

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 942**

51 Int. Cl.:
B23K 26/00 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09780677 .2**
96 Fecha de presentación: **15.07.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2300191**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para fabricar compuestos orgánicos que contienen metales**

30 Prioridad:
15.07.2008 DE 102008033070
17.07.2008 DE 102008033570

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2012

73 Titular/es:
Laser Zentrum Hannover E.V.
Hollerithallee 8
30419 Hannover, DE

72 Inventor/es:
BARCIKOWSKI, Stephan y
PETERSEN, Svea

74 Agente/Representante:
Zuazo Araluze, Alexander

ES 2 383 942 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).

DESCRIPCION

Procedimiento y dispositivo para fabricar compuestos orgánicos que contienen metales.

5 La invención se refiere a dispositivos y procedimientos que pueden realizarse con los mismos para fabricar compuestos que contienen metales, que presentan un componente metálico nanoparticular y un componente orgánico o que están compuestos por los mismos. El componente orgánico tiene preferiblemente una afinidad con un analito, en particular con un componente de la célula. Alternativamente puede ser el componente orgánico una molécula natural o sintética, en particular un monómero o polímero.

10 Petersen, Jakobi y Barcikowski, Applied Surface Science (ciencia aplicada de las superficies) 5435-5438(2009) y Petersen y Barcikowski, Advanced Functional Materials (materiales funcionales avanzados), 1167-1172 (2009) describen la fabricación de conjugados de nanopartículas con oligonucleótidos mediante ablación in situ de una lámina de oro por medio de impulsos de láser ultracortos en solución acuosa.

Tarea de la invención

Es tarea de la invención proporcionar un procedimiento y un dispositivo adecuado para realizar el procedimiento para fabricar conjugados que contienen metales.

15 Descripción general de la invención

La invención soluciona la tarea con el procedimiento y el dispositivo definidos en las reivindicaciones. Al respecto proporciona la invención un procedimiento para fabricar, preferiblemente para fabricar continuamente, conjugados que presentan un componente metálico nanoparticular y un componente orgánico o que están compuestos por los mismos. El procedimiento aprovecha la generación de nanopartículas que contienen metales activados o reactivos mediante irradiación de un cuerpo metálico con radiación láser y evita la modificación o el daño debido a la irradiación con láser de componentes orgánicos de tales conjugados.

25 El componente metálico nanoparticular incluye o está compuesto preferiblemente por metales de resonancia plasmónica, en particular Au, Ag, Ti y/o Cu. El componente metálico nanoparticular del compuesto fabricado mediante el procedimiento correspondiente a la invención se encuentra preferiblemente en forma metálica, en particular está elegido a partir del grupo que incluye el oro, plata, titanio, platino, iridio, tántalo, hierro, níquel, cobalto y cobre y mezclas de los mismos, en particular aleaciones de hierro-níquel y aleaciones de cobalto-samario, aleaciones de oro-plata (AuAg), aleaciones de hierro-oro (FeAu) y aleaciones de níquel-titanio (NiTi) o como óxido metálico, en particular elegido a partir del grupo que incluye óxidos de titanio, cinc y hierro, en particular óxidos metálicos ferromagnéticos de los mismos. Además, preferiblemente es también el componente nanoparticular metálico una partícula núcleo-cubierta, cuyo núcleo es metálico y cuya cubierta es el óxido del mismo metal, por ejemplo Zn (núcleo)/ZnO (cubierta). Se ha comprobado que el procedimiento de fabricación correspondiente a la invención, en particular cuando se utiliza un fluido portador que contiene oxígeno, por ejemplo alcohol o agua, genera partículas con un núcleo metálico y una cubierta de óxido metálico.

35 Para la estabilidad del enlace del componente metálico con el componente orgánico de conjugados, es preferible que uno de estos componentes sea una base Lewis débil, mientras que el otro es un ácido Lewis débil, o bien uno de estos componentes es una base Lewis fuerte, mientras que el otro componente es un ácido Lewis fuerte, por ejemplo Au con un componente orgánico que contiene grupos tiol o bien Fe con un componente orgánico que contiene grupos amino.

40 El enlace entre el componente metálico nanoparticular y el componente orgánico es preferiblemente un enlace directo, pudiendo presentar opcionalmente el componente orgánico un llamado grupo espaciador, por ejemplo un alquilo C1 a C6 o un poliglicol, en particular hexaetilenglicol, enlazando el grupo espaciador con el componente metálico.

45 El componente orgánico del enlace orgánico que contiene metal es una base Lewis y puede presentar un grupo susceptible de reacción, por ejemplo elegido a partir de enlaces dobles C-C, en particular enlaces dobles etilénicamente insaturados, grupos carboxilo, carbonilo, tiol, sulfuro y epóxido, en particular con grupo tiol terminal, como por ejemplo un radical de cisteína, un radical de alquiltiol o etilenglicoltiol o un bisulfuro, por ejemplo un bisulfuro de piridilo, bisulfuro de alquilo C1 a C12, un bisulfuro de etilenglicol o ácido lipoico.

50 En una forma de ejecución preferente presenta el componente orgánico una secuencia de ácido nucleínico y/o una secuencia de aminoácido con una afinidad específica con un analito, en particular una afinidad específica con un componente intracelular o extracelular de una célula procariótica o eucariótica, en particular una célula animal. Preferiblemente presenta el componente orgánico una secuencia de ácido nucleínico, también denominada oligonucleótido, que por ejemplo es complementario inverso es decir, hibridizable, de una secuencia objetivo que es el analito. De manera especialmente preferente es el componente orgánico una secuencia de ácido nucleínico, que es específico de un segmento específico de cromosomas de sexo de una célula animal, en particular de una célula de esperma.

55

En otra forma de ejecución presenta el componente orgánico los componentes que ligan un antígeno de un anticuerpo, por ejemplo una o varias cadenas de aminoácidos, que forman un paratope de un anticuerpo, en particular un anticuerpo natural o sintético o un componente de un anticuerpo que liga un antígeno.

5 Correspondientemente puede ser el componente orgánico un componente de enlace del componente correspondiente a la invención, por ejemplo un anticuerpo natural o sintético, de una cadena o de dos cadenas, en particular una secuencia de ácido nucleínico, que actualmente se indican en 5' después de 3', por ejemplo RNA, ADN, ADN fosforilado (PSNA), ADN peptidil, por ejemplo LNA (locked nucleic acid, ácido nucleico bloqueado) o PNA, o un ligando específico del receptor, p.e. para un receptor celular, u otro compuesto que interactúa específicamente con un componente ligado a la superficie de una célula o un componente interno de la célula, en particular un anticuerpo.

10 Una secuencia de ácido nucleínico, que es parte integrante orgánica de un conjugado correspondiente a la invención, puede presentar por ejemplo una secuencia de ácido nucleínico específica de un cromosoma del sexo, allel o SNP.

15 Secuencias de ácido nucleínico preferentes son TCT GTG AGA CGA CGC ACC GGT CGC AGG TTT TGT CTC ACA (ID sec. Núm. 1), la secuencia específica del cromosoma Y del vacuno AGA GAC TGT GGA ACC GG (ID sec. Núm 2) GGC GAC TGT GCA AGC AGA (ID sec. núm. 3) o AGC ACA TCT CGG TCC CTG (ID sec. núm. 4) o un cartucho de expresión que codifica un gen marcador, por ejemplo una proteína luminiscente, en particular GFP, eGFP, Red, una secuencia específica de un marcador de enfermedad, por ejemplo la GGG AGG GCG AUG CGG AUC AGC CAU GUU UAC GUC ACU CCU UGU CAA UCC UCA UCG GC específica del antígeno de membrana de la próstata (ID sec. Núm. 5) o una secuencia codificadora de siRNA, por ejemplo la siRNA ACC UUC AGG GUC AGC UUG C dirigida contra GFP (ID sec. Núm. 6).

20 Para componentes orgánicos de conjugados correspondientes a la invención, que presentan una afinidad específica con un analito, se denominan los conjugados correspondientes a la invención también conjugados de comprobación o detección.

25 Es preferible que los conjugados correspondientes a la invención, en particular los conjugados de detección, en los que una nanopartícula que contiene metal está unida con un componente orgánico, que presenta una afinidad específica para una analito, presenten compuestos ligados adicionalmente que refuerzan la penetración, por ejemplo péptidos de poliarginina, en particular preferiblemente con un residuo de ácido mirístico ligado y/o un agente de transfección, por ejemplo elegido a partir del grupo que incluye Fugene, lipofectamina, oligofectamina, Optifect, DMRIE C, AnthD, penetratina (ID de sec. Núm. 7, RQIKIWFQNRRMKWKK) penetratina 43-58, proteína HIVI-Tat (ID sec. núm. 8, GRICKKRRQRPRPPQ), péptido tat 49-59, péptido tat 48-52, péptido tat 2-4, péptidos que contienen la secuencia ID núm. 9 (YGRKIGZRQRRRQYGRKKRRQRRRQ) o que están compuestos por la misma, péptidos anfipáticos (MAPs), por ejemplo la secuencia de aminoácidos KALA ó KLAL, péptidos que contienen cis- γ -amino-L-prolina, VP22, LL37, TP10, MPG, galparan, transportan, MPG, SynB1, Fushi-tarazu, engrailed, pVEC, plsl, cisteína, glicina, Hoechst 33342, polisacáridos, en particular dextrano, glucosaminoglicano, en particular ácido hialurónico, heparina y quitosán, lípidos, polivinilpirrolidona, etilenglicol y mezclas así como conjugados de los mismos. Alternativa o adicionalmente pueden estar formulados los conjugados para reforzar la penetración en células como liposomas, o estar formulados en mezcla con liposomas.

30 Además se refiere la invención a la utilización de conjugados de detección y a la aplicación del procedimiento de fabricación de conjugados de detección, que presentan un componente orgánico específico de un analito, para el análisis citométrico de flujo y/o la clasificación citométrica de flujo del analito. Preferiblemente está ligado el analito a una partícula, en particular es el analito un componente de la célula. La clasificación puede por lo tanto también ser la clasificación de células.

35 En general se refiere la invención a la aplicación de conjugados de detección y a la aplicación del procedimiento de fabricación para generar conjugados de detección para el análisis, a elección acoplado con el subsiguiente paso de la clasificación de analitos mediante activación del componente nanoparticular metálico del conjugado, por ejemplo mediante irradiación con radiación de una longitud de onda de activación, que es específica para la activación de la resonancia de plasmón superficial, detección de la señal emitida por el conjugado midiendo la radiación emitida y determinación del desplazamiento del máximo de emisión o absorción.

40 A elección pueden clasificarse los analitos o bien partículas que presentan los analitos a continuación según el desplazamiento determinado del máximo de emisión o absorción en dos o más fracciones, por ejemplo en una fracción con una intensidad de señal a un lado de un valor de umbral, para cuyos analitos el componente orgánico del conjugado, en particular una secuencia de ácido nucleínico del conjugado, es específico, en particular hibridizable, y una fracción para la que se han medido intensidades de señal en el otro lado del valor de umbral, en el que por ejemplo no se hibridiza la secuencia de ácido nucleínico del conjugado.

45 En general puede encontrarse la longitud de onda de activación en la gama de 350 a 1000 nm, preferiblemente en la gama de 450 a 800 nm, de manera especialmente preferente en 633, 488, 514 ó 543 nm.

- En particular se refiere la invención a la aplicación de conjugados de detección y a la utilización del procedimiento de fabricación de conjugados de detección que presentan una proporción de ligando específica de los cromosomas de sexo, en particular una secuencia de ácido nucleínico específica de los cromosomas de sexo, para la detección específica de los cromosomas de sexo de espermatozoides, en particular la aplicación de conjugados de detección y la aplicación del procedimiento de fabricación para fabricar conjugados de detección para la clasificación de espermatozoides intactos, con capacidad de vivir de un mamífero humano, no humano en una fracción que contiene esencialmente cromosomas X y una fracción que contiene esencialmente cromosomas Y.
- En esta forma de ejecución se refiere la invención también a la aplicación de conjugados que presentan un componente metálico nanoparticular y un componente orgánico en un procedimiento para generar una fracción de espermatozoides no humanos mediante clasificación por medio de un citómetro del flujo con las etapas de tomar contacto con espermatozoides intactos, con posibilidad de vida, obtenidos de un mamífero humano, no humano con las etapas
- separación de los espermatozoides bien en gotas de un fluido envolvente, preferiblemente eléctricamente conductor e isotónico o en una corriente de fluido generada por ejemplo en un citómetro de flujo,
- activación del componente metálico nanoparticular del conjugado por ejemplo irradiando con radiación de una longitud de onda de activación, que es específica para la activación de la resonancia plasmónica en la superficie,
- detección de la señal emitida por el conjugado midiendo la radiación emitida,
- determinación del desplazamiento del máximo de emisión o absorción,
- clasificación de los espermatozoides según la intensidad de la señal medida en al menos dos fracciones de los espermatozoides, para generar al menos dos fracciones de espermatozoides, por ejemplo una fracción con una intensidad de señal a un lado de un valor de umbral para la fracción de espermatozoides específica del cromosoma de sexo para cuyo cromosoma de sexo la componente orgánica del conjugado, en particular la secuencia de ácido nucleínico del conjugado, era en particular hibridizable y una fracción de espermatozoides para la que las señales de intensidad se midieron en el otro lado del valor de umbral, en las que por ejemplo no se hibridiza según la secuencia de ácido nucleínico del conjugado.
- La longitud de onda de activación se encuentra en la gama de 350 a 1000, preferiblemente en la gama de 520 a 800 nm, por ejemplo para partículas de oro. En general puede realizarse la detección de la señal emitida por el conjugado midiendo luz dispersa; la determinación del máximo de emisión o absorción puede ser la determinación del desplazamiento del máximo de la longitud de onda de emisión, ya que la longitud de onda emitida se desplace mediante la fijación del conjugado a un analito.
- En esta aplicación reside una ventaja especial en que los conjugados fabricados emiten, en cada caso específicamente para el cromosoma de sexo contenido en un espermatozoide, una señal detectable que cualitativamente se desvía de forma significativa cuando tiene lugar la correspondiente activación y la señal se desvía significativamente en función de la hibridización, siendo esta desviación suficientemente grande para que pueda medirse la misma sin una orientación específica de los espermatozoides en función de la energía de activación irradiada o bien respecto al detector para captar la señal emitida.
- Correspondientemente puede realizarse esta aplicación del procedimiento para fabricar conjugados en la fabricación de fracciones de espermatozoide específicas del cromosoma de sexo, preferiblemente con el aislamiento de los espermatozoides durante la detección de una señal emitida por el conjugado y durante la subsiguiente clasificación en fracciones en base a la señal de detección medida, también sin orientar espermatozoides a lo largo de su eje longitudinal, por ejemplo en un citómetro de flujo generando una fase líquida continua o generando un flujo de gotas, estando contenido en cada gota exactamente un espermatozoide.
- Preferiblemente se refiere la aplicación en la fabricación de una fracción de espermatozoides individuales a continuación de la detección de la señal del conjugado de detección a una fracción, por ejemplo desviando gotas o segmentos de volumen del líquido envolvente o portador que contienen un espermatozoide. La desviación puede realizarse por ejemplo mediante un campo eléctrico generado en función de la señal detectada. Alternativamente a esta clasificación en al menos dos fracciones, es posible también en la aplicación correspondiente a la invención dejar espermatozoides individualizados a continuación de la detección en función de la magnitud de la señal de detección sin influencia en el medio portador o bien en el líquido envolvente, o bien, en función de la señal de detección desactivar una fracción de los espermatozoides, por ejemplo calentando mediante una radiación láser selectiva los espermatozoides que en la detección precedente han sobrepasado por arriba o por abajo un valor de umbral de la señal. En esta variante de la aplicación de conjugados contiene una fracción de espermatozoides generada los espermatozoides no desactivados, es decir, por ejemplo no irradiados y la otra fracción los espermatozoides desactivados (no susceptibles de fecundar), realizándose la inactivación en función de que se sobrepase por arriba o por abajo un valor de umbral para la señal de detección medida. Esta aplicación puede por ello referirse a un procedimiento en el que en un citómetro del flujo está colocado un láser para

la irradiación desactivadora de células individuales en un flujo de líquido continuo en función de la señal que emite el conjugado de detección.

Una secuencia de ácido nucleínico preferente, específica del cromosoma Y, en particular del vacuno, es la ID sec. núm. 4 (5' AGC ACA TCT CGG TCC CTG 3') y alternativamente puede utilizarse una secuencia de ácido nucleínico de la ID sec. núm. 4 y/o núm. 5.

Alternativamente a la secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo, puede contener un conjugado correspondiente a la invención por ejemplo una secuencia de ácido nucleínico específica de un allel o de un SNP (polimorfismo mononucleótido), para fraccionar células, en particular espermatozoides, específicamente según allel o específicamente según SNP.

Se prefiere que los conjugados de detección estén compuestos por nanopartículas de oro coloidales con secuencias de ácido nucleínico específicas del cromosoma de sexo directamente allí ligadas, de forma opcional adicionalmente con compuestos que refuerzan la penetración ligados directamente a la nanopartícula de oro. Los conjugados de detección presentan por lo tanto una secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo ligada directamente a nanopartículas coloidales, en particular nanopartículas de oro coloidales, dado el caso adicionalmente compuestos que refuerzan la penetración ligados directamente a las nanopartículas.

Para activar los conjugados de detección que presentan una nanopartícula de oro coloidal, puede utilizarse en la aplicación para fraccionar espermatozoides por ejemplo luz con una longitud de onda de 350 a 1000 nm, preferiblemente de 450 a 1000 nm, de manera especialmente preferente unos 800 nm para la irradiación. Como señal para la detección específica del cromosoma de sexo puede medirse la absorción de la radiación de activación, detectándose preferiblemente la hibridación específica del cromosoma de sexo de la secuencia de ácido nucleínico de un conjugado como modificación de la absorción, dado el caso mediante desplazamiento de la longitud de onda, en particular hacia longitudes de onda superiores.

En base a la detección de la radiación emitida por el conjugado cuando se aplica para la detección de un analito, opcionalmente con subsiguiente clasificación función de la señal detectada del conjugado como modificación de la luminiscencia, absorción y/o dispersión, opcionalmente con determinación del desplazamiento de la longitud de onda, posibilita la invención la aplicación del conjugado para procedimientos de análisis y clasificación para células, en particular para espermatozoides con las etapas de la detección sin contacto de la hibridación específica del cromosoma de sexo y el subsiguiente fraccionamiento y/o inactivación de espermatozoides aislados en función de la señal detectada.

El procedimiento correspondiente a la invención prevé la ablación de un cuerpo metálico en un fluido portador mediante irradiación con láser, moviéndose el fluido portador durante la irradiación con láser del cuerpo metálico sobre su superficie, por ejemplo bombeándose. Las nanopartículas que contienen metal generadas mediante la irradiación con láser se mueven mediante el movimiento forzado del fluido portador desde la zona del rayo láser, con lo que las nanopartículas que contienen metales, tras la toma de contacto o bien reacción con un compuesto precursor del componente orgánico, esencialmente no pasan a través del rayo láser. Para los fines de la invención incluye el concepto de cuerpo metálico, además del metal de una sola pieza o el óxido metálico, también metal u óxido metálico particular, en particular polvo metálico o polvo de óxido metálico, que opcionalmente se fija y/o puede contener un aglutinante.

El fluido portador utilizado en el procedimiento de fabricación es preferiblemente un líquido, por ejemplo elegido a partir del grupo que contiene, a partir de compuestos acuosos, en particular agua pura no salina, solución tampón acuosa con Tris, HEPES, MES, imidazol, glicina y/o trietanolamina, agua o aquellas soluciones tampón acuosas que tienen un disolvente orgánico, por ejemplo elegida a partir del grupo que incluye alcohol C1 a C5, en particular etanol, propanol, butanol, acetona, formaldehído, así como THF y mezclas de al menos dos de los mismos. Alternativamente puede estar elegido el líquido portador a partir del grupo de los disolventes orgánicos antes citados y mezclas de los mismos, siendo preferiblemente el líquido portador THF o acetona.

Al fluido portador se le añade antes o después de que incida la radiación láser sobre el cuerpo metálico un compuesto precursor de un componente orgánico del conjugado. El compuesto precursor contenido en el fluido portador forma con las nanopartículas que contienen metal obtenidas mediante la irradiación con láser del cuerpo metálico, enlaces sin más, con lo que los conjugados se generan por ejemplo también sin reactivos de acoplamiento bifuncionales. Preferiblemente tienen los enlaces precursores al menos un grupo reactivo con las nanopartículas que contienen metal dentro de un corto tiempo (en particular dentro de 0,5 μ s hasta 100 ms) tras su generación mediante irradiación con láser.

En una forma de ejecución alternativa, la radiación láser es una radiación de láser de impulsos ultracortos. Se ha comprobado que la modificación de conjugados se evita mediante la radiación láser, por medio de radiación de láser de impulsos ultracortos, mientras se generan mediante irradiación de un cuerpo metálico suficientes nanopartículas, que reaccionan con un compuesto precursor orgánico en el fluido portador para formar un conjugado. Actualmente se atribuye la evitación de modificaciones de conjugados generados en un procedimiento de fabricación con radiación de láser de impulsos ultracortos a una conducción del procedimiento en la que la duración del impulso, que

por ejemplo es más corta que 1 a 100 ps, es más corta que el tiempo de relajación de la nanopartícula que contiene metal. Correspondientemente puede realizarse esta forma de ejecución sin generar un movimiento del fluido portador sobre el cuerpo metálico.

5 En esta forma de ejecución se fabrican los conjugados de detección, que preferiblemente son nanopartículas de oro coloidales, que están conjugadas con un oligonucleótido específico del cromosoma de sexo, en particular PNA, mediante ablación de nanopartículas con un láser de impulsos ultracortos de oro en medio acuoso como fluido portador y existiendo en el medio acuoso la secuencia de ácido nucleínico, añadiéndose adicionalmente, opcionalmente a la vez o añadido posteriormente, un agente que refuerza la penetración. La generación de nanopartículas de oro mediante ablación por láser por medio de impulsos ultracortos genera nanopartículas con superficie reactiva, que pueden presentar también Au⁺, Au³⁺ parcial oxidado en la superficie. Sorprendentemente se ha encontrado que solamente la generación de nanopartículas de metal mediante ablación por láser de impulsos ultracortos en presencia de la secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo, dado el caso también para agentes que refuerzan la penetración en mezcla o posteriormente añadidos, da como resultado un enlace directo de la secuencia de ácido nucleínico o bien del agente que refuerza la penetración con las nanopartículas de oro. Mediante la ablación por láser de impulsos ultracortos se oxidan parcialmente las partículas de metal, en particular nanopartículas de oro, y funcionan como aceptadores de electrones que realizan un enlace con componentes ligantes, en particular secuencias de ácido nucleínico y optativamente a la vez o posteriormente con reactivos presentes que refuerzan la penetración, por ejemplo un enlace complejo o coordinativo, con lo que en el conjugado el metal se encuentra en forma metálica, en particular no como óxido metálico.

20 Para aumentar la solidez del enlace, pueden estar dotadas las secuencias de ácido nucleínico o bien el reactivo que refuerza la penetración (el compuesto que refuerza la penetración) de grupos reactivos con oro, en particular con grupos tiol, carboxi, amida y/o amino, encontrándose las secuencias de ácido nucleínico en el extremo 3' y/o 5', preferiblemente en el extremo 3', para el enlace con una nanopartícula. Es posible realizar este procedimiento de fabricación continuamente en una cámara de flujo, fluyendo por delante medio acuoso con un contenido de secuencia de ácido nucleínico en oro, mientras el oro genera nanopartículas coloidales mediante irradiación con radiación de impulsos ultracortos. En esta forma de ejecución pueden utilizarse reactivos que refuerzan la penetración en una relación deseada en mezcla con secuencias de ácido nucleínico, o bien pueden añadirse al flujo de fluido reactivos que refuerzan la penetración flujo abajo del lugar de la generación de las nanopartículas coloidales de oro, con lo que tras la reacción de las nanopartículas con secuencias de ácido nucleínico pueden reaccionar puntos reactivos de las nanopartículas con el agente que refuerza la penetración.

35 En el marco de la invención se generan nanopartículas magnéticas, por ejemplo nanopartículas con un contenido en o compuestas por Fe, óxido de Fe y/o una aleación de Fe, que a continuación pueden detectarse detectando el desplazamiento de la relajación en el acoplamiento el cromosoma de sexo específico, por ejemplo mediante detección de la diferencia de relajación debida al enlace específico del conjugado de detección junto a o en espermatozoides de mamíferos, por ejemplo de la diferencia de relajación entre espermatozoides que contienen el cromosoma X y espermatozoides que contienen el cromosoma Y en secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo para la subsiguiente selección de espermatozoides. En una secuencia de ácido nucleínico no específica del conjugado de detección puede realizarse la detección y selección en base a la diferencia de relajación cuantitativa, ya que los espermatozoides también se diferencian en el distinto contenido total de ADN.

40 Alternativamente a la secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo puede por lo tanto estar contenida una secuencia de ácido nucleínico aleatoria o arbitraria y/o una sustancia intercalante de ADN, por ejemplo un colorante, en particular Höchst Bisbenzimid 33342, como componente orgánico en los conjugados de detección, con lo que para la identificación en base al cromosoma de sexo ha de detectarse una diferencia cuantitativa de la señal debido al bajo contenido total en ADN de los espermatozoides que contienen cromosoma Y.

45 Las nanopartículas contenidas en los conjugados de detección correspondientes a la invención están generadas preferiblemente mediante ablación por láser de impulsos ultracortos de un metal en medio acuoso, por ejemplo sumergido en una composición acuosa, teniendo el impulso ultracorto una duración de impulso de 10 fs a 15 ps, para una longitud de onda de más de 330 nm y como máximo de 1030 nm, en particular en la gama de 500 a 1000 nm. La duración de la ablación es preferiblemente de aprox. 10 a 200 seg, por ejemplo de 40 a 60 seg, en particular de 53 seg, para una energía de impulso de aprox. 50 a 200 μJ, en particular de 80 a 120 μJ, preferiblemente 120 μJ, siendo la duración del impulso de aprox. 100 a 140 fs, en particular de aprox. 120 fs, preferiblemente a 800 nm.

50 El procedimiento de fabricación correspondiente a la invención da como resultado nanopartículas que también con el componente ligante unido, que es por ejemplo un péptido o una secuencia de ácido nucleínico específica del cromosoma de sexo, preferiblemente como PNA, tienen un tamaño y/o conformación especialmente adecuados para 55 atravesar la pared de la célula de espermatozoides de mamíferos, en particular de vacuno. Las nanopartículas tienen por ejemplo un tamaño de 1 a 150 nm, hasta 100 nm, preferiblemente 5 a 50 nm o hasta 25 nm.

60 El procedimiento de fabricación para conjugados de detección con un contenido en nanopartículas genera en esta forma de ejecución, debido a la generación de nanopartículas mediante irradiación con láser de impulsos ultracortos, para una reducida acción del calor sobre componentes de los conjugados o sobre el fluido portador, conjugados de detección en un espacio de tiempo muy pequeño, por ejemplo de 1 a 10 ps, dentro del cual existe una elevada

reactividad de las nanopartículas metálicas. Las nanopartículas presentan esta reactividad inmediatamente tras ser generadas por ejemplo con secuencias de ácido nucleínico que contienen tiol, mientras que a continuación de este espacio de tiempo se inicia la aglomeración de las nanopartículas. La reducida acción del calor es ventajosa, ya que de esta manera se reduce el daño de los componentes orgánicos y preferiblemente se evita en lo esencial.

5 Correspondientemente presentan las secuencias de ácido nucleínico a utilizar para el procedimiento de fabricación preferiblemente grupos tiol, queto, carboxi, amida o amino o grupos fosfino, para establecer el correspondiente enlace coordinativo con las nanopartículas de oro, es decir, sin utilizar un reactivo de acoplamiento adicional entre la secuencia de ácido nucleínico y las nanopartículas, con lo que el conjugado de detección está compuesto por nanopartículas metálicas y secuencia de ácido nucleínico, que presenta un grupo reactivo, en particular terminal, por ejemplo un grupo tiol, queto, carboxi, amida o amino o un grupo fosfino, que realiza un enlace coordinativo con la nanopartícula.

10 En una forma de ejecución preferente prevé el procedimiento para fabricar conjugados con un componente metálico nanoparticular y un componente orgánico, mover un fluido portador, que en particular es un líquido portador, mediante un equipo de circulación o de bomba sobre la superficie de un metal, e irradiar el metal con un láser. Mediante la irradiación del metal con láser se generan nanopartículas metálicas. El fluido portador puede presentar un compuesto precursor del componente orgánico del conjugado o bien puede añadirse este compuesto precursor al fluido portador flujo abajo del metal.

15 Mediante el movimiento del fluido portador sobre la superficie del metal durante la irradiación con radiación láser, se mueven las nanopartículas generadas desde la zona contigua al rayo láser y en función de la frecuencia de repetición del láser son activadas en medida reducida o ya no son activadas por el rayo láser. Preferiblemente tiene por lo tanto también esta forma de ejecución la radiación láser, en función de la frecuencia de repetición, esencialmente un reducido efecto o ningún efecto sobre componentes orgánicos de conjugados ya formados, que presentan un componente orgánico unido al componente metálico. Esto tiene la ventaja de que el compuesto precursor contenido en el fluido portador puede reaccionar con las nanopartículas reactivas directamente a continuación de ser generadas mediante irradiación con láser, pero debido al movimiento del fluido portador fuera del segmento de volumen del fluido portador que es atravesado por el rayo láser.

20 Se ha comprobado que también cuando se generan nanopartículas mediante irradiación continua con láser a partir de una superficie metálica en un fluido portador que contenía compuesto precursor, cuando se mueve el fluido portador sobre la superficie de metal, los conjugados generados se fabricaban con un mayor rendimiento que con un láser de impulsos ultracortos y/o no presentaban ninguna modificación del compuesto precursor, a excepción de los grupos reactivos del compuesto precursor, que realizan un enlace con la nanopartícula, por ejemplo grupos tiol, queto, carboxi y amida. Así pudo comprobarse por ejemplo para oligonucleótidos que en la conducción del procedimiento correspondiente a la invención con movimiento del fluido portador sobre la superficie del metal durante la irradiación con láser, cuando el fluido portador contenía compuesto precursor ya flujo arriba de la superficie del metal, no se presentaba esencialmente ninguna modificación del oligonucleótido, a excepción del enlace con la nanopartícula. A diferencia de ello, pudieron comprobarse al generar nanopartículas mediante elevada energía láser con una conducción estática del proceso, es decir, sin movimiento del fluido portador, modificaciones químicas del componente orgánico de conjugados y se supone actualmente que estas modificaciones son atribuibles a la irradiación con láser de los conjugados.

30 Es preferible que el fluido portador se mueva mediante bombeo del fluido portador en el recipiente en el que se encuentra el metal y pueda ser irradiado por un láser que irradia continuamente. En una forma de ejecución simple puede generarse el bombeo mediante un agitador como equipo de bomba dentro del recipiente, alimentándose el recipiente por cargas con fluido portador que contiene compuesto precursor e irradiándose bajo agitación un metal u óxido metálico situado dentro del fluido portador con radiación de láser continua. Alternativamente puede ser el equipo de circulación un equipo de circulación conectado al recipiente, que presenta un equipo de bomba para mover el fluido portador. Preferiblemente presenta el recipiente una entrada para compuesto precursor y/o una abertura de salida.

35 En la descripción incluye el concepto de compuesto precursor tanto compuestos precursores y sustancias precursoras para los componentes orgánicos de un conjugado correspondiente a la invención, en particular un componente orgánico específico para un analito, como también compuestos y sustancias precursores orgánicos no específicos, como por ejemplo compuestos precursores de compuestos que refuerzan la penetración u orgánicos no específicos.

40 En la descripción del procedimiento correspondiente a la invención para fabricar conjugados rigen las descripciones de etapas del procedimiento, así como también la correspondiente disposición de elementos de un dispositivo adecuado para el procedimiento para las correspondientes etapas del procedimiento descritas.

45 En una forma de ejecución preferente se bombea el fluido portador mediante una bomba o mediante una fuente de líquido sometida a presión a través de una primera abertura de entrada hasta una célula de flujo en la que está fijado el metal y que es irradiada por un rayo láser y sale a continuación a través de una abertura de salida de la célula de flujo.

De manera especialmente preferente forma el metal un segmento de la superficie interior de la célula de paso y está dispuesto por ejemplo sobre una superficie interior de la célula de paso. La célula de paso presenta preferiblemente una sección de paso que limita con la superficie del metal de un máximo de 7 cm², preferiblemente de un máximo de 2 cm², más preferiblemente de un máximo de 1 cm², preferiblemente como máximo de 1 a 50 mm² o bien hasta 20 mm², con lo que el fluido portador sólo puede moverse por delante de la superficie de metal a una distancia limitada de la misma y el compuesto precursor contenido en el fluido portador o el compuesto precursor conducido al fluido portador a continuación de la irradiación con láser del metal, es decir, flujo abajo del rayo láser o bien del metal, sólo existe en un segmento de volumen contiguo a la superficie del metal y allí reacciona con las nanopartículas generadas, mientras que a una gran distancia de la superficie del metal, en la que inmediatamente tras la irradiación con láser de la superficie del metal no existe ninguna nanopartícula, esencialmente no existe ningún fluido portador y ningún compuesto precursor.

El rayo láser orientado hacia la superficie del metal en el recipiente o bien canal de paso del flujo, es generado preferiblemente por un láser y atraviesa un segmento de pared transparente para la radiación láser del recipiente o bien de la cámara de flujo. Preferiblemente tiene la cámara de flujo una abertura por encima del cuerpo metálico de 100 µm a 4 mm, con lo que el fluido portador puede fluir en un espesor de capa de 100 µm a 4 mm sobre el cuerpo metálico. Preferiblemente está dispuesta la cámara esencialmente en vertical u orientada para el paso del flujo en dirección vertical, estando orientado el rayo láser hacia una superficie del cuerpo metálico esencialmente dispuesta en vertical. El rayo láser puede estar orientado aproximadamente en horizontal sobre la superficie del cuerpo metálico.

Debido al movimiento correspondiente a la invención del fluido portador sobre la superficie del metal durante la irradiación del metal con láser, se mueven las nanopartículas generadas mediante la irradiación con láser desde el segmento de volumen atravesado por el rayo láser del recipiente o bien del canal de flujo. Como consecuencia es posible que la radiación láser sea una radiación láser de impulsos ultracortos o una radiación láser continua, generada por ejemplo por un láser CW (continuous wave, de onda continua), láser de cuerpo sólido, por ejemplo un láser ND-YAG, láser Erbium YAG, láser Ti-zafiro o una fibra o láser de diodos.

Es preferible que la radiación láser que incide sobre la superficie de metal o de óxido metálico se mueva respecto al cuerpo metálico. El movimiento relativo de la radiación láser respecto al cuerpo metálico puede realizarse mediante una conducción del rayo láser con forma de espiral o de meandro sobre la superficie de metal o dióxido de metal, o mediante un movimiento de este tipo de la cámara con una orientación fija de la radiación láser.

Para generar un movimiento relativo entre el rayo láser y la superficie del metal, puede estar fijado el cuerpo metálico o la cámara de flujo sobre un dispositivo de fijación móvil y/o puede moverse el rayo láser sobre la superficie del metal, por ejemplo mediante el movimiento de un espejo deflector, que orienta el rayo láser desde el medio láser hacia la superficie del metal.

El fluido portador puede enfriarse, preferiblemente hasta una temperatura superior a su punto de solidificación, por ejemplo hasta un máximo de 20 °C, preferiblemente hasta 1 a 10 o bien hasta 5 °C y el fluido portador con o de disolvente orgánico hasta por debajo de 0 °C. Correspondientemente presenta el dispositivo correspondiente a la invención preferiblemente un equipo enfriador para enfriar el fluido portador hasta estas temperaturas.

Preferiblemente se añaden durante el procedimiento flujo abajo del cuerpo metálico otros compuestos precursores, por ejemplo los de reactivos que refuerzan la penetración.

En otra forma de ejecución preferente, en la que el fluido portador se mueve continuamente, con menos preferencia a impulsos, sobre la superficie del metal, es captado un segmento de volumen del canal de flujo, flujo abajo del metal y/o flujo abajo del rayo láser, por un sensor. Preferiblemente es el sensor un espectrómetro, en particular un espectrofotómetro. Alternativa o adicionalmente puede medirse un segmento de volumen flujo arriba del metal y/o flujo arriba del rayo láser mediante un sensor, en particular mediante un espectrómetro. Los valores captados por el espectrómetro, de los que al menos hay uno, pueden utilizarse a elección para controlar el posicionamiento del rayo láser, para controlar el posicionamiento del metal y/o para controlar la radiación láser según la intensidad o el movimiento respecto a la superficie del cuerpo metálico, en particular cuando se trata de radiación láser de impulsos ultracortos para controlar la frecuencia y/o la duración del impulso, por ejemplo acoplando los valores de medida tomados por un espectrómetro con una unidad de control que controla el movimiento del equipo de fijación para el metal, el posicionamiento del rayo láser y/o la generación del rayo láser y/o la adición dosificada del compuesto precursor.

Preferiblemente incluye el procedimiento, a continuación de la generación de conjugados, la etapa de la separación de al menos una parte del fluido portador y/o la etapa de la separación de los compuestos precursores no transformados en conjugados o de nanopartículas no transformadas de los conjugados generados, por ejemplo tras la salida del fluido portador con conjugados allí contenidos a través de la abertura de salida 3. Para separar nanopartículas no transformadas o compuesto precursor del conjugado, pueden utilizarse procedimientos de separación tradicionales, en particular procedimientos cromatográficos, por ejemplo una cromatografía de exclusión de tamaño o una separación cromatográfica de afinidad de conjugados con un medio de cromatografía que presenta analitos inmovilizados, en particular cuando el primer compuesto precursor o bien la componente orgánica del

conjugado que se genera a partir del mismo presenta una afinidad específica con el analito. Para la separación puede realizarse a elección una segunda etapa cromatográfica, específica del componente metálico de los conjugados, por ejemplo en el caso de nanopartículas ferromagnéticas la separación del conjugado del fluido portador mediante un campo magnético, mediante centrifugación y/o mediante AFFFF (fraccionamiento asimétrico flujo-campo-flujo).

Descripción precisa de la invención

La invención se describirá ahora con más precisión con referencia las figuras en base a ejemplos, en los que muestra la

figura 1 una vista esquemática de un dispositivo sencillo para realizar el procedimiento correspondiente a la invención,

figura 2 una forma de ejecución preferente de un dispositivo para realizar el procedimiento continuo,

figura 3 esquemáticamente otra forma de ejecución de un dispositivo para realizar el procedimiento correspondiente a la invención.

En las figuras designan las mismas cifras de referencia elementos con la misma función.

En la figura 1 se muestra un dispositivo sencillo, adecuado para aplicarlo en el procedimiento, que presenta un recipiente 1 con una primera abertura de entrada 2 y una abertura de salida 3, aquí en forma de una abertura común. Para generar un movimiento del fluido portador 4 está dispuesto un equipo de bomba 5 en contacto con el fluido portador 4, por ejemplo dentro del recipiente 1. Tal como se muestra esquemáticamente, puede ser el equipo de bombeo 5 en esta forma de ejecución un agitador.

El metal se fija, en forma de un cuerpo metálico 6, que presenta o que está compuesto por el metal de una sola pieza o particular y/u óxido metálico, mediante un equipo de fijación 7 en el recipiente 1. El equipo de fijación 7 puede también ser un recipiente abierto por un lado, cuando el cuerpo metálico 6 tiene forma pulverulenta. Un láser 8, que presenta un medio de láser junto con elementos ópticos para generar un rayo láser, está dispuesto tal que el rayo láser está orientado hacia el segmento del equipo de fijación 7 sobre el que ha de disponerse el cuerpo metálico 6. Preferiblemente se controla el rayo láser generado por el láser 8 mediante un espejo 9, siendo móvil el espejo 9 y estando controlado para permitir un movimiento del rayo láser respecto al segmento del equipo de fijación 7 en el que está dispuesto el cuerpo metálico 6.

Alternativa o adicionalmente puede estar unido el equipo de fijación 7 con una unidad de control y estar controlado tal que pueda moverse, para mover su segmento en el que ha de colocarse el cuerpo metálico 6 respecto al rayo láser.

Mediante la primera abertura de entrada 2 puede añadirse al líquido portador 4 un primer compuesto precursor 10, que forma un componente orgánico del conjugado con la nanopartícula metálica que genera el rayo láser a partir del cuerpo metálico 6.

Opcionalmente puede añadirse un segundo componente precursor y otros más, por ejemplo reactivos que refuerzan la penetración, que reaccionan como el primer compuesto precursor 10 con la nanopartícula metálica inmediatamente tras ser generada mediante la radiación láser para formar un conjugado.

Las figuras 2 y 3 muestran formas de ejecución en las que el recipiente 1 está realizado como canal de flujo, que durante el procedimiento es recorrido continuamente o por cargas por líquido portador. Correspondientemente pueden combinarse las características citadas con referencia a estas figuras del dispositivo o del procedimiento en cada caso entre sí y/o con las características citadas en la precedente descripción.

La figura 2 muestra una forma de ejecución preferente de un dispositivo para su aplicación en la fabricación de dispositivos correspondientes a la invención para su aplicación en un procedimiento para fabricar conjugados, en el que el recipiente 1 está configurado como canal de flujo. El recipiente 1 presenta en su primer extremo una primera abertura de entrada 2 y en su segundo extremo opuesto una abertura de salida 3. En un segmento del recipiente 1 configurado como canal de flujo está dispuesto un equipo de fijación 7 para alojar un cuerpo metálico 6. Preferiblemente está cerrado el recipiente 1 configurado como canal de flujo en su periferia y presenta respecto al equipo de fijación 7 un segmento 11 transparente para la radiación láser utilizada. Correspondientemente está dispuesto el láser 8, a elección con un espejo 9 para una deflexión controlada tal que el rayo láser está orientado a través del segmento transparente del recipiente 1 configurado como canal de flujo hacia el segmento del equipo de fijación 7 en el que ha de disponerse el cuerpo metálico 6.

En general puede añadirse el primer compuesto precursor 10 al fluido portador antes o después de la entrada en la primera abertura de entrada. Preferiblemente presenta el recipiente 1 configurado como canal de flujo inmediatamente flujo abajo del equipo de fijación 7 una segunda abertura de entrada 16, a la que está conectado un segundo depósito 19 para un primer compuesto precursor 10 y/o para un segundo compuesto precursor, por

ejemplo un compuesto precursor de un reactivo que refuerza la penetración. La tubería de unión con la segunda abertura de entrada 16 presenta preferiblemente un equipo dosificador 15, que para los fines de la descripción se denomina también válvula dosificadora 15.

5 El recipiente 1 configurado como canal de flujo puede presentar adicional o alternativamente a las segundas aberturas de entrada 16 una o varias terceras aberturas de entrada 18, dispuestas en un segmento del canal del flujo entre la primera abertura de entrada 2 y el equipo de fijación 7. La tercera abertura de entrada 18 está acoplada con un segundo depósito 19 y puede controlarse mediante otra válvula dosificadora 15, dispuesta en la tubería de unión entre el segundo depósito 19 y la tercera abertura de entrada 18. El segundo depósito 19 puede estar lleno por ejemplo con un primer 10 y/o un segundo compuesto precursor.

10 Preferiblemente presentan por lo tanto las tuberías que unen la primera abertura de entrada 2 con el primer depósito para fluido portador y una segunda abertura de entrada 16 y una tercera abertura de entrada 18 con el correspondiente segundo y tercer depósito asociado respectivamente, respectivas válvulas dosificadoras 15 controlables, que de manera especialmente preferente están unidas con una unidad de control 21.

15 Para el control y/o mando del dispositivo y del procedimiento, presenta el dispositivo un sensor 22, que detecta una propiedad de los componentes incluidos en el fluido portador. Preferiblemente es el sensor 22 un espectrómetro, en particular un espectrofotómetro, cuya zona de detección es al menos un segmento del volumen interior del recipiente 1. De manera especialmente preferente, presenta el recipiente 1 configurado como canal de flujo, en un tramo entre el equipo de fijación 7 y la abertura de salida 3, es decir, flujo abajo del equipo de fijación 7 o bien flujo abajo del rayo láser, en el que el mismo penetra a través del volumen interior del recipiente 1, un segmento de cubeta 12 que
20 presenta una distancia entre dos paredes de cubeta 13, 14 distanciadas superior al diámetro del canal de flujo, estando dispuesto el detector en una primera pared de cubeta 13 y/o una segunda pared de cubeta 14. La primera pared de cubeta 13 es preferiblemente ópticamente transparente para una longitud de onda medida por el sensor y la segunda pared de cubeta 14 puede ser ópticamente transparente para una longitud de onda generada por un emisor del sensor o para la longitud de onda medida por el sensor, o ser un espejo para reflejar la radiación hacia la
25 primera pared de cubeta 13.

De manera especialmente preferente está unido el sensor 22 con una unidad de control 21, que está equipada para generar señales de control como reacción a los valores de medida del detector para el control del láser 8, la posición del espejo 9 y/o el ajuste de una válvula dosificadora 15, que sirve para añadir dosificadamente un primer y/o
30 segundo compuesto precursor y que para transmitir las señales de control está unida con el láser 8, el equipo de ajuste del espejo 9 y/o las válvulas dosificadoras 15 mediante una línea de datos.

En una forma de ejecución más preferente está unida la abertura de salida 3 mediante una tubería de retorno 23, que preferiblemente contiene una bomba controlada, con la abertura de entrada 2, mediante la que se devuelve al
35 menos una parte del fluido portador controladamente desde la abertura de salida 3 a la abertura de entrada 2, cuando se realiza el procedimiento correspondiente a la invención. En esta forma de ejecución puede reciclarse fluido portador a través del segmento del recipiente 1 en el que la radiación láser está orientada hacia el cuerpo metálico 6 y atraviesa un segmento de volumen del recipiente 1, dando lugar al retorno de al menos una parte del fluido portador a la actuación del rayo láser sobre nanopartículas ya generadas. En esta forma de ejecución es preferible hacer pasar en una primera etapa del procedimiento fluido portador sin compuesto precursor a través del canal de flujo e irradiar el cuerpo metálico 6 con radiación láser, con lo que el retorno de fluido portador desde la
40 abertura de salida 3 hasta la abertura de entrada 2 da lugar a un paso de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, que se encuentran suspendidos en el fluido portador, a través del segmento de volumen del recipiente 1 en el que la radiación láser atraviesa el recipiente 1. Se ha comprobado que la acción de la radiación láser sobre nanopartículas ya generadas y suspendidas en el fluido portador da lugar a una modificación selectiva de las nanopartículas, en particular a una reducción de su tamaño o de su distribución de tamaños y con ello por ejemplo a
45 partículas más pequeñas, que preferiblemente presentan una distribución homogénea o una distribución de tamaños más estrecha. Al respecto se prefiere introducir en una segunda etapa del procedimiento la primera 10 y/o la segunda sustancia precursora a través de una segunda abertura de entrada 16 en el recipiente 1 configurado como canal de flujo, estando detenido el retorno de fluido portador desde la abertura de salida 3 a la abertura de entrada 2 y dejando que salga fluido portador a través de la abertura de salida 3, preferiblemente con subsiguiente separación
50 de al menos una parte del fluido portador de los conjugados generados.

La figura 3 muestra otra forma de ejecución preferente del dispositivo correspondiente a la invención para su aplicación en el procedimiento de fabricación de conjugados, en el que dentro de una carcasa 20 está dispuesto un
55 recipiente 1 configurado como canal de flujo. El láser 8 genera un rayo láser continuo o un rayo láser pulsatorio, que mediante el espejo 9 controlable está dirigido a través de un segmento transparente de la pared del recipiente 1 hacia el cuerpo metálico 6. El espejo 9 está colocado por ejemplo en un equipo de ajuste controlado por una unidad de control y constituye por ejemplo un equipo de exploración (escáner). Una primera abertura de entrada 2 del recipiente 1 configurado como canal de flujo está unida con un depósito (no representado) para fluido portador y está recorrida por líquido portador sometido a presión por ejemplo mediante una bomba 5. El fluido portador puede estar mezclado con compuesto precursor o bien puede aportarse el compuesto precursor a través de segundas aberturas

de entrada 16 y/o terceras aberturas de entrada 18, en particular cuando el fluido portador, al entrar por la primera abertura de entrada 2, no presenta ningún compuesto precursor.

5 Las tuberías que unen la primera abertura de entrada 2 con un primer depósito (no mostrado) para fluido portador, segundas aberturas de entrada 16 y terceras aberturas de entrada 18 con los correspondientes segundo y tercer depósito asociados (no mostrados) presentan preferiblemente respectivas válvulas dosificadoras 15 controlables, que de manera especialmente preferente están unidas con una unidad de control 21, tal como se describe con referencia a la figura 2.

El canal del flujo presenta en un tramo de pared un equipo de fijación 7, sobre el que está dispuesto un cuerpo metálico 6. El segmento de pared 11 frente al equipo de fijación 7 es transparente para la radiación láser.

10 Tal como se representa esquemáticamente, puede estar formado el recipiente 1 por una carcasa 20, que al menos puede dividirse en el segmento en el que está dispuesto el equipo de fijación 7, para posicionar por ejemplo el cuerpo metálico 6 sobre el equipo de fijación.

Ejemplo 1: fabricación de un conjugado de detección con nanopartículas de oro

15 Para fabricar un conjugado de detección con una nanopartícula metálica, se introdujo una lámina de oro como cuerpo metálico en un dispositivo según la figura 1 en una solución acuosa como líquido portador, que contenía una secuencia de ácido nucleínico correspondiente a la ID-sec. núm.3 como compuesto precursor. La lámina de oro se irradió con impulsos de láser de 120 fs con una longitud de onda de 800 nm con una energía máxima de 400 µJ por impulso, diámetro de radiación 4 mm para una distancia de unos 40 mm desde la lente hasta la lámina de oro con una frecuencia de repetición de 5 kHz. La aportación de energía a la lámina de oro era de unos 100 µJ. La solución acuosa contenía aprox. 3 µM de secuencia de ácido nucleínico en agua con una altura de la capa de aprox. 1 cm por encima de la lámina de oro.

20 El análisis de los productos de reacción mediante electroforesis de poliacrilamida mostró sólo una pequeña degradación de la secuencia de ácido nucleínico. El análisis de los productos de reacción mediante microscopio electrónico de transmisión dio como resultado que los conjugados presentan una distribución de tamaños con un promedio de aprox. 5,2 a 5,5 nm. Los conjugados no estaban aglomerados y mostraban una configuración aproximadamente esférica, generándose con los parámetros utilizados unos 20 µg/min de partículas de oro, que realizaron sin otros reactivos químicos de acoplamiento un enlace estable con la secuencia de ácido nucleínico.

25 Al repetir este procedimiento con una aportación de energía más elevada mediante la radiación láser sin o bien alternativamente con movimiento de la solución acuosa, se generaron los mismos conjugados, mostrando su análisis, con el movimiento de la solución acuosa, una proporción inferior de conjugados con secuencia de ácido nucleínico degradada. Aquí se observa que el movimiento correspondiente a la invención del fluido portador permite una elevada aportación de energía mediante radiación láser sobre el cuerpo metálico, sin provocar una degradación significativa de conjugados.

30 El procedimiento se realizó también en un dispositivo con canal de flujo según la figura 3, no reciclándose el líquido portador. La segunda y la tercera aberturas de entrada estaban cerradas, estando unida la abertura de salida con un tubo flexible mediante un recipiente colector. El líquido portador bombeado a través de la primera abertura de entrada 2 contenía un oligonucleótido según la ID-sec. núm. 3 como compuesto precursor y se transportó con un flujo volumétrico de 1 ml/min. El segmento de volumen del canal de flujo entre el cuerpo metálico (lámina de oro) y el segmento de pared transparente era de unos 2 mL. Como láser se utilizó un láser de impulsos ultracortos con una potencia de radiación de aprox. 200 µJ a 300 µJ.

35 Para la purificación se separaron los conjugados generados en el líquido portador mediante centrifugación de oligonucleótidos que no estaban unidos con oligonucleótidos y de nanopartículas no unidas con componente orgánico.

Ejemplo 2: aplicación del procedimiento de fabricación para conjugados para la detección de espermatozoides que contenían cromosoma Y en semen reciente y su clasificación específica del sexo

40 Se diluyó semen de toro recién obtenido de la manera usual en un diluyente y se incubó con conjugado de detección fabricado según una variante del ejemplo 1 durante 30 a 120 minutos, preferiblemente a una temperatura de 20 °C a 40 °C y a continuación se irradió en un citómetro de flujo según el documento US 5125759 o el documento DE 10 2005 044 530 con luz de la correspondiente longitud de onda de activación (520 nm) para la nanopartícula de oro. Se midió la emisión.

45 Para los espermatozoides que contenían cromosoma Y marcados específicamente con conjugado de detección según el ejemplo 1, se midió una señal de luminiscencia, que presentó respecto a la señal medida para los espermatozoides que contenían cromosoma X un máximo desplazado. Esto muestra que este conjugado de detección genera en la hibridación de la secuencia de ácido nucleínico una señal específica para el analito bajo radiación con la longitud de onda de activación, mientras que las células que no contenían ninguna secuencia

hibridizante con la secuencia de ácido nucleínico del conjugado de detección emitían una señal distinta bajo radiación.

5 Para los espermatozoides coloreados con el conjugado de detección del ejemplo 1 específicamente para cada cromosoma, se observó una modificación de la resonancia plasmónica superficial detectada para los espermatozoides que contenían cromosoma Y, mientras que los espermatozoides que contenían cromosoma X mostraron una resonancia plasmónica superficial significativamente menos modificada.

Lista de referencias:

- | | | |
|----|----|--|
| | 1 | recipiente |
| | 2 | primera abertura de entrada |
| 10 | 3 | abertura de salida |
| | 4 | fluido portador |
| | 5 | equipo de bomba |
| | 6 | cuerpo metálico |
| | 7 | equipo de fijación |
| 15 | 8 | láser |
| | 9 | espejo |
| | 10 | primer compuesto precursor |
| | 11 | segmento transparente |
| | 12 | segmento de cubeta |
| 20 | 13 | primera pared de cubeta |
| | 14 | segunda pared de cubeta |
| | 15 | válvula dosificadora, equipo dosificador |
| | 16 | segunda abertura de entrada |
| | 17 | primer depósito |
| 25 | 18 | tercera abertura de entrada |
| | 19 | segundo depósito |
| | 20 | carcasa |
| | 21 | unidad de control |
| | 22 | sensor |
| 30 | 23 | tubería de retorno |

LISTADO SECUENCIAL

- | | | |
|----|-------|--|
| | <110> | centro de láser Hannover e. V. |
| | <120> | procedimiento y dispositivo para fabricar compuestos orgánicos que contienen metales |
| | <130> | M1010-C-PCT |
| 35 | <160> | 9 |
| | <170> | Patentnl versión 3.5 |
| | <210> | 1 |
| | <211> | 39 |

- <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> sec.ID núm. 1: oligonucleótido con especificidad para el cromosoma Y
- 5 <400> 1
tctgtgagac gacgcaccgg tcgcaggttt tgttcaca 39
<210> 2
<211> 17
<212> ADN
- 10 <213> secuencia artificial
<220>
<223> sec.ID núm. 2: oligonucleótido con especificidad para el cromosoma Y
<400> 2
agagactgtg gaaccgg 17
- 15 <210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
- 20 <223> sec.ID núm. 3: oligonucleótido con especificidad para el cromosoma Y
<400> 3
ggcgcactgtg caagcaga 18
<210> 4
<211> 18
- 25 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> sec.ID núm. 4: oligonucleótido con especificidad para el cromosoma Y
<400> 4
- 30 agcacatctc ggtccctg 18
<210> 5
<211> 56
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 35 <220>
<223> sec.ID núm. 5: oligonucleótido

<400> 5
 gggagggcga ugcggaucag ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucggc 56
 <210> 6
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sec.ID núm. 5: siRNA
 <400> 6
 10 accuucaggg ucagcuugc 19
 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> sec.ID núm. 7: componente orgánico para reforzar la penetración
 <400> 7
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15
 20 <210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> sec.ID núm. 8: componente orgánico para reforzar la penetración
 <400> 8
Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10
 <210> 9
 30 <211> 24
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sec.ID núm. 9: componente orgánico para reforzar la penetración
 35 <400> 9
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Tyr Gly Arg Lys

1 5 10 15
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar conjugados que presentan un componente nanoparticular que contiene un metal y un componente orgánico, mediante aportación de un fluido portador (4) en un recipiente (1),
colocando un cuerpo metálico (6), que presenta metal u óxido de metal, en el fluido portador (4),
5 generando nanopartículas que contienen metal mediante irradiación de la superficie del cuerpo metálico (6) con rayo láser,
moviéndose el fluido portador (4) mediante un equipo de bomba (5) sobre la superficie del cuerpo metálico (6) y mezclándose el fluido portador (4) con un compuesto precursor del componente orgánico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1,
10 **caracterizado porque** la radiación láser es una radiación láser continua.
3. Procedimiento según la reivindicación 2,
caracterizado porque la radiación láser es generada por un láser CW (8) de onda continua.
4. Procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque la radiación láser es una radiación láser de impulsos ultracortos.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
caracterizado porque el fluido portador (4) se mezcla con el compuesto precursor antes de moverse sobre la superficie del cuerpo metálico (6).
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
20 **caracterizado porque** el cuerpo metálico (6) está formado por una sola pieza o bien es un metal particular u óxido metálico.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
caracterizado porque el fluido portador (4) se mezcla con compuesto precursor del componente orgánico, después de haberse movido sobre la superficie del cuerpo metálico (6).
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
25 **caracterizado porque** el recipiente (1) está configurado como canal de flujo y el cuerpo metálico (6) está dispuesto en un segmento del canal del flujo entre una abertura de entrada (2) en un primer extremo del recipiente (1) y una abertura de salida (3) en un segundo extremo del recipiente (1) y el fluido portador (4) se mueve desde la abertura de entrada (2) hacia la abertura de salida (3).
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
30 **caracterizado porque** el fluido portador (4) se mueve en flujo turbulento sobre la superficie del cuerpo metálico (6).
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
caracterizado porque al fluido portador se le añade al menos otro compuesto precursor de un componente orgánico, antes o después de que el fluido portador (4) se mueva sobre la superficie del cuerpo metálico (6).
- 35 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
caracterizado porque el fluido portador (4) se acumula en el extremo de salida (3) y se separa el compuesto precursor no transformado con nanopartículas y/o nanopartículas no transformadas con compuesto precursor del conjugado.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 11,
40 **caracterizado porque** al menos una parte del fluido portador se devuelve del extremo de salida (3) al extremo de entrada (2).
13. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado por la generación de una señal de medida cuando se detecta al menos una característica del fluido portador (4) en un segmento de cubeta (12) del recipiente (1).

14. Procedimiento según la reivindicación 13,

caracterizado porque la detección es una detección espectrométrica o una dispersión dinámica de la luz.

5 15. Procedimiento según la reivindicación 12,

caracterizado porque a partir de la señal de medida procedente de la detección del fluido portador, se genera una señal de control para la radiación láser y la misma controla la radiación láser y/o un movimiento relativo de la radiación láser respecto al cuerpo metálico y/o la adición de compuesto precursor al fluido portador.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

10 **caracterizado porque** el primer compuesto precursor está elegido a partir del grupo que incluye oligonucleótidos, péptidos, poliéter, poliéster, poliamida y monómeros con al menos un grupo reactivo, elegido entre enlaces C-C insaturados, grupos bisulfuro, tiol, ceto, carboxi, fosfino, amino y amida.

17. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

15 **caracterizado porque** el metal es oro (Au) y el primer compuesto precursor es un oligonucleótido específico del cromosoma de sexo.

18. Aplicación de un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes para identificar un analito intracelular o extracelular, siendo específico el primer compuesto precursor para los analitos y detectándose la presencia del componente nanoparticular que contiene metal del conjugado en células.

19. Aplicación según la reivindicación 18,

20 **caracterizada porque** las células se clasifican en función de la detección del componente nanoparticular del conjugado en células mediante citometría de flujo en fracciones.

20. Dispositivo para aplicarlo en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15 con un recipiente (1) para alojar un fluido portador (4),

25 un equipo de circulación unido con el recipiente (1) para mover el líquido portador en el recipiente (1) y un equipo de fijación (7) dispuesto dentro del recipiente (1) para fijar un cuerpo metálico (6),

presentando el recipiente una abertura de entrada (2) para la entrada del fluido portador (4) y una abertura de salida (3) para la salida del fluido portador (4),

con un láser (8) equipado para generar radiación láser y orientarlo al segmento del equipo de fijación (7) en el que ha de disponerse el cuerpo metálico (6).

30 21. Dispositivo según la reivindicación 20,

caracterizado porque el equipo de circulación es una tubería de circulación conectada al recipiente (1) con un equipo de bomba, o bien un equipo de bomba (5) dispuesto en el recipiente (1).

22. Dispositivo según la reivindicación 20 ó 21,

35 **caracterizado porque** el recipiente (1) está configurado como canal de flujo, que en su primer extremo presenta la abertura de entrada (2) y en su segundo extremo opuesto presenta la abertura de salida (3), estando dispuesto el equipo de fijación (7) en un segmento del canal de flujo entre la abertura de entrada (2) y la abertura de salida (3) y el canal de flujo presenta un segmento (11) transparente para la radiación láser generada por el láser (8), a través del cual está dirigida la radiación láser.

23. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 22,

40 **caracterizado porque** el canal del flujo presenta un segmento de cubeta (12) que presenta una primera pared de cubeta (13) y una segunda pared de cubeta (14) distanciada de la anterior y en la primera pared de cubeta (13) está dispuesto un sensor (22) para medir al menos una característica del fluido portador (4) y/o de un conjugado.

24. Dispositivo según la reivindicación 23,

45 **caracterizado porque** la primera pared de la cubeta (13) es ópticamente transparente y el sensor (22) es un fotómetro.

25. Dispositivo según la reivindicación 23 o 24,

caracterizado porque la segunda pared de la cubeta (14) es ópticamente transparente y está dispuesta una fuente de radiación en la segunda pared de la cubeta (14) y está orientada hacia la primera pared de la cubeta (13).

26. Dispositivo según la reivindicación 23 o 24,

5 **caracterizado porque** la segunda pared de la cubeta (14) es un espejo.

27. Dispositivo según una de las reivindicaciones 18 a 23,

caracterizado porque a la abertura de salida (3) está conectada una tubería de retorno (23) dotada de una válvula, estando unida dicha tubería con la abertura de entrada (2).

28. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 27,

10 **caracterizado porque** el láser (8) está equipado para generar una radiación láser continua.

29. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 28,

15 **caracterizado porque** el recipiente (1) presenta en un segmento entre el equipo de fijación (7) y la abertura de salida (3) una segunda abertura de entrada (16), que está unida con un equipo dosificador (15) intercalado con un primer depósito (17) para alojar un primer y/o segundo compuesto precursor y/o una tercera abertura de entrada (18) en un segmento entre la abertura de entrada (2) y el equipo de fijación (7), que está unida con el equipo dosificador (15) intercalado con un segundo depósito (19) para alojar un primer o segundo compuesto precursor.

30. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 29,

20 **caracterizado porque** el sensor (22) está unido para transmitir señales de medida con una unidad de control (21), que está equipada para procesar las señales recibidas del sensor (22) y generar señales de control para el control de equipos dosificadores (15), láser (8) y/o la posición del espejo (9) y/o de una válvula (15) en la tubería de retorno (23) y está unido con la misma para la transmisión de señales de control.

FIGURA 1

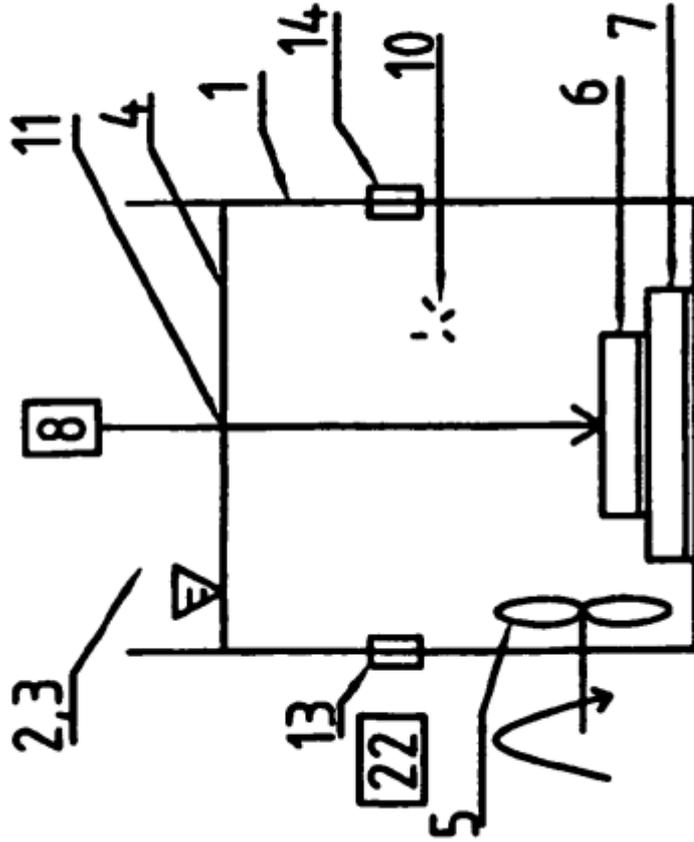


FIGURA 2

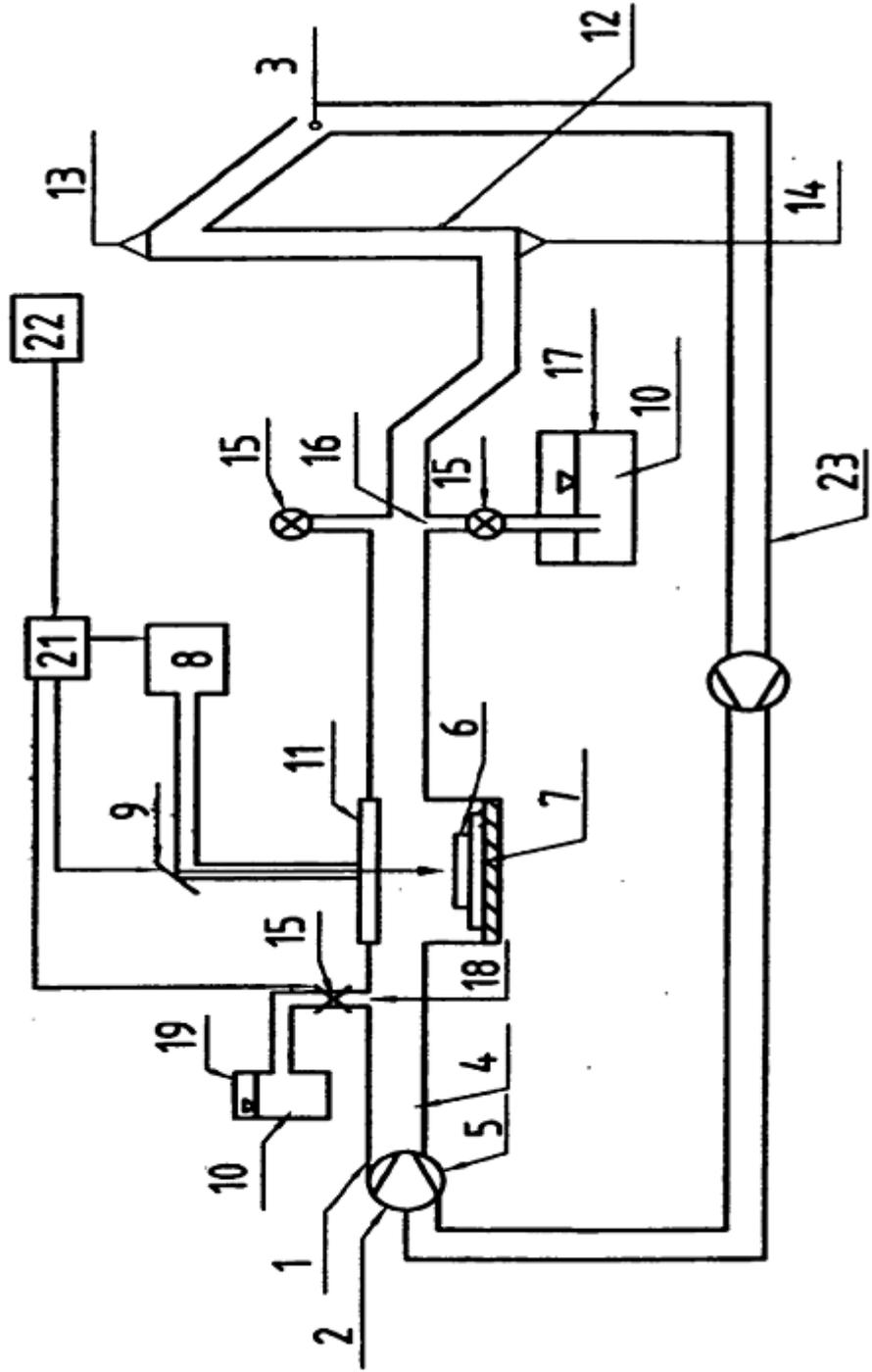


FIGURA 3

