



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 565**

51 Int. Cl.:

C01B 33/14 (2006.01)

C09C 1/28 (2006.01)

C09C 3/00 (2006.01)

C01B 13/32 (2006.01)

C01B 33/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03708174 .2**

86 Fecha de presentación : **04.03.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1483203**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54

Título: **Nanopartículas oxídicas modificadas con inclusiones hidrófobas, método de producción y uso de dichas partículas.**

30

Prioridad: **06.03.2002 DE 102 09 744**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73

Titular/es: **Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung
der angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27C
80686 München, DE
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**

72

Inventor/es: **Geiger, Albert;
Griebel, Dragan;
Herrmann, Rupert y
Kuerzinger, Konrad**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 265 565 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).

ES 2 265 565 T3

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas oxídicas modificadas con inclusiones hidrófobas, método de producción y uso de dichas partículas.

5 La presente invención se refiere a procesos para producir nanopartículas de óxidos metálicos, modificadas con inclusiones hidrófobas, en concreto a partículas de óxidos metálicos que llevan moléculas diana halogenadas; a las partículas así producidas y a su uso, especialmente como tóner, protector solar, insecticida o marcador de biomoléculas.

10 Las partículas de látex son hidrófobas, resultan muy apropiadas como huésped para moléculas hidrófobas, y se usan como tales (Kawaguchi, H., Prog. Polym. Sci. 25 (2000) 1171-1210). Aunque las nanopartículas orgánicas dispersadas en agua se están empleando crecientemente en farmacia, cosmética, fitosanitarios y alimentación, aún quedan, por ejemplo, restos de disolvente que pueden tener un efecto adverso en las respectivas aplicaciones. Actualmente estos problemas se están investigando con intensidad (Horn, D., y Rieger, J., Angew. Chem. 113 (2001) 4460-4492).

15 Como las partículas de óxidos metálicos se sintetizan por métodos químicos de vía húmeda, en una mezcla agua-etanol, lógicamente no llevan tensioactivos, estabilizantes, etc. que puedan interferir. Además hay una superficie multifuncional que se puede modificar según las necesidades, por ejemplo con funcionalidades carboxilo (como ligadores biológicos) o con grupos fluoro-organilo (para influir en las propiedades físicoquímicas de la superficie). Las partículas de los óxidos metálicos son hidrófilas por naturaleza y, por lo tanto, no sirven para alojar moléculas hidrófobas.

20 Las nanopartículas a base de silicatos, teñidas con colorantes hidrófilos, se conocen del estado técnico anterior desde hace mucho tiempo. Se usan en forma de pigmentos, por ejemplo como colorantes para tóners y tintas, para materiales plásticos, y también como marcadores y materiales soporte en el sector médico-técnico.

25 A escala industrial, las partículas de silicato se fabrican principalmente mediante hidrólisis a la llama (p.ej. Aerosol®). Las partículas de silicato obtenidas de este modo pueden colorearse superficialmente o por capas.

30 En la patente US 5,102,763 se describe el uso en tóners de partículas hidrófilas de SiO₂ coloreadas. La superficie de estas partículas se colorea covalentemente haciendo reaccionar partículas de silicato preactivadas, con diversos colorantes.

La producción de partículas coloreadas por enlace covalente de un colorante con la superficie de las partículas se describe en la patente WO 93/10190.

35 Las partículas de silicato que solo están coloreadas en la superficie tienden a perder color por sangrado, con lo cual disminuye la intensidad del color y estas partículas ya no suelen quedar uniformemente coloreadas. No se describe el empleo de estas partículas en la producción de conjugados apropiados para diagnóstico.

40 En la patente US 5,209,998 se describe un proceso para producir partículas coloreadas con una superficie de silicato. El proceso de producción se basa en el recubrimiento de pigmentos con una envoltura de silicato. Por lo tanto solo está coloreado el núcleo de estas partículas. Como aplicación se describe el empleo de estas partículas en tóners electrostáticos, materiales plásticos y tintas; no se revela ninguna aplicación de tipo diagnóstico.

45 Un procedimiento para producir partículas de silicato monodispersas, es decir partículas de silicato de tamaño uniforme, es el proceso sol-gel. Fue descrito por primera vez por Stöber y otros, (Colloid J. Interface Sci. 26 (1968) 62-69). La producción de las llamadas partículas Stöber y sus propiedades se estudiaron posteriormente en detalle por numerosos grupos de trabajo. Estos estudios incluyen la determinación de las condiciones de síntesis necesarias para obtener ciertos tamaños de partícula (Van Helden, y otros, Colloid J. Interface Sci. 81 (1981) 354-68; Giesche, H., J. European Ceramic Soc. 14 (1994) 189-204, Van Blaaderen, A., y Vrij, A., Adv. Chem. Ser. 234 (1994) 83-111), así como investigaciones sobre el crecimiento de las partículas y la composición química (Byers, C. H., y otros, Ind. Eng. Chem. Res. 26 (1987) 1916-1923; Matsoukas, T., y Goulari, E., Colloid J. Interface Sci. 124 (1988) 252-261; Harris, T., y otros, J. Non-Cryst. Solids 121 (1990) 307-403; Matsoukas, T., y Gulari, E., Colloid J. Interface Sci. 132 (1989) 13-21; Badley, R. D., y otros, Langmuir 6 (1990) 792-801).

55 Para dotar partículas de silicato procedentes del proceso sol-gel con colorantes, se han descrito en el estado técnico diversas posibilidades.

60 Van Blaaderen y otros, Langmuir 8 (1992) 2921-2931, así como Quillet y otros, Colloid J. Interf. Sci. 159 (1993) 150-7, prepararon partículas Stöber coloreadas con isotiocianato de fluoresceína o isotiocianato de rodamina (Verhaegh y Van Blaaderen, A., Langmuir 10 (1994) 1427-1438. Los colorantes se hicieron reaccionar antes con 3-aminopropil-trietoxi-silano (AMEO). En este caso el colorante se fijó covalentemente a la superficie o se incorporó covalentemente por capas en la partícula. En estos estudios, la coloración inhomogénea resultante jugaba un papel secundario y el método dio normalmente partículas bastante grandes, con tamaños alrededor de 500 nm de diámetro. Las partículas obtenidas se usaron como sistemas modelo para la investigación básica. Por su elevado tamaño, las partículas de silicato preparadas de esta manera son poco apropiadas para aplicaciones diagnósticas.

Shibata, S., y otros, J. Sol-Gel Sci. And Techn. 10 (1997) 263-268 dotaron físicamente partículas Stöber con distintos colorantes hidrófilos, como rodamina 6G, porfirinas solubles en agua, azul Nilo, etc. Von Schwert, R., disertación

ES 2 265 565 T3

de Würzburg 2000 encontró que en el proceso Stöber solo se pueden incorporar físicamente (no covalentemente) colorantes catiónicos, pero no aniónicos o hidrófobos.

5 Matijevic y otros, Dyes and Pigments 17 (1991) 323-340 presentaron partículas Stöber modificadas superficialmente con 3-aminopropiltrimetoxisilanos, las cuales se unieron a colorantes mediante el grupo amino, en un proceso complejo. La superficie de las partículas Stöber también se modificó de otras maneras diversas, incluyendo reacciones con 3-metacril-oxipropiltrimetoxisilano (MEMO), con octadeciltrimetoxisilano (ODS) y con 3-aminopropiltrimetoxisilano (AMEO) (Giesche, H., y Matijevic, E., Dyes and Pigments 17 (1991) 323-340; Van Blaaderen, A., y Vrij, A., Colloid J. Interface Sci. 156 (1993) 1-18; Badley, R. D., y otros, Langmuir 6 (1990) 792-801; Philipse, A. P., y Vrij, A., Colloid J. Interface Sci. 12 (1989) 121-136; Van Helden, A. K., y Vrij, A., Colloid J. Interface Sci. 81 (1981) 354-368).

15 En el proceso sol-gel se pueden producir partículas de silicato teñidas homogéneamente, incorporando el colorante por enlace covalente (ver patente EP 1 036 763). No obstante, primero hay que silanizar los colorantes, antes de que puedan emplearse en este proceso. La incorporación covalente solo es posible de esta forma.

20 La patente EP 0658525 A revela el uso de compuestos metal-alquilalcoxi polihalogenados para producir capas repelentes del agua. La superficie de un substrato se dota de una capa homogénea repelente del agua, hidrolizando un compuesto metal-alquilalcoxi polifluorado.

La patente DE 10163646 A revela un proceso para recubrir substratos, según el cual, el substrato se reviste en presencia de un compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado, hidrolizando un precursor de óxido metálico. La incorporación de una molécula diana no halogenada es factible.

25 La patente US 2003/0032681 A revela un proceso para producir aerogeles hidrófobos, usando un precursor del óxido metálico y un compuesto metal-alquiloxi polihalogenado.

30 Muchas moléculas diana importantes para la incorporación en nanopartículas, particularmente muchos colorantes, llevan grupos halógenos como sustituyentes. Estos colorantes no son solamente hidrófobos, sino también oleófobos.

35 Son conocidos los recubrimientos fluorados a base de SiO₂ (efecto Lotus, superficies fáciles de limpiar, ajuste de índices de refracción -Kron J., y otros, 2º seminario de Wörlitz: Capas funcionales- superficies adhesivas y anti-adhesivas ("Fördergemeinschaft Dünne Schichten e.V." [Comunidad promotora de capas delgadas, sociedad registrada]), libro de sesiones 2000. Sin embargo, debido a la rápida gelificación durante la producción de partículas con fluoralkiltri-alcoxisilanos, aún no se han sintetizado partículas de silicato fluoradas. Pero este tipo de partículas sería deseable, a fin de poder incluir también moléculas hidrófobas y, especialmente, oleófobas en las partículas de SiO₂.

40 Por tanto, el objeto de la presente invención era modificar el proceso de preparación de partículas de óxidos metálicos, de manera que en partículas de SiO₂, por ejemplo, se pudieran integrar complejos hidrófobos o colorantes orgánicos hidrófobos.

Así pues, el objetivo era desarrollar un proceso que permitiera incorporar colorantes hidrófobos y en concreto oleófobos a partículas de óxidos metálicos.

45 El objetivo se alcanza mediante la presente invención, que se define detalladamente en las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan formas de ejecución preferidas.

50 Sorprendentemente, se encontró que con el proceso sol-gel se pueden producir partículas de óxidos metálicos en presencia de fluororganilalcoxisilano o de arilalcoxisilano e incorporar sin enlace covalente moléculas diana hidrófobas, y especialmente oleófobas, a estas nanopartículas durante dicho proceso de producción.

55 Como proceso sol-gel se entiende cualquier proceso que puede emplearse en analogía con el descrito por Stöber y otros (1968), arriba mencionado, para producir nanopartículas coloidales. Los productos de este proceso se designan como partículas Stöber o nanopartículas.

60 La presente invención se refiere a la incorporación no covalente de "moléculas diana halogenadas" a partículas de óxido metálico. Las moléculas diana en el sentido de la presente invención constan de 5 - 65 por ciento en peso (= en peso) de halógeno y tienen preferentemente un peso molecular comprendido entre 250 y 5.000 Dalton. Las moléculas diana son sobre todo colorantes halogenados e insecticidas halogenados.

La molécula diana halogenada no está silanizada. Por tanto su incorporación a las partículas Stöber es de tipo no covalente.

65 El proceso según la presente invención se caracteriza sobre todo porque por primera vez se han podido preparar partículas Stöber en presencia de un "compuesto metal-alquil-alcoxi polihalogenado". El proceso se puede llevar a cabo en presencia o en ausencia de una molécula diana. Un compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado contiene un radical alquilo lineal o ramificado de 2 hasta 20 átomos de carbono que lleva al menos dos grupos halógeno. El radical alquilo polihalogenado lleva preferiblemente menos de 30 grupos halógeno. Los compuestos metal-alquilalcoxi

ES 2 265 565 T3

polihalogenados particularmente preferidos contienen radicales alquilo de 3 hasta 20 átomos de carbono y 2 hasta 15 grupos halógeno. Se prefieren, sobre todo, los compuestos metal-alquilalcoxi basados en silicio, titanio o circonio, y especialmente los alquilalcoxisilanos.

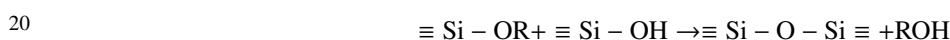
5 Como “precursores de óxidos metálicos” se utilizan en general alcóxidos o halogenuros metálicos. Los alcóxidos metálicos preferidos son los de silicio, sobre todo el tetra-etoxisilano (TEOS) y el tetrametoxisilano (TMES).

10 En el proceso Stöber original, con SiO₂ como óxido metálico, las partículas de SiO₂ se preparan por hidrólisis y condensación de un alcóxido de silicio, casi siempre tetra-etoxisilano (TEOS). La reacción tiene lugar en una mezcla de agua, amoníaco y un alcohol de bajo peso molecular, a menudo etanol. Las reacciones principales para la formación de las partículas de SiO₂ pueden describirse como sigue:

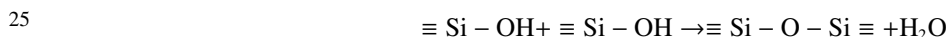
1) hidrólisis



2) condensación I



3) condensación II



4) reacción global



35 Para la síntesis se mezclan primero alcohol, agua y amoníaco y a continuación se añade el TEOS. Según las condiciones de síntesis, después de unos pocos segundos o minutos la solución se vuelve opalescente. Este periodo de inducción aumenta al bajar el tamaño de partícula y la temperatura. El tamaño de partícula de las partículas resultantes tiene una desviación estándar de 2-8%. Durante la reacción, el alcohol sirve de codisolvente para el TEOS, que es insoluble en agua. El amoníaco cataliza tanto la reacción de hidrólisis como la reacción de condensación. La base desprotona los grupos silanol en la superficie de las partículas formadas. Las cargas negativas así producidas estabilizan el sistema coloidal como consecuencia de la repulsión electrostática. Por lo tanto las suspensiones permanecen estables durante varios meses o años. Al mismo tiempo, los grupos silanol presentes permiten una funcionalización de la superficie de las partículas (en la literatura al respecto figuran diversos ejemplos (AMEO, ETEO, MEMO, MPTMO, GLYMO, GF20)). Modificando la superficie adecuadamente puede variarse la dispersabilidad en distintos disolventes.

45 El tamaño de partícula se puede regular mediante la concentración de amoníaco y de agua, mediante la temperatura de reacción y mediante el disolvente empleado. Pueden verse las siguientes tendencias:

- 1) Tanto el incremento de la concentración del amoníaco como del agua aceleran la reacción y hacen aumentar el tamaño de partícula.
- 50 2) Cuanto mayor es la longitud de cadena del alcohol y su grado de ramificación, mayor es el tamaño de partícula y menor la monodispersión.
- 3) El tamaño de partícula aumenta con la longitud del radical alcoxi del silano. La fuerza iónica de la solución reaccionante (efecto salino) también puede influir en el tamaño de partícula, como consecuencia de la compresión de la doble capa electrostática.
- 55 4) Si la concentración de TEOS es superior a 0,2 mol/l, las partículas tienen mayor polidispersión y su esfericidad empeora.

60 Las influencias anteriormente expuestas del proceso Stöber original sobre la formación de partículas también son aplicables, por analogía, a un proceso según la presente invención, en el cual se usa adicionalmente un compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado para integrar p.ej. una molécula diana halogenada en las partículas Stöber obtenidas mediante este proceso.

65 El proceso de la presente invención puede llevarse a cabo, por ejemplo, haciendo reaccionar simultáneamente los componentes precursor de óxido metálico, colorante halogenado y compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado, en las condiciones de reacción apropiadas conocidas del especialista.

ES 2 265 565 T3

Preferentemente, la molécula diana halogenada y el compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado se disuelven con anterioridad en un disolvente adecuado, se mezclan y luego se añaden juntos.

5 Para preparar una partícula de óxido metálico que contenga al menos una molécula diana halogenada, se prefiere especialmente un proceso sol-gel que comprende las etapas de a) preparación de una mezcla que lleva la molécula diana y un compuesto metalalquilalcoxi polihalogenado, b) iniciación del proceso sol-gel con un precursor de óxido metálico, c) adición de la solución a), d) otra adición opcional de precursor de óxido metálico y e) finalización del proceso sol-gel.

10 Las relaciones cuantitativas del precursor de óxido metálico utilizadas en las anteriores etapas b) y d) pueden variar ampliamente. De modo preferente, en la etapa b) se usa entre el 90 y 10% de la cantidad total de precursor de óxido metálico empleada en el proceso y en la etapa d) entre el 10 y 90% restante. Con especial preferencia, las cantidades parciales usadas en b) son del 75 al 25% y en d) del 25 al 75%.

15 También es variable el tiempo de iniciación del proceso sol-gel en la etapa b). Preferentemente es inferior a 1 h, con mayor preferencia entre 1 y 20 minutos, sobre todo entre 2 y 10 minutos.

20 Ha resultado particularmente apropiado ajustar las relaciones molares entre el precursor de óxido metálico y el compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado. Preferentemente se utiliza un 0,04 hasta un 0,4% molar del compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado, sobre todo 0,1 hasta 0,3% molar, referido al precursor de óxido metálico.

25 Las moléculas diana halogenadas llevan preferentemente entre 10 y 65, con especial preferencia entre 15 y 50% en peso de halógeno, hallándose el peso molecular comprendido preferentemente entre 250 y 5.000 Dalton, con mayor preferencia entre 300 y 4.000 Dalton, con especial preferencia entre 400 y 3.000 Dalton.

Los halógenos preferidos para las moléculas diana halogenadas son el flúor y el cloro.

30 La cantidad de molécula diana empleada puede variar según las necesidades. Naturalmente también pueden prepararse partículas que no lleven moléculas diana o solo en cantidades mínimas. Preferentemente se emplea entre 0,1 y 10% en peso de molécula diana, sobre todo entre 0,2 y 5% en peso, referido a precursor de óxido metálico.

35 Como óxidos metálicos o como componentes de óxidos mixtos entran en consideración, sobre todo, los óxidos de los elementos de los grupos III, IV y IVb del sistema periódico. Preferentemente, el precursor de óxido metálico se elige de tal modo que, además de las inclusiones de la molécula diana y del compuesto metal-alquilo polihalogenado incorporado por enlace covalente, las partículas Stöber consten básicamente de B_2O_3 , Al_2O_3 , SiO_2 , SnO_2 , ZrO_2 o TiO_2 .

Naturalmente las partículas a base de óxidos mixtos pueden emplearse de manera análoga en el proceso sol-gel de la presente invención.

40 Se prefieren especialmente los precursores de óxido metálico a base de boro, silicio o circonio, sobre todo de silicio.

La presente invención también se refiere a las partículas que se pueden obtener mediante el proceso conforme a la presente invención.

45 En concreto son partículas que fueron obtenidas por hidrólisis y condensación de precursores sol-gel de elementos de los grupos III, IV, IVb, preferentemente Si (Ti, Zr, Al), en combinación con precursores sol-gel hidrófobos tales como alquiltrialcoxisilanos perfluorados (p.ej. 3,3,3-trifluoro-propiltrimetoxisilano) o bis(trialcoxisililalquil)bencenos (p.ej. bis(trimetoxisililetil)benceno). Estas partículas contienen preferentemente las moléculas diana arriba citadas.

50 Debido al entorno hidrófobo (fluorado) existente en las partículas de óxido metálico preparadas según la presente invención, los fluoróforos, por ejemplo, no manifiestan los efectos negativos que de lo contrario suele tener el agua, es decir no se produce ningún hinchamiento atribuible al agua.

55 La modificación del interior de la partícula, según la presente invención, permite incorporar otras moléculas o complejos tanto hidrófobos (p.ej. LC Red 640) como oleóforos en la matriz oxídica originalmente muy polar, además de los complejos lantanoides. Si es necesario, la superficie de las partículas puede funcionalizarse por ejemplo con grupos carboxilo, amino, mercapto, epoxi y aldehído. Esto también puede realizarse por silanización. El tamaño de partícula se puede ajustar con una distribución estrecha, desde la escala nanométrica hasta la micrométrica.

60 El tipo de partícula no es decisivo (véase fig. 1). Las partículas tienen preferentemente un núcleo formado por un óxido inorgánico. Este núcleo puede ser tener una estructura homogénea (tipo 1) o heterogénea (de tipo núcleo-corteza (2) o según el modelo de pastel de pasas (3)).

65 Las partículas Stöber según la presente invención cargadas con una molécula diana halogenada se pueden usar muy ventajosamente en varios ámbitos técnicos. Son especialmente adecuadas como marcadores de biomoléculas y por tanto para el uso de las biomoléculas marcadas en procedimientos inmunológicos y otros métodos de detección, como tóners de impresión, como agentes de protección solar y como insecticidas. También es factible su incorpora-

ES 2 265 565 T3

ción en cualquier matriz polimérica (p.ej. Ormocer®). El uso como marcador de biomoléculas o como insecticida es especialmente preferido.

5 Las partículas de óxido metálico según la presente invención pueden modificarse *a posteriori*. Así, por ejemplo, las partículas se pueden revestir con una o más capas adicionales, preferentemente incoloras, para proteger químicamente la partícula. La finalidad de esta envoltura es obtener una superficie del óxido metálico lo más uniforme posible, p.ej. una superficie tipo silicato, de la que no sobresalga ninguna molécula de colorante. Esto facilita otros acoplamientos con grupos funcionales y con biomoléculas, y minimiza el peligro de reacciones secundarias con moléculas de colorante en la superficie. Se prefiere aplicar una capa adicional incolora de silicato, con un espesor de 1 hasta 30 nm, sobre todo de 2 hasta 20 nm, alrededor de la partícula de silicato coloreada.

15 Las partículas de óxido metálico según la presente invención pueden dotarse de grupos funcionales, directamente o en la superficie de la capa de adicional de revestimiento, para acoplarse con otras moléculas, preferiblemente con biomoléculas, según la presente invención.

Lo importante es que el grupo funcional introducido esté anclado en la red de la partícula de óxido metálico, con el fin de asegurar una unión estable.

20 Los grupos modificadores preferidos son grupos funcionales como por ejemplo carboxilo, amino, epoxi, hidroxilo o tiol. La introducción de estos grupos es conocida del especialista. Por tanto no hace falta tratarlo por separado.

Es preferible la introducción de grupos carboxilo, que se realiza, por ejemplo, haciendo reaccionar la partícula coloreada de óxido metálico con un anhídrido de diácido que contiene dicho grupo silanol para el anclaje en la partícula. Antes de la reacción con las biomoléculas, a las cuales deben acoplarse, los grupos funcionales pueden activarse transformándolos con N-hidroxisuccinimida en ésteres activos. Todos estos pasos son conocidos del especialista.

30 Los conjugados de la presente invención constan de partículas de óxido metálico cargadas con un colorante halogenado y de biomoléculas. El acoplamiento de las biomoléculas tiene lugar preferentemente mediante los grupos funcionales introducidos en la superficie. En general las biomoléculas se fijan a la superficie de la partícula mediante grupos amino o carboxilo libres o mediante grupos tiol, de modo que la unión covalente se produce preferentemente mediante enlaces amido o tioéter.

35 Como biomoléculas en el sentido de la presente invención se entienden todas las moléculas que pueden emplearse para determinar un analito en una muestra, especialmente para la determinación inmunológica de un analito. El término biomoléculas comprende, por ejemplo, proteínas, glicoproteínas, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, sacáridos, hormonas, haptenos, vitaminas, ligadores naturales o producidos artificialmente y antígenos. Como biomoléculas en el conjugado de la presente invención se prefieren los anticuerpos y sus fragmentos. Como anticuerpos se entienden tanto los monoclonales como los policlonales y los quiméricos y sus correspondientes fragmentos, como por ejemplo Fab, Fc, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv. El acoplamiento con las biomoléculas tipo estreptavidina, avidina o biotina también pertenece a una de las formas de ejecución preferidas de la presente invención.

45 Otro objeto de la presente invención son los conjugados formados por las partículas de óxido metálico según la presente invención y las biomoléculas. Estos conjugados de la presente invención se usan preferentemente en un método para detectar un analito en una muestra, poniendo en contacto la muestra con uno o varios ligadores específicos del analito.

50 El método para detectar un analito se lleva a cabo preferentemente como inmunoensayo, lo cual significa que al menos uno de los ligadores específicos del analito es de tipo inmunológico. En este método, la muestra que lleva supuestamente el analito se incuba con un ligador inmunológico específico. En el caso de un ensayo de antígeno, como por ejemplo para marcadores tumorales como el PSA, este ligador inmunológico específico es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se fija específicamente al analito, es decir al antígeno PSA del tumor. En los métodos de detección de anticuerpos contra un determinado antígeno (p.ej. anticuerpos anti-HCV) como ligador inmunológico específico se puede usar, por ejemplo, el respectivo antígeno. La unión específica se detecta mediante el conjugado de la presente invención cuyo colorante incorporado sirve de marcador. Las biomoléculas inmovilizadas sobre las partículas de óxido metálico actúan como ligadores específicos del analito o como ligadores específicos de una sustancia que a su vez está fijada específicamente al analito.

60 En un proceso de ensayo diagnóstico, por ejemplo, la partícula de óxido metálico puede estar conjugada con una biomolécula tipo estreptavidina o avidina. Luego el conjugado se fija al grupo biotina de una molécula (por ejemplo, de un antígeno peptídico o de una secuencia de ácido nucleico) que ya está biotinilada.

El especialista ya está familiarizado con la realización de inmunoensayos y de pruebas de ácidos nucleicos.

65 Los conjugados conforme a la presente invención se utilizan preferentemente en una prueba basada en una tira de ensayo. A continuación se describe un ejemplo de cómo puede elaborarse una tira de ensayo y cómo se desarrolla un ensayo de este tipo.

ES 2 265 565 T3

Las tiras de ensayo se componen normalmente de un material soporte sobre el que se monta un velo de aplicación, una membrana y un velo absorbente. El conjugado de la presente invención, cuyas biomoléculas son específicas del analito, y, opcionalmente, otros ligadores específicos del analito se aplican y secan en dirección cromatográfica ascendente, o sea por encima del punto de partida de la muestra líquida. Los ligadores específicos y el conjugado de la presente invención no empiezan a migrar cromatográficamente hasta entrar en contacto con un líquido, es decir, con la muestra. Igualmente en dirección cromatográfica se aplican varias proteínas sobre la membrana, formando dos franjas o líneas.

En la primera línea (línea del resultado) se halla inmovilizado un ligador específico del analito. En la primera línea también puede ir fijada una molécula como la estreptavidina, a la cual pueden fijarse luego ligadores biotinilados específicos del analito. En este caso, tanto los ligadores biotinilados específicos del analito como el conjugado deben aplicarse por encima del punto inicial de la tira de ensayo y cromatografiarse junto con la muestra. Sobre la segunda línea en dirección cromatográfica (línea de control) está aplicado un ligador que fija específicamente las biomoléculas del conjugado de la presente invención.

Mientras la muestra líquida migra desde el punto inicial de la tira de ensayo a través de la misma, el conjugado según la presente invención, y eventualmente el ligador específico del analito, empiezan a migrar asimismo hacia el frente líquido. En este proceso, el analito de la muestra se fija específicamente al ligador inmovilizado sobre la primera línea. El conjugado de la presente invención también se fija al analito, formándose un sándwich que puede detectarse por el color de las partículas de óxido metálico. En la tira de ensayo el líquido sigue subiendo hasta el final de la misma. En este proceso, el conjugado de la presente invención que no se ha consumido en la fijación del analito es capturado sobre la segunda línea por el ligador que fija específicamente las biomoléculas del conjugado. Por el color aparecido en la línea de control puede verse que la cromatografía sobre la tira de ensayo ha funcionado básicamente y/o ha finalizado.

Otro objeto de la presente invención es una tira de ensayo diagnóstica que además del conjugado según la presente invención contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la prueba cromatográfica.

Según la presente invención, los conjugados también se pueden usar en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. En tal caso, una sonda de ácido nucleico que se hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico a detectar se acopla como biomolécula con las partículas de óxido metálico coloreadas según la presente invención. La secuencia de ácido nucleico de la muestra o de una mezcla obtenida, por ejemplo, mediante amplificación PCR se puede detectar específicamente por el colorante que llevan las partículas de óxido metálico.

Conforme a la presente invención, los conjugados que llevan las partículas de óxido metálico según la presente invención y una biomolécula también pueden usarse en sistemas de matrices o chips. Esos sistemas son dispositivos de ensayo miniaturizados. Sobre la superficie de fases sólidas apropiadas, tales como plásticos, vidrio, metales u óxidos metálicos se aplican manchas de reactivo separadas entre sí a distancia muy pequeña, del orden de micras. Estas manchas de reactivo contienen los ligadores específicos necesarios para llevar a cabo el correspondiente proceso de detección. Estos métodos permiten detectar simultánea y rápidamente muchos parámetros analíticos diferentes, en un espacio muy reducido, utilizando poca cantidad de material y de muestra. Los conjugados según la presente invención -que comprenden partículas de óxidos metálicos teñidas con colorantes halogenados y biomoléculas- también se pueden usar como reactivos de detección en estos sistemas de matrices o chips. Como colorantes apropiados para teñir las partículas de óxidos metálicos se prefieren los de tipo fluorescente, sobre todo aquellos que permiten medir la fluorescencia por resolución temporal. En concreto los conjugados de la presente invención permiten el uso de conjugados diversamente coloreados y/o de distintos conjugados cargados con distintas biomoléculas, a fin de detectar simultáneamente varios analitos mediante los diferentes colorantes (fluorescentes). Dichos sistemas matriciales han resultado especialmente ventajosos para los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos.

La detección simultánea de varios analitos distintos (por ejemplo ácidos nucleicos específicos de HIV y HCV en una muestra o anticuerpos específicos de HIV y HCV en una muestra) mediante los conjugados según la presente invención, diversamente teñidos y/o cargados con distintas biomoléculas, no queda restringida a la aplicación en sistemas matriciales, pero es particularmente apropiada para ello.

Como material de muestra para todos los ensayos de tipo diagnóstico se puede emplear cualquier fluido corporal. Preferentemente se usa sangre completa, suero, plasma, orina, sudor o saliva.

Otro objeto de la presente invención es el empleo de los conjugados, formados por partículas de óxido metálico según la presente invención y por biomoléculas, en un método diagnóstico, preferentemente inmunológico, para detectar un analito en una muestra.

También es objeto de la presente invención un reactivo diagnóstico que lleva los conjugados conforme a la presente invención. El reactivo puede contener además los aditivos tampón, sales o detergentes conocidos del especialista.

Un kit de ensayo que contiene los conjugados según la presente invención y otros reactivos corrientes conocidos del especialista para la realización de un ensayo también es una de las formas de ejecución preferidas de la presente invención.

Muchos insecticidas importantes tienen un alto contenido de halógenos. Estos insecticidas son moléculas diana preferidas en el proceso de la presente invención para la incorporación no covalente a partículas de óxido metálico y en concreto a partículas de silicato.

5 El tracto digestivo de los insectos y, sobre todo, de las larvas de los insectos difiere fundamentalmente del de los mamíferos. Mientras que en el estómago de los mamíferos hay un pH fuertemente ácido, en el tracto digestivo de las larvas de los insectos se digiere el alimento en un intervalo de pH muy alcalino.

10 Las partículas de óxido metálico, y sobre todo las basadas en silicato o partículas de óxidos mixtos, que contienen más de 20% de silicato tienen la característica especial de hincharse en condiciones de pH alcalino, como las que hay p.ej. en el tracto digestivo de los insectos, y liberar componentes no incorporados por enlace covalente, en concreto insecticidas polihalogenados. Como las moléculas diana insecticidas no están covalentemente unidas a las partículas según la presente invención, se liberan y actúan en el intestino del insecto, es decir precisamente en el lugar deseado.

15 La inclusión de agentes insecticidas en las partículas de óxido metálico mediante el proceso sol-gel según la presente invención tiene el efecto adicional de que p.ej. los principios activos quedan protegidos del agua. El efecto insecticida solo se produce después de que el insecto ingiera alimento. Las partículas sol-gel según la presente invención con agentes insecticidas incorporados son menos tóxicas y/o más compatibles con el medio ambiente que los agentes libres.

20 Los colorantes halogenados con propiedades espectrales importantes para la industria de impresión se pueden incorporar a partículas sol-gel en el proceso conforme a la presente invención. Estas partículas se usan especialmente en combinación con los llamados tóners.

25 Las sustancias halogenadas que pueden incorporarse según la presente invención a partículas de óxidos metálicos incluyen muchos productos que absorben o suprimen la luz UV nociva o que vuelven a emitirla como luz de mayor longitud de onda, menos perjudicial. Las partículas de óxidos metálicos según la presente invención que contienen tales sustancias se usan preferentemente en la industria cosmética como productos de protección solar.

30 La presente invención se ilustra más detalladamente con los siguientes ejemplos, publicaciones y figuras, cuyo ámbito protector resulta de las reivindicaciones. Los procesos descritos deben entenderse como ejemplos que, aun tras las modificaciones, continúan describiendo el objeto de la presente invención.

35 Descripción de las figuras

Fig. 1: representación esquemática de partículas homogéneas (tipo 1) o heterogéneas (núcleo-corteza (tipo 2) o modelo de pastel de pasas (tipo 3)), con matriz de óxido inorgánico.

40 Fig. 2: fórmula estructural del complejo tris-[4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona]-Eu(III) (complejo Eu(NTA)₃).

Fig. 3: espectro UV-Vis del complejo Eu(NTA)₃ en CH₂Cl₂/EtOH (1:1) λ_{Abs.} = 333 nm

45 Fig. 4: espectro de fluorescencia del Eu(NTA)₃ en CH₂Cl₂/EtOH (1:1) λ_{Exc.} = 333 nm.

Asignación de las bandas de fluorescencia a las transiciones espectrales.

50 Asignación de las bandas de emisión*

$$- \lambda_{Em} = 578 \text{ nm } ^5D_0 \rightarrow ^7F_0$$

$$- \lambda_{Em} = 590 \text{ nm } ^5D_0 \rightarrow ^7F_1$$

55 $- \lambda_{Em} = 612 \text{ nm } ^5D_0 \rightarrow ^7F_2$

$$- \lambda_{Em} = 651 \text{ nm } ^5D_0 \rightarrow ^7F_3$$

60 $- \lambda_{Em} = 699 \text{ nm } ^5D_0 \rightarrow ^7F_4$

* Lit.: R. Reisfeld y otros, J. of Alloys and Compounds 300-301 (2000), 147-151.

65 Fig. 5: medición de una muestra sólida de partículas de silicato que contienen el complejo Eu(NTA)₃ fijada sobre un portaobjetos.

ES 2 265 565 T3

Ajustes:

potencia = 950 mV, anchuras de rendija = EX/EM = 10/1

5 fuente de luz = lámpara de xenón

$\lambda_{Exc.} = 333 \text{ nm}$

10

$\lambda_{Em} = 613 \text{ nm}$

Fig. 6: espectro IR de las partículas de silicato dotadas con el complejo Eu(NTA)_3 en una pastilla prensada de KBr

Asignación de las bandas:

15

$$\nu(\text{O} - \text{H}) = 3,430 \text{ cm}^{-1}$$

$$\delta(\text{H}_2\text{O}) = 1,640 \text{ cm}^{-1}$$

20

$$\nu(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 1,100 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

$$\nu(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 800 \text{ cm}^{-1} \text{ (sym)}$$

25

$$\delta(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 471 \text{ cm}^{-1} \text{ (?)}$$

Asignación según: Fendler, J.H., Nanoparticles and nanostructured Films, Wiley-VCH 1998, 180-183.

30

Fig.7: espectro Raman de una muestra sólida de partículas de silicato dotadas con el complejo Eu(NTA)_3

Asignación de las bandas:

35

$$\nu(\text{C} - \text{H}, \text{alifático}) = 2,943, 2,875 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

$$\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 1,452 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 1,068 \text{ cm}^{-1} \text{ (as)}$$

40

$$\nu(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 839, 793 \text{ cm}^{-1} \text{ (sym)}$$

$$\delta(\text{Si} - \text{O} - \text{Si}) = 482 \text{ cm}^{-1}$$

45

Asignación según: Fendler, arriba citado.

Fig. 8: fotografías TEM de partículas de silicato de 130-158 nm dotadas con 4,9 μmoles de complejo Eu(NTA)_3 por g de SiO_2 a 6.300 aumentos (fig. 8 a la izquierda) y a 63.000 aumentos (fig. 8 a la derecha)

50

Fig. 9: espectro RMN de sólidos ^{13}C VACP/MAS del complejo Eu(NTA)_3 .

Interpretación:

55

129, 4/126, 7 ppm; C - H aromático

61, 2 ppm; $\text{CH}_2 - \text{OH}$

60

27, 6 ppm; $\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CF}_3$

17, 4 ppm; $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$

65

Fig. 10: espectro RMN de sólidos ^{29}Si MAS de partículas de silicato dotadas con el complejo Eu(NTA)_3 .

ES 2 265 565 T3

La integración de las señales da como resultado la siguiente distribución:

110,7 ppm; grupos Q4, 70,54%

5 101,1 ppm; grupos Q3, 27,24%

91,0 ppm; grupos Q2, 2,21%

10 Abreviaturas empleadas

AMEO	3-aminopropiltrióxisilano
<Dig>	anti-digoxigenina
15 ETEO	etiltrióxisilano
GF20	anhídrido 2(3-trióxisililpropil)-succínico
20 GLYMO	glicidoxipropiltrimetoxisilano
Ig	inmunoglobulina
LCR	LightCycler Red
25 MAC	anticuerpo monoclonal
MEMO	metacriloxipropiltrimetoxisilano
30 MES	ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico
MPTMO	3-mercaptopropiltrimetoxisilano
BPLA	albúmina de plasma bovino
35 SA	estreptavidina
Si-NP	nanopartícula de silicato
40 TEOS	tetraetoxisilano
TMES	tetrametoxisilano

45 Ejemplo 1

Receta general para preparar complejos lantánido (III)-tris-4,4,4-trifluoro-(1-naftoíl)-1,3-butanodiona

50 Se disolvieron 800 mg (3 mmol) de 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftoíl)-1,3-butanodiona en 15 ml de etanol. A esta disolución se le añadieron seguidamente 3 ml de una solución de NaOH 1 M. En un embudo de decantación se disolvió 1 mmol de cloruro o nitrato de lantano (III) en 5 ml de agua y luego se añadió lentamente por goteo a la solución reaccionante. Luego se agregaron 100 ml más de agua a la mezcla reaccionante y se agitó durante una hora a 65°C. El producto se separó por filtración, en forma de un sólido de color amarillo pálido, y se lavó tres veces, respectivamente, con 5 ml de agua y etanol. A continuación se secó durante 3 horas a 120°C en la estufa.

55 Este método general se usó para preparar complejos de terbio (III), gadolinio (III), disprosio (III) y erbio.

Ejemplo 2

60 *Procedimiento para la integración física de colorantes en nanopartículas de silicato (Si-NP) libres de flúor (“normales”) y en Si-NP organofluoradas (“fluoradas”)*

2.1 Preparación de partículas de silicato normales, teñidas con LightCycler Red 640[®] (partículas de referencia)

65 Se disolvieron 41 mg ($4,29 \cdot 10^{-5}$ moles) de Light-Cycler Red 640[®] en 330 ml de etanol al 99%. A esta disolución se le añadieron 168 ml de agua desmineralizada y 11 ml de una disolución de hidróxido amónico 14 molar. La disolución se temperó a 35°C. Una vez establecido un equilibrio térmico se agregaron 24 ml (107 mmoles) de tetraetoxisilano

ES 2 265 565 T3

(TEOS) bajo fuerte agitación. La reacción estaba completada a las 24 h. Las partículas tienen un tamaño de unos 135 nm de diámetro. Estas partículas se depuraron de colorante no integrado, centrifugándolas tres veces y redispersándolas en etanol fresco.

5 2.2 Preparación de partículas de silicato fluoradas, teñidas con LightCycler Red 640®

a) Receta para partículas con un contenido de 0,3% de fluoro-alquilsilano

10 A una disolución de 165 ml de EtOH, 84 ml de H₂O y 5,5 ml de NH₄OH temperada a 35°C se añadieron 23,8 μmoles de LightCycler Red 640®, luego 6 ml de TEOS y 30 μl (155 μmoles) de 3,3,3-trifluoropropiltrimetoxisilano (relación empleada de LCR 640 : fluoroalquilsilano = 1:7). Después de 5 minutos de agitación se agregaron los 6 ml restantes de TEOS a la mezcla reaccionante. La reacción se interrumpió después de 8 h y las partículas se separaron por centrifugación. Las partículas se redispersaron en H₂O y se purificaron mediante centrifugación y redispersión repetidas.

15

b) Receta para partículas con un contenido de 0,2% de fluoro-alquilsilano

20 A una disolución de 31 ml de EtOH, 20 ml de H₂O y 7 ml de NH₄OH temperada a 30°C se añadieron 23,3 μmoles de LightCycler Red 640®, luego 5 ml de TEOS y 20 μl (119 μmoles) de 3,3,3-trifluoropropiltrimetoxisilano (relación empleada de LCR 640 : fluoroalquilsilano = 1:5). Después de 5 minutos de agitación se agregaron los 5 ml restantes de TEOS a la mezcla reaccionante. La reacción se interrumpió después de 8 h y las partículas se separaron por centrifugación. Las partículas se redispersaron en H₂O y se purificaron mediante centrifugación y redispersión repetidas.

25 2.3 Preparación de partículas de silicato dotadas de Eu(III)-tris-4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona

El complejo de Eu(III)-tris-4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona se preparó siguiendo el procedimiento de Charles, R.G., y Roedel, E.P., J. Inorg. Nucl. Chem. 29 (1967) 715-723.

30 a) Adición simultánea de alcóxido y de una mezcla de alquil-alcoxisilano polihalogenado y molécula diana halogenada

35 A una disolución de 61 ml de agua, 40 ml de etanol y 14 ml de solución de hidróxido amónico, temperada a 30°C, se le añadieron 20 ml de TEOS y una mezcla de 20 mg de tris-[4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona]-Eu(III), 1 ml de diclorometano y 0,25 ml de 3,3,3-trifluoropropiltrimetoxi-silano. La mezcla reaccionante se agitó 4 horas a 30°C y 10 h más a temperatura ambiente. Las partículas se purificaron por centrifugación y luego se redispersaron, primero en etanol y luego, en la siguiente etapa de lavado, en agua.

40 Grado de incorporación (del complejo): 4,9 μmol/g de SiO₂

Contenido de Eu calculado: 0,07%

Contenido de Eu hallado mediante análisis por fluorescencia de rayos X (RFA): 0,05%

45 Tamaño de partícula determinado por TEM: 130-158 nm

b) Adición sucesiva de alcóxido y de una mezcla de alquil-alcoxisilano polihalogenado y molécula diana halogenada

50 En un matraz redondo de 250 ml se prepararon 61 ml de agua y 40 ml de etanol a 30°C. Luego se añadieron 14 ml de solución amoniaca y 10 ml de TEOS. Paralelamente se disolvieron 19,4 mg (20,4 μmoles) de tris-[4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona]-Eu(III) en 1 ml de diclorometano, y la solución se mezcló con 250 μl de trifluoropropiltrimetoxi-silano en un baño de ultrasonidos. Pasados 5 minutos la solución se añadió gota a gota al preparado y se agitó durante 5 minutos más. A continuación se agregaron otros 10 ml de TEOS y la mezcla reaccionante se agitó durante 4 h a 30°C y luego durante 10 horas a temperatura ambiente. La purificación se llevó a cabo con etanol y agua en varios ciclos de lavado.

60 2.4 Preparación del complejo tricloruro de tris-(2,2'-bipiridil)-erbio (III)

Se añadieron 1,1 g (7 mmoles) de 2,2'-bipiridina y 250 mg (0,7 mmoles) de nitrato de erbio (III) (como complejo hidratado indefinido) a 60 ml de metanol. La mezcla reaccionante se calentó a 60°C durante 2 h, agitando fuertemente. Al enfriar precipitó el complejo en forma de polvo amarillento.

La integración en partículas de silicato tuvo lugar tal como se describe en el ejemplo 2.3a.

65

ES 2 265 565 T3

2.5 Preparación del complejo tricloruro de tris-(2,2'-bipiridil)-terbio (III)

Se añadieron 1,47 g (9,43 mmol) de 2,2'-bipiridina y 250 mg ($9,43 \cdot 10^{-4}$ moles) de cloruro de terbio (III) hexahidrato a 60 ml de metanol. La mezcla reaccionante se calentó a 60°C durante 2 h, agitando fuertemente. Al enfriar precipitó el complejo en forma de polvo amarillento.

La integración en partículas de silicato tuvo lugar tal como se describe en el ejemplo 2.3a.

2.6 Preparación del complejo tricloruro de tris-(1,10-fenantrolin)-terbio (III)

Se añadieron 482 mg (2,67 mmoles) de 1,10-fenantrolina y 250 mg (0,94 mmoles) de cloruro de terbio (III) hexahidrato a 20 ml de metanol. La solución se agitó a 60°C durante 2 h y luego se enfrió lentamente a temperatura ambiente (durante la noche). La solución amarilla resultante se recubrió con n-pentano. El complejo precipita en forma de polvo.

La integración en partículas de silicato tuvo lugar tal como se describe en el ejemplo 2.3a.

2.7 Resumen del comportamiento de integración de colorantes diferentes en partículas de silicato no modificadas y modificadas con halógeno

Integración de	Integración en	
	Si-NP normales	Si-NP fluoradas
Colorantes fluorados	(-) Tb(III)-bipi (-) Er(III)-bipi (-) Tb(III)-fen	(-) Tb(III)-bipi (-) Tb(III)-fen
Colorantes fluorados o halogenados	(-) Eu(NTA) ₃ (-) LCR 640	(+) Eu(NTA) ₃ (+) Er(NTA) ₃ (+) LCR 640
<p><u>Leyenda:</u></p> <p>(-) integración negativa (+) integración positiva bipi = α, α'-bispiridina fen = 1,10-fenantrolina</p>		

Ejemplo 3

Modificación de la superficie con GF20 (receta para la introducción de grupos carboxilo)

La dispersión obtenida en el ejemplo 2.1 o 2.2 no debería tener un pH superior a 9,0. Si es necesario, hay que realizar más ciclos de lavado (centrifugación/redispersión). A la dispersión etanólica resultante, de 250 ml de volumen, se le añadieron 210 μ l ($75,4 \cdot 10^{-5}$ moles) de anhídrido 2-(3-trietoxisililpropil)-succínico (GF20), agitando fuertemente. La solución reaccionante se agitó durante 15 h a 40°C. Para su purificación, las partículas se separaron por centrifugación y se redispersaron en agua. Esta etapa de purificación se repitió dos veces más. Se obtiene una dispersión acuosa de partículas modificadas en superficie, con un grado de cobertura de unos 2 grupos CO₂H/nm² de superficie de partícula.

Ejemplo 4

Preparación de conjugados a partir de partículas de silicato coloreadas con LightCycler Red 640 y de anticuerpos anti-digoxigenina (conjugados <Dig>)

Se centrifugaron 10 mg de partículas de silicato (0,5 ml de suspensión al 2%) durante 30 minutos a 15.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el aglomerado sólido se volvió a suspender en 1 ml de tampón MES 2 mM de pH 6,5. Este proceso de lavado se repitió otra vez. A continuación se añadieron 100 μ l de tampón MES 100 mM de pH 6,5, 100 μ l de sulfo-N-hidroxisuccinimida al 2% (peso/vol.) (S-NHS; Pierce n° 24510) en tampón MES de pH 6,5 y 100 μ l de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-diamino-propil)-carbodiimida al 0,2% (peso/vol.) (EDC; Pierce n° 22980ZZ) en tampón MES de pH 6,5. Tras un periodo de 20 minutos de incubación en una incubadora giratoria, se centrifugó durante 30 min. a 15.000 rpm y se retiró el sobrenadante. El aglomerado sólido se redispersó en 867 μ l de tampón MES 2 mM de pH 6,5 y se agregaron 133 μ l de disolución MAC<Dig>M-IgG (anticuerpo monoclonal IgG anti-digoxigenina de ratón; concentración = 15 mg/ml). Luego se incubó durante 2 h a temperatura ambiente (TA). A continuación se

ES 2 265 565 T3

añadió 1 ml de una solución de albúmina de plasma bovino (BPLA) en tampón de fosfato potásico 5 mM de pH 7,4 y se incubó durante 60 min. más a TA. Se centrifugaron las partículas conjugadas, se retiró el sobrenadante y el aglomerado sólido se suspendió otra vez en 1 ml de tampón 5 mM. El proceso de lavado con fosfato potásico se repitió dos veces y, después de la última etapa de centrifugación, las partículas se suspendieron de nuevo en 0,5 ml de BPLA al 2% en tampón Hepes 5 mM de pH 7,4.

Ejemplo 5

Empleo de conjugados <Dig>-partículas de silicato en una prueba con tiras de ensayo

Las tiras de ensayo necesarias para llevar a cabo los experimentos están formadas por una lámina de plástico, sobre la cual se pega un velo de aplicación, una membrana y un velo absorbente. En la membrana hay dos proteínas inmovilizadas sobre líneas diferentes: estreptavidina y anticuerpo anti-IgG de ratón.

Se inmovilizó Poly-SA sobre la línea diana o línea del resultado, es decir, la primera línea en dirección de la cromatografía, a fin de capturar específicamente partículas unidas con péptido digoxigenilado y biotinilado, mediante la fijación de biotina. Los anticuerpos anti-IgG de ratón se inmovilizaron sobre la línea de control, es decir, la segunda línea en dirección de cromatografía. Estos anticuerpos anti-IgG de ratón deberían captar todas las partículas en exceso, no fijadas en la línea del resultado (conjugados de los anticuerpos anti-digoxigenina del ratón con las partículas de silicato).

Según la variante de tira de ensayo, el velo de aplicación se impregnó con el material de muestra sometido al ensayo, es decir, con 1 $\mu\text{g/ml}$ o 0 $\mu\text{g/ml}$ de un péptido biotinilado y digoxigenilado. Para diluir las partículas de silicato y para relavar las tiras de ensayo se utilizó un tampón Hepes 100 mM de pH 7,5 (NaCl 50 mM, urea 70 mM, EDTA 1 mM, BPLA al 2%). Las partículas de silicato se diluyeron en el tampón Hepes hasta una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

A continuación se pipetearon 60 μl de dicha dilución de partículas de silicato sobre el velo de reacción y se cromatografió durante 10 minutos. Luego se pipetearon 40 μl de tampón Hepes sobre el velo de reacción y se cromatografió durante 10 minutos más. Al final se evaluó la tira de ensayo. En ausencia del péptido (= analito) solo era visible la línea de control, en presencia del péptido era visible asimismo la línea del resultado.

Los conjugados según la presente invención formados por partículas de silicato teñidas con colorantes halogenados y por biomoléculas (aquí: anticuerpos anti-digoxigenina) son, por lo tanto, apropiados como reactivos de detección en tiras de ensayos inmunológicos.

Lista de referencias

Badley, R.D., y otros, *Langmuir* 6 (1990) 792-801

Byers, C.H., y otros, *Ind. Eng. Chem. Res.* 26 (1987) 1916-1923

Charles, R.G., y Roedel, E.P., *J. Inorg. Nucl. Chem.* 29 (1967) 715-723

Patente EP 1 036 763

Fendler, J.H., *Nanoparticles and Nanostructured Films*, Wiley-VCH 1998, 180-183

Giesche, H., y Matijevic, E., *Dyes and Pigments* 17 (1991) 323-340

Giesche, H., *J. European Ceramic Soc.* 14 (1994) 189-204

Harris, T., y otros, *J. Non-Cryst. Solids* 121(1990) 307-403

Horn, D., y Rieger, J., *Angew. Chem.* 113 (2001) 4460-4492

Kawaguchi, H., *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 1171-1210

Kron, J., y otros, 2º Seminario de Wörlitz, libro de sesiones 2000

Matijevic, y otros, *Dyes and Pigments* 17 (1991) 323-340

Matsoukas, T., y Goulari, E., *Colloid J. Interface Sci.* 124 (1988) 252-261

Matsoukas, T., y Goulari, E., *Colloid J. Interface Sci.* 132 (1989) 13-21

Philipse, A. P., y Vrij, A., *Colloid J. Interf. Sci.* 12 (1989) 121-136

ES 2 265 565 T3

Quellet, y otros, *Colloid J. Interface Sci.* 159 (1993) 150-7

Reisfeld, R., y otros, *J. of Alloys and Compounds* 300-301 (2000), 147-151

5 **Schwert**, R., Disertación, *Würzburg* (?) 2000

Shibata, S., y otros, *J. Sol-Gel Sci. and Techn.* 10 (1997) 263-268

Stöber, y otros, *Colloid J. Interface Sci.* 26 (1968) 62-69

10

Patente U.S. nº 5,102,763

Patente U.S. nº 5,209,998

15

Van **Blaaderen**, A., y **Vrij**, A., *Adv. Chem. Ser.* 234 (1994) 83-111

Van **Blaaderen**, A., y **Vrij**, A., *Colloid J. Interface Sci.*, 156 (1993) 1-18

Van **Blaaderen**, y otros, *Langmuir* 8 (1992) 2921-2931

20

Van **Helden**, A.K., y **Vrij**, A., *Colloid J. Interf. Sci.* 81 (1981) 354-368

Verhaegh, y Van **Blaaderen**, A., *Langmuir* 10 (1994) 1427-1438

25

Patente WO 93/10190.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 265 565 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso sol-gel para producir una partícula de óxido metálico que contenga al menos una molécula diana halogenada, el cual comprende las etapas siguientes
- 10 a) preparación de una mezcla que contiene la molécula diana y un compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado,
 - b) inicio del proceso sol-gel con el precursor de óxido metálico,
 - c) adición de la solución de a),
 - 15 d) adición opcional del precursor de óxido metálico y
 - e) finalización del proceso sol-gel.
- 20 2. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa a) se usa de 90 hasta 10% del precursor de óxido metálico y en la etapa d) de 10 hasta 90% del mismo.
3. Proceso según una de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque se usa entre 0,04 y 0,4% molar de compuesto metal-alquilalcoxi polihalogenado, respecto a la cantidad de partida de precursor de óxido metálico.
- 25 4. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se emplea entre 0,1 y 10% en peso de molécula diana respecto a la cantidad de partida de precursor de óxido metálico.
5. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la molécula diana halogenada está clorada o fluorada.
- 30 6. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el óxido metálico consta de B_2O_3 , Al_2O_3 , SiO_2 , ZrO_2 o TiO_2 , o bien de óxidos mixtos.
7. Partícula de óxido metálico que puede obtenerse mediante el proceso según una de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 8. Empleo de una partícula según la reivindicación 7 como marcador para biomoléculas.
9. Empleo de una partícula según la reivindicación 7 como agente de protección solar.
10. Empleo de una partícula según la reivindicación 7 como tóner.
- 40 11. Empleo de una partícula según la reivindicación 7 como insecticida.

45

50

55

60

65

Fig. 1

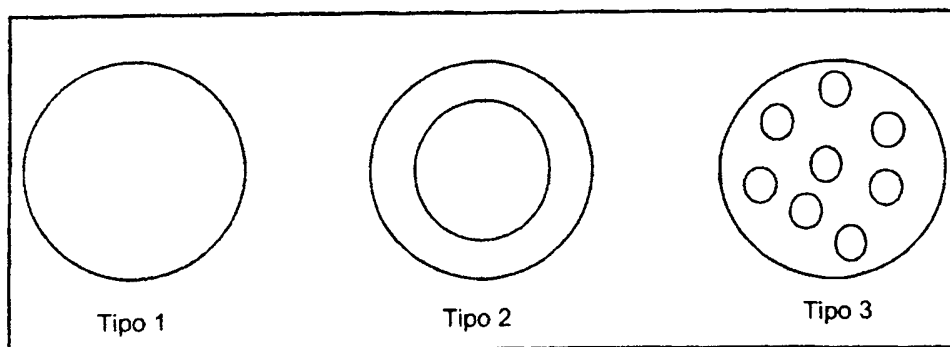


Fig. 2

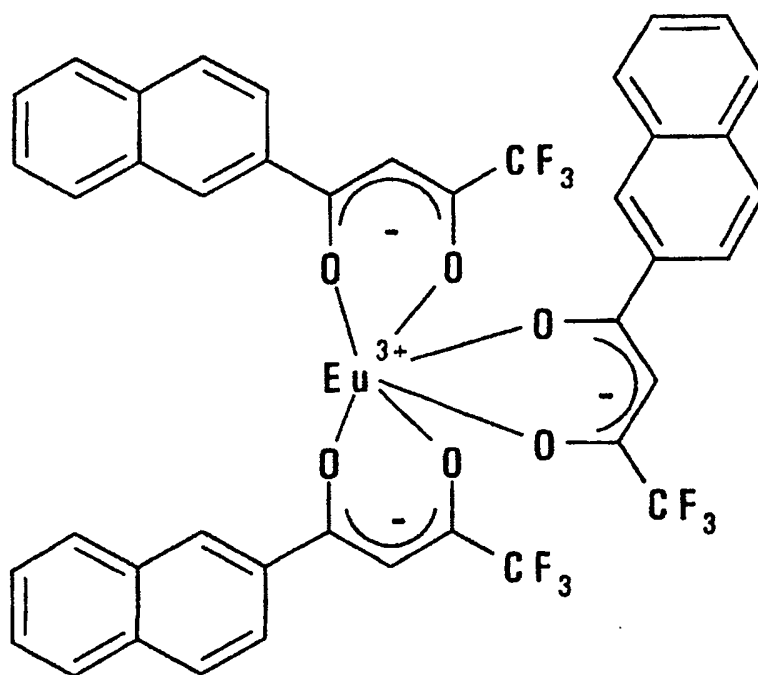


Fig. 3

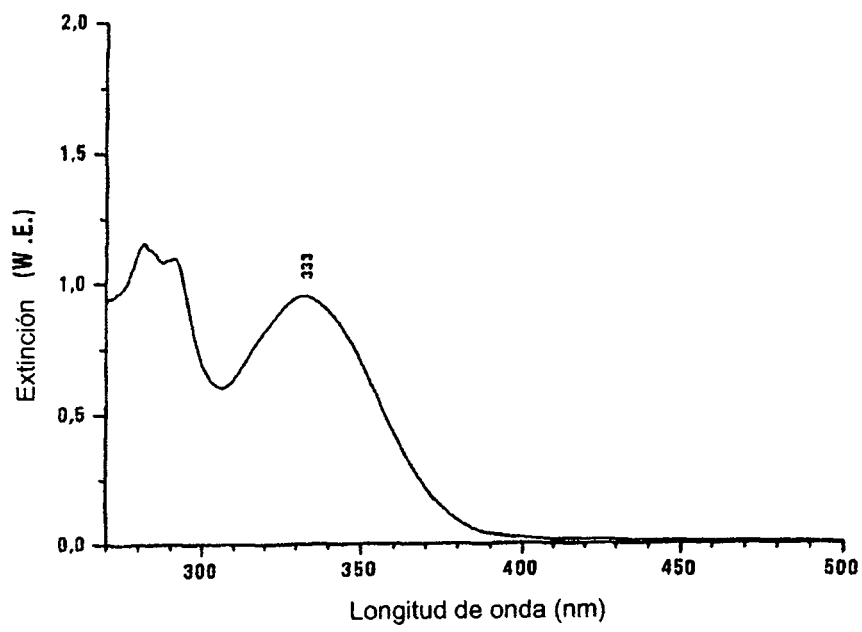


Fig. 4

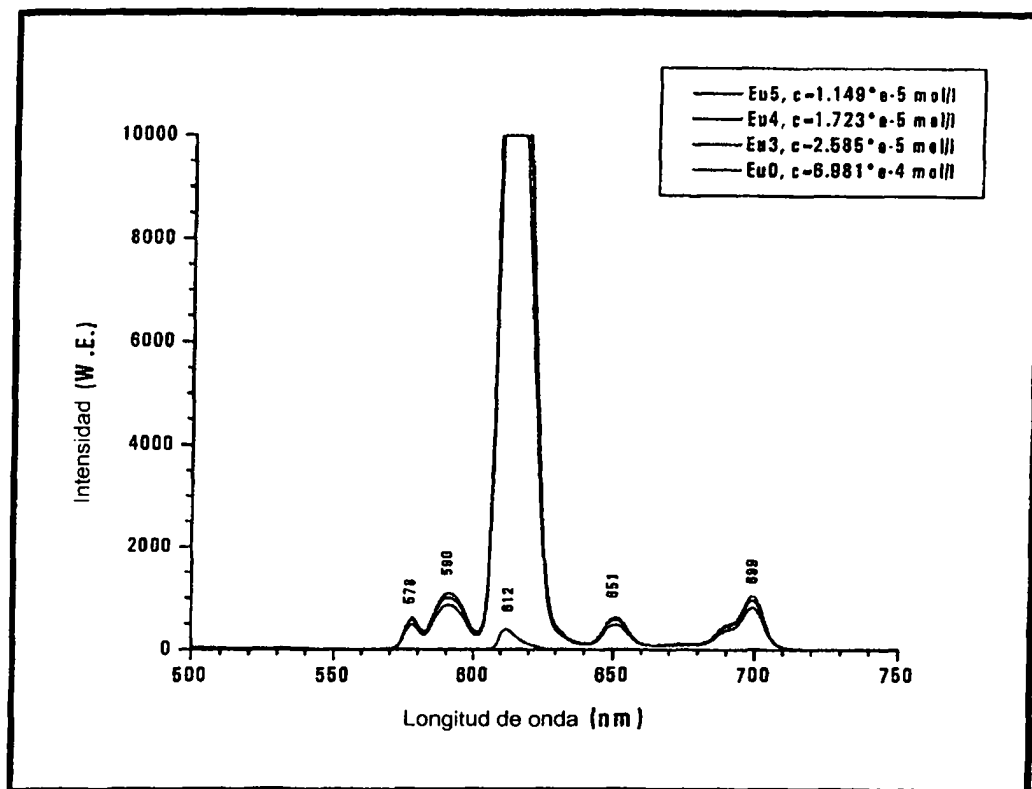


Fig. 5

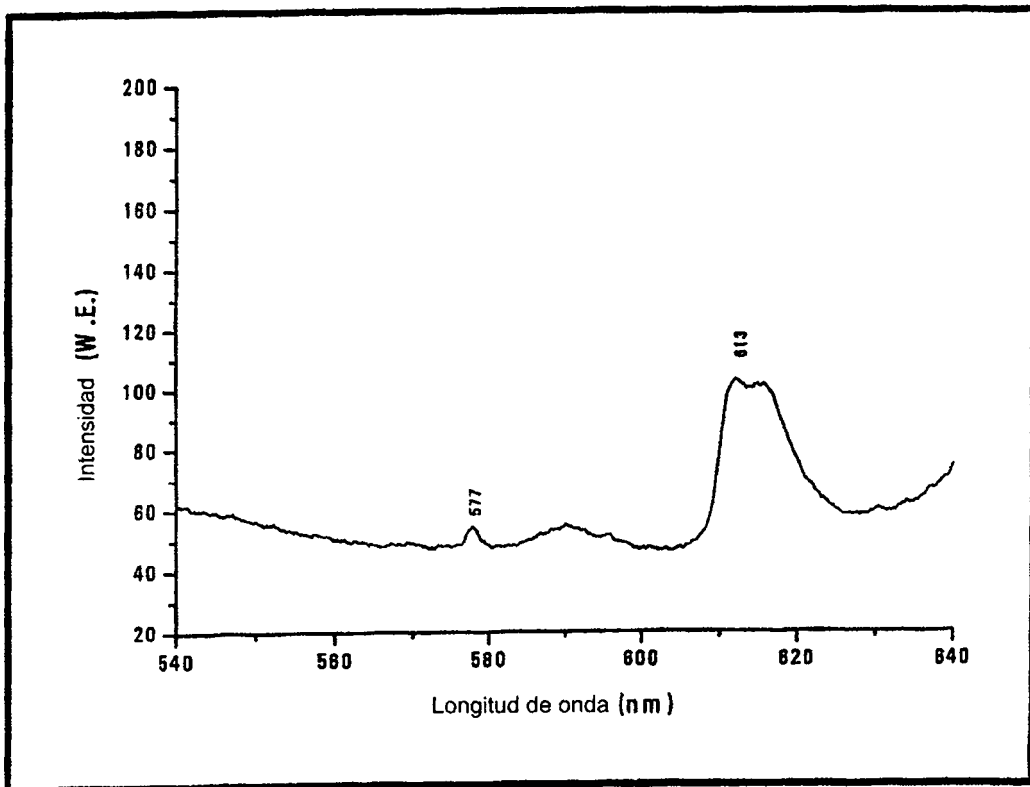


Fig. 6

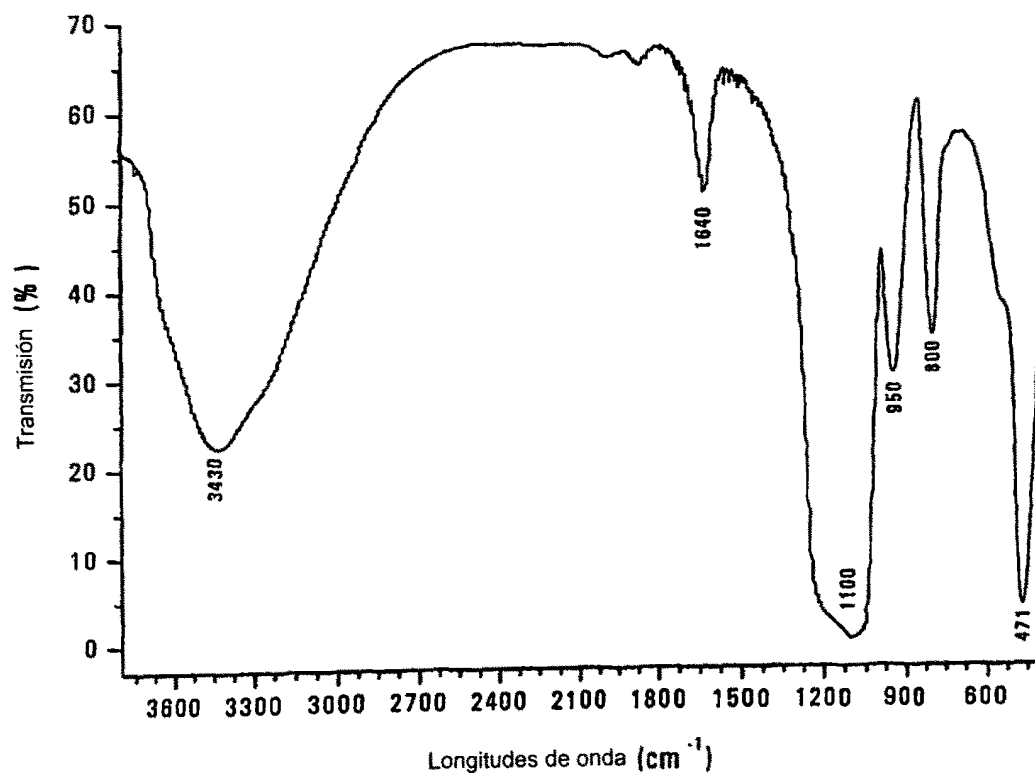


Fig. 7

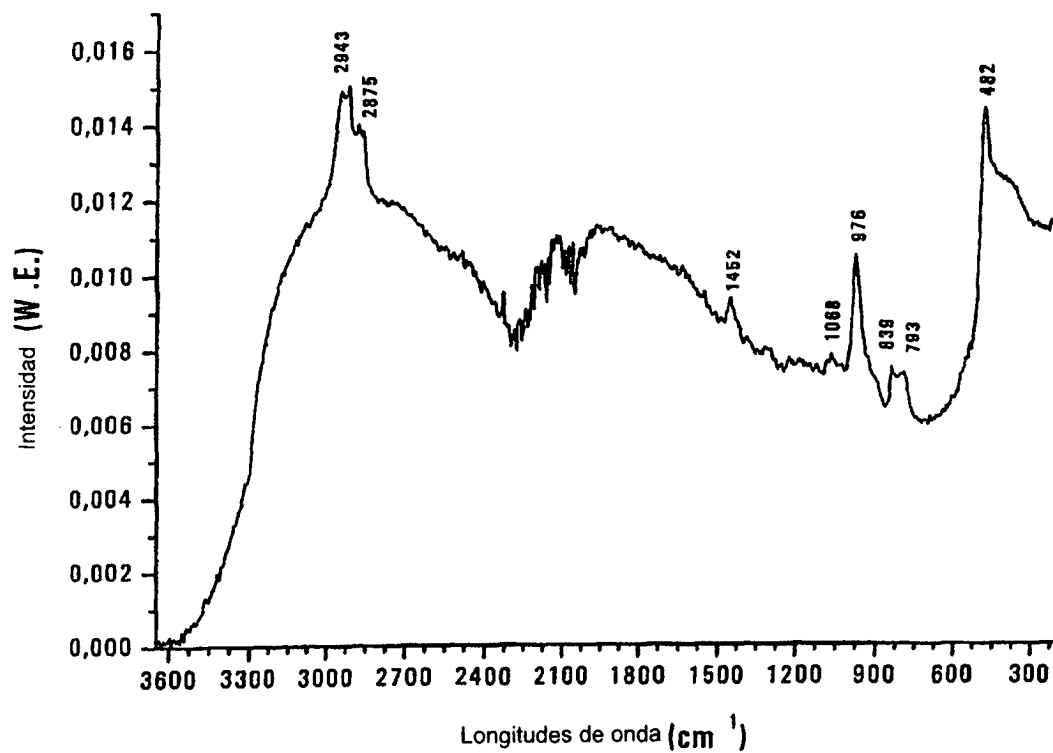


Fig. 8

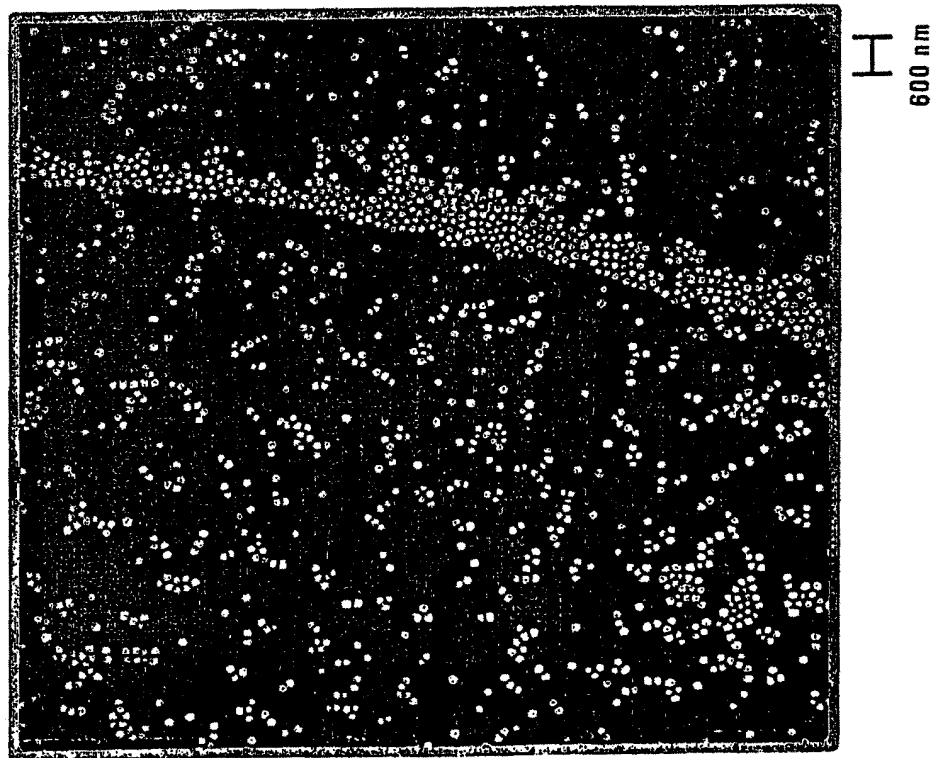
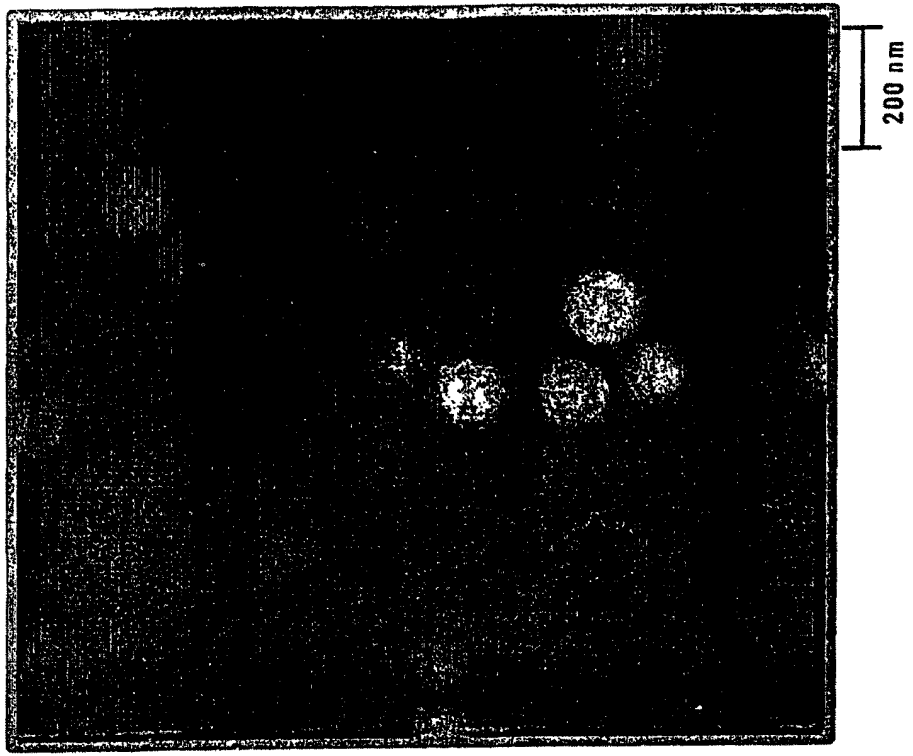


Fig. 9

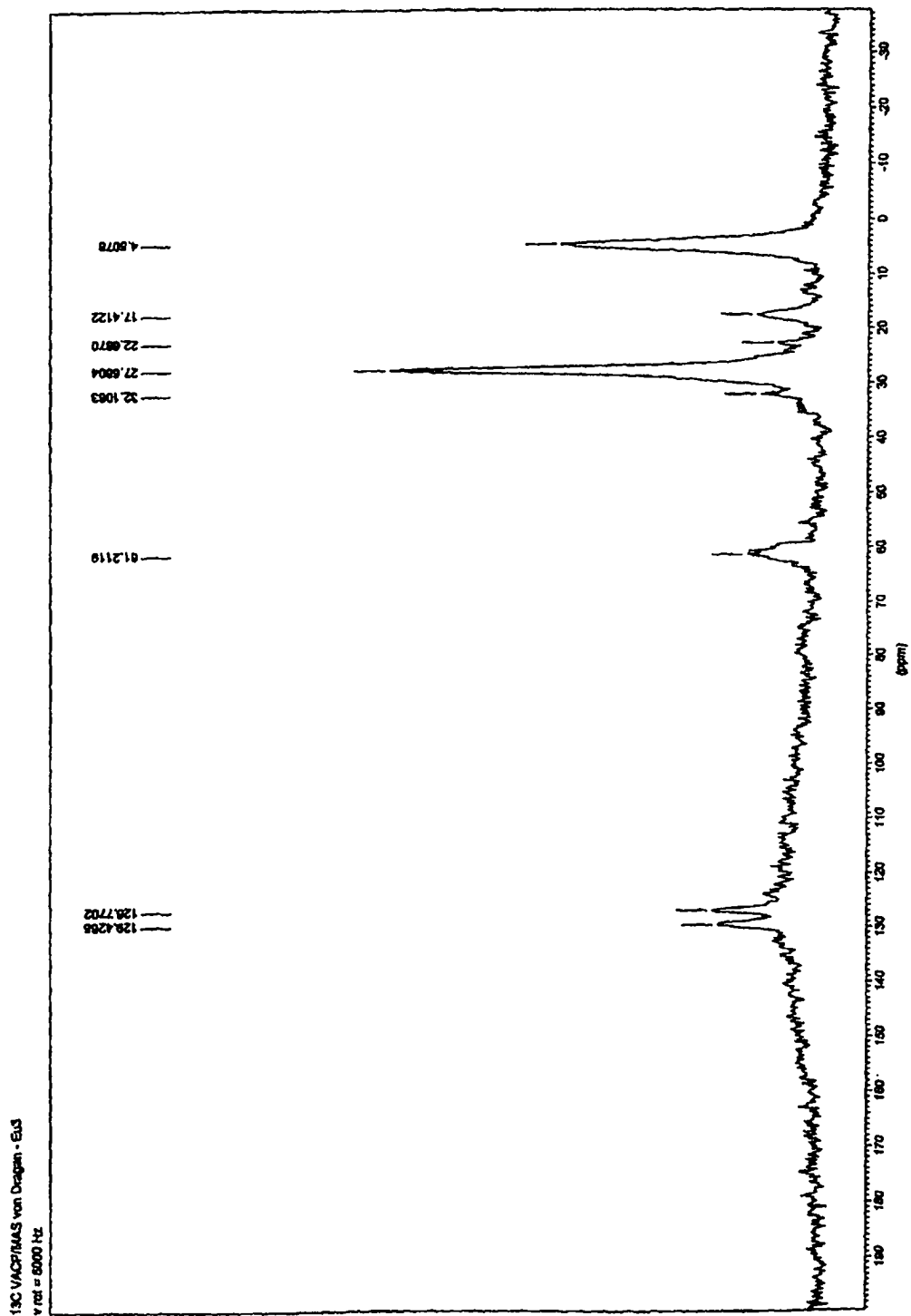


Fig. 10

