



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000029914
Data Deposito	02/07/2015
Data Pubblicazione	02/01/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	1	42

Titolo

METODO PER L'APERTURA PLASMONICA DI PORI IN UNA MEMBRANA CELLULARE.

TITOLO: "Metodo per l'apertura plasmonica di pori in una membrana cellulare"

DESCRIZIONE

5 Settore tecnico

La presente invenzione si riferisce a un metodo per l'apertura di pori in una membrana cellulare.

Sfondo tecnologico

Sono noti nel settore vari metodi per l'apertura di 10 pori in una membrana cellulare.

Questa tecnica, denominata anche "porazione" (traduzione del termine inglese "poration"), è tipicamente utilizzata per ottenere un accesso all'interno della cellula attraverso la membrana cellulare. Tale accesso può 15 essere, ad esempio, finalizzato a:

- fornire sostanze di diverso tipo all'interno della cellula, a seguito dell'apertura dei pori;
- misurare una quantità riferita ad una proprietà nell'ambiente intracellulare; e
- 20 - ottenere una discriminazione delle informazioni intracellulari ed extracellulari.

Una tipologia di metodo per l'apertura di pori in una membrana cellulare prevede l'uso di nanostrutture. Un esempio di tale tipologia è dato dalla pubblicazione 25 "Interfacing Silicon Nanowires with Mammalian Cells" di Woong Kim, et al., 2007. Il maggior inconveniente dovuto a questo metodo consiste nel fatto che esso non consente un controllo di tipo "valvolare" sul processo di apertura di pori e nel fatto che nella cellula viene realizzata 30 l'apertura oppure essa non viene realizzata.

Ulteriori tipologie sono basate su metodi chimici. Tra le più diffuse vi sono quelle che prevedono una strategia

di tipo "cavallo di troia" (in lingua inglese nota come "trojan horse"), ovvero in cui la molecola di interesse viene legata un'altra molecola o bio-agente che di per sé è capace a superare la membrana cellulare. Un tipico esempio 5 è rappresentato dai virus. L'inconveniente principale di questo tipo di approccio è che per ogni tipo di molecola per ogni diversa linea cellulare, bisogna trovare un agente che faccia da "cavallo" e quindi studiare un protocollo chimico specifico che permetta di legare i due agenti.

10 Inoltre questa operazione va eseguita senza alterare le capacità del "cavallo" del virus di oltrepassare la membrana. Inoltre ancora nel caso specifico dei virus, sorgono problemi di sicurezza per il loro impiego. Inoltre questo metodo è tipicamente messo in atto mediante il 15 rilascio di sostanza nel liquido della cellula e dunque non vi è controllo o selettività sulla cellula in cui avviene l'apertura dei pori.

Ancora un'altra tipologia di metodo per l'apertura di pori in una membrana cellulare utilizza energia elettrica; 20 tale tipologia è conosciuta nel settore con il termine "elettroporazione" (traduzione dell'espressione della lingua inglese "electroporation"). Un esempio di tale tipologia è dato dal brevetto statunitense No. US 4,822,470, avente il titolo "Method and apparatus for cell 25 poration and cell fusion using radiofrequency electrical pulses". Nel suddetto brevetto, l'apertura di pori viene ottenuta grazie ad una corrente elettrica che provoca una rottura nella membrana. In questo caso, vi sono due principali inconvenienti. Un primo inconveniente è dato dal 30 fatto che l'elettroporazione può essere causa di danneggiamento cellulare che è difficile da stimare, soprattutto in cellule che sono sensibili alla corrente

elettrica quali ad esempio neuroni e cardiomiociti. Un secondo inconveniente è dato dal fatto che - per avere un controllo e una selettività - su una singola cellula (all'interno di un gruppo di cellule) è necessario tipicamente realizzare una circuiteria complessa e costosa.

Una ulteriore tipologia di metodo per l'apertura di pori in una membrana cellulare prevede il taglio della membrana cellulare mediante laser oppure mediante laser accoppiato con oggetti metallici, quali nano-particelle oppure nano-aste (anche definite in lingua inglese come "nano-rod"). Un esempio di una siffatta tecnologia può essere reperito nella pubblicazione "Mechanism of femtosecond laser nano-surgery of cells and tissues", di Vogel et al., 2005. I processi ivi descritti non sono basati su effetti plasmonici, ma sulla formazione di una bolla di cavitazione che provoca - in modo indesiderabile - uno shock meccanico alla membrana. Alcuni degli svantaggi connessi a questo metodo sono dovuti al fatto che le potenze laser coinvolte sono molto elevate ed inoltre il laser deve essere focalizzato in modo molto preciso sulla membrana cellulare. Quindi, l'apertura di pori in membrane di molte cellule risulta molto difficile da attuare in breve tempo, a causa del fatto che il laser deve essere focalizzato nuovamente di volta in volta per ciascuna cellula.

La pubblicazione brevettuale No. US 7,834,331 (Ben-Yakar et al.) riguarda una tecnica di nano-ablazione mediante laser a femtosecondi, denominata in lingua inglese anche come "*Plasmonic Laser Nano-ablation*" e abbreviata dall'acronimo PLN. Questa tecnica trae vantaggio dallo scattering plasmonico amplificato da superfici (in lingua inglese "*surface-enhanced plasmonic scattering*") di impulsi

laser ultracorti mediante nano particelle per vaporizzare strutture sub-cellulari del volume dell'attolitro. Nella suddetta nano-ablazione mediante laser a femtosecondi o PLN, ciascuna particella agisce come una "nano-lente" focalizzando la luce laser [near-field] alla particella e solo alle strutture cosiddette "foto-disgregatrici" (in lingua inglese "photo-disrupting") che sono distanti alcuni nanometri. Questo elimina la necessità di un fascio strettamente focalizzato, ottenendo comunque una risoluzione di ablazione della scala dei nanometri. Inoltre, lo scattering amplificato intorno alle particelle riduce la quantità della fluenza richiesta del laser . Nel suddetto documento viene previsto un metodo comprendente il posizionare una nano-particella in prossimità di una superficie di un materiale; irradiare la nano-particella con un laser regolato alla frequenza plasmonica della nano-particella; consentire una effetto "near-field" dalla nanoparticella irradiata per foto-danneggiare il materiale.

La pubblicazione di Malerba et al., "Novel 3D plasmonic nano-electrodes for cellular investigations and neural interfaces", SPIE 9166, Biosensing and Nanomedicine VII, 91660N, August 27, 2014, riguarda una piattaforma multifunzionale elettronica-plasmonica. Tale piattaforma è in grado di effettuare contemporaneamente una analisi chimica e una rilevazione elettronica da una interfaccia cellulare. Il sistema si basa sull'utilizzo di nanotubi metallici cavi, integrati in matrici multi-elettrodiche customizzate e consente lo studio di segnalazione neuronale su diverse lunghezze che spaziano da quelle molecolari a quelle di cellule singole e interconnesse. Nella suddetta pubblicazione viene mostrato che le stesse strutture sono amplificatrici efficienti del campo elettrico, nonostante

vi sia uno strato metallico continuo in corrispondenza della base, che le collega ai componenti elettrici dei circuiti integrati. La metodologia proposta, grazie alla sua semplicità ed elevata capacità di trasmissione (throughput) ha il potenziale di fornire ulteriori miglioramenti sia nel campo della plasmonica, sia nell'integrazione su vaste aree di dispositivi elettronici attivi di tipo commerciale.

La pubblicazione brevettuale WO 2011/124899 (Gunn-Moore Frank et al.) si riferisce ad un sistema ed un metodo per l'apertura di pori in membrane di cellule biologiche e tessuti in una area specifica, e l'apertura di pori in larga scala in una ampia area con microbolle eccitate da un cosiddetto "laser-induced breakdown" di singole nanoparticelle intrappolate otticamente.

Per completezza sono qui di seguito citate altre pubblicazioni note nel settore:

- Ting-Hsiang Wu et al., *Photothermal Nanoblade for Large Cargo Delivery into Mammalian Cells*, Analytical Chemistry 2011 83 (4), 1321-1327;
- Tirlapur et al., *Targeted transfection by femtosecond laser*, Nature, Vol. 413, 18 luglio 2002;
- Xie, et al., *Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation*, Nature Nanotechnology, 2012, 7, 185-190; e
- Ziliang Carter al., *Iridium oxide nanotube electrodes for sensitive and prolonged intracellular measurement of action potentials*, Nature Communications 5, 3206.

Sintesi dell'invenzione

Uno scopo dell'invenzione è quello di consentire l'accesso all'interno delle cellule viventi evitando - o quantomeno riducendo significativamente - le perturbazioni

apportate al loro stato.

Secondo la presente invenzione, questo ed altri scopi vengono raggiunti mediante un metodo avente le caratteristiche citate nell'annessa rivendicazione 5 indipendente 1.

E' da intendersi che le annesse rivendicazioni costituiscono parte integrante degli insegnamenti tecnici qui forniti nella descrizione dettagliata che segue in merito alla presente invenzione. In particolare, nelle 10 annesse rivendicazioni dipendenti sono definite alcune forme di realizzazione preferite che includono caratteristiche tecniche opzionali.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione appariranno chiari dalla descrizione dettagliata 15 che segue, data a puro titolo esemplificativo e non limitativo, con riferimento in particolare ai disegni allegati, qui di seguito riepilogati.

Breve descrizione dei disegni

La figura 1 illustra un nano-elemento plasmonico, in particolare una nano-antenna atta ad essere impiegata in 20 una forma di realizzazione esemplificativa del metodo secondo la presente invenzione.

La figura 2 è una rappresentazione schematica della distribuzione spaziale della temperatura assunta dalla nano 25 antenna dopo 10 ps trascorso dall'eccitazione dovuta all'impulso laser.

La figura 3 rappresenta in modo schematico un passo operativo di un metodo eseguito secondo una forma di realizzazione esemplificativa della presente invenzione.

Le figure da 4 a 8 rappresentano una sequenza di passi 30 operativi di un metodo realizzato in accordo con una forma di realizzazione esemplificativa della presente invenzione

ed in cui è altresì prevista l'immissione o il prelevamento di sostanze attraverso la membrana cellulare in cui è stata eseguita l'apertura di un poro

Descrizione dettagliata dell'invenzione

5 Con riferimento ai disegni allegati, è illustrato un metodo per l'apertura dei pori in una membrana cellulare.

Come meglio visibile nella figura 3, il suddetto metodo comprende i seguenti passi operativi:

10 a) disporre almeno un nano-elemento plasmonico metallico (10) a contatto - o in stretta prossimità - con una membrana cellulare (M) immersa in acqua o in una soluzione fisiologica e sulla cui superficie è destinato ad essere aperto almeno un poro (P);

15 b) focalizzare per un periodo di tempo (T) compreso fra 1 fs e 20 ps un fascio di luce (B), quale ad esempio un fascio laser, su detto nano-elemento plasmonico metallico (10), detto fascio di luce (B) avendo una frequenza regolata alla frequenza plasmonica di risonanza di detto nano-elemento plasmonico metallico (10), affinché detto fascio di luce (B) causi un'eccitazione plasmonica in elettroni appartenenti a detto nano-elemento plasmonico metallico (10) e ne promuova l'espulsione verso l'ambiente circostante aprendo almeno un poro (P) su detta membrana cellulare (M), in cui contemporaneamente

20 25 da una parte, detto fascio di luce (B) influenza mediante accelerazione ponderomotiva detti elettroni espulsi mediante detta eccitazione plamsonica e crea un'onda di pressione in detta acqua o in detta soluzione salina, e

30 dall'altra parte, detto fascio di luce (B) influenza direttamente detti elettroni espulsi mediante inverse bremsstrahlung e crea calore localizzato su detto nano-

elemento plasmonico metallico (10).

Si noti che sia l'onda di pressione sia la generazione di calore possono contribuire all'apertura di un poro P su detta membrana cellulare M.

5 In particolare, quando l'energia dell'impulso laser necessaria a "porare" (vale a dire, ad aprire pori) la membrana è fornita al sistema plasmonico per un tempo sufficientemente breve, come ad esempio 0.1 ps, l'accelerazione degli elettroni in acqua sarà prevalentemente ponderomotiva e quindi l'effetto termico sarà di minore rilievo, compatibilmente con il mantenimento di condizioni fisiologiche cellulari normali. Diversamente, quando il tempo T è di durata maggiore, come ad esempio 1 ps, l'apertura del poro P sarà prevalentemente per effetto 10 di interazione diretta tra laser e elettroni liberi (teoricamente detta interazione di "inverse bremsstrahlung") che comporta generazione di calore.

15

Nel range di un periodo di tempo T compreso fra 0,1 ps e 1 ps si ha una fase di transizione nella quale i due 20 fenomeni, quello ponderomotivo e quello di inverse bremsstrahlung, coesistono.

In altri termini, per opportune durate del periodo di tempo T, avviene sostanzialmente una apertura di pori "fredda" (anche definibile in lingua inglese come plasmonic "cold" poration). Viceversa per tempi T di durata maggiore, 25 si avrà una porazione calda" o termica (anche definibile in lingua inglese come "thermal plasmonic poration").

In sintesi, secondo un aspetto preferito della presente invenzione, durante l'esecuzione del procedimento 30 si verifica una combinazione degli effetti tecnici apertura di pori "fredda" e di apertura di pori "calda" o termica. La prevalenza dell'effetto di apertura di pori "fredda" o

dell'apertura di pori "calda" o termica nella suddetta combinazione è sostanzialmente dipendente dalla durata periodo di tempo T durante il quale avviene le focalizzazione del fascio laser B, la cui energia deve 5 comunque essere sufficiente a causare l'apertura del poro P

Nel seguito della presente descrizione saranno chiariti più dettagliatamente gli aspetti relativi agli effetti di apertura di pori "calda" o termica e di apertura di pori "fredda"

10 Come sarà ulteriormente chiarito nel seguito della presente descrizione, la membrana cellulare M può appartenere ad una cellula C di un qualsivoglia campione biologico, in cui sia necessario o desiderato eseguire l'apertura di pori sulla sua superficie.

15 Con riferimento in particolare alla figura 1, è illustrato a titolo di esempio un singolo nano-elemento plasmonico, quale la nano-antenna 10. Tale nano-elemento plasmonico può essere realizzato di metallo leghe metalliche. In particolare il nano-elemento plasmonico può 20 essere realizzato con un metallo nobile (ad esempio, oro) o sue leghe.

Vantaggiosamente ma non necessariamente, come sopra accennato, il nano-elemento plasmonico può essere una nano-antenna 10, di tipo per sé noto.

25 Nella forma di realizzazione illustrata, la nano-antenna 10 è atta ad essere immersa in acqua e ad essere eccitata da un singolo impulso di un fascio di luce laser.

30 Preferibilmente, la suddetta nano-antenna 10 ha la forma di un nano-cilindro attraversato da una cavità passante, in particolare in posizione centrale.

Nella forma di realizzazione illustrata, la suddetta nano-antenna 10 è realizzata di un metallo nobile, ad

esempio oro.

Vantaggiosamente ma non necessariamente, come sopra accennato, il fascio di luce atto ad eccitare il nano-elemento plasmonico è un laser.

5 Sarà esposta qui di seguito una forma di realizzazione esemplificativa in cui il metodo realizza una apertura di pori "calda" o termica.

Nella forma di realizzazione illustrata con particolare riferimento alla figura 1, la nano-antenna 10 è 10 realizzata di oro e l'impulso laser emesso dalla sorgente di luce che è atto ad eccitare tale nano-antenna 10 ha durata di 8 ps, una lunghezza d'onda pari a circa 1064 nm ed una frequenza di ripetizione di 80 Mhz.

L'antenna è eccitata da circa 4×10^6 impulsi 15 consecutivi, con una densità di potenza di picco di circa 2×10^9 W/cm².

Pertanto, nonostante la potenza di picco dell'impulso laser sia estremamente elevata, tuttavia la quantità totale di energia trasferita alla nano-antenna 10 nella durata 20 sopra indicata di 8 ps è ridotta (vale a dire, circa 150 pJ), in particolare se raffrontata all'ambiente cellulare avente una dimensione dell'ordine di grandezza dei micrometri. Infatti quando tale ridotta quantità di energia è dissipata in forma di calore attraverso la membrana 25 cellulare M, l'aumento atteso della temperatura ambiente è circa dell'ordine di grandezza di 10^{-3} Kelvin.

Esemplificazione di un esperimento di porazione fredda considera invece un impulso laser della durata di 80 fs, una lunghezza d'onda pari a circa 780 nm ed una frequenza 30 di ripetizione di 76 Mhz.

L'antenna e' eccitata da circa 1.5×10^6 impulsi consecutivi, con una densità di potenza di picco di circa

2*10¹⁰ W/cm². In questo caso, l'energia trasferita alla nanoantenna 10 durante la durata temporale di 80 fs e' di circa 15 pJ, un'ordine di grandezza inferiore rispetto a quella richiesta nel caso della porazione "calda" dal momento che durante questi regimi temporali tutta l'energia e' utilizzata per l'estrazione di elettroni dall'antenna e la generazione della bolla di pressione. In aggiunta, l'antenna puo essere eccitata con un numero minore di impulsi rispetto a quello sopra indicato, eventualmente riducendone il numero fino anche a un singolo impulso.

Come è chiaro ad un tecnico del settore, le dimensioni del nano-elemento plasmonico (in particolare, della nano-antenna 10) dipendono dalla lunghezza d'onda del fascio di luce B utilizzato per ottenere l'apertura dei pori nella membrana cellulare M. A titolo di esempio non limitativo, per ottenere un comportamento di tipo plasmonico con una luce nell'ambito del campo vicino infrarosso (NIR) visibile, l'altezza e il diametro della nano-antenna 10 può essere di circa 0,5-2 μm e 100-300 nm.

Tuttavia, è importante sottolineare che queste nano-antenne 10 esibiscono assorbimento ed amplificazione della radiazione elettromagnetica su vasta gamma di frequenze. Pertanto la medesima dimensione della nana-antenna sarà idonea ad un campo di lunghezze d'onda relativamente ampio.

Il tempo estremamente ridotto necessario per raggiungere una elevata temperatura dell'antenna è un fattore decisamente vantaggioso per applicazioni in cui sulle membrane cellulari M di numerose cellule C deve essere aperta una pluralità di pori in modo selettivo. In effetti, è ampiamente noto dalla letteratura tecnica che le membrane cellulari M si richiudono nuovamente in pochi minuti dopo l'avvenuta realizzazione di un poro P, il che

diviene quindi un problema per i metodi che prevedono una apertura di pori P che avvenga lentamente; grazie al breve periodo di riscaldamento, l'apertura di pori ottenuta in modo plasmonico può essere usata per realizzare l'apertura 5 di pori in una pluralità di cellule all'interno della finestra temporale in cui la membrana cellulare si rigenera, chiudendosi.

La figura 2 mostra la distribuzione di temperatura nello spazio della nano-antenna 10 immersa in acqua. Come 10 può essere notato, la temperatura massima di 80°C è raggiunta in corrispondenza della punta 10a della nano-antenna 10, mentre la base della nano-antenna 10 rimane sostanzialmente a temperature prossime alla temperatura iniziale di 37°C. Il che dimostra che il calore rimane 15 confinato in scala nanometrica. Nella forma di realizzazione riferita a quanto illustrato nella figura 2, l'acqua che circonda la nano-antenna rimane ad una temperatura di 37°C nonostante l'eccitazione realizzata dall'impulso di fascio laser.

Il confinamento di calore mostrato nella figura 2 è un significativo vantaggio del metodo realizzato secondo la 20 presente invenzione rispetto ai metodi noti allo stato della tecnica. Infatti, si deve tenere conto del fatto che l'ampiezza dei pori ottenuti nella membrana cellulare è proporzionale, fra l'altro, alla grandezza del punto caldo. Da una parte, nell'apertura di pori ottenuta in moto foto-termico, la grandezza minima del punto caldo è limitata 25 dalla lunghezza d'onda della sorgente laser, che è molto più ampia della grandezza della punta dell'antenna nel caso di luce nello spettro vicino infrarosso (NIR). Dall'altra parte, l'apertura di pori indotta in modo chimico può 30 essere la sola tecnica che potrebbe - in linea teorica -

realizzare fori di dimensioni inferiori rispetto a quelli ottenuti con una apertura di pori realizzata termicamente in modo plasmonico. A questo riguardo, l'apertura di pori realizzata in modo chimico si basa infatti su reazioni su 5 scala molecolare. Tuttavia la metodologia di apertura di pori realizzata in modo chimico coinvolge l'intera membrana cellulare e dunque tutte le cellule contenute nel mezzo in cui viene rilasciato l'agente chimico atto ad indurre l'apertura dei pori. Pertanto tale metodologia non consente 10 di applicare una selettività nelle effettive cellule - o nella parte di cellula specifica - su cui viene realizzata l'apertura di pori.

Sarà esposta qui di seguito una forma di realizzazione esemplificativa in cui il metodo realizza una apertura di 15 pori "fredda".

In linea generale, con durate inferiori del periodo di tempo T , l'ambiente non fa in tempo a riscaldarsi e gli elettroni liberati dal metallo con cui è realizzata la nano-antenna 10 e che sono immersi in acqua vengono accelerati (accelerazione ponderomotiva) dal campo elettrico di antura plasmonica e per interazione diretta con il laser stesso. In questo modo viene generata un'onda di pressione che localmente apre in modo transitorio nano-pori sulla membrana cellulare M. A questo riguardo, si desidera 20 sottolineare che la struttura del nano-elemento plasmonico utilizzata è la medesima che è impiegabile per l'apertura di pori "calda" o termica. Come sopra accennato, l'aspetto che differenzia le due tecniche di apertura di pori consiste sostanzialmente nella durata dell' impulso laser T 25 in cui viene focalizzato il fascio laser B. Pertanto componenti ed elementi precedentemente descritti con riferimento all'apertura di pori "calda" o termica ed 30

applicabili anche all'apertura di pori "fredda" non saranno qui di seguito ripetuti per motivi di brevità.

Qui di seguito saranno descritti alcuni dati e rilevazioni sperimentali con riferimento ad una possibile modalità di attuazione del metodo secondo l'invenzione, in cui si utilizza sostanzialmente una apertura di pori "fredda". Chiaramente tali dati e rilevazioni non devono essere intesi come limitativi dell'ambito di tutela della presente invenzione. In tal caso, l'impulso laser è in grado di eccitare polaritoni plasmonici di superficie (anche definiti in lingua inglese come "surface plasmon polaritons" ad abbreviati dall'acronimo SPPs) che sono molto efficaci nel decadere in elettroni altamente energetici e denominati come "hot electrons" che risultano essere immersi in acqua. Più in dettaglio, nei periodi di tempo T previsti per l'apertura di pori "fredda", l'acqua può essere considerata come un semiconduttore amorfo. A questo riguardo, misure sperimentali hanno evidenziato che la funzione di lavoro dell'oro (quale metallo preferito per la nano-antenna) in presenza di acqua si riduce da un valore di 4,9 eV a 3,7 eV, o anche valori inferiori, cosicché l'estrazione o liberazione degli elettroni a partire dall'oro (od anche ad un altro metallo che sia scelto per realizzare la nano-antenna) viene favorita energeticamente. Inoltre, il campo elettrico dovuto all'effetto plasmonico nell'interfaccia tra oro e acqua è amplificato di un fattore che può essere di circa 20 volte, o superiore. A causa dei valori di campo plasmonico sopra riportati, gli elettroni saranno dunque accelerati dalla forza ponderomotiva ad una energia cinetica media che può essere di circa 10 eV o superiore. questo valore di energia è sufficiente per creare una ionizzazione a cascata nelle

molecole di acqua. Tale ionizzazione a cascata crea un'onda di pressione in grado di aprire localmente nano-pori nella membrana cellulare M.

Saranno invece qui di seguito riepilogati alcuni 5 aspetti vantaggiosi del metodo della presente invenzione relativi ad applicabili ad un'apertura di pori "fredda" ed un'apertura di pori "calda" o termica.

Come in parte già accennato in precedenza, nella 10 figura 3 è rappresentato un passo operativo eseguito in una forma di realizzazione esemplificativa del metodo secondo la presente invenzione. Tale passo operativo include il focalizzare il fascio di luce B, in particolare un fascio laser pulsato, sulla nano-antenna 10. La radiazione del fascio di luce B ha una frequenza regolata alla frequenza 15 plasmonica di risonanza della nano-antenna 10. In questo modo, il fascio di luce B viene convertito in calore localizzato sulla nano-antenna 10 ed è atto ad aprire il poro P attraverso la membrana cellulare M.

Preferibilmente il fascio di luce B è focalizzato 20 verso una superficie di contatto situata fra la nano-antenna 10 e la membrana cellulare M. In particolare, nella forma di realizzazione illustrata, tale superficie di contatto comprende la porzione distale o punta 10a della nano-antenna 10.

Nella 25 forma di realizzazione illustrata con particolare riferimento alla figura 3, è prevista una sorgente di luce 12 predisposta per emettere il fascio di luce B in grado di eccitare la nano-antenna 10 presentante proprietà plasmoniche. In questo modo viene eseguita l'apertura del poro P su una membrana cellulare M appartenente ad una cellula C di un qualsivoglia campione biologico. Preferibilmente, è presente altresì un sistema 30

ottico 14 per focalizzare il fascio di luce B emesso dalla sorgente di luce 12 sulla nano-antenna 10.

Sempre con riferimento alla figura 3, è possibile notare come la sorgente di luce 12 e - laddove sia previsto 5 - il sistema ottico 14 siano situati da parte opposte rispetto alla nano-antenna 10 rispetto dalla membrana cellulare M.

Nella forma di realizzazione illustrata, il fascio di luce B emesso e focalizzato attraversa la cellula C e la 10 relativa membrana M, raggiungendo quindi la nano-antenna 10, in particolare nella superficie di contatto reciproca, ad esempio la porzione distale o punta 10a di tale nano-antenna 10.

Nella figura 3 è illustrato un substrato 16 che porta 15 una pluralità di nano-antenne 10 (o in alternativa anche altri nano-elementi plasmonici di diversa tipologia) in grado di aprire pori P attraverso la membrana cellulare M, in differenti e numerose posizioni di quest'ultima. Preferibilmente, tale substrato 16 è realizzato flessibile 20 ed è in grado di essere appoggiato direttamente sulla membrana cellulare M, in modo che la membrana cellulare M e il substrato 16 siano fra di loro combacianti. Nella forma di realizzazione illustrata, il substrato 16 comprende una membrana flessibile che supporta le nano-antenne 10.

25 In particolare, le nano-antenna 10 sono sporgenti dal substrato 16 dalla medesima parte o faccia.

Nella forma di realizzazione illustrata, l'insieme ottico 14 può comprendere un microscopio verticale o invertito. In alternative l'insieme ottico può inoltre 30 anche essere un obiettivo di messa a fuoco oppure un collimatore.

Preferibilmente, l'intimo contatto fra la membrana

cellulare M e il nano-elemento plasmonico corrispondente, può essere realizzato facendo crescere in colture le cellule C direttamente sul nano-elemento. Nella forma di realizzazione illustrata, è realizzata la coltura delle 5 cellule C direttamente sulle nano-antenne 10.

In alternativa, è possibile mettere in contatto la membrana cellulare M con il nano-elemento plasmonico corrispondente anche soltanto immediatamente prima dell'esecuzione dell'apertura dei pori P. Quest'ultimo 10 caso, si dimostra particolarmente vantaggioso quando il nano-elemento plasmonico, in particolare le nano-antenne 10, è realizzato di un materiale che è citotossico, ad esempio l'argento.

Come descritto in precedenza, quando il fascio di luce 15 focalizzato eccita una rispettiva nano-antenna 10, esso provoca - a seconda della durata del periodo di tempo T - una combinazione di accelerazione pondermotiva e accelerazione diretta da parte del laser (inverse bremsstrahlung) con conseguente incremento della 20 temperatura nella punta di tale nano-antenna 10 e quindi sulla membrana cellulare M viene dunque realizzata l'apertura di un poro corrispondente.

Chiaramente, il dispositivo utilizzato può includere 25 numerose nano-antenne 10 (od anche altri nano-elementi plasmonici), anche migliaia di esse. La sorgente di luce 12 può essere fatta passare in corrispondenza di tutte le nano-antenne 10 per focalizzare un fascio di luce, di volta in volta su ciascuna di esse. Quindi, come sopra accennato, 30 è possibile eseguire l'apertura di pori P su membrane cellulari M appartenenti anche a differenti cellule C di un medesimo campione biologico. Dunque, vi sono alcuni vantaggi di tipo significativo associati a questo aspetto.

Un vantaggio è dato dal fatto che le nano-antenne 10 possono essere disposte sul rispettivo supporto 16 in modo particolarmente denso e fitto, in modo tale da essere eccitate una ad una dal fascio di luce B emesso dalla sorgente di luce 12; tale struttura è anche di semplice fabbricazione rispetto a quanto avviene nel caso di dispositivi atti a realizzare l'apertura di pori P con eccitazione di tipo elettrico, anche detta elettroporazione (che richiedono matrici di nano-elementi indipendenti con cablature complesse e costose). Un altro vantaggio è dato dal fatto che il piano focale del fascio di luce B è fissato dalla superficie del dispositivo su cui le nano-antenne 10 sono fabbricate; in questo modo vi è un vantaggio rispetto ai metodi di apertura di pori realizzati in modo foto-termico, in cui il fascio di luce deve essere focalizzato in modo regolato e calibrato ogni volta su ciascuna cellula C allo scopo di concentrare l'energia specificamente sulla membrana M desiderata.

Come visibile nelle figure da 4 a 8, fra i possibili tipi di nano-elementi plasmonici, l'uso delle nano-antenne 10 è particolarmente vantaggioso in quanto ciascuna di esse può realizzare un rispettivo nano-canale 18 (numerato soltanto nella figura 7) configurato per essere percorso da sostanze S atte ad attraversare, in ingresso od in uscita, la membrana cellulare M. In particolare, tale nano-canale 18 può fungere da sistema di erogazione di sostanze S, anche in forma molecolare, all'interno della cellula, costituendo dunque una applicazione micro-fluidica (o nano-fluidica).

Si sottolinea che le figure da 4 a 8 sono riferite in particolar modo alla contribuzione dell'apertura di pori "calda". Tuttavia, le medesime figure sono applicabili per

illustrare ciò che avviene per quanto attiene al contributo relativo alla apertura di pori "fredda". La differenza fra i due effetti tecnici che si verificano durante l'esecuzione di un metodo secondo la presente invenzione è
5 data dal fatto che l'apertura di pori "fredda" non contribuisce di per sé ad un riscaldamento plasmonico (citato nella figura 6), piuttosto tale apertura di pori "fredda" contribuisce alla formazione di "hot electrons" che causano l'onda di pressione che tende ad aprire la
10 membrana M.

Nella forma di realizzazione illustrata, il nano-canale 18 attraversa la rispettiva nano-antenna 10 ed anche il substrato 16.

In particolare nelle figure da 4 a 8, è illustrata una
15 sequenza di passi operativi per eseguire questa tecnica micro-fluidica intracellulare, ad esempio per l'erogazione di sostanze S in forma di medicamenti.

Nella figura 4, le cellule C sono sottoposte a coltura direttamente sul substrato 16 in modo tale che esse possano
20 circondare ed "invaginare" le nano-antenne 10.

Nella figura 5, il fascio di luce B emesso dalla sorgente di luce 12 è diretto verso la punta (estremità distale) di una rispettiva nano-antenna 10, in posizione allontanata dal substrato 16.

Nelle figure 6 e 7 è visibile l'effetto tecnico
25 realizzato dal calore indotto in modo plasmonico realizza sulla membrana cellulare M. Tale calore genera quindi un poro P (figura 6) attraverso il quale le sostanze S, ad esempio in forma di molecole, possono fluire attraverso la
30 nano-antenna 10 (figura 7). Con opportuni accorgimenti è possibile fare giungere direttamente all'interno della cellula C, S sostanze contenute in apposite cavità o

compartimenti realizzati nel substrato 16 o comunque comunicanti con la nano-antenna 10 attraverso tale substrato 16 (in particolare, mediante il nano-canale 18 che attraversa substrato 16 e nano-antenna 10). In 5 alternativa, è anche prevedibile un flusso di fluido in direzione inversa, dalla cellula C alle cavità eventualmente ottenute nel substrato 16.

Nella figura 8 è visibile che, dopo pochi minuti dall'apertura del poro P, la membrana cellulare M si chiude 10 nuovamente, ritornando nella condizione di partenza mostrata nella figura 4, ma in cui all'interno della cellula C è stata immessa la quantità di sostanza S desiderata.

Pertanto, come sopra descritto, le nano-antenne 10 15 costituiscono un eccellente canale per la diffusione molecolare in ambiente intracellulare. Il che significa che è possibile integrare queste strutture in un dispositivo microfluidico che comprende una pluralità di compartimenti separati per fluidi, in cui ciascuno di tali compartimenti 20 è in grado di contenere sostanze di tipo differente ed è collegato fluidicamente con una corrispondente nano-antenna 10 specifica.

A titolo di esempio, possono essere previste differenti sostanze S per una applicazione di tipo 25 microfluidico del metodo secondo la presente invenzione. Ad esempio, tali sostanze possono includere materiale genetico, nano-particelle o soluzioni complesse senza necessità di protocolli dedicati per il loro trasferimento, come nei metodi chimici o trasfezione virale.

30 Applicazioni di tipo microfluidico per il metodo secondo la presente invenzione possono consentire una automatizzazione tale anche da raggiungere numerose

attuazioni in periodi di tempo brevi (ad esempio, 10^5 cellule trattate in un ora).

Inoltre, la tenuta di fluido fra i nanotubi e la membrana M impedisce che avvenga una erogazione indesiderata di materiale appartenente alla matrice extracellulare. Più in generale, viene consentito un controllo sull'ambiente intracellulare: questo metodo può anche essere utilizzato per controllare il valore intracellulare del pH, la distribuzione di ioni (ad esempio, Ca^+ , K^+ , Na^+ , Cl^-). Ancora, tale metodo può essere combinato con l'uso di matrici microelettrodiiche per condurre esperimenti elettrofisiologici in una configurazione che rappresenterebbe un'unica piattaforma. Inoltre, il medesimo approccio potrebbe essere utilizzato per raccogliere fluidi intracellulari ed analizzarli con metodi particolarmente raffinati e sensibili, quali - ad esempio - spettroscopia di massa; il che consente di analizzare le singole cellule.

Come sopra accennato, in connessione con la forma di realizzazione illustrata, oltre all'utilizzo delle nano-antenne 10, il metodo secondo l'invenzione può prevedere differenti alternative per il nano-elemento plasmonico. A titolo di esempio, fra l'altro, è possibile impiegare varie categorie di tali nano-elementi plasmonici, quali generiche nano-particelle, oppure struttura a nano-antenna planare o nano-antenne tridimensionali (come quelle illustrate nei disegni).

Per quanto attiene alle nano-particelle, possono essere utilizzate particelle metalliche aventi dimensioni in scala nanometrica che sono in grado di risuonare grazie all'eccitazione dovuta ad un fascio di luce incidente di opportuna frequenza. Queste nano-particelle possono essere

depositate sul substrato sostanzialmente piano (ed eventualmente flessibile) o disperse nel liquido. Lo sfruttamento e l'applicabilità di tali nano-particelle per l'apertura di pori nella membrana cellulare possono essere
5 limitati a causa della loro citotossicità.

Per quanto riguarda le antenne planari, possono essere usate strutture bi-dimensionali con particolari proprietà e geometrie configurate per essere in risonanza a causa dell'eccitazione provocata dal fascio di luce incidente di
10 opportuna frequenza; la loro grandezza può variare da decine ad alcune centinaia di nanometri. Esse sono facilmente depositabili su substrati planari, quali quarzo o silicio. Il loro sfruttamento per l'apertura di pori in modo plasmonico può essere limitato a causa della distanza
15 fra la struttura metallica piana e la membrana cellulare giacente sull'antenna. In effetti, la particolare geometria delle antenne planari rischia di non consentire un buon contatto - od una sufficiente prossimità - tra le antenne e le cellule, pertanto potrebbe limitare l'efficienza della
20 porazione.

Infatti, per quest'ultimo motivo, vi è un ulteriore vantaggio nell'adottare il metodo proposto che si basa su strutture tridimensionali che protrudono dal piano del substrato dove le cellule vengono coltivate. Quando le
25 cellule vengono coltivate su un comune substrato planare esse aderiscono al substrato in modo non omogeneo da punto a punto. Ogni cellula aderisce in modo diverso e anche la singola cellula presenta, nell'area di interfaccia tra la membrana cellulare e il substrato, una adesione variabile
30 da punto a punto.

Diversamente, dalla letteratura tecnica, è noto che le cellule aderiscono molto bene su strutture tridimensionali,

il che risulta in un accoppiamento più stretto fra la membrana e la nano-antenna (L. Hanson et al., Nano Lett., 2012, 12 (11), pagg. 5815–5820). In particolare, quando le cellule sono coltivate su substrati che presentano 5 strutture protrudenti di opportune forme e dimensioni, quali ad esempio i detti nano-elementi plasmonici aventi altezza di qualche micron e diametro dell'ordine delle centinaia di nanometri, le dette cellule tendono ad aderire al substrato in corrispondenza delle strutture protrudenti. 10 Un esempio di tali nano-antenne tridimensionali è quello introdotto nella pubblicazione di F. De Angelis et al., Nano Lett. 2013, 13, 3553–3558. In linea generale, le cellule tendono generalmente a circondare, "invaginando" o inglobando queste tipologie di strutture tridimensionali 15 con la loro membrana cellulare.

In altre parole, invece di avere una adesione variabile da punto a punto e non prevedibile, la struttura protrudente funziona da punto di adesione spontanea per la membrana cellulare. Questo comporta diversi distinti e 20 ulteriori vantaggi. In primo luogo il punto di adesione diviene prevedibile e controllabile. Questo è di particolare importanza poiché la porazione della membrana avverrà in corrispondenza del punto di adesione tra la nanostruttura e la membrana stessa. Di conseguenza la 25 possibilità di controllare meglio il punto di adesione offre una migliorata capacità di controllo sul processo di porazione nel suo insieme. Inoltre le membrane cellulari tendono ad aderire saldamente su dette nanostrutture protrudenti fino anche ad avvolgere o "invaginare" le 30 strutture stesse: questa stretta adesione riduce la distanza tra la superficie di metallo su cui viene generata l'onda di pressione e la membrana cellulare che deve essere

porata dall'onda stessa. Una ridotta distanza implica una porazione più netta e precisa e tipicamente dei pori più piccoli. Quando ad esempio, il detto nano-elemento plasmonico è usato anche come elettrodo per misurare o applicare correnti o tensioni elettriche, come avviene negli esperimenti di elettrofisiologia, la ridotta distanza spaziale tra il poro P e l'elettrodo consentono un miglioramento dell'accoppiamento elettrico e capacitivo tra il liquido intracellulare e l'elettrodo stesso.

Ulteriori vantaggi si hanno quando come elemento plasmonico si utilizza una struttura cava atta a introdurre una detta sostanza S nel comparto intracellulare come, a titolo esemplificativo, è stato descritto nelle figure 6-7

Secondo questo schema il nanotubo plasmonico ha un'estremità saldata alla membrana cellulare e l'altra estremità che si inserisce direttamente in un canale microfluidico o altro ritrovato atto a deliverare la sostanza S. Di conseguenza, una volta aperto il poro P mediante il fascio laser, il nanotubo plasmonico realizza un accesso esclusivo al comparto intracellulare. Con ciò si intende che la sostanza S può essere introdotta direttamente nell'ambiente intracellulare senza che questa venga in contatto con il bagno extracellulare. Viceversa questo approccio impedisce alle sostanze contenute nel bagno extracellulare di entrare nell'ambiente intracellulare quando la membrana cellulare viene porata.

Come sopra accennato, uno dei vantaggi associato al metodo di apertura di pori in maniera plasmonica secondo la presente invenzione consiste nel fatto che esso è utilizzabile per lo studio di cellule elettricamente attive, quali neuroni e cardiomiociti. Queste cellule generano impulsi elettrici, le cui caratteristiche sono

fondamentali per la comprensione del loro comportamento e della loro risposta a particolari medicamenti o condizioni. Infatti è noto che queste cellule, specialmente i neuroni, sono molto sensibili e rispondono a vari stimoli, fra i quali potenziale elettrico, calore, luce e medicamenti specifici. Pertanto tutti i metodi per l'apertura di pori che si basano su potenziale elettrico, calore, luce, o medicamenti (o, più in generale, sostanze chimiche) influenzeranno inevitabilmente il sistema e dunque non consentiranno di osservare l'attività (in particolare, quella elettrica) del sistema biologico, senza alterarlo. Al contrario, l'apertura di pori plasmonica può creare una interruzione nella membrana cellulare richiedendo una bassa quantità di energia, insufficiente a innescare una risposta elettrica stimolata. Di conseguenza, un campione biologico elettricamente attivo non sarebbe influenzato, e dunque perturbato, dall'apertura di pori plasmonica e dunque può essere studiato nelle suo stato spontaneo e non alterato.

Un altro vantaggio significativo del metodo secondo la presente invenzione è dovuto al fatto della sua controllabilità nel tempo e nello spazio.

Un ulteriore vantaggio del metodo secondo la presente invenzione è dato dal fatto che il tempo per l'apertura di un poro in una singola cellula è molto breve, ad esempio anche al di sotto di 1 microsecondo.

Un altro vantaggio del metodo secondo la presente invenzione è dato dal fatto che i nano-elementi plasmonici possono essere fabbricati in matrici dense e ampie su cui le cellule possono essere direttamente assoggettate a coltura. Facendo passare la sorgente di luce al di sopra di tali matrici, migliaia di cellule possono essere sottoposte ad apertura di pori in un tempo molto breve, prima che le

membrane cellulari inizino a recuperare il loro stato iniziale, chiudendosi.

Un altro aspetto vantaggioso consiste nel fatto che il confinamento del processo di riscaldamento o di generazione 5 di un'onda di pressione sulla punta dell'antenna è di ampiezza nanometrica; il che conduce alla generazione di fori estremamente piccoli sulla membrana cellulare, evitando una alterazione dell'ambiente circostante di tipo indesiderato.

10 Un ulteriore vantaggio è dato dal fatto che se il nano-elemento plasmonico presenta un canale fluidico, tale nano-elemento plasmonico è in grado di costituire una valvola (in particolare se il nano-elemento plasmonico comprende una nano-antenna, esso costituisce una nano-15 valvola).

Naturalmente, fermo restando il principio dell'invenzione, le forme di attuazione ed i particolari di realizzazione potranno essere ampiamente variati rispetto a quanto descritto ed illustrato a puro titolo di esempio non limitativo, senza per questo uscire dall'ambito 20 dell'invenzione come definito nelle anesse rivendicazioni.

In particolare, come è evidente ad un tecnico del settore, gli effetti tecnici conseguiti grazie all'esecuzione del metodo secondo la presente invenzione 25 prescindono dalla forma illustrata della nano-antenna con riferimento ai disegni allegati. In altri termini, la forma della nano-antenna può essere variata rispetto a quella illustrata - ad esempio - nella figura 1, a condizione che tale nano-antenna presenti una risonanza plasmonica alla 30 lunghezza d'onda della radiazione desiderata. A titolo esemplificativo, la nano-antenna potrebbe anche essere non cava e potrebbe ancora presentare un effetto di

riscaldamento in modo plasmonico oppure potrebbe avere una forma cava conica invece di una forma cilindrica.

Oltre a quanto sopra, non si intende come limitativo dell'ambito di tutela della presente invenzione il fatto
5 che il fascio di luce nella forma di realizzazione illustrata sia di tipo laser. Infatti, come è chiaro ad un tecnico del settore, il fascio di luce può provenire da numerose e differenti tipologie di sorgenti di luce, ad esempio coerente od incoerente, monocromatica o
10 policromatica, pulsata o continua.

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

/GV

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'apertura dei pori in una membrana cellulare, detto metodo comprendendo i seguenti passi operativi:
 - 5 a) disporre almeno un nano-elemento plasmonico metallico (10) a contatto - o in stretta prossimità - con una membrana cellulare (M) immersa in acqua o in una soluzione fisiologica e sulla cui superficie è destinato ad essere aperto almeno un poro (P);
 - 10 b) focalizzare per un periodo di tempo (T) compreso fra 1 fs e 20 ps un fascio di luce (B), quale ad esempio un fascio laser, su detto nano-elemento plasmonico metallico (10), detto fascio di luce (B) avendo una frequenza regolata alla frequenza plasmonica di risonanza di detto
 - 15 nano-elemento plasmonico metallico (10), affinché detto fascio di luce (B) causi un'eccitazione plasmonica in elettroni appartenenti a detto nano-elemento plasmonico metallico (10) e ne promuova l'espulsione verso l'ambiente circostante aprendo almeno un poro (P) su detta membrana
 - 20 cellulare (M), in cui contemporaneamente
 da una parte, detto fascio di luce (B) influenza mediante accelerazione ponderomotiva detti elettroni espulsi mediante detta eccitazione plasmonica e crea un'onda di pressione in detta acqua o in detta soluzione
 - 25 salina, e
 dall'altra parte, detto fascio di luce (B) influenza direttamente detti elettroni espulsi mediante *inverse bremsstrahlung* e crea calore localizzato su detto nano-elemento plasmonico metallico (10).
- 30 2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto periodo di tempo (T) è inferiore o uguale a circa 0.1 ps ed è prevalente il contributo di detta onda di pressione

ottenuta mediante accelerazione ponderomotiva per aprire detto almeno un poro (P).

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui in cui detto periodo di tempo (T) è maggiore o uguale a circa 1 ps
5 ed è prevalente il contributo di detto calore localizzato ottenuto mediante *inverse bremsstrahlung* per aprire detto almeno un poro (P).

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico
10 (10) è tridimensionalmente protrudente e aderisce strettamente a detta membrana cellulare (M).

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) presenta un'altezza dell'ordine di grandezza del micron.

15 6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) presenta un diametro dell'ordine di grandezza di un centinaio di nanometri.

20 7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo a) comprende il disporre una pluralità di nano-elementi plasmonici (10) a contatto con detta membrana cellulare (M).

25 8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo a) comprende il disporre una struttura comprendente un substrato (16) supportante detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) a contatto con detta membrana cellulare (M).

30 9. Metodo secondo la rivendicazione 8, in cui il passo operativo a) comprende l'effettuare una coltura cellulare direttamente su detto substrato (16) in modo tale che detta membrana cellulare (M) si accresca a contatto con detto almeno un nano-elemento plasmonico (10).

10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico comprende una nano-antenna (10).
11. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) è realizzato di un metallo nobile, o sue leghe.
12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo b) comprende le seguenti fasi:
 - 10 b1) emettere detto fascio di luce (B); e
 - b2) focalizzare detto fascio di luce (B) emesso attraverso un assieme ottico (14) in direzione di detto almeno un nano-elemento plasmonico (10).
13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detta fase 15 b1) comprende l'emettere un fascio laser (B), preferibilmente del tipo ad impulsi.
14. Metodo secondo la rivendicazione 12 o 13, in cui la fase b2) comprende il dirigere detto fascio di luce (B) focalizzato verso una superficie di contatto (10a) fra 20 detto nano-elemento plasmonico (10) e detta membrana cellulare (M).
15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui detta superficie di contatto comprende una porzione distale (10a) di detto nano-elemento plasmonico (10).
- 25 16. Metodo secondo la rivendicazione 14 o 15, in cui detto fascio di luce (B) attraversa detta cellula (C) prima di raggiungere detta superficie di contatto (10a).
17. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre il seguente passo 30 operativo:
 - c) far passare una quantità di sostanza (S), ad esempio una quantità di un medicamento, attraverso detto almeno un

nano-elemento plasmonico (10) e detto almeno poro (P) aperto su detta membrana cellulare (M).

18. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui detto passo operativo c) comprende il far passare detta quantità 5 di sostanza (S), proveniente dall'esterno di detta cellula (C), attraverso detto nano-elemento plasmonico (10) e detto poro (P) verso l'interno della cellula (C) nello spazio individuato da detta membrana cellulare (M).

19. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui detto 10 passo operativo c) comprende il far passare detta quantità di sostanza (S), proveniente dall'interno di detta cellula (C) nello spazio individuato da detta membrana cellulare (M), attraverso detto poro (P) e detto nano-elemento plasmonico (10) verso l'esterno di detta cellula (C).

15

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

/GV

RIASSUNTO

Il metodo comprende i seguenti passi: a) disporre un nano-elemento plasmonico metallico (10) a contatto con una membrana cellulare (M) immersa in acqua o in una soluzione fisiologica e sulla cui superficie è destinato ad essere aperto un poro (P); e b) focalizzare per un periodo di tempo (T) compreso fra 1 fs e 10 ps un fascio di luce (B), quale ad esempio un fascio laser, sul nano-elemento plasmonico metallico (10). Il fascio di luce (B) ha una frequenza regolata alla frequenza plasmonica di risonanza del nano-elemento plasmonico metallico (10), affinché il fascio di luce (B) causi un'eccitazione plasmonica in elettroni appartenenti al nano-elemento plasmonico metallico (10) e ne promuova l'espulsione verso l'ambiente circostante aprendo un poro (P) sulla membrana cellulare (M). Da una parte, il fascio di luce (B) influenza mediante accelerazione ponderomotiva gli elettroni espulsi mediante eccitazione plasmonica e crea un'onda di pressione in detta acqua o in detta soluzione salina. Dall'altra parte, il fascio di luce (B) influenza direttamente gli elettroni espulsi mediante *inverse bremsstrahlung* e crea calore localizzato sul nano-elemento plasmonico metallico (10).

(Figura 3)

Preclassificazione brevettuale: A61B

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'apertura dei pori in una membrana cellulare, detto metodo comprendendo i seguenti passi operativi:
 - 5 a) disporre almeno un nano-elemento plasmonico metallico (10) a contatto - o in stretta prossimità - con una membrana cellulare (M) immersa in acqua o in una soluzione fisiologica e sulla cui superficie è destinato ad essere aperto almeno un poro (P);
 - 10 b) focalizzare per un periodo di tempo (T) compreso fra 1 fs e 20 ps un fascio di luce (B), quale ad esempio un fascio laser, su detto nano-elemento plasmonico metallico (10), detto fascio di luce (B) avendo una frequenza regolata alla frequenza plasmonica di risonanza di detto
 - 15 nano-elemento plasmonico metallico (10), affinché detto fascio di luce (B) causi un'eccitazione plasmonica in elettroni appartenenti a detto nano-elemento plasmonico metallico (10) e ne promuova l'espulsione verso l'ambiente circostante aprendo almeno un poro (P) su detta membrana
 - 20 cellulare (M), in cui contemporaneamente
 da una parte, detto fascio di luce (B) influenza mediante accelerazione ponderomotiva detti elettroni espulsi mediante detta eccitazione plasmonica e crea un'onda di pressione in detta acqua o in detta soluzione
 - 25 salina, e
 dall'altra parte, detto fascio di luce (B) influenza direttamente detti elettroni espulsi mediante *inverse bremsstrahlung* e crea calore localizzato su detto nano-elemento plasmonico metallico (10).
- 30 2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto periodo di tempo (T) è inferiore o uguale a circa 0.1 ps ed è prevalente il contributo di detta onda di pressione

ottenuta mediante accelerazione ponderomotiva per aprire detto almeno un poro (P).

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui in cui detto periodo di tempo (T) è maggiore o uguale a circa 1 ps
5 ed è prevalente il contributo di detto calore localizzato ottenuto mediante *inverse bremsstrahlung* per aprire detto almeno un poro (P).

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico
10 (10) è tridimensionalmente protrudente e aderisce strettamente a detta membrana cellulare (M).

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) presenta un'altezza dell'ordine di grandezza del micron.

15 6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) presenta un diametro dell'ordine di grandezza di un centinaio di nanometri.

20 7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo a) comprende il disporre una pluralità di nano-elementi plasmonici (10) a contatto con detta membrana cellulare (M).

25 8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo a) comprende il disporre una struttura comprendente un substrato (16) supportante detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) a contatto con detta membrana cellulare (M).

30 9. Metodo secondo la rivendicazione 8, in cui il passo operativo a) comprende l'effettuare una coltura cellulare direttamente su detto substrato (16) in modo tale che detta membrana cellulare (M) si accresca a contatto con detto almeno un nano-elemento plasmonico (10).

10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico comprende una nano-antenna (10).
11. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 precedenti, in cui detto almeno un nano-elemento plasmonico (10) è realizzato di un metallo nobile, o sue leghe.
12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il passo operativo b) comprende le seguenti fasi:
 - 10 b1) emettere detto fascio di luce (B); e
 - b2) focalizzare detto fascio di luce (B) emesso attraverso un assieme ottico (14) in direzione di detto almeno un nano-elemento plasmonico (10).
13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detta fase 15 b1) comprende l'emettere un fascio laser (B), preferibilmente del tipo ad impulsi.
14. Metodo secondo la rivendicazione 12 o 13, in cui la fase b2) comprende il dirigere detto fascio di luce (B) focalizzato verso una superficie di contatto (10a) fra 20 detto nano-elemento plasmonico (10) e detta membrana cellulare (M).
15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui detta superficie di contatto comprende una porzione distale (10a) di detto nano-elemento plasmonico (10).
- 25 16. Metodo secondo la rivendicazione 14 o 15, in cui detto fascio di luce (B) attraversa detta cellula (C) prima di raggiungere detta superficie di contatto (10a).
17. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre il seguente passo 30 operativo:
 - c) far passare una quantità di sostanza (S), ad esempio una quantità di un medicamento, attraverso detto almeno un

nano-elemento plasmonico (10) e detto almeno poro (P) aperto su detta membrana cellulare (M).

18. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui detto passo operativo c) comprende il far passare detta quantità 5 di sostanza (S), proveniente dall'esterno di detta cellula (C), attraverso detto nano-elemento plasmonico (10) e detto poro (P) verso l'interno della cellula (C) nello spazio individuato da detta membrana cellulare (M).

19. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui detto 10 passo operativo c) comprende il far passare detta quantità di sostanza (S), proveniente dall'interno di detta cellula (C) nello spazio individuato da detta membrana cellulare (M), attraverso detto poro (P) e detto nano-elemento plasmonico (10) verso l'esterno di detta cellula (C).

15

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

/GV

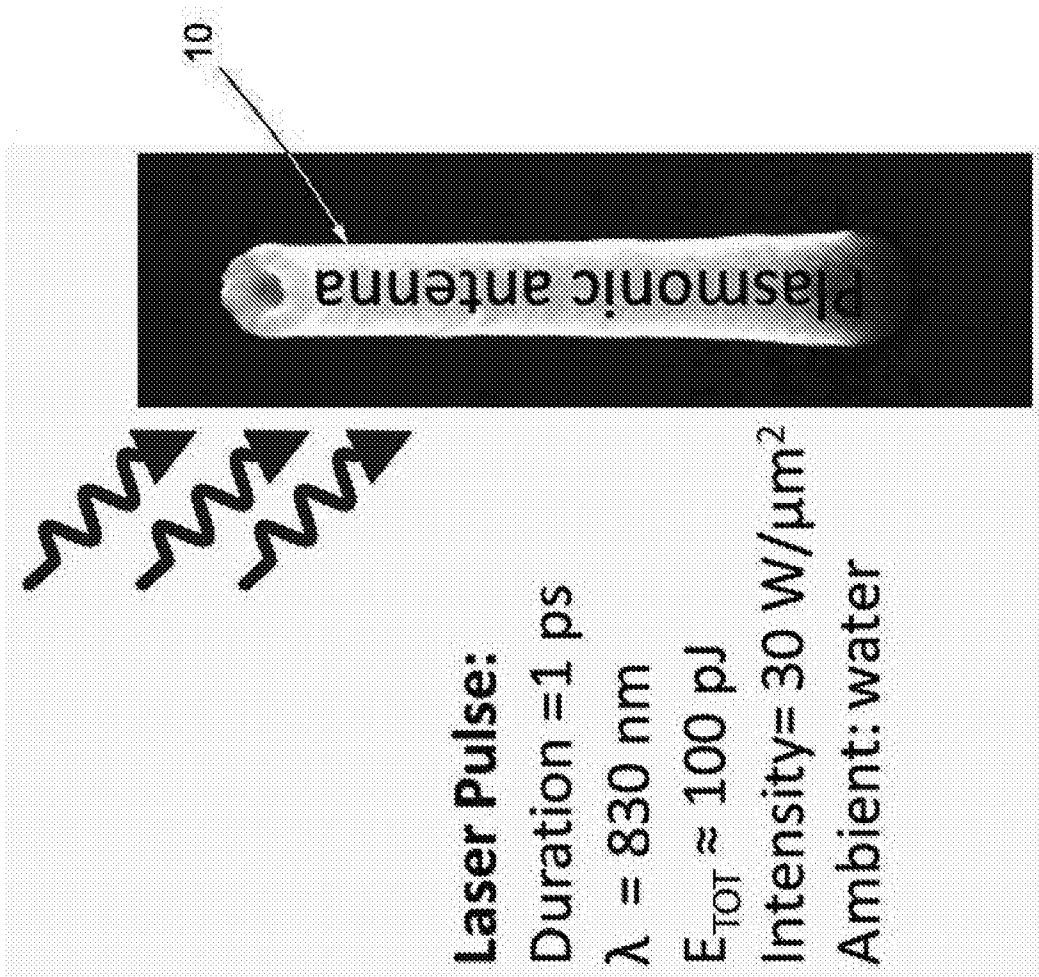


Fig. 1

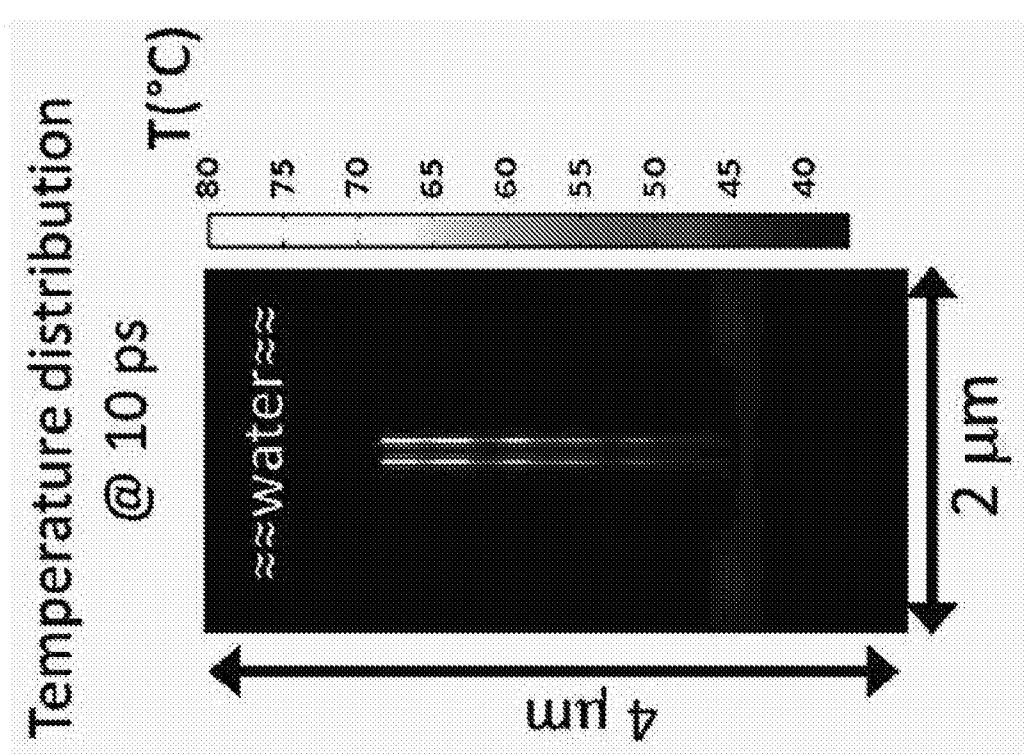


Fig. 2

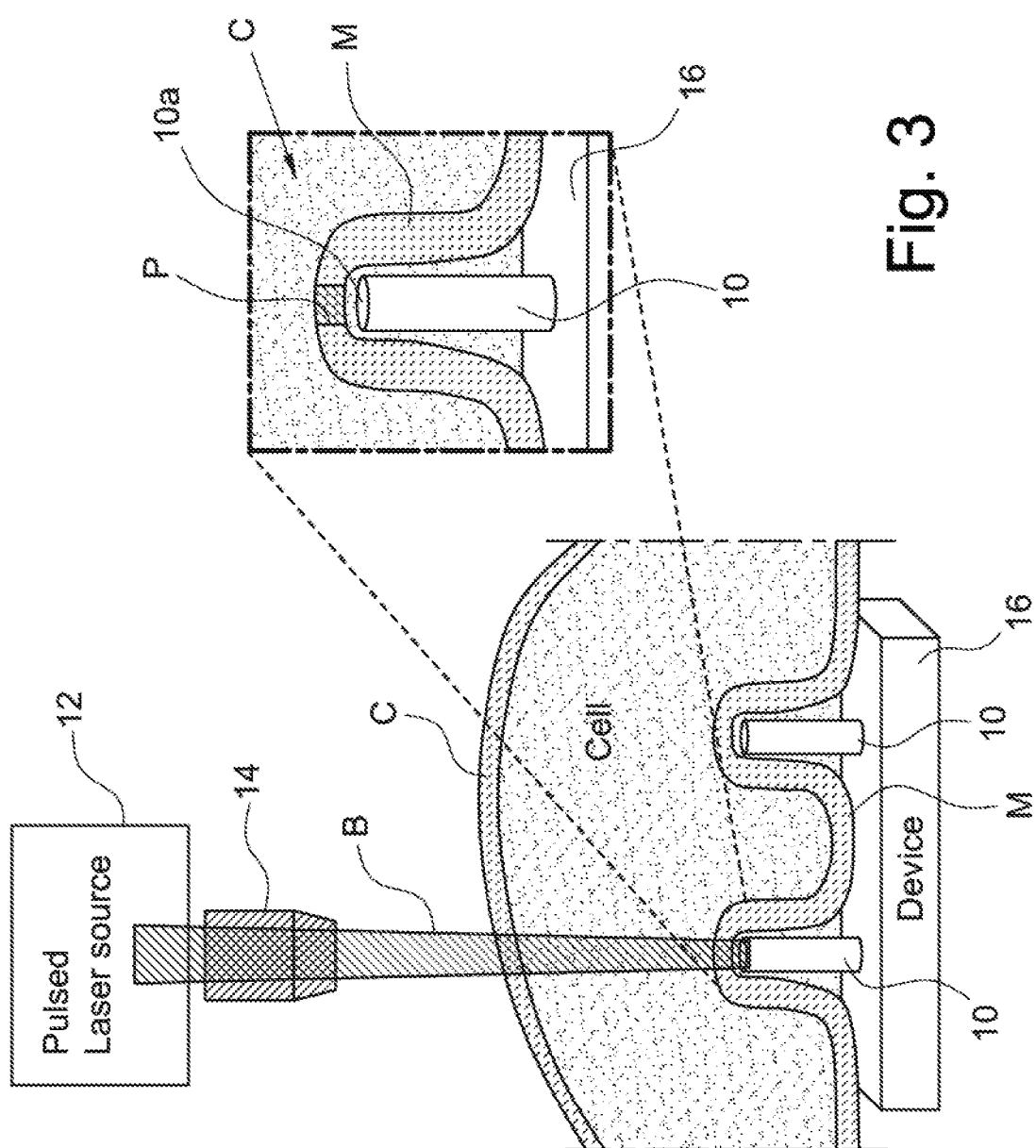
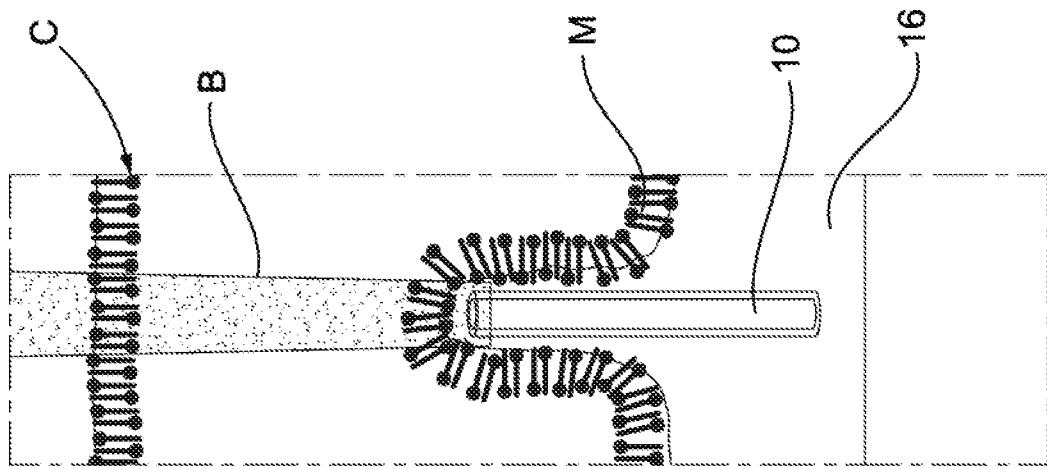
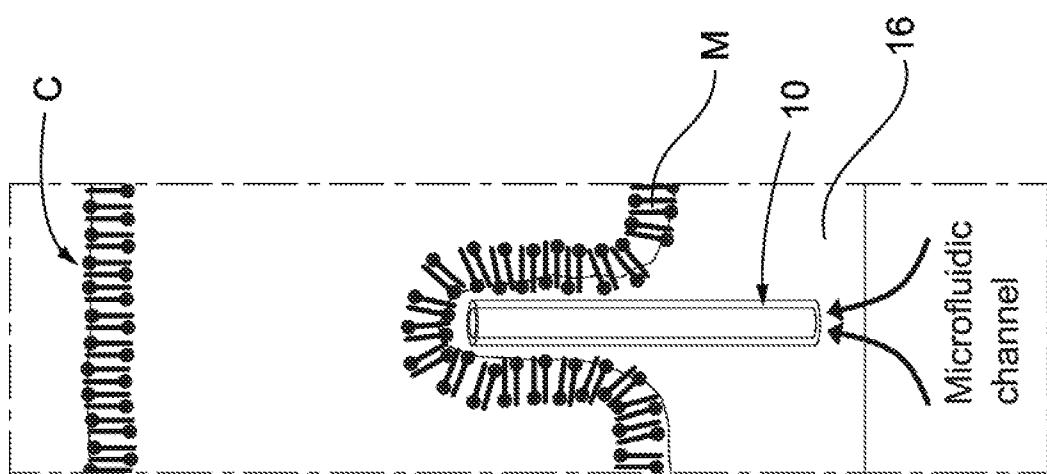


Fig. 3



Laser
irradiation

Fig. 5



Cell on
antenna

Fig. 4

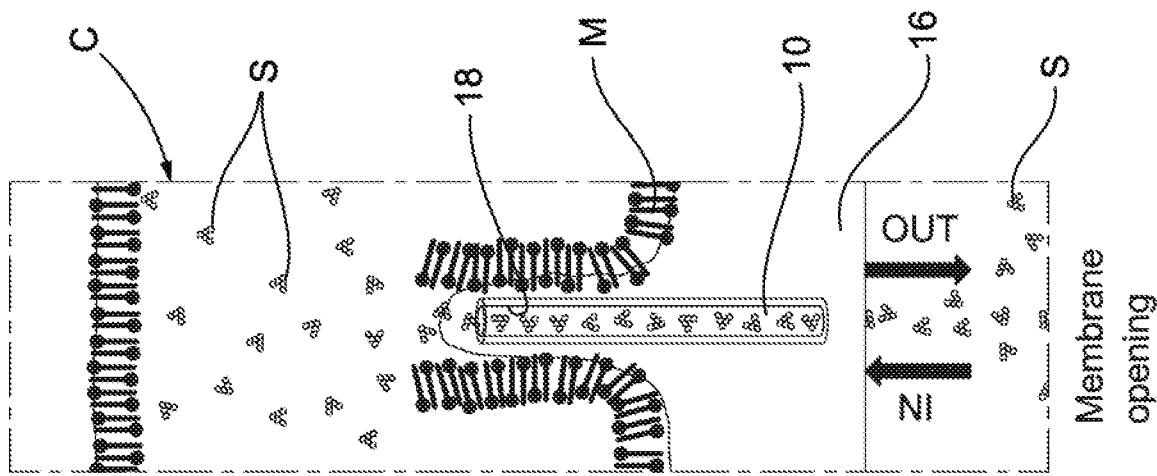


Fig. 7

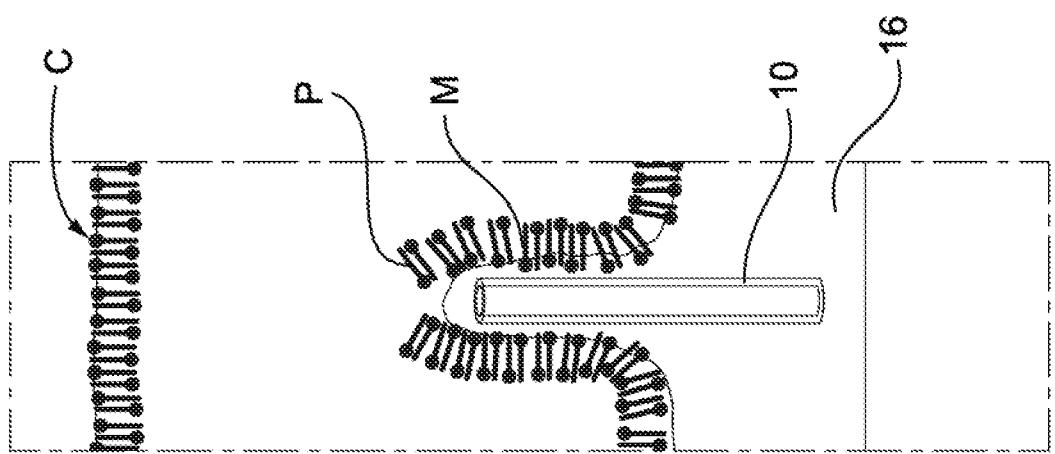
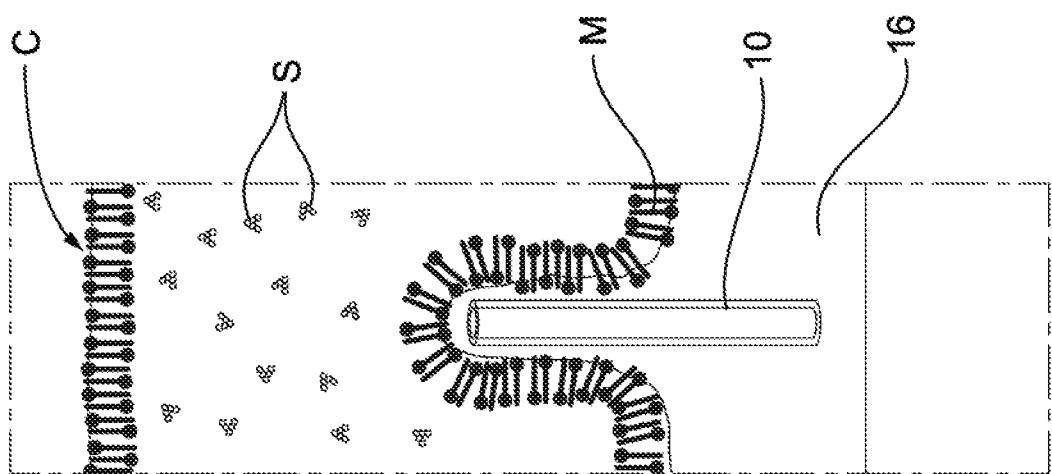


Fig. 6



Membrane
reforming

Fig. 8