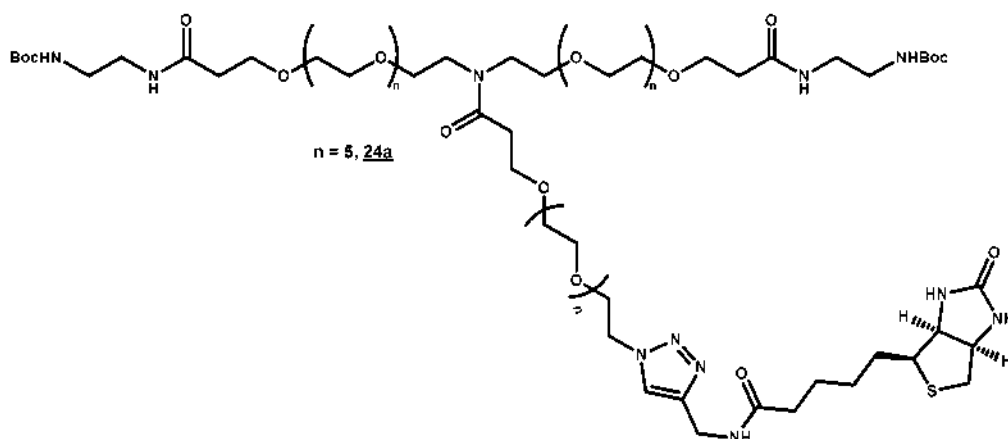
Procedimiento general: A una solución de Krytox157FSH-COCl **5** (2 eq.) en Novec 7100 (0,1 g/ml) se le añadió una solución de un derivado de amina (**22a** o **22b**, 1 eq.) y TEA (3 eq.) en DCM. (20 ml). El producto bruto obtenido tras la evaporación del disolvente se disolvió en una mezcla de Novec 7500/FC 3283 (1/1). La capa fluorada se lavó tres veces con CHCl₃ y se concentró a presión reducida para producir los tensioactivos de diKrytox-peg-azida **23a** y **23b** en forma de aceites amarillentos.

50

55

60

65

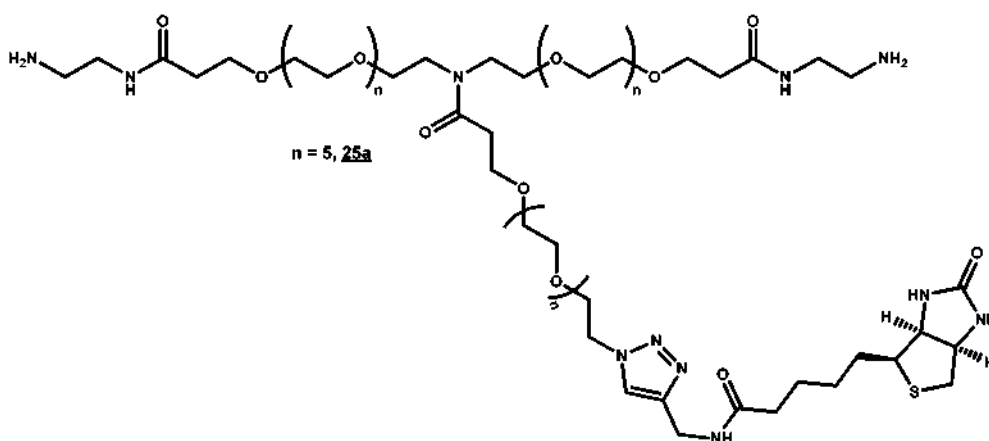


24a, (4,46-Dioxo-25-(1-(4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oi)-7,10,13,16,19,22,28,31,34,37,40,43-dodecaoxa-3,25,47-triazanonatetracontano-1,49-diil)dicarbamato de di-*tert*-butilo, $C_{72}H_{133}N_{11}O_{27}S$, PM = 1616,9 g/mol.

En un matraz shlenk en atmósfera de argón se añadió biotina-alquino (1,5 eq. 158 mg, 0,56 mmol), tripeg₆-N₃ **22a** (1 eq., 500 mg, 0,37 mmol) THF (3 ml) y agua (3 ml). El matraz se evacuó y se retrolavó con argón. El proceso de evacuación y lavado se repitió tres veces. Se añadieron ascorbato de sodio (0,8 eq., 59,3 mg, 0,30 mmol) y CuSO₄·5H₂O (30 %, 28 mg, 0,11 mmol) a la mezcla y el matraz se evacuó y se retrolavó con argón. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Monitorización por TLC: DCM/MeOH al 15 %, revelador KMnO₄. La solución resultante se diluyó con agua (50 ml), se extrajo con DCM (4 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida (RP-C18 16 g; H₂O a H₂O/ACN 6/4 en 30 minutos) produjo tripeg₆-biotina **24a** como un aceite amarillento.

24a, ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (s, 1H), 7,51 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 6,94 (s, 2H), 6,62 (s, 1H), 6,06 (s, 1H), 5,30 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 4,58 - 4,47 (m, 4H), 4,43 - 4,32 (m, 2H), 3,85 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,79 - 3,51 (m, 74H), 3,34 (dd, *J* = 5,5 y 11,2 Hz, 4H), 3,23 (d, *J* = 5,4 Hz, 4H), 3,14 (dd, *J* = 7,3 y 11,8 Hz, 1H), 2,93 (dd, *J* = 5,0 y 12,8 Hz, 1H), 2,77 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 2,68 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,45 (t, *J* = 5,8 Hz, 4H), 2,31 - 2,14 (m, 2H), 1,81 - 1,61 (m, 4H), 1,43 (s, 18H), 1,41 - 1,18 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173,2, 171,9, 171,2, 164,3, 156,3, 144,9, 123,3, 78,8, 77,7, 77,6, 77,4, 77,1, 70,6 - 70,1, 69,2, 69,2, 67,3, 67,1, 61,7, 60,1, 55,7, 50,1, 48,6, 46,1, 40,4, 39,6, 36,8, 35,6, 34,4, 33,4, 28,4, 28,2, 28,0, 25,3.

MS (ESI) *m/z*: 809,1 [(M + 2H)/2]²⁺.

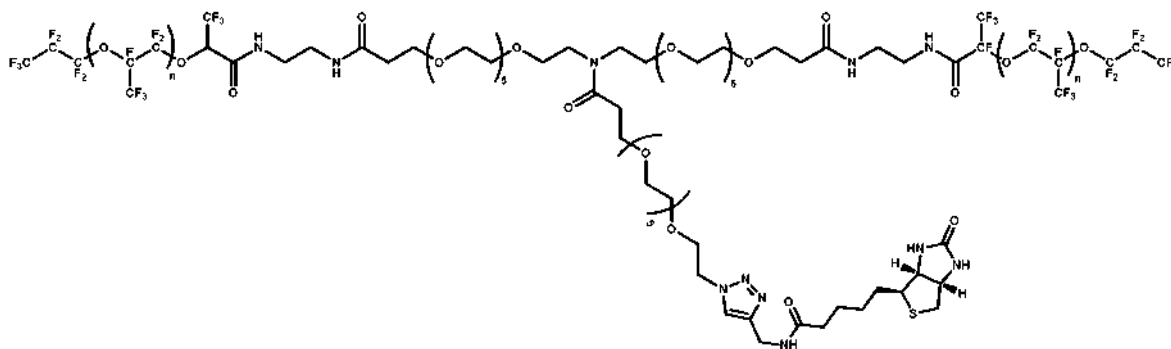


25a, *N,N*-bis(24-Amino-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-22-azatetracosil)-1-(4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-amida, $C_{62}H_{117}N_{11}O_{23}S$, PM = 1416,7 g/mol.

A una solución de tripeg₆-biotina (1 eq., 360 mg, 0,223 mmol) en DCM (6 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en dioxano (30 eq., 1,67 ml, 6,68 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. Después de la concentración, el producto bruto se disolvió en MeOH (5 ml) y se añadió dietilamina-poliestireno (5 eq., 3 mmol/g, 372 mg). La resina se separó por filtración y se lavó con MeOH. Después de la evaporación del filtrado, se obtuvo el derivado de diamina

libre **25a** como un aceite amarillento (290 mg, 0,21 mmol, 92 %).

25a, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,93 (s, 1H), 4,60 - 4,53 (m, 2H), 4,50 (dd, $J = 4,3$ y $7,9$ Hz, 1H), 4,44 (s, 2H), 4,30 (dd, $J = 3,9$ y $7,3$ Hz, 1H), 3,91 - 3,86 (m, 2H), 3,83 - 3,72 (m, 6H), 3,70 - 3,53 (m, 68H), 3,48 (td, $J = 3,5$ y $5,8$ Hz, 4H), 3,25 - 3,16 (m, 1H), 3,11 - 3,02 (m, 4H), 2,93 (dd, $J = 5,0$ y $12,7$ Hz, 1H), 2,75 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,71 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,49 (t, $J = 5,9$ Hz, 4H), 2,25 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,81 - 1,52 (m, 4H), 1,50 - 1,38 (m, 2H). Faltan las señales de NH_2 y NH .



26a, diKrytox-peg₁₈-biotina

Se disolvieron tripeg₆-biotina- NH_2 **25a** (1 eq., 100 mg, 0,071 mmol) y TEA (6 eq., 0,059 ml, 0,424 mmol) en una mezcla de DMF (0,5 ml) y CHCl_3 (9,5 ml) en atmósfera de argón. Se añadió una solución de Krytox157FSH- COCl **5** (2 eq., 917 mg, 0,141 mmol) en Novec 7100 (10 ml) y la mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. El material bruto obtenido después de la evaporación del disolvente se disolvió en FC3283 (80 ml). La solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se añadió CHCl_3 (80 ml) para formar una emulsión. Después de la separación de las dos capas, el compuesto deseado se extrajo en la capa FC 3283. Esta última se concentró a presión reducida para producir diKrytox-peg₆-biotina como un aceite amarillento pegajoso.

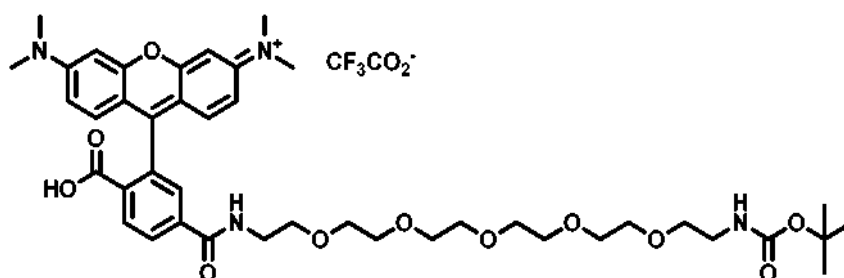
4. Síntesis de derivados de cicloalquino tensionados fluorescentes

Para establecer una prueba de concepto de la captura en la superficie interna de la microgota mediante química clic sin cobre, se sintetizaron dos derivados de cicloalquino tensionados fluorescentes. Se eligió BCN ((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil) por su fácil disponibilidad y se conjugó con fluoróforos TAMRA y sulfo-Cy5. Para el derivado de TAMRA, primero se realizó una reacción de acoplamiento pseudopeptídico entre TAMRA-6- CO_2H y el derivado **1** de mono *N*-boc peg₆ diamina. Después de la desprotección de *N*-boc, el fluoróforo se acopló a BCN en su forma **21** activada con carbonato de nitrofenilo (Figura 4). El éster SulfoCy5 NHS se acopló directamente a BCN- NH_2 **31** mediante un enlace amida (Figura 5).

(1*R*,8*S*,9*S*)-Biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (4-nitrofenil) carbonato **29** (Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L.J.A.; Rutjes, F.P.J.T.; van Hest, J.C.M.; Lefeber, D.J.; Friedl, P.; van Delft, F.L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 9422-9425) y (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (2-aminoetil)carbamato **31** (Wang, K., Sachdeva, A., Cox, D.J., Wilf, N.M., Lang, K., Wallace, S., Mehl, R.A., Chin J.W. *Nature Chemistry*, 2014, 6, 393) se sintetizó de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura.

TAMRA-peg₆-NHBoc (sal de TFA), **27**

(2,2,2-Trifluoroacetato de *N*-(9-(2-carboxi-5-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14,17,20-hexaoxa-5-azadocosan-22-il)carbamoyl)fenil)-6-(dimetilamino)-3H-xanten-3-iliden)-*N*-metilmetanaminio)



C₄₄H₅₇F₃N₄O₁₃ PM = 906,94 g/mol

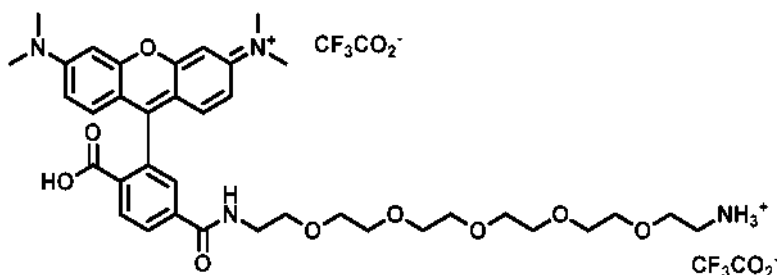
A una solución de TAMRA-6-COOH (1 eq., 60,0 mg, 0,14 mmol) y TEA (3,3 eq., 0,06 ml, 0,46 mmol) en DMF (1 ml) enfriada a 0 °C se añadió HBTU (1,5 eq., 79,3 mg, 0,21 mmol). Después de 5 minutos, se añadió una solución de *N*-(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-il)carbamato de *tert*-butilo **1** (1,5 eq., 79,6 mg, 0,209 mmol) en DMF (1 ml) y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua (5 ml) y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en un mínimo de MeOH y se purificó por cromatografía ultrarrápida (RP 16 g, H₂O (TFA al 0,05 %) a ACN, 30 minutos) para dar TAMRA-peg₆-NH₂ **19** (67,9 mg, 0,0856 mmol, 61 %) como un sólido de color rosado. Faltan las señales de CO₂H y NH.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,39 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,21 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,83 (brs, 1H), 7,12 (d, *J* = 9,5 Hz, 2H), 7,01 (dd, *J* = 2,0 y 9,4 Hz, 2H), 6,92 (d, *J* = 1,9 Hz, 2H), 3,78 - 3,49 (m, 20H), 3,47 - 3,42 (m, 2H), 3,27 (s, 12H), 3,16 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H).

MS (ESI) *m/z*: 793,4 [M]⁺.

15 TAMRA-peg₆-NH₂ (sal de TFA), **28**

(2,2,2-trifluoroacetato de 1-(4-carboxi-3-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xanten-9-il)fenil)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azononadecan-19-amino)



C₄₁H₅₀F₆N₄O₁₃ PM = 920,84 g/mol

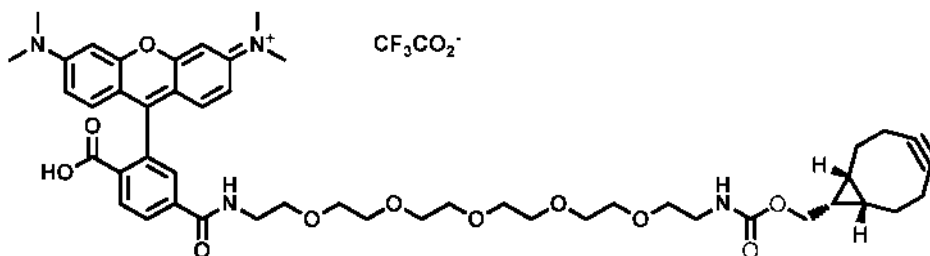
A una solución de TAMRA-peg₆-NH₂ **27** (1 eq., 60 mg, 0,076 mmol) en MeOH (3 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en dioxano (15 eq., 0,28 ml, 1,14 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de concentrar a presión reducida, la mezcla se disolvió en un mínimo de MeOH y se purificó por cromatografía ultrarrápida (RP 16 g, H₂O (TFA al 0,05 %) a ACN, 30 minutos) para producir TAMRA-peg₆-NH₂ (sal de TFA) **28** (59,2 mg, 0,0643 mmol, 85 %) como un sólido de color rosado.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,40 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,21 (dd, *J* = 1,8, 8,2 Hz, 1H), 7,88 (dd, *J* = 33,9, 10,5 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 9,5 Hz, 2H), 7,06 (dd, *J* = 2,4, 9,5 Hz, 2H), 6,99 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,75 - 3,70 (m, 2H), 3,69 - 3,55 (m, 20H), 3,31 (s, 12H), 3,15 - 3,11 (m, 2H). Faltan las señales de CO₂H, NH y NH₂.

MS (ESI) *m/z*: 693,2 [M]⁺.

TAMRA-peg₆-BCN (sal de TFA), **30**

(2,2,2-Trifluoroacetato de *N*-(9-(5-(((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19-hexaoxa-4-azahenicosan-21-il)carbamoyl)-2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-3*H*-xanten-3-iliden)-*N*-metilmetanaminio)



C₅₀H₆₁F₃N₄O₁₃ PM = 983,03 g/mol

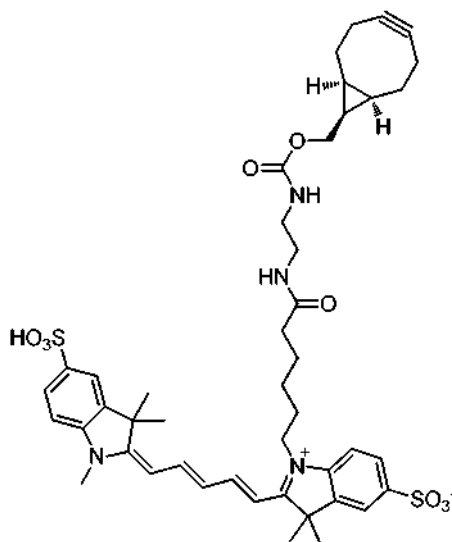
A una solución de TAMRA-peg₆-NH₂ **28** (sal de TFA) (1 eq., 17 mg, 0,018 mmol) y TEA (5 eq., 0,013 ml, 0,092 mmol) en DMF (2 ml) se añadió (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (4-nitrofenil) carbonato **29** (1,1 eq., 6,4 mg, 0,020 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la evaporación a presión reducida, el material bruto se purificó mediante HPLC preparativa para producir TAMRA-peg₆-BCN (sal de TFA) **30** (12,2 mg, 0,012 mmol, 67 %) como un sólido de color rosado. Condiciones de la HPLC prep?

¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 8,82 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,29 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,24 (dd, *J* = 1,7 y 8,2 Hz, 1H), 7,88

(d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 7,12 - 7,00 (m, 5H), 6,97 (s, 2H), 4,01 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,63 - 3,33 (m, 22H), 3,26 (s, 12H), 3,09 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,30 - 2,01 (m, 6H), 1,64 - 1,40 (m, $J = 9,6$ Hz, 2H), 1,33 - 1,13 (m, 1H), 0,83 (t, $J = 9,6$ Hz, 2H). Falta la señal de CO_2H .
MS (ESI) m/z : 869,4 $[\text{M}]^+$.

5 sulfoCy5-BCN 32

1-(6-((2-(((1*R*,8*S*,9*S*)-Biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi)carbonil)amino)etil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-(1,3,3-trimetil-5-sulfoindolin-2-iliden)penta-1,3-dien-1-il)-3*H*-indol-1-ilo-5-sulfonato



$\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$ PM = 861,08 g/mol

A una solución de sulfoCy5-NHS (1 eq. 8,60 mg, 0,0113 mmol) y DIEA (3 eq., 0,0056 ml, 0,0339 mmol) en DMF (2 ml) se añadió (2-aminoetil)carbamato de (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo **31** (1,2 eq. 3,2 mg, 0,0135 mmol). La reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la concentración a presión reducida, el material bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (RP 5 g, H_2O a ACN, 30 minutos) para producir sulfoCy5-BCN **32** (7,70 mg, 0,0087 mmol, 77 %) como un sólido oscuro.

MS (ESI) m/z : 859,3 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Ejemplo 2: Ingeniería de la superficie de microgotas por SPAAC (cicloadición de azida-alquino promovida por tensión)

1. Materiales y métodos

45 Fabricación del microchip:

Se preparó un molde de resistencia SU-8 (MicroChem Corp.) sobre una oblea de silicio (Siltronix) mediante exposición a UV (alineador de máscara de contacto MJB3; SUSS MicroTec) a través de una máscara de fotolitografía (Selba SA) y posterior revelado (revelador SU-8; MicroChem Corp.). Se añadió un agente de curado a la base de PDMS (kit de elastómero de silicona Sylgard 184; Dow Corning Corporation) hasta una concentración final del 10 % (p/p), se mezcló y se vertió sobre el molde hasta una profundidad de 5 mm. Después de desgasificar durante varios minutos y reticular a 70 °C durante la noche, el PDMS se despegó del molde y los puertos de entrada y salida se perforaron con un punzón de biopsia Harris Uni-Core de 0,75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences). El PDMS se activó mediante incubación durante 3 minutos en un plasma de oxígeno (Diener Zepto) y se unió a un portaobjetos de vidrio de 50 mm x 75 mm (Fisher Bioblock). Los canales se fabricaron fluorófilos mediante el uso de un agente comercial para el recubrimiento de superficies (ABCR1 AB111155). La altura del canal era de 40 μm y el tamaño de la boquilla era de 25 μm con un ancho del canal de 40 μm . Se usó un segundo chip para reinyectar la emulsión recolectada con un ancho de canal de 50 μm .

60 Estación de microfluidos:

Todos los materiales ópticos se adquirieron de Thorlab, a menos que se indique lo contrario. La configuración óptica comprende un microscopio invertido Eclipse Ti (Nikon) montado en una mesa óptica e incluye 4 láseres (Strasus-375 nm 16 mW, Stradus-488 nm 50 mW, Stradus-532 nm 40 mW y Stradus-642 nm 110 mW). La fluorescencia emitida se detectó mediante tubos fotomultiplicadores (PMT, Hamamatsu Photosensor H10722-20). La señal de salida de los PMT se analizó mediante el uso de una tarjeta FPGA PCI-7852R Virtex-5 LX50R (National Instruments Corporation)

que ejecuta un programa escrito en LabView 2013 (módulo FPGA, National Instruments Corporation). La mesa óptica incluye además una cámara (Guppy F-080, Allied Vision Technologies).

Diseño experimental y materiales:

5

Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000).

Se utilizaron velocidades de flujo de 500 $\mu\text{L/h}$ para la fase acuosa y de 500 $\mu\text{L/h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear gotas de 40-50 pL. La emulsión se recogió en un Eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Para los experimentos de control y dilución de tensioactivo, se utilizó 2,5 % p/p de un tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en la fase oleosa. Para la reacción de SPAAC, se utilizaron el tensioactivo dibloque de azida Krytox-peg₁₂-azida **14** y el tensioactivo tribloque de azida diKrytox-peg₁₂-azida **23b** al 2,5 % p/p en la fase oleosa. Para la fase acuosa, TAMRA-peg₆-BCN **30**, sulfoCy5-BCN **32** y fluoróforos de control (TAMRA-6-CO₂H y Cy5-alquino) se disolvieron en Pluronic F-127 (0,01 % en PBS 1x).

10

15

Las emulsiones W/O se reinyectaron en el segundo chip y se separaron con aceite fluorado (3M Novec 7500). Se utilizaron velocidades de flujo de 200 $\mu\text{L/h}$ para Novec 7500 y de 100 $\mu\text{L/h}$ para la muestra de emulsión.

El ACMS utilizado como control de fluoróforos se sintetizó de acuerdo con la literatura (Woronoff, G., El Harrak, A., Mayot, E., Schicke, O., Miller, O.J., Soumillion, P., Griffiths, A.D., Rycelynck M. Anal. Chem., 2011, 83, 2852-2857).

Microscopía confocal:

Las emulsiones W/O se analizaron mediante el uso de un microscopio confocal Leica SPE (láseres utilizados: 405 nm (ACMS), 561 nm (derivados de TAMRA) y 635 nm (derivados de sulfoCy5), objetivo 20X, Leica 11506513).

25

Polarización de fluorescencia:

Las emulsiones W/O (15- 30 μl) se colocaron en microplacas Corning® de 96 pocillos de media área 3686. Los análisis de polarización de fluorescencia se realizaron por triplicado mediante el uso de un lector de múltiples marcadores Wallac® Victor 3 (longitudes de onda de excitación/emisión 620/665 nm).

30

2. Resultados

35

2.1 Reacción de SPAAC en la superficie interna de la gota mediante el uso de Krytox-peg₁₂-azida 14

La reacción de SPAAC en la superficie interna de la gota se evaluó mediante el uso de Krytox-peg₁₂-azida **14** y los dos derivados de BCN fluorescentes (sulfoCy5-BCN **32** Figura 6 y TAMRA peg₆-BCN **30** Figura 7).

40

Se preparó una primera emulsión mediante el uso de un tensioactivo dibloque de azida (Krytox-peg₁₂-azida **14**) al 2,5 % en Novec 7500 y sulfoCy5-BCN **32** a 300 nM en Pluronic al 0,01 % para la fase acuosa (Figura 6A). Las señales obtenidas durante la reinyección de la emulsión mostraron que la fluorescencia de sulfoCy5 era mayor en la parte anterior y en la posterior de las gotas e indicaron que la sonda se ubicó preferentemente en la superficie interna de la gota de agua. Este resultado se confirmó mediante microscopía confocal que demostró claramente que la fluorescencia se concentró en la superficie interna de las microgotas como resultado de la reacción clic entre el fluorotensioactivo azida **14** y el cicloalquino tensionado fluorescente **32**. Para demostrar la especificidad de la reacción también se realizaron dos controles negativos. El primer fluorotensioactivo comercial sin grupos funcionales (008-F, Ran Biotechnologies) y el derivado de BCN fluorescente **32** se utilizaron para preparar la segunda emulsión (Figura 6B). Finalmente, se generaron microgotas con el tensioactivo dibloque de azida **14** en presencia de fluoróforo sulfoCy5-alquino (Figura 6C). Este control de fluoróforo no está funcionalizado con un alquino tensionado y la reacción clic no puede ocurrir sin un catalizador de cobre. En ambos casos, las señales de PMT y de microscopía confocal mostraron que la fluorescencia era uniforme a través de las gotas, lo que confirma que la reacción clic no se produjo en estas condiciones.

45

50

Se obtuvieron resultados similares con el segundo derivado de BCN fluorescente TAMRA-peg₆-BCN **30**. La reacción de SPAAC se produjo sólo cuando se usó Krytox-peg₁₂-azida **14** en presencia de TAMRA-peg₆-BCN **30** como se muestra por la concentración de fluorescencia en la superficie interna de la gota (Figura 7A). El uso de un tensioactivo sin grupos funcionales (008-F, Figura 7B) o un fluoróforo sin grupos funcionales (TAMRA-6-CO₂H, Figura 7C) condujo a microgotas con una concentración de fluorescencia uniforme, lo que confirma que no se produjo la reacción de SPAAC.

60

La multifuncionalización de la superficie de las microgotas se evaluó al encapsular conjuntamente ambas sondas fluorescentes en microgotas estabilizadas con dibloque-azida **14** como fluorotensioactivo. Se diluyeron sulfoCy5-BCN **32** y TAMRA-peg₆-BCN **30** a 200 nM en Pluronic al 0,01 % (en PBS 1x) y se utilizó Krytox-peg₁₂-azida **14** al 2,5 % en Novec 7500 para la fase oleosa. Las señales de PMT durante la reinyección de la emulsión y la microscopía confocal

65

mostraron que la fluorescencia de ambas sondas se ubicó preferentemente en la superficie interna de las microgotas (Figura 8).

2.2 Dilución del dibloque-azida en el tensioactivo comercial sin grupos funcionales 008-F

Para modular la densidad superficial del grupo azida, se diluyó el dibloque-azida **14** en un fluorotensioactivo comercial sin grupos funcionales (008-F, Ran Biotechnologies). La reacción de SPAAC se evaluó a tres concentraciones de Krytox-peg₁₂-azida **14** (A: 20 %, B: 10 % y C: 5 %) en el fluorotensioactivo comercial (008-F). La fase acuosa se cargó con sulfoCy5-BCN **32** a 300 nM y un fluoróforo de control ACMS a 1 μM en Pluronic al 0,01 %. Se obtuvieron señales de PMT características para la fluorescencia localizada en la superficie para las concentraciones A (**14** 20 %) y B (**14** 10 %) pero no para la concentración C (**14** 5 %). Para todas las condiciones, la microscopía confocal reveló que la reacción de SPAAC se produjo después de la dilución del dibloque-azida en el tensioactivo comercial sin grupos funcionales (Figura 9). En todas las condiciones, el fluoróforo de control se distribuyó en las gotas, lo que se confirmó por las señales de PMT durante la reinyección de la emulsión y la microscopía confocal.

2.3 Caracterización de la adición de grupos funcionales en la superficie mediante polarización de la fluorescencia

Para caracterizar la modulación de la densidad superficial del azida en la interfase, se realizaron análisis de polarización de la fluorescencia en la emulsión recogida después de la reacción con un derivado de alquino tensionado y fluorescente. Los primeros experimentos se realizaron con un intervalo de concentración del dibloque-azida **14** en tensioactivo comercial sin grupos funcionales con una concentración constante de la sonda fluorescente sulfoCy5-BCN. Se prepararon siete emulsiones con concentración creciente de Krytox-peg₁₂-azida **14** (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 %) en surfactante sin grupos funcionales (008-F) para la fase oleosa y sulfoCy5-BCN **32** a 250 nM en Pluronic al 0,01 % para la fase acuosa. Los resultados se muestran en la Figura 10. El aumento de la concentración del dibloque-azida **14** condujo a un aumento de la fluorescencia con polarización que indica que se capturó una mayor concentración de sonda fluorescente en la superficie interna de la gota. Además, los resultados mostraron que la polarización de la fluorescencia alcanzó una meseta en alrededor del 20 % del dibloque-azida **14**. A partir de esta concentración, la microgota de la superficie no parece estar saturada y la sonda de alquino tensionado y fluorescente puede reaccionar completamente con los restos azida en la superficie interna. Un cálculo aproximado que considera un volumen de las microgotas de 44 pL y la concentración de **32** de 250 nM indica que una gota contiene aproximadamente 11 attomol de la sonda **32**. Así, las microgotas estabilizadas con una mezcla de **14** /008-F 20/80 contienen 11 attomol de azida en su superficie interna que corresponde a una densidad superficial de 1,8 nmol/m².

Se realizó un segundo experimento de polarización de la fluorescencia con un intervalo de concentración de la sonda sulfoCy5-BCN **32**. Se mantuvo constante una concentración del 5 % de Krytox-peg₁₂-azida **14** en el surfactante comercial (008-F) y la fase acuosa se cargó con una concentración creciente de sulfoCy5-BCN **32** (0,01, 0,1, 1 y 10 μM en Pluronic al 0,01 %). Los resultados se muestran en la Figura 11. También se realizaron controles negativos con sólo el uso del tensioactivo 008-F sin grupos funcionales como estabilizador y la polarización de la fluorescencia permaneció constante (186 ± 15 mP) para cada concentración de la sonda. No se observó ninguna modificación de la polarización de la fluorescencia entre 10 y 100 nM, lo que indica que la superficie de las microgotas no estaba saturada en este intervalo de concentración. El aumento de la concentración de la sonda fluorescente a 1 μM condujo a una disminución de la polarización de la fluorescencia. Por tanto, la interfase de las microgotas parece saturarse entre 100 nM y 1 μM de sonda libre. Esto corresponde a una cantidad del grupo azida por gota entre 4,4 y 44 attomol. De manera satisfactoria, este número 4,4-44 attomol de azida/gota para 5 % de tensioactivo azida es coherente con el resultado obtenido por encima de aproximadamente 11 attomol de azida/gota para 20 % de tensioactivo azida. Finalmente, a 10 μM, los controles negativos y positivos mostraron los mismos valores de polarización de la fluorescencia que muestran que la cantidad de sonda de fluoróforo ubicada en la superficie interna de la microgota es despreciable en comparación con la sonda de fluoróforo libre dentro de la gota.

2.4 Reacción de SPAAC mediante el uso del tribloque-azida (diKrytox-peg₁₂-azida 23b)

La reacción de SPAAC en la superficie interna de la microgota se evaluó para el fluorotensioactivo tribloque-azida de acuerdo con la misma condición aplicada para el dibloque-azida **14**. Para esto, se usó diKrytox-peg₁₂-azida al 2,5 % en Novec 7500 para encapsular las dos sondas fluorescentes primero por separado y después juntas. Las dos sondas fluorescentes reaccionaron con éxito con el tensioactivo tribloque azida **23b** (sulfoCy5-BCN **32** Figura 12A y TAMRA-peg₆-BCN **30** Figura 12B) y la difuncionalización de microgotas de superficie también se validó mediante la encapsulación conjunta de las dos sondas fluorescentes (Figura 12C).

Ejemplo 3

Materiales y métodos

1. Inversión de la emulsión

Para invertir la emulsión de agua en aceite (w/o), se utilizó una emulsión doble para crear una cápsula oleosa alrededor de las gotas acuosas y se utilizó un campo eléctrico para romper esta cápsula. Básicamente, la electrocoalescencia

de las gotas acuosas internas con la fase acuosa externa conduce a la desestabilización de la cápsula oleosa, lo que genera una gota de aceite en agua (o/w), cuya superficie externa corresponde a la superficie interna de la gota de agua de la que proviene. La unión de enfoque de flujo se utilizó para generar una emulsión w/o en un primer microchip. La generación de emulsión doble mediante enfoque de flujo y desestabilización eléctrica se realizó en un segundo microchip (Figura 13).

2. Fabricación del microchip

Los canales de microfluidos del segundo microchip se diseñaron con Autocad (Autodesk 2014) para generar una emulsión doble con electrodos para desestabilizarla. Los electrodos de apantallamiento evitan que el campo eléctrico se extienda por todas partes (figura 13). L_1 (3 mm) y L_2 (4 mm) en la figura 2 tienen que ser lo suficientemente largos, respectivamente, para evitar la electrocoalescencia de la emulsión w/o en el reinjector y perturbar la generación de emulsión doble debido al campo eléctrico.

Se fabricó un molde de resistencia SU-8 (MicroChem Corp.) sobre una oblea de silicio (Siltronic) mediante exposición a UV (alineador de máscara de contacto MJB3; SUSS MicroTec) a través de una máscara de fotolitografía (Selva SA) y posterior revelado (revelador SU-8; MicroChem Corp.). Se añadió un agente de curado a la base de PDMS (kit de elastómero de silicona Sylgard 184; Dow Corning Corporation) hasta una concentración final del 10 % (p/p), se mezcló y se vertió sobre el molde hasta una profundidad de 5 mm. Después de desgasificar durante varios minutos y reticular a 70 °C durante la noche, el PDMS se despegó del molde y los puertos de entrada y salida se perforaron con un punzón de biopsia Harris Uni-Core de 0,75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences). El PDMS se activó mediante incubación durante 3 min en un plasma de oxígeno (Diener Zepto) y se unió a un portaobjetos de vidrio de 50 mm x 75 mm (Fisher Bioblock).

El primer microchip se utilizó para crear una emulsión de agua en aceite (w/o) de gotas de 30 pl. Los canales se fabricaron fluorófilos mediante el uso de un agente comercial para el recubrimiento de superficies (ABCR1 AB111155). La altura del canal era de 20 μm y el tamaño de la boquilla era de 25 μm con un ancho del canal de 40 μm .

El segundo microchip se utilizó para crear una emulsión doble y desestabilizarla con un campo eléctrico. El chip se usó justo después de la unión de PDMS a un portaobjetos de vidrio mediante el uso de plasma de oxígeno para que el PDMS permaneciera hidrófilo.

La altura de los canales, el ancho del canal de reinyección y el ancho del canal de generación de la emulsión doble fueron de 20 μm , 30 μm y 50 μm respectivamente. Los electrodos se fabricaron con solución salina (NaCl 180g/L en agua desionizada, Sigma S3014) y se moldearon alrededor del canal en un canal paralelo con la misma altura. Se aplicó una onda de voltaje sinusoidal a los electrodos a 400 V y 10 kHz con un generador de funciones (Agilent, 33220A) y un amplificador de voltaje (TREK Modelo 623D).

3. Configuración de la estación de microfluidos

Todos los materiales ópticos se adquirieron de Thorlab, a menos que se indique lo contrario. La configuración óptica comprendía un microscopio invertido Eclipse Ti (Nikon) montado en una mesa óptica. Se combinaron los haces de láser de 640 nm (Obis, Coherent) y láser de 532 nm (MXL-III-532) mediante el uso de un espejo dicroico "D3" y el haz resultante se combinó con un láser de 488 nm (Picarro) mediante el uso de un espejo dicroico "D2". El rayo resultante se combinó con un láser de 375 nm (LAS, Newport-Spectra-physics) mediante el uso de un espejo dicroico "D1" y se dirigió al objetivo del microscopio mediante el uso de un espejo "M" y un espejo dicroico "D5" enfocado en el medio del canal del dispositivo en el punto de detección. La fluorescencia emitida se recogió con el objetivo del microscopio y se separó de los rayos láser mediante un primer espejo dicroico "D5". La luz azul, la luz verde, la luz naranja y la luz roja se resolvieron de otras con los espejos dicroicos "D6", "D7", "D8" y "D9" respectivamente. La fluorescencia emitida se detectó mediante tubos fotomultiplicadores (PMT, Hamamatsu Photonics KK) equipados con filtros de paso de banda "F1" para luz azul, "F2" para luz verde, "F3" para luz naranja, "F4" para luz roja y "F5" para luz infrarroja. La señal de salida de los PMT se analizó mediante el uso de una tarjeta FPGA multifunción PCI-7831R RIO (National Instruments Corporation) que ejecuta un programa escrito en LabView 2013 (módulo FPGA, National Instruments Corporation). La velocidad de adquisición de datos del sistema fue de 166 kHz. El proceso completo se monitoreó redirigiendo parte de la luz emitida con el uso de un espejo dicroico "D0" hacia una cámara CCD (Guppy, Allied Vision Technologies) equipada con un filtro de paso largo "F0" que eliminó los reflejos potencialmente dañinos de los láseres (Figura 16).

4. Diseño experimental y materiales

Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000). Se produjo una emulsión W/O con una fase acuosa que contenía estreptavidina fluorescente 500 nM (Lifetechnologies, S11223) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma P-3619). Se utilizaron velocidades de flujo de 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase acuosa y 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novoc 7500) para crear gotas de 30 pl. La emulsión se recogió en un eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Para el experimento de control, se utilizó 5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant,

RAN Biotechnologies) en fase oleosa. Para la captura de proteínas, un surfactante especial (Krytox-PEG-Biotina) se funcionalizó con biotina para unirse específicamente a la estreptavidina y se usó al 5 % p/p en fase oleosa.

La emulsión W/O se reinyectó (entrada 1, figura 14) en el segundo microchip de manera empaquetada (debido a la diferencia de densidad entre el aceite y el agua). Las gotas de agua (50 μ l/h) se separaron con aceite (50 μ l/h) (entrada 2, figura 14). Se creó una emulsión doble con una corriente acuosa exterior constituida de Dye647 2,5 μ M (Dyomics 647-00) y Triton X-100 1 % p/p (Sigma X-100) en PBS a una velocidad de flujo de 200 μ L/h (entrada 3, figura 14). Se aplicó un campo eléctrico de CA a través de los electrodos por los conectores enchufados en las entradas A (300 Vpp, 10 kHz) y B (0 V) en la figura 14.

Resultados

1. Captura de proteínas

En el experimento de control con un tensioactivo sin grupos funcionales, la fluorescencia de la estreptavidina fue uniforme a través de las gotas (fig. 16). En presencia de tensioactivo biotilado, la fluorescencia de estreptavidina se localizó en la superficie interna de las gotas, lo que indicó que la estreptavidina se localizó preferentemente en la superficie interna de la gota de agua (figura 16).

2. Inversión de fase

En el experimento de control con un tensioactivo sin grupos funcionales, la fluorescencia de estreptavidina fue mayor entre las gotas de aceite que sobre las gotas de aceite con un valor medio de 0,2 V sobre las gotas, lo que indica que la estreptavidina no se localizó en la superficie externa de las gotas de aceite (fig. 17). En el experimento con el tensioactivo con grupos funcionales, la fluorescencia de la estreptavidina fue mayor sobre la gota de aceite (con un valor medio de 0,55 V) que entre ellas (fig. 17), lo que indica que la estreptavidina permaneció unida al tensioactivo biotilado después de la inversión de fase. Para el análisis de datos, se eliminaron las gotas no invertidas por tamaño, ya que eran más grandes que las invertidas.

Las poblaciones negativas y positivas se pueden distinguir en un histograma cuando se grafica el valor medio de la fluorescencia de estreptavidina sobre las gotas de aceite (fig. 18). La primera población, centrada alrededor de 0,22 V, es el control negativo, mientras que la población centrada alrededor de 0,55 V es la positiva. Este método de inversión permite una separación rápida y clara entre las gotas positivas y negativas.

Ejemplo 4

Materiales y métodos

1. Inversión de la emulsión

Para invertir la emulsión de agua en aceite (w/o), se utilizó una emulsión doble para crear una cápsula oleosa alrededor de las gotas acuosas y el voltaje aplicado en la fase acuosa externa se utilizó para romper esta cápsula oleosa. Básicamente, la electrocoalescencia de las gotas acuosas internas con la fase acuosa externa conduce a la desestabilización de la cápsula oleosa, lo que genera una gota de aceite en agua (o/w), cuya superficie externa corresponde a la superficie interna de la gota de agua de la que proviene. La unión de enfoque de flujo se utilizó para generar una emulsión w/o en un primer microchip. La generación de emulsión doble mediante enfoque de flujo se realizó en un segundo microchip y la desestabilización eléctrica se realizó en una cubeta de electroporación en la que se aplicó un voltaje.

2. Fabricación del microchip

Los canales de microfluidos del segundo microchip se diseñaron con Autocad (Autodesk 2014) para generar una emulsión doble e incubarla en el chip con una línea de retardo para desestabilizarla.

Se fabricó un molde de resistencia SU-8 (MicroChem Corp.) sobre una oblea de silicio (Siltronix) mediante exposición a UV (alineador de máscara de contacto MJB3; SUSS MicroTec) a través de una máscara de fotolitografía (Selba SA) y posterior revelado (revelador SU-8; MicroChem Corp.). Se añadió un agente de curado a la base de PDMS (kit de elastómero de silicona Sylgard 184; Dow Corning Corporation) hasta una concentración final del 10 % (p/p), se mezcló y se vertió sobre el molde hasta una profundidad de 5 mm. Después de desgasificar durante varios minutos y reticular a 70 °C durante la noche, el PDMS se despegó del molde y los puertos de entrada y salida se perforaron con un punzón de biopsia Harris Uni-Core de 0,75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences). El PDMS se activó mediante incubación durante 3 min en un plasma de oxígeno (Diener Zepto) y se unió a un portaobjetos de vidrio de 50 mm x 75 mm (Fisher Bioblock).

El primer microchip se utilizó para crear una emulsión de agua en aceite (w/o) de gotas de 30 pl. Los canales se volvieron fluorófilos mediante el uso de un agente de recubrimiento de superficies comercial (ABCR, AB111155). La

altura del canal era de 20 μm y el tamaño de la boquilla era de 25 μm con un ancho del canal de 40 μm .

El segundo microchip se utilizó para crear una emulsión doble y desestabilizarla. El chip se usó justo después de la unión de PDMS a un portaobjetos de vidrio mediante el uso de plasma de oxígeno para que el PDMS permaneciera hidrófilo.

La altura de los canales, el ancho del canal de reinyección y el ancho del canal de generación de la emulsión doble fueron respectivamente 40 μm , 30 μm y 50 μm .

3. Configuración de la estación de microfluidos

Ver el ejemplo 3

4. Diseño experimental y materiales

Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000). Se produjo una emulsión W/O con una fase acuosa que consistía en tampón PBS (Sigma P-3619). Se utilizaron velocidades de flujo de 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase acuosa y 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear gotas de 30 pl. La emulsión se recogió en un eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Se usó 5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en la fase oleosa.

La emulsión W/O se reinyectó en el segundo microchip de manera empaquetada (debido a la diferencia de densidad entre el aceite y el agua). Las gotas de agua (50 $\mu\text{l/h}$) se separaron con aceite (50 $\mu\text{l/h}$) (Figura 19). Se creó una emulsión doble con una corriente acuosa exterior constituida de Triton X-100 al 1 % p/p (Sigma X-100) en agua a una velocidad de flujo de 200 $\mu\text{L/h}$. La emulsión doble se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm (Figura 20) en la que se aplicó un voltaje de 10 V, 25 V y 50 V durante 100 ms.

Resultados

Para un voltaje aplicado de menos de 25 V durante 100 ms, la emulsión doble permanece intacta, no se observó inversión. Para un voltaje aplicado de 50 V durante 100 ms, se observó inversión y se obtuvo una emulsión o/w simple (Figura 21).

Ejemplo 5

Materiales y métodos

1. Inversión de la emulsión

Para invertir la emulsión de agua en aceite (w/o), se utilizó una emulsión doble para crear una cápsula oleosa alrededor de las gotas acuosas y observamos que esta cápsula se rompe por sí sola cuando se incubaba en un chip a temperatura ambiente. Básicamente, la coalescencia de las gotas acuosas internas con la fase acuosa externa conduce a la desestabilización de la cápsula oleosa, lo que genera una gota de aceite en agua (o/w), cuya superficie externa corresponde a la superficie interna de la gota de agua de la que proviene. La unión de enfoque de flujo se utilizó para generar una emulsión w/o en un primer microchip. La generación de emulsión doble mediante enfoque de flujo y desestabilización espontánea se realizó en un segundo microchip.

2. Fabricación del microchip

Los canales de microfluidos del segundo microchip se diseñaron con Autocad (Autodesk 2014) para generar una emulsión doble e incubarla en el chip con una línea de retardo para desestabilizarla.

Se fabricó un molde de resistencia SU-8 (MicroChem Corp.) sobre una oblea de silicio (Siltronic) mediante exposición a UV (alineador de máscara de contacto MJB3; SUSS MicroTec) a través de una máscara de fotolitografía (Selba SA) y posterior revelado (revelador SU-8; MicroChem Corp.). Se añadió un agente de curado a la base de PDMS (kit de elastómero de silicona Sylgard 184; Dow Corning Corporation) hasta una concentración final del 10 % (p/p), se mezcló y se vertió sobre el molde hasta una profundidad de 5 mm. Después de desgasificar durante varios minutos y reticular a 70 °C durante la noche, el PDMS se despegó del molde y los puertos de entrada y salida se perforaron con un punzón de biopsia Harris Uni-Core de 0,75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences). El PDMS se activó mediante incubación durante 3 min en un plasma de oxígeno (Diener Zepto) y se unió a un portaobjetos de vidrio de 50 mm x 75 mm (Fisher Bioblock).

El primer microchip se utilizó para crear una emulsión de agua en aceite (w/o) de gotas de 30 pl. Los canales se volvieron fluorófilos mediante el uso de un agente de recubrimiento de superficies comercial (ABCR, AB111155). La altura del canal era de 20 μm y el tamaño de la boquilla era de 25 μm con un ancho del canal de 40 μm .

El segundo microchip se utilizó para crear una emulsión doble y desestabilizarla. El chip se usó justo después de la unión de PDMS a un portaobjetos de vidrio mediante el uso de plasma de oxígeno para que el PDMS permaneciera hidrófilo.

5 La altura de los canales, el ancho del canal de reinyección y el ancho del canal de generación de la emulsión doble fueron respectivamente 40 μm , 30 μm y 50 μm . Se utilizó una línea de retardo de 10 minutos para observar la desestabilización espontánea en el chip.

10 3. Configuración de la estación de microfluidos

Ver el ejemplo 3.

15 4. Diseño experimental y materiales

a. Inversión de fase

20 Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000). Se produjo una emulsión W/O con una fase acuosa que consistía en tampón PBS (Sigma P-3619). Se utilizaron velocidades de flujo de 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase acuosa y 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear gotas de 30 pl. La emulsión se recogió en un eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Se usó 5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en la fase oleosa.

25 La emulsión W/O se reinyectó (entrada 1, figura 23) en el segundo microchip de manera empaquetada (debido a la diferencia de densidad entre el aceite y el agua). Las gotas de agua (50 $\mu\text{l/h}$) se separaron con aceite (50 $\mu\text{l/h}$) (entrada 2, figura 23). Se creó una emulsión doble con una corriente acuosa externa constituida de Triton X-100 al 1 % p/p (Sigma X-100) en agua a una velocidad de flujo de 200 $\mu\text{L/h}$ (entrada 3, figura 23) y se incubó en el chip con una línea de retardo durante 10 minutos (Figuras 22 y 23).

30 b. Captura de proteínas

35 Un conjugado de FITC con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Lifetechnologies, 62-6511) se biotiniló mediante el uso de un kit de biotinilación de anticuerpos en un solo paso (Miltenyi Biotec, 130-093-385). Este anticuerpo se premezcló a 100 nM con estreptavidina con AlexaFluor532 (Lifetechnologies, S11223) a 1 μM en solución salina tamponada con fosfato (Sigma P-3619) durante 45 min a temperatura ambiente. Se produjo una emulsión W/O con esta fase acuosa premezclada. Se utilizaron velocidades de flujo de 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase acuosa y 400 $\mu\text{l/h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear gotas de 30 pl.

40 Para el experimento de control, se utilizó 2,5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en fase oleosa. Para la captura de proteínas, un tensioactivo especial (Krytox-PEG-Biotina) se funcionalizó con biotina para unirse específicamente a la estreptavidina y se utilizó al 2,5 % p/p en fase oleosa.

Resultados

45 1. Inversión de fase

50 Después de generar la emulsión doble, se observó que la inversión de fase se producía de forma espontánea (fig. 24). En presencia de tensioactivo, las interfases entre la fase acuosa interna, la fase oleosa y la fase acuosa externa resultaron ser inestables. Sin embargo, la inversión no se realizó al mismo tiempo para todas las gotas debido al tiempo de migración del tensioactivo. Para el análisis de datos, se eliminaron las gotas no invertidas por tamaño, ya que eran más grandes que las invertidas.

55 2. Captura de proteínas

En presencia de tensioactivo sin grupos funcionales, la fluorescencia verde de IgG se localizó en el volumen de las gotas en las imágenes confocales. Por el contrario, en presencia de biotina-tensioactivo, la fluorescencia verde de IgG se localiza en la superficie de las gotas, lo que indica que el tensioactivo capturó la IgG con la estreptavidina (Figura 25).

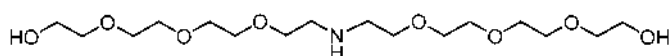
60 Después de la inversión de fase en presencia de biotina-surfactante con inversión espontánea, la fluorescencia verde de IgG permaneció en la superficie de las gotas, lo que indica que la captura permaneció después de la inversión de fase (Figura 26).

65 Ejemplo 6: Síntesis de tensioactivos multiazidas

Se sintetizaron tensioactivos multiázidas que portan dos o cuatro restos azida de acuerdo con la estrategia de síntesis que se indica en la Figura 27. El intermediario clave de esta síntesis consistió en la preparación de un enlazador de peg de dialquilamina que contenía dos restos azida **38** mediante dimerización reductora de azida. Para el tensioactivo de diazida **44**, este intermediario se acopló a una tercera cadena de peg **41** que comprende un resto de ácido carboxílico y un grupo protegido con *N*-boc. Después de la escisión de *N*-Boc la cabeza hidroxílica se acopló a Krytox-COCl **5** para producir el fluorotensioactivo diazida **44**. El tensioactivo tetraazida **47** también se obtuvo mediante la sustitución de cloruro cianúrico por dos dialquilamina **38**, seguido de la introducción de etilendiamina y después la reacción de acoplamiento con Krytox-COCl **5**.

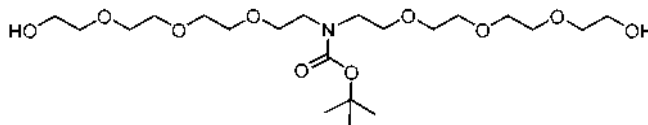
2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi) etan-1-ol **33** (Sayyadi, N.; Connallyc, R.E.; Try, A. Chem. Commun., 2016, 52, 1154-1157) y 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de *tert*-butilo **39** (Garofalo, A. ; Parat, A. ; Bordeianu, C.; Ghobril, C.; Kueny-Stotz, M.; Walter, A.; Jouhannaud, J.; Begin-Colina, S.; Felder-Flesch, D. New J. Chem., 2014, 38, 5226-5239) se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura.

34, 3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosano-1,23-diol C₁₆H₃₅NO₈ PM = 369,46 g/mol



A una solución de **33** (1 eq., 1,14 g, 5,20 mmol) en dioxano (10,4 ml) se le añadió Pd/C (5 %, 0,28 g, 0,26 mmol). La mezcla se agitó a presión atmosférica de H₂ durante 12 horas. La mezcla de reacción se diluyó en DCM (150 ml) y se filtró a través de un lecho de celite. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

35, bis(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de *tert*-butilo C₂₁H₄₃NO₁₀ PM = 469,57 g/mol

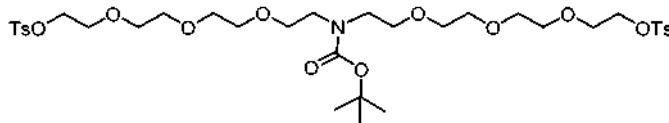


A una solución de **34** (1 eq., 1,3 g, 3,52 mmol) y TEA (3 eq., 1,47 ml, 10,60 mmol) en DCM (23,2 ml) se añadió Boc₂O (1,1 eq., 0,845 g, 3,87 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 50 ml de una solución acuosa de NaH₂PO₄ (1 M) y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 50 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc 5 min, después DCM a DCM/MeOH 9/1 en 30 minutos) para producir **35** (1,32 g, 2,82 mmol, 80 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,73-3,71 (m, 4H), 3,66- 3,56 (m, 24H), 3,45-3,42 (m, 4H), 1,44 (s, 9H). Faltan las señales de OH.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 154,9, 79,0, 72,1, 70,1 a 69,8, 69,2 a 69,0, 60,9, 47,3 a 47,1, 27,9 (3C).

36, 12-(*tert*-butoxicarbonil)-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosano-1,23-diilo bis(4-metilbencenosulfonato) C₃₅H₅₅NO₁₄S₂ PM = 777,94 g/mol



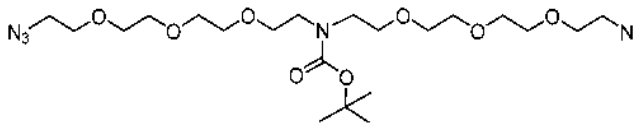
A una solución del dímero **35** (1 eq., 734 mg, 1,56 mmol) en DCM (14,5 ml) en atmósfera de argón se le añadieron TEA (10 eq., 2,19 ml, 15,60 mmol) y DMAP (0,2 eq., 38,2 mg, 0,31 mmol). La mezcla de reacción se agitó 5 minutos a 0°C y se añadió cloruro de tosilo (4 eq., 1,19 g, 6,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 100 ml de DCM y la mezcla se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ (3 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano/EtOAc 1/1 a EtOAc en 30 minutos) para producir **36** (1,11 g, 1,42 mmol, 91 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,66 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H), 7,22 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H), 4,02 (t, *J* = 4,5 Hz, 4H), 3,55 (t, *J* = 4,5 Hz, 4H), 3,48 - 3,40 (m, 20H), 3,34 - 3,24 (m, 4H), 2,31 (s, 6H), 1,32 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155,1, 144,6, 132,8, 129,6 (4C), 127,7 (4C), 79,1, 70,4 - 70,0, 69,4, 69,1, 68,3, 47,4, 28,2 (3C), 21,3.

37, bis(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de *tert*-butilo C₂₁H₄₁N₇O₈ PM = 519,60 g/mol

65



5

A una solución de **36** (1 eq., 973 mg, 1,25 mmol) en DMF (8 ml) se le añadió NaN_3 (4 eq., 325 mg, 5,00 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a 80 °C. Después de la concentración, se añadieron 100 ml de DCM y la mezcla se filtró a través de un lecho de celite y se lavó con salmuera (3 x 50 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se evaporó para producir **37** (1,05 g, 2,02 mmol, 86 %) como un aceite amarillo.

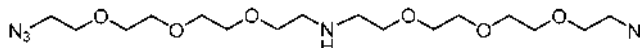
10

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3,83 - 3,49 (m, 24H), 3,51 - 3,30 (m, 8H), 1,44 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 155,1, 79,1, 71,4 - 69,1, 50,5, 47,7, 47,4, 28,2.

38, bis(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)amina $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_6$ PM = 419,48 g/mol

15



20

A una solución de **37** (1 eq., 1 g, 1,92 mmol) en DCM (20 ml) en atmósfera de argón se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (15 eq., 7,22 ml, 28,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de la concentración, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/ NH_4OH 9/0,9/0,1 en 30 minutos) para producir **38** (605 mg, 1,44 mmol, 75 %) como un aceite amarillo.

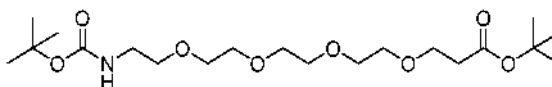
25

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3,72 - 3,54 (m, 24H), 3,39 (t, J = 4,9 Hz, 4H), 2,81 (t, J = 5,3 Hz, 4H). Falta la señal de NH. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 70,1, 69,8, 65,8, 50,6, 46,8.

30

40, 2,2-Dimetil-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oato de *tert*-butilo $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_8$ PM = 421,53 g/mol

35



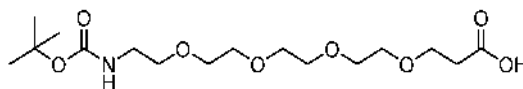
A una solución de **39** (1 eq., 1,4 g, 4,03 mmol) en MeOH (70 ml) se le añadió Pd/C (1 %, 42 mg, 0,04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a presión atmosférica de H_2 durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar a través de un lecho de celite, el producto bruto se disolvió en DCM (30 ml). Se añadieron Et_3N (2 eq., 1,12 ml, 8,06 mmol) y Boc_2O (1,2 eq., 1,06 g, 4,84 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la concentración, se añadieron 30 ml de agua y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se evaporaron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano/ EtOAc 1/1 a EtOAc en 30 minutos) para producir **40** (1,44 g, 3,42 mmol, 85 %) como un aceite amarillo.

40

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,04 (bs, 1H), 3,70 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,66 - 3,56 (m, 12H), 3,53 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,35 - 3,25 (m, 2H), 2³,50 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,44 (s, 18H).

41, Ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oico $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_8$ PM = 365,42 g/mol

45



50

A una solución de **40** (1 eq., 1,18 g, 2,80 mmol) en MeOH (10 ml) y H_2O (10 ml) se añadió LiOH (5 eq., 0,342 g, 14,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se agregaron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 50 ml). La fase acuosa se acidificó con una solución acuosa de ácido cítrico (0,1 M, 50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron para producir **41** (964 mg, 2,64 mmol, 94 %) como un aceite incoloro.

55

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,24 (bs, 1H), 3,78 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,73 - 3,54 (m, 14H), 3,40 - 3,19 (m, 2H), 2,61 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H). Falta la señal de CO_2H . $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 174,7, 156,1, 79,1, 70,4, 70,4 - 70,0, 66,4, 40,2, 34,7, 28,3.

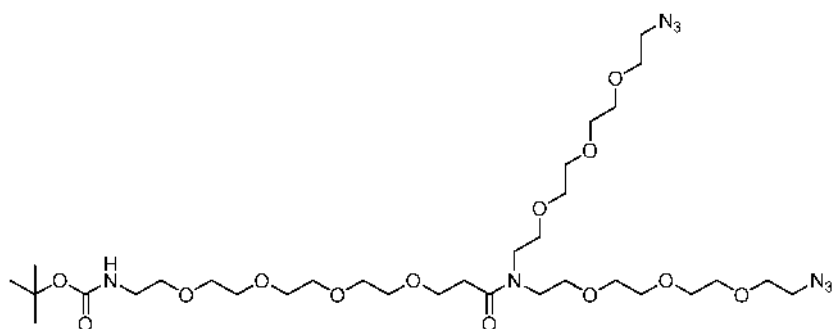
60

42, (1-Azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-13-oxo-3,6,9,16,19,22,25-heptaoxa-12-azaheptacosan-27-il) carbamato de *tert*-butilo $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_{13}$ PM = 766,89 g/mol

65

5

10



15

20

25

A una solución de **41** (1,05 eq., 0,875 g, 2,4 mmol) en DCM (10 ml) se le añadieron HOBt (1,1 eq., 0,339 g, 2,51 mmol) y EDC (1,1 eq., 0,39 g, 2,51 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se añadió una solución de **38** (1 eq., 1,04 g, 2,28 mmol) y TEA (3 eq., 0,951 ml, 6,84 mmol) en DCM (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la concentración, se añadieron 100 ml de agua y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 9/1 en 35 minutos) para producir **42** (1,43 g, 1,87 mmol, 82 %) como un aceite amarillento.

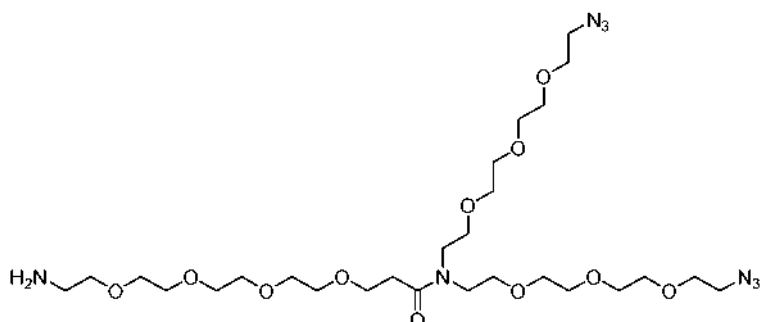
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5,04 (bs, 1H), 3,71 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,64 - 3,43 (m, 42H), 3,32 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H), 3,28 - 3,19 (m, 2H), 2,63 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,38 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,1, 155,8, 78,7, 70,6 - 70,0, 69,9, 69,3, 69,1, 67,3, 50,5, 48,6, 46,1, 40,2, 33,4, 28,3.

30

35

40



45

A una solución de **42** (1 eq., 1,10 g, 1,43 mmol) en DCM (20 ml) se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (15 eq., 5,38 ml, 21,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de la concentración, el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 9/0,9/0,1 en 30 minutos) para producir **43** (853 mg, 1,28 mmol, 89%) como un aceite amarillento. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,73 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,68 - 3,49 (m, 40H), 3,47 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,35 (t, *J* = 4,9 Hz, 4H), 2,89 - 2,76 (m, 2H), 2,66 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H). Falta la señal de NH₂.

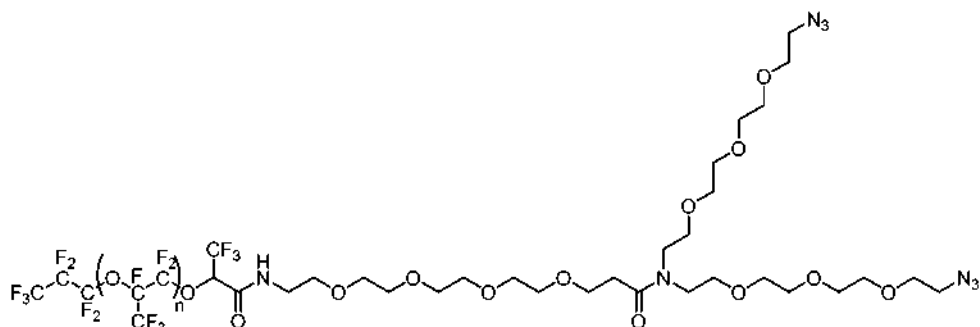
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,1, 73,2, 70,5 - 70,0, 69,8, 69,2, 69,1, 67,3, 50,4, 48,6, 46,0, 41,6, 33,3.

50

44, Krytox-peg₁₂-diN₃

55

60

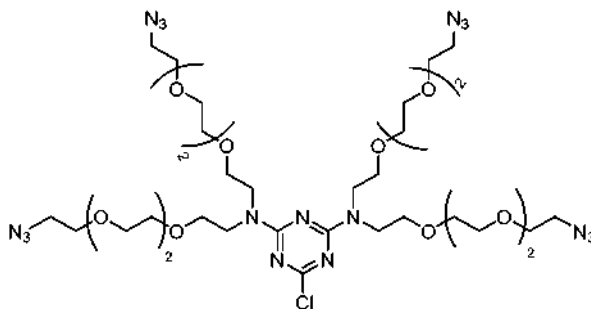


65

n = 35-40

Krytox157FSH-COCl **5** (1 eq., 3,00 g, 0,46 mmol) se disolvió en una mezcla de Novec7100 (10 ml) y DCM (5 ml). Se añadió una solución de **43** (1,2 eq., 0,37 g, 0,55 mmol) y TEA (3 eq., 0,14 g, 0,192 ml, 1,38 mmol) en DCM (5 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El producto bruto obtenido tras la evaporación del disolvente se disolvió en HFE7500 (75 ml). La solución resultante se transfirió en un embudo de decantación y se lavó con una mezcla de DCM/H₂O 1/1 (2 x 200 ml) y después DCM (100 ml). La fase fluorada se concentró al vacío para producir Krytox-peg₁₂-diN₃ **44** como un aceite amarillento pegajoso.

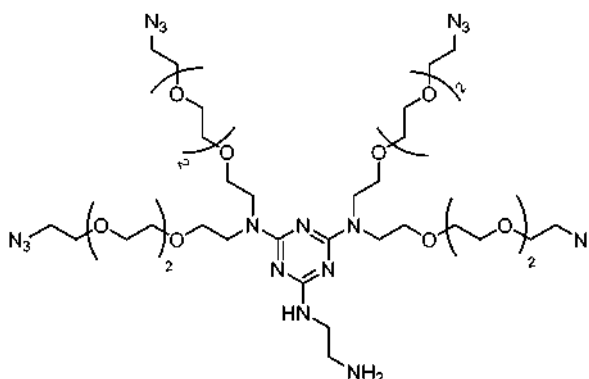
45. *N*²,*N*²,*N*⁴,*N*⁴-tetrakis(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-6-cloro-1,3,5-triazina-2,4-diamina C₃₅H₆₄CLN₁₇O₁₂ PM = 950,45 g/mol



A una solución de **38** (2,1 eq., 700 mg, 1,54 mmol) en acetonitrilo (5 ml) y DIEA (10 eq., 1,21 ml, 7,31 mmol) se le añadió cloruro cianúrico (1 eq., 134 mg, 0,73 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de la concentración, se añadieron 40 ml de una solución acuosa de HCl al 10 % y la mezcla se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano a EtOAc en 35 minutos) para producir **45** (505 mg, 0,53 mmol, 73 %) como un aceite incoloro.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,78 (t, *J* = 5,6 Hz, 4H), 3,74 (t, *J* = 5,8 Hz, 4H), 3,70 - 3,54 (m, 48H), 3,39 (t, *J* = 5,0 Hz, 8H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 168,7, 164,5, 70,5 - 70,4, 70,2, 69,9, 69,2, 68,7, 50,5, 48,1, 47,7, 27,2.

46. *N*²-(2-aminoetil)-*N*⁴,*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶-tetrakis(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina C₃₇H₇₁N₁₉O₁₂ PM = 974,10 g/mol

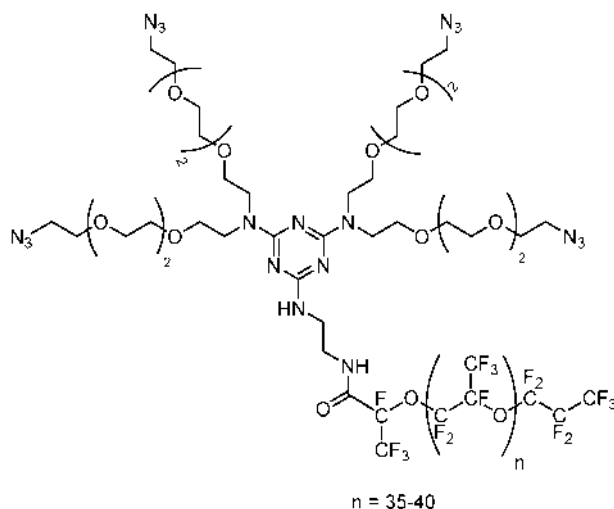


A una solución de **45** (1 eq., 500 mg, 0,53 mmol) y DIEA (20 eq., 1,74 ml, 10,50 mmol) en acetonitrilo (5 ml) se le añadió etilendiamina (20 eq., 633 mg, 10,50 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 15 horas. Después de la concentración, el producto bruto se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 9/0,9/0,1 en 35 minutos) para producir **46** (405 mg, 0,42 mmol, 79%) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4,94 (bt, *J* = 5,7 Hz, 1H), 3,66 (m, 56H), 3,45 - 3,31 (m, 10H), 2,87 (dd, *J* = 9,4, 5,5 Hz, 2H). Falta la señal de NH₂.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 166,3, 165,0, 70,6 - 70,3, 70,0, 69,5, 69,3, 50,6, 47,6, 47,5, 43,6, 42,1.

47. Krytox-peg₁₆-tetraN₃

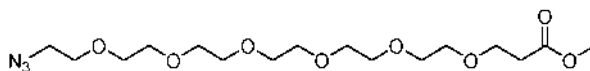


Krytox157FSH-COCl **5** (1 eq., 1,75 g, 0,27 mmol) se disolvió en una mezcla de Novec7100 (8 ml) y DCM (4 ml). Se añadió una solución de **46** (1,5 eq., 392 mg, 0,40 mmol) y TEA (3 eq., 0,112 ml, 0,81 mmol) en DCM (4 ml) seguido de la adición de HOBt (1 eq., 36,4 mg, 0,27 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 48 horas. El producto bruto obtenido tras la evaporación del disolvente se disolvió en HFE7500 (75 ml). La solución resultante se transfirió en un embudo de decantación y se lavó con una mezcla de DCM/H₂O 1/1 (2 x 200 ml) y después DCM (100 ml). La fase fluorada se concentró *al vacío* para producir Krytox-peg₁₆-tetraN₃ **47** como un aceite amarillento pegajoso.

Ejemplo 7: Síntesis de reactivos de conjugación

Se sintetizaron reactivos de conjugación para asegurar la introducción de un resto alquino tensionado en biomoléculas (oligonucleótido y anticuerpo) que se injertarán en la superficie interna de la microgota y permitirán la captura de las dianas correspondientes. Los reactivos de conjugación que contienen uno o cuatro restos BCN y un éster activado que puede reaccionar con un aminooligonucleótido y un anticuerpo a través del residuo de lisina se han sintetizado de acuerdo con la estrategia de síntesis descrita en la Figura 28. Para preparar el reactivo de conjugación mono-BCN **53**, se sintetizó primero un derivado de peg **50** que comprende una amina y un éster metílico y se acopló a BCN en su forma activada con carbonato de nitrofenilo **29**. Después de la saponificación del éster metílico, se activó el compuesto de ácido carboxílico **51**. También se obtuvo un reactivo de conjugación tetra-BCN **58** por bisustitución de cloruro cianúrico con **22b** seguido de la introducción de un propionato de metilo. Después, los restos N-boc se han desprotegido y las aminas libres resultantes se han acoplado al derivado de BCN preactivado **29**. La saponificación del éster metílico **67** seguida de la activación del resto de ácido carboxílico proporcionó el reactivo de conjugación tetra-BCN **58**.

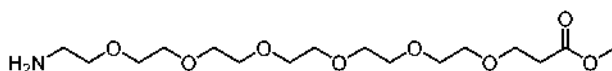
49, 1-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de metilo C₁₆H₃₁N₃O₈ PM = 393,44 g/mol



A una solución de 17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol **48** (1 eq., 3,40 g, 11,10 mmol) y acrilato de metilo (1,5 eq., 1,49 ml, 16,60 mmol) en THF (30 ml) a 0 °C se añadió tBuOK (0,1 eq., 135 mg, 1,20 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de la concentración, se añadió H₂O (100 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano a EtOAc en 35 minutos) para producir **49** (1,80 g, 4,58 mmol, 41 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,74 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,70 - 3,58 (m, 25H), 3,38 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 2,59 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

50, 1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de metilo C₁₆H₃₃NO₈ PM = 393,44 g/mol

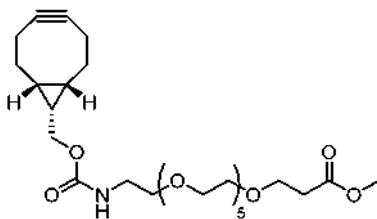


A una solución de **49** (1 eq., 600 mg, 1,53 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió Pd/C (1 %, 16,2 mg, 0,0153 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente a presión atmosférica de H₂ durante 14 horas. La mezcla se filtró a través de celite, se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH/NH₄OH 9/0,9/0,1 en 30 minutos) para producir **50** (455 mg, 1,24 mmol, 81 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,75 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,67 - 3,59 (m, 20H), 3,50 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,85 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,60 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H). Falta la señal de NH₂.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,8, 73,4, 70,5 - 70,2, 66,5, 51,5, 41,7, 34,8.

51. 1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oato de metilo
C₇H₄₅NO₁₀ PM = 543,65 g/mol

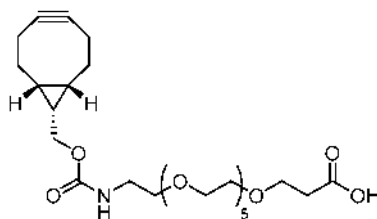


A una solución de (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (4-nitrofenil) carbonato **29** (1 eq., 250 mg, 0,79 mmol) en 0,5 ml de DMF Se añadió una solución de **50** (1,1 eq., 320 mg, 0,87 mmol) y TEA (3 eq., 0,331 ml, 2,38 mmol) en 0,5 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de la evaporación, se añadieron 20 ml de una solución acuosa de NaHPO₄ (1 M) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 85/15 en 30 minutos) para producir **51** (360 mg, 0,66 mmol, 84 %) como un aceite incoloro.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5,24 (bs, 1H), 4,15 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,75 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,67 - 3,60 (m, 20H), 3,55 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,42 - 3,30 (m, 2H), 2,60 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,35 - 2,15 (m, 6H), 1,62 - 1,51 (m, 2H), 1,44 - 1,29 (m, 1H), 0,94 (t, *J* = 9,8 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171,6, 156,6, 98,5, 70,4, - 70,2, 70,1, 69,9, 66,4, 62,2, 51,4, 40,6, 34,6, 28,9, 21,2, 19,9, 17,7.

52. ácido 1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oico
C₂₆H₄₃NO₁₀ PM = 529,63 g/mol

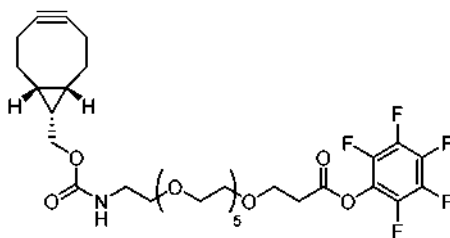


A una solución de **51** (1 eq. 915 mg, 1,68 mmol) en 10 ml de MeOH/H₂O 1/1 se añadió LiOH (5 eq., 201 mg, 8,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la evaporación del MeOH, la capa acuosa se acidificó mediante la adición de 50 ml de una solución acuosa de NaH₂PO₄ (1 M) y se extrajo con DCM (4 x 50 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar **52** (815 mg, 1,54 mmol, 91 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5,35 (bs, 1H), 4,14 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,77 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,71 - 3,58 (m, 20H), 3,56 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,41 - 3,30 (m, 2H), 2,60 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,38 - 2,13 (m, 6H), 1,66 - 1,50 (m, 2H), 1,41 - 1,28 (m, 1H), 0,94 (t, *J* = 9,7 Hz, 2H). Falta la señal de CO₂H.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173,8, 156,9, 98,8, 70,2, 70,7 - 70,2, 66,6, 62,7, 40,8, 35,0, 29,1, 21,4, 20,1, 17,8.

53. 1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oato de perfluorofenilo
C₃₂H₄₂F₅NO₁₀ PM = 695,68 g/mol

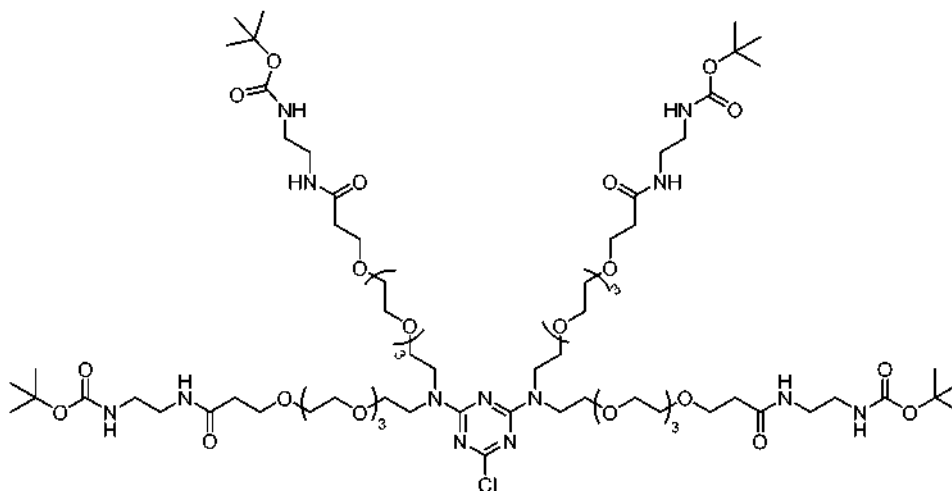


A una solución de **52** (1 eq., 800 mg, 1,51 mmol) y pentafluorofenol (1,2 eq., 333 mg, 1,81 mmol) en DCM (20 ml) se le añadió DCC (1,1 eq., 342 mg, 1,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de la concentración, el producto bruto se disolvió en DCM (75 ml), se filtró a través de un lecho de celite y se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ (2 x 75 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ciclohexano/EtOAc 1/1 a EtOAc en 30 minutos y después EtOAc/MeOH 95/5 en 10 minutos) para producir **53** (875 mg, 1,26 mmol, 83 %) se obtuvo como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5,24 (bs, 1H), 4,14 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 3,87 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,69 - 3,57 (m, 20H), 3,55 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,42 - 3,28 (m, 2H), 2,94 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,35 - 2,11 (m, 6H), 1,67 - 1,50 (m, 2H), 1,41 - 1,29 (m, 1H), 0,93 (t, J = 9,7 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 167,5, 156,8, 98,8, 70,7 - 70,1, 66,0, 62,7, 40,8, 34,4, 29,1, 21,4, 20,1, 17,8.

54. ((6-cloro-1,3,5-triazina-2,4-diil)bis(4,34-dioxo-7,10,13,16,22,25,28,31-octaoxa-3,19,35-triazaheptatriacontano-19,1,37-triil))tetracarbamato de tetra-*terc*-butilo C₇₅H₁₄₀N₁₃O₂₈ PM = 1707,46 g/mol



A una solución de **20b** (2,3 eq., 615 mg, 0,77 mmol) en acetonitrilo (3 ml) y DIEA (10 eq., 0,554 ml, 3,35 mmol) se le añadió cloruro cianúrico (1 eq., 61,8 mg, 0,33 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de la concentración, se añadieron 40 ml de una solución acuosa de NaHPO₄ 1 M y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 90/10 en 30 minutos) para producir **54** (380 mg, 0,22 mmol, 66 %) como un aceite amarillo claro.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,96 (bs, 4H), 5,32 (bs, 4H), 3,80 - 3,68 (m, 16H), 3,61 (dd, J = 17,7, 9,8 Hz, 56H), 3,39 - 3,29 (m, J = 5,1 Hz, 8H), 3,27 - 3,16 (m, 8H), 2,45 (t, J = 5,7 Hz, 8H), 1,42 (s, 36H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172,1, 168,8, 164,5, 156,3, 78,9, 70,5 - 70,1, 69,1, 68,8, 67,1, 48,1, 47,7, 40,3, 39,6, 36,8, 28,4 (12C).

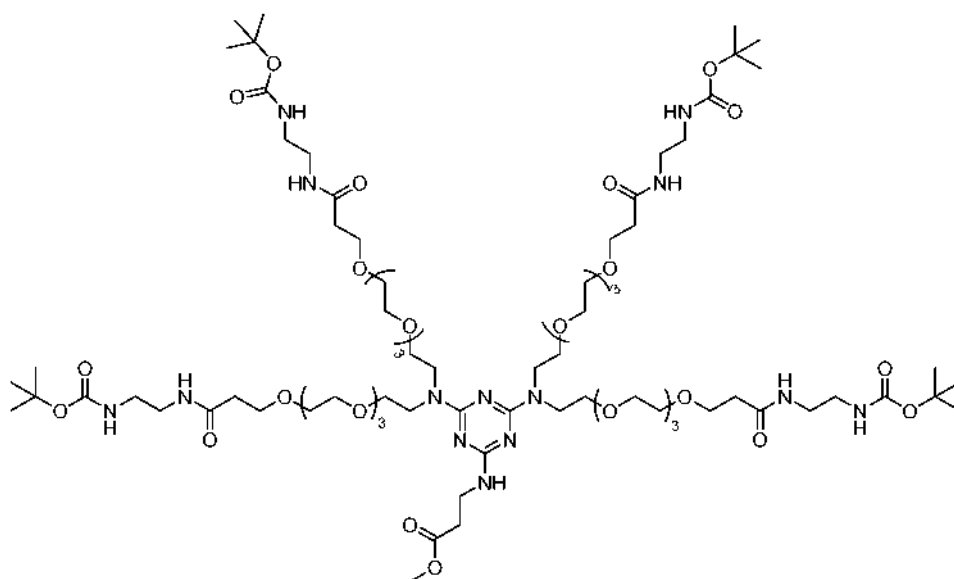
55. 3-((4,6-bis(bis(2,2-dimetil-4,9-dioxo-3,12,15,18,21-pentaoxa-5,8-diazatricosan-23-il)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)propanoato de metilo C₇₉H₁₄₈N₁₄O₃₀ PM = 1774,12 g/mol

5

10

15

20



25

30

A una solución de **54** (1 eq., 375 mg, 0,22 mmol) y DIEA (10 eq., 0,363 ml, 2,20 mmol) en acetonitrilo (7 ml) se añadió hidrocloreuro de metil 3-aminopropionato (8 eq., 245 mg, 1,76 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 48 horas. Después de la concentración, se añadieron 70 ml de una solución acuosa de NaH₂PO₄ (1 M) y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 75 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 9/1 en 30 minutos) para producir **55** (330 mg, 0,19 mmol, 85 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6,98 (bs, 4H), 5,34 (bs, 4H), 3,85 - 3,47 (m, 77H), 3,39 - 3,27 (m, 8H), 3,28 - 3,14 (m, 8H), 2,60 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,46 (t, J = 5,7 Hz, 8H), 1,43 (s, 36H). Falta la señal de NH.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172,7, 172,0, 156,3, 78,9, 70,4 - 70,1, 69,4, 69,2, 67,1, 51,5, 47,6, 40,3, 39,6, 36,8, 36,3, 34,3, 28,4 (12C).

35

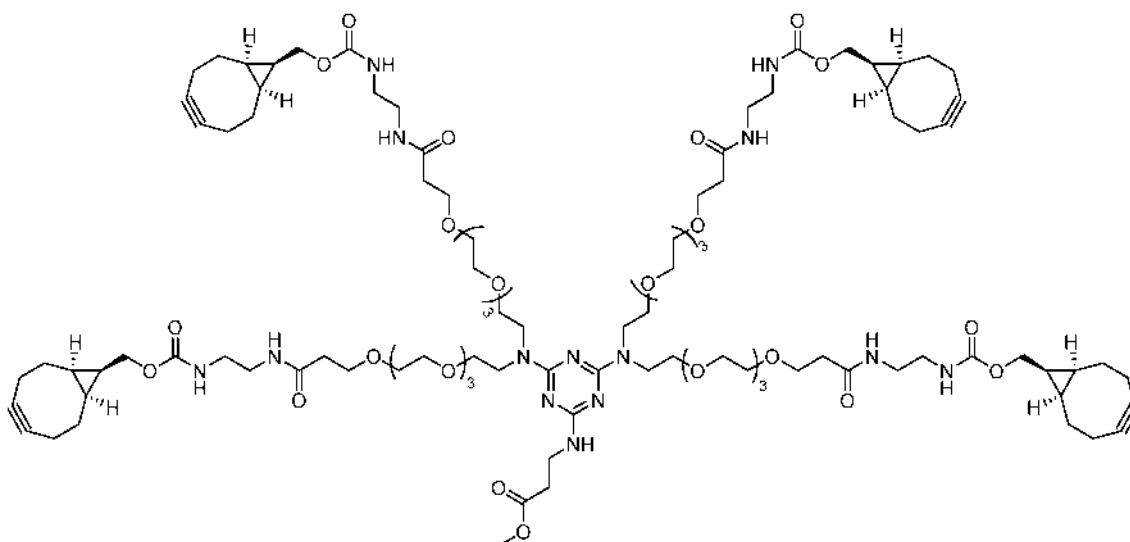
56. 3-((4,6-bis(bis(1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3,8-dioxo-2,11,14,17,20-pentaoxa-4,7-diazado-cosan-22-il)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)propanoato de metilo C₁₀₃H₁₆₄N₁₄O₃₀ PM = 2078,51 g/mol

40

45

50

55



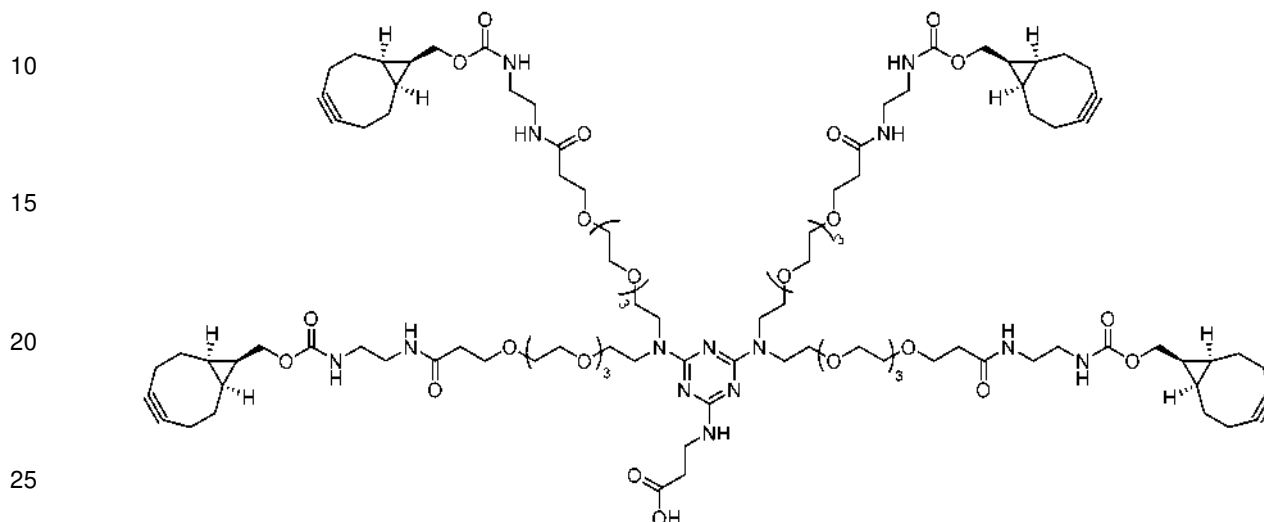
60

65

A una solución de **55** (1 eq., 280 mg, 0,16 mmol) en DCM/MeOH 1/1 (7,5 ml) se le añadió una solución de HCl 4 M en dioxano (60 eq., 2,37 ml, 9,47 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas y se concentró. El producto bruto se disolvió en DMF (5 ml), después se añadieron TEA (10 eq., 159 mg, 0,219 ml, 1,58 mmol) y (1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-ilmetil (4-nitrofenil) carbonato **29** (4 eq., 199 mg, 0,63 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Después de la concentración, se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 9/1 en 35 min) para producir **56** (230 mg, 0,11 mmol, 70 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,01 (bs, 4H), 5,60 (bs, 4H), 5,33 (bs, 1H), 4,12 (d, *J* = 7,9 Hz, 8H), 3,78 - 3,47 (m, 77H), 3,42 - 3,31 (m, ³8H), 3,33 - 3,20 (m, 8H), 2,60 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,46 (t, *J* = 5,5 Hz, 8H), 2,36 - 2,13 (m, 24H), 1,56 (d, *J* = 11,4 Hz, 8H), 1,32 (dd, *J* = 18,6, 10,3 Hz, 4H), 0,92 (t, *J* = 9,6 Hz, 8H).

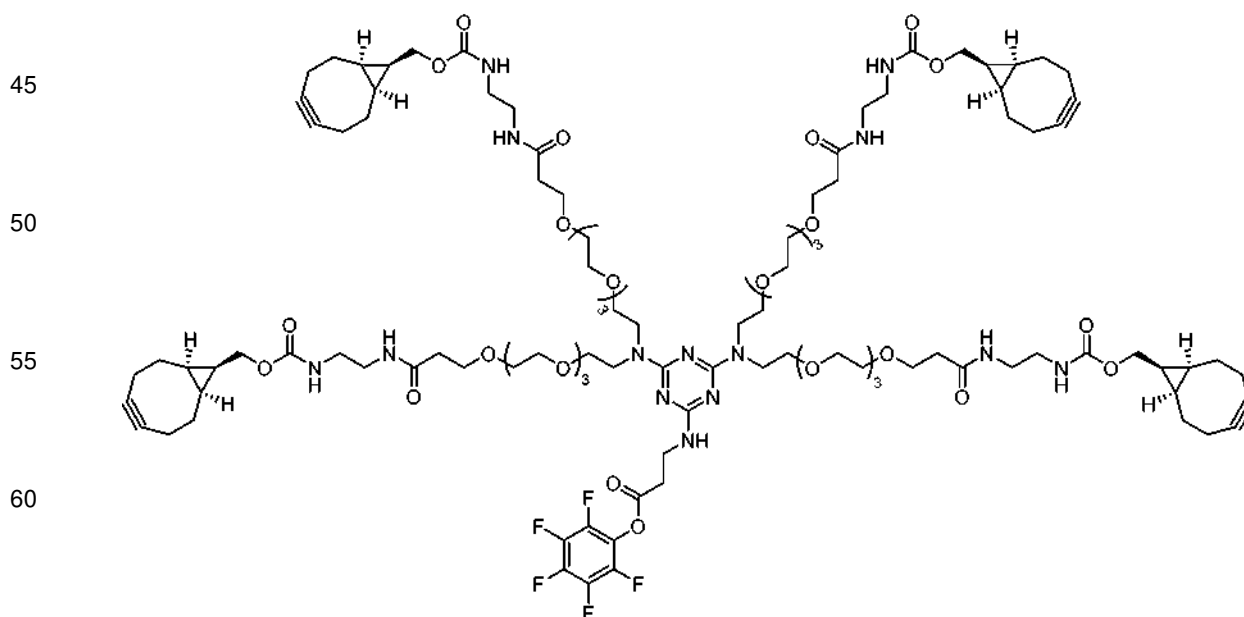
5 **57**, Ácido 3-((4,6-bis(bis(1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3,8-dioxo-2,1,14,17,20-pentaoxa-4,7-diazadocosan-22-il)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)propanoico C₁₀₂H₁₆₂N₁₄O₃₀ PM = 2064,49 g/mol



A una solución de **56** (1 eq., 230 mg, 0,11 mmol) en H₂O/MeOH 1/1 (2 ml) se añadió LiOH (5 eq., 13 mg, 0,55 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de la evaporación de MeOH, la fase acuosa se acidificó mediante la adición de 30 ml de una solución acuosa de NaHPO₄ 1 M y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM a DCM/MeOH 85/15 en 35 minutos) para producir **57** (125 mg, 0,06 mmol, 55 %) como un aceite amarillento.

35 **¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO)** δ 7,87 (s, 4H), 7,07 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 4,03 (d, *J* = 8,0 Hz, 8H), 3,54 (dt, *J* = 11,1, 7,3 Hz, 74H), 3,12 - 3,04 (m, 8H), 3,04 - 2,94 (m, 8H), 2,49 - 2,41 (m, 2H), 2,30 (t, *J* = 6,4 Hz, 8H), 2,18 (dd, *J* = 28,0, 12,0 Hz, 24H), 1,52 (d, *J* = 10,5 Hz, 8H), 1,33 - 1,25 (m, 4H), 0,87 (d, *J* = 9,1 Hz, 8H).

40 **58**, 3-((4,6-bis(bis(1-((1*R*,8*S*,9*S*)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3,8-dioxo-2,11,14,17,20-pentaoxa-4,7-di-azadocosan-22-il)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)propanoato de perfluorofenilo C₁₀₈H₁₆₁F₅N₁₄O₃₀ PM = 2230,54 g/mol



A una solución de **57** (1 eq., 125 mg, 0,06 mmol) y pentafluorofenol (1,2 eq., 13,4 mg, 0,07 mmol) en DCM (0,52 ml) se le añadió DCC (1,1 eq., 13,7 mg, 0,07 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de la concentración, se añadieron 30 ml de DCM y la mezcla se filtró a través de un lecho de celite para producir **58** (111 mg, 0,05 mmol, 90 %) como un aceite amarillento.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,00 (bs, 4H), 5,58 (bs, 4H), 5,49 (bs, 1H), 4,12 (d, *J* = 7,9 Hz, 8H), 3,79 - 3,49 (m, 74H), 3,43 - 3,32 (m, 8H), 3,33 - 3,22 (m, 8H), 3,00 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 2,46 (t, *J* = 5,4 Hz, 8H), 2,36 - 2,13 (m, 24H), 1,65 - 1,49 (m, 8H), 1,40 - 1,28 (m, 4H), 0,92 (t, *J* = 9,6 Hz, 8H).

10 Ejemplo 8: Preparación de una quimiosonda mediante la reacción de un oligonucleótido con amino modificado con un reactivo de conjugación descrito en el Ejemplo 7

Materiales y métodos:

15 Los oligonucleótidos con amino modificado se adquirieron de IDT. Las purificaciones después de la conjugación de los oligonucleótidos se llevaron a cabo en un sistema Shimadzu (bomba: LC 20-AD, detector: SPD 20-A, muestreador automático: SIL 20-A) mediante el uso de una columna C18 5 μM SunFire™ de 4,6 x 150 mm (Waters). Los parámetros de HPLC fueron los siguientes: velocidad de flujo 1 ml/min, la fase móvil A fue acetato de trietilamonio (TEAA) en agua (50 mM) y la fase móvil B fue TEAA en acetonitrilo (50 mM). La detección se realizó a 260 nm. Gradiente A: del 15 al 40 % de la fase móvil B de 0 a 30 min. Gradiente B: del 15 al 35 % de la fase móvil B de 0 a 30 min. Gradiente C: del 15 al 50 % de la fase móvil B de 0 a 30 min.

Procedimiento general para conjugaciones de oligonucleótidos:

25 En un tubo Eppendorf de 2 ml, se introdujo un oligonucleótido con amino modificado (1 nmol/μL en agua, 1 eq.), una solución del reactivo de conjugación **53** o **58** en acetonitrilo (10 eq.) y NaHCO₃ (1 M en agua, 250 eq.). El volumen final se ajustó con acetonitrilo para obtener una relación agua/acetonitrilo 1/1. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche en atmósfera de argón y después se inyectó directamente en HPLC para su purificación. Los detalles de las conjugaciones de oligonucleótidos así como las secuencias de oligonucleótidos con amino modificado y sus secuencias complementarias utilizadas durante los experimentos de microfluidos se resumen en la siguiente tabla.

35 Detalles de las conjugaciones y secuencias de oligonucleótidos. 5AmC12: C12 modificador de amino 5', iCy5: Cy5™ interno, 3Cy5Sp: Cy5™ 3' introducido en la resina de soporte, 5ATTO488N: Atto™ 488 5' (éster NHS), 3ATTO488N: Atto™ 488 3' (éster NHS).

Secuencias de oligonucleótidos con amino modificado	Reactivo de conjugación	Gradiente de HPLC	Conjugados basados en BCN obtenidos	Secuencias de oligonucleótidos complementarias
5'- /5AmMC12/AA/iCy5/GATACGAATTC GGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGG -3' (SEQ ID NO: 1)	53	A	59	60: 5'- /5ATTO488N/CCAC TACCAGCAGAACA CCCCCAGAATTCG TATC-3' (SEQ ID NO: 2)
5'- /5AmMC12/TTGCTGTAGCCAAATTC G/3Cy5Sp/-3' (SEQ ID NO: 3)	53	B	61	62: 5'- CGAATTTGGCTAC AGCAA/3ATTO488 N/-3' (SEQ ID NO: 4)
5'- /5AmMC12/TTGCTGTAGCCAAATTC G/3Cy5Sp/-3' (SEQ ID NO: 5)	58	C	63	62: 5'- CGAATTTGGCTAC AGCAA/3ATTO488 N/-3' (SEQ ID NO: 6)
5'- /5AmMC12/TTGCAGTTTTTTTTTTTT TTTTTTTT-3' (SEQ ID NO: 7)	53	B	64	65: 5'- /5ATTO488N/TTGA TCCAAAAAAAAAAA A AAAAAAAAAA-3' (SEQ ID NO: 8)

65 Ejemplo 9: Captura de una diana oligonucleotídica mediante el método de la invención (comentario de la quimiosonda: oligonucleótido para la diana)

1. Materiales y métodos

Ver el ejemplo 2.

5 Diseño experimental y materiales:

Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000). Se utilizaron velocidades de flujo de 500 $\mu\text{L}/\text{h}$ para la fase acuosa y de 500 $\mu\text{l}/\text{h}$ para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear las gotas (40-60 pL). La emulsión se recogió en un Eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Para el injerto de biomoléculas mediante la reacción de SPAAC, se utilizaron los tensioactivos de azida Krytox-peg₁₂-diN₃ **44** y Krytox-peg₁₆-tetraN₃ **47** al 2,5 % p/p en fase oleosa. Para los experimentos de control negativo, se utilizó 2,5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en fase oleosa. Para la fase acuosa, los conjugados de oligonucleótidos basados en BCN y sus dianas complementarias se disolvieron en CutSmart 1x (New England Biolabs, Referencia: B7204S).

Las emulsiones W/O se reinyectaron en el segundo chip y se separaron con aceite fluorado (3M Novec 7500). Se utilizaron velocidades de flujo de 200 $\mu\text{L}/\text{h}$ para Novec 7500 y de 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ para la muestra de emulsión.

20 Microscopía confocal:

Las emulsiones W/O se analizaron con un microscopio confocal Leica SPE (láseres utilizados: 405 nm (ACMS), 488 nm (derivados de Atto488) y 635 nm (derivados de sulfoCy5), objetivo 20X, Leica 11506513).

25 2. Resultados:

Injerto de oligonucleótido en la superficie interna de las microgotas. El injerto de Cy5-oligonucleótido después de la conjugación con uno o cuatro restos BCN (**59** y **63**) se validó mediante el uso de Krytox-peg₁₂-diN₃ **44** como fluorotensioactivo (Figura 30). En ambos casos, las señales obtenidas durante la reinyección de la emulsión mostraron que la fluorescencia de Cy5 era mayor en la parte anterior y en la posterior de las gotas e indicaron que los oligonucleótidos se ubicaron preferentemente en la superficie interna de la gota de agua. Estos resultados fueron confirmados por microscopía confocal que demostró que los Cy5-oligonucleótidos se concentraron en la superficie interna de las microgotas.

Injerto de oligonucleótido y captura del oligonucleótido complementario. Para imitar la captura de una secuencia de ADN complementaria, se repitieron los experimentos con encapsulación conjunta del oligonucleótido de injerto que porta restos BCN y una secuencia de oligonucleótido complementaria (Figura 31). Con el uso del fluorotensioactivo Krytox-peg₁₂-diN₃ **44**, se demostró el injerto de conjugados mono-BCN y tetra-BCN Cy5-oligonucleótido (**59** y **63** respectivamente) seguido de la captura de un oligonucleótido complementario que contiene un fluoróforo Atto488. La microscopía confocal mostró que las fluorescencias de Cy5 y Atto488 se concentraron en la superficie interna de las microgotas, lo que confirma que los oligonucleótidos modificados con BCN se injertaron convenientemente en la superficie interna permitiendo la captura de los oligonucleótidos complementarios (Figura 31 a-b). Se preparó una tercera emulsión mediante el uso de Krytox-peg₁₆-tetraN₃ **47** como fluorotensioactivo, el mono-BCN Cy5-oligonucleótido **61** y el Atto488-oligonucleótido complementario **62**. El análisis de microscopía confocal confirmó nuevamente el éxito del injerto y la captura de oligonucleótidos (Figura 31c). Finalmente, el oligo-polidT **63** conjugado de antemano a un resto BCN se injertó en la superficie interna de las microgotas para permitir la captura del oligonucleótido Atto488-polidA **64** (Figura 31d). Este resultado mostró la oportunidad de capturar el ARNm total que porta la secuencia de polidA después del proceso de maduración celular.

Controles negativos. Para demostrar la especificidad de la reacción, se prepararon controles negativos mediante el uso de un fluorotensioactivo comercial sin grupos funcionales (008-F, Ran Biotechnologies). Las emulsiones se prepararon mediante encapsulación conjunta de mono-BCN y tetra-BCN Cy5-oligonucleótidos (**59** y **63** respectivamente) y los correspondientes Atto488-oligonucleótidos complementarios (**60** y **62** respectivamente). En ambos casos, la fluorescencia de Cy5 y Atto488 se distribuyó de manera homogénea a través de las gotas de agua, lo que demuestra que la reacción de SPAAC no puede ocurrir sin fluorosurfactantes azida (Figura 32a-b). El mismo resultado se obtuvo con el uso de BCN-oligo-polidT **63** y el Atto-488 polidA complementario **64** (Figura 32c).

Ejemplo 10: Injerto de un anticuerpo (Trastuzumab) por el método de la invención

60 1. Preparación de la quimiosonda

Trastuzumab se ha conjugado con sulfoCy5 y BCN a través de sus residuos de lisina. sulfoCy5CO₂NHS se adquirió de Interchim (Ref. 992779).

65 Procedimiento general: En un tubo Eppendorf de 2 ml, se introdujeron Trastuzumab (2,5 mg/ml en tampón de borato 50 mM pH 8, 1 eq.), una solución del reactivo de conjugación **53** (1,5 mM en DMSO, 6 eq.) y una solución de sulfoCy5-

CO₂NHS (1 mM en DMSO, 3 eq.). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la solución se purificó mediante BioSpin P-30 (BioRad) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor para obtener Trastuzumab-Cy5-BCN **66**.

5 2. Injerto de la quimiosonda de acuerdo con la invención

Materiales y métodos: ver el ejemplo 2.

10 *Diseño experimental y materiales:* Las velocidades de flujo se controlaron mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000). Se utilizaron velocidades de flujo de 500 µl/h para la fase acuosa y de 500 µl/h para la fase oleosa fluorada (3M Novec 7500) para crear las gotas (40-60 pL). La emulsión se recogió en un Eppendorf lleno de aceite y se cerró con un tapón de PDMS para evitar la coalescencia debido al contacto con el aire. Para el injerto de anticuerpos mediante la reacción de SPAAC, se usó el tensioactivo de azida Krytox-peg₁₂-diN₃ **44** al 2,5 % p/p en fase oleosa. Para los experimentos de control negativo, se utilizó 2,5 % p/p de tensioactivo sin grupos funcionales (008-FluoroSurfactant, RAN Biotechnologies) en fase oleosa. Para la fase acuosa, Trastuzumab-Cy5-BCN **66** y ACMS se disolvieron en CutSmart 1x (New England Biolabs, Referencia: B7204S).

15 *Microscopía confocal:* las emulsiones W/O se analizaron mediante el uso de un microscopio confocal Leica SPE (láseres utilizados: 405 nm (ACMS) y 635 nm (derivados de sulfoCy5), objetivo 20X, Leica 11506513).

20 *Resultados:* Se validó el injerto de Trastuzumab-Cy5-BCN **66** mediante el uso de Krytox-peg₁₂-diN₃ **44** como fluorotensioactivo (Figura 33). El análisis de la emulsión por microscopía confocal mostró que Trastuzumab-Cy5 se concentró en la superficie interna de las microgotas mientras que el fluoróforo de control (ACMS) se distribuyó de manera homogénea a través de las gotas (Figura 33a). Este resultado confirma el injerto exitoso del anticuerpo en la superficie de las microgotas. Se preparó un control negativo con el uso de fluorotensioactivo comercial sin grupos funcionales (008-F, Ran Biotechnologies). En este caso, la microscopía confocal reveló que, como fluoróforo de control (ACMS), el Trastuzumab-Cy5-BCN **67** no se injertó en la superficie de la microgota, lo que demuestra que la reacción solo puede ocurrir mediante el uso de un fluorotensioactivo azida (Figura 33b).

30 Ejemplo 11: Captura de ARN marcados y su purificación por inversión de gotas

En este ejemplo, se preparó y purificó un fragmento de 970 nt de longitud del ARNm de GAPDH marcado con fluorescencia antes de i) diluirlo en un tampón estabilizador en presencia de un gran exceso de ARN inespecíficos, ii) dispersar la solución en gotas de agua en aceite en las que iii) el ARN se capturó en la superficie interna de las gotas y, finalmente, iv) el ARN diana se purificó a partir de la mezcla de reacción.

Secuencias

Molécula	Núm. de identificación	Secuencia	Modificación
Plantilla de ADN de GAPDH ***	1	TAATACGACTCACTATAGGGatggggaaggtgaaggtcggagtcacg gatttgctgattggcgccctggcaccagggtgctttaactctggtaaagtgatatt gttgccatcaatgacccctcattgacctcaactacatggtttacatgtccaatgatcc accatggcaaatccatggcaccgtcaaggctgagaacgggaagctgtcatcaat ggaatcccatcaccatctccaggagcgagatccctccaaatcaagtgggctgat gctggcgtgagtacgtcgtggagtcactggcgtctcaccacctggagaaggctg gggctcattgcagggggagccaaaagggtcatcatctgccccctgtgtagcc ccatgttcgtatgggtgtaacctgagaagtatgacaacagcctcaagatcatca gcaatgctcctgcaccaccaactgcttagcaccctggccaaggtcatccatgaca ctttggtatcgtggaaggactcatgaccacagtccatgcatcactgccaccagaag actgtggatggccccctcgggaaactgtggcgtgatggccgctcctccagaac atcatccctgctcactgctgccaaggctgtggcaaggtcatccctgagctgaa cggaagctcactggcatggccttcctggtccccactgccaacgtgcatggtggac ctgacctgctgtagaaaaactgccaatatgatgacatcaagaagcagtggaag caggcgtcggaggggccccctcaagggtcctcctggtactgagcaccagggtgt ctcctctgactcaacagcgacaccactcctccaccttgacgtgggctggcattgc cctcaacgaccactttgcaagctatttctggtatgacaacgaattggctacagcaa ca (SEQ ID NO: 9)	ninguna
Dir de GAPDH **	2	ggaactgaattcTAATACGACTCACTATAGGGatggggaaggtgaagg tcgg (SEQ ID NO: 10)	ninguna
Rev de GAPDH	3	Tgttgctgtagccaaattcg (SEQ ID NO: 11)	ninguna

65

continuación

Molécula	Núm. de identificación	Secuencia	Modificación
Fragmento de ARN de GAPDH	4	Gggauggggaaggugaaggucggagucaacggauuuggucguauugggcg ccuggucaccagggcugcuuuuaacucugguaaaguggauuuguugccau caaugaccccucauugaccucaacuacaugguuuacauguuccaauaugau uccaccauggcaaaauccauggcaccgucagggcugagaacgggaagcuug ucaucaauggaaaucccaucaccaucuuccaggagcgagaucccucaaaa caaguggggcgauugcuggcugagucgucguggaguccacuggcgucuu accaccauggagaaggcuggggcucauuugcagggggagccaaagggu aucaucucugcccccucugcugaugcccccaguucgucuauggugugaacc augagaaguaugacaacagccucaagaucacagcaaugccuccugcaccac caacugcuuagcaccucggccaaggucauccaugacaacuugguauugcug gaaggacucaugaccacaguccaugccaucacugccaccagaagacugugg augggccuccgggaaacuguggcugaugccgggggucuccagaacau cauccugccucucagggcugccaaggcugugggcaaggucauccugag cugaacgggaagcucacuggcauggccuuccgugucccacugccaacgugu caguggugaccugaccugccgucuaagaaaaccugccaaauaugaugacau caagaagguggugaagcaggcugcggaggggcccccuaagggcauccugggc uacacugagcaccagggucuccucugacucaacagcgacaccacuccu ccaccuuugacgcuggggcuggcauugcccuaacgaccacuugucaagcu cauuuccugguagacaacgaauuuggcuacagcaaca (SEQ ID NO: 12)	Atto488-UTP
ADN de captura	5	5'-NH ₂ -C12-TTGCTGTAGCCAAATTCG-3' (SEQ ID NO: 13)	BCN-peg ₆
<p>* El ADN se obtuvo mediante transcripción inversa con especificidad génica del ARNm de GAPDH contenido en la fracción de ARN total extraída de células HeLa de mamíferos. El ADNc se clonó en el vector pUC18 y se verificó su secuencia mediante secuenciación de Sanger (GATC Biotech).</p> <p>** El promotor T7 está subrayado y se muestra en letras mayúsculas</p>			

El oligonucleótido de ADN 5 se modificó con el reactivo de conjugación **53** mediante su función amino en el extremo terminal 5' de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

Preparación y funcionamiento de chips de microfluidos

Los dispositivos de microfluidos se obtuvieron mediante un proceso de moldeado de réplicas clásico como se describió anteriormente en (Mazutis y otros, 2009. Anal Chem 81: 4813-4821). Brevemente, los dispositivos se diseñaron en Autocad (Autodesk 2014), se imprimieron fotomáscaras negativas (Selba S.A.) y se utilizaron para preparar moldes mediante métodos de fotolitografía estándar. Se usó fotorresistencia SU8-2025 (MicroChem Corp.) para modelar canales de 40 µm de profundidad sobre obleas de silicio (Siltronix). A continuación, se fabricaron dispositivos de microfluidos en poldimetilsiloxano (PDMS, Silgard 184, Dow-Corning) mediante métodos convencionales de litografía blanda (Xia y Whitesides 1998. Annu Rev Mater Sci 28: 153-184). Los electrodos modelados se rellenaron con metal mediante calentamiento del chip de microfluidos a 90 °C e inyección de soldadura fundida a baja temperatura de 51In/32.5Bi/16.5Sn (Indium Corporation, Singapur) (Siegel y otros, 2007. Adv Mater 19: 727-733). Finalmente, las conexiones eléctricas con la soldadura se realizaron con pedazos cortos de cables eléctricos (Radiospares). Las principales dimensiones y la profundidad de los dispositivos de microfluidos se proporcionan en las figuras correspondientes y en sus leyendas.

Las fases acuosas se cargaron en tubos de PTFE de 0,75 mm de D.I. (Thermo Scientific) y los aceites se cargaron en tubos Micrew de 2 ml (Thermo Scientific). Los líquidos se inyectaron en dispositivos de microfluidos a velocidades de flujo constantes y altamente controladas mediante el uso de un controlador de flujo impulsado por presión MFCS™ de 7 bar (Fluigent) equipado con Flowells (medidores de flujo de 7 µL/min) para permitir el funcionamiento en modo de flujo controlado.

Configuración óptica, adquisición de datos y sistema de control

La configuración óptica se basó en un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) montado en una plataforma amortiguadora de vibraciones (Thorlabs B75150AE). Los rayos de un láser de 375 nm (CrystaLaser DL375-020-O) y un láser de 488 nm (Crysta-Laser DL488-050-O) se combinaron mediante el uso de un espejo dicróico (Semrock Di02-R405-25x36), con forma de líneas mediante el uso de un par de lentes (Semrock LJ1878L2-A y LJ1567L1-A) y se dirigieron al objetivo del microscopio (Nikon Super Plan Fluor 20x ELWD o Nikon Super Plan Fluor 40x ELWD) para enfocar en el medio del canal en el punto de detección. La fluorescencia emitida se recogió con el mismo objetivo y se separó de los rayos láser mediante un espejo dicróico de bordes múltiples (Semrock Di01-R405/488/561/635-25x36). La fluorescencia azul (ácido 7-aminocumarin-4-metanosulfónico) se resolvió de la fluorescencia verde (Atto488-ARN) y naranja (TAMRA) mediante un tercer espejo dicróico (Semrock LM01-480-25). Después, la fluorescencia verde se separó de la fluorescencia naranja mediante un espejo dicróico adicional (Semrock FF562-Di03-25x36). La fluorescencia se midió finalmente mediante tres tubos fotomultiplicadores (Hamamatsu H10722-20)

equipados con filtros de paso de banda (Semrock FF01-445/45-25, FF01-600/37-25 y FF03-525/50-25 para la detección de azul, verde y naranja respectivamente). La adquisición de señales de los PMT se realizó mediante un módulo de adquisición de datos inteligente (DAQ) con un chip FPGA programable por el usuario (National Instruments PCI-7851R) impulsado por soporte lógico inalterable (firmware) y software desarrollados internamente. Para monitorear el experimento usamos un espejo dicróico adicional (Semrock FF665-Di02-25x36) para dividir la luz en una cámara CCD (Allied Vision Technologies Guppy F-033). Un filtro de paso largo (Semrock BLP01-664R-25) evitó reflejos potencialmente dañinos de los láseres en la cámara.

Preparación de ARN diana marcado

El ADN plantilla **1** se amplificó por PCR al mezclar 10 ng de **1** en una mezcla de amplificación (volumen total = 50 μ E) que contenía 0,2 μ M de **2**, 0,2 μ M de **3**, 0,2 mM de cada dNTP (Thermo Scientific), 1 μ L de Phire DNA polimerasa (Thermo Scientific) y el tampón suministrado. Después, el ADN **1** se amplificó mediante el uso de una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C, seguido de 25 ciclos de 5 segundos a 98 °C, 30 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C, antes de una etapa de extensión final de 120 seg a 72 °C. A continuación, el ADN se purificó mediante el uso del sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) según las instrucciones del proveedor y se eluyó en agua desionizada sin ADNasa/sin ARNasa. A continuación, el ADN purificado se cuantificó mediante medición de la DO^{260}_{nm} de la solución (NanoDrop).

A continuación, 2500 ng de ADN plantilla **1** amplificado y purificado se transcribieron en presencia de Atto488-UTP mediante el uso del kit de marcaje de ARN con Atto488 (Jena Bioscience) según lo recomendado por el proveedor. La transcripción adecuada se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados) y el ARN del tamaño esperado se purificó en gel después de la eliminación de proteínas mediante extracción con fenol. Para ello, 100 μ L de la mezcla de reacción se mezclaron con 100 μ L de tampón de carga (Glicerol 20 %, TBE IX, Urea 8 M, bromofenol azul) antes de cargarlos en un gel de agarosa al 1 % en TBE y someterlos a una migración en tampón TBE durante 35 min a 130 V. Después de la migración, la banda que contenía ARN se identificó bajo radiación UV, se cortó del gel y se colocó en una longitud de membrana de diálisis (valor de corte = 6000-8000, SpectraPore), rellena con agua sin nucleasa y cerca estaban las pinzas recomendadas. A continuación, se eluyó el ARN marcado del gel al sumergir el montaje en una solución de TBE sometida a un campo de CD de 95 V durante 60 min. A continuación, el ARN eluido que contenía la fase acuosa se precipitó en etanol al 70 %, acetato de sodio 300 mM y en presencia del portador Glycoblue (Invitrogen). Después de la centrifugación, el sedimento se lavó con etanol al 70 % antes de resuspenderlo en DMSO al 15 %. Finalmente, el ARN se cuantificó por medición de la DO^{260}_{nm} de la solución (NanoDrop) que constituyó una solución de ARN **4**.

Encapsulación y captura de ARN

Procedimiento experimental

Una solución de 25 nM de ARN **4** marcado se mezcló con 200 nM de ADN de captura **5** que contenía BCN en tampón estabilizador KP (MES 25 mM pH 6, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y BSA a 0,4 mg/ml). La mezcla se complementó adicionalmente con 4 mg/ml de ARN total de levadura de competencia (Ambion) y ácido 7-aminocumarin-4-metanosulfónico 5 μ M (usado como rastreador de gotas). La mezcla se cargó en un tramo de tubería de PTFE (tubería con D.I. de 0,75 mm; Thermo Scientific) y un extremo de la tubería se conectó al dispositivo de infusión Fluigent mientras que el otro extremo de la tubería se conectó al generador de gotas (Figura 34). Una fase oleosa compuesta de Novec 7500 suplementado con un 2,5 % de tensioactivo Krytox-peg₁₆-tetraN₃ **47** se infundió en la segunda entrada del dispositivo y se utilizó para producir gotas de 40 pL a una velocidad de 3500 gotas por segundo mediante la infusión de la fase acuosa a 1500 nL/min y la fase oleosa a 1900 nL/min. Las gotas se recogieron durante 20 min a través de un tramo de tubería en un tubo de PCR de 0,2 ml cerrado con un tapón de PDMS. A continuación, la emulsión se sometió a una incubación de 5 min a 85 °C seguido de 5 min a 50 °C y una etapa final de 5 min a 25 °C.

Resultados

Tras una breve incubación de 20 min a 25 °C, se obtuvieron imágenes de la emulsión en un sistema confocal (Zeiss LSM 780). En la Figura 35, la formación de un anillo verde demostró la captura del ARN en la superficie interna de la gota, mientras que el colorante de cumarina (en azul) permaneció difuso en las gotas.

Purificación de ARN por inversión de gotas

Procedimiento experimental

Las gotas de agua en aceite (w/o) que mostraban ARN capturado se reinyectaron en un dispositivo inversor (Figura 36) y se infundieron 350 nL/min para reinyectar a una velocidad de 165 gotas por segundo. Las gotas w/o se separaron mediante una corriente de aceite Novec-7500 sin tensioactivo infundido a 400 nL/min y se produjo una emulsión doble (agua en aceite en agua, w/o/w) afectando la corriente resultante mediante un flujo de fase acuosa (Tween 20 al 0,1 %, Hepes 10 mM pH 7,4 y TAMRA 5 μ M) infundido a 1300 nL/min. Con el uso de estos ajustes, cada gota w/o de 40 pL se individualizó en 100 pL (40 pL de gota w/o + 60 pL de aceite) con no más de 1 gota w/o por gota w/o/w mientras

que alrededor del 90 % de las gotas o/w estaban ocupadas.

5 Las gotas w/o/w se convirtieron (inviertieron) en gotas de aceite en agua (o/w) al pasar entre un par de electrodos a los que se aplicó un campo de CA de forma cuadrada (2500 V, 30 Hz) mediante el uso de un generador de funciones conectado a un amplificador de alto voltaje (TREK Modelo 623B). Las gotas se recogieron en un tubo de 0,5 ml bajo agua.

Resultados

10 Con el uso de este procedimiento, hasta el 90 % de las gotas o/w estaban ocupadas y hasta el 95 % de estas gotas ocupadas se convirtieron con éxito en gotas o/w. Además, mientras que la cumarina contenida inicialmente en el w/o se eliminó por el proceso de inversión, el ARN fluorescente verde capturado permaneció inmovilizado en la superficie externa de las gotas (Figura 37).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université de Strasbourg Centre International de Recherche aux Frontières de la Chimie Centre National de la Recherche Scientifique

20 <120> Ingeniería de la superficie intragotas para capturar una diana molecular

<130> B2221PC

<160> 13

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 35

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido con amino modificado

35

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> C12 modificador de amino 5' y Cy5TM interno

40

<400> 1

gatacgaatt cgggtgttct gctggtagtg gtcgg

35

<210> 2

45

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Oligonucleótido complementario

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

55

<223> 5'Atto(TM) 488 (éster NHS)

<220>

<221> característica_misc

	<222> (1)..(1)	
	<223> 5'Atto 488 (éster NHS)	
5	<400> 2 ccactaccag cagaacaccc ccagaattcg tatc	34
	<210> 3	
	<211> 18	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido con amino modificado	
15	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> C12 modificador de amino 5'	
20	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 3' Cy5 introducido en resina de soporte	
25	<400> 3 ttgctgtagc caaattcg	18
	<210> 4	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido complementario	
35	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 3' Atto 488 (éster NHS).	
40	<400> 4 cgaattggc tacagcaa	18
	<210> 5	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido con amino modificado	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (1)..(1)	
55	<223> C12 modificador de amino 5'	

	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (18)..(18)	
5	<223> 3' Cy5 introducido en resina de soporte	
	<400> 5	
	ttgctgtagc caaattcg	18
10	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido complementario	
	<220>	
	<221> característica_misc	
20	<222> (18)..(18)	
	<223> 3' Atto 488 (éster NHS)	
	<400> 6	
	cgaatttggc tacagcaa	18
25	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido con amino modificado	
	<220>	
	<221> característica_misc	
35	<222> (1)..(1)	
	<223> C12 modificador de amino 5'	
	<400> 7	
40	ttgcagtttt tttttttt tttttt	27
	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido complementario	
50	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 5' Atto 488 (éster NHS)	
55	<400> 8	

ES 2 824 488 T3

	ttgatccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	27
	<210> 9	
	<211> 987	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Plantilla de ADN de GAPDH	
	<400> 9	
	taatacgact cactataggg atggggaagg tgaaggcgg agtcaacgga ttggtcgta	60
15	ttgggcgcct ggtcaccagg gctgcttta actctggtaa agtggatatt gttgcatca	120
	atgaccctt cattgacct aactacatgg ttacatgtt ccaatatgat tccaccatg	180
	gcaaattcca tggcaccgtc aaggctgaga acggaagct tgtcatcaat ggaaatcca	240
20	tcaccatctt ccaggagcga gatccctcca aaatcaagtg gggcgatgct ggcgctgagt	300
	acgtcgtgga gtccactggc gtcttcacca ccatggagaa ggctggggct cattgcagg	360
25	ggggagccaa aagggtcatc atctctgcc cctctgctga tgccccatg ttcgtcatgg	420
	gtgtgaacca tgagaagtat gacaacagcc tcaagatcat cagcaatgcc tcctgcacca	480
	ccaactgctt agcaccctg gccaaagtca tccatgacaa ctttggtatc gtggaaggac	540
30	tcatgaccac agtccatgcc atcactgcca ccagaagac tgtggatggc ccctccggga	600
	aactgtggcg tgatggccgc ggggctctcc agaacatcat ccctgcctct actggcgctg	660
35	ccaaggctgt gggcaaggtc atccctgagc tgaacgggaa gctcactggc atggccttc	720
	gtgtcccccac tgccaacgtg tcagtgggtg acctgacctg ccgtctagaa aaacctgcca	780
	aatatgatga catcaagaag gtggatgaagc aggcgtcgga gggccccctc aaggcatcc	840
40	tgggtacac tgagcaccag gtggctctct ctgactcaa cagcgacacc cactcctcca	900
	cccttgacgc tgggctggc attgcctca acgaccact tgtaagctc atttctggt	960
45	atgacaacga atttgctac agcaaca	987
	<210> 10	
	<211> 53	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de GAPDH	
	<400> 10	
55	ggaactgaa ttctaatacg actcactata gggatgggga aggtgaaggt cgg	53

ES 2 824 488 T3

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de GAPDH	
10	<400> 11	
	tgttgctgta gccaaattcg	20
	<210> 12	
	<211> 970	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Fragmento de ARN de GAPDH	
20	<400> 12	
	gggaugggga aggugaaggu cggagucaac ggauuugguc guauugggcg ccuggucacc	60
	agggcugcuu uaaacucugg uaaaguggau auuguugcca ucaaugaccc cuucauugac	120
25	cucaacuaca ugguuuacau guuccaauau gauuccaccc auggcaaaau ccauggcacc	180
	gucaaggcug agaacgggaa gcuugucauc aauggaaauc ccaucaccau cuuccaggag	240
30	cgagaucccu ccaaaaucua guggggcgau gcuggcgcug aguacgucgu ggaguccacu	300
	ggcgucuuca ccaccaugga gaaggcuggg gcucauuugc aggggggagc caaaaggguc	360
	aucaucucug cccccucugc ugaugcccc auguucguca ugggugugaa ccaugagaag	420
35	uaugacaaca gccucaagau caucagcaau gccuccugca ccaccaacug cuuagcacc	480
	cuggccaagg ucauccauga caacuuggu aucguggaag gacucaugac cacaguccau	540
40	gccaucacug ccaccagaa gacuguggau ggccccuccg ggaaacugug gcgugauggc	600
	cgcgggguc uccagaacau cauccugcc ucuacuggcg cugccaaggc ugugggcaag	660
	gucaucccug agcugaacgg gaagcucacu ggcauggccu uccgugucc cacugccaac	720
45	gugucagugg uggaccugac cugccgucua gaaaaccug ccaaauauga ugacaucaag	780
	aaggugguga agcaggcugc ggagggcccc cucaagggca uccugggcu cacugagcac	840
50	cagguggucu ccucugacuu caacagcgac acccacuccu ccacuuuga cgcuggggcu	900
	ggcauugccc ucaacgacca cuuugucaag cucuuuccu gguaugacaa cgaauuuggc	960
	uacagcaaca	970
55		

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5

<220>
<223> ADN de captura

<220>
10 <221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> 5'-NH2-C12

<400> 13
15 ttgctgtagc caaattcg 18

REIVINDICACIONES

1. Un método para capturar una diana molecular, dicho método comprende
 - 5 a) proporcionar gotas de emulsión de agua en aceite que comprenden un tensioactivo con grupos funcionales en la interfase de las gotas, dicho tensioactivo con grupos funcionales comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales;
 - 10 b) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con una quimiosonda presente o añadida en la fase acuosa de las gotas, dicha quimiosonda comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales, y
 - 15 c) poner en contacto dicho tensioactivo con grupos funcionales con la diana molecular presente o añadida en la fase acuosa de las gotas,

15 capturar así la diana molecular en la interfase interna de las gotas de emulsión a través de (i) la unión directa o indirecta de la quimiosonda al tensioactivo con grupos funcionales y (ii) la unión específica de la quimiosonda a la diana molecular, y en donde las etapas b) y c) se realizan de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden.
- 20 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, que se implementa mediante el uso de un sistema de microfluidos.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, que comprende además invertir la fase de las gotas de emulsión de agua en aceite para producir así gotas de emulsión de aceite en agua y exponer la diana molecular

25 capturada en la superficie externa de las gotas de emulsión.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una etapa de recuperar, detectar y/o cuantificar la diana molecular capturada.
- 30 5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la diana molecular es una proteína o un ácido nucleico.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el resto de captura de la quimiosonda se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un Spiegelmer, un aptámero peptídico, un aptámero, un ligando o un sustrato de la diana molecular, un ácido nucleico que puede hibridar con la diana

35 molecular y un fragmento de receptor que puede unirse a la diana molecular.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tensioactivo con grupos funcionales es un tensioactivo dibloque o tribloque.

40
8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la quimiosonda se une al tensioactivo con grupos funcionales mediante interacciones covalentes.
9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la quimiosonda se une

45 directamente al tensioactivo con grupos funcionales a través de interacciones covalentes, preferentemente la cabeza hidrófila con grupos funcionales del tensioactivo y el dominio de unión de la quimiosonda, donde cada uno porta un resto químico reactivo, los que pueden reaccionar entre sí a través de una reacción clic o una reacción de bioconjugación.
- 50 10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la quimiosonda se une al tensioactivo con grupos funcionales a través de un intermediario de unión, preferentemente la cabeza hidrófila con grupos funcionales del tensioactivo y el intermediario de unión, donde cada uno porta un resto químico reactivo, los cuales pueden reaccionar entre sí mediante una reacción clic o una reacción de bioconjugación.
- 55 11. El método de conformidad con la reivindicación 9 o 10, en donde la reacción clic se selecciona del grupo que consiste en cicloadición dipolar de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), cicloadición de alquino-azida promovida por tensión (SPAAC), reacciones de Diels-Alder con tetrazinas y alquinos o alquenos tensionados, cicloadición de tetrazina-isonitrilo, reacción clic de tiol-alqueno tal como cicloadición de maleimida-cisteína, y una cicloadición de sidnona-alquino, preferentemente es una cicloadición de alquino-azida promovida por

60 tensión (SPAAC).
12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la quimiosonda se une al tensioactivo con grupos funcionales mediante interacciones no covalentes, directamente o mediante un intermediario de unión.

65
13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la diana molecular es de

una entidad biológica encapsulada dentro de las gotas y en donde el método comprende opcionalmente lisar dicha entidad para liberar dicha diana molecular.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el tensioactivo con grupos funcionales comprende o consiste en un resto de fórmula (Ib).

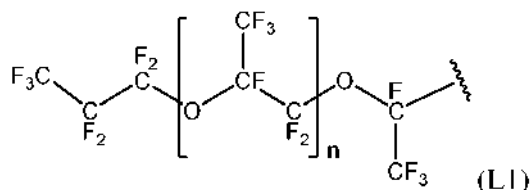


en donde:

- a y b son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 5,
- cada LIPO es una cola lipófila seleccionada independientemente del grupo que consiste en una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, opcionalmente interrumpida por uno o varios heteroátomos y opcionalmente sustituida por uno o varios grupos seleccionados de grupos alquilo C₁-C₃, halógenos tales como F, Cl o Br, -OH, -OMe, y -CF₃, una cadena de perfluoropoliéter, una cadena de perfluorocarbono y combinaciones de estos,
- cada HIDRO es una cabeza hidrófila que comprende un resto seleccionado independientemente de un grupo dimorfolinofosfato, un poliéter, una polieteramina, un poliglicerol y combinaciones de estos,
- cada FUNC es un resto funcional del tensioactivo seleccionado de un grupo alquinilo, un grupo azido, una biotina, una estreptavidina y una avidina.

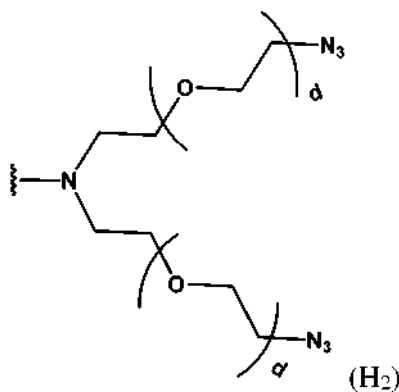
15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el tensioactivo con grupos funcionales comprende

- una o dos colas lipófilas que comprenden, o consisten en el resto de fórmula (L1):



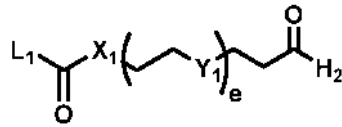
en donde n es un número entero de 25 a 45

- una cabeza hidrófila que porta al menos un resto de fórmula (H2)



en donde d es un número entero de 1 a 12

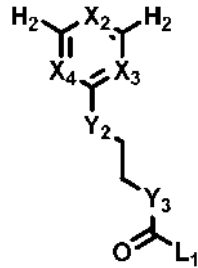
16. El método de conformidad con la reivindicación 15, en donde el tensioactivo con grupos funcionales tiene una de las siguientes fórmulas:



5

en donde e es un número entero de 1 a 12 y X₁ y Y₁ se seleccionan independientemente de NH, CH₂ y O;

10

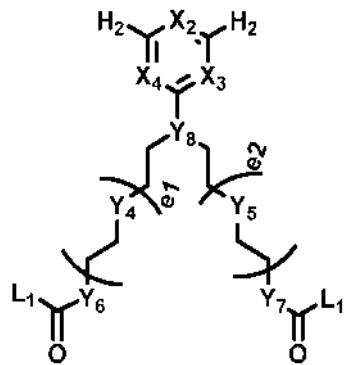


15

20

en donde Y₂ e Y₃ se seleccionan independientemente de NH, CH₂ u O y X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente de CH y N, y

25



30

35

40

en donde

- o X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente de CH y N,
- o Y₈ es CH o N,
- o Y₄, Y₅, Y₆ e Y₇ se seleccionan independientemente de NH, O y CH₂ y,
- o e₁ y e₂ son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 12,

45

en donde L₁ y H₂ son como se definen en la reivindicación 15.

17. El uso de un kit que comprende

50

- un tensioactivo con grupos funcionales que comprende al menos una cola lipófila unida a una cabeza hidrófila con grupos funcionales; y
- una quimiosonda que comprende al menos (i) un resto de captura que puede unirse específicamente a una diana molecular y al menos (ii) un dominio de unión que puede unirse directa o indirectamente al tensioactivo con grupos funcionales,

55

para capturar una diana molecular de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

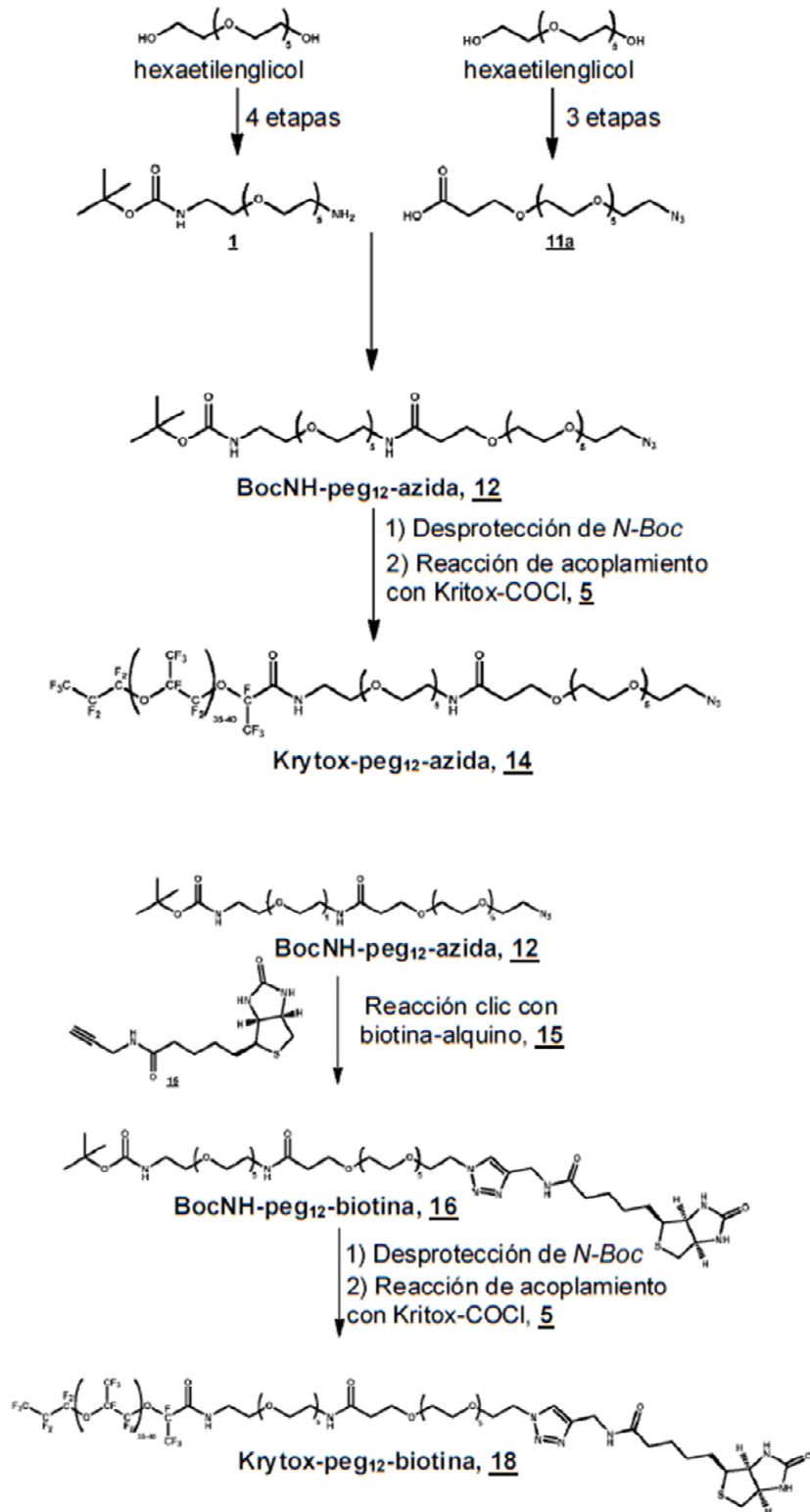


Figura 2

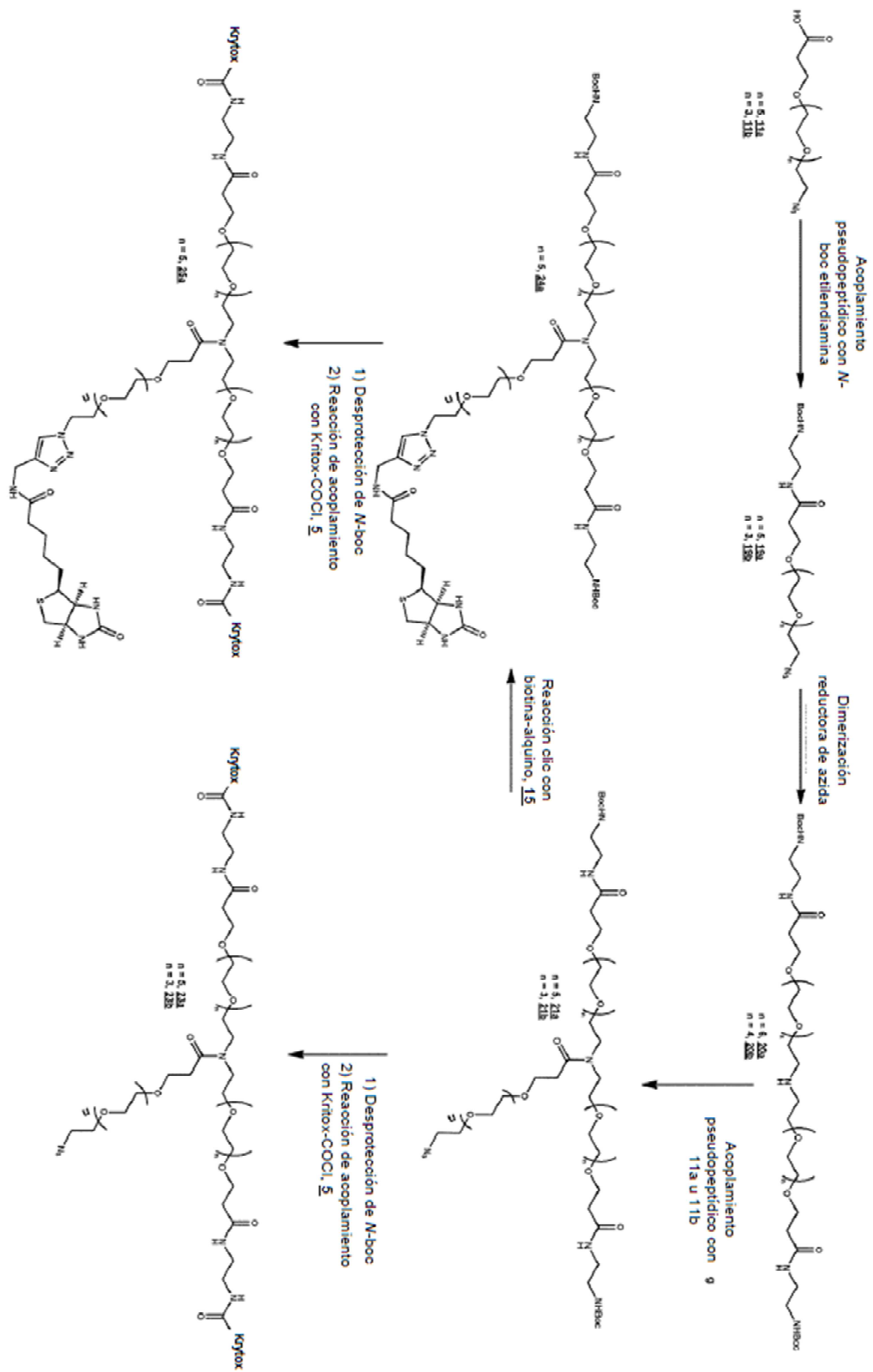


Figura 3

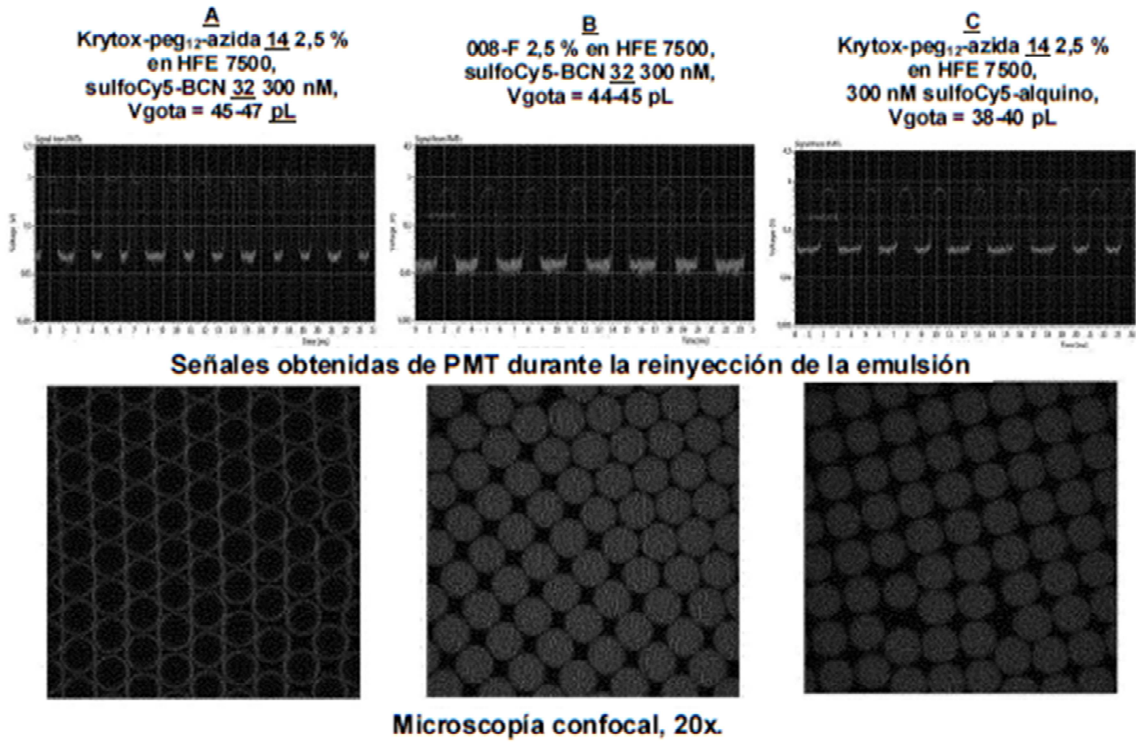


Figura 6

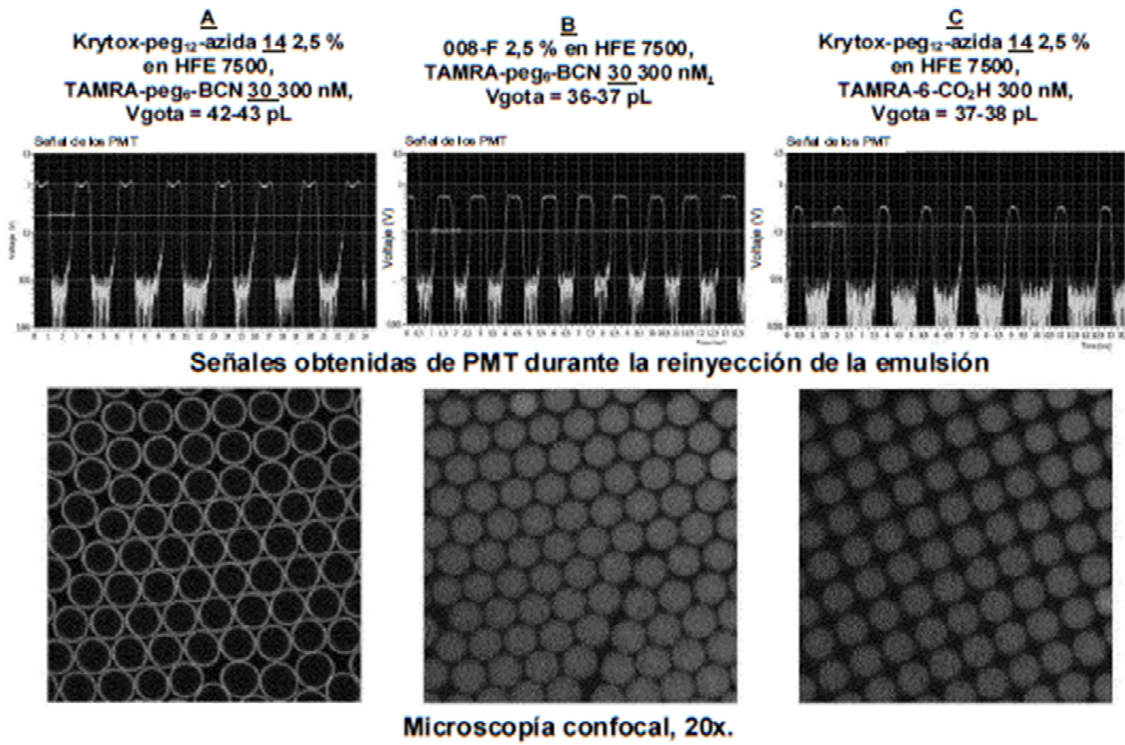
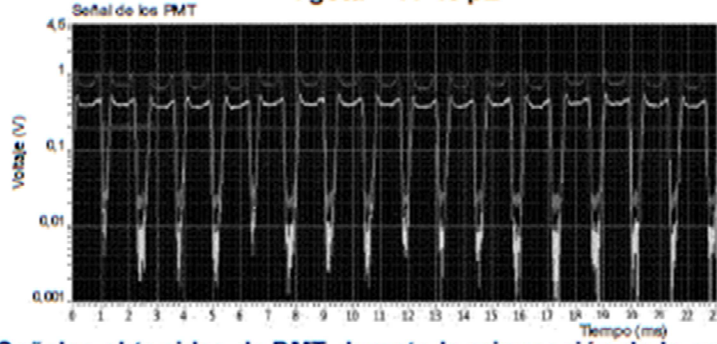
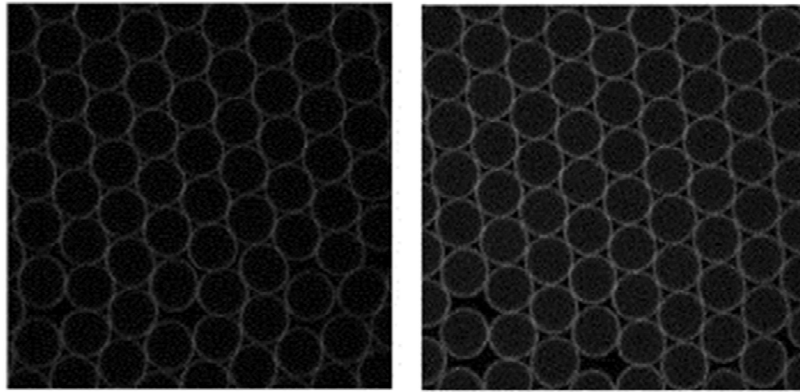


Figura 7

Krytox-peg₁₂-azida 14 2,5 % en HFE 7500,
 TAMRA-peg₆-BCN 30 200 nM / sulfoCy5-BCN 32 200 nM
 Vgota = 44-46 pL



Señales obtenidas de PMT durante la reinyección de la emulsión



Microscopía confocal, 20x.

Figura 8

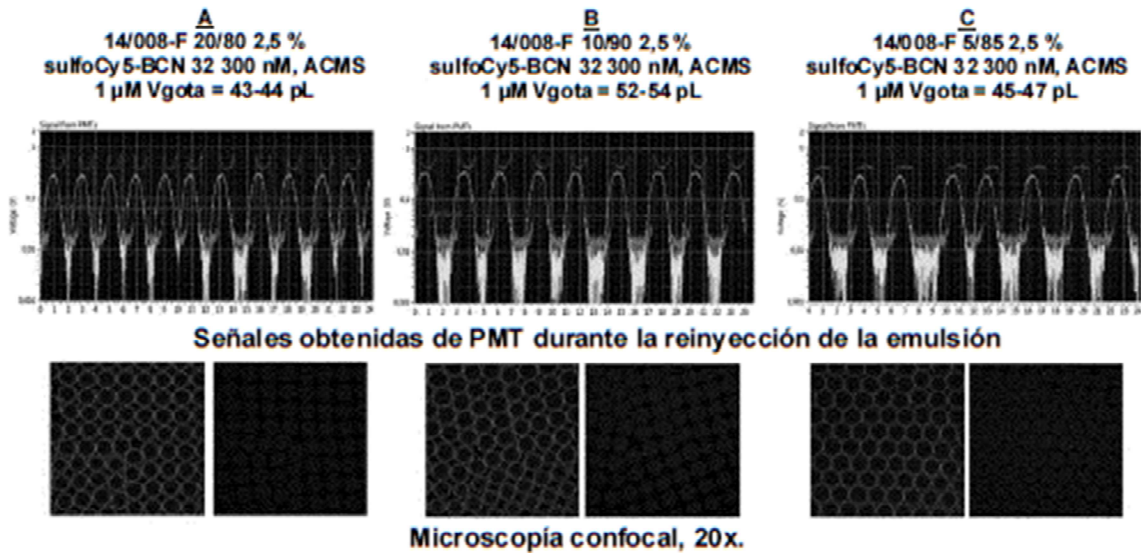


Figura 9

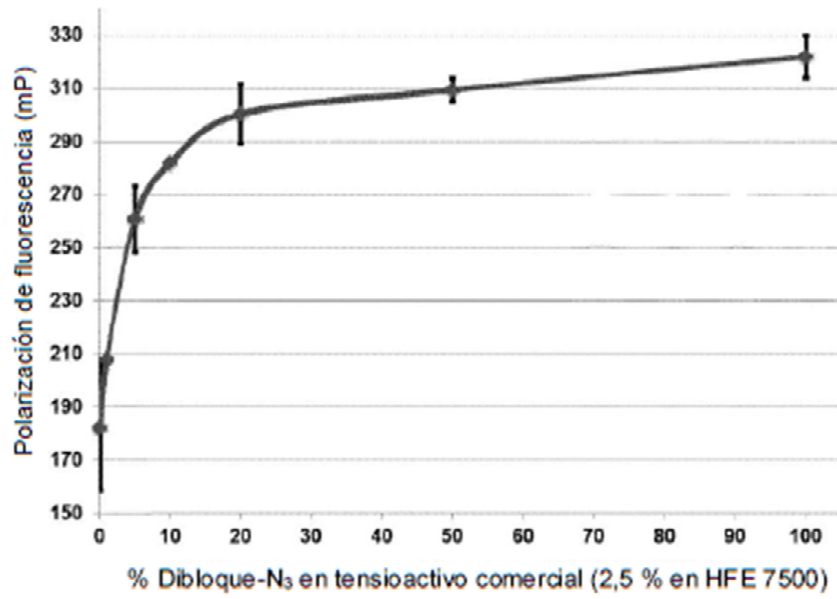


Figura 10

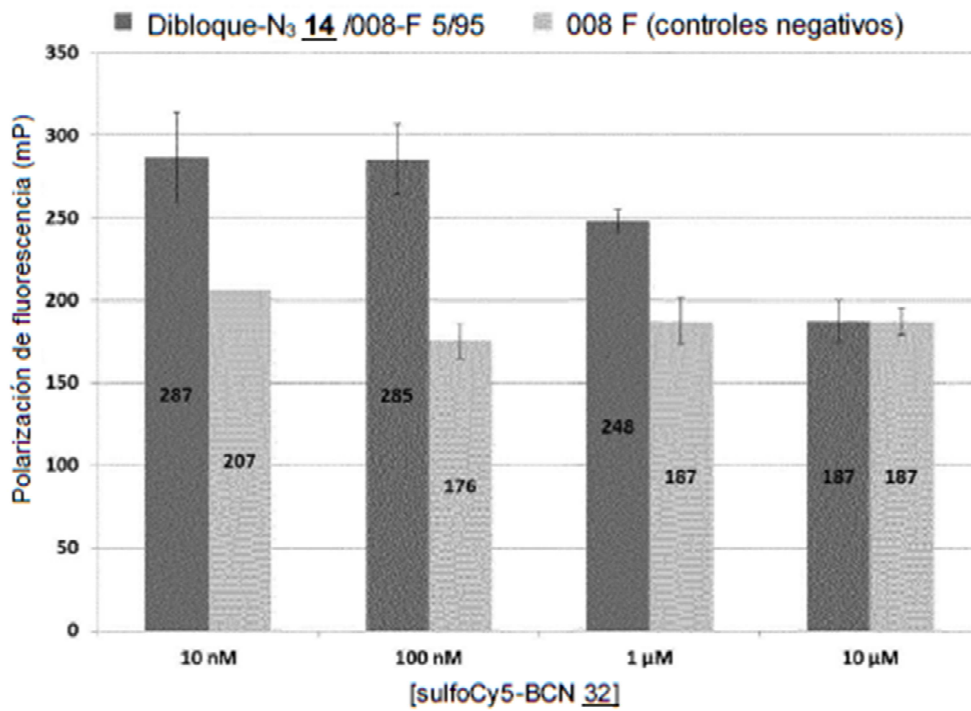


Figura 11

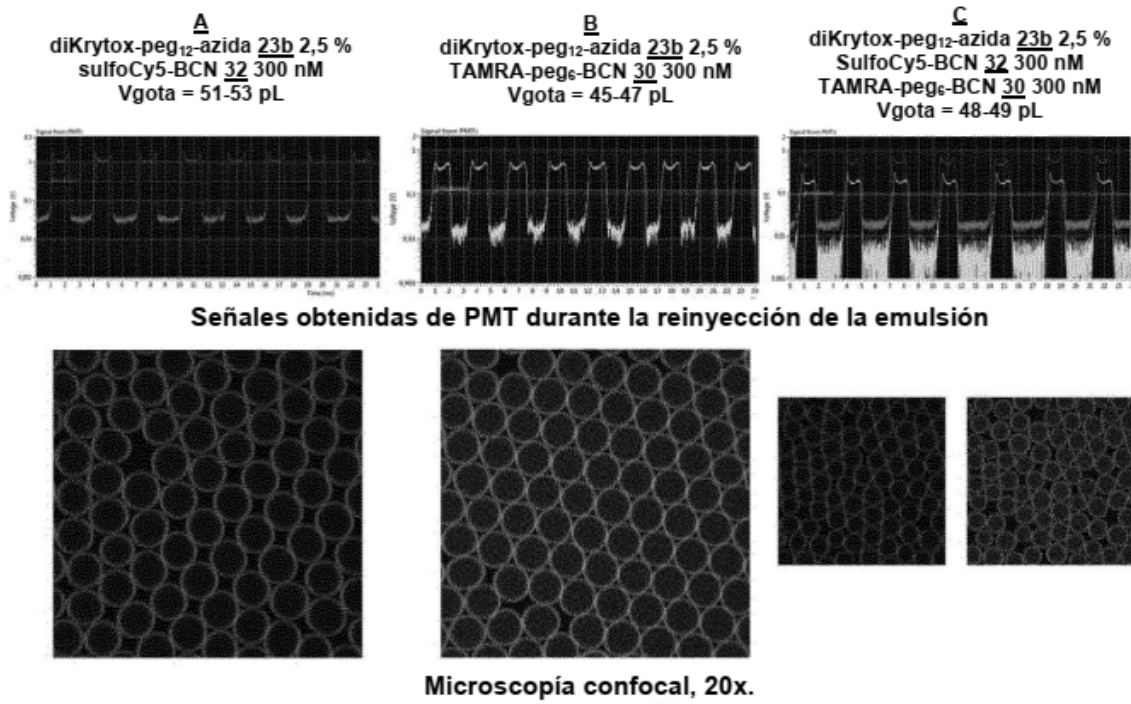


Figura 12

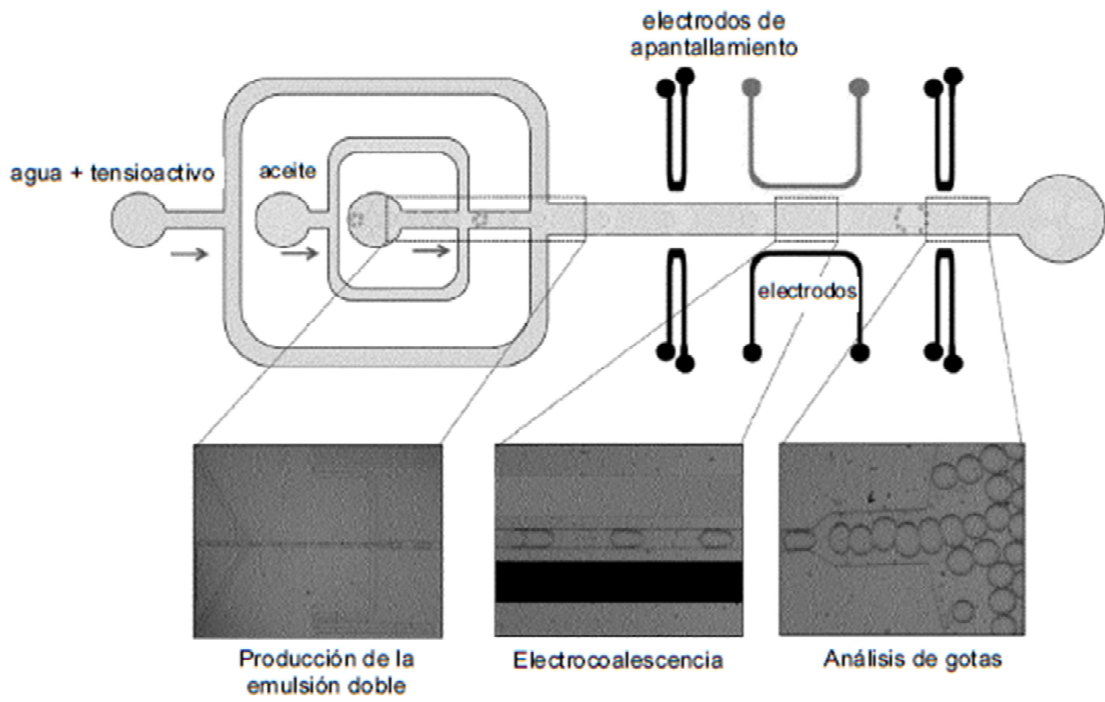


Figura 13

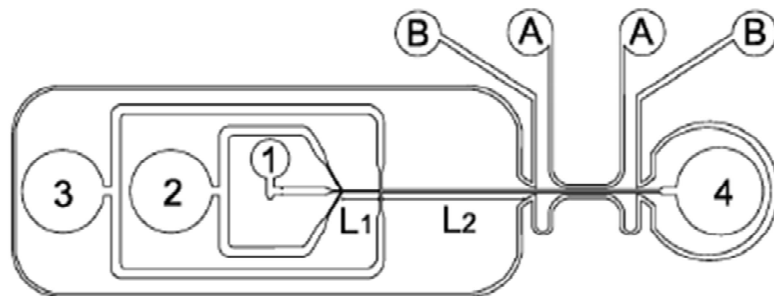


Figura 14

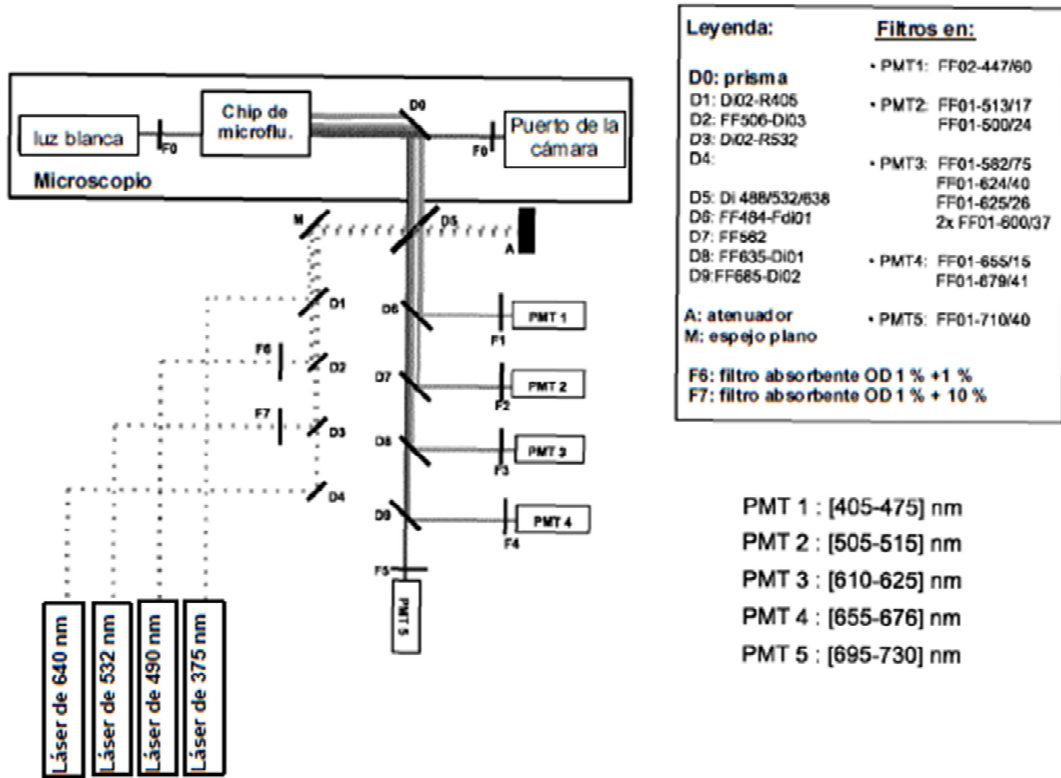


Figura 15

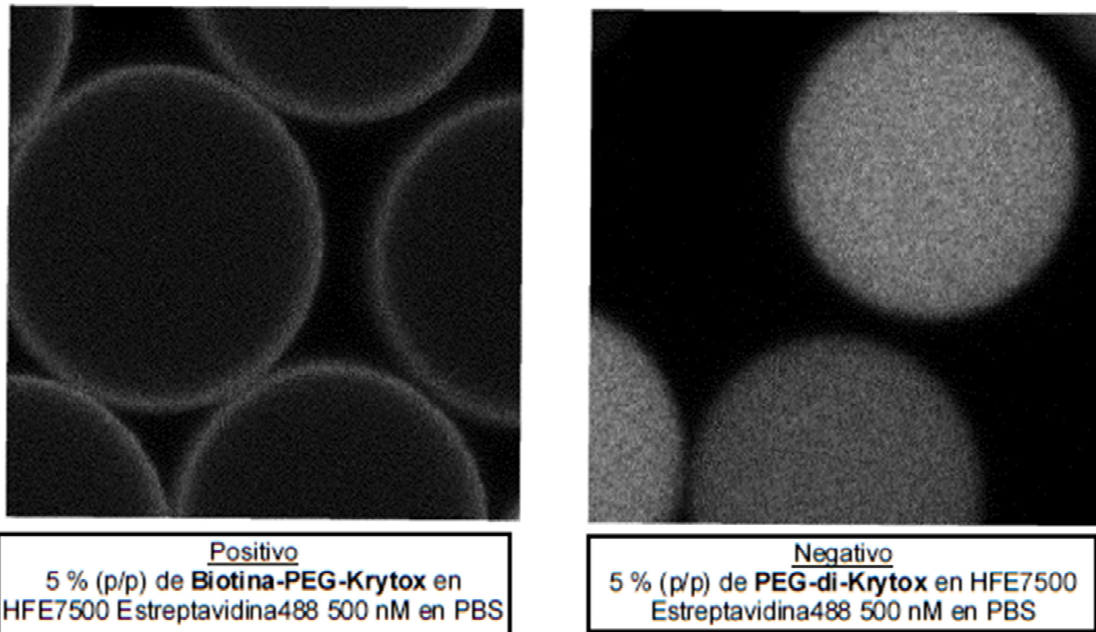


Figura 16

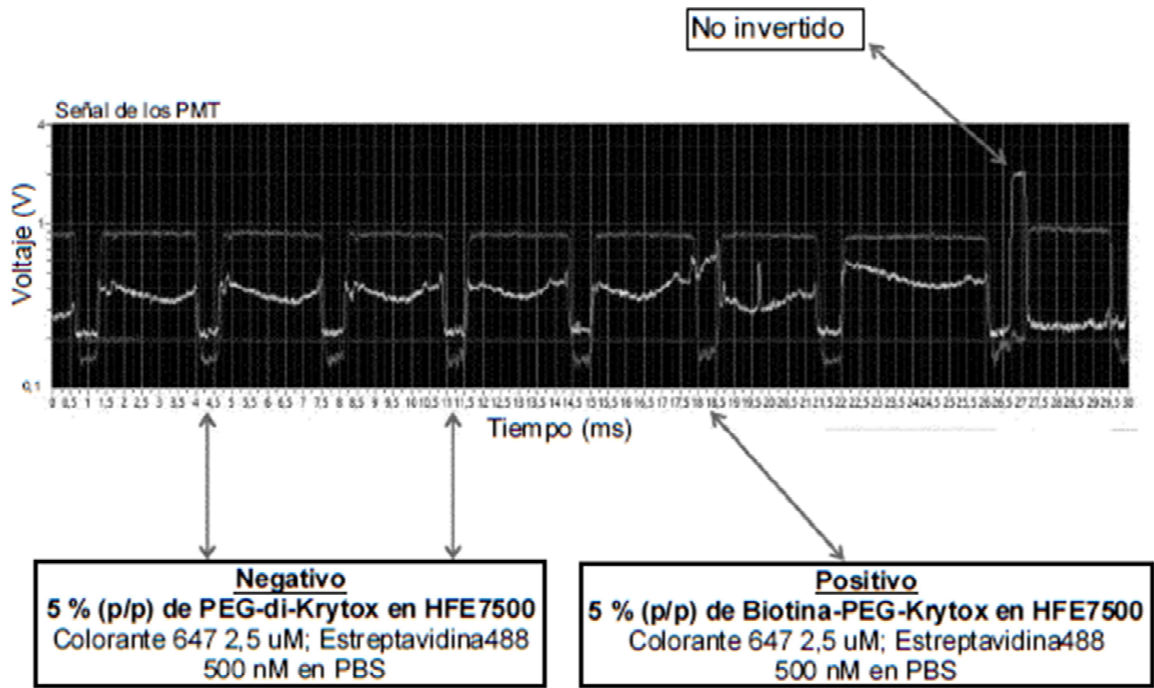


Figura 17

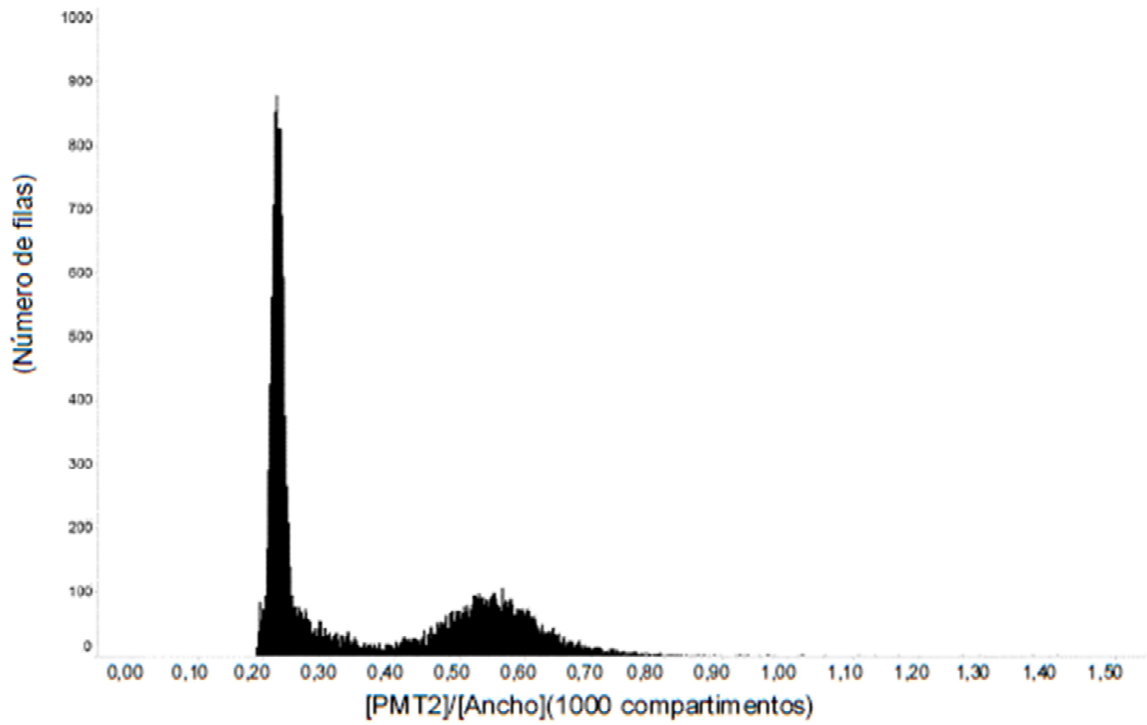


Figura 18

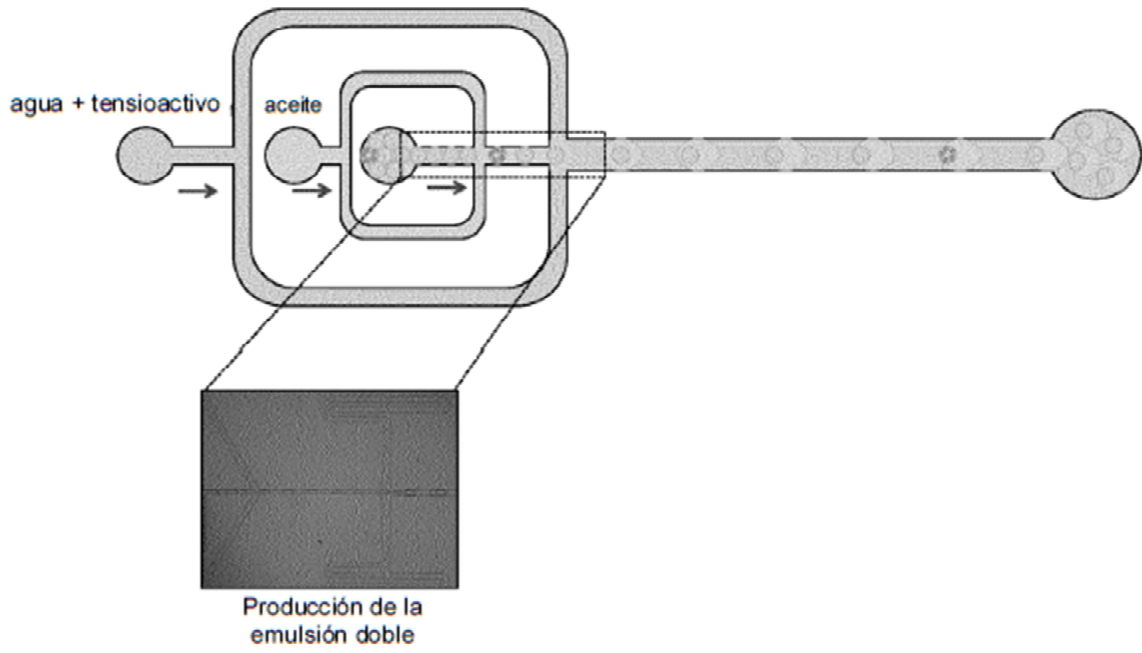


Figura 19



Figura 20

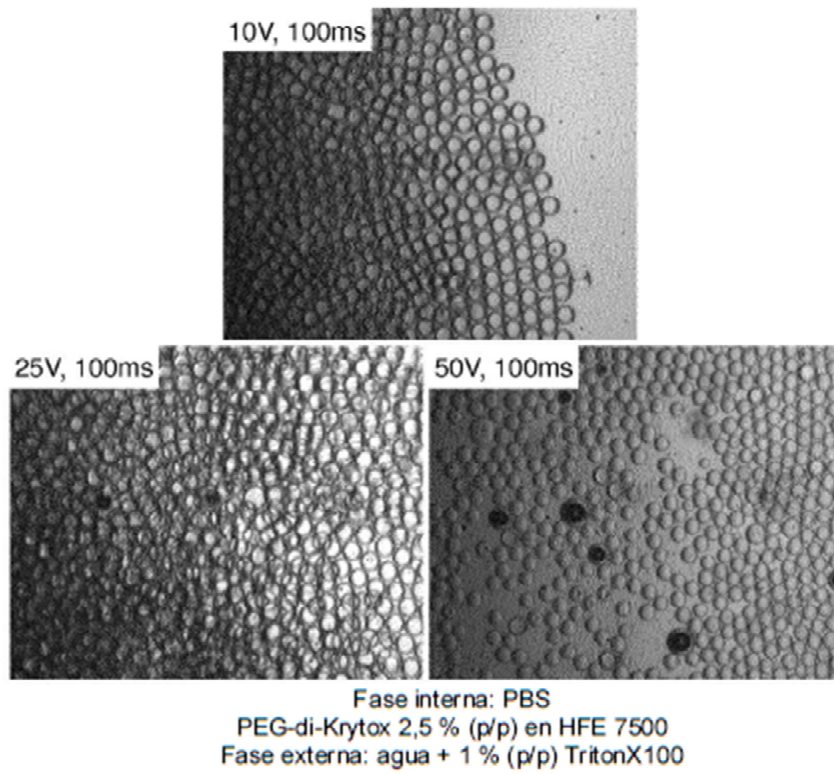


Figura 21

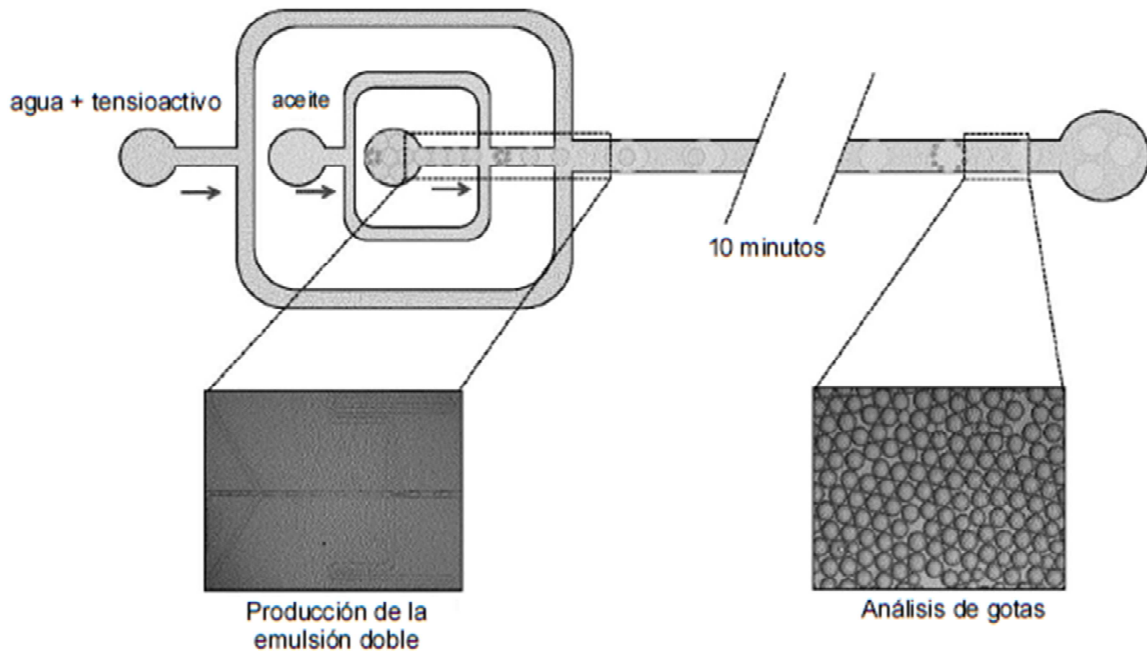


Figura 22

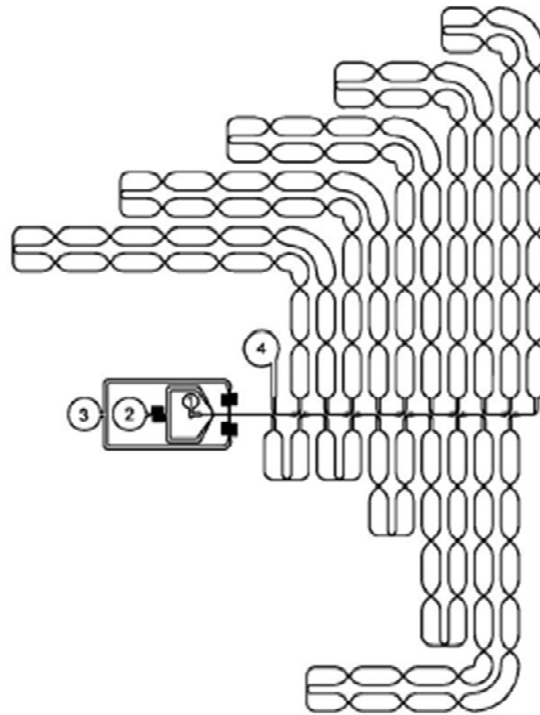
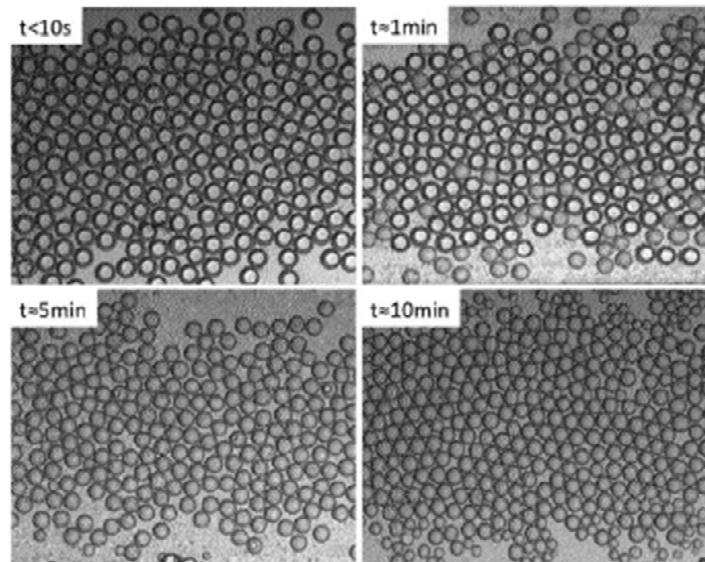
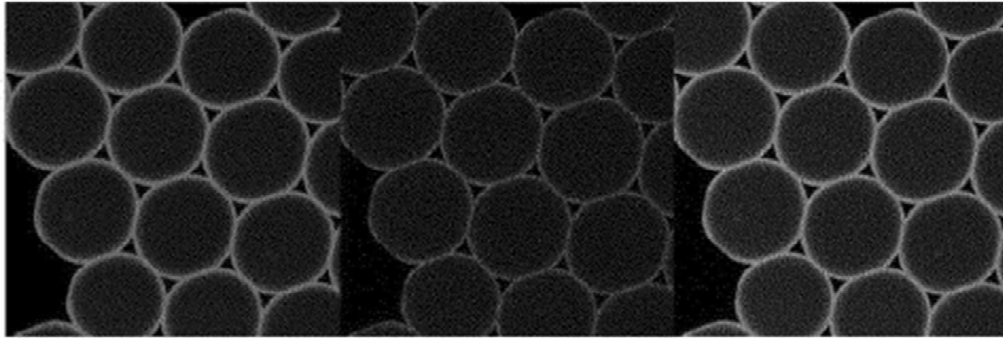


Figura 23

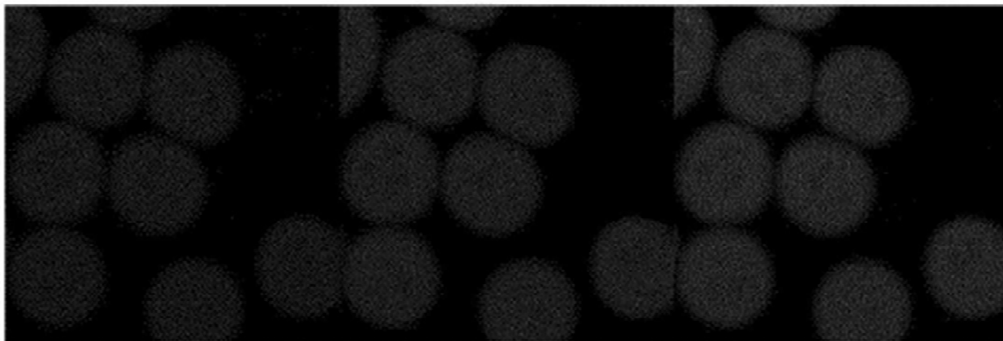


Fase interna: PBS
PEG-di-Krytox 2,5 % (p/p) en HFE 7500
Fase externa: agua + 1 % (p/p) TritonX100

Figura 24

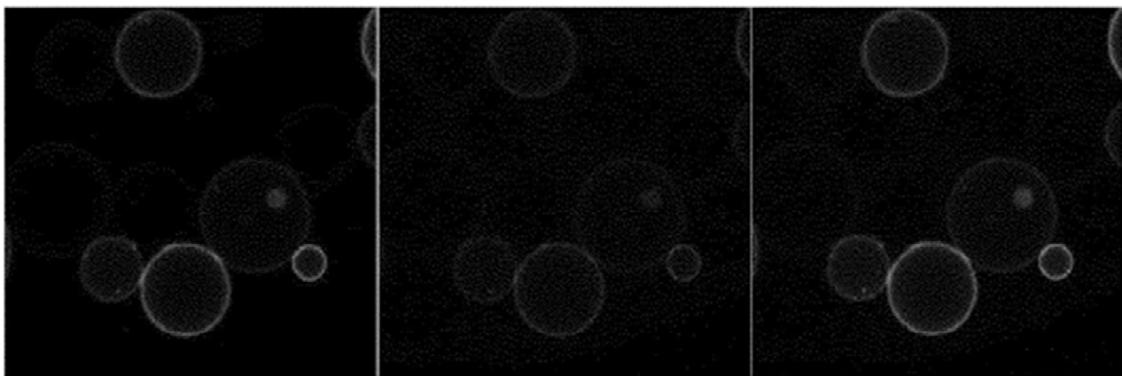


**2,5 % (p/p) de Biotina-PEG-tensioactivo Krytox (GiLa) en HFE7500:
Estreptavidina AlexaFluro532 1 uM; [Biotina]Anticuerpo FITC 100 nM
en PBS; imagen fusionada (derecha)**



**2,5 % (p/p) de tensioactivo PEG-di-Krytox en HFE7500:
Estreptavidina AlexaFluro532 1 uM; [Biotina]Anticuerpo FITC 100 nM
en PBS; imagen fusionada (derecha)**

Figura 25



**2,5 % (p/p) de Biotina-PEG-tensioactivo Krytox (GiLa) en HFE7500:
Estreptavidina AlexaFluro532 1 uM; [Biotina]Anticuerpo FITC 100 nM
en PBS; imagen fusionada (derecha)**

Figura 26

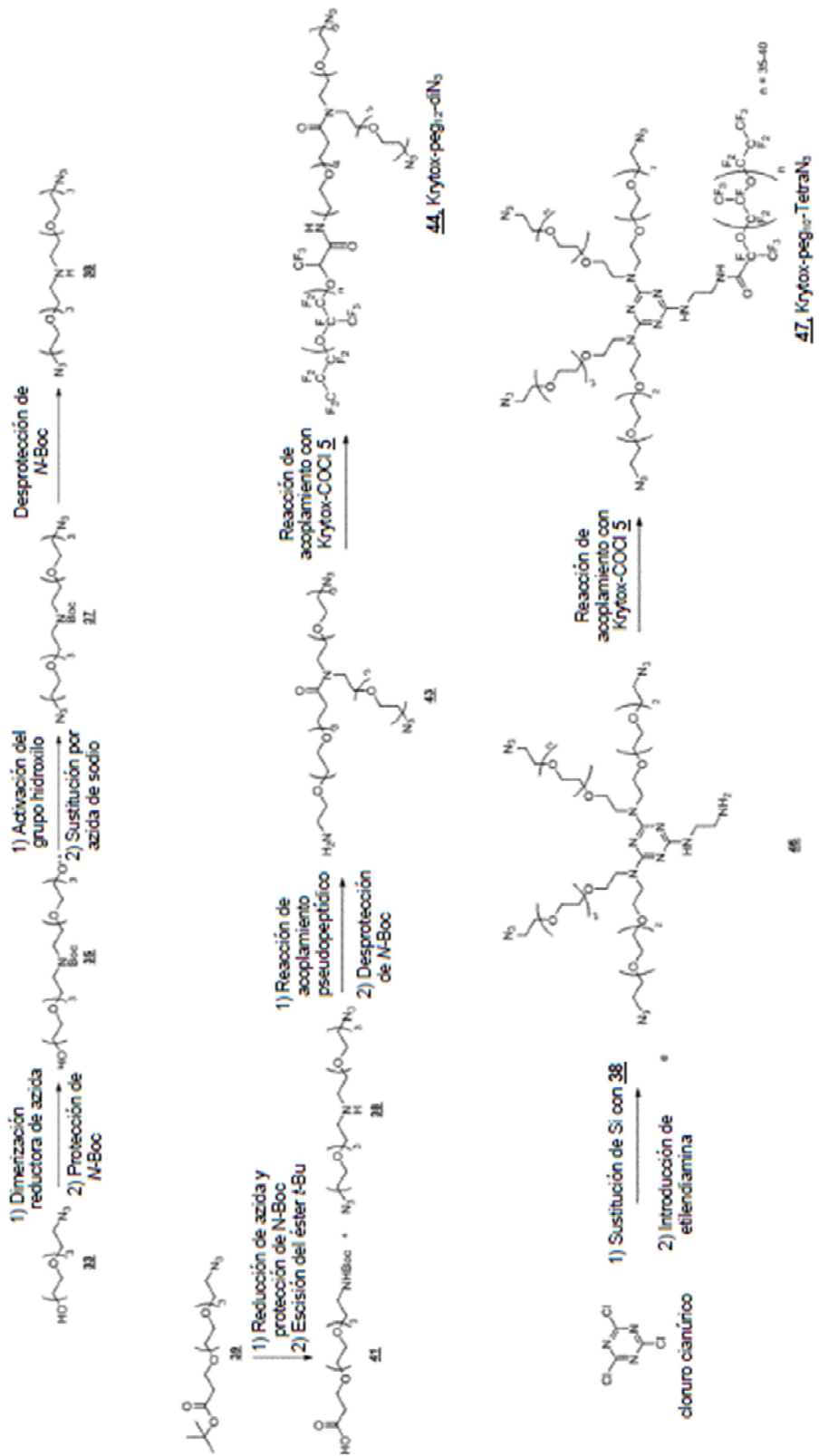


Figura 27

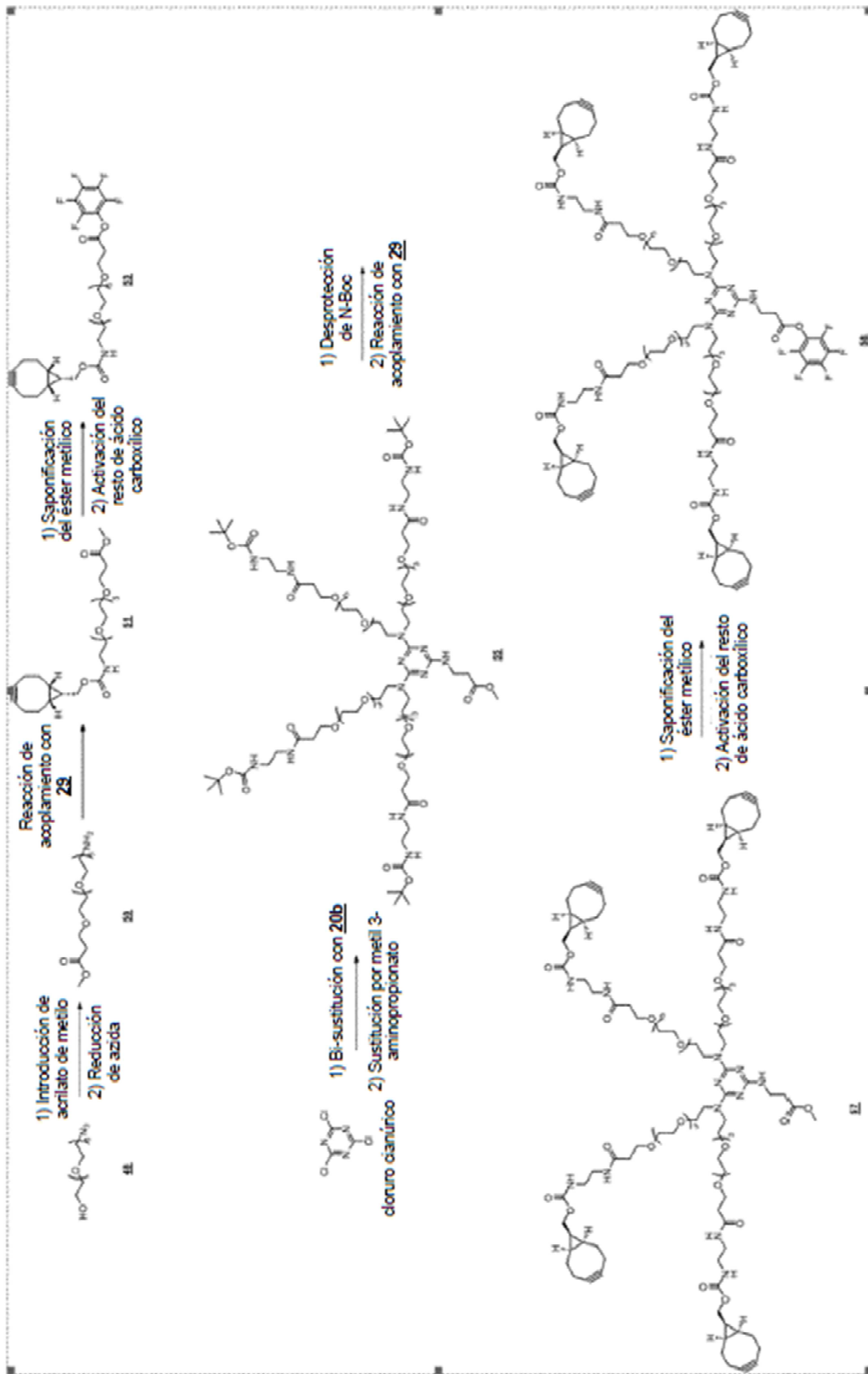


Figura 28

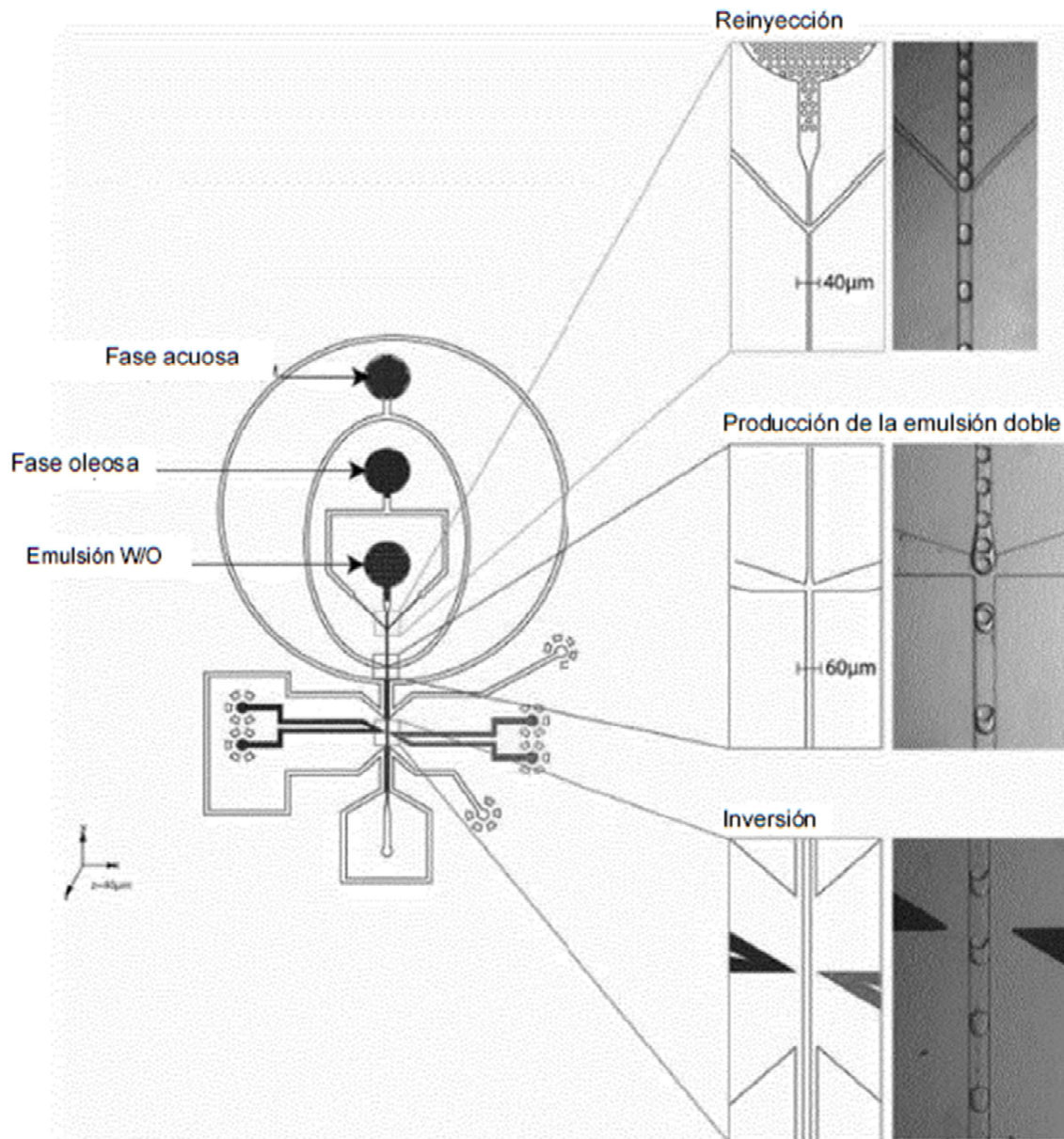


Figura 29

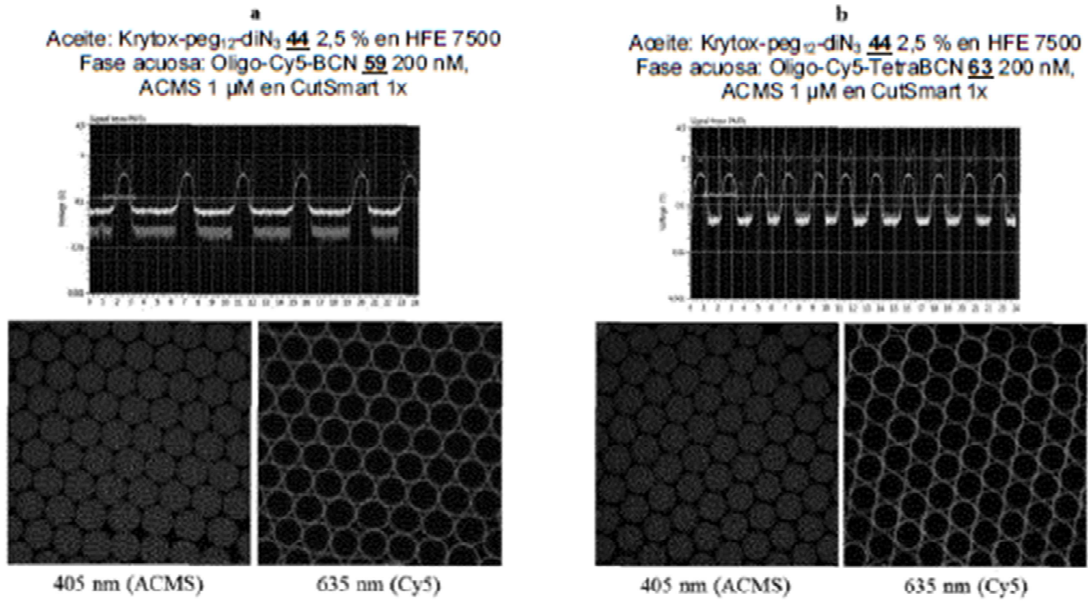


Figura 30

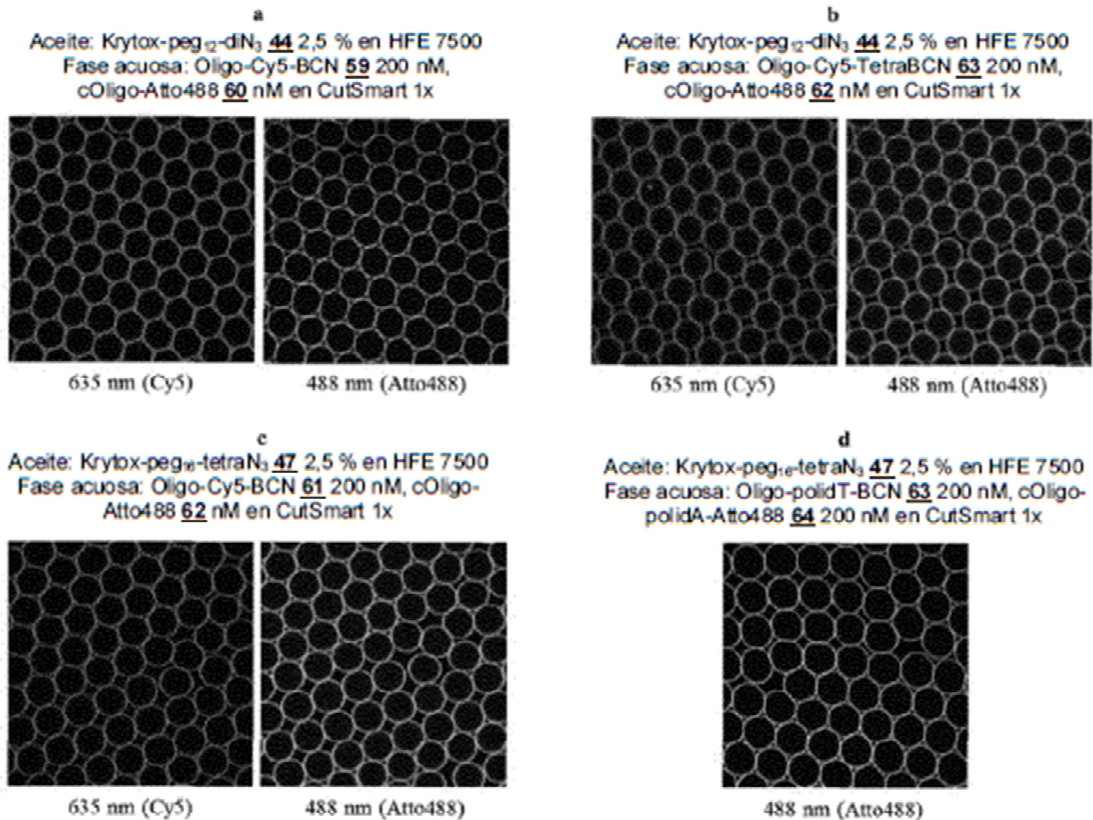


Figura 31

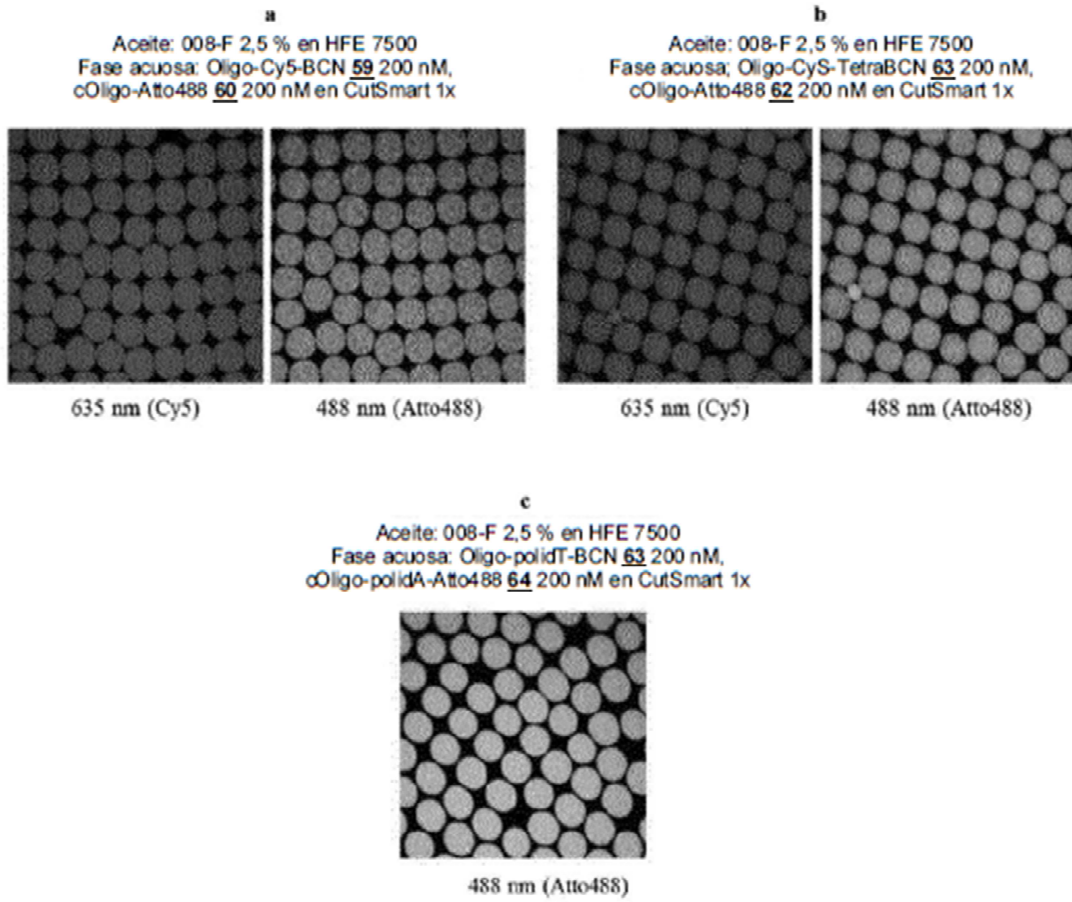


Figura 32

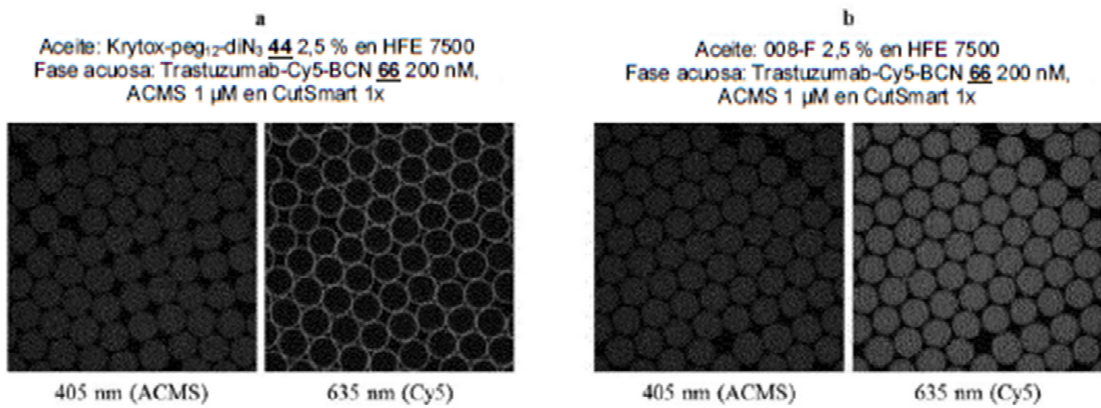


Figura 33

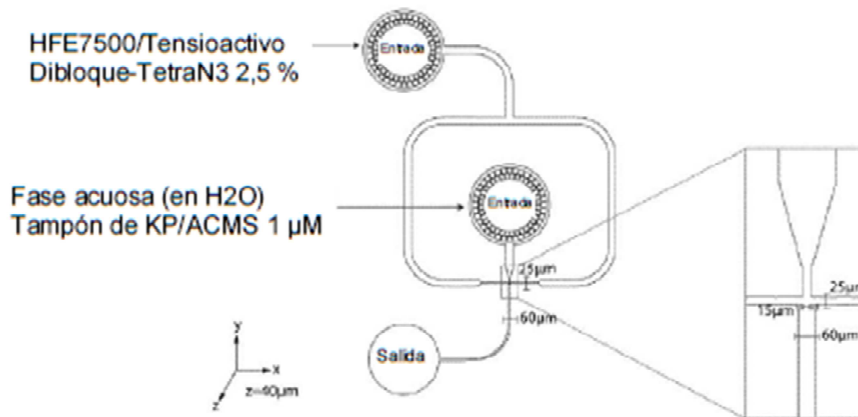


Figura 34

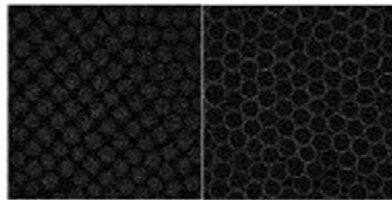


Figura 35

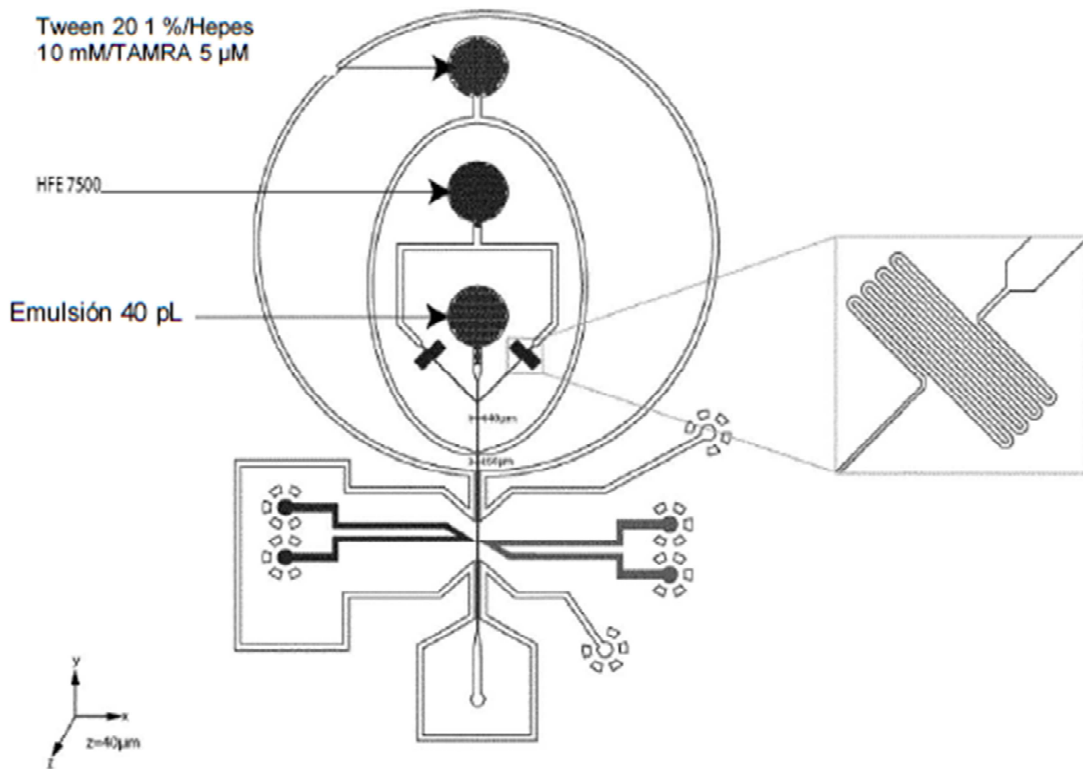
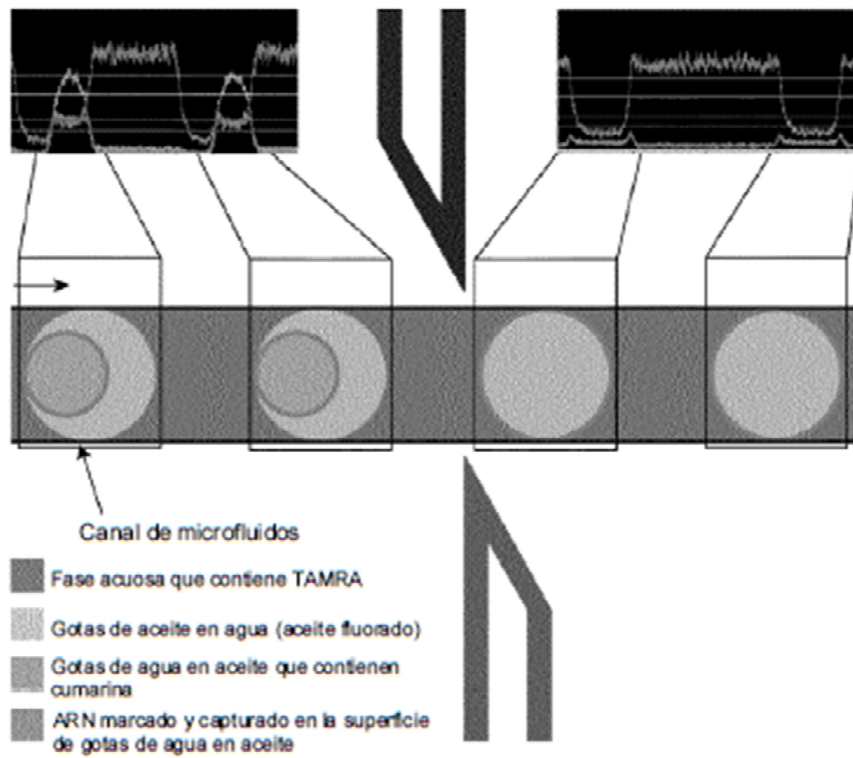


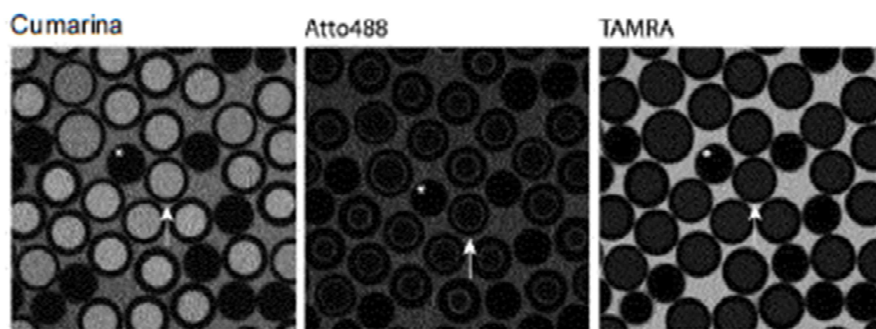
Figura 36

A.



B.

Antes de la inversión



Después de la inversión

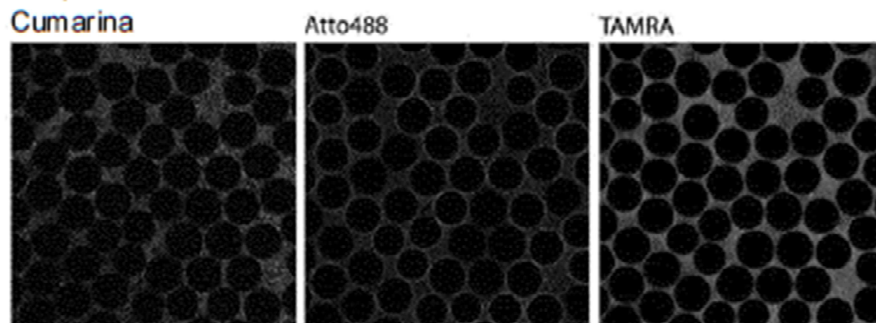


Figura 37