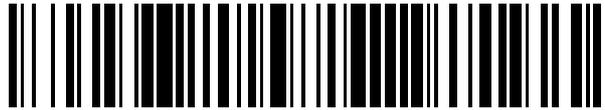


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 057**

21 Número de solicitud: 201730451

51 Int. Cl.:

**G01N 21/63** (2006.01)  
**B82Y 15/00** (2011.01)  
**C09K 11/85** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:  
**28.03.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:  
**01.10.2018**

71 Solicitantes:  
**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (62.3%)**  
**Calle Tulipán s/n - Rectorado - Despacho 205**  
**28933 MOSTOLES (Madrid) ES;**  
**IMDEA (INSTITUTO MADRILEÑO DE ESTUDIOS**  
**AVANZADOS) ENERGÍA (33.3%) y**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (4.4%)**

72 Inventor/es:  
**MOYANO RODRÍGUEZ, Edelweiss;**  
**CAAMAÑO FERNÁNDEZ, Antonio José;**  
**RAMIRO BARGUENO, Julio;**  
**ROJO ÁLVAREZ, Jose Luis;**  
**RAMOS LÓPEZ, Francisco Javier;**  
**DE LA PEÑA O'SHEA, Víctor y**  
**JAQUE GARCÍA, Daniel**

74 Agente/Representante:  
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **USO DE UNA COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES**

57 Resumen:  
Uso de una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha composición comprende nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al azul, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al verde, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo y nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo/morado para determinar profundidades de materiales porosos, para determinar grosor de láminas de materiales porosos, para determinar la estructura radicular de una planta o para elaborar un agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano.

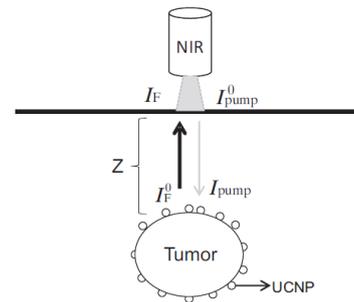


Fig. 4

ES 2 684 057 A1

**USO DE UNA COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE  
NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes que puede ser aplicada en la detección de profundidad aplicada en diferentes campos científicos tales como: Medicina, Química, ciencia de superficies y Botánica. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de la composición para determinar grosor de láminas de materiales porosos, para determinar la estructura radicular de una planta o para elaborar un agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano.

15

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los trazadores fluorescentes tienen la capacidad de fluorecer en diferentes longitudes de onda del rango visible del espectro electromagnético, en función de su composición química, textura, estructura y morfología, cuando son expuestos a una radiación coherente, típicamente en el rango del infrarrojo cercano. En los últimos años se han propuesto técnicas que utilizan "*quantum dots*"; pero estos compuestos muestran problemas: necesitan radiación ultravioleta (que causa potenciales daños sobre los tejidos) y se produce una reducción de la eficiencia de la fluorescencia.

25

Se han descrito compuestos basados en matrices inorgánicas dopadas con elementos de tierras raras, conocidos como "*upconversion*".

El proceso *upconversion* es un proceso intrínseco de los lantánidos, mediante el que se produce una excitación en cadena de los electrones tras la radiación del compuesto con infrarrojo cercano, para posteriormente dar lugar a una relajación de los electrones y por lo tanto una emisión de la energía acumulada en dicha excitación.

La relajación de estos electrones, desde el estado excitado al fundamental, da lugar a la emisión de una radiación electromagnética con longitudes de onda cortas. Para que este

35

proceso pueda llevarse a cabo, son necesarios tres elementos que formaran parte de la red cristalina del compuesto, actuando cada uno para un determinado fin en el proceso:

5 - Estabilizador: Son los materiales que forma la matriz cristalina del compuesto. Siendo esta la base de la estructura cristalina del mismo.

- Sensibilizador: Tierra rara que actúa donando energía a los activadores, siendo los elementos lantánidos trivalente los que muestran mayor eficiencia *upconversion*.

10 - Activador: Este elemento acumula la energía del sensibilizador y emite radiación con longitudes de onda más cortas que las de la energía recibida.

Este proceso es observado en todos los metales de transición. Sin embargo, aquellos con mayor eficiencia son los lantánidos, debido a su configuración electromagnética.

15

Los lantánidos que muestran mayor eficiencia *upconversion* son los iones trivalentes. Por ello, la configuración habitual de nanopartículas fluorescentes *upconversion* se forma con los iones trivalentes de lantánidos unidos a compuestos inocuos que actúan como estabilizadores

20

En el estado de la técnica existen pocos métodos descritos para la medida del grosor de las capas de pasivación de materiales metálicos. La técnica más utilizada es la llamada espectroscopía de impedancia electroquímica, que supone una acción negativa sobre el material estudiado que puede dañar la capa medida.

25

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha composición comprende  
30 nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al azul, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al verde, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo y nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo/morado para determinar profundidades de materiales porosos, para determinar grosor de láminas de  
35 materiales porosos, para determinar la estructura radicular de una planta o para elaborar un

agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano, donde dicho uso comprende:

- 5 (a) aplicar sobre dicho material poroso dicha composición o aplicar sobre el medio de crecimiento de dicha planta dicha composición o administrar dicha composición a dicho sujeto humano,
- (b) irradiar el material poroso o el medio de crecimiento de dicha planta o la piel de dicho sujeto humano con radiación de longitud de onda en el infrarrojo cercano en el rango 800-1000 nm o con radiación de longitud de onda en el visible en el rango 500-700 nm,
- 10 (c) detectar la radiación emitida por dichas nanopartículas y
- (d) determinar profundidades de materiales porosos, grosor de láminas de materiales, estructura radicular de una planta o profundidad de la piel a la que se encuentra el tumor a partir de la determinación de la profundidad a la que se encuentran las nanopartículas.

Otra realización es el uso de la invención, donde la composición comprende:

- 15 - nanopartículas que comprenden el estabilizador  $\text{NaYF}_4$ , el sensibilizante Yb y un activador, donde dicho activador es Er o Ho ( $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ , activador), que emiten radiación a longitudes de onda que corresponden al azul, verde y rojo,
- nanopartículas que comprenden el estabilizador  $\text{NaYF}_4$ , el sensibilizante Yb y el activador Tm ( $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ , Tm), que emiten radiación a longitudes de onda que corresponden al azul y
- 20 rojo/morado,
- nanopartículas que comprenden el estabilizador  $\text{LaF}_3$ , el sensibilizante Tm y un activador, donde dicho activador es Er o Ho ( $\text{LaF}_3:\text{Tm}$ , activador), que emiten radiación a longitudes de onda que corresponden al rojo y
- nanopartículas que comprenden el estabilizador  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , el sensibilizante Yb y un activador,
- 25 donde dicho activador es Er o Ho ( $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ , activador), que emiten radiación a longitudes de onda que corresponden al rojo.

Otra realización es el uso de la invención, donde dichas nanopartículas comprenden moléculas específicas contra tumores de piel.

30

Otra realización es el uso de la invención, donde dichas moléculas específicas contra tumores de piel son anticuerpos.

Otra realización es el uso de la invención, donde dichos tumores de piel están seleccionados del grupo compuesto por melanomas, carcinomas, linfomas y sarcomas.

35

5 El uso de la composición de la invención para elaborar un agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano permite realizar un diagnóstico por imagen de cáncer epitelial, permitiendo determinar la profundidad de las áreas afectadas. Este uso no necesita trazadores radiactivos ni radiación ionizante, que se utiliza en el estado de la técnica.

10 El uso de la composición de la invención para elaborar un agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano utiliza marcadores fluorescentes que no suponen ninguna toxicidad para el organismo. Una ventaja de este uso de la invención es que no requiere equipos de gran coste económicos ni de gran complejidad tecnológica.

15 En el uso de la composición de la invención para elaborar un agente de diagnóstico para el diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano se pueden utilizar diferentes formulaciones que permiten su utilización en diversas condiciones de diagnóstico.

Otra realización alternativa es una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha composición comprende nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al azul, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al verde, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo y nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo/morado para su uso en un procedimiento de diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano, donde dicho procedimiento comprende:

- (a) administrar dicha composición a dicho sujeto humano,
- 25 (b) irradiar la piel de dicho sujeto humano con radiación de longitud de onda en el infrarrojo cercano en el rango 800-1000 nm o con radiación de longitud de onda en el visible en el rango 500-700 nm,
- (c) detectar la radiación emitida por dichas nanopartículas y
- (d) determinar profundidad de la piel a la que se encuentra el tumor a partir de la determinación de la profundidad a la que se encuentran las nanopartículas.

Otra realización alternativa es un método de diagnóstico de cáncer de piel en un sujeto humano que comprende:

- 35 (a) administrar una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha composición comprende nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al azul, nanopartículas que emiten radiación a una

longitud de onda que corresponde al verde, nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo y nanopartículas que emiten radiación a una longitud de onda que corresponde al rojo/morado a dicho sujeto humano,

5 (b) irradiar la piel de dicho sujeto humano con radiación de longitud de onda en el infrarrojo cercano en el rango 800-1000 nm o con radiación de longitud de onda en el visible en el rango 500-700 nm,

(c) detectar la radiación emitida por dichas nanopartículas y

(d) determinar profundidad de la piel a la que se encuentra el tumor a partir de la determinación de la profundidad a la que se encuentran las nanopartículas.

10

Las nanopartículas de la composición de la invención tienen una alta eficiencia de emisión de radiación en el rango visible.

15 La combinación de nanopartículas de la invención muestra un espectro diferenciado en el rango visible a diferentes profundidades del tejido biológico. Esto se debe a una diferente respuesta a diferentes longitudes de onda del tejido biológico.

20 En la presente invención, la radiación en el infrarrojo cercano genera una excitación en cadena de los elementos (tierras raras) que conforman dichas nanopartículas, lo que permite una respuesta de fluorescencia en la región del visible.

25 Esta fluorescencia visible permite localizar tumores. Para ello, la superficie de las nanopartículas es modificada con moléculas específicas contra tumores de piel de manera que las nanopartículas se unirán a las células tumorales al ser introducidas en el torrente sanguíneo. Dichas moléculas específicas contra tumores de piel pueden ser anticuerpos.

30 Las diferentes longitudes de onda de la región visible del espectro presentan diferente atenuación a las capas del tejido. Conociendo dicha atenuación se determina la profundidad a la que se encuentra las nanopartículas y por lo tanto el tumor.

35 La presente invención proporciona el uso de la composición de la invención para determinar grosor de láminas de materiales porosos. Este uso permite medir el grosor de las capas generadas en pasivación, debido a que son compuestos inertes que permitirían mantener intacto el material tras su medida.

Para ello se coloca una capa de nanopartículas fluorescentes *upconversion* sobre el material y se obtiene la posterior pasivación del mismo. Mediante la incisión de radiación infrarroja sobre la lámina de pasivación se obtiene una respuesta lumínica que dependiendo del material estudiado y el grosor de la capa correspondería a una longitud de onda del rango del visible, es decir, se obtendría una respuesta discriminativa en color.

La pasivación más común es la del aluminio, que forma una capa de óxido de aluminio conocida como alúmina y protege al material de la acción de agentes externos. La alúmina es un material que comienza a degradarse con frecuencias menores a 1MHz lo que determina que la radiación infrarroja y visible sería inerte para la misma.

Aparece la señal discriminativa en color debido a que la absorbancia del material disminuye del azul al rojo en el espectro visible (M. S. Aw et al., Transition metal pairs on ceria-promoted, ordered mesoporous alumina as catalyst for methane-CO<sub>2</sub> reforming reaction. Catalysis Science & Technology., 2016,6, 3797-3805).

Para poder comprender dicha señal de salida, siguiendo la premisa de que las capas de pasivación son porosas, se aplica la ley de extinción exponencial desarrollada en los modos de realización preferente (ecuaciones 7-11), teniendo en cuenta el coeficiente de atenuación efectivo que será específico de cada material y cada señal de atenuación del mismo con respecto a la longitud de onda.

La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes para determinar la estructura radicular de una planta.

Existen varios estudios en los que se han elaborado diversos experimentos basados en el crecimiento de plantas en un medio que contiene disueltas cantidades elevadas de nanopartículas fluorescentes *upconversion*, resultando los mismos en un crecimiento y desarrollo igual al de plantas de control (Peng, J. et al., Upconversion Nanoparticles Dramatically Promote Plant Growth Without Toxicity. Nano Research. November 2012, Volume 5, Issue 11, pp 770–782). Además al crecer en dicho medio, las nanopartículas fluorescentes *upconversion* pasan a estar en el sistema vascular de la planta, eliminando la necesidad de incorporar posteriormente las nanopartículas fluorescentes *upconversion* a las mismas para elaborar las medidas de crecimiento

pertinentes. Por otra parte, la ventaja que presentan las nanopartículas fluorescentes *upconversion* es que son inocuas para los vegetales.

5 Es bien conocido que, debido a la fotosíntesis, los elementos que conforman las plantas tales como clorofila y carotenoides, tienen bandas de absorción en el azul y el rojo en la región del visible, estas diferencias de absorción de la luz visible permitirían observar el crecimiento de las raíces de las plantas mediante la evaluación del grosor de las mismas según la respuesta lumínica que generen.

10 Al igual que para el tejido biológico, se tiene que estudiar dicha respuesta lumínica para conocer la profundidad de la señal de emisión, lo que se llevará a cabo conociendo la extinción exponencial que sufre el espectro de emisión de las nanopartículas introducidas en la planta.

15 Para ello, hay que tener en cuenta que a diferencia del tejido biológico, en el vegetal, el porcentaje de agua se encuentra entre el 70% y el 90%, y está en su mayoría en las raíces. Por lo que los cálculos de profundidad de la señal, se tendrán que elaborar con respecto al coeficiente de atenuación efectivo del agua que afectaría sobre todo a la señal infrarroja.

20

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de diferentes compuestos en polvo:  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Er}$  (primera imagen, empezando por arriba),  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm}$  (segunda imagen, empezando por arriba),  $\text{LaF}_3 : \text{Tm, Er}$  (tercera imagen, empezando por arriba) y  $\text{Y}_2\text{O}_3 : \text{Yb, Er}$  (cuarta imagen, empezando por arriba).

Figura 2: La curva discontinua representa la emisión o fluorescencia del compuesto y la curva continua la absorción de los compuestos:  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Er}$  (primera gráfica, empezando por arriba),  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm}$  (segunda gráfica, empezando por arriba),  $\text{LaF}_3 : \text{Tm, Er}$  (tercera gráfica, empezando por arriba) y  $\text{Y}_2\text{O}_3 : \text{Yb, Er}$  (cuarta gráfica, empezando por arriba).

Figura 3: Diferentes fases cristalinas presentes en cada compuesto, determinado por difracción de rayos X:  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Er}$  (primera gráfica, empezando por arriba),  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm}$  (segunda gráfica, empezando por arriba),  $\text{LaF}_3 : \text{Tm, Er}$  (tercera gráfica, empezando por arriba) y  $\text{Y}_2\text{O}_3 : \text{Yb, Er}$  (cuarta gráfica, empezando por arriba).

Figura 4: Representación esquemática de la transferencia de radiación hacia y desde nanopartículas fluorescentes en un tejido biológico.

5 Figura 5: Modelo de melanoma a diferentes profundidades. Primera fila, epidermis (0-0,04 mm); segunda fila, dermis (0,04-4 mm); tercera fila, subdermis (4-60 mm). Primera columna, posición del melanoma respecto a la superficie de la piel; segunda columna, nanopartículas fluorescentes unidas de forma aleatoria a la superficie del melanoma, las nanopartículas representadas en tono claro son aquellas que están iluminadas, las representadas en tono  
10 oscuro indica nanopartículas en zona oscura o no iluminada. La tercera columna representa el patrón de color de luz visible resultante en la superficie de la piel relativo a la profundidad de las nanopartículas fluorescentes. El patrón de color para determinar la profundidad se establece mediante las longitudes de onda de luz visible  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ .

15 Figura 6: Modelo de estructura radicular de una planta. La diferenciación colorimétrica se establece con las longitudes de onda de la luz visible  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$  así ordenadas debido al coeficiente de absorción efectivo del agua, mayoritaria en las raíces.

Figura 7: Modelo de determinación de grosor de láminas de pasivación.  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  representan  
20 la longitud de onda de la luz visible que emiten las nanopartículas, representando las longitudes de onda que permiten atravesar la capa de pasivación en función de su grosor.

### MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

25 Ejemplo 1. Síntesis de nanopartículas fluorescentes *upconversion*

Los parámetros más relevantes de las nanopartículas que afectan directamente al proceso físico y pueden ser modificados en la síntesis son:

- 30
- Tamaño.
  - Pureza de la fase cristalina.
  - Morfología.
  - Monodispersidad.

35 Los métodos más estudiados para el control de estos parámetros son: método de coprecipitación; descomposición térmica, proceso sol-gel y método solvotérmico. Todos

5 estos procesos tienen limitaciones, sobretodo en cuanto a dispersión de las nanopartículas y las distribuciones de tamaño, excepto el método solvotérmico. Este método permite la síntesis de nanocristales con un tamaño, morfología, propiedades ópticas y magnéticas controladas a través de la temperatura y el tiempo de reacción, la concentración de reactivos, el valor del pH y los distintos precursores de la reacción. Por ello, será usado el método solvotérmico para la síntesis de nanopartículas fluorescentes *upconversion* presentadas en este trabajo.

Para poder sintetizar dichas nanopartículas se han llevado a cabo los siguientes pasos:

10

- Preparación de la disolución madre: esta disolución contiene las tierras raras (lantánidos) que actúan como: estabilizador, sensibilizador (donador de energía) y activador (emisor de energía) para llevar a cabo el proceso *upconversion*. La disolución usada tiene 0.5 M  $\text{Ln}(\text{NO}_3)$  donde el porcentaje de cada lantánido es:

15

- Porcentaje X de estabilizador.
- Porcentaje 0.2X de sensibilizador.
- Porcentaje 0.002X de activador.

20 Todos estos porcentajes son calculados relativos al número de moles. Finalmente, cuando la solución está preparada, es agitada a una temperatura entre 40-50 °C hasta la disolución total de los componentes y el cambio de la misma de un color blanco a transparente.

25 - Preparación de la disolución A: se trata de una mezcla de ácido oleico y etanol, los que actúan respectivamente como controlador del crecimiento y la solubilidad de las partículas en la mezcla. La cantidad (en moles) de estos compuestos es calculada como sigue:

- Ácido oleico, relativo a la cantidad de estabilizador:

30

$$\text{Mol}_{\text{ácido oléico}} = 81,5 \text{ Mol}_{\text{estabilizador}} \quad (1)$$

- Etanol, relativo a la cantidad de ácido oleico:

$$\text{Mol}_{\text{EtOH}} = 8,2 \text{ Mol}_{\text{ácido oléico}} \quad (2)$$

35 - Preparación de la disolución B: Esta mezcla está formada por NaF y NaOH. El primero de estos componentes es usado para formar la matriz del cristal. El segundo se usa como

Á

agente de precipitación para dar lugar a las partículas sólidas. La cantidad de los mismos (en moles) es calculada como:

5 - NaF: Es necesario un exceso de compuesto con respecto al estabilizador. En este caso será usada una cantidad tres veces mayor.

$$\text{Mol}_{\text{NaF}} = 3 \text{ Mol}_{\text{estabilizador}} \quad (3)$$

10 - NaOH: se calcula relativo a la cantidad de NaF considerando un exceso sobre la misma, se consideró suficiente tras varios ensayos un exceso de 2.5.

$$\text{Mol}_{\text{NaOH}} = 2,5 \text{ Mol}_{\text{NaF}} \quad (4)$$

15 El siguiente paso es la mezcla de las disoluciones A y B el tiempo necesario que asegure la acción de cada componente.

Una vez se ha obtenido la disolución final, es introducida en un autoclave (el volumen de la disolución introducida dependerá del volumen del autoclave utilizado) el cual se introducirá a su vez en un horno mufla para generar las condiciones idóneas para la formación de las nanopartículas. En este caso las condiciones fueron 230 °C durante 24 horas. Cuando este proceso es finalizado, el precipitado resultante obtenido en el interior del autoclave es lavado con etanol y agua en varias ocasiones con la ayuda de una centrífuga.

25 Para ello, el etanol y el agua, se introducirán en un tubo junto con el precipitado y la mezcla se llevará a una centrífuga a 6000 r.p.m. durante 5 min, tras lo cual se desechará la parte líquida quedando limpio el precipitado.

30 El paso final en la síntesis es la introducción de las partículas lavadas en un horno para eliminar posibles residuos que no se han podido eliminar con los lavados en centrífuga. Este proceso es denominado calcinación y sus condiciones son 400 °C durante 4 horas.

Las nanopartículas fluorescentes *upconversion* que se sintetizaron son:

35 NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er  
NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm  
LaF<sub>3</sub>:Tm,Er

Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Yb,Er.

Estas nanopartículas fueron seleccionadas debido a que presentan diferentes espectros de fluorescencia con los que se puede cubrir todo el rango del espectro visible.

5

Ejemplo 2. Caracterización de las nanopartículas fluorescentes *upconversion*

Para llevar a cabo la combinación de nanopartículas fluorescentes *upconversion* adecuada para conseguir una respuesta diferenciada en profundidad, primero hay que caracterizarlas individualmente. Las características que más afectan al proceso *upconversion* son:

10

- Estructura de la nanopartícula: una elevada relación superficie volumen favorece la eficiencia del proceso.

15

- Espectro de absorción y emisión: son elementos clave para conocer la respuesta en profundidad de los materiales.

Para poder caracterizar las nanopartículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope (SEM)*) (Hitachi TM-1000). Este genera una imagen a partir de un haz de electrones, el cual es detectado tras interactuar con la muestra de observación, lo que permite definir la estructura, textura y posible composición química de la muestra.

20

Se realizó una difracción de rayos X (*X-Ray Diffraction (XRD)*). Para ello se usó el equipo Philips PW 3040/00 X'Pert MPD/MRD.

25

Todo ello permitió caracterizar la estructura cristalina de las nanopartículas a nivel atómico y molecular.

Para caracterizar el espectro de absorción es utilizado un equipo Perkin Elmer Lambda 1050 UV. Para ello, los compuestos son irradiados con un láser de 980 nm (potencia 1kW) y su respuesta es detectada con un espectrómetro StellarNet Inc calibrado que permite la visualización de los picos de emisión. Con todos estos resultados, se puede observar que relaciones afectan directamente a la potencia de emisión de los compuestos, y por lo tanto a la longitud de onda e intensidad de la misma. Esto haría posible (o no) la visualización del proceso *upconversion* de los compuestos a través de los diferentes materiales porosos.

30

35

La relación más importante es determinada por las imágenes obtenidas del SEM, donde se deduce que la intensidad de emisión es directamente dependiente del tamaño de las nanopartículas. Simultáneamente gracias al análisis de los espectros del XRD se observa que existen diferentes fases cristalinas y composiciones en las nanopartículas sintetizadas lo que nos determina que las diferentes morfologías, observadas en las imágenes del SEM, en un misma nanopartícula no corresponden a las mismas fases cristalinas y composiciones.

Se observó que en aquellos compuestos con picos representativos de la fase cristalina hexagonal de las nanopartículas fluorescentes *upconversion*, la intensidad de emisión es mayor que en los que aparecen mezclas de fases. Esta reducción de la intensidad de emisión puede ser debida a las diferentes emisiones presentadas por diferentes fases cristalinas y a la presencia de fases que no llevan a cabo el proceso *upconversion* como es el caso del NaF y que debilitan la absorción de infrarrojo por parte de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* y por lo tanto también su emisión. Por lo que sería necesaria la búsqueda de nuevas condiciones de reacción que hicieran posible un total control de los compuestos resultantes, de esta forma, se podría generar compuestos concretos para medir la profundidad de materiales concretos.

Se han generado y caracterizado cuatro nanopartículas fluorescentes *upconversion* diferentes. Se ha caracterizado la estructura cristalina de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* con base NaYF<sub>4</sub> como largas varillas hexagonales, pero, debido al proceso de síntesis solvotermal, también encontramos productos (nanopartículas fluorescentes *upconversion* y no nanopartículas fluorescentes *upconversion*) con estructura cúbica. La estructura cristalina tanto de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* LaF<sub>3</sub>:Tm,Er como de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Yb,Er es cúbica y los productos (no nanopartículas fluorescentes *upconversion* con estructura cúbica) también aparecen en el compuesto resultante. Estos productos parecen obstaculizar el proceso de *upconversion* de manera que se hace necesario el control del proceso de síntesis para que se eleve la pureza de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* obtenidas.

Adicionalmente, las nanopartículas fluorescentes *upconversion* con bases de NaYF<sub>4</sub> muestran mayor eficiencia al proceso *upconversion* que las que presentan fase cúbica. Como el proceso *upconversion* es un proceso de superficie, nanopartículas fluorescentes *upconversion* con mayor relación superficie volumen (Ej: varillas hexagonales largas y finas)

serán más eficientes que aquellas que presenten bajas relaciones (Ej: nanoestructuras cúbicas).

5 Aunque todas las nanopartículas fluorescentes *upconversion* presentan proceso *upconversion*, cuando son iluminadas con luz blanca ambiental (condiciones típicas de trabajo), aquellas con estructura hexagonal son más eficientes que las que presentan estructuras cúbicas.

10 Ejemplo 3. Diseño nanopartículas fluorescentes *upconversion* como agente de diagnóstico

Los materiales UC son ideales para trabajar en la primera y segunda ventana biológica (Smith, A. M. et al., Second window for in vivo imaging, Nature Nanotechnology, 4(11): 710-711 (2009)). Estas están respectivamente localizadas en el espectro electromagnético en 650-950 nm y 1000-1350nm, la segunda ventana puede ser usada para la iluminación de la UCNP mientras que la primera es ideal para la transmisión de la respuesta fluorescente. 15 Además, el interés de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* en el campo de la diagnosis del cáncer es que es posible establecer una unión directa de estos compuestos con las células cancerígenas. Gracias a la mutación de la superficie de estas células se producen cambios en su producción antigénica. Por lo tanto, en la superficie del tejido del tumor aparecen antígenos que no se encuentran con tal abundancia en el tejido sano. Por lo 20 que sí se dopan las nanopartículas fluorescentes *upconversion* con anticuerpos relativos al antígeno del tumor, se permitirá la unión de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* y las células cancerígenas debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Hay otras formas de unión de las células cancerígenas, ya sea a través de procesos físicos o por la 25 unión de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* con moléculas que imitan la estructura de biomoléculas presentes en el cuerpo humano.

El uso de estas nanopartículas está muy indicado en el campo de la diagnosis por las siguientes razones:

- 30
- Posibilidad de uso de radiación tanto visible como infrarroja para generar imágenes en el tejido biológico que no provocan efectos nocivos ni a las células ni al tejido irradiado.
  - Además, el uso de ambas radiaciones tiene un efecto adicional que permite aumentar 35 hasta cien veces la relación señal-ruido resultante. Este hecho se debe a la combinación de

la presencia de ambas ventanas biológicas (canal de bajo nivel de ruido) y la ausencia de auto-florescencia por parte del tejido irradiado (ausencia de interferencias).

- Las nanopartículas fluorescentes *upconversion* no son tóxicas y son, de hecho, biológicamente inertes.

A continuación se explicará como la transferencia de radiación tiene lugar en las dos ventanas biológicas del tejido. Adicionalmente se incluye el modelo para el tratamiento de imágenes en los procesos de detección de profundidad en diagnóstico de tumores subcutáneos.

### Transferencia de radiación en medio biológico

El espectro de interés estará directamente afectado por dos efectos: i) absorción y ii) dispersión de fotones en el tejido biológico. Ambos pueden modificar el número de fotones que van desde la Fuente (UCNP) hasta la superficie del tejido pero no modificará su energía, es decir, su longitud de onda.

La probabilidad de la absorción de fotones por un medio por unidad de longitud de la trayectoria (en  $\text{cm}^{-1}$ ) es dada por el coeficiente de absorción o  $\mu_a$ . La probabilidad de dispersión de fotones por un medio por unidad de longitud de la trayectoria ( $\text{cm}^{-1}$ ), es dada por el coeficiente de dispersión o  $\mu_s$ . La probabilidad de dispersión en el tejido biológico es normalmente al menos tres órdenes de magnitud superior que la de absorción.

Sin embargo, la dispersión en un medio biológico, que es altamente anisotrópico presenta notables diferencias a las encontradas en medios isotrópico considerados como estándar en este tipo de aplicaciones. Así, se tiene que considerar que el tipo de dispersión que tiene lugar es en régimen difusivo, en el cual la probabilidad de dispersión de un fotón por unidad de longitud de trayectoria se reduce al menos dos órdenes de magnitud con respecto al coeficiente de absorción, debido a la anisotropía. Este efecto se tiene en cuenta considerando el coeficiente de dispersión reducido, el cual estima la probabilidad equivalente de la dispersión de un fotón en medio isotrópico en régimen difusivo y es definido como:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (5)$$

donde  $g$  es la media del coseno de dispersión del Angulo polar por dispersión única.

La difusión se rige por la ley de Fick, la cual conduce al coeficiente de difusión, que se vincula con la influencia del gradiente, y puede definirse como (en unidades de  $\text{cm}^{-1}$ ):

5

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)} \quad (6)$$

Además, hay que tener en cuenta la ley de extinción exponencial que determina la intensidad del haz de fotones que pasa a través de una longitud  $z$  en un medio anisotrópico, definida como:

10

$$I = I_0 e^{-\mu_e z} \quad (7)$$

Donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de entrada y salida respectivamente, y  $\mu_e$  el coeficiente de atenuación efectivo, el cual cuantifica la influencia de la tasa de decaimiento a distancias alejadas de la fuente de emisión (definido en  $\text{cm}^{-1}$ ):

15

$$\mu_e = \sqrt{\frac{\mu_a}{D}} \quad (8)$$

El coeficiente de atenuación efectivo puede también ser interpretado como la profundidad a la que la intensidad de la luz decrece a  $1/e$  de la intensidad inicial, es decir,  $I \approx 36,79\%$  de  $I_0$ .

20

La extinción de la luz en medio biológico es experimentalmente medida como  $\mu_e$ . El coeficiente de atenuación efectivo ha sido medido en diferentes medios biológicos, principalmente en hemoglobina oxigenada y desoxigenada, piel humana y grasa.

25

#### Modelo de atenuación para tejido biológico

Se utilizó un modelo de canal o modelo de atenuación. Dicho modelo permitió definir la atenuación para el espectro de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* a diferentes profundidades en tejido biológico, teniendo en cuenta tanto la atenuación de la fuente emisora (NIR) como la de la fluorescencia en los diferentes tipos de medios biológicos del tejido (visible).

30

En las secciones previas se ha determinado que  $\mu_e$  es el parámetro responsable de la atenuación de la luz en un medio anisotrópico. Si en este caso la luz es NIR o visible, será aplicado el  $\mu_e$  de la primera y la segunda ventana biológica del tejido. Por ello se define una fuente de radiación de infrarrojo cercano en contacto con la piel, iluminando con una intensidad  $I_{0pump}$  a las nanopartículas fluorescentes *upconversion* situadas a una profundidad  $z$ . Gracias a los rangos de segunda ventana biológica es conocido que la  $I_{pump}$  ( $I_{0pump}$  es de 980 nm) será adecuada como para excitar las nanopartículas fluorescentes *upconversion*. La luz emitida por las partículas puede ser fenomenológicamente modelada en términos de intensidad de excitación del láser como:

$$I_F^0(\lambda) = \frac{K(I_{pump}^0)^2}{1 + AI_{pump}^0 + B(I_{pump}^0)^2} \quad (9)$$

Donde  $A$ ,  $B$  y  $K$  son constantes positivas. Sin embargo, como la iluminación tiene lugar a una determinada profundidad del tejido biológico, la atenuación del láser de infrarrojo cercano sigue la ley de atenuación exponencial que se puede observar en la Eq. 7:

$$I_F^0(\lambda, z) = \frac{K(I_{pump})^2}{1 + AI_{pump} + B(I_{pump})^2} \quad (10)$$

Y  $I_{pump} = I_{pump}^0 e^{-\mu_e z}$ .

Si se aplica la ley de extinción exponencial también al espectro de emisión, la intensidad de la radiación emitida (con longitud de onda  $\lambda_F$ ) de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* situadas a una profundidad  $z$  dentro del tejido biológico (con un coeficiente de atenuación efectivo de  $\mu_e(\lambda)$ ) iluminadas con un láser (con longitud de onda  $\lambda_P$ ) puede ser fácilmente calculada como:

$$I_F(\lambda, z) = \frac{e^{-z\mu_e(\lambda_F)} K I_0^2}{e^{2z\mu_e(\lambda_P)} (1 + AI_0) + B I_0^2} \quad (11)$$

Donde  $I_0 \equiv I_{pump}^0$

La ecuación previa será usada para calcular la respuesta esperada de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* a diferentes profundidades con diferentes componentes del tejido biológico.

5 Adaptación de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* para formar imágenes de tumores

10 Teniendo en cuenta  $\mu_e(\lambda)$  y la medida de los picos de emisión de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* de la sección previa, se puede determinar que son líneas de emisión que se encuentran en la primera ventana biológica (entre 650 y 950 nm).

15 Considerando los resultados obtenidos en los procesos de caracterización, se han determinado los parámetros de control y mejora de las propiedades de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* para el proceso de interés. Las bases y los sensibilizadores pueden ser usados para obtener mayor intensidad de fluorescencia de emisión, mientras que la modificación del activador puede usarse para cambiar los picos de emisión que permitirían modificar el espectro. Se puede ver que es sencillo idear una estrategia de optimización mediante la combinación de diferentes nanopartículas fluorescentes *upconversion*, que daría lugar a combinaciones identificables de espectros resultantes. Esta  
20 estrategia de optimización puede ser desarrollada por medio de investigación química combinatoria o por simulación del espectro esperado.

25 En la presente solicitud se exploró el uso de una combinación simple de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* sintetizadas con diferentes comportamientos en la emisión para predecir sus espectros de respuesta en la superficie de la piel. La combinación de los materiales seleccionados en cada caso da lugar a sistemas en los que aparece una combinación de diferentes líneas de emisión cada una de las cuales tiene asociada una atenuación relativa a los componentes del tejido biológico a diferentes profundidades, resultando en un patrón de colores que permite el diagnóstico a diferentes profundidades  
30 epiteliales.

Ejemplo 4. Resultados obtenidos con el modelo de atenuación para tejido biológico

35 Se han considerado a tres niveles de profundidad de diagnóstico a nivel de la piel (0 - 0.04 mm), a nivel de la dermis (0.04 - 4 mm) y a nivel de la subdermis (4 mm – 6 cm).

El modelo del tumor ha sido extraído de un melanoma real y por simplicidad se ha ajustado a un modelo geométrico, tipo elipsoide.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos. En la primera y segunda columnas se muestra la posición y el modelo de tumor observado. En la tercera columna se observa la superficie del tumor expuesta. Asumiendo que las nanopartículas fluorescentes *upconversion* se adhieren aleatoriamente a la superficie del tumor, solamente las expuestas a iluminación infrarrojo cercano podrán sufrir el proceso *upconversion*. Así, las zonas de tonos grises claros, representan las nanopartículas fluorescentes *upconversion* susceptibles a *upconversion* y por lo tanto las que serán fluorescentes, mientras que tonos más oscuros están aquellas que no son irradiadas y por lo tanto no emitirán luz.

Finalmente, en la última columna se representa la imagen que se observará en la superficie de la piel de acuerdo con la combinación de nanopartículas fluorescentes *upconversion* previamente descrita y sufriendo la atenuación concordante con los diferentes componentes del tejido biológico a cada profundidad.

En la primera fila, se presenta un melanoma situado a nivel de superficie, por lo que el coeficiente de atenuación relevante a este nivel es únicamente el de la piel. En este nivel los capilares son extremadamente pequeños y la contribución de estos es irrelevante. Además, no hay grasa presente en la epidermis, por lo tanto la atenuación de la piel es muy débil y el espectro se puede observar en la superficie sin sufrir atenuación.

En la segunda fila de la misma figura, se representa la situación en la que el melanoma con las mismas dimensiones que en el nivel previo, se encuentra en la dermis. Aquí, los coeficientes de atenuación relevantes son los de la piel y la sangre desoxigenada (se selecciona desoxigenada por tener un coeficiente de atenuación superior al de la oxigenada). Se considera un  $\mu_e$  resultante fruto de la contribución de  $2/3\mu$  (piel) y  $1/3\mu_e(\text{HG}_{\text{DeOx}})$  debido al aumento de la presencia de capilares en esta región.

En este caso, se observan diferentes colores dependiendo de la profundidad. La intensidad de las longitudes de onda del verde es mayor en zonas más cercanas a la superficie. Sin embargo, las longitudes de onda del rojo comienzan a aparecer en regiones más profundas.

Finalmente, en la tercera fila, se muestra el caso de un melanoma a nivel subdérmico, donde el coeficiente de atenuación considerado en una contribución de piel, sangre y grasa

en una proporción  $1/3\mu_e(\text{piel})$ ,  $1/3\mu_e(\text{HG}_{\text{DeOx}})$  y  $1/3\mu_e(\text{grasa})$ , debido a que en la subdermis aparece la grasa como componente del tejido. En este último caso, se observa solamente el color rojo y esto es debido a la banda de paso existente en las ventanas biológicas para estas longitudes de onda.

5

Los resultados presentados demuestran la factibilidad del uso de las nanopartículas fluorescentes *upconversion* para obtener patrones de colores diferenciados dependiendo de la profundidad del tejido a la que se encuentre un determinado tumor.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar la profundidad de un material caracterizado porque dicho método comprende:
- 5 (a) aplicar sobre dicho material una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha combinación comprende:
- al menos una nanopartícula que comprende  $\text{NaYF}_4$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y un activador seleccionado entre Er o Ho, en que dicha nanopartícula es capaz de emitir radiación a longitudes de onda que corresponden al azul, verde y
  - 10 rojo,
  - al menos una nanopartícula que comprende  $\text{NaYF}_4$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y Tm como activador, en que dicha nanopartícula es capaz de emitir radiación a longitudes de onda que corresponden al azul y rojo/morado,
  - al menos una nanopartícula que comprende  $\text{LaF}_3$  como estabilizador, Tm como
  - 15 sensibilizante y un activador seleccionado entre Er o Ho, en que dicha nanopartícula es capaz de emitir radiación a longitudes de onda que corresponden al rojo y
  - al menos una nanopartícula que comprende  $\text{Y}_2\text{O}_3$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y un activador seleccionado entre Er o Ho, en que dicha nanopartícula es capaz de emitir radiación a longitudes de onda que corresponden al rojo,
- 20 (b) irradiar el material de la etapa (a) con radiación de longitud de onda en el infrarrojo cercano en el rango 800-1000 nm o con radiación de longitud de onda en el visible en el rango 500-700 nm, para obtener nanopartículas emisoras de radiación,
- (c) detectar la radiación emitida por dichas nanopartículas del paso (b),
- (d) determinar a partir de la radiación detectada en el paso (c) la profundidad a la que se
- 25 encuentran las nanopartículas y
- (e) determinar la profundidad del material a partir de la profundidad a la que se encuentran las nanopartículas del paso (d).
2. Método para determinar la profundidad de un material de acuerdo con la reivindicación 1,
- 30 caracterizado porque el material se selecciona entre: un material poroso, la raíz de una planta o la piel de un sujeto humano.
3. Método, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho material poroso tiene estructura laminar.

35

4. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en que dicho material es piel de un sujeto humano.

**5** 5. Método para determinar la profundidad de un material de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la composición del paso (a) comprende al menos una molécula capaz de reconocer un antígeno en células de un tumor de piel.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicha molécula es un anticuerpo.

**10**

7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque dicho tumor de piel se selecciona del grupo compuesto por un melanoma, un carcinoma, un linfoma y un sarcoma.

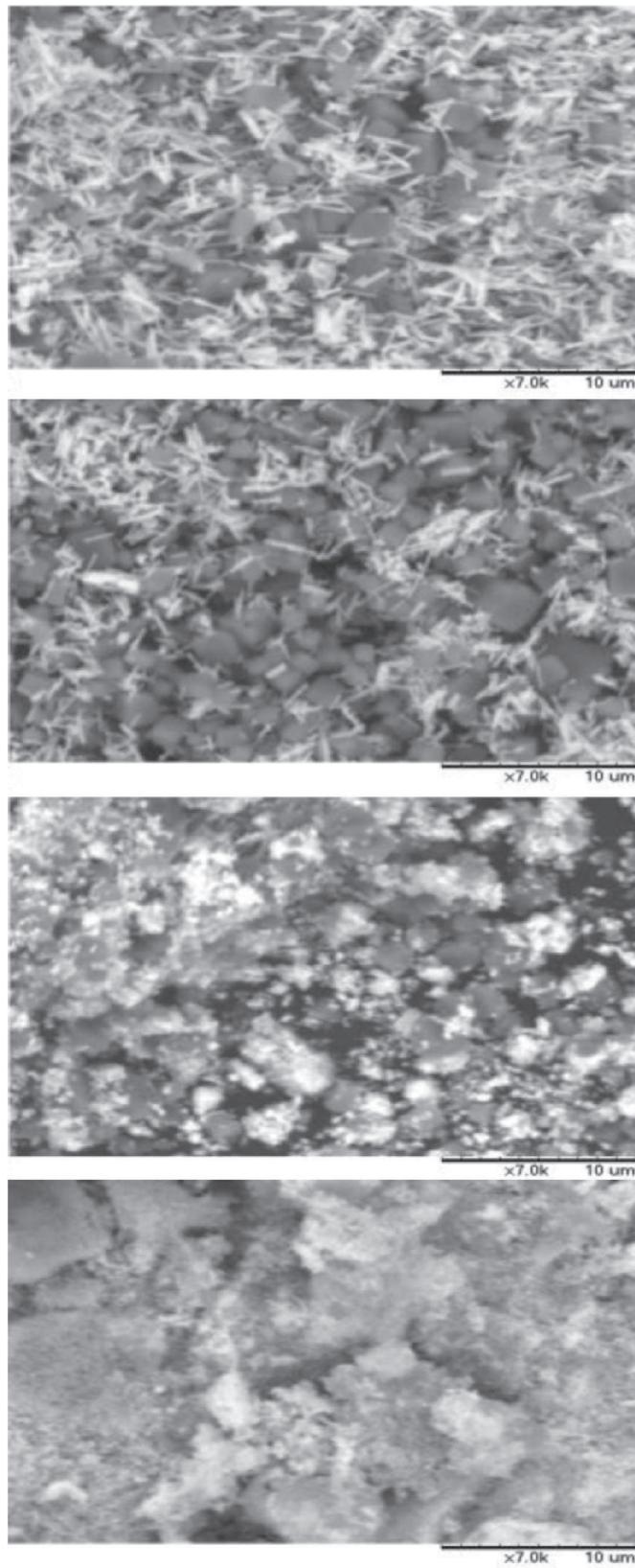
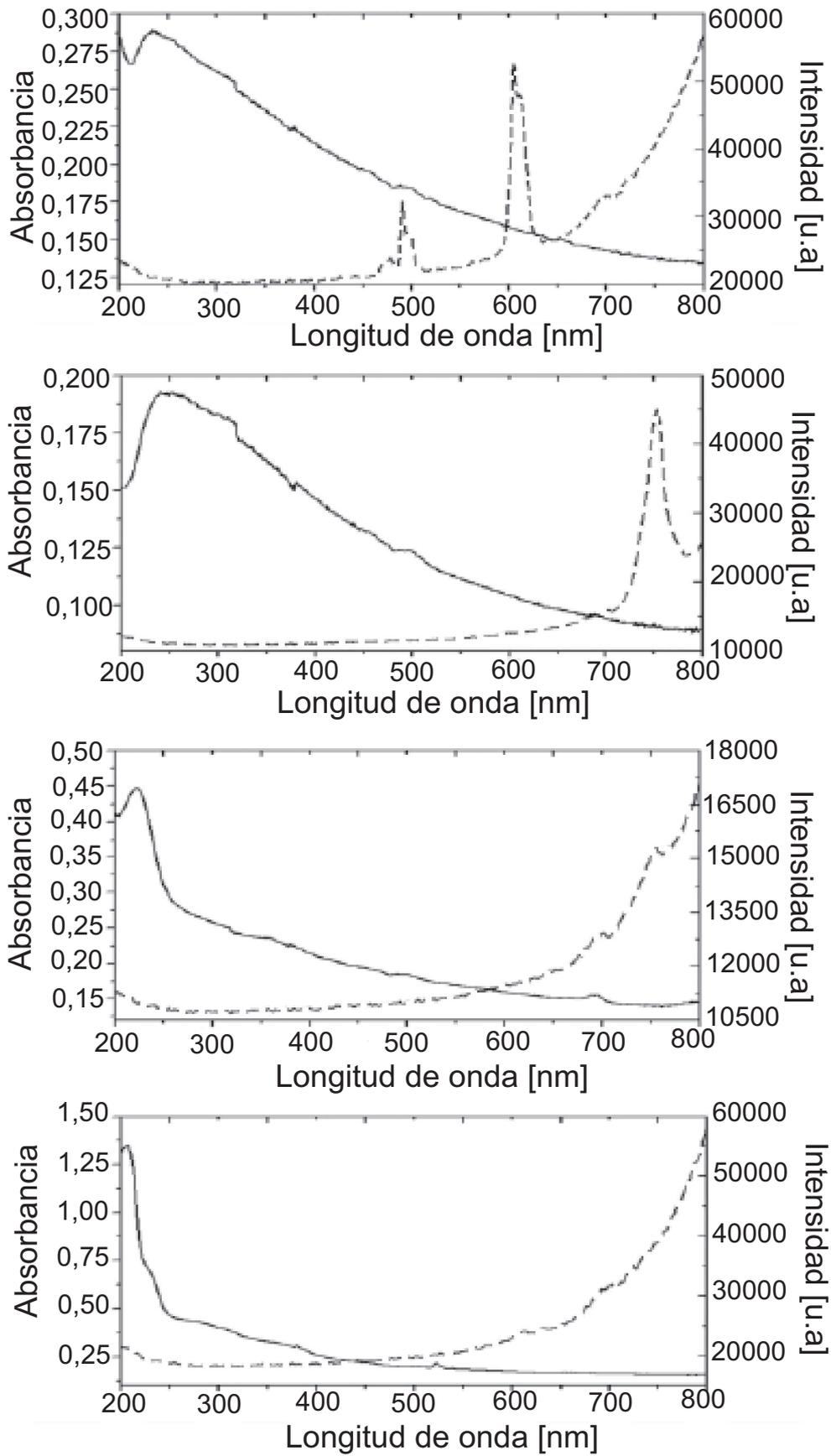
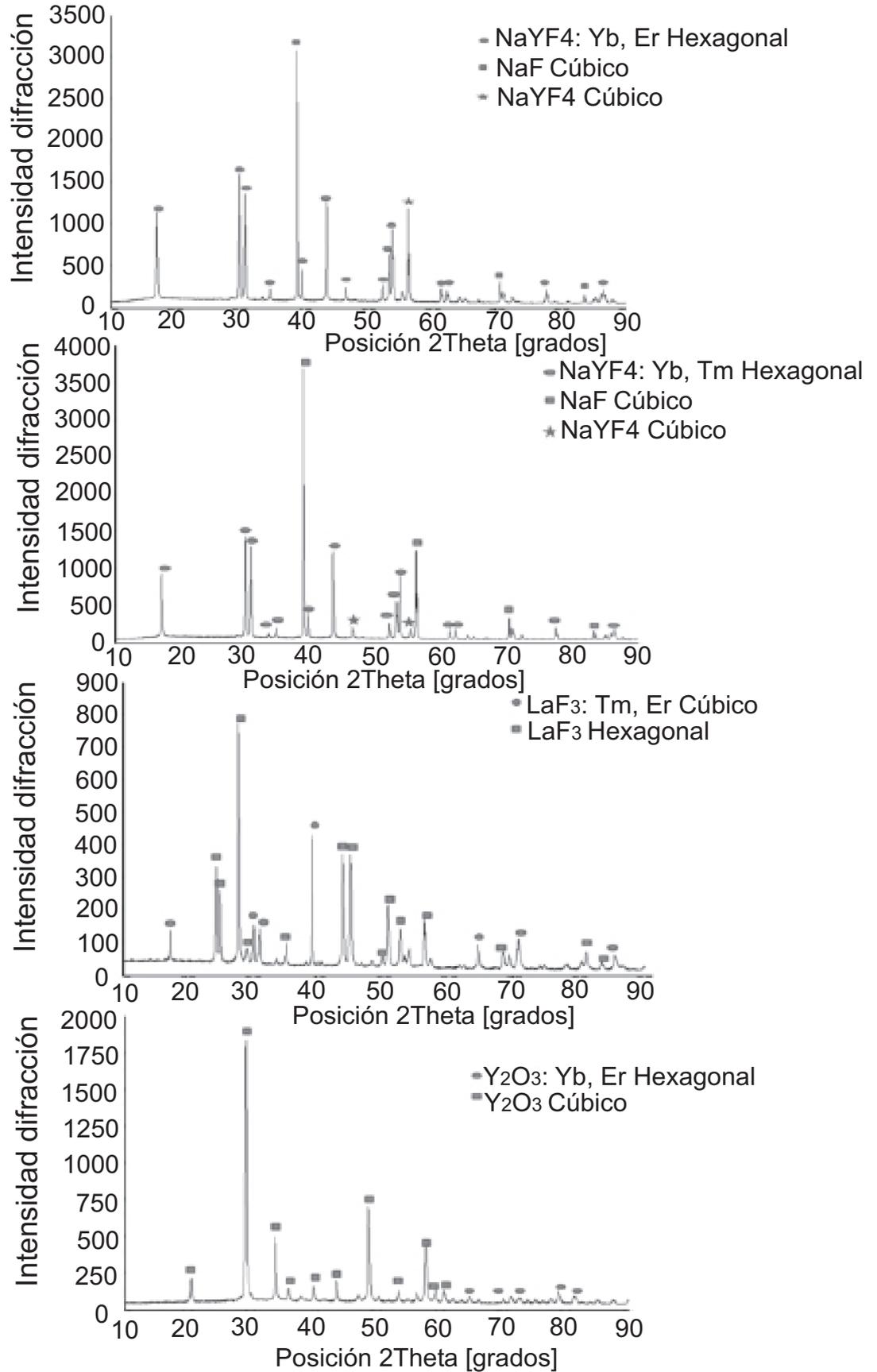


Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

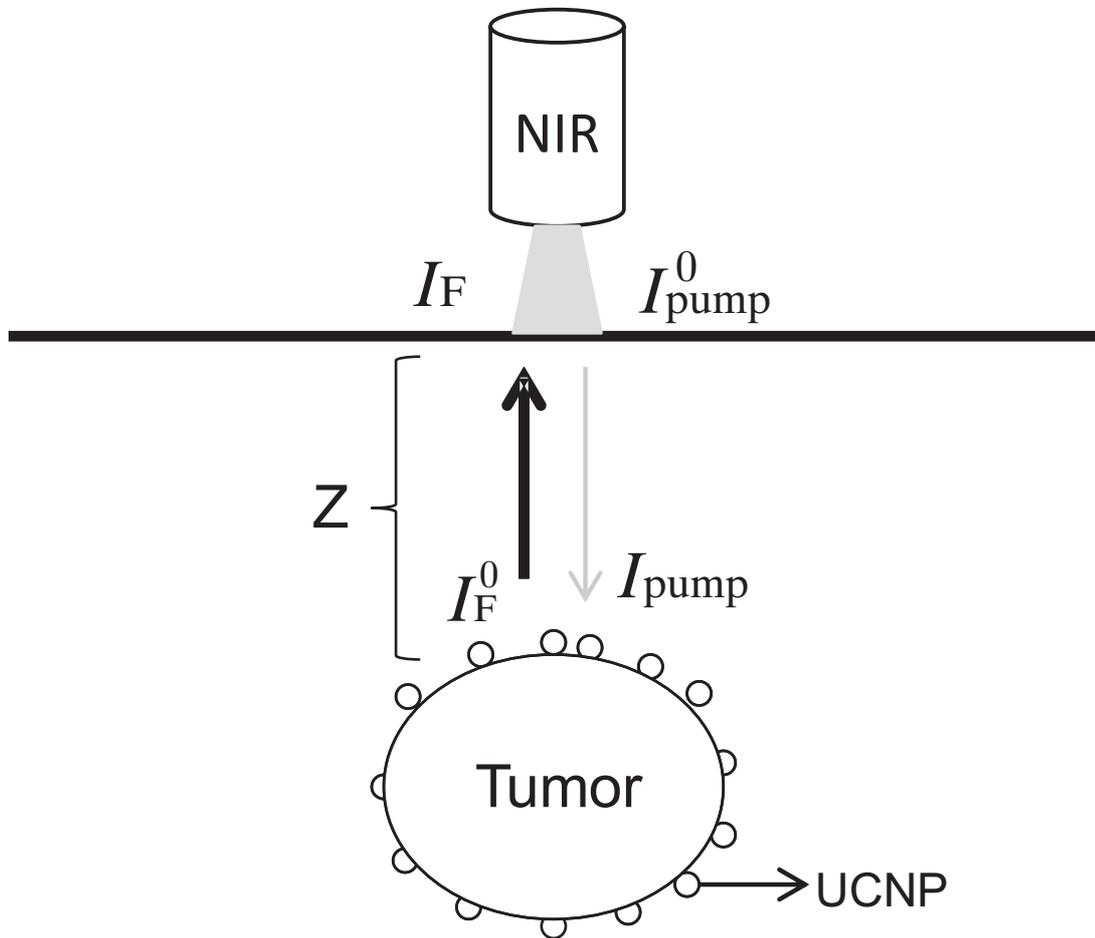


Fig. 4

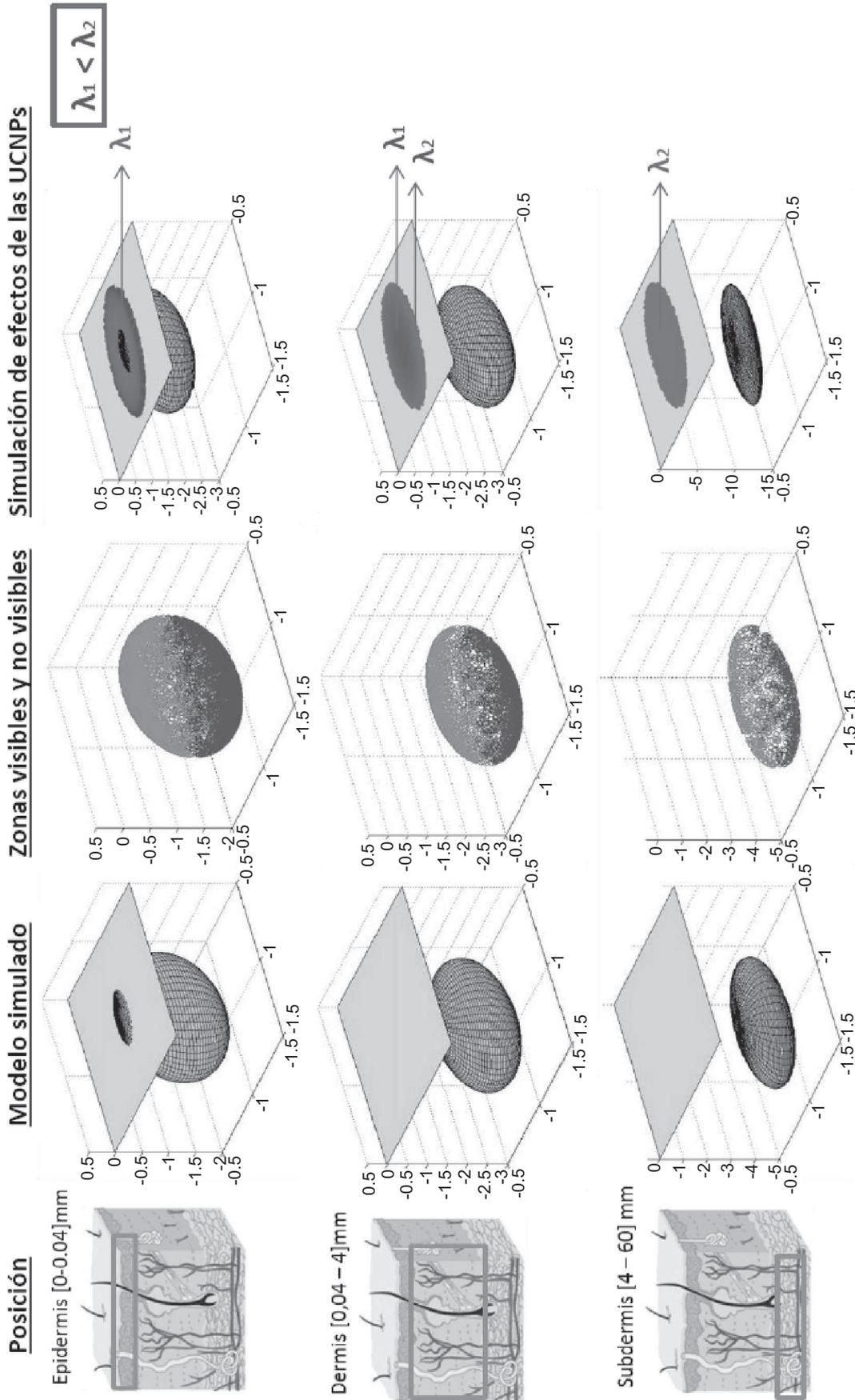


Fig. 5

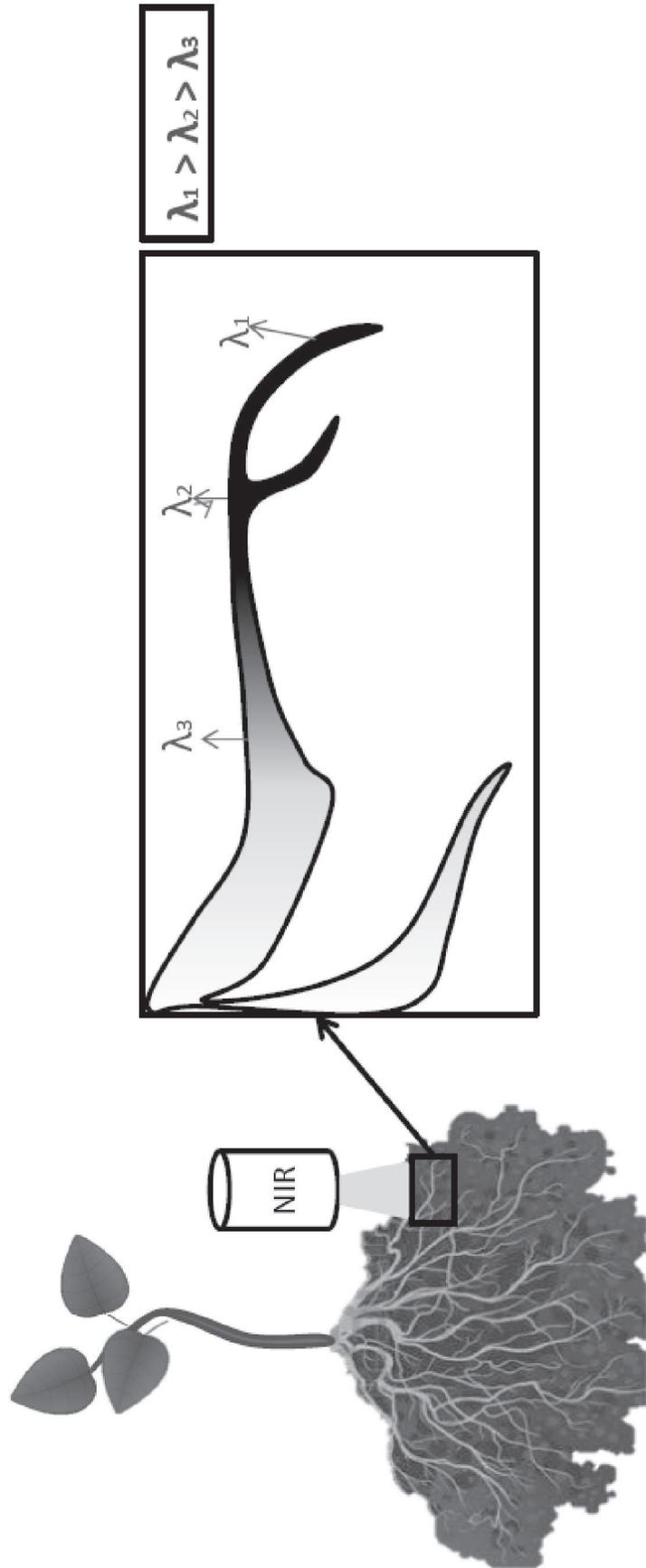


Fig. 6

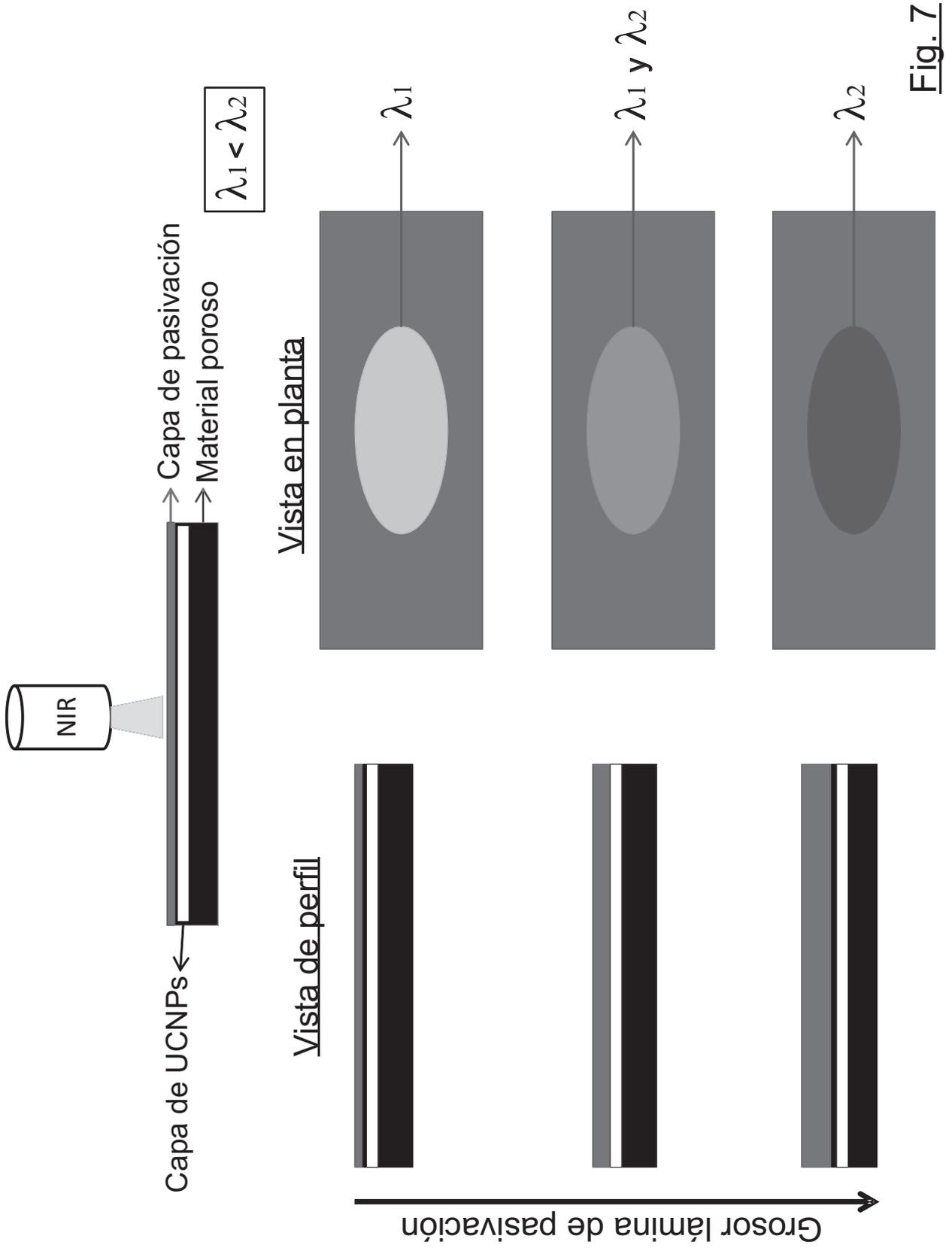


Fig. 7



- ②① N.º solicitud: 201730451  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2017  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MOYANO, E., et al., TAILORING UPCONVERSION NANOPARTICLES FOR EARLY DERMATOLOGICAL TUMOR DETECTION, Seminarios TSC-URJC, 29/05/2014 [en línea][recuperado el 03/04/2018]. Recuperado de Internet <URL: <a href="https://docs.google.com/file/d/0ByBNyfZ4h5nvdDZNVm5JSWI2WIU/edit">https://docs.google.com/file/d/0ByBNyfZ4h5nvdDZNVm5JSWI2WIU/edit</a> >. páginas 1 – 12. Resumen, páginas 3-5, 7-11.	1-7
A	CHATTERJEE, D.K., et al., UPCONVERSION FLUORESCENCE IMAGING OF CELLS AND SMALL ANIMALS USING LANTHANIDE DOPED NANOCRYSTALS, BIOMATERIALS, 03/12/2007, Vol. 29, Nº 7, Páginas 937 - 943, ISSN 0142-9612, <DOI: doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.051>. Resumen, apartado: "Fluorescence imaging of deep tissues in animal.	1-7
A	WO 2013112856 A2 (UNIV COLORADO REGENTS) 01/08/2013. Página 16, líneas 26-30, página 18, línea 20-página 19, línea 30, página 23, línea 29-página 24, línea 8.	1-7
A	YUELI, H. et al., FACILE SYNTHESIS OF 5 NM NaYF <sub>4</sub> :Yb/Er NANOPARTICLES FOR TARGETED UPCONVERSION IMAGING OF CANCER CELLS, TALANTA, 18/02/2016, Vol. 152, Páginas 504 - 512, ISSN 0039-9140, <DOI: doi:10.1016/j.talanta.2016.02.039>. Resumen.	1-7
A	WO 2015102535 A1 (UNIV SINGAPORE) 09/07/2015, ejemplo 1.	1-7
A	WO 2013181076 A1 (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL et al.) 05/12/2013, párrafos: [0071]-[0073].	1-7

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones  para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 06.04.2018	Examinador M. d. García Poza	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N21/63** (2006.01)

**B82Y15/00** (2011.01)

**C09K11/85** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, B82Y, C09K

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.04.2018

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-7	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-7	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MOYANO, E., et al., TAILORING UPCONVERSION NANOPARTICLES FOR EARLY DERMATOLOGICAL TUMOR DETECTION, Seminarios TSC-URJC [en línea][recuperado el 03/04/2018]. Recuperado de Internet <URL: <a href="https://docs.google.com/file/d/0ByBNyfZ4h5nvdDZNVm5JSWI2WIU/edit">https://docs.google.com/file/d/0ByBNyfZ4h5nvdDZNVm5JSWI2WIU/edit</a> >	29.05.2014

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El documento D01 divulga un método para determinar la profundidad de un material (tumor de piel de un sujeto humano, resumen) que comprende:

- i) aplicar sobre dicho material una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes, donde dicha combinación comprende: al menos una nanopartícula que comprende  $\text{NaYF}_4$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y Er como activador; al menos una nanopartícula que comprende  $\text{NaYF}_4$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y Tm como activador; al menos una nanopartícula que comprende  $\text{LaF}_3$  como estabilizador, Tm como sensibilizante y Er como activador; y al menos una nanopartícula que comprende  $\text{Y}_2\text{O}_3$  como estabilizador, Yb como sensibilizante y Er como activador (apartados: "Synthesis of UCNPs", "Tailoring UCNPs for tumor imaging y fig.10);
- ii) irradiar dicho material con radiación de 980 nm;
- iii) detectar la radiación emitida por las nanopartículas (apartado: "Characterization of UCNPs" y fig.8);
- iv) determinar la profundidad a la que se encuentran dichas nanopartículas y
- v) determinar la profundidad del tumor (fig.13).

Ese tumor puede ser un melanoma (fig. 12) y para que las nanopartículas se unan al tumor se puede utilizar un anticuerpo (página 3).

Por lo tanto, se considera que el objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1 a 7, se encuentra divulgado en el documento D01, por lo que carece de novedad y de actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).