

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 444**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/542** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**C09K 11/02** (2006.01)

**C09K 11/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2014 PCT/EP2014/063117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14206918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2014 E 14738423 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3014274**

54 Título: **Ensayo radiométrico de cuantificación de enzima hidrolítica**

30 Prioridad:

**25.06.2013 EP 13382239**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2017**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT CATALÀ D'INVESTIGACIÓ  
QUÍMICA (50.0%)  
Av. Països Catalans, 16  
43007 Tarragona, ES y  
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS  
AVANÇATS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PALOMARES, EMILIO;  
STOICA, GEORGIANA y  
CASTELLÓ SERRANO, IVÁN**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 644 444 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

Ensayo radiométrico de cuantificación de enzima hidrolítica

- 5 El objeto de la invención se relaciona con el campo de la bioquímica analítica, en particular con el campo de la determinación mediante sensores radiométricos de compuestos biológicos. La invención es útil, por ejemplo, en el campo de la diagnosis clínica, en particular la diagnosis de la fibrosis quística.

## ANTECEDENTES

- 10 El campo de la diagnosis clínica busca constantemente nuevos métodos de detección de biomoléculas claves que constituyen marcadores biológicos para un amplio rango de patologías. Además de estándares altos de especificidad y sensibilidad, este campo requiere de métodos rápidos, fáciles de implementar y que requieren de una instrumentación estándar. Además, los ensayos clínicos amables para el usuario, y que se pueden implementar al punto de atención son preferidos, por lo que es necesario reducirlos a dispositivos pequeños.

- 15 Las enzimas hidrolíticas juegan un papel fundamental en numerosos procesos biológicos. Como tal, la supervisión de estas enzimas es de gran importancia en el campo de la diagnosis clínica, pero también en otros campos como la industria alimentaria o la industria biofarmacéutica. Durante la última década, el sondeo de enzimas hidrolíticas se ha basado principalmente en métodos basados en sus afinidades como los inmunoensayos, a pesar de que los ensayos basados en la actividad enzimática pueden dar lugar a una mayor especificidad. Así, los inmunoensayos tales como ELISA acostumbran a consumir mucho tiempo y no ser fáciles de implementar al punto de atención, además de requerir de varias etapas de reacción y distintos reactivos. Además, los inmunoensayos carecen a menudo de especificidad, consecuencia de la reactividad cruzada. Otras aproximaciones basadas en cromatografía líquida o electroforesis de gel para monitorizar la actividad hidrolítica han sido descritos, pero la mayoría consumen mucho tiempo y son laboriosos.

- 20 Un ejemplo de enzima hidrolítica relevante a una patología es la tripsina. La tripsina es relevante en la enfermedad de fibrosis quística (a partir de ahora FC), un desorden genético autosómico recesivo que afecta particularmente al páncreas, los pulmones, el hígado y el intestino. La FC es causada por una mutación en el gen de la proteína CFTR (regulador de la conductancia a través de la membrana celular). Los bebés con FC pueden sufrir un aumento de tripsinógeno en la sangre, porque una mucosa bloquea la comunicación entre el páncreas y el intestino, implicando que la tripsina no llega al intestino. Muchos países han establecido un ensayo por defecto para los recién nacidos que implica la cuantificación de tripsinógeno en la sangre (test inmunoreactivo de tripsinógeno), que típicamente utiliza los inmunoensayos basados en fluorescencia, como el DELFIA Neonatal IRT kit (PerkinElmer). Sin embargo, estos ensayos tienen los inconvenientes de los inmunoensayos en cuanto a especificidad, efectividad y amabilidad para el paciente. Además, debido a una gran cantidad de falsos positivos inherentes a este tipo de ensayos, los recién nacidos que tengan resultados anormales tienen que o bien repetir el ensayo, o ser sometidos a ensayos genéticos para determinar si son portadores de al menos una copia del gene CFTR. Los niños que hayan proporcionado resultados anormales en este segundo ensayo o portadores del genotipo necesitan un test de sudor para confirmar la diagnosis de FC. Este procedimiento es largo y a veces considerado invasivo por los padres.

- 35 Sapsford et al. han descrito otra aproximación para la supervisión de la actividad enzimática de la tripsina. Estos autores describieron un ensayo electroluminiscente usando puntos cuánticos (a partir de ahora QDs) conjugados con péptidos susceptibles de ser hidrolizados por la tripsina ("Monitoring of enzymatic proteolysis on a electroluminescent-CCD microchip platform using quantum dot-peptide substrates", *Sensors y Actuators B*, 2009, vol. 139, pp. 13–21). Este sistema se beneficia de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de Förster (a partir de ahora FRET) entre el punto cuántico y el marcador portado por el péptido. Por acción de la enzima, la variación en la respuesta óptica del sistema se puede medir para dar lugar a una determinación cualitativa de la actividad de la tripsina. Sin embargo, este sistema no proporciona de manera precisa una determinación cuantitativa de la actividad enzimática.

- 45 Qiang Ma et al, ("Multilayered, core/shell nanoprobos based on magnetic ferric oxide particles and quantum dots for multimodality imaging of breast cancer tumors", *Biomaterials*, 2012, vol. 33, pp. 8486-8494) describen nanosondas bioconjugadas de núcleo/capa con multi-capa de sílice basadas en partículas magnéticas de óxido férrico y puntos cuánticos que se utilizan con fines de diagnóstico, en particular para diagnosticar cáncer de mama. La fabricación de las nanosondas descritas se lleva a cabo mediante un procedimiento de microemulsión inversa.

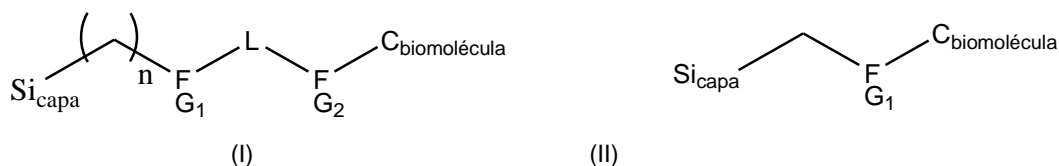
- 50 Por lo tanto, es necesario proporcionar ensayos alternativos para cuantificar con precisión la actividad hidrolítica de una enzima, en particular la tripsina, y que no tengan los inconvenientes mencionados más arriba.

- 60

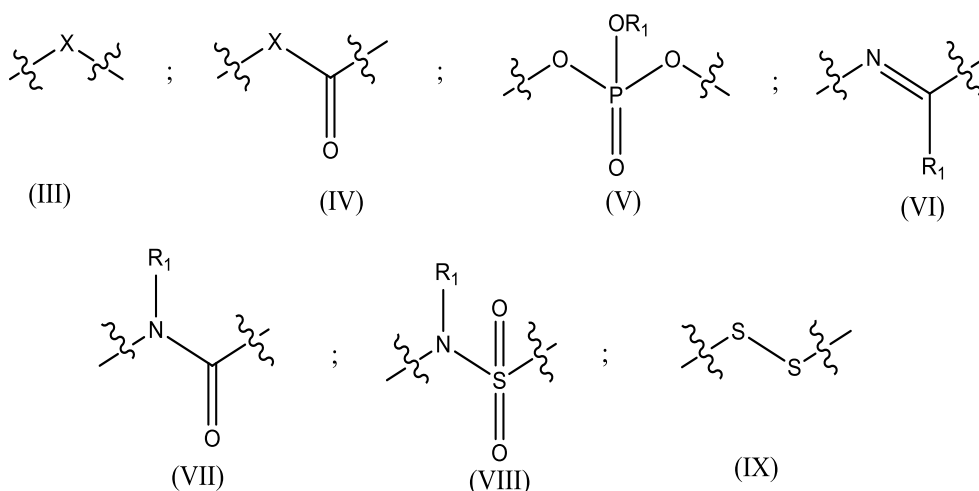
RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un ensayo radiométrico de alta eficacia para cuantificar la actividad de una enzima hidrolítica. Dicho ensayo se beneficia del proceso de FRET que tiene lugar en unas nanopartículas especialmente diseñadas y que comprenden una primera población de QDs (QD1), una segunda población de QDs (QD2), una biomolécula que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica y un marcador fotoluminescente. La Figura 1 muestra una representación esquemática de La nanopartícula de la invención.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula que comprende (i) un núcleo que comprende una primera población de puntos cuánticos (QDs) incrustados en sílice, (ii) una capa que comprende una segunda población de QDs incrustados en sílice, (iii) al menos una biomolécula seleccionados de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, dicha biomolécula estando unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de formula (I) y (II),



dónde  $Si_{capa}$  es un átomo de silicio comprendido en la capa y  $C_{biomolécula}$  es un átomo de carbono comprendido en la biomolécula; n es un entero comprendido entre 0 y 10;  $FG_1$  y  $FG_2$  son cada uno un diradical independientemente seleccionado del grupo constituido por los diradicales de formula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX)



dónde X es S o O;  $R_1$  es H o  $(C_1-C_{12})$ alquilo; L es un diradical seleccionado de los diradicales que derivan de un compuesto seleccionado de  $(C_1-C_{12})$ alcano,  $(C_1-C_{12})$ alqueno,  $(C_1-C_{12})$ alquino,  $(C_3-C_6)$ cicloalcano y benceno; y (iv) una marcador fotoluminescente para cada biomolécula, dónde el marcador está conectada a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de formula  $FG_3$  seleccionado del grupo constituido por los diradicales de formula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) definidos más arriba; dónde la primera y segunda poblaciones de QDs tienen diferentes longitudes de onda de emisión de fotoluminiscencia máxima, y únicamente la segunda población de QDs es susceptible de producir transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) con el marcador fotoluminescente.

Las nanopartículas de la invención se pueden usar en ensayos biológicos; particularmente, se pueden usar para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra. Así, otro aspecto de la invención hace referencia al uso de la nanopartícula de la invención para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra. El diseño específico de las nanopartículas proporciona unas altas sensibilidad, reproducibilidad y precisión en la cuantificación de la enzima hidrolítica. Cuando las nanopartículas comprenden un péptido que contiene un sitio susceptible de ser cortado por tripsina, estas nanopartículas se pueden usar para diagnosticar la fibrosis quística. Así, otro aspecto de la invención hace referencia a una nanopartícula de la invención, dónde la nanopartícula comprende un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina, como agente de diagnosis de fibrosis quística.

La invención también hace referencia a un método para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra que comprende las etapas de: (i) contactar una nanopartícula como se define más arriba con la muestra, y (ii) determinar la intensidad fotoluminescente (PL) de los QD1 y QD2 obtenida por exposición de la mezcla de la etapa (i) a una fuente de luz capaz de excitar los QD1 y QD2, para que emitan una emisión PL, y dónde la relación entre las intensidades fotoluminescentes de QD1 y QD2 se correlaciona con la cantidad de enzima hidrolítica en la muestra. Una representación esquemática de un modo de realización particular del método de la invención se muestra en la figura 2.

El ensayo presentado proporciona una cuantificación radiométrica de enzimas hidrolíticas, lo cual lo hace superior a ensayos fotoluminescentes previamente descritos. En comparación con ensayos convencionales para cuantificación de enzimas, como los inmunoensayos, la invención proporciona resultados de cuantificación en un tiempo mínimo y una manipulación mínima (una etapa), evitando problemas de reactividad cruzada gracias a la alta especificidad de la enzima para el sitio de corte. Además, el ensayo biológico de la invención se puede reducir en un dispositivo de tamaño reducido utilizable en el punto de atención al paciente y, gracias a su robustez, se pueden usar muestras biológicas directamente. Estas ventajas hacen el ensayo biológico de la invención particularmente apropiado para la diagnosis. Cuando se aplica a la diagnosis de FC, el método es no invasivo a la vez que fiable, evitando así la mayoría de inconvenientes de métodos de diagnosis de FC convencionales.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método de diagnosis de la fibrosis quística que comprende las etapas de: (i) contactar muestra de heces obtenida de un paciente con una a nanopartícula como se define más arriba que comprende un péptido que comprende un sitio susceptible de ser cortado por tripsina, y (ii) determinar la intensidad PL de los QD1 y QD2 obtenida por exposición de la mezcla de la etapa (i) a una fuente de luz de excitación capaz de excitar los QD1 y QD2, para que emitan una emisión PL, y dónde la relación entre las intensidades fotoluminescentes de QD1 y QD2 es proporcional a la cantidad de tripsina en las heces, y dónde una concentración de tripsina comprendido de 0 a 90  $\mu\text{g/g}$  es indicativa de fibrosis quística.

Finalmente, otro aspecto de la invención hace referencia a un método de preparación de una nanopartícula como se definen más arriba. Este método comprende (i) formar un núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice por el método de microemulsión reversa, (ii) formar una capa que contiene una segunda población de QDs incrustados en sílice sometiendo el núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice de la etapa (i) al método de microemulsión reversa, (iii) recuperar la nanopartícula núcleo-capa obtenida en la etapa (ii), y opcionalmente funcionalizar la superficie de la capa, y (iv) añadir al menos una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido, dónde cada biomolécula comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, y un marcador fotoluminescente que está unido a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de fórmula  $\text{FG}_3$  como se define en la reivindicación 1; dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se definen más arriba.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Representación esquemática de una nanopartícula de la invención. La nanopartícula comprende un núcleo de una primera población de QDs incrustados en sílice ( $\text{QD1@SiO}_2$ ), una capa de una segunda población de QDs incrustados en sílice ( $\text{QD2@SiO}_2$ ), y una biomolécula marcada por un marcador fotoluminescente conectada a la superficie de la capa bien directamente, bien a través de un fragmento (M).

FIG. 2. Representación esquemática del método de cuantificación de tripsina de la invención usando una nanopartícula que comprende un péptido de SEC ID NO: 2 marcado por TAMRA con un sitio de corte para tripsina (el sitio de corte se indica por una flecha) conectado a la superficie de la capa a través de un fragmento M. A, en ausencia de tripsina, se observa FRET. B, en presencia de tripsina, el péptido es digerido y el FRET es interrumpido.

FIG. 3. Espectros de absorción normalizada de las nano esferas  $\text{QD540@SiO}_2$  (línea discontinua) y TAMRA (+ símbolo) y espectros de emisión normalizada de las nano esferas  $\text{QD540@SiO}_2$  (círculo) y TAMRA (triángulo). El eje X representa la longitud de onda, en nm.

FIG. 4. De izquierda a derecha: espectros de emisión de  $\text{QD540}$ , TAMRA y  $\text{QD660}$ . El eje X representa la longitud de onda, en nm. El eje Y representa la intensidad de fluorescencia normalizada en unidades de fluorescencia (FU).

FIG. 5. Espectros de emisión de  $\text{QD660@SiO}_2@QD540@SiO}_2$  (a) posteriormente a una digestión con 25  $\mu\text{g/L}$  de tripsina, y (b) posteriormente a una digestión con 350  $\mu\text{g/L}$  de tripsina. Las leyendas de la figura corresponden al tiempo de digestión enzimática, en minutos (0-30 min). El eje X representa la longitud de onda, en nm. El eje Y representa la intensidad de fluorescencia en unidades de fluorescencia (FU).

FIG. 6. Perfil cinético de la digestión enzimática en función de la concentración de tripsina usando el ratio entre los picos de emisión PL de QD540 y QD660 en las nanopartículas QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub>. Curvas de izquierda a derecha: concentración de 350, 250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/L de tripsina. El eje X axis representa el tiempo (min).

FIG. 7. Curva de calibración resultando de los valores experimentales de la figura 6 de  $I_{540}/I_{660}$  posteriormente a una digestión de 10 minutos. El eje X axis representa la concentración de tripsina (µg/L).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término “fotoluminiscencia” (abreviado como PL) hace referencia a un proceso en que una molécula, en este caso el QD, absorbe fotones (radiación electromagnética) y entonces re-irradia fotones. La fotoluminiscencia incluye fluorescencia y fosforescencia. En el caso de la fluorescencia, por absorción de una radiación electromagnética por la molécula (en el caso de la invención, QD o marcador), un electrón del orbital molecular más alto ocupado (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) salta a un nivel energético superior correspondiendo al estado excitado (orbital molecular más bajo ocupado o Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)), la diferencia de energía entre HOMO y LUMO correspondiendo a la energía de la radiación electromagnética, caracterizada por su longitud de onda. El electrón que ocupa la LUMO se relaja entonces a niveles de energía inferiores, lo cual provoca una emisión de una radiación electromagnética a cierta longitud de onda. Típicamente, el periodo entre absorción y emisión es muy corto, del orden de 10 nanosegundos. En el contexto de la invención, PL hace referencia particularmente a fluorescencia, donde parte de la energía original se disipa, de tal manera que los fotones emitidos son de más baja energía que los fotones absorbidos. Se dice en estos casos que el fotón resultante es desplazado hacia el rojo. Otro tipo de PL contemplado en el contexto de la invención es la fosforescencia, donde la energía de los fotones absorbidos provoca la generación de un estado de multiplicidad de spin elevada, usualmente un estado triplete. Una vez en estado triplete, la transición hacia estados de más baja energía singlete está prohibida, provocando así una transición más lenta. El proceso de transición irradiante hacia el estado singlete es lento, pudiendo durar entre minutos u horas. La fotoluminiscencia se puede expresar por las intensidades de absorción y emisión a ciertas longitudes de onda. Preferiblemente, la longitud de onda de emisión es más alta que la longitud de onda de absorción.

Las moléculas PL tienen un rango de longitudes de onda capaces de excitar la molécula en varios modos, y, igualmente, las moléculas PL pueden emitir luz de diferentes longitudes de onda, estos rangos siendo nombrados respectivamente espectros de absorción y emisión.

El término “marcador fotoluminescente” o “marcador PL” o “marcador” hace referencia a un compuesto capaz de emitir luz por excitación con luz. En la invención, un marcador PL debe ser capaz de ser conectado covalentemente a otra molécula, particularmente, a la parte de la biomolécula que contiene un sitio de corte para una enzima hidrolítica que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por la enzima hidrolítica. El marcador PL contenido en la nanopartícula de la invención tiene espectros de emisión y absorción que permiten el establecimiento de FRET entre los QDs contenidos en la capa de la nanopartícula (segunda población de QDs) y dicho marcador. La distancia media entre dichos QDs contenidos en la capa y el marcador PL es adecuada para que se pueda establecer el FRET.

“Transferencia de energía de resonancia y fluorescencia de Förster” o “FRET” hace referencia a un proceso basado en dos sustancias fotoluminescentes donde, inicialmente, una de las sustancias (el dador) puede transferir energía a la segunda (aceptor). La eficiencia de este proceso de transferencia de energía es inversamente proporcional a la distancia entre dador yceptor elevada a la sexta potencia, haciendo el FRET extremadamente sensible a distancias cortas entre las dos sustancias. Consecuentemente, se observa FRET cuando el dador y el aceptor se encuentran suficientemente próximos el uno del otro y cuando existe un solapamiento espectral suficiente entre los espectros de emisión del dador y de absorción del aceptor.

El “solapamiento espectral” es el área de solapamiento entre la emisión del dador y la absorción del aceptor. El solapamiento espectral a una determinada longitud de onda o un rango de longitudes de onda se puede calcular como el ratio del área de superficie de intensidad de emisión PL normalizada del dador con el área de superficie de absorbancia normalizada del aceptor. El solapamiento espectral se expresa como un porcentaje.

El término “puntos cuánticos” (QDs) se entiende en el estado de la técnica como nanocristales semiconductores fotoluminescentes cuyas propiedades están estrechamente relacionadas con el tamaño y forma del cristal. Un QD es capaz de emitir una radiación electromagnética o luz cuando se excitan (es decir, los QDs son luminiscentes). Generalmente, la diferencia energética entre las bandas baja y alta de conducción crece a medida que el tamaño del cristal disminuye, y consecuentemente, se necesita más energía para excitar el QD que a su vez, libera más energía cuando el cristal vuelve en su estado de reposo. Por ejemplo, en aplicaciones de marcadores fluorescentes, esto equivale a frecuencias de luz emitida más altas para QDs de pequeño tamaño cristalino, resultando en un

desplazamiento del rojo hacia el azul de la luz emitida. Así, una de las ventajas de los QDs es la maleabilidad de sus propiedades fotoluminescentes por control del crecimiento del cristal. Adicionalmente, los QDs tienen un espectro de absorción muy amplio, junto con un espectro de emisión confinado en el rango de longitudes de onda visibles, lo cual permite la excitación simultánea de varios tamaños de cristales a una sola longitud de onda. Los QDs se benefician también de una gran estabilidad fotoquímica. Por todo ello, los QDs son una alternativa ventajosa a los marcadores orgánicos convencionales en aplicaciones bioanalíticas.

Un QD consiste en un primer material semiconductor recubierto en algunos casos por otro material semiconductor. El material de recubrimiento preferiblemente tiene una diferencia energética de bandas mayor a la del primer material y puede ser elegido por tener un espacio interatómico parecido al del primer material. El primero y/o segundo material semiconductor puede ser, de manera no limitativa, ZnS, ZnSe, ZnTe, US, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, InAs, InSb, PbSe, o una aleación o una de sus mezclas. En modos de realización particulares los QDs son constituidos por CdSe, CdS, CdSe recubierto con ZnS (CdSe/ZnS), o por CdS recubierto con ZnS (CdS/ZnS).

El tamaño de los QD suele estar comprendido de 1 nm a 50 nm en diámetro, en algunos casos de 2 nm a 20 nm, en algunos casos de 2 nm a 10 nm. Los QDs se pueden preparar por métodos establecidos en el estado de la técnica.

En el contexto de la invención, el término "población" en referencia a los QDs hace referencia a una pluralidad de QDs que comparten una misma longitud de onda de máxima emisión, y consecuentemente un diámetro de partícula similar.

Por "QDs incrustados en sílice" (también expresado aquí como QD@SiO<sub>2</sub>), se entiende que los QDs están dispersados dentro de una matriz de sílice. Los QDs incrustados en sílice son repartidos de manera no homogénea dentro de la matriz. Esta configuración proviene del método de preparación, en el cual los QDs son sometidos al método de microemulsión reversa. La configuración de la nanopartícula se puede controlar por el método de preparación, particularmente, por el tiempo de reacción y la estequiometría de los reactivos. Por ejemplo, si los QDs reaccionan con suficiente sílice por el método de emulsión reversa para formar el núcleo durante un largo tiempo, el núcleo de la nanopartícula será más grande, con una configuración en que la concentración de QDs en la parte externa del núcleo es muy baja o inexistente. Alternativamente, diferentes proporciones de QDs y sílice en el método de microemulsión reversa dará lugar a diferentes nanopartículas en cuanto a la configuración de los QDs dentro de la matriz.

Una "enzima hidrolítica", también llamada "hidrolasa", es una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace químico. Las hidrolasas están clasificadas como EC 3 en la clasificación de número EC de enzimas pero se puede también dividir en subcategorías, en función de la naturaleza del enlace químico en que actúan. Ejemplos no limitativos de enzimas hidrolíticas son: proteasas (peptidasas o proteasas), que cortan un enlace peptídico; nucleasas, que cortan un enlace fosfodiéster entre las subunidades del nucleótido; lipasas, que cortan un enlace éster en las grasas; y glicosidasas que cortan un enlace éter en los carbohidratos.

El término "sitio de corte," hace referencia al sitio de la biomolécula, por ejemplo un péptido, en que la enzima hidrolítica actúa selectivamente para cortar dicha biomolécula.

El término "grupo funcional" se debe interpretar como usualmente en el estado de la técnica, es decir, como un conjunto específico de átomos y enlaces dentro de una molécula responsable de la reactividad de la molécula. El mismo grupo funcional participa en la misma reacción química, o similar, independientemente del tamaño de la molécula al cual pertenece.

El término "fragmento" en el contexto de la invención se debe interpretar como un radical químico que une la biomolécula que comprende un sitio susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica a la superficie de la capa.

El término "(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-alquilo" hace referencia a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada saturada con 1 a 12 átomos de carbono. Preferiblemente "(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-alquilo" es (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alquilo, que es preferiblemente un grupo no sustituido seleccionado de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, s-butilo y t-butilo. Por diradicales derivando de (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alcano se entienden los diradicales constituidos a partir de una cadena de hidrocarburo saturada lineal o ramificada con 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo: -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. Similarmente, los diradicales que derivan de un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alqueno o un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alquino son diradicales constituidos por una cadena de hidrocarburo saturada lineal o ramificada con 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo: -CH<sub>2</sub>-CH=CH- o -CH<sub>2</sub>-C≡C-. Similarmente, los diradicales que derivan de (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalcano son diradicales constituidos por una cadena de hidrocarburo cíclico saturado con 1 a 12 átomos de carbono.

Los inventores han desarrollado un método de cuantificación de actividad de una enzima hidrolítica que se beneficia del proceso de FRET que tiene lugar en la nanopartícula de nuevo diseño. Estas nanopartículas contienen dos

poblaciones de QDs incrustados en sílice de manera concéntrica y una biomolécula marcada con un marcador que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, dicha biomolécula siendo conectada a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (I) o (II) como definido más arriba (ver FIGs 1 y 2). El tipo de fragmento conectando la biomolécula a la superficie de la capa depende parcialmente de la naturaleza química de la biomolécula.

En un modo de realización, la biomolécula está conectada a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (I). En otro modo de realización, la biomolécula está conectada a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (II). Estos fragmentos se introducen durante la preparación de las nanopartículas para proporcionar la reactividad deseada a la superficie de la capa como se describe más abajo.

En un modo de realización, en el fragmento de fórmula (I),  $n$  es un entero comprendido de 1 a 5. En un modo de realización, en el fragmento de fórmula (I),  $L$  es un diradical seleccionado de los diradicales que derivan de ( $C_1-C_{12}$ )alcano, ( $C_3-C_6$ )cicloalcano y benceno. En un modo de realización particular, en el fragmento de fórmula (I),  $L$  es un diradical que deriva de ( $C_1-C_{12}$ )alcano. En otro modo de realización particular, en el fragmento de fórmula (I),  $L$  es un diradical que deriva de ( $C_1-C_6$ )alcano. En un modo de realización, en el fragmento de fórmula (I),  $FG_1$  y  $FG_2$  son cada uno un diradical independientemente seleccionado del grupo constituido por los diradicales de fórmula (IV), (V), (VI), (VII) y (IX). En otro modo de realización, en el fragmento de fórmula (I),  $FG_1$  y  $FG_2$  son cada uno un diradical independientemente seleccionado del grupo constituido por los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII). En un modo de realización particular, en el fragmento de fórmula (I),  $FG_1$  y  $FG_2$  son un diradical de fórmula (VI). En un modo de realización,  $X$  es O. En otro modo de realización,  $R_1$  es H.

En un modo de realización, en el fragmento de fórmula (II),  $n$  es 0. En el fragmento de fórmula (II), cuando  $n$  es 0,  $FG_1$  es seleccionado del grupo constituido por los diradicales de fórmula (III), (IV), (V) y (VI), donde  $X$  es O. En otro modo de realización, en el fragmento de fórmula (II),  $n$  está comprendido de 1 a 5. En el fragmento de fórmula (II), cuando  $n$  está comprendido de 1 a 5,  $FG_1$  es un diradical seleccionado de los diradicales de fórmula (IV), (V), (VI), (VII) y (IX). Particularmente, en el fragmento de fórmula (II), cuando  $n$  está comprendido de 1 a 5,  $FG_1$  se selecciona de los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII).

En un modo de realización particular, la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (I), donde  $n$  es un entero comprendido de 1 a 5; y  $FG_1$  y  $FG_2$  son independientemente seleccionados de los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII) donde  $X$  es O. En otro modo de realización, la nanopartícula es conectada a la capa a través de un fragmento de fórmula (II), donde  $n$  es un entero comprendido de 1 a 5; y  $FG_1$  se selecciona de los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII) donde  $X$  es O. En otro modo de realización particular, la nanopartícula se conecta a la capa a través de un fragmento de fórmula (II), donde  $n$  es 0 y  $FG_1$  se selecciona de los diradicales de fórmula (III), (IV), (VI) o (V), donde  $X$  es O.

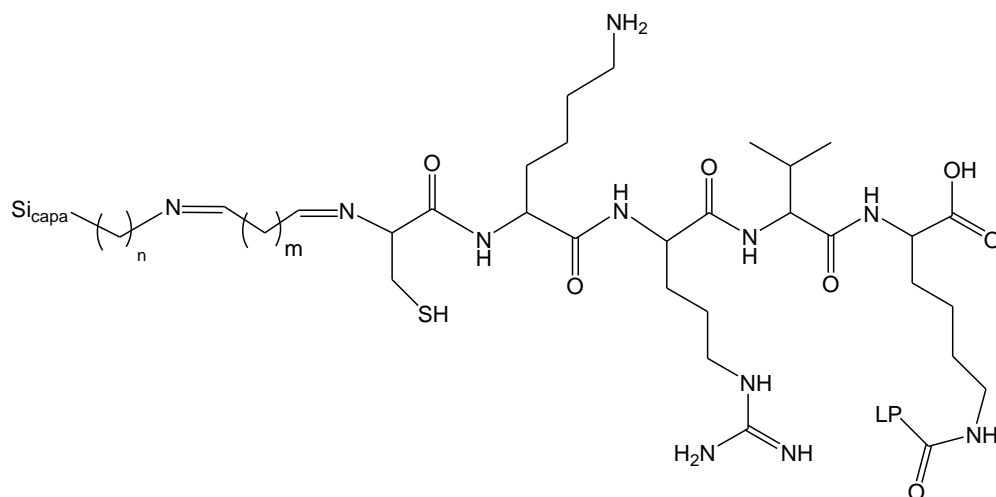
Como se menciona más arriba, la biomolécula comprendida en la nanopartícula de la invención se selecciona de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato y un lípido que comprenden un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica. La enzima hidrolítica se selecciona del grupo constituido por las enzimas clasificadas EC 3 en la clasificación numérica de enzimas. En un modo de realización, la biomolécula es un ácido nucleico que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por una nucleasa. En otro modo de realización, la biomolécula es un carbohidrato que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por una glicosil hidrolasa. En otro modo de realización, la biomolécula es un lípido que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por una lipasa. En otro modo de realización, la biomolécula es un péptido que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por una proteasa. En otro modo de realización la secuencia de dicho péptido comprende de 3 a 12 aminoácidos. En un modo de realización particular, la biomolécula es un péptido que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina. En otro modo de realización particular, la biomolécula es un péptido que comprende la secuencia: Cys-Lys-Arg-Val-Lys (SEC ID NO: 1), que contiene un sitio de corte para tripsina. La tripsina corta específicamente proteínas al sitio "carboxilo" de los aminoácidos lisina y arginina dentro de una cadena peptídica, salvo en caso en que cualquiera esté conectado a una prolina. Los péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos diseñados para contener un sitio de corte para una enzima hidrolítica se pueden obtener por métodos conocidos. En particular, los péptidos diseñados para contener un sitio de corte para una enzima hidrolítica se pueden obtener síntesis de fase sólida.

La biomolécula usada en la invención está unida a un marcador PL, donde dicho marcador se está unido a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de fórmula  $FG_3$  seleccionado del grupo constituido por los diradicales de fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) definidos más arriba. En modos de realización particulares,  $FG_3$  es seleccionado de los diradicales de fórmula (IV), (VII) y (VIII). Más particularmente,  $FG_3$  es un diradical de fórmula (VII) donde  $R_1$  es H. Ejemplos no limitativos de marcadores PL útiles en la invención son rodamina, y derivados de rodamina como tetrametilrodamina (TMR), carboxitetrametil-rodamina (TAMRA), Carboxi-X-rodamina (ROX), tetrametilrodamina 5-(o 6)-isotiocianato (TRITC), 5-(o 6)-carboxitetrametilrodamina succinimidil éster (NHS-rodamina), tetraetilrodamina

5 hidrocloruro (Rodamina B), Xanthylium, 9-(2-(etoxicarbonil)fenil)-3,6-bis(etilamino)-2,7-dimetil, chloruro (Rodamina 6G), sulforodamina 101 cloruro de sulfonilo (Texas Red), y 5-[5-carboxipentil]sulfamoil]-2-[6-(dietilamino)-3-(dietiliminiumil)-3H-xanthen-9-il]benceno-1-sulfonato (Rodamina Red-X). En un modo de realización particular, el marcador es TAMRA. En otro modo de realización particular, la nanopartícula comprende un péptido que contiene un sitio de corte susceptible de ser cortado por una proteasa, particularmente tripsina, conectado a TAMRA. En otro modo de realización particular, péptido marcado con TAMRA se define con la secuencia Cys-Lys-Arg-Val-Lys-TAMRA (SEC ID NO: 2).

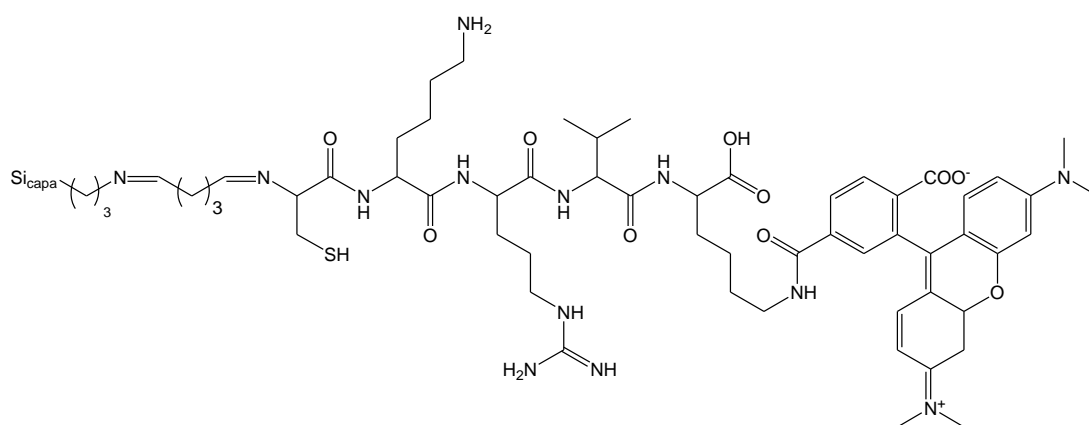
10 En otro modo de realización particular la nanopartícula de la invención contiene al menos: (a) un fragmento de fórmula (I), donde n es un entero comprendido entre 1 y 5, FG<sub>1</sub> y FG<sub>2</sub> son independientemente seleccionados de los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII), y X es O, (b) una biomolécula que es un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina, la secuencia de dicho péptido comprendiendo de 3 a 12 aminoácidos, y (c) un marcador PL conectado al péptido a través de un diradical seleccionado de los diradicales de fórmula (IV), (VII) y (VIII). En otro modo de realización particular la nanopartícula de la invención contiene al menos: (a) un fragmento de fórmula (I), donde n es un entero comprendido entre 1 y 5, FG<sub>1</sub> y FG<sub>2</sub> son independientemente seleccionados de los diradicales de fórmula (IV), (VI) y (VII), donde X es O, (b) una biomolécula que es a péptido de SEC ID NO:1, y (c) un marcador PL conectado al péptido a través de un diradical de fórmula (VII) donde R<sub>1</sub> es H.

20 En otro modo de realización particular la nanopartícula de la invención comprende al menos una estructura de fórmula (X) conectada a la superficie de la capa, donde n es un entero de 1 a 5, m es un entero de 1 a 6, y PL es rodamina o un derivado de rodamina.



Formula (X)

25 En otro modo de realización particular, la nanopartícula de la invención comprende al menos una estructura de fórmula (X') conectada a la superficie de la capa. En este modo de realización, la biomolécula es un péptido de SEC ID NO: 2.



Formula (X')



5 Generalmente, el ratio de biomolécula marcada con marcador PL/nanopartícula está comprendida de 0,1/1 a 100/1, es decir de 0,1 a 100 biomoléculas marcadas con marcador PL están comprendidas en una nanopartícula. En un modo de realización, el ratio de biomolécula marcada con PL/nanopartícula está comprendido entre 50/1 y 100/1, es decir, 50 a 100 biomoléculas marcada con PL están comprendidas en una nanopartícula. En otro modo de realización, el ratio está comprendido de 70/1 a 90/1. En un modo de realización particular, la biomolécula es un péptido marcado con TAMRA que comprende un sitio de corte como se ha definido más arriba (SEC ID NO: 2), y el ratio adecuado péptido/nanopartícula está en torno a de 83/1.

10 En otro modo de realización, el ratio de biomolécula / nanopartícula marcada con marcador PL está comprendido de 0,1/1 a 50/1. En otro modo de realización, el ratio está comprendido de 0,1/1 a 5/1. En otro modo de realización, el ratio está comprendido de 0,3/1 a 3/1. En otro modo de realización particular, la biomolécula es un péptido marcado con TAMRA que comprende un sitio de corte de tripsina como se ha definido anteriormente (SEC ID NO: 2), y el ratio apropiado de péptido/nanopartícula está en torno a 1/1.

15 En un modo de realización, la distancia media entre el marcador y QD2 está comprendida de 7 a 22 nm y la emisión PL de QD2 y la absorción PL del marcador o la emisión PL del marcador y la absorción PL de QD2 tienen un solapamiento espectral comprendido de 40 a 80% área/área. Esta distancia y solapamiento espectral son particularmente adecuados para un FRET eficiente en las nanopartículas de la invención. Adicionalmente, la distancia media entre la primera y la segunda población de QDs puede estar comprendida de 25 a 100 nm. Tal distancia permite evitar de manera eficaz el FRET entre las dos poblaciones de QDs, y también entre el marcador y QD1 en las nanopartículas de la invención. Un proceso de FRET eficiente también se puede evitar entre la primera y segunda poblaciones de QDs, o entre QD1 y el marcador, cuando el espectro de emisión PL del dador y el espectro de absorción del aceptor no tienen un solapamiento espectral significativo, incluso si la distancia media es inferior a 25 nm. Así, en adición a la distancia media entre QD1 y QD2, o alternativamente, el espectro de emisión PL de QD1 y el espectro de absorción PL del marcador tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área, o el espectro de emisión PL del marcador y el espectro de absorción PL de QD1 tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área. Además de la distancia entre QD1 y el marcador PL comprendida de 25 a 100 nm, o alternativamente, el espectro de emisión PL de QD1 y el espectro de absorción PL de QD2 tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área, o el espectro de emisión PL de QD2 y el espectro de absorción PL de QD1 tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área.

35 En un modo de realización particular, la distancia media entre el marcador y QD2 está comprendida de 10 a 18 nm, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nm. En otro modo de realización particular el solapamiento espectral entre el espectro de emisión PL de QD2 y el espectro de absorción PL del marcador o entre el espectro de emisión PL del marcador y el espectro de absorción PL de QD2 está comprendido de 50 a 80% área/área, o de 60 a 80% área/área, o de 70 a 80% área/área. Además, en una configuración particular de la nanopartícula de la invención, QD2 es el dador y el marcador PL es el aceptor en el proceso de FRET. Sin embargo, la configuración inversa también es posible.

40 En un modo de realización particular, la nanopartícula de la invención tiene las siguientes características: la distancia media entre el marcador PL y QD2 está comprendida de 12 a 16 nm, el espectro de emisión PL de QD2 y espectro de absorción PL del marcador tienen un solapamiento espectral comprendido de 60 a 80% área/área, y la distancia media entre el marcador y QD1 está comprendida de 40 a 90 nm.

45 En un modo de realización preferido de la invención, las poblaciones QD1 y QD2 comprenden nanocristales de CdSe.

50 En un modo de realización de la invención, QD1 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 600 a 700 nm, QD2 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 500 a 600 nm, y el marcador tiene una longitud de onda de absorción PL comprendida de 450 a 650 nm. En otro modo de realización, QD1 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 630 a 680 nm, QD2 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 520 a 560 nm, y el marcador tiene una longitud de onda de absorción PL comprendida de 500 a 620 nm. En otro modo de realización, QD1 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 640 a 670 nm, particularmente 660 nm, QD2 tiene una longitud de onda de emisión PL comprendida de 530 a 550 nm, particularmente, 540 nm, y el marcador tiene una longitud de onda de absorción PL comprendida de 550 a 600 nm, particularmente 580 nm.

60 Las nanopartículas de la invención constituyen sensores radiométricos particularmente apropiados para cuantificar la actividad de una enzima hidrolítica. La digestión enzimática de biomoléculas es altamente específica, ya que cada enzima hidrolítica corta enlaces particulares de la biomolécula. Así, en un modo de realización de la invención, las nanopartículas se usan para cuantificar tripsina en una muestra. Con ese fin, la nanopartícula de la invención comprende un péptido que comprende un sitio susceptible de ser cortado por tripsina.

El método para cuantificar una enzima hidrolítica de acuerdo con la invención procede de la manera siguiente. En el estado de reposo (es decir, en ausencia de enzima hidrolítica), se establece FRET entre la segunda población de QDs y el marcador por excitación de la nanopartícula de la invención. Excitación significa en este caso que la nanopartícula está sometida a una fuente de luz que permite que la primera y segunda poblaciones de QDs emitan una emisión PL. Dicha fuente de luz de excitación puede estar comprendida, por ejemplo, de 375 a 515 nm. Las intensidades PL de las dos poblaciones de QD se pueden determinar por medios convencionales de detección, por ejemplo, un espectrofotómetro. Se detectarán tres distintos señales de emisión PL, porque los QD1, QD2 y el marcador en las nanopartículas de la invención tienen diferentes espectros de emisión. Cuando una nanopartícula que contiene una biomolécula que comprende un sitio de corte para una enzima hidrolítica está en contacto con dicha enzima, el corte de la biomolécula tiene lugar. Dicho corte interrumpe el proceso de FRET entre QD2 y el marcador, lo cual da lugar a un cambio detectable de intensidad PL del sistema. Cuando las nanopartículas de acuerdo con la invención están en contacto con la enzima, la variación en intensidad PL es proporcional a la actividad de la enzima hidrolítica, es decir que se puede relacionar con la concentración de enzima. Además, ya que QD1 no interviene en ningún proceso de FRET con QD2 o con el marcador, la intensidad PL de QD1 permanece constante y proporciona una referencia interna para la cuantificación. Dicha referencia interna contribuye significativamente a la sensibilidad y robustez del método de cuantificación, particularmente porque no se ve afectado por las condiciones ambientales (la intensidad PL del núcleo permanece constante independientemente del pH, de la temperatura o de otras condiciones ambientales).

El método de la invención para la cuantificación de tripsina se muestra en FIG 2. En este caso particular, cuando la tripsina corta el péptido conectado a la nanopartícula, se interrumpe el FRET entre QD2 y el marcador PL, resultando en un cambio detectable de intensidad PL de QD2 (aumento de intensidad de señal). Non obstante, cabe resaltar que la cuantificación de tripsina es un modo de realización particular de la invención que no limita el ámbito de protección de la invención, ya que el método de cuantificación descrito se puede aplicar de la misma manera para cuantificar otras enzimas hidrolíticas.

En el método de la invención, se determina el ratio entre intensidades PL de la segunda y primera población de QDs, y se correlaciona con la cantidad de enzima en la muestra. Esta correlación se puede determinar por calibración del sistema con muestras de concentración conocida en enzima, es decir, por determinación del ratio de intensidad PL de la segunda y primera población de QDs en ausencia de enzima y con concentraciones conocidas de enzima. Se puede extrapolar una concentración desconocida de enzima en una muestra por determinación del ratio entre las intensidades PL detectadas para la segunda y primera población de QDs. La calibración de un sistema que usa las nanopartículas de la invención se detalla en los ejemplos más abajo para la cuantificación de tripsina. El mismo protocolo de calibrado se puede usar para determinar la relación de otras enzimas hidrolíticas con las intensidades PL de las poblaciones de QDs de nanopartículas análogas.

La alta especificidad para el sitio de corte de la biomolécula, junto con la eficiencia del proceso de FRET y la referencia interna contribuyen a hacer el método de la invención altamente sensible, preciso y robusto. El resultado se puede obtener pocos minutos después de haber puesto en contacto la muestra con las nanopartículas. Cuando el método se usa para llevar a cabo diagnosis, por ejemplo diagnosis de FC, los resultados se pueden obtener en tiempos más cortos y con menos manipulación que con los inmunoensayos convencionales. Adicionalmente, este ensayo biológico se puede reducir para que sea aplicable en el punto de atención. Espectrofotómetros portables son conocidos en el arte y se podrían adaptar para ser usados en el método de la invención.

Como se muestra en los ejemplos más abajo, los inventores determinaron la concentración de tripsina en muestras de heces de pacientes afectados por la FC gracias al método de la invención, y encontraron que dichos pacientes tienen una concentración de tripsina comprendida de 0 a 90  $\mu\text{g/g}$ . Adicionalmente, el método de la invención se puede usar para determinar el fenotipo para el gen CFTR de un sujeto cuantificando la cantidad de tripsina en las heces. Los sujetos que tienen dos copias funcionales del gen CFTR tienen una concentración fecal de tripsina comprendida de 160 a 340  $\mu\text{g/g}$ , mientras que sujetos que tienen una copia mutada (no funcional) del gen CFTR tienen una concentración fecal de tripsina comprendida de 91 a 349  $\mu\text{g/g}$ . Es de interés porque la FC tiene un patrón recesivo autosómico. La mayoría de gente sin FC tiene dos copias funcionales del gen CFTR, y las dos copias deben ser no funcionales para que se desarrolle la FC. Así, una concentración fecal de tripsina comprendida de 91 a 159  $\mu\text{g/g}$  indica que el sujeto es heterocigoto para el gen CFTR (tiene una copia funcional y una copia no funcional). El paciente se considera entonces portador de FC, es decir que no desarrolla la patología pero sus descendientes sí podrían. En contraste, una concentración fecal de tripsina por encima de 340  $\mu\text{g/g}$  es representativa de dos copias funcionales del gen CFTR, es decir del estatuto de no-portador. Como mencionado más arriba, una concentración fecal de tripsina de 0 a 90  $\mu\text{g/g}$  indica que el sujeto sufre de FC y que tiene dos copias mutadas del gen CFTR. Así, un modo de realización de la invención proporciona un método como definido más arriba para clasificar un sujeto como portador homocigótico de FC, portador heterocigótico de FC o no-portador de FC, donde una concentración fecal de tripsina comprendida de 0 a 90  $\mu\text{g/g}$  es indicativa de un portador

homocigótico de FC, una concentración fecal de tripsina comprendida de 91 a 159  $\mu\text{g/g}$  es indicativa de un portador heterocigótico de FC y una concentración fecal de tripsina superior a 340  $\mu\text{g/g}$  es indicativa de un no-portador.

La divulgación también hace referencia a un kit para cuantificar u a enzima hidrolítica en una muestra que comprende una nanopartícula como definido más arriba junto con instrucciones para la cuantificación de la enzima hidrolítica. En un modo de realización particular la invención proporciona un kit de diagnóstico de FC. Este kit comprende nanopartículas dónde la biomolécula comprende un sitio de corte para tripsina como definido en algunos modos de realización más arriba, así como instrucciones para la cuantificación de tripsina en muestra biológica. Estas instrucciones son, por ejemplo, instrucciones para llevar a cabo el test, tomar las medidas, calibrar el sistema, o incluso una curva de calibración pre-calculada para la cuantificación directa como la proporcionada en los ejemplos más abajo. El kit puede adicionalmente contener otros reactivos o medios para llevar a cabo el test, por ejemplo, tampones, disolución de ensayo, controles positivos y negativos, disolución de parado (una disolución que detiene la reacción de hidrólisis), cubetas desechables, platos de microtitración, o similar. El kit puede también incluir medios para la calibración del método de cuantificación, como disoluciones de tripsina.

El kit contiene una suspensión de nanopartículas de la invención en una disolución tampón. La disolución tampón suele tener un pH neutro. En un modo de realización particular, el tampón es una disolución de fosfato (PBS). En otro modo de realización las nanopartículas de la invención están depositadas, inmovilizadas, o recubiertas, en un soporte sólido. Por ejemplo, las nanopartículas de la invención pueden ser inmovilizadas, o recubiertas, o depositadas en una membrana, un plato de vidrio, un plato de poli estireno, un plato de microtitración, etc. Las nanopartículas pueden ser directamente inmovilizadas en el soporte sólido y opcionalmente recubiertas por un hidrogel. Alternativamente, las nanopartículas pueden estar incluidas en un hidrogel o en una matriz sol-gel previamente a su inmovilización en el soporte sólido. Tales soportes precargados con nanopartícula se pueden usar directamente como sustratos en el método de la invención. Por ejemplo, la muestra que contiene tripsina es directamente añadida a un plato de microtitración pre-cargado con la nanopartícula y, después de poco tiempo, se determinan las señales de salida. Este formato tiene la ventaja de poder analizar muestras múltiples al mismo tiempo.

La invención también proporciona un método de preparación de las nanopartículas. En un modo de realización, la invención se refiere a un método de preparación de una nanopartícula como se ha definido más arriba, que comprende (i) formar un núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice por el método de microemulsión reversa, (ii) formar una capa que contiene una segunda población de QDs incrustados en sílice sometiendo el núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice de la etapa (i) al método de microemulsión reversa, (iii) recuperar la nanopartícula núcleo-capa obtenida en la etapa (ii), opcionalmente (iv) funcionalizar la superficie de la capa, y (v) añadir una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido que comprenden un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica y están unidos a un marcador fotoluminiscente que está unido a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de fórmula  $\text{FG}_3$  como se define en la reivindicación 1; dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se definen en la reivindicación 1..

Este método comprende en primer lugar formar un núcleo que contiene QD1 incrustados en sílice ( $\text{QD1@SiO}_2$ ). El método de microemulsión reversa se puede usar para este propósito. El  $\text{QD1@SiO}_2$  obtenido se usa como producto de partida para la segunda etapa de microemulsión reversa, en qué se añade QD2 al núcleo de  $\text{QD1@SiO}_2$ . El resultado de esta segunda etapa de microemulsión reversa es la formación de una capa alrededor de  $\text{QD1@SiO}_2$ , dicha capa conteniendo QD2, también incrustados en sílice ( $\text{QD1@SiO}_2@\text{QD2@SiO}_2$ ). La superficie de la estructura núcleo/capa así formada tiene grupos funcionales libres, por ejemplo, grupos funcionales hidroxilo o aldehído, según el reactivo usado en la etapa de microemulsión reversa, que son susceptibles de reaccionar con otros compuestos, dichos compuestos estando consecuentemente unidos a la superficie de la capa. Sin embargo, si se desea una reactividad distinta en la superficie, la funcionalización de la superficie es posible. Después de recuperar las estructuras núcleo/capa, con o sin funcionalización adicional, la siguiente etapa en el método de la invención es añadir una biomolécula unida a un marcador fotoluminescente y que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica.

El método de microemulsión reversa es conocido en el arte para preparar QDs incrustados en sílice (Ma *et al*, "Multiplexed color encoded silica nanospheres prepared by stepwise encapsulating quantum dot/SiO<sub>2</sub> multilayers", *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, pp. 7071–7073). El método básicamente comprende añadir, bajo agitación vigorosa, QDs y un compuesto proveedor de sílice en un sistema líquido que comprende un disolvente orgánico y un surfactante no iónico. Después de un tiempo comprendido de 20 a 30 min, se inyecta amoniaco y la emulsión resultante se agita durante un tiempo comprendido de 2 a 24 h. Para preparar las nanopartículas de la invención, se lleva a cabo esta primera etapa de microemulsión reversa, dando lugar a perlas que constituyen el núcleo. Entonces, se añade QD2, más compuesto proveedor, y más tarde amoniaco al sistema líquido para formar la capa de QD2 incrustado en sílice alrededor de los núcleos.

Algunos compuestos proveedores de sílice útiles en la invención son TEOS (tetraetil ortosilicato) y TEAS (trietiloxi aldehído silano). Disolventes orgánicos útiles en el método de microemulsión reversa son ciclohexano, hexano, pentano, heptano, metanol y etanol. Surfactantes no iónicos útiles en la invención son NP-7 (nonilfenol etoxilato), IGEPAL CA-630 (Octilfenil-polietileno glicol), NP-40 (nonil fenoxipoiotioxietanol), Triton X100 (polietileno glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil eter), y polisorbato 80.

Cuando la segunda etapa de microemulsión reversa está completada, las estructuras núcleo/capa se recuperan mediante medios convencionales, por ejemplo, por filtración o centrifugación, y lavadas una o más veces. La etapa de lavado se puede llevar a cabo usando un disolvente orgánico, por ejemplo, etanol, metanol o acetona.

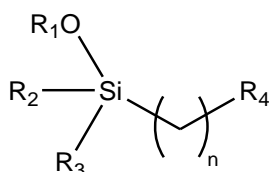
La superficie de la estructura núcleo/capa así formada tiene grupos funcionales libres. Estos grupos funcionales dependen del compuesto proveedor de sílice usado en la segunda etapa de microemulsión reversa. Por ejemplo, cuando se usa TEOS, el grupo funcional de la superficie de la capa es hidroxilo. Cuando se usa TEAS el grupo funcional de la superficie de la capa es aldehído. Así, la reactividad de la superficie de la capa se puede ajustar a través del método de preparación.

Aprovechando esta reactividad, la biomolécula puede ser unida directamente a la estructura núcleo/capa (sin funcionalización de la superficie). Esto da lugar a una nanopartícula donde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (II), donde  $n$  es 0 y  $FG_1$  se selecciona de los diradicales de fórmula (III), (IV), (V) o (VI) como se ha definido más arriba, donde  $X$  es O. Un método adecuado para la obtención de una nanopartícula de acuerdo con este modo de realización comprende reaccionar la biomolécula que contiene un grupo funcional adecuado para reaccionar con el grupo funcional de la estructura núcleo/capa obtenida más arriba. Algunos grupo funcionales que pueden reaccionar con la superficie de la estructura núcleo/capa obtenida más arriba son hidroxilo, carboxilo, amina, y grupos fosforilo. Los grupos fosforilo pueden ser, de manera no limitativa, ésteres de fosfato o diésteres de fosfato.

Sin embargo, como mencionado más arriba la superficie de la capa puede ser opcionalmente funcionalizada antes de añadir la biomolécula. Esto da lugar a nanopartículas que comprenden un fragmento de fórmula (I) o (II), donde  $n$  está comprendido de 1 a 10.

En un modo de realización la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (II), donde  $n$  está comprendido de 1 a 10. Un método adecuado de preparación de la nanopartícula de este modo de realización comprende los siguientes pasos:

(a) Reaccionar la estructura núcleo/capa con un compuesto de fórmula XI



Formula XI

dónde  $R_1$  es H o  $(C_1-C_3)$ alquilo,

$R_2$  y  $R_3$  son independientemente seleccionados de  $OR_5$  o  $(C_1-C_3)$ alquilo,

$R_5$  se selecciona de H o  $(C_1-C_3)$ alquilo,

$R_4$  se selecciona de  $NH_2$ , SH, OH y  $CO_2H$ , y

$n$  es un entero de 1 a 10.

Esta reacción se lleva a cabo bajo agitación en presencia de un disolvente orgánico, como tolueno, a temperatura ambiente y durante un tiempo comprendido de 15 a 30 h, por ejemplo 24 h. En modos de realización particulares, se puede añadir también 3-(trihidroxisilil)propil metilfosfonato (THPMP) para evitar la agregación de las nanopartículas. En algunos modos de realización,  $R_2$  y  $R_3$  en el compuesto de fórmula XI son independientemente  $OR_5$ . En modos de realización particulares, el compuesto de fórmula XI se selecciona de aminopropil trimetoxisilano (APTMS), aminopropil trietoxisilano (APTES), 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS) y 3-mercaptopropil trietoxisilano (MPTES);

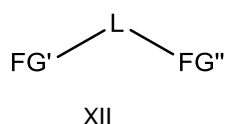
(b) reaccionar el producto de (a) con una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido que comprende un sitio susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica. Esta etapa se lleva a cabo bajo condiciones apropiadas para la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional libre

comprendido en la biomolécula y R<sub>4</sub>. En un modo de realización particular la biomolécula es una biomolécula marcada con un marcador PL.

5 Por tanto, la etapa (b) comprende hacer reaccionar el producto de (a) con una biomolécula seleccionada de péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido, en el que dicha biomolécula comprende un sitio susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica y un marcador fotoluminiscente que está unido a la parte de la biomolécula que se separa de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un dirradical de fórmula FG<sub>3</sub> como se ha definido anteriormente, dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se han definido  
10 previamente.

En otro modo de realización, la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento de fórmula (I), dónde n está comprendido de 1 a 10. Este modo de realización implica la funcionalización de la superficie de la capa previamente a la unión con la biomolécula. Un método apropiado para la preparación de una nanopartícula de acuerdo con este modo de realización comprende las etapas (a), (b') y (c), dónde la etapa (a) es como definido más arriba y las etapas (b') y (c) son:  
15

(b') reaccionar el producto de (a) con un compuesto de fórmula XII



20 dónde L es un dirradical seleccionado de los dirradicales que derivan de un compuesto seleccionado de (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alcano, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alqueno, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alquino, (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalcano y benceno, y FG' y FG'' son independientemente seleccionados de -OH, -CO<sub>2</sub>H, -OP(O)(OR')<sub>2</sub>, -CHO, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>2</sub>Cl y -SH dónde R' es H o (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo.

25 El compuesto de fórmula XII puede ser, por ejemplo, un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)diácido, una (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)diamina, una (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)hidroxiamina, un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)hidroxiácido, un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)diol, un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)dialdehído, una dicetona o un aminoácido. Algunos compuestos de fórmula XII son, de manera no limitativa, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)polietileneimina, ácidos (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)mercaptoalquanoicos (como ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropiónico, y ácido mercaptoundecanoico), ácido tioglicólico, y (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>)dialdehídos. En un modo de realización particular el compuesto de fórmula XII es un (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)dialdehído, como el glutaraldehído.  
30

(c) reaccionar el producto de (b') con una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido que comprende un sitio susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica. Esta etapa se lleva a cabo bajo condiciones apropiadas para la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional libre comprendido en la biomolécula y FG''. En un modo de realización particular la biomolécula es una biomolécula marcada con PL.  
35

Por tanto, la etapa (c) comprende hacer reaccionar el producto de (b') con una biomolécula seleccionada de péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido, en el que dicha biomolécula comprende un sitio susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica y un marcador fotoluminiscente que está unido a la parte de la biomolécula que se separa de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un dirradical de fórmula FG<sub>3</sub> como se ha definido anteriormente, dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se han definido  
40 previamente.

45 Este método es ventajoso ya que permite optimizar la reactividad de la estructura núcleo/capa con la biomolécula, dando lugar a una mayor versatilidad del sistema. Cuando se funcionaliza la superficie de la capa cabe tener en cuenta que el fragmento añadido no debe exceder cierto tamaño, de tal manera que la distancia entre QD2 y el marcador permita el proceso de FRET.

50 Típicamente, la biomolécula que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica está unida al marcador PL previamente a la etapa de unión de la biomolécula a la superficie de la capa. Unos marcadores PL adecuados se han mencionado más arriba. Métodos de marcaje de péptidos, carbohidratos, lípidos y/o ácidos nucleicos con compuestos PL son conocidos en el arte y algunos péptidos marcados con marcadores son comerciales. Los péptidos marcados se pueden preparar por modificación del péptido aislado o por incorporación del  
55 marcador durante la síntesis en fase sólida. Se usan tres estrategias para marcar péptidos con marcadores: 1) marcaje durante la síntesis del péptido; se incorporan marcadores que no se ven afectados por las condiciones de desprotección en los residuos aminados de la cadena peptídica 2) los péptidos sintéticos se pueden modificar en

ciertos residuos específicos que permiten la incorporación de marcadores; y 3) los péptidos sintéticos pueden ser marcados covalentemente a través de marcadores reactivos a aminas o tioles.

Los fluoróforos pueden estar conjugados al N-terminus de un péptido unido a una resina antes de que se quiten otros grupos protectores y el péptido marcado se desprenda de la resina. Los fluoróforos reactivos a grupos amina se usan en un exceso de 5 veces la cantidad de grupos amina en el péptido inmovilizado. Otra posibilidad consiste en usar aminoácidos marcados por un cromóforo o fluorescentes para incorporarlos en sitios específicos del péptido. El marcaje también se puede conseguir usando un aminoácido biotinilado. Si se usase por ejemplo Fmoc-Lys(biotinil)-OH en la síntesis del péptido, el grupo biotina permitiría la unión específica a la streptavidina o a un conjugado de avidina a este sitio.

Siguiendo el protocolo rutinario de síntesis, los péptidos también se pueden marcar por prácticamente todos los marcadores usados en marcaje de proteínas. Esto implica principalmente marcadores reactivos con aminas o tioles. Mientras el protocolo estándar de marcaje de proteínas usa disoluciones acuosas de proteínas, el marcaje de péptidos en disolventes orgánicos requiere de modificaciones específicas. El uso de trietilamina u otras aminas terciarias se puede implementar para garantizar la formación de la unión entre el péptido y el marcador. En la nanopartícula descrita más abajo, el péptido marcado con SEC ID NO: 2 se obtuvo por formación de un enlace peptídico entre el marcador TAMRA y la cadena lateral de la lisina antes de la síntesis del péptido por fase sólida. Los métodos de formación de péptidos son conocidos en el arte.

Un número de diferentes nanopartículas de la invención se puede obtener por el método descrito más arriba, según el compuesto proveedor de sílice usado, los compuestos de funcionalización para formar el fragmento, los marcadores PL usados y las biomoléculas que comprenden un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, así como la estequiometría de los reactivos. Así la divulgación también proporciona una nanopartícula obtenible por los procesos descritos en esta invención, en particular el proceso que comprende las siguientes etapas:

(i) formar un núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice por el método de microemulsión reversa, (ii) formar una capa que contiene una segunda población de QDs incrustados en sílice sometiendo el núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice de la etapa (i) al método de microemulsión reversa, (iii) recuperar la nanopartícula núcleo-capa obtenida en la etapa (ii), y opcionalmente funcionalizar la superficie de la capa, y (iv) añadir al menos una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido, donde cada biomolécula comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, y un marcador fotoluminescente que está unido a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de fórmula  $FG_3$  como se define en la reivindicación 1; donde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se definen más arriba.

Se proporciona una nanopartícula obtenible formando una estructura núcleo/capa en las etapas (i)-(iii) como definidas anteriormente y posteriormente funcionalizando la superficie de la capa y añadiendo una biomolécula marcada con marcador PL como definido en las etapas (a)-(b) mencionadas más arriba. Se proporciona una nanopartícula obtenible formando una estructura núcleo/capa en las etapas (i)-(iii) como definidas en la breve descripción de la invención y añadiendo una biomolécula marcada con PL como definido en las etapas (a)-(b')-(c) mencionadas más arriba. Se proporciona una nanopartícula obtenible formando una estructura núcleo/capa en las etapas (i)-(iii) como definidas en la breve descripción de la invención y posteriormente funcionalizando la superficie de la capa y añadiendo una biomolécula marcada con PL como definido en las etapas (a)-(b')-(c) mencionadas más arriba, donde el compuesto de fórmula XI es APTMS, el compuesto de fórmula XII es glutaraldehído y la biomolécula marcada con PL es un péptido marcado de secuencia SEC ID NO: 2.

Para los propósitos de la invención, las expresiones "obtenible", "obtenido" y expresiones equivalentes similares se utilizan indistintamente y, en cualquier caso, la expresión "obtenible" abarca la expresión "obtenido".

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra "comprende" incluye la expresión "que consiste en". Los objetos adicionales, ventajas y características de la invención se deducirán por el experto en la materia a través de la examinación de la descripción o podrían deducirse de la reducción a la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración. Los signos de referencia a figuras y dibujos puestos entre paréntesis en una reivindicación únicamente sirven a hacer la reivindicación más inteligible y no pretende en ningún caso limitar dicha reivindicación.

EJEMPLOS

Materiales. Tripsina (13.000-20.000 unidades/mg), polvo de selenio (~ 100 mesh, 99,99%), trioctilfosfina (TOP, 90%), tolueno anhidro (99,8%), óxido de trioctilfosfina (TOPO, 90%), acetato de cadmio dihidrato (98%), óxido de cadmio (CdO, >99,99%), 1-octadeceno (90%), tetraetil ortosilicato (TEOS, 99,999), 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS, 97%), (3-trihidroxisilil) propil metilfosfonato (THPMP), disolución tampón de fosfatos (PBS) se compraron de Sigma-Aldrich. El amoniaco se compró de Fluka. Los péptidos con SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 3 se compraron de Biotrend.

Síntesis de los QDs. Se obtuvieron los QDs de CdSe, usándose TOPO-TOP como ligando de recubrimiento. Se preparó una disolución de selenio mezclando 0.4 g de selenio en polvo, 10 mL de TOP y 0,2 mL de tolueno anhidro, bajo agitación y atmosfera de argón. Se puso una mezcla de 20 g de TOPO y 0,25 g de acetato de cadmio dihidrato en un matraz, se agito y se calentó a 150 °C bajo argón, y, luego, a 320 °C. Una vez la temperatura alcanzo los 320 °C, se inyectó la disolución de selenio y se enfrió a 270 °C. Se dejó la reacción por un tiempo de 5 y 45 minutos para la preparación de QDs emisores de verde (QD540) y QDs emisores de rojo (QD660) respectivamente. Se paró la reacción, se enfriaron las muestras y se lavaron tres veces con etanol y acetona. Las muestras se guardaron disueltas en 10 mL de cloroformo.

Síntesis de las nanopartículas. En primer lugar, se prepararon los QDs incrustados en sílice (QD@SiO<sub>2</sub>). Se usaron dos poblaciones de puntos cuánticos de CdSe: una primera población de QDs con longitud de onda de emisión a 540 nm (verde (2,7 nm), QD540) y una segunda población de QDs con longitud de onda de emisión a 660 nm (rojo (5,6 nm), QD660). Se prepararon nano esferas de puntos cuánticos incrustados en sílice de uno y dos colores i.e. QD540@SiO<sub>2</sub> y QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub>, respectivamente por el método de microemulsión reversa (Ma *et al*, "Multiplexed color encoded silica nanospheres prepared by stepwise encapsulating quantum dot/SiO<sub>2</sub> multilayers", *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, pp. 7071–7073). 0,8 mL de QDs660 (5 mM) como obtenido más arriba y 0,640 mL TEOS fueron introducidos en un sistema líquido que contiene 15 mL de ciclohexano y 2,6 mL del surfactante NP-7 bajo agitación vigorosa. Pasadas 30 min, se añadió 0,1 mL amoniaco. Se agito la microemulsión durante 24 horas. El crecimiento gradual de sílice alrededor del QD hidrofóbico se ve favorecido por el reemplazamiento progresivo de los ligandos originales hidrofobicos por TEOS hidrolizado y NP-7. Esto resulto en perlas luminiscentes de QD660@SiO<sub>2</sub>. Entonces, se añadió 0,8 mL (6 mM) de QDs540 como obtenido más arriba y 0,1 mL TEOS al sistema líquido para formar una capa de fina de QDs540@SiO<sub>2</sub> alrededor de las perlas. La superficie de las nano esferas así obtenidas se funcionalizó con grupos amina por adición de 30 de of APTMS y dejando agitar 24 horas a temperatura ambiente. 80 µL de THPMP se añadió también para evitar la agregación electrostática de las nanopartículas. Finalmente, se centrifugaron las nanopartículas, se lavaron con etanol y se almacenaron finalmente en 5 mL PBS.

Posteriormente, se funcionalizó la superficie de las nano esferas de QD540@SiO<sub>2</sub> o QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub> con glutaraldehido. 2 mL de QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS o QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS en PBS (provieniendo de la disolución preparada más arriba) y 0,25 mL de glutaraldehido (0,25 mg/mL) fueron mezclados y agitados durante 4 h at 37 °C. Se centrifugo la disolución para quitar el exceso de glutaraldehido y se suspendió el residuo en 5 mL PBS. La siguiente etapa consistió en la adición de la biomolécula, que era un péptido marcado con TAMRA y que contiene un sitio de corte para la tripsina. Se prepararon dos nanopartículas distintas, cada una con un péptido marcado con TAMRA diferente: péptido pro-activo (NH<sub>2</sub>-Cys-Lys-Arg-Val-Lys-TAMRA, SEC ID NO: 2) y péptido In-activo (NH<sub>2</sub>-Cys-Lys-Pro-Val-Lys-TAMRA, SEC ID NO: 3). Para la unión de los péptidos, 500 µL de 400, 800 o 1200 µg/L péptidos marcados con TAMRA fueron añadidos a 2 mL de QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS-glutaraldehido o QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS- glutaraldehido como obtenido más arriba y agitados durante 20 horas a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó la disolución para quitar los péptidos no unidos. Al final, se suspendieron el QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS-glutaraldehido- SEC ID NO: 2 o QD660@SiO<sub>2</sub>@QD540@SiO<sub>2</sub>-APTMS-glutaraldehido- SEC ID NO: 2 en 5 mL PBS.

Digestión enzimática. Se añadió una disolución de tripsina de determinada concentración 25-350 entre 25-350 µg/L a 1 mL de nanopartículas como obtenido más arriba (5-6 mM) y se mezcló por un periodo de tiempo a 37 °C de 30 segundos a 120 minutos. Pasado este tiempo, se calentó la mezcla a 70 °C y se mantuvo una hora a esta temperatura para desnaturalizar la enzima y parar la reacción.

Caracterización. La formación de las nano esferas QDs@SiO<sub>2</sub> se puede visualizar directamente por microscopia de transmisión electrónica (TEM). Los espectros de UV-Visible y fluorescencia fueron mesurados usando una celda de cuarzo de 1 cm en un espectrofotómetro Shimadzu UV Spectrophotometer 1700 y un espectrométero de luminescencia Aminco-Bowman Series 2. Las intensidades PL a 540 y 660 nm se determinaron por excitación con un láser azul a 405 nm.

Cuantificación de Tripsina en heces humanos. Se estudió la concentración en tripsina de muestras de heces humanos de 11 pacientes, cuatro de los cuales habían sido previamente diagnosticados por test genético como homocigotos (FC). Los otros 7 pacientes no sufren FC pero fueron clasificados como heterocigotos por test genético. Los cuatro pacientes fueron incluidos en un programa de asistencia en varios hospitales de Barcelona y

tomaban diariamente dosis optimizadas de una enzima pancreática de tal manera que se incrementó la absorción de proteína (8-10 capsulas de Creon© 25,000 o 20 capsulas de Creon© 10,000 diarias). Se obtuvo el permiso y consentimiento por escrito de todos los pacientes o padres en el caso de menores de edad.

5 Se añadió 1g de heces sólidos de cada paciente (previamente almacenados a -8 °C), a 3 mL de PBS (pH 7,2) y se agito hasta obtener una suspensión homogénea. Para las medidas, se caliento la mezcla a 37 °C y se añadió y 1 mL de 5-6 mM QD660@SiO2@QD540@SiO2-APTMS-glutaraldehido- SEC ID NO: 2 en PBS obtenido como especificado arriba. La reacción se dejó durante 10 minutos y se calentó a 70 °C durante una hora para detener la reacción. Finalmente, se midieron las intensidades PL a 540 y 660 nm de las muestras.

10 Estadísticas: Las síntesis, digestiones enzimáticas y experimentos de cuantificación se llevaron a cabo al menos tres veces cada uno. Los resultados fueron en todos los casos reproducibles.

### 15 Resultados

La microscopia por transmisión de electrones (TEM) confirmo la formación de las estructuras núcleo/capa. Para una típica síntesis de un color, el diámetro medio de las perlas de QD540@SiO2 era de 38 nm. Cuando las perlas eran recubiertas con una segunda población QDs@SiO2, es decir, QD660@SiO2@QD540@SiO2, el diámetro medio de las perlas era de 77 nm.

20 La FIG 3 muestra los perfiles de absorción-emisión de fotoluminiscencia (PL) de las nano esferas QD540@SiO2 y del marcador TAMRA. Existe un ligero desplazamiento hacia el azul en la emisión PL de los QD@SiO2 en comparación con los QDs en disolución, es decir, 520 nm *versus* 540 nm, como se observó previamente, aun así la fluorescencia original se recupera después de la digestión con tripsina. El marcador TAMRA tiene una emisión de fluorescencia a 575 nm. Como se muestra en la FIG 3, la emisión de fluorescencia de QD540@SiO2 se solapa con el pico de absorción de TAMRA, permitiendo el proceso de FRET.

30 Como descrito en los métodos más arriba, la siguiente etapa era la unión de las perlas previamente obtenidas con un péptido marcado con TAMRA. Se usaron dos péptidos distintos, ya que uno de ellos proporciona una muestra de control sobre los experimentos. De un lado, el péptido marcado pro-activo tiene la siguiente secuencia: 3'-NH2-Cys-Lys-Arg-Val-Lys-TAMRA-5'. La actividad proteolítica de la tripsina es altamente específica para la secuencia Lys-Arg-Val y la digestión enzimática corta el péptido. Por otro lado, la muestra de control contiene un péptido marcado por TAMRA de similar naturaleza química, excepto que la Arginina (Arg) se cambió por Prolina (Pro). La tripsina no puede digerir el péptido "in-activo" y las propiedades de fluorescencia de la muestra de control no están alteradas por la presencia de tripsina. Se midieron los espectros de emisión de nano esferas QD540@SiO2 unidas a distintas concentraciones del péptido marcado con TAMRA pro-activo, para evaluar el efecto de la concentración de marcador sobre la emisión de los QDs. Con el aumento de la concentración de péptido marcado con TAMRA en las nano esferas de QD540@SiO2, la intensidad de emisión entre 500 y 550 nm disminuye, lo cual corresponde a la longitud de onda de emisión de fluorescencia de los puntos cuánticos. Esta baja de intensidad de emisión es una prueba directa de la existencia de FRET entre las nano esferas de QD540@SiO2 y el marcador TAMRA en el sistema de un color.

45 Se incubó el sistema de un color con tripsina para que se digiera el péptido, y se midió el espectro de emisión. Los perfiles espectroscópicos confirmaron la existencia de FRET entre las nano esferas QD540@SiO2 y el péptido marcado con TAMRA "pro-activo". Además, la muestra de control con el sistema in-activo QD540@SiO2 no mostro ningún cambio significativo en la emisión de fluorescencia.

50 El uso de un sistema de un solo color de QD540@SiO2 permitió el análisis cualitativo de la actividad proteolítica de la tripsina. Sin embargo, este sistema no facilita la determinación cuantitativa de la actividad enzimática. Para obtener una determinación cuantitativa de la actividad enzimática, los inventores añadieron un a segunda población de QDs al núcleo de las nano esferas de sílice con emisión de fluorescencia a 660 nm (FIG. 4). Así, el uso de dos fluoroforos con espectros de emisión distinguibles permite establecer un ratio medible, es decir  $I_{540}/I_{660}$ . Además, la intensidad de emisión a 660 nm permanece constante, ya que los QD660 de las nano esferas no intervienen en el proceso de FRET. Las características esenciales en este sistema de dos colores son que los dos fluoróforos se pueden excitar a la misma longitud de onda pero solo uno de los dos puede participar en el proceso de FRET con el marcador TAMRA. A pesar de un pequeño solapamiento entre la emisión de QD660 y la absorción del TAMRA, la distancia entre QD660 y el TAMRA, de alrededor de 38 nm, no permite la transferencia de energía, mientras que la distancia y el solapamiento entre QD540 y el TAMRA permiten el establecimiento del FRET. Gracias al contado de fotón correlacionado con el tiempo (TCSPC) y el espectro de emisión, los inventores encontraron que la distancia media entre el QD540 y el TAMRA es de 14,6 nm, con una eficiencia de 0,5238. El R0 calculado (distancia para la cual la eficiencia es de 50%) era de 7,79 nm y la distancia media entre QD540 y TAMRA era de 7,657 nm, lo cual coincide con el valor obtenido a partir de la medida del tiempo de vida, es decir 7,665 nm. En conclusión, se cumplen todos los prerrequisitos para un nanosensor cuantitativo.



La FIG. 5 ilustra los cambios en la emisión de fluorescencia de las nanopartículas QD660@SiO2@QD540@SiO2 en presencia de dos concentraciones de tripsina diferentes, 25 µg/L (FIG 5a) versus 350 µg/L (FIG 5b). El incremento de la concentración en tripsina conduce a una recuperación más rápida de la emisión original a 540 nm.

Los inventores llevaron a cabo el estudio de digestión enzimática usando el péptido marcado pro-activo en un rango de concentraciones de tripsina amplio (25-350 µg/L). La FIG 6 muestra el ratio entre la intensidad de emisión PL de QD540 y QD660 ( $I_{540}/I_{660}$ ) a lo largo de una digestión enzimática de 120 minutos con distintas concentraciones de enzima. Existe una relación directa entre la velocidad de digestión enzimática y la concentración de enzima, lo cual permite diferenciar fácilmente entre las diferentes concentraciones de enzima usadas. En otras palabras, cuando más alta es la concentración en tripsina, más corto es el tiempo requerido para alcanzar el plateau en las medidas cinéticas. Así, los inventores pudieron diferenciar entre las diferentes concentraciones de tripsina mediante el análisis de la actividad de la tripsina a tiempos iniciales de digestión (particularmente 10 minutos) usando el sistema radiométrico QD660@SiO2@QD540@SiO2 (FIG. 7). Como se puede apreciar, la curva de calibración es muy lineal ( $\chi^2=0.9947$ ) y permite correlacionar el ratio entre las intensidades PL a 540 y 660 nm ( $I_{540}/I_{660}$ ) de las muestras con su concentración en tripsina y gran sensibilidad.

Este método fue usado para cuantificar la concentración fecal de tripsina para 4 pacientes de FC (pacientes C, F, I y K), y 7 pacientes que son heterocigotos para el gene CFTR (pacientes A, B, D, E, G, H y J). Se determinó la concentración de tripsina de estas muestras en base a la curva de calibración descrita más arriba. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y confirman que los heces de los cuatro pacientes enfermos tienen una concentración en tripsina inferior a 90 µg/g, mientras que los heces de pacientes no enfermos tienen una concentración en tripsina superior a 90 µg/g.

Tabla 1. Concentración fecal de tripsina

Paciente	Tripsina (µg /g heces)			
	medurado		Valores corregidos	
A	171,98	± 3,081	171,98	± 3,081
B	121,92	± 1,504	121,92	± 1,504
C	129,19	± 4,053	40,05	± 1,256
D	217,01	± 8,341	217,01	± 8,341
E	188,04	± 7,277	188,04	± 7,277
F	121,15	± 4,694	10,9	± 0,422
G	168,58	± 9,997	168,58	± 9,997
H	158,85	± 7,767	158,85	± 7,767
I	111,89	± 8,272	34,69	± 2,564
J	133,41	± 3,043	133,41	± 3,043
K	128,93	± 4,905	50,28	± 1,913

Non obstante, cabe tener en cuenta que estos pacientes toman una medicación para incrementar su cantidad de enzimas pancreáticas (8-10 capsulas de Creon® 25,000 o 20 capsulas de Creon® 10,000 diarias), y en consecuencia, la actividad enzimática adicional proporcionada por la medicación se debe restar de la concentración de tripsina medida (ver Tabla 2).

Tabla 2. Cálculos de concentración fecal en tripsina corregida en pacientes de FC medicados

	C	F	I	K
Medicación	Creon 25,000	Creon 10,000	Creon 25,000	Creon 25,000
Tripsina/capsula <sup>1</sup>	1,000	600	1,000	1,000
Capsulas/día	9	20	9	8
Total tripsina/día <sup>1</sup>	9,000	12,000	9,000	8,000
Normal tripsina <sup>1,2</sup>	13,000	13,000	13,000	13,000
Extra tripsina de medicación	70%	92%	70%	62%
Tripsina real en el	30%	8%	30%	38%

organismo					
[tripsina] (µg/g)	mesurada	129,19	121,15	111,89	128,93
[tripsina] (µg/g)	corregida	40,05	10,9	34,69	50,28

<sup>1</sup>PhEur unidades

<sup>2</sup>Concentración normal de tripsina en pacientes saludables

Los resultados demuestran que las nanopartículas de la invención proporcionan una cuantificación sensible, específica y precisa de la actividad de tripsina, útil en la diagnosis de FC y en la predicción del fenotipo del paciente para el gen CFTR. Este método es fácil de utilizar, rápido y robusto y es, en consecuencia, muy útil en la diagnosis de fibrosis quística.

#### REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

Sapsford *et al* ("Monitoring of enzymatic proteolysis on a electroluminescent-CCD microchip platform using quantum dot-peptide substrates", *Sensors y Actuators B*, 2009, vol. 139, pp. 13–21.

Ma *et al*, "Multiplexed color encoded silica nanospheres prepared by stepwise encapsulating quantum dot/SiO<sub>2</sub> multilayers", *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, pp. 7071–7073

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundació Institut Català d'Investigació Química

<120> Ensayo radiométrico de cuantificación de enzima hidrolítica

<130> P2648PC00

<150> EP13382239.5

<151> 2013-06-25

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido pro-activo

<400> 1

Cys Lys Arg Val Lys

1

5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido pro-activo, marcado con TAMRA

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> aminoácido marcado con TAMRA

# ES 2 644 444 T3

<400> 2  
Cys Lys Arg Val Lys  
5 1 5

<210> 3  
<211> 5  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> péptido in-activo, marcado con TAMRA

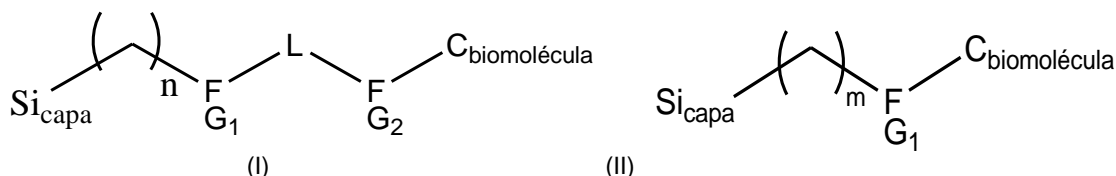
15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
20 <223> aminoácido marcado con TAMRA

<400> 3  
Cys Lys Pro Val Lys  
25 1 5

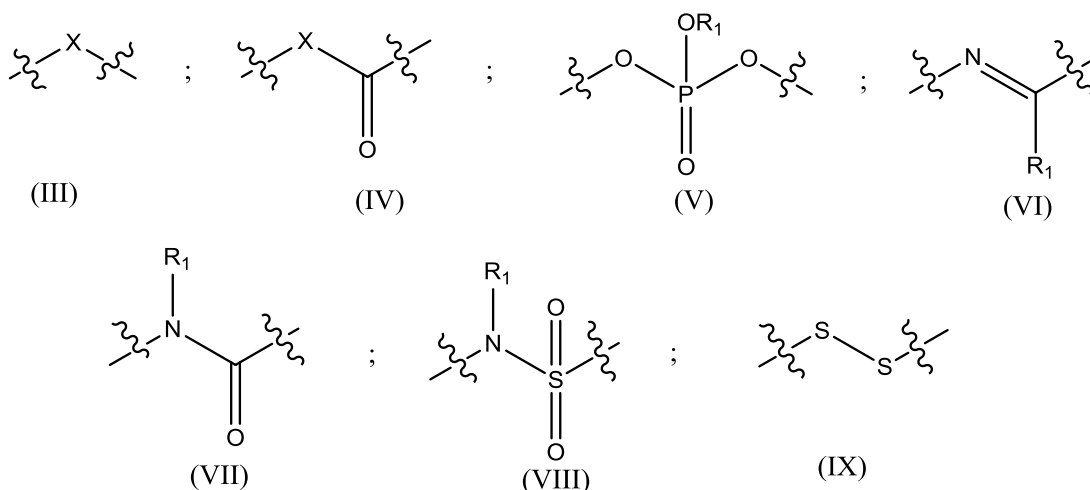
REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende

- 5 (i) un núcleo que comprende una primera población de puntos cuánticos (QDs) incrustados en sílice,  
 (ii) una capa que comprende una segunda población de QDs incrustados en sílice,  
 (iii) al menos una biomolécula seleccionados de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, dicha biomolécula estando unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de formula (I) y (II),



- 10 dónde  $\text{Si}_{\text{capa}}$  es un átomo de silicio comprendido en la capa y  $\text{C}_{\text{biomolécula}}$  es un átomo de carbono comprendido en la biomolécula;  
 n es un entero comprendido entre 0 y 10;  
 $\text{FG}_1$  y  $\text{FG}_2$  son cada uno un diradical independientemente seleccionado del grupo constituido por los diradicales de formula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX)



- 15 dónde X es S o O;  $\text{R}_1$  es H o (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alquilo;  
 L es un diradical seleccionado de los diradicales que derivan de un compuesto seleccionado de (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alcano, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alqueno, (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)alquino, (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalcano y benceno;  
 y

- 20 (iv) un marcador fotoluminescente para cada biomolécula, dónde el marcador está conectado a la parte de la biomolécula que se desprende de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de formula  $\text{FG}_3$  seleccionado del grupo constituido por los diradicales de formula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) definidos más arriba;

25 dónde la primera y segunda poblaciones de QDs tienen diferentes longitudes de onda de emisión de fotoluminiscencia máxima, y únicamente la segunda población de QDs es susceptible de producir transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) con el marcador fotoluminescente.

30 2. La nanopartícula de la reivindicación 1 dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento de formula (I) dónde:

- 35 n es un entero comprendido entre 1 y 5;  
 X es O; y  
 $\text{FG}_1$  y  $\text{FG}_2$  son independientemente seleccionados de los diradicales de formula (IV), (VI) y (VII).

3. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 dónde  $FG_3$  es seleccionado de los diradicales de formula (IV), (VII) y (VIII).

4. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 dónde la biomolécula es un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima proteolítica, y dónde la secuencia del péptido comprende de 3 a 12 aminoácidos.

5. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 dónde la biomolécula es un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina.

6. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, dónde

(i) la distancia media entre el marcador fotoluminescente y la segunda población de QDs está comprendida de 7 a 22 nm,

(ii) el espectro de emisión fotoluminescente de la segunda población de QDs y el espectro de absorción fotoluminescente del marcador tienen un solapamiento espectral comprendido de 40 a 80% área/área; o el espectro de emisión fotoluminescente del marcador y el espectro de absorción fotoluminescente de la segunda población de QDs tienen un solapamiento espectral comprendido de 40 a 80% área/área,

(iii) la distancia media entre el marcador y la primera población de QDs está comprendida de 25 a 100 nm y/o el espectro de emisión fotoluminescente de la primera población de QDs y el espectro de absorción fotoluminescente del marcador tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área; o la distancia media entre el marcador y la primera población de QDs está comprendida de 25 a 100 nm y/o el espectro de emisión fotoluminescente del marcador y el espectro de absorción fotoluminescente de la primera población de QDs tienen un solapamiento espectral comprendido de 0 a 30% área/área, y

(iv) la distancia media entre la primera población de QDs y segunda población de QDs está comprendida de 25 a 50 nm y/o el espectro de emisión fotoluminescente de la primera población de QDs y el espectro de absorción fotoluminescente de la segunda población de QDs tienen un solapamiento espectral de 0 a 30% área/área; o la distancia media entre la primera población de QDs y la segunda población de QDs está comprendida de 25 a 50 nm y/o el espectro de emisión fotoluminescente de la segunda población de QDs y el espectro de absorción fotoluminescente de la primera población de QDs tienen un solapamiento espectral de 0 a 30% área/área.

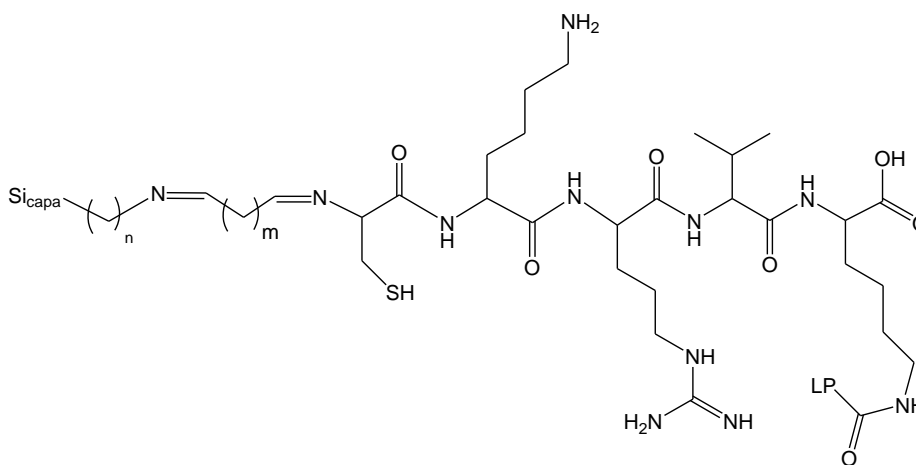
7. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6, dónde

(i) la primera población de QDs tiene una longitud de onda de emisión fotoluminescente máxima comprendida de 600 a 700 nm,

(ii) la segunda población de QDs tiene una longitud de onda de emisión fotoluminescente máxima comprendida de 500 a 600 nm, y

(iii) el marcador tiene una longitud de onda de absorción fotoluminescente máxima comprendida de 450 a 650 nm.

8. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende una estructura de formula (X) conectada a la superficie de la capa



(X)

dónde m es un entero de 1 a 6; y

PL es un marcador fotoluminescente seleccionada de rodamina o un derivado de rodamina.

9. La nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, dónde los QDs se seleccionan del grupo constituido por CdSe, CdS, CdSe recubiertos con ZnS (CdSe/ZnS) y CdS recubiertos con ZnS (CdS/ZnS).
- 5 10. Uso de la nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, dónde la nanopartícula comprende un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina.
- 10 12. Uso de una nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, como agente de diagnosis para la fibrosis quística, dónde la nanopartícula se usa para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra, y comprende un péptido que comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por tripsina.
- 15 13. Un método para cuantificar una enzima hidrolítica en una muestra que comprende las etapas de:  
 (i) contactar una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 con la muestra,  
 (ii) determinar la intensidad fotoluminescente de la primera y segunda poblaciones de QDs cuando se expone la mezcla de la etapa (i) a una fuente de luz de excitación capaz de excitar la primera y segunda poblaciones de QDs,  
 20 dónde la relación entre las intensidades fotoluminescentes de la segunda y primera poblaciones de QD se correlaciona con la cantidad de enzima hidrolítica en la muestra.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, dónde la nanopartícula comprende un péptido que comprende un sitio susceptible de ser cortado por tripsina y la muestra es de heces humanas.
- 25 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14 que además comprende la etapa de diagnosticar la fibrosis quística cuando la concentración fecal de tripsina en la muestra está comprendida de 0 a 90 µg/g heces.
16. Un método de preparación de una nanopartícula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende:  
 30 (i) formar un núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice por el método de microemulsión reversa,  
 (ii) formar una capa que contiene una segunda población de QDs incrustados en sílice sometiendo el núcleo que comprende una primera población de QDs incrustados en sílice de la etapa (i) al método de microemulsión reversa,  
 35 (iii) recuperar la nanopartícula núcleo-capa obtenida en la etapa (ii), y opcionalmente funcionalizar la superficie de la capa, y  
 (iv) añadir al menos una biomolécula seleccionada de un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato o un lípido, dónde cada biomolécula comprende un sitio de corte susceptible de ser cortado por una enzima hidrolítica, y un marcador fotoluminescente que está unido a la parte de la biomolécula que se desprende  
 40 de la nanopartícula después del corte de dicha biomolécula por una enzima hidrolítica a través de un diradical de fórmula  $FG_3$  como se define en la reivindicación 1; dónde la biomolécula está unida a la superficie de la capa a través de un fragmento seleccionado de los fragmentos de fórmula (I) y (II) como se definen en la reivindicación 1.

FIG. 1

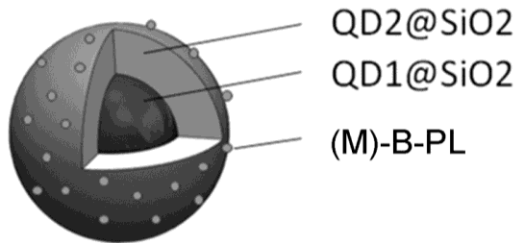


FIG. 2

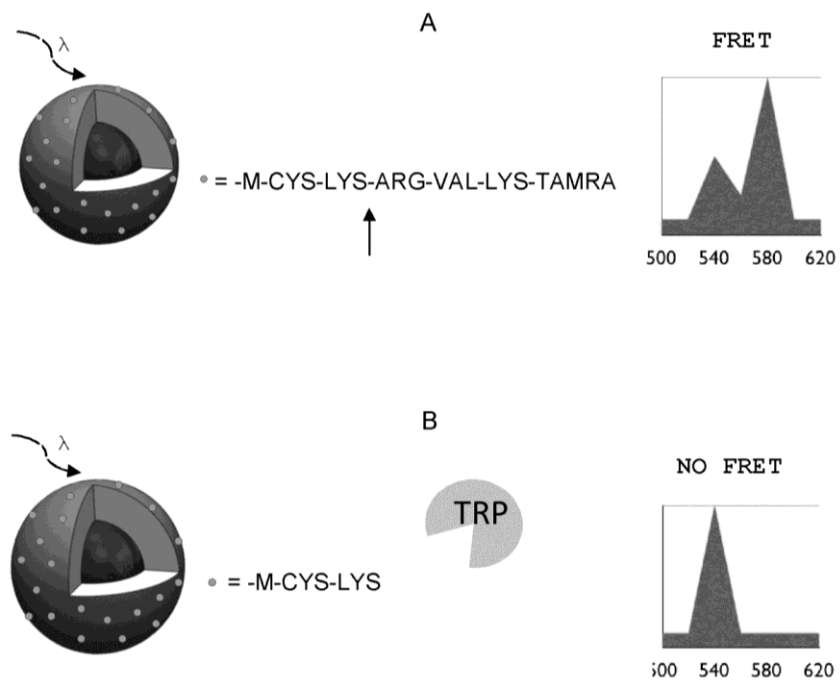


FIG. 3

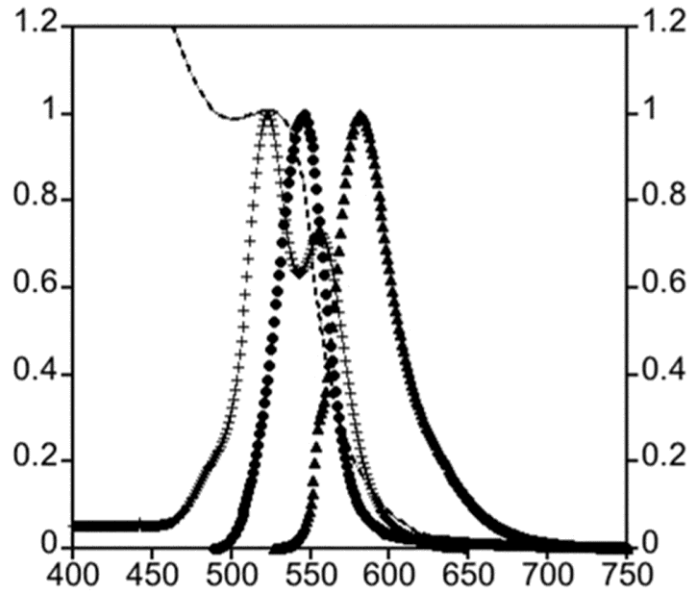


FIG.4

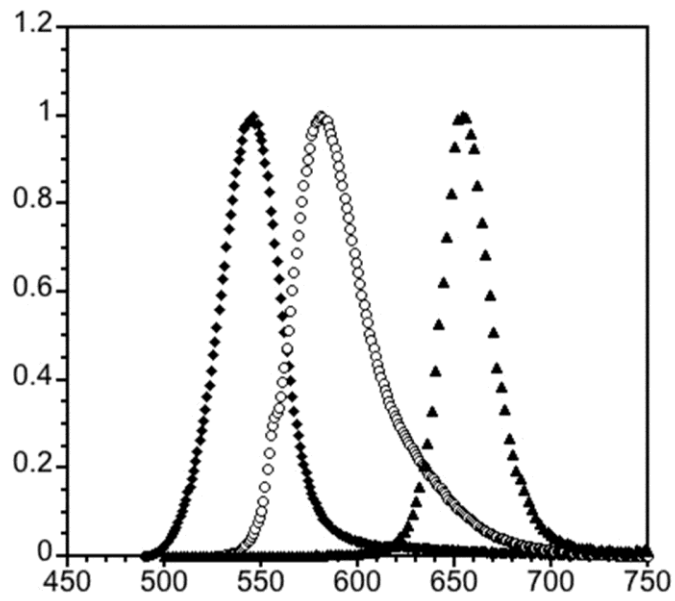




FIG. 5

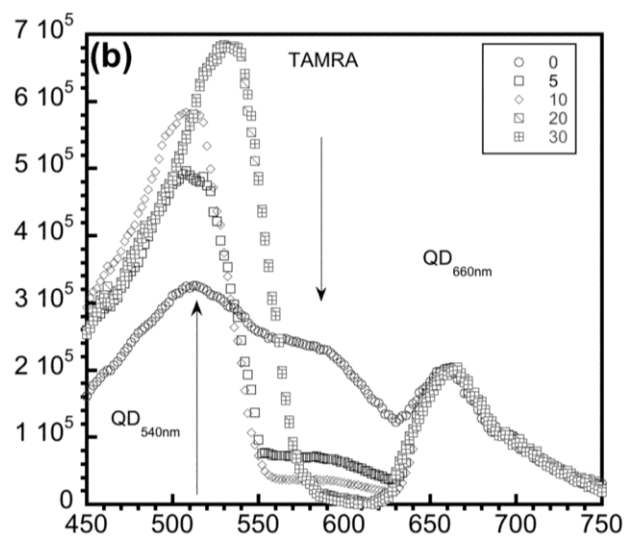
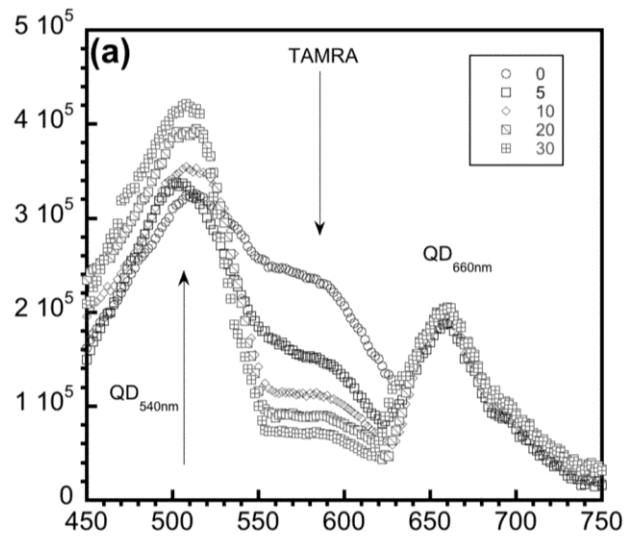


FIG. 6

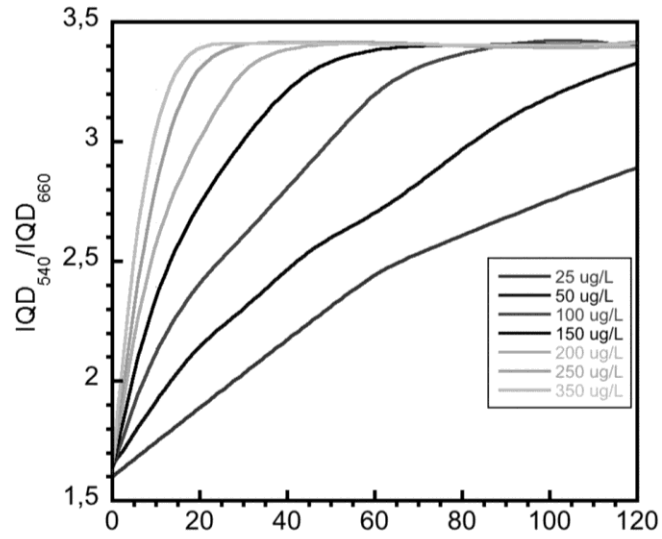
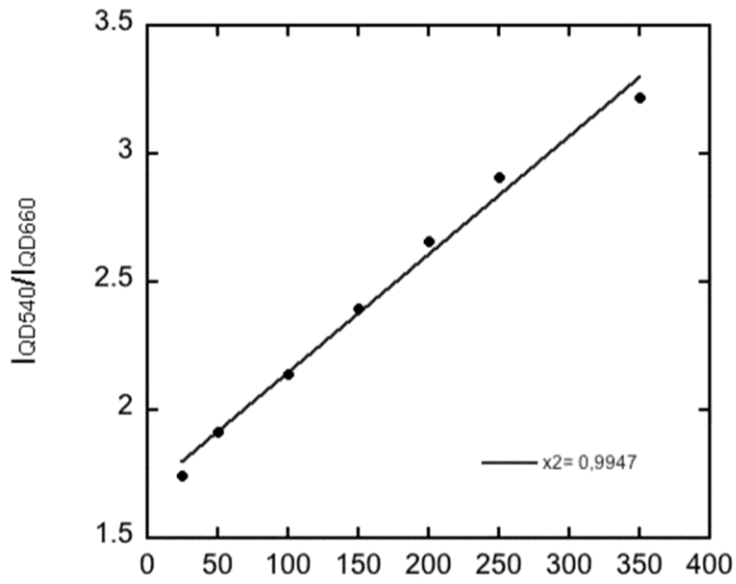


FIG. 7



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP 13382239 A [0089]

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- Monitoring of enzymatic proteolysis on a electrolumi-nescent-CCD microchip platform using quantum dot-peptide substrates. Sensors and Actuators B, 2009, vol. 139, 13-21 [0005]
- **QIANG MA et al.** Multilayered, core/shell nano-probes based on magnetic ferric oxide particles and quantum dots for multimodality imaging of breastcan-cer tumors. Biomaterials, 2012, vol. 33, 8486-8494 [0006] [0088]
- **MA et al.** Multiplexed color encoded silica nano-spheres prepared by stepwise encapsulating quan-tum doUSi02 multilayers. Chem. Commun., 2011, vol. 47, 7071-7073 [0056] [0071] [0088]
- **SAPSFORD et al.** Monitoring of enzymatic proteol-ysis on a electroluminescent-CCD microchip platform using quantum dot-peptide substrates. Sensors and Actuators B, 2009, vol. 139, 13-21 [0088]