

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 886**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

B32B 19/00 (2006.01)

B05D 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/US2014/017342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14754877 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2959299**

54 Título: **Nanopartículas fluorescentes multicapa y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

20.02.2013 US 201361767066 P

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

22.04.2019

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Center for Technology Licensing at Cornell
University, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**IYER, SRIKANT, K. y
WIESNER, ULRICH, B.**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 709 886 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

Nanopartículas fluorescentes multicapa y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad para la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 61/767.066, presentada el 20 de febrero de 2013.

DECLARACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN PATROCINADA POR EL GOBIERNO

- 10 **[0002]** Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno bajo el contrato n.º 2009-ST-108-LR0004 otorgado por el Departamento de Seguridad Nacional. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

- 15 **[0003]** La presente divulgación se refiere en general a nanopartículas que contienen material sensible a la fluorescencia en capas. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a nanopartículas de sílice que contienen material sensible a la fluorescencia y de múltiples capas.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

- 20 **[0004]** El descubrimiento de fármacos, el cribado de fármacos, la expresión de genes y la identificación de proteínas como dianas de vacunas se basan en la realización de ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS) con gran cantidad de moléculas. Esto requiere la selección de grandes bibliotecas químicas para moléculas diana particulares, tales como proteínas, anticuerpos, nucleótidos o péptidos. La selección de bibliotecas grandes o la
25 multiplexación biológica acelera el desarrollo de herramientas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. La multiplexación biológica implica realizar múltiples ensayos simultáneamente sin comprometer la sensibilidad y la especificidad. El avance hacia el HTS miniaturizado ha llevado a la detección de miles de compuestos por día. La tecnología de fabricación de matrices bidimensionales de arriba a abajo ha llevado al desarrollo de chips de ADN, micromatrices y bioMEMS. La codificación posicional basada en el reconocimiento de patrones ha ayudado aún más
30 a identificar huellas digitales moleculares específicas. Algunos de los principales inconvenientes de estas tecnologías son que son caros en términos de configuración de equipos y reactivos y complejos en términos de preparación de muestras y fabricación de matrices. Además, la variabilidad en las mediciones debido a la reactividad cruzada y la reproducibilidad ha hecho que estas metodologías sean difíciles para el análisis a gran escala.

- 35 **[0005]** El potencial de la codificación multiplex utilizando tecnología de cuentas basada en el racionamiento de color se ha explorado previamente. Se utilizaron dos colorantes orgánicos para codificar una cuenta de poliestireno de 5,5 µm a 8 niveles de intensidad diferentes para ensayos multiplexados. Se sintetizaron cuentas de poliestireno de 1,2 µm codificadas con seis nanopartículas de puntos cuánticos de núcleo-envuelta de CdSe/ZnS distinguibles espectralmente a seis niveles de intensidad diferentes en diferentes proporciones al hinchar el polímero
40 en una mezcla de disolventes apropiada. Las especies fluorescentes en los casos anteriores se incorporaron físicamente en partículas de poliestireno de tamaño micrométrico y, debido a su gran tamaño, no se pudieron aplicar fácilmente para la obtención de bioimágenes multiplexadas *in vivo* o intracelulares. Se desarrollaron nanocódigos de barras fluorescentes basados en dendrímeros como ADN (DL-ADN) al etiquetar con precisión el ADN-DL con dos fluoróforos orgánicos en diferentes proporciones en función del número de sitios reactivos
45 disponibles. Para amplificar la señal de fluorescencia de estos nanocódigos de barras, nuevamente se usaron microcuentas como soporte para la obtención de imágenes y la detección molecular. De forma similar, se sintetizaron nanopartículas de sílice basadas en transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET) de 70 nm que codifican colorantes con diferentes relaciones de colorantes y se cargaron en microesferas recubiertas con estreptavidina de 10 µm. Este trabajo se extendió y se aplicó a la codificación óptica en química combinatoria
50 desarrollando partículas de sílice basadas en > 100 nm (FRET) que codifican colorantes con diferentes relaciones de colorantes que luego se cargaron en microesferas de poliestireno de 10 µm como sustratos para la multiplexación. Las relaciones de colorantes codificadas en estas partículas basadas en FRET se cuantificaron basándose en los colorantes dosificados en la mezcla de reacción y suponiendo que se incorporaron todos los colorantes. Debido a los grandes tamaños de las cuentas finales (> 1 µm) en ninguno de estos casos se demostró la obtención de imágenes
55 intracelulares.

- [0006]** Por lo tanto, existe la necesidad de crear partículas de codificación multiplex en las que se suprima la FRET para obtener un nivel deseado de brillo de partículas, y por lo tanto una relación de señal a ruido deseable, de tamaños de aproximadamente 100 nm o menos que se puedan usar en aplicaciones *in vivo* e *in vitro* ya que las
60 partículas con tamaños por debajo de 100 nm son particularmente adecuadas para la captación celular, y por lo tanto son deseables para aplicaciones de obtención de imágenes intracelulares.

BREVE RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

- 65 **[0007]** De acuerdo con los aspectos de la invención, se proporcionan nanopartículas y procedimientos de

acuerdo con las reivindicaciones.

[0008] En este documento se describen nanopartículas de sílice fluorescentes multicolor (también denominadas en este documento nanopartículas que contienen material sensible a la fluorescencia (MSF) multicapa, puntos *mcC* y puntos C tricolor y puntos C multicolores) con recubrimientos de PEG de superficie (para la funcionalización con diferentes restos tales como proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas). Las nanopartículas de sílice fluorescente multicolor pueden denominarse nanopartículas de sílice fluorescente multicolor brillante. Por ejemplo, las nanopartículas tienen tamaños por debajo de 100 nm que contienen dos, tres o más colorantes espectralmente distintos a dos, tres o más niveles de intensidad diferentes. Las nanopartículas de sílice fluorescente multicolor se pueden usar, por ejemplo, para la obtención de bioimágenes intracelulares, detección de alto rendimiento y diagnósticos médicos.

[0009] En un caso, las nanopartículas de sílice contienen los colorantes N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-il) maleimida (DACm (azul)), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMRm (verde)) y Cy5-maleimida (Cy5m (rojo)). Estos colorantes están contenidos a tres niveles de intensidad por colorante (sin colorante, colorante bajo o colorante alto). La arquitectura de las partículas está diseñada para controlar el número de colorantes por color y para minimizar la transferencia de energía entre los colorantes para obtener el máximo brillo. Esta combinación de tres colorantes en tres niveles de intensidad da como resultado la síntesis de veintiséis partículas distinguibles basadas en la longitud de onda y la intensidad de fluorescencia. Las nanopartículas tienen de uno a tres órdenes de magnitud en la mejora del brillo de la fluorescencia en comparación con los colorantes libres. Las nanopartículas con alta carga de colorante fueron ~3,5-4 veces más brillantes que las partículas con partículas cargadas con colorante medio. En este sistema, el movimiento de cargas de colorante medio a alto al incorporar capas adicionales de sílice no disminuye la emisión de fluorescencia relativa de las nanopartículas.

[0010] Los procedimientos para fabricar nanopartículas de sílice fluorescentes multicolor se llevan a cabo de manera tal que, por ejemplo, se añadan colorantes a un núcleo de partículas dopadas con colorante capa por capa y cada colorante espectralmente distinto se separe espacialmente con una envuelta de sílice pura para reducir la transferencia de energía entre los colorantes.

[0011] En un caso, las nanopartículas se sintetizan de manera que los tres colorantes se añaden capa por capa con el verde en el núcleo, seguido del rojo en la envuelta interna, seguido del azul añadido como capa de colorante final. Sin embargo, se puede realizar cualquier orden de adición de colorante sin afectar el rendimiento de la nanopartícula. Las capas de colorante están separadas espacialmente por capas de sílice lo suficientemente gruesas como para suprimir efectivamente la transferencia de energía entre las capas de colorante. Por lo tanto, cada partícula individual tiene estructuras de tipo cebolla con, por ejemplo, hasta veinticuatro capas distintas alrededor de un núcleo teñido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012]

Figura 1. (a) Ilustración esquemática del enfoque capa por capa para incorporar los tres colorantes TMRm (verde), Cy5m (rojo) y DACm (azul) en nanopartículas de sílice (centro) y las posibles combinaciones basadas en los niveles de encapsulación para cada colorante (0, 5, 20 colorantes, respectivamente). Para simplificar, las partículas con carga de colorante medio (~5 colorantes/partícula, tono más claro) y carga de colorante alta (~20 colorantes/partícula, tono más oscuro) se muestran con un tono más claro/más oscuro de verde, rojo y azul. (b) Foto tomada de las 26 nanopartículas fluorescentes multicolor de núcleo-envuelta sintetizadas en agua dispuestas en diferentes filas como partículas sin TMRm (sin verde, fila inferior), partículas con ~5 colorantes TMRm (carga baja de colorante verde, fila intermedia) y partículas con ~20 colorantes TMRm en el núcleo (alta carga de colorante verde, fila superior). Téngase en cuenta que la 27ª cubeta en la fila más baja (izquierda) representa una solución de partículas de sílice pura sin colorante, es decir, con una combinación de colores 0, 0, 0. (c) Clave de las nanopartículas que se muestran en la Figura 1b. El blanco representa partículas de sílice pura sin ningún colorante, como control. TMRm (verde), Cy5m (rojo) y DACm (azul)

Figura 2. Representaciones esquemáticas de la síntesis de puntos C *multicolores* (puntos *mcC*): (a) Gráfica comparativa de la superposición entre las distribuciones de Poisson para lotes de síntesis con diferentes números promedio de colorantes por partícula, ver leyenda. Orden de las curvas de izquierda a derecha: 5, 10, 15, 20 colorantes/partícula. (b) Esquema de reacción generalizado del derivado de maleimida de los tres colorantes TMRm (1), Cy5m (2) y DACm (3) con (3-mercaptopropil) trimetoxisilano para dar el conjugado de colorante silano correspondiente. (c-e) Adición de colorante capa por capa para puntos C de un solo color: partículas TMRm (G), partículas Cy5m (R) y partículas DACm (B), seguida de la adición de un polietilenglicol silano de masa molar de 5 k (PEG-silano) como capa final; (f-h) enfoque de capa por capa para puntos *mcC* de dos colores con diferentes niveles de brillo para (f) las combinaciones G y R, (g) G y B y (h) R y B a partir de los puntos C de G y R de un solo color, seguidos de protección terminal con PEG-silano; y (i) enfoque de capa por capa para los puntos C de tres colores protegidas terminalmente con PEG-silano a partir de G y R que contienen puntos C de dos colores.

Figura 3. Caracterización de puntos C de un solo color. Los paneles (a-c) comparan los espectros de absorbancia y

fluorescencia de nanopartículas cargadas con colorante medio y alto con el colorante libre parental para (a) TMRm, (b) Cy5m y (c) DACm. Las soluciones de colorante libre y partículas se emparejaron en absorbancia antes de estas mediciones. Los paneles (d-f) comparan las curvas de autocorrelación de FCS de los colorantes libres (líneas continuas) con las de las nanopartículas cargadas con colorante medio (círculos huecos) y alto (círculos sólidos) en soluciones: DACm. Los paneles (g-i) comparan el brillo por especies fluorescentes (colorantes frente a partículas) medidos a partir de los conjuntos de datos del detector FCS para (g) sistema TMRm, (h) sistema Cy5m y (i) sistema DACm.

Figura 4. Caracterización de puntos *mcC* (a) Curvas representativas de FCS de partículas intermedias específicas en solución que se mueven hacia puntos C de tres colores que cubren todo el esquema sintético a partir de puntos C de un solo color cargados con colorante TMRm medio/alto (mG, círculos verdes huecos/hG, círculos verdes continuos) a través de puntos C de dos colores cargados con colorante Cy5m medio/alto (hGmR, círculos rojos huecos/hGhR, círculos rojos continuos) a los puntos C de tres colores finales cargados con colorante DACm medio/alto (hGhRmB, círculos azules huecos/hGhRhB, círculos azules sólidos). Azul (curva izquierda), verde (curva media), rojo (curva derecha). (b) Espectros representativos de emisión de fluorescencia de puntos C de tres colores obtenidos por excitación en el azul (izquierda), verde (medio) y rojo (derecha). (c) Resumen de los perfiles de intensidad experimental para cada una de las 26 nanopartículas de sílice fluorescente, medidos por espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario. Las barras verdes representan la emisión de TMRm, las barras rojas de Cy5m y las barras azules de DACm. Las alturas de las barras representan niveles de intensidad de emisión.

Figura 5. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de puntos *mcC* en mastocitos RBL-2H3 que muestran el canal, (a) Ch verde: 560 nm, (b) Ch rojo: 633 nm, (c) Ch azul: 405 nm, (d) Ch amarillo 488 nm; (e) imágenes superpuestas de (a, b, c, y d) (f) imagen de campo brillante.

Figura 6. Una sola imagen en mosaico de partículas mixtas de 512 x 512 que muestra células que contienen hasta 17 partículas diferentes. (a-d) Las imágenes se obtuvieron simultáneamente en los canales rojo, verde, azul y amarillo. (e) Las cuatro imágenes fluorescentes se apilaron para demostrar que las partículas están de hecho dentro de las células. (f) Imagen adquirida en campo claro.

Figura 7. Se cargaron 17 nanopartículas multicolor espectralmente distintas en células de leucemia basófila de rata. (a) Imagen de color falso a tamaño completo (1280 x 1280 píxeles) de las células, cada una cargada con 1 de 17 puntos de "color" *mcC* únicos que demuestran la "decodificación" con éxito de una muestra de múltiples partículas. Una leyenda codificada por colores, que ilustra la composición de las partículas y el color de la célula asignado, se muestra en la parte inferior derecha. (b) Una región ampliada de la misma imagen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

[0013] La presente divulgación proporciona nanopartículas que contienen material sensible a la fluorescencia (MSF) multicapa. También se proporcionan procedimientos para fabricar y utilizar las nanopartículas que contienen MSF multicapa.

[0014] Una nanopartícula que contiene MSF multicapa de la presente divulgación proporciona una nanopartícula que puede ser identificada de forma única por los MSF específicos y los niveles de MSF. Las nanopartículas con códigos incorporados para su identificación pueden actuar como portadores y etiquetas para las moléculas. La combinación específica de FHM(s)/nivel(es) (que puede describirse como un "código de barras" óptico) se puede identificar por su emisión de fluorescencia (por ejemplo, en forma de una imagen). Por ejemplo, en una mezcla de nanopartículas que contienen MSF multicapa que tienen diferentes combinaciones de FHM/nivel, cada combinación diferente de FHM/nivel puede identificarse de manera única. Cada partícula distinguible es análoga a un solo pocillo o matriz en la tecnología de matriz 2-D. Por lo tanto, la multiplexación no se limita al número de pocillos o matrices, sino al número de partículas distinguibles. La arquitectura de las nanopartículas minimiza la extinción intracapa e intercapa de la fluorescencia del MSF. Esto proporciona nanopartículas que tienen un brillo deseable a través del uso efectivo de todos los colorantes fluorescentes en las partículas, lo que resulta en niveles deseables de señal a ruido en esquemas de detección óptica/fluorescente.

[0015] En un aspecto, la presente divulgación proporciona nanopartículas de sílice multicapa que contienen MSF. Las nanopartículas comprenden uno o más materiales sensibles a la fluorescencia (MSF) que pueden estar presentes en una o más cantidades (es decir, niveles). Las nanopartículas pueden ser de 5 nm a 500 nm, incluidos todos los valores enteros y los intervalos entre ellos, en tamaño (por ejemplo, diámetro).

[0016] La referencia a las nanopartículas que contienen MSF multicapa en este documento pretende incluir las nanopartículas que contienen colorante multicapa. La referencia a la capa o capas de sílice sin MSF en este documento pretende incluir la capa o capas de sílice sin colorante. La referencia a la capa o capas de sílice que contienen MSF en este documento pretende incluir la capa o capas de sílice que contienen colorante. La referencia a la capa o capas de sílice sin MSF más externa en el presente documento pretende incluir la capa o capas de sílice más externas que contienen colorante. La referencia a MSF en este documento pretende incluir la molécula o moléculas de colorante. La referencia a un precursor o precursores de conjugado de MSF en este documento pretende incluir precursor o precursores de conjugado colorante. La referencia a la capa o capas de sílice que contienen MSF más externas en este documento pretende incluir la capa o capas de sílice que contienen colorante más externas.

[0017] En una realización, la nanopartícula comprende un núcleo de sílice que comprende una pluralidad de moléculas de MSF unidas covalentemente a la red de sílice del núcleo, de 1 a 100 capas de sílice que contienen MSF, comprendiendo cada capa una pluralidad de moléculas de MSF unidas covalentemente a la red de sílice de la
 5 capa de sílice que contiene MSF, una o más capas de sílice sin MSF, en donde una de las capas de sílice sin MSF separa el núcleo de sílice de una de las capas de sílice que contienen MSF y, si está presente, cada par adyacente de las capas de sílice que contienen MSF está separado por una de las capas de sílice libres de MSF, una capa de sílice sin MSF más externa dispuesta sobre la capa de sílice que contiene MSF más externa; y una pluralidad de moléculas de poli (etilenglicol) unidas covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más
 10 externa. La nanopartícula puede comprender además uno o más restos (por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, aptámeros, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polímeros, moléculas orgánicas pequeñas y combinaciones de los mismos) unidos covalentemente a las moléculas de poli (etilenglicol) unidos covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa. La nanopartícula puede tener un diámetro de 5 nm a 500 nm, incluidos todos los valores de nm enteros y los intervalos entre ellos. Cada capa de sílice sin MSF tiene un
 15 espesor (por ejemplo, de 1 nm a 20 nm) de manera que hay menos del 10 % de transferencia de energía medible entre el MSF en el núcleo y en una capa de sílice que contiene MSF adyacente o en capas de sílice que contienen MSF adyacentes.

[0018] En otra realización, la nanopartícula comprende un núcleo de sílice que comprende una pluralidad de moléculas de MSF unidas covalentemente a la red de sílice del núcleo, de 1 a 100 capas de sílice que contienen MSF, comprendiendo cada capa una pluralidad de moléculas de MSF unidas covalentemente a la red de sílice de la
 20 capa de sílice que contiene MSF, una o más capas de sílice sin MSF, en donde una de las capas de sílice sin MSF separa el núcleo de sílice de una de las capas de sílice que contienen MSF y, si está presente, cada par adyacente de las capas de sílice que contienen MSF está separado por una de las capas de sílice libres de MSF, y una capa de
 25 sílice sin MSF más externa se dispone sobre la capa de sílice que contiene MSF más externa. La nanopartícula puede tener un diámetro de 5 nm a 500 nm, incluidos todos los valores de nm enteros y los intervalos entre ellos. Cada capa de sílice sin MSF tiene un espesor (por ejemplo, de 1 nm a 20 nm) de manera que haya menos del 10 % de transferencia de energía medible entre el MSF en el núcleo y en una capa de sílice que contiene MSF adyacente o en capas adyacentes de sílice que contienen MSF.

[0019] En una realización, cada una de las capas de sílice libres de MSF puede estar dispuesta sobre el núcleo de sílice o una capa de sílice que contiene MSF.

[0020] En otra realización, la nanopartícula comprende a) un núcleo de sílice que comprende una pluralidad de MSF unidos covalentemente a la red de sílice del núcleo; y b) capas alternas de capas de sílice libres de MSF y
 35 capas que contienen MSF que rodean el núcleo de sílice, en donde una capa de sílice sin MSF rodea el núcleo. La capa más externa es una capa de sílice sin MSF o una capa que contiene MSF. Opcionalmente, una pluralidad de moléculas de poliéter se unen covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa o capa que contiene MSF.

[0021] El núcleo tiene una forma sustancialmente esférica y puede tener de 1 nm a 20 nm, incluidos todos los valores de nm enteros entre ellos, en tamaño (por ejemplo, diámetro). El núcleo tiene una pluralidad de material sensible a la fluorescencia (por ejemplo, moléculas sensibles a la fluorescencia, como moléculas de colorante y moléculas de pigmento) que pueden unirse covalentemente a la red de óxido de silicio del núcleo.

[0022] La capa de sílice sin MSF se dispone sobre el núcleo y/o una capa de sílice que contiene MSF. No hay MSF detectable en esta capa. Esta capa cubre al menos parcialmente el núcleo y/o una capa de sílice que contiene MSF. En una realización, la capa es una capa continua que cubre completamente el núcleo y/o una capa de sílice que contiene MSF. La nanopartícula puede tener de 1 a 99 capas de sílice sin MSF, incluidos todos los
 50 números enteros de capas y los intervalos entre ellas.

[0023] Cada capa de sílice sin MSF aísla (es decir, reduce la transferencia de energía entre) el núcleo y la capa de sílice que contiene MSF adyacente o las capas de sílice que contienen MSF adyacente. En varias realizaciones, cada capa de sílice sin MSF tiene un espesor tal que hay un 10 % o menos, un 5 % o menos, un 4 %
 55 o menos, un 3 % o menos, un 2 % o menos, o un 1 % o menos de transferencia de energía medible entre las moléculas de MSF en el núcleo y en una capa de sílice que contiene MSF adyacente o en capas de sílice que contienen MSF adyacente. En una realización, cada capa de sílice sin MSF tiene un espesor tal que no hay transferencia de energía medible entre el MSF en el núcleo y la capa de sílice que contiene MSF adyacente o capas de sílice que contienen MSF adyacente. La transferencia de energía entre el MSF en el núcleo y la capa de sílice
 60 que contiene MSF adyacente o las capas de sílice que contienen MSF adyacente se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transferencia de energía puede medirse por excitación de un MSF (por ejemplo, una especie colorante) (donador) que absorbe a longitudes de onda más bajas y el examen de la emisión de un segundo MSF (por ejemplo, una segunda especie colorante) (aceptor) que tiene una superposición entre su espectro de absorbancia y el espectro de emisión del colorante donador. Un segundo procedimiento es
 65 medir la intensidad de emisión del MSF donador (por ejemplo, colorante) en ausencia y presencia de un MSF

aceptor (por ejemplo, colorante). Si se produce FRET entre el donador y el aceptor, se suprime la emisión del donador. Por ejemplo, la capa de sílice sin MSF puede tener de 1 nm a 20 nm, incluidos todos los valores de nm enteros y los intervalos entre ellos.

5 **[0024]** La capa de sílice que contiene MSF se dispone sobre una capa de sílice sin MSF. Esta capa cubre al menos parcialmente la capa de sílice sin MSF. En una realización, la capa es una capa continua que cubre completamente el núcleo y/o una capa de sílice que contiene MSF. En una realización, cada capa de sílice sin MSF tiene un único tipo de MSF. La nanopartícula puede tener de 1 a 100 capas de sílice que contienen MSF, e incluye todos los números enteros de capas y los intervalos entre ellas. La capa de sílice que contiene MSF puede tener un
10 espesor de menos de 1 nm a 20 nm. En una realización, la capa de sílice que contiene MSF tiene un espesor de 1 nm a 20 nm, que incluye todos los valores de nm enteros y los intervalos entre ellos. La capa de sílice sin MSF más externa se dispone sobre la capa de sílice que contiene MSF más externa. Esta capa cubre al menos parcialmente la capa de sílice que contiene MSF más externa. En una realización, la capa es una capa continua que cubre completamente el núcleo y/o una capa de sílice que contiene MSF. Esta capa tiene un espesor de 1 nm a 20 nm,
15 incluidos todos los valores de nm enteros y los intervalos entre ellos.

[0025] El núcleo, las capas de sílice que contienen MSF y las capas de sílice sin MSF tienen una estructura de red. La red se puede formar por condensación de un precursor de sílice. En una realización, la red es una red de sílice. La red de sílice del núcleo se puede formar por condensación de precursores de sílice como, por ejemplo,
20 TMOS y TEOS. Pueden prepararse precursores adecuados usando procedimientos conocidos y pueden obtenerse de fuentes comerciales.

[0026] Se puede usar cualquier material sensible a la fluorescencia (por ejemplo, colorantes y pigmentos) que pueda unirse covalentemente a la red de óxido de silicio de la nanopartícula. Ejemplos de MSF incluyen moléculas
25 de colorante. Pueden prepararse materiales adecuados que responden a la fluorescencia usando procedimientos conocidos y pueden obtenerse de fuentes comerciales.

[0027] Se conocen una amplia variedad de materiales adecuados sensibles a la fluorescencia químicamente reactivos, ver, por ejemplo, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH
30 CHEMICALS, 6ª ed., R. P. Haugland, ed. (1996). Un fluoróforo típico es, por ejemplo, un compuesto aromático o heteroaromático fluorescente tal como un pireno, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbena, un indol o benzindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o un benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina, una carbocianina, un carbostirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinolina, una cumarina (incluidas las hidroxycumarinas y aminocumarinas y sus derivados fluorados), y
35 compuestos similares, véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. n.º 5.830.912; 4.774.339; 5.187.288; 5.248.782; 5.274.113; 5.433.896; 4.810.636; y 4.812.409.

[0028] Por ejemplo, el colorante es un colorante orgánico. Los ejemplos de colorantes orgánicos adecuados incluyen, pero no son derivados de xanteno (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, verde de Oregón, eosina, rojo de
40 Texas y colorantes Cal Fluor), derivados de cianina (por ejemplo, cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina, merocianina y colorantes Quasar), derivados de naftaleno (por ejemplo, derivados de dansilo y prodan), derivados de cumarina, derivados de oxadiazol (por ejemplo, piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol), derivados de pireno (por ejemplo, azul cascada), derivados de oxazina (por ejemplo, rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo, oxazina 170), derivados de acridina (por ejemplo, proflavina, naranja de acridina, amarillo de
45 acridina), derivados de arilmetina (por ejemplo, auramina, violeta cristal, verde de malaquita), derivados de tetrapirrol (por ejemplo, porfina, ftalocianina y bilirrubina), colorante CFTM (Biotium), BODIPY® (Invitrogen), ALEXA FLUOR® (Invitrogen), DYLIGHTTM (Thermo Scientific, Pierce), ATTOTM y TRACYTM (Sigma Aldrich), FLUOPROBES® (Interchim), sus derivados, y similares.

50 **[0029]** Es deseable usar materiales con respuesta fluorescente que tengan espectros de absorción y/o emisión que correspondan a las longitudes de onda de excitación y detección utilizadas habitualmente. Por ejemplo, los materiales sensibles a la fluorescencia que tienen espectros de absorción y/o emisión que corresponden a longitudes de onda de excitación y/o detección utilizadas en sistemas de imagen disponibles en el mercado. Por ejemplo, la nanopartícula puede tener MSF con longitudes de onda de emisión rojas, verdes, azules, o una
55 combinación de ellas. En una realización, los materiales sensibles a la fluorescencia son colorantes fluorescentes seleccionados entre N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-ilo) (DAC), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMR), Cy5, N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-il) maleimida (DACm), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMRm), Cy5-maleimida (Cy5m), o una combinación de las mismas.

60 **[0030]** El MSF está unido covalentemente (por ejemplo, directamente o mediante un grupo de enlace) a la red de sílice de nanopartículas del núcleo o la capa que contiene MSF. El MSF puede unirse covalentemente de forma directa a la red de sílice a través de un grupo de enlace a través de, por ejemplo, un enlace éster, enlace amida o enlace tioéter. Por ejemplo, un MSF (por ejemplo, una molécula de colorante) puede unirse covalentemente a un precursor sol-gel (por ejemplo, un alquil (trialcoxil) silano funcionalizado) a través de un grupo de enlace y este
65 precursor de conjugado de MSF se usa para producir el núcleo o la capa que contiene MSF. En una realización, el

MSF está unido covalentemente a la red de óxido de silicio por un conjugado de maleimida-mercapto. Los enlaces covalentes o enlaces entre el MSF y un precursor sol-gel (por ejemplo, un alquil (trialcoxi) silano funcionalizado) pueden formarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

5 **[0031]** El MSF (por ejemplo, las moléculas de colorante) en las nanopartículas (es decir, que está unido covalentemente a la red de sílice de nanopartículas del núcleo o capa que contiene MSF) tiene una intensidad de emisión de fluorescencia (es decir, brillo) que es mayor que la del MSF libre cuando la emisión de fluorescencia de cada uno se mide en una solución acuosa. En varias realizaciones, la intensidad de emisión de fluorescencia de uno o más o todos los MSF (por ejemplo, moléculas de colorante) en la nanopartícula es del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 10 50 %, 75 %, 100 %, dos veces, cinco veces, 10 veces, o 20 veces mayor que la del MSF libre (por ejemplo, moléculas de colorante) cuando la emisión de fluorescencia de cada una se mide en una solución acuosa.

[0032] La capa de sílice sin MSF más externa puede pasivarse de modo que la nanopartícula esté estabilizada estéricamente contra la agregación con otras nanopartículas en soluciones tampón fisiológicas. Por 15 ejemplo, la nanopartícula tiene una pluralidad de grupos poliméricos, tales como grupos de poliéter unidos covalentemente a la superficie exterior de la capa. Los grupos poliéter pueden derivarse de una molécula de poliéter o de una molécula de poliéter funcionalizada. En una realización, el grupo poliéter es un grupo PEG.

[0033] En una realización, la nanopartícula tiene una pluralidad de grupos de poli (etilenglicol) (PEG) unidos 20 covalentemente a la superficie exterior de la capa. Los grupos de PEG pueden derivarse de una molécula de PEG o una molécula de PEG funcionalizada. Los grupos de PEG están unidos covalentemente a la red de sílice de la capa. Por ejemplo, los grupos PEG pueden tener un peso molecular de 400 g/mol a 10.000 g/mol. Los grupos de PEG cubren al menos una parte de la capa de sílice sin MSF más externa. Es deseable que los grupos de PEG cubran al menos una parte de la capa de modo que las nanopartículas estén estabilizadas estéricamente contra la agregación 25 en soluciones tampón fisiológicas.

[0034] Uno o más de los grupos de PEG pueden tener un resto unido covalentemente al grupo (es decir, la cadena de PEG). En una realización, todos los grupos de PEG tienen un resto unido covalentemente al grupo de PEG (es decir, la cadena de PEG). La nanopartícula puede tener todos los restos idénticos o combinaciones de 30 restos. El resto puede ser un resto dirigido que se dirige a una estructura celular (por ejemplo, una estructura celular de superficie o una estructura intracelular). Los ejemplos de restos adecuados incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, subunidades de proteínas y dominios de proteínas), péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN monocatenario, moléculas de ADN bicatenario, moléculas de ARN monocatenario, moléculas de ARN bicatenario y moléculas de ADN ramificadas), aptámeros (por ejemplo, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN 35 y aptámeros de proteínas), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polímeros (por ejemplo, dendrímeros), moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, moléculas de fármacos y compuestos orgánicos tales como ácido fólico o ácido fólico).

[0035] El MSF (por ejemplo, los colorantes individuales) puede estar presente en la nanopartícula en diversas 40 cantidades (es decir, niveles). El MSF presente en la nanopartícula es la suma de todos los mismos tipos de MSF presentes en cualquiera de las capas de sílice que contienen el núcleo y el MSF. La cantidad (es decir, el nivel) de MSF en una nanopartícula dada se puede expresar como el número de MSF (por ejemplo, moléculas de colorante) por nanopartícula. Es deseable que la cantidad de colorante sea tal que los niveles de MSF en una nanopartícula puedan distinguirse de los niveles del mismo MSF en una nanopartícula diferente. La ausencia del colorante se 45 considera un nivel. La cantidad de colorante presente en las nanopartículas que tienen el mismo nivel nominal de colorante puede variar. En diversas realizaciones, la cantidad de MSF en la nanopartícula es tal que hay un 10 % o menos, un 5 % o menos, un 4 % o menos, un 3 % o menos, un 2 % o menos, un 1 % o menos que se superponen en la cantidad del mismo MSF en otra nanopartícula presente (por ejemplo, que constituye otro código de barras óptico). En una realización, la cantidad de MSF en la nanopartícula es tal que no hay superposición en la cantidad 50 del mismo MSF en otra nanopartícula presente (por ejemplo, que constituye otro código de barras óptico).

[0036] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende las nanopartículas. La composición puede comprender una pluralidad de nanopartículas distinguibles (es decir, 55 identificables de forma única). En una realización, la composición comprende una pluralidad de nanopartículas. En otra realización, la composición comprende una pluralidad de nanopartículas que tienen diferentes combinaciones de colorantes y/o niveles de colorantes. Por ejemplo, cada una de la pluralidad de nanopartículas tiene dos o tres colorantes (por ejemplo, N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-ilo) (DAC), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMR), Cy5) a un nivel de 0, 5 o 20 colorantes por nanopartícula.

60 **[0037]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para fabricar las nanopartículas que contienen MSF multicapa. En los procedimientos, la nanopartícula se forma mediante la adición capa por capa de capas de sílice libres de MSF y capas de sílice que contienen MSF a un núcleo.

[0038] En una realización, un procedimiento para fabricar una nanopartícula que contiene MSF multicapa 65 comprende las etapas de: a) poner en contacto un precursor de sílice, una pluralidad de un único tipo de precursor

de conjugado de MSF, un disolvente y una base de tal manera que un núcleo de sílice que tenga una pluralidad de MSF se conjuga con la red de sílice del núcleo de sílice, b) poner en contacto el material de la etapa a) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice, c) poner en contacto el material de b) con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de manera que se forme una capa de sílice que contiene MSF; d) opcionalmente, poner en contacto el material de la etapa c) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF sobre la capa de sílice que contiene MSF y poner en contacto el material resultante con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de modo que se forme una capa de sílice que contiene MSF; e) opcionalmente, repetir la etapa d) un número deseado de veces, en el que el contacto es con el material de una etapa d) realizada previamente; e) poner en contacto el material de la etapa c), la etapa d) o la etapa e) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF más externa en la capa de sílice que contiene MSF más externa; f) poner en contacto con el material de la etapa c), d), o e) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF más externa en la capa que contiene MSF más externa; y g) poner en contacto el material de la etapa f) con moléculas de poliéter funcionalizadas de modo que se forme una nanopartícula que tiene una pluralidad de moléculas de poliéter unidas covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa de la nanopartícula. En un ejemplo, las moléculas de poliéter funcionalizadas son moléculas de PEG funcionalizadas y los grupos de poliéter son grupos de PEG.

20 **[0039]** En otra realización, un procedimiento para fabricar una nanopartícula que contiene MSF multicapa comprende las etapas de: a) poner en contacto un precursor de sílice, una pluralidad de un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de tal manera que un núcleo de sílice que tenga una pluralidad de MSF se conjuga con la red de sílice del núcleo de sílice, b) poner en contacto el material de la etapa a) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice, c) poner en contacto el material de b) con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de manera que se forme una capa de sílice que contiene MSF, poner en contacto el material de b) con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de modo que se forme una capa de sílice que contiene MSF; d) opcionalmente, poner en contacto el material de la etapa c) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF sobre la capa de sílice que contiene MSF y poner en contacto el material resultante con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de modo que se forme una capa de sílice que contiene MSF; e) opcionalmente, repetir la etapa d) un número deseado de veces, en el que el contacto es con el material de una etapa d) realizada previamente; f) poner en contacto el material de la etapa c), la etapa d) o la etapa e) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF más externa en la capa de sílice que contiene MSF más externa.

[0040] En las realizaciones que forman una nanopartícula que contiene MSF multicapa, los disolventes, bases, precursores de conjugado de MSF y precursores de sílice pueden ser cualquier especie descrita en el presente documento. Por lo tanto, los disolventes, bases, precursores de conjugado de MSF y precursores de sílice pueden ser los mismos para cada etapa de contacto o pueden ser diferentes para una o más de las etapas de contacto.

[0041] El precursor de sílice sufre una reacción (como una reacción de condensación) para formar una red de sílice. El precursor de sílice puede ser tetrametoxisilano (TMOS) o tetraetoxisilano (TEOS). Los precursores pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica u obtenidos de fuentes comerciales.

[0042] El precursor de conjugado de MSF es un MSF unido covalentemente, de forma directa o mediante un grupo de enlace, a un resto de conjugado de MSF que tiene al menos un grupo (por ejemplo, un grupo alcóxisilano tal como metóxisilano o etóxisilano) que puede sufrir una reacción de condensación tal que el MSF se una covalentemente a la red (por ejemplo, la red de sílice) del núcleo o la capa de sílice que contiene MSF. Por ejemplo, el resto de conjugado de MSF es un grupo trialcóxisilano (por ejemplo, $-\text{Si}(\text{OR})_3$, en donde cada R es un grupo metilo o etilo que tiene un grupo reactivo, como un grupo mercapto (-SH). El grupo de enlace puede derivarse de un grupo de maleimida. El precursor de conjugado de MSF puede formarse mediante químicas de conjugación conocidas. En una realización, el precursor de conjugado de MSF es un conjugado de maleimida-mercapto. Por ejemplo, el MSF se conjuga con 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTMS) directamente o mediante reacción con un grupo maleimida en un conjugado de MSF-maleimida. En una realización, el MSF es un conjugado de MSF-maleimida. Por ejemplo, un conjugado de MSF-maleimida se hace reaccionar con 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTMS) para formar un precursor de conjugado de MSF.

[0043] La molécula de poliéter funcionalizada (por ejemplo, la molécula de PEG funcionalizada) tiene un grupo funcional que puede reaccionar con la superficie más externa de la capa de sílice sin MSF más externa, de manera que la molécula de poliéter (por ejemplo, la molécula de PEG) está unida covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa de la nanopartícula. Por ejemplo, una molécula de poliéter o una molécula de PEG está unida covalentemente, de forma directa o por medio de un grupo de enlace, a un resto que tiene al menos un grupo (por ejemplo, un grupo alcóxisilano como metóxisilano o etóxisilano) que puede

experimentar una reacción de condensación tal que la molécula de poliéter o la molécula de PEG está unida covalentemente a la red de sílice de la superficie más externa de la capa de sílice sin MSF más externa. Un ejemplo de un grupo funcional adecuado es un grupo trialcóxisilano (por ejemplo, $-\text{Si}(\text{OR})_3$, donde cada R es un grupo metilo o etilo). Un ejemplo de un grupo de enlace adecuado es $(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-)$. En una realización, la molécula de PEG
5 funcionalizada es metoxi-PEG-silano (mPEG-silano).

[0044] Opcionalmente, la molécula de PEG funcionalizada puede tener un resto unido covalentemente a ella. Dicha molécula de PEG funcionalizada puede formarse usando una molécula de PEG heterobifuncional. La molécula de PEG heterobifuncional tiene al menos un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo funcional
10 en la superficie más externa de la capa de sílice sin MSF más externa y un grupo funcional que puede reaccionar con el resto (o una versión funcionalizada de la misma).

[0045] En la reacción de formación del núcleo, el precursor de sílice, una pluralidad de un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base (por ejemplo, amoníaco) se hacen reaccionar en unas
15 condiciones (por ejemplo, tiempo y temperatura) de manera que se forme una pluralidad de núcleos de sílice que tienen una pluralidad de conjugados de MSF a la red de sílice del núcleo de sílice.

[0046] En la reacción de formación de la capa de sílice sin MSF, los núcleos (por ejemplo, la mezcla de reacción en la que se forman los núcleos) se ponen en contacto con un precursor de sílice y un disolvente de modo
20 que se forme una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice.

[0047] En la reacción de formación de la capa de sílice que contiene MSF, las nanopartículas que comprenden un núcleo y una capa de sílice sin MSF (por ejemplo, la mezcla de reacción en la que se forman las nanopartículas que comprenden un núcleo y una capa de sílice sin MSF) se ponen en contacto con un precursor de
25 sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF diferente al único tipo de precursor de conjugado de MSF en el núcleo, un disolvente y una base de manera que se forme una capa de sílice que contiene MSF.

[0048] En la reacción de formación de la capa de sílice que contiene MSF, la concentración de precursor de sílice se mantiene por debajo de la concentración del umbral de nucleación. En una realización, la reacción se añade
30 en alícuotas en serie para mantener la concentración del precursor de sílice por debajo de la concentración del umbral de nucleación. Es deseable usar TMOS, que tiene una cinética de reacción de hidrólisis más rápida en comparación con las de TEOS, a fin de que sea más fácil mantener la concentración del precursor de sílice por debajo de la concentración del umbral de nucleación.

[0049] Opcionalmente, la reacción de formación de la capa de sílice sin MSF y la reacción de formación de la capa de sílice que contiene MSF se repiten secuencialmente en las nanopartículas que comprenden en secuencia desde el centro de un núcleo de la nanopartícula, una capa de sílice sin MSF y una capa de sílice que contiene MSF
35 (por ejemplo, la mezcla de reacción en la que se forman estas nanopartículas) hasta que se forman nanopartículas que tienen de 2 a 100 capas de sílice que contienen MSF, incluyendo todo el número entero de capas de sílice que contienen MSF y los intervalos entre ellas. En estas reacciones opcionales de capa de sílice que contienen MSF, el MSF puede ser igual o diferente al utilizado en cualquier otra reacción de capa de sílice que contiene MSF.
40

[0050] En la reacción de formación de la capa de sílice sin MSF más externa, las nanopartículas que tienen un núcleo, una o más capas de sílice sin MSF y una o más capas de sílice que contienen MSF (por ejemplo, la
45 mezcla de reacción en la que se forman estas nanopartículas) se ponen en contacto con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF más externa sobre la capa de sílice que contiene MSF más externa.

[0051] En la reacción de funcionalización de PEG (también denominada en el presente documento
50 PEGilación), las nanopartículas que tienen un núcleo, una o más capas de sílice sin MSF, y una o más capas de sílice que contienen MSF, y una capa de sílice sin MSF más externa (por ejemplo, la mezcla de reacción en la que se forman estas nanopartículas) se ponen en contacto con moléculas de PEG funcionalizadas de modo que se forme una nanopartícula que tiene una pluralidad de moléculas de PEG unidas covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa de la nanopartícula.
55

[0052] En una realización, se forma un núcleo de sílice usando un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base. Se forma una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice utilizando un precursor de sílice y un disolvente. Se forma una capa de sílice que contiene MSF sobre la capa de sílice sin MSF utilizando un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base. Opcionalmente,
60 alternativamente se forman una o más capas de sílice libres de MSF y una o más capas de sílice que contienen MSF en la capa de sílice que contiene MSF más alejada del núcleo de sílice. Después de que se formen todas las capas que contienen MSF, se forma una capa de sílice sin MSF más externa en la capa que contiene MSF que está más alejada del núcleo de sílice utilizando un precursor de sílice y un disolvente. La capa de sílice sin MSF más externa se hace reaccionar opcionalmente con moléculas de poliéter funcionalizadas, de modo que se forma una
65 nanopartícula que tiene una pluralidad de moléculas de poliéter unidas covalentemente a la superficie exterior de la

capa de sílice sin MSF más externa de la nanopartícula. En un ejemplo, las moléculas de poliéter funcionalizadas son moléculas de PEG funcionalizadas y los grupos de poliéter son grupos de PEG.

5 **[0053]** El disolvente utilizado en cualquiera de las etapas del procedimiento es un alcohol y una cantidad de agua adecuada para hidrolizar los precursores (por ejemplo, precursores de sílice, precursores de conjugado de MSF y/o moléculas de PEG funcionalizadas). En una realización, el disolvente comprende alcohol y una cantidad adecuada de agua. En una realización, el alcohol es etanol.

10 **[0054]** La determinación de las condiciones apropiadas para la reacción de formación del núcleo, la reacción de formación de la capa de sílice sin MSF, la reacción de la capa de sílice que contiene MSF o la reacción de la capa de sílice que contiene MSF más externa está dentro del alcance de un experto en la materia. Por ejemplo, la reacción de formación del núcleo, la reacción de formación de la capa de sílice sin MSF, la reacción de la capa de sílice que contiene MSF o la reacción de la capa de sílice que contiene MSF más externa se llevan a cabo de 10 °C a 30 °C, incluidos todos los valores de °C enteros y los intervalos entre ellos, durante 10 minutos a 120 minutos, 15 incluidos todos los valores de minutos enteros y los intervalos entre ellos.

20 **[0055]** La base utilizada en cualquiera de las etapas del procedimiento cataliza una reacción de condensación de los precursores (por ejemplo, precursores de sílice, precursores de conjugado de MSF y/o moléculas de PEG funcionalizadas). En una realización, la base es amoníaco (por ejemplo, amoníaco en una solución acuosa).

25 **[0056]** En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona usos de las nanopartículas que contienen MSF multicapa. Las nanopartículas pueden usarse para aplicaciones tales como procedimientos de obtención de imágenes (por ejemplo, procedimientos de obtención de bioimágenes intracelulares), detección de alto rendimiento, diagnósticos médicos, detección y seguimiento de productos.

30 **[0057]** Las nanopartículas que contienen MSF multicapa se pueden usar para dirigir y/o identificar tipos de células específicas (por ejemplo, células con ciertas estructuras internas), sin lisar las células. Los procedimientos utilizan la microscopía fluorescente o la citometría de flujo para detectar distintas nanopartículas que contienen MSF multicapa. En una realización, un procedimiento de obtención de imágenes comprende las etapas de: poner en contacto una célula o una pluralidad de células con una pluralidad de nanopartículas que contienen MSF multicapa (o una pluralidad de nanopartículas distinguibles); y la obtención de una pluralidad de imágenes de la célula o pluralidad de células, cada imagen obtenida que usa una longitud de onda de excitación diferente y una longitud de onda de emisión diferente, donde cada longitud de onda de excitación diferente se encuentra en el espectro de absorción, un tipo diferente de MSF presente en la nanopartícula y cada longitud de onda de emisión diferente se encuentra en el espectro de emisión de un tipo diferente de MSF presente en la nanopartícula. El procedimiento puede comprender además la etapa de combinar la pluralidad de imágenes para proporcionar una sola imagen. En los procedimientos de obtención de imágenes, la imagen se puede llevar a cabo utilizando técnicas de microscopía fluorescente como, por ejemplo, microscopía confocal. Puede ser deseable usar nanopartículas que tengan una 40 pluralidad de restos conjugados con los grupos PEG.

45 **[0058]** Por ejemplo, los procedimientos de obtención de imágenes se pueden usar para identificar células en base a sus estructuras interiores de una manera multiplexada. En una realización, las células se ponen en contacto con las nanopartículas o una pluralidad de nanopartículas distinguibles que tienen un tamaño de 1 nm a menos de 100 nm, de modo que las nanopartículas se introducen en las células. Por ejemplo, las células pueden someterse a electroporación (por ejemplo, electroporación de onda cuadrada) para facilitar la incorporación de las nanopartículas en las células.

50 **[0059]** La célula o la pluralidad de células pueden estar presentes en un sujeto. El sujeto puede ser cualquier sujeto que tenga una célula o una pluralidad de células. Por ejemplo, el sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano.

55 **[0060]** Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente divulgación. No están destinados a limitarla de ninguna manera.

EJEMPLO 1

60 **[0061]** El siguiente es un ejemplo que describe la síntesis y el uso de nanopartículas que contienen MSF multicapa de la presente divulgación.

65 **[0062]** En este ejemplo, se produjeron nanopartículas de sílice con núcleo y envuelta fluorescentes codificadas ópticamente. Las nanopartículas se denominan puntos Cornell *multicolor* o simplemente puntos *mcC* y tienen tamaños por debajo de 100 nm, lo que hace que las nanopartículas sean deseables para la selección de alto rendimiento y su aplicación a la obtención de bioimágenes intracelulares utilizando multiplexación de fluorescencia. Estas nanopartículas están codificadas con tres fluoróforos orgánicos espectralmente distintos, es decir, N-(7-

dimetilamino-4-metilcumarin-3-il) maleimida (DACm, $\lambda_{abs} = 395$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMRm, $\lambda_{abs} = 540$ nm, $\lambda_{em} = 570$ nm) y Cy5-maleimida (Cy5m, $\lambda_{abs} = 640$ nm, $\lambda_{em} = 670$ nm), con tres números de colorantes controlados con precisión, es decir, 0, 5 y 20, respectivamente, por partícula, que dan como resultado 26 nanopartículas ópticamente distinguibles como se muestra en la Figura 1. Los colorantes se eligieron según las fuentes de láser de excitación habitualmente disponibles ($\lambda_{exc} = 405$ nm, 540 nm y 633 nm) utilizadas en microscopía confocal o en técnicas de detección de alto rendimiento como la citometría de flujo, lo que hace que los puntos *mcC* sean útiles para la instrumentación de fluorescencia convencional. La arquitectura de las partículas está diseñada de tal manera que los colorantes se añaden a un núcleo de partículas dopadas con colorante capa por capa y cada colorante espectralmente distinto está separado espacialmente por una capa de sílice pura para reducir la transferencia de energía entre los colorantes (Figura 1). Esto asegura niveles de brillo máximos y, por lo tanto, relaciones de señal a ruido máximas en las imágenes.

[0063] Se fabricaron nanopartículas de sílice fluorescente codificadas ópticamente que tienen distintas firmas fluorescentes, que se pueden usar en el desarrollo de ensayos de cribado. La versatilidad de la química de la superficie de sílice permitió que la superficie de las nanopartículas se modificara con sondas biomoleculares, como oligonucleótidos o péptidos. El número de códigos ópticos fluorescentes 'C' que pueden generarse a partir de puntos *mcC* basados en sílice depende de dos parámetros, el número de colores de colorante, 'm' y el número de niveles de intensidad de fluorescencia, 'N', asociados con cada color. Para niveles de intensidad que van de 0 a infinito, el número de códigos se define como $C = N^m - 1$. El presente caso de tres niveles de intensidad, $N = 3$, de tres colores, $m = 3$, da lugar a 26 códigos de color.

[0064] Para llevar a cabo la síntesis de puntos *mcC*, se abordaron tres cuestiones: (1) la identificación de los colorantes fluorescentes apropiados, 'm', según las fuentes de línea de láser de excitación disponibles habitualmente; (2) la identificación de los números apropiados de colorantes que pueden incorporarse de manera reproducible en las partículas para generar niveles de intensidad de fluorescencia distinguibles, 'N', y (3) la separación espacial de los colorantes espectralmente distintos dentro de la partícula para minimizar la transferencia de energía y, por lo tanto, la extinción de la fluorescencia con el fin de alcanzar los niveles máximos de brillo. Los tres colorantes elegidos para desarrollar puntos *mcC* fueron DACm, TMRm y Cy5m, véase más arriba. La intensidad de fluorescencia medida para una sola partícula y un solo color depende del número de colorantes incorporados en ella. Suponiendo que en un lote típico de síntesis de puntos *mcC*, el número de colorantes de un color específico se distribuye por Poisson (asumiendo así que la encapsulación del colorante es un proceso estocástico), para distinguir diferentes niveles de intensidad de diferentes puntos *mcC*, los valores medios de estas distribuciones de Poisson se eligieron de tal manera que haya una superposición mínima entre las alas de las distribuciones (véase Figura 2a). Por lo tanto, es deseable controlar con precisión la incorporación de colorante en la partícula y tener una transferencia de energía mínima entre los colorantes al aumentar sus números de encapsulación para evitar la extinción de la fluorescencia. Para un tamaño de núcleo dado al aumentar el número de moléculas de colorante, los colorantes en proximidad espacial tienden a mostrar la transferencia de energía. Por lo tanto, para minimizar la interferencia entre los colorantes, en el presente documento se usó un enfoque de capa por capa para construir partículas con altos números de encapsulación de colorante. El trabajo previo de síntesis de puntos C reveló que las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta de 20-30 nm de diámetro normalmente incorporaban alrededor de 5 a 7 colorantes por núcleo de partículas para una concentración de colorante dada. Suponiendo que la incorporación de colorante se distribuye por Poisson, para partículas con un número promedio de colorantes por partícula de 10 y 15, respectivamente, una superposición de ~45 % y ~25 %, respectivamente, como se muestra en la Figura 2a, se esperan 5 colorantes por lote de partículas. En contraste, las partículas con un número promedio de 20 colorantes por partícula solo muestran un ~3 % de superposición con 5 colorantes por lote de partículas. Se espera un pequeño solapamiento similar para la distribución de Poisson de 5 colorantes por lote de partículas con un lote de partículas que contiene cero colorantes de ese color (Figura 2a). Basándonos en estas consideraciones, elegimos los tres niveles distintos de 0, 5 y 20 colorantes por partículas, respectivamente, para distinguir diferentes niveles de intensidad del mismo color en puntos *mcC*.

[0065] La Figura 2b-i muestra un esquema de las diversas rutas de síntesis de partículas capa por capa que dan lugar a los 26 puntos *mcC* distintos. La notación utilizada en este ejemplo para distinguir los códigos de color de puntos *mcC* contiene letras minúsculas para representar niveles de intensidad de fluorescencia (m/h para medio/alto, es decir, ~5/20 colorantes por partícula) y letras mayúsculas para representar colores de fluorescencia (G/R/B para emisión verde/rojo/azul, respectivamente). Cada secuencia se mueve desde el núcleo a la envuelta exterior. Por ejemplo, un punto mGhRmB *mcC* tiene un núcleo de color verde medio (~5 colorantes), seguido por una envuelta interna roja alta (~20 colorantes), seguido por una envuelta exterior azul media (~5 colorantes). Un color no presente (es decir, cero colorantes de ese color) en un punto *mcC* se representa simplemente omitiendo su notación. Por ejemplo, un punto hGhB *mcC* tiene un núcleo alto verde (~20 colorantes), sin rojo (es decir, cero colorantes rojos), y una envuelta exterior azul alta (~20 colorantes). La síntesis de partículas se realizó conjugando primero el colorante activado con maleimida disponible en el mercado (TMRm, Cy5m o DACm) con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS) utilizando la reacción de bioconjugación de maleimida-mercapto para formar un conjugado de colorante (Figura 2b). Tres partículas de un solo color que contienen cargas de colorante medio (mG, mR o mB, respectivamente, véase Figura 2c-e) se sintetizaron por primera vez a través de una condensación de sílice de tipo Stöber modificada, mediante la condensación conjunta del colorante conjugado con TEOS en concentraciones

apropiadas de amoníaco y agua en alcohol. A esto se le añadió una envuelta delgada de sílice dosificando la solución de reacción con TEOS a concentraciones por debajo del umbral de nucleación para evitar cualquier nucleación secundaria. Se eliminó un volumen específico de cada solución de reacción y estas partículas se separaron como partículas con cargas de colorante medio. Para llegar a las tres partículas de un solo color con altas cargas de colorante (hG, hR o hB, respectivamente, véase Figura 2c-e), al resto de las soluciones de reacción, se añadió un conjugado de colorante para co-condensar con los grupos silanol en la superficie de las nanopartículas de sílice de núcleo-envuelta. Después de esta etapa, se añadió nuevamente una envuelta delgada de sílice como se ha descrito anteriormente. Este procedimiento de capa de colorante-envuelta de sílice alterno se llevó a cabo hasta que se obtuvo la alta carga de colorante apropiada con ~20 colorantes por partícula. La Figura 2c-e muestra un esquema de las estructuras resultantes tipo cebolla para partículas de punto C de un solo color para color verde alto (TMRm), rojo alto (Cy5m) y azul alto (DACm). Los números necesarios de capas adicionales de colorante y sílice en el núcleo por partícula para lograr una emisión de alta intensidad fueron cuatro para partículas de color verde alto (TMRm) y azul alto (DACm), y tres para partículas de color rojo alto (Cy5m).

15 **[0066]** Después del desarrollo de los protocolos de síntesis para controlar con precisión el número de colorantes por partícula para los tres sistemas de colorante distintos, diseñamos cuidadosamente arquitecturas de partículas para incorporar los tres colorantes en la misma partícula con diferentes niveles de carga de colorante para cada colorante. Estas partículas se sintetizaron de manera que los tres colorantes se añadieron capa por capa con el colorante TMRm (verde) en el núcleo seguido por el conjugado de colorante Cy5m (rojo) en una envuelta interna, 20 seguido por el conjugado de colorante DACm (azul) añadido como capa de colorante final (ver partícula central en la Figura 1a). Los fluoróforos orgánicos tienen espectros de absorción y emisión relativamente amplios. Dependiendo de la proximidad espectral y espacial de los diversos colorantes en nuestras partículas, se espera que ocurra la transferencia de energía de resonancia de Förster. Dicha transferencia de energía no radiactiva es el resultado de la superposición espectral entre la emisión de un colorante donador con el espectro de absorción de un colorante 25 aceptor. La eficiencia de la transferencia de energía entre dos colorantes está determinada por el radio de Förster, que es la distancia a la cual se produce una transferencia de energía eficiente del 50 % entre el donador y el aceptor. El radio de Förster calculado para el par DACm-TMRm es ~40 Å (4,0 nm), mientras que el del par TMRm-Cy5m es ~45 Å (4,5 nm). Dado que DACm y Cy5m están en los extremos del espectro visible, con 15 Å (1,5 nm), el radio de Förster de este par es el más pequeño. La eficiencia de la transferencia de energía cae drásticamente, como $1/r^6$, con la distancia de separación, r , entre moléculas de donador y de aceptor. Con el fin de suprimir efectivamente la transferencia de energía, las capas de colorante TMRm y Cy5m en nuestras partículas se separaron mediante una envuelta de sílice de 10-12 nm de espesor (por ejemplo, véase Figura 2f). Para partículas que no contienen colorante Cy5m, se hizo crecer un espesor de envuelta de sílice de 10-12 nm en TMRm que contenía núcleos de partículas antes de la adición de colorante DACm (por ejemplo, véase Figura 2g). Para la 35 primera adición de la capa de colorante DACm a partículas que contienen TMRm y Cy5m, primero se hizo crecer una envuelta de sílice pura de 6-8 nm de espesor (por ejemplo, véase Figura 2i). Por lo tanto, las capas de colorante de diferentes colores se separaron espacialmente con capas de sílice lo suficientemente gruesas para esperar una supresión efectiva de la transferencia de energía.

40 **[0067]** Dado que TMRm fue el colorante elegido para que estuviera en el centro, para mantener la consistencia en la síntesis de diferentes puntos mcC , se sintetizaron un gran lote de partículas de TMRm cargadas con colorante medio y alto. El siguiente paso para obtener puntos C de dos colores fue hacer crecer una envuelta de separación de sílice de 10-12 nm de espesor en estas nanopartículas, seguido de la adición de un conjugado de colorante Cy5m (Figura 2f). Después de añadir una envuelta final de sílice, esto representaba las partículas con 45 cargas de colorante Cy5m (mR) medias. Después de esta etapa, se añadieron dos capas adicionales de colorante Cy5m más sus envueltas de sílice para obtener partículas cargadas con colorante Cy5m (hR) alto. La reducción de capas adicionales para llegar a altas cargas de colorante en los puntos C *multicolor* más grandes se deben a su mayor tamaño en relación con los puntos C de un solo color que proporcionan más área de superficie por partícula para un añadido de colorante adicional. Las síntesis que siguen a estos protocolos proporcionaron los siguientes 50 cuatro puntos C de dos colores con cero colorantes DACm por partícula: mGmR, mGhR, hGmR y hGhR. Para obtener partículas de dos colores con cero colorantes Cy5m por partícula, se añadió conjugado de colorante DACm a las partículas mG y hG con una envuelta de separación de sílice de 10-12 nm de espesor para separar las capas de colorante TMRm y DACm (Figura 2g). Esto representaba las partículas con cargas de colorante DACm (mB) medias. Se añadieron tres capas adicionales de colorante DACm y sus envueltas de sílice a las partículas de mGmB 55 y hGmB para obtener altas cargas de colorante DACm (hB). Las síntesis que siguen a estos protocolos proporcionaron los siguientes cuatro puntos C de dos colores con cero colorantes DACm por partícula: mGmB, mGhB, hGmB y hGhB.

[0068] Los puntos C de dos colores con cero colorantes TMRm por partícula se sintetizaron utilizando 60 partículas de núcleo-envuelta Cy5m como plantilla (Figura 2h). Para ello, se sintetizó un gran lote de partículas dopadas con Cy5m medias, que se dividió en dos porciones, dejando un lote como partículas con carga de colorante Cy5m (mR), mientras que al otro lote se añadieron tres capas alternas de colorante Cy5m y de envuelta de sílice para obtener partículas cargadas con colorante Cy5m (hR) (Figura 2d). Se hizo crecer una envuelta de separación de sílice de 6-8 nm de espesor en estas nanopartículas de mR/hR, seguido de la adición de un conjugado de 65 colorante DACm (Figura 2h). Junto con una envuelta de sílice final, esto representaba las partículas con cargas de

colorante DACm (mB) medias. Posteriormente, se añadieron tres capas alternas de colorante DACm y de envuelta de sílice para obtener altas cargas de colorante DACm (hB). Las síntesis que siguieron a estos protocolos proporcionaron los últimos cuatro puntos C de dos colores con cero colorantes TMRm por partícula: mRmB, mRhB, hRmB y hRhB.

5

[0069] Finalmente, para obtener partículas de tres colores con los tres colorantes incorporados, se hizo crecer una envuelta de sílice de 6-8 nm de espesor en mGmR, mGhR, hGmR y hGhR, seguido de la adición de una capa de colorante DACm con envuelta de sílice. A las partículas de mGmRmB, mGhRmB, hGmRmB y hGhRmB resultantes se le añadieron tres capas adicionales de colorante DACm y envuelta de sílice para obtener partículas DACm (hB) dopadas con alto colorante (Figura 2i). Las síntesis que siguen a estos protocolos proporcionaron los siguientes ocho puntos *mcC* de tres colores: mGmRmB, hGmRmB, mGhRmB, hGhRmB, mGmRhB, hGmRhB, mGhRhB y hGhRhB.

[0070] La capacidad de ajustar con precisión los números de colorante en estas nanopartículas de sílice fluorescente multicolor conlleva una considerable complejidad arquitectónica. Por ejemplo, los puntos C de tres colores con altas cargas de colorante para TMRm, Cy5m y DACm (hGhRhB) contienen cuatro capas de colorante TMRm y cuatro envueltas de sílice añadidas a la partícula núcleo-envuelta cargada con colorante TMRm medio (que suma hasta nueve capas alrededor del núcleo TMRm), seguido de tres capas de envuelta de colorante y tres envueltas de sílice para obtener la alta carga de colorante Cy5m, seguidos de cuatro capas de colorante y cuatro envueltas de sílice para obtener la alta carga de colorante DACm. Todas las partículas finalmente se recubrieron en la superficie con una capa de polietilenglicol (PEG) para proporcionar estabilización estérica en soluciones tampón y hacerlas más biocompatibles. El resultado es una arquitectura tipo cebolla con 24 capas distintas (incluida la capa PEG) alrededor de un núcleo teñido, de las cuales 11 son capas de colorante y 12 son capas de envuelta de sílice pura. Sobre la base de las diversas combinaciones de colorante por partícula, se sintetizaron 26 partículas distinguibles espectroscópicamente como se muestra en la Figura 1. La Figura 1a muestra representaciones en color de estas 26 partículas ensambladas de manera que reflejan las vías de síntesis descritas anteriormente. La Figura 1b representa una foto de las 26 partículas en soluciones acuosas en cubetas bajo luz ambiental. Las cubetas se organizan de acuerdo con las cargas de colorante TMRm verde, con partículas que no contienen carga de colorante TMRm medio y alto que se encuentran en las filas inferior, media y superior, respectivamente (véase Figura 4b para asignaciones específicas). Para comparación, la 27ª cubeta en la parte inferior izquierda de la Figura 1b está llena con nanopartículas de sílice PEGilada no teñidas.

[0071] Sección experimental. Productos químicos y materiales. Para llevar a cabo la síntesis de partículas, todos los productos químicos se utilizaron como se recibieron. El tetraetoxisilano (TEOS, $\geq 99\%$, GC) y el amoniaco en etanol (2,0 M) se compraron a Sigma Aldrich. Se usó (3-mercaptopropil)-trimetoxisilano (MPTMS, $> 96\%$ de pureza, Gelest Inc.) como agente de enlace de conjugación para la incorporación de colorante en nanopartículas de sílice. Los colorantes utilizados para la síntesis de nanopartículas fueron Cy5-maleimida (Cy5m, GE Healthcare Life Sciences), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMRm, Life Technologies) y N-(7-dimetilamino-4-metilcumarina-3-il) maleimida (DACm, Anaspec, Inc.). Los colorantes se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, anhidro $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich). El polietilenglicol terminado en etoxi-silano (mPEG-Silano, masa molar ~ 5000 g/mol) se adquirió de Layson Bio. Las reacciones se llevaron a cabo en etanol (prueba 200, Pharmco-Aaper) y agua desionizada (agua desionizada, $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, pureza, sistema Millipore Milli-Q). Las partículas se dializaron utilizando un tubo de membrana de diálisis Snakeskin de 10.000 de corte de peso molecular (MWCO) (Pierce) y se filtraron con filtros de jeringa PTFE de $0,2 \mu\text{m}$ (Fisher Scientific). Las partículas se transfirieron a un tampón de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS sin calcio y magnesio, Life Sciences) para realizar mediciones celulares utilizando el dispositivo centrífugo Macrosep® Advance, con un MWCO de 30.000 (Pall Corporation). Se añadió azida sódica (BioUltra, $\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich) a las partículas en solución tampón para actuar como biocida. Para las imágenes celulares, las nanopartículas se sometieron a electroporación usando Gene Pulser X (Bio-Rad). La superficie de las células se marcó con la subunidad B de la toxina del cólera Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

50

[0072] Síntesis de nanopartículas. Conjugación de colorante. El derivado de maleimida de los colorantes TMRm (2,6 mM en DMSO), Cy5m (1,26 mM en DMSO) y DACm (3,4 mM en DMSO) se disolvió en DMSO en una campana con atmósfera de nitrógeno durante 15 horas. Para las síntesis de nanopartículas, los colorantes se conjugaron con MPTMS en una proporción molar de colorante a silano de 1:25 en la campana durante 10-12 horas. Se utilizaron concentraciones de 10×10^{-5} M/4,0 $\times 10^{-5}$ M/45 $\times 10^{-5}$ M para los conjugados de colorante TMRm/Cy5m/DACm, respectivamente.

[0073] Síntesis de puntos C de un solo color con cargas de colorante medio y alto. Síntesis de nanopartículas cargadas con TMRm medio y alto. A 10 ml de solución de etanol que contenía 0,88 M de agua desionizada y 0,2 M de amoniaco en etanol, se le añadieron $1,3 \times 10^{-5}$ M de conjugado de TMRm y se dejó agitar durante 15 minutos. A esta solución se le añadieron 0,055 M de TEOS y la reacción se dejó agitar durante 12 horas. A esta solución se le añadieron gota a gota 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de $1 \mu\text{l}$ por ml de volumen de reacción cada 30 minutos, dando como resultado partículas cargadas con TMRm medio (mG).

[0074] Para partículas cargadas con TMRm alto (hG), se añadieron 2×10^{-5} M de conjugado de TMRm a 5 ml

65

de solución de reacción mG y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de la adición de 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l/ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición adicional de la capa de colorante TMRm-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia se repitió un total de cuatro veces para obtener partículas de hG.

5

[0075] Síntesis de nanopartículas con Cy5m medio y alto. A 10 ml de solución de etanol que contenía 0,88 M de agua desionizada y 0,2 M de amoníaco en etanol, se le añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M y se dejó agitar durante 15 minutos. A esta solución se le añadieron 0,055 M de TEOS y la reacción se dejó agitar durante 12 horas. A esta solución se le añadieron gota a gota 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos, dando como resultado partículas cargadas con Cy5m medio (mR).

10

[0076] Para partículas con alta carga de Cy5m (hR), se añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M a 5 ml de solución de reacción mR y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de la adición de 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición de la capa de colorante Cy5m-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia se repitió un total de tres veces para obtener partículas hR.

15

[0077] Síntesis de nanopartículas DACm media y alta. A 10 ml de solución de etanol que contenía 0,88 M de agua desionizada y 0,2 M de amoníaco en etanol, se le añadieron 5×10^{-5} M de conjugado de colorante DACm y se dejó agitar durante 15 minutos. A esta solución se le añadieron 0,055 M de TEOS puro y la reacción se dejó agitar durante 12 horas. A esta solución se le añadieron gota a gota 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos, dando como resultado partículas cargadas con DACm medio (mB).

20

[0078] A 5 ml de soluciones de partículas mB, se le añadieron 5 ml de etanol para sintetizar partículas cargadas con DACm alta (hB). Las concentraciones de agua desionizada y amoníaco en etanol se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente. Se añadió conjugado de colorante DACm 9×10^{-5} M a la solución de reacción de 10 ml y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición adicional de la capa de colorante DACm-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia se repitió un total de cuatro veces para obtener soluciones de partículas de hB.

30

[0079] Síntesis de puntos C multicolor (puntos mcC). Síntesis de la envuelta de sílice sobre partículas cargadas con TMRm medio y alto: Las partículas cargadas con TMRm medio (mG) se sintetizaron escalando la solución de reacción hasta 100 ml. Se añadió conjugado de colorante TMRm $1,3 \times 10^{-5}$ M a 100 ml de etanol que contenía agua desionizada 0,88 M y amoníaco 0,2 M en etanol y se dejó agitar durante 15 minutos, seguido de 0,055 M de TEOS puro y se dejó agitar durante 12 horas. A esta solución se le añadieron gota a gota 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta de sílice. Después de la síntesis de partículas mG, la solución se separó en dos matraces de fondo redondo con 50 ml cada uno. A una de las soluciones de 50 ml de partículas mG, se le añadió conjugado de colorante TMRm 2×10^{-5} M y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de la adición de 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición adicional de la capa de colorante TMRm-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia se repitió un total de cuatro veces para obtener partículas con TMRm alto (hG).

40

[0080] A cada una de las soluciones de 50 ml de mG y hG, se le añadió TEOS 2,6 M puro a una velocidad de 2 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para obtener una envuelta de sílice de 10-12 nm de espesor antes de llevar a cabo la síntesis de partículas de dos colores.

45

[0081] Síntesis de la envuelta de sílice sobre partículas cargadas con Cy5m medio y alto. Las partículas cargadas con Cy5m medio (mR) se sintetizaron escalando a un sistema de reacción de 30 ml. Se añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M a una solución de etanol de 30 ml que contenía agua desionizada 0,88 M y amoníaco 0,2 M en etanol y se dejó agitar durante 15 minutos, seguido de 0,055 M de TEOS puro y la reacción se dejó agitar durante 12 horas. A esta solución se le añadieron gota a gota 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta de sílice. La solución de partículas mR se separó en dos matraces de fondo redondo con 15 ml cada uno. A una de las soluciones de 15 ml de partículas mR, se le añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de la adición de 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición de la capa de colorante Cy5m-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia se repitió un total de tres veces para obtener partículas cargadas con Cy5m alto (hR).

55

60

[0082] A cada una de las soluciones de 15 ml de mR y hR, se le añadió TEOS puro 1,8 M a una velocidad de 2 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para obtener una envuelta con un espesor de 6-8 nm.

[0083] Síntesis de puntos C de dos colores. Adición de conjugado de colorante Cy5m a partículas de TMRm medias y altas. Para sintetizar partículas con colorante Cy5m como segunda capa, se tomaron 30 ml de soluciones

65

de partículas mG y hG con una envuelta de sílice de 10-12 nm de espesor en dos matraces separados de fondo redondo. Para la carga de Cy5m media, se añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M a cada uno de los matraces de reacción que contenían 30 ml de soluciones de partículas mG y hG y se dejó agitar durante 8 horas. A esta solución de reacción se le añadió gota a gota 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta delgada de sílice. Se retiraron 15 ml de cada solución de reacción y se reservaron como soluciones de partículas mGmR y hGmR. Para una alta carga de Cy5m, se añadió conjugado de colorante Cy5m 1×10^{-5} M a cada uno de las soluciones de reacción de 15 ml de mGmR y hGmR y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de la adición de 0,105 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición de la capa de colorante Cy5m-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia de adición de la capa de colorante Cy5m-envuelta de sílice TEOS alterna se llevó a cabo un total de dos veces para obtener soluciones de partículas con mGhR y hGhR.

[0084] Adición de conjugado de colorante DACm a partículas de TMRm medias y altas. Para sintetizar partículas con DACm como segunda capa de colorante, se tomaron 10 ml de las soluciones de partículas TMRm medio y alto con envuelta de sílice de 10-12 nm de espesor en dos matraces de fondo redondo separados (de la sección 1.3.a).

[0085] Para una carga de DACm media, se añadió 5×10^{-5} M de conjugado de colorante DACm a cada uno de los matraces de reacción que contenían 10 ml de soluciones de partículas mG y hG y la solución de reacción se dejó agitar durante 8 horas. Se añadió una envuelta delgada de sílice a la reacción mediante la adición gota a gota de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta de sílice. Se separaron 5 ml de las soluciones de reacción como soluciones de partículas mGmB y hGmB.

[0086] Para una alta carga de DACm, se añadieron 5 ml de etanol a 5 ml de soluciones de partículas de mGmB y hGmB de dos colores. Las concentraciones de agua desionizada y amoníaco en etanol se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente. Se añadió conjugado de colorante DACm 9×10^{-5} M a la solución de reacción de 10 ml y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición de la capa de colorante-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia de adición de la capa de colorante DACm-envuelta de sílice TEOS alterna se llevó a cabo un total de tres veces para obtener partículas cargadas con DACm alto como soluciones de partículas mGhB y hGhB.

[0087] Adición de conjugado de colorante DACm a partículas de Cy5m medias y altas. Para sintetizar partículas con DACm como segunda capa de colorante, se tomaron 10 ml de las soluciones de partículas mR y hR con envuelta de sílice de 6-8 nm de espesor en dos matraces de fondo redondo separados (de la sección 1.3.b).

[0088] Para una carga de DACm media, se añadió 5×10^{-5} M de conjugado de colorante DACm a cada uno de los matraces de reacción que contenían 10 ml de soluciones de partículas de mR y hR y la disolución de reacción se dejó agitar durante 8 horas. Se añadió una envuelta delgada de sílice a la reacción mediante la adición gota a gota de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta de sílice. Se separaron 5 ml de las soluciones de reacción como soluciones de partículas mRmB y hRmB.

[0089] Para una alta carga de DACm, se añadieron 5 ml de etanol a 5 ml de soluciones de partículas de mRmB y hRmB de dos colores. Las concentraciones de agua desionizada y amoníaco en etanol se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente. Se añadió conjugado de colorante DACm 9×10^{-5} M a la solución de reacción de 10 ml y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por ml de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición de la capa de colorante-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia de adición de la capa de colorante DACm-envuelta de sílice TEOS alterna se llevó a cabo un total de tres veces para obtener partículas cargadas con DACm alto como soluciones de partículas de mRhB y hRhB.

[0090] Síntesis de puntos C de tres colores. Síntesis de la envuelta de sílice en partículas de dos colores que contienen TMRm y Cy5m. A 10 ml de mGmR, mGhR, hGmR y hGhR como se menciona en la sección 1.3.c., se le añadieron 1,8 M de TEOS puro a una velocidad de 2 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos para obtener una envuelta que tiene 6-8 nm de espesor. Se tomaron 10 ml de solución de cada una de las partículas de dos colores que contenían TMRm y Cy5m en matraces separados de fondo redondo. Las concentraciones de agua desionizada y amoníaco se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente.

[0091] Adición de conjugado de colorante DACm a partículas de dos colores cargadas con TMRm y Cy5m. Para una carga de DACm media, se añadieron 5×10^{-5} M de conjugado de colorante DACm a cada uno de los matraces de reacción que contenían 10 ml de soluciones de partículas de mGmR, mGhR, hGmR y hGhR y se dejaron agitar durante 8 horas. Se añadió una envuelta delgada de sílice a la reacción mediante la adición gota a gota de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos para formar una envuelta de sílice. Se separaron 5 ml de las soluciones de reacción como partículas de mGmRmB,

mGhRmB, hGmRmB y hGhRmB.

[0092] Para una alta carga de DACm, se añadieron 5 ml de etanol a 5 ml de soluciones de partículas de tres colores que contienen partículas cargadas con DACm medio. Las concentraciones de agua desionizada y amoníaco en etanol se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente. Se añadió conjugado de colorante DACm 9×10^{-5} M a la solución de reacción de 10 ml y se dejó agitar durante 8 horas, seguido de 0,15 M de TEOS puro a una velocidad de 1 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos. La solución se dejó agitar durante 4 horas antes de la adición adicional de la capa de colorante DACm-envuelta de sílice TEOS. Esta secuencia de adición de la capa de colorante DACm-envuelta de sílice TEOS alterna se realizó tres veces para obtener partículas cargadas con DACm alto: partículas de mGmRhB, mGhRhB, hGmRhB y hGhRhB.

[0093] Crecimiento de la envuelta de sílice en nanopartículas antes de la PEGilación. Se hizo crecer una envuelta de sílice sobre todas las partículas mediante la adición gota a gota de TEOS para obtener el mismo tamaño para todas las nanopartículas. Para todas las soluciones, las concentraciones de agua desionizada y amoníaco en etanol se mantuvieron a 0,88 M y 0,2 M, respectivamente.

[0094] A 10 ml de solución que contenía partículas DACm medio (sección 1.1.b)/alto (sección 1.1.c), se le añadieron 4,8 M de TEOS y a partículas TMRm medio/alto (sección 1.3.a), se le añadió 2,7 M de TEOS a una tasa de 2 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos. A 5 ml de soluciones de partículas Cy5m medias y altas (sección 1.3.b), se le añadieron 3,6 M de TEOS a una velocidad de 2 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos.

[0095] A 5 ml de las soluciones de partículas de dos colores que contienen G-R (sección 1.3.c)/G-B (sección 1.3.d)/R-B (sección 1.3.e), se le añadieron 2,6 M de TEOS/2,6 M de TEOS/3,3 M de TEOS, respectivamente, a una velocidad de 2 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos.

[0096] A 5 ml de las soluciones de partículas de tres colores que contienen solo partículas de DACm medio (sección 1.3 f), se le añadieron 0,7 M de TEOS adicionales a una velocidad de 2 μ l por mililitro de volumen de reacción cada 30 minutos. No se añadió TEOS adicional a las partículas de tres colores que contienen DACm alto.

[0097] PEGilación de nanopartículas de puntos *mcC*. 1,0 litro de agua desionizada se ajustó a pH 5 añadiendo ácido clorhídrico 2,0 M (ac.) usando un pH-metro (VWR International Symphony, SB70P). Para llevar a cabo la PEGilación, todas las partículas se crecieron hasta el mismo tamaño que se menciona en la sección de síntesis de partículas. Se preparó una solución acuosa de PEG-silano 0,08 M (mPEG-silano, MW 5k) disolviendo el PEG-silano en agua desionizada a pH 5. Se tomó 1 ml de esta solución en un vial y se añadieron 2 ml de etanol y la solución se dejó agitar durante unos 10 minutos. Se añadieron gota a gota 1,0 ml de la solución de partículas tal como se preparó a 3 ml de mPEG-silano disuelto en la mezcla de etanol-agua, y a continuación la solución se dejó en agitación en un baño de aceite mantenido a 70 °C durante 24 horas.

[0098] Después de la PEGilación, las partículas se dializaron en agua desionizada utilizando un tubo de membrana de diálisis de 10.000 de MWCO y se filtraron con filtros de jeringa de PTFE de 0,2 μ m y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente para una caracterización adicional.

[0099] Para las mediciones de imágenes celulares, las partículas se transfirieron a una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) utilizando el dispositivo centrífugo de avance Macrosep®, con un MWCO de 30.000. Después de la diálisis, se añadieron 5 ml de la solución de nanopartículas PEGiladas a 5 ml de solución tampón y se centrifugaron durante 30 minutos a 3500 rpm. Este proceso se repitió tres veces con solución tampón. Como etapa final, las partículas se calentaron a 75 °C durante 15 minutos para pasteurizar la solución, seguido de la adición de una solución acuosa de azida de sodio al 0,1 % (p/v).

[0100] Caracterización de nanopartículas cargadas con colorante medio y alto. Las fotografías de la imagen de luz reflejada de las 27 cubetas se tomaron bajo luz ambiental. La imagen fotográfica se dispuso como partículas sin colorante TMRm (fila inferior), partículas con ~5 colorantes TMRm (fila central) y partículas con ~20 colorantes en el núcleo (fila superior). Cada fila fue tomada por separado utilizando los ajustes idénticos de ISO 100 y 1/20ª de una segunda exposición en f/4,5 en una cámara Canon EOS Digital Rebel 400 D, fija en un trípode y a continuación se apilan en la disposición como se ha mencionado usando Adobe Photoshop.

[0101] Espectrometría y espectrofluorometría. Las partículas se emparejaron en absorbancia al colorante libre respectivo diluyendo las partículas o el colorante libre con agua desionizada en una cubeta de cuarzo usando un espectrómetro Varian Cary 5000 (Varian, Palo Alto, CA). Se utilizaron los coeficientes de extinción de DACm ($25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), TMRm ($98.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y Cy5m ($250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para cuantificar la concentración de colorantes en las muestras. Las mediciones de fluorescencia de las muestras emparejadas en absorbancia se realizaron en un espectrofluorómetro Quantmaster de Photon Technologies International (PTI, Birmingham, NJ).

[0102] Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Para cuantificar el brillo por partícula, el radio

hidrodinámico y la concentración de partículas; las muestras emparejadas en absorbancia se midieron en Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia multiespectral (FCS) de construcción propia configurada usando fuentes de excitación láser en estado sólido de 405 nm (para partículas DACm), HeNe 535 nm (para partículas TMRm) y HeNe 633 nm (para partículas Cy5m). El haz de excitación se reflejó a través de un objetivo de inmersión en agua de 60X Olympus UPlan SAPO, 1,2NA. Se puso un volumen de 200 µl a concentraciones nanomolares de la muestra fluorescente en una placa de micropocillos con un fondo de cubreobjetos del n.º 1,5 (MatTek P35G-1.5-10-C). La luz emitida de la muestra se recogió por el objetivo, se pasó a través del dicroico de excitación/emisión y se reflejó en una lente de enfoque mediante el espejo de emisión. La luz de emisión se enfocó a través de un filtro de paso largo (Chroma) para eliminar cualquier luz de excitación y recolectar solo los fotones de emisión. Se usó un agujero de 50 micrómetros para limitar axialmente el volumen efectivo del cual se recogió la fluorescencia. La luz se pasó luego a través de una segunda lente hacia un fotodiodo de avalancha (SPCM 14, Perkin Elmer). La fotocorriente resultante se autocorrelacionó digitalmente con una tarjeta correlacionadora (Correlator.com).

[0103] Los datos se ajustaron utilizando una función de autocorrelación corregida por tripletes, como se muestra en la forma analítica en la ecuación 1.

$$G(\tau) = 1 + \left(\frac{1}{N}\right) \times \left(1 - A + A \times \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right)\right) \times \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}\right) \times \left(\frac{1}{\left(\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D} s^2}\right)}\right)$$

Ecuación 1

A es la amplitud de la corrección del triplete, τ_R es el tiempo de difusión aparente de una molécula/partícula de colorante en el estado de triplete, τ_D es el tiempo de difusión de la molécula/partícula en el estado de singlete y N es el número de moléculas en el volumen focal. El parámetro de factor de estructura 's' describe el volumen focal gaussiano tridimensional en términos de la relación del eje axial al radial y se calcula a partir de las mediciones del colorante patrón con un coeficiente de difusión conocido. Para obtener el factor de estructura 's' para las líneas láser de 405 nm, 535 nm y 633 nm, los colorantes utilizados fueron N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-il)-maleimida, tetrametilrodamin-5-maleimida y Alexa Fluor 647-maleimida, respectivamente.

[0104] Imagen celular. Cultivo de células. Las células RBL-2H3 se mantuvieron en cultivo en monocapa en MEM complementado con FBS al 20 % (Atlanta Biologicals) y 10 µg/ml de sulfato de gentamicina como se ha descrito anteriormente.

[0105] Suministro de nanopartículas a las células mediante electroporación. Las células se recogieron 3-5 días después del paso y 1×10^6 /ml de células RBL-2H3 se sometieron a electroporación en 0,5 ml de tampón de electroporación frío (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, 1 mg/ml de glucosa, HEPES 20 mM (pH 7,4) con 200 µl de nanopartículas suspendidas en tampón DPBS (5-10 µM)). La electroporación de onda cuadrada se usó con ajustes de 280 V, longitud de pulso de 10,0 ms, 4 pulsos e intervalos de pulso de 0,1 ms usando Gene Pulser X (Bio-Rad). Este procedimiento se repitió para cada una de las 26 nanopartículas. Las células electroporadas se dejaron recuperar durante aproximadamente una hora antes de fijarse con un 4 % de paraformaldehído y un 0,1 % de glutaraldehído. Las células fijadas se marcaron luego con 0,5 µg/ml de la subunidad B de la toxina del cólera Alexa 488 durante 15 minutos a temperatura ambiente para teñir la membrana celular.

[0106] Imagen confocal. Se tomaron imágenes de las células que contienen nanopartículas en un microscopio confocal Zeiss 510 LSM utilizando un objetivo de agua 40X (NA = 1,2). Las imágenes se tomaron secuencialmente utilizando las líneas de láser 405, 488, 561, 633 nm para la excitación y los grupos de filtros 420-480 (Band Pass, BP), 575 (Long Pass, LP), 505-550 (BP) y 650 (LP) para recoger la luz emitida. Se usó ImageJ para dividir las imágenes en verde, rojo, azul, amarillo y campo claro. Las imágenes superpuestas se concatenaron en ImageJ, conteniendo solo imágenes de los cuatro canales de emisión. Las partículas se identificaron en función de la co-localización de las imágenes en rojo, verde y azul.

[0107] Todas las partículas resultantes se PEGilaron utilizando poli (etilenglicol)-silano de masa molar 5k antes de realizar cualquier medición espectroscópica (ver sección experimental). Dado que la descripción de la caracterización espectroscópica completa de las 26 especies de partículas está más allá del alcance de este documento, en el presente documento solo se proporcionan ejemplos representativos de puntos *mcC* específicos, junto con un resumen de las mediciones espectroscópicas de los niveles de brillo de todos los colores en todas las 26 partículas, véanse Figuras 3 y 4. Con el fin de caracterizar las nanopartículas y comprender sus propiedades fluorescentes, las primeras soluciones acuosas de las nanopartículas de un solo color cargadas con colorante DACm, TMRm y Cy5m medias y altas se adaptaron a las de los respectivos colorantes libres originales. La Figura 3a-c muestra la absorbancia resultante y los espectros de emisión. No se observaron cambios espectrales significativos entre los colorantes libres y las partículas, lo que sugiere que la estructura electrónica de los colorantes se conservó en la encapsulación. Las nanopartículas dopadas con colorante DACm, TMRm y Cy5m medias y altas

muestran una mejora de ~6,0, ~1,3 y ~1,5, respectivamente, en relación con el colorante libre. Para los tres sistemas, la encapsulación del colorante en el rígido ambiente de sílice da lugar a importantes mejoras de brillo en relación con el colorante libre en solución acuosa, lo que concuerda con estudios anteriores y sugiere que en estas condiciones los colorantes no exhiben una extinción de la fluorescencia, incluso a los altos niveles de carga 5 demostrados en el presente documento.

[0108] El número de colorantes incorporados en las partículas se cuantificó utilizando espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) en combinación con mediciones de absorbancia. La configuración experimental de FCS se equipó para excitar los colorantes a $\lambda = 405$ nm, 543 nm y 633 nm, respectivamente (ver sección 10 experimental). La FCS es una técnica de espectroscopía basada en la difusión que utiliza la fluorescencia del grupo difusor para generar una curva de autocorrelación. Similar a la dispersión dinámica de la luz (DLS), la escala de tiempo en la que se descompone la correlación se puede relacionar con un coeficiente de difusión que a su vez se puede relacionar con un radio/diámetro hidrodinámico del resto de difusión. La Figura 3d-f compara las curvas de autocorrelación de los tres colorantes parentales (líneas continuas) con las de los seis puntos C de un solo color 15 (mG, mR y mB, símbolos abiertos; hG, hR y hB, símbolos cerrados) derivados de los tres colorantes/colores a cargas de colorante medias y altas, respectivamente. Las nanopartículas incorporadas al colorante se difunden mucho más lentamente que los colorantes libres originales, lo que confirma un aumento significativo en el radio hidrodinámico del colorante libre a la partícula. Además, las partículas que contienen niveles de colorante medio y alto muestran curvas de correlación muy similares que revelan el alto control sobre el tamaño de partícula objetivo 20 final. El análisis de las curvas de autocorrelación para los sistemas DACm, TMRm y Cy5m revela diámetros de 1,3 nm, 1,4 nm y 1,4 nm, respectivamente, para los colorantes libres, así como de 40 nm, 45 nm y 35 nm, respectivamente, para nanopartículas cargadas con colorante medio y alto.

[0109] A partir de la amplitud, $G(0)$, de la curva de autocorrelación de FCS, se puede obtener el número de 25 restos fluorescentes en el volumen focal a partir del cual se puede deducir su concentración. Usando esta concentración de partículas junto con la concentración de colorantes obtenida de las mediciones de absorbancia, se puede calcular el número de colorantes por partícula. Esta es una información que permitió evaluaciones cuantitativas de colorantes por número de partículas en la síntesis de puntos C *multicolores* (puntos *mcC*) y se usó como retroalimentación para optimizar los protocolos de síntesis para lograr los niveles de control necesarios 30 descritos en el presente documento. Basándonos en estas mediciones, calculamos que el número de colorantes por partícula para partículas cargadas con colorante medio y alto es de 6/27, 6/22 y 6/24 para TMRm, Cy5m y DACm. Además, a partir del producto de la mejora de la fluorescencia de un colorante encapsulado en la partícula sobre el colorante libre en solución acuosa y el número de colorantes por partícula, se puede calcular un factor de brillo para cada sistema de colorante-partícula. Este factor describe cuán más brillantes son las partículas en relación con un 35 solo colorante libre en solución acuosa. Los factores de brillo respectivos determinados de esta manera fueron: 9,1/35 para las partículas de TMRm media/alta, 9/33 para las partículas de Cy5m media/alta y 36/144 para las partículas de DACm media/alta. Estos resultados sugieren que las partículas deben ser de uno a dos órdenes de magnitud más brillantes que los colorantes libres originales. Además de sus propiedades de multiplexación, estos niveles de brillo muy altos harán que los puntos *mcC* sean muy atractivos para aplicaciones de obtención de 40 bioimágenes. Los factores de brillo calculados pueden compararse con el brillo experimental de los colorantes y partículas medidos por las tasas de recuento de las especies difusoras individuales en el detector óptico FCS. Esto proporciona una medida directa del brillo de los colorantes y partículas libres, respectivamente. La Figura 3g-i muestra los resultados de estas medidas. La Figura 3g muestra que las partículas cargadas con TMRm media/alta son 6,6 ($\pm 0,1$)/32 ($\pm 0,4$) veces más brillantes que el colorante libre TMRm original, mientras que para el sistema 45 Cy5m, la Figura 3h muestra que las partículas cargadas con Cy5m media/alta son 5,3 ($\pm 0,2$)/27,6 ($\pm 0,4$) veces más brillantes que el colorante libre Cy5m original. La Figura 3i compara el brillo para el sistema de partículas DACm y muestra que las partículas cargadas con DACm media/alta son 24 ($\pm 3,0$)/105 (± 10) veces más brillantes que el colorante libre DACm original, respectivamente. Estas mediciones directas del brillo confirman que, como objetivo, los niveles de brillo individuales están separados entre sí por un factor de 4-6. De acuerdo con observaciones 50 similares en estudios anteriores, los factores de brillo calculados sobreestiman sistemáticamente los valores obtenidos de las mediciones de FCS. Esto puede deberse a un error en la determinación de los equivalentes de colorante, que, por ejemplo, no supone ningún cambio en la sección transversal de absorción entre los colorantes libres y encapsulados. También puede deberse al hecho de que las mediciones de FCS se realizaron con luz polarizada, que posiblemente solo excitó los subconjuntos de los colorantes en las partículas, lo que a su vez da 55 lugar a recuentos por partícula más pequeños de lo esperado por el factor de brillo.

[0110] Trabajos previos en nanopartículas multicapa fluorescentes con tamaños > 3 μm revelaron que la intensidad de la fluorescencia de las partículas disminuía al aumentar el número de capas de la envuelta, debido a 60 los cambios en el índice de refracción que causaban la dispersión de la luz emitida. Se verificó si se aplicaba el mismo efecto a las partículas presentes comparando las relaciones del número de colorantes por partícula con el brillo por partícula para partículas cargadas con colorante medio y alto. Nuestros resultados mostraron que para las partículas cargadas con DACm medio y alto, la relación era de 4,0/4,3, para las partículas cargadas con TMRm medio y alto, la relación era de 4,5/4,8, y para las partículas cargadas con Cy5m medio y alto, la relación era de 3,66/3,69. Estos resultados revelan que, a diferencia de los resultados anteriores, nuestro sistema que se mueve de 65 cargas de colorante medio a alto al incorporar capas de sílice adicionales no disminuye la emisión de fluorescencia

relativa.

[0111] La Figura 4a muestra curvas representativas de FCS de partículas específicas que se mueven hacia puntos *mcC* de tres colores que cubren todo el esquema sintético a partir de puntos C de un solo color cargados con colorante TMRm medio/alto (mG, círculos huecos/hG, círculos completos) a través de puntos C de dos colores cargados con colorante Cy5m medio/alto (hGmR, círculos huecos/hGhR, círculos completos) a los puntos *mcC* de tres colores cargados con colorante DACm medio/alto (hGhRmB, círculos huecos/hGhRhB, círculos completos). Todas las partículas en esta gráfica se terminaron usando una etapa de PEGilación, aunque no crecieron hasta el mismo tamaño de ~85 nm. Los resultados indican claramente el aumento en el tamaño de partícula como se refleja en un cambio de las curvas de correlación a tiempos más largos al comenzar desde partículas cargadas con colorante con TMRm medio a partículas que contienen los tres colorantes con cargas de colorante altas. Las curvas de FCS de partículas fluorescentes verdes muestran contribuciones pronunciadas de estados de triplete en tiempos cortos, lo que se explica por el procedimiento de ajuste (ver sección experimental). La síntesis de partículas del núcleo-envuelta cargadas con TMRm media (mG, círculos verdes huecos) dio como resultado partículas de 15 nm ($\pm 0,5$) de diámetro (incluida la capa de PEG). La adición de cuatro capas de colorante TMRm y envuelta de sílice dio como resultado partículas cargadas con colorante TMRm de 28 nm ($\pm 0,6$) de diámetro (incluida la capa de PEG) (hG, círculos verdes sólidos). Cada una de las cuatro capas alternas de colorante y envuelta de sílice contribuyó 1,2-1,5 nm al espesor de la envuelta (o 2,4-3 nm al diámetro de partícula). Las partículas de dos colores con carga de colorante Cy5m media primero tenían una envuelta de sílice de 10 a 12 nm de espesor (aumentando el diámetro de las partículas en 20-24 nm) injertada en las partículas hG de 28 nm de diámetro, seguidas de la adición de un colorante Cy5m y una envuelta de sílice alternos. capa (hGmR, círculos rojos huecos). La comparación de las curvas de autocorrelación para las partículas hG y hGmR revela una gran diferencia en el tamaño de las partículas, ya que la curva hGmR se desplaza significativamente hacia la derecha de la curva hG. El análisis revela un diámetro de 53 nm ($\pm 2,0$) para los puntos C de dos colores. Las partículas con alta carga de colorante Cy5m con dos capas alternas adicionales de colorante Cy5m y envuelta de sílice en la partícula hGmR dieron como resultado puntos C de dos colores de 57 nm ($\pm 2,2$) de diámetro (hGhR, círculos rojos sólidos). Cada colorante Cy5m adicional y la capa de envuelta de sílice aumentaron el espesor de la partícula en ~1,0-1,1 nm (aumentando el diámetro de la partícula en 2,0-2,2 nm). Finalmente, las partículas que contenían el tercer colorante DACm tenían una envuelta separadora de sílice de 6 a 8 nm de espesor (que aumentaba el diámetro de las partículas en 12-16 nm) crecidas en las partículas de hGhR de 57 nm ($\pm 2,2$) seguidas de la adición de una única capa alterna de colorante de DACm y envuelta de sílice, que produce puntos C de tres colores (hGhRmB, círculos azules huecos) con un diámetro de partícula de ~72 nm ($\pm 4,1$). El aumento en el tamaño de partícula es notable cuando se comparan las curvas FCS de hGhR y hGhRmB. La curva final de FCS en la Figura 4a es de puntos C de tres colores con cargas altas de los tres colorantes (hGhRhB, círculos azules sólidos) con tres capas alternas de colorante de DACm y envuelta de sílice adicionales más una capa de superficie de PEG, añadida a las partículas de hGhRmB que dan como resultado un diámetro de partícula final de 85 nm ($\pm 4,6$).

[0112] La ausencia de transferencia de energía entre colorantes de diferente color en la misma partícula, es decir, la eficiencia de la envuelta de sílice pura para suprimir la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), se destaca en la Figura 4b que muestra seis espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de cuatro partículas (hGhRhB, hGhRmB, mGhRhB y hGmRhB) que contienen los tres colorantes/colores. Para los espectros de la izquierda y la derecha (emisión azul y roja, respectivamente), soluciones se emparejaron en absorbancia en el verde, mientras que para los espectros de las soluciones medias (emisión verde) se emparejaron en absorbancia en el rojo. La Figura 4b compara los perfiles de emisión de las excitaciones a 405 nm, 540 nm y 633 nm, respectivamente, de DACm (mB/hB), TMRm (mG/hG) y Cy5m (mR/hR) medios y altos que contienen partículas de tres colores. Las partículas con alta carga de colorante DACm (hGhRhB) eran aproximadamente 3,8 veces más brillantes que con la carga de DACm media (hGhRmB) cuando se excitan a 405 nm. Las partículas con alta carga de colorante TMRm (hGhRhB) eran aproximadamente 3,5 veces más brillantes que con la carga media de TMRm (mGhRhB) cuando se excitaron a 540 nm. En la excitación a 633 nm, las partículas con alta carga de Cy5m (hGhRhB) fueron aproximadamente 4,0 veces más brillantes que con la carga media (hGmRhB). Los niveles de emisión muy diferentes confirman que las partículas que contienen una carga de colorante media y alta para cada color pueden diferenciarse espectroscópicamente. Además, ninguno de los espectros con emisión azul o verde muestra evidencia espectroscópica de FRET. Por ejemplo, en las muestras de excitación de hGhRmB o hGhRhB a 405 nm (en el azul) no hay transferencia de energía significativa de DACm a TMRm o Cy5m a través de la emisión verde o roja, respectivamente. De manera similar, cuando se excitan las partículas de hGhRhB o mGhRhB a 540 nm, no se observa una transferencia de energía significativa de TMRm a Cy5m a través de la emisión roja. Llegamos a la conclusión de que las envueltas de sílice utilizadas para separar espacialmente las capas de diferentes colorantes de color suprimen claramente la FRET que de otro modo se observaría en los espectros.

[0113] La Figura 4c resume los niveles de brillo espectroscópico de todos los colores en las 26 partículas en forma de gráficos de barras colocados de manera idéntica a las cubetas en la Figura 1b llena de soluciones de partículas. Los niveles de brillo se midieron como los respectivos máximos de emisión de fluorescencia para cada color de cada partícula como se ejemplifica en la Figura 4b. La altura de las barras para cada color se normalizó al brillo de las partículas con carga de colorante medio. Al ir de arriba a abajo, en analogía a la foto en la Figura 1b, hemos separado la pantalla en tres familias/filas con un número decreciente de colorantes TMRm verdes (barras

verdes) con ~20 (fila superior), ~5 (fila central) y 0 colorantes (fila inferior) por partícula en el núcleo de las partículas. De estos gráficos de barras, las partículas con alta carga de colorante TMRm eran ~3,5 veces más brillantes que las partículas TMRm cargadas con colorante medio. Al recorrer la figura de izquierda a derecha, comparamos los niveles de brillo de fluorescencia en cada una de estas familias/filas "verdes" para partículas que contienen diferentes cantidades de Cy5m (barras rojas) y colorantes DACm (barras azules). A partir de los resultados, según lo previsto en el diseño (véase más arriba) las partículas con alta carga de colorante Cy5m fueron ~4-4,3 veces más brillantes que las partículas que contienen niveles de colorante Cy5m medio, mientras que las partículas cargadas con DACm alto fueron aproximadamente ~3,8-4,2 veces más brillantes que las partículas cargadas con DACm medio. Los niveles de brillo de partículas medidas como se revela en la Figura 4c para los tres colores de los puntos *mcC* se deben únicamente al número de colorantes de ese color en la partícula. Esto permite predicciones de niveles de brillo basados en protocolos de síntesis y hace que la identificación de códigos de colores específicos sea más manejable.

[0114] Multiplexación biológica en ensamblajes celulares. Tras la caracterización de los puntos *mcC*, se llevó a cabo la multiplexación de fluorescencia para demostrar la obtención de imágenes intracelulares multicolor. Las soluciones celulares individuales se sometieron a electroporación con un tipo de solución de partículas (consulte la sección experimental), y a continuación, las células se mezclaron y se diferenciaron según el esquema de mezcla de colores RGB utilizando imágenes confocales. Se utilizaron mastocitos de leucemia basofílica de rata (RBL-2H3) para estas mediciones y la superficie celular se marcó con la subunidad B de la toxina de Alexa488-Cholera ($\lambda_{abs} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm, una longitud de onda no utilizada en la síntesis del punto *mcC*) para identificar la periferia celular.

[0115] La Figura 5 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de una mezcla de células que contienen partículas hB, hGhB, hGhR y hGhRmB, respectivamente. La Figura 5 (a-d) muestra imágenes de células como se obtuvieron en los canales verde, rojo, azul y amarillo, al excitar las células a 560 nm, 633 nm, 405 nm y 488 nm, respectivamente. Estas imágenes muestran la emisión para cada canal de color correspondiente a los fotones emitidos por cada colorante presente en la nanopartícula. Las células RBL-2H3 muestran autofluorescencia en el canal verde (Figura 5a) y azul (Figura 5b), sin embargo, dado que las partículas son brillantes, la alta relación señal a ruido hace posible identificar nanopartículas internalizadas en las células. La Figura 5e, muestra la imagen superpuesta de los cuatro canales, donde las células etiquetadas con partículas de hB (círculos azules) muestran la emisión solo en el canal azul, sin emisión en el canal verde o rojo, mientras que las células marcadas con hGhRmB (círculo magenta) muestran la emisión en los canales rojo, verde y azul. Las células que contienen partículas de dos colores, hGhB (círculo amarillo) y hGhR (círculo rojo) no muestran ninguna contribución en los canales rojo y azul, respectivamente. La Figura 5f muestra la imagen de campo brillante de las células que muestra que la morfología de estas células RBL-2H3 se mantuvo intacta después de la electroporación, lo que hace posible llevar a cabo la obtención de imágenes celulares. Sobre la base de esta figura, mostramos que los puntos *mcC* están internalizados y, al colocalizar la contribución de emisión de cada canal, las células teñidas con nanopartículas se pueden distinguir entre sí.

[0116] Este ejemplo es la primera demostración de fluorescencia de multiplexación intracelular con la utilización de nanopartículas de sílice multicolor. Los puntos *mcC* brillantes proporcionan una plataforma para diferenciar dianas en función de un simple código de color RGB. Se espera que la funcionalización en nanopartículas de la superficie de estas arquitecturas de partículas capa por capa pueda ser una herramienta poderosa para aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en biología fundamental, señalización celular, biomedicina y cribado celular y farmacéutico de alto rendimiento.

EJEMPLO 2

[0117] El siguiente es un ejemplo que describe el uso de las nanopartículas multicapa que contienen MSF de la presente divulgación en procedimientos de obtención de imágenes.

[0118] Preparación de la muestra. En estos experimentos, cada una de las 26 muestras de células de leucemia basófila de rata (RBL) se transfectó mecánicamente con un único tipo de partícula mediante electroporación de onda cuadrada. Las células se marcaron en la membrana utilizando un conjugado de toxina de cólera y Alexa Fluor® 488. Este cuarto colorante fluorescente espectralmente distinto se eligió para que la membrana celular fluorescente pudiera distinguirse de los puntos *mcC* dentro de las células. Las muestras de una sola partícula se pusieron en placas directamente en portaobjetos de microscopio de vidrio y se fijaron antes de la obtención de imágenes. La mezcla de muestras de células de una sola partícula antes del recubrimiento nos permitió crear muestras de múltiples partículas con un único tipo de puntos *mcC* por célula.

[0119] *Imagen y Análisis.* Se tomaron imágenes de las células utilizando un microscopio láser de barrido confocal Zeiss 710, que permite la detección simultánea de los colorantes Cy5, TMR, DAC y Alexa Fluor® 488. Las imágenes se obtuvieron simultáneamente en un canal "rojo" ($\lambda_{ex} = 633$ nm), un canal "verde" ($\lambda_{ex} = 561$ nm), un canal "azul" ($\lambda_{ex} = 405$ nm) y un canal "amarillo" ($\lambda_{ex} = 488$ nm). Se obtuvieron imágenes individuales de 1680 x 1280 píxeles de 16 bits, cuatro imágenes fluorescentes y una imagen de campo brillante, y se dividieron en secciones de 512 x 512 píxeles. Un mosaico representativo de una imagen de partículas mixtas, que muestra las células RBL

marcadas con Alexa Fluor® 488 que contienen hasta 17 partículas diferentes se muestra en la Figura 6. Las imágenes fluorescentes también se apilaron para mostrar que las células han alcanzado una concentración suficientemente alta de partículas.

5 **[0120]** Se identificaron células individuales utilizando el marcador de membrana celular fluorescente. La fluorescencia de fondo y los agregados celulares se excluyeron mediante análisis de tamaño, por lo que las células se aproximaron como áreas circulares de alta intensidad. Las entidades fluorescentes con un diámetro inferior a 5 μm o superior a 15 μm se consideraron fuera del intervalo de tamaño normal de las células individuales y, por lo tanto, no se analizaron. Los límites de células individuales identificados en esta imagen también se aplicaron a las
10 imágenes del canal RGB correspondientes. En el resto de este análisis solo se utilizaron las intensidades de píxeles en las posiciones en el interior de la célula. Todos los algoritmos de procesamiento de imágenes fueron de construcción propia e implementados usando MATLAB.

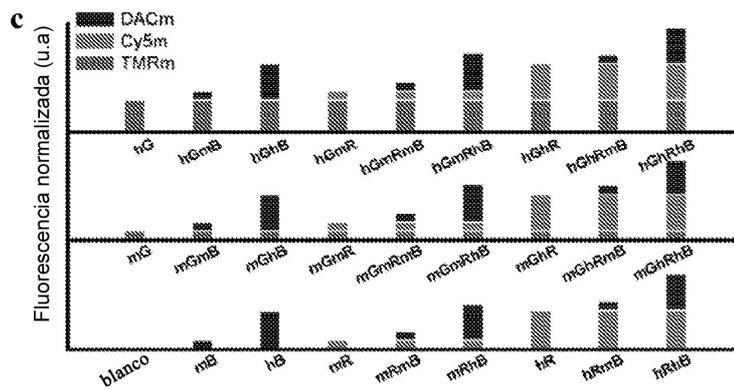
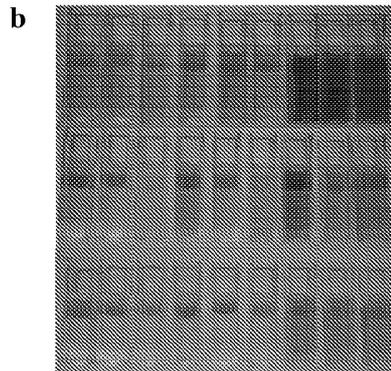
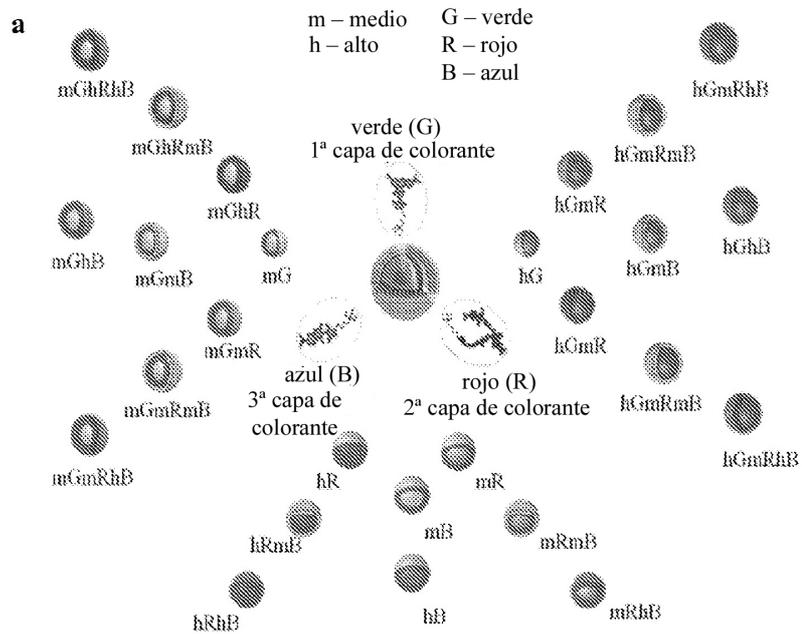
[0121] Se utilizaron imágenes de una sola partícula (1280 x 1280 píxeles) para caracterizar la firma
15 fluorescente del punto *mcC* correspondiente. A las células individuales se les asignaron intensidades medias de rojo, verde y azul, calculadas utilizando el 50 % más brillante de píxeles en cada célula. Los píxeles de baja intensidad se excluyeron de este análisis para minimizar la contribución de los píxeles que contienen pocas o ninguna partícula. Se utilizó el análisis estadístico de las intensidades de píxeles medias rojas, verdes y azules de más de 1000 células para generar umbrales RGB que nos permiten "decodificar" imágenes de múltiples partículas. Las imágenes de
20 múltiples partículas se analizaron célula por célula de acuerdo con los resultados generados anteriormente. Hemos "decodificado" con éxito una imagen de 17 partículas según este procedimiento como prueba de concepto. Se muestra una versión de esta imagen en color falso (1280 x 1280 píxeles) en la Figura 7. En la figura, las células han sido codificadas por colores de acuerdo con el "color" del interior de la nanopartícula.

REIVINDICACIONES

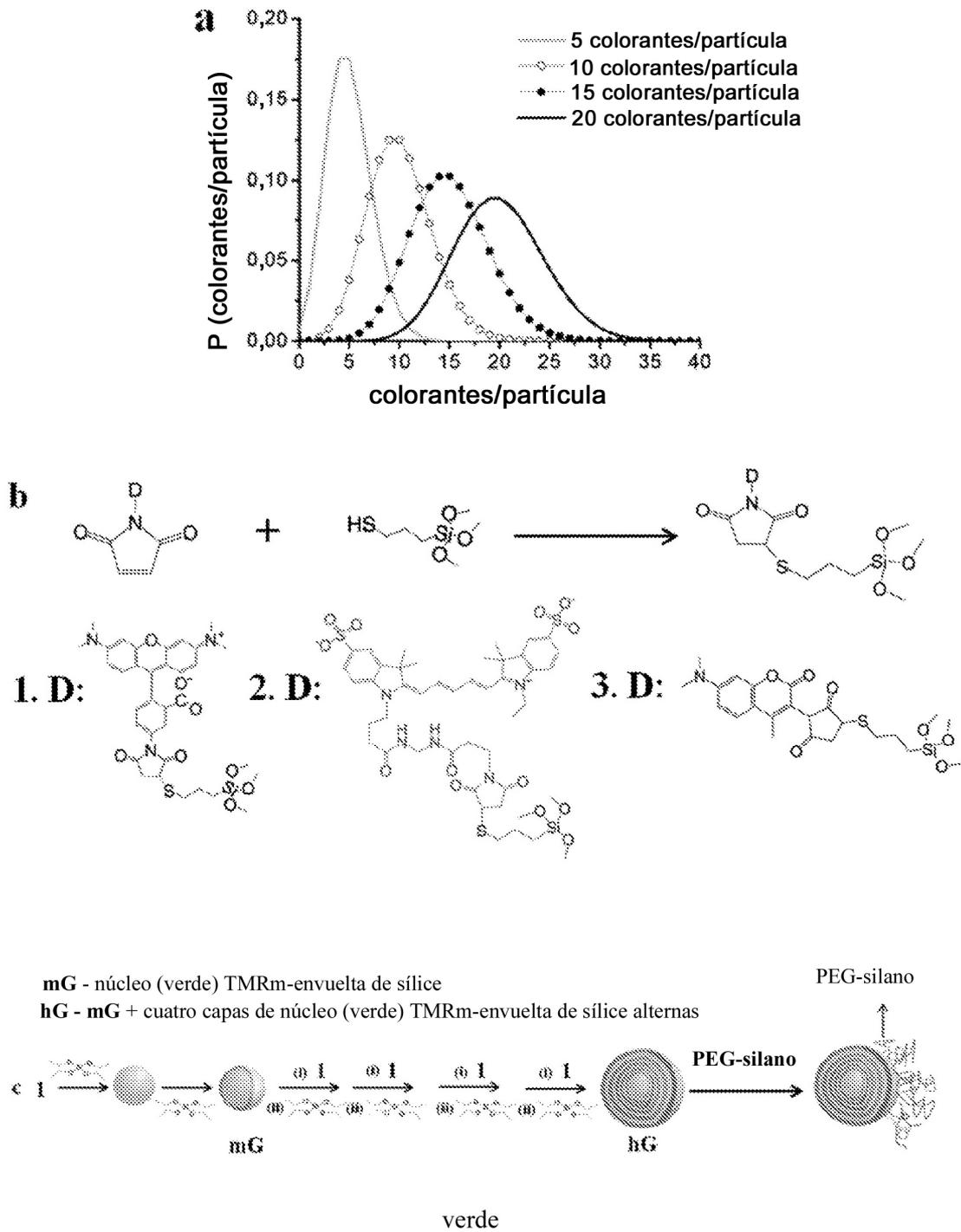
1. Una nanopartícula que comprende:
 - 5 a) un núcleo de sílice que comprende una pluralidad de un material sensible a la fluorescencia (MSF) unido covalentemente a la red de sílice del núcleo;
 - b) de 1 a 100 capas de sílice que contienen MSF, comprendiendo cada capa una pluralidad de MSF unidos covalentemente a la red de sílice de la capa de sílice que contiene MSF;
 - 10 c) una o más capas de sílice sin MSF, en donde una de las capas de sílice sin MSF separa el núcleo de sílice de una de las capas de sílice que contienen MSF y, si está presente, cada par adyacente de las capas de sílice que contienen MSF está separado por una de las capas de sílice sin MSF;
 - d) una capa de sílice sin MSF más externa dispuesta sobre la capa de sílice que contiene MSF más externa; y
 - e) una pluralidad de moléculas de poli(etilenglicol) unidas covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa;

15 en la que cada capa de sílice sin MSF tiene un espesor de 1 nm a 20 nm.
2. La nanopartícula de la reivindicación 1, que comprende además uno o más restos unidos covalentemente a las moléculas de poli(etilenglicol) unidas covalentemente a la superficie exterior de la capa de sílice sin MSF más externa.
3. La nanopartícula de la reivindicación 2, en la que dicho uno o más restos se seleccionan entre proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, aptámeros, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polímeros, moléculas orgánicas pequeñas y combinaciones de los mismos.
- 25 4. La nanopartícula de la reivindicación 3, en la que los ácidos nucleicos se seleccionan entre moléculas de ADN de cadena sencilla, moléculas de ADN de doble cadena, moléculas de ARN de cadena sencilla, moléculas de ARN de doble cadena, moléculas de ADN ramificadas y combinaciones de las mismas.
- 30 5. La nanopartícula de la reivindicación 1, nanopartícula que tiene un diámetro de 5 nm a 500 nm.
6. La nanopartícula de la reivindicación 1, nanopartícula que tiene un diámetro de 5 nm a 100 nm.
7. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que cada capa de sílice sin MSF tiene un espesor tal que hay un 10 % o menos de transferencia de energía medible entre el MSF en el núcleo y en una capa de sílice que contiene MSF adyacente o en capas de sílice que contienen MSF adyacentes.
- 35 8. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el núcleo y todas las capas que contienen MSF tienen un MSF diferente.
- 40 9. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el MSF es un colorante orgánico.
10. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el MSF se selecciona entre N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-ilo) (DAC), tetrametilrodamin-5-maleimida (TMR), Cy5, o una combinación de los mismos.
- 45 11. Un procedimiento para fabricar la nanopartícula de la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto un precursor de sílice, una pluralidad de un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de manera que se forme un núcleo de sílice que tiene una pluralidad de MSF conjugado a la red de sílice del núcleo de sílice,
 - 50 b) poner en contacto el material de la etapa a) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice;
 - c) poner en contacto el material de b) con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente y una base de modo que se forme una capa de sílice que contiene MSF;
 - 55 d) opcionalmente, poner en contacto el material de la etapa c) con un precursor de sílice y un disolvente de manera que se forme una capa de sílice sin MSF en el núcleo de sílice y poner en contacto el material resultante con un precursor de sílice, un único tipo de precursor de conjugado de MSF, un disolvente, y una base de modo que se forme una capa de sílice que contiene MSF;
 - e) opcionalmente, repetir la etapa d) un número deseado de veces, en el que el contacto es con el material de una etapa d) realizada previamente;
 - 60 f) poner en contacto el material de la etapa c), la etapa d) o la etapa e) con un precursor de sílice y un disolvente de modo que se forme una capa de sílice sin MSF más externa en la capa que contiene MSF más externa; y
 - g) poner en contacto el material de la etapa f) con moléculas de PEG funcionalizadas de modo que se forme una nanopartícula que tiene una pluralidad de moléculas de PEG unidas covalentemente a la superficie exterior de la
 - 65 capa de sílice sin MSF más externa de la nanopartícula.

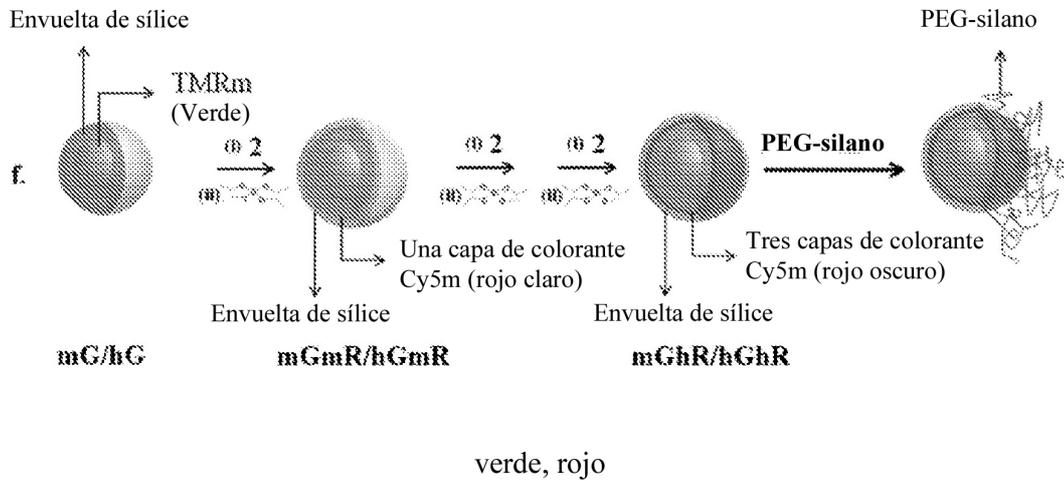
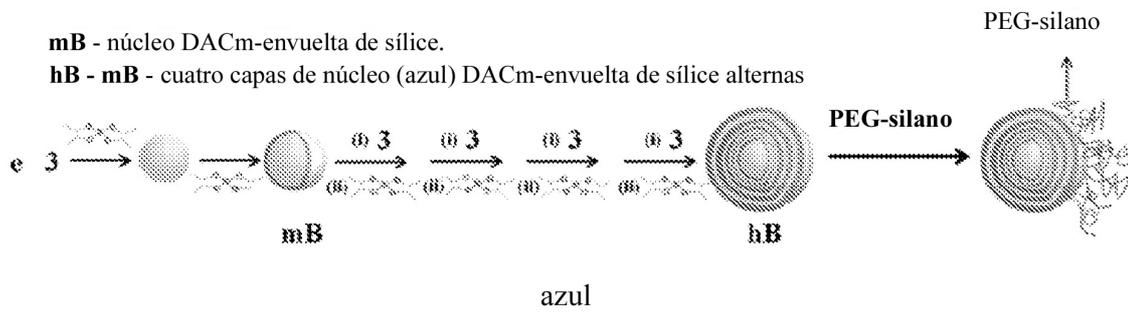
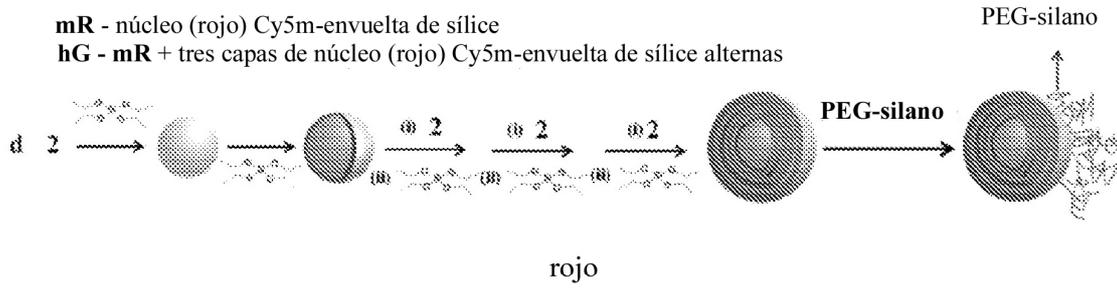
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las moléculas de PEG son moléculas de PEG heterobifuncionales.
- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además la etapa de aislar la nanopartícula.
14. Un procedimiento de obtención de imágenes que comprende las etapas de:
- a) poner en contacto una célula con una pluralidad de nanopartículas de la reivindicación 1; y
- 10 b) obtener una pluralidad de imágenes de la muestra, cada imagen obtenida usando una longitud de onda de excitación diferente y una longitud de onda de emisión diferente, en donde cada longitud de onda de excitación diferente se encuentra en el espectro de absorción de un tipo diferente de MSF presente en la nanopartícula y cada longitud de onda de emisión diferente se encuentra en el espectro de emisión de un tipo diferente de MSF presente en la nanopartícula.
- 15
15. El procedimiento de obtención de imágenes de la reivindicación 14, que comprende además la etapa de combinar la pluralidad de imágenes para proporcionar una única imagen.
16. El procedimiento de obtención de imágenes de la reivindicación 14, en el que la imagen se obtiene por
- 20 microscopía confocal.
17. El procedimiento de obtención de imágenes de la reivindicación 14, en el que la célula está presente en un sujeto.



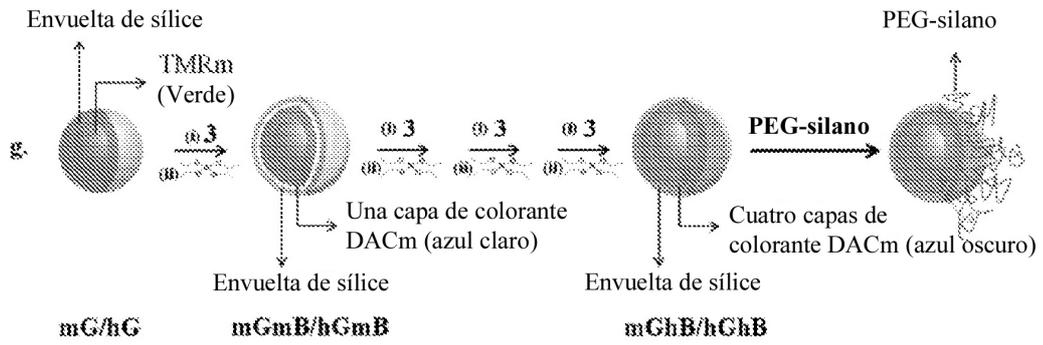
Figuras 1a-c



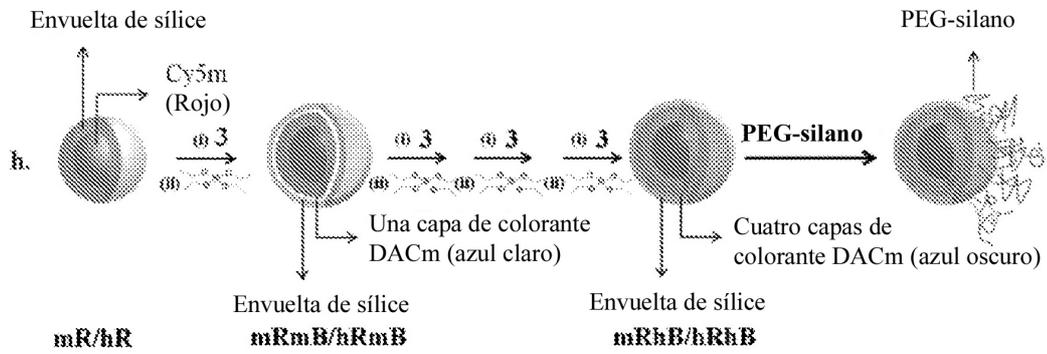
Figuras 2a-c



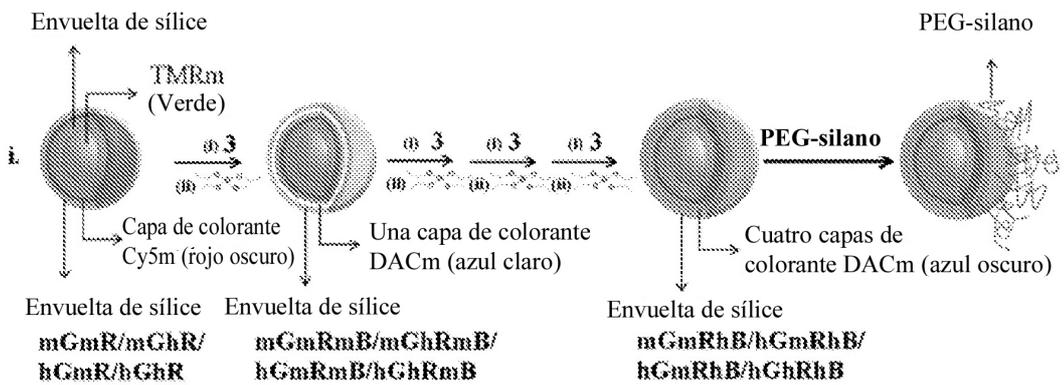
Figuras 2d-f



verde, azul

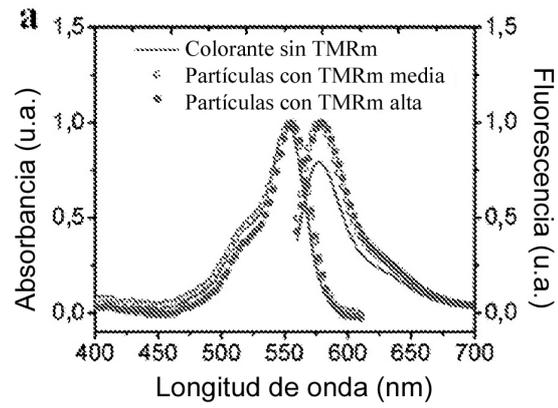


rojo, azul

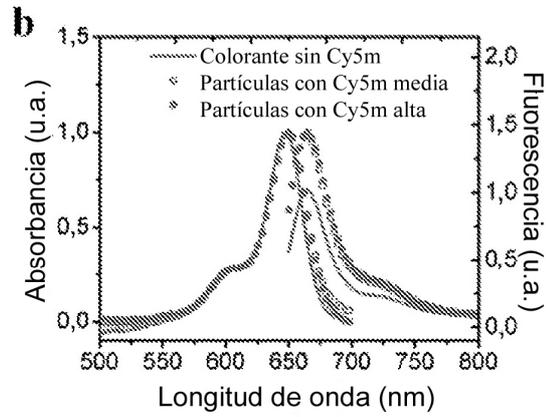


verde, rojo, azul

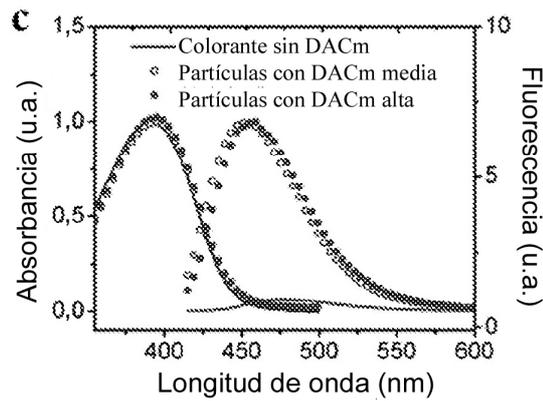
Figuras 2g-i



verde

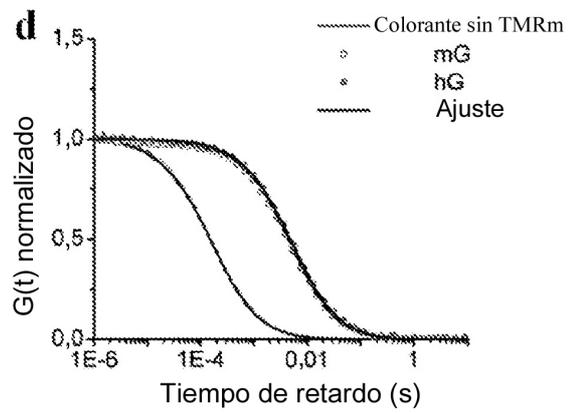


rojo

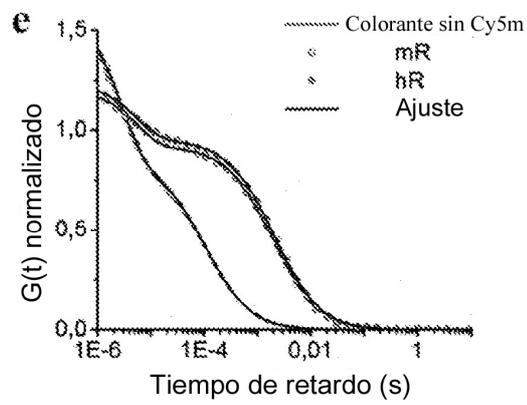


azul

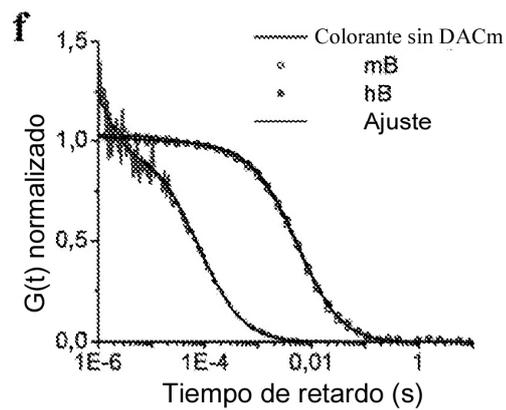
Figuras 3a-c



verde

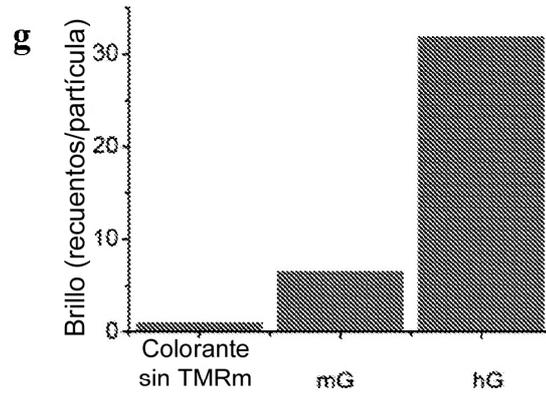


rojo

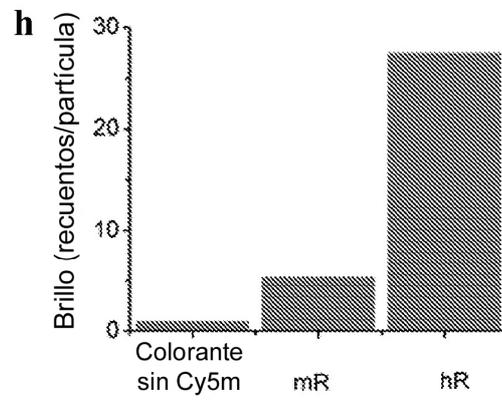


azul

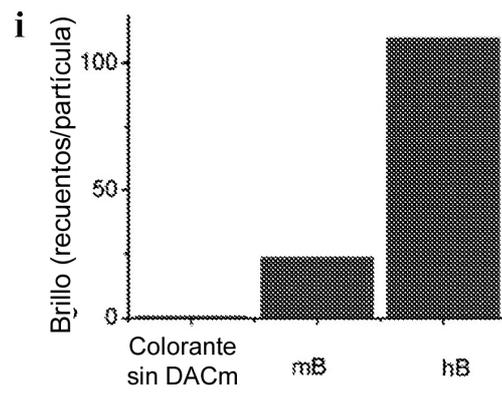
Figuras 3d-f



verde

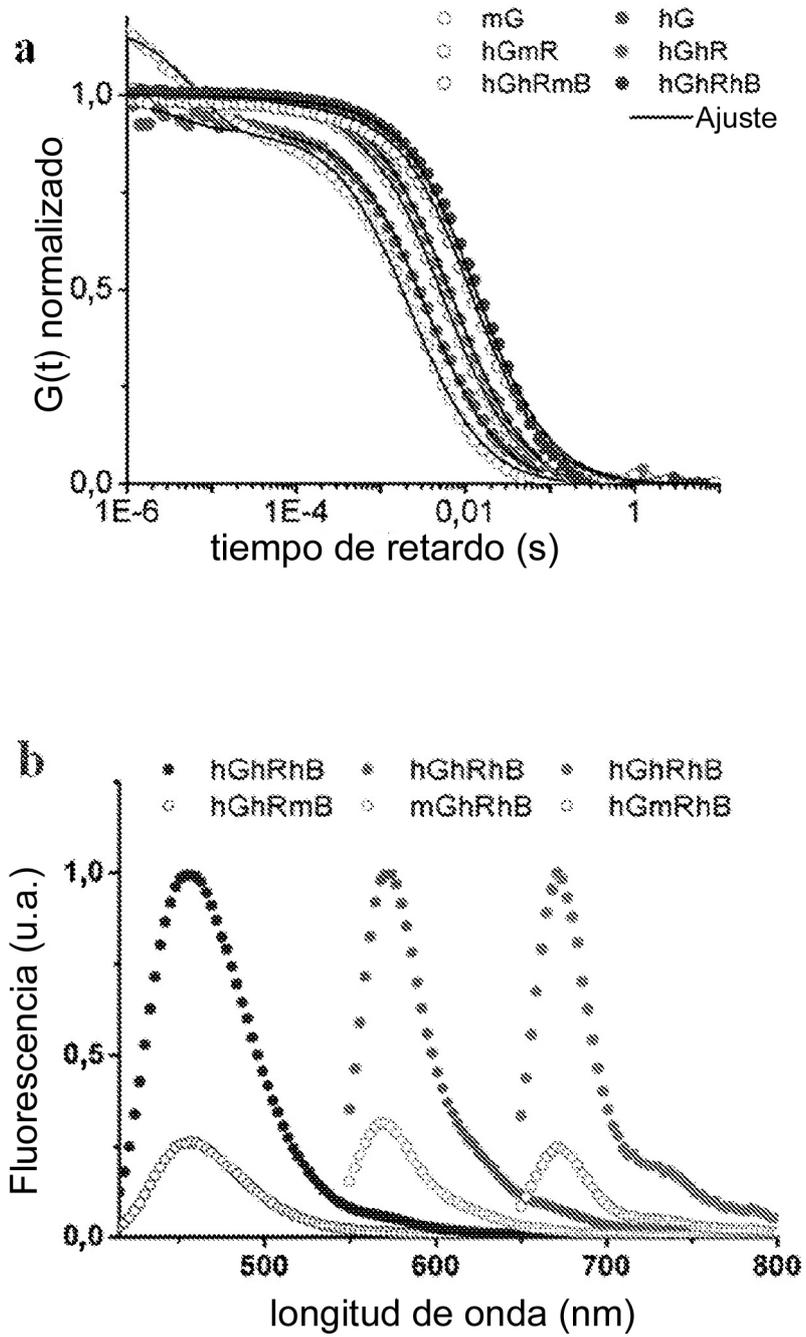


rojo



azul

Figuras 3g-i



Figuras 4a-b

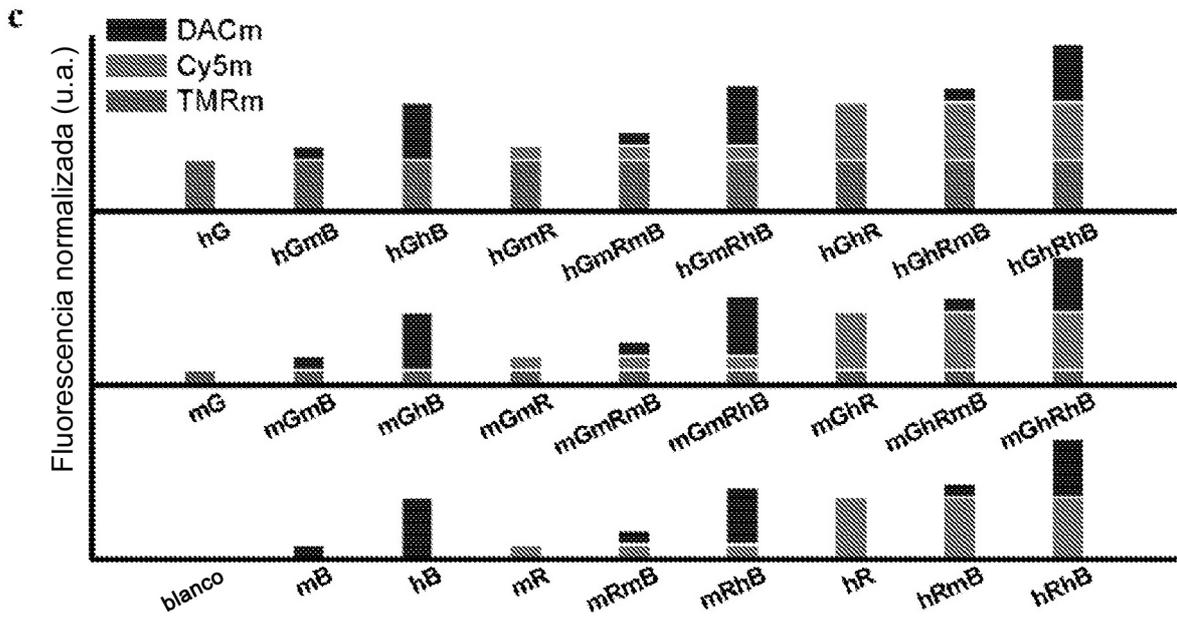
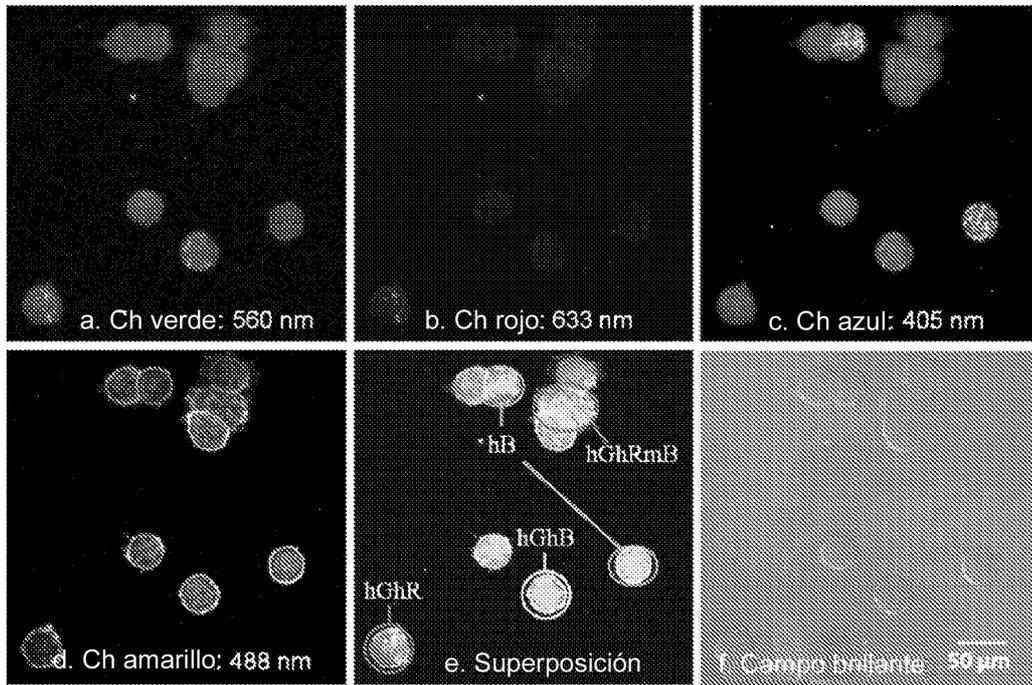
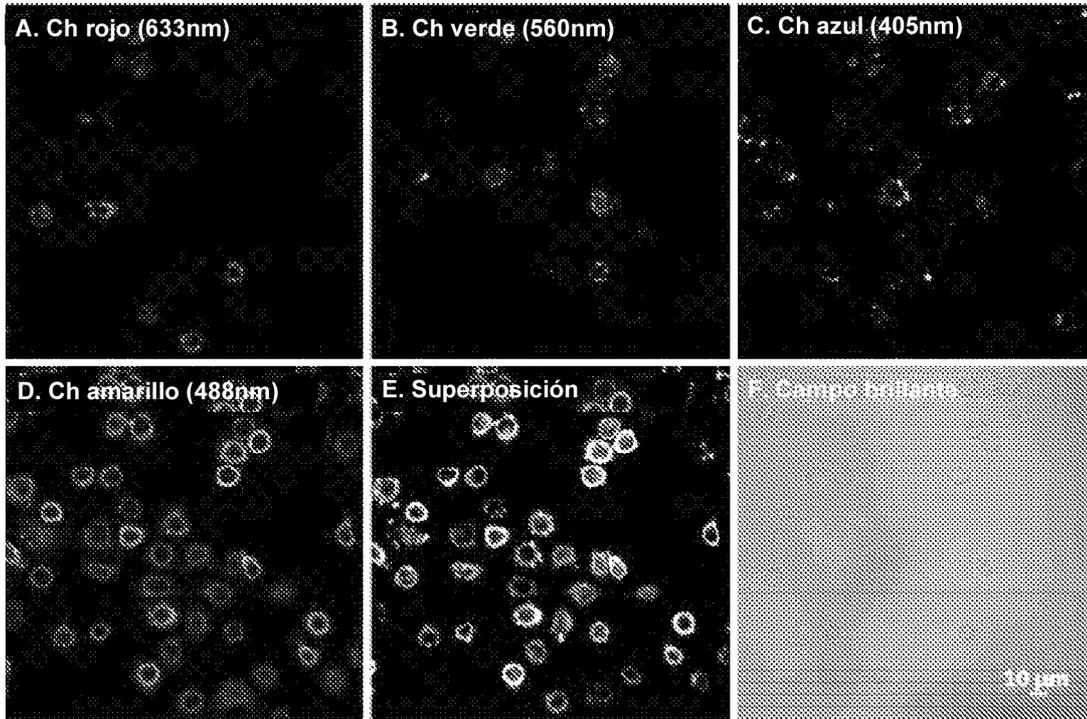


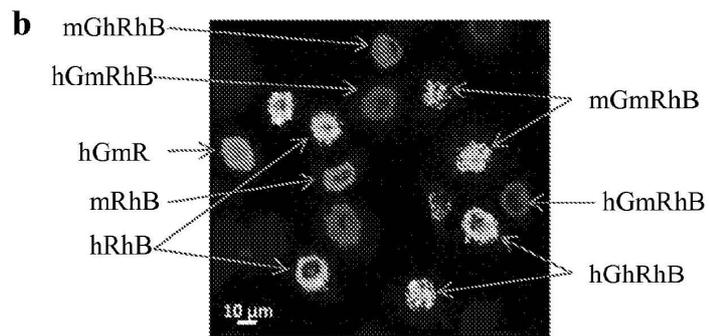
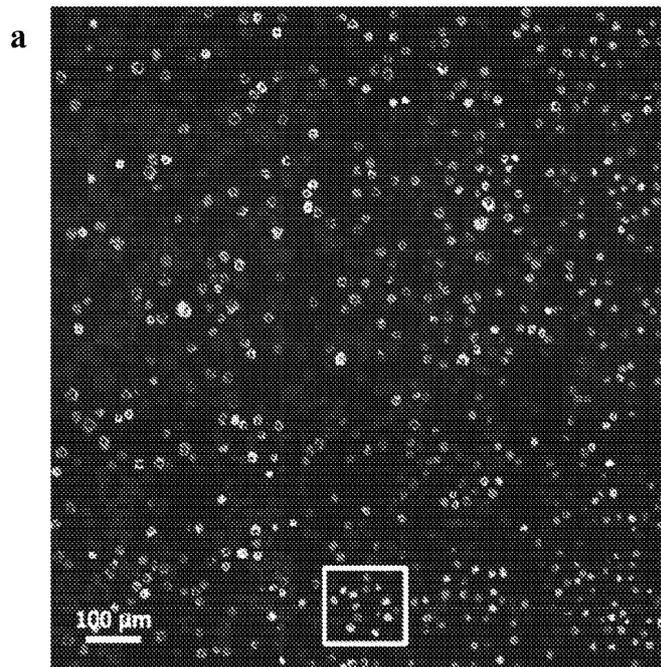
Figura 4c



Figuras 5a-f



Figuras 6a-f



N.º de colorantes			Color resultante	N.º de colorantes			Color resultante
G	R	B		G	R	B	
0	20	0	hG	0	20	0	mRhB
20	0	0	hGmR	0	0	0	mG
20	0	0	hGhB	0	0	0	mRhB
0	20	0	hRhB	0	20	0	mGmRhB
20	0	0	hG	20	0	0	hGmRhB
0	0	0	mGmR	0	0	20	hGmRhB
0	0	0	mGmRhB	20	0	0	mRhB
0	0	0	mG	0	0	0	Sin partículas
20	0	0	hGhRhB				
0	0	0	mGhR				

Figura 7a-b