



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 287 703**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/58 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04713923 .3**

⑧6 Fecha de presentación : **24.02.2004**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1608980**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

⑤4 Título: **Un bioensayo homogéneo de transferencia de energía luminiscente.**

③0 Prioridad: **28.03.2003 FI 20030460**
30.01.2004 US 540300 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

⑦3 Titular/es: **Tero Soukka**
Savikatu 3 E 121
20540 Turku, FI
Harri Härmä y
Timo Lövgren

⑦2 Inventor/es: **Soukka, Tero;**
Härmä, Harri y
Lövgren, Timo

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un bioensayo homogéneo de transferencia de energía luminiscente.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la medida de la concentración de analitos o de la actividad biológica en un fluido biológico, sólo un poco transparente o no transparente a las longitudes de onda del visible, usando una transferencia de energía luminiscente basada en bioensayos homogéneos que comprende un primer grupo marcado con un dador de energía y
10 un segundo grupo marcado con un aceptor de energía, en donde el dador es una marca de lantánido luminiscente que es capaz de transformar la excitación de baja energía en una emisión de mayor energía.

Antecedentes de la invención15 *Tecnologías de bioensayos homogéneos*

El desarrollo de bioensayos cuantitativos cada vez más sencillos, rápidos, fiables y sensibles ha sido uno de los principales objetivos en la evolución de las técnicas de inmunoensayos, de otros ensayos de unión de ligandos y de ensayos de actividad biológica. Los métodos de inmunoensayos homogéneos han recibido mucha atención, debido a
20 que pueden acelerar un ensayo eliminando la necesidad de etapas tediosas de separación de las marcas ligadas y libres, y simplificando de forma significativa la construcción del instrumento requerido para llevar a cabo un ensayo de forma automática (Ullman EF, J Chem Ed 1999; 76: 781-788; Ullman, EF, J Clin Ligand Assay 1999; 22: 221-227). Uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de instrumentos point-of-care avanzados de bajo coste para inmunoanálisis son las limitaciones de las tecnologías de marcado. Las tecnologías de marcado disponibles actualmente adecuadas para
25 inmunoensayos homogéneos, sin separación, tienen problemas de interferencia de matrices de muestras biológicas complejas, las tecnologías no pueden emplearse universalmente para diferentes analitos y formatos de ensayo, por ejemplo ensayos competitivos y no competitivos, sencillamente no permiten la realización de ensayos suficientemente sensibles que permitan una lectura rápida, o la instrumentación requerida para la detección es demasiado compleja o cara para ser empleada en un instrumento point-of-care.

Los métodos de ensayo homogéneos basados en fotoluminiscencia han recibido mucha atención, ya que se pueden emplear varios tipos de interacciones físicas y químicas para modular la emisión de marcas fotoluminiscentes debido a la formación de complejos inmunológicos específicos. Los métodos empleados habitualmente se basan en la polarización de la luz emitida o en la transferencia de energía no radiactiva entre dos compuestos fotoluminiscentes, o entre
30 un compuesto fotoluminiscente y uno no luminiscente (Hemmilä I, Clin Chem 1985; 31: 359-370). Las propiedades de fluorescencia de dos compuestos fluorescentes se emplearon en un inmunoensayo homogéneo a finales de los 70 cuando Ullman y col. demostraron que la transferencia de energía de fluorescencia entre un dador de fluoresceína y un par aceptor de tetrametilrodamina podía emplearse para construir inmunoensayos tanto competitivos como no competitivos (Ullman EF y col., J Biol Chem 1976; 251: 4172-4178; Ullman EF y Khanna PL, Methods Enzymol 1981;
35 74: 28-60). Se midió la transferencia de energía a partir de la disminución de la fluorescencia del dador, que limitó mejoras adicionales en la sensibilidad. El aumento de la fluorescencia del aceptor no era practicable, ya que sólo pudo observarse un ligero incremento en la emisión del aceptor sensibilizado mediante autofluorescencia, dispersión de luz o absorbancia de matrices de muestras biológicas y la emisión directa del dador en la longitud específica del aceptor.

Muchos compuestos y proteínas presentes en fluidos biológicos o sueros son fluorescentes de forma natural, y el uso de fluoróforos convencionales conduce a serias limitaciones en la sensibilidad (Wu P y Brand L, Anal Biochem 1994; 218: 1-13). Otro problema principal cuando se usan técnicas de fluorescencia homogéneas basadas en medidas de intensidad es el efecto de filtro interior y la variabilidad de las propiedades ópticas de una muestra. Para corregir este problema se ha usado la dilución de la muestra, pero siempre a costa de la sensibilidad analítica. La posibilidad
40 de transferencia de energía de fluorescencia en los inmunoensayos mejoró significativamente cuando en los 90 se emplearon como dadores criptatos y quelatos de lantánidos fluorescentes con emisiones de vida larga y con grandes desplazamientos de Stokes (Mathis G, Clin Chem 1993; 39: 1953-1959; Selvin PR y col., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 10024-10028; Stenroos K y col., Cytokine 1998; 10: 495-499; WO 98/15830; US 5998146; WO 87/07955). También se ha descrito la posibilidad de emplear tecnología de marcado en reacciones de disociación, por ejemplo en
45 ensayos de ruptura (Karvinen J y col., J Biomol Screen 2002; 7: 223-231).

La detección de fluorescencia resuelta en el tiempo de la emisión sensibilizada permitió la eliminación de la autofluorescencia y la medida de la relación de señal dual (patente de EE.UU. 5527684; Mathis, G, Clin Chem 1993; 39: 1953-1959) corrigió la variabilidad de las propiedades ópticas de la muestra. La fluorescencia de los compuestos y de
50 las proteínas presentes en los fluidos biológicos tiene una vida corta y el uso de marcas de larga vida combinadas con la detección resuelta en el tiempo de la emisión de aceptor sensibilizado (con vida prolongada) permitió la minimización del ruido de fondo del ensayo y mejoró la relación señal ruido. La variabilidad de la absorción de luz de excitación a 337 nm se corrigió midiendo la emisión del dador a 620 nm y usando la relación de la señal de transferencia de energía a 665 nm y la emisión a 620 nm para generar una variable que es independiente de las propiedades ópticas de
55 la muestra de suero.

Como alternativa a los ensayos homogéneos reales se han introducido tecnologías de ensayo libre de separación basadas en la detección confocal de marcas fotoluminiscentes ligadas a vehículos particulados (Saunders GC y col.,

Clin Chem 1985; 31: 2020-2023; Frengen J y col., Clin Chem 1993; 39: 2174-2181; Fulton RJ y col., Clin Chem 1997; 43: 1749-1756). En años recientes, se ha desarrollado la tecnología, y algunos inmunoensayos nuevos basados en vehículos pueden considerarse ensayos homogéneos, ya que se llevan a cabo de forma prácticamente similar (Hänninen P y col., Nat Biotechnol 2000; 18: 548; patente de EE.UU. 5891738; Schaertl S y col., J Biomol Screen 2000; 5: 227-238), aunque la señal real de la marca no se modula, sino que el componente marcado no ligado es excluido espacialmente de la medida. Por lo demás, dichos ensayos son comparables a los ensayos homogéneos, pero la medida es relativamente lenta ya que las partículas de vehículo han de ser escaneadas activamente o deben difundir pasivamente hasta el punto focal, y se requiere la señal asociada a varias partículas de vehículo para una medida fiable (Waris ME y col., Anal Biochem 2002; 309: 67-74). El inmunoensayo de luminiscencia de canalización de oxígeno, LOCI del inglés “Luminiscence oxygen channeling immunoassay”, un verdadero ensayo homogéneo basado en un par de marca particulado y en quimioluminiscencia fotoactivada con aumento de conversión, se ha llevado a cabo con una extrema sensibilidad (Ullman EF y col., Clin Chem 1996; 42: 1518-1526; Ullman EF y col., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5426-5430), pero las reservas en la formación del par partícula-partícula y la susceptibilidad frente a interferencias de muestra han impedido la adaptación de la tecnología para aplicaciones de diagnóstico rutinario. Para evitar impedimentos estéricos en la unión de al menos una de las marcas, preferiblemente ambas marcas de un par marcado deberían ser de un tamaño molecular pequeño.

Las técnicas de ensayos homogéneos basadas en marcas fluorescentes permitirían ensayos muy rápidos y sencillos usando un método de incubación sencilla sin ninguna etapa de lavado. En la mayoría de las tecnologías de inmunoensayo de fluorescencia homogéneas convencionales, la realización del ensayo todavía presenta importantes limitaciones: la sensibilidad de los ensayos está limitada por interferencias de los componentes de la matriz y de las propiedades ópticas de las matrices, por ejemplo, orina, saliva, suero, plasma o sangre entera, con el rendimiento de fluorescencia y en nivel de ruido de fondo, y por el grado obtenible de modulación de la fluorescencia, por ejemplo, interceptación, potenciamiento, transferencia de energía o polarización (Hemmilä I, 1985). Las propiedades ópticas de las matrices biológicas en longitudes de onda visibles y en la región del infrarrojo cercano se describen en Chance B, Photon Migration in Tissues, pág. 206; Kluwer Academia/Plenum Publishers, 1990, Nueva Cork. Los ensayos de polarización de fluorescencia que usan fluorescencia que utiliza fluoróforos de infrarrojo cercano (patente de EE.UU. 6060598) se limitan a ensayos de unión competitiva. Idealmente, la modulación de la señal de fluorescencia no debería restringir el tipo de ensayo, competitivo o no competitivo, o el tipo y el tamaño molecular de un analito, y la modulación debería ser detectable y preferiblemente inmutable cuando una porción significativa de la disolución de ensayo consiste en una matriz biológica. Estos estrictos requerimientos para un inmunoensayo de fluorescencia homogéneo sensible explican porqué la mayoría de los ensayos desarrollados se han limitado a la investigación académica, restringidos a un tipo concreto de analito y de matriz, y porqué presentan una baja sensibilidad y un estrecho intervalo dinámico (Mathis G, 1993).

Marcas luminiscentes de larga vida

El empleo de criptatos de lantánido fluorescentes de larga vida en inmunoensayos de transferencia de energía homogéneos proporcionó una tecnología de ensayos mejorada, que resolvió la mayoría de los problemas asociados a los métodos de inmunoensayo homogéneos anteriores. La tecnología de emisión de criptato amplificada resuelta en el tiempo (TRACE, del inglés “time-resolved amplified cryptate emission”) es una técnica de marcado general que permite realizar ensayos no competitivos altamente sensibles, y también es adecuada para ensayos competitivos. La tecnología es aplicable a muestras de suero sólo con una corrección de la absorbancia de la muestra usando medidas simultáneas tanto de la emisión del dador como de la del aceptor, y no es compatible con muestras de sangre entera. Aunque esta tecnología ha permitido realizar inmunoensayos rápidos y sencillos a partir de sueros y con buena precisión, no ha tenido éxito a nivel comercial. El instrumento empleaba un láser de nitrógeno para permitir un pulso de excitación fino y extremadamente potente, que dio lugar a excelentes resultados pero con un diseño caro del instrumento. Además, las ventajas de un ensayo rápido se vieron parcialmente reducidas, ya que la tecnología no era adecuada para sangre entera y requería una preparación de la muestra de suero.

El desarrollo de análisis homogéneos de sangre entera usando técnicas fotoluminiscentes basadas en la proximidad requiere una selección de marcas con excitación y emisión sensibilizada en la ventana del infrarrojo cercano. En principio, existen colorantes dadores y aceptores fluorescentes de vida corta adecuados en el infrarrojo cercano, pero la autofluorescencia y la dispersión todavía limitan la detección (Oswald B y col., Anal Biochem 2000; 280: 272-277), aunque el láser de pulsos o la excitación modulada de alta frecuencia y la resolución en el tiempo por debajo de nanosegundos en la detección de la fluorescencia (Augustin C. 2001, Ruthenium-ligand complexes as bioanalytical luminescent probes for polarization and energy transfer systems. Tesis Doctoral, Universidad de Regensburg, Alemania, pág. 119), disponible a un elevado coste, mejoraría en cierto modo la sensibilidad. Para una resolución en el tiempo de milisegundos habría disponible una instrumentación de coste reducido, pero por desgracia no existen colorantes dadores fluorescentes en el infrarrojo cercano que sean perfectos y que tengan vidas de fluorescencia de milisegundos. Tampoco los quelatos de lantánido (III) fluorescentes de infrarrojo cercano (Werts MHV. 2000. Luminescent lanthanide complexes: Visible Light sensitised red and near-infrared luminescence. Tesis Doctoral, Universidad de Ámsterdam, Holanda, pág. 131), los complejos de rutenio (II) (Augustin CM y col., Anal Biochem 2002; 305:166-172), las porfirinas fosforescentes de platino (II) y paladio (II) (Soini AE y col., J Porphyrins Phthalocyanines 2001; 5: 735-741), ni los colorantes de transferencia de energía (Lakowicz JR y col., Anal Biochem 2001; 288: 62-75) proporcionan todas las características requeridas, ya que o bien se excitan fuera de la ventana de infrarrojo cercano o bien los picos de emisión son a longitudes de onda por encima de los 850 nm, zona en la que no se dispone actualmente de ningún colorante aceptor factible.

Fosforescentes anti-stokes o aumentadores

Los materiales luminiscentes que pueden excitarse mediante una radiación de onda larga, por ejemplo radiación infrarroja, y luego emiten una radiación de menor longitud de onda, particularmente radiación visible, también se denominan fosforescentes anti-stokes o fosforescentes aumentadores. Se excitan mediante una absorción secuencial de dos o más fotones de la radiación excitante. Por tanto, la excitación se lleva a cabo en dos o más etapas de tal modo que los centros luminiscentes de los fosforescentes alcanzan un nivel de energía tal que los fotones emitidos desde los mismos tienen más energía que los fotones que producen la excitación. Los dos o más fotones absorbidos pueden tener la misma o diferente energía o longitud de onda y pueden producirse a partir de fuentes de luz sencillas o múltiples.

El aumento difiere de la excitación de dos-fotones o multi-fotón basada en la absorción multi-fotón simultánea (patentes de EE.UU. 5777732 y 5523573) ya que la absorción de múltiples fotones en el método descrito no tiene porqué ser simultánea y se pueden aplicar intensidades de luz de excitación significativamente menores. La excitación de marcas aumentadoras se puede llevar a cabo, por ejemplo, con lámparas halógenas de pulsos o con diodos semiconductores emisores de luz o con láseres, que son compactos, tienen una elevada potencia y también son económicos (Johnson BD, Photonics Spectra 2001; 35: 52). La radiación de excitación empleada en el aumento no es suficientemente energética para excitar la emisión de ruido de fondo desde la muestra o desde los alrededores con excitación multi-fotón a una longitud de onda, que interferiría con la medida.

Los fosforescentes aumentadores se conocen desde la década de 1970, pero sus propiedades únicas de fluorescencia anti-stokes no se han empleado en investigación biomédica hasta la década de 1990 (Corstjens P y col., Clin Chem 2001; 47: 1885-1893; Niedbala RS y col., Anal Biochem 2001; 293: 22-30; van de Rijke F y col., Nat Biotechnol 2001; 19: 273-276; Zijlmans HJMAA y col., Anal Biochem 1999; 267: 30-36).

En la patente WO 02/44725 se describe el empleo de un dador particulado de larga vida con un aceptor fluorescente de corta vida en ensayos de unión de ligandos, dicha patente también cubre el uso de fosforescentes anti-stokes como dadores, pero no se refiere al análisis de sangre entera. La descripción del ensayo resuelto en el tiempo homogéneo basado en partículas de esta solicitud de patente solapa parcialmente con otras solicitudes de patente anteriores, WO 00/23785 y WO 99/12018, que, sin embargo, no consideran el uso de fosforescentes anti-stokes. El uso de fosforescentes aumentadores en aplicaciones diagnósticas basadas en la separación se ha descrito en las patentes WO 94/07142, US 5674698, US 6159686 y US 6312914. El principio de ensayo homogéneo basado en fosforescentes aumentadores se ha descrito en la patente WO 98/43072, y con más detalle en la US 2002/0119485. Los quelatos aumentadores se han descrito en la patente US 5891656 y en Faris GW y Hryndza M, Proc SPIE - Int Soc Opt Eng 2002; 4626: 449-452. El método de separación de diferentes duraciones de vida usando excitación cíclica se ha descrito en la patente WO 99/63327.

Por tanto, se ha sugerido que dichos fosforescentes aumentadores y quelatos aumentadores pueden usarse en diversos ensayos, también ensayos homogéneos de transferencia de energía que se lleven a cabo con sangre entera, suero o plasma, o con otros fluidos biológicos, que absorben radiación en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 600 nm, y que son difíciles de medir con las tecnologías actuales de bioensayos homogéneos.

Objetivo y resumen de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método de bioensayo homogéneo basado en la transferencia de energía luminiscente adecuado para el uso en bioensayos que se van a llevar a cabo con fluidos biológicos que absorben radiación en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 600 nm, especialmente sangre entera, suero o plasma. El objetivo es alcanzar ensayos que sean rápidos y que no necesiten ninguna etapa de separación, que puedan llevarse a cabo en una sola etapa sin interferencia de marcas o componentes del fluido biológico, que puedan llevarse a cabo empleando una instrumentación económica, sin necesidad de una resolución temporal entre la excitación y el registro de la emisión, y sin necesidad de corregir la variación en la absorbancia de las matrices de muestra en las longitudes de onda de la excitación o de la emisión.

Los inventores de la presente invención han descubierto que los objetivos antes mencionados pueden lograrse mediante el uso como marca dadora de un fosforescente de lantánido luminiscente aumentador o de un quelato de tierras raras aumentador.

Por tanto, la invención se refiere a un método de bioensayo homogéneo basado en transferencia de energía de luminiscencia que comprende un primer grupo marcado con un dador de energía y un segundo grupo marcado con un aceptor de energía, en donde

- el dador es una marca de lantánido luminiscente, siendo capaz dicha marca de aumentar una excitación de baja energía para obtener una emisión de mayor energía,
- el aceptor es una marca luminiscente o no luminiscente, y
- se mide el aumento o la disminución, respectivamente, de la transferencia de energía desde el dador hacia el aceptor resultante del acortamiento o del alargamiento, respectivamente, de la distancia entre dichas marcas.

De acuerdo con la invención,

- el ensayo se realiza en un fluido biológico que absorbe radiación en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 600 nm,
- la medida se lleva a cabo a una longitud de onda > 600 nm, y
- la marca dadora, que puede excitarse a una longitud de onda superior a su longitud de onda de emisión, es excitada en la ventana de longitudes de onda en la que el fluido biológico no absorbe esencialmente la radiación de excitación.

Se mide la intercepción de la luminiscencia del dador, o la emisión sensibilizada del aceptor luminiscente, en la ventana de longitudes de onda en la que el fluido biológico no absorbe esencialmente la radiación de emisión, y por tanto no afecta a la medida.

La invención proporciona una combinación única de características para los bioensayos homogéneos no separativos basados en la detección luminiscente:

- 1) la señal del ensayo (emisión de aceptor sensibilizado o emisión detenida de dador) es estrictamente dependiente de la distancia entre las dos marcas, dador y aceptor, así como la eficacia de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia depende de la inversa de la distancia elevada a la sexta potencia.
- 2) la señal del ensayo es independiente de la matriz de la muestra biológica, ya que tanto la longitud de onda de excitación como la de emisión se encuentran en la región del infrarrojo cercano.
- 3) la señal del ensayo se puede medir sólo con resolución espectral, es decir, sin necesidad de resolución temporal, ya que el material biológico no produce una luminiscencia anti-stokes de fondo.
- 4) la tecnología de marcado es adecuada para ensayos de unión de ligandos competitivos y no competitivos, para moléculas de analito grandes y pequeñas, puesto que uno o los dos restos marcadores pueden ser de tamaño molecular pequeño.

Estas características permiten la realización de bioensayos universales sensibles usando muestras de sangre entera diluidas mínimamente (y otros fluidos biológicos) y una instrumentación sencilla y económica sin resolución temporal y sin corrección de la variación de las propiedades ópticas de la muestra, proporcionando una plataforma ideal para, por ejemplo, métodos de inmunoensayo point-of-care.

Los fosforescentes aumentadores de lantánido convierten el infrarrojo en luz visible a través de la absorción secuencial de dos fotones de baja energía, lo cual constituye una auténtica característica única que no se da en ninguno otro sitio en la naturaleza, y evidentemente con la excitación infrarroja no se produce ninguna fluorescencia de fondo o dispersión por acción de fluidos biológicos en la longitud de onda visible específica del fosforescente. La marca aumentadora proporciona una relación señal ruido mejorada y una total eliminación de la autofluorescencia de fondo de la muestra. Las propiedades ópticas de los fosforescentes aumentadores no ven afectadas en absoluto por el entorno, ya que el proceso de aumento se produce únicamente dentro del cristal del fosforescente aumentador.

La excitación de dichos fosforescentes aumentadores, al contrario que la excitación de dos fotones, no requiere una potencia de láser extremadamente elevada, ya que no es necesario que se absorban dos o más fotones simultáneamente.

Estos compuestos luminiscentes anti-stokes, lantánidos fosforescentes aumentadores o quelatos de lantánido aumentadores, podrían emplearse como dadores en bioensayos homogéneos, incluyendo inmunoensayos, de forma similar a los quelatos de tierras raras de larga vida en el ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo, pero sin la necesidad de resolución temporal o de excitación ultravioleta y corrección de la variación de las propiedades ópticas de la muestra, proporcionando todas las características para una tecnología de marcado ideal. En realidad, la medida anti-stokes debería permitir una eliminación mejorada del ruido de fondo empleando filtros ópticos sencillos de paso de banda, en comparación con la detección resuelta en el tiempo que requiere además una resolución temporal.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el espectro de absorción del suero humano (A; dilución 1:10 en disolución salina). El suero humano es relativamente transparente a 400-1100 nm.

La Figura 2 muestra el espectro de absorción de la sangre humana entera (A; dilución 1:10 en disolución salina). La sangre humana entera es relativamente transparente a 600-1100 nm.

La Figura 3 muestra la ventana de infrarrojo cercano (NIR) (el intervalo de longitud de onda entre 650 y 900 nm). La figura muestra que la hemoglobina (Hb) y el agua (H₂O) tienen sus coeficientes de absorción más bajos dentro de la ventana de NIR.

La Figura 4a muestra los espectros de excitación (A; línea punteada) y de emisión (B; línea continua) de un fosforescente aumentador preferido (fosforescente de Yb(III) dopado con Er(III); y 4b muestra las Figuras 4a y 5 (Alexa 660; (2)) insertadas en la Figura 2. En la Figura 4b se muestran las bandas principales de excitación (A) y de emisión (B) del dador en combinación con los espectros de excitación (C) y de emisión (D) del aceptor Alexa 660 y el espectro de absorción de la sangre entera (E; dilución 1:10 en disolución salina).

La Figura 5 muestra los espectros de excitación (A; líneas punteadas) y de emisión (B; líneas continuas) de dos colorantes aceptores fluorescentes de vida corta, Alexa 555 (1) y Alexa 660 (2).

La Figura 6 muestra los principios básicos de los inmunoensayos (A) no competitivos y (B) competitivos basados en el ensayo de proximidad de luminiscencia aumentadora, cuando el dador es una marca aumentadora de lantánido particulado.

La Figura 7 muestra una ilustración de las diferencias en longitud de vida de la emisión de aceptor sensibilizado (τ_2 ; transferencia de energía no radiante) y de la emisión de fondo radiante (τ_3 ; reabsorción de luz emitida).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Debe entenderse que los términos “primer grupo” y “segundo grupo”, ambos marcados, incluyen cualquier componente tal como el componente de reconocimiento de bioafinidad (en reacciones en las que la distancia entre los grupos disminuye, por ejemplo en reacciones de bioafinidad) o una parte de una molécula o sustrato (por ejemplo, los extremos distales de una molécula de péptido cuya ruptura produce la separación de los dos grupo marcados).

El término “bioensayo” incluye ensayos de asociación, es decir, ensayos de bioafinidad, tal como inmunoensayos y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos en los que la distancia entre los grupos marcado disminuye. Adicionalmente, dicho término cubre los ensayos de disociación, tales como los ensayos de ruptura en los que la distancia entre los grupos marcados aumenta.

El término “inmunoensayo” incluye ensayos de unión de ligandos competitivos y no competitivos basados en anticuerpos policlonales o monoclonales, receptores, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo, así como ligantes artificiales como aptámeros y proteínas diseñadas.

El término “bioensayos homogéneos” cubre bioensayos que no requieren etapas de separación. Las únicas etapas requeridas son etapas sencillas o múltiples de adición de reactivos, de incubación y de medida.

El término “luminiscencia” cubre fotoluminiscencia, es decir fluorescencia, incluyendo la fluorescencia retardada con tiempos de vidas de fluorescencia de micro o milisegundos, y fosforescencia. Los compuestos luminiscentes de vida larga tienen una vida de luminiscencia superior a 1 microsegundo (tiempo en el que la intensidad de emisión de luminiscencia decae hasta un valor relativo $1/e$, es decir cuando queda aproximadamente el 37% de la intensidad de emisión de luminiscencia) y los compuestos con vidas de luminiscencia por debajo de ese valor se denominan compuestos luminiscentes de vida corta.

Los términos “marca luminiscente de lantánido” y “marca de lantánido” incluyen un quelato o estructura de quelato de lantánido, que contiene uno o más iones de lantánido, un lantánido inorgánico que contiene una partícula fosforescente, o una nanopartícula polimérica que contiene los quelatos o las partículas fosforescentes de lantánido descritos. El lantánido puede representar un elemento lantánido sencillo o una combinación de varios elementos lantánidos diferentes.

El término “lantánido” equivale en la presente memoria a “ión metálico de tierra rara” e incluye elementos lantánidos sencillos y combinaciones de varios elementos lantánidos diferentes seleccionados entre los siguientes: neodimio, praseodimio, samario, europio, prometio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio e itrio, especialmente erbio, praseodimio, tulio e iterbio.

El término “aumento” significa un proceso fotoluminiscente que convierte una luz incidente de baja energía en una luz emitida de mayor energía. También se denomina fotoluminiscencia anti-stokes. Un material de fotoluminiscencia anti-stokes convierte luz de baja energía en luz de alta energía. En el “aumento” se absorben secuencialmente dos o más fotones de baja energía de la misma o de diferente energía, en dos o más etapas, para generar un único fotón de mayor energía, al contrario que la absorción simultánea en la excitación de dos fotones o multifotón.

El término “marca aumentadora de lantánido” debe entenderse como un compuesto de lantánido fotoluminiscente con capacidad de aumento, es decir una marca luminiscente de lantánido que es capaz de aumentar una excitación de baja energía a una emisión de mayor energía en base a una excitación en dos o más etapas: eso significa que se absorben secuencialmente dos o más fotones para excitar la marca, al contrario que la absorción simultánea en la excitación de dos o tres fotones. Las marcas aumentadoras de lantánido incluyen fosforescentes aumentadores de lantánido y quelatos aumentadores de lantánido.

El término “quelato aumentador de lantánido” significa en la presente memoria una marca aumentadora de lantánido, en la que en un ión sencillo de tierra rara o una combinación de diferentes iones de tierras raras es quelado a un ligando o a múltiples ligandos acomplejantes mono o multinucleares. El ligando puede o no contener una estructura recolectora de luz. La eficacia de recolección de luz de los iones individuales y de los ligandos quelados sin estructura recolectora de luz es baja. Por tanto, se pueden diseñar quelatos aumentadores de tierras raras que tengan incorporados ligandos con estructuras orgánicas o inorgánicas recolectoras de luz, por ejemplo, otro ión. Las energías recolectadas de dos o más fotones son transferidas una detrás de la otra mediante procesos intramoleculares no radiantes desde el estado de singlete hasta el de triplete de la estructura orgánica, a continuación desde el estado de triplete secuencialmente hasta el nivel de emisión del ión de tierra rara, que emite entonces un único fotón de emisión característica.

El término “fosforescente aumentador de lantánido” debe entenderse como una marca particulada luminiscente de lantánido capaz de producir un aumento, en donde la partícula absorbe radiación de longitud de onda larga y emite luz a longitudes de onda más cortas como resultado de la unión de energías de la absorción secuencial de radiación de longitud de onda larga. En determinados tipos de fosforescentes, se necesita una dosis mínima de energía a menor longitud de onda para excitar y pre-cargar el fosforescente antes de que sea posible el aumento de la radiación de longitud de onda larga. El fosforescente aumentador puede ser capaz de deslocalizar su excitación desde una parte o desde el total del volumen de la partícula, mediante transferencia interna de energía entre estados excitados similares dentro de la partícula, y hasta una única o unas pocas moléculas aceptoras. Esto significa que un único aceptor puede ser excitado mediante lantánidos que de otro modo estarían demasiado lejos para que la transferencia de energía fuera eficaz.

El término “dador” y “marca dadora” debe entenderse como un compuesto luminiscente aumentador (unido al primer o al segundo grupo de bioensayo) capaz de transferir energía al aceptor cuando se encuentra en una proximidad suficiente.

Los términos “aceptor” y “marca aceptora” significan un compuesto luminiscente o no luminiscente (unido al primer o al segundo grupo de bioensayo) que tiene un espectro de absorción al menos parcialmente solapado con el espectro de emisión del dador y capaz de transferir energía desde el dador.

El término “fluido biológico” significa cualquier fluido biológico que absorbe radiación en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 600 nm, pero particularmente en sangre entera, suero, plasma, saliva, orina, heces suspendidas, plasma seminal, sudor, licor, fluido amniótico, homogenato de tejido o ascites. El fluido biológico se refiere especialmente a sangre entera, suero o plasma, particularmente a sangre entera.

El fluido biológico puede ser el fluido como tal o diluido. Por tanto, por ejemplo, el término “sangre entera” incluye también “sangre entera diluida”.

Los fluidos biológicos tales como el suero, el plasma e incluso la sangre entera son relativamente transparentes a la luz en el intervalo de longitudes de onda de 600 a 1000...1100 nm (el suero humano incluso a menores longitudes de onda, véase la Figura 1), especialmente en la ventana del infrarrojo cercano entre 650 y 900 nm. Las proteínas y los ácidos nucleicos absorben fuertemente en la región del ultravioleta y la absorción de muchas proteínas, especialmente de la hemoglobina, continúan hasta longitudes de onda de aproximadamente 650 nm (véase la Figura 2, que muestra el espectro de absorción de la sangre entera humana, y la Figura 3 que muestra la absorción de oxi- y desoxi-hemoglobina y de agua en función de la longitud de onda, en donde se indica el intervalo de longitudes de onda más transparente para la sangre entera, la ventana del infrarrojo cercano (IR)). El agua absorbe fotones débilmente a longitudes de onda superiores a los 900 nm y la absorción de agua se vuelve dominante a longitudes de onda superiores a los 1150 nm. En la práctica, cuando se emplea una muestra de sangre entera, sólo son practicables las longitudes de onda en la ventana entre 600 y 1100 nm, o más preferiblemente en la ventana del infrarrojo cercano de 650 a 900 nm.

Marcas dadoras preferidas

Por tanto, el lantánido luminiscente aumentador o anti-stokes para uso como marca dadora deberá ser excitable a una longitud de onda por debajo de la longitud de onda a la que la absorción de agua se vuelve predominante, es decir por debajo de 1150 nm, preferiblemente por debajo de 1100 nm, y más preferiblemente por debajo de 900 nm.

En el caso de que la marca aceptora no sea una marca luminiscente que detenga la emisión de la marca dadora cuando las marcas están próximas, también es necesario que la emisión de la marca luminiscente aumentadora de lantánido tenga lugar a una longitud de onda por encima del límite en el que la absorción por parte de proteínas y de ácidos nucleicos se vuelve predominante, es decir, preferiblemente por encima de 600 nm, especialmente por encima de 650 nm.

En el caso de que la marca aceptora sea una marca luminiscente, la emisión de la marca luminiscente aumentadora de lantánido podría tener lugar a una longitud de onda por debajo del límite en el que la absorción por parte de los componentes del fluido biológico se vuelve predominante, debido a que la marca aceptora emitirá a una longitud de onda más alta que la longitud de onda de emisión del dador.

Los fosforescentes anti-stokes de lantánido más prometedores presentan bandas de emisión estrechas en el verde (550 nm) y en el rojo (670 nm), similares a las de otros iones lantánidos luminiscentes como el europio y el terbio, y son excitados en el límite superior de la ventana del infrarrojo cercano a 950-1000 nm. Para los ensayos de transferencia de energía se prefieren las bandas de emisión estrechas, que requieren una baja emisión directa del dador en la longitud de onda específica del aceptor. Las propiedades ópticas de los fosforescentes no se ven afectadas por su entorno, por ejemplo por el pH o por la temperatura del ensayo, ya que el proceso de aumento se produce con el cristal hospedante.

En la Figura 4a se muestra un fosforescente anti-stokes particularmente preferido, en la que se presenta los espectros de excitación (A; línea punteada) y de emisión (B; línea continua) del fosforescente de Yb(III) dopado con Er(III). El fosforescente se encuentra en forma de partículas finas. La excitación es más eficaz a 930-1010 nm. Se observan bandas de emisión estrechas a 510-560 nm y a 640-680 nm. La Figura 4b demuestra que la banda estrecha de (A) excitación y de (B) emisión a 640-680 nm de esta marca dadora tienen lugar en el intervalo de longitudes de onda transparentes de la sangre entera humana; (E) el espectro de absorción de una muestra de sangre entera anti-coagulada diluida en disolución salina. La marca dadora descrita es adecuada para usarse en combinación con la marca aceptora Alexa 660 con (C) la banda de excitación a 663 nm y con (D) la amplia banda de emisión que se extiende hasta longitudes de onda por encima de 690 nm.

Como ejemplos de otras marcas dadoras aumentadoras de lantánido adecuadas para su uso en esta invención se pueden mencionar las combinaciones de iterbio con otros lantánidos tales como praseodimio, tulio, holmio o terbio. Los suministradores de fosforescentes adecuados son, por ejemplo, LUMINOPHOR Joint Stock Company (www.luminophor.ru), LUMITEK Internacional (www.lumitek.com) y Phosphor Technology Ltd. (www.phosphor-technology.com).

De acuerdo con una realización preferida, la marca dadora es una partícula o está embebida en una partícula. El diámetro de la partícula se encuentra preferiblemente en el intervalo de 1 nm a 1 μ m.

De acuerdo con otra realización preferida, la marca dadora es un quelato aumentador de lantánido.

Marcas aceptoras preferidas

En el caso de que la marca aceptora es una marca luminiscente, es excitada mediante absorción de luz a una longitud de onda menor que la de la luz emitida, y la diferencia se conoce como desplazamiento de Stokes. Preferiblemente, la marca luminiscente aceptora es excitada mediante la absorción de luz a la longitud de onda de la emisión principal o significativa de una marca dadora, y preferiblemente emite a una longitud de onda con ninguna o una mínima intensidad de emisión de una marca dadora. Los criterios de selección se describen en las patentes WO98/15830 y US 5998146. El solapamiento del espectro de emisión del dador y del espectro de excitación del aceptor no es un requisito incondicional.

En el caso de que la marca aceptora no sea una marca luminiscente, preferiblemente absorbe luz a la longitud de onda de la emisión principal o significativa de una marca dadora.

La energía de una marca dadora puede transferirse a una o más marcas aceptoras o a una o más partículas que contengan una o más marcas aceptoras del mismo o de diferente tipo de marcas aceptoras.

La marca luminiscente aceptora puede ser una molécula luminiscente sencilla o una combinación de diferentes moléculas luminiscentes seleccionadas para permitir un mayor desplazamiento de Stokes. La marca aceptora luminiscente preferida se selecciona del grupo que consiste en fluoróforos de vida corta que decaen rápidamente (Chan WC y Nie S, Science 1998; 281: 2016-2018) tales como los puntos cuánticos disponibles en Quantum Dot Corp (www.qdots.com), y partículas poliméricas embebidas con cualquiera de los mismos, o con cualquier combinación (Patente de EE.UU. N° 5326692; Roberts DV y col., J Lumin 1998; 79: 225-231; Han M y col., Nat Biotechnol 2001; 19: 631-635) disponibles, por ejemplo, bajo los nombres comerciales FluoSpheres y TransFluoSpheres en Molecules Probes (www.probes.com). La marca luminiscente aceptora o una parte de la misma también puede ser una proteína fluorescente del infrarrojo cercano (Trinquet E y col., Anal Biochem 2001; 296: 232-244; Kronick MN, J Immunol Methods 1986; 92: 1-13; Fradkov AF y col., FEBS Lett 2000; 479: 127-130).

El tamaño preferido de la partícula de aceptor oscila entre 1 nm y 1 μ m de diámetro.

Los fluoróforos aceptores especialmente adecuados son, por ejemplo, las series Alexa y BODIPY disponibles en Molecular Probes (www.probes.com), los colorantes Cy de Amersham Biosciences (www.amershambiosciences.com), los colorantes EVOblue y DY de Dyomics (www.dyomics.com), los colorantes Atto de Atto-tec (www.atto-tec.de) y los colorantes Oyster de Denovo Biolabels (www.biolabel.de). Se prefieren los colorantes de transferencia de energía fluorescentes diméricos, los colorantes tándem y las casetas de transferencia de energía, que comprenden dos moléculas fluorescentes, porque su propiedad de presentar un desplazamiento Stokes grande y ajustable (documentos US 5565554; WO 9939203; EP 0747700 A2; Burghart, A y col., Chem Común 2000; 22: 2203-2204) permite la utilización de longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas.

Como ejemplos específicos se pueden mencionar Alexa 546, Alexa 555, Alexa 660 y Alexa 680, que son adecuados para ser usados como marcas aceptoras junto con las marcas aumentadoras de erbio descritas como marcas dadoras.

La marca aceptora preferible debería seleccionarse entre las que tienen un espectro de excitación que solape, al menos parcialmente, con picos del espectro de emisión de la marca dadora, y que tenga un máximo de emisión entre las longitudes de onda de emisión y de excitación del dador. La Figura 5 muestra los espectros de excitación (A; líneas punteadas) y de emisión (B; línea continua) de dos colorantes fluorescentes preferidos, Alexa 555 (1) y Alexa 660 (2). El Alexa 555 (peso molecular aproximado de 1250) tiene amplias bandas de excitación y de emisión con máximos a 555 y 565 nm, respectivamente, y una emisión significativa por encima de 600 nm, y el Alexa 660 (peso molecular aproximado de 1100) a 663 nm y 690 nm, respectivamente, con una emisión significativa por encima de 700 nm.

La marca aumentadora y la marca luminiscente aceptora se pueden seleccionar de tal modo que tanto la excitación como la emisión de la marca aumentadora y la emisión sensibilizada opcional de la marca aceptora se den a longitudes de onda con una mínima absorbancia de las muestras biológicas, y con mínimas interferencias debidas a la variación de sus propiedades ópticas. Las marcas aumentadoras en combinación con una marca aceptora permiten la realización de ensayos homogéneos independientemente de la matriz de la muestra, lo que permite niveles de señal casi idénticos sin requerir ninguna corrección de la absorción cuando se emplean patrones basados en tampones y fluidos biológicos.

La marca aceptora no luminiscente, es decir la marca interceptora, puede ser una molécula sencilla (patente de EE.UU. N° 6329205B1), un cúmulo de oro (Dubertret B, Calame M y Libchaber AJ, Nat Biotechnol. 2001; 19: 365-70) o nanopartículas coloreadas con moléculas que absorben luz.

Los fluoróforos aceptores especialmente adecuados son, por ejemplo, las series DABCYL y QSY de Molecular Probes (www.probes.com), los colorantes Dark Cy de Amersham Biosciences (www.amershambiosciences.com), los colorantes Eclipse™ Dark Quencher de Epoch Biosciences (www.epochbio.com), los colorantes Black Hole Quencher de Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com), los colorantes DYQ de Dyomics (www.dyomics.com) y ElleQuencher de Oswel (www.oswel.com). Como ejemplos específicos, se pueden mencionar el QSY-21 y el Black Hole Quencher 3, que son adecuados para ser usados como marcas aceptoras no luminiscentes junto con las marcas aumentadoras de erbio descritas como marcas dadoras. Ambos colorantes presentan una fuerte absorción a 600-700 nm y no tienen emisión de luminiscencia.

Otras realizaciones preferidas

El bioensayo de acuerdo con esta invención puede ser un ensayo no competitivo o un ensayo competitivo. La Figura 6 muestra los principios básicos de ensayos de unión (A) no competitivos y (B) competitivos basados en el ensayo de proximidad de luminiscencia de aumento: (1) una marca fosforescente aumentadora, por ejemplo, partículas de menos de 1 micra o quelato aumentador de lantánido, (dador) recubierto con un fragmento de anticuerpo específico de analito; (2) un analito; (3) un fragmento de anticuerpo marcado con fluorescente de infrarrojo cercano (aceptor) contra el analito; (4) un derivado fluorescente de infrarrojo cercano (aceptor) de analito o de análogo de analito; (5) excitación de la marca aumentadora de lantánido (dador) a la longitud de onda específica; (6) transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre el dador y el acepto en proximidad; (7) acepto sensibilizado con fluorescencia de vida prolongada si el dador es un compuesto luminiscente de vida larga; y (8) emisión sensibilizada del acepto luminiscente a la longitud específica del acepto.

Aunque no se necesita resolución temporal en el método de acuerdo con esta invención, es aplicable si se desea. En particular, la sensibilidad de los ensayos rápidos que utilizan alta concentración de los componentes marcados se ve restringida por la luminiscencia de fondo en la longitud de onda específica del acepto resultante de la transferencia de energía radiante entre las marcas dadoras y aceptoras de la disolución, tal como se ilustra en la Figura 7. Las emisiones de luz que dan como resultado transferencia de energía radiante y no radiante, respectivamente, difieren en sus tiempos de vida, τ_3 y τ_2 , respectivamente, y la transferencia de energía radiante se puede excluir con resolución temporal y con separación de componentes de diferentes tiempos de vida en emisión de luminiscencia. La vida de luminiscencia de la emisión de luz resultante de una transferencia de energía no radiante (τ_2) es más corta (Heyduk T y Heyduk E, Anal Biochem 2001; 289: 60-67; Selvin PR y col., J Am Chem Soc 1994; 116: 6029-6030) que la vida de la emisión de luz procedente de la transferencia de energía radiante (τ_3) y de la emisión directa del dador (τ_1). Los tiempos de vida se pueden separar usando pulsos de excitación y detección controlada en el tiempo, o de forma alternativa, usando excitación modulada en intensidad y análisis de la emisión de luminiscencia desplazada de fase. La separación de tiempos de vida permite también la discriminación contra cualquier ruido de fondo de vida corta, que podría ser excitado mediante una excitación de dos fotones o multi-fotón con una elevada intensidad de las fuentes de luz.

Aunque no es necesario realizar correcciones de la absorbancia en esta invención, dicha corrección también podría aplicarse si se desea.

REIVINDICACIONES

1. Una transferencia de energía de luminiscencia basada en un método de bioensayo homogéneo que comprende un primer grupo marcado con un dador de energía y un segundo grupo marcado con un aceptor de energía, en donde
 - el dador es una marca luminiscente de lantánido, siendo dicha marca capaz de aumentar una excitación de baja energía en una emisión de mayor energía,
 - el aceptor es una marca luminiscente o no luminiscente, y
 - se mide el aumento o la disminución, respectivamente, en la transferencia de energía desde el dador hacia el aceptor resultantes de un acortamiento o de un alargamiento, respectivamente, de la distancia entre dichas marcas,que se **caracteriza** porque
 - el ensayo se realiza en un fluido biológico que absorbe radiación en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 600 nm,
 - la medida se lleva a cabo a una longitud de onda > 600 nm, y
 - la marca dadora, que es excitable a una longitud de onda mayor que su longitud de onda de emisión, es excitada en la ventana de longitudes de onda en la que el fluido biológico no absorbe esencialmente la radiación de excitación.
2. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque la marca aceptora es una marca no luminiscente, y la emisión de la marca dadora se produce en la ventana de longitudes de onda en la que el fluido biológico no absorbe esencialmente la radiación de emisión.
3. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque la marca aceptora es una marca luminiscente, y la emisión de la marca aceptora se produce en la ventana de longitudes de onda en la que el fluido biológico no absorbe esencialmente la radiación de emisión del aceptor.
4. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, que se **caracteriza** porque el fluido biológico es sangre entera, suero, plasma, saliva, orina, heces suspendidas, plasma seminal, sudor, licor, fluido amniótico, homogenato de tejido o ascites; particularmente sangre entera, suero o plasma.
5. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 4, que se **caracteriza** porque el fluido biológico es sangre entera y la excitación del dador se produce en la ventana de longitudes de onda de 600 a 1100 nm, preferiblemente de 650 a 900 nm.
6. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 5, que se **caracteriza** porque la marca aceptora es una marca luminiscente que emite en el intervalo de longitudes de onda de 600 a 1100 nm, preferiblemente de 650 a 900 nm.
7. El método de bioensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se **caracteriza** porque la marca dadora es un quelato luminiscente de lantánido.
8. El método de bioensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se **caracteriza** porque la marca dadora es una partícula de fosforescente luminiscente de lantánido o se encuentra embebida en una partícula.
9. El método de bioensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se **caracteriza** porque el bioensayo es un inmunoensayo para la detección o cuantificación de un analito, en donde la marca dadora se aplica sobre una partícula que porta un primer anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, específico del analito, y la marca aceptora se aplica i) sobre un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, específico del analito, en donde el inmunoensayo se lleva a cabo como un ensayo no competitivo, o ii) sobre un análogo de analito, en donde el inmunoensayo se lleva a cabo como un ensayo competitivo.
10. El método de bioensayo de acuerdo con la reivindicación 9, que se **caracteriza** porque la partícula tiene un diámetro en el intervalo de 1 nm a 1 μ m.
11. El método de bioensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-10, que se **caracteriza** porque el dador tiene una larga vida de estado excitado, el aceptor tiene una corta vida de estado excitado, y la emisión del aceptor se mide después de un retardo.
12. El método de bioensayo de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, que se **caracteriza** porque no se emplea ninguna corrección de la absorbancia.

FIGURA 1

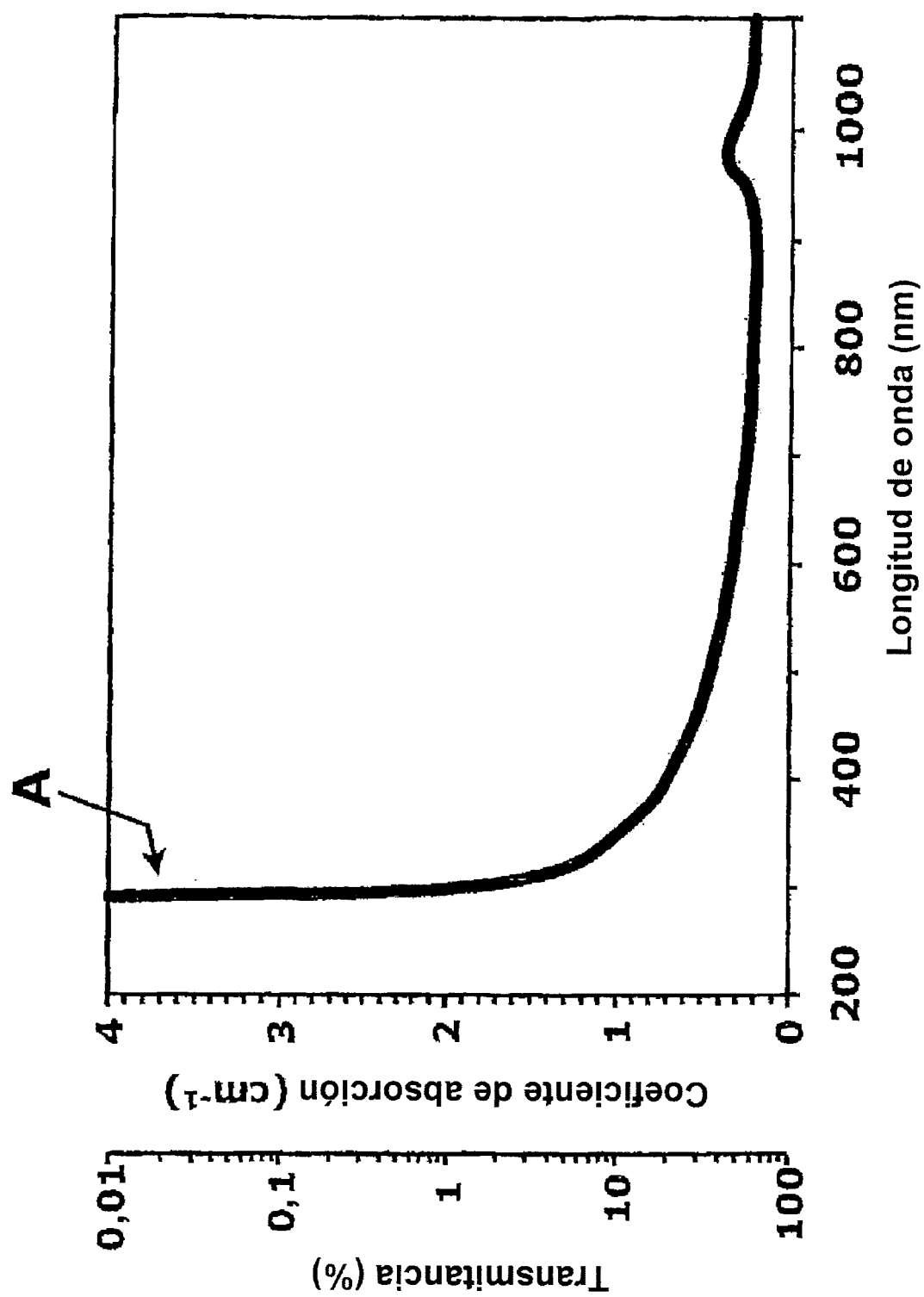


FIGURA 2

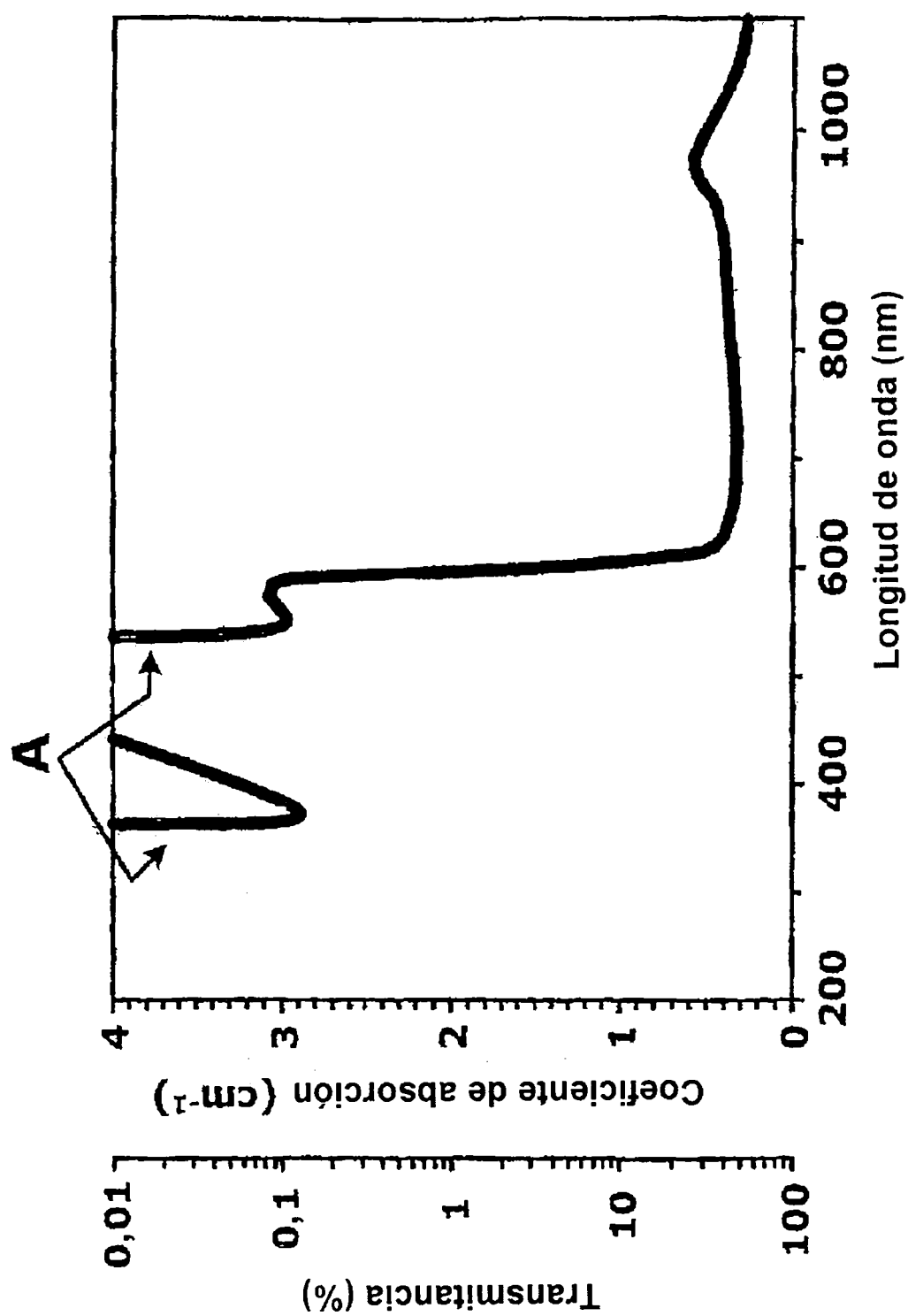
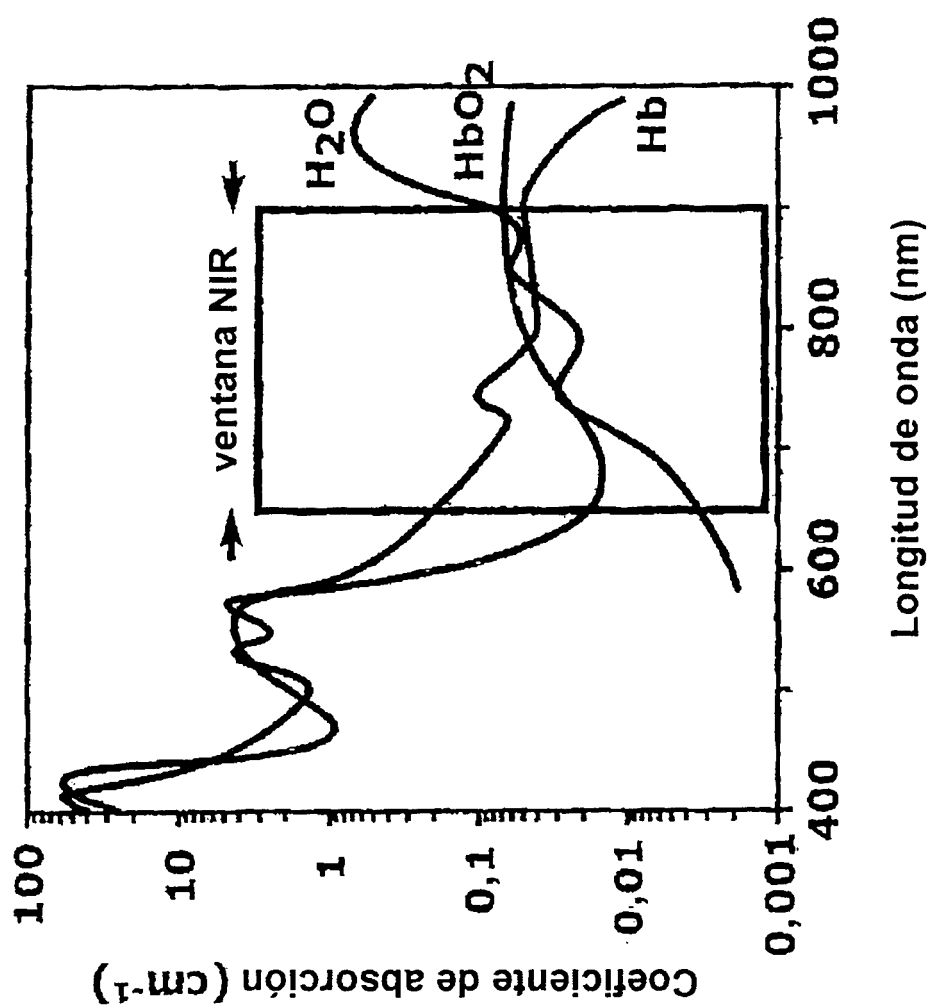


FIGURA 3



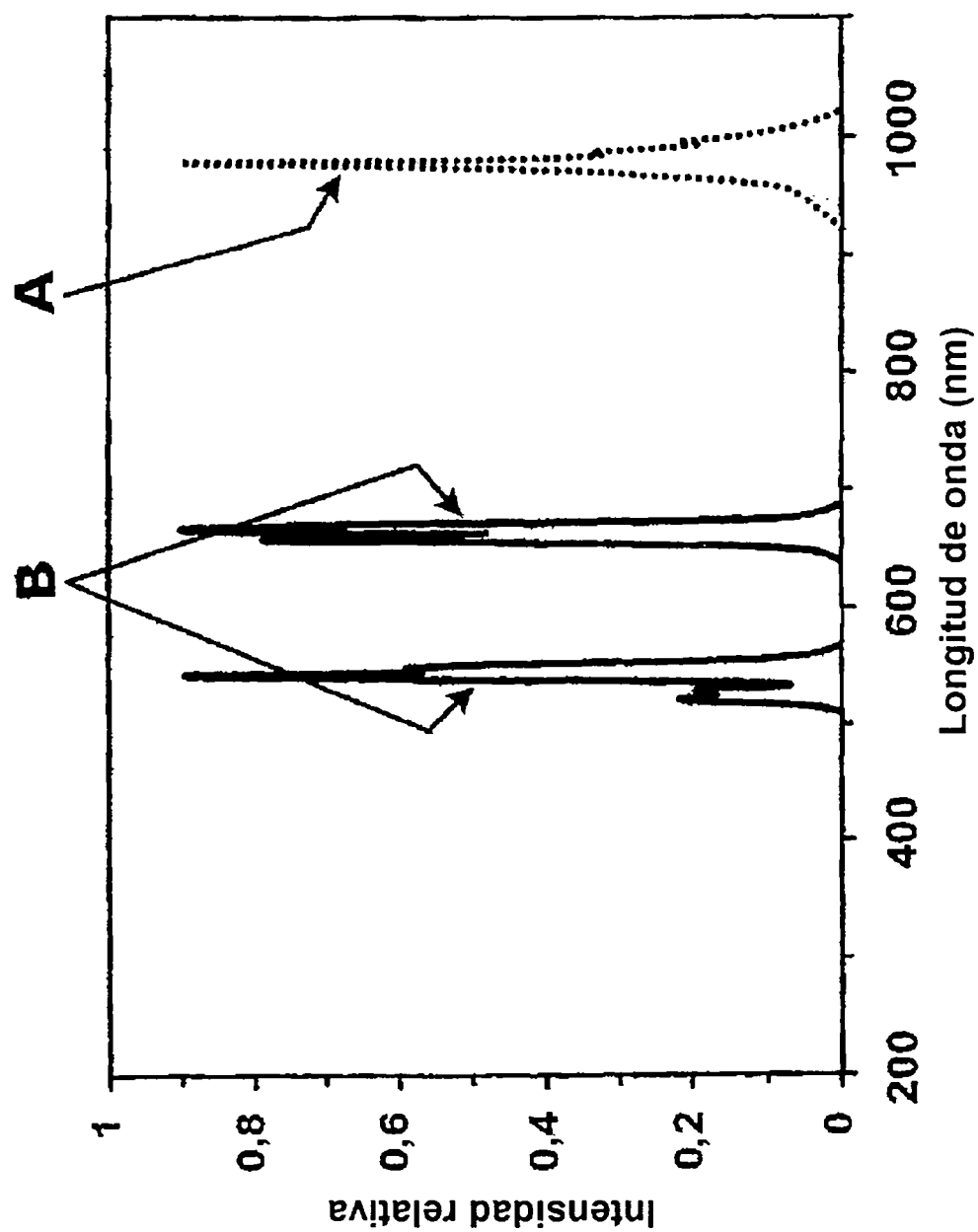


FIGURA 4b

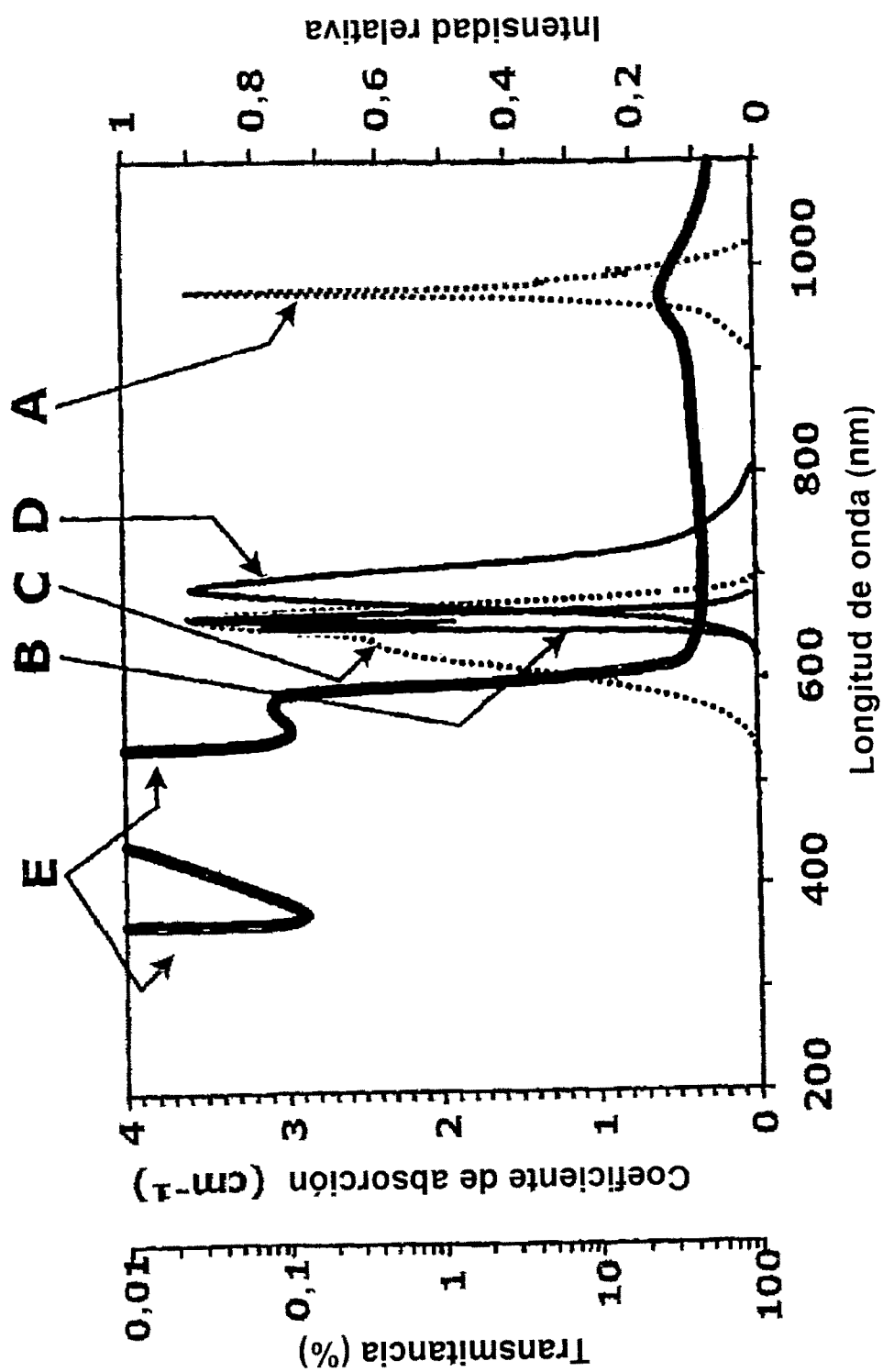


FIGURA 5

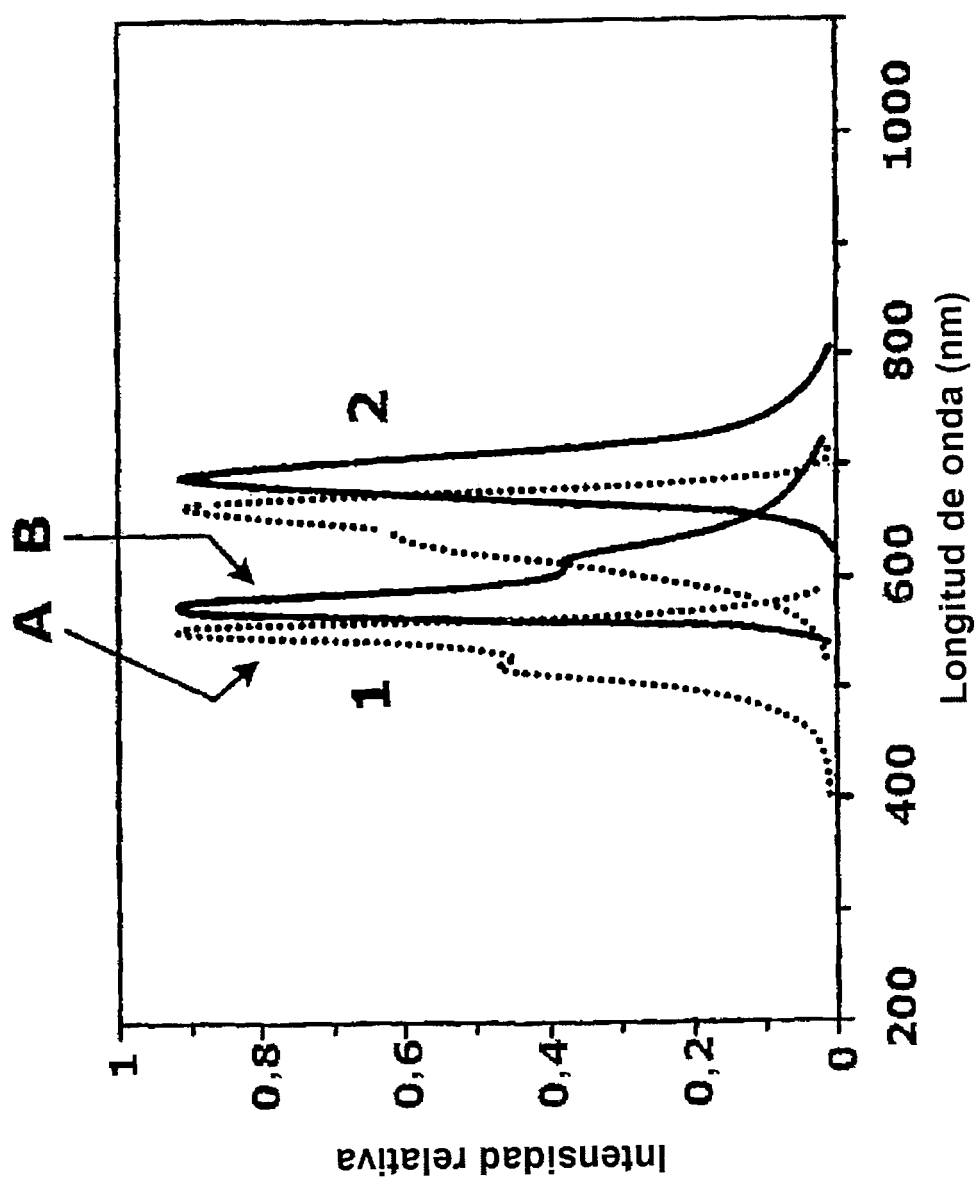


FIGURA 6

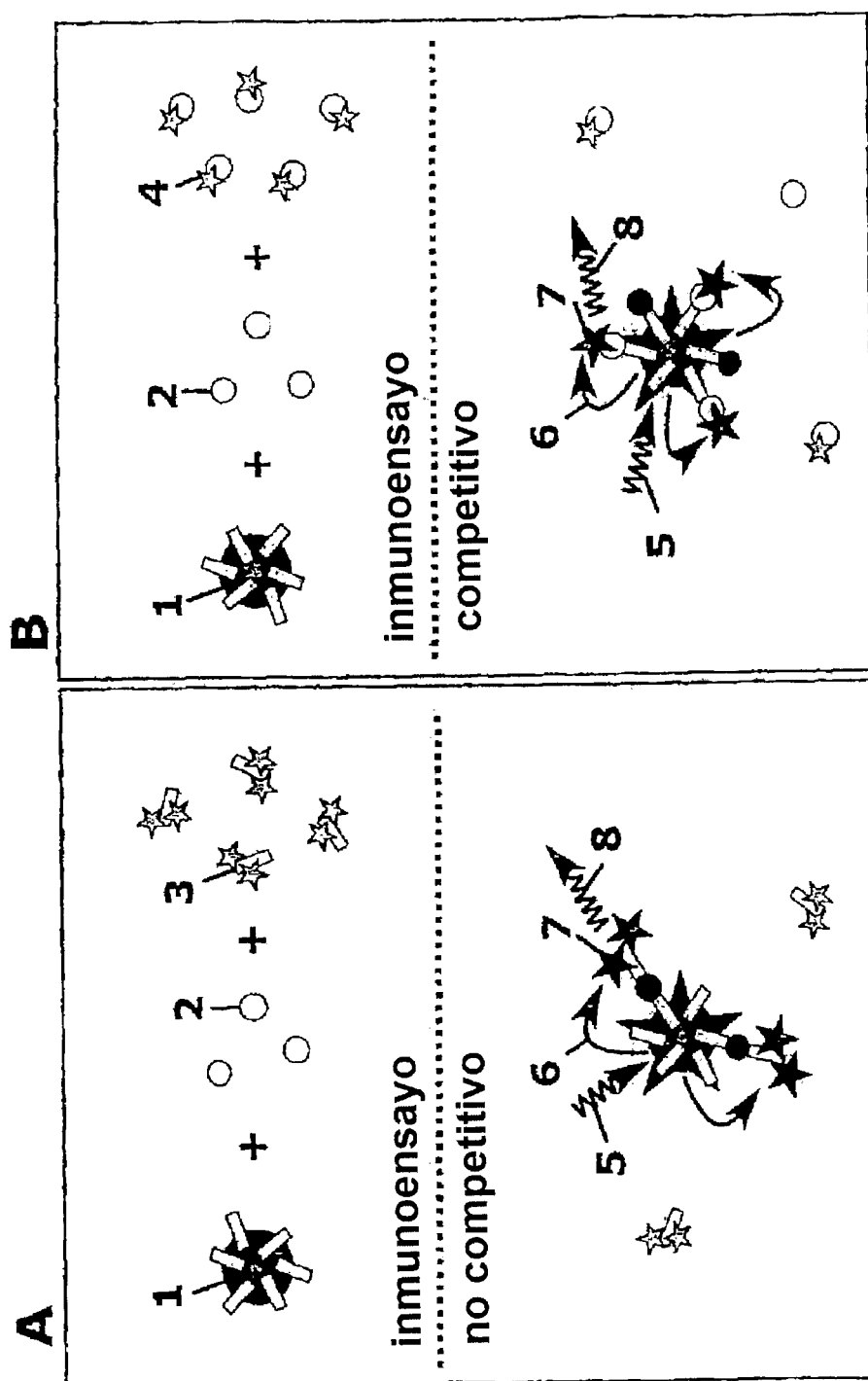


FIGURA 7

