

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2018/224719 A1

(43) Fecha de publicación internacional
13 de diciembre de 2018 (13.12.2018) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:

G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070413

(22) Fecha de presentación internacional:

07 de junio de 2018 (07.06.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201730777 07 de junio de 2017 (07.06.2017) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES];
HOSPITAL REAL., AVDA. DEL HOSPICIO S/N, 18071
GRANADA (ES).

(72) Inventores: **DELGADO GONZÁLEZ, Antonio**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y ORGÁNICA, 18071 Granada (ES). **SÁNCHEZ MARTÍN, Rosario María**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y ORGÁNICA, 18071 Granada (ES). **DÍAZ MOCHÓN, Juan José**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y ORGÁNICA, 18071 Granada (ES). **VALERO GRIÑÁN, María Teresa**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y ORGÁNICA, 18071 Granada (ES). **ORTE GUTIÉRREZ, Ángel**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA, 18071 Granada (ES). **GARCÍA FERNÁNDEZ, Emilio**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA., DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA, 18071 Granada (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: DUAL PROBES FOR FLOW CYTOMETRY AND MASS CYTOMETRY

(54) Título: SONDAS DUALES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO Y CITOMETRÍA DE MASAS

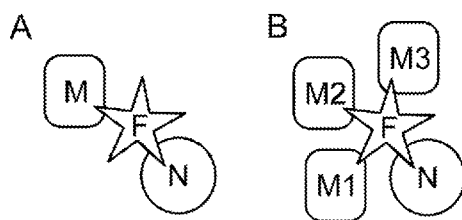


Figura 1

(57) Abstract: The invention describes probes based on fluorescent cross-linked nanoparticles functionalised with metals, which act as dual probes for both flow cytometry (FACS) and mass cytometry (CyTOF). These probes can be used to barcode live cells or to carry out in-vivo studies of different cell lines by means of cell co-cultures.

(57) Resumen: La invención describe sondas basadas en nanopartículas entrecruzadas fluorescentes y funcionalizadas con metales que actúan como sondas duales, sirviendo tanto para la citometría de flujo (FACS) como la citometría de masas (CyTOF). Estas sondas pueden aplicarse para realizar codificación por código de barras de células vivas o para llevar a cabo estudios in vivo de diferentes linajes celulares a través de co-cultivos celulares.



WO 2018/224719 A1

SONDAS DUALES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO Y CITOMETRÍA DE MASAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra en el campo del análisis de la biología celular, dentro del campo del análisis de células y más concretamente en el de las sondas para citometría.

El campo de aplicación de la invención es la citometría, especialmente en el de la citometría de flujo (FACS) y citometría de masas (CyTOF). De forma particular, las sondas que se describen se pueden aplicar para realizar codificación por código de barras de células vivas o para llevar a cabo estudios in vivo de diferentes linajes celulares a través de co-cultivos celulares

ESTADO DE LA TÉCNICA

Citometría de flujo (FACS)

La citometría de flujo (FACS, del inglés "*Fluorescence-activated cell sorting*") es una técnica que se utiliza para enumerar los niveles absolutos de células y sus subconjuntos. Se usa ampliamente para análisis de células sanguíneas y otras muestras clínicas y para identificar bacterias patógenas. La citometría de flujo es una tecnología madura que utiliza la hidrodinámica para enfocar una corriente de partículas alineadas. Se usa la óptica para iluminar una partícula con láser u otras fuentes de luz y detectores para resolver la luz dispersa así como señales fluorescentes. La especificidad para un subconjunto diana de células se logra uniendo marcadores fluorescentes al subconjunto con moléculas de afinidad tales como anticuerpos. El coste típico de un FACS está en el rango de \$ 40,000 a \$ 150,000. Otra clase de citómetros de flujo es el contador Coulter (CC). Al medir la impedancia eléctrica a través de una abertura, el contador Coulter puede medir el recuento de células y el volumen. Los contadores Coulter se usan rutinariamente como analizadores hematológicos para los glóbulos rojos y blancos. Otras aplicaciones incluyen biología celular, análisis de alimentos, cosméticos, metales y biología marina.

Citometría de masas (CyTOF)

La citometría de masas (CyTOF, del inglés "*Cytometry by Time-Of-Flight*") es una técnica novedosa que se desarrolló inicialmente por DVS Sciences que fue adquirida por la empresa Fluidigm.

La citometría de masas es una herramienta analítica que permite, simultáneamente, la detección y cuantificación de docenas de marcadores dentro de una misma partícula y/o célula [Bandura DR et al.: *Mass cytometry: technique for real time single cell multi target immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry*. Anal Chem, 2009, 81:6813-6822] gracias al uso de metales pesados asociados a la detección mediante espectroscopia de masas. Esto le otorga una alta capacidad de multiplexing necesaria hoy día en los laboratorios de investigación biomédicos. Además, permite hacer análisis de células individuales. Esta técnica utiliza metales que aparecen en el periodo 6 de la tabla periódica, normalmente lantánidos, como

marcadores. Estos metales se usan a modo de huella dactilares debido a que son elementos que no se encuentran en las células y sus espectros de masas son fácilmente identificables debido a sus distribuciones isotópicas específicas para cada uno de ellos. Hoy día existen 14 lantánidos comerciales, con 38 isótopos puros y estables que se utilizan para el marcaje de anticuerpos y polímeros para citometría de masas. Actualmente, la mayoría de las aplicaciones de la citometría de masas se basan en el uso anticuerpos conjugados con un isótopo específico de metal estable de masa atómica definida, que actúa como reportero [Illy, N., et al. *Metal-chelating polymers by anionic ring-opening polymerization and their use in quantitative mass cytometry*, Biomacromolecules, 2012, 13(8): 2359-69]. Desde su introducción en el período 2008-2009, los grupos científicos que tienen acceso a esta plataforma han llevado a cabo análisis revolucionarios a nivel de células individuales usando muestras biológicas heterogéneas de una manera nunca antes vista hasta la fecha. Por ejemplo, estos grupos han publicado las respuestas inmunes a fármacos viendo la células hematopoyéticas a nivel de células individuales [Bendall SC et al.: *Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum*. Science, 2011, 332(6030):687-96], han puesto de manifiesto la heterogeneidad fenotípica de la leucemia humana [Amir el-AD et al.: *viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia*, Nature Biotechnology, 2013, 31, 545–552] y han sido capaces de identificar la reprogramación de los reguladores de células madre, descifrando así los primeros pasos que conducen a la adquisición de la pluripotencia de las células adultas [Spitzer MH et al.: *Mass Cytometry: Single Cells, Many Features*. Cell, 2016, 165 (4), 780 – 791]. Estos resultados demuestran la alta especificidad y sensibilidad que ofrece esta nueva herramienta que se basa en citometría de flujo y plasma acoplado inductivamente (ICP) como fuente de ionización que están asociados a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) (MS) - ICP-TOF MS [Liu, R. et al: *Inductively coupled plasma mass spectrometry based immunoassay: A review*. Mass Spectrometry Reviews, 2014, 33, 373–393]. Previo al análisis, las células se marcan con anticuerpos marcados con isótopos de metales pesados y se usan protocolos clásicos para la citometría de flujo estándar. Una vez que se lleva a cabo la incubación, las células son nebulizadas y cada célula individual es detectada por ICP-TOF MS en lugar de la fluorescencia. La creación de un espectro de masas individual por célula permite identificar y cuantificar la composición de isótopos de metales pesados. Esto permite aumentar, de forma muy significativa, la capacidad de multiplexación de los ensayos a nivel de una sola célula y con una alta sensibilidad.

Recientemente, la citometría de masas se ha aplicado para crear imágenes de muestras de tejidos. [WO 2016/090356 A1]

Uso de reactivos con metales para el marcaje celular

Los metales, principales los metales pesados y los lantánidos, asociados a polímeros y anticuerpos son los elementos que se emplean en citometría de masas (CyTOF) como marcadores [Illy, N., et al. Metal-chelating polymers by anionic ring-opening polymerization and their use in quantitative mass cytometry, *Biomacromolecules*, 2012, 13(8): 2359-69]. Existen
5 marcadores que engloban por ejemplo isótopos de paladio (102, 104, 105, 106, 108, 110) molecular unidos a polímeros lineares [Zunder, E. R. et al, *Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm*, *Nature Protocols*, 2015, 10, 316–333], [Behbehani, G. K. et al.: *Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining*. *Cytometry A* 85 (2014):
10 1,011-1,019], [Majonis, D. et al. *Dual-purpose polymer labels for fluorescent and mass cytometric affinity bioassays*. *Biomacromolecules* 14 (2013): 1,503–1,513], que se utilizan sobre células ya fijadas. En el año 2015 se presentaron estos reactivos con el objeto de ser usados como código de barras usando paladio pero con el inconveniente que sólo sirve para células fijadas.

Estos polímeros lineares metalo-fluorescences no son capaces de entrar en las células vivas por
15 lo que deben emplearse sobre células ya fijadas para poder permeabilizarlas y así permitir su entrada dentro de las células, Por tanto, no permiten realizar estudios celulares in vivo ni co-cultivos celulares.

Uso de nanopartículas de poliestireno

Al inicio del desarrollo del citómetro de masas se desarrollaron partículas de poliestireno con
20 metales que se usaron como calibrante del equipo [Abdelrahman Al et al., *Metal-Containing Polystyrene Beads as Standards for Mass Cytometry*, *J Anal At Spectrom.*, 2010, 25(3): 260–268]. Estas nanopartículas compuestas por poliestireno y poliacrilato atrapaban sales metálicas durante el proceso de polimerización por dispersión. Se usan como un calibrante interno para
25 estudios celulares mediante espectroscopia de masas pero no como marcadores celulares per se. Los autores no informan de su citotoxicidad ya que se emplean una vez que las células están fijadas y marcadas con anticuerpos con metales como un calibrante interno del sistema. Recientemente, se han presentado microgeles codificados con lantánidos [Lin W. et al.: *A High-Sensitivity Lanthanide Nanoparticle Reporter for Mass Cytometry: Tests on Microgels as a Proxy*
30 *for Cells*. *Langmuir* 2014; 30(11): 3142–3153]. Estos microgeles compuestos por poli(NIPAm/VCL/MAA) recubren a sales nanocristalinas de lantánidos.

Códigos de barras para la codificación celular

La codificación celular mediante código de barras consiste en el marcaje único y exclusivo de
35 cada línea celular con una combinación de isótopos de metales. El código asignado es específico, como una huella dactilar, comportándose así como un código de barras. De tal forma

que cada combinación de isótopos sólo la lleva un determinado tipo de células, bien sean distintas líneas celulares o células primarias que provienen de distintos pacientes.

Las perspectivas de futuro indican a un uso extendido de CyTOF para la codificación celular por código de barras debido al gran número de marcadores que esta tecnología permite por célula.

- 5 Se conocen pocas referencias que presentan reactivos para llevar a cabo esta codificación mediante fluorescencia (FCB, del inglés “*Fluorescent Cell Barcoding*”) [*Fluorescent Cell Barcoding for Multiplex Flow Cytometry*, CurrProtocCytom. 2011 Jan; CHAPTER: Unit-6.31] y aún menos, solo tres, por citometría de masas (MCB, del inglés “*Mass Cell Barcoding*”) lineales [Zunder, E. R. et al, *Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm*, Nature Protocols, 2015, 10, 316–333], [Behbehani, G. K. et al.: *Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining*. Cytometry A 85 (2014): 1,011-1,019], [Majonis, D. et al. *Dual-purpose polymer labels for fluorescent and mass cytometric affinity bioassays*. Biomacromolecules 14 (2013): 1,503–1,513]. Algunos de los reactivos desarrollados en estas investigaciones se transfirieron al
- 10 mercado y desde 2015 están siendo comercializados por Fluidigm. En particular, hay un polímero lineal que lleva quelado distintos isótopos de paladio que es capaz de ser usado como código de barras para ser leído por citometría de masas. Este reactivo presenta el inconveniente que sólo sirve para células fijadas. Estos códigos de barras engloban isótopos de paladio (102, 104, 105, 106, 108, 110) molecular.
- 20 Por otro lado, existe un polímero lineal, desarrollado por DVS, que unido a anticuerpos se usa para marcar anticuerpos tanto con metales como con fluoróforos, lo que permite leerlo tanto por fluorescencia como por citometría de masas [Majonis, D. et al. *Dual-purpose polymer labels for fluorescent and mass cytometric affinity bioassays*. Biomacromolecules 14 (2013): 1,503–1,513]. Este polímero actúa solamente como enlace entre los metales y el fluoróforo con el anticuerpo.
- 25 Sin embargo, estos polímeros metalo-fluorescentes al ser lineales y no estar en forma de nanopartículas tampoco tienen capacidad de entrar en las células. Además, el polímero se une a un anticuerpo, que a su vez se une a un ligando de superficie de las células, lo que permite el marcaje de distintos tipos celulares, pero al mismo tiempo impide realizar un estudio de linajes celulares distintos puesto que sólo identifican células que presenten un determinado marcador,
- 30 es decir, sólo pueden unirse a las células que posean el ligando elegido. Estos reactivos no se han estudiado en relación a su citotoxicidad ya que se usan en células ya fijadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- En un primer aspecto, la presente invención describe sondas que comprenden nanopartículas
- 35 entrecruzadas fluorescentes y funcionalizadas con metales que son aptas tanto para realizar citometría de flujo (FACS) como citometría de masas (CyTOF).

Estas sondas son atóxicas, entran a las células per se, sin necesidad de fijarlas y permeabilizarlas y su entrada no depende de ningún perfil fenotípico especial, por lo que son útiles para el marcaje de diferentes líneas celulares. Además, es posible emplearlas en células vivas, permitiendo así el posterior co-cultivo celular. Estos co-cultivos son susceptibles de experimentación y, como las nanopartículas se encuentran dentro de las células, se puede hacer codificación celular por código de barras. Además, como son fluorescentes, después de la experimentación se puede realizar la clasificación de células activadas por fluorescencia ("sorted", en inglés) y recoger los linajes celulares que sean de interés para estudios posteriores. A diferencia de las polímeros para CyTOF mencionadas en la sección anterior, estas sondas son capaces de entrar en las células sin necesidad de permeabilizar, no son tóxicas [YusopM. R. et al.; *Palladium-mediated intracellular chemistry*. Nature Chemistry.2011, 3, 239-423], [Unciti-Broceta, A. et al. *Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd0 nanoparticles to perform bioorthogonal organometallic chemistry in living cells*. NatureProtocols. 2012, 7, 1207-1218], y no afectan al proteoma de las células, lo que permite realizar estudios sobre células vivas. Al atravesar las membranas de las células per se, sin necesidad de permeabilización, lo cual implica fijar las células, las sondas que se describen en esta invención permiten realizar co-cultivo de diferentes líneas celulares y ensayos múltiples.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de las sondas objeto de la invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de codificación celular por código de barras (*barcoding*) que emplea las nanopartículas de la invención.

En un cuarto aspecto, la a presente invención se refiere al uso de las sondas de la invención para activar pro-fármacos mediante catálisis citoplasmática de reacciones organometálicas en el interior de células vivas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de dos sondas de la invención en la que una nanopartícula (N) se funcionaliza con un fluoróforo (F) al que se le unen A) un metal (M) o B) varios metales o isótopos metálicos distintos (M1, M2 y M3).

Figura 2. Viabilidad celular (ensayo MTT) de células MDA-MB-231 nanofectadas durante 6 días con sondas fluoro-metálicas expresada como porcentaje de las células no nanofectadas de control.. B) Análisis de captación celular de sondas fluoro-metálico por células MDA-MB-231 a diferentes proporciones por célula, medida por citometría de flujo. C) Diagramas de dispersión

representativos de CyToF del porcentaje de absorción de Pd (0) -Cy5-PEG-NP₅₀₀ con un número creciente de nanopartículas (0, 100 y 1.000 sondas por célula). Intercalante marcado con ¹⁹¹Ir se utilizó para la tinción de núcleos. D) Comparación de las curvas de captación de Pd (0) -Cy5-PEG-NP₅₀₀ por medio de citometría de flujo y CyToF con las mismas células. El análisis ANOVA bidireccional seguido por un test post hoc de Bonferroni no mostró diferencias entre las técnicas. (E) Imagen de microscopía confocal de una célula nanofectada representativa en una relación de 3.000 Pd (0) -Cy5-PEG-NP₅₀₀ / célula. Las flechas apuntan a sondas en el citoplasma celular.

Figura 3. Ejemplo de sistema de codificación dual capaz de codificar hasta 8 líneas celulares distintas empleando 4 combinaciones de isótopos de paladio (¹⁰²Pd, ¹⁰⁵Pd, ¹⁰⁶Pd y ¹⁰⁸Pd) que pueden ser individualizadas por citometría de masas y cada una de ella a su vez con una fluoróforo distinto (Cy3 y Cy5) capaces de ser diferenciados por citometría de flujo.

Figura 4. Esquema de reacción de desprotección fluorogénica de bis-aliloxicarbonil rodamina catalizada por microesferas Pd (0).

Figura 5. Esquema de la reacción provocada sobre profármacos de gemcitabina y 5-FU mediante catálisis organometálica.

Figura 6. Gráficos correspondientes a la emisión de fluorescencia en FACS, canal de APC. A – E: A) NP control, sin Cy5; B) NP-Cy5-¹⁰⁶Pd; C) NP-Cy5-¹¹⁰Pd; D) NP-Cy5-¹⁰⁶Pd -¹¹⁰Pd y E) NP-Cy5-Pd(OAc)₂.

Figura 7. Gráficos correspondientes a la emisión de fluorescencia en FACS, canal de PE. A – E: A) NP control, sin Cy3; B) NP-Cy3-¹⁰⁶Pd ; C) NP-Cy3-¹¹⁰Pd; D) NP-Cy3-¹⁰⁶Pd -¹¹⁰Pd y E) NP-Cy3-Pd(OAc)₂.

Figura 8. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy5-¹⁰⁶Pd. A – C: Señales correspondientes a los isótopos ¹⁰⁶Pd, ¹¹⁰Pd y ¹⁰⁵Pd respectivamente, siendo solamente positivas para ¹⁰⁶Pd. D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ¹⁰⁶Pd, ¹¹⁰Pd y ¹⁰⁵Pd, respectivamente.

Figura 9. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy5-¹¹⁰Pd. A – C: Señales correspondientes a los isótopos ¹⁰⁶Pd, ¹¹⁰Pd y ¹⁰⁵Pd respectivamente, siendo solamente positivas para ¹¹⁰Pd. D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ¹⁰⁶Pd, ¹¹⁰Pd y ¹⁰⁵Pd, respectivamente.

Figura 10. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy5- ^{106}Pd - ^{110}Pd . A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas tanto para ^{106}Pd como para ^{110}Pd . D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

5

Figura 11. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy5-Pd(OAc)₂. A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas para todos ellos. D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

10

Figura 12. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy3- ^{106}Pd . A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas para ^{106}Pd . D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

15

Figura 13. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy3- ^{110}Pd . A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas para ^{110}Pd . D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

20

Figura 14. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy3- ^{106}Pd - ^{110}Pd . A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas para ^{106}Pd y ^{110}Pd . D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

25

Figura 15. Gráficos correspondientes a CyTOF para NP-Cy5-Pd(OAc)₂. A – C: Señales correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd respectivamente, siendo positivas para todos ellos. D – F: Histogramas correspondientes a los isótopos ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd , respectivamente.

30

Figura 16. A – E. Gráficos correspondientes al porcentaje de viabilidad celular en función del número de NPs por célula, tras 96h de incubación.

Figura 17. Gráfico representativo del porcentaje de células MDA-MB-231 positivas en el canal APC después de haber sido incubadas con 5.000 NPs por célula durante 6h. A) y D) Células MDA-MB-231 control, sin incubar con NPs; B) y E) Células MDA-MB-231 incubadas con NPs control; C) y F) Células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{106}Pd y NP-Cy5- ^{110}Pd , respectivamente.

35

Figura 18. Gráficos correspondientes a células MDA-MD-231 en CyTOF. Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Arriba: señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

Figura 19. Gráficos correspondientes a células MDA-MD-231, incubadas con NP-Cy5- ^{106}Pd en CyTOF. Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Arriba: señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

Figura 20. Gráficos correspondientes a células MDA-MD-231, incubadas con NP-Cy5- ^{110}Pd en CyTOF. Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Arriba: señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

Figura 21. Gráficos correspondientes a la mezcla 50%-50% de células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{106}Pd y células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{110}Pd . Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Arriba: señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

Figura 22. Gráficos correspondientes a la mezcla 25%-75% de células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{106}Pd y células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{110}Pd . Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Los dos gráficos de arriba muestran la señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

Figura 23. Gráficos correspondientes a la mezcla 75%-25% de células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{106}Pd y células MDA-MB-231 incubadas con NP-Cy5- ^{110}Pd . Izquierda: señal correspondiente al canal del isótopo ^{106}Pd . Derecha: señal correspondiente al canal del isótopo ^{110}Pd . Arriba: señal de los isótopos de Pd frente al marcador celular Ir. Abajo: señal de los isótopos de Pd frente al "Event Length".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones:

A efectos de la presente invención se considerarán “isótopos” de un metal a otros metales que tienen su mismo número atómico pero distinta masa atómica.

- 5 El término “fluoróforo” se refiere a cualquier compuesto químico fluorescente, usado como colorante, que después de excitarse a una determinada longitud de onda, emite luz a longitudes de ondas mayores. Un ejemplo de fluoróforo son los colorantes de metina o “polimetinas”, compuestos fluorescentes que comprenden un número impar de CH vinculado en una cadena de carbono conjugado en forma de zig-zag. En función de los grupos de átomos situados en el extremo de la cadena de carbono, el colorante de polimetina se divide en diferentes familias como las cianinas o y antocianina.

Así, “codificación celular por código de barras” o “barcoding” (término habitualmente empleado) se refiere a cualquier técnica que comprenda la identificación de distintas líneas celulares a través de una combinación única predefinida de isótopos metálicos y fluoróforos.

El término “polímero” se refiere a cualquier macromolécula formada por uniones covalentes de múltiples unidades de una misma unidad molecular.

- 20 El término “nanofección” comprende cualquier procedimiento de introducción de nanopartículas en células.

El término “multiplexación” (del inglés “*multiplexing*”) está referido a la capacidad para medir, simultáneamente, múltiples analitos en una misma muestra.

- 25 Por “reportero” se entenderá cualquier componente responsable de generar una señal que puede ser detectada posteriormente.

- El concepto “fijación de células” comprende cualquier manipulación de células vivas que tenga por objeto de mantener toda su arquitectura estructural y química inalterada mientras que se inhiben todas sus funciones bioquímicas.

El término “permeabilización de células” comprende cualquier tratamiento mediante el cual se favorezca la entrada de biomoléculas, reactivos o nanopartículas dentro de las células.

- 35 También se entenderá que una sonda, una nanopartícula, un marcador o un reactivo, “entra” en una célula cuando es capaz de atravesar la membrana plasmática e introducirse en el interior de la célula sin necesitar de ningún ligando o receptor específico.

Asimismo, los algunos de los compuestos químicos citados en este documento emplearán las siguientes abreviaturas o nombres comerciales:

HOBt: Hidroxibenzotriazol. Compuesto orgánico derivado de los benzotriazoles que se utiliza en la síntesis de péptidos mediante fase sólida para producir ésteres activados.

Etil(hidroxiimino)cianoacetato, comercializado como OxymaPure®: Reactivo de acoplamiento utilizado en la síntesis de péptidos mediante fase sólida.

DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida. Reactivo de acoplamiento tipo carbodiimida, soluble en disolventes orgánicos, utilizado en la síntesis de péptidos mediante fase sólida.

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidahidrocloreto. Reactivo de acoplamiento tipo carbodiimida, soluble en agua, utilizado en la síntesis de péptidos mediante fase sólida.

DMF: N,N-dimetilformamida. Compuesto orgánico líquido a temperatura ambiente, incoloro, miscible en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos y que se utiliza como disolvente de reacciones químicas.

Finalmente, el término "comprende", que también podrá interpretarse como "consiste en", y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Sondas de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a una sonda de ahora en adelante "sonda de la invención" (Fig. 1, A) que comprende al menos una nanopartícula polimérica entrecruzada y funcionalizada (N), al menos un fluoróforo (F) conjugado con la nanopartícula y al menos un metal (M) quelado al fluoróforo.

Esta caracterización equivale a que la sonda de la invención comprende al menos un metal y al menos un fluoróforo quelante, o bien, a que la sonda de la invención comprende menos un metal, al menos un fluoróforo no quelante y al menos un agente quelante.

La nanopartícula polimérica comprendida en la sonda puede ser invención de poliestireno, 4-aminoestireno, estireno, amino poliestireno, ácido poliláctico (PLA), acidopolilactico-glicolico (PLGA), poli(N-vinilpirrolidona) (PVP), polietilen glicol (PEG), policaprolatona, ácido poliacrílico (PAA), poli metil metacrilato, poliacrilamida, quitosan, gelatina o alginato de sodio, entre otros polímeros. En una realización particular, la nanopartícula comprendida en la sonda de la invención es de poliestireno o 4-aminoestireno.

En otra realización particular, la nanopartícula comprendida en la sonda de la invención está entrecruzada con divinilbenceno (DVB), 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, bis(2-metacriloil)oxietildisulfuro, azobisisobutironitrilo (AIBN), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) o benzoilperoxido (BPO). De forma preferente, esta nanopartícula está entrecruzada con divinilbenceno.

En otra realización particular, la nanopartícula está funcionalizada con grupos amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), maleimida, azida, alquino, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol. Preferentemente la nanopartícula está funcionalizada con grupos amino (animofuncionalizada).

En una realización aún más preferente, la nanopartícula comprendida en la sonda de la invención es de poliestireno, está entrecruzada con divinilbenceno y funcionalizada con grupos amino.

En una realización preferente, la sonda de la invención comprende fluoróforos que a su vez son agentes quelantes, por lo que no necesita la incorporación de agentes adicionales. De esta forma, en la sonda de la invención los iones metálicos se encuentran quelados a los fluoróforos.

No obstante, en otra realización particular, la sonda de la invención comprende al menos un fluoróforo que no es agente quelante junto con al menos un agente quelante como, por ejemplo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), dietilentriamino, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Así, en otra realización preferente, los fluoróforos están funcionalizados con grupos sulfonatos, que actúan como agentes quelantes.

En otra realización particular, los fluoróforos unidos covalentemente a la nanopartícula comprendida en la sonda de la invención son fluoróforos de la familia de los cianinas, una familia sintética de fluoróforos que pertenece al grupo de polimetinas, preferentemente cianinas seleccionadas del conjunto formado por Cy3, Cy5 y Cy7.

En otra realización particular los metales que se encuentran quelados al fluoróforo en la sonda de la invención son isótopos de paladio o de lantánidos, preferentemente isótopos de metales seleccionados del grupo formado por Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu y Pd, más preferentemente Pd.

En una realización particular, la sonda de la invención comprende varios isótopos del mismo metal (Fig. 1, B). En una realización preferente, la sonda comprende varios isótopos de metales seleccionados del grupo formado por Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu y Pd. En una realización más preferente, la sonda de la invención comprende varios isótopos de paladio.

El tamaño de la nanopartícula comprendida en la sonda de la invención está comprendido entre 100 y 2000nm (nanómetros), preferentemente entre 1000 y 2000nm, preferente entre 100 y 300nm más preferentemente entre 400 y 900nm.

5

Las sondas de la invención se han diseñado para el desarrollo de ensayos celulares y sirven como sondas, en adelante tanto en citometría de flujo (FACS) como en citometría de masas (CyTOF).

10 Las sondas presentadas en esta invención permiten el marcaje de células vivas al entrar en las células sin ofrecer ninguna citotoxicidad y sin necesidad de permeabilizar las células, de tal forma, que permite el cultivo prolongado de células marcadas con estos marcadores. Además, estas sondas no son específicas de ningún tipo celular por lo que pueden ser usadas para distintos tipos de linajes celulares permitiendo ser usadas para codificar distintas líneas celulares
15 y su posterior co-cultivo.

Procedimiento de la invención

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de síntesis de sondas de la invención, en adelante *“procedimiento de síntesis de la invención”*.

20

El procedimiento de síntesis de la invención comprende las siguientes etapas:

- Emulsión y polimerización de un material que comprende un monómero conformado por cadenas heterocarbonadas, un agente de entrecruzamiento, un iniciador de la polimerización y un monómero que comprende al menos un grupo amina o
25 carboxílico, preferentemente amina, para obtener una nanopartícula entrecruzada y funcionalizada, y preferentemente aminofuncionalizada.
- Conjugación entre los aminos de la nanopartícula resultante en la fase anterior con los grupos ácidos de fluoróforos mediante reacciones de fase sólida.
- Incorporación de metales mediante quelación de los iones metálicos con los
30 fluoróforos

A continuación se describe con mayor detalle cada una de estas etapas:

Emulsión-polimerización para obtener una nanopartícula entrecruzada y aminofuncionalizada.

35

Esta etapa se basa en el proceso encuentra descrito en [Sanchez-Martin y col., 2005, ChemBioChem, 6, 1341-1345].

Los materiales de partida para el proceso de emulsión-polimerización contienen cadenas heterocarbonadas, (cadenas que contienen principalmente carbono e hidrógeno, pero que también incluyen heteroátomos como nitrógeno, oxígeno o azufre).

5 A modo de ejemplo se puede emplear poliestireno, 4-aminoestireno, estireno, amino poliestireno, ácido poliláctico (PLA), acidopolilactico-glicolico (PLGA), poli(N-vinilpirrolidona) (PVP), polietilen glicol (PEG), policaprolatona, ácido poliacrílico (PAA), poli metil metacrilato, poliacrilamida, chitosan, gelatina o alginato de sodio, entre otros polímeros.

En una realización preferente, se utilizan estireno y 4-aminoestireno como material de partida.

10 Ejemplos de agentes de entrecruzamiento aptos para llevar a cabo el procedimiento de la invención son, divinilbenceno (DVB), 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, bis(2-metacriloil)oxietildisulfuro, azobisisobutironitrilo (AIBN), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) o benzoilperoxido (BPO). De forma preferente, el agente de entrecruzamiento empleado es divinilbenceno (DVB).

15 Tras el proceso de emulsión y polimerización se puede obtener una nanopartícula funcionalizada, es decir, una nanopartícula en la que el extremo final de las cadenas heterocarbonadas que comprenden el polímero que es nuestra nanopartícula, se encuentra funcionalizado.

20 La funcionalización de la nanopartícula se puede realizar con grupos amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), tiol, maleimida, triazina, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol o mediante click-chemistry (incluyendo grupos azida y alquino). En una realización preferente la funcionalización se realiza con grupos amino.

25 En una realización preferente, el procedimiento de la invención consiste en un proceso de emulsión-polimerización usando poliestireno o 4-aminoestireno, usando divinilbenceno (DVB) como agente de entrecruzamiento.

Conjugación entre los aminos de la nanopartícula resultante en la fase anterior con los grupos ácidos de fluoróforos

30 En esta etapa se llevan a cabo reacciones de funcionalización de las nanopartículas con cadenas heterocarbonosas que pueden ser ramificadas, y que de ahora en adelante se llamarán "cadena de carbono", mediante la reacción entre los grupos funcionales ácido, amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), tiol, maleimida, triazina, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol, azida y alquino entre otros, de la cadena de carbono y los grupos funcionales amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), tiol, maleimida, triazina, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol, azida y alquino de las nanopartículas aminofuncionalizadas. La cadena de carbono contiene uno o más grupos adecuados para formar un enlace covalente con las moléculas activas y al mismo tiempo genera un espacio entre la nanopartícula y dichas moléculas. Son cadenas de longitud variable

35

que tienen grupos capaces de formar enlaces covalentes, en particular los grupos ortogonales entre ellos, es decir, que se desprotegen con diferentes procedimientos durante la síntesis. Su presencia mejora la biocompatibilidad y disminuyen las interacciones entre la nanopartícula y las moléculas activas. Ejemplos de tales cadenas incluyen cadenas con un número de carbonos entre 6 y 24; cadenas de glicoles metoxipoliétericos; cadenas de dimetilsuberimidato; cadenas de glicoles polialquílicos, en particular polietilenglicoles, entre las que preferentemente se usa la cadena de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamina (espaciador PEG). La longitud de la cadena también se puede modificar de acuerdo con las necesidades (impedimento estérico de las moléculas que se van a unir, condiciones de reacción, etc.) mediante la adición de más cadenas heterocarbonadas.

En una realización particular, el reactivo de acoplamiento empleado en la reacción de síntesis en fase sólida se selecciona de entre HOBt, DIC, Oxyma Pure® o EDC usando DMF como disolvente.

En una realización preferente los fluoróforos empleados en esta etapa tienen estructura tipo cianinas, más preferentemente cianinas seleccionadas del grupo formado por Cy3, Cy5 y Cy7, y más preferentemente cianinas seleccionadas del grupo formado por Cy3, Cy5 y Cy7 funcionalizadas con grupos sulfonatos. En una realización aún más preferente se hacen reaccionar los fluoróforos Cy3, Cy5 y Cy7 sulfonados (Sulfo-Cy3, Sulfo-Cy5 y sulfo Cy7, respectivamente) a través de sus grupos ácidos carboxílicos previamente activados mediante una funcionalización tipo NHS éster.

A modo de ejemplo, se puede emplear Sulfo-Cy5 con maleimida, amina, ácido carboxílico, azida, tiol, maleimida, alquino y con tetrazina, lo que permitiría usar nanopartículas funcionalizadas con tiol, ácido carboxílico, y también por azida.

Incorporación de metales mediante quelación de los iones metálicos con los fluoróforos

En esta última etapa se incorpora al menos un metal a la sonda mediante quelación de iones metálicos con los fluoróforos.

En el caso en el que los fluoróforos no sean quelantes, se incorporará previamente o posteriormente un agente quelante. En este caso se usa una cadena de carbono ramificada que contenga dos grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes. En particular, los grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes llevan grupos protectores ortogonales. Así, una vez unida la cadena de carbono a la nanopartícula se lleva a cabo el siguiente proceso: (i) desprotección de uno de los grupos funcionales de la cadena de carbono; (ii) conjugación de, o bien el fluoróforo o bien el agente quelante; (iii) desprotección del otro grupo funcional de la

cadena carbonada; (iv) conjugación de, o bien el fluoróforo o bien el agente quelante. Este procedimiento permite el acoplamiento mediante enlaces amida tanto de los fluoróforos de forma directa, como de diferentes cadenas de carbono tales como polietilenglicol o lisina, que actúan de espaciadores entre las cadenas poliméricas y los fluoróforos, por lo que en una realización más preferente, el procedimiento comprende una fase, anterior a la incorporación de los agentes quelantes o de los fluoróforos, que incorpora espaciadores entre los fluoróforos y las cadenas poliméricas. Para ello se hace reaccionar los grupos funcionales ácido de los espaciadores químicos (como polietilenglicol o glicina) con los grupos funcionales amino de las nanopartículas aminofuncionalizadas mediante protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida. La introducción de espaciadores químicos es necesario para la separación del núcleo de la nanopartícula de la biomolécula final que se acopla, para evitar problemas de impedimento estérico, no viéndose comprometida su acoplamiento a la nanopartícula ni el desarrollo de su función química o biológica.

Procedimiento de “barcoding” utilizando las sondas de la invención

Como se ha indicado, las nanopartículas de la invención pueden comprender metales con distinta masa atómica y/o isótopos de un mismo metal de forma que puedan ser detectados mediante citometría de masas y también pueden contener varios fluoróforos, preferentemente fluoróforos consistentes en cianinas funcionalizadas con grupos sulfonatos, más preferentemente cianinas seleccionadas del grupo formado por Cy3, Cy5 y Cy7, funcionalizadas con grupos sulfonatos.

Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de codificación celular por código de barras o barcoding, en adelante “procedimiento de barcoding de la invención” que emplea las nanopartículas de la invención.

Concretamente, el procedimiento de barcoding de la invención permite discriminar distintos tipos celulares en función del tipo de nanopartículas con el que sean nanofectadas debido a la combinación única, predefinida, de un fluoróforo y distintos isótopos de paladio en la misma sonda. Esta combinación única, detectada mediante citometría de masas y citometría de flujo, permite que las sondas actúen como códigos de barras, constituyendo cada combinación de fluoróforo e isótopos de paladio un código diferente al resto. De esta forma se puede hacer una lectura simultánea de distintas líneas celulares.

Capacidad de discriminación de códigos mediante citometría de masas y citometría de flujo.

La capacidad de discriminación de cada código mediante citometría de masas y/o citometría de flujo es necesaria y fundamental para la realización posterior de co-cultivos celulares. Para ello se deberá, después de haber analizado y caracterizado cada serie de sondas codificadas por separado (apartado anterior), incubar cada una de las sondas codificadas (Figura 2) con distintos

tipos de líneas celulares. De esta forma una línea celular determinada tendrá una combinación específica de isótopos y/o fluoróforo que podrán posteriormente ser identificados por la citometría de masas y/o citometría de flujo. Una vez que las células se incuban con las sondas, estas “entran” en las células sin necesidad de ningún ligando o receptor específico y sin producir ningún efecto citotóxico. Una vez marcadas cada línea celular, éstas se co-cultivan en las mismas condiciones y posteriormente se analizan por citometría de masas y/o citometría de flujo.

Otro aspecto consiste en usar una línea única celular que puede ser una línea celular primaria y codificar distintos tratamientos que se lleven a cabo en esa línea celular, de tal forma que las distintas respuestas fenotípicas a los distintos tratamientos puedan ser leídos de forma simultánea.

Liberación de fármacos en el interior de células vivas

En un cuarto aspecto, la a presente invención se refiere al uso de las sondas de la invención para activar pro-fármacos mediante catálisis citoplasmática de reacciones organometálicas en el interior de células vivas.

La capacidad de entrar en células vivas de la sonda de la invención permite introducir un profármaco en el interior de una célula, liberando el fármaco activo mediante un proceso de catálisis organometálica entre el metal de la sonda y el profármaco.

De forma particular, en otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento que comprende la administración de principios activos unidos a la sonda de la invención.

Ejemplos de fármacos modificados que se pueden administrar junto con la sonda de la invención son aquellos cuyos profármacos se activan con metales como fármacos tales como 5-fluoruracilo (5-FU), gemcitabina, cladribina o citarabina.

MODOS DE REALIZACIÓN

1. Síntesis de sondas que comprenden nanopartículas entrecruzadas y aminofuncionalizadas de poliestireno (NPs), fluoróforos tipo cianinas y paladio.

La síntesis de las sondas se realizó siguiendo los siguientes pasos:

Emulsión-polimerización para obtener una nanopartícula entrecruzada y aminofuncionalizada.

- Se llevó a cabo un proceso de emulsión-polimerización de estireno y 4-aminoestireno con un agente de entrecruzamiento para obtener una nanopartícula aminofuncionalizada. Para ello se empleó una solución acuosa de: (i) estireno como monomero principal; (ii) divinilbenzeno (DVB), como agente entrecruzante; (iii) vinilbenzilamina clorhidrato (VBAH) que se usa como el monómero que aporta los grupos aminicos.
- La reacción se llevó a cabo a 80 ° C en atmosfera inerte y usando sulfato de magnesio como agente estabilizante. Pasados 30 minutos desde el inicio de la reacción se añadió el iniciador radicalario hidrosoluble, el 2-diidrocloreuro-2'-azobis- (2-metilpropionamida) (V-50). La reacción se mantuvo durante otras dos horas bajo agitación. De este modo se obtuvieron nanopartículas con diámetros comprendidos entre 100 y 2000 nanómetros.

Conjugación entre los aminos de la nanopartícula resultante en la fase anterior con los grupos ácidos de fluoróforos

Para llevar a cabo la etapa de conjugación entre los grupos aminos de las nanopartículas y los ácidos de los fluoróforos, las nanopartículas se acondicionaron previamente mediante su lavado, tres veces, con dimetilformamida (DMF), a través de ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos). Posteriormente, 75 equivalentes de ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinamico(Fmoc-PEG-OH) o Fmoc-Glicina se disolvieron en 1 mL de DMF junto con 75 equivalente de Oxyma y 75 equivalente de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, la solución se añadió a las nanopartículas secas, se suspendió, y la suspensión se dejó agitando a 60°C y 1.400 rpm durante 2 horas.

Pasadas las 2 horas, las nanopartículas se lavaron con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) para obtener las nanopartículas Fmoc-PEGiladas. La desprotección del grupo protector Fmoc (fluorenilmetoxycarbonilo) se llevó a cabo mediante un tratamiento consistente en tres lavados de 20 minutos con 1 mL de 20% piperidina en DMF. Después del tratamiento con piperidina, se realizaron tres lavados con 1 mL de DMF (13400 rpm, 3 minutos) mediante ciclos de suspensión-centrifugación.

Incorporación de metales mediante quelación de los iones metálicos con los fluoróforos

Para la conjugación del fluoróforo tipo cianina (Cy3, Cy5 o Cy7) a la nanopartícula, y quelación al metal correspondiente (paladio), se utilizó una solución madre de 1 mg/mL del fluoróforo tipo cianina (sulfo-fluoróforo NHS éster) en DMF y una solución 10 mM de acetato de paladio en DMF. Se toma el mismo volumen de solución de fluoróforo que el volumen de nanopartículas con el que se está trabajando (ej. si se trabaja con 50 µL de nanopartículas, se usan 50 µL de solución de fluoróforo), y se le añaden 2 µL de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y se agita. A la mezcla se le añade el mismo volumen de solución de paladio 10 mM en DMF y se vuelve a agitar. La mezcla se añade a las correspondientes nanopartículas con grupos polietilenglicol secas y se suspende. La suspensión se deja en agitación a temperatura ambiente, a 1.400 rpm, durante 14

horas en ausencia de luz. Al día siguiente las sondas se lavan tres veces mediante ciclos de suspensión-centrifugación con DMF (13.400 rpm, 3 minutos) y con metanol (13.400 rpm, 5 minutos). Una vez están acondicionadas las nanopartículas en metanol, se centrifugan, se elimina el sobrenadante, se añade 1 mL de una solución de hidrazina al 10% en metanol para reducir el paladio (II) a paladio (0), y se suspende. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 1.400 rpm, a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Inmediatamente después, se centrifugan las sondas (13.400 rpm, 5 min) y se lavan tres veces con ciclos de suspensión-centrifugación con metanol (13.400 rpm, 5 min) y tres veces con agua (13.400 rpm, 8 min), y finalmente se suspenden en el mismo volumen de agua que el volumen de nanopartículas con el que se empezó a trabajar (ej. 50 μ L).

Caracterización de las sondas.

Con este procedimiento, se sintetizaron dos conjuntos de sondas consistentes en nanopartículas entrecruzadas de poliestireno de 500nm aminofuncionalizadas con un fluoróforo tipo cianina funcionalizado con un grupo sulfonato (Un átomo de azufre que se une a la cadena heterocarbonada central de la cianina y que a su vez va unido a tres átomos de oxígeno) (Sulfo-Cy5 o Sulfo-Cy3) y con tres isótopos de paladio distintos (Pd105, Pd106, Pd108 o Pd102, Pd105, Pd108)

2. Uso como marcadores intracelulares en células vivas.

Como prueba de concepto se evaluó la eficiencia de las sondas sintetizadas como marcadores intracelulares en células vivas. Se realizaron tres evaluaciones de sondas marcadas con una mezcla de isótopos de paladio a la vez que marcadas con el fluoróforo Cy5:

(i) Eficiencia de nanofección, número de nanopartículas/sondas necesarias para alcanzar $\geq 95\%$ de nanofección.

(ii) Biocompatibilidad: Para descartar una posible toxicidad celular del paladio se realizaron estudios de proliferación celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231 durante seis días en contacto con sondas cargadas con paladio control (Fig. 2, A). La ausencia de diferencias significativas demuestra la alta biocompatibilidad de estas sondas y su inocuidad como marcadores en co-cultivo (Fig. 2, A).

(iii) Ensayos de nanofección: Utilizando esta misma línea de cáncer de mama se determinó la eficiencia en la captación de las sondas a diferentes tiempos y concentraciones de sondas mediante citometría de flujo y citometría de masas, validando los resultados de las dos técnicas y su alta reproducibilidad. En ambos casos las células que captan sondas aparecen como positivas (Fig. 2, B-D). c. Número de sondas necesario para conseguir $\geq 95\%$ de Nanofección (MNF $\geq 95\%$) [Unciti-Broceta, JD et al: *Number of Nanoparticles per Cell Through a Spectrophotometric Method – A key parameter to Assess Nanoparticle-based Cellular Assays*.

Scientific Reports, 5 (2015) 10091]. Incrementando progresivamente el número de nanopartículas se consigue saturar el sistema, apareciendo $\geq 95\%$ de células cargadas con nanopartículas duales. Este número de sondas es el necesario para realizar con éxito el marcaje por código de barras de diferentes isótopos de paladio.

5

3.- Codificación Celular por Código de Barras

El experimento base para Codificación Celular por Código de Barras consistió en:

1. Funcionalización con isótopos de paladio y fluoróforos: las sondas (Fig. 3) consistieron en nanopartículas funcionalizadas con un fluoróforo tipo cianina (Sulfo-Cy5 o Sulfo-Cy3) y con una
10 combinación de tres isótopos de paladio distintos seleccionados del grupo ^{102}Pd , ^{105}Pd , ^{106}Pd y ^{108}Pd , con una proporción determinada y conocida. De esta forma obtuvimos diferentes códigos de barras en función de la combinación de fluoróforo e isótopos de paladio que contiene cada sonda. Posteriormente, se llevó a cabo una caracterización mediante citometría de flujo (FACS) y citometría de masas (CyTOF) de cada sonda.
- 15 2. Ensayo celular primario: Sobre un cultivo de células vivas, se añadió al medio un tipo de sonda (código de barra), que fueron internalizadas por las células al cabo de un periodo de tiempo establecido. Pasado ese tiempo, se procedió al análisis de dichas células, comparadas con un control de células con nanopartículas sin funcionalizar y células sin nanopartículas, mediante citometría de flujo (FACS) y citometría de masas (CyTOF).
- 20 3. Ensayo celular secundario: Una vez validada la detección del código de barras correspondiente en las células, se procedió a realizar un análisis de varios códigos de barras en distintos tipos celulares. Para ello, se eligieron 2 códigos de barras diferentes y se añadieron, por separado, cada código a un tipo celular concreto. Posteriormente, ambos cultivos celulares fueron mezclados y analizados por citometría de flujo (FACS) y citometría de masas (CyTOF). Se
25 han sintetizado y caracterizado 8 tipos diferentes de nanopartículas (NP), incluyendo, al menos, un fluoróforo (Cy5 o Cy3) y un isótopo de paladio (^{106}Pd , ^{110}Pd y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -una mezcla de isótopos-): NP-Cy5- ^{106}Pd , NP-Cy5- ^{110}Pd , NP-Cy5- $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, NP-Cy5- ^{106}Pd - ^{110}Pd , NP-Cy3- ^{106}Pd , NP-Cy3- ^{110}Pd , NP-Cy3- $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ y NP-Cy3- ^{106}Pd - ^{110}Pd . En total, 8 códigos de barras.

30 Caracterización mediante citometría de flujo (FACS) y citometría de masas (CyTOF)

Primeramente se llevó a cabo la caracterización mediante citometría de flujo (FACS), debido a la presencia del fluoróforo (Figuras 6 y 7). Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de las nanopartículas mediante citometría de masas (CyTOF) para comprobar la presencia específica del isótopo ^{106}Pd (figuras 8 y 12) y del isótopo ^{110}Pd (figuras 9 y 13), de la mezcla de
35 los isótopos ^{106}Pd y ^{110}Pd (figuras 10 y 14), y de todos los isótopos (se eligieron ^{106}Pd , ^{110}Pd y ^{105}Pd) en el caso de las NPs funcionalizadas con $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (figuras 11 y 15).

Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar la toxicidad de las NPs se realizaron ensayos de viabilidad celular basados en resazurina sódica. Se utilizaron células tumorales MDA-MB-231 incubadas durante 96h, hasta
5 con 40.000 Np por célula, en placas de 96 pocillos, con 3.000 células por pocillo. Los ensayos de viabilidad celular muestran una viabilidad similar entre las NPs metalofluorescentes y las NPs control, sin funcionalizar, demostrando que no son tóxicas (figura 16).

Caracterización de células tumorales MDA-MB-231 nanofectadas con NPs metalofluorescentes

10 Para la nanofección de las células, se realizaron ensayos de uptake celular, con el objetivo de determinar la cantidad óptima de NPs necesarias para obtener una señal adecuada mediante FACS..

Se incubaron las células MDA-MB-231 durante 6h con las NPs metalofluorescentes, a cantidades crecientes de NPs por célula hasta 10.000 NPs/célula, en placas de 24 pocillos, a 50.000
15 células/pocillo. Los resultados muestran que al utilizar 5.000 NPs/célula, las NPs entran en las células tumorales MDA-MB-231 y que son detectables mediante FACS (figura 17).

En cuanto a los ensayos de caracterización mediante CyTOF, se eligió nanofectar las células MDA-MB-231 con 5.000 NPs/célula, durante 3h, en placas de 6 pocillos, con 1.000.000
20 células/pocillo.

Se realizaron 5 experimentos diferentes, por duplicado, de células MDA-MB-231 nanofectadas con NPs metalofluorescentes, utilizando como control células MDA-MB-231 que no habían sido incubadas con nanopartículas (figura 18). Para ello, las células MDA-MB-231 se incubaron con las NPs durante el tiempo establecido, para, posteriormente, realizar un marcaje de los núcleos
25 celulares con Iridio (Ir), siguiendo protocolos ya establecidos por Fluidigm para CyTOF:

1. MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹⁰⁶Pd (figura 19)

2. MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹¹⁰Pd (figura 20)

3. MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹⁰⁶Pd / MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹¹⁰Pd (50%-50%): En este caso, se incubaron las células con cada tipo de NP por separado y, en el momento de
30 preparar el tubo para CyTOF, se mezclaron las células nanofectadas con NP-Cy5-¹⁰⁶Pd y las células nanofectadas con NP-Cy5-¹¹⁰Pd, en una proporción de 50%-50%, hasta alcanzar la misma concentración de células/mL que en los experimentos anteriores (figura 21).

4. MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹⁰⁶Pd / MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹¹⁰Pd (25%-75%): En este caso, se incubaron las células con cada tipo de NP por separado y, en el momento de
35 preparar el tubo para CyTOF, se mezclaron las células nanofectadas con NP-Cy5-¹⁰⁶Pd y las células nanofectadas con NP-Cy5-¹¹⁰Pd, en una proporción de 25%-75%, hasta

alcanzar la misma concentración de células/mL que en los experimentos anteriores (figura 22).

5. MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹⁰⁶Pd / MDA-MB-231 + NP-Cy5-¹¹⁰Pd (75%-25%): En este caso, se incubaron las células con cada tipo de NP por separado y, en el momento de preparar el tubo para CyTOF, se mezclaron las células nanofectadas con NP-Cy5-¹⁰⁶Pd y las células nanofectadas con NP-Cy5-¹¹⁰Pd, en una proporción de 75%-25%, hasta alcanzar la misma concentración de células/mL que en los experimentos anteriores (figura 23).

El análisis de CyTOF se realizó con FlowJo, seleccionando la población celular que contenía las NPs metalofluorescentes. Para la interpretación de los resultados obtenidos de CyTOF, se tuvo en cuenta el porcentaje de señal positiva para cada isótopo de Pd respecto de Iridio y de la longitud del evento ("Event Length"), en los duplicados, obteniendo, por tanto, 4 datos de porcentaje de señal positiva para cada canal. De esta forma, se analizó tanto la población Ir/Pd ++, correspondiente a las NPs presentes en las células, como a la población Event Length/Pd +, que representa "cuentas" de las señales de Pd obtenidas a lo largo del experimento, dentro de la población ¹⁹¹Ir/¹⁹³Ir ++ (células). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 1.

EXPERIMENTO	Canal ¹⁰⁶ Pd	Canal ¹¹⁰ Pd	% ¹⁰⁶ Pd	% ¹¹⁰ Pd
NP-Cy5- ¹⁰⁶ Pd	33.31%	-	100	-
NP-Cy5- ¹¹⁰ Pd	-	15.5%	-	100
50%-50%	18.1%	8.06%	50	52
25%-75%	12.02%	12.8%	36	83
75%-25%	33.5%	4.26%	100	27

Tabla 1.- Resultados del análisis CyTOF para cada canal

- Canal ¹⁰⁶Pd: representa el porcentaje de la población positiva para el isótopo ¹⁰⁶Pd
- Canal ¹¹⁰Pd: representa el porcentaje de la población positiva para el isótopo ¹¹⁰Pd
- % ¹⁰⁶Pd: corresponde al porcentaje que la señal de un experimento determinado representa frente a la señal generada en el canal del isótopo ¹⁰⁶Pd, cuando las células son nanofectadas solo con NP-Cy5-¹⁰⁶Pd.
- % ¹¹⁰Pd: corresponde al porcentaje que la señal de un experimento determinado representa frente a la señal generada en el canal del isótopo ¹¹⁰Pd, cuando las células son nanofectadas solo con NP-Cy5-¹¹⁰Pd.

Se observa como el isótopo ¹¹⁰Pd genera una señal más baja que el isótopo ¹⁰⁶Pd, aproximadamente, la mitad.

Se identifica claramente como la señal de ambos isótopos se disminuye hasta la mitad, cuando se utiliza una mezcla al 50% de células conteniendo las NP-Cy5-¹⁰⁶Pd y las NP-Cy5-¹¹⁰Pd.

Cuando se utiliza una mezcla de 25% de células conteniendo NP-Cy5-¹⁰⁶Pd y un 75% de células conteniendo NP-Cy5-¹¹⁰Pd, se observa como la señal del isótopo ¹⁰⁶Pd cae hasta un 36%,

mientras que la señal del isótopo ^{110}Pd aumenta hasta un 83%. Este descenso de un isótopo y el aumento de señal del otro corresponden a un resultado cualitativo esperado.

Lo mismo ocurre cuando se utiliza una mezcla de 75% de células conteniendo NP-Cy5-Pd ^{106}Pd , y 25% de células conteniendo NP-Cy5-Pd ^{110}Pd , donde se produce un aumento hasta el 100% de la señal para el isótopo ^{106}Pd , y una caída hasta el 27% de la señal del isótopo ^{110}Pd .

Con estos resultados se concluye que:

1) Hemos sido capaces de sintetizar y caracterizar NPs metalofluorescentes con diferentes fluoróforos (Cy5 y Cy3) y con diferentes isótopos de Pd (106, 110, 106+110 y una mezcla de isótopos). Además, cada una de las NPs sintetizadas corresponde a un código específico que puede ser utilizado para codificar células

2) Las NPs metalofluorescentes son incorporadas por las células, comportándose de manera no tóxica.

3) Las NPs metalofluorescentes incorporadas dentro de las células son fácilmente detectables mediante citometría de flujo (FACS) y mediante citometría de masas (CyTOF), comportándose como sondas duales.

4) Hemos conseguido realizar los primeros ensayos de codificación celular mediante citometría de masas, donde la utilización de un código u otro (NP-Cy5- ^{106}Pd y NP-Cy5- ^{110}Pd) o la mezcla en diferentes proporciones de ambos códigos (50%-50%, 25%-75% y 75%-25%) generara señales totalmente diferentes en CyTOF.

4. Ensayos de liberación de fármacos mediante catálisis organometálica.

Se produjeron varias sondas que comprenden Pd (0) como metal y Cy5-PEG-NP $_{500}$ como fluoróforo mediante la reducción in situ de Pd (II) a Pd (0). La síntesis de estas partículas siguió el mismo protocolo para el acoplamiento de sulfo-Cy5 y quelación con Pd (II) descrito en el ejemplo 1.

A continuación, para conseguir que se produzca la organocatálisis, Pd (II) se redujo a Pd (0) mediante la adición de 150 μl de hidrazina al 10% en metanol. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 min. Después se lavaron los NP con tres ciclos de centrifugación en suspensión con metanol (13.400 rpm, 5 min) y agua (13.400 rpm, 8 min), antes de finalmente suspenderse en agua.

La eficacia de la reducción de paladio se evaluó mediante la reacción de desprotección mediada por Pd (0) del compuesto bis-aliloxicarbonil rodamina (Figura 4). Este compuesto no es fluorescente en esa forma mientras que sí lo es cuando se encuentra en contacto con Pd (0).

En el caso de gemcitabina y 5-FU, se comprobó que sus pro-farmacos entraron en contacto con la sonda de paladio, la catálisis organometálica provoca su activación al entrar en contacto con el paladio (Figura 5), lo que permite que se liberen en el interior de la célula.

REIVINDICACIONES

1. Sonda para realizar citometria de flujo y/o citometría de masas que comprende al menos una nanopartícula polimérica entrecruzada y funcionalizada, al menos un fluoróforo conjugado con la nanopartícula y al menos un metal quelado al fluoróforo.
2. Sonda según reivindicación anterior caracterizada por que la nanopartícula es de poliestireno o de 4-aminoestireno.
3. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que la nanopartícula está entrecruzada con divinilbenceno (DVB), 1,4-bis(4-vinilfenoxi)butano, bis(2-metacriloil)oxietildisulfuro, azobisisobutironitrilo (AIBN), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) o benzoilperoxido (BPO), preferente entrecruzada con divinilbenceno.
4. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que la nanopartícula está funcionalizada con grupos amino, carboxilo, tiol, maleimida, tiazina, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol, azida o alquino, preferentemente funcionalizada con grupos amino.
5. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que los fluoróforos que comprende son agentes quelantes.
6. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende al menos un fluoróforos no es un agente quelante junto con al menos un agente quelante.
7. Sonda según reivindicación anterior caracterizada por que los fluoróforos que comprende están funcionalizados con grupos sulfonados.
8. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que los fluoróforos son cianinas, preferentemente cianinas seleccionadas del conjunto formado por Cy3, Cy5 y Cy7.
9. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que los metales que se encuentran quelados al fluoróforo son isótopos de paladio o de lantánidos.
10. Sonda según reivindicación anterior en la que los metales son mezcla de isótopos de metales seleccionados del grupo formado por Pr, Nd, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu y Pd, preferentemente Pd.
11. Sonda según reivindicación anterior en la que los metales son isótopos específicos de metales seleccionados del grupo formado por Pr, Nd, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu y Pd, preferentemente ^{102}Pd , ^{104}Pd , ^{105}Pd , ^{106}Pd , ^{108}Pd , ^{110}Pd .
12. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada por que su tamaño está comprendido entre 100 y 2000nm, preferentemente entre 1000 y 2000nm, preferente entre 100 y 300nm más preferentemente entre 400 y 900nm.
13. Procedimiento para sintetizar sondas según reivindicaciones 1 a 11 que comprende las siguientes etapas:

- Emulsión y polimerización de un material que comprende un monómero conformado por cadenas heterocarbonadas, un agente de entrecruzamiento, un iniciador de la polimerización y un monómero que comprende al menos un grupo está funcionalizada con grupos amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), tiol, maleimida, tiazina, tetrazina, tiol, ciclooctino, alcohol, azida o alquino, preferentemente amina, para obtener una nanopartícula entrecruzada aminofuncionalizada.
 - Conjugación entre los aminos de la nanopartícula resultante en la fase anterior con los grupos ácidos de fluoróforos mediante reacciones de fase sólida.
 - Incorporación de metales mediante quelación de los iones metálicos con los fluoróforos
14. Procedimiento según reivindicación anterior caracterizado por que emplea estireno y 4-aminoestireno como material de partida.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 caracterizado por que el agente de entrecruzamiento empleado divinilbenceno.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 caracterizado por que los fluoróforos empleados son Cy3, Cy5 y Cy7 sulfonados y se conjugan al hacerlos reaccionar a través de sus grupos ácidos carboxílicos previamente activados mediante una funcionalización tipo NHS éster.
- 17.- Procedimiento de codificación celular por código de barras que emplea al menos una de las sondas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 18.- Procedimiento de reacción organometálica citoplasmática que emplea al menos una de las sondas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11

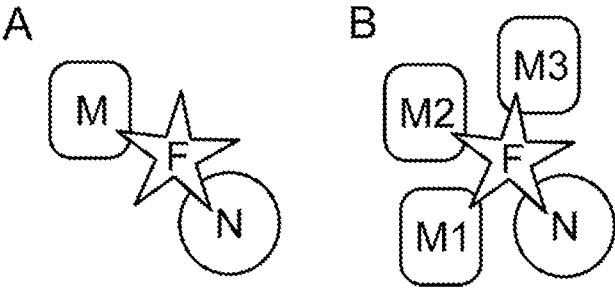


Figura 1

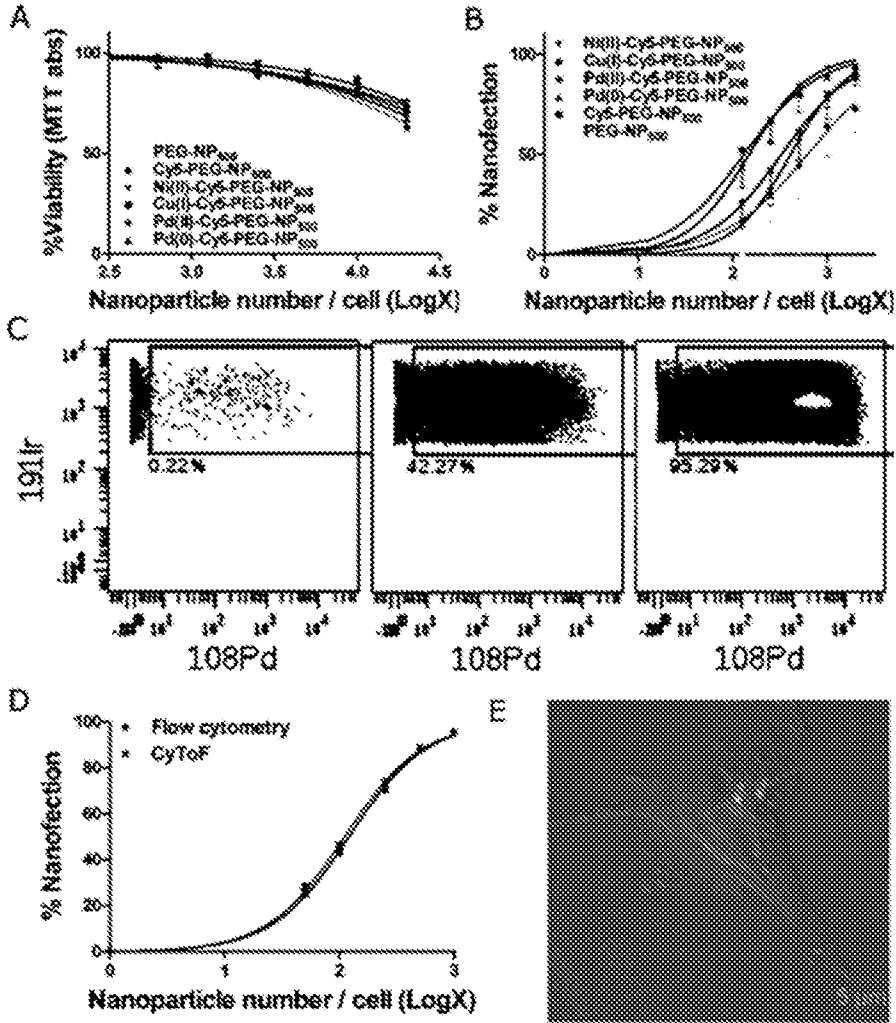


Figura 2

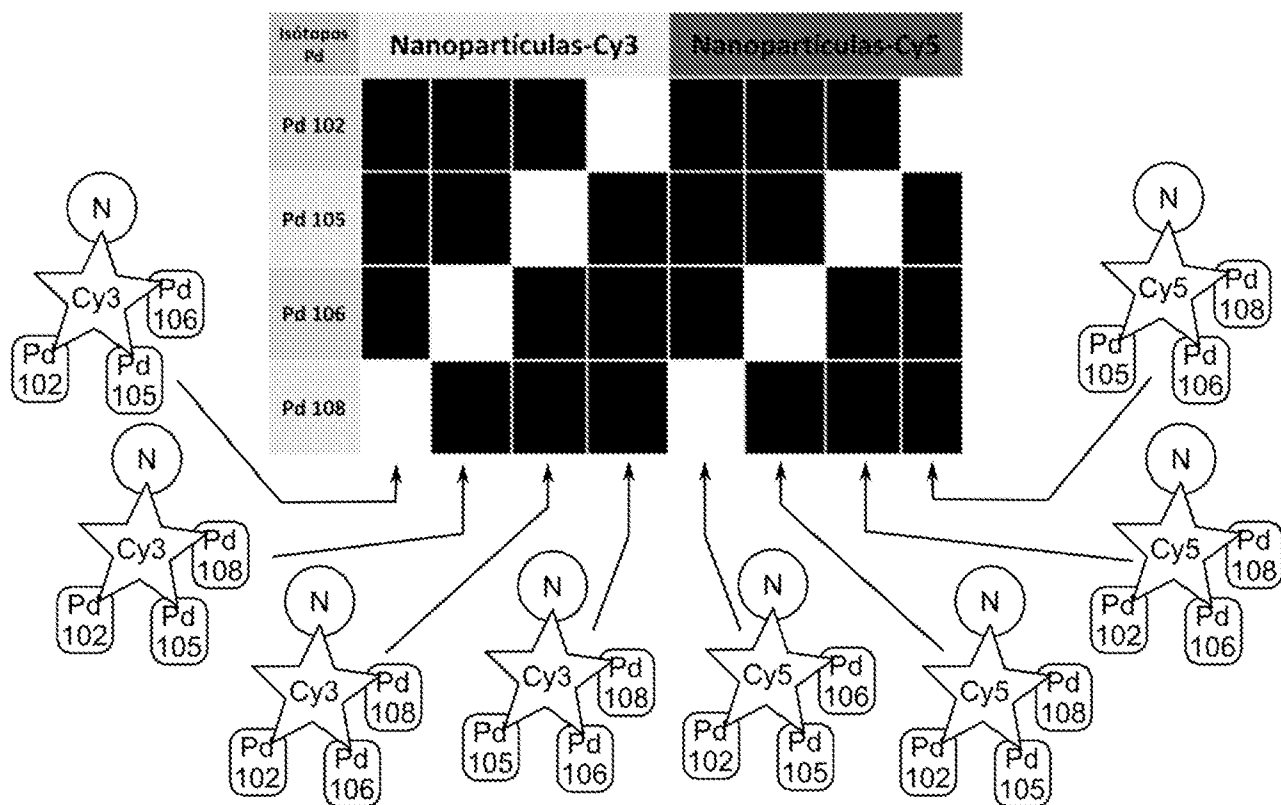


Figura 3

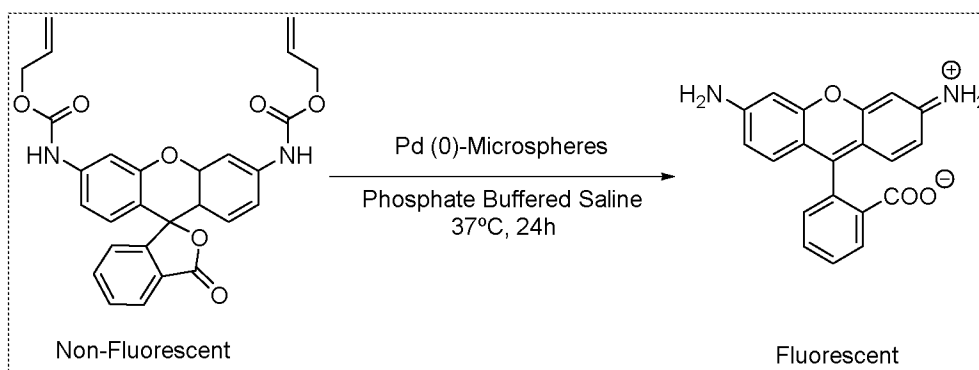


Figura 4

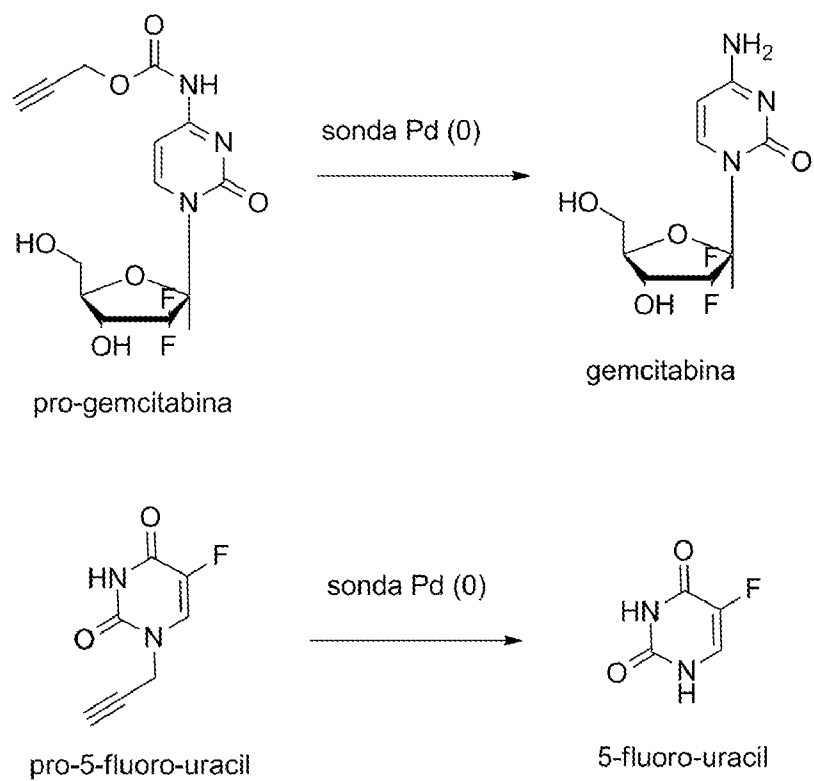


Figura 5

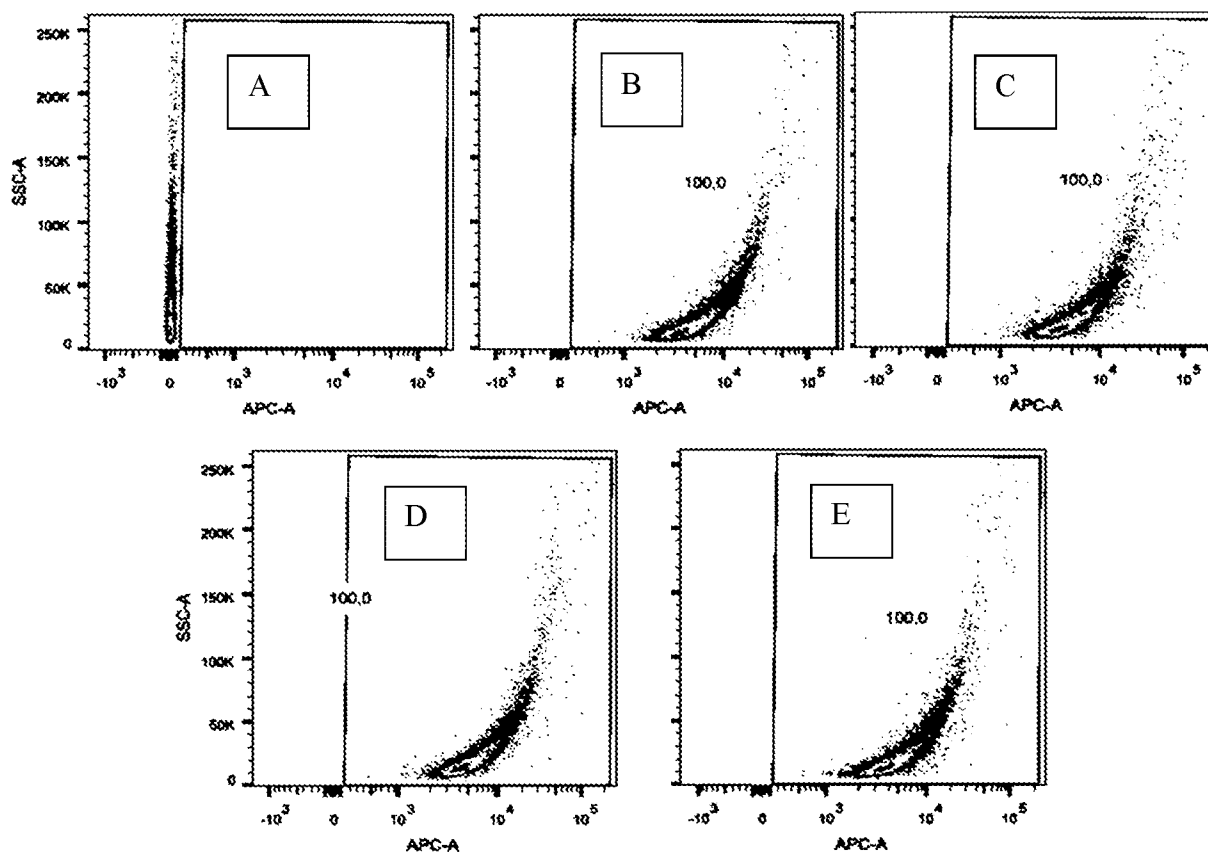


Figura 6

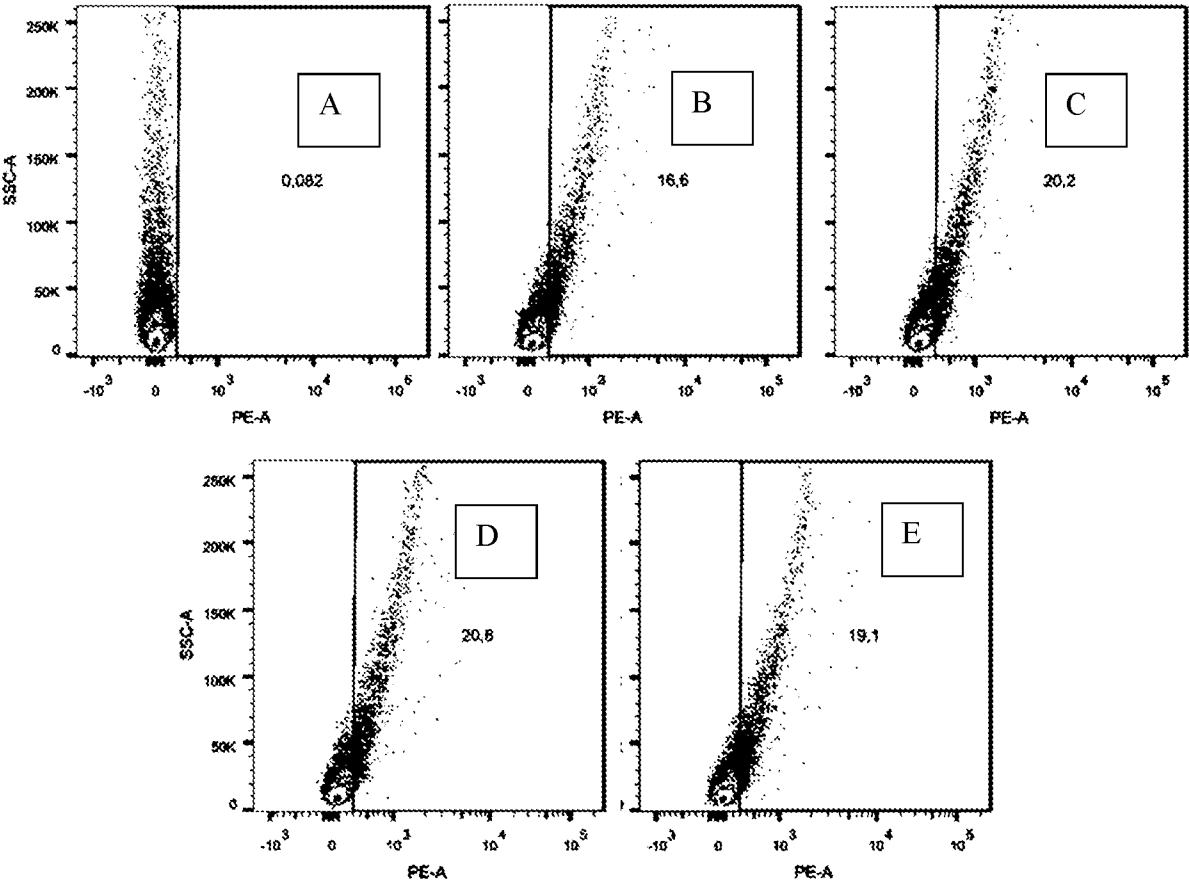


Figura 7

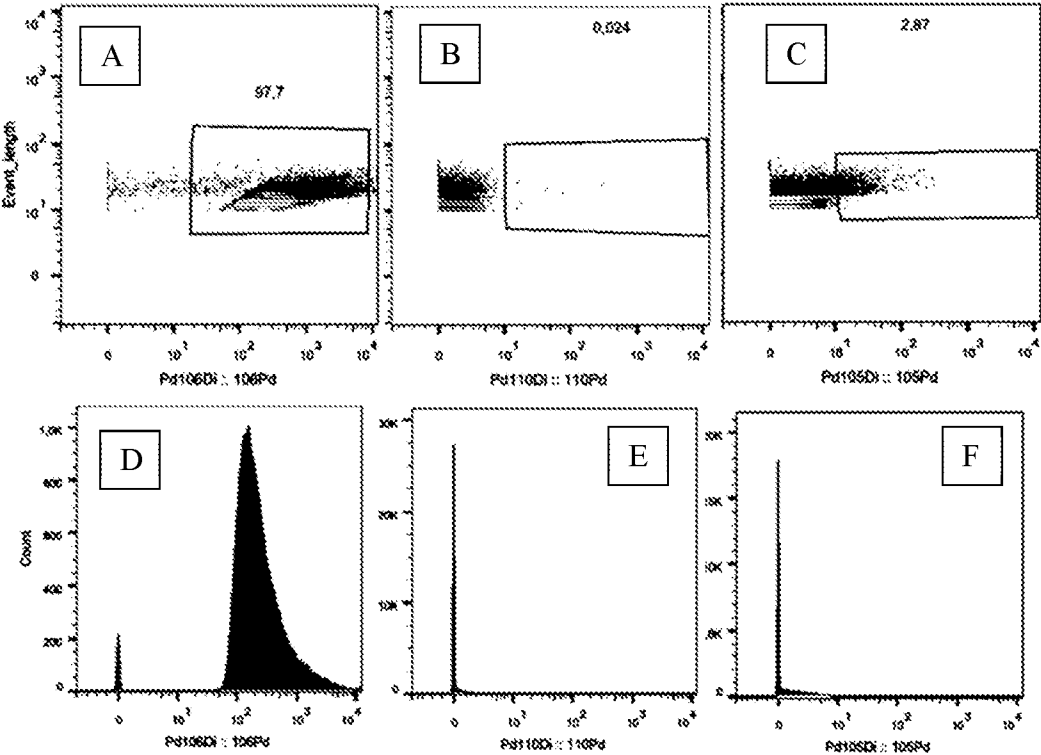


Figura 8

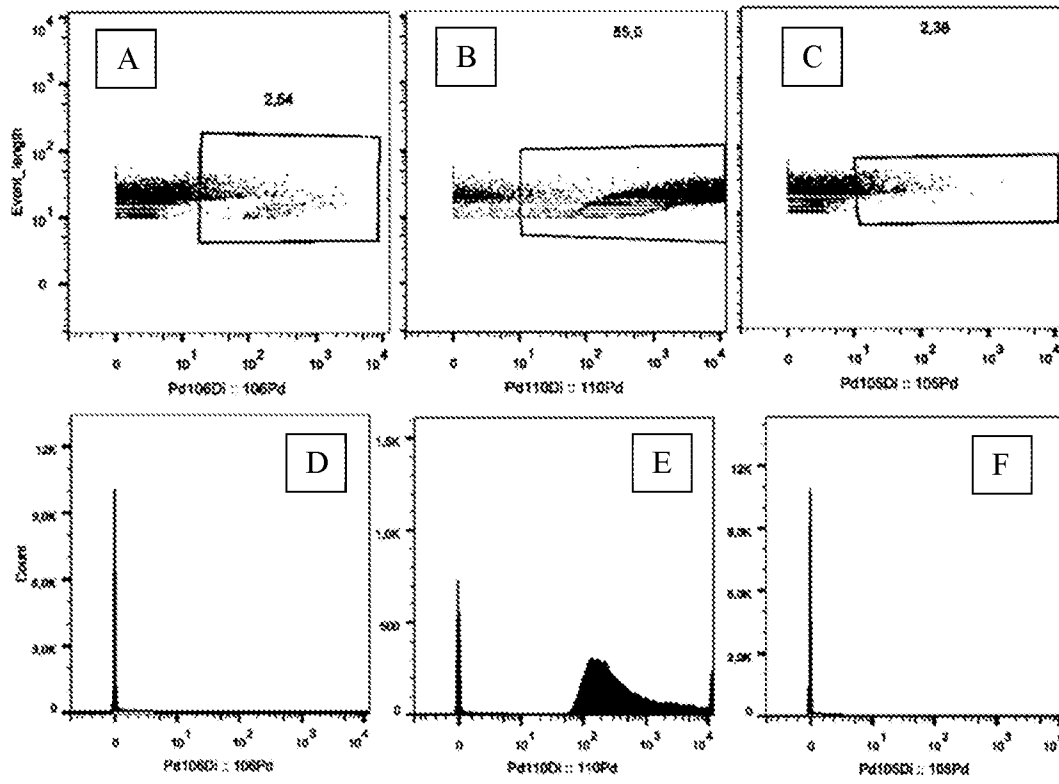


Figure 9

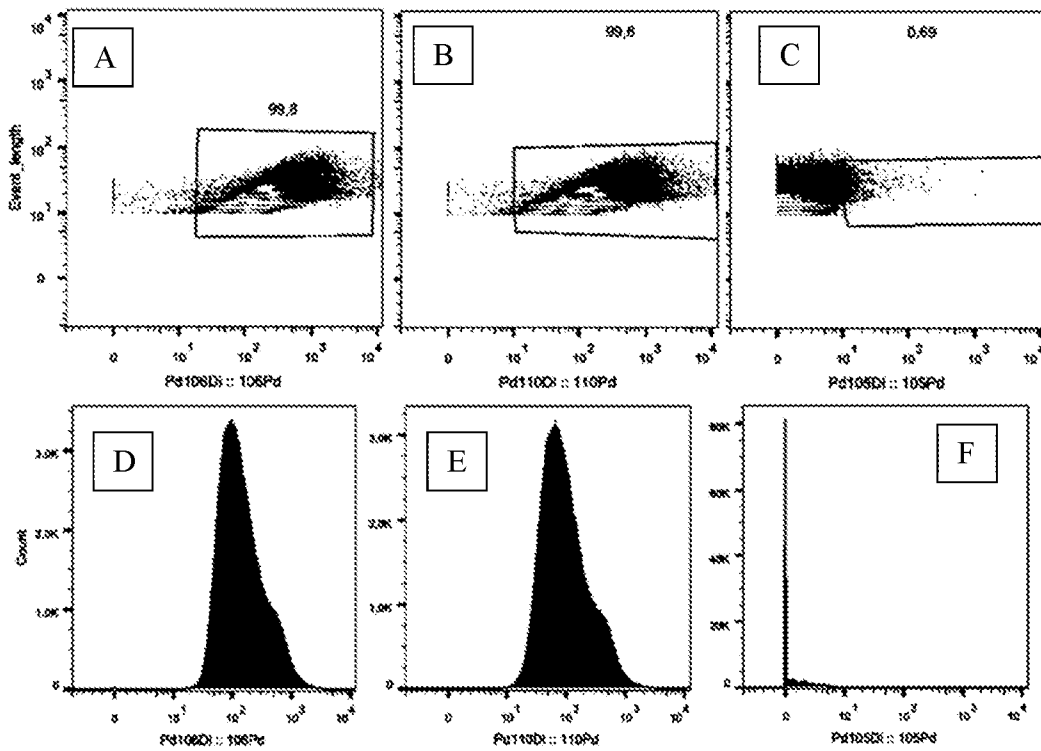


Figure 10

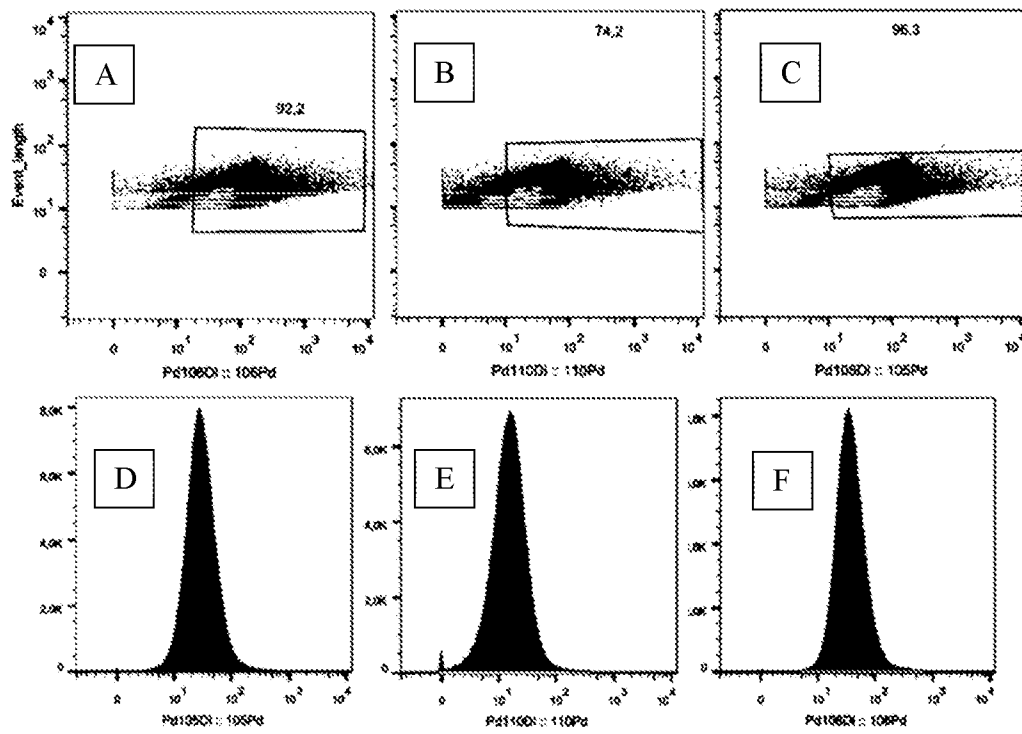


Figura 11

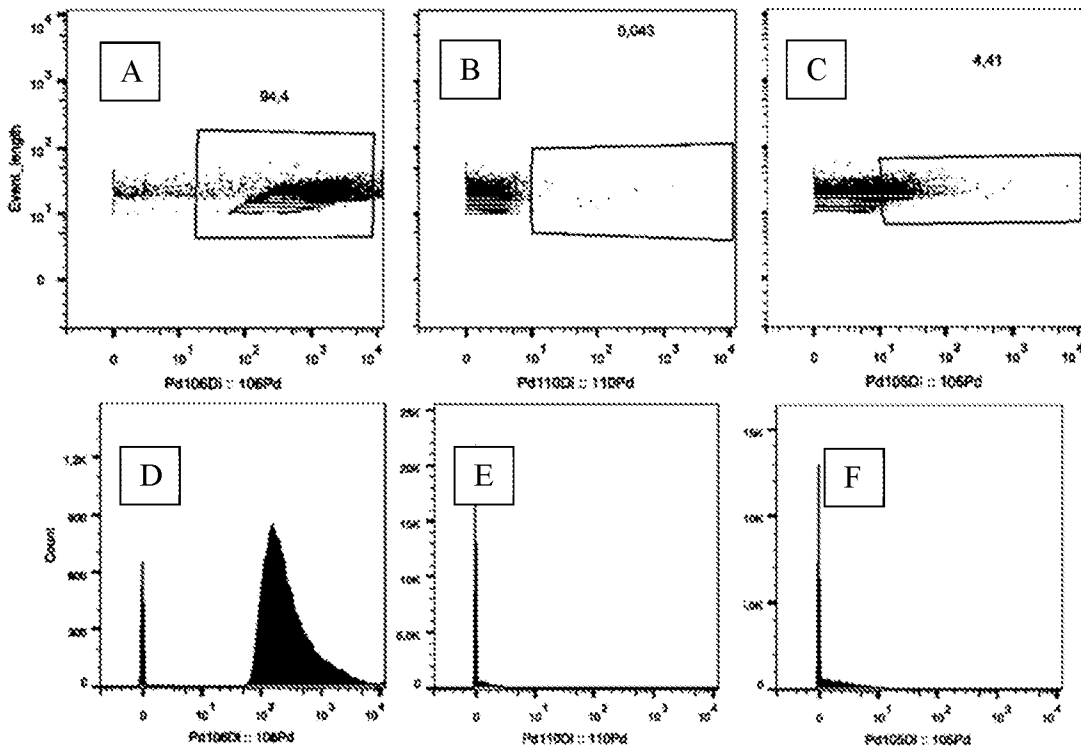


Figura 12

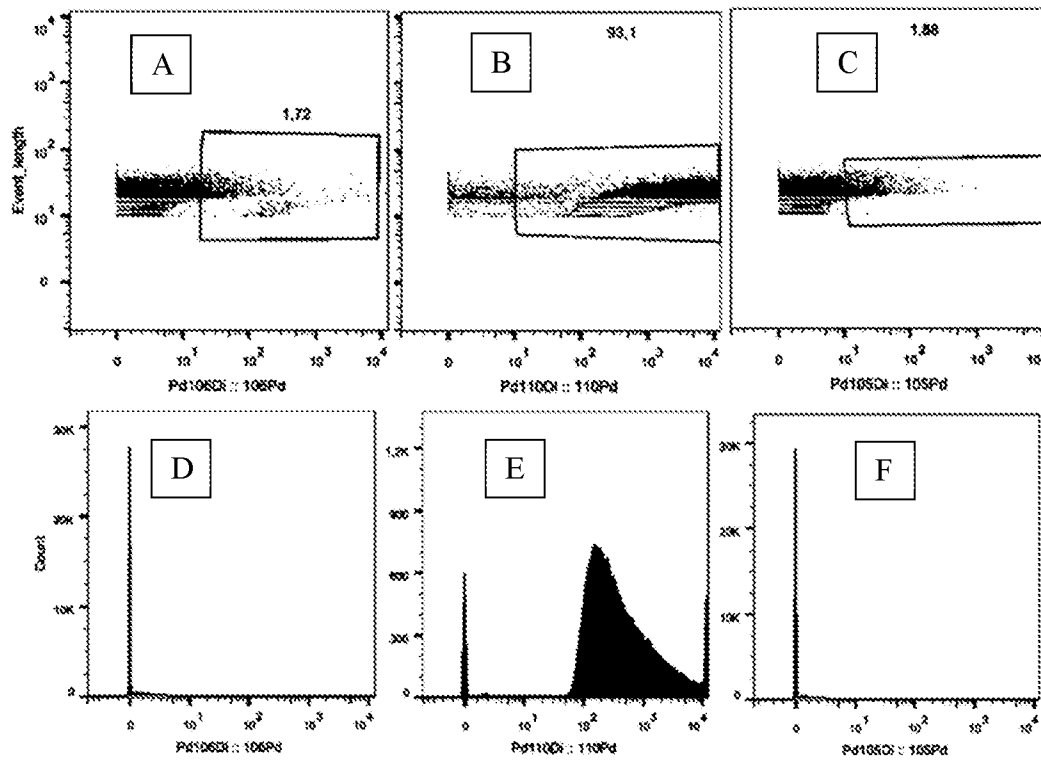


Figura 13

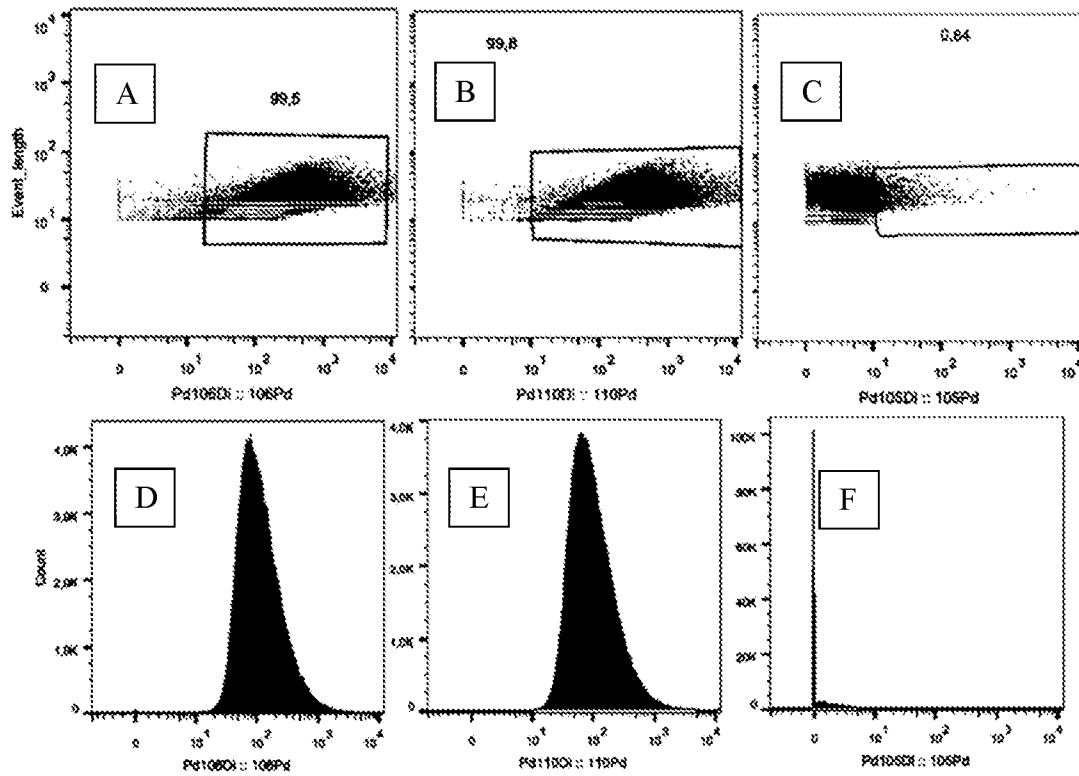


Figura 14

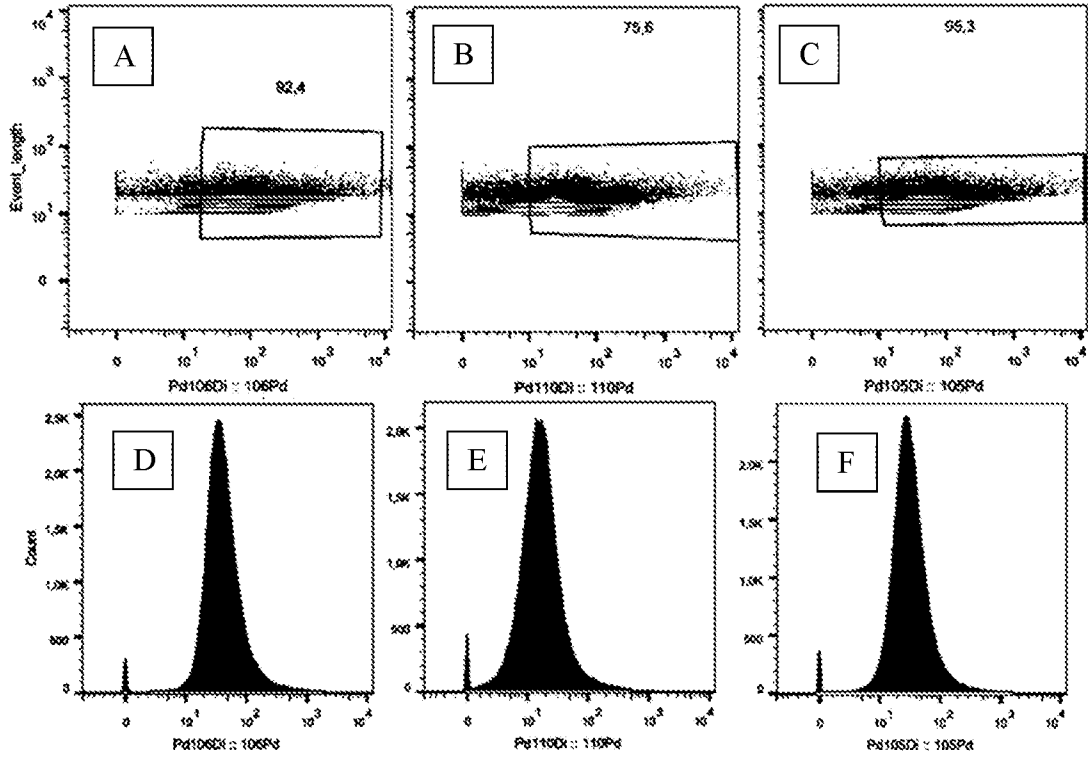


Figura 15

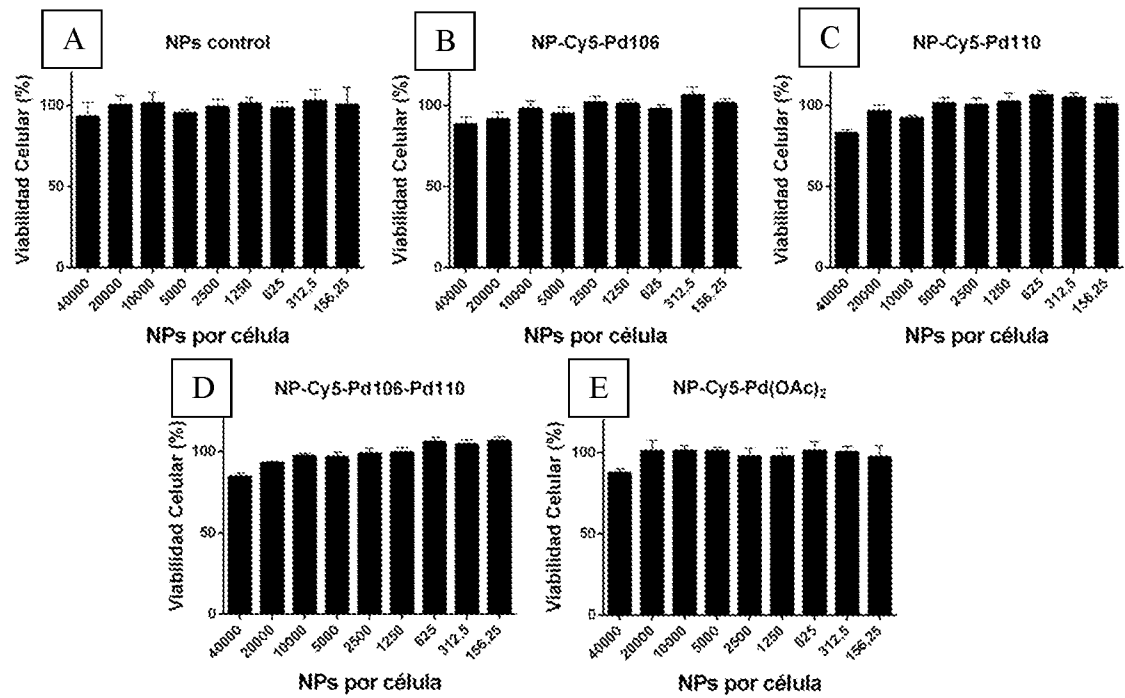


Figura 16

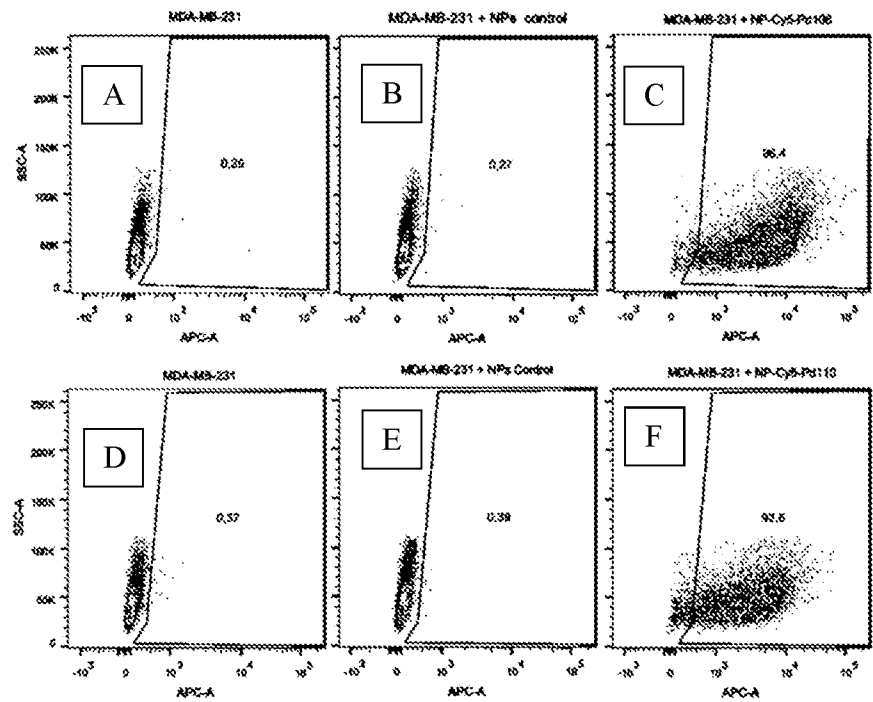


Figura 17

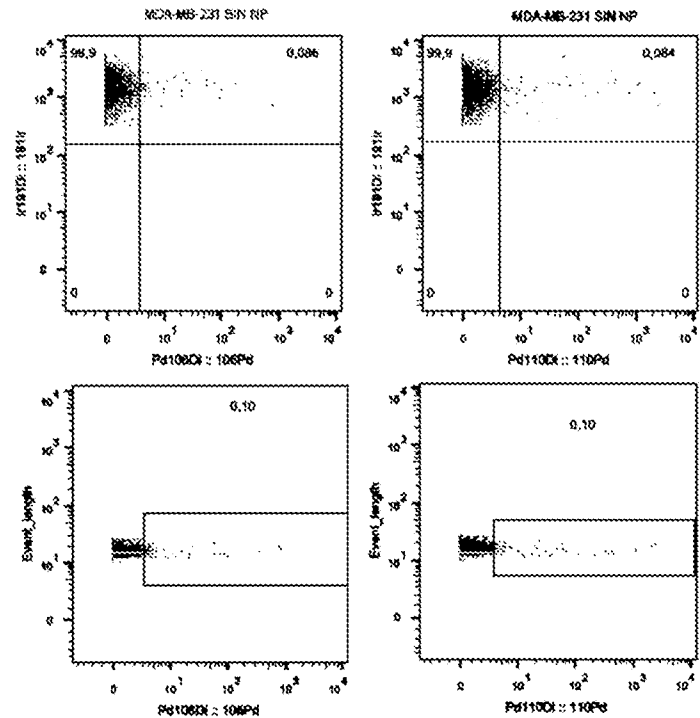


Figura 18

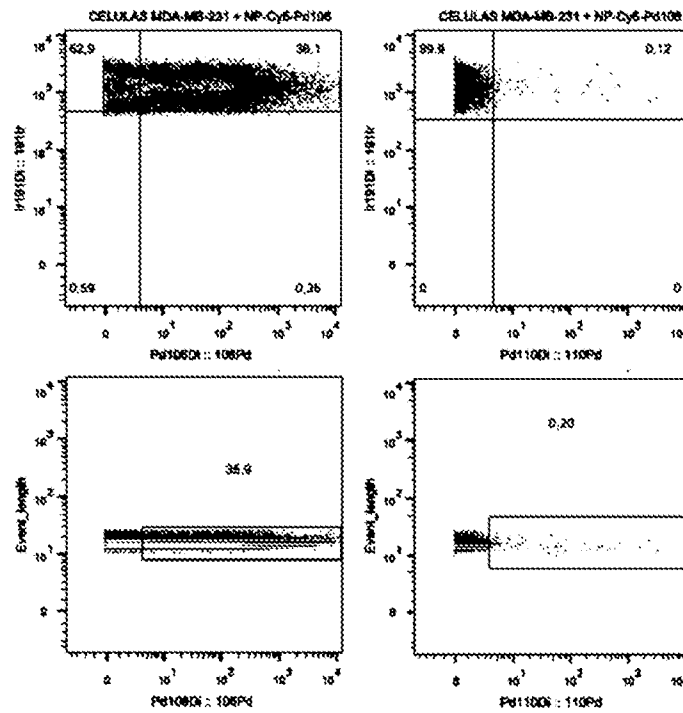


Figura 19

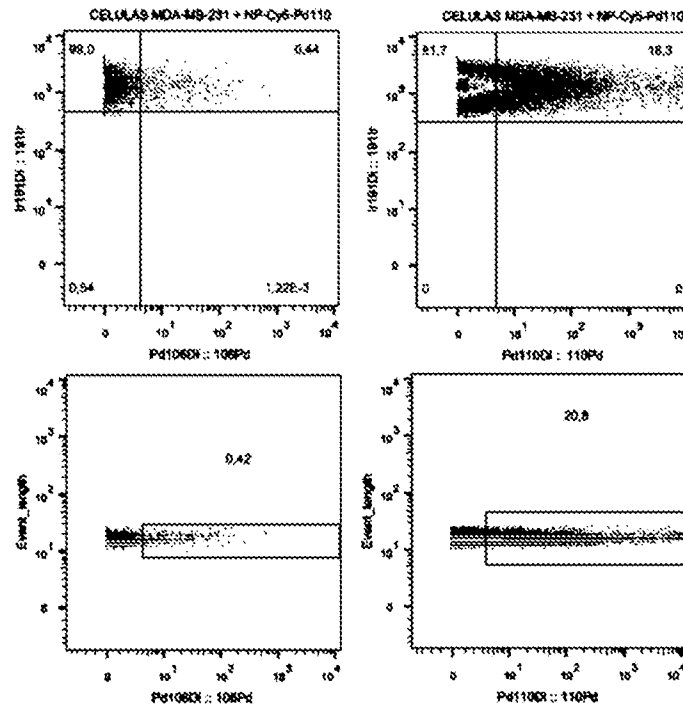


Figura 20

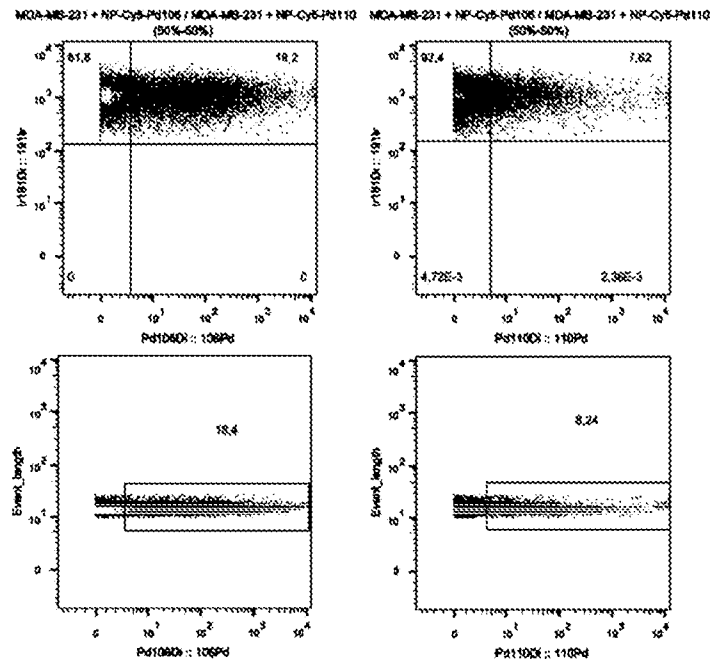


Figura 21

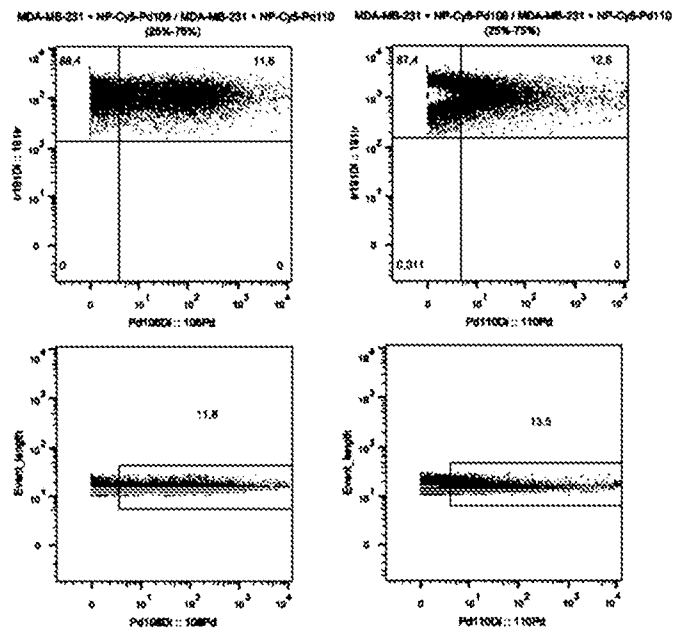


Figura 22

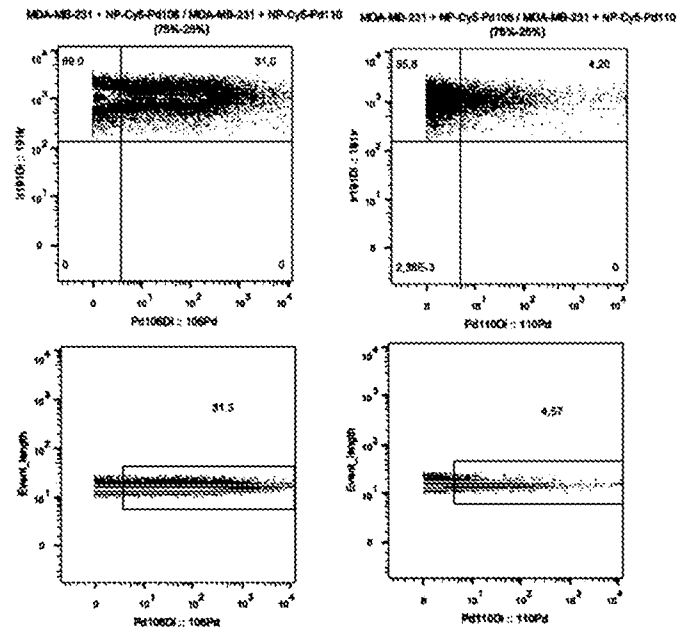


Figura 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N, C09K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL ,XPESP, CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DELGADO-GONZALEZ, ANTONIO, et al. Metallofluorescent Nanoparticles for Multimodal Applications. 2018. ACS Omega, 05/01/2018, Vol. 3, N° 1, Pages 144-153, <DOI: 10.1021/acsomega.7b01984> the whole document.	1-18
X	THIELBEER, FRANK, et al. Palladium-mediated bioorthogonal conjugation of dual-functionalised nanoparticles and their cellular delivery. Chemical Science, 11/10/2012, Vol. 4, N° 1, Pages 425-431, <DOI: 10.1039/C2SC20706K> paragraphs Results and discussion, Experimental Section.	1-12, 17, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09/10/2018

Date of mailing of the international search report
(11/10/2018)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
V. Balmaseda Valencia

Telephone No. 91 3493048

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070413

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UNCITI-BROCETA, ASIER, et al. Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd 0 nanoparticles to perform biorthogonal organometallic chemistry in living cells. No 6, p. 1207. Nature protocols, 01/05/2012, Vol. 7, N° 6, Pages 1207-1218 the whole document.	1-12
X	US 2017003293 A1 (CHIU DANIEL T ET AL.) 05/01/2017, example 6, claims 147-153.	1, 5, 10-12, 17, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2018/070413

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2017003293 A1	05.01.2017	JP2017507191 A	16.03.2017
		CN105934498 A	07.09.2016
		EP3074482 A1	05.10.2016
		EP3074482 A4	27.09.2017
		WO2015081126 A1	04.06.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070413

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64 (2006.01)

C09K11/06 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070413

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
G01N, C09K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL ,XPESP, CAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	DELGADO-GONZALEZ, ANTONIO, et al. Metallofluorescent Nanoparticles for Multimodal Applications. ACS Omega, 05/01/2018, Vol. 3, Nº 1, Páginas 144-153, <DOI: 10.1021/acsomega.7b01984> todo el documento.	1-18
X	THIELBEER, FRANK, et al. Palladium-mediated bioorthogonal conjugation of dual-functionalised nanoparticles and their cellular delivery. Chemical Science, 11/10/2012, Vol. 4, Nº 1, Páginas 425-431, <DOI: 10.1039/C2SC20706K> apartados Results and discussion, Experimental Section.	1-12, 17, 18

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
09/10/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
11 de octubre de 2018 (11/10/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
V. Balmaseda Valencia
Nº de teléfono 91 3493048

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070413

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	UNCITI-BROCETA, ASIER, et al. Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd 0 nanoparticles to perform biorthogonal organometallic chemistry in living cells. Nature protocols, 01/05/2012, Vol. 7, Nº 6, Páginas 1207-1218, todo el documento.	1-12
X	US 2017003293 A1 (CHIU DANIEL T ET AL.) 05/01/2017, ejemplo 6, reivindicaciones 147-153.	1, 5, 10-12, 17, 18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070413

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2017003293 A1	05.01.2017	JP2017507191 A	16.03.2017
		CN105934498 A	07.09.2016
		EP3074482 A1	05.10.2016
		EP3074482 A4	27.09.2017
		WO2015081126 A1	04.06.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

G01N21/64 (2006.01)

C09K11/06 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)