(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 10 032 T2** 2007.07.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 473 347 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 10 032.5**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 009 704.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **30.04.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.11.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C09K 11/02*** (2006.01)
C09K 11/81 (2006.01)

(73) Patentinhaber:
Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN) GmbH, 20146 Hamburg, DE; Bayer Technology Services GmbH, 51373 Leverkusen, DE

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(72) Erfinder:
Dr Meyer, Christiane, 20359 Hamburg, DE; Dr Haase, Markus, 22457 Hamburg, DE; Dr Hoheisel, Werner, 51061 Köln, DE; Dr Bohmann, Kerstin, 50733 Köln, DE

(54) Bezeichnung: **Kern-Mantel Nanoteilchen für (F) RET-Testverfahren**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft lumineszente, insbesondere fotolumineszente Nanopartikel mit einem Kern aus einem Metallsalz oder -oxid, umgeben von einer lumineszenten Schale, die Synthese dieser Partikel sowie deren Verwendung in (F)RET-Assayverfahren, insbesondere in Bioassayverfahren.

Hintergrund der vorliegenden Anmeldung

[0002] Im Laufe der letzten Dekade haben Nanopartikel, d.h. Partikel mit einer Größe unterhalb 1 μm, großes Interesse in Forschung und Industrie wegen ihrer einzigartigen Eigenschaften auf sich gezogen. Forschung und Entwicklung auf optoelektronischem Gebiet haben sich auf lumineszente Partikel im Hinblick auf deren mögliche Anwendung Licht emittierenden Dioden (LED), Displays, optoelektronischen Vorrichtungen in Nanometer-Abmessungen oder als Lichtquelle in niederschwelligen Lasern konzentriert.

[0003] Unter den Lumineszenzmaterialien wird oft zwischen Halbleiter- und Nicht-Halbleiter-Materialien unterschieden.

[0004] Halbleiter-Nanopartikel (oft bezeichnet als "Quanten-Punkte"), wie II-VI- oder III-V-Halbleiter, die dotiert sein können oder nicht, sind durch eine Quantenbegrenzung von sowohl dem Elektron als auch dem Loch in allen drei Raumdimensionen gekennzeichnet, welche zu einer Steigerung bei der effektiven Bandenlücke des Materials bei sinkender Kristallgröße führt. Infolgedessen ist es möglich, sowohl die optische Absorption als auch die Emission der Halbleiter-Nanopartikel nach blau (zu höheren Energien) mit zunehmender Verkleinerung der Nanopartikel zu verschieben.

[0005] Wasserlösliche Kern/Schale-Halbleiter-Nanopartikel sind z.B. in WO 00/17 655 beschrieben.

[0006] Im Vergleich mit Quanten-Punkten beruht die besondere Attraktivität nanokristalliner Nicht-Halbleiter-basierter Lumineszenzmaterialien, insbesondere Lanthanid-dotierter Metalloxide oder -salze, darauf, dass deren Fluoreszenzemission relativ eng ist und nicht im größeren Ausmaß vom Wirtsmaterial und der Größe der Nanopartikel abhängt. Es ist vielmehr lediglich der Typ des Lanthanid-Metalls, welcher die Emissionsfarbe bestimmt. In PCT/DE 01/03 433 von denselben Anmelderinnen ist ein allgemein anwendbares Syntheseverfahren für Lanthanid-dotierte Nanopartikel dieses Typs offenbart. Diese Nanopartikel lassen sich in Größen (unterhalb 30 nm) herstellen, ohne noch länger mit der Wellenlänge des sichtbaren Lichts wechselzuwirken, um dadurch transparente Dispersionen, z.B. in organischen oder wässrigen Lösungsmitteln, zu ergeben.

[0007] Weitere Publikationen, betreffend Lanthanid-dotierte Nicht-Halbleiter-basierte Lumineszenz-Nanopartikel, sind z.B. die folgenden:
K. Riwotzki et al., Angewandte Chemie, Int. Ed. 40, 2001, Seiten 573–576, bezüglich $LaPO_4$:Ce,Tb;
K. Riwotzki, M. Haase, J. Phys. Chem. B; Band 102, 1998, Seiten 10129–10135, bezüglich YVO_4:Eu, YVO_4:Sm und YVO_4:Dy;
H. Meyssamy et al., Advanced Materials, Band 11, Ausgabe 10, 1999, Seiten 840–844, bezüglich $LaPO_4$:Eu, $LaPO_4$:Ce und $LaPO_4$:Ce,Tb;
K. Riwotzki et al., J. Phys. Chem. B 2000, Band 104, Seiten 2824–2828, "Liquid phase synthesis doped nanoparticles: colloids of luminescent $LaPO_4$:Eu and $CePO_4$:Tb particles with a narrow particle size distribution";
M. Haase et al., Journal of Alloys and Compounds, 303–304 (2000) 191–197, "Synthesis and properties of colloidal lanthanide-doped nanocrystals";
Jan W. Stouwdam und Frank C. J. M. van Veggel, Nano Letters, ASAP-Artikel, web-Freigabe: 15. Mai 2002, "Near-infrared emission of redispersible Er^{3+}, Nd^{3+} and Ho^{3+} doped LaF_3 nanoparticles"; und
G. A. Hebbink et al., Advanced Materials 2002, 14, Nr. 16, Seiten 1147–1150, "Lanthanide(III)-doped nanoparticles that emit in the nearinfrared".

[0008] Halbleiter-basierte Nanopartikel ("Quanten-Punkte") sind zur Verwendung in Bioassayverfahren bereits in Betracht gezogen worden. Bawendi et al., Physical Review Letters, 76, 1996, Seiten 1517–1520, berichten z.B. über FRET-Effekte in spezifisch markierten biologischen Systemen. Ferner ist in WO 00/29 617 offenbart, dass Proteine oder Nucleinsäuren mittels "Quanten-Punkten" als Markierung in (F)RET-Assayverfahren detektiert werden können. In US 6,468,808 B1 und US 6,326,144 B1 sind biomolekulare Konjugate von Quanten-Punkten und deren Verwendung in der Fluoreszenzspektroskopie ebenfalls beschrieben.

[0009] (F)RET ((Fluoreszenz)-Resonanzenergietransfer) und der verwandte Resonanzenergietransfer (RET) beruhen auf dem Transfer von Anregungsenergie aus einem Donor mit der Befähigung zum Ausstrahlen von

Fluoreszenz auf einen Akzeptor in enger Nachbarschaft. Mit dieser Technik ist es z.B. mit geeigneten fluoreszenten Markierungen in biologischen Systemen möglich, Abstände auf molekularer Ebene im Bereich von ca. 1 bis 8 nm zu bestimmen. Die auf den Akzeptor übertragene Energie kann ohne Emission durch innere Umwandlung (RET) wieder nachlassen und führt dann nur zur Streichung (Löschung) der Donorfluoreszenz. Alternativ dazu, emittiert der Akzeptor die aufgenommene Energie auch in der Form von Fluoreszenz (FRET). Diese Phänomene sind gut verstanden und lassen sich im Fall einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor mit der Theorie von Förster erklären (siehe z.B. J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic Press, New York, 1990, Seiten 368–445). Der Energietransfer verringert die Intensität der Donorfluoreszenz sowie deren Lebensdauer und initiiert, sensibilisiert oder steigert gleichzeitig die Akzeptorfluoreszenz. Die Effizienz bzw. der Wirkungsgrad des Energietransfer hängen von der inversen 6. Potenz der intermolekularen Separation ab und sinken proportional zu $R_0^6/(R_0^6 + R^6)$ ab. R_0, der sogenannte Förster-Radius, kennzeichnet diesen Abstand zwischen Donor und Akzeptor, für welchen die Effizienz des Energietransfer 50% beträgt.

[0010] Die F(RET)-Effizienz kann entweder über die Fluoreszenzintensität des Donor mit Akzeptor (Q_{DA}) bzw. ohne Akzeptor (Q_D) mittels der Gleichung: $1 – (Q_{DA}/Q_D)$ oder durch Vergleich der Lebensdauern des Donor in der Gegenwart (T_{DA}) und der Abwesenheit (T_D) der Akzeptor-Sonde auf Basis der Gleichung: $1 – (T_{DA}/T_D)$ bestimmt werden.

[0011] Die Verwendung von "Quanten-Punkten" in Bioassayverfahren leidet allerdings an verschiedenen Nachteilen. Da die Emissionswellenlängen der fluoreszenten "Quanten-Punkte" von der Größe der Partikel abhängen, kann eine nur sehr enge Größenverteilung angewandt werden. Dies stellt eine Herausforderung für Synthese- und/oder Größenauswahlverfahren dar. Außerdem ergeben "Quanten-Punkte" im Normalfall relativ niedrige Quanten-Wirkungsgrade, was durch emissionsfreie Elektron-Loch-Paarrekombinationen verursacht ist. Zur Überwindung dieses Nachteils sind CdSe/CdS-Kern/Schale-Strukturen vorgeschlagen worden, worin der CdS-Überzug die Fotostabilität des lumineszenten CdSe-Kerns schützt und steigert (X. Peng et al., J. Am. Chem. Soc. 119, 1997, Seiten 7019–7029).

[0012] In typischer Weise werden (F)RET-basierte Assayverfahren mit organischen Farbstoff-Molekülen, wie mit Fluorescein oder Rhodamin, durchgeführt. Für viele Anwendungen beruht ein genereller Nachteil, der mit diesen organischen Fluoreszenzfarbstoffen zusammenhängt, auf deren unzureichender Stabilität gegenüber einfallendem Licht. Deren Fototoxizität kann ferner biologisches Material in der nahen Umgebung beschädigen. Weitere unerwünschte Eigenschaften beruhen auf deren breiten Emissionsbanden und den kleinen Stokes-Verschiebungen, d.h. auf der Differenz zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum sowie auf den relativ engen spektralen Anregungsbanden, die oft den Einsatz mehrerer Lichtquellen und/oder komplizierter Foto-Systeme erforderlich machen.

[0013] Demnach ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, fluoreszente anorganische Materialien bereitzustellen, die sich besonders für (F)RET-Assayverfahren, wie insbesondere für Bioassayverfahren, eignen und mit denen die obigen Nachteile überwunden werden.

[0014] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die (F)RET-Effizenz bzw. den Wirkungsgrad davon zu steigern. Eine höhere (F)RET-Effizienz erhöht die Empfindlichkeit des Verfahrens und verbessert z.B. das Signal/Rausch-Verhältnis.

[0015] Außerdem benötigen (F)RET-basierte Assayverfahren Donor-Moleküle mit hohen Quantenausbeuten (dem Verhältnis von emittierten zu absorbierten Fotonen) zur Steigerung der Gesamtempfindlichkeit des Assay. Deshalb ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, anorganische fluoreszente Partikel mit hohen Quantenausbeuten bereitzustellen, welche diese dann auch besonders attraktiv für andere Anwendungen als in Bioassayverfahren machen.

[0016] Gemäß einer weiteren Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird ein spezifisches Verfahren zur Herstellung dieser fluoreszenten Materialien angegeben und zur Verfügung gestellt.

[0017] Schließlich ist es noch eine Aufgabe, einen Bioassay auf Basis anorganischer nanoteilchenförmiger Materialien anzugeben und zur Verfügung zu stellen.

[0018] DE 10 131 173 A betrifft ein Verfahren zur Herstellung nanoteilchenförmiger Kern/Schale-Partikel, worin der Kern aus einem anorganischen Oxid-Nanopartikel mit einer Größe unterhalb 100 nm besteht und die Schalenmaterialien aus anorganischen Oxid/Hydroxiden, einem Metall, einem Polymer oder aus einem Glas-

material ausgewählt sein können. Dieses Dokument enthält keinen Beschreibungshinweis dahingehend, dass dieses Kernmaterial mit oxidischen Schalen zu überziehen wäre. In den Beispielen wird von Polyvinylalkohol als Überzug Gebrauch gemacht.

[0019] US 2003/0 032 192 A1 offenbart ein Verfahren zur Herstellung homogener Nicht-Halbleiter-Nanopartikel wie aus Phosphaten.

[0020] US 2003/0 017 264 A1 offenbart ein Verfahren zur Synthese lumineszenter Nanopartikel vom Kern/Schale-Typ aus mindestens einem Halbleiter-Kern. Ein bevorzugtes Kernmaterial ist CdSe.

Zusammenfassung der vorliegenden Erfindung

[0021] Die obigen technischen Aufgaben sind mit lumineszenten anorganischen Nanopartikeln, umfassend
(a) einen Kern aus einem ersten Metallsalz oder -oxid, welcher umgeben ist von
(b) einer Schale aus einem zweiten Metallsalz, das lumineszent ist und Nicht-Halbleiter-Eigenschaften aufweist,

sowie mit dem Verfahren zur im Folgenden dargelegten Herstellung gelöst worden.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0022] Fig. 1 zeigt die Fluoreszenzspektren homogener $CePO_4$-Kernpartikel und von $CePO_4$/$TbPO_4$-Kern/Schale-Partikeln gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0023] Fig. 2 zeigt verschiedene Bilder, erhalten mit Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskopie von 1 $CePO_4$:Tb/$LaPO_4$-Kern/Schale-Partikel.

[0024] Fig. 3 zeigt 2 Fluoreszenzabfallkurven von $CePO_4$/$TbPO_4$-Kern/Schale-Partikeln gemäß der Erfindung, die modifiziert bzw. chemisch an Fluorescein gekuppelt wurden. Als Bezugsvergleich ist die Fluoreszenz-Abfallkurve von $CePO_4$/$TbPO_4$-Kern/Schale-Partikeln, die nicht an Fluorescein gekuppelt wurden, ebenfalls dargestellt.

[0025] Fig. 4 zeigt die Fluoreszenzabfallkurven Fluorescein-gekuppelter, homogener $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikel (Vergleichsbeispiel 1).

[0026] Fig. 5a zeigt 2 Fluoreszenzspektren, gemessen im Zeit-geschleusten (time gated = TGF)-Modus, von $CePO_4$/$TbPO_4$-Kern/Schale-Partikeln gemäß der Erfindung, die nicht weiter modifiziert bzw. an Fluorescein gekuppelt worden waren.

[0027] Fig. 5b zeigt 1 Fluoreszenzspektrum, gemessen im Zeit-geschleusten Modus, homogener $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel (Vergleichsbeispiel 1) bei 520 bzw. 542 nm.

[0028] Fig. 6a: Homogener Kinase-Assay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an 1 Molekül

[0029] Fig. 6b: Homogener Immunoassay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an 1 Molekül

[0030] Fig. 7: Kompetitiver Immunassay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an 1 Molekül (Epitop)

[0031] Fig. 8: Homogener Sättigungsimmunoassay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an getrennte Moleküle

[0032] Fig. 9: Homogener kompetitiver Immunoassay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an getrennte Moleküle

[0033] Fig. 10: Homogener Assay mit (F)RET-Partnern, gekuppelt an 1 Molekül

[0034] Fig. 11: Assay gemäß einem Verfahren molekularer Leuchtsignale

Detaillierte Beschreibung der vorliegenden Erfindung

I. Lumineszente Nanopartikel

[0035] Die lumineszenten, insbesondere fotolumineszenten Partikel der vorliegenden Erfindung umfassen (a) einen Kern aus einem ersten Metallsalz oder -oxid, welcher von (b) einer lumineszenten Nicht-Halbleiter-Schale aus einem zweiten Metallsalz umgeben ist.

[0036] "Lumineszenz" kennzeichnet die Eigenschaft der beanspruchten Nanopartikel, Energie (z.B. in der Form von Fotonen (IR, sichtbar, UV), Elektronenstrahlen, Röntgenstrahlen usw.) zu absorbieren, welche dann als Licht niedrigerer Energie wieder ausgestrahlt wird. Es sollte klar sein, dass der Begriff "lumineszent" über die Beschreibung und die Ansprüche hinweg auch die spezifischere und bevorzugtere Bedeutung "fotolumineszent" einschließt.

[0037] Als "Fotolumineszenz" wird die Befähigung der anorganischen Metallsalze verstanden, Fotonen einer spezifischen Energie (z.B. UV, sichtbares Licht) zu absorbieren und Licht niedrigerer Energie (längerer Wellenlänge, z.B. UV, sichtbares Licht, IR) über eine bestimmte Zeitdauer wieder auszustrahlen. Die Dauer der Lichtemission kann der Lebensdauer des angeregten Zustands bis zu 10^{-7} oder 10^{-8} s, was in typischer Weise als Fluoreszenz bezeichnet wird, aber auch einer viel längeren Zeit entsprechen. Für Lanthanid-dotierte Salze, z.B. für Sulfate, Phosphate oder Fluoride, werden in typischer Weise Zeiten für die Lebensdauer des angeregten Zustands in der Größenordnung von ms (z.B. von 1 bis 20 ms) beobachtet.

[0038] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, dass weder das Schalen- noch das Kernmaterial Halbleitereigenschaften zeigen und ergeben.

[0039] Auch sind sowohl Schale als auch Kern bevorzugt aus kristallinen Materialien dargestellt. Dies lässt sich durch Röntgen-Pulverbeugungsmuster belegen.

[0040] Die Formgestalt der beanspruchten Kern/Schale-Partikel kann z.B. nadelförmig, ellipsoid oder kugelförmig sein, wobei die letzteren beiden Optionen bevorzugt sind.

[0041] Die beanspruchten Kern/Schale-Nanopartikel weisen vorzugsweise eine entlang ihrer längsten Achse gemessene Durchschnittsgröße von 1 bis 100 und bevorzugter von 1 bis 50 nm auf. Durchschnittsgrößen von maximal 30 nm, maximal 20 nm, maximal 10 nm, z.B. von 2 bis 8 oder 4 bis 6 nm sind sogar noch erwünschter. In jedem Fall beträgt die Standardabweichung bevorzugt weniger als 30% und insbesondere weniger als 10%.

[0042] Die Partikelgröße und -verteilung können gemäß Techniken, die noch weiter in den bereits zitierten Artikeln von K. Riwotzki et al. und M. Haase et al. beschrieben sind, z.B. mit Transmissionselektromikrografien (TEM) gemessen werden. Gelpermeationschromatografie und Ultra-Zentrifugation ermöglichen ebenfalls die Bestimmung der Größe.

[0043] Die Dicke der Schale besteht bevorzugt aus mindestens 2 Monoschichten. Die bevorzugte Obergrenze für die Schalendicke beträgt 2 Durchmesser des Kerns (für nicht-kugelige Partikel, gemessen entlang der längsten Achse) und bevorzugter 1 Kerndurchmesser, z.B. ca. 2/3 davon).

[0044] Gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind der Kern (a) aus einem Metallsalz oder -oxid, welcher keine Energie aus der Schale nach ihrer elektronischen Anregung aufnimmt, insbesondere aus einem nicht-lumineszenten Metallsalz oder -oxid, und (b) die Schale aus einem lumineszenten, insbesondere dotierten Metallsalz hergestellt.

[0045] Über die vorliegende Erfindung hinweg soll "Dotierung" in einem breiten Sinn verstanden sein. Die Obergrenze des zu verwendenden Dotiermittels sollte niedrig genug liegen, um die erzeugte Lumineszenz nicht durch Konzentrations-Löschphänomene zu verringern. Dementsprechend hängt die Obergrenze von Faktoren wie vom Typ des Dotierions und dem Abstand zwischen den Dotier-Metallionen im Gitter ab, welche spezifisch für jedes Kernmaterial sind. Vorzugsweise ist das Wirtsmaterial durch das Dotiermittel in einer Menge bis zu 50 und bevorzugt von 0,1 bis 45 mol-%, z.B. von 0,5 bis 40 oder von 1 bis 20 mol-% ersetzt.

[0046] Es bestehen auch keine besonderen Einschränkungen bezüglich des Typs des Dotiermetalls, das eingebaut wird, solange dieses befähigt ist, absorbierte Fotonen in lumineszente Strahlung umzuwandeln. Somit sind beispielsweise Metalle wie Ag, Cu, Co oder Mn (z.B. in Kombination mit Zink als Wirtsmetall) verwendbar.

Eine Dotierung mit Lanthanidmetallen ist allerdings bevorzugt, da die Lumineszenz von Lanthanidmetallen insbesondere von deren Gitterumgebung unabhängig ist. Im Allgemeinen ist die Verwendung zwei- oder dreiwertiger Dotiermittel, insbesondere solcher Lanthanid-Dotiermittel, bevorzugt. Zweiwertige Lanthaniden (+II-Oxidationszustand) sind durch eine relativ starke Absorption, aber relativ breite Emissionsbanden gekennzeichnet. Aus diesem Grund können sie in geeigneter Weise als Sensibilisierer verwendet werden, welcher die Energie auf andere lumineszierende Metalle (z.B. auf Eu^{2+} bis Mn^{2+}) überträgt. Das Vermögen dreiwertiger Lanthaniden (Oxidationszustand: +III) zur Lichtemission in der Form relativ scharfer Banden macht sie zu besonders attraktiven Dotiermitteln zur Einzelverwendung, obwohl es, wie später noch genauer erläutert wird, geeignete Kombinationen dreiwertiger Lanthaniden als Dotiersysteme ebenfalls gibt.

[0047] Geeignete Dotiermaterialien für die Schale schließen Al, Cr, Tl, Mn, Ag, Cu, As, Nb, Ni, Ti, In, Sb, Ga, Si, Pb, Bi, Zn und Co ein, die, in Abhängigkeit vom eingesetzten Wirtsmaterial, Lumineszenzeigenschaften aufweisen, was insbesondere für Mn, Ag, Cu, Bi, Cr, Sn, Sb und vorzugsweise für die Lanthaniden und insbesondere für Ce(58), Pr(59), Nd(60), Sm(62), Eu(63), Gd(64), Tb(65), Dy(66), Ho(67), Er(68), Tm(69) oder Yb(70) oder für Kombinationen davon zutrifft.

[0048] Eine Dotierung mit Lanthanidmetall ist bevorzugt, da die Lumineszenz der Lanthanidmetalle ganz besonders unabhängig von deren Gitterumgebung ist.

[0049] Im Hinblick auf die Praxis (den Typ der Fluoreszenz, die Intensität usw.) zeigen und ergeben Ce, Tb, Eu, Nd, Dy, Tm, Sm, Gd, Ho, Er und Yb die interessantesten Lumineszenzeigenschaften.

[0050] Er^{3+}, Nd^{3+} und Ho^{3+} sind von besonderem Interesse für den Telekommunikationsbereich, da sie von 1300 bis 1600 nm ausstrahlen. Ce wird bevorzugt in Kombination mit einem weiteren Dotiermaterial, wie mit Nd, Dy oder Tb, verwendet. Ce ist dafür bekannt, UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 250 bis 300 nm stark zu absorbieren, zeigt aber eine ziemlich breite Lumineszenzbande bei ca. 330 nm, abhängig vom Wirtsgitter (z.B. von Phosphat). Bei Verwendung in Kombination mit weiteren Dotiermitteln, auf die die absorbierte Energie übertragen werden kann, können sehr wirkungsvolle Lumineszenzsysteme erzeugt werden. Eine weitere attraktive Kombination von Dotiermetallen ist Yb und Er, welche von großer Bedeutung in Er^{3+}-dotierten optischen Verstärkern ist, in denen Er^{3+} indirekt über Yb^{3+} gepumpt wird, das einen um das 10-Fache höheren Absorptionsquerschnitt und einen viel breiteren Peak bei 980 nm als Er^{3+} aufweist. Nd^{3+} und Gd^{3+} sind ebenfalls kombinierbar.

[0051] Wie vorher bereits angegeben, ist es nicht nur möglich, diese Lanthanidmetallkombinationen als Dotiermittel für die Schale zu verwenden, sondern es ist gleichermaßen wirkungsvoll, als Wirtsmetall diese Lanthanidmetallionen (z.B. Ce^{3+}, Yb^{3}, Nd^{3+}) mit dem höheren Absorptionsquerschnitt einzusetzen und einen Teil davon durch geringere Mengen weiterer Metalle (z.B. von Tb^{3+}, Er^{3+}, Gd^{3+}) zu ersetzen. Aus diesem Grund sind Lanthanidsalze (z.B. Salze von Ce^{3+}, Yb^{3+}, Nd^{3+}) ebenfalls als das Wirtsmaterial der Schale verwendbar.

[0052] Für Anwendungen in wässrigen Medien wie für biologische Assayverfahren sind die am meisten bevorzugten Dotiermittel diejenigen (z.B. Tb, Dy, Tm, Sm), die eine Lumineszenz im sichtbaren Bereich zeigen und ergeben, um Wechselwirkungen mit Wasser zu minimieren, wodurch andernfalls das emittierte Licht absorbiert werden könnte.

[0053] Das Wirtsmaterial für die Schale ist nicht spezifisch eingeschränkt und kann aus bekannten nicht-lumineszenten Metallsalzen, wie aus Sulfiden, Seleniden, Sulfoseleniden, Oxisulfiden, Phosphaten, Halophosphaten, Arsenaten, Sulfaten, Boraten, Aluminaten, Gallaten, Silikaten, Germanaten, Oxiden, Vanadaten, Niobaten, Tantalaten, Woframaten, Molybdaten, Alkalihalogenaten, weiteren Halogeniden, insbesondere aus Fluoriden, Phosphiden oder aus Nitriden, ausgewählt sein. Die Verwendung von Sulfaten, Phosphaten oder Fluoriden ist besonders bevorzugt.

[0054] Die Metalle dieser Salze gehören bevorzugt zu den Hauptgruppen 1, 2, 13 oder 14, den Untergruppen 3, 4, 5, 6, 7 oder zu den Lanthaniden. Da die meisten lumineszenten Dotiermittel zwei- oder dreiwertige Metallionen sind, ist es bevorzugt, als Gegenion für die Schale nicht-lumineszente zwei- oder dreiwertige Metallatome wie die Metalle der Gruppe 2 (Erdalkalimetalle, wie Mg, Ca, Sr oder Ba) oder der Gruppe 3 (Sc, V oder La) oder der Gruppe 13 (z.B. Al, Ga oder In) oder Zn zu verwenden.

[0055] Bevorzugte Ausgestaltungen der Wirtsmetallsalze umfassen:
Phosphate der entsprechenden Zahl von Metallatomen (zur Gewährleistung der Ladungsneutralität), ausgewählt aus der Hauptgruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), der Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus den Lan-

thaniden (aus den Elementen 58 bis 71, d.h. aus Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb und aus Lu);
Sulfate der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Borate der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Hauptgruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder der Gruppe 13 (Al, Ga, In, Tl) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Fluoride der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), der Untergruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Aluminate (z.B. Al_5O_{12} oder AlO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Gallate (z.B. Ga_5O_{12}) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Silikate (z.B. SiO_3 oder SiO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La), Gruppe 12 (z.B. aus Zn, Cd) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Vanadate (z.B. VO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Wolfamate (z.B. WO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Molybdate (z.B. MoO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben);
Tantalate (z.B. TaO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben); oder
Arsenate (z.B. AsO_4) der entsprechenden Zahl von Metallatomen, ausgewählt aus Gruppe 2 (z.B. aus Mg, Ca, Sr, Ba), Gruppe 3 (z.B. aus Sc, Y, La) oder aus Lanthaniden (wie oben).

[0056] Bei Auswahl eines geeigneten Wirtsmaterials für ein spezifisches Dotiermittel ist ferner, wie dies im Stand der Technik bekannt ist, zu bedenken, dass Wirts- und Dotiermetall vorzugsweise die gleiche Wertigkeit und ähnliche (Toleranz: z.B. ±20%) oder identische Ionendurchmesser aufweisen sollten. Gleichzeitig wird in typischer Weise die Kompatibilität des Dotiermittels mit dem Wirtsmetall erhöht, falls diese dazu befähigt sind, mit einem spezifischen Anion Kristalle des gleichen oder ähnlichen Gittertyps mit der oder den gleichen oder ähnlichen Gitterkonstante(n) (Toleranz: z.B. ±20%) zu bilden.

[0057] Die obigen Kriterien können oft mit Ba und La als Wirtsmaterialmetall für den Kern erfüllt werden, da diese Metalle Ionendurchmesser ergeben, die denen der zweiwertigen (+II)-Lanthaniden sehr ähneln. Aus dem gleichen Grund stellen La- und Y-Salze geeignete Wirtsmaterialien für dreiwertige (+III)-Lanthanid-Dotiermittel dar.

[0058] Spezifische Beispiele lumineszenter Schalenmaterialien sind z.B.: LiJ:Eu; NaJ:Tl; CsJ:Tl; CsJ:Na; LiF:Mg; LiF:Mg,Ti; LiF:Mg,Na; $KMgF_3$:Mn; BaFCl:Eu; BaFCl:Sm; BaFBr:Eu; $BaFCl_{0,5}Br_{0,5}$:Sm; BaY_2F_8:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); $BaSi_2O_5$:Pb; $BaMg_2Al_{16}O_{27}$:Eu; $BaMgAl_{14}O_{23}$:Eu; $BaMgAl_{10}O_{17}$:Eu; $BaMgAl_2O_3$:Eu; $Ba_2P_2O_7$:Ti; $(Ba,Zn,Mg)_3Si_2O_7$:Pb; $Ce(Mg,Ba)Al_{11}O_{19}$; $Ce_{0,65}Tb_{0,35}MgAl_{11}O_{19}$:Ce,Tb; $MgAl_{11}O_{19}$:Ce,Tb; MgF_2:Mn; MgS:Eu; MgS:Ce; MgS:Sm; MgS:(Sm,Ce); (Mg,Ca)S:Eu; $MgSiO_3$:Mn; $3,5MgO \times 0,5MgF_2 \times GeO_2$:Mn; $MgWO_4$:Sm; $MgWO_4$:Pb; $6MgO \times As_2O_5$:Mn; $(Zn,Mg)F_2$:Mn; $(Zn_4Be)SO_4$:Mn; Zn_2SiO_4:Mn; Zn_2SiO_4:Mn,As; $Zn_3(PO_4)_2$:Mn; $CdBO_4$:Mn; CaF_2:Mn; CaF_2:Dy; CaS:A (A = Lanthanid, Bi); (Ca,Sr)S:Bi; $CaWO_4$:Pb; $CaWO_4$:Sm; $CaSO_4$:A (A = Mn, Lanthanid); $3Ca_3(PO_4)_2 \times Ca(F,Cl)_2$:Sb,$M_n$; $CaSiO_3$:Mn,Pb; $Ca_2Al_2Si_2O_7$:Ce; $(Ca,Mg)SiO_3$:Ce; $(Ca,Mg)SiO_3$:Ti; $2SrO \times 6(B_2O_3) \times SrF_2$:Eu; $3Sr_3(PO_4)_2 \times CaCl_2$:Eu; $A_3(PO_4)_2 \times ACl_2$:Eu (A = Sr, Ca, Ba); $(Sr,Mg)_2P_2O_7$:Eu; $(Sr,Mg)_3(PO_4)_2$Sn; SrS:Ce; SrS:Sm,Ce; SrS:Sm; SrS:Eu; SrS:Eu,Sm; SrS:Cu,Ag; $Sr_2P_2O_7$:Sn; $Sr_2P_2O_7$:Eu; $Sr_4Al_{14}O_{25}$:Eu; $SrGa_2S_4$:A (A = Lanthanid, Pb); $SrGa_2S_4$:Pb; $Sr_3Gd_2Si_6O_{18}$:Pb,Mn; YF_3:Yb,Er; YF_3:Ln (Ln = Lanthanid); $YLiF_4$:Ln (Ln = Lanthanid); $Y_3Al_5O_{12}$:Ln (Ln = Lanthanid); $YAl_3(BO_4)_3$Nd,Yb; (Y,Ga)BO_3:Eu; (Y,Gd)BO_3:Eu; $Y_2Al_3Ga_2O_{12}$:Tb; Y_2SiO_5:Ln (Ln = Lanthanid); Y_2O_2S:Ln (Ln = Lanthanid); YVO_4A (A = Lanthanid, In); Y(P,V)O_4:Eu; $YTaO_4$:Nb; $YAlO_3$:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); YOCl:Yb,Er; $LnPO_4$:Ce,Tb (Ln = Lanthanid oder Mischung von Lanthaniden); $LuVO_4$:Eu; $GdVO_4$:Eu; Gd_2O_2S:Tb; $GdMgB_5O_{10}$:Ce,Tb; LaOBr:Tb; La_2O_2S:Tb; LaF_3:Nd,Ce; $BaYb_2F_8$:Eu; $NaYF_4$:Yb,Er; $NaGdF_4$:Yb,Er; $NaLaF_4$:Yb,Er; LaF_3:Yb,Er,Tm; $BaYF_5$:Yb,Er; GaN:A (A = Pr, Eu, Er, Tm); $Bi_4Ge_3O_{12}$; $LiNbO_3$:Nd,Yb; $LiNbO_3$:Er; $LiCaAlF_6$:Ce; $LiSrAlF_6$:Ce; $LiLuF_4$:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); $Li_2B_4O_7$:Mn; Y_2O_2Eu; Y_2SiO_5:Eu; $CaSiO_3$:Ln, worin Ln = 1, 2 oder mehr Lanthaniden.

[0059] Bei Klassifizierung gemäß dem Wirts-Gittertyp können die folgenden bevorzugten Ausgestaltungen ebenfalls aufgezählt werden:

1. Halogenide: z.B. XY_2 (X = Mg, Ca, Sr, Ba; Y = F, Cl, J); CaF_2:Eu(II); BaF_2:Eu; $BaMgF_4$:Eu; $LiBaF_3$Eu;

SrF_2Eu; $SrBaF_2Eu$; $CaBr_2Eu\text{-}SiO_2$; $CaCJ_2$:Eu; $CaCJ_2$:Eu-SiO_2; $CaCJ_2$:Eu,Mn-SiO_2; CaJ_2:Eu; CaJ_2:Eu,Mn; $KMgF_3$:Eu; SrF_2:Eu(II); BaF_2:Eu(II); YF_3; $NaYF_4$; MgF_2:Mn; MgF_2:Ln (Ln = Lanthanid(en)).

2. Erdalkalisulfate: z.B. XSO_4 (X = Mg, Ca, Sr, Ba); $SrSO_4$:Eu; $SrSO_4$:Eu,Mn; $BaSO_4$:Eu; $BaSO_4$:Eu,Mn; $CaSO_4$; $CaSO_4$:Eu; $CaSO_4$:Eu,Mn; sowie gemischte Erdalkalisulfate, auch in Kombination mit Magnesium, z.B. Ca,$MgSO_4$:Eu,Mn.

3. Phosphate und Halophosphate: z.B. $CaPO_4$:Ce,Mn; $Ca_5(PO_4)_3Cl$:Ce,Mn; $Ca_5(PO_4)_3F$:Ce,Mn; $SrPO_4$:Ce,Mn; $Sr_5(PO_4)_3Cl$:Ce,Mn; $Sr_5(PO_4)_3F$:Ce,Mn; die letzteren auch codotiert mit Eu(II) oder codotiert mit Eu,Mn; α-$Ca_3(PO_4)_2$:Eu; β-$Ca_3(PO_4)_2$:Eu,Mn; $Ca_5(PO_4)_3Cl$:Eu; $Sr_5(PO_4)_3Cl$:Eu; $Ba_{10}(PO_4)_6Cl$:Eu; $Ba_{10}(PO_4)_6Cl$:Eu,Mn; $Ca_2Ba_3(PO_4)_3Cl$:Eu; $Ca_5(PO_4)_3F$:$Eu^{2+}X^{3+}$; $Sr_5(PO_4)_3F$:$Eu^{2+}X^{3+}$ (X = Nd, Er, Ho, Tb); $Ba_5(PO_4)_3Cl$:Eu; β-$Ca_3(PO_4)_2$:Eu; $CaB_2P_2O_9$:Eu; $CaB_2P_2O_9$:Eu; $Ca_2P_2O_7$:Eu; $Ca_2P_2O_7$:Eu,Mn; $Sr_{10}(PO_4)_6Cl_2$:Eu; $(Sr,Ca,Ba,Mg)_{10}(PO_4)_6Cl_2$:Eu; $LaPO_4$:Ce; $CePO_4$; $LaPO_4$:Eu; $LaPO_4$:Ce; $LaPO_4$:Ce,Tb; $CePO_4$:Tb.

4. Borate: z.B. $LaBO_3$; $LaBO_3$:Ce; $ScBO_3$:Ce; $YAlBO_3$:Ce; YBO_3:Ce; $Ca_2B_5O_9Cl$:Eu; $xEuO \times yNa_2O \times zB_2O_3$.

5. Vanadate: z.B. YVO_4; YVO_4:Eu; YVO_4:Dy; YVO_4:Sm; YVO_4:Bi; YVO_4:Bi,Eu; YVO_4:Bi,Dy; YVO_4:Bi,Sm; YVO_4:Tm; YVO_4Bi,Tm; $GdVO_4$; $GdVO_4$:Eu; $GdVO_4$:Dy; $GdVO_4$:Sm; $GdVO_4$:Bi; $GdVO_4$:Bi,Eu; $GdVO_4$:Bi,Dy; $GdVO_4$:Bi,Sm; YVO_4:Eu; YVO_4:Sm; YVO_4:Dy.

6. Aluminate: z.B. $MgAl_2O_4$:Eu; $CaAl_2O_4$:Eu; $SrAl_2O_4$Eu; $BaAl_2O_4$:Eu; $LaMgAl_{11}O_{19}$:Eu; $BaMgAl_{10}O_{17}$:Eu; $BaMgAl_{10}O_{17}$:Eu,Mn; $CaAl_{12}O_{19}$:Eu; $SrAl_{12}O_{19}$:Eu; $SrMgAl_{10}O_{17}$:Eu; $Ba(Al_2O_3)_6$:Eu; (Ba,Sr)$MgAl_{10}O_{17}$:Eu,Mn; $CaAl_2O_4$:Eu,Nd; $SrAl_2O_4$Eu,Dy; $Sr_4Al_{14}O_{25}$:Eu,Dy.

7. Silikate: z.B. $BaSrMgSi_2O_7$:Eu; Ba_2MgSiO_7:Eu; $BaMg_2Si_2O_7$:Eu; $CaMgSi_2O_6$:Eu; $SrBaSiO_4$:Eu; $Sr_2Si_3O_8 \times SrCl_2$:Eu; $Ba_5SiO_4Br_6$:Eu; $Ba_5SiO_4Cl_6$:Eu; $Ca_2MgSi_2O_7$:Eu; $CaAl_2Si_2O_8$:Eu; $Ca_{1,5}Sr_{0,5}MgSi_2O_7$:Eu; $(Ca,Sr)_2MgSi_2O_7$:Eu; Sr_2LiSiO_4F:Eu.

8. Wolframate und Molybdate: z.B. X_3WO_6 (X = Mg, Ca, Sr, Ba); X_2WO_4 (X = Li, Na, K, Rb, Cs); $XMoO_4$ (X = Mg, Ca, Sr, Ba); sowie Polymolybdate oder Polywolframate oder die Salze der entsprechenden Hetero- oder Isopolysäuren.

9. Germanate: z.B. Zn_2GeO_4.

10. Außerdem die folgenden Klassen: $ALnO_2$:Yb,Er (A = Li, Na; Ln = Gd, Y, Lu); $LnAO_4$:Yb,Er (Ln = La, Y; A = P, V, As, Nb); $Ca_3Al_2Ge_3O_{12}$:Er; Gd_2O_2S:Yb,Er; La_2S:Yb,Er.

[0060] Gemäß der ersten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung nehmen das Kernmaterial, d.h. ein Metallsalz oder -oxid, keinen Energietransfer aus der lumineszenten Schale in ihrem elektronischen Zustand auf.

[0061] Diese Bedingung lässt sich immer mit Kern-Metallsalzen oder -oxiden erfüllen, die nur elektronische Zustände aufweisen, worin der energetische Abstand zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem ersten elektronisch angeregten Zustand größer als der Abstand zwischen dem ersten elektronisch angeregten Zustand der ausgewählten lumineszenten Schale und deren Grundzustand ist. Unter diesen Umständen kann die Energie (z.B. UV, sichtbares Licht, IR), die von der Schale absorbiert wird, nicht auf die Kern-Metallatome oder -anionen übertragen werden. Die Lokalisierung der in der Schale erstellten Energie steigert dadurch Oberflächenlöschphänomene und soll die Gesamt-(F)RET-Effizienz der Partikel erhöhen. Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung sind das Kernsalz oder -oxid nicht-lumineszent, weshalb ihnen Absorptionsbanden (UV-vis oder IR) fehlen, auf die die Energie aus der angeregten Schale übertragen werden könnte. Da nicht-lumineszente Materialien billiger als lumineszente Materialien sind, ist dies auch wirtschaftlich von Vorteil.

[0062] Vorzugsweise entspricht das Kernmaterial dem Wirtsmaterial der dotierten Schale.

[0063] Geeignete den Kern bildende Anionen sind somit die gleichen wie die oben angegebenen und beinhalten, ohne darauf eingeschränkt zu werden, Phosphate, Halophosphate, Arsenate, Sulfate, Borate, Aluminate, Gallate, Silikate, Germanate, Oxide, Vanadate, Niobate, Tantalate, Wolframate, Molybdate, Alkalihalogenate, weitere Halogenide oder Nitride. Nanoteilchenförmige Metallsalze dieses Typs sind in PCT/DE 01/03 433 offenbart.

[0064] Die einzigen Kriterien, die die Auswahl der Kern-Metallatome bestimmen, ist deren fehlende Befähigung, Lumineszenz aus der Schale nach Bestrahlung mit Fotonen aufzunehmen. Bevorzugte Metallionen, die zu diesem Zweck verwendet werden können, sind die gleichen wie die oben für das Wirtsmaterial der Schale genannten. Sie schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Metalle der Gruppe 2 (Erdalkalimetalle wie Mg, Ca, Sr oder Ba), Metalle der Gruppe 3 (wie Sc, Y oder La), Zink oder Metalle der Gruppe 13 (wie Al, Ga oder In) ein. Zur Steigerung der Eignung des Schalenmaterials zum Wachstum auf der Oberfläche des Kernmaterials ist es ferner bevorzugt, aber nicht absolut notwendig, als Kernmaterial die gleichen Salze auszuwählen, die den Wirt der dotierten Schale darstellen. Wird diese Bedingung nicht erfüllt, ist es bevorzugt, dass das Wirtsmaterial des Kerns und das Schalenmaterial zum gleichen Gittertyp gehören und sehr ähnliche (Toleranz:

z.B. ±20%) oder identische Gitterkonstanten aufweisen.

[0065] Gemäß einer zweiten Ausgestaltung umfasst (a) der Kern ein erstes Metallsalz oder -oxid ("Donor"), die nach Anregung befähigt sind, die Anregungsenergie auf (b) ein zweites Schalen-bildendes lumineszentes Metallsalz ("Akzeptor") zu übertragen, das dann diese Energie als Lumineszenz ausstrahlt.

[0066] Geeignete Donor-Akzeptor-Metallkombinationen können z.B. unter den oben identifizierten Dotiermitteln und insbesondere aus Lanthaniden ausgewählt sein und im Allgemeinen einen Abstand zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand des Donormetalls benötigen, welcher eine höhere Energie als den entsprechenden Abstand des Akzeptormetalls beinhaltet.

[0067] Beispiele für geeignete Fotonenenergieabsorber (Donoren), die als Kernmaterialien der zweiten Ausgestaltung der Erfindung verwendet werden können, sind Lanthanidionen mit relativ hohen Absorptionsquerschnitten wie Ce^{3+}, Yb^{3+}, Nd^{3+} oder Eu^{2+}. Ce^{3+} wird bevorzugt in Kombination mit Tb^{3+} Dy^{3+} oder mit Nd^{3+} als Schalenmaterialmetall und Akzeptor, z.B. in der Form der entsprechenden Sulfate, Phosphate oder Fluoride, verwendet.

[0068] Yb^{3+}-Salze, wie die Phosphate, Sulfate oder Fluoride, werden bevorzugt als Kernmaterial mit Er^{3+}-Salzen, wie den Sulfaten, Phosphaten bzw. Fluoriden, als Schalenmaterial kombiniert. Dadurch wird es ermöglicht, Er^{3+} indirekt über Yb^{3+} zu pumpen.

[0069] Bezüglich des Schalenaufbaus können die Akzeptoratome als hochkonzentrierte Dotiermaterialien der im Zusammenhang der ersten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung beschriebenen Wirtsmaterialien verwendet werden. Allerdings ist es ebenfalls möglich, dass die gesamte Schale aus dem entsprechenden Akzeptorsalz, z.B. dem Metallsulfat, -phosphat oder -fluorid, besteht, um den Wirkungsgrad des Energietransfers aus dem Kern zur Schale zu steigern.

[0070] Das Kernmaterial der zweiten Ausgestaltung kann das Donormetall als hochkonzentriertes Dotiermittel eines oben beschriebenen Wirtsmaterials umfassen. Alternativ dazu und bevorzugt, besteht der Kern aus dem entsprechenden Donormetallsalz.

[0071] Das Anion des Kernsalzes kann frei unter kompatiblen Anionen ausgewählt werden, die das Wachstum des ausgewählten Schalenmaterials ermöglichen. Beispiele geeigneter Anionen sind die für die erste Ausgestaltung angegeben, wobei Sulfat, Phosphat oder Fluorid bevorzugt sind.

[0072] Ein besonders bevorzugtes Beispiel für die sogenannte zweite Ausgestaltung betrifft $CePO_4$/$TbPO_4$-Kern/Schale-Partikel.

[0073] Gemäß der zweiten Ausgestaltung ist es ebenfalls möglich, Vanadate, Molybdate, Wolframate oder Germanate als Kernmaterialien (den Donor) zu verwenden, da die entsprechenden Anionen ebenfalls befähigt sind, Energie zu absorbieren und diese auf ein geeignetes Schalenmaterial (den Akzeptor) zu übertragen, welche dann die Energie als Lumineszenz wieder ausstrahlen. Diese können auch mit Dotiermetallen kombiniert sein, die ihrerseits als Lumineszenzzentren wirken und somit die Lumineszenz wie Bi^{3+} und/oder Eu^{3+} für Vanadate verstärken. Der Kern kann z.B. Vanadate, Molybdate, Wolframate oder Germanate von Metallen der Gruppe 3 (wie von Sc, Y oder La) oder Metalle der Gruppe 13 (wie von Al, Ga oder In) umfassen oder daraus bestehen. Er wird bevorzugt mit Lanthanidsalzen, vorzugsweise mit Phosphaten, Vanadaten, Molybdaten, Wolframaten oder mit Germanaten, als Schalenmaterial kombiniert, worin das Lanthanid als Energieakzeptor wirkt. Spezifische Beispiele schließen Kern/Schale-Kombinationen des Typs $LaVO_4$/$EuPO_4$, $LaVO_4$/$NdPO_4$ oder YVO_4/$DyPO_4$ ein.

II. Synthese von Kern/Schale-Nanopartikeln

[0074] Die oben beschriebenen Kern/Schale-Nanopartikel der vorliegenden Erfindung werden in einem unten und in den Ansprüchen dargelegten Verfahren synthetisiert, welches mindestens die folgenden zwei Stufen umfasst, in denen man:

1. eine sogenannte "erste Mischung" aus Nanopartikeln eines ersten Metallsalzes oder -oxids, z.B. aus Metallsulfat-, -phosphat- oder -fluorid-Nanopartikeln (Kernen), in einem organischen Medium zubereitet und man
2. die genannte erste Mischung, eine Anionquelle für die zu bildende Schale, insbesondere eine Phosphat-, Sulfat- oder Fluoridquelle, mit einer "zweiten Mischung" aus Schale-bildenden Metallionen und einem orga-

nischen Komplexiermittel für die genannten Metallionen bei einer Temperatur von 50 bis 350°C umsetzt, bis die Schale um die genannten Nanopartikelkerne herum gebildet worden ist.

II.1 Erste Verfahrensstufe und Synthese der Nanopartikel

[0075] Die Nanopartikel, die als Kernmaterial vorgesehen und in der sogenannten "ersten Mischung" vorhanden sind, können gemäß Verfahren synthetisiert werden, die im Stand der Technik bekannt sind.

[0076] Im Allgemeinen sind Nass-Syntheseverfahren gegenüber trockenen Bildungsverfahren bevorzugt, da die ersteren eine bessere Steuerung der Partikelgrößen ermöglichen. Ferner kann die Aggregation der gebildeten Nanopartikel leichter in Nass-Syntheseverfahren unterdrückt werden.

[0077] Unter den bekannten Nass-Syntheseverfahren sind z.B. Sol-Gel-Verfahren, hydrothermische Synthesen oder organische Synthesen mit Komplexiermitteln, die das Kristallwachstum regulieren, anwendbar. Ferner ist es möglich, ganz spezifisch die Fluoride in einem Syntheseverfahren zu erzeugen, beschrieben im bereits erwähnten Artikel von J. W. Stouwdam und F. C. J. M. Van Veggel. Demgemäß sind LaF_3-Nanopartikel und weitere Fluoride durch Erhitzen einer Lösung von Ammoniumdi-n-octadecyldithiophosphat und NaF in Ethanol/Wasser herstellbar. Anschließend werden Lösungen der entsprechenden Metallnitrate in Wasser zugetropft, worauf die Lösung 2 h lang bei 75°C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht allerdings darin, dass die erzeugten Partikel noch eine relativ breite Partikelgrößenverteilung ergeben, was weitere Reinigungsstufen durch Zentrifugation erforderlich macht.

[0078] Die "hydrothermische Synthese" Lanthanid-dotierter Phosphate ist z.B. beschrieben in "Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanomaterials: particles and fibres of $LaPO_4$:Eu, $LaPO_4$:Ce and $LaPO_4$:Ce,Tb" von H. Meyssamy et al., Advanced Materials (1999), Band 11, Nr. 10, Seiten 840 ff. Als Ausgangsmaterialien für Sulfat-, Phosphat- oder Fluorid-Nanopartikel werden vorzugsweise Metallchloride, -nitrate oder -acetate verwendet. Die Reaktion wird in Wasser als Reaktionsmedium in einem Autoklav durchgeführt, um hohe Drücke, vorzugsweise Drücke von 10 bis 20 bar, während der Reaktion einzuhalten.

[0079] Die hydrothermische Synthese führt zu relativ großen Partikeln, die nadelförmig sind. Ferner kennzeichnet eine relativ breite Verteilung der Partikelgröße in typischer Weise das Produkt. Im oben genannten Verfahren von H. Meyssamy et al. beträgt der Prozentsatz von Nanopartikeln mit Durchmessern von weniger als 25 nm z.B. lediglich ca. 20%. Diese können durch anschließende Zentrifugationsstufen isoliert werden.

[0080] Weitere Beispiele für die hydrothermische Synthese sind in PCT/DE 01/03 433 zu finden. Dieses Dokument offenbart, auf allgemeinerer Ebene und anhand konkreter Beispiele, die Synthese nanoteilchenförmiger Silikate, Vanadate, Wolframate, Molybdate, Tantalate usw. in Wasser unter hohen Drücken (im Autoklav). Ferner bezieht sich dieses Dokument auf eine verwandte Technik für die Synthese von Aluminaten oder Gallaten in 1,6-Hexandiol (darin auch bezeichnet als "glycothermische Snythese").

[0081] Ferner ist es möglich, gegebenenfalls dotierte Sulfate unter Umgebungsdruck in organischen Medien, ausgewählt aus Polyolen und Sulfoxiden, zu erzeugen, welche das Kristallwachstum durch Metall-Komplexieraktivität regulieren sollen. Dieses Verfahren wird im Folgenden als "Polyol- oder Sulfoxid-Synthese" bezeichnet.

[0082] Die einzusetzenden Polyole weisen vorzugsweise 2 oder 3 Hydroxygruppen auf, und es können als Beispiele Glycerin, Ethylenglykol oder Polyethylenglykol genannt werden, wobei Polyethylenglykol mit niedrigem Molekulargewicht (bevorzugte Durchschnittszahl der Ethylenglykol-Einheiten bis zu 4) vorzugsweise verwendet wird. Als Sulfoxid kann Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet werden. Dieses Syntheseverfahren wird bevorzugt zur Herstellung von Erdalkalimetallsulfaten, wie von Magnesium-, Calcium-, Strontrium- oder Bariumsulfat, als dotiertes Wirtsmaterial angewandt.

[0083] Bevorzugte Metallatomquellen sind die entsprechenden Chloride und deren Hydrate. Als Ausgangsmaterial für das Sulfat werden bevorzugt Alkalimetallsulfate, Ammoniumsulfate oder Sulfate mit einem organischen Kation herangezogen. Die entsprechenden Hydrogensulfate sind gleichermaßen geeignet.

[0084] Das organische Kation ist bevorzugt aus basischen N-haltigen aliphatischen, aromatischen und aliphatisch/aromatischen Substanzen ausgewählt, welche vorzugsweise 4 bis 30 und bevorzugter 4 bis 20 Kohlenstoffatome aufweisen. Geeignete Kationen sind z.B.:

– quartäres Ammonium oder Phosphonium, worin die 4 Substituenten unabhängig ausgewählt sein können

aus Alkyl mit vorzugsweise 1 bis 10 Kohlenstoffatomen (bevorzugter mit 1 bis 5) oder aus Benzyl, oder
– protonierte aromatische Basen, wie von Hydrazin, Amantadin, Pyridin oder von Collidin.

[0085] Ganz entsprechend können Sulfat-Nanopartikel aus Ausgangsmaterialien wie aus Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Tetramethylammoniumsulfat, Bistetrabutylammoniumsulfat oder aus Triethylammoniumhydrogensulfat hergestellt werden. Weitere geeignete Ausgangsmaterialien sind Ammoniumhydrogensulfat, Ammoniumsulfat, Alkalimetallhydrogensulfate, Amantadinsulfate, Ethylendiammoniumsulfat und Hydraziniumsulfat.

[0086] Zur Dotierung des Sulfat-Wirtsmaterials sind Nitrate oder Halogenide des entsprechenden Dotiermittels und insbesondere des entsprechenden Metallchlorids verwendbar.

[0087] Sind Hydrogensulfate im Ausgangsmaterial enthalten, werden organische Basen wie Imidazol bevorzugt als Säure-Fänger zum Reaktionsmedium gegeben. Die Reaktion wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 50 bis 240°C durchgeführt, wobei der niedrigere Temperaturbereich von 50 bis 100°C für Glycerin bevorzugt ist und höhere Temperaturen im Bereich von 160 bis 240 und insbesondere von 160 bis 180°C für die anderen Polyol- oder Sulfoxid-Lösungsmittel am meisten geeignet sind. Die erhaltenen Partikel weisen Durchschnittsdurchmesser in der Größenordnung von 0,2 bis 50 nm auf und sind gut in wässrigen Medien dispergierbar.

[0088] Nanopartikelkerne, erhalten mit Sol-Gel-Verfahren, hydrothermischen Synthesen, glycothermischen Synthesen oder mit der sogenannten "Polyol- oder Sulfoxid-Synthese", sind manchmal nicht im organischen Medium, das in der ersten Stufe des beanspruchten Verfahrens verwendet wird, dispergierbar, besonders wenn sich das Reaktionsmedium für den Kern bzw. das Verfahren der Erfindung (die Schale-Synthese) deutlich bezüglich der Polarität unterscheiden. Aus diesem Grund kann es notwendig werden, die Nanopartikel einer Nachbehandlung mit einer geeigneten polaren organischen Verbindung zur Steigerung ihrer Dispergierbarkeit zu unterziehen. Vorzugsweise wird diese Nachbehandlung mit dem und im gleichen organischen Medium (Komplexiermittel), welche in der Schale-Synthese zur Anwendung gelangen, oder mit und in organischen Medien ähnlicher Polarität durchgeführt.

[0089] Wird z.B. die Schale-Synthese in N- oder P-haltigen Medien durchgeführt, kann die Nachbehandlung in geeigneter Weise beinhalten, dass man die Partikel, erhalten in Sol-Gel-Verfahren, glyco- oder hydrothermischen Synthesen oder in der sogenannten "Polyol- oder Sulfoxid-Synthese" einer Nachbehandlung mit den N- oder P-haltigen Medien unterzieht.

[0090] In dieser Nachbehandlung werden die Nanopartikel in der entsprechenden organischen Verbindung erhitzt. Dies hat den Effekt, dass Wasser oder weitere hydrophile Reste, die an der Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden, durch die polare organische Verbindung ersetzt werden. Aus den oben genannten Gründen wird die polare organische Verbindung bevorzugt aus N- oder P-haltigen Komplexiermitteln für Metallionen ausgewählt, wie dies weiter unten im Zusammenhang der "organischen Synthese" und der zweiten Verfahrensstufe beschrieben wird. Allerdings können auch weitere funktionalisierte polare organische Verbindungen verwendet werden.

[0091] Diese Nachbehandlung ist für in der "Polyol- oder Sulfoxid"-Synthese erzeugte Sulfate nicht erforderlich, falls die anschließenden Herstellstufen in Polyolen und/oder Sulfoxiden durchgeführt werden.

[0092] Gemäß einem weiteren und bevorzugten Verfahren, das nachfolgend als "organische Synthese" bezeichnet ist, umfasst das Verfahren zur Herstellung der Nanopartikelkerne Stufen, in denen man:

a) in einem organischen Reaktionsmedium aus mindestens einem Metall-Komplexiermittel und gegebenenfalls mindestens einem weiteren Lösungsmittel eine im Reaktionsmedium lösliche oder dispergierbare Metallquelle mit einer im Reaktionsmedium löslichen oder dispergierbaren Anionquelle, insbesondere mit einer Phosphat-, Sulfat- oder Fluoridquelle, umsetzt,

b) gegebenenfalls das Reaktionsmedium aus dem dabei gebildeten nanoteilchenförmigen Metallsalz (z.B. aus dem Phosphat, Sulfat oder Fluorid) entfernt und man

c) gegebenenfalls das nanoteilchenförmige Salz gewinnt.

[0093] Als "organisches Medium" werden organische Lösungsmittel verstanden, die, neben unvermeidbaren Spuren, kein Wasser enthalten. Der Siedepunkt des organischen Medium liegt vorzugsweise höher als die unten angegebenen Reaktionstemperaturen. Er beträgt z.B. 150 bis 400, vorzugsweise mehr als 180 und insbesondere mehr als 210°C (bei Umgebungsdruck).

[0094] Abhängig von der Empfindlichkeit der Metallquelle gegenüber einer Oxidation ist es bevorzugt, die Reaktion unter Inertgas wie unter Stickstoff oder Argon durchzuführen.

[0095] Bezüglich des Reinheitsgrades der Ausgangsmaterialien ist es empfehlenswert, Metallsalze mit einer Reinheit von mindestens 99,9% zu verwenden. Alle Reaktionsteilnehmer und die Lösungsmittel werden vorzugsweise wasserfrei verwendet und/oder vor Gebrauch getrocknet. Allerdings sollten Metallchloride, die häufig als Hydrate eingesetzt werden, bevorzugt keinen längeren Trocknungsprozeduren unterzogen werden, da dies die Bildung von im Reaktionsmedium unlöslichen Oxichloriden begünstigen kann.

[0096] Die Reaktion wird vorzugsweise bei Temperaturen von 50 bis 350°C, z.B. von 120 bis 320 und insbesondere von 180 bis 190°C, durchgeführt. Die geeignete Temperatur kann der Durchschnittsfachmann ganz leicht und einfach durch Verfolgung der Reaktion der Reaktionsteilnehmer bei graduell steigenden Temperaturen ermitteln, um dadurch die Syntheseminimaltemperatur zu bestimmen, bei der die Reaktion mit hinreichender Geschwindigkeit fortschreitet. Für diesen Zweck können die Nanopartikel z.B. aus Proben des Reaktionsmedium ausgefällt werden, wodurch es ermöglicht wird, das Partikelwachstum bei steigenden Reaktionszeiten zu untersuchen.

[0097] Geeignete Reaktionszeiten sind in gleicher Weise bestimmbar und liegen vorzugsweise im Bereich von 10 min bis 48 h und insbesondere von 30 min bis 20 h.

[0098] Nach Beendigung der Reaktion kann die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Sind die Nanopartikel während der Reaktion oder nach der Abkühlung noch nicht vollständig ausgefällt worden, ist es möglich, Methanol zum Reaktionsmedium oder umgekehrt zum Erhalt maximaler Ausbeuten zu geben.

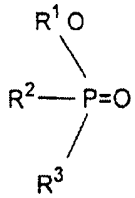
[0099] Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird davon ausgegangen, dass das in der "organischen Synthese" verwendete Metall-Komplexiermittel an Oberfläche-Metallatome der gebildeten Nanopartikel koordinert und dadurch deren Wachstum nach der Reaktion der Ausgangsmaterialien beendet werden. Es wird davon ausgegangen, dass das Metall-Komplexiermittel an der Partikeloberfläche gebunden bleibt und auf diese Weise Agglomerations- und Austauschprozesse zwischen den Partikeln wie eine Oswald-Reifung verhindert oder verringert werden. Das Verfahren gemäß der "organischen Synthese" führt somit zu ziemlich kleinen Partikeln, in denen der an der längsten Achse gemessene Durchschnittsdurchmesser vorzugsweise 1 bis 10 und insbesondere 2 bis 8 nm, z.B. 4 bis 6 nm, mit engen Größenverteilungen (Standardabweichung < 30%, insbesondere < 10%) beträgt. Das Metall-Komplexiermittel ist durch das Vorliegen einer polaren Gruppe mit der Befähigung zur Koordination des Metallions und mindestens eines zweiten Molekül-Teils (eines weniger polaren, vorzugsweise hydrophoben Teils), z.B. eines aliphatischen, aromatisch/aliphatischen oder eines rein aromatischen Molekül-Teils mit bevorzugt 4 bis 20 und insbesondere 6 bis 14 Kohlenstoffatomen, gekennzeichnet.

[0100] Das Metall-Komplexiermittel ist vorzugsweise eine phosphororganische Verbindung oder ein mono- oder disubstituiertes Amin.

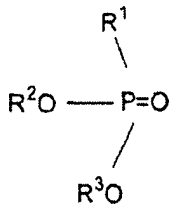
[0101] Unter den letzteren sind die am meisten bevorzugten Ausgestaltungen Mono- oder Dialkylamine, in denen der Alkylrest vorzugsweise 4 bis 20 und insbesondere 6 bis 14 Kohlenstoffatome, wie Dodecylamin oder Bis(ethylhexyl)amin, aufweist.

[0102] Bezüglich der phosphororganischen Verbindungen, ist es bevorzugt, mindestens eine der folgenden Substanzen zu verwenden:

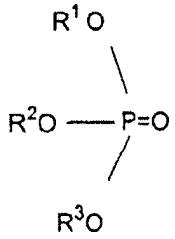
a) Ester der Phosphinsäure:



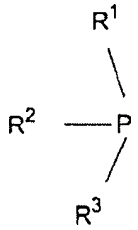
b) Diester der Phosphonsäure:



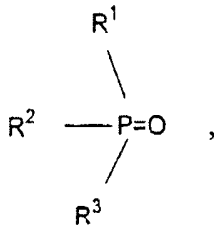
c) Triester der Phosphorsäure, am meisten bevorzugt Trialkylphosphate wie Tributylphosphat oder Tris(ethylhexyl)phosphat:



d) Trialkylphosphine, wie Trioctylphosphin (TOP):



oder
e) Trialkylphosphinoxide, wie Trioctylphosphinoxid (TOPO):



worin R^1, R^2 und R^3 unabhängig aus verzweigten oder linearen aliphatischen (bevorzugt Alkyl), aliphatisch/aromatischen oder aromatischen Resten mit 4 bis 20, bevorzugter 4 bis 14 und insbesondere mit 4 bis 10 Kohlenstoffatomen, ausgewählt sind. Die aromatischen Reste können z.B. Phenyl und die aliphatisch/aromatischen Reste z.B. Tolyl, Xylyl oder Benzyl sein.

[0103] Die Verwendung der phosphororganischen Verbindungen (a) bis (c) und (e), insbesondere (a) bis (c), ist besonders bevorzugt.

[0104] Das Metall-Komplexiermittel kann das einzige Lösungsmittel im organischen Reaktionsmedium sein. Es wird bevorzugt in einer Menge von mindestens 10 mol, bezogen auf die molare Menge des oder der als Metallquelle verwendeten Metallatom(e), eingesetzt, wenn es das einzige Lösungsmittel darstellt. Die bevorzugte Obergrenze beträgt annähernd 1000 mol.

[0105] Abhängig von der Wahl des Metall-Komplexiermittels und insbesondere von der Länge des hydrophoben Molekül-Teils, kann die Verwendung größerer Mengen nachteilig sein, da dies eine vollständige Ausfällung der gebildeten Nanopartikel beeinträchtigen kann.

[0106] Daher ist es bevorzugt, zusätzlich "mindestens ein weiteres Lösungsmittel" einzusetzen. In dieser Ausgestaltung wird das Metall-Komplexiermittel (das "erste Lösungsmittel") bevorzugt in einer molaren Menge von weniger als 10 mol und bevorzugter von 0,9 bis 6 mol eingesetzt, bezogen auf 1 mol Metallionen (verwendet als Metallquelle). Die Menge des bzw. der "weiteren Lösungsmittel(s)" beträgt vorzugsweise 5 bis 100 mol, bezogen auf 1 mol Metallatome (verwendet als Metallquelle).

[0107] Das oder die "weitere(n) Lösungsmittel" sollten mit dem Metall-Komplexiermittel mischbar sein und einen Siedepunkt oberhalb der Syntheseminimaltemperatur, vorzugsweise oberhalb 150, bevorzugter oberhalb 180 und am meisten bevorzugt oberhalb 210°C aufweisen. Siedepunkte oberhalb 400°C können unerwünscht sein.

[0108] Das oder die "weitere(n) Lösungsmittel" kann/können eines auf Basis von Kohlenwasserstoffen sein oder mindestens eine polare Gruppe aufweisen. Die Verwendung der letzteren ist bevorzugt, falls Kristallisationswasser in den Metallsalz-Ausgangsmaterialien vorhanden ist und das genannte Wasser durch ein Lösungsmittel ersetzt werden soll, das zur Koordination an das Metall befähigt ist. Das oder die "weitere(n) Lösungsmittel" ist (sind) vorzugsweise ausgewählt aus:

– Lösungsmitteln mit mindestens einer Ether-Funktionalität, insbesondere aus Dialkylether mit 5 bis 10 Kohlenstoffatomen pro Alkylgruppe, wie aus Dipentyl-, Dihexyl-, Diheptyl-, Dioctyl- oder aus Diisoamylether, Diaryl- oder Diaralkylethern mit insbesondere 12 bis 18 Kohlenstoffatomen, wie aus Diphenyl- oder Dibenzylether, aus Mono- oder Polyethylenglykol(PEG)-dialkylethern (worin jedes Alkyl vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatome aufweist und die Durchschnittszahl der PEG-Einheiten vorzugsweise 4 bis 10 beträgt), wie aus Diethylenglykoldibutylether, Triethylenglykoldibutylether und/oder aus Tetraethylenglykoldimethylether;
– verzweigten oder unverzweigten Alkanen, die vorzugsweise 10 bis 18 und insbesondere 12 bis 16 Kohlenstoffatome aufweisen, wie aus Dodecan oder Hexadecan; und/oder aus
– einer organischen hochsiedenden Base, vorzugsweise einer N-haltigen aliphatischen Base, am meisten bevorzugt aus einem dreifach substituierten Amin, insbesondere aus Trialkylaminverbindungen mit 5 bis 10 Kohlenstoffatomen pro Alkylgruppe, wie aus Trioctylamin oder Tris(2-ethylhexyl)amin, oder aus einer N-haltigen aromatischen Base mit vorzugsweise 3 bis 20 Kohlenstoffatomen, wie aus Imidazol.

[0109] Diese Lösungsmittel können auch in Kombination eingesetzt werden. Die organische hochsiedende Base kann nicht nur als Lösungsmittel dienen, sondern auch als Säure-Fänger fungieren. Bei Verwendung von z.B. einer Säure, wie von Phosphorsäure oder HF, als Anionquelle ist es dann bevorzugt, die Base in annähernd äquimolarer Menge (z.B. von ca. 0,6 bis 1,4 mol) zu verwenden, bezogen auf den/das oder die Wasserstoff(e)/atom(e) der Säure.

[0110] Die "Kationquelle" kann aus jedem geeigneten (hinreichend reaktiven) Metallsalz ausgewählt sein und ist bevorzugt ein Metallchlorid, ein Metallalkoxid (worin das Alkoxid vorzugsweise 1 bis 6 und insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatome aufweist), ein Metallnitrat oder Metallacetat. Die Verwendung von Metallchloriden ist besonders bevorzugt. Hydratisierte Metallsalze können ebenfalls verwendet werden. Allerdings ist es dann bevorzugt, das Kristallisationswasser vor der Reaktion zu entfernen.

[0111] Die "Anionquelle" wird bevorzugt aus in PCT/DE 01/03 433 offenbarten Ausgangsmaterialien ausgewählt. Zur Synthese der nanoteilchenförmigen Sulfate, Phosphate, Borate, Fluoride, Sulfide, Arsenate oder Silikate eigenen sich die folgenden Verbindungen:

a. Schwefelsäure, Phosphorsäure, Borsäure oder HF,
b. Sulfid-, Arsenat-, Phosphat-, Borat-, Sulfat-, Silikat- oder Fluoridsalze, die in der Synthesemischung löslich oder zumindest dispergierbar sind, insbesondere Salze mit einem organischen Kation oder Alkalimetallsalze, oder
c. Ester, die bei höheren Temperaturen zersetzt werden, wie Borsäurealkylester, Schwefelsäurealkylester, Arsensäurealkylester oder Kieselsäurealkylester (z.B. Tetraethylorthosilikate).

[0112] Bezüglich Option b, ist das Kation vorzugsweise aus basischen N-haltigen aliphatischen, aromatischen und aliphatisch/aromatischen Substanzen ausgewählt, die bevorzugt 4 bis 30 und bevorzugter 4 bis 20 Kohlenstoffatome aufweisen. Geeignete Kationen sind z.B. quartäres Ammonium oder Phosphonium, wie oben beschrieben für die protonierten aromatischen Basen, wie Pyridin oder Collidin. Zur Herstellung von Phosphat-Nanopartikeln können Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat, Tetramethylammoniumdihydrogenphosphat oder Triethylammoniumdihydrogenphosphat als Anionquelle verwendet werden. Entsprechend können Sulfat-Nanopartikel aus Ausgangsmaterialien wie aus Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Tetramethylammoniumhydrogensulfat, Bistetrabutylammoniumsulfat oder aus Triethylammoniumhydrogensulfat hergestellt werden. Zur Herstellung von Nanopartikeln mit fluorhaltigen Anionen können Triethylamin-Trishydrofluorid, Tetrabutylammoniumfluorid, Tetrabutylammoniumhydrogendifluorid, Dodecylaminhydrofluorid oder die weniger löslichen Pyridin- oder Collidinhydrofluoride verwendet werden.

[0113] Werden das Metallion (die Kationquelle) zu langsam im organischen Medium aufgelöst, ist es bevorzugt, diese in einem niedrigen Alkohol, vorzugsweise in Methanol, vor der Zugabe des Metall-Komplexiermittels und des Reaktionslösungsmittels aufzulösen. Methanol und Kristallisationswasser werden dann abdestil-

liert, worauf getrocknet wird, bevor die weiteren Reaktionsteilnehmer zugegeben werden.

[0114] Gemäß dem beanspruchten Verfahren werden die gemäß einem der obigen Syntheseverfahren erhältlichen Nanopartikel als Dispersion in einem organischen Medium (als sogenannte "erste Mischung") bereitgestellt.

[0115] Das organische Medium beruht vorzugsweise auf einem oder mehreren polaren Lösungsmitteln mit einem Siedepunkt von mehr als 120°C und insbesondere von mehr als 180, aber weniger als 400°C. Es wird bevorzugt, aus "Metall-Komplexiermitteln", insbesondere aus den genannten Mono- oder Dialkylaminen, worin die Alkylreste 4 bis 20 C-Atome aufweisen, aus phosphororganischen Verbindungen, Polyolen und aus Sulfoxiden ausgewählt. Vorzugsweise enthält das organische Medium das Metall-Komplexiermittel und gegebenenfalls "mindestens ein weiteres Lösungsmittel", die im Zusammenhang des Verfahrens gemäß der "organischen Synthese" beschrieben sind.

[0116] Entsprechend ist es möglich und bevorzugt, die in der "organischen" Synthese oder in "Polyol oder Sulfoxid" in der ersten Stufe des beanspruchten Verfahrens erzeugten Nanopartikel ohne deren Isolierung zu verwenden.

[0117] Es sei angemerkt, dass das organische Medium als Dispersionsmedium für die Nanopartikelkerne dient. Somit werden wegen der Fähigkeit des organischen Medium, an das Metallatom koordiniert zu werden, die Nanopartikel in ihrem kolloidalen (nicht-gelösten) Zustand gehalten, bevor eine Schale darauf wachsen kann.

II.2. Zweite Verfahrensstufe

[0118] In der zweiten Stufe werden
- die oben beschriebene erste Mischung,
- eine Anionquelle für die zu bildende Schale, insbesondere eine Phosphat-, Sulfat- oder Fluoridquelle, und
- eine sogenannte "zweite Mischung" aus die Schale bildenden Metallionen (und deren Gegenion) und einem organischen Komplexiermittel für die genannten Metallionen

bei einer Temperatur von 50 bis 350°C umgesetzt, bis eine lumineszente Schale um die genannten Nanopartikel herum gebildet worden ist.

[0119] Generell ist es bevorzugt, die Anionquelle und die erste Mischung getrennt zu halten, um eine vorzeitige Reaktion zu vermeiden.

[0120] Die zweite Verfahrensstufe kann gemäß den folgenden drei Ausgestaltungen (A), (B) und (C) durchgeführt werden:
Verfahren (A) umfasst Stufen, in denen man
ein erste Mischung aus Metallsalz- oder -oxid-Nanopartikel, z.B. aus Metallsulfat-, -phosphat- oder aus -fluorid-Nanopartikeln, in einem organischen Medium zubereitet,
die genannte erste Mischung auf eine Temperatur von 50 bis 350°C erhitzt,
zu dieser ersten Mischung bei dieser Temperatur getrennt eine Anionquelle für die zu bildende Schale und eine zweite Mischung aus die Schale bildenden Metallionen und einem organischen Komplexiermittel für die genannten Metallionen tropft und man
die entstandene Mischung bei dieser Temperatur umsetzt, bis eine lumineszente Schale um die genannten Nanopartikel herum gebildet worden ist.
Durch die getrennte, aber gleichzeitige Zugabe der Anionquelle und der zweiten Mischung, z.B. mittels zwei Tropftrichtern, werden die Konzentration der Wirk-Ausgangsmaterialien für die Schale und somit die Selektivität der Reaktion durch Absenkung eines unabhängigen Partikelwachstums aus den Ausgangsmaterialien für die Schale gesteigert.
Verfahren (B) umfasst Stufen, in denen man:
eine erste Mischung aus Nanopartikeln eines ersten Metallsalzes oder -oxids, z.B. aus Metallsulfat-, -phosphat- oder -fluorid-Nanopartikeln, in einem organischen Medium zubereitet,
eine die Schale bildende Anionquelle zur genannten ersten Mischung gibt,
die entstandene Mischung auf eine Temperatur von 50 bis 350°C erhitzt,
dazu eine zweite Mischung aus die Schale bildenden Metallionen und einem organischen Komplexiermittel für die genannten Metallionen tropft und man
die entstandene Mischung bei dieser Temperatur umsetzt, bis eine lumineszente Schale um die genannten Na-

nopartikel herum gebildet worden ist.
Die Verfahren (A) und (B) neigen dazu, einheitlichere Partikel zu bilden, die außerdem einen geringeren Prozentsatz unabhängig gewachsener Partikel des Schale-bildenden Materials enthalten.
Verfahren (C) umfasst Stufen, in denen man
eine erste Mischung aus Nanopartikeln eines ersten Metallsalzes oder -oxids, z.B. aus Metallsulfat-, -phosphat- oder -fluorid-Nanopartikeln, in einem organischen Medium zubereitet,
eine erste Mischung, eine Anionquelle für die zu bildende Schale und eine zweite Mischung aus die Schale bildenden Metallionen und einem organischen Komplexiermittel für die genannten Metallionen vorzugsweise durch Zugabe der genannten ersten Mischung und der genannten Anionenquelle zur genannten zweiten Mischung zusammenbringt und
die entstandene Mischung auf eine Temperatur von 50 bis 350°C erhitzt, bis eine lumineszente Schale um die genannten Nanopartikel gebildet worden ist.

[0121] In überraschender Weise wurde herausgefunden, dass eine graduelle Zugabe, z.B. durch Zutropfen, der Ausgangsmaterialien nicht absolut erforderlich ist. Obwohl, gemäß Verfahren (C), die Ausgangsmaterialien durch Vermischen der kompletten Anteile zusammengebracht werden können, wird das gewünschte Kern/Schale-Material mit hoher Selektivität und geringem unabhängigen Partikelwachstum gebildet. Das Verfahren (C) ist somit leichter zu handhaben als die Verfahren (A) und (B).

[0122] Falls nichts Anderes ausgesagt wird, gelten die folgenden bevorzugten Ausgestaltungen für alle drei Verfahren (A), (B) und (C).

[0123] Als Metallionquelle kann jedes hinreichend reaktive Metallsalz, vorzugsweise Chloride oder Alkoxide des Schalen-Metallions, verwendet werden. Die Alkoxidgruppe weist vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatome auf.

[0124] Jede geeignete Anionquelle kann verwendet werden, solange sie befähigt ist, eine Schale um die in der ersten Stufe erhaltenen Kernpartikel herum zu bilden.

[0125] Geeignete Anionen für die Schalenbildung schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Phosphate, Halophosphate, Arsenate, Sulfate, Borate, Aluminate, Gallate, Silikate, Germanate, Oxide, Vanadate, Niobate, Tantalate, Wolframate, Molybdate, Alkalihalogenate, weitere Halogenide, Nitride, Sulfide, Selenide, Sulfoselenide oder Oxisulfide ein.

[0126] Es ist bevorzugt, für die Schalenbildung Anionen zu verwenden, die in organischen Medien unter ähnlichen oder identischen Bedingungen wie den in PCT/DE 01/03 433 beschriebenen in geeigneter Weise reagieren. Beispiele schließen Silikate, Borate, Arsenate, Sulfide, Sulfate, Phosphate und Fluoride und insbesondere Sulfate, Phosphate und Fluoride ein. Dieses Dokument enthält auch die technische Lehre, welche Anionquellen zur Erzeugung des entsprechenden nanoteilchenförmigen Materials verwendet werden können.

[0127] Bezüglich einer geeigneten Quelle für die Silikate, Borate, Arsenate, Sulfide, Sulfate, Phosphate und die Fluoride, sind auch Anionquellen zu nennen, die oben für die erste Stufe des beanspruchten Verfahrens beschrieben sind, insbesondere diejenigen, die in der "Polyol- oder Sulfoxid"- und/oder der "organischen" Synthese verwendet wurden.

[0128] Die Anionquelle, insbesondere die Quelle für die Phosphate, Fluoride oder Sulfate, wird bevorzugt in Mengen von 0,75 bis 3 und insbesondere von 0,75 bis 2 mol verwendet, bezogen auf die stöchiometrisch zur Reaktion mit allen Schale-bildenden zugegebenen Metallatomen benötigte molare Menge. Bei binären Salzen (AB) liegt das Verhältnis B (Anion) zu A (Metall) somit im Bereich von 0,75:1 bis 2:1.

[0129] Phosphat- und Fluoridquellen, wie Phosphorsäure oder HF, werden bevorzugt in überschüssigen Mengen in der "organischen" Synthese der aus Phosphat oder Fluorid hergestellten Kern- oder Kern/Schale-Partikel eingesetzt. Die überschüssige molare Menge beträgt vorzugsweise mindestens 1,05 mol, bevorzugter 1,1 bis 2 und insbesondere 1,2 bis 1,6 mol, bezogen auf die stöchiometrisch erforderliche molare Menge. Ähnlich bevorzugt ist es, Sulfatquellen, wie quartäre Ammonium(hydrogen)sulfatsalze, in überschüssigen Mengen in der "Polyol- oder Sulfoxid"-Synthese von Sulfat-Kern- oder Kern/Schale-Partikeln zu verwenden. Die überschüssige molare Menge beträgt vorzugsweise 1,05 mol, bevorzugter 1,1 bis 3 und insbesondere 1,2 bis 2 mol, bezogen auf die stöchiometrisch erforderliche molare Menge.

[0130] Das in der zweiten Mischung enthaltene organische Komplexiermittel kann ebenfalls aus den organi-

schen Komplexiermitteln ausgewählt sein, wie bereits oben im Zusammenhang des Verfahrens gemäß der "organischen" Synthese der Nanopartikel oder der für die "Polyol- oder Sulfoxid"-Synthese beschriebenen Lösungsmittel erläutert worden sind.

[0131] Generell ist es erwünscht, die effektive Konzentration der Schale-bildenden Ionen so niedrig wie möglich zu halten. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird dies durch die Verwendung des vorliegenden Metall-Komplexiermittels bewerkstelligt. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass nur eine kleine Konzentration reaktiver (unkomplexierter) Metallionen das Schalenwachstum gegenüber der unabhängigen Bildung neuer Partikel begünstigt.

[0132] Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung sind das für die erste Mischung verwendete organische Medium und das in der zweiten Mischung vorliegende Komplexiermittel durch eine bzw. eines der vorgenannten phosphororganischen Verbindungen, mono/disubstituierten Amine, Polyole oder Sulfoxide dargestellt. Es ist ferner bevorzugt, dieselbe polare organische Verbindung als organisches Medium und Komplexiermittel zu verwenden.

[0133] Außerdem ist es bevorzugt, das vorgenannte "mindestens eine weitere Lösungsmittel" im gleichen Verhältnis zum organischen Komplexiermittel einzusetzen. Dadurch wird es ermöglicht, niedrigere Mengen Metall-Komplexiermittel als im Fall der Verwendung von nur einem einzigen Lösungsmittel zu verwenden. Dann beträgt das Molverhältnis des Metall-Komplexiermittels und der die Schale bildenden Metallionen vorzugsweise wiederum 0,9:1 bis 6:1.

[0134] Besitzt die Anionquelle für das Schalenmaterial saure Wasserstoffatome, ist es bevorzugt, die oben beschriebenen Basen zu verwenden. Die oben beschriebene organische hochsiedende Base (z.B. Trialkylamin) wird z.B. bevorzugt als Säure-Fänger für Anionquellen wie Phosphorsäure oder HF unter den oben beschriebenen Bedingungen verwendet. Diese organische hochsiedende Base kann auch in der Synthese der Silikate, Borate, Arsenate oder Sulfate in typischer Weise bei Anwendung von Anionquellen mit sauren Wasserstoffatomen zugegeben werden. Gemäß Verfahren (A) oder (B) wird die Base bevorzugt als Bestandteil der "zweiten Mischung" aus der Metallquelle und dem Komplexiermittel zugegeben.

[0135] Die Gesamtmenge an Lösungsmittel(n), einschließlich des Metall-Komplexiermittels, ist vom Durchschnittsfachmann leicht bestimmbar, da es generell bevorzugt ist, alle Ausgangsmaterialien homogen aufzulösen oder zu dispergieren. In Verfahren (A) und (B) ist es bevorzugt, ungefähr die gleichen Mengen an Lösungsmitteln zur Auflösung der Anionquelle und der Metallquelle (der zweiten Mischung) zu verwenden.

[0136] Allgemein gesprochen, schreitet die Reaktion bevorzugt unter den gleichen oder ähnlichen Bedingungen voran, wie dies vorher unter Punkt II.1 für die "Polyol- oder Sulfoxid-" oder die "organische" Synthese diskutiert wurde, falls nichts Anderes ausgesagt ist. Dies gilt ebenso für die Verwendung eines inerten Schutzgases und die Trocknung der Reaktionsteilnehmer.

[0137] Die Menge an Nanopartikelkernen, die mit den verbleibenden Ausgangsmaterialien kombiniert wird, ist nicht besonders eingeschränkt und hängt in erster Linie von der beabsichtigten Schalendicke ab.

[0138] Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wird das Reaktionsmedium auf eine Temperatur von 50 bis 350 und insbesondere von 120 bis 320°C erhitzt, bis eine lumineszente Schale um die in der ersten Verfahrensstufe hergestellten Nanopartikelkerne herum gebildet worden ist.

[0139] Die Reaktion wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 160 bis 240 und insbesondere von 180 bis 220°C für die Fluoride und Phosphate und von 160 bis 180°C für die Sulfate durchgeführt. Die Bildung von Sulfat-Schalen in Glycerin kann auch viel niedrigere Temperaturen (z.B. von 50 bis 100°C) zulassen. Die geeigneten Temperaturen können vom Durchschnittsfachmann ganz leicht durch Verfolgen des Schalenwachstums bei graduell steigenden Temperaturen ermittelt werden, um dadurch die Syntheseminimaltemperatur zu bestimmen, bei der die Reaktion mit hinreichender Geschwindigkeit, aber ohne unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Bildung neuer Partikel aus den für die Schale vorgesehenen Ausgangsmaterialien, abläuft.

[0140] In diesen Verfahren (A) und (B), in denen die Ausgangsmaterialien zugetropft werden, liegt die Zugabezeit vorzugsweise im Bereich von 0,5 bis 10 und insbesondere von 1 bis 5 h.

[0141] Bevorzugte Reaktionszeiten liegen im Bereich von 30 min bis 48 h, insbesondere von 1 bis 20 h und ganz spezifisch von 1,5 bis 16 h. Wiederum wird durch Verfolgen der Reaktion, z.B. durch Ausfällen der Na-

nopartikel aus dem Reaktionsmedium entnommenen Proben und durch Untersuchen der Partikelgrößenverteilung in TEM-Mikrografien die Bestimmung der geeigneten Reaktionszeiten ermöglicht. Die Reaktion muss, z.B. durch Abkühlen, beendet werden, sobald eine Oswald-Reifung beobachtet wird, d.h., wenn die größeren Partikel auf Kosten der kleineren Partikel zu wachsen beginnen.

[0142] Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsmedium auf Raumtemperatur abgekühlt. Dies verstärkt bereits die Ausfällung der gebildeten Kern/Schale-Nanopartikel. Bei unvollständiger Ausfällung ermöglicht die Zugabe von Fällungslösungsmitteln (z.B. von Methanol) zum Reaktionsmedium oder umgekehrt die vollständige Gewinnung des Reaktionsprodukts. Alternativ dazu, ist es möglich, die überschüssigen organischen Lösungsmittel, einschließlich des organischen Komplexiermittels, abzudestillieren oder eine Ultra-Filtration durch Membranen mit einer bevorzugten Porengröße durchzuführen, die Dalton-Werten in der Größenordnung von 5.000 bis 10.000 entspricht. Diese Werte entsprechen einem Schnitt bei ca. 3 nm, welcher in vielen Fällen groß genug ist, um das Lösungsmittel durchlaufen zu lassen, und klein genug ist, um das Durchdringen und einen Verlust von Nanopartikeln zu verhindern. In typischer Weise ist ein Druck von 2 bis 5 bar zum Austausch der Lösungsmittel in den entsprechenden Ultra-Filtrationszellen notwendig.

[0143] Ferner ist es bevorzugt, die erhaltenen Nanopartikel z.B. mit Methanol, Ethanol oder mit Isopropanol zu waschen.

[0144] Auf die unten und in den Beispielen angegebenen Weisen kann bestätigt werden, dass das Schalenwachstum tatsächlich stattgefunden hat.

[0145] Eine Möglichkeit betrifft das kontinuierliche Verfolgen der Reaktion durch Ausfällen kleiner Proben und Analysieren von deren Partikelgrößenverteilung, z.B. in TEM-Mikrografien. Die auf diese Weise gezogenen Proben zeigen, ob ein Schalenwachstum über die gesamte Reaktionszeit hinweg erfolgt ist oder ob die unabhängige Bildung kleinerer Partikel ebenfalls beobachtet werden kann. EDX-Analyse (Energie-dispersive Röntgenanalyse) kann die Gesamtzusammensetzung der Nanopartikel belegen. XPS-Spektroskopie vermag weitere Informationen bezüglich der Verteilung der Zusammensetzung von den äußeren bis zu den inneren Anteilen der Partikel zu liefern, wenn die XPS bei unterschiedlichen Anregungsenergien durchgeführt wird. Außerdem können die Lumineszenzspektren der Kern/Schale-Partikel oft ganz leicht von denen der in der Reaktion eingesetzten Kern-Nanopartikel unterschieden werden, wie sich dies auch in den Beispielen zeigen lässt.

III. Verwendung der Kern/Schale-Partikel

III.1 Anwendung in Bioassayverfahren

[0146] Die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung können in vorteilhafter Weise in Bioassayverfahren zur Anwendung gelangen, in denen von deren Lumineszenzeigenschaften Gebrauch gemacht wird. Eine besonders interessante Anwendung für die vorliegenden Kern/Schale-Partikel sind (F)RET-basierte Assayverfahren ("(Fluoreszenz)Resonanzenergietransfer", wie oben bereits angedeutet).

[0147] In biologischen Systemen wird der (F)RET oft zur Bestimmung der räumlichen Nachbarschaft entsprechend markierter Biomoleküle oder -molekülgruppen angewandt. Das Verfahren kann als Beleg für verschiedene biologische Reaktionen oder Wechselwirkungen von Interesse, z.B. von Protein-Protein-Wechselwirkungen, Antigen-Antikörper-Reaktionen während Immunreaktionen, Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, eines Hybridismus von Nucleinsäure oder der Bindung von Proteinen an Nucleinsäuren, dienen.

[0148] Die Bestimmung, dass ein (F)RET aufgetreten ist, erfolgt über die Messung einer Intensitätsänderung oder einer spektralen Änderung der Donor- oder Akzeptorlumineszenz oder über die Messung von Änderungen bei der Abbauzeit der Donorlumineszenz.

[0149] Viele Anwendungen dieser Techniken und Verfahrensweisen sind in der Literatur beschrieben und auch auf die vorliegende Erfindung anwendbar, wie z.B., ohne darauf eingeschränkt zu sein, auf: die Bestimmung spezifischer Antigene in Immunofluoreszenz-Assayverfahren (US 3,996,345; US 4,160,016; US 4,174,384; US 4,199,559), die Bestimmung elektrostatischer Potenziale in spezifischen lokalisierten Flächen auf der Oberfläche von Proteinen (Yamamoto et al., J. Mol. Biol. 241, 1994, Seiten 714–731) oder auf Hochdurchsatz-Siebungsverfahren (Boisclair et al., J. of Biomolecular Screening 5, 2000, Seiten 319–328).

[0150] Außerdem kann mit (F)RET-Systemen auch der absolute Abstand zwischen zwei Biomolekülen bzw. innerhalb von Teilen von 1 Biomolekül bestimmt werden. Diese Technik ist bereits erfolgreich auf die Protein-

oder DNA-Strukturanalyse (Heyduk et al., SPIE, Band 3256, 1998, Seiten 218–222), auf die Messung von Abständen innerhalb Polypeptiden (Lakowicz et al., Biophys. Chem. 36, 1990, Seiten 99–115), auf Proteine (K. Cai et al., J. Biol. Chem. 271, 1996, Seiten 27311–27320), auf Polynucleotide (Hochstrasser et al., Biophys. Chem. 45, 1992, Seiten 133–141, und Ozaki et al., Nucl. Acids Res. 20, 1992, Seiten 5205–5214) oder auf weitere Makromoleküle, auf die Analyse von Membranen und Membran-Proteinen und deren Konstruktion (S. Wang et al., Biochemistry 27, 1988, Seiten 2033–2039), auf die Detektion (US 4,996,143; US 5,532,129; US 5,565,332) und die Quantifizierung amplifizierter Nucleinsäuren durch PCR (Polymerase Chain Reaction) (US 5,538,848; US 5,723,591), z.B. für in vitro-Diagnostika, genetische Analysen, forensische Analysen, Nahrungsmittel- und agrochemische Tests oder für Abstammungstests, angewandt worden. Die DNA oder RNA werden direkt, d.h. ohne zusätzliche Trennstufen, detektiert oder quantifiziert.

[0151] Eine quantitative Nucleinsäure-Bestimmung durch Realzeit-PCR mit (F)RET-Systemen liefert der als TaqMan®-Assay (Applied Biosystems Division of Perkin-Elmer Corp., Foster City, USA) bekannte 5'-Nuclease-Assay (US 5,538,848; US 5,210,015; Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1991, Seiten 7276–7280; Lee et al., Nucleic Acids Res. 21, 1993, Seiten 3761–3766). Ein Verfahren molekularer Leuchttürme (Signale) (Tyagi und Krammer, Nature Biotechnology 14, 1996, Seiten 303–306; US 5,312,728) beruht auf einem ähnlichen Mechanismus.

[0152] Kürzlich wurde eine Übersicht über "FRET in biochemistry" von S. Brakmann und N. Nöbel in Nachrichten aus der Chemie, 51, März 2003, Seiten 319–322, veröffentlicht, worin weitere Alternativen für FRET-basierte Bioassayverfahren beschrieben sind, in denen die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung ebenfalls zur Anwendung gelangen können.

[0153] Demzufolge können die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung in (F)RET-basierten Bioassayverfahren verwendet werden, welche eine erste Molekülgruppe A, die mit mindestens einem Energiedonor (Donor) markiert ist, und mindestens eine zweite Molekülgruppe B umfassen, die mit mindestens einem Energieakzeptor (Akzeptor) markiert ist, worin
der Donor ein Molekül oder Partikel umfasst, die durch Energietransfer aus dem Donor unter teilweiser oder vollständiger Löschung der Donorlumineszenz angeregt werden können, und worin
Donor und/oder Akzeptor die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung, vorzugsweise diejenigen mit einem entlang ihrer längsten Achse gemessenen Durchschnittsdurchmesser von nicht mehr als 50 und insbesondere von nicht mehr als 30 nm usw., wie hierin vorher bereits beschrieben, umfassen.

[0154] Dieser Assay kann auf 2 Weisen durchgeführt werden. (F)RET-basierte Assayverfahren machen es erforderlich, dass der Akzeptor ebenfalls zur Lumineszenzemission befähigt ist. RET-Systeme funktionieren dagegen auch, wenn der Akzeptor ohne Strahlungsemission relaxiert.

[0155] Bevorzugt werden die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung als Donor verwendet. Da diese elektromagnetische Strahlung mit Stokes- oder anti-Stokes-Verschiebung nach einer energetischen Anregung ausstrahlen, ist eine spektroskopische Unterscheidung zwischen Anregungsquelle und emittierter Strahlung leicht möglich.

[0156] Die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung zeigen und ergeben ein überlegenes Verhalten in Bioassayverfahren des obigen Typs, da ihre Lumineszenz wirkungsvoller gelöscht werden kann. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird davon ausgegangen, dass der höhere Prozentsatz an Lumineszenzzentren an oder in enger Nachbarschaft zur Oberfläche im Vergleich mit homogenen Partikeln dieser Beobachtung Rechnung trägt. Die höhere Eignung zur Löschung bringt verschiedene wichtige Vorteile in (F)RET-basierten Bioassayverfahren, wie eine höhere Empfindlichkeit, mit sich.

[0157] Die höhere Eignung zur Löschung schlägt sich in den Abbau/Abfallkurven (Intensität der Lumineszenz gegen die Zeit) als kürzere Halbwerte (Halbwertszeit) des Donor nieder. In Zeit-geschleuster Fluoreszenzspektroskopie (TGF-Modus) wird ein nahezu vollständiges Verschwinden der Donorlumineszenz (aus den Kern/Schale-Partikeln) wegen eines sehr wirkungsvollen Energietransfer zum Akzeptorsystem erhalten, wie dies noch detaillierter in den Beispielen erläutert wird.

[0158] Bezüglich bevorzugter Ausgestaltungen der Kern/Schale-Partikel, die als Donor und/oder Akzeptor, vorzugsweise nur als Donor, verwendet werden, wird auf Punkt I der vorliegenden Beschreibung Bezug genommen.

[0159] Bei Auswahl eines geeigneten Donor/Akzeptor-Paars ist es im Allgemeinen empfehlenswert, Do-

nor-Sonden mit hohen Quantenausbeuten einzusetzen. Ferner ist es erforderlich, dass das Emissionsspektrum der Donor-Sonde deutlich mit dem Absorptionsspektrum der Akzeptor-Sonde überlappt. Eine weitere Bedingung, die angepasste Anordnung (annähernd parallel) der Donor- und Akzeptor-Übergangsdipol-Orientationen, stellt im Allgemeinen kein Problem in biologischen Systemen dar, was eine uneingeschränkte isotrope Bewegung von Donor und Akzeptor ermöglicht. Ferner ist, wie bereits erwähnt, der Förster-Abstand in Rechnung zu stellen, insofern Donor und Akzeptor vorzugsweise innerhalb $1 \pm 0{,}5R_0$ (Förster-Abstand) voneinander vorliegen. Der Förster-Abstand ist derjenige Abstand, bei welchem der Energietransfer zu 50% wirkungsvoll ist. Er lässt sich, wie im Stand der Technik bekannt, aus den spektralen Eigenschaften von Donor und Akzeptor berechnen.

[0160] Typische Donor- und Akzeptor-Systeme, die sich von Kern/Schale-Partikeln der vorliegenden Erfindung unterscheiden, sind organische Farbstoffe wie Fluorescein, Tetramethylrhodamin, IAEDANS, EDANS, Dabcyl, BODIPY FL, QSY 7 und QSY 9. Weitere im Handel verfügbare lumineszente organische Farbstoffe, die sich für den Spektralbereich von ca. 350 bis 750 nm und darüber eignen, sind die Alexa Fluor-Farbstoffe (hergestellt von Molecular Probes) oder CyDyes (Amersham Pharmacia). Unter diesen Farbstoffen sind diejenigen, die bei höheren Wellenlängen (sichtbar bis Nah-IR) absorbieren und ausstrahlen, besonders attraktiv, da sie biologische Systeme nicht schädigen.

[0161] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, die Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung als Donor in Kombination mit einem geeigneten Akzeptor, ausgewählt aus den obigen organischen Fluoreszenzfarbstoffen, zu verwenden.

[0162] Partikel mit einer Eu^{3+}-dotierten Schale können z.B. als Donor mit Alexa Fluor 680 als Akzeptor oder Tb^{3+}-haltige Partikel können mit Dabcyl oder Fluorescein kombiniert werden. Beispiele für diese Tb-haltigen Kern/Schale-Partikel sind z.B. Kern/Schale-Systeme mit einem inerten (nicht-lumineszenten) Kern, umgeben von einer Tb^{3+}- oder Ce^{3+}-, Tb^{3b}-dotierten Metallsalz- oder -oxid-Schale, sowie Kern/Schale-Systeme auf Basis eines Cer(Cer^{3+})-Salz- oder -Oxid-Kerns, umgeben von einer Schale aus Terbium(Tb^{3+})-Salz oder -Oxid.

[0163] Kern/Schale-Partikel mit einem Durchschnittsdurchmesser unterhalb 50 nm zeigen und ergeben ein kleineres Potenzial für unerwünschte sterische Wechselwirkungen oder Sedimentation in Bioassayverfahren als größere Partikel. Außerdem ist zu erwarten, dass die Kinetik der Bindungsreaktion (z.B. einer Immunreaktion oder DNA-Hybridisierung) des biochemischen Verfahrens, das untersucht wird, weniger beeinflusst wird.

[0164] 2 unterschiedliche spektroskopische Modi werden in typischer Weise zur Messung des Energietransfer in (F)RET-basierten Systemen (WO 87/07 955; EP 0 242 527; EP 0 439 036; WO 92/01 225; US 4,822,733; US 5,279,943; US 5,622,821; US 5,656,433; US 5,998,146; US 6,239,271), d.h. Zeit-geschleuste Fluorimetrie (TGF) und/oder Zeit-aufgelöste Fluorimetrie (time resolved fluoremetry = TRF), angewandt. Gemäß TGF-Modus wird der fluoreszente Donor mit einer gepulsten Lichtquelle (z.B. mit Laser, Blitzlicht) angeregt, worauf die Lichtemission nach einem vorbestimmten Verzug innerhalb eines spezifischen Zeitfensters gemessen wird. Der relativ kurze Verzug ermöglicht immer noch die Messung mit hinreichend hoher Intensität der langzeitigen Lumineszenz von Lanthanidionen. Die relativ kurzzeitige Hintergrundfluoreszenz (in typischer Weise kürzer als 1 µs), wie verursacht durch innewohnende Autofluoreszenz des biologischen Materials, Verunreinigungen von Lösungsmitteln oder durch umgebendes biologisches Material, wird durch den Verzug fast völlig unterschieden.

[0165] Im Gegensatz zum TGF-Modus wird im TRF-Modus die Lumineszenz als Funktion der Zeit bei konstanter Wellenlänge gemessen. Der Donor wird ebenfalls durch eine gepulste Lichtquelle oder in unterschiedlicher Weise modulierte Lichtquellen angeregt.

[0166] Kern/Schale-Partikel mit einem Durchmesser von nicht mehr als 50 nm können in geeigneter Weise im TRF-Modus verwendet werden, wobei für größere Partikel ein Hauptteil des Partikelvolumen nicht nah genug am Akzeptor vorliegt, um am Energietransfer teilzunehmen, um dadurch die Intensität des Effekts zu erniedrigen.

[0167] Gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt und ergibt mindestens einer der (F)RET-Partner, d.h. der Donor oder Akzeptor, eine relativ lange Lumineszenzabfallzeit, wogegen der andere (F)RET-Partner durch kurze Abfallzeiten gekennzeichnet ist.

[0168] Bevorzugt werden Kern/Schale-Partikel mit Lumineszenz-Halbwertszeiten von 1 µs bis 50 ms und bevorzugter von 100 µs bis 10 ms als Donor verwendet.

[0169] Werden diese Donoren mit herkömmlichen organischen Fluoreszenzfarbstoffen, die in typischer Weise kürzere Abfallzeiten aufweisen, kombiniert, sensibilisiert und verlängert der Donor die Lumineszenz des Akzeptor über seine innewohnende Lumineszenz hinaus. Die Messung solcher Systeme im TGF-Modus ermöglicht den Ausschluss der kurzzeitigen innewohnenden Akzeptor-Lumineszenz und die Bestimmung der sensibilisierten Akzeptor-Lumineszenz mit hoher Empfindlichkeit.

[0170] Weitere geeignete Akzeptoren können aus elektrisch leitenden Materialien, wie aus Gold, Silber, Platin oder aus leitfähigen Metalloxiden, wie aus In-Sn-Oxid (ITO), oder aus leitfähigen Polymeren ausgewählt sein.

[0171] Zur Bindung der Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung an das oder die biologische(n) Molekül(e), auf welcher der Assay beruht, sind die folgenden Techniken und Verfahrensweisen anwendbar.

[0172] Die Bindung kann erzeugt werden durch:

– chemische Modifizierung der Kern/Schale-Partikel, wobei in typischer Weise "funktionelle Gruppen" auf der Oberfläche erzeugt werden, die zur Bindung an ein biologisches Molekül befähigt sind, und/oder durch
– Verbinden der gegebenenfalls chemisch modifizierten Oberfläche des Kern/Schale-Partikels mit kovalent oder nicht-kovalent gebundenen sogenannten "verbindenden Molekülen",

worauf das oder die Biomolekül(e) mit den dadurch erhaltenen Partikeln umgesetzt werden.

[0173] Der Begriff "verbindendes Molekül" bedeutet eine Substanz mit der Befähigung zur Verbindung mit den Kern/Schale-Partikeln der Erfindung und ebenso zur Verbindung an ein Affinitätsmolekül oder an ein Molekül oder einen Molekülteil, welche im Wettstreit um die gleichen Bindungsstellen des Affinitätsmoleküls als Ziel-Molekül, z.B. um ein Epitop, liegen.

[0174] Der Begriff "Ziel-Molekül" bedeutet eine Ganzheit oder Gruppe, deren An- oder Abwesenheit in einem Material wie einer biologischen Probe durch Verwendung der Kern/Schale-Partikel der Erfindung gesichert festgestellt werden soll.

[0175] Der Begriff "Affinitätsmolekül" bedeutet ein Biomolekül, das selektiv an das Ziel-Molekül (falls vorhanden) in dem Material (z.B. einem biologischen Material), das analysiert wird, gebunden wird.

[0176] Der hierin vorab verwendete Begriff "funktionelle Gruppen" ist nicht auf reaktive Gruppen, die kovalente Bindungen bilden, eingeschränkt, sondern schließt auch chemische Gruppen ein, die zu einer ionischen Wechselwirkung oder zu Wasserstoffbindungen mit dem oder den Biomolekül(en) führen. Außerdem sei angemerkt, dass eine strikte Unterscheidung zwischen an der Oberfläche erzeugten "funktionellen Gruppen" und verbindenden Molekülen, die "funktionelle Gruppen" tragen, nicht möglich ist, da manchmal die Modifikation der Oberfläche eine Reaktion kleinerer verbindender Moleküle wie von Ethylenglykol mit der Nanopartikeloberfläche erforderlich macht.

[0177] Die funktionellen Gruppen oder die verbindenden Moleküle, die diese tragen, können aus Aminogruppen, Carbonsäuregruppen, Thiolen, Thioethern, Disulfiden, Guanidinogruppen, Hydroxylgruppen, Amingruppen, vicinalen Diolen, Aldehyden, α-Haloacetylgruppen, Quecksilberorganylen, Estergruppen, Säurehalogeniden, Säurethioestern, Säureanhydriden, Isocyanaten, Isothiocyanaten, Sulfonsäurehalogeniden, Imidoestern, Diazoacetaten, Diazoniumsalzen, 1,2-Diketonen, Phosphonsäuren, Phosphorsäureestern, Sulfonsäuren, Azoliden, Imidazolen, Indolen, N-Maleimiden, α-β-ungesättigten Carbonylverbindungen, Arylhalogeniden oder aus deren Derivaten ausgewählt sein.

[0178] Nicht-einschränkende Beispiele für weitere verbindende Moleküle mit höheren Molekulargewichten sind Nucleinsäure-Moleküle, Polymere, Copolymere, polymerisierbare Kupplungsmittel, Silika, Proteine und kettenartige Moleküle mit einer Oberfläche mit der entgegengesetzten Polarität zu den Kern/Schale-Partikeln. Nucleinsäuren können eine Verbindung zu Affinitätsmolekülen ergeben, die selber Nucleinsäure-Moleküle, obwohl mit einer komplementären Sequenz bezüglich des verbindenden Moleküls enthalten. Als Beispiele für polymerisierbare Kupplungsmittel können Diacetylen, Styrolbutadien, Vinylacetat, Acrylat, Acrylamid, Vinylverbindungen, Styrol, Siliziumoxid, Boroxid, Phosphoroxid, Borate, Pyrrol, Polypyrrol und Phosphate genannt werden.

[0179] Verbindungsverfahren werden nun detaillierter beschrieben:

1. Die Oberfläche der Kern/Schale-Nanopartikel kann z.B. durch die Bindung von Phosphorsäurederivaten mit funktionellen reaktiven Gruppen chemisch modifiziert werden. Ein Beispiel dieser Phosphor- oder Phos-

phonsäureetherderivate ist Iminobis(methylenphosphono)carbonsäure, die gemäß einer "Mannich-Moedritzer"-Reaktion synthetisiert werden kann (Moedritzer und Irani, J. Org. Chem. 1966, 31, 1603). Diese Bindungsreaktion kann mit Kern/Schale-Partikeln durchgeführt werden, wie sie direkt aus dem Herstellverfahren der vorliegenden Erfindung oder nach einer Vorbehandlung (z.B. mit Trimethylsilylbromid) erhalten werden. Im ersten Fall kann das Phosphonsäure(ester)derivat z.B. Komponenten des Reaktionsmediums verdrängen, die noch an der Oberfläche gebunden sind. Diese Verdrängung kann bei höheren Temperaturen verstärkt werden. Trimethylsilylbromid soll andererseits Alkylgruppen-haltige Phosphor-basierte Komplexiermittel, wie sie im Verfahren der Erfindung verwendet werden, entalkylieren, um dadurch neue Bindungsstellen für das Phosphonsäure(ester)derivat zu erzeugen. Das Phosphonsäure(ester)derivat oder daran gebundene verbindende Moleküle können die gleichen funktionellen Gruppen wie oben ergeben.

2. Ein weiteres Beispiel einer Oberflächenbehandlung von Kern/Schale-Nanopartikeln beinhaltet, dass die Partikel in einem Diol, wie in Ethylenglykol, erhitzt werden. Es sei angemerkt, dass diese Behandlung überflüssig sein kann, wenn die Synthese der Kern/Schale-Partikel bereits in einem Diol erfolgte. Unter diesen Bedingungen weist das direkt erhaltene Syntheseprodukt wahrscheinlich die notwendigen funktionellen Gruppen bereits auf. Diese Behandlung ist allerdings auf Kern/Schale-Partikel anwendbar, die in den oben beschriebenen N- oder P-haltigen Komplexiermitteln erzeugt wurden. Werden solche Kern/Schale-Partikel einer Nachbehandlung mit Ethylenglykol unterzogen, können Bestandteile des Reaktionsmedium (z.B. Komplexiermittel), die noch an der Oberfläche gebunden sind, durch das Diol ersetzt und/oder entalkyliert werden. Die Behandlung mit Diolen führt zu wasserlöslichen Partikeln. In analoger Weise können primäre Alkohole mit einer zweiten funktionellen reaktiven Gruppe, wie oben angegeben, für die Nachbehandlung verwendet werden. Es ist auch möglich, N-haltige Komplexiermittel, die noch an die Partikeloberfläche gebunden sind, durch primäre Aminderivate mit einer zweiten funktionellen Gruppe, ausgewählt aus den obigen Beispielen, zu ersetzen.

3. Die Oberfläche der Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung kann auch mit Silika überzogen werden. Silika ermöglicht dabei eine relativ einfache chemische Konjugation organischer Moleküle, da Silika leicht mit organischen Verbindungsmitteln, wie mit Triethoxysilan oder Chlorsilan, reagiert. Die Partikeloberfläche kann auch mit Homo- oder Copolymeren überzogen werden. Beispiele für polymerisierbare Kupplungsmittel sind N-(3-Aminopropyl)-3-mercaptobenzamidin, 3-(Trimethoxysilyl)propylhydrazid und 3-(Trimethoxysilyl)propylmaleimid. Weitere Beispiele polymerisierbarer Kupplungsmittel wurden bereits oben genannt. Diese Kupplungsmittel können einzeln oder in Kombination in Abhängigkeit vom Typ des Copolymer verwendet werden, das als Nanopartikelüberzug erzeugt wird.

4. Gemäß einem weiteren Oberflächenmodifikationsverfahren können Kern/Schale-Partikel, die oxidische Übergangsmetallverbindungen enthalten, durch Chlorglas oder organisches Chlorierungsmittel in die entsprechenden Oxichloride überführt werden. Diese Oxichloride sind befähigt, mit Nukleophilen, wie mit Hydroxy- oder Aminogruppen, die oft in Biomolekülen vorgefunden werden, zu reagieren. Dieses Verfahren ermöglicht die Erzeugung einer direkten Konjugation mit Proteinen, z.B. über die Aminogruppe von Lysin-Seitenketten. Die Konjugation mit Proteinen nach Oberflächenmodifikation mit Oxichloriden kann auch durch Verwendung eines bifunktionellen Verbindungsmittels, wie von Maleimidopropionsäurehydrazid, bewerkstelligt werden.

5. Für nicht-kovalente Verbindungsverfahren sind Kette-Typ-Moleküle mit einer Polarität oder Ladung besonders geeignet, die zu denen der Kern/Schale-Partikeloberfläche entgegengesetzt sind. Beispiele für verbindende Moleküle, die mit Kern/Schale-Nanopartikeln nicht-kovalent verbunden werden können, schließen anionische, kationische oder zwitterionische oberflächenaktive Mittel, saure oder basische Proteine, Polyamine, Polyamide, Polysulfone oder Polycarbonsäuren ein. Die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Nanopartikel und amphiphilem Reagenz mit einer funktionellen reaktiven Gruppe kann die notwendige Verbindung erzeugen. Insbesondere eignen sich Kette-Typ-Moleküle mit amphiphilem Charakter, wie Phospholipe oder derivatisierte Polysaccharide, die miteinander vernetzt werden können. Die Absorption dieser Moleküle auf der Oberfläche des Kern/Schale-Partikels kann durch Coinkubation bewerkstelligt werden. Die Bindung zwischen Affinitätsmolekül und Kern/Schale-Partikel kann auch auf nicht-kovalenten, selbst-organisierenden Bindungen beruhen. Ein Beispiel betrifft einfache Detektionssonden mit Biotin als verbindendes Molekül und Avidin- oder Streptavidin-gekuppelte Affinitätsmoleküle.

[0180] Protokolle für Kupplungsreaktionen funktioneller Gruppen an biologische Moleküle sind in der Literatur, z.B. in "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996) zu finden. Das biologische Molekül, insbesondere ein Affinitätsmolekül, kann an das verbindende Molekül kovalent oder nicht-kovalent in Linie mit Standardverfahren der organischen Chemie wie einer Oxidation, Halogenierung, Alkylierung, Acylierung, Addition, Substitution oder einer Amidierung gekuppelt werden. Diese Verfahren zur Kupplung eines biologischen Moleküls an das kovalent- oder nicht-kovalent-gebundene verbindende Molekül kann vor der Kupplung des verbindenden Moleküls an die Kern/Schale-Nanopartikel oder danach durchgeführt werden. Ferner ist es mittels Inkubation möglich, eine direkte Bindung von Affinitätsmolekülen an entsprechend vorbehandelte

Kern/Schale-Nanopartikel (z.B. mit Trimethylsilylbromid) zu bewerkstelligen, welche dann eine modifizierte Oberfläche aufgrund dieser Vorbehandlung (z.B. eine Oberfläche mit höherer Ladung oder Polarität) ergeben. Die Molekülgruppen A und B, die mit einem Donor bzw. Akzeptor markiert wurden, können einen Teil des gleichen Moleküls darstellen und z.B. an das gleiche Affinitätsmolekül gekuppelt sein. Eine Änderung beim räumlichen Abstand dieser Molekülgruppen kann z.B. durch eine Konformationsänderung oder eine Molekülspaltung verursacht sein. Diese Konfirmationsänderung oder Molekülspaltung können das Ergebnis einer Wechselwirkung zwischen dem Affinitätsmolekül und einem Ziel-Molekül sein.

[0181] Alternativ dazu, können die Molekülgruppen A und B auf unterschiedlichen Molekülen angeordnet vorliegen, wobei die genannten Molekülgruppen A und B jeweils an ihre eigenen Affinitätsmoleküle gekuppelt sind. Eine Änderung beim räumlichen Abstand kann durch eine Wechselwirkung der Affinitätsmoleküle, die an Molekülgruppen A und B angeordnet sind, mit einem verbundenen Ziel-Molekül oder miteinander herbeigeführt sein. Diese Wechselwirkung kann z.B. eine Wechselwirkung zwischen Proteinen, wie eine Immunreaktion von Antigen mit Antikörper, ein Nucleinsäure-Hybridismus oder die Wechselwirkung zwischen Nucleinsäuren und Proteinen sein.

[0182] Der Bioassay kann z.B. ein homogener Immunoassay zum Detektieren eines Analyts in einer Körperprobe (z.B. Abstrich, Speichel, Organpunktat, Biopsie, Sekretion, Flüssigkeit, Galle, Blut, Lymphe, Urin, Faeces) sein. Homogene Assayverfahren machen keine Wasch- oder Trennstufen erforderlich.

[0183] Der Bioassay mit den Kern/Schale-Partikeln der vorliegenden Erfindung kann auch ein heterogener Assay sein.

[0184] Der Analyt (in der Regel das Ziel-Molekül), welche im Assay detektiert werden, können z.B. ein mono- oder polyklonaler Antikörper, ein Protein, ein Peptid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Oligo- oder Polysaccharid, ein Hapten oder ein niedermolekulares synthetisches oder natürliches Antigen sein.

[0185] Ebenso sind nicht-einschränkende Beispiele für Affinitätsmoleküle Proteine, Peptide, Oligonucleotide oder weitere Nucleinsäure-Moleküle oder verwandte Spezies, wie PNAs oder Morpholinos sowie Oligo- oder Polysaccharide, Haptene wie Biotin oder Digoxin oder niedermolekulare synthetische oder natürliche Antigene oder Epitope.

[0186] Der Assay kann in Lösung sowie in Festphase- oder Array-basierten Systemen zur Anwendung gelangen, worin Oligo- oder Polynucleotidketten oder Antikörper oder Antigene jeweils auf der Oberfläche immobilisiert werden.

[0187] Assayverfahren mit den Kern/Schale-Partikeln der vorliegenden Erfindung können auf verschiedene Weisen angewandt und genutzt werden.

[0188] Gemäß einem Anwendungstyp sind die (F)RET-Partner auf demselben Molekül angeordnet, d.h., beide (F)RET-Partner werden über entsprechende verbindende Moleküle (teilweise nicht dargestellt) mit demselben Affinitätsmolekül gebunden (Fig. 6a, Fig. 6b, Fig. 7, Fig. 10 und Fig. 11). Die Bindung eines Ziel-Moleküls an das Affinitätsmolekül induziert eine Konfirmationsänderung des Affinitätsmoleküls, um dadurch eine Änderung der räumlichen Position der Markierungen zueinander und somit eine messbare Differenz im (F)RET zu ergeben.

[0189] Für die weiteren Anwendungen werden die (F)RET-Partner auf verschiedenen Molekülen angeordnet und jeweils mit ihrem eigenen Affinitätsmolekül (Fig. 8) oder mit dem Analyt und dem Affinitätsmolekül (Fig. 9) gekuppelt. Die jeweiligen Affinitätsmoleküle können in einer Weise ausgewählt werden, um eine Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor zu ergeben, die durch die Reaktion mit dem Ziel-Molekül entweder erzeugt oder gelöscht wird, um dadurch eine Änderung des Energietransfers zu induzieren.

[0190] Die Verwendungen der Kern/Schale-Nanopartikel gemäß der vorliegenden Erfindung in (F)RET-basierten Bioassayverfahren werden nun noch weiter an Hand der **Fig.** 6 bis Fig. 11 erläutert.

[0191] Fig. 6a zeigt schematisch die Wechselwirkung der (F)RET-Partner auf demselben Molekül in einem homogenen Kinase-Assay. Der lad-Nanopartikel **1** (lad = luminescent anorganic doped/lumineszent anorganisch dotiert) und Chromophor **2** werden mittels einer Peptidsequenz **3** verbunden. Die Peptidsequenz enthält eine Kinase-spezifische Identifikationssequenz **4**. Wird die Peptidsequenz **3** an dieser Position durch eine Kinase **5** phosphoryliert, verändert das Vorliegen von Phosphat **6** die Konformation der Peptidsequenz **3**. Somit

wird die Wechselwirkung zwischen den (F)RET-Partnern, und zwar dem Nanopartikel **1** und dem Chromophor **2**, messbar.

[0192] Fig. 6b zeigt schematisch einen homogenen Immunoassay mit (F)RET-Partnern auf 1 Molekül, wofür Protein-Protein-Wechselwirkungen, z.B. Antigen-Antikörper-Reaktionen, zu bestimmen sind. Nanopartikel **1** und Chromophor **2** werden mittels der Peptidsequenz **3** verbunden. Die Peptidsequenz enthält ein Epitop **14**. Wird ein Antikörper **15**, der in spezifischer Weise das Epitop **14** erkennt, an dieses gebunden, ändert sich die Konformation der Peptidsequenz 3. Dadurch wird die Wechselwirkung zwischen den (F)RET-Partnern, dem Nanopartikel **1** und dem Chromophor **2**, messbar.

[0193] Das zu detektierende Molekül kann direkt an das Affinitätsmolekül gebunden werden, wie gemäß Fig. 6a und Fig. 6b beschrieben. Allerdings kann das erstere auch indirekt für die Bindung eines Moleküls an das Affinitätsmolekül verantwortlich sein. Ein entsprechendes Beispiel dafür stellt die Messung von Ca^{2+}-Konzentrationen in lebenden Zellen dar. Zu diesem Zweck wird die Calcium-abhängige Bindung von Calmodulin an Myosin-Leichtkette-Kinase (myosin-light-chain kinase = MLCK) in ungestreiften Muskeln genutzt. Die Calmodulin-Bindungsdomäne der MLCK wirkt als Affinitätsmolekül und wird an (F)RET-Partner gekuppelt. Abhängig von der Ca^{2+}-Konzentration, wird Calmodulin an die Bindungsdomäne gebunden und bewirkt eine Konformationsänderung der Detektiersonde. Dies ergibt eine Änderung des messbaren (F)RET.

[0194] Fig. 7 zeigt schematisch einen kompetitiven Immunoassay mit (F)RET-Partnern auf 1 Molekül, welcher zur Bestimmung der Konzentration eines Analyt **26** in einer Körperprobe angewandt wird. Nanopartikel **1** und Chromophor **2** werden über ein verbindendes Molekül **29** verbunden, welches an ein Epitop **27** gebunden wird. Das Epitop **27** wird gemäß einem Epitop des zu detektierenden Analyt **26** erstellt. Das Affinitätsmolekül **28** wird spezifisch an das Epitop **27** gebunden. Durch Zugabe einer Probe (z.B. einer Körperprobe), die den zu detektierenden Analyt **26** enthält, wird das noch an das Epitop **27** gebundene Affinitätsmolekül **28** aus diesem Epitop **27** verdrängt. Dies führt zu einer Konformationsänderung eines Affinitätsmoleküls **29** und somit zu einer messbaren Änderung der Wechselwirkung zwischen den (F)RET-Partnern, nämlich dem Nanopartikel **1** und dem Chromophor **2**. Diese (F)RET-Änderung wird zur Bestimmung der Konzentration des Analyt **26** herangezogen.

[0195] Fig. 8 zeigt schematisch einen homogenen Sättigungsimmunoassay mit (F)RET-Partnern auf unterschiedlichen Molekülen. Die Affinitätsmoleküle von lad-Nanopartikel **110** bzw. Chromophor **120** vermögen unterschiedliche Epitope desselben Ziel-Moleküls **130** zu erkennen, was zu einem messbaren Energietransfer in der Gegenwart des Ziel-Moleküls **130** führt. Ein Beispiel eines homogenen Immunassay, bei welchem Donor und Akzeptor auf unterschiedlichen Molekülen angeordnet werden, stellt die Detektion von hCG (human chorional Gonadotropin) in Serum dar. Dabei werden Donor und Akzeptor an Antikörper gekuppelt, die unterschiedliche Epitope des hCG erkennen. Bei Vorliegen von hCG in einer Körperprobe werden Donor- und Akzeptor-Sonden an den Analyt gebunden. Der messbare FRET kann zur Bestimmung der Konzentration des Analyt in der Körperprobe mittels einer Eichkurve herangezogen werden.

[0196] Fig. 9 zeigt schematisch einen homogenen, kompetitiven Immunoassay mit (F)RET-Partnern **210** und **220** auf unterschiedlichen Molekülen. Ein oder mehr Chromophore **220** werden mit Molekül **222** verbunden, welches teilweise oder vollständig einem zu detektierenden Molekül **224** entspricht. Der lad-Nanopartikel **210** wird an ein Affinitätsmolekül **212** gekuppelt, welches spezifisch mit dem Molekül **222** und dem zu detektierenden Molekül **224** wechselwirkt. Eine Bindung entsteht zwischen dem Affinitätsmolekül **212** und dem Molekül **222**, um dadurch einen (F)RET zu ermöglichen. Wird nun eine Probe (z.B. eine Körperprobe), die das zu detektierende Molekül **224** enthält, zugegeben, erfolgt eine Verdrängungsreaktion in Abhängigkeit von der Konzentration des in der genannten Probe zu detektierenden Moleküls **224**. Dies erzeugt eine messbare Änderung, in diesem Fall eine Verringerung des (F)RET, wodurch die Bestimmung der Konzentration des zu detektierenden Moleküls mittels einer Eichkurve ermöglicht wird.

[0197] Fig. 10 zeigt schematisch einen homogenen Assay mit (F)RET-Partnern auf 1 Molekül. Ein lad-Nanopartikel **310** und ein Chromophor **320** werden über ein Peptid **330** als Affinitätsmolekül verbunden. Dieses Peptid kann durch ein zu detektierendes Enzym **340** gespalten werden. Nach dieser Spaltung kann der (F)RET nicht länger beobachtet werden.

[0198] Der Assay von Fig. 10 kann zur Bestimmung einer spezifischen Enzymaktivität, z.B. einer für einen HI-Virus spezifischen Protease, herangezogen werden. Beide (F)RET-Partner werden durch die kurze Identifikationssequenz dieser Protease verbunden und räumlich voneinander durch die Aktivität dieser Protease getrennt, was zur Peptidspaltung führt. Die zu detektierende Enzymaktivität kann auch aus einer Restriktionsen-

donuclease stammen. Dann werden beide (F)RET-Partner durch Nucleinsäure verbunden.

[0199] Fig. 11 zeigt schematisch einen Assay gemäß einem Verfahren molekularer Leuchttürme (Signale). Molekulare Leuchttürme sind DNA-Moleküle, die die Befähigung zur Selbstfaltung durch intermolekulare komplementäre Sequenzen zu einer sogenannten Stamm-Schleife- oder Haar-Pin-Struktur aufweisen. 1 lad-Nanopartikel **410** wird an 1 Terminus einer DNA-Sequenz **430** gekuppelt. Der andere Terminus wird an ein Chromophor **420** als Fluoreszenz-Löschungsmittel oder -Löscher gebunden. In der Haar-Pin-Struktur sind beide (F)RET-Partner **410** und **420** in enger Nachbarschaft angeordnet. Die Fluoreszenz des Donors **410** wird deshalb vollständig gelöscht. Ein Ziel-Molekül **440** zeigt Sequenzen, die zur Schleifenregion der DNA-Sequenz **430** komplementär sind. Da die Bindung des Ziel-Moleküls **440** energetisch günstiger ist, werden die Haar-Pin-Konformation aufgelöst, der Chromophor **420** und der lad-Nanopartikel **410** voneinander getrennt und eine messbare Fluoreszenz ausgestrahlt, da der (F)RET nicht länger die Fluoreszenzlöschung verursacht. Die Hybridismuseigenschaften können in einer solchen Weise angepasst werden, dass eine einzelne Basenpaar-Fehlordnung zwischen dem molekularen Leuchtturm **430** und der Ziel-DNA **440** nicht zu einer Öffnung der Haar-Pin-Struktur führt. Somit wird es ermöglicht, sogar einzelne Basenunterschiede (z.B. SNPs, einzelne Nucleotid-Polymorphismen) zu detektieren.

[0200] Die in Fig. 11 dargestellte Verfahrenstechnik kann auch zum Markenschutz und/oder zur Sicherheitsmarkierungen von Produkten angewandt werden. Wird ein Produkt mit DNA (Fragmenten) markiert, die an beiden Enden kurze komplementäre Strukturen aufweisen, von denen die eine mit einem Kern/Schale-Partikel der vorliegenden Erfindung und die andere mit oben erläuterten Akzeptoren verbunden werden, ist ein (F)RET im entstandenen molekularen Leuchtturm (der Haar-Pin-Struktur) feststellbar. Sobald diese DNA (das Fragment) mit der komplementären Struktur in Kontakt gebracht werden, löst der Hybridismus die Haar-Pin-Struktur auf, um dadurch den (F)RET zu verhindern. Dies ermöglicht eine spezifische Identifikation sowie den Schutz von Handelsprodukten. Markenschutz auf Basis einer Identifikation mit synthetischer DNA wurde bereits, z.B. von November AG, Deutschland, in den Handel gebracht.

III.2 Weitere Anwendungen

[0201] Unabhängig von ihrer Anwendung in Bioassayverfahren ermöglichen die beanspruchten Kern/Schale-Partikel ganz allgemein eine (F)RET-basierte Messung von Nanometer-Abständen in biologischen oder weiteren Systemen, wenn jene mit einem geeigneten Lumineszenz-Akzeptor kombiniert werden. Derartige Messungen können z.B. von Interesse für spektroskopische Zwecke in den Nanomaterial-Wissenschaften sein.

[0202] Außerdem können die beanspruchten Kern/Schale-Partikel für verschiedene industrielle Vorrichtungen und Produkte verwendet werden, in denen ausgezeichnete (Foto-)Lumineszenzeigenschaften gefordert werden.

[0203] Zu diesem Zweck werden sie in typischer Weise als Dispersion in fluiden oder festen Medien zubereitet.

[0204] Geeignete fluide Medien umfassen z.B. ein organisches oder wässriges Dispersionsmedium, eine Überzugszusammensetzung, eine Tinte oder einen Farbstoff, eine Polymerzusammensetzung oder ein Aerosol. Geeignete organische Dispersionsmedien schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Toluol, $CHCl_3$ oder CH_2Cl_2 ein.

[0205] Die Synthese mit N- oder P-haltigen Medien/Komplexiermitteln, wie oben beschrieben, gewährleistet die rasche Dispergierbarkeit der Kern/Schale-Partikel gemäß der vorliegenden Erfindung in organischen Medien.

[0206] Die Zubereitung einer wässrigen Dispersion kann eine Nachbehandlung erforderlich machen, wobei die Rückstände von in der Synthese verwendeten organischen Materialien durch Lösungsmittel mit einer Funktionalitätsbindung an der Oberfläche der Partikel und an einem Molekül-Teil ersetzt werden, wodurch die notwendige Kompatibilität in Wasser, gegebenenfalls in Kombination mit Wasser-mischbaren Lösungsmitteln, gewährleistet wird.

[0207] Das feste Dispersionsmedium kann aus einem Überzug, einer Tinte oder einem Farbstoff, einer Polymerzusammensetzung und insbesondere aus einem Polymerfilm ausgewählt sein.

[0208] Die Nanopartikel als solche oder in typischer Weise ein fluides oder festes Medium, die diese enthal-

ten, können z.B. zur Lichterzeugung, für Druck- oder Markierungserzeugnisse und -materialien verwendet werden.

[0209] Derartige Anwendungen sind z.B. Licht-emittierende Dioden, Displays, optoelektronische Vorrichtungen, z.B. Verstärker in nm-Abmessungen und Lichtquellen in Zero-Schwellen-Lasern. Sie können auch eine Tinte in Druckvorrichtungen betreffen, was von großer Bedeutung in der Sicherheitsmarkierung von Dokumenten oder Banknoten ist.

IV. Beispiele

Beispiel 1: $CePO_4$-Nanopartikelkerne mit einer $TbPO_4$-Schale

[0210] In einem 100 mL-Rundkoben mit Hochleistungs-Rückflusskühler, Temperatursonde und Heizmantel werden 3,72 g (10 mmol) $CeCl_3 \times 7H_2O$ in ca. 4 mL Methanol gelöst, worauf 40 mL Tris-2-ethylhexylphosphat (TEHP) zur entstandenen Lösung gegeben werden. Ein Vakuum wird an den Rundkolben angelegt, um Methanol und Kristallisationswasser zuerst bei Raumtemperatur (1 bis 2 h lang) und dann bei 50°C (ca. 1,5 h lang) zu entfernen.

[0211] In einem zweiten Kolben wird trockene Orthophosphorsäure (20 mmol) in 5 mL Tetraethylenglykoldimethylether gelöst.

[0212] Unter einer Stickstoff-Atmosphäre werden bei 50°C 13,1 mL (30,0 mmol) Trioctylamin und 2,5 mL Orthophosphorsäure/Tetraethylenglykoldimethylether-Mischung zur $CeCl_3$-Lösung in TEHP gegeben. Danach wird die Mischung 15 h lang bei 200°C erhitzt. Nach dieser Zeitspanne wird eine klare Dispersion ("erste Mischung") aus $CePO_4$-Partikeln (Durchschnittsdurchmesser: 5 mm) erhalten.

[0213] In einem zweiten 100 mL-Rundkolben mit Hochleistungs-Rückflusskühler, Temperatursonde und Heizmantel werden 3,72 g (10 mmol) $TbCl_3 \times 6H_2O$ in ca. 4 mL Methanol aufgelöst, worauf 40 mL Tris-2-ethylhexylphosphat (TEHP) zur Lösung gegeben werden. Nach Anlegen eines Vakuum an diesen Rundkolben werden Methanol und Kristallisationswasser zuerst bei Raumtemperatur (1 bis 2 h lang) und dann bei 50°C (1,5 h lang) entfernt. Unter einer Stickstoff-Atmosphäre weden bei 50°C 13,1 mL (30 mmol) Trioctylamin und 2,5 mL (10 mmol Phosphorsäure) Orthophosphorsäure/Tetraethylenglykoldimethylether-Lösung sowie 14 mL der $CePO_4$-Dispersion (abgekühlt auf ca. 20 bis 30°C) zur $TbCl_3$-Lösung (zur "zweiten Mischung") gegeben, worauf bei 200°C 12 h lang erhitzt wird. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung zur Ausfällung der Kern/Schale-Nanopartikel in Methanol gegossen. Der Niederschlag wird zentrifugiert (bei 5500 U/min), worauf die entstandenen Partikel mit Methanol gewaschen und getrocknet werden.

[0214] Das Fotolumineszenzspektrum dieser Partikel, dargestellt in Fig. 2, belegte deren Kern/Schale-Struktur.

[0215] TEM-Messungen zeigten ferner an, dass die Partikel einen Durchschnittsdurchmesser (entlang ihrer längsten Achse) von ca. 6 nm aufwiesen.

[0216] Fig. 1 zeigt die Fluoreszenzspektren homogener $CePO_4$-Partikel (Linie **1**), sowie Kern/Schale-Partikel gemäß der vorliegenden Erfindung (Linien **2** und **3**), worin eine $TbPO_4$-Schale um die $CePO_4$-Partikel herum gewachsen ist. Das durch die Linie **2** reflektierte Spektrum wurde nach einer Reaktionszeit von 0,5 h aufgenommen, wogegen die Linie **3** die Fluoreszenz von $CePO_4$-Kernen mit einer vollständig entwickelten $TbPO_4$-Schale zeigt (Reaktionszeit von 18 h). Die Spektren wurden bei derselben optischen Dichte (10^{-3} Gew.-%) in i-Propanol (λ_{exc} = 274 nm) aufgenommen.

[0217] Wie aus Fig. 1 ersichtlich, sind die homogenen $CePO_4$-Partikel durch eine starke Fluoreszenzemission bei ca. 330 nm gekennzeichnet, zeigen aber keine Emission im sichtbaren Bereich. Diese Situation wird dramatisch durch den $TbPO_4$-Überzug verändert. Ce^{3+} absorbiert ganz stark die Anregungsstrahlung, überträgt die absorbierte Energie auf Tb^{3+}, das diese dann in der Form von 4 starken charakteristischen Banden bei 488, 545, 586 und 617 nm wieder ausstrahlt. Dieser Energietransfer führt zu einer erniedrigten Ce-Emission und lässt die Tb-Emission stark ansteigen.

Beispiel 2: $LaPO_4$-Nanopartikelkerne mit einer $TbPO_4$-Schale

[0218] In einem 100 mL-Rundkolben mit Hochleistungs-Rückflusskühler, Temperatursonde und Heizmantel

werden 3,2 g (8,6 mmol) $LaCl_3 \times 7H_2O$ in ca. 10 mL Methanol gelöst, worauf 39 mL Tris-2-ethylhexylphosphat (TEHP) zur entstandenen Lösung gegeben werden. Ein Vakuum wird an den Kolben zur Entfernung des Methanols und des Kristallwassers zuerst bei Raumtemperatur (1 bis 2 h lang) und dann bei 50°C (einige h lang) angelegt.

[0219] Unter einer Stickstoff-Atmosphäre werden bei 50°C 11,5 mL (26,3 mmol) Trioctylamin und 2,3 mL Orthophosphorsäure/Tetraethylenglykoldimethylether-Mischung zur $LaCl_3$-Lösung in TEHP gegeben. Danach wird die Mischung 16 h lang bei 200°C erhitzt. Nach dieser Zeitspanne wird eine klare Dispersion (eine "erste Mischung") aus $LaPO_4$-Partikeln erhalten.

[0220] In einem zweiten 100 mL-Rundkolben mit Hochleistungs-Rückflusskühler, Temperatursonde und Heizmantel werden 2,97 g (8 mmol) $TbCl_3 \times 6H_2O$ in ca. 10 mL Methanol aufgelöst, worauf 35,2 mL Tris-2-ethylhexylphosphat (TEHP) zur Lösung gegeben werden. Nach Anlegen eines Vakuum am Rundkolben werden das Methanol und das Kristallwasser zuerst bei Raumtemperatur (1 bis 2 h lang) und dann bei 50°C (einige h lang) entfernt. Unter einer Stickstoff-Atmosphäre werden bei 50°C 10,5 mL (24 mmol) Trioctylamin und 2,0 mL (8 mmol Phosphorsäure) Orthophosphorsäure/Tetraethylenglykoldimethylether-Lösung sowie die gesamte Menge der $LaPO_4$-Dispersion (abgekühlt auf ca. 20 bis 30°C) zur $TbCl_3$-Lösung (zur "zweiten Mischung") gegeben, worauf bei 200°C 16 h lang erhitzt wird. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung in Methanol (300 mL) zur Ausfällung der Kern/Schale-Nanopartikel gegossen. Der Niederschlag wird zentrifugiert (bei 5500 U/min), worauf die entstandenen Partikel 2 Mal mit Methanol gewaschen und dann getrocknet werden.

Referenzbeispiel 1: Analyse der Kern/Schale-Partikel

[0221] Dieses Referenzbeispiel beschreibt die Messung der chemischen Zusammensetzung, des Kerndurchmessers sowie der Schalendicke von $CePO_4$:Tb-Nanopartikelkernen mit einer $LaPO_4$-Schale. Obwohl diese Partikel nicht durch die Ansprüche gedeckt sind, ist das vorliegende Analyseverfahren auf die vorliegende Erfindung voll anwendbar.

[0222] Zu diesem Zweck wurden die Partikel auf einen mit Löchern versehenen Kohlefilm montiert und unter einem Philipps CM300UT-Mikroskop untersucht.

[0223] EELS (Elektronenenergieverlustspektroskopie) zeigte, dass die chemische Durchschnittszusammensetzung der Kationen war:
Ce/La = 0,34 ± 0,05, Tb/La = 0,12 ± 0,03, was bedeutet, dass
La/Ce = 3,0 ± 0,4 und Ce/Tb = 2,8 ± 0,8, wobei der letztere Wert in etwa dem angewandten Molverhältnis Ce/Tb (3,14/1) entspricht.

[0224] HREM (Hochauflösungselektronenmikroskopie) bestätigte die Kristallinität der erhaltenen Kern/Schale-Partikel.

[0225] Außerdem wurde ein Hellfeldbild mit einem leichten Unterbrennpunkt bei einer Rasterrate von 0,48 nm/Bildpunkt aufgenommen, um auch kleinere Partikel abzudecken. Die Analyse dieses Bildes zeigte, dass die Hauptpartikelklasse bezüglich des Volumens Durchmesser von 5 bis 9 nm ergab. 6 dieser Partikel wurden mit EFTEM (Energie-Filtertransmissionselektronenmikroskopie), in spezifischer Weise mit dem sogenannten "Spektrum-Bildverfahren", untersucht, das vom "Landeszentrum für Hochleistungsspektroskopie, Institut für Anorganische Chemie" in Bonn, Deutschland, zur quantitativen Analyse entwickelt wurde. Zu diesem Zweck wurden 6 kristalline Partikel bei sehr hoher Vergrößerung auf einer CCD-Kamera hinter einem Abbildungsenergiefilter zentriert. Dann wurden der kleinste Objektivschirm (4,6 mrad) und der größte Eingangsschirm (3 mm) eingesetzt und der Energiefilter in seinem Spektroskopiemodus angewandt. Dadurch wird die komplette Intensität, die durch den Eingangsschirm geht, Linie für Linie auf den Detektor abgebildet. Wegen der chromatischen Aberration der Linse bildet dieses Verfahren nur einen Ausschnitt von ca. ±40 eV mit hoher Schärfe (unterhalb nm) so ab, dass dieser auf den La_{M5}- und $Ce_{M5,4}$-Kanten bei 832, 849, 884 und 902 eV fokussiert wird. Bei der ausgewählten Primärvergrößerung von 99 K betrug der Durchmesser des Eingangsschirms immer 11,2 nm.

[0226] Fig. 2 zeigt (D) das Hellfeldbild (mit Eingangsschirm) von 1 $CePO_4$:Tb-Nanopartikel, umgeben von $LaPO_4$-Schale (Durchmesser: ca. 7 nm), (E) das Spektrumbild bei 860 eV Energieverlust sowie Profile durch die Partikeloberfläche (A, C) und das Zentrum (B). Die Profile (A, B und C) zeigen die $La_{M5,4}$- und $Ce_{M5,4}$-Peaks, deren relative Intensität in etwa der lokalen Zusammensetzung entspricht. Die unterschiedlichen Profile bestä-

tigen das Vorliegen der Kern/Schale-Struktur eines an Ce reichen Kerns und einer an La reichen Schale. Die 6 ausgewählten Partikel wiesen einen Durchschnittsdurchmesser von 7,5 ± 1,9 nm aus einem Ce-reichen Kern mit einem Durchmesser von 4,0 ± 1,1 nm und einer La-reichen Schale mit einer Dicke von 1,9 ± 0,7 nm auf (Tb wurde in dieser Analyse nicht bestimmt).

Beispiel 3: Kupplung von Fluorescein an die Kern/Schale-Partikel aus Beispiel 1 ($CePO_4$/$TbPO_4$)

3-1: Amino-Funktionalisierung der Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Nanopartikel mit Iminobis(methylenphosphono)undecansäure und 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan

[0227] 0,388 g (1 mmol) Iminobis(methylenphosphono)undecansäure werden mit 1,5 mL Ethylenglykol und 0,51 g (2,5 mmol) 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan durch Erwärmen auf 50°C über 30 min gelöst. Die entstandene Lösung ist leicht gelblich. 25 mg (= 71,5 nmol) in Beispiel erhaltene Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Nanopartikel werden zur Lösung gegeben, gerührt und bei 120°C 4 h lang erhitzt. Die Dispersion ist trüb und leicht gelb. Nach Dialyse (Dialyseleitung: Spectra/Por, 5–6.000 MWCO, Spektrum, Niederlande) über Nacht gegen 2 × 2 L 10 mM Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, fallen die Partikel aus.

3-2: Kupplung von Fluorescein an die Amino-funktionalisierten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Nanopartikel

[0228] 5 mg (25 nmol) der Amino-funktionalisierten Nanopartikel (oben beschrieben) werden 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert, worauf das Pellet in 500 µL 0,2 M Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, resuspendiert wird, um eine Konzentration von 10 mg/mL zu ergeben. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) wird in einer 1:1-Lösung von DMF und 0,2 m Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, auf eine Konzentration von 5 mmol/mL gelöst. Ein 17-facher Überschuss (87 µL = 429 nmol) wird zu den Partikeln gegeben, worauf die Mischung unter Rotieren bei Raumtemperatur 4,5 h lang inkubiert wird. Das ungebundene FITC wird an einer Sephadex G-25 M PD 10-Säule (Amersham BioScience) mit 10 mM Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, als Elutionspuffer abgetrennt. Die eluierte Fraktion von 3,9 mL enthält Fluorescein-gekuppelte Nanopartikel.

Vergleichsbeispiel (Comparative Example = CE) 1: Kupplung von Fluorescein an homogene $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikel

CE1-1: Herstellung von $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikeln

[0229] 300 mL TEHP (Tris-(2-ethylhexyl)phosphat) wurden in einem trockenen Stickstoff-Strom entgast. Danach werden 7,43 g $LaCl_3 \times 7H_2O$ (20 mmol), 8,38 g $CeCl_3 \times 7H_2O$ (22,5 mmol) und 2,8 g $TbCl_3 \times 6H_2O$ (7,5 mmol) in 100 mL Methanol gelöst und zum TEHP gegeben. Danach werden das Wasser und das Methanol unter Vakuum bei einer Temperatur von 30 bis 40°C entfernt. Dann wird eine frisch zubereitete Lösung von 4,9 g trockener Orthophosphorsäure (50 mmol), gelöst in einer Mischung aus 66,5 mL Trioctylamin und 150 mL TEHP, zugegeben. An die erhaltene klare Lösung wird sofort ein Vakuum angelegt, und es wird mit Stickstoff gespült, um die Oxidation von Ce^{3+} bei Temperaturerhöhung zu minimieren. Danach wird die Lösung auf 200°C erhitzt. Die Erhitzungsphase wird beendet, wenn die Siedetemperatur auf 175°C abgesunken ist (nach ca. 30 bis 40 h). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird ein 4-facher Überschuss von Methanol zugegeben, um die Partikel auszufällen. Die Partikel werden abgetrennt, mit Methanol gewaschen und getrocknet.

CE1-2: Entalkylierung mit Bromtrimethylsilan

[0230] 300 mg der $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel (ca. 850 nmol), erhalten in CE1-1, werden 4 h lang mit 2,3 g Bromtrimethylsilan (15 mmol) in 100 mL Chloroform am Rückfluss gehalten. Die Hauptmenge des Bromtrimethylsilan-Überschusses sowie flüchtige Zwischenprodukte werden unter Vakuum entfernt und abgetrennt. Der Nanopartikel-haltige Rückstand wird über Nacht unter Rühren in einer Mischung aus 6 mL Wasser und 100 µL Ammoniak (25%ig) hydrolysiert. Die entstandenen Partikel bilden eine milchige Suspension und sedimentieren teilweise nach einigen h. Sie können durch Zentrifugation abgetrennt werden.

CE1-3: Amino-Funktionalisierung der entalkylierten $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikeln mit Iminobis(methylenphosphono)capronsäure

[0231] 0,5 g (1,75 mmol) Iminobis(methylenphosphono)capronsäure (KBD 9267) werden mit 0,894 g (4,375 mmol) 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan (Fluka) in 2 mL Ethylenglykol unter Erwärmen bei 50°C über 30 min gelöst. Die entstandene Lösung ist leicht gelblich. 35 mg (= 175 nmol) in CE1-2 erhaltene $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel werden zur Lösung gegeben, gerührt und bei ca. 120°C 4 h lang erhitzt. Die Dispersion ist auch nach

Abkühlung auf Raumtemperatur klar und bräunlich. Nach Dialyse gegen 2 × 2 L 10 mM Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, ist die Lösung leicht gelb und klar.

CE1-4: Kupplung von Fluorescein an die Amino-funktionalisierten $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel

[0232] Die Lösung der Amino-funktionalisierten $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel aus CE1-3 wird im Vakuum auf ca. 4,8 mg/mL eingeengt. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) wird in einer 1:1-Lösung aus DMF und 0,2 m Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, auf eine Konzentration von 5 mmol/mL gelöst. Ein 17-facher Überschuss (87 µL = 429 nmol) wird zu 5 mg (ca. 1 mL = 25 nmol) der Nanopartikel gegeben, worauf die Mischung unter Rotieren bei Raumtemperatur 4,5 h lang inkubiert wird. Ungebundenes FITC wird an einer Sephadex G-25 M PD 10-Säule (Amersham Bioscience) mit 10 mM Na-Carbonat-Puffer, pH = 8,5, als Elutionspuffer abgetrennt. Die eluierte Fraktion von 3,5 mL enthält Fluorescein-gekuppelte Nanopartikel.

Beispiel 4: Messung des FRET mit den Fluorescein-gekuppelten Nanopartikeln

[0233] Die Fluorescein-gekuppelten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel des Beispiels 3 sowie die homogenen $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikel des Vergleichsbeispiels 1 wurden mit verschiedenen spektroskopischen Analysen zur Bestimmung des FRET-Wirkungsgrads untersucht.

[0234] Die Messungen wurden mit einem FL3-22-Spektrometer von Jobin Yvon mit wässrigen Dispersionen der Probe in optischen Zellen mit einer Breite und Tiefe von jeweils 1 cm durchgeführt. Die Konzentration wurde so ausgewählt, dass die optische Dichte 0,3 nicht überstieg.

[0235] Fig. 3 zeigt die Abfallkurven von 2 Partikel-Typen, die im TRF-Modus nach gepulster Anregung bei 280 nm gemessen wurden:

– Die gestrichelte Linie stellt die Abfallkurve bei 542 nm (Tb-Emission) der in Beispiel 1 erhaltenen unmodifizierten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel, Halbwertszeit: 1,4 ms, dar;
– die fett gedruckte Linie stellt die Abfallkurve bei 542 nm der in Beispiel 3 erhaltenen Fluorescein-gekuppelten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel, Halbwertszeit: 0,02 bis 0,1 ms, dar;
– die dünne Linie stellt die Abfallkurve bei 520 nm (Fluoresceinemission) der in Beispiel 3 erhaltenen Fluorescein-gekuppelten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel, Halbwertszeit von 0,02 bis 0,06 ms, dar.

[0236] Fig. 4 zeigt die Abfallkurven der Fluorescein-gekuppelten, homogenen $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikel des Vergleichsbeispiels 1, die im TRF-Modus nach gepulster Anregung bei 280 nm gemessen wurden:

– Die fett gedruckte Linie stellt die Abfallkurve bei 542 nm (Halbwertszeit ca. 1,7 ms) dar;
– die dünne Linie stellt die Abfallkurve der gleichen Partikel bei 520 nm (Halbwertszeit: ca. 1,0 bis 1,5 ms) dar.

[0237] Die Fluorescein-gekuppelten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel des Beispiels 3 zeigen viel kürzere Fluoreszenz-Halbwertszeiten (bei 542 nm: 0,02 bis 0,1 ms) als die Partikel des Vergleichsbeispiels 1 (ca. 1,7 ms). Dies zeigt an, dass die Kern/Schale-Struktur der Partikel gemäß der Erfindung einen viel effizienteren Energietransfer zum Akzeptormolekül (zum Fluorescein) ermöglichen, um dadurch den FRET-Wirkungsgrad zu steigern. Die Fluoreszenz-Halbwertszeit (ca. 1,4 ms) der unmodifizierten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel ist somit um das ca. 14-Fache höher als die für die Fluorescein-gekuppelten Kern/Schale-Partikel des Beispiels 3 beobachtete.

[0238] Die Fluoreszenzhalbwertszeit der unmodifizierten homogenen $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel (nicht gekuppelt an Fluorescein) beträgt ca. 2,4 ms, d.h., sie ist um das ca. 1,5-Fache höher als die für die entsprechenden Fluorescein-gekuppelten Partikel des Vergleichsbeispiels 1 (bei 542 nm: ca. 1,7 ms) beobachtete. Bei Vergleich dieses Verhältnisses (von ca. 1,5/1) mit dem in Fig. 3 dargestellten Verhältnis (ca. 14/1) zeigt sich die Verbesserung des mit der vorliegenden Erfindung erzielten FRET-Wirkungsgrads ganz klar.

[0239] Fig. 5a zeigt Fluoreszenzspektren, gemessen im TGF-Modus nach gepulster Anregung bei 280 nm und einem Messverzug von 40 µs nach dem letzten Anregungspuls:

– die fett gedruckte Linie stellt das Spektrum der in Beispiel 1 erhaltenen unmodifizierten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel dar; und
– die dünne Linie stellt das Spektrum der in Beispiel 3 erhaltenen Fluorescein-gekuppelten Kern($CePO_4$)-Schale($TbPO_4$)-Partikel dar.

[0240] Der linke Intensitätsmaßstab entspricht der fett gedruckten Linie und der rechte entspricht der dünnen

Linie. Das Emissionsspektrum der modifizierten Kern/Schale-Partikel (aus Beispiel 3) ist durch eine sehr niedrige Intensität der charakteristischen Tb^{3+}-Bande bei 545 nm (erniedrigt auf ca. 1/40) und durch das Auftreten einer neuen breiten Bande bei 520 nm gekennzeichnet, die aus der Fluoresceinemission stammt. Nach Energietransfer der Anregungsenergie (bei 280 nm) von den Ce^{3+}(Kern)- zu den Tb^{3+}(Schale)-Lumineszenzzentren lösen die letzteren eine Fluoresceinlumineszenz durch FRET aus.

[0241] Fig. 5b zeigt 1 Fluoreszenzspektrum, gemessen in TGF-Modus nach gepulster Anregung bei 280 nm und einem Messverzug von 40 µs nach dem letzten Anregungspuls, von
– den Fluorescein-gekuppelten, homogenen $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikeln des Vergleichsbeispiels 1.

[0242] Dieses Spektrum bestätigt ebenfalls das Auftreten des FRET, da eine relativ breite Emissionsbande bei ca. 520 nm, die aus Fluorescein stammt, beobachtbar ist. Allerdings ist die durch die charakteristische Tb^{3+}-Bande bei 545 nm reflektierte Donoremission noch viel stärker als in **Fig.** 4a (dünne Linie), was den niedrigeren FRET-Wirkungsgrad belegt.

Referenzbeispiel 2 (Reference Example 2 = RE2): Bioassayverfahren

[0243] In den folgenden Referenzbeispielen sind spezifische Verfahrenstechniken zur Bindung homogener Nanopartikel an Biomoleküle mit den entsprechend markierten Biomolekülen in biologischen Assayverfahren dargestellt. Obwohl die eingesetzten Nanopartikel keine erfindungsgemäßen sind, sind diese Referenzbeispiele auf die beanspruchten Kern/Schale-Partikel vollkommen übertragbar. In diesem Zusammenhang ist sich der Fachmann bewusst, dass Oberflächenmodifikationsverfahren, wie sie im Folgenden für homogene Nanopartikel dargestellt sind, bevorzugt auch auf Kern/Schale-Partikel, die in ähnlicher Weise synthetisiert wurden, insbesondere bezüglich der Wahl des Lösungsmittels angewandt werden, das in typischer Weise an der Oberfläche der erhaltenen Nanopartikel gebunden wird.

RE2-1: Carboxy-Funktionalisierung der $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel

[0244] $LaPO_4$:Ce,Tb-Partikel wurden wie in Vergleichsbeispiel CE1-1 hergestellt und zubereitet.

[0245] 50 mg dieser Nanopartikel (ca. 140 nmol) werden 3 h lang bei 110°C zusammen mit 5 mL Ethylenglykol (ca. 180 mmol) und 5 µL Schwefelsäure (96 bis 98%ig) unter Rühren und Inertgas erhitzt. Alternativ dazu, ist es möglich, weitere Diole, vorzugsweise Polyethylenglykole verschiedener Kettenlängen, am meisten bevorzugt $HO-(CH_2-CH_2O)_n-OH$, worin n = 2 bis 9, zu verwenden. Die Partikel beginnen sich in Ethylenglykol bei ca. 135°C aufzulösen. Nach Beendigung der Behandlung werden ein Vakuum von ca. 1,5 mbar angelegt und ca. die Hälfte der Ethylenglykolmenge entfernt. Dies ergibt einen klaren Rückstand. Danach wird der Rückstand gegen Wasser über Nacht dialysiert (Dialyseleitung: Spectra/Por, 5–6.000 MWCO, Spectrum, Niederlande).

[0246] 0,5 mL Schwefelsäure (96 bis 98%ig) werden dann zu einer Lösung von 100 mg (ca. 300 nmol) der erhaltenen Nanopartikel in 20 mL Wasser gegeben. 1 mM $KMnO_4$-Lösung wird zur entstandenen Mischung getropft, bis die Entfärbung der violetten Farbe nicht länger beobachtbar ist. Danach wird die gleiche Menge $KMnO_4$-Lösung erneut zugegeben und dann über Nacht gerührt (> 12 h lang). Überschüssiges Permanganat wird durch Zutropfen einer frisch zubereiteten 1 mM Natriumsulfit-Lösung reduziert. Die entstandene Mischung wird über Nacht gegen 0,1 M MES, 0,5 M NaCl, pH = 6,0, dialysiert (Dialyseleitung: Spectra/Por, 5–6.000 MWCO, Spectrum, Niederlande).

RE2-2: Entalkylierung mit Bromtrimethylsilan

[0247] 300 mg (ca. 850 nmol) in Vergleichsbeispiel CE1-1 hergestellte $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel wurden genauso wie in Vergleichsbeispiel CE1-2 behandelt.

RE2-3: Kupplung der $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel mit 11-Bis(phosphorylmethyl)aminoundecansäure und 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan

[0248] 11-Bis(phosphorylmethyl)aminoundecansäure wird durch Erhitzen einer Mischung aus 201 g 11-Aminoundecansäure, 170 g Phosphorsäure, 200 mL konzentrierter Salzsäure und aus 200 mL Wasser bei 100°C und anschließendes Zutropfen von 324 g (Formalin) (37%ig) über 1 h und durch Rühren 1 h lang bei 100°C hergestellt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das ausgefallene Produkt durch Vakuum-gestützte Filtration isoliert und unter Vakuum getrocknet. Dadurch werden 334 g 11-Bis(phosphorylmethyl)aminoundecansäure erhalten. Ähnlich geeignet sind die entsprechenden Säuren mit 2 bis 18 Kohlenstoffatomen.

[0249] 0,5 g (1,85 mol) 11-Bis(Phosphorylmethyl)aminoundecansäure werden in 2 mL Ethylenglykol gelöst, worauf 0,894 g (4,375 mmol) 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan zugegeben werden. Nach Bildung einer klaren Lösung (exotherme Reaktion) werden 35 mg (100 nmol) in RE2-2 erhaltene $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel bei 50°C zugegeben und dann bei 125°C erhitzt. Bei ca. 120°C lösen sich die Partikel vollständig auf. Nach 4 h wird eine klare, leicht bräunliche Lösung erhalten, die sogar nach Abkühlen auf Raumtemperatur klar bleibt. Die Reaktionsmischung wird gegen 2 × 2 L 10 mM Natriumcarbonat-Puffer, pH = 8,5, dialysiert (Dialyseleitung: Spectra/Por, 5–6000 MWCO, Spectrum, Niederlande). Das erhaltene Dialysat enthält die ausgefällten Nanopartikel.

RE2-4: Biotinylierung der $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel aus RE2-3

[0250] 6,2 mL (= 5 mg oder ca. 15 nmol) der in RE2-3 erhaltenen Nanopartikelmischung werden in einem Rotationsverdampfer auf 4,81 mg/mL eingeengt. Unter weiterem Rotieren wird die erhaltene Dispersion 4 h lang mit einem 20-fach molaren Überschuss von Biotin-X-NHS (Sulfobiotinaminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester, Calbiochem, Schwalbach, Deutschland) inkubiert und dann gegen PBS-Puffer (8 mM K_2HPO_4; 150 mM NaCl; 2 mM Na_2HPO_4; pH = 7,4) dialysiert (Dialyseleitung: Spectra/Por, 5–6000 MWCO, Spectrum, Niederlande). Das erhaltene Dialysat ist leicht neblig.

RE2-5: Kupplung von DNA-Oligonucleotid an die $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel von RE2-3

[0251] Die in RE2-3 erhaltenen Nanopartikel werden mit einem 40-fachen Überschuss von Sulfo-SIAB (Sulfosuccinimidyl(4-jodacetyl)aminobenzoat, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland) aktiviert: 7,5 mg (ca. 25 nmol) Amino-funktionalisierte Nanopartikel werden erneut in einer Centricon-Filtriereinheit (MW-Ausschluss bei 50.000, Millipore, Eschborn, Deutschland) in TSMZ-Puffer, pH = 7,3 (0,1 M NaCl; 0,1 M Triethanolamin-HCl; 0,02 M NaOH; 0,27 mM $ZnCl_2$; 0,1% Tween 20; 1 mM $MgCl_2$) gepuffert und auf eine Konzentration von ca. 7 mg/mL eingestellt. 50 µL 20 mM Sulfo-SIAB-Lösung in Wasser werden zur Partikeldispersion gegeben und dann 15 min lang bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 12 µL 1 M Glycin (12-facher Überschuss) beendet, worauf das freie Sulfo-SIAB an einer Sephadex G25 PD 10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) abgetrennt wird. Ein DNA-Oligonucleotid mit der Sequenz 5'-CCACGCTTGTGGGTCAACCCCCGTGG-3' und einer Thiol-Modifikation am 5'-Terminus und einer Dabcyl-Modifikation (4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoyl) am 3'-Terminus sowie als Vergleich ein DNA-Oligonucleotid, das sich nur beim fehlenden Dabcyl-Molekül am 3'-Terminus von der Sonde unterschied, wurden von Interactiva (Ulm, Deutschland) bestellt. Äquimolare Mengen des DNA-Oligonucleotids und der SIAB-aktivierten Nanopartikel wurden vermischt und bei 25°C 3 h lang und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die an das DNA-Oligonucleotid gekuppelten Nanopartikel wurden von nicht-gekuppelten Partikeln und vom freien DNA-Oligonucleotid mittels FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) abgetrennt. Die gekuppelten Partikel wurden in 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4, und in 0,1% BSA bei 4°C aufbewahrt. Solange keine Ziel-DNA vorhanden ist, faltet sich das erhaltene Molekül in einer Haar-Pin-Struktur, worin beide Termini des Moleküls in enger Nachbarschaft zueinander vorliegen und FRET auftreten kann. Unter diesen Bedingungen wird die Nanopartikel-Fluoreszenz durch Dabcyl gelöscht.

RE2-6: Kupplung eines anti-β-hCG-Monoklonalantikörpers an die $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel aus RE2-3

[0252] Zuerst werden in RE2-3 erhaltenen $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikel mit einem 30-fach molaren Überschuss von 2-Iminothiolan (2-IT, Traut's Reagens, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) aktiviert: 2 mL (ca. 25 nmol, 4 mg/mL) dieser Partikel wurden in TSE-Puffer, pH = 8,5 (0,04 M NaCl; 0,05 M Triethanolamin-HCl; 0,04 M NaOH; 0,5 mM EDTA; 0,1% Tween 20; pH = 8,5) überführt. Zu diesem Zweck werden sie 3 Mal 15 min lang bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen und der jeweils verbleibende Rückstand wird in 700 µL TSE-Puffer, pH = 8,5, aufgenommen. Diese Partikel werden mit 75 µl 10 mM 2-IT (in TSE-Puffer, pH = 8,5) bei 25°C 1 h lang inkubiert, worauf die Reaktion mit 9 µL (12-fachem Überschuss) 1 M Glycin beendet wird. Zur Abtrennung des 2-IT-Überschusses wird die entstandene Mischung erneut 3 Mal 15 min lang bei 3000 g zentrifugiert, worauf der Überstand abgegossen und der Niederschlag 2 Mal in 1 mL TSE-Puffer, pH = 7,3 (0,1 M NaCl; 0,1 M Triethanolamin-HCl; 0,02 M NaOH; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20; pH = 7,3) und nach der 3. Zentrifugation in 250 µL TSE-Puffer, pH = 7,3, resuspendiert werden. Gleichzeitig wird eine äquimolare Menge von monoklonalem Maus-Antikörper, der für β-hCG spezifisch ist (Klon F199C1, Perkin-Elmer Life Sciences-Wallac Oy, Finnland), mit einem 40-fachen Überschuss von SMCC (N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) aktiviert. 750 µL anti-β-hCG-Antikörper (= 25 nmol bei einer Konzentration von 5 mg/mL) werden in einer Centricon-Filtriereinheit (MG-Ausschluss bei 50.000) in TSMZ-Puffer, pH = 7,3 (0,1 M NaCl; 0,1 M Triethanolamin-HCl; 0,02 M NaOH; 0,27 mM $ZnCl_2$; 0,1% Tween 20; 1 mM $MgCl_2$) erneut gepuffert und auf eine Konzentration von 7 mg/mL eingestellt. 50 µL 20 mM SMCC-Lösung in DMF (= 1 mmol) werden zu dieser Antikörper-Lösung gegeben und

dann bei 25°C 30 min lang inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 12 µL 1 M Glycin (12-facher Überschuss) beendet und das freie SMCC wird an einer gebrauchsfertigen Sephadex G25 PD 10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) abgetrennt. Schließlich werden äquimolare Mengen der 2-IT-aktivierten Nanopartikel-Dispersion und der SMCC-aktivierten Antikörper-Lösung vermischt und 3 h lang bei 25°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-gekuppelten Nanopartikel werden von nicht-gekuppelten Partikeln und freien Antikörpern mit Gelpermeationschromatografie an Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gereinigt. 0,1 M MES, 0,5 M NaCl, pH = 6,0, werden als Puffer-Eluierungsmittel verwendet. Die Retentionszeit für die gekuppelten Nanopartikel beträgt ca. 2 h.

RE2-7: Kupplung der $LaPO_4$:Eu^{3+}-Nanopartikel mit hIL-2

[0253] $LaPO_4$:Eu^{3+}-Nanopartikel wurden in TEHP wie in der Literatur (J. Phys. Chem. B 2000, 104, 2824–2828) mit dem einzigen Unterschied erzeugt, dass 1,76 g $LaCl_3 \times 7H_2O$ anstatt des diesbezüglich genannten Nitrats verwendet wurden. 300 mg (ca. 1 µmol) dieser Nanopartikel wurden unter Rückfluss zusammen mit 2,23 g (15 mmol) Bromtrimethylsilan in 125 mL Chloroform 4 h lang erwärmt. Der Hauptteil des Bromtrimethylsilan-Überschusses und der gebildeten Zwischenprodukte wird abdestilliert, worauf der Rückstand unter leichten alkalischen Bedingungen hydrolysiert wird. Zu diesem Zweck wird der Rückstand mit 6 mL Wasser, wozu 100 µL Ammoniak (25%ig) gegeben wurden, behandelt und über Nacht gerührt. Die entstandenen Partikel bilden eine milchige Dispersion und sedimentieren teilweise nach einigen h. 5 mg (= 25 mmol, 106 µL) dieser Bromtrimethylsilan-behandelten Nanopartikel wurden 1 h lang bei 37°C unter Schütteln mit rekombinantem menschlichen IL-2-Protein (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) in 10 mM Natriumcarbonat-Puffer, pH = 8,5, in einem Molverhältnis von 2:1 inkubiert. Anschließend wird überschüssiges Protein durch Zentrifugieren der entstandenen Mischung 6 Mal 10 min lang bei 3.000 g abgetrennt und dann jeweils in 1 mL Natriumcarbonat-Puffer, pH = 8,5, resuspendiert. Das $LaPO_4$:Eu^{3+}/IL-2-Konjugat wird bei 4°C aufbewahrt.

RE2-8: Homogener Energietransfer-Assay zum Detektieren von β-hCG mit den Antikörper-gekuppelten Nanopartikeln aus RE2-6 als Donor und mit Fluoreszenz-gekuppelten Antikörpern als Akzeptor

Kupplung von anti-β-hCG-Antikörpern an Fluorescein:

[0254] Fluororeporter®-FITC-Protein-Markierungskit, hergestellt von Molecular Probes, wurde zur Kupplung von Fluorescein an anti-β-hCG-Antikörper (M15294, Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finnland) gemäß den Instruktionen des Herstellers angewandt. 0,5 mg Antikörper wurden in einer Centricon-Filtriereinheit (MG-Ausschluss bei 50.000) in 0,2 M Hydrogencarbonat-Puffer, pH = 9,0, erneut gepuffert. Die Antikörperlösung wird dann mit einem 25-fachen Überschuss von 5 mM Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Lösung (gelöst in einer Mischung des gleichen Volumens aus DMF und 0,2 M Hydrogencarbonat-Puffer, pH = 9,0) 3 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der FITG-Überschuss wird an einer gebrauchsfertigen Sephadex G25 PD 10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) abgetrennt, und die Antikörper-Konzentration und das Verhältnis Fluorescein/Antikörper werden spektroskopisch bestimmt. 0,01% Natriumazid und 0,1% BSA werden zum Konjugat gegeben, das bei 4°C aufbewahrt wird.

Durchführung des Assay:

[0255] 50 µL β-hCG-Standards aus einem im Handel erhältlichen Kit zur Messung von freiem β-hCG in Serum (A007-101, Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finnland) werden 60 min lang bei 25°C zusammen mit 100 nmol in RE2-6 erhaltenen Nanopartikel-Antikörper-Konjugaten und 100 nmol Fluorescein-gekuppelten anti-β-hCG-Antikörpern in 200 µL Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4, in einer UV-durchlässigen 96-Lochvertiefungen-Mikrotiterplatte (UVStar, Greiner) inkubiert. Die 2 anti-β-hCG-Antikörper sind gegen unterschiedliche Epitope der β-hCG-Untereinheit gerichtet. Danach werden die Proben in einem Fluoreszenz-Spektrometer (von Jobin Yvon, Fluorolog 3) unter den folgenden Bedingungen gemessen: gepulste Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm, Emission: 542 nm, Spaltbreite: 5 nm, Integrationszeit: 0,1 ms. Die für die individuellen β-hCG-Konzentrationen erhaltenen Ergebnisse werden in eine Eichkurve eingegeben. Der β-hCG-Gehalt von Körperproben kann in analoger Weise wie in Serumproben durch Bestimmung der Konzentration auf Basis dieser Eichkurve gemessen werden.

RE2-9: Homogener kompetitiver Energietransferassay zur Bestimmung von hIL-2 mit den hIL-2-gekuppelten Nanopartikeln ($LaPO_4$:Eu^{3+}) aus RE2-7 und mit Alexa Fluor 680-gekuppelten anti-hIL-2Rα-Kette-Antikörpern

Kupplung monoklonaler anti-hIL-2Rα-Kette-Antikörpern mit Alexa Fluor 680:

[0256] 1 mg monoklonaler Antikörper 7G7B6, der spezifisch die α-Kette von menschlichem Interleukin-2-Rezeptor (hIL-2α-Kette) (ATCC, Rockville, USA) erkennt, wurde gegen PBS dialysiert, auf eine Konzentration von 2 mg/mL eingestellt und mit Alexa Fluor 680-Protein-Markierungskit (Molecular Probes Europe BV, Niederlande) gemäß den Instruktionen des Herstellers markiert. Mit 0,1 M Natriumbicarbonat-Puffer (pH = 8,3) als Reaktionspuffer wurde die Inkubation bei Raumtemperatur 1 h lang durchgeführt. Der gekuppelte Antikörper wird an einer Säule, die im Kit enthalten ist, mit PBS-Puffer und 0,2 mM Na-Azid als Eluierungspuffer gereinigt. In einer 1 cm optischen Zelle wird die Absorption (A) bei 280 und 679 nm zur Bestimmung der Protein-Konzentration des gekuppelten Antikörpers gemessen, wobei diese mit der folgenden Gleichung berechnet wird:

$$M = \frac{(A_{280} - (A_{679}\ x\ 0,05))\ x\ Verdünnungsfaktor}{203\,000},$$

worin 203000 $cm^{-1}M^{-1}$ den molaren Extinktionskoeffizient von IgG darstellt und 0,05 der Korrekturfaktor für die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm ist. Die Konzentration des gekuppelten Antikörpers beträgt 1,27 und wird auf 1 mg/mL (ca. 6,5 µM) mit PBS und 0,2 mM Na-Azid eingestellt. Der gekuppelte Antikörper wird bei 4°C aufbewahrt. Der Markierungswirkungsgrad wird wie folgt berechnet:

$$\text{Mol Farbstoff pro mol Antikörper} = \frac{A_{679}\,x Verdünnungsfaktor}{184000\ x\ \text{Protein} - Konzentration\ M},$$

worin 184000 $cm^{-1}m^{-1}$ den molaren Extinktionskoeffizient des Alexa Fluor 680-Farbstoffs bei 679 nm darstellt. Das Verhältnis von Antikörper/Farbstoff-Konjugat beträgt 3,2.

Durchführen des Assay:

[0257] Die notwendigen Verdünnungen der verschiedenen Komponenten werden mit 50 mM TSA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7,75; 0,9% NaCl; 0,05% NaN_3) erhalten. 40 Lochvertiefungen von UV-durchlässigen Mikrotiterplatten (UVStar, Greiner) werden zuerst mit MSA-Lösung (0,5%) 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindung abzusättigen, worauf eine Mischung des $LaPO_4$:Eu^{3+}/IL-2-Konjugats aus Beispiel RE2-7, Alexa Fluor 680-markiertem anti-hIL-2α-Kette-Antikörper und aus rekombinantem hIL-2sRα-Protein (aus menschlichem IL-2-löslichen-Rezeptor-α, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) jeweils mit einer Endkonzentration von 40 nM zugegeben wurde. 20 dieser Lochvertiefungen werden mit nicht-markiertem hIL-2-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen beladen, wobei 20 mit einem Protein mit keiner Relevanz für diesen Assay zurückbleiben. Jede Konzentration wird mit 50 nM zum serienmäßigen Test einer Konzentration von 0 bis 950 nM gesteigert. Das Endvolumen der Reaktion beträgt in jedem Fall 200 µL. Die Inkubation wird im Dunkeln 45 min lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Die Signale werden mit einem Wallac 1420 Victor™ Multilabel-Zähler (Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finnland) unter den folgenden Bedingungen gemessen: Anregung: 340 nm, Emission: 665 nm, Zeitverzug: 50 µs, Zeitfenster: 200 µs und Kreislaufzeit: 1000 µs. Jeder Wert wird 2 Mal bestimmt und auf Basis der Ergebnisse für unspezifische Bindung, erhalten mit dem irrelevanten Protein, korrigiert. Die gemessenen Werte werden gegen die Proteinkonzentrationen in einem Diagramm aufgetragen, um eine Eichkurve zu ergeben, mittels derer die Konzentrationen des menschlichen Interleukin-2 bestimmbar sind. Dies ist in analoger Weise für menschliche Körperproben genauso möglich.

RE2-10 Quantitative PCR-Bestimmung bakterieller DNA durch intramolekularen Energietransfer mit den DNA-Oligonucleotid-gekuppelten $LaPO_4$:Ce,Tb-Nanopartikeln aus RE2-5

[0258] Der Primer und die Sonde zur quantitativen DNA-Bestimmung wurden spezifisch für das RNA-Polymerase-Gen von Mycobacterium tuberculosis selektiert und mit Interactiva (Ulm, Deutschland) erzeugt. Der Primer wies die folgende Sequenz auf: Vorwärts: 5'-GGCCGGTGGTCGCCGCG-3', Rückwärts: 5'-ACGTGACAGACCGCCGGC-3'.

Assay zur quantitativen Bestimmung bakterieller DNA

[0259] Für 50 µL-PCR-Reaktionen wurden 50 nM der Nanopartikel (Dabcyl-Oligonucleotid-gekuppelt) aus RE2-5 als Sonde, 500 nM von jeweils beiden Primern, 2 E Amplitaq Gold-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer),

250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM dGTP, 500 µM dUTP, 4 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl und 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0) vermischt. Genomische M. tuberculosis-DNA wird als DNA-Templat mit den gleichen Primern amplifiziert und in ein Plasmid mit dem Invitrogen Zero Blunt TOPO PCR-Klonier-Kit (Invitrogen BV/NOVEX, Niederlande) kloniert. Zum Erhalt einer Standardkurve werden 5 unterschiedliche Konzentrationen des DNA-Plasmids von 1 pg bis 100 ng sowie eine Reaktion ohne DNA-Templat verwendet. 30 Reaktionen wurden für jede Konzentration so zubereitet, dass, beginnend nach dem 15. Zyklus, eine Probe nach jedem zusätzlichen Zyklus zur spektrometrischen Messung derselben gezogen werden konnte. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µL, und die Amplifikation wurde mit einem Thermocycler (PCR-System 2400, Perkin-Elmer) unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 10 min bei 95°C; 15 bis 45 Zyklen von 30 s bei 95°C, 45 s bei 56°C und 30 s bei 72°C. Die Proben wurden in einem Fluoreszenz-Spektrometer (von Jobin Yvon, Fluorolog 3) unter den folgenden Bedingungen gemessen: gepulste Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm, Emission: 542 nm, Spaltbreite: 4 nm, Zeitverzug: 50 µs, Wiederholungsrate von ca. 25 Hz. In gleicher Weise ist es möglich, die Halbwertszeit der Terbium-Emissionslinie zu bestimmen. Für diesen Zweck wurden die folgenden Bedingungen angewandt: Anregung: 280 nm, Emission: 542 nm, Spaltbreite: 5 nm, Integrationszeit: 0,1 ms. Während des Hybridismus von Sonde und Ziel-DNA tritt kein intramolekularer FRET zwischen dem gekoppelten Nanopartikel und Dabcyl auf. Mit steigender Ziel-DNA-Konzentration steigt die Tb-Fluoreszenz des Nanopartikels deshalb gegenüber der Vergleichsprobe ohne Templat an. Gleichzeitig verlängert sich die Halbwertszeit der Nanopartikel-Fluoreszenz-Lebensdauer gegenüber der Vergleichsprobe ohne Templat-DNA. Diese Differenzen beider Parameter können gegen die Zyklenzahl aufgetragen werden, um eine Eichkurve für jede DNA-Templat-Konzentration zu erstellen.

Patentansprüche

1. Lumineszierende anorganische Nanopartikel, umfassend:
(a) einen Kern, hergestellt aus einem ersten Metallsalz oder -oxid, umgeben von
(b) einer Hülle, hergestellt aus einem zweiten Metallsalz, das lumineszierend ist, und Nicht-Halbleitereigenschaften aufweist.

2. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 1, wobei das Salz des Kerns und der Hülle dasselbe Anion umfassen, wobei das Anion vorzugsweise gewählt aus Phosphaten, Sulfaten oder Fluoriden.

3. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 1 oder 2 mit einem durchschnittlichen Durchmesser, basierend auf ihrer längsten Achse von weniger als 30 nm.

4. Lumineszierende Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die durchschnittliche Dicke der Hülle den durchschnittlichen Durchmesser des Kerns nicht übersteigt.

5. Lumineszierende Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, worin (a) der Kern nicht-lumineszierend ist und (b) die Hülle ein lumineszierendes Metallatom umfasst, das vorzugsweise gewählt ist aus den Lanthaniden Ce(58), Pr(59), Nd(60), Sm(62), Eu(63), Gd(64), Tb(65), Dy(66), Ho(67), Er(68), Tm(69) oder Yb(70) oder Kombinationen daraus, oder aus Cr und Mn.

6. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 5, wobei die Hülle dieses Metall als Hauptmetallkomponente umfasst, insbesondere als einzige Metallkomponente.

7. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 5, worin die Hülle dieses Metall als Dotiermittel eines nicht-lumineszierenden Wirtsmaterials umfasst.

8. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 6, wobei der Kern aus $LaPO_4$ und die Hülle aus $TbPO_4$ bestehen.

9. Lumineszierende Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, worin (a) der Kern ein erstes Metallsalz oder -oxid umfasst, das nach Anregung zur Übertragung der Anregungsenergie auf (b) ein zweites lumineszierendes Metallsalz, das dieselbe als Lumineszenz emittiert.

10. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9, wobei das Kernmetall und das Hüllmetall gewählt sind aus Ce(58), Pr(59), Nd(60), Sm(62), Eu(63), Gd(64), Tb(65), Dy(66), Ho(67), Er(68), Tm(69) oder Yb(70).

11. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9 oder 10, wobei das Kernmetall gewählt aus Ce und das Hüllmetall aus Nd, Dy oder Tb.

12. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9 oder 10, wobei das Kernmetall Yb und das Hüllmetall Er ist.

13. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9, wobei der Kern das Metall des ersten Metallsalzes oder -oxids als Hauptmetallkomponente umfasst, insbesondere als einzige Metallkomponente und/oder die Hülle das Metall des zweiten lumineszierenden Metallsalzes als Hauptmetallkomponente, insbesondere als einzige Metallkomponente umfasst.

14. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9, wobei der Kern das Metall des ersten Metallsalzes oder -oxids als Dotiermittel eines Wirtsmaterials umfasst und/oder die Hülle das Metall des zweiten lumineszierenden Metallsalzes als Dotiermittel des Wirtsmaterials umfasst.

15. Lumineszierende Nanopartikel gemäß Anspruch 9 bis 11, wobei der Kern aus $LaPO_4$:Ce oder $CePO_4$ und die Hülle aus $TbPO_4$ besteht.

16. Verfahren für die Herstellung der Nanopartikel gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend die folgenden Schritte:
Herstellung einer ersten Mischung, umfassend Nanopartikel eines ersten Metallsalzes oder -oxids in einem organischen Medium,
Umsetzen der ersten Mischung, einer Anionenquelle für die zu formende Hülle und einer zweiten Mischung, umfassend hüllenbildende Metallionen und ein organischen Komplexierungsmittel für die Metallionen bei einer Temperatur von 50 bis 350°C, bis eine Hülle sich um die Nanopartikelkerne eines ersten Metallsalzes oder -oxids gebildet hat.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei das organische Medium, das in der ersten Mischung vorliegt, und das organische Komplexierungsmittel, das in der zweiten Mischung vorliegt, identisch sind.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16 oder 17, wobei das organische Medium und das Komplexierungsmittel gewählt sind aus Mono- oder Dialkylaminen, wobei die Alkylreste 4 bis 20 C-Atome aufweisen, phosphororganischen Verbindungen, Polyolen oder Sulfoxiden.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, umfassend die Schritte der Synthese der Nanopartikelkerne in dem organischen Medium, gefolgt von einer Umsetzung dieser Kerne ohne vorherige Isolierung.

20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die Anionenquelle, insbesondere die Phosphat-, Sulfat- oder Fluoridquelle in überschüssigen molaren Mengen verwendet wird, basierend auf der stöchiometrisch benötigen Menge zur Umsetzung mit den zur Verfügung stehenden hüllenbildenden Metallatomen.

21. Flüssiges oder festes Medium, enthaltend die Nanopartikel gemäß den Ansprüchen 1 bis 15.

22. Flüssiges Medium gemäß Anspruch 21, gewählt aus einem organischen oder wässrigen Dispersionsmedium, einer Beschichtungszusammensetzung, einer Tinte oder einem Farbstoff, einer Polymerzusammensetzung oder einem Aerosol.

23. Festes Medium gemäß Anspruch 21, gewählt aus einer Beschichtung, einer Tinte oder einem Farbstoff, einer Polymerzusammensetzung, insbesondere einem Polymerfilm.

24. Verwendung von Nanopartikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 in auf (F)RET-basierenden Bioassays.

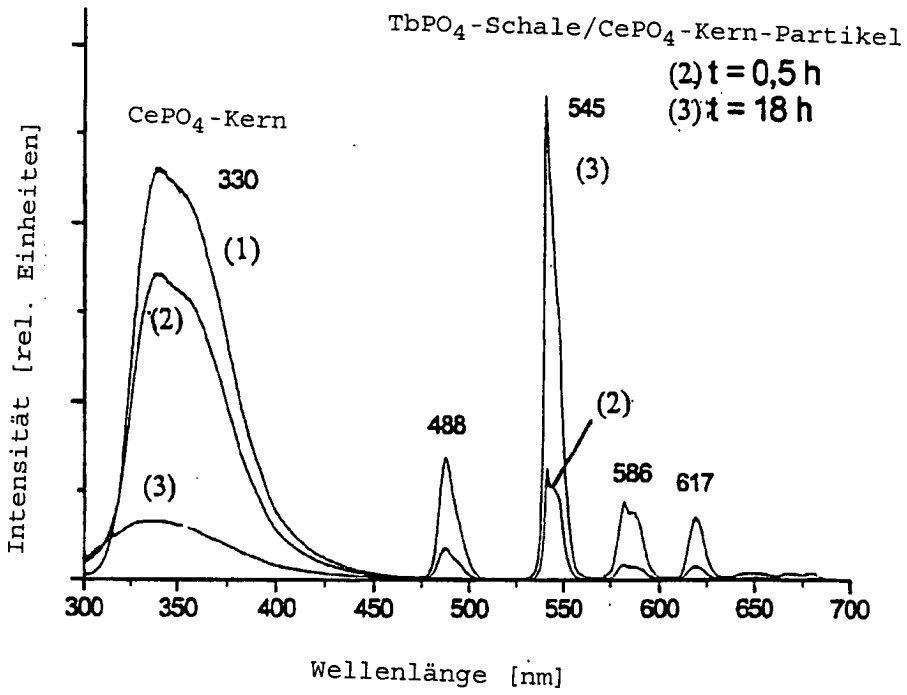
25. Verwendung gemäß Anspruch 24 in auf (F)RET-basierenden Bioassays zum Nachweis von Nucleinsäuren.

26. Verwendung von Nanopartikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 oder dem Medium von Ansprüchen 21 bis 23 zur Erzeugung von Licht, für den Druck oder für die Markierung von Sachen und Materialien.

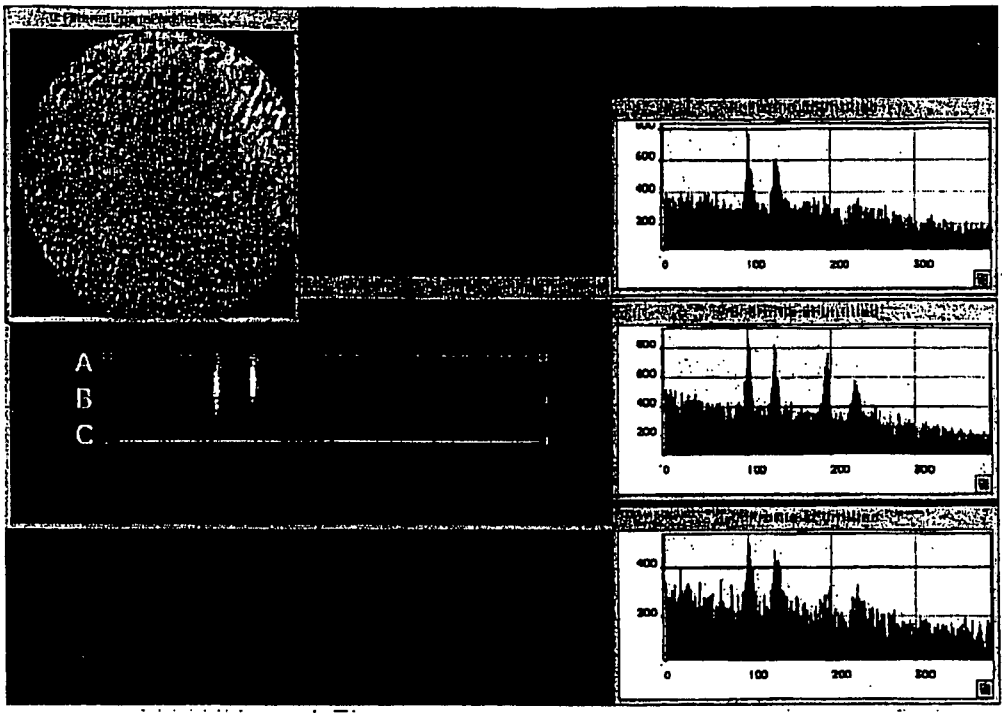
Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

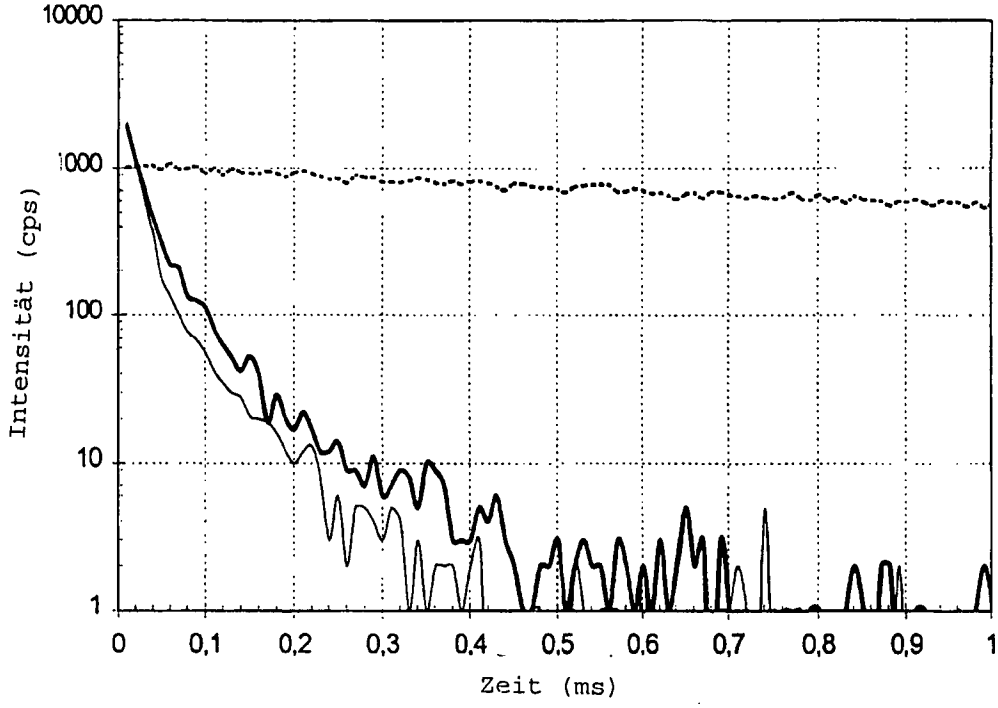
Figur 1



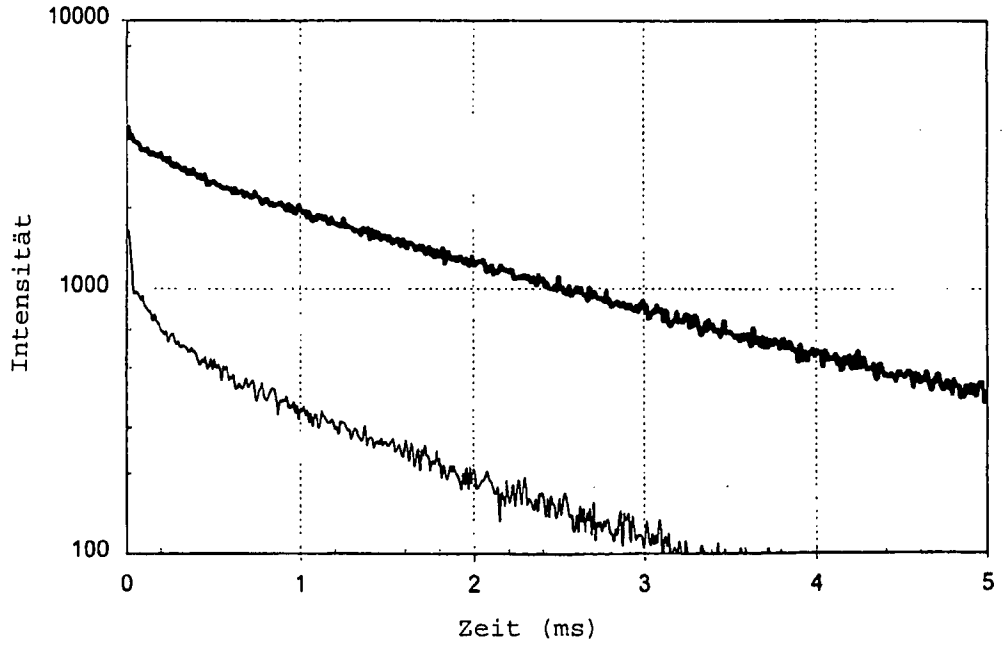
Figur 2



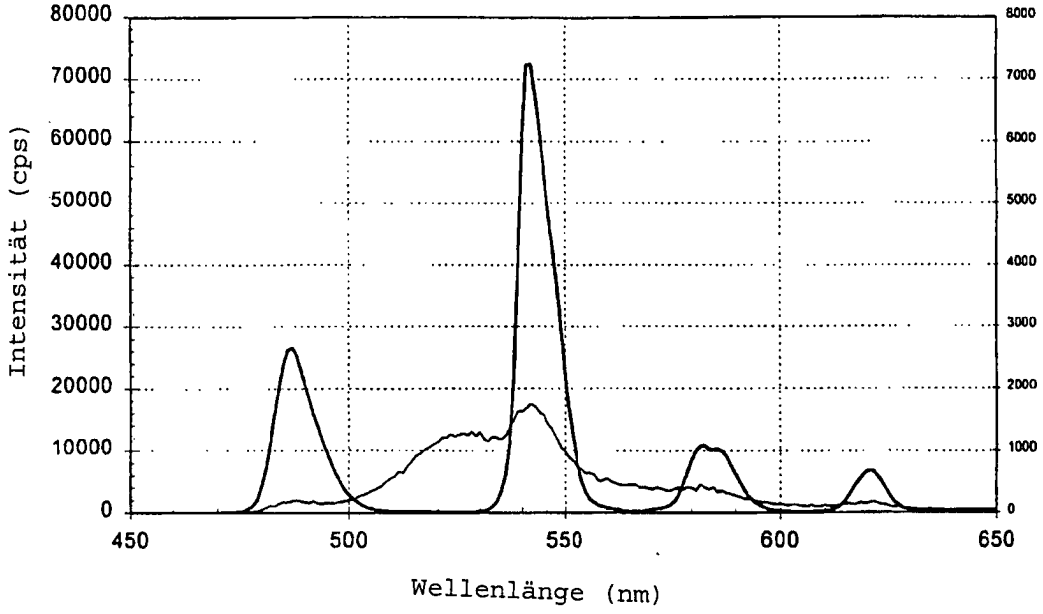
Figur 3



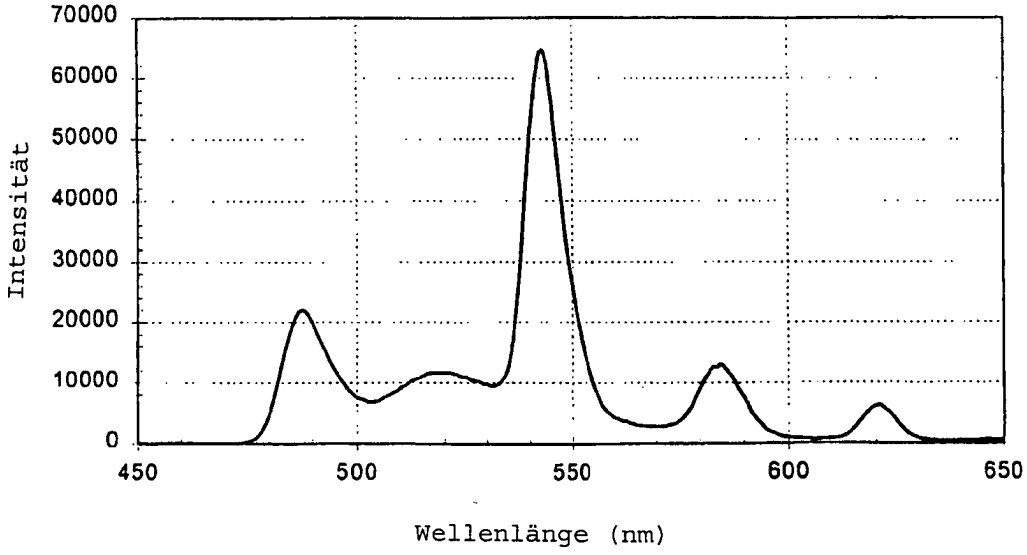
Figur 4



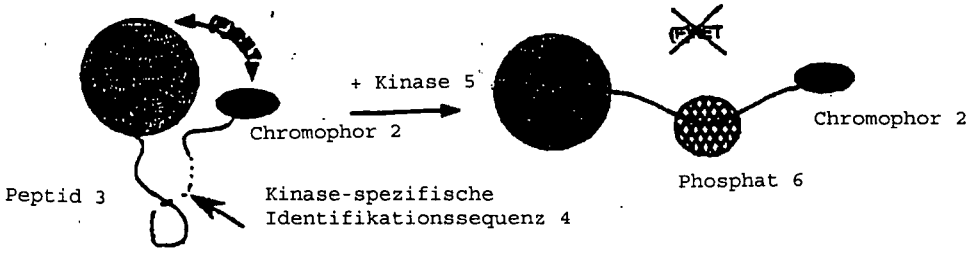
Figur 5a



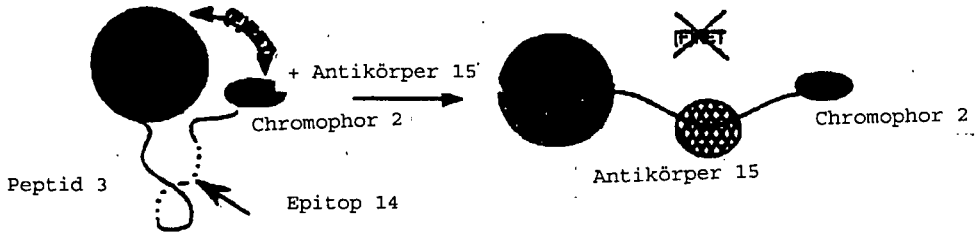
Figur 5b



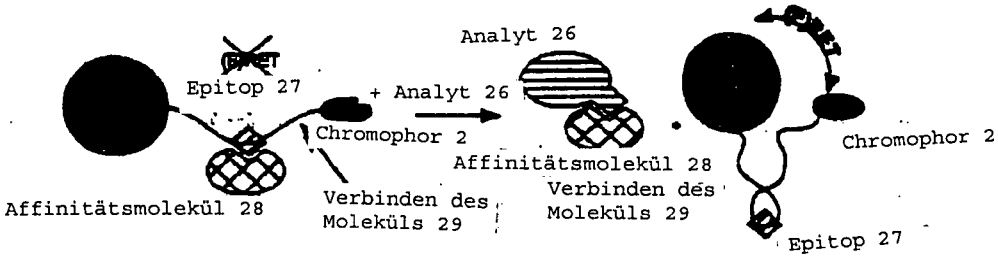
Figur 6a



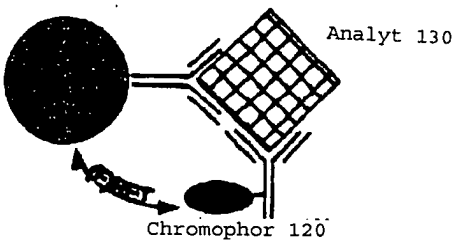
Figur 6b



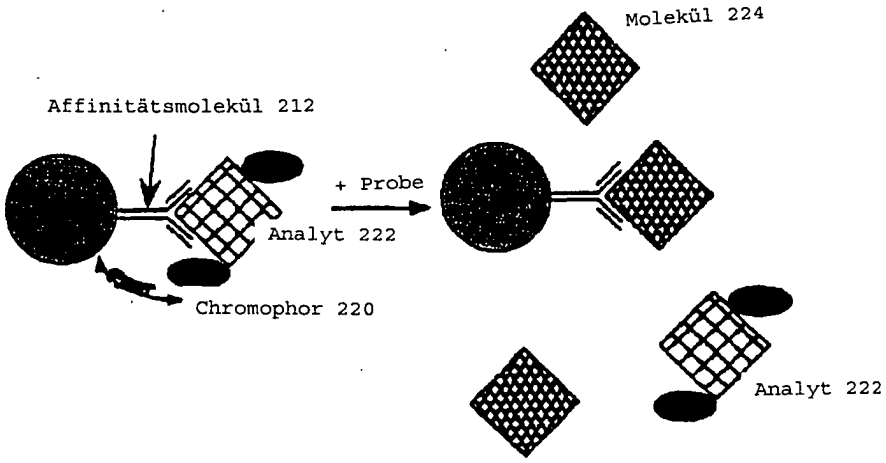
Figur 7



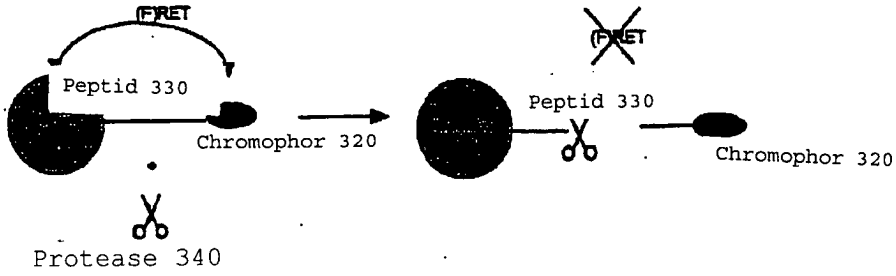
Figur 8



Figur 9



Figur 10



Figur 11

