

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
2. Oktober 2014 (02.10.2014)



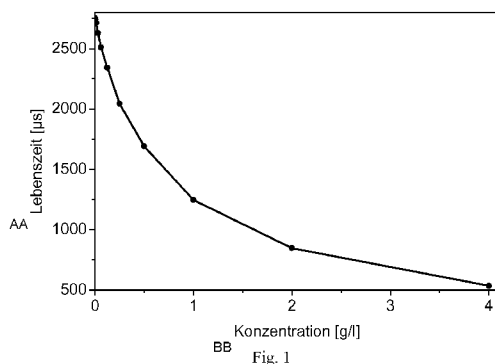
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/154615 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/72* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/055805
- (22) Internationales Anmeldedatum:
24. März 2014 (24.03.2014)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2013 205 346.0 26. März 2013 (26.03.2013) DE
- (71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V. [DE/DE]; Hansastr. 27c, 80686 München (DE).
- (72) Erfinder: MORGNER, Frank; Gutenbergstr. 91, 14467
Potsdam (DE).
- (74) Anwalt: MAIWALD PATENTANWALTS GMBH;
Berthold Lux, Elisenhof, Elisenstr. 3, 80335 München
(DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

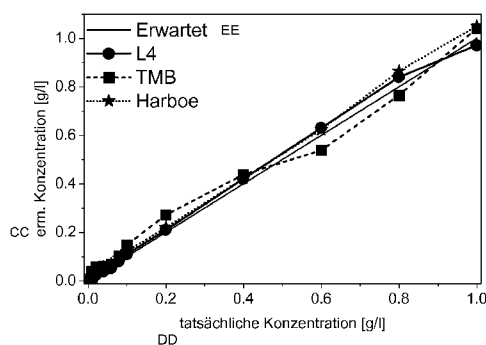
(54) Title: LANTHANOID-COMPLEX-BASED SPECTROSCOPIC HEMOGLOBIN DETERMINATION IN A LIQUID BIOLOGICAL MEDIUM

(54) Bezeichnung : LANTHANOIDKOMPLEXBASIERTE SPEKTROSKOPISCHE HÄMOGLOBINBESTIMMUNG IN EINEM FLÜSSIGEN BIOLOGISCHEN MEDIUM



(57) Abstract: The invention relates to a method for the quantitative determination of hemoglobin in a liquid biological medium outside of the body and the use of at least one luminescent lanthanoid complex for the quantitative determination of hemoglobin in a liquid biological medium outside of the body.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers sowie die Verwendung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers.



AA... Life span [μ s]
BB... Concentration [g/l]
CC... Determined concentration [g/l]
DD... Actual concentration [g/l]
EE... Expected



(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,

CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Lanthanoidkomplexbasierte spektroskopische Hämoglobinbestimmung in einem flüssigen biologischen Medium

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers sowie die Verwendung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers.

10

- Das eisenhaltige Sauerstofftransportprotein Hämoglobin (Hb) kommt normalerweise in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) von Menschen und Tieren und nur zu einem äußerst geringen Anteil als freies Protein in den Körperflüssigkeiten vor. Die beispielsweise in Blutplasma vorhandene Hämoglobinkonzentration beträgt bei
- 15 gesunden Menschen zwischen 10 und 30 mg/l. Abnorme Konzentrationen in den Körperflüssigkeiten weisen daher auf pathologischen Erythrozytenabbau *in vivo* (durch Krankheiten, Gifte u.ä.) oder *in vitro* (beispielsweise durch unsachgemäße Abnahme von Blut eines Patienten) hin. Hb ist daher ein klinisch sehr nützlicher Parameter zur Beurteilung sowohl der Qualität von Blutproben als auch der
- 20 Krankheitserkennung. Ersteres ist von großer Bedeutung, da Hb Messungen verschiedenster Biomarker in Plasma und Serum verfälscht und so die Analysen im schlimmsten Fall unbrauchbar macht. Letzteres ist wichtig, da viele Krankheiten wie Malaria, Sichelzellenanämie oder immunologische Störungen aber auch Gifte beispielsweise zum Anstieg der Konzentration freien Hämoglobins in Blutplasma
- 25 und -serum führen. Die Konzentration freien Hämoglobins in Körperflüssigkeiten möglichst genau zu kennen ist daher von großer Bedeutung. Die Bestimmung freien Hämoglobins ist aus diesem Grund eine der am häufigsten durchgeführten Messungen sowohl in der klinischen Diagnostik als auch der Laboranalytik und der Veterinärmedizin.

30

Verschiedenste Verfahren zur Bestimmung von Hämoglobin sind bekannt, wobei diese Verfahren hauptsächlich auf photometrischen Messungen basieren. Hier existieren verschiedene Methoden (Fairbanks et. al., Clinical Chemistry, 1992, vol. 38, 132-140, Tsuda et. al., Laboratory Hematology, 1998, vol. 4, 276-280). Zu
5 nennen sind insbesondere: die Cyanmethode (Standardbestimmungsmethode), die Laurylsulfat-Methode und die Tetramethylbenzidin-Methode (TMB). Gemein ist all diesen Verfahren, dass die Bildung eines Komplexes in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration zu einer Farbänderung der Probe führt, die über Absorption bestimmt wird.

10

Diese Verfahren sind jedoch zeitaufwendig und mit der Verwendung hoher Mengen verschiedenster Chemikalien verbunden, die ferner zu einem hohen Entsorgungsaufwand führen. Darüber hinaus ist die Probenvorbereitung aufwendig und führt zu einer Vielzahl möglicher Fehlerquellen.

15

Weitere Verfahren basieren auf der rein spektroskopischen Bestimmung von Hämoglobin. Zu nennen sind hier insbesondere die Methode nach Harboe sowie die Methode nach Kahn. Bei diesen Verfahren wird die Absorption der Probe bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt und daraus dann die
20 Hämoglobinkonzentration in der Probe ermittelt. Die Methode nach Harboe arbeitet mit verdünnten Lösungen, bei der Methode nach Kahn erfolgen die Messungen in unverdünnten Proben.

Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass bereits kleine Abweichungen in der
25 Zusammensetzung der Proben (beispielsweise zu wenig Wasser im Blut oder ein vom Durchschnitt abweichender Metabolismus) zur Unbrauchbarkeit der Messergebnisse führen können. Ferner können verschiedene Bestandteile in der

Probe das Messergebnis verfälschen, wobei das Ausmaß dieser Störung nicht feststellbar ist. Die möglichen Abweichungen können daher sehr groß sein.

Neben diesen etablierten Verfahren, werden in den JP 57059151A, JP 57133350A,
5 WO 96/23223A, US 2010/267538A, JP 62000838A, US 5,149,503A und JP 2122267A, weitere Verfahren beschrieben.

Alle vorgenannten Verfahren beschreiben Lösungswege, die mit dem der vorliegenden Erfindung keine Übereinstimmung aufweisen.

10

Daher besteht nach wie vor Bedarf an Verfahren zur Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium, die auf einfache Weise, d.h. ohne aufwendige Probenvorbereitung, ohne chemische Veränderung der Probe, und unter geringem Einsatz von Chemikalien durchführbar sind und die gleichzeitig eine
15 geringe Anfälligkeit für Störungen aufweisen.

20

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium bereit zu stellen, das außerhalb des Körpers durchgeführt werden kann. Eine weitere Aufgabe besteht darin, dass das Verfahren ohne aufwendige Probenvorbereitung und ohne chemische Veränderung der Probe durchgeführt werden kann. Weiterhin besteht eine Aufgabe darin, ein Verfahren bereit zu stellen, dass eine geringe Störungsanfälligkeit durch in der Probe enthaltene Verbindungen aufweist. Eine zusätzliche Aufgabe besteht darin, dass das Verfahren ohne Verwendung großer Mengen
25 unterschiedlichster Chemikalien durchgeführt werden kann und somit gleichzeitig ein geringer Entsorgungsaufwand bestehen soll.

Die Lösung der genannten und weiterer Aufgaben ergibt sich aus den Gegenständen der unabhängigen Ansprüche. Vorteilhafte Ausführungsformen ergeben sich durch deren Kombination mit den Merkmalen der abhängigen Ansprüche.

- 5 Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers bereitgestellt, umfassend die Schritte:
- a) die Bereitstellung eines flüssigen biologischen Mediums enthaltend eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin,
 - 10 b) die Bereitstellung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes,
 - c) Inkontaktbringen des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a) mit dem mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) zur Ermöglichung einer Wechselwirkung zwischen dem mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) und dem in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) enthaltenen Hämoglobin, und
 - 15 d) Bestimmung der emittierten Lumineszenz von dem Hämoglobin interagierenden Lanthanoidkomplex in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt c).
- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine quantitative Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers. Zusätzlich kann das Verfahren ohne aufwendige Probenvorbereitung und chemische Veränderung der Probe durchgeführt werden. Zusätzlich kann der Verbrauch an Chemikalien deutlich reduziert werden, wodurch Kosten, Arbeitsaufwand und
- 25 Entsorgungsaufwand minimiert werden können. Des Weiteren weist das Verfahren eine geringe Störungsanfälligkeit durch in der Probe enthaltene Verbindungen auf.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers bereitgestellt.

5

In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Speichel, Urin, Fruchtwasser, Liquor und Gemische von diesen.

10 In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst das flüssige biologische Medium aus Schritt a) eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 1 bis 5000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 5 bis 4000 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 bis 2000 mg/l.

15 In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) a) wasserlöslich, und/oder b) wird in einer Menge von 1 ng/l bis 1000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 500 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 100 mg/l, basierend auf der Menge des flüssigen biologischen Mediums aus
20 Schritt a), bereitgestellt.

In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mindestens ein Lanthanoid(III)-Ion.

25

In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist das mindestens eine Lanthanoid(III)-Ion ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Ytterbium(III)-Ion (Yb^{3+}), Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}),

Erbium(III)-Ion (Er^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}), Neodymium(III)-Ion (Nd^{3+}) und Gemische von diesen, und bevorzugt aus der Gruppe umfassend Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}) und Gemische von diesen.

5

In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mindestens einen mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildenden Liganden.

- 10 In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine komplexbildende Ligand mindestens ein mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element ausgewählt aus der Gruppe umfassend Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor und Gemische von diesen.
- 15 In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) in einem Wellenlängenbereich größer 400 nm, bevorzugt in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 1000 nm, durchgeführt.
- 20 In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit und/oder Lumineszenzintensität.

- In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst das
- 25 Verfahren ferner Schritt e), in dem die quantitative Bestimmung des Hämoglobins in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) durch Vergleich der in Schritt d) bestimmten emittierten Lumineszenz mit einer Kalibrierkurve erfolgt.

- In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Kalibrierkurve durch Bestimmung der emittierten Lumineszenz von definierten Mengen an Hämoglobin in einem flüssigen Kalibriermedium erhalten und das flüssige Kalibriermedium entspricht dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt
- 5 a) oder das flüssige Kalibriermedium stellt eine mit Zusätzen versehene Pufferlösung dar, die in ihrer Zusammensetzung dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) im Wesentlichen entspricht.

- In einer beispielhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt Schritt
- 10 c) und/oder Schritt d) und/oder Schritt e) bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C, bevorzugt in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C.

Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung genauer beschrieben:

- 15 Das Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers der vorliegenden Erfindung umfasst mindestens die Schritte:
- a) die Bereitstellung eines flüssigen biologischen Mediums enthaltend eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin,
- 20 b) die Bereitstellung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes,
- c) Inkontaktbringen des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a) mit dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) zur Ermöglichung einer Wechselwirkung zwischen dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) und dem in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a)
- 25 enthaltenen Hämoglobin, und
- d) Bestimmung der emittierten Lumineszenz von dem Hämoglobin interagierenden Lanthanoidkomplex in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt c).

Gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens, wird ein flüssiges biologisches Medium enthaltend eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin bereitgestellt.

- 5 Der Begriff "flüssiges Medium" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung in seiner üblichen, dem Fachmann geläufigen Bedeutung verstanden. Insbesondere bezieht sich dieser Begriff auf ein biologisches Medium, dass bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C, bevorzugt in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C flüssig ist. Unter dem Begriff "biologisches Medium" wird im Sinne dieser
- 10 Erfindung eine menschliche oder tierische Körperflüssigkeit verstanden. Insbesondere bezieht sich dieser Begriff auf extrazelluläre Körperflüssigkeiten, wie Körperflüssigkeiten, die in Kreisläufen zirkulieren, Verdauungssäfte, Sekrete und Exkrete. Unter dem Begriff "Körper" wird im Sinne dieser Erfindung ein menschlicher oder tierischer Körper verstanden. Insbesondere bezieht sich dieser
- 15 Begriff auf einen menschlichen Körper.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Speichel, Urin, Fruchtwasser, Liquor und Gemische von diesen.

- 20 Beispielsweise ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Speichel, Urin, Fruchtwasser oder Liquor.
- 25 Insbesondere ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Speichel oder Urin. Alternativ ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt aus der Gruppe umfassend

Vollblut, Serum oder Plasma. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das flüssige biologische Medium aus Schritt a) Serum oder Plasma.

Der Begriff "Hämoglobin" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung in seiner üblichen, dem Fachmann geläufigen Bedeutung verstanden. Insbesondere bezieht sich dieser Begriff auf Hämoglobin A1 (HbA1 oder HbA) Hämoglobin A2 (HbA2), sowie die fetalen Hämoglobine HbF und Gower-2

Die zu bestimmende Menge an Hämoglobin in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) kann in einem weiten Bereich variieren. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das flüssige biologische Medium aus Schritt a) eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 1 bis 5000 mg/l. Beispielsweise umfasst das flüssige biologische Medium eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 5 bis 4000 mg/l oder in einem Bereich von 10 bis 2000 mg/l.

Insbesondere umfasst das flüssige biologische Medium eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 10 bis 1000 mg/l oder in einem Bereich von 10 bis 500 mg/l. Alternativ umfasst das flüssige biologische Medium eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 10 bis 100 mg/l. Beispielsweise umfasst das flüssige biologische Medium eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 10 bis 50 mg/l oder in einem Bereich von 10 bis 30 mg/l.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das flüssige biologische Medium Blutplasma und umfasst eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 10 bis 1000 mg/l. Alternativ ist das flüssige biologische Medium

Blutserum und umfasst eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 10 bis 1000 mg/l.

Das flüssige biologische Medium kann das flüssige biologische Medium als solches
5 oder verdünnt sein. Beispielsweise ist das flüssige biologische Medium das flüssige biologische Medium als solches.

Gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens, wird mindestens ein lumineszenter Lanthanoidkomplex bereitgestellt.

10

Der Begriff "lumineszent" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung in seiner üblichen, dem Fachmann geläufigen Bedeutung verstanden. Insbesondere umfasst dieser Begriff Lanthanoidkomplexe, die nach entsprechender Anregung elektromagnetische Strahlung im UV-/VIS-/NIR-Bereich emittieren.

15

Lumineszente Lanthanoidkomplexe, die in Wechselwirkung mit Hämoglobin eine lange Lebensdauer aufweisen, sind Komplexe mit einer Lebensdauer von mehr als 100 µs. Lumineszente Lanthanoidkomplexe, die in Wechselwirkung mit Hämoglobin eine kurze Lebensdauer aufweisen, sind Komplexe mit einer Lebensdauer von
20 weniger als 100 µs.

25

Beispielsweise hat der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b), in Wechselwirkung mit Hämoglobin, eine lange Lebensdauer. Alternativ hat der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b), in Wechselwirkung mit Hämoglobin, eine kurze Lebensdauer.

Unter dem Begriff "Lanthanoidkomplex" wird im Sinne dieser Erfindung eine Verbindung verstanden, die ein oder mehrere Lanthanoidionen als Zentralion und

einen oder mehrere Liganden umfasst. Beispielsweise umfasst, vorzugsweise enthält, der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex ein Lanthanoidion als Zentralion und einen oder mehrere Liganden. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst, vorzugsweise enthält, der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex ein Lanthanoidion als Zentralion und einen
5 Liganden.

An den mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex werden keine besonderen Anforderungen gestellt, vorausgesetzt es handelt sich um einen
10 hämoglobin-sensitiven lumineszenten Lanthanoidkomplex. Unter dem Begriff "hämoglobin-sensitiver" lumineszenter Lanthanoidkomplex wird im Sinne dieser Erfindung eine Verbindung verstanden, die in Wechselwirkung mit Hämoglobin veränderte lumineszente Eigenschaften aufweist. In anderen Worten, das Emissionsspektrum des lumineszenten Lanthanoidkomplexes muss zumindest
15 teilweise mit dem Absorptionsspektrum des Hämoglobins überlappen, so dass der Energietransfer zwischen lumineszentem Lanthanoidkomplex und Hämoglobin zumindest eine Lumineszenzeigenschaft des lumineszenten Lanthanoidkomplexes meßbar ändert.

20 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird in Schritt b) ein lumineszenter Lanthanoidkomplex bereitgestellt. Alternativ werden in Schritt b) mehrere lumineszente Lanthanoidkomplexe bereitgestellt.

Der Begriff "Lanthanoid"komplex wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung in
25 seiner üblichen, dem Fachmann geläufigen Bedeutung verstanden. Insbesondere umfasst dieser Begriff Lanthanoidionen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cer, Praseodym, Neodym, Promethium, Samarium, Europium, Gadolinium,

Terbium, Dysprosium, Holmium, Erbium, Thulium, Ytterbium, Yttrium und Gemische von diesen.

Beispielsweise umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus
5 Schritt b) mindestens ein Lanthanoid(III)-Ion. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) ein Lanthanoid(III)-Ion. Alternativ umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) zwei oder drei Lanthanoid(III)-Ionen.

10

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist das mindestens eine Lanthanoid(III)-Ion ausgewählt aus der Gruppe umfassend Ytterbium(III)-Ion (Yb^{3+}), Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Erbium(III)-Ion (Er^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}), Neodymium(III)-Ion (Nd^{3+})
15 und Gemische von diesen.

Beispielsweise ist das mindestens eine Lanthanoid(III)-Ion ausgewählt aus der Gruppe umfassend Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}) und Gemische von diesen.

20

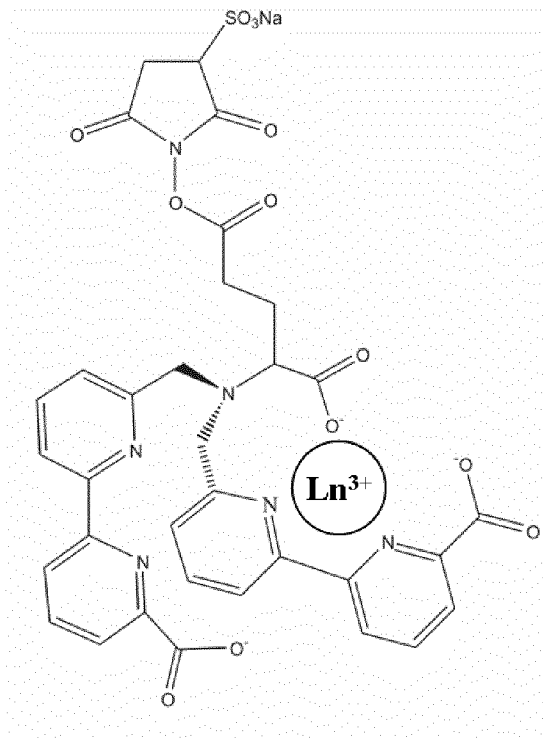
Vorzugsweise ist das mindestens eine Lanthanoid(III)-Ion ein Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}) oder ein Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}).

25 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mindestens einen mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildenden Liganden. Beispielsweise umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) einen mit dem

Lanthanoid(III)-Ion komplexbildenden Liganden. Alternativ umfasst der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mehrere mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildende Liganden.

- 5 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst der mindestens eine komplexbildende Ligand mindestens ein mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element ausgewählt aus der Gruppe umfassend Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor und Gemische von diesen. Beispielsweise umfasst der mindestens eine komplexbildende Ligand mindestens ein mit dem
- 10 Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element ausgewählt aus der Gruppe umfassend Stickstoff, Sauerstoff und Gemische von diesen. Vorzugsweise umfasst der mindestens eine komplexbildende Ligand ein Gemisch aus Stickstoff und Sauerstoff als mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element. Alternativ umfasst der mindestens eine komplexbildende Ligand mindestens ein mit dem
- 15 Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element ausgewählt aus der Gruppe umfassend Schwefel oder Phosphor.

- In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird der kommerziell erhältliche Lanthanoidkomplex Lumi4Tb-NHS (Lumiphore Inc., Kalifornien, USA)
- 20 als der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex in Schritt b) bereitgestellt. Alternativ wird der kommerziell erhältliche Luminophor Europium Tris(bipyridin) (Eu-TBP; Cisbio Bioassays, Frankreich, Europa) als der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex in Schritt b) bereitgestellt.
- 25 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird die folgende Struktur I als der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex in Schritt b) bereitgestellt:



Struktur I

- In der Struktur I ist das Lanthanoid(III)-Ion vorzugsweise Europium oder Terbium.
- 5 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist das Lanthanoid(III)-Ion in der Struktur I vorzugsweise Europium oder Terbium.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ist der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex wasserlöslich.

10

Vorzugsweise weist der lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) eine Löslichkeit in Wasser bei 20 °C (± 2 °C) von mehr als 1 g/l. Beispielsweise weist der lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) eine Löslichkeit in Wasser bei 20 °C (± 2 °C) von 1 bis 50 g/l, bevorzugt von 1 bis 40g/l, weiter bevorzugt von 1 bis

15 30 g/l und noch weiter bevorzugt von 1 bis 20 g/l auf.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) in einer Menge von 1 ng/l bis 1000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 500 mg/l und weiter bevorzugt in
5 einem Bereich von 10 ng/l bis 100 mg/l, basierend auf der Menge des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a), bereitgestellt.

Gemäß Schritt c) der vorliegenden Erfindung wird das flüssige biologische Medium aus Schritt a) mit dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) in Kontakt
10 gebracht. Das Inkontaktbringen ermöglicht eine Wechselwirkung zwischen dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) und dem in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) enthaltenen Hämoglobin.

Das Inkontaktbringen des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a) mit dem
15 lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) erfolgt beispielsweise durch Diffusion in der Probe oder unter Rühren. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt das Inkontaktbringen des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a) mit dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) unter Rühren vorzugsweise unter Rühren.

20 Unter dem Begriff "Rühren" wird im Sinne dieser Erfindung jegliche Durchmischung des erhaltenen Gemisches verstanden, die zu einer ausreichenden räumlichen Nähe zwischen Hämoglobin und dem lumineszenten Lanthanoidkomplex führt, um eine Emission von Lumineszenz zu erzielen.

25 Dementsprechend kann das Rühren durch Schütteln des Gemisches oder durch ein mechanisches Gerät, wie ein Rührfisch oder ein Rührstab, erfolgen.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst das in Schritt c) erhaltene flüssige biologische Medium den mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) in einer Menge von 1 ng/l bis 1000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 500 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 100 mg/l, basierend auf der Menge des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a).

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt Schritt c) bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C. Beispielsweise erfolgt Schritt c) bei einer Temperatur in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C.

Gemäß Schritt d) der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz von dem mit Hämoglobin interagierenden Lanthanoidkomplex in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt c).

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) in einem Wellenlängenbereich größer 400 nm.

Beispielsweise erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 1000 nm.

Der strahlungslose Energietransfer zwischen Hämoglobin und dem mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex hängt von der räumlichen Nähe beider Verbindungen ab. Daher ändern sich die bestimmmbaren Lumineszenzwerte wie Lumineszenzintensität und Lumineszenzabklingzeit des lumineszenten Lanthanoidkomplexes besonders effizient, wenn eine substantielle Anzahl von Molekülen beider Verbindungen in engen räumlichen Kontakt gebracht wird. Ferner ist bevorzugt, dass die Menge an dem mindestens einen lumineszenten

Lanthanoidkomplex nicht zu hoch ist. Beispielsweise umfasst das in Schritt c) erhaltene flüssige biologische Medium den mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplex in einer Menge von 1 ng/l bis 1000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 500 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 100 mg/l, basierend auf der Menge des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a).

Daher erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) vorzugsweise durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit und/oder Lumineszenzintensität.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit und Lumineszenzintensität. Alternativ erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit oder Lumineszenzintensität.

Beispielsweise erfolgt die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt Schritt d) bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C. Beispielsweise erfolgt Schritt d) bei einer Temperatur in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, umfasst das erfinderische Verfahren ferner Schritt e), in dem die quantitative Bestimmung des Hämoglobins in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) durch Vergleich der in Schritt d) bestimmten emittierten Lumineszenz mit einer Kalibrierkurve erfolgt.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wird die Kalibrierkurve durch Bestimmung der emittierten Lumineszenz von definierten Mengen an Hämoglobin in einem flüssigen Kalibriermedium erhalten. Das Kalibriermedium entspricht dabei in
5 seiner Zusammensetzung dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a), mit der Maßgabe, dass kein Hämoglobin enthalten ist oder nur eine bekannte Menge an Hämoglobin enthalten ist. Alternativ stellt das flüssige Kalibriermedium eine mit Zusätzen versehene Pufferlösung dar, die in ihrer Zusammensetzung dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) im Wesentlichen entspricht.

10

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, erfolgt Schritt e) bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C. Beispielsweise erfolgt Schritt e) bei einer Temperatur in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C.

15 Unter dem Begriff "quantitative Bestimmungen von Hämoglobin" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird die Bestimmung der Konzentration des in dem flüssigen biologischen Mediums enthaltenden Hämoglobins verstanden.

In anderen Worten, die quantitative Bestimmung von Hämoglobin in dem flüssigen
20 biologischen Medium erfolgt durch Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d), wie durch die Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit und/oder Lumineszenzintensität. Beispielsweise erfolgt die quantitative Bestimmung von Hämoglobin in dem flüssigen biologischen Medium durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit oder Lumineszenzintensität. Vorzugsweise erfolgt die
25 quantitative Bestimmung von Hämoglobin in dem flüssigen biologischen Medium durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit.

Das dargestellte Verfahren bietet insbesondere den Vorteil, dass es eine quantitative Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers ermöglicht und das Verfahren ohne aufwendige Probenvorbereitung und chemische Veränderung der Probe durchgeführt werden. Zusätzlich kann der

5 Verbrauch an Chemikalien deutlich reduziert werden, wodurch Kosten, Arbeitsaufwand und Entsorgungsaufwand minimiert werden können. Des Weiteren weist das Verfahren eine geringe Störungsanfälligkeit durch in der Probe enthaltene Verbindungen auf. Insgesamt resultiert daraus, dass bei vergleichbarer Sensitivität der Messungen, auch eine Zeit-, als auch eine Verbrauchsmaterialienersparnis im

10 Vergleich zu gebräuchlichen Verfahren auftritt. Es ist weiterhin möglich, dieselbe Probe zur Bestimmung weiterer Biomarker zu nutzen. Dies kann beispielsweise auf der Basis von Försterresonanzenergietransfer (FRET) in FRET-Immunoassays geschehen, bei dem der in Schritt b) bereitgestellte lumineszente Lanthanoidkomplexe als Donor fungiert. Dies macht die gleichzeitige Bestimmung

15 mehrerer Biomarker mit einer Messung (Multiplexing) möglich.

Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften, kann der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex in einem weiteren Aspekt zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers

20 verwendet werden.

Die Ausgestaltungen des flüssigen biologischen Mediums und des mindestens einen lumineszenten Lanthanoidkomplexes gemäß dem erfinderischen Verfahren gelten auch für die Verwendung und umgekehrt.

25

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit von Lumi4Tb von der Hämoglobinkonzentration in Wasser.

5

Fig. 2: Bestimmung von Hämoglobin in Wasser nach dem erfinderischen Verfahren und gebräuchlichen Bestimmungsmethoden im Vergleich zu der tatsächlichen (erwarteten) Hb-Konzentration der Probe (durchgehende Linie).

10 Fig. 3: Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit von Lumi4Tb von der Hämoglobinkonzentration in Blutserum.

Fig. 4: Vergleich der experimentell durch Lumi4Tb bestimmten Hämoglobinkonzentration verschiedener Proben von Blutserum mit den erwarteten Konzentrationen (gestrichelte Linie).

15

Fig. 5: Vergleich der experimentell durch Lumi4Tb bestimmten Hämoglobinkonzentration verschiedener Proben von Blutplasma und Blutserum mit den erwarteten Konzentrationen (durchgehende Linie).

20

Fig. 6: Bestimmung von Hämoglobin in Plasma und Vergleich der mit verschiedenen Bestimmungsmethoden ermittelten Hb-Konzentration in der Probe.

Fig. 7: Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit von Lumi4Tb von der Hämoglobinkonzentration in Urin und Speichel.

25

Beispiele

Zum Nachweis der quantitativen Bestimmung von Hämoglobin (Hb) in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers sind u.a. die nachfolgend
5 dargestellten Versuche durchgeführt worden. Es haben sich reproduzierbare Ergebnisse gezeigt, die mit der tatsächlichen Hämoglobinkonzentration besser übereinstimmen wie die die durch gebräuchliche Verfahren bestimmt wurden.

Ein hämoglobinsensitives Luminophor wurde zur Bestimmung der
10 Hämoglobinkonzentration in einer Probe untersucht. Lanthanoidkomplexe stellten sich im Verlauf der Untersuchungen als geeignete Luminophore heraus. Ihre Lumineszenz hängt sowohl in Intensität als auch Abklingzeit von der Konzentration an Hämoglobin in der zu untersuchenden Probe ab (siehe Fig 1), wobei die Veränderung der Lumineszenzabklingzeit als Parameter eindeutiger ist. Die
15 Untersuchungen wurden sowohl mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Kryptor (BRAHMS, Hennigsdorf, Deutschland), dem Mikrotiterplattenlesegerät Nanoscan LF500 (IOM, Berlin, Deutschland) als auch dem Spektrometer FLS920 (Edinburgh Instruments, Edinburgh, UK) durchgeführt. Ein Vergleich der mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Lanthanoidkomplexes Lumi4Tb-NHS (Lumiphore Inc.
20 Kalifornien, USA) ermittelten Hämoglobinkonzentrationen in Wasser im Vergleich zu verschiedenen bisher gebräuchlichen Verfahren zeigt, dass das erfinderische Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin mittels Lanthanoidlumineszenz mindestens vergleichbare, im Mittel sogar exaktere Messergebnisse liefert als die bisher gebräuchlichen Verfahren (siehe Fig. 2). Die
25 mit dem erfinderischen Verfahren und den gebräuchlichen Verfahren bestimmten Hämoglobinkonzentrationen sind im Vergleich zur tatsächlichen Hb-Konzentration der Probe dargestellt.

Bei Messungen in anderen Medien als Wasser sind Wechselwirkungen mit weiteren in dem Medium enthaltenen Probenbestandteilen generell möglich, die die zu emittierende Lumineszenz der Lanthanoidkomplexe beeinflussen können. Dies ist vor allem bei Messungen in Blutplasma und –serum zu berücksichtigen, da diese
5 einen hohen Anteil an verschiedensten Proteinen aufweisen. Zu nennen sind hier insbesondere Albumin und verschiedene Globuline, deren Konzentrationen üblicherweise 38 – 52 g/l (Albumin), 3,9 – 9,4 g/l (α -Globuline), 5 – 9 g/l (β -Globuline) bzw. 7 – 15 g/l (γ -Globuline) betragen.

10 Trotz dieser Vielzahl möglicher Wechselwirkungspartner, zeigt das erfinderische Verfahren nur eine sehr geringe Anfälligkeit für Störungen. Insbesondere ist festzustellen, dass die Lumineszenzlebenszeit von Lanthanoidkomplexen in verschiedenen Proben von Plasma und Serum nur wenig schwankt. Die Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit von Lumi4Tb von der Hämoglobinkonzentration in
15 Blutserum ist in Fig. 3 dargestellt. Aufgrund dieser geringen Schwankungen der Lumineszenzabklingzeit kann davon ausgegangen werden, dass eine Kalibrierkurve für Blutplasma und –serum Gültigkeit für alle Messungen in diesen Körperflüssigkeiten besitzt. Diese Kalibrierkurve kann daher als Kalibrierkurve für alle durchgeführten Messungen in Blutplasma und Blutserum verwendet werden.

20

Die vorherige Annahme wird durch Bestimmungen der Hämoglobin-Konzentration mit Hilfe dieser Kalibrierkurve in Plasma und Serum verschiedener Personen gestützt (siehe Fig. 4 und 5), da die erzielten Ergebnisse, insbesondere für Blutserum, sehr gut mit den Erwartungen übereinstimmen.

25

Dazu wurden zu einer Plasma- oder Serumprobe zunehmende Konzentrationen an Hämoglobin pipettiert und anschließend die Hb-Konzentration in den Proben bestimmt. Im Idealfall sollte die ermittelte Konzentration mit der zugegebenen

identisch sein. Im Gegensatz zum Blutserum wiesen alle Plasmaproben eine Initialkonzentration zwischen 0.3 und 0.5 g/l Hämoglobin auf. Diese wurde zum besseren Vergleich der erwarteten mit den ermittelten Hb-Konzentrationen von den experimentell ermittelten Hb-Gesamtkonzentrationen in der Probe abgezogen.

- 5 Dadurch kam es zu größeren Schwankungen der Ergebnisse in Blutplasma (siehe Fig. 5), verglichen mit denen in Blutserum (siehe Fig. 4).

- Ein Vergleich der über die Lanthanoidlumineszenz ermittelten Hb-Konzentrationen einer Plasmaprobe mit den Ergebnissen, die durch andere gebräuchliche
- 10 Bestimmungsmethoden gewonnen wurden, zeigt eine gute Übereinstimmung der ermittelten Konzentrationen aller Methoden (siehe Fig. 6). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte für die Methode nach Kahn direkt, für TMB und Lumi4Tb durch Vergleich der Ergebnisse der Plasmamessung mit der jeweiligen Kalibrierkurve. Der Hämoglobingehalt des genutzten Plasmas ohne Zugabe von
- 15 Hämoglobin wurde zu etwa 0.23 g/l bestimmt.

- Dies verdeutlicht eindrucksvoll die Anwendbarkeit des erfinderischen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Hb-Konzentration mit Lanthanoidkomplexen in einem flüssigen biologischen Medium, wie z.B. Blutplasma oder Serum. Die Sensitivität ist
- 20 damit ausreichend, um untypische Hämoglobinkonzentrationen nachzuweisen.

- Auch die quantitative Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium wie Urin oder Speichel ist möglich. Bei diesen Körperflüssigkeiten ist zu erwarten, dass der Einfluss des pH-Werte in den Vordergrund tritt, da bei sauren pH-
- 25 Werten die Lumineszenz des verwendeten Lanthanoidkomplexes stark verändert sein kann. Es konnte aber gezeigt werden, dass auch bei Messungen in Urin und Speichel eine konzentrationsabhängige Änderung der Lumineszenzlebenszeit auftritt (siehe Fig. 7). Da bereits bei Konzentrationen von wenigen mg/l zum Teil deutliche

Änderungen der Lumineszenzlebenszeit auftreten, sind ähnlich sensitive Messungen wie in Blutplasma und –serum möglich.

Der Ablauf der Messung der Hämoglobinkonzentration mit Lanthanoidkomplexen ist
5 für alle Messungen wie folgt:

Zu einer zu untersuchenden Probe wird ein Lanthanoidkomplex zugegeben. Dessen Konzentration kann relativ frei gewählt werden. Es sind Lanthanoid-Konzentrationen bis in den fM-Bereich möglich, was im Sinne einer Kosten- und Materialienersparnis
10 wünschenswert ist. Direkt anschließend kann, ohne eine Inkubationszeit beachten zu müssen, die Messung der Lumineszenz des Lanthanoidkomplexes erfolgen. Dieser wird dabei im spektralen Bereich seiner Absorption mit einer gepulsten Anregungslichtquelle (Laser, Blitzlichtlampe, LED, LD) bestrahlt, sofern die Messung zeitaufgelöst und/oder steady-state erfolgen soll bzw. mit einer
15 kontinuierlichen Lichtquelle (Xe-Lampe, LED) falls die Messung nur steady-state erfolgt. Die Messung der Lumineszenzintensität (steady-state oder zeitaufgelöst) oder der Lumineszenzabklingzeit erfolgt im Bereich eines oder aller Emissionsmaxima der Lanthanoidkomplexe. Die Messung kann durch verschiedene Geräte verschiedener Hersteller erfolgen, wie beispielsweise einem
20 Mikrotiterplattenlesegerät Kryptor (BRAHMS, Hennigsdorf, Deutschland), einem Mikrotiterplattenlesegerät Nanoscan LF500 (IOM, Berlin, Deutschland) als auch einem Spektrometer FLS920 (Edinburgh Instruments, Edinburgh, UK). Da die Lumineszenz der Lanthanoidkomplexe von der Hämoglobinkonzentration in der Probe abhängig ist, kann die Intensität bzw. die Abklingzeit derselben mit der einer
25 Kalibrierkurve verglichen und so die Hämoglobinkonzentration in der zu untersuchenden Probe bestimmt werden.

Die Kalibrierkurve wird durch die Aufnahme einer Kurve von Hämoglobinstandards verschiedener Konzentration im jeweils zu untersuchenden Medium (Plasma, Serum, Urin, Speichel, u.ä. bzw. Pufferlösungen, deren Zusammensetzung der des untersuchten Mediums sehr ähnlich ist) für das jeweils zur Messung benutzte

- 5 Messgerät (Spektrometer, Fluoreszenzreader) erstellt (siehe Fig. 3).

Ansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium außerhalb des Körpers, umfassend:
 - a) die Bereitstellung eines flüssigen biologischen Mediums enthaltend eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin,
 - b) die Bereitstellung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes,
 - c) Inkontaktbringen des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a) mit dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) zur Ermöglichung einer Wechselwirkung zwischen dem lumineszenten Lanthanoidkomplex aus Schritt b) und dem in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) enthaltenen Hämoglobin, und
 - d) Bestimmung der emittierten Lumineszenz von dem Hämoglobin interagierenden Lanthanoidkomplex in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt c).
2. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei das flüssige biologische Medium aus Schritt a) ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Speichel, Urin, Fruchtwasser, Liquor und Gemische von diesen.
3. Das Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das flüssige biologische Medium aus Schritt a) eine zu bestimmende Menge an Hämoglobin in einem Bereich von 1 bis 5000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 5 bis 4000 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 bis 2000 mg/l umfasst.
4. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b)
 - a) wasserlöslich ist,

und/oder

b) in einer Menge von 1 ng/l bis 1000 mg/l, bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 500 mg/l und weiter bevorzugt in einem Bereich von 10 ng/l bis 100 mg/l, basierend auf der Menge des flüssigen biologischen Mediums aus Schritt a), bereitgestellt wird.

5

5. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mindestens ein Lanthanoid(III)-Ion umfasst.

10

6. Das Verfahren nach Anspruch 5, wobei das mindestens eine Lanthanoid(III)-Ion ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Ytterbium(III)-Ion (Yb^{3+}), Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Erbium(III)-Ion (Er^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}), Neodymium(III)-Ion (Nd^{3+}) und Gemische von diesen, und bevorzugt aus der Gruppe umfassend Terbium(III)-Ion (Tb^{3+}), Europium(III)-Ion (Eu^{3+}), Samarium(III)-Ion (Sm^{3+}), Dysprosium(III)-Ion (Dy^{3+}) und Gemische von diesen.

15

7. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, wobei der mindestens eine lumineszente Lanthanoidkomplex aus Schritt b) mindestens einen mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildenden Liganden umfasst.

20

8. Das Verfahren nach Anspruch 7, wobei der mindestens eine komplexbildende Ligand mindestens ein mit dem Lanthanoid(III)-Ion komplexbildendes Element ausgewählt aus der Gruppe umfassend Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor und Gemische von diesen umfasst.

25

9. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) in einem Wellenlängenbereich größer 400 nm, bevorzugt in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 1000 nm, durchgeführt wird.
- 5
10. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung der emittierten Lumineszenz in Schritt d) durch Bestimmung der Lumineszenzabklingzeit und/oder Lumineszenzintensität erfolgt.
- 10 11. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Verfahren ferner Schritt e) umfasst, indem die quantitative Bestimmung des Hämoglobins in dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) durch Vergleich der in Schritt d) bestimmten emittierten Lumineszenz mit einer Kalibrierkurve erfolgt.
- 15
12. Das Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Kalibrierkurve durch Bestimmung der emittierten Lumineszenz von definierten Mengen an Hämoglobin in einem flüssigen Kalibriermedium erhalten wird und das flüssige Kalibriermedium dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) entspricht oder das flüssige Kalibriermedium eine mit Zusätzen versehene Pufferlösung darstellt, die in ihrer Zusammensetzung dem flüssigen biologischen Medium aus Schritt a) im Wesentlichen entspricht.
- 20
13. Das Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei Schritt c) und/oder Schritt d) und/oder Schritt e) bei einer Temperatur in einem Bereich von 15 °C bis 50 °C, bevorzugt in einem Bereich von 20 °C bis 40 °C erfolgt.
- 25

14. Verwendung mindestens eines lumineszenten Lanthanoidkomplexes gemäß einem der Ansprüche 4 bis 8 zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in einem flüssigen biologischen Medium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 außerhalb des Körpers.

Figuren

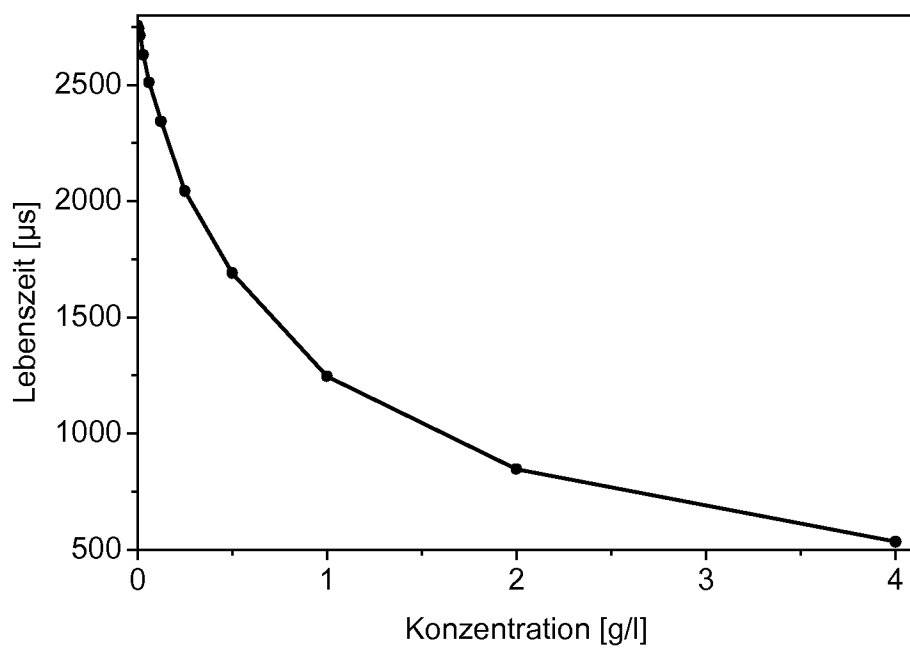


Fig. 1

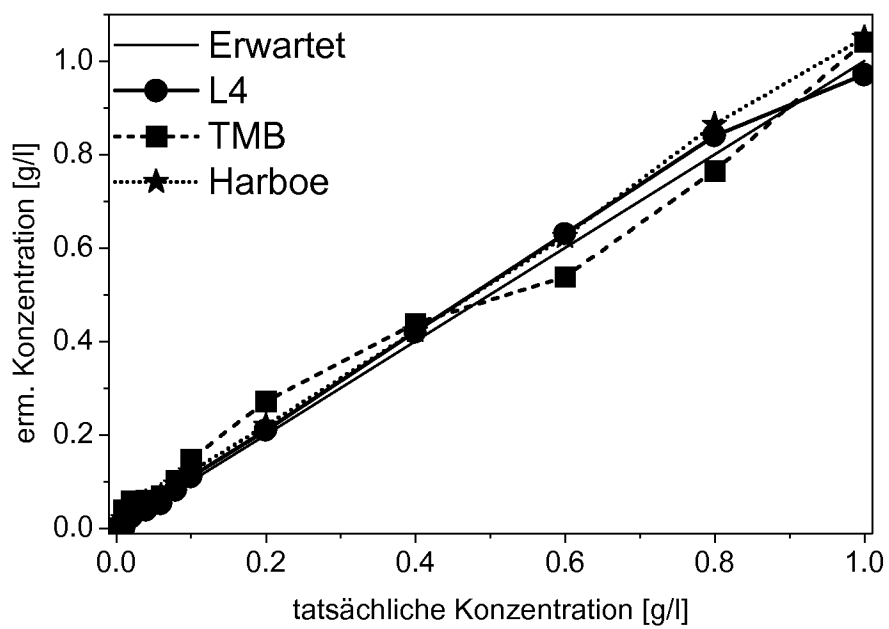


Fig. 2

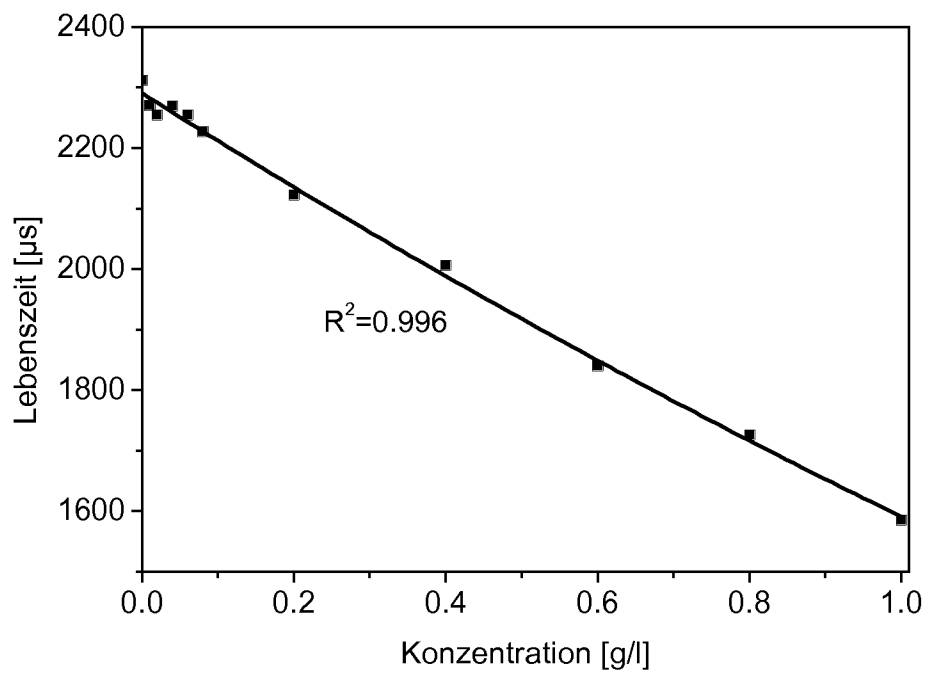


Fig. 3

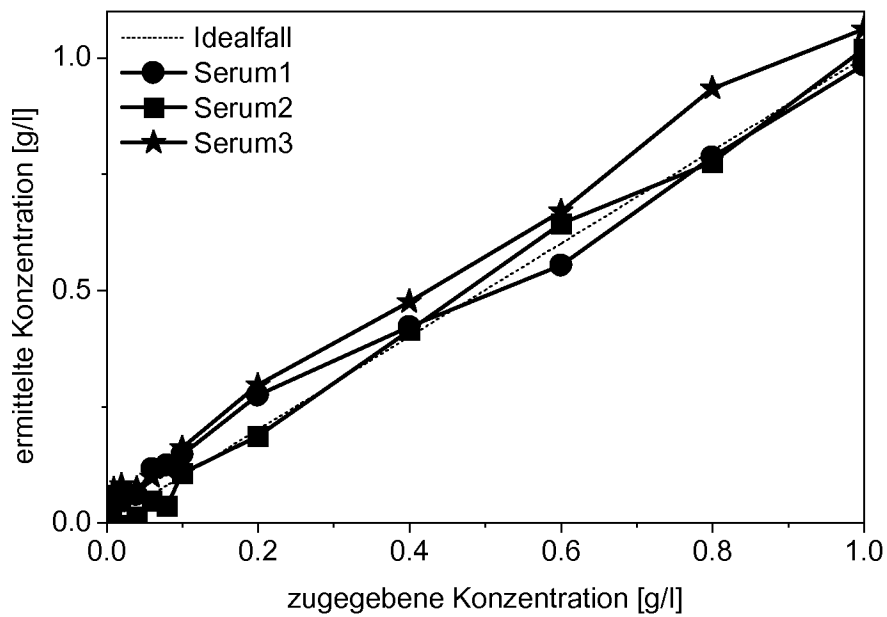


Fig. 4

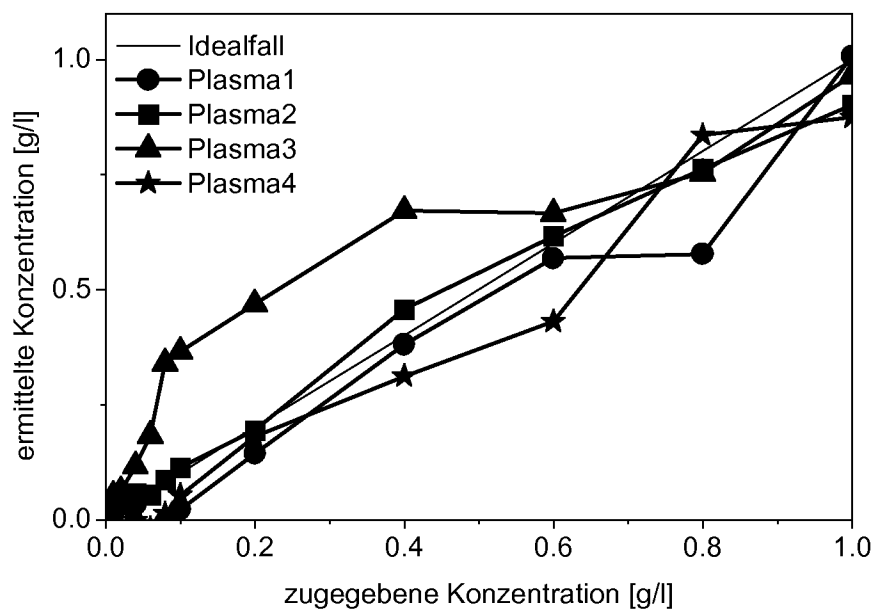


Fig. 5

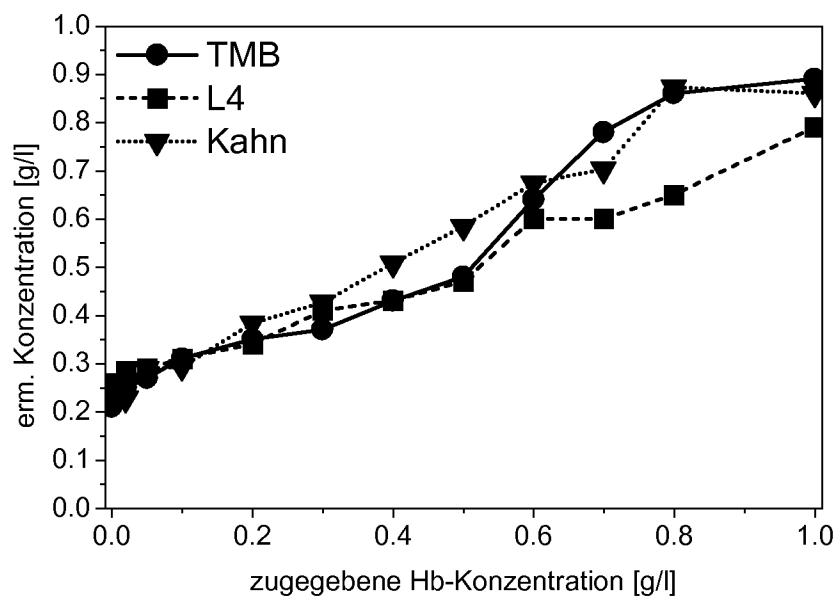


Fig. 6

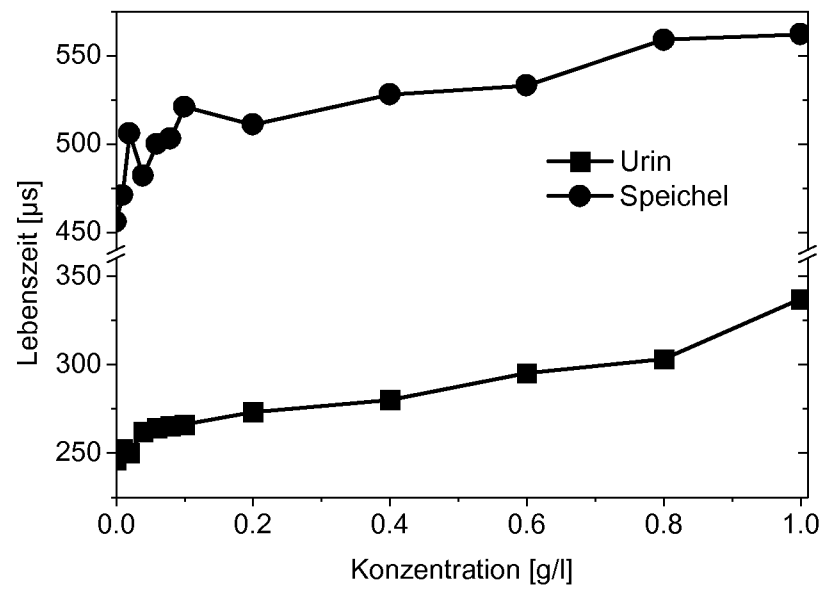


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N21/64 G01N33/58 G01N33/72
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 206 144 A (ZEUTHEN JESPER [DK] ET AL) 27 April 1993 (1993-04-27) column 1, lines 52-53 column 7, line 7 - column 8, line 26 column 11, line 56 claims 1,5	1-14
X	----- WO 2005/029092 A1 (WALLAC OY [FI]; BLOMBERG KAJ [FI]; KANKAANPAEAE PASI [FI]; CAMPBELL TH) 31 March 2005 (2005-03-31) page 5, lines 6-17 page 6, line 14 page 7, lines 29-33 page 9, lines 4-18; claims 1,8,9; figures 1,2A,2B; example 2 ----- -/-	1-6,9-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2014

Date of mailing of the international search report

15/05/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duijs, Eric

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055805

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHENG Y ET AL: "Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2,3-DPG-hemoglobin's oxygen affinity", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1535, no. 2, 14 February 2001 (2001-02-14), pages 200-216, XP004277053, ISSN: 0925-4439, DOI: 10.1016/S0925-4439(00)00100-9 table 4	13
X	----- US 6 340 744 B1 (LEIF ROBERT C [US] ET AL) 22 January 2002 (2002-01-22) columns 1-4 column 8 column 11, lines 40-44 column 14, line 49 -----	1-10,13, 14
X	----- US 2012/052516 A1 (BAUDIN-CREUZA VERONIQUE [FR] ET AL) 1 March 2012 (2012-03-01) paragraphs [0021], [0025], [0034], [0119], [0120] -----	1-6,9, 11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055805

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5206144	A	27-04-1993	NONE

WO 2005029092	A1	31-03-2005	AT 427500 T 15-04-2009
		BR PI0414666 A 28-11-2006	
		CA 2539793 A1 31-03-2005	
		CN 1882840 A 20-12-2006	
		EP 1673635 A1 28-06-2006	
		ES 2321104 T3 02-06-2009	
		HK 1089511 A1 10-07-2009	
		WO 2005029092 A1 31-03-2005	

US 6340744	B1	22-01-2002	AT 270298 T 15-07-2004
		CA 2360054 A1 20-07-2000	
		DE 60011877 D1 05-08-2004	
		EP 1150985 A1 07-11-2001	
		US 6340744 B1 22-01-2002	
		US 2002132992 A1 19-09-2002	
		WO 0042048 A1 20-07-2000	

US 2012052516	A1	01-03-2012	EP 2422203 A1 29-02-2012
		US 2012052516 A1 01-03-2012	
		WO 2010122160 A1 28-10-2010	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N21/64 G01N33/58 G01N33/72 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 206 144 A (ZEUTHEN JESPER [DK] ET AL) 27. April 1993 (1993-04-27) Spalte 1, Zeilen 52-53 Spalte 7, Zeile 7 - Spalte 8, Zeile 26 Spalte 11, Zeile 56 Ansprüche 1,5 -----	1-14
X	WO 2005/029092 A1 (WALLAC OY [FI]; BLOMBERG KAJ [FI]; KANKAANPAEAE PASI [FI]; CAMPBELL TH) 31. März 2005 (2005-03-31) Seite 5, Zeilen 6-17 Seite 6, Zeile 14 Seite 7, Zeilen 29-33 Seite 9, Zeilen 4-18; Ansprüche 1,8,9; Abbildungen 1,2A,2B; Beispiel 2 ----- -/-	1-6,9-14
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. Mai 2014		15/05/2014
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Duijs, Eric

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHENG Y ET AL: "Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2,3-DPG-hemoglobin's oxygen affinity", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, Bd. 1535, Nr. 2, 14. Februar 2001 (2001-02-14), Seiten 200-216, XP004277053, ISSN: 0925-4439, DOI: 10.1016/S0925-4439(00)00100-9 Tabelle 4	13
X	----- US 6 340 744 B1 (LEIF ROBERT C [US] ET AL) 22. Januar 2002 (2002-01-22) Spalten 1-4 Spalte 8 Spalte 11, Zeilen 40-44 Spalte 14, Zeile 49	1-10,13, 14
X	----- US 2012/052516 A1 (BAUDIN-CREUZA VERONIQUE [FR] ET AL) 1. März 2012 (2012-03-01) Absätze [0021], [0025], [0034], [0119], [0120] -----	1-6,9, 11-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055805

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5206144	A	27-04-1993	KEINE
WO 2005029092	A1	31-03-2005	AT 427500 T 15-04-2009
		BR PI0414666 A	28-11-2006
		CA 2539793 A1	31-03-2005
		CN 1882840 A	20-12-2006
		EP 1673635 A1	28-06-2006
		ES 2321104 T3	02-06-2009
		HK 1089511 A1	10-07-2009
		WO 2005029092 A1	31-03-2005
US 6340744	B1	22-01-2002	AT 270298 T 15-07-2004
		CA 2360054 A1	20-07-2000
		DE 60011877 D1	05-08-2004
		EP 1150985 A1	07-11-2001
		US 6340744 B1	22-01-2002
		US 2002132992 A1	19-09-2002
		WO 0042048 A1	20-07-2000
US 2012052516	A1	01-03-2012	EP 2422203 A1 29-02-2012
		US 2012052516 A1	01-03-2012
		WO 2010122160 A1	28-10-2010