

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 141**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C08F 8/42 (2006.01)

C08F 220/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2007 E 11008035 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2444804**

54 Título: **Marcadores elementales de cadena principal polimérica**

30 Prioridad:

27.05.2006 US 803356 P

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**FLUIDIGM CANADA INC. (100.0%)
70 Esna Park Drive, Unit 12
Markham, ON L3R 6E7, CA**

72 Inventor/es:

**WINNIK, MITCHELL, A.;
NITZ, MARK;
BARANOV, VLADIMIR y
LOU, XUDONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 141 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

Marcadores elementales de cadena principal polimérica

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. con n.º de serie 60/803.356, titulada "*Polymer backbone elemental tags*", presentada el 27 de mayo de 2006, cuyo contenido se ha incorporado en su totalidad como referencia.

Avisos legales y de derechos de autor

10 Una porción de la divulgación de este documento de patente contiene material que está sometido a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor no ha puesto objeción a la reproducción en facsímil por uno cualquiera del documento de patente o la descripción de patente, como aparece en los archivos o registros de patente de la Oficina de Patentes y Marcas, pero se observa en todo caso todos los derechos de autor y de la imagen de marca cualesquiera que sean.

Campo

15 La invención se refiere a una nueva clase de biomoléculas marcadas que han sido específicamente diseñadas para operar junto con la detección por análisis elemental, para proporcionar determinaciones de biomarcadores multiplexados de alta sensibilidad.

Introducción

20 Una tecnología que permita una precisa cuantificación de proteínas es deseable en el área floreciente de los proteómicos y descubrimiento de fármacos, así como en áreas de ensayos clínicos y diagnósticos. También, es importante en la investigación biológica dirigida a analizar la síntesis de proteínas, funciones y enfermedades a nivel molecular. Actualmente, existen varias técnicas que se usan ampliamente para estimar la concentración de proteínas que incluyen: ensayos de Bradford y Lowry, espectroscopía UV, espectrometría de masa orgánica, HPLC, citometría de flujo, ensayos de unión de ligandos, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay), y radioinmunoensayo (RIA, del inglés RadiolimmunoAssay). No obstante, esta variedad extensa de herramientas analíticas y técnicas de investigación bien establecidas, siguen siendo insuficientes para los retos de hoy en día. Los fallos de estos métodos se refieren a limitaciones en la sensibilidad, la selectividad, el rango dinámico, la capacidad de determinar la concentración de varias proteínas simultáneamente de una manera precisa y absoluta (multiplexación). La realización de que el análisis elemental ofrece ventajas significativas al campo de cuantificación de proteína ha dirigido el desarrollo de varios métodos nuevos de cuantificación de proteína, a través de inmunoensayos ligados a espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, del inglés Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)¹⁻⁴. Esta técnica nueva proporciona un campo innovador para ICP-MS en el análisis de muestras biológicas^{5,6}. Las propiedades analíticas únicas de ICP-MS permiten la selección de marcadores de los elementos no radioactivos que no tienen lugar de manera natural en las muestras biológicas.

Definiciones

35 El "análisis elemental" es un procedimiento en el que una muestra es analizada para determinar su composición elemental y/o composición isotópica. El análisis elemental se puede lograr mediante varios métodos, que incluyen, pero no se limitan a:

40 (i) espectroscopía atómica óptica, tal como absorción atómica de llama, absorción atómica en horno de grafito, emisión atómica con plasma acoplado inductivamente, que sondan la estructura electrónica externa de los átomos;

(ii) la espectroscopía atómica espectrométrica de masas, tal como espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, que sondan la masa de los átomos;

(iii) fluorescencia de rayos X, emisión de rayos X inducida por partículas, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, espectroscopía electrónica Auger, que sondan la estructura electrónica interna de los átomos.

45 "Analizador elemental" es un instrumento para la cuantificación de la composición atómica de una muestra empleando uno de los métodos del análisis elemental.

50 "Análisis elemental de partícula" es un procedimiento donde una muestra, compuesta de partículas dispersadas en un líquido (por ejemplo, gránulos en tampón, o células en un medio de cultivo, o sangre), se interroga de tal manera que la composición atómica se registra para partículas individuales (por ejemplo, gránulo a gránulo, célula a célula, partícula a partícula). Un ejemplo del instrumento analítico es un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masas, ICP- TOF, o ICP-MS o cualquier analizador elemental configurado para interrogar partículas individuales

"Análisis elemental en volumen o en masa" es un procedimiento donde una muestra analizada es interrogada de tal manera que la composición atómica es promediada entre todo en volumen de la muestra.

5 "Un estándar interno" se define como una cantidad conocida de un compuesto, diferente al analito que se añade al desconocido. La señal del analito se compara con la señal del estándar interno para saber la cantidad de analito presente. Un estándar interno se puede usar cuando se realiza la cuantificación por espectrometría de masas. Un estándar interno también se puede usar mediante otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

10 "Muestra biológica" se refiere a cualquier muestra de naturaleza biológica que requiere análisis. Por ejemplo, la muestra puede comprender o se puede sospechar que comprende moléculas biológicas, tejido, fluido, células de un animal, plan, hongo, o bacteria. También incluye moléculas de origen vírico. Las muestras típicas incluyen, pero no se limitan a, esputo, sangre, células de la sangre (por ej., células blancas), tejido o muestras de biopsia con aguja fina, orina, fluido peritoneal, fluido pleural, o células resultantes de los mismos. Las muestras biológicas también pueden incluir cortes de tejidos tales como cortes congelados tomados con fines histológicos. Otra fuente típica de muestras biológicas son cultivos de células y virus de animal, planta, bacteria, hongos donde los estados de expresión de los genes se pueden manipular para explorar la relación entre los genes. Las muestras biológicas también puede incluir disoluciones de moléculas biológicas (purificadas o no purificadas) tales como proteínas, péptidos, anticuerpos, ADN, ARN, aptámeros, polisacáridos, lípidos, etc. Otros ejemplos son conocidos por los expertos en la técnica.

20 "Anticuerpos" son moléculas glicoprotéicas de inmunoglobulina que se encuentran normalmente en el suero de los animales. Los anticuerpos se pueden obtener de mamíferos tales como conejos, ratones, ratas, cabras, etc., y pollo o se pueden obtener mediante métodos recombinantes como es conocido por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567. Los procedimientos para la inmunización y obtención de una respuesta de producción de anticuerpos elevada en un animal, son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en "*Anticuerpos, A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, páginas 92-115. Los anticuerpos se pueden usar como moléculas enteras, fragmentos de moléculas conocidos como fragmentos Fab' y Fab 2', como anticuerpos monovalentes (que combinan una cadena ligera y una cadena pesada modificada), y otros ejemplos conocidos por los expertos en la técnica.

"Anticuerpos primarios" son anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno inyectado en un animal. Estos se pueden extraer del animal o se pueden preparar mediante medios recombinantes.

30 "Anticuerpos secundarios" son los anticuerpos que se unen específicamente a anticuerpos primarios. Por ejemplo, los anticuerpos primarios se pueden usar como el antígeno inyectado en un animal de una especie diferente, para generar anticuerpos secundarios. Por ejemplo, los anticuerpos anti ratones secundarios del conejo se pueden preparar inmunizando un conejo con anticuerpos de ratón.

35 "Antígeno" es una sustancia que estimula una respuesta inmune en un organismo huésped, especialmente la producción de anticuerpos. Los antígenos usualmente son proteínas o polisacáridos, pero pueden ser cualquier tipo de moléculas, que incluyen pero no se limitan a, moléculas pequeñas (haptenos) acopladas a una proteína portadora.

40 "Biomarcadores" son moléculas y construcciones, que pueden ser por ejemplo antígenos, moléculas pequeñas, nucleótidos, oligonucleótidos, ADN o ARN, que están presentes en el volumen de la célula o en la superficie de la célula de un solo tipo de célula, o cuya abundancia relativa es única para ese tipo de célula. Los biomarcadores de células se pueden usar para distinguir esa célula de otras células. Por ejemplo, los antígenos presentes en la superficie de la célula de un solo tipo de célula se denominan biomarcadores de la superficie de la célula que distinguen esa célula de otras células.

45 "Inmunoensayo" como se usa en la presente memoria significa un ensayo en el cual un analito, tal como antígeno o biomarcador celular, es detectado por un reactivo de afinidad tal como un anticuerpo primario. Por ejemplo, un "inmunoensayo" puede ser un ensayo en el que un analito es detectado por un reactivo de afinidad marcado, tal como un anticuerpo primario conjugado a un polímero marcado con metal.

50 "Biomolécula" como se usa en la presente memoria significa cualquier molécula biológica e incluye biomoléculas pequeñas, por ejemplo, pero no se limitan a: lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, vitaminas, hormonas, neurotransmisores, carbohidratos, azúcares, disacáridos, aminoácidos, nucleótidos, fosfato, y monosacáridos; y biomoléculas grandes, por ejemplo, pero no se limitan a: péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, es decir, ADN, ARN, oligosacáridos, polisacáridos, y priones. Otras biomoléculas son conocidas por los expertos en la técnica son abarcadas por las enseñanzas de los autores de la presente solicitud.

55 "Reactivo de afinidad" es una biomolécula capaz de unirse fuertemente a una molécula o analito diana, por ejemplo un antígeno o biomarcador. Por ejemplo, un anticuerpo es un reactivo de afinidad que reconoce y se une con alta afinidad a un antígeno específico. La estreptavidina es una molécula de proteína que se une específicamente a biotina y puede considerarse como otro ejemplo de reactivo de afinidad. Otros reactivos de afinidad son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, aptámeros, oligonucleótidos, moléculas de proteínas, lectinas y polisacáridos.

"Reactivo de afinidad marcado" es un reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo o apatámero u oligonucleótido, polisacáridos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento) que se conjuga con un marcador sintético (resto) usualmente a través de un grupo enlazante. El marcador puede ser, pero no se limita a, un polímero con múltiples grupos quelantes enlazados covalentemente. En mayor medida, los grupos quelantes pueden tener un elemento o multitud de elementos unidos a los mismos. La secuencia y el orden de la etapa de quelación dependen del protocolo de marcaje.

El término "detectar" se usa en el sentido más amplio queriendo significar que incluye, tanto mediciones cualitativas como cuantitativas, de una molécula específica. Por ejemplo, mediciones cualitativas y cuantitativas de un antígeno o biomarcador específico con la ayuda de un marcador (por ejemplo, un anticuerpo marcado u otro reactivo de afinidad marcado).

"Marcador elemental" o "marcador" es un resto químico que incluye un elemento o multitud de elementos que tienen uno o muchos isótopos (denominados "átomos marcadores") unidos a una estructura molecular soporte, o que es capaz de unir dichos uno o más elementos o uno o más isótopos. El marcador elemental también puede comprender los medios para unir el marcador elemental a una molécula de interés o molécula diana (por ejemplo, un analito). Los diferentes marcadores elementales se pueden distinguir sobre la base de la composición elemental de los marcadores. Un marcador elemental puede contener muchas copias de un isótopo dado y puede tener varias copias reproducibles de cada isótopo en cada marcador. Un marcador elemental se distingue funcionalmente de una multitud de otros marcadores elementales en la misma muestra debido a que su composición elemental o isotópica es diferente a la de otros marcadores.

El término "átomo marcador" es el átomo del elemento o isótopo que diferencia un marcador elemental de otro y que se detecta mediante análisis elemental.

"Un soporte" es una superficie que ha sido funcionalizada por, por ejemplo, pirrol-2,5-diona (maleimido), anión de ácido sulfónico, o p-(clorometil) estireno. Un soporte, por ejemplo, puede ser, pero no se limita a, una membrana sintética, gránulo (poliestireno, agarosa, sílice, etc.), superficie plana en microposillos de plástico, portaobjetos, tubos de reacción, etc., como es conocido por los expertos en la técnica.

"ICP-MS" es el espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente - un analizador elemental basado en espectrometría de masas sensible. Las diferentes configuraciones de ICP-MS se distinguen principalmente por la técnica de selección de masa empleada y puede ser, por ejemplo el cuadrupolo o tiempo de vuelo (ICP-TOF) o sector magnético (ICP-MS de alta resolución). Existen muchos modelos de ICP-MS comercialmente disponibles que tienen un amplio espectro de configuraciones, capacidades y modificaciones.

Un "polímero" es una sustancia compuesta de moléculas caracterizada por las múltiples repeticiones de una o más especies de átomos o grupos de átomos (unidades constitucionales) enlazadas entre sí, en cantidades suficientes para proporcionar un conjunto de propiedades que no varían notablemente con la adición o retirada de una o algunas unidades constitucionales. (Definición según IUPAC, véase E. S. White, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1997, Vol. 37, pp. 171-192). Una molécula polimérica se puede concebir en términos de su cadena principal, el enlace conectado de átomos que abarca la longitud de la molécula, y los grupos colgantes, unidos a la porción de cadena principal de cada unidad constituyente. Los grupos colgantes son a menudo química o funcionalmente diferentes a la cadena principal. Los grupos colgantes que tienen una alta afinidad por los iones metálicos pueden actuar como grupos quelantes o ligandos para esos iones.

"Copolímeros" son polímeros que consisten en dos o más unidades constituyentes químicamente diferentes. Un "polímero lineal" es un polímero caracterizado por una secuencia lineal de unidades constituyentes. Un "copolímero de bloques" es un polímero lineal con secuencias de unidades constituyentes de tipo común, unidas a secuencias de unidades constituyentes de diferente tipo. Un "polímero ramificado" es un polímero en el cual surgen cadenas poliméricas adicionales (las ramificaciones) de la cadena principal del polímero. Normalmente, la secuencia lineal más larga se denomina la "cadena principal". Un polímero ramificado en el que la reacción química de las unidades constituyentes de las cadenas ramificadas es diferente a la de la cadena principal se denomina un "copolímero de injerto".

"Polímeros en estrella" tienen múltiples cadenas poliméricas lineales que emanan de una unidad o núcleo constituyente común. "Polímeros hiper-ramificados" son polímeros múltiplemente ramificados en los cuales los átomos de la cadena principal están dispuestos en forma de árbol. Estos polímeros se refieren a "dendrimeros", que tienen tres características arquitectónicas diferenciadas: un núcleo iniciador, capas interiores (generaciones) compuestas por unidades repetitivas unidas radialmente al núcleo iniciador, y una superficie exterior de funcionalidad terminal unida a la generación más externa. Los "Dendrimeros" difieren de los polímeros hiper-ramificados por su extraordinaria simetría, alto grado de ramificación, y funcionalidad terminal (telequímica) maximizada.

Un "polímero marcado con metal" (también denominado "portador de marcador de metal polimérico", o "conjugado metal-polímero", o "polímero derivado de quelato") es una variedad de marcador elemental que consiste en una cadena principal polimérica que porta al menos un grupo quelante colgando con átomos metálicos unidos a los

mismos. Estos polímeros marcados con metal pueden ser, pero no se limitan a, lineales, en estrella, ramificados, u homopolímeros o copolímeros hiper-ramificados así como copolímeros de bloques o de injerto.

Un "grupo colgante de unión a metal" es un grupo colgante en el polímero que es capaz de unirse a un metal o a un isótopo de un metal. También se denomina ligando.

- 5 Un "grupo (enlazante) de unión" o "enlazante" es una porción de una molécula que se usa para acoplar (conjugar) dos moléculas o polímeros diferentes, dos subunidades de una molécula, o una molécula a un sustrato, por ejemplo un agente de afinidad.

10 Abreviaturas comúnmente usadas: NAS es N-acriloxisuccinimida; NMAS es N- metacriloxisuccinimida; DMA es N,N-dimetilacrilamida; t-BDB es el agente de transferencia de cadena por polimerización de transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT, del inglés reversible addition-fragmentation chain transfer), ditiobenzoato de terc-butilo; AMBN es 2,2-azobis (2-metilbutironitrilo); DMSO es sulfóxido de dimetilo; DOTA es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético; PMAA es ácido poli(metacrílico); DTPA es ácido dietilentiamina pentacético; PDMAEMA es poli(dimetilaminoetil metacrilato); Fmoc es 9-fluorenilmetil-carbamato; DTT es ditioneitol; TMS es trimetilsililo y TCEP es tri(2-carboxietil)fosfina.

- 15 Los términos Mn, Mw y PDI (índice de polidispersidad): Mw/Mn se usan para indicar el peso molecular medio y numérico, y el índice de polidispersidad describe la distribución de pesos moleculares, respectivamente.

"Quelación" es el procedimiento de unión de un ligando, el quelante, quelador o agente quelante, a un ion metálico formando un complejo metálico, el quelato. En contraste con los ligandos monodentados simples tales como H₂O o NH₃, los quelantes polidentados forman múltiples enlaces con el ion metálico.

- 20 "Elemento de transición" significa un elemento que tiene uno de los siguientes números atómicos 21-30, 39-48, 57-80 y 89-92. Los elementos de transición incluyen los metales de tierras raras, lantánidos y metales nobles.

"Lantánidos" son los metales de transición con números atómicos de 57 a 71 que incluyen La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu.

- 25 "Metal" significa un elemento que tiene uno de los siguientes números atómicos 3, 4, 11-13, 19-33, 37-52, 55-84, 87-102,

Compendio

Una clase de marcadores optimizada para el análisis elemental que incluyen (pero limitada a) la aplicación de ICP-MS no ha sido desarrollada antes. Se tuvieron que hacer estudios preliminares^{1;3;4;7} usando marcadores que están actualmente en uso con fines completamente diferentes. Los marcadores elementales de la presente invención, no son los de la técnica anterior que están específicamente diseñados para el análisis elemental. Para implementar el marcaje elemental al máximo, se requirió el desarrollo de una nueva clase de marcadores. La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) tiene varias propiedades únicas que se pueden aprovechar para crear una combinación instrumental de marcadores elementales ideal. La ventaja más importante es el hecho de que un gran número de metales pesados y sus isótopos, proporcionan señales diferenciadas que se pueden detectar simultáneamente. Así, pueden desarrollarse muchos marcadores elementales, por ejemplo más de 50; la intensidad obtenida de los elementos marcados hace las veces de firma que representa la concentración del analito en la muestra. En segundo lugar, la sensibilidad a la abundancia de ICP-MS, una medida de la superposición de señales de los isótopos próximos, es alta (por ejemplo, superior a 10⁶ para el analizador cuadrupolo), y esto asegura la independencia de los canales de detección en un amplio rango dinámico. La tercera propiedad clave es que MS es muy sensible; la detección del orden de 100 moléculas de un determinado antígeno por célula puede ser factible, e independiente en gran medida del orden del multiplexado, constituye una mejora sustancial con respecto a los actuales instrumentos citómetros de fluorescencia. Por último, el ICP-MS como un detector ofrece absoluta cuantificación que es independiente en gran medida de la forma molecular del analito o matriz de la muestra. Existe una necesidad definitiva de integrar estas propiedades clave de análisis elemental con la metodología bio-analítica. En la presente memoria, los autores de la misma proporcionan un diseño nuevo de marcadores elementales, que asegura drásticamente mayor capacidad del multiplexado y sensibilidad de los bio-ensayos.

La nueva clase de marcadores elementales basados en polímeros es adecuada para la determinación usando instrumentos ICP-MS convencionales, en el caso de que se desee un ensayo promedio de un conjunto de muestras (es decir, ensayo en masa). Por ejemplo, cuando un tejido es suficientemente homogéneo, o el diagnóstico permite promediar la biopsia, la muestra se puede teñir con los reactivos de afinidad marcados con metal y, después del lavado, se puede acidificar para lisar las células del tejido y proporcionar una disolución homogénea que puede analizarse según los protocolos de ICP-MS normalizados antiguos. El protocolo de ensayo en masa aún permite el ensayo de multiplexado de forma masiva, con límites de detección para cada marcador comparables al radioinmunoensayo individual. Los biólogos celulares pueden ver esto como un análogo de alto rendimiento cuantitativo de inmunoelectrotransferencia (Western blotting).

La nueva clase de marcadores elementales basadas en polímeros es adecuada para la determinación de biomarcadores usando un instrumento nuevo basado en ICP-MS flujocitometría⁸ y proporciona hasta 50 o más marcadores notificadores diferenciables para ensayos inmunológicos que permiten la determinación simultánea (masivamente multiplexada) de muchos biomarcadores, proporcionando en última instancia una exquisita distinción e identificación de las células enfermas (u otras células de interés) en las muestras de pacientes en el análisis elemental de partículas.

La nueva clase de marcadores elementales basadas en polímeros es adecuada para el doble marcaje de reactivos de afinidad – marcador fluorescente y marcador elemental en el mismo reactivo de afinidad. Previamente, los anticuerpos doblemente marcados se usaron para localizar tipos específicos de células en cortes de tejidos (microscopía fluorescente) e identificando a continuación las estructuras particulares de las células usando microscopía electrónica. Por lo tanto, los anticuerpos se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ferritina como un material denso a los electrones.⁹ Más recientemente, se han preparado inmunosondas que combinan un marcador fluorescente con un pequeño cúmulo dorado mediante conjugación covalente con fragmentos Fab'. Estos nuevo inmunoconjugados permiten la recogida de dos conjuntos complementarios de resultados, de microscopía fluorescente y electrónica, a partir de un solo experimento de marcaje.¹⁰ Otro avance en reactivos tales como pares de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia de terbio-fluoresceína y proteína verde fluorescente de terbio se logró para estudiar reacciones de kinasa usando transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET, del inglés Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer)¹¹.

Las enseñanzas de los autores de la presente solicitud incluyen reactivos de afinidad doblemente marcados para facilitar la preclasificación y subsiguiente análisis elemental de células raras en muestras mixtas mediante citometría de flujo basada en ICP-MS. La biología celular requiere localización microscópica de biomarcadores en la superficie de la célula o intracelularmente. Al mismo tiempo, es necesaria una información cuantitativa sobre la abundancia de los marcadores. Al unir covalentemente un marcador fluorescente y un marcador elemental al mismo reactivo de afinidad (por ejemplo un anticuerpo) y usando este reactivo de afinidad, en primer lugar, para localizar la señal a una estructura subcelular particular (membrana, núcleo, citoplasma, citoesqueleto, etc.) a través de microscopía fluorescente y, en segundo lugar, para cuantificar el número de reactivos de afinidad unidos por ICP-MS, aumentará significativamente la comprensión desde el punto de vista biológico de los procedimientos investigados.

Un aspecto de la invención es proporcionar un marcador elemental que comprende un polímero, en donde el polímero comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal. Además, el marcador elemental puede comprender un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula. El marcador elemental puede ser soluble en agua. También puede cargarse negativamente. El número de grupos colgantes de unión a metal capaces de unirse a al menos un átomo de metal puede ser entre aproximadamente 1 y 1.000, y lo más típicamente entre 10 y 250. Al menos un átomo de metal puede unirse a al menos uno de los grupos colgantes de unión a metal. El polímero puede tener un grado de polimerización entre aproximadamente 1 y 1.000, lo más típicamente entre 10 y 250.

El polímero se puede seleccionar del grupo que consiste en polímeros lineales, copolímeros, polímeros ramificados, copolímeros de injerto, polímeros de bloques, polímeros en estrella, polímeros hiper-ramificados. La cadena principal del polímero se puede derivar de poli(acrilamida), poli(metacrilato), o poli(metacrilamida) sustituidos y puede ser un derivado sustituido de un homopolímero o copolímero de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico o ácido metacrílico.

El grupo colgante de unión a metal se puede unir al polímero a través de un éster o a través de una amida. El grupo funcional puede ser un grupo reactivo a tiol. El átomo de metal puede ser un elemento de transición o un isótopo del mismo, o un lantánido o un isótopo de un lantánido. El marcador elemental además puede comprender un enlazante unido al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de formar un enlace covalente con una biomolécula. El marcador elemental también puede comprender un espaciador unido al enlazante, en donde el espaciador es capaz de unirse a una biomolécula. El espaciador puede ser un espaciador de polietilenglicol (PEG). El espaciador puede comprender un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador con el polímero a través de un grupo funcional reactivo al espaciador en el polímero. Asimismo, el espaciador puede contener un grupo funcional que es capaz de unir un enlazante con el espaciador.

El marcador elemental descrito previamente, se puede unir covalentemente a una biomolécula. La biomolécula puede ser un reactivo de afinidad, y el reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un reactivo de afinidad con marcador elemental, en donde el reactivo de afinidad se marca con el marcador elemental descrito previamente, y en donde al menos uno de los grupos colgantes se une, o es capaz de unirse, a al menos un átomo de metal.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método para preparar el marcador elemental descrito previamente, que comprende: (i) proporcionar un polímero; y (ii) unir covalentemente al menos un grupo colgante de unión a metal que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal con el polímero. La

etapa de proporcionar el polímero puede comprender síntesis del polímero, en donde la síntesis se selecciona del grupo que consiste en polimerización con adición-fragmentación reversible (RAFT), polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP, del inglés Atom Transfer Radical Polymerization) y polimerización aniónica. La etapa de proporcionar el polímero puede comprender síntesis del polímero a partir de compuestos seleccionados del grupo que consiste en N-alquil acrilamidas, N,N-dialquil acrilamidas, N-aril acrilamidas, N-alquil metacrilamidas, N,N-dialquil metacrilamidas, N-aril metacrilamidas, ésteres de metacrilato, ésteres de acrilato y equivalentes funcionales de los mismos. El grupo colgante de unión a metal que es capaz de unirse a al menos un átomo de metal puede comprender un ligando de pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) o un ligando de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). Además, el método puede comprender funcionalizar el polímero, en donde el grupo funcional es capaz de unirse covalentemente a una biomolécula. El método también puede comprender unir un enlazante al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de unirse a una biomolécula. El método además puede comprender unir covalentemente una biomolécula al enlazante. Por último, el método además puede comprender unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal.

Otro aspecto de la invención es para proporcionar un método de preparar el marcador elemental descrito previamente, que comprende: (i) proporcionar un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal, y comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse covalentemente a un enlazante; (ii) unir un enlazante al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de unirse a una biomolécula; (iii) unir covalentemente una biomolécula al enlazante; y (iv) unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal. La etapa de unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se puede llevar a cabo antes de la etapa (ii). La etapa de enlazar al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se puede llevar a cabo antes de la etapa (iii). La etapa de enlazar al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se puede llevar a cabo después de la etapa (iii). El método además puede comprender una etapa de unión de un espaciador al enlazante, en donde el espaciador se sitúa entre el enlazante y la biomolécula y/o una etapa de unión de un espaciador al polímero, en donde el espaciador se sitúa entre el polímero y el enlazante. El espaciador se puede añadir antes de la etapa (ii). El espaciador puede ser un espaciador de polietilenglicol (PEG). El espaciador puede contener un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador al polímero, a través de un grupo funcional reactivo al espaciador en el polímero. El espaciador puede contener un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador al enlazante. El método puede incluir una etapa de hacer reaccionar el tiol con un grupo de unión de maleimido.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un marcador elemental preparado mediante los métodos descritos previamente.

Otro aspecto de la invención es un método para el análisis de un analito, que comprende (i) incubar el reactivo de afinidad marcado descrito previamente con un analito, en donde el reactivo de afinidad se une con el analito; (ii) separar el reactivo de afinidad marcado no unido, del reactivo de afinidad unido; (iii) analizar el elemento unido al reactivo de afinidad unido al analito mediante análisis elemental.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método para el análisis multiplexado de dos o más analitos, que comprende: (i) incubar dos o más reactivos de afinidad diferencialmente marcados descritos previamente con dos o más analitos, en donde los reactivos de afinidad se unen con los analitos, para producir dos o más analitos diferencialmente marcados; (ii) separar los reactivos de afinidad no unidos de los reactivos de afinidad unidos; y (iii) analizar los marcadores diferenciales unidos a los dos o más analitos mediante análisis elemental.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método para el análisis de un analito, que comprende: (i) incubar el marcador elemental descrito previamente con un analito, de manera que el marcador elemental se una al analito; (ii) separar elementos de marcaje no unidos de los elementos de marcaje unidos; (iii) analizar los elementos de marcaje unidos mediante análisis elemental.

El reactivo de afinidad según cualquiera de los métodos anteriores se puede marcar luego con un marcador fluorescente. El analito se puede situar en o sobre una célula, por ejemplo una célula enferma, y además una célula de leucemia. La etapa de análisis puede comprender análisis en masa, donde la composición atómica se promedia entre el volumen total de una muestra, y/o análisis de partículas individuales. Las partículas pueden ser células.

Los métodos descritos previamente se pueden llevar a cabo mediante análisis elemental por medio de ICP-MS o por medio de un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masas.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un kit para la preparación del marcador elemental descrito previamente, que comprende al menos uno de los siguientes: un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal y que además comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula, una disolución metálica, reactivos para unir el enlazante, el espaciador o la biomolécula al polímero, reactivos para unir un grupo funcional al enlazante o al espaciador, reactivos para unir un metal al polímero, reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos, tampones, instrucciones para preparar el

marcador elemental, instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad, instrucciones para unir un metal al marcador elemental.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un kit para el análisis de analitos según los métodos descritos previamente, que comprende al menos uno de los siguientes: un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal y que además comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula, una disolución metálica, reactivos para unir el enlazante, el espaciador o la biomolécula al polímero, reactivos para unir un grupo funcional al enlazante o al espaciador, reactivos para unir un metal al polímero, reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos, tampones, instrucciones para preparar el marcador elemental, instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad, instrucciones para unir un metal al marcador elemental e instrucciones para usar los marcadores elementales para el análisis de analitos mediante análisis elemental.

El polímero para cualquiera de los kits anteriores se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímeros o copolímeros de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico y ácido metacrílico. Los reactivos pueden incluir al menos uno de los siguientes: TCEP (tri(2-carboxietil)fosfina), conjugado ligando-polímero-enlazante-espaciador, tampón fosfato, TBS (disolución salina tamponada con Tris), EDTA (ácido diaminoetanotetraacético), tampón de acetato de amonio, anticuerpos, disolución de sal metálica, disolución de sales de lantánidos, tampones bloqueadores, tampones de lavado, FBS (suero fetal bovino), DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco), BSA (albúmina de suero bovino), ditiotreitolo, bismaleimida, y DMF (dimetilformamida). El polímero se puede unir a un enlazante o se puede unir a un enlazante y a un espaciador.

Estas y otras características de las enseñanzas de los autores de esta solicitud se explican en la misma.

Breve descripción de las figuras

La invención se ilustra en las figuras de los dibujos que la acompañan, cuyo fin es servir de ejemplo no limitativo, y en las cuales las referencias similares pretenden referirse a partes similares o correspondientes.

La Figura 1. Son vistas esquemáticas de los marcadores elementales para la detección de biomoléculas, las cuales según la invención tienen la estructura general I. Los quelatos de metal poliméricos propuestos: R = grupo orgánico, L= ligando de metal. En la estructura "a" cada unidad repetida del polímero lleva el L_n3+ ligado, representado por (L). En la estructura "b", una fracción de las unidades repetidas tiene un grupo orgánico R según la invención. El asterisco (*) representa el extremo iniciado del polímero, NAS es una vista esquemática de N-acriloxisuccinimida. NMAS es una vista esquemática de N-metacriloxisuccinimida.

La Figura 2. Son vistas esquemáticas de un ejemplo de la síntesis de ligandos funcionales que se pueden usar para unir el elemento/metal "L" al polímero.

La Figura 3. Son vistas esquemáticas de la unión de los ligandos (grupos colgantes) a los polímeros RAFT (Esquema 3) y a polímeros ATRP (Esquema 4).

La Figura 4. Son vistas esquemáticas de la unión de los ligandos (grupos colgantes) a los polímeros producidos mediante polimerización aniónica (Esquema 5) y PDMAEMA (Esquema 6).

La Figura 5. Son vistas esquemáticas de la unión del grupo acoplante (el enlazante) a los polímeros RAFT (Esquema 7a), polímeros ATRP (Esquema 7b), y polímeros producidos mediante polimerización aniónica (Esquema 7c).

La Figura 6. Son vistas esquemáticas de ejemplos alternativos de reacciones químicas de acoplamiento según la invención. En el Esquema 8b, el término "grupo final" se usa para referirse al grupo acoplante.

La Figura 7. Son vistas esquemáticas de estructuras de monómeros.

La Figura 8. Son las condiciones experimentales y los resultados de pesos moleculares para copolímeros aleatorios de DMA y NAS en dioxano a 80°C.

La Figura 9. Son vistas esquemáticas de la preparación de conjugado ligando-polímero.

La Figura 10. Son vistas esquemáticas de la preparación del conjugado ligando-polímero basado en DOTA.

La Figura 11. Son vistas esquemáticas de la síntesis del marcador elemental.

La Figura 12. Son vistas esquemáticas de un procedimiento para generar un polímero con grupos amino colgantes para unir a los ligandos DTPA y de emplear un nuevo iniciador basado en cistamina.

La Figura 13. Es un gráfico de barras de los resultados del Experimento 6. Las células K562 crecientes (no diferenciadas) se tiñeron con anticuerpos primarios marcados con conjugado ligando-polímero (como se describe en

el Esquema 11)- que porta lantánidos identificadores: el anticuerpo monoclonal anti-CD38 se marcó con La; el anti-CD110 - con Eu; el anti-CD61 - con Dy; el anti-CD45 - con Ho; el anti-CD54 - con Nd; el CD49d - con Pr. Las células se hicieron reaccionar con los anticuerpos marcados, bien con cada uno por separado, o con todos los anticuerpos simultáneamente (ALL; 6-plexante). Hay que señalar que el marcador de células de la sangre nucleado omnipresente altamente expresado CD45 (Ho) es en promedio 10 veces mayor que los marcadores de adhesión celular (CD54, Cd38, CD49d), y 100 veces mayor que los marcadores de diferenciación megacariocitos CD61 y CD110 (las células no se indujeron a diferenciar a lo largo del camino de megacariocito).

La Figura 14. a. Es un gráfico de barras tridimensional que muestra la comparación directa de la fluorescencia obtenida a partir de las células teñidas con CD33-FITC o doblemente marcadas con CD33-FITC-Pr usando citometría de flujo. b. Es un gráfico de barras tridimensional que muestra la comparación directa de la respuesta normalizada obtenida a partir de las células teñidas con CD33-Pr o doblemente marcadas con CD33-FITC-Pr usando ICP-MS.

La Figura 15. Es un diagrama de flujo I del procedimiento de polimerización RAFT.

La Figura 16. Es un diagrama de flujo II del procedimiento de unión de polímero-DTPA-enlazante.

15 Descripción de las diversas realizaciones

Los requisitos globales de un marcador elemental son menos exigentes que los de un marcador fluorescente¹², puesto que la naturaleza química de un elemento no es importante para su detección mediante análisis elemental. El marcador debe contener un número de átomos reproducible, y preferiblemente elevado, de una composición de elementos o isótopos. El marcador puede comprender un elemento o isótopo, o consistir en una composición de más de un elemento o isótopo. También, puede incluir una mezcla natural de isótopos. Asimismo, es posible que el marcador elemental pueda comprender un grupo colgante que comprenda un cierto metal o isótopo y un segundo grupo colgante que comprende otro metal o isótopo. La reproducibilidad en el número de átomos idénticos incorporados es la base para el análisis cuantitativo, y un aumento en el número de esos átomos mejora la sensibilidad de forma lineal. Otro atributo clave es la resistencia a la lixiviación, lo que distingue esta invención de los productos DELFIA. Se requiere la movilidad del metal quelatado en los productos DELFIA (Ensayos y Reactivos DELFIA®, PerkinElmer, USA). Los átomos marcadores pueden ser cualesquiera átomos de un elemento o isótopo que diferencie el marcador de otros átomos en la muestra, incluyendo de otros átomos marcadores asociados con marcadores elementales diferenciados. Típicamente, los átomos marcadores serán metales, en particular los elementos de transición, y lo más típicamente lantánidos.

30 Los marcadores a emplear para la detección de analitos tienen la estructura general I de la Figura 1.

El polímero puede ser cualquier polímero como es conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de polímeros se muestran en las figuras 1 a 4. Además, la cadena principal del polímero se puede derivar de poli(acrilamida, polimetacrilato o polimetacrilamida sustituidos. Más aún, la cadena principal del polímero puede ser un derivado sustituido de un homopolímero o copolímero de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico o ácido metacrílico. El polímero se puede sintetizar mediante cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la síntesis se puede lograr con compuestos tales como N-alquil acrilamidas, N,N-dialquil acrilamidas, N-aril acrilamidas, N-alquil metacrilamidas, N,N-dialquil metacrilamidas, N-aril metacrilamidas, ésteres de metacrilato, ésteres de acrilato y equivalentes funcionales de los mismos.

40 El ligando o grupo colgante pueden ser cualquier ligando como es conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de ligandos se muestran en las figuras 2 a 4.

El enlazante puede ser cualquier enlazante como es conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de enlazantes se muestran en las figuras 5 y 6. El enlazante es opcional.

El espaciador es opcional. Ejemplos de espaciadores incluyen espaciadores de bloque PEG, y otros conocidos por los expertos en la técnica.

45 La invención implica principalmente, pero no exclusivamente, los siguientes aspectos:

(i) Síntesis del portador de marcador de metal polimérico. Funcionalmente, el polímero marcado con metal es estable en condiciones típicas de ensayo, que incluyen una muy baja responsabilidad cinética de los metales unidos y de la tasa de intercambio de metales entre polímeros;

50 (ii) Síntesis y caracterización del grupo de unión (enlazante) en combinación con un portador de marcador de metal polimérico;

(iii) Síntesis del reactivo de afinidad marcado, que incluye funcionalmente un grupo de unión (enlazante) en combinación con el portador de marcador de metal polimérico. El reactivo de afinidad marcado puede ser un anticuerpo marcado u otro reactivo de afinidad marcado; y

(iv) Método para emplear los reactivos de afinidad como herramientas multiplexantes.

De forma más general, la invención implica síntesis y ensayo de marcadores que contienen metal para marcar las moléculas bio-orgánicas, que incluyen reactivos de afinidad tales como anticuerpos. Específicamente diseñado para el análisis elemental, dicho marcador sería típicamente: (i) soluble en agua, (ii) no tóxico, (iii) fácilmente separado de un material marcado mediante métodos conocidos tales como cromatografía, centrifugación, filtración o diálisis; y además, puede tener tres o cuatro restos: el grupo de unión (enlazante), posiblemente un espaciador (por ejemplo, un espaciador de PEG), el esqueleto del polímero (portador), y los átomos marcadores (como muchos átomos marcadores (del mismo metal o isótopo, o de un metal y/o isótopo diferente) como sea posible). Para analizadores elementales diferentes, las características del marcador elemental pueden ser similares.

Aunque se ejemplifica una realización de la invención en la que se usa anticuerpos como el reactivo de afinidad, se entiende que se pueden usar otros reactivos de afinidad y que están dentro del alcance de la invención.

Polímero portador: Un importante aspecto de la invención es la síntesis de un polímero, al que se puede unir un gran número de átomos marcadores. Típicamente, los átomos marcadores son átomos de metal. El polímero puede ser soluble en agua. Este resto no está limitado por el contenido químico. Sin embargo, éste simplifica el análisis si el esqueleto tiene un tamaño relativamente reproducible (por ejemplo, longitud, número de átomos marcadores, carácter de dendrímero reproducible, etc.). Los requisitos de estabilidad, solubilidad, y no toxicidad también se toman en consideración. Así, la preparación y caracterización del polímero hidrosoluble funcional mediante una estrategia de síntesis, que coloca muchos grupos funcionales a lo largo de la cadena principal más un grupo diferente en un extremo, que se puede usar para unir el polímero a través de un enlazante a una biomolécula (por ejemplo, un reactivo de afinidad) es parte de esta invención.

Los marcadores a emplear para la detección de analitos tienen la estructura general I de la Figura 1. La señal a detectar será la del polímero, que contendrá entre aproximadamente 1 a 1000 (o más) átomos de un elemento (por ejemplo, átomos de lantánido (Ln)) como parte de su estructura. Un enlazante / espaciador flexible en un extremo del polímero puede contener un grupo funcional reactivo con tiol tal como una maleimida, y a través de este grupo se puede enlazar a un reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo) para el analito diana específico. Variaciones incluyen la unión con aminas primarias de bio-moléculas u otros métodos de unión conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de la selección de grupos funcionales para el brazo del enlazante se pueden obtener de la bibliografía sobre anticuerpos PEGilados, recientemente revisada por Chapman¹³. Los polímeros como portadores de los marcadores de átomos con metal tienen un número similar de átomos de cadena principal al de los polímeros PEG, que han sido unidos a diversos anticuerpos sin pérdida de afinidades de unión. Por ejemplo, un PEG2000 (2 KDa) tiene un grado medio de polimerización de 45 que corresponde a 140 átomos de cadena principal, y PEG5000 tiene 340 átomos de cadena principal. Para poner estos marcadores en perspectiva, el tamaño medio de un anticuerpo IgG desde el extremo del Fc al Fab es de aproximadamente 11 nm¹⁴. El radio de giro de las construcciones poliméricas debe ser lo más pequeño posible, en algún punto entre aproximadamente 2 nM y 11 nM.

En una realización, la invención implica polímeros que contienen los átomos de Ln³⁺ como sustituyentes de los grupos colgantes y su síntesis. En la estructura "a" de la figura 1, cada unidad repetida del polímero porta el ligando Ln³⁺, designándose dicho grupo con (L). No es probable ni requerido, que cada grupo colgante porte un sustituyente (L). En la estructura b de la Figura 1, una fracción de las unidades repetidas tienen un grupo orgánico R. En estas estructuras, el asterisco (*) representa el extremo iniciado del polímero. Se tienen en consideración los siguientes factores: 1) El polímero puede ser soluble en agua. Debido a su estabilidad hidrolítica, se pueden usar N-alquil acrilamidas, N-alquil metacrilamidas, ésteres de metacrilato o equivalentes funcionales. 2) Un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 1 a 1.000 (1 a 2.000 átomos de la cadena principal) abarca a la mayoría de los polímeros de interés. Los polímeros de tamaño superior están dentro del alcance de la invención con la misma funcionalidad y son posibles como es comprensible por los expertos en la técnica. Típicamente, el grado de polimerización estará entre 10 y 250. 3) Los polímeros pueden ser susceptibles a una síntesis por una ruta que lleva a una polidispersidad relativamente estrecha. El polímero se puede sintetizar mediante polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP) o polimerización con adición-fragmentación reversible (RAFT), lo que debería llevar a valores de Mw/Mn en el intervalo de 1,1 a 1,2. Una estrategia alternativa implica polimerización aniónica, donde son obtenibles polímeros con Mw/Mn de aproximadamente 1,02 a 1,05. Ambos métodos permiten el control sobre los grupos finales, a través de una selección de agentes indicadores o terminadores. Esto permite sintetizar polímeros a los que el enlazante se puede unir. 4) Se puede adoptar una estrategia para preparar polímeros que contienen grupos colgantes funcionales en la unidad repetida, a la que se puede unir la unidad de metal de transición con ligando (por ejemplo una unidad Ln) en una etapa posterior. Esta realización tiene varias ventajas. Esta evita complicaciones que pudieran surgir al llevar a cabo polimerizaciones de monómeros que contienen ligandos. Además, la cadena principal del polímero es una conocida que se puede adaptar si no para todos, al menos para la mayoría de los polímeros que contienen Ln. Así, los polímeros pueden tener una longitud media de cadena y una distribución de longitud de cadena comunes. 5) Los polímeros diana de tipo "a" pueden ser polielectrolitos cargados negativamente o tener grupos colgantes zwitteriónicos. Para minimizar la repulsión de cargas entre grupos colgantes, los ligandos diana para (Ln³⁺) deberían conferir una carga neta de -1 al quelato. Para los polímeros de tipo "b", los grupos R no están en su mayor parte cargados, aunque en un ejemplo, los autores presentan un polímero en los que la pequeña fracción x de los grupos R tendrá una carga positiva. Por último, diversas reacciones químicas bien conocidas posibilitan la unión del grupo enlazante con su grupo reactivo tiol al polímero. Se puede añadir varios grupos colgantes al polímero. Prácticamente, el número puede estar entre 1 y 1.000, y más típicamente entre 10 y 250. El grupo colgante de unión a metal se puede unir al polímero mediante

métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, el grupo colgante puede unirse a través de un éster o a través de una amida.

Ejemplos para la síntesis de ligandos funcionales que son usados para unirse (L) al polímero se muestran en la Figura 2 (esquemas 1 y 2). Los ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 Elección y síntesis del quelato (átomo marcador): El uso de los lantánidos se establece en la presente descripción como factible, sin embargo, se pueden lograr resultados similares para diferentes elementos. En toda la serie de lantánidos se observa una coordinación química muy similar. Todos los lantánidos favorecen el estado de oxidación +3 y preferentemente se coordinan con ligandos de oxígeno duros. Los lantánidos no presentan geometrías de coordinación definidas y varían en número de coordinación entre 7 y 10 en toda la serie. Así, el mismo polímero derivado de quelato se puede usar para todos los metales Ln, que facilitan la producción de marcadores que contienen diferentes lantánidos usados en ensayos multiplexación¹⁵. Diferentes realizaciones utilizan diferentes metales que se pueden obtener usando consideraciones similares con respecto a su naturaleza química. Se han desarrollado números complejos Ln para usar como radiofármacos y agentes de imagen¹⁶. Pero la técnica no describe átomos metálicos unidos a grupos colgantes en la cadena principal del polímero. Los quelatos multidentados desarrollados para estas aplicaciones forman complejos de Ln termodinámicamente estables y cinéticamente inertes, lo cual es importante para minimizar la toxicidad de los lantánidos libres *in vivo*. Incorporar estos quelatos de lantánido optimizados como grupos colgantes en estructuras poliméricas, parece que se han descrito por primera vez en la presente memoria.

20 Como ejemplos, se describen dos estructuras de ligando como ejemplos funcionales de quelatos enlazados covalentemente en la cadena principal polimérica. El criterio de selección para esta realización incluye síntesis conocida, coordinación de heptadentado u octadentado para impulsar la estabilidad cinética frente a la disociación del ion metálico, un grupo funcional de amina primaria colgante para la unión del quelante al polímero, y una carga neta de -1 para el quelato ligado. El pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), un quelante acrílico se puede derivar fácilmente como un ligando de amina funcionalizado (Esquema 1, Figura 2). El acoplamiento de una diamina monoprotendida con el anhídrido de DTPA comercialmente disponible, seguido de desprotección proporciona un ligando candidato a ser acoplado al éster activo polimérico. La carga neta del compuesto una vez complejada a lantánido es -1. La fácil síntesis de este quelante lo convierte en un atractivo punto de inicio para optimizar la cadena principal polimérica con quelantes unidos.

30 Los ligandos de DTPA son inherentemente más débiles cinéticamente que el ligando macrocíclico basado en la estructura del cicleno. La naturaleza macrocíclica de los ligandos basados en cicleno preorganiza el sitio de unión de metal, produciendo una mayor estabilidad termodinámica y cinética. Estos quelatos son conocidos por ser estables *in vivo* durante días¹⁷. La reacción del tritercbutilmetilcicleno comercialmente disponible (Macrocyclics) con el derivado de homoserina fácilmente disponible proporciona un derivado DOTA ortogonalmente protegido (Esquema 2, Figura 2)¹⁸. El grupo protector Fmoc se puede retirar para acceder a la amina y que esté disponible para acoplarse a la cadena principal polimérica. En algunos casos puede ser necesario emplear un espaciador entre el quelato DOTA y el polímero. Una variedad de aminoácidos selectivamente protegidos de diferentes longitudes está comercialmente disponible y se pueden acoplar y desproteger fácilmente para formar enlazantes. El complejo lantánido de este quelato llevará una carga neta de -1. En base a la funcionalidad, estos quelatos de Ln con el grupo reactivo -NH₂ grupo se denominan (L)-NH₂.

40 Síntesis del polímero y unión del quelato: Más adelante en la invención, se describen la síntesis de los polímeros candidatos, la unión de los quelatos disfuncionales a la cadena principal polimérica, y la caracterización de los polímeros que contienen metal. Estos pretenden ser ejemplos, y no limitan el alcance de las reivindicaciones. Se pueden usar otros ejemplos, como es conocido por los expertos en la técnica.

45 Copolímero aleatorio poli(DMA-co-NAS): Un informe reciente¹⁹ describe la síntesis de un copolímero aleatorio con una relación en moles de 75/25 (3, Figura 3) de N-acriloxisuccinimida (NAS) con N,N-di metil acrilamida (DMA) mediante RAFT con alta conversión, excelente control de masa en moles en el intervalo de 5.000 a 130.000, y con Mw/Mn ~ 1,1. En esta realización (Esquema 3, Figura 3), el éster de NHS activo de 3, Figura 3 se hace reaccionar con un lantánido ligado (L) que porta un grupo amino reactivo para proporcionar el copolímero 4, Figura 3. La Figura 15, es un diagrama de flujo que muestra las etapas implicadas en la polimerización RAFT.

50 Poli(NMAS): Otro enfoque más ha sido descrito por Müller²⁰ y se usa para unir conjugados de fármacos a la cadena principal del polímero. En este enfoque, Müller polimerizó NMAAS mediante ATRP (Esquema 4, Figura 3), obteniendo polímeros con una masa media en moles que variaba de 12 a 40 KDa con Mw/Mn de aproximadamente 1,1. En sus experimentos, cantidades limitadas de diversos fármacos o imitadores de fármacos que portaban un espaciador y una amina primaria se hicieron reaccionar con los grupos éster de NHS de 5, Figura 3, y seguidamente los sitios restantes se hicieron reaccionar con exceso de Me₂NH. Su iniciador fue el éster hidroxietílico de ácido bromoisobutírico; así, todas las cadenas poliméricas tenían un alcohol primario como grupo final. En la presente memoria, se hicieron reaccionar muestras de 5, Figura 3, con exceso de (L)-NH₂, maximizando el número de grupos (L) que se pueden unir al polímero.

Poli(MAA): Otro aspecto de las enseñanzas de los autores de la presente solicitud, se refiere a las ventajas funcionales específicas de los marcadores poliméricos con una distribución de masas en moles muy estrecha. El ácido polimetacrílico (PMAA) se puede preparar mediante polimerización aniónica de sus ésteres de t-butilo o trimetilsililo (TMS). Si la reacción se termina con óxido de etileno antes de la hidrólisis del éster (Figura 4), el polímero portará un $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ como un grupo final funcional. Una ruta para unir (L) al polímero implica hacer reaccionar la sal de carboxilato de tetrabutilamonio del polímero con el derivado de bromoacetamida de (L) — NH_2 (Esquema 5, Figura 4).

Poli(DMAEMA): Recientemente, se prepararon muestras de poli(dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) mediante ATRP²¹. Este es un polímero bien conocido que se prepara convenientemente, con valores medios de M_n que varían de 2 a 35 KDa con M_w/M_n de aproximadamente 1,2. Este polímero también se puede sintetizar mediante polimerización aniónica con una distribución de tamaños más estrecha²². Este polímero se puede hacer reaccionar con el derivado de bromoacetamida de (L) — NH_2 . Esto proporciona un polímero zwitteriónico 8, Esquema 6, Figura 4, que tiene una adecuada solubilidad en agua. Los grupos dimetilaminoetilo sin reaccionar serán protonados a un pH neutro y aportan una pequeña carga positiva al polímero.

Espaciadores: Una fuente potencial de interferencia entre un marcador de polímero que porta metal y la actividad del reactivo de afinidad, es la gran proximidad del polímero voluminoso cuando se une al reactivo de afinidad. Espaciadores, por ejemplo, los espaciadores de PEG, se pueden situar entre el enlazante y el polímero o entre el polímero y el enlazante. Los métodos para la adición de espaciadores son conocidos por los expertos en la técnica.

El espaciador también puede ser una parte integral de la cadena principal del polímero para ayudar a mitigar este problema. En las enseñanzas de los autores de la presente solicitud, la síntesis (por ejemplo, véase los esquemas 4 - 6, las figuras 3 y 4) se pueden modificar para crear copolímero de bloques de PEG. La porción de PEG del copolímero de bloques sirve como un espaciador de PEG, y las estrategias de síntesis hacen posible variar la longitud del espaciador de PEG, según se necesite, en respuesta a los resultados de bioensayos que indican problemas en la eficacia o la sensibilidad de la unión. El espaciador puede ser cualquier espaciador como es conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede ser un espaciador mínimo como se muestra en el Esquema 12 y Compuesto 12. Esta representación específica parece ser nueva, puesto que los autores de esta descripción no tienen constancia de su aplicación anterior.

Reacciones químicas de grupo control final y de acoplamiento: Según la revisión de Chapman sobre anticuerpos PEGilados¹³, los enfoques sobre la unión del PEG a través de la reacción con el grupo amino libre de la lisina fueron exitosos, pero los anticuerpos PEGilados obtenidos mostraron una reducida eficacia de unión al antígeno. Parece que la naturaleza aleatoria de la reacción química a los diversos grupos de lisina en el anticuerpo, ocasionaron una unión de PEG en sitios que interfirieron con la unión. Un mejor resultado se obtuvo en el caso donde se unió una cadena de PEG específicamente a una sola cisteína en el fragmento FC, que se introdujo en el anticuerpo a través de mutación específica de sitio. En la presente memoria se describe la reducción de un enlace disulfuro en el fragmento FC del anticuerpo, seguido de la unión covalente de los polímeros a uno o ambos de los grupos $-\text{SH}$ formados. Así, un grupo reactivo tiol se puede usar en un terminal de los polímeros.

Polímeros RAFT: el grupo final de tiobenzoato de polímeros RAFT se convierte convenientemente en un grupo $-\text{SH}$ terminal. Esta reacción química se muestra en el Esquema 7a, Figura 5, para el polímero 4, Figura 3. Numerosos métodos son conocidos por los expertos en la técnica de tioles reticulantes, por analogía con reacciones descritas para el polietilenglicol terminado en $-\text{SH}$ (PEG-SH)²³, y permiten la unión del polímero a través del disulfuro mixto al $-\text{SH}$ libre de un anticuerpo u otro reactivo de afinidad (denominado "proteína-SH"). Alternativamente, los derivados de bismaleimida están comercialmente disponible y la alquilación del polímero con estos reactivos seguida de purificación por cromatografía de permeación en gel (GPC, del inglés Gel Permeation Chromatography) y la reacción con el tiol libre del anticuerpo u otro reactivo de afinidad proporciona el conjugado deseado²⁴.

Polímeros ATRP: Polímeros de la estructura 5, Figura 3, descritos por el grupo de Müller²⁵ tienen un grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ terminal. En la invención se describe un iniciador diferente para la reacción de polimerización. Los derivados de 2,6-naftaleno están fácilmente disponibles y proporcionarán una amina ortogonalmente protegida. Después de la desprotección, la reacción de la amina con una NHS-maleimida bifuncional, el agente reticulante de tiol-amina proporcionará el agente marcador polimérico para la conjugación del anticuerpo. Este iniciador también proporciona un cromóforo conveniente para la cuantificación del polímero. Esto también se muestra en el Esquema 7b, Figura 5.

Polimerización aniónica (Esquema 5, Figura 4): las polimerización aniónicas a menudo se pueden terminar mediante la reacción con electrófilos funcionales para introducir un grupo final al polímero²⁶. Los enolates reaccionan eficazmente con haluros alílicos y bencílicos²⁷. La polimerización de estireno por enfriamiento con epíclorohidrina ha demostrado ser problemática²⁸. En la presente memoria se describen las condiciones para enfriar el extremo de un poli(t-butil-metacrilato) vivo para proporcionar el epóxido terminal. Aunque el metacrilato de glicidilo se puede polimerizar aniónicamente a baja temperatura en presencia de LiCl , lo que hace al anión propagante menos nucleófilo²⁹, se espera que el enolato de metacrilato de t-butilo abra el anillo de un grupo epoxi a temperatura más elevada³⁰. Abrir el epóxido con azida proporciona un grupo funcional ortogonal estable en condiciones de hidrólisis de éster. El tratamiento de azidas con un alquino en presencia de sales de Cu(I) produce triazoles de alto

rendimiento³¹. Al usar esta reacción de acoplamiento se instala una maleimida reactiva a tiol en el terminal del polímero. Esto también se muestra en el Esquema 7c, Figura 5.

Grupos de unión (enlazantes): El grupo de unión proporciona un enlace covalente entre moléculas (proteínas, péptidos, oligonucleótidos) bio-orgánicas, por ejemplo, reactivos de afinidad, y el marcador elemental. Por ejemplo, el enlace se pueden efectuar a través de tioles usando un grupo de unión maleimido; a través del N-terminal o cadena lateral básica (lisina, arginina, histidina) (véase, Esquema 8c, Figura 6), a través del C-terminal o cadena lateral ácida (ácido aspártico, ácido glutámico) usando p-(clorometil)estireno (véase, Esquema 8c, Figura 6), o a través de oxidación del resto azúcar en el anticuerpo u otro reactivo de afinidad y acoplamiento a través de grupo hidrazina. Se pueden aprovechar los grupos tiol creados mediante reducción del enlace disulfuro en el fragmento FC del anticuerpo. Se cree que esta combinación "molécula bio-orgánica – grupo de unión - marcador elemental" se describe por primera vez en la presente memoria.

Ejemplo funcional de reacciones químicas de acoplamiento: existen cuatro reacciones químicas principales que se usan comúnmente para unir polímeros (tal como PEG) a los tioles libres de las proteínas. Recientemente, se han revisado las ventajas y desventajas de cada una de estas reacciones³². Un enfoque implica intercambio de disulfuro como se muestra en el Esquema 7a, Figura 5. Tres otras reacciones comunes implican la adición de -SH a una maleimida o a una vinil sulfona y el desplazamiento de yoduro de una yodoacetamida (Esquemas 8a-c, Figura 6). Para evitar la lenta hidrólisis en agua, que es típica de los grupos maleimida y yodoacetamida, es posible una estrategia en la cual el agente reactivo a tiol se añade al extremo del polímero que porta (L) justo antes de marcar el reactivo de afinidad. Esta estrategia se aprovecha de la reacción química "click" desarrollada recientemente por Sharpless³³ (Esquema 8b, La figura 6) que implica la adición de 1,3-dipolar de azidas a acetilenos, una reacción que Sharpless ha demostrado que se produce en condiciones suaves con rendimiento cuantitativo. Para introducir la unidad de acetileno en el extremo de los polímeros que portan un grupo terminal -NH₂, estos se hacen reaccionar con un derivado de éster activo de ácido 4-pentínico. A continuación, el polímero se prepara para una reacción con un derivado de la forma X-R-N₃, donde R es el espaciador y X representa el grupo reactivo a tiol.

El acoplamiento del polímero a un anticuerpo u otro reactivo de afinidad: como ejemplo, la reducción de los enlaces disulfuro en un anticuerpo u otro reactivo de afinidad se pueden realizar usando trialquilfosfina inmovilizada TCEP (clorohidrato de tris[2-carboxietil] fosfina) unido covalentemente a un soporte de agarosa en gránulos (Pierce). El TCEP es conocido por ser un reductor eficaz de disulfuros de alquilo en un amplio intervalo de pH y no interfiere con reactivos que reaccionan a sulfhidrilo comúnmente usados, tales como reticulantes de maleimida. El uso de gránulos permite recuperar el anticuerpo reducido u otro reactivo de afinidad mediante centrifugación simple del agente reductor con posterior separación de los gránulos.

Purificación de anticuerpos modificados con polímero: debido al gran tamaño de los anticuerpos IgG (150 KDa) una opción es separar el exceso de polímero marcador metalado (20-40 KDa) del anticuerpo usando cromatografía de filtración en gel. Alternativamente, se han usado la proteína A y la proteína G para purificar los anticuerpos.

Como es conocido por los expertos en la técnica, los átomos elementales o metálicos se pueden añadir al marcador polimérico en diferentes etapas durante la producción de la biomolécula marcada. Es beneficioso añadir el elemento (metal) del marcador después de la conjugación del anticuerpo u otro reactivo de afinidad con el ligando-polímero. Esta estrategia tiene varias ventajas: i) la conversión del conjugado anticuerpo-ligando-polímero en conjugado anticuerpo-metal-polímero se puede realizar directamente antes del bio-ensayo; ii) la multitud de moléculas de afinidad se pueden marcar con el mismo conjugado ligando-polímero en las mismas condiciones. La elección del metal (oisótopo) a usar, puede determinarse directamente antes del experimento de multiplexado por parte del usuario del reactivo, aumentando significativamente la flexibilidad experimental; iii) el desacoplamiento de ambas etapas de marcaje permiten una serie de importantes experimentos de control independiente, en los cuales el mismo anticuerpo se puede marcar con diferentes metales; iv) la selección de los patrones internos no se impide, y la sensibilidad relativa del analizador elemental se puede controlar eficazmente.

El orden de las etapas para la síntesis de la biomolécula marcada puede tomar muchas formas. A continuación, se proporcionan tres ejemplos, pero se entiende que son posibles otros órdenes de etapas:

A	B	C
Sintetizar el polímero	Sintetizar el polímero	Sintetizar el polímero
Unir el metal al polímero	Unir el enlazante al polímero	Unir el enlazante al polímero
Unir el enlazante al polímero	Unir el metal al polímero	Unir el enlazante al anticuerpo
Unir el enlazante al anticuerpo	Unir el enlazante al anticuerpo	Unir el metal al polímero

Asimismo, el enlazante se puede unir a la biomolécula antes de unir el enlazante al polímero. Lo más frecuente, es que los metales se unan en cualquier momento antes de unir el reactivo de afinidad marcado al analito. Es posible

añadir los metales después de unir el reactivo de afinidad al analito, pero se espera que la interferencia del medio sea elevada debido a que muchos analitos, y en particular células, se unirán a metales no específicamente. Es por lo tanto, menos probable que se realice exitosamente después de unir el reactivo de afinidad al analito.

5 Igualmente, el marcador elemental polimérico se puede unir a una biomolécula que no sea un reactivo de afinidad. Por ejemplo, el marcador elemental polimérico se puede unir directamente a un analito, por ejemplo, pero no limitado a, un factor de crecimiento, citosina o quimiosina para estudiar la cinética de las interacciones de ligando-receptor. Específicamente, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor) con marcador elemental polimérico se puede usar como una sonda, para investigar la abundancia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés epidermal growth factor receptor) en la superficie de la célula, dimerización e internalización del receptor. Este aspecto también está dentro del alcance de las enseñanzas de los autores de la presente solicitud. Asimismo, se pueden analizar dos o más analitos en una reacción multiplexada.

10 Aspectos de las enseñanzas de los autores de la presente solicitud se pueden entender mejor a través de los siguientes ejemplos, que no se deben de considerar de ninguna manera como limitativos del alcance de las enseñanzas de la presente descripción.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de copolímeros de N,N-dimetilacrilamida y N-acriloxisuccinimida mediante polimerización RAFT.

Se copolimerizaron N,N-dimetilacrilamida (DMA) y N-acriloxisuccinimida (NAS) mediante la técnica de polimerización de transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT), para obtener precursores de copolímeros aleatorios con grupos laterales estadísticamente injertados a través de unidades de NAS reactivas¹⁹. Los copolímeros aleatorios de DMA y NAS, poli(DMA-co-NAS), se prepararon usando ditiobenzoato de terc-butilo (t-BDB) como agente de transferencia de cadena (CTA) (Esquema 9, Figura 7).

Preparación de ditiobenzoato de terc-butilo (t-BDB).³⁴ En un matraz de fondo redondo de 500 mL provisto de un agitador magnético, se añadieron 150 mL de una disolución de éter dietílico de ácido s-(tiobenzoi)tioglicólico (0,27 g, 2,4 mmol) a 100 mL de una disolución básica acuosa (NaOH, 1 mol L⁻¹) de 2-metil-2-propanotiolato de sodio (0,510 g, 2,9 mmol). Esta mezcla bifásica se mezcló vigorosamente a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, se retiró la fase de éter color púrpura y se lavó dos veces con 500 mL de una disolución básica acuosa (NaOH 1 mol L⁻¹) y dos veces con 500 mL de una disolución acuosa de NaCl al 10% y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Purificación mediante cromatografía en gel de sílice (Kieselgel-60) con éter de petróleo y acetato de etilo (99/1: v/v) como diluyente dio ditiobenzoato de terc-butilo (t-BDB) como un aceite de color púrpura oscuro (rendimiento del 90%). RMN de ¹H (CDCl₃) d (ppm): 1,69 (s, 9H, 3^xCH₃), 7,36 (m, 2H, meta-ArH), 7,50 (m, 1 H, para-ArH) y 7,88 (m, 2H, orto-ArH).

Preparación de N-acriloxisuccinimida (NAS).³⁵ Se disolvieron N-hidroxisuccinimida (10 g, 0,086 mol) y trietilamina (13,2 g, 0,129 mol) en cloroformo (130 mL) a 0°C. Se añadió cloruro de acróilo (8,6 g, 0,094 mol) gota a gota durante un período de 2 horas a la mezcla de reacción agitada. La reacción se describe en el Esquema 1, Figura 2. Después de agitar 30 minutos adicionales a 0°C, la disolución se lavó dos veces con 60 mL de una disolución acuosa de NaCl saturada, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró de manera de obtener un volumen residual de 30 mL. Se añadió una mezcla de acetato de etilo/pentano (14 mL, 1:3 v/v) y la temperatura se mantuvo a 0°C para inducir la cristalización de NAS durante toda la noche (rendimiento del 70%). RMN de ¹H (CDCl₃) d (ppm): 2,95 (s, 4H, CH₂CH₂), 6,20 (m, 1 H, CH=CH₂), 6,4 (m, 1 H, CH=CH₂) y 6,75 (m, 1 H, CH=CH₂).

40 Preparación de copolímeros aleatorios de DMA y NAS. Condiciones experimentales generales: se destiló DMA bajo presión reducida antes de usar. Se introdujeron monómeros, t-BDB, iniciador 2,2'-azobis(2-metilbutironitrilo) (AMBN) y disolvente dioxano en un tubo Schlenk provisto de un agitador magnético. La mezcla se desgasificó mediante tres ciclos de congelación-vacío-descongelación y seguidamente se calentó bajo argón en un baño de aceite termostataado a 80°C. Los rendimientos en porcentajes se calcularon gravimétricamente.

45 La estructura de los copolímeros se ha verificado mediante la aplicación de métodos cromatográficos y espectrométricos apropiados. Se ha usado cromatografía de permeación en gel (GPC) para establecer el peso molecular y la distribución de pesos moleculares de los copolímeros. Se usó un cromatógrafo líquido Viscotek provisto de un detector UV/vis Viscotek VE3210 y un detector de índice de refracción VE3580 y una columna de GPC Viscotek GMHHR-M Viscogel™. El caudal se mantuvo a 0,5 mL min⁻¹ usando una bomba de GPC Viscotek VE1121. Se usó 1-metil-2-pirrolidinona como diluyente. Los pesos moleculares se proporcionan como equivalentes de poliestireno. La Figura 15, es un diagrama de flujo del procedimiento de polimerización RAFT.

55 Preparación de copolímero que contiene 13% en moles de unidades de NAS. Se añadieron NAS (0,81 g, 4,82 mmol), DMA (3,2 mL, 31 mmol), AMBN (70 mg, 0,36 mmol) y t-BDB (116 mg, 0,521 mmol) en 33 mL de 1,4-dioxane. La disolución se desgasificó en un tubo Schlenk y se calentó a 80°C durante 18 horas. A continuación, la disolución se enfrió y se precipitó en 300 mL de éter dietílico. El sólido recogido se volvió a disolver en 1,4-dioxano y se precipitó en éter dietílico. El rendimiento del polímero seco fue de 75%. El peso molecular y la polidispersidad se muestran en la Figura 8.

Preparación de copolímero que contiene 47% en moles de unidades de NAS. Se añadieron NAS (2,33 g, 13,9 mmol), DMA (N,N-dimetilacrilamida 1,6 mL, 15,5 mmol), AMBN (70 mg, 0,36 mmol) t-BDB (116 mg, 0,521 mmol) en 30 mL de 1,4-dioxano. La disolución se desgasificó en un tubo Schlenk y se calentó a 80°C durante 18 horas. Se observó una somera precipitación en el tubo. A continuación, la disolución se enfrió y precipitó en 300 mL de éter dietílico. El sólido recogido se volvió a disolver en DMF y se precipitó en 300 mL de éter dietílico. El rendimiento del polímero seco fue de 80%. El peso molecular y la polidispersidad se muestran en la Figura 8.

Preparación de copolímero que contiene 60% en moles de unidades de NAS. Se preparó mediante un procedimiento similar al mencionado previamente (47% en moles de unidades de NAS). Se añadió más monómero de NAS y se sustituyó el disolvente 1,4-dioxano por DMF. El rendimiento del polímero seco fue de 80%. El peso molecular y la polidispersidad se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 2. Preparación de conjugado ligando-polímero.

La siguiente preparación del conjugado ligando-polímero es adecuada para usar con cualquier ligando funcionalizado de amina según Esquema 10 y Esquema 11, Figura 9.

A una disolución agitada del copolímero de (N,N-dimetilacrilamida (DMA) y N-acriloxisuccinimida (NAS)) que contiene 47% en moles de unidades de NAS (35 mg, 3,5461 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (300µl) en DMF/H₂O (60:40, 1 mL) se añadió una disolución del ligando colgante de amina **9**, Figura 9 (78 mg) en la misma mezcla (2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se retiró al vacío y los sólidos se disolvieron en H₂O. Las disoluciones se dializaron mediante lavados repetidos con agua desionizada (5x 4mL) en un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.) La disolución retenida en el dispositivo filtrante se concentró obteniéndose un sólido amarillento. El sólido se purificó posteriormente mediante precipitación de metanol con dietiléter para proporcionar un polvo amarillo (48 mg).

El conjugado ligando-polímero (5,5 mg) se disolvió en 1 mL de tampón fosfato 50 mM, (pH 8,5, 2 mL de DTT 20 mM) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 50°C. Después de la reacción, la mezcla se hizo ácida (pH 4) con ácido acético y se lavó en un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.) con ácido acético acuoso (5mM, 5x 4 mL). La disolución retenida en el dispositivo filtrante se transfirió luego a un pequeño matraz de reacción que contenía 2 mL de tampón fosfato 100 mM, pH 8,5. Una disolución de 1,4-bis(maleimido)butano (50 equiv.; 32 mg) en DMF se añadió en el matraz y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a 50 °C El disolvente se evaporó para proporcionar un residuo, el cual se disolvió en H₂O, y la disolución transparente se lavó de nuevo usando un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.) con agua desionizada (5x 5mL). Se liofilizó el sobrenadante para proporcionar el polímero conjugado final (4 mg).

Ejemplo 3. Preparación de conjugado ligando-polímero: conjugado basado en DOTA según Esquema 12, Figura 10.

A una disolución agitada de copolímero DMA-NAS con 60% en moles de unidades de NAS (100 mg) en DMF (3 mL) y trietilamina (1 mL) se añadió una disolución de ligando colgante de amina **10** (363 mg, 0,590 mmol) en DMF (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de retirar el disolvente al vacío, el residuo **11** se disolvió en ácido trifluoroacético puro (3 mL) y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La disolución se evaporó, y el residuo se llevó en agua y se dializó con lavados repetidos con agua desionizada (6x 5 ml) en un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.). La disolución retenida en el dispositivo filtrante (ca. 0,8 mL) se concentró para obtener un sólido amarillo **12** (179 mg).

La muestra entera de conjugado polímero-ligando **12** se disolvió en tampón fosfato 50 mM (pH 8,5, 2 mL) que contenía DL-ditiotreititol 20 mM, y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 50°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se acidificó a un pH 4 con ácido acético, se lavó en un filtro centrífugo Amicon (5 K MW C.O.) con ácido acético acuoso (5 mM, 5x5 mL). La disolución retenida en el dispositivo filtrante (0,8 mL) se transfirió luego a un pequeño matraz de reacción que contenía tampón fosfato (100 mM, pH 8,5, 5 mL). Se añadió una disolución de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilmaleimida) (191 mg, 0,619 mmol) en DMF (2 mL) en el matraz y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió agua (3 mL) en el matraz y se retiró el sólido mediante filtración. La disolución transparente resultante se lavó de nuevo con agua desionizada (5X 5 mL) usando un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.) y el sobrenadante se purificó mediante una columna Sephadex G-50 con sistema HPLC usando agua como diluyente. La fracción se recogió y liofilizó para proporcionar el polímero conjugado final **13** (165,0 mg).

Ejemplo 4. Preparación de conjugado ligando-polímero: conjugado basado en DTPA según las figuras 9, 11 y Figura 16.

A una disolución agitada de copolímero DMA-NAS con 60% en moles de unidades de (2,0 g) en DMF (30 mL) y trietilamina (4,3 mL) se añadió una disolución de terc-butyl-2-aminoetilcarbamato, **14** (2,5 g, 15,6 mmol) en DMF (10 mL). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se precipitó en 500 mL de éter dietílico. El sólido recogido **15** (400 mg) se disolvió en ácido trifluoroacético puro (3 mL) y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La disolución se evaporó, y el residuo se llevó en agua y se dializó con lavados repetidos con agua desionizada (6x 5 ml) en un filtro centrífugo Amicon (5K MW C.O.). La disolución retenida en el dispositivo filtrante (ca. 0,8 mL) se concentró para obtener un sólido amarillo **16** (210 mg).

El éster succinimídico de DTPA se preparó según un procedimiento publicado.³⁶ Se disolvieron 16 g de DTPA (40,64 mmol) en 320 mL de acetonitrilo (23 g, 230 mmol de trietilamina añadida). La disolución se agitó a 50°C para disolver el DTPA. Se añadieron 3,36 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 16,3 mmol) y 1,9 g de N-hidroxisuccinimida (NHS, 16,3 mmol) simultáneamente a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo durante la noche. Se observó un precipitado blanco y se filtró con papel filtro, generando una disolución (A).

Se disolvieron 210 mg de sólido **16** (ca. 0,8 mmol de grupos amino) en 80 mL de agua destilada y se añadió a la disolución (A) a temperatura ambiente. Se añadieron 5 mL de trietilamina, y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se evaporaron los disolventes (trietilamina, acetonitrilo) y se añadieron 100 mL de agua. La disolución se dializó (membrana cortada de 1 K) durante dos días. Seguidamente, la disolución acuosa se concentró y se añadió ácido acético. Esta se dializó de nuevo con la misma membrana durante otros tres días. La disolución se concentró para proporcionar un sólido **17** (190 mg).

Se disolvió el sólido **17** (110 mg) en 2,3 mL de una disolución tamponada de fosfato (pH 7,2). A continuación, se añadió tri(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 0,18 mL de una disolución 0,5 M) a la disolución tamponada a temperatura ambiente. Después de agitar la disolución durante 2 horas, esta se añadió a 2,2'-(etilenedioxi)-bis(etilmaleimida) (0,36 mmol, 106 mg) en 2,3 mL de DMF a temperatura ambiente. Después de 2 horas se añadieron 100 mL de agua destilada y la disolución se filtró a través de una membrana cortada de 5k con DMSO al 5%/agua (2 veces) y luego agua destilada (3 veces). La fracción se recogió y liofilizó para proporcionar el polímero conjugado final **18** (90 mg). La Figura 16, es un diagrama de flujo que muestra el procedimiento para los procedimientos de unión de polímero-DTPA-enlazante.

Ejemplo 5. Preparación de conjugado ligando-polímero: Poli(MAA) o Poli(AA).

Un aspecto de la invención se refiere a las ventajas funcionales específicas de los marcadores poliméricos con una distribución de masa en moles muy estrecha. El ácido polimetacrílico [Poli(MAA)] o el ácido poliacrílico [Poli(AA)] se pueden preparar mediante polimerización aniónica de su éster de t-butilo o trimetilsililo (TMS).³⁷ Si la reacción se termina con sulfuro de terc-butildimetilsilil 3-cloropropilo,³⁸ antes de la hidrólisis del éster (véase más adelante), el polímero portará un grupo final funcional -SH protegido. Estos se hacen reaccionar con terc-butilo-2-aminoetilcarbamato para formar un polímero con grupos amino protegidos, que se hidroliza luego para formar el polímero **19** (Figura 12, Esquema 13). Los grupos amino libres sobre la cadena principal de polímero **19** ofrece sitios para la unión de quelato. La ruta para unir quelato se refiere al procedimiento anterior usando éster succinimídico DTPA (Figura 11).

Poli(NMAS). Otro enfoque ha sido descrito por Müller³⁹ y se usa para unir conjugados de fármacos a la cadena principal del polímero. En este enfoque, NMAS se polimerizó mediante ATRP, obteniéndose polímeros con una masa media en moles que varían de 12 a 40 KDa con Mw/Mn de aproximadamente 1,1. El iniciador usado fue éster hidroxietílico de ácido bromoisobutírico; así todas las cadenas poliméricas tenían un alcohol primario como grupo final. En la presente memoria se puede preparar un iniciador nuevo basado en cistamina **20** (Figura 12, Esquema 14). A continuación, éste se usa en el ATRP de NMAS para formar un polímero **21** (Figura 12, Esquema 14) con grupo disulfuro. El polímero **21** se puede hacer reaccionar con terc-butil-2-aminoetilcarbamato como se muestra en la Figura 12, Esquema 13 para generar un polímero con grupos amino colgantes para la unión de los ligandos de DTPA. Al usar tri(2-carboxietil)fosfina (TCEP), el enlace disulfuro se redujo y se generó un grupo final tiol para unir un enlazante a un anticuerpo (Figura 12, Esquema 15).

Ejemplo 6. Marcaje multiplexante de células de leucemia.

Las células K562, una línea de células modelo de leucemia mieloide crónica humana, se cultivaron bajo condiciones habituales de cultivo de tejidos en DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con FBS al 10% (suero fetal bovino), L-glutamina 2mM, y antibióticos. Se recogieron las células crecientes mediante centrifugación a baja velocidad (500 x g), se lavaron una vez con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 y se inmunomarcaron con anticuerpos primarios unidos al conjugado metal-polímero (Ho, Dy, Nd, Eu, Pr, o La por separado para cada anticuerpo) como se describe en Esquema 10 y Esquema 11 (Figura 9). Se seleccionaron seis anticuerpos específicos de superficie celular para el experimento: CD38, CD110, CD61, CD45, CD54, CD49d. Se marcaron alícuotas de células en tubos triplicados (0,3x10⁶) con cada anticuerpo por separado o con todos los anticuerpos combinados en una mezcla de reacción (muestra ALL). Como grupo control negativo, las inmunoglobulinas isotipo IgG1 de ratón se unieron a los conjugados metal-polímero que portaban los mismos elementos que los anticuerpos primarios- Ho, Dy, Nd, Eu, Pr, o La. Después de 30 minutos incubando sobre hielo, las células se lavaron con PBS tres veces mediante centrifugación. El pellet celular final se disolvió en HCl concentrado (35%), se mezcló con un volumen equivalente a 1 ppb de una disolución de Ir/HCl como estándar interno y se sometió a análisis de volumen por ICP-MS. Los resultados se presentan en la Figura 13.

Los anticuerpos se unieron a un conjugado metal-polímero (sintetizado según Esquema 10 y Esquema 11, Figura 9) según el protocolo y reactivos siguientes.

Reactivos: Anticuerpo al menos 100-150 µg (~1 nmol) en 100 µl PBS/EDTA (~1 mg/ml). Los anticuerpos se adquirieron comercialmente en BD Biosciences, San Jose, CA).

ES 2 553 141 T3

Gel TCEP reductor de disulfuro (4% de gránulos de agarosa reticulados) de Pierce nº 77712; suministrado como suspensión al 50%. Usado en una relación suspensión (50%) a anticuerpo v/v de 1:1.

Conjugado ligando-polímero (véase Esquema 11, Figura 9) disuelto en agua destilada doble (ddH₂O). MW esperado 11.000.

5 Tampón R es fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2, EDTA 2,5 mM.

Tampón C es TBS, EDTA 1 mM.

Tampón L es acetato de amonio 20 mM, pH 6,0.

Reducción de enlaces disulfuro IgG: se añadieron 200 µL de tampón R y 50 µL de disolución de anticuerpo a una membrana de diafiltración.

10 Se centrifugaron 10.000 g durante 10 minutos. Se desechó el flujo. Se repitió una vez.

Se añadieron 100 µL de tampón R y 0,8 µL de disolución de TCEP 0,5M a la membrana de diafiltración y se mezcló suavemente (TCEP 4mM). No se aplicó mezclado de vórtice.

Se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se añadieron 200 µL de tampón C. Se centrifugaron 10.000 g durante 10 minutos. Se desechó el flujo.

15 Se marcó IgG reducido: Se añadió 200 µL de tampón C a la membrana.

Se preparó el marcador elemental en tampón C con una concentración de 1 mM (1,1 mg de marcador elemental en 50 µL de tampón C).

Se añadieron 10 µL del marcador elemental preparado al tubo que contenía 200 µL de la disolución de IgG reducido y se mezcló bien. No se aplicó mezclado de vórtice.

20 Se dejó que la reacción continuara al menos durante 1 hora a 37°C.

Se añadieron 200 µL de tampón L a la membrana. Se centrifugaron 10.000 g durante 10 minutos. Se desechó el flujo. Se repitió dos veces.

Se añadieron 100 µL de tampón L a la membrana para volver a suspender el anticuerpo marcado.

25 Se añadieron 5 µL de una disolución lantánido 0,1 M (preparado en agua ultrapura como es conocido por los expertos en la técnica) al anticuerpo conjugado con el marcador polimérico. Se mezcló bien. No se aplicó mezclado de vórtice.

Se Incubó durante 30-60 minutos a 37°C.

Se añadieron 300 µL de TBS. Se centrifugaron 10.000 g durante 10 minutos. Se desechó el flujo. Se repitió tres veces.

30 Se añadieron 50 µL de TBS. Se pipeteó varias veces para recuperar el conjugado y se transfirió a un tubo Eppendorf.

Aunque se usó ICP-MS en este análisis, se entiende que otras formas de análisis elemental que se podrían haber usado se incluyen dentro del alcance de las enseñanzas de los autores de la presente solicitud.

35 Asimismo, aunque las células de leucemia se marcaron como el analito se entiende que cualquier célula o partícula se puede analizar de manera similar.

Ejemplo 7. Análisis anticuerpos doblemente marcados – marcador fluorescente y marcador elemental.

En este ejemplo, anticuerpos doblemente marcados facilitan la preclasificación y subsiguiente análisis elemental de células raras en muestras mixtas mediante citometría de flujo basada en ICP-MS.

40 Se realizó un demostración ilustrativa de congruencia de resultados recogidos por citometría de flujo (FACS) y ICP-MS de células teñidas con anticuerpos doblemente marcados (CD33- FITC-Pr).

Los anticuerpos monoclonales frente al antígeno de superficie celular CD33 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CD33-FITC; GenTex Inc.) se marcaron con la construcción polímero-DOTA-Pr. Este anticuerpo doblemente marcado se denominará en lo sucesivo CD33-FITC-Pr. Se usaron varias líneas de célula de leucemia humana bien caracterizadas (KG1 a, THP-1, Kasumi-3; ATCC Inc.) en estudio de tinción de células. Se llevó a cabo análisis FACS en un instrumento citómetro de flujo FACScalibur™ (BD Biosciences Inc.). Los datos de ICP- MS se

45

obtuvieron usando ELAN DRCPlus (Perkin Elmer SCIEX). Se lavaron las células vivas mediante centrifugación a baja velocidad y se encubieron con CD33-FITC-Pr o CD33-FITC o CD33-Pr para controles de expresión del antígeno. Se monitorizó la unión de la inmunoglobulina no específica con IgG-FITC, IgG-Pr o IgG-FITC-Pr doblemente marcado de ratón. Los resultados presentados en la Figura 14a, muestran que la fluorescencia obtenida de células teñidas con CD33-FITC-Pr doblemente marcado, son similares a CD33-FITC en todas las líneas celulares sometidas a ensayo. Hay que señalar que la línea celular KG1a no expresa CD33.

Igualmente, cuando la expresión CD33 se sometió a ensayo usando anticuerpos CD33-Pr y CD33-FITC-Pr doblemente marcados con marcador elemental (Figura 14b), las respuestas normalizadas fueron similares.

Ejemplo 8. Análisis elemental de partículas usando un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masas.

Los marcadores de conjugado metal-polímero permiten el ensayo multiplexado en formato de un sola célula para distinguir una célula rara (por ejemplo, enferma) en una muestra compleja (por ejemplo, sangre). El método se puede usar para identificar células de leucemia en una muestra de sangre del paciente, empleando marcadores de metal-polímero conjugados a anticuerpos específicos, que reconocen los antígenos de superficie celular presentes en las células de leucemia. Por ejemplo, una tinción multiplexada positiva de algunas células de la muestra mononuclear de sangre periférica con anticuerpos frente a CD33, CD34, CD38, CD13, CD15, CD36 (marcados con metales diferentes) y analizada en un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masa, indicaría que el paciente esta desarrollando un leucemia monoblástica aguda (AML-M5). De manera similar, este método se puede usar para identificar y cuantificar otras células, o partículas.

Ejemplo 9 Kits

La invención abarca kits útiles para la preparación de los marcadores elementales y para llevar a cabo los métodos de la invención. Los kits pueden incluir al menos uno de los siguientes elementos:

un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal, y que comprende además un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula, una disolución metálica, reactivos para la unión del enlazante, espaciador o biomolécula al polímero, reactivos para la unión de un grupo funcional al enlazante o al espaciador, reactivos para la unión de un metal al polímero, reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos, tampones, instrucciones para preparar el marcador elemental, instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad, instrucciones para unir un metal al marcador elemental e instrucciones para usar los marcadores elementales para el análisis de analitos mediante análisis elemental. Por ejemplo, el polímero puede ser homopolímeros o copolímeros de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico y ácido metacrílico. Los reactivos se pueden elegir de al menos uno de los siguientes: TCEP (tri(2-carboxietil)fosfina), conjugado de ligando-polímero-enlazante-espaciador, tampón fosfato, TBS (disolución salina tamponada con Tris), EDTA (ácido diaminoetanotetraacético), tampón de acetato de amonio, anticuerpos, disolución de sal metálica, disolución de sales de lantánidos, tampones bloqueadores, tampones de lavado, FBS (suero fetal bovino), DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco), BSA (albúmina de suero bovino), ditiotreitol, bismaleimida, y DMF (dimetilformamida). El polímero proporcionado se puede unir a un enlazante o se puede unir a un enlazante y a un espaciador.

Todas las referencias citadas se incorporan como referencia.

Aunque las enseñanzas de los autores de la presente solicitud se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que estas enseñanzas se limiten a estas realizaciones. Al contrario, las enseñanzas de los autores de la presente solicitud abarcan diversas alternativas, modificaciones, equivalentes, como serán evidentes para los expertos en la técnica.

Lista de referencias.

1. Baranov, V. I.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. *European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, Hafjell, Noruega 2001, Book of Abstracts, p. 85.
2. Baranov, V. I.; Quinn, Z.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. *Anal.Chem.* 2002, Vol. 74, pp. 1629-36.
3. Baranov, V. I.; Quinn, Z. A.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. *J.Anal.Atom.Spectrom.* 2002, Vol. 17, pp. 1148-52.
4. Quinn, Z. A.; Baranov, V. L.; Tanner, S. D.; Wrana, J. L. *J.Anal.Atom.Spectrom.* 2002, Vol. 17, pp. 892-96.
5. Baranov, V., Tanner, S., Bandura, D., y Quinn, Z. Kit for detecting/measuring transition element, comprising tag having transition element for tagging biologically active material and instruction for tagging material, combining tagged material with analyte, detecting/measuring elements. MDS, S. C. I. E. y MDS INC. [US2004072250-A1; WO2005003767-A2].
6. Baranov, V., Tanner, S., Bandura, D., and Quinn, Z. Detecting and measuring transition elements e.g. isotope or ions, in a sample, comprises tagging biologically active materials, and detecting and measuring reactant complexes

- by an atomic mass or optical spectrometer. MDS, S. C. I. E. y MDS INC. [WO200254075-A; EP1348127-A; US2002086441-A; WO200254075-A1; EP1348127-A1; AU2002215784-A1; JP2004516490-W].
7. Baranov, V. I.; Quinn, Z.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. *Anal.Chem.* 2002, Vol. 74, pp. 1629-36.
- 5 8. Bandura, D. R., Baranov, V., I, Tanner, S., y Tanner, S. D. Elemental flow cytometer, e.g. mass spectrometer or optical emission spectrometer based cytometer used in, e.g. health science, food sciences, environmental sciences, and genomics and proteomics, has spectrometer. Bandura, D. R., Baranov, V., I, Tanner, S., and MDS INC. [US2005218319-A1; WO2005093784-A1].
9. Hsu, K. C; Zabriskie, J. B.; Rifkind, R. A. *Science* 1963, Vol. 142, pp. 1471-&.
- 10 10. Powell, R. D.; Halsey, C. M. R.; Spector, D. L.; Kaurin, S. L.; McCann, J.; Hainfeld, J. F. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997, Vol. 45, pp. 947-56.
11. Riddle, S. M.; Vedvik, K. L.; Hanson, G. T.; Vogel, K. W. *Analytical Biochemistry* 2006, Vol. 356, pp. 108-16.
12. Shunmugam, R.; Tew, G. N. *J.Am.Chem.Soc.* 2005, Vol. 127, pp. 13567-72.
13. Chapman, A. P. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, Vol. 54, pp. 531-45.
14. Guddat, L. W.; Herron, J. N.; Edmundson, A. B. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 1993, Vol. 90, pp. 4271-75.
- 15 15. Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C; Howard, J. A. *Chem.Rev.* 2002, Vol. 102, pp. 1977-2010.
16. Liu, S.; Edwards, D. S. *Bioconjug.Chem.* 2001, Vol. 12, pp. 7-34.
17. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem.Rev.* 1999, Vol. 99, pp. 2293-352.
18. Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A. *Tetrahedron* 1988, Vol. 44, pp. 637-42.
- 20 19. Relógio, P.; Charreyre, M. T. C; Farinha, J. S. P.; Martinho, J. M. G.; Pichot, C. *Polymer* 2004, Vol. 45, pp. 8639-49.
20. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Muller, A. H.; Brocchini, S. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 2001, Vol. 40, pp. 594-97.
21. Wang, X. S.; Dykstra, T. E.; Salvador, M. R.; Manners, L; Scholes, G. D.; Winnik, M. A. *J.Am.Chem.Soc.* 2004, Vol. 126, pp. 7784-85.
- 25 22. Shen, Y.; Zeng, F.; Zhu, S.; Pelton, R. *Macromolecules* 2001, Vol. 34, pp. 144-50.
23. Woghiren, C; Sharma, B.; Stein, S. *Bioconjug.Chem.* 1993, Vol. 4, pp. 314-18.
24. Green, N. S.; Reisler, E.; Houk, K. N. *Protein Sci.* 2001, Vol. 10, pp. 1293-304.
25. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Muller, A. H.; Brocchini, S. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 2001, Vol. 40, pp. 594-97.
26. Hirao, A.; Hayashi, M. *Acta Polymerica* 1999, Vol. 50, pp. 219-31.
- 30 27. Mizawa, T.; Takenaka, K.; Shiomi, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2000, Vol. 55, pp. 237-46.
28. Xie, H. Q.; Pan, S. B.; Guo, J. S. *European Polymer Journal* 2003, Vol. 39, pp. 715-24.
29. Hild, G.; Lamps, J. P.; Rempp, P. *Polymer* 1993, Vol. 34, pp. 2875-82.
30. Takenaka, K.; Hirao, A.; Nakahama, S. *Polymer International* 1995, Vol. 37, pp. 291-95.
- 35 31. Cozzi, P. G.; Hilgraf, R.; Zimmermann, N. *European Journal of Organic Chemistry* 2004.
32. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2002, Vol. 54, pp. 459-76.
33. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Frechet, J. M.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 2004, Vol. 43, pp. 3928-32.
34. Favier, A.; Charreyre, M. T.; Chaumont, P.; Pichot, C. *Macromolecules* 2002, Vol. 35, pp. 8271- 80.
- 40 35. D'Agosto, F.; Charreyre, M. T.; Pichot, C. *Macromolecular Bioscience* 2001, Vol. 1, pp. 322-28.
36. Rebizak, R.; Schaefe, M.; Dellacherie, E. *Bioconjug.Chem.* 1997, Vol. 8, pp. 605-10.

37. Mori, H.; Muller, A. H. *Prog. Polym. Sci* 2003, Vol. 28, pp. 1403-39.

38. Tohyama, M.; Hirao, A.; Nakahama, S.; Takenaka, K. *Macromolecular Chemistry and Physics* 1996, Vol. 197, pp. 3135-48.

39. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Muller, A. H.; Brocchini, S. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2001, Vol. 40, pp. 594-97.

5 La presente invención se refiere además a los siguientes puntos:

1. Un marcador elemental que comprende un polímero, en donde el polímero comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal.
2. El marcador elemental según el punto 1, que comprende además un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula.
3. El marcador elemental según el punto 1, en donde el polímero es soluble en agua.
4. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el polímero está cargado negativamente.
5. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el número de grupos colgantes de unión a metal capaces de unirse a al menos un átomo de metal está entre aproximadamente 1 y 1.000.
6. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el número de grupos colgantes de unión a metal capaces de unirse a al menos un átomo de metal está entre aproximadamente 10 y 250.
7. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde al menos un átomo de metal se une a al menos uno de los grupos colgantes de unión a metal.
8. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en polímeros lineales, copolímeros, polímeros ramificados, copolímeros de injerto, polímeros de bloques, polímeros en estrella, y polímeros hiper-ramificados.
9. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde la cadena principal del polímero se deriva de poli(acrilamida), poli(metacrilato), o poli(metacrilamida) sustituidas.
10. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde la cadena principal del polímero es un derivado sustituido de un homopolímero o copolímero de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico o ácido metacrílico.
11. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el grupo colgante de unión a metal se une al polímero a través de un éster.
12. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el grupo colgante de unión a metal se une al polímero a través de una amida.
13. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el polímero tiene un grado de polimerización de entre aproximadamente 1 y 1.000.
14. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el polímero tiene un grado de polimerización de entre aproximadamente 10 y 250.
15. El marcador elemental según uno cualquiera de los puntos 2 a 14, en donde el grupo funcional es un grupo reactivo a tiol.
16. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el átomo de metal es un elemento de transición o un isótopo del mismo.
17. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el átomo de metal es un lantánido o un isótopo de un lantánido.
18. El marcador elemental según uno cualquiera de los puntos 2 a 17, que comprende además un enlazante unido al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de unirse covalentemente a una biomolécula.
19. El marcador elemental según el punto 18, que comprende además un espaciador unido al enlazante, en donde el espaciador es capaz de unirse a una biomolécula.
20. El marcador elemental según el punto 19, en donde el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG).

21. El marcador elemental según cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende además un espaciador, en donde el espaciador comprende un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador al polímero a través de un grupo funcional reactivo al espaciador en el polímero.
- 5 22. El marcador elemental según el punto 21, en donde el espaciador contiene un grupo funcional que es capaz de unir un enlazante al espaciador.
23. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, que se une covalentemente a una biomolécula.
24. El marcador elemental según cualquiera de los puntos precedentes, en donde el marcador es soluble en agua.
- 10 25. El marcador elemental según uno cualquiera de los puntos 23 o 24, en donde la biomolécula es un reactivo de afinidad.
26. El marcador elemental según el punto 25, en donde el reactivo de afinidad es un anticuerpo.
27. Un reactivo de afinidad con marcaje elemental, en donde el reactivo de afinidad se marca con el marcador elemental según cualquiera de los puntos 1 a 22, y en donde al menos uno de los grupos colgantes se une, o es capaz de unirse, a al menos un átomo de metal.
- 15 28. Un método para preparar el marcador elemental según el punto 1, que comprende:
- (i) proporcionar un polímero; y
 - (ii) unir covalentemente al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unir al menos un átomo de metal al polímero.
- 20 29. El método según el punto 28, en donde la etapa de proporcionar el polímero comprende síntesis del polímero, en donde la síntesis se selecciona del grupo que consiste en polimerización con adición-fragmentación reversible (RAFT), polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP) y polimerización aniónica..
- 25 30. El método según el punto 28, en donde la etapa de proporcionar el polímero comprende síntesis del polímero a partir de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en N-alquil acrilamidas, N,N-dialquil acrilamidas, N-aril acrilamidas, N-alquil metacrilamidas, N,N-dialquil metacrilamidas, N-aril metacrilamidas, ésteres de metacrilato, ésteres de acrilato y equivalentes funcionales de los mismos.
31. El método según uno cualquiera de los puntos 28 a 30, en donde el grupo colgante de unión a metal que es capaz de unirse a al menos un átomo de metal que comprende un ligando de pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) o un ligando de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA).
- 30 32. Un método según uno cualquiera de los puntos 28 a 31, que comprende además funcionalizar el polímero, en donde el grupo funcional es capaz de unirse covalentemente a una biomolécula.
33. El método según el punto 32, que comprende además unir un enlazante al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de unirse a una biomolécula.
34. El método según el punto 33, que comprende además unir covalentemente una biomolécula al enlazante.
- 35 35. El método según el punto 34, que comprende además unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal.
36. Un método para preparar el marcador elemental según el punto 23, que comprende:
- (i) proporcionar un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal, y comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse covalentemente a un enlazante;
 - 40 (ii) unir un enlazante al grupo funcional del polímero, en donde el enlazante es capaz de unirse a una biomolécula;
 - (iii) unir covalentemente una biomolécula al enlazante; y
 - (iv) unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal.
- 45 37. El método según el punto 36, en donde la etapa de unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se lleva a cabo antes de la etapa (ii).
38. El método según el punto 36, en donde la etapa de unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se lleva a cabo antes de la etapa (iii).

- 39.** El método según el punto 36, en donde la etapa de unir al menos un átomo de metal a al menos un grupo colgante de unión a metal se lleva a cabo después de la etapa (iii).
- 40.** El método según el punto 36, que comprende además una etapa de unir un espaciador al enlazante, en donde el espaciador se sitúa entre el enlazante y la biomolécula.
- 5 **41.** El método según el punto 36, que comprende además una etapa de unir un espaciador al polímero, en donde el espaciador se sitúa entre el polímero y el enlazante.
- 42.** El método según uno cualquiera de los puntos 40 o 41, en donde el espaciador se añade antes de etapa (ii).
- 43.** El método según el punto 43, en donde el espaciado es un espaciador de polietilenglicol (PEG).
- 10 **44.** El método según los puntos 41 a 43, en donde el espaciador contiene un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador al polímero, a través de un grupo funcional reactivo al espaciador en el polímero.
- 45.** El método según los puntos 40 a 43, en donde el espaciador contiene un grupo funcional que es capaz de unir el espaciador al enlazante.
- 46.** El método según uno cualquiera de los puntos 28 a 45, en donde al menos un átomo de metal se une a al menos un grupo colgante de unión a metal.
- 15 **47.** El método según uno cualquiera de los puntos 28 a 45, en donde el átomo de metal es un elemento de transición o un isótopo de un elemento de transición.
- 48.** El método según uno cualquiera de los puntos 28 a 45, en donde el átomo de metal es un lantánido o un isótopo de un lantánido.
- 49.** El método según el punto 36, en donde la etapa de unir el enlazante al polímero implica un grupo reactivo a tiol.
- 20 **50.** El método según el punto 49, en donde el tiol se hace reaccionar con un grupo de unión a maleimido.
- 51.** Un marcador elemental preparado mediante el método según uno cualquiera de los puntos 28 a 50.
- 52.** Un método para el análisis de un analito, que comprende:
- (i) incubar el reactivo de afinidad con marcaje elemental según el punto 27 con un analito, en donde el reactivo de afinidad se une con el analito;
- 25 (ii) separar el reactivo de afinidad marcado no unido, del reactivo de afinidad unido;
- (iii) analizar el elemento unido al reactivo de afinidad unido al analito mediante análisis elemental.
- 53.** Un método para el análisis multiplexado de dos o más analitos, que comprende:
- (i) incubar dos o más reactivos de afinidad con marcaje elemental diferenciado según el punto 27 con dos o más analitos, en donde los reactivos de afinidad se unen con los analitos, para producir dos o más analitos diferencialmente marcados;
- 30 (ii) separar los reactivos de afinidad no unidos, de los reactivos de afinidad unidos; y
- (iii) analizar los marcadores diferenciales unidos a los dos o más analitos mediante análisis elemental.
- 54.** Un método para el análisis de un analito, que comprende:
- (i) incubar el marcador elemental según uno cualquiera de los puntos 1 a 24 con un analito, de manera que el marcador elemental se una al analito;
- 35 (ii) separar los elementos de marcaje no unidos de los elementos de marcaje unidos;
- (iii) analizar los elementos de marcaje unidos mediante análisis elemental.
- 55.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 54, en donde el reactivo de afinidad se marca posteriormente con un marcador fluorescente.
- 40 **56.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 54, en donde el analito se sitúa dentro de una célula o sobre una célula.
- 57.** El método según el punto 56, en donde la célula es una célula enferma.

- 58.** El método según el punto 57, en donde la célula enferma es una célula de leucemia o un progenitor de una célula de leucemia.
- 59.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 58, en donde la etapa de análisis comprende análisis en masa, en donde la composición atómica es promediada entre todo en volumen de la muestra.
- 5 **60.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 58, en donde la etapa de análisis comprende el análisis de partículas individuales.
- 61.** El método según el punto 60, en donde las partículas son células.
- 62.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 61, en donde el análisis elemental es ICP-MS.
- 10 **63.** El método según uno cualquiera de los puntos 52 a 62, en donde el análisis elemental se realiza mediante un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masa.
- 64.** Un kit para la preparación del marcador elemental según uno cualquiera de los puntos 1 a 26, que comprende al menos uno de los siguientes:
- 15 un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal y que además comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula, una disolución metálica, reactivos para unir el enlazante, el espaciador o la biomolécula al polímero, reactivos para unir un grupo funcional al enlazante o al espaciador, reactivos para unir un metal al polímero, reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos, tampones, instrucciones para preparar el marcador elemental, instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad, e instrucciones para unir un metal al marcador elemental.
- 20 **65.** Un kit para el análisis de analitos de acuerdo con los métodos según uno cualquiera de los puntos 52 a 63, que comprende al menos uno de los siguientes:
- 25 un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal y que además comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula, una disolución metálica, reactivos para unir el enlazante, el espaciador o la biomolécula al polímero, reactivos para unir un grupo funcional al enlazante o al espaciador, reactivos para unir un metal al polímero, reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos, tampones, instrucciones para preparar el marcador elemental, instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad, instrucciones para unir un metal al marcador elemental e instrucciones para usar los marcadores elementales para el análisis de analitos mediante análisis elemental.
- 30 **66.** El kit según uno cualquiera de los puntos 64 a 65, en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en homopolímeros o copolímeros de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico o ácido metacrílico.
- 35 **67.** El kit según uno cualquiera de los puntos 64 a 66, en donde los reactivos incluyen al menos uno de los siguientes: TCEP (tri(2-carboxietil)fosfina), conjugado ligando-polímero-enlazante-espaciador, tampón fosfato, TBS (disolución salina tamponada con Tris), EDTA (ácido diaminoetanotetraacético), tampón de acetato de amonio, anticuerpos, disolución de sales metálicas, disolución de sales de lantánidos, tampones bloqueadores, tampones de lavado, FBS (suero fetal bovino), DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco), BSA (albúmina de suero bovino), ditiotreitol, bismaleimida, y DMF (dimetilformamida).
- 68.** El kit según uno cualquiera de los puntos 64 a 67, en donde el polímero se une a un enlazante.
- 40 **69.** El kit según uno cualquiera de los puntos 64 a 68, en donde el polímero se une a un enlazante y a un espaciador.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el análisis de un analito, que comprende:

- (i) incubar un analito con un marcador elemental o un reactivo de afinidad con marcaje elemental, en donde el marcador elemental o el reactivo de afinidad se une con el analito,

5 en donde, el marcador elemental comprende un polímero, o el reactivo de afinidad con marcaje elemental es marcado con un marcador elemental que comprende un polímero,

en donde, el polímero comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal;

- 10 (ii) separar el reactivo de afinidad marcado no unido del reactivo de afinidad marcado unido o elementos de marcador no unidos de los elementos de marcador unidos; y

- (iii) analizar el elemento unido al reactivo de afinidad unido al analito o elementos de marcador unidos mediante análisis elemental.

2. El método según la reivindicación 1, que comprende:

- 15 (i) incubar el reactivo de afinidad con marcaje elemental con el analito, en donde el reactivo de afinidad se une con el analito,

en donde, el reactivo de afinidad es marcado con el marcador elemental que comprende un polímero,

comprendiendo el polímero al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal;

- (ii) separar el reactivo de afinidad marcado no unido del reactivo de afinidad marcado unido; y

- 20 (iii) analizar el elemento unido al reactivo de afinidad unido al analito mediante análisis elemental.

3. El método según la reivindicación 2, en donde dos o más reactivos de afinidad con marcaje elemental diferencial se incuban con dos o más analitos, en donde los reactivos de afinidad se unen con los analitos, para producir dos o más analitos diferencialmente marcados y en donde los marcadores diferenciales que se unen a los dos o más analitos se analizan mediante análisis elemental.

25 4. El método según la reivindicación 1, que comprende:

- (i) incubar el marcador elemental con el analito, de manera que el marcador elemental se una al analito,

en donde, el marcador elemental comprende un polímero, comprendiendo el polímero al menos un grupo colgante de unión a metal, que comprende al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal;

- 30 (ii) separar los elementos del marcador no unidos de los elementos del marcador unidos; y

- (iii) analizar los elementos del marcador unidos mediante análisis elemental.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el reactivo de afinidad se marca posteriormente con un marcador fluorescente.

35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el analito se sitúa dentro o sobre una célula.

7. El método según la reivindicación 6, en donde la célula es una célula enferma seleccionada del grupo que consiste en una célula de leucemia o un progenitor de una célula de leucemia.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la etapa de análisis comprende análisis en masa, en donde la composición atómica es promediada entre el volumen total de la muestra.

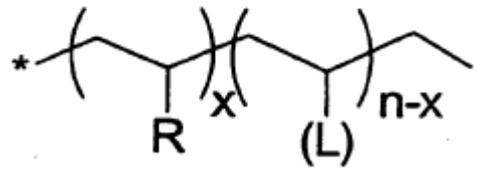
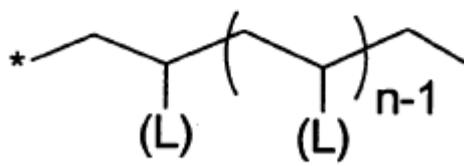
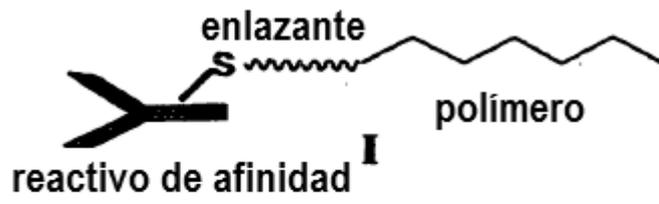
40 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la etapa de análisis comprende el análisis de partículas individuales.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el análisis elemental es ICP-MS.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el análisis elemental se realiza mediante un citómetro de flujo basado en espectrómetro de masa.

- 12.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el número de grupos colgantes de unión a metal capaces de unirse a al menos un átomo de metal está entre aproximadamente 10 y 250.
- 13.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la cadena principal del polímero se deriva de poli(acrilamida), polimetacrilato, o polimetacrilamida sustituidas.
- 5 **14.** Un kit para el análisis de analitos de acuerdo con los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende al menos uno de los siguientes:
- un polímero que comprende al menos un grupo colgante de unión a metal, que contiene al menos un átomo de metal o es capaz de unirse a al menos un átomo de metal y que además comprende un grupo funcional que permite al polímero unirse a uno de un enlazante, un espaciador, o una biomolécula,
- 10 una disolución metálica,
- reactivos para unir el enlazante, el espaciador o la biomolécula al polímero,
- reactivos para unir un grupo funcional al enlazante o al espaciador,
- reactivos para unir un metal al polímero,
- reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos,
- 15 tampones,
- instrucciones para preparar el marcador elemental,
- instrucciones para unir el marcador elemental a un reactivo de afinidad,
- instrucciones para unir un metal al marcador elemental, e
- instrucciones para usar los marcadores elementales para el análisis de los analitos mediante análisis elemental.
- 20 **15.** El kit según la reivindicación 14, en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en homopolímeros o copolímeros de acrilamidas, metacrilamidas, ésteres de acrilato, ésteres de metacrilato, ácido acrílico o ácido metacrílico.

Figura 1



a

b

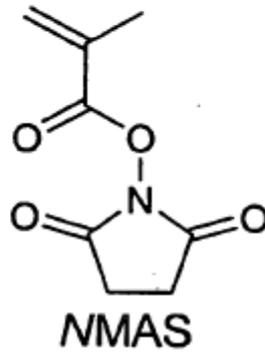
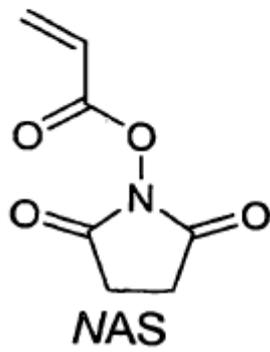


Figura 2

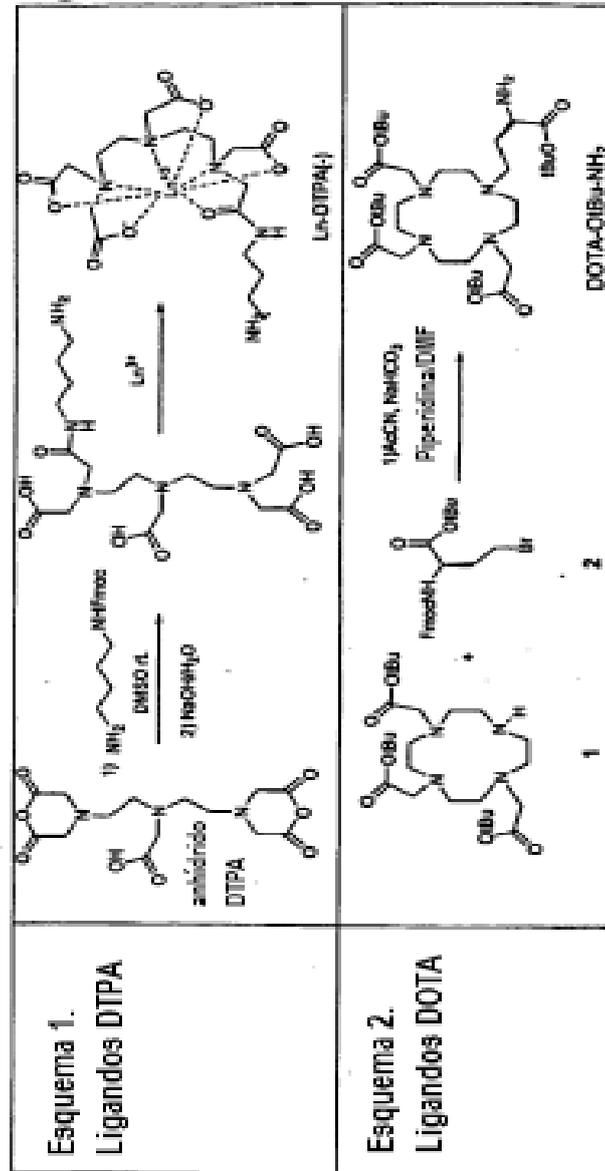


Figura 3

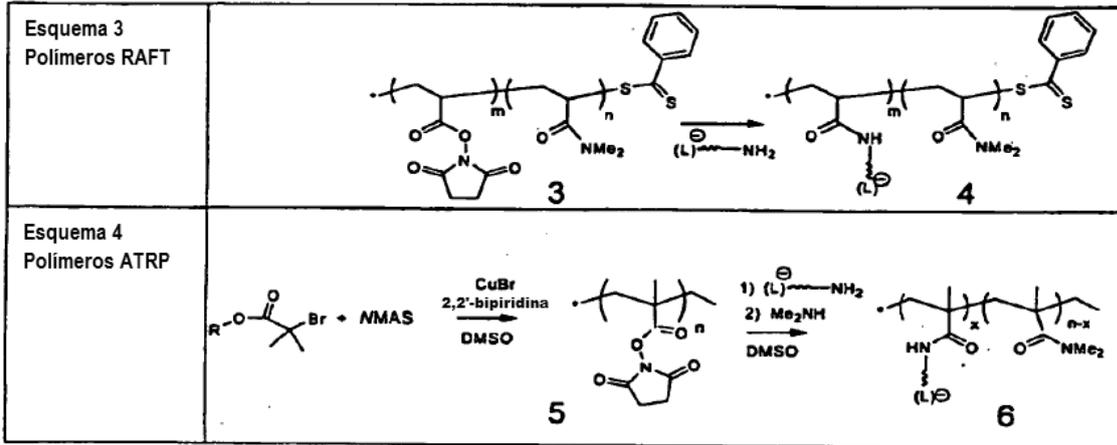


Figura 4

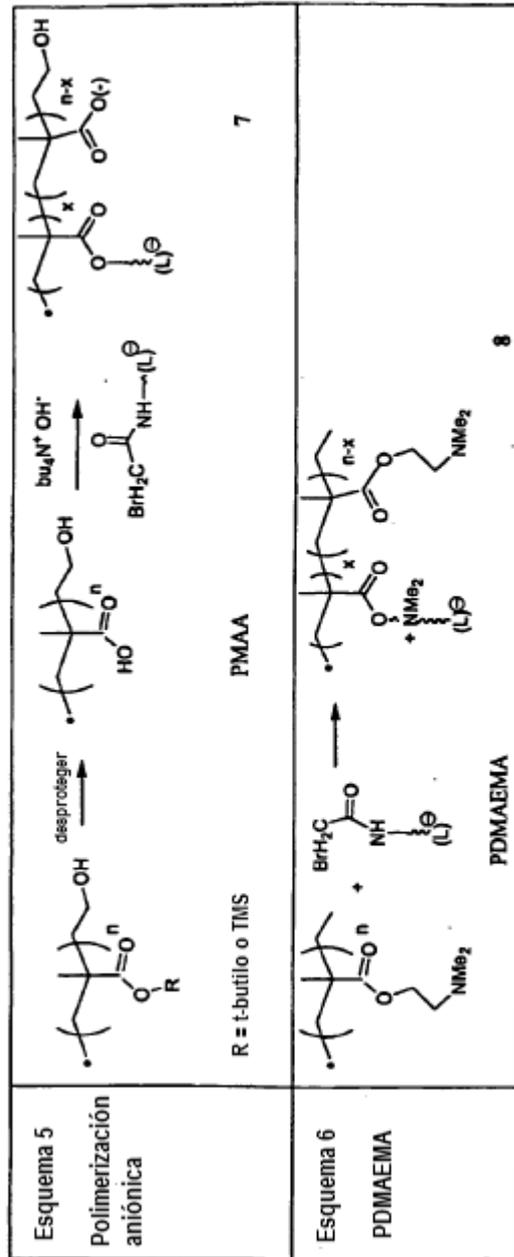


Figura 5

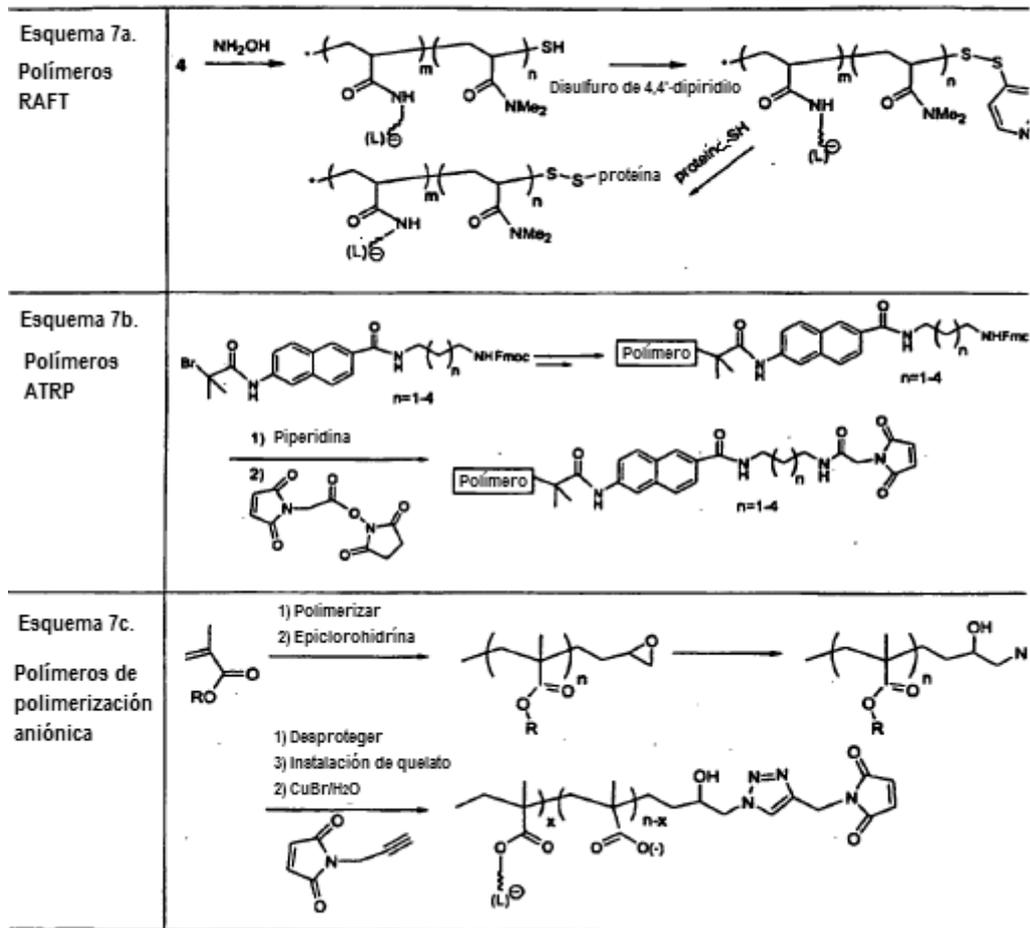


Figura 6

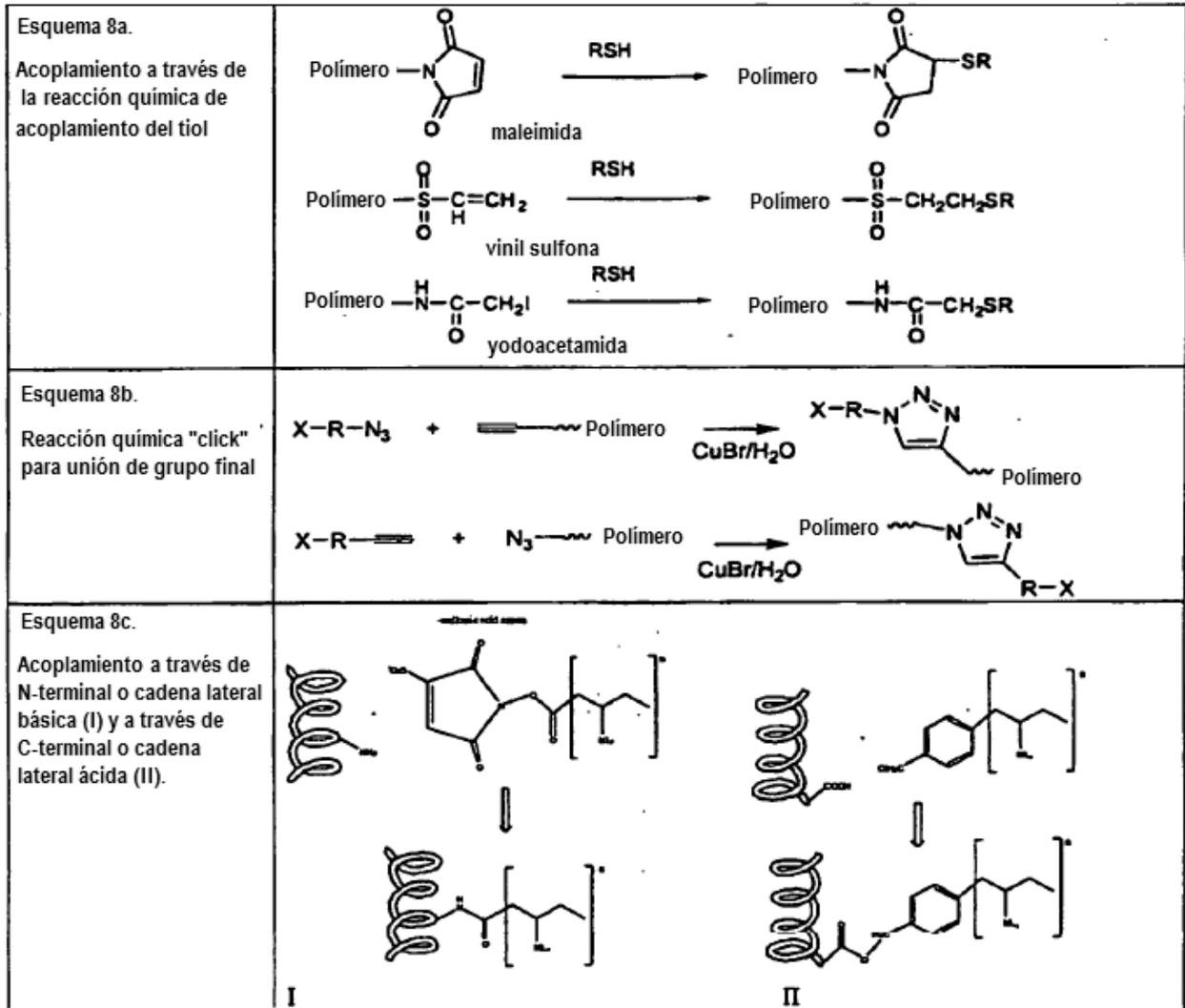


Figura 7

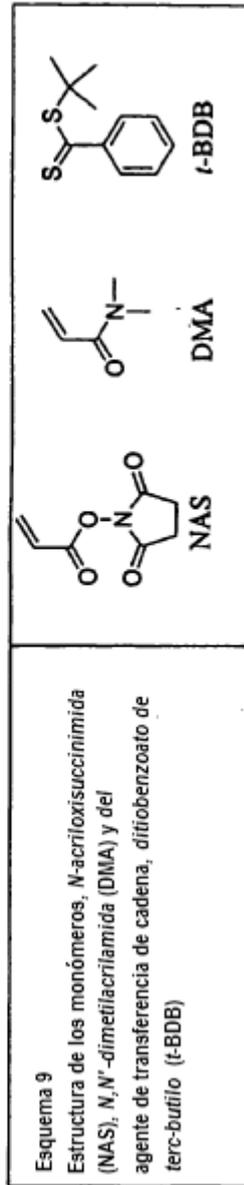


Figura 8

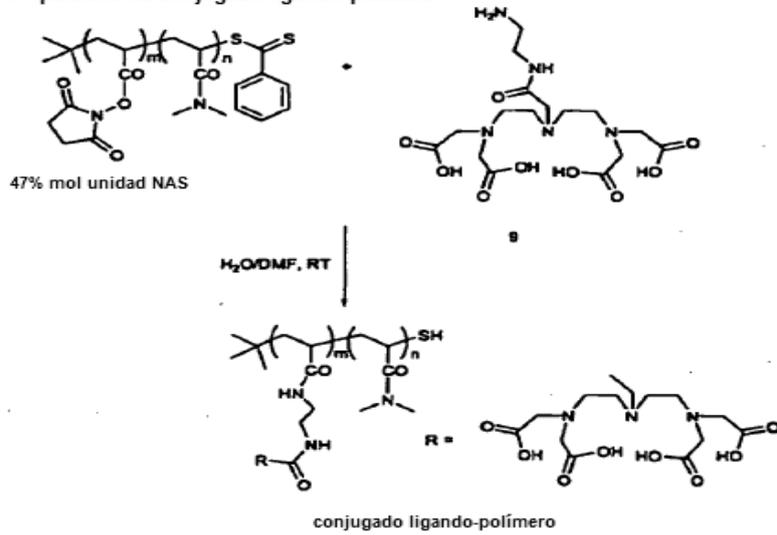
Relación de NAS/DMA %moles,%peso		$[M]_0$ / $[CTA]_0$	$[CTA]_0$ / $[AMBN]_0$	Tiempo de reacción (h)	Rendi- miento polimero	$M_{n,GPC}$	M_w / M_n
13	20	70	1,4	18	75%	6.500	1,45
47	60	55	1,5	18	80%	8.298	1,50
60	72	70	3	18	80%	8.000	1,15

CTA: Agente de transferencia de cadena, *t*-BDB. $[M]_0$: concentración monomérica inicial.

$M_{n,GPC}$: usando patrones de poliéstitireno

Figura 9

Esquema 10
Preparación de conjugado ligando-polímero



Esquema 11
Reacción del conjugado ligando-polímero con 1,4-bis(maleimido) butano

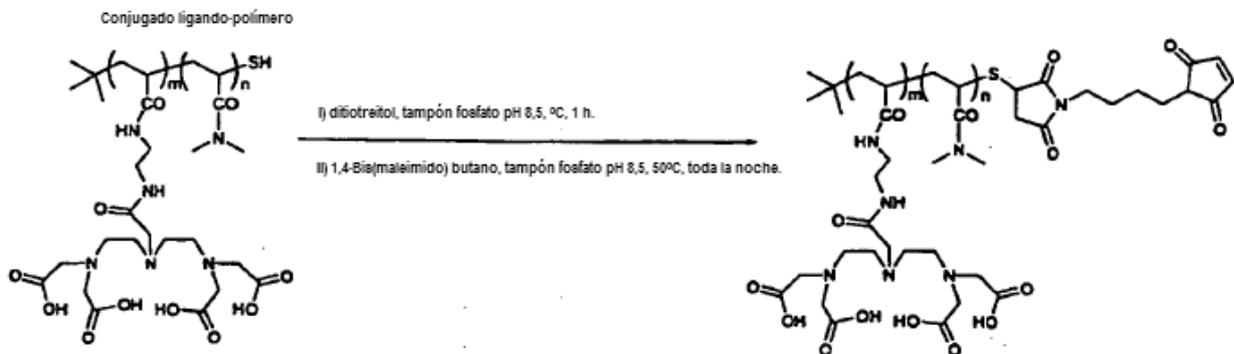
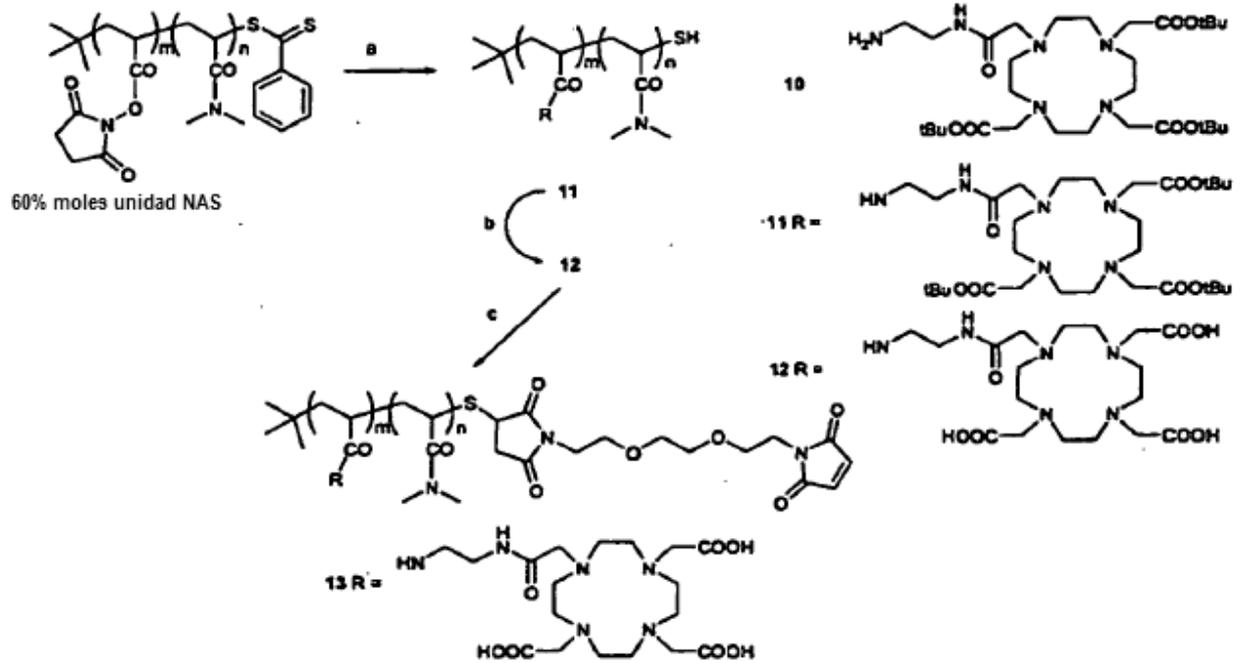


Figura 10

Esquema 12.

Preparación de conjugado ligando-polímero basado en DOTA



- a) trietilamina, DMF, amina 10, 14 h; b) Ácido trifluoroacético, 14 h;
 c) (i) ditiotreitól, tampón fosfato pH 8,5, 50°C, 1h,
 ii) 2,2'-(etilendioxo)bis(etilmaleimida), DMF/H₂O, 1h, RT

Figura 12

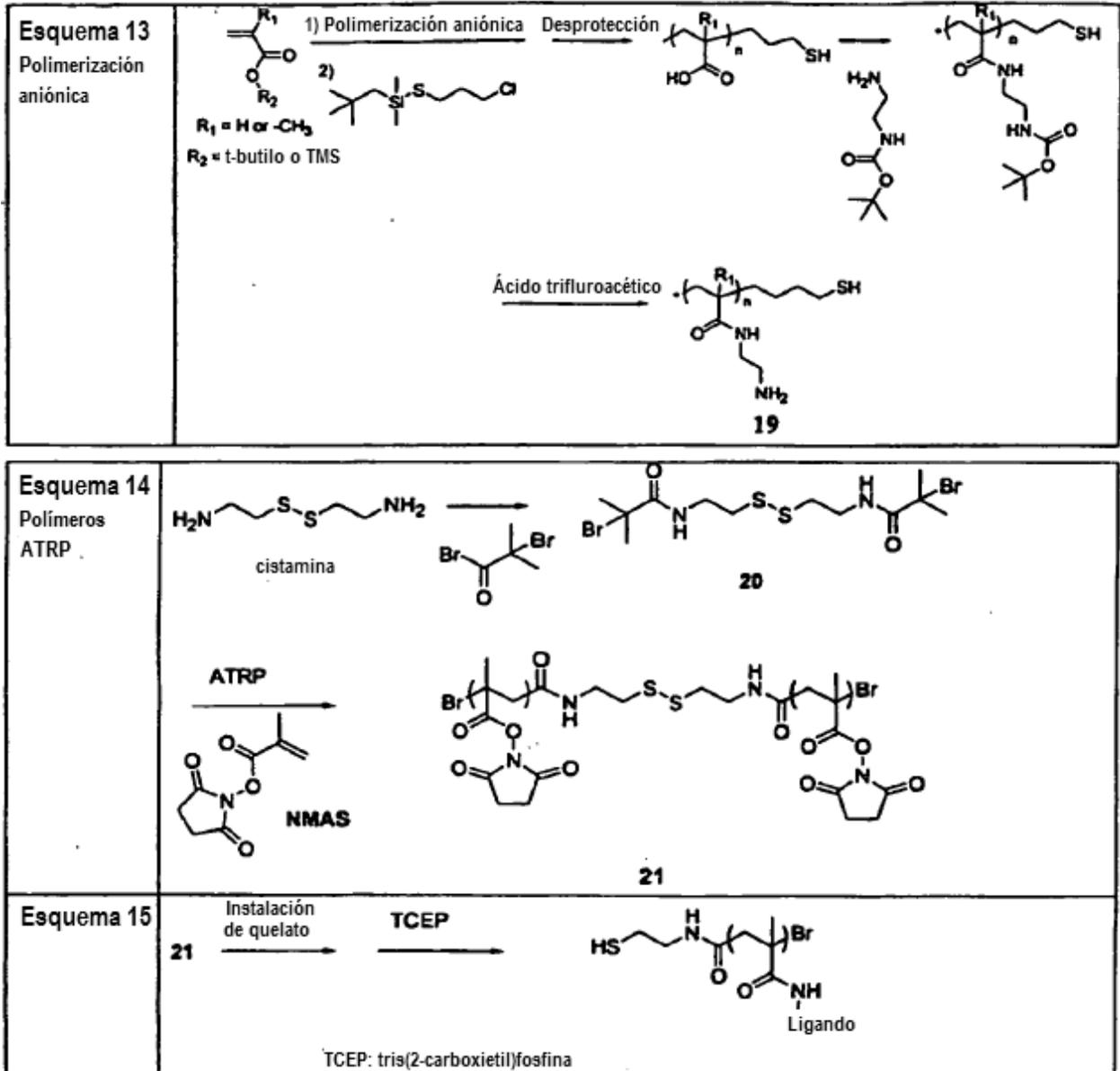


Figura 13

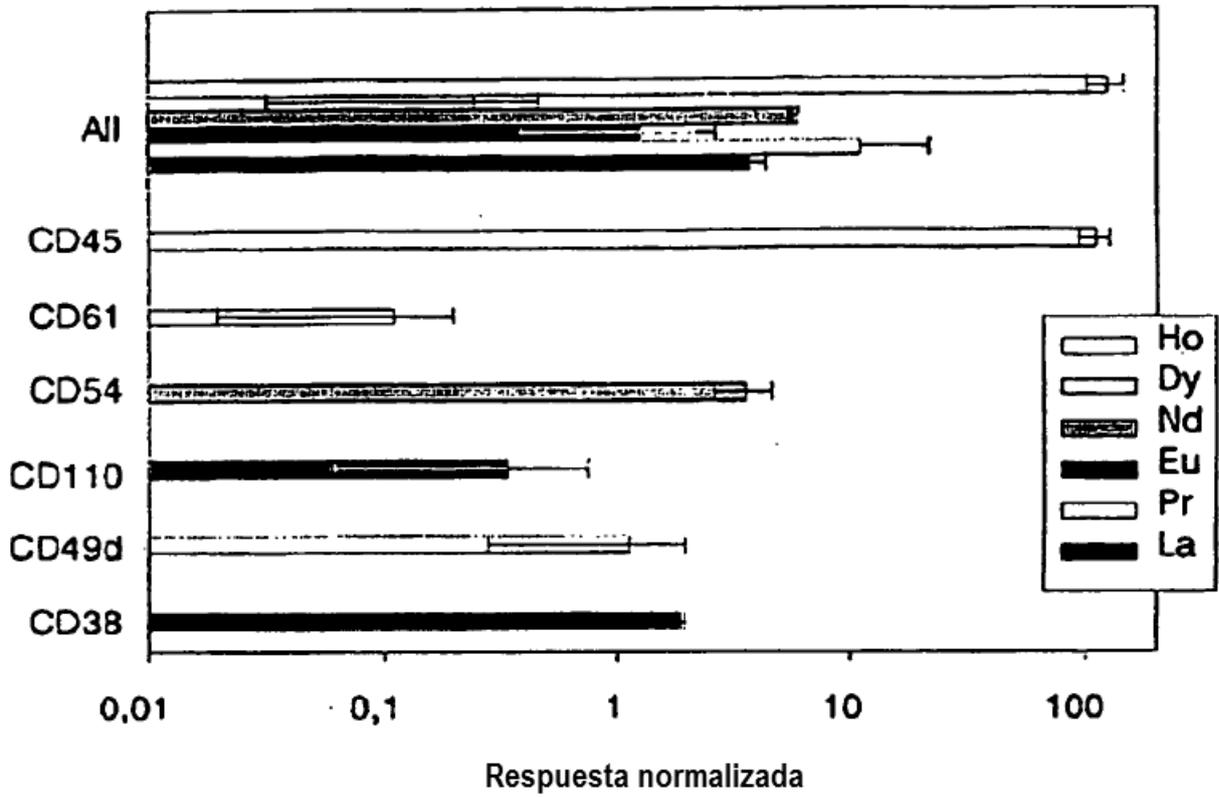
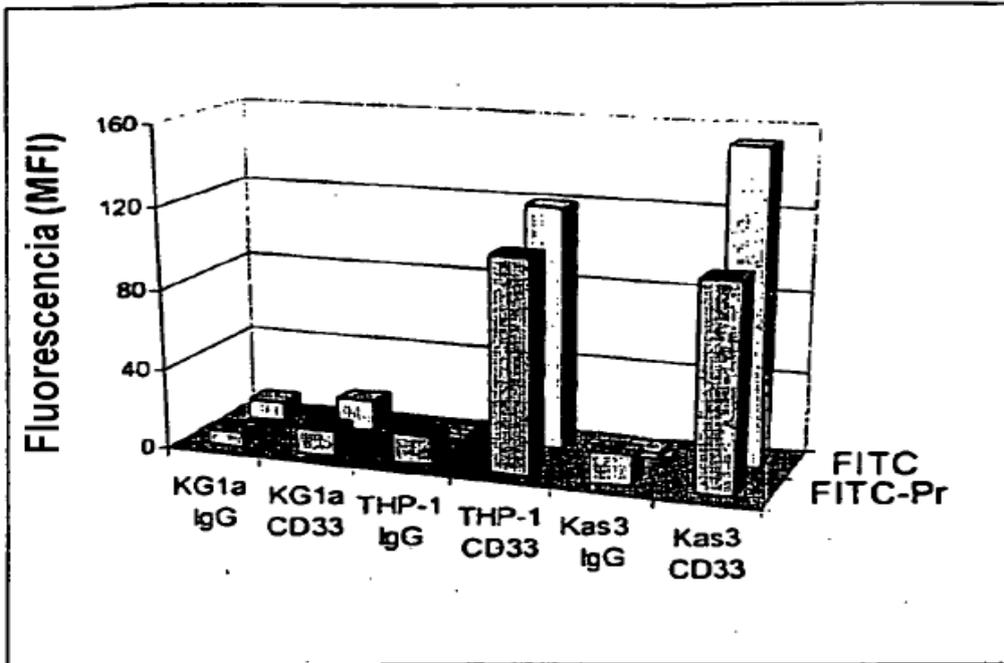
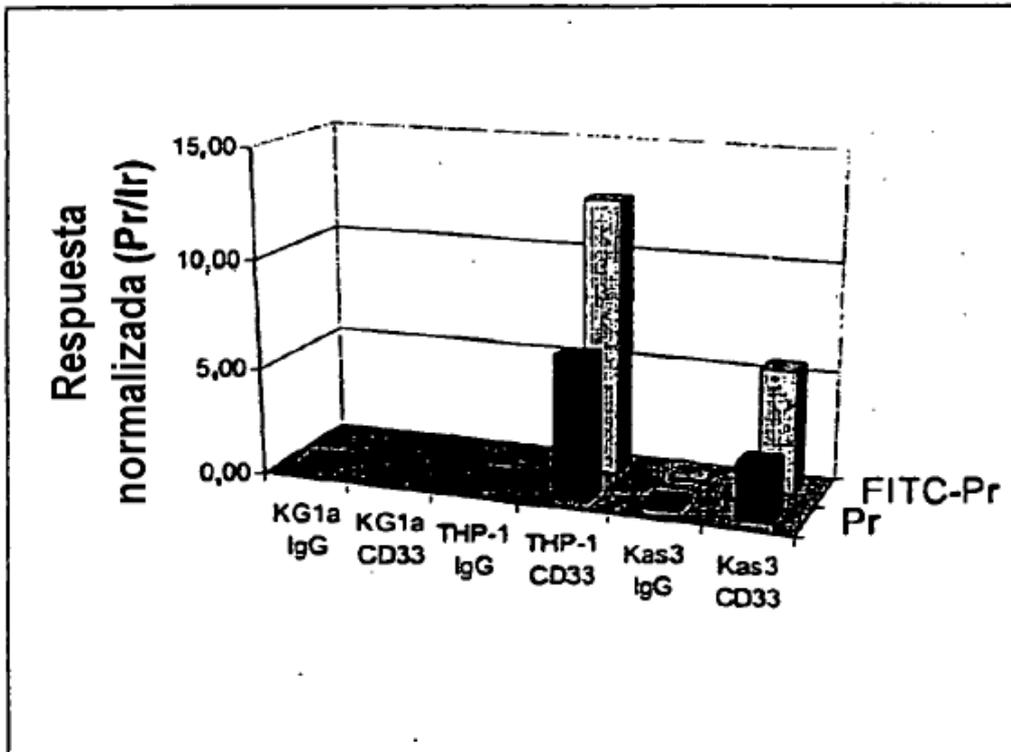


Figura 14



a



b

Figura 15

Diagrama de flujo I

Procedimiento de polimerización RAFT

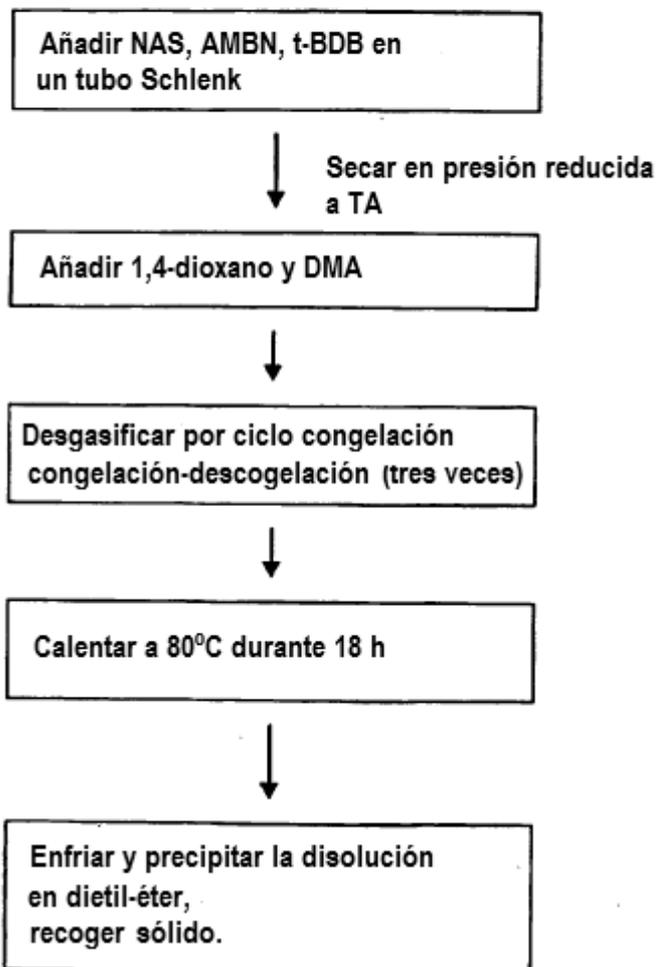


Figura 16

Diagrama de flujo II

Procedimiento de unión de polímero-DTPA-enlazante
(correspondiente a la Figura 9)

