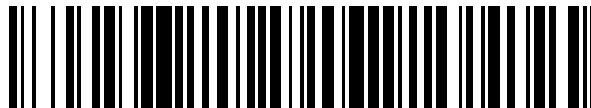


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 128**

51 Int. Cl.:

C09K 11/02 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2011 PCT/US2011/023383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO2011097248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2011 E 11703788 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2531569**

54 Título: **Composición y procedimiento para la estabilización de partículas fluorescentes**

30 Prioridad:

02.02.2010 US 337363 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.07.2017

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**MAY, ERIC;
NAGY, ALEXANDRA y
KOSMEDER, JEROME**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 621 128 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento para la estabilización de partículas fluorescentes

CAMPO DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere a la composición y al uso de un nuevo tampón de estabilización para el almacenamiento de partículas fluorescentes.

ANTECEDENTES

5 Las muestras biológicas, tales como secciones de tejido de sujetos humanos, se pueden tratar con un colorante que contiene un fluoróforo orgánico conjugado a un anticuerpo que se une a proteínas, fragmentos de proteínas u otras dianas de la muestra. La muestra teñida se ilumina entonces con luz y el fluoróforo emite fluorescencia. Se utiliza una cámara digital conectada a un microscopio para capturar una imagen de la muestra. Las áreas en las que la combinación
10 fluoróforo-anticuerpo está unida a la diana de interés (por ejemplo, una proteína producida por células cancerosas) aparecen como regiones coloreadas en la imagen de la muestra, en las que el color de la zona viene determinado por el espectro de fluorescencia del fluoróforo aplicado a la muestra. Además del espectro visible, la señal de fluorescencia se puede detectar en las regiones de infrarrojo o ultravioleta, dependiendo del espectro de emisión del fluoróforo concreto. También se puede aplicar a la muestra un colorante que contiene dos o más fluoróforos. Estos procedimientos tienen una variedad de usos, incluyendo el diagnóstico de enfermedades, la evaluación de la respuesta al tratamiento y el
15 desarrollo de nuevos medicamentos para combatir enfermedades.

Más recientemente, se han desarrollado puntos cuánticos (quantum dots) como un material de detección para aplicaciones biológicas de tinción y obtención de imágenes. Los puntos cuánticos (nanocristales Qdot™ o Qdots™) son nanomateriales semiconductores luminiscentes cristalinos. Los puntos cuánticos proporcionan varias ventajas sobre los fluoróforos orgánicos tradicionales para el uso en aplicaciones biológicas de tinción. Estas ventajas incluyen picos de
20 bandas de emisión estrechos, amplios espectros de absorción, señales intensas y estabilidad relativa de la señal de fluorescencia. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de los puntos cuánticos y de los conjugados de puntos cuánticos en disolución es históricamente inestable si se almacenan en condiciones incompatibles. EP 2 085 782 A1 divulga una composición que comprende un tampón que comprende un resto de piperazina (HEPES pH8), BSA, azida de sodio y un tensioactivo no iónico de polioxietileno tal como polioxietileno alquilfenil éter.

SUMARIO

Se divulgan composiciones para la estabilización de la señal de fluorescencia y el uso de nanopartículas, tales como puntos cuánticos (nanocristales Qdot™) y conjugados Qdot™. El almacenamiento de nanopartículas en las composiciones divulgadas, por ejemplo, minimiza la agregación de partículas y proporciona condiciones compatibles con la fluorescencia. Como resultado, se pueden utilizar pequeñas cantidades en procedimientos automatizados y manuales, al tiempo que se mantiene la sensibilidad y especificidad de la nanopartícula y/o del conjugado de nanopartícula en un formato de ensayo.
30

Se divulgan modos de realización de una nueva composición para la estabilización de los puntos cuánticos y los conjugados de puntos cuánticos, así como los procedimientos para su uso. Ciertos modos de realización de la composición incluyen a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína, en el que al menos una de la amina o la proteína y/o el hidrolizado de proteína está presente en una concentración eficaz para estabilizar y/o aumentar la fluorescencia de una partícula fluorescente almacenada en la composición. En algunos modos de realización, la composición tiene un pH en el intervalo de 7 a 10 e incluye borato 0,02 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso, alquilamina 25 mM a 200 mM, conservante del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso y tensioactivo del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso.
40

En ciertos modos de realización, la amina es una amina sustituida que tiene la fórmula $R_nNH_{(3-n)}$, donde $n = 1, 2$ o 3 , y en donde cada R es independientemente un grupo alifático, un grupo heteroalifático, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo alquilarilo o un grupo arilalquilo, y al menos un R está sustituido. En algunos modos de realización, al menos un R está sustituido con uno o más grupos $-OH$, $-OR_1$, $-CO_2R_1$, $-CN$ o combinaciones de los mismos, en donde R_1 es un grupo alifático o arilo sustituido o no sustituido.
45

En algunos modos de realización, la amina es una amina primaria, secundaria o terciaria. En algunos modos de realización, la alquilamina es una alcanolamina. En ciertos modos de realización, la amina es una amina *N*-etanol sustituida, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metildietanolamina, *N,N*-dimetiletanolamina, o una combinación de las mismas.

En algunos modos de realización, la proteína y/o el hidrolizado de proteína es triptona vegetal, peptona de salmón, hidrolizados ácidos de caseína, hidrolizados básicos de caseína, hidrolizado de albúmina de pollo, gelatina de piel de pescado, o una combinación de los mismos. En ciertos modos de realización, el conservante es a) azida de sodio, b) una composición conservante que comprende 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 9,5 a 9,9 %, c) una composición conservante que comprende 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 2,3 %, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 0,7 %, carboxilato de alquilo al 2-3 % como un estabilizador, y glicol modificado al 93-95 %, o d) una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, tal como Tween® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano), Triton® X-100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter)) o Brij 35 (polioxietilenglicol dodecil éter)

En un modo de realización particular, la composición tiene un pH de 8 a 8,5 y comprende borato 50 mM, hidrolizados de caseína al 1,05 % (p/p), trietanolamina 50 mM, azida de sodio al 0,08 % en peso y monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,005 % en peso.

También se divulgan modos de realización de un procedimiento para el uso de la nueva composición. En algunos modos de realización, una solución de partículas fluorescentes, tales como una solución de punto cuántico o solución de conjugado de punto cuántico, se diluye en la composición para producir una solución diluida de partículas fluorescentes, y la solución diluida de partículas fluorescentes / de la composición se almacena a una temperatura inferior a la temperatura ambiente para aumentar la vida útil de la partícula fluorescente. En algunos modos de realización, la fluorescencia de la partícula fluorescente en suspensión se estabiliza durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, o al menos seis meses. En ciertos modos de realización, la intensidad de fluorescencia de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico suspendido en un modo de realización de las composiciones divulgadas sigue siendo sustancialmente la misma cuando la partícula fluorescente en suspensión se almacena durante al menos un mes a 4 °C. En modos de realización particulares, la intensidad de fluorescencia de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico en suspensión en un modo de realización de las composiciones de almacenamiento divulgadas sigue siendo sustancialmente la misma durante al menos tres meses a 4 °C. Con fines de comparación, el mismo punto cuántico o conjugado de punto cuántico almacenado sin la composición divulgada, por ejemplo, en una composición de la técnica anterior o alternativa, muestra una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia después de un mes a 4 °C.

En ciertos modos de realización, una partícula fluorescente almacenada en la composición tiene una mayor fluorescencia en un punto de tiempo dado con respecto a la fluorescencia de la partícula almacenada en un modo de realización de la composición que carece de uno o más de la alquilamina, la proteína, el tensioactivo y/o el conservante. En algunos modos de realización, aumenta la fluorescencia inicial. En otros modos de realización, el aumento de la fluorescencia se produce en un momento posterior a la formulación inicial. En algunos modos de realización, el aumento de la fluorescencia se mantiene durante al menos 5 horas, al menos 25 horas, al menos 100 horas, al menos 250 horas, al menos 750 horas, al menos 1500 horas, al menos 3000 horas o al menos 4300 horas (*es decir*, seis meses). En modos de realización particulares, la fluorescencia de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico aumenta de un 5 % a un 20 %, de un 5 % a un 15 %, en al menos un 5 %, en al menos un 10 %, en al menos un 15 % o en al menos un 20 % cuando se suspende en un modo de realización de las composiciones de almacenamiento divulgadas en comparación con el punto cuántico o conjugado de punto cuántico suspendido en una composición de la técnica anterior o alternativa. En ciertos modos de realización, la intensidad de fluorescencia, en un momento posterior a la mezcla de la partícula fluorescente con la composición, aumenta en al menos un 5 % con respecto a la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.

En algunos modos de realización, una sonda se hibrida a una diana para proporcionar una sonda hibridada, *por ejemplo*, en un ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Un conjugado punto cuántico-anticuerpo en suspensión en la composición de almacenamiento divulgada se utiliza para detectar la sonda hibridada. En algunos modos de realización, un conjugado punto cuántico-anticuerpo se utiliza para detectar antígenos de proteína en tejido, *por ejemplo*, en un ensayo de inmunohistoquímica de fluorescencia (IHC). En algunos modos de realización, la concentración del conjugado punto cuántico-anticuerpo es de 0,5 nM a 150 nM, de 1 nM a 125 nM, de 5 nM a 100 nM, de 25 nM a 75 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM o 100 nM en la composición divulgada. En ciertos modos de realización, la concentración del conjugado punto cuántico-anticuerpo es de 50 nM en la composición divulgada.

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en un gradiente de elución de afinidad con trietanolamina 50 mM a pH 10,5.

ES 2 621 128 T3

- FIG. 2 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en un gradiente de elución de afinidad con trietanolamina 100 mM a pH 10,5.
- FIG. 3 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en un gradiente de elución de afinidad con trietanolamina 50 mM a pH 8,5.
- 5 FIG. 4 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en tampón borato 0,42 M con aditivos de amina 50 mM.
- FIG. 5 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en diversos tampones.
- 10 FIG. 6 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en tampones PBS 10 mM que contienen diversos aditivos.
- FIG. 7 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en tampones 10X PBS que contienen diversos aditivos.
- FIG. 8 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en tampones borato 0,32 mM que contienen diversos aditivos.
- 15 FIG. 9 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N en tres sistemas tampón que contienen proteína de bloqueo y trietanolamina, con y sin un conservante y un tensioactivo.
- FIG. 10 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N y un conjugado Qdot™ 655-30N-Ms MAb en tres tampones que contienen diversos aditivos.
- 20 FIG. 11 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato a pH 8,3 con concentraciones de sales variables.
- FIG. 12 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a diversos valores de pH.
- FIG. 13 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a pH 8,3 con diversas concentraciones de proteína.
- 25 FIG. 14 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a pH 8,3 con diversas fuentes de proteína al 1,05 % en peso.
- FIG. 15 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a pH 8,3 con concentraciones variables de Tween® 20.
- 30 FIG. 16 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a pH 8,3 con diversos tensioactivos.
- FIG. 17 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 565-30N y conjugados Qdot™ 565-30N-Ms MAb en tampones con concentraciones variables de ProClin® 300.
- FIG. 18 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 655 nm frente al tiempo para nanocristales Qdot™ 655-30N y conjugados Qdot™ 655-30N-Ms MAb en tampones con concentraciones variables de ProClin® 300.
- 35 FIG. 19 es un gráfico de unidades de luz fluorescente frente al tiempo para diversos nanocristales Qdot™-30N en una composición tampón de estabilización de Qdot™ con azida de sodio al 0,08 % en peso.
- FIG. 20 es una vista ampliada de la parte inferior de la FIG. 19.
- FIG. 21 es un gráfico de unidades de luz fluorescente frente al tiempo para diversos nanocristales Qdot™-30N en una composición tampón de estabilización de Qdot™ con ProClin® 300 al 0,05 % en peso.
- 40 FIG. 22 es una vista ampliada de la parte inferior de la FIG. 21.
- FIG. 23 es un gráfico de unidades de luz fluorescente frente al tiempo para diversos conjugados Qdot™-30N-Ms MAb en la Solución A o en una composición tampón de estabilización de Qdot™, ya sea con ProClin® 300 al 0,05 % en peso o con azida de sodio al 0,08 % en peso. Cada Qdot™ se mide a una longitud de onda diferente.

FIG. 24 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 565 nm frente al tiempo para un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms MAb en diversas composiciones tampón de estabilización de Qdot™ deconstruidas.

FIG. 25 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 585 nm frente al tiempo para un conjugado Qdot™ 585-30N-Ms MAb en diversas composiciones tampón de estabilización de Qdot™ deconstruidas.

- 5 FIG. 26 es un gráfico de unidades de luz fluorescente a 800 nm frente al tiempo para un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms MAb en diversas composiciones tampón de estabilización de Qdot™ deconstruidas.

FIG. 27 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms MAb en una composición tampón de estabilización de Qdot™ en células de cáncer de próstata a 0 días.

- 10 FIG. 28 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en la Solución A en células de cáncer de próstata a 0 días.

FIG. 29 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en una composición tampón de estabilización de Qdot™ en células de cáncer de próstata después de 1 mes.

- 15 FIG. 30 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en la Solución A en células de cáncer de próstata después de 1 mes.

FIG. 31 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en una composición tampón de estabilización de Qdot™ en células de cáncer de próstata después de 3 meses.

- 20 FIG. 32 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en la Solución A en células de cáncer de próstata después de 3 meses.

FIG. 33 es una imagen espectral compuesta, con una magnificación de 40X, que ilustra la tinción FISH del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en una composición tampón de estabilización de Qdot™ en células de cáncer de próstata después de 6 meses.

- 25 FIG. 34 es una imagen FISH estándar del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en una composición tampón de estabilización de Qdot™ en células de cáncer de próstata después de 6 meses.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Términos y definiciones

- 30 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers, *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" tiene por objeto incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal y como se usa en el presente documento, el término "comprende" significa "que incluye". Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, B, o A y B.

- 40 A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente divulgación, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otras características de la divulgación son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

- 45 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, porcentajes, temperaturas, tiempos, etc., tal como se usan en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones se deben entender como modificados por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, implícita o explícitamente, los parámetros numéricos expuestos son aproximaciones que pueden depender de las

propiedades deseadas buscadas y/o de los límites de detección en condiciones/procedimientos de prueba estándar. Cuando directa y explícitamente se distingan modos de realización de la técnica anterior expuesta, los números de dichos modos de realización no son aproximaciones a menos que especifique la palabra "aproximadamente". Además, también se entiende que todos los tamaños de nucleótidos o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos.

Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Con el fin de facilitar la revisión de los diversos ejemplos de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

10 El término **alifático** significa que tiene una cadena de carbono ramificada o no ramificada. La cadena puede ser saturada (que tiene todos los enlaces sencillos) o insaturada (que tiene uno o más enlaces dobles o triples). La cadena puede ser lineal o cíclica (*es decir*, cicloalifático).

15 **Alquilo**: un grupo hidrocarburo que tiene una cadena de carbono saturada. La cadena puede ser ramificada o no ramificada, y puede ser lineal o cíclica (*es decir*, cicloalquilo). El término **alquilo inferior** significa que la cadena incluye 1 a 10 átomos de carbono.

20 **Anticuerpo**: "anticuerpo" se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmune en cualquier cordado tal como un vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de las mismas que se unen específicamente a una molécula de interés (o a un grupo de moléculas de interés muy similares) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas. Un "anticuerpo" comprende típicamente un ligando polipéptido que tiene al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno. Las inmunoglobulinas se componen de una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada la región variable pesada (V_H) y la región variable ligera (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por la inmunoglobulina. Ejemplos de fragmentos de inmunoglobulina incluyen, sin limitación, fragmentos proteolíticos de inmunoglobulina [tales como $F(ab)_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab que son conocidos en la técnica], fragmentos de inmunoglobulinas recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos $F(ab)_2$, proteínas Fv de cadena única ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas por puentes disulfuro ("dsFv"). Otros ejemplos de anticuerpos incluyen diacuerpos, triacuerpos (tal como se conocen en la técnica) y anticuerpos de camélidos. "Anticuerpo" también incluye moléculas de ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

35 Los compuestos **aromáticos** o **arilo** son típicamente hidrocarburos insaturados, cíclicos que tienen enlaces simples y dobles alternos. El benceno, un anillo de 6 carbonos que contiene tres dobles enlaces, es un compuesto aromático típico.

40 **Bioconjugado o conjugado**: un compuesto que tiene una nanopartícula, tal como un punto cuántico, y una biomolécula acoplada eficazmente a la nanopartícula, ya sea directa o indirectamente, por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la biomolécula puede acoplarse en forma covalente o no covalente (por ejemplo, electrostáticamente) a la nanopartícula. La unión indirecta de la biomolécula a la nanopartícula es también posible, tal como mediante el uso de una molécula como "enlazador", siempre que el enlazador no afecte negativamente a la luminiscencia del punto cuántico o la función de la biomolécula. El enlazador es, preferentemente, biocompatible. Enlazadores moleculares comunes conocidos en la técnica incluyen una amina primaria, un tiol, estreptavidina, neutravidina, biotina, o compuestos similares.

45 **Biomolécula**: cualquier molécula que se pueda incluir en un sistema biológico, incluyendo, pero no limitado a, una proteína sintética o natural o un fragmento de la misma, glicoproteína, lipoproteína, aminoácido, nucleósido, nucleótido, ácido nucleico, oligonucleótido, ADN, ARN, carbohidrato, azúcar, lípido, ácido graso, hapteno, anticuerpo y similares.

50 **Proteína de bloqueo**: una composición de proteína o hidrolizado de proteína que se usa para reducir la unión no específica al esqueleto (*es decir*, la unión no específica de la sonda o la unión a proteínas) en reacción de hibridación y detección. Ejemplos de proteínas de bloqueo incluyen, pero no se limitan a, caseína, hidrolizados de caseína, triptona vegetal, hidrolizado de proteína vegetal, hidrolizado de proteína de soja, peptona, peptona de caseína, peptona de salmón, gelatina, hidrolizado de gelatina, proteína globulina de cabra, albúmina de pollo y albúmina sérica de bovino.

Conjugación, unión o enlace: acoplamiento de una primera unidad a una segunda unidad. Esto incluye, pero no se limita a, unión covalente de una molécula a otra molécula, unión no covalente de una molécula a otra (*por ejemplo*, unión electrostática) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. nº 6.921.496, que divulga procedimientos para la conjugación electrostática), unión no covalente de una molécula a otra molécula mediante enlace de hidrógeno, unión no covalente de una molécula a otra molécula mediante fuerzas de van der Waals, y cualquiera y todas las combinaciones de tales acoplamientos.

Marcador detectable: un compuesto o composición detectable que se une directa o indirectamente a otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de dicha molécula. Las nanopartículas son un ejemplo no limitativo de una clase de marcadores detectables.

Detergente o tensioactivo: un detergente o tensioactivo es un agente activo de superficie que se concentra en la interfaz entre un líquido no polar y un líquido polar (*por ejemplo*, aceite-agua) y ejerce una acción emulsionante. Los detergentes se clasifican como aniónicos, catiónicos o no iónicos, dependiendo de su modo de acción química. Los detergentes no iónicos funcionan mediante un mecanismo de puentes de hidrógeno. Además, los tensioactivos o detergentes reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Una molécula de tensioactivo tiene típicamente una "cabeza" polar o iónica y una "cola" de hidrocarburo no polar. Tras la disolución en agua, las moléculas de tensioactivo se agregan y forman micelas, en las que las colas no polares se orientan hacia el interior y las cabezas polares o iónicas se orientan hacia el exterior, hacia el entorno acuoso. Las colas no polares crean un "bolsillo" no polar dentro de la micela. Los compuestos no polares de la solución son secuestrados en los bolsillos formados por las moléculas de tensioactivo, permitiendo así que los compuestos no polares permanezcan mezclados en la solución acuosa.

Fluorescencia: un tipo de luminiscencia en la que un átomo o molécula absorbe energía y después emite luz visible al realizar la transición desde un estado electrónico mayor a uno inferior. El término "fluorescencia" se limita a fenómenos en los que el intervalo de tiempo entre la absorción y la emisión de energía es extremadamente corto, *por ejemplo*, de 10^{-9} a 10^{-7} segundos.

Hibridación: *in situ* fluorescente (FISH): FISH es una técnica utilizada para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos, tales como secuencias de ADN en los cromosomas. FISH utiliza sondas marcadas fluorescentemente que se unen sólo a aquellas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia en condiciones de reacción definidas. FISH también se puede utilizar para detectar secuencias de ARNm particulares en muestras de tejido.

Fluoróforo: el grupo funcional, o una parte, de una molécula que hace que la molécula fluoreszca cuando se expone a una fuente de excitación. El término "fluoróforo" se utiliza también para referirse a compuestos fluorescentes usados para marcar las proteínas con un marcador fluorescente.

Compuestos heteroalifáticos son compuestos alifáticos que tienen al menos un heteroátomo, *es decir*, uno o más átomos de carbono se han sustituido por otro átomo, típicamente, nitrógeno, oxígeno o azufre.

Compuestos heteroarilo son compuestos aromáticos que tienen al menos un heteroátomo, *es decir*, uno o más átomos de carbono del anillo se han sustituido por un átomo que tiene al menos un par de electrones libres, típicamente, nitrógeno, oxígeno o azufre.

Nanopartícula o nanocrystal: una partícula a nanoescala con un tamaño que se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula nanoscópica que tiene al menos una dimensión de menos de aproximadamente 100 nm. Ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas metálicas, materiales de tipo fullereno, nanotubos inorgánicos, dendrímeros (tales como con quelatos metálicos unidos de forma covalente), nanofibras, nanocuernos, nanocebollas, nanobarras, nanocuerdas y puntos cuánticos. Una nanopartícula puede producir una señal detectable, por ejemplo, a través de la absorción y/o emisión de fotones (incluyendo fotones visibles y de radiofrecuencia) y la resonancia de plasmones.

Fotoluminiscencia: un proceso en el que un átomo o molécula absorbe fotones y se excita a un estado de energía superior. A continuación, el átomo o molécula vuelve a un estado de menor energía mediante la emisión de un fotón. Dos tipos de fotoluminiscencia son fluorescencia y fosforescencia. La fluorescencia se caracteriza por un período de tiempo extremadamente corto (*por ejemplo*, 10^{-8} a 10^{-3} segundos) entre la absorción y la emisión. La fosforescencia es un proceso lento de transición de regreso a un estado de energía más bajo después del cese de la excitación, que en ocasiones dura minutos u horas. Tal como se usa en el presente documento en relación con los puntos cuánticos, fotoluminiscencia se refiere a la fluorescencia.

Punto cuántico: una partícula a nanoescala que exhibe propiedades electrónicas y ópticas dependientes del tamaño debido al confinamiento cuántico. Los puntos cuánticos se han producido, por ejemplo, con materiales semiconductores (p.ej., seleniuro de cadmio y sulfuro de plomo) y con cristalitas (obtenidas mediante epitaxia de haz molecular), etc. Una

variedad de puntos cuánticos con diversas características de fluorescencia y químicas de superficie están disponibles comercialmente de Invitrogen de Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA) (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. nº 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138). Los puntos cuánticos también están disponibles comercialmente de, *por ejemplo*, Evident Technologies (Troy, NY) y Ocean NanoTech, LLC (Springdale, AR). Otros puntos cuánticos incluyen los puntos cuánticos de aleaciones tales como ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, ScSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, CdHgSeTe, InGaAs, GaAlAs e InGaN (los puntos cuánticos de aleaciones y los procedimientos para su fabricación se describen, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. nº 2005/0012182 y la publicación PCT WO 2005/001889).

10 **Estable/estabilización:** como se usa en el presente documento con respecto a una partícula fluorescente, el término "estable" significa que no presenta sustancialmente ninguna pérdida de intensidad de fluorescencia durante un período de tiempo, tal como una o más horas, uno o más días, una o más semanas o uno o más meses. **Estabilización** de una partícula fluorescente significa colocar la partícula fluorescente en una composición que evita o reduce la disminución de la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente en un período de tiempo, o incluso aumenta la intensidad de la fluorescencia de la partícula fluorescente, en comparación con la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente en ausencia de la composición.

20 **Sustituido:** se refiere a una molécula o grupo en el que uno o más átomos se han sustituido por un grupo funcional, un átomo distinto del hidrógeno, o un radical. Por ejemplo, una amina tiene la fórmula general $R_nNH_{(3-n)}$, en donde $n = 1, 2$ o 3 , y en donde cada R es independientemente un grupo alifático, un grupo heteroalifático, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo alquilarilo o un grupo arilalquilo. Una **amina sustituida** se refiere a una amina en la que al menos un hidrógeno de un grupo R se ha sustituido por un grupo funcional, un átomo distinto del hidrógeno, o un radical. Por ejemplo, una amina alquil-sustituida se refiere a una alquil amina en la que uno o más hidrógenos de la cadena de alquilo se ha reemplazado por otro átomo o grupo funcional. La etanolamina es un ejemplo de una amina de alquil-sustituida, en donde un átomo de hidrógeno de la cadena de etilo se ha sustituido por -OH.

25 II. Puntos cuánticos

Los nanocristales semiconductores cromogénicos y/o fluorescentes, también denominados a menudo 'puntos cuánticos', se pueden usar como marcadores detectables. Los puntos cuánticos nanocristalinos son partículas nanocristalinas semiconductoras, y sin limitar la presente invención para su uso con emisores de luz de partículas de un tamaño particular, típicamente tienen un tamaño en el intervalo de 2 a 10 nm.

30 Los puntos cuánticos son típicamente fluoróforos estables, a menudo son resistentes al fotoblanqueo, y tienen un amplio intervalo de longitudes de onda de excitación con un estrecho espectro de emisión. Se pueden seleccionar puntos cuánticos que tienen características de emisión particulares, tales como emisiones a longitudes de onda particulares, de modo que se pueden utilizar diferentes y variados puntos cuánticos con diferentes y variadas características de emisión para identificar diferentes y variadas dianas. Los bioconjugados de puntos cuánticos se caracterizan por presentar rendimientos cuánticos comparables a los colorantes fluorescentes tradicionales más brillantes disponibles. Además, estos fluoróforos basados en puntos cuánticos absorben de 10 a 1000 veces más luz que los colorantes fluorescentes tradicionales. La banda de emisión de los puntos cuánticos es estrecha y simétrica, lo que significa que el solapamiento con otros colores se minimiza, lo que resulta en un flujo mínimo hacia canales de detección adyacentes y en una interferencia atenuada, que puede conducir a la multiplexación simultánea de puntos cuánticos que emiten de manera diferenciada para los propósitos de detección. Los espectros de emisión simétricos y ajustables se pueden variar de acuerdo con el tamaño y la composición del material de las partículas, lo que permite una distribución espacial flexible y cercana de diferentes puntos cuánticos sin un solapamiento espectral sustancial. Además, sus espectros de absorción son amplios, lo que hace posible excitar todas las variantes de color de los puntos cuánticos simultáneamente usando una sola longitud de onda de excitación, minimizando de este modo la autofluorescencia de la muestra.

45 Además, se ha encontrado que la pegilación, la introducción de grupos de polietilenglicol en los conductos de puntos cuánticos, puede disminuir sustancialmente la interacción no específica proteína-punto cuántico. Ciertos puntos cuánticos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Life Technologies, Inc. Varios modos de realización de trabajo utilizan nanopartículas de puntos cuánticos, tales como nanocristales Qdot™ 565 y Qdot™ 800, en donde el número utilizado en dicha nomenclatura se refiere a la longitud de onda aproximada de emisión máxima de la nanopartícula. Por ejemplo, un nanocristal Qdot™ 565 emite luz que tiene una longitud de onda de 565 nm y produce un color verde claro. Por lo tanto, se pueden seleccionar puntos cuánticos para proporcionar una señal detectable a una longitud de onda particular. La detección se realiza a través de una variedad de medios, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, fluorómetro, escáner fluorescente, etc., dependiendo de la aplicación dada.

III. Conjugados de puntos cuánticos

El uso de puntos cuánticos ha sido limitado debido a su falta de biocompatibilidad. Los nuevos avances en la química del recubrimiento de superficies, sin embargo, han ayudado a superar estos problemas. Véase, por ejemplo, Wu, X. *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnol.* 21, 41–46 (2003); Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M. & Simon, S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnol.* 21, 47–51 (2003); y Dubertret, B. *et al.* In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298, 1759–1762 (2002).

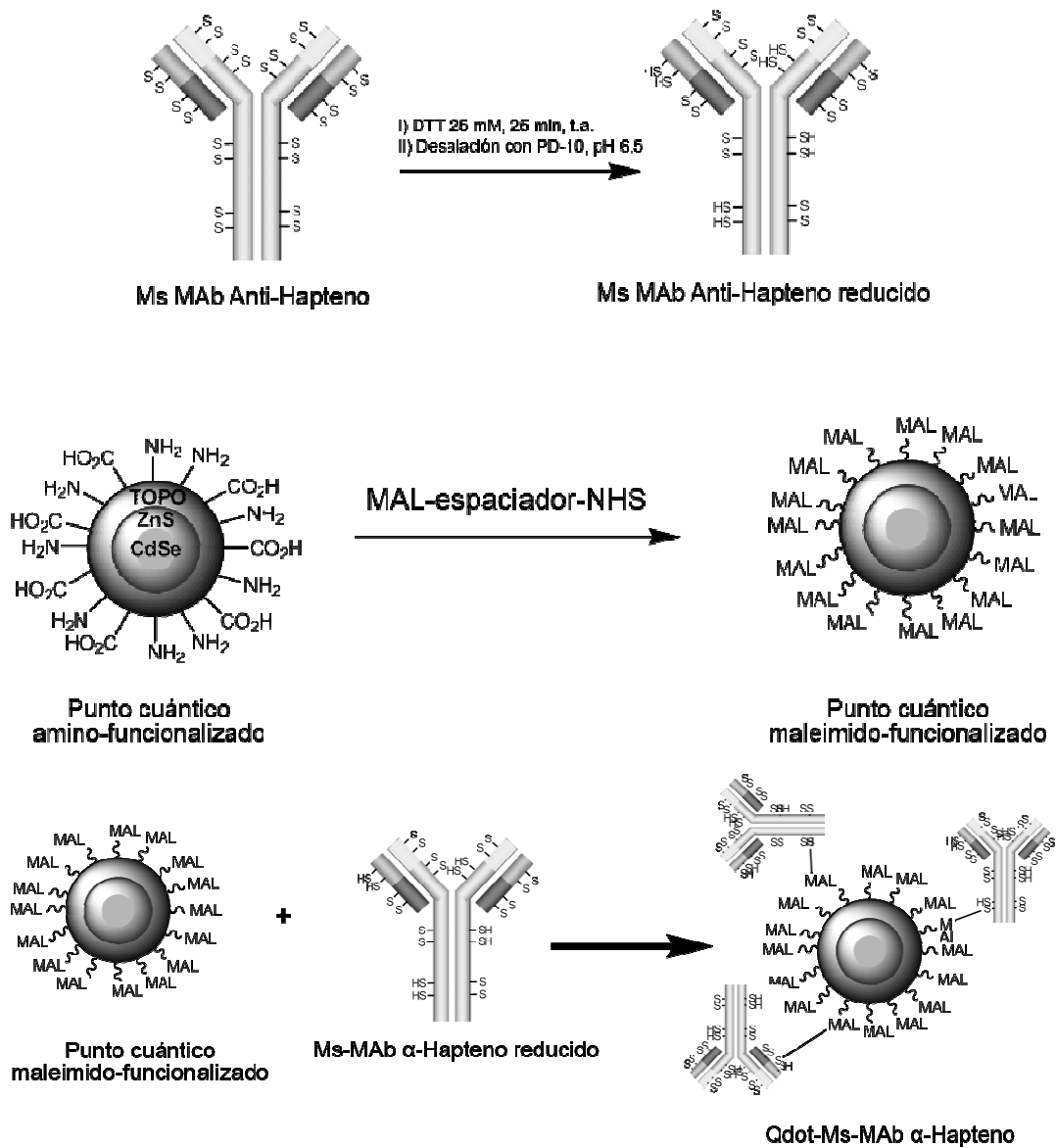
Los puntos cuánticos también se han conjugado con moléculas de biorreconocimiento, *por ejemplo*, como la estreptavidina. Estos conjugados se han utilizado para la detección de dianas tanto en células fijadas como en las secciones de tejido. Además, las proteínas de la superficie celular y los compartimentos endocíticos de las células vivas se han detectado con bioconjugados de puntos cuánticos.

Los puntos cuánticos se pueden conjugar con las biomoléculas, *por ejemplo*, un aminoácido, péptido/proteína, o un nucleósido/nucleótido/ácido nucleico. Ejemplos de biomoléculas específicas útiles para preparar bioconjugados incluyen, sin limitación: anticuerpos monoclonales o policlonales, tales como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM; fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de interés (o a un grupo de moléculas muy similares de interés) para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas, incluyendo, sin limitación, fragmentos proteolíticos de anticuerpos (tales como F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH y fragmentos Fab que son conocidos en la técnica), fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, fragmentos sFv biespecíficos, fragmentos dsFv biespecíficos, fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena única ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas por puentes disulfuro ("dsFv"). Otras biomoléculas útiles incluyen diacuerpos, triacuerpos, y anticuerpos de camélidos; anticuerpos de ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados); anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos); estreptavidina; receptores; enzimas; BSA; polipéptidos; aptámeros; y sus combinaciones.

Los bioconjugados que comprenden puntos cuánticos y biomoléculas, están disponibles comercialmente. Alternativamente, los bioconjugados de puntos cuánticos se pueden sintetizar. Los procedimientos para obtener conjugados de biomoléculas y puntos cuánticos son generalmente conocidos en la técnica, y bioconjugados útiles se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado.

Por ejemplo, una inmunoglobulina se puede incorporar a un caparazón de puntos cuánticos de CdSe/ZnS mediante: 1) la reducción de puentes disulfuro naturales mediante tratamiento con ditiotreitól (DTT); 2) la funcionalización de grupos de bloqueo (capping) de puntos cuánticos amino-terminados, grupos de bloqueo (capping) de puntos cuánticos con un éster de NHS heterobifuncional-(espaciador)_x-maleimida (x = 4, 8, 12) adecuado; 3) la derivatización de puntos cuánticos maleimida-terminados con estas inmunoglobulinas tioladas; y 4) la purificación de los conjugados utilizando técnicas adecuadas, tales como la cromatografía de exclusión por tamaño. El proceso se representa en el Esquema 1:

Esquema 1



5 Un conjugado de estreptavidina se puede obtener mediante la sustitución de una estreptavidina tiolada por la inmunoglobulina tiolada del proceso, *por ejemplo*, una molécula de estreptavidina tratada con 2-iminotiolano.

10 Los puntos cuánticos utilizados en los ejemplos anteriores están protegidos por un caparazón orgánico de óxido de trioctil fosfina (TOPO) unido electrostáticamente y un polímero anfílico intercalante para inducir la solubilidad en agua. Este polímero tiene aproximadamente 30 grupos amino terminales para una funcionalización adicional. Véase E.W. Williams, *et. al.*, "Surface-Modified Semiconductive and Metallic Nanoparticles Having Enhanced Dispersibility in Aqueous Media", Patente de EE. UU. n.º 6.649.138. Con el fin de formar conjugados de puntos cuánticos altamente sensibles, los anticuerpos se pueden unir a los puntos cuánticos en proporciones variables. La química es similar a la descrita en la Publicación de las Patentes de EE. UU. n.º 2006/0246523 y 2009/0176253.

IV. Detección de puntos cuánticos

Los microscopios de fluorescencia estándar son una herramienta para la detección de puntos cuánticos y bioconjugados de puntos cuánticos. Dado que los bioconjugados de puntos cuánticos son virtualmente fotoestables, se puede dedicar tiempo con el microscopio para encontrar regiones de interés y centrarse adecuadamente en las muestras. Los bioconjugados de puntos cuánticos son útiles siempre que se requiere una emisión fotoestable brillante y son particularmente útiles en aplicaciones multicolor, donde sólo se dispone de una fuente de excitación / filtro y se requieren mínimas interferencias entre los colores. Por ejemplo, los puntos cuánticos se han utilizado para formar conjugados de estreptavidina e IgG para etiquetar marcadores de superficie celular y antígenos nucleares y para teñir microtúbulos y actina (Wu, X. et al. (2003), *Nature Biotech*, 21, 41-46).

Como un ejemplo, la fluorescencia se puede medir con el sistema de formación de imágenes multiespectrales Nuance™ (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA). Como otro ejemplo, la fluorescencia se puede medir con el sistema de formación de imágenes espectrales SpectraView™ (Applied Spectral Imaging, Vista, CA). La formación de imágenes multiespectrales es una técnica en la que se recopila información espectroscópica de cada píxel de una imagen y los datos resultantes se analizan con un software de procesamiento de imágenes espectrales. Por ejemplo, el sistema Nuance™ puede tomar una serie de imágenes a diferentes longitudes de onda que se pueden seleccionar electrónicamente y de manera continuay después utilizar las imágenes con un programa de análisis diseñado para manejar este tipo de datos. El sistema Nuance™ es capaz de obtener información cuantitativa de múltiples colorantes simultáneamente, incluso cuando los espectros de los colorantes están muy solapados o cuando están colocalizados, o se producen en la misma localización de la muestra, siempre que las curvas espectrales sean diferentes. Muchos materiales biológicos presentan autofluorescencia o emiten luz de menor energía cuando se excitan con luz de mayor energía. Esta señal puede resultar en imágenes y datos con menor contraste. Las cámaras de alta sensibilidad sin capacidad de formación de imágenes multiespectrales aumentan la señal de autofluorescencia junto con la señal de fluorescencia. La formación de imágenes multiespectrales puede separar la autofluorescencia de los tejidos y, por lo tanto, aumentar la relación señal-ruido que se puede alcanzar.

V. Almacenamiento de partículas fluorescentes

La intensidad de fluorescencia de las partículas fluorescentes almacenadas, tales como puntos cuánticos y conjugados de puntos cuánticos en solución, disminuye con el tiempo. Por ejemplo, conjugados Qdot™-anticuerpo que se han almacenado en tampones disponibles en el mercado durante un periodo de tiempo muestran una reducida intensidad en la señal de fluorescencia en ensayos FISH en comparación con las soluciones recién preparadas de conjugados Qdot™-anticuerpo. Sin limitarse a una teoría de operación, la pérdida de intensidad de la señal se debe potencialmente a la agregación de los conjugados y/o a la pérdida de rendimiento cuántico del nanomaterial.

En el presente documento se divulgan modos de realización de una nueva composición, que estabiliza y reduce la pérdida de fluorescencia relativa en partículas fluorescentes en disolución. En algunos modos de realización, la composición puede estabilizar la intensidad de fluorescencia de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico durante un período de tiempo de al menos un mes, cuando el punto cuántico o conjugado de punto cuántico se almacena en la composición a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como a 4 °C. Esta temperatura de almacenamiento en particular se cita, no para limitar el procedimiento de almacenamiento a una temperatura particular, sino más bien para proporcionar una base para comparar la composición estabilizada frente a la no estabilizada. En algunos modos de realización, la intensidad de fluorescencia puede continuar siendo sustancialmente la misma cuando la partícula fluorescente se almacena en un modo de realización divulgado de la composición durante varias semanas o meses a 4 °C. En ciertos modos de realización, la estabilización de la partícula fluorescente significa que hay menos de un 50 % de pérdida, menos de un 30 % de pérdida, menos de un 20 % de pérdida, menos de un 10 % de pérdida, menos de un 5 % de pérdida, menos de un 1 % de pérdida, de un 5 % a un 30 % de pérdida, de un 5 % a un 20 % de pérdida, de un 1 % a un 10 % de pérdida, de un 1 % a un 5 % de pérdida, o incluso un 0 % de pérdida de intensidad de fluorescencia relativa cuando la partícula fluorescente se almacena en un modo de realización divulgado de la composición durante al menos un día, al menos una semana, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos seis meses a 4 °C. Por ejemplo, en ciertos modos de realización, la intensidad de fluorescencia relativa continúa siendo sustancialmente la misma después de su almacenamiento en la composición durante un mes a 4 °C. En un modo de realización particular, la composición puede estabilizar la intensidad de fluorescencia durante al menos tres meses cuando un conjugado punto cuántico-anticuerpo se almacena en la composición a 4 °C. En un ejemplo de trabajo, la intensidad de fluorescencia relativa de un conjugado punto cuántico-anticuerpo continuó siendo sustancialmente la misma después de un período de tres meses de almacenamiento a 4 °C. Así, en algunos modos de realización, la fluorescencia de la partícula fluorescente en suspensión se estabiliza durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos seis meses. Con fines de comparación, el mismo punto cuántico o conjugado de punto cuántico almacenado sin que la composición divulgada, por ejemplo, en una composición de la técnica anterior o alternativa, muestra una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia después de un mes a 4 °C, y puede exhibir pérdida completa de fluorescencia después de unos meses, *por ejemplo*, después de tres meses.

Las composiciones de estabilización, tal como se describen en el presente documento, también permiten el uso de procedimientos automatizados de una manera diluida en una plataforma.

En ciertos modos de realización, la composición puede aumentar la intensidad de fluorescencia de una partícula fluorescente con respecto a una composición comparable que carece de uno o más de la amina, la proteína, el tensioactivo y/o el conservante. En algunos modos de realización, aumenta la fluorescencia inicial. En otros modos de realización, el aumento de la fluorescencia se observa en un momento posterior a la formulación inicial. En algunos modos de realización, el aumento de la fluorescencia se mantiene durante al menos 5 horas, al menos 25 horas, al menos 100 horas, al menos 250 horas, al menos 750 horas, al menos 1500 horas, al menos 3000 horas o al menos 4300 horas (*es decir*, seis meses). En modos de realización particulares, la fluorescencia de un punto cuántico o conjugado de punto cuántico, con respecto al mismo conjugado no dispersado en la composición, aumenta típicamente al menos un 5 %, tal como de un 5 % a un 20 %, de un 5 % a un 15 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 % o al menos un 20 %.

Mientras se investigaban las potenciales condiciones de elución en cromatografía de afinidad para conjugados Qdot™, se descubrió inicialmente que los tampones de elución que contienen alquilaminas terciarias que contienen sustituyentes de etanol estabilizan la pérdida relativa de fluorescencia de nanopartículas Qdot™ en solución. Esta influencia se demostró además en una amplia variedad de tampones. Se investigaron varias aminas diferentes (1ª, 2ª y 3ª) con varias funcionalidades y se observaron efectos similares. No obstante, basándose en los resultados iniciales, las trietanolaminas, tales como trietanolamina, proporcionaron la mayor estabilización de la fluorescencia a temperaturas elevadas de 37 °C y 45 °C. Los eluyentes de cromatografía que contienen una alta concentración de sales (*por ejemplo*, NaCl 2 M, KI 2,5 M o MgCl₂ 2,5 M), una alta concentración de compuestos orgánicos (*por ejemplo*, polietilenglicol acuoso a un 25 %) o condiciones muy ácidas (*por ejemplo*, ácido cítrico 50 mM, pH = 3,0) demostraron disminuir en gran medida la fotoluminiscencia de Qdot™.

Se ensayaron composiciones para determinar su capacidad para estabilizar la fluorescencia de Qdot™. Ciertos modos de realización divulgados incluyen una amina, un tampón, una proteína de bloqueo, un conservante y un tensioactivo. Se formuló una composición del tampón inicial de estabilización de Qdot™ (QSB). Esta composición QSB inicial incluyó borato 0,32 M (pH 8,3), hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso, trietanolamina 50 mM, conservante de azida de sodio al 0,08 % en peso (disponible de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y tensioactivo Tween® 20 al 0,005 % en peso (disponible de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se evaluó cada componente QSB para determinar su efecto sobre la estabilidad de Qdot™. Además, se evaluó el QSB para determinar sus efectos sobre la eficiencia de la tinción de las hibridaciones in situ fluorescentes (FISH).

A. Amina

La adición de una amina a una composición tampón de estabilización de Qdot™ puede estabilizar la fluorescencia de un nanocrystal Qdot™ o conjugado Qdot™ con el tiempo. Sin estar ligado por ninguna teoría particular de operación, se cree que la amina puede pasivar defectos en la superficie de los puntos cuánticos, lo que aumenta el rendimiento cuántico luminiscente del punto cuántico. La amina puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria, tal como una amina alifática, una amina heteroalifática, una arilamina, una heteroarilamina, una alquil-arilamina, una aril-alquilamina o una amina cíclica (*por ejemplo*, ciclohexilamina, piridina). La amina tiene la fórmula general R_nNH_(3-n), en donde n = 1, 2 o 3, y en donde cada R es independientemente un grupo alifático, un grupo heteroalifático, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo alquilarilo o un grupo arilalquilo. Cada R puede estar sustituido o no sustituido. En algunos modos de realización, al menos un R está sustituido con, por ejemplo, uno o más grupos -OH, -OR₁, -CO₂R₁ o -CN, o una combinación de los mismos, en donde R₁ es un grupo alifático o arilo sustituido o no sustituido. La amina puede ser también una amina cíclica sustituida o no sustituida, *por ejemplo*, ciclohexilamina. Típicamente, la amina es una amina sustituida, en particular una alquilamina sustituida distinta de un aminoácido o una alquil-alquilamina sustituida. En algunos modos de realización, la amina es una alquilamina inferior no sustituida o una alquilamina inferior sustituida distinta de un aminoácido o una alquil-alquilamina inferior sustituida (*por ejemplo*, 1-metilbutilamina). En ciertos modos de realización, el grupo alquilo sustituido es un alquilalcohol inferior o alquilonitrilo inferior. Por ejemplo, el grupo alquilo sustituido puede ser etanol o propionitrilo. Una amina secundaria o terciaria puede incluir una combinación de grupos alquilo y/o alquilo sustituido. En modos de realización particulares, la amina incluye un grupo alcohol, tal como un grupo N-etanol. Ejemplos de aminas con un grupo N-etanol incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metildietanolamina, N,N-dimetil-etanolamina, N,N-bis(2-hidroxietil)glicina y bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano.

Se determinó que, para los modos de realización divulgados, las aminas que contienen un sustituyente N-etanol (*por ejemplo*, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metildietanolamina o N,N-dimetiletanolamina) proporcionan la mayor estabilización de la fluorescencia. Por lo tanto, el grupo funcional hidroxilo, y grupos similares, tales como -OR₁ y -CN facilitan la estabilidad de la fluorescencia. Aunque las etanolaminas sustituidas proporcionan efectos similares a

4 °C y a temperatura ambiente (*por ejemplo*, 25 °C), la trietanolamina proporcionó la mayor estabilización de la fluorescencia a temperaturas elevadas de 37 °C y 45 °C para los modos de realización divulgados.

La amina se puede utilizar en composiciones tampón de estabilización de Qdot™ en cualquier cantidad eficaz, tal como una cantidad mayor que cero hasta al menos 200 mM, típicamente de 25 mM a 200 mM, más típicamente de 38 mM a 75 mM. En algunos modos de realización, la amina está presente en una concentración inferior o igual a 200 mM, tal como de 25 a 200 mM, de 50 a 100 mM o de 38 a 75 mM. En ciertos modos de realización, la composición QSB incluye una etanolamina sustituida en una concentración de 25 a 200 mM. Por ejemplo, la composición puede incluir etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metildietanolamina, *N,N*-dimetiletanolamina o una combinación de las mismas en una concentración de 50 mM. En un modo de realización particular, la composición incluye trietanolamina 50 mM.

En ciertos modos de realización, las composiciones QSB que comprenden una amina aumentan la fluorescencia de un punto cuántico o conjugado de punto cuántico almacenado en la composición QSB. En algunos modos de realización, se observa un aumento inicial de la fluorescencia (*por ejemplo*, medida con un lector de placas multimodo de barrido espectral) en comparación con una composición QSB sin una amina. En ciertos modos de realización, el aumento de la fluorescencia persiste durante al menos 25 horas después de la formulación inicial.

B. Sal tampón, concentración y pH

Se investigaron varios sistemas tampón para determinar su compatibilidad con los puntos cuánticos. También se evaluaron los efectos del pH del tampón.

Se ha encontrado que los tampones con valores de pH elevados (*por ejemplo*, mayor que o igual a pH 7) y las concentraciones de sal moderadas (*por ejemplo*, de 0,02 M a 0,5 M) estabilizan al menos algunos nanocristales Qdot™ y conjugados Qdot™-anticuerpo. Se puede utilizar cualquier tampón que estabiliza la fluorescencia durante un período de tiempo, y que no interfiere con los resultados de formación de imágenes. Ejemplos de tampones para el almacenamiento de puntos cuánticos incluyen tampones borato, tampón fosfato salino (PBS), tampón Tris salino (TBS) y combinaciones de los mismos. Tampones adecuados disponibles comercialmente pueden incluir aditivo FortéBio Kinetics Buffer (añadido a 10X PBS, pH 7,4, FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) y Pierce SEA BLOCK (una formulación de bloqueo basada en suero de salmón y trucha arcoiris en tampón PBS con azida de sodio al 0,1 %). En ciertos modos de realización, se encontró que tampones borato en una concentración aproximada de 0,4 M (*por ejemplo*, borato 0,42 M, pH 8,3), 10X PBS (pH 7,5, fosfato 100 mM, cloruro de sodio 150 mM), aditivo FortéBio Kinetics Buffer (añadido a 10X PBS, pH 7,4), Solución A y Pierce SEA BLOCK estabilizan la fluorescencia de Qdot™.

En algunos modos de realización, las composiciones que comprenden un tampón y una amina son compatibles además con fluorescencia de Qdot™. En modos de realización particulares, la amina es una *N*-etanolamina sustituida, *por ejemplo*, trietanolamina. Por ejemplo, borato 0,4 M con TEA 50 mM (pH 8,6) y 10X PBS con TEA 50 mM (pH 8,3) demuestran una estabilidad mejorada de Qdot™ en comparación con borato 0,4 M o 10X PBS solo.

Se seleccionó el tampón borato como un ejemplo adecuado de tampón de estabilización de Qdot™ y se evaluaron los efectos de la concentración de sal y del pH. Se sabe que la fotoluminiscencia disminuye en algunos tampones con una alta concentración de sal (*por ejemplo*, superior a 2 M). Sin estar limitado por ninguna teoría particular de operación, altas concentraciones de sal pueden facilitar la difusión de pequeñas moléculas a través de la capa externa de fosfolípidos de un punto cuántico recubierto con polímero, dando como resultado una disminución o una pérdida completa de la fotoluminiscencia o el rendimiento cuántico. Por lo tanto, concentraciones de sal moderadas, superiores a cero hasta aproximadamente 2 M, pueden ser más adecuadas para la estabilización de Qdot™.

En algunos modos de realización, por ejemplo, una concentración de borato de 0,02 M a 0,5 M, o de 0,05 M a 0,32 M, es compatible con la fluorescencia de Qdot™. En ciertos modos de realización, las concentraciones de sal en el extremo inferior del intervalo son compatibles con los puntos cuánticos y las proteínas asociadas, y la agregación se reduce al mínimo. En un modo de realización particular, la fluorescencia de Qdot™ era más compatible cuando la concentración de borato era 0,32 M en comparación con otras formulaciones de tampón.

Se encontró una composición de tampón con un pH ácido que reduce la fotoluminiscencia de Qdot™ con respecto a las composiciones que tienen un pH neutro o básico. Por ejemplo, una solución de ácido cítrico 50 mM, pH 3,0, demostró disminuir en gran medida la fotoluminiscencia. Por lo tanto, un pH mayor que o igual a 7 es preferentemente adecuado para el almacenamiento de nanocristales Qdot™ y conjugados Qdot™-anticuerpo. Un pH mayor que 10,5, sin embargo, puede ser inadecuado para la estabilidad a largo plazo de los anticuerpos. Por lo tanto, en algunos modos de realización, la composición tiene un pH de 7 a 10, tal como de 7 a 9,5, de 7 a 9, de 7,4 a 9,5, de 8 a 9 o de 8 a 8,5.

C. Proteína

Se ha demostrado que la adición de proteínas no específicas, hidrolizados de proteínas, o péptidos *es decir*, "proteínas de bloqueo", a los ensayos de hibridación *in situ* fluorescente reduce la señal de fondo y mejora la detección de una sonda hibridada o conjugado a anticuerpo. Algunos tampones comercialmente disponibles incluyen proteínas de bloqueo. Por ejemplo, el aditivo FortéBio Kinetics Buffer incluye 0,1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino). La Solución A incluye hidrolizados básicos de caseína al 1,5 % en peso. Es ventajoso incluir proteínas, hidrolizados de proteínas o péptidos en una composición de almacenamiento de Qdot™ para estabilizar la fluorescencia.

Se puede utilizar cualquier concentración de proteína que facilita la estabilidad de Qdot™ y no interfiere con la formación de imágenes. No obstante, si la concentración de proteína es demasiado alta, se puede producir agregación de proteínas y reducir la intensidad de fluorescencia de un nanocrystal Qdot™ o conjugado Qdot™-anticuerpo. Por lo tanto, una composición adecuada incluye proteína suficiente para estabilizar la intensidad de fluorescencia y reducir la señal de fondo durante los ensayos posteriores, al tiempo que mantiene una concentración de proteína que minimiza la agregación. En algunos modos de realización, una composición QSB incluye desde más de cero a al menos el 2 % en peso, tal como del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso, del 1,0 % en peso al 1,1 % en peso o del 0,06 % en peso al 0,60 % en peso de proteínas, hidrolizados de proteínas o péptidos. Además, un experto en la técnica reconocerá la importancia de utilizar una fuente de proteína filtrada a fin de no introducir proteínas agregadas en el sistema.

Numerosas fuentes de proteínas, hidrolizados de proteínas y péptidos están comercialmente disponibles. Las fuentes adecuadas pueden incluir triptona vegetal, hidrolizados de caseína, gelatina, peptona de salmón, proteína globulina de cabra, hidrolizado de albúmina de pollo o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, se usan triptona vegetal, hidrolizados ácidos de caseína, hidrolizados básicos de caseína, gelatina de piel de pescado o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en ciertos modos de realización, una composición QSB incluye triptona vegetal, hidrolizados ácidos de caseína, hidrolizados básicos de caseína, gelatina de piel de pescado o combinaciones de los mismos en una concentración desde mayor que cero a al menos el 2 % en peso, tal como del 0,5 % en peso al 1,5 % en peso, tal como del 0,05 % en peso al 1,1 % en peso, del 1,0 % en peso al 1,1 % en peso, del 0,06 % en peso al 0,60 % en peso o del 0,25 % en peso al 0,55 % en peso.

En ciertos modos de realización, la inclusión de una proteína en la composición QSB estabiliza la fluorescencia de un punto cuántico o conjugado de punto cuántico almacenado en la composición QSB. Sin estar limitado por ninguna teoría en particular, las proteínas, los hidrolizados de proteínas o los péptidos puede estabilizar la fluorescencia de los puntos cuánticos o conjugados de puntos cuánticos mediante la formación de micelas alrededor de los puntos cuánticos o conjugados, minimizando así la agregación y manteniendo la solubilidad de los puntos cuánticos o conjugados.

D. Tensioactivo

La adición de un tensioactivo a una composición QSB puede reducir la agregación de proteínas y conjugados Qdot™-anticuerpo. Los tensioactivos pueden formar micelas que rodean los conjugados Qdot™-anticuerpo en una solución acuosa y obstaculizar los procesos de agregación, estabilizando así la fluorescencia de Qdot™.

Algunos detergentes iónicos, tales como dodecil sulfato sódico, eran perjudiciales para los rendimientos cuánticos relativos de las nanopartículas Qdot™. En algunos modos de realización, se encontró que los detergentes no iónicos estabilizan la fluorescencia de Qdot™. Detergentes no iónicos adecuados incluyen, por ejemplo, glicoles alifáticos, en particular los glicoles de alquileo (tales como Tween® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) y Triton® X-100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter)), glicoles de alquileo oxigenados (tales como Brij 35 (polioxietilenglicol dodecil éter)) y etoxilados de alcohol (tales como Tergitol™ 15-S-9, un etoxilado de alcohol secundario, disponible de Dow Chemical Company). En ciertos modos de realización, Brij 35 al 0,05 % en peso en tampón borato 50 mM, pH 8,3, demostró estabilizar la intensidad de fluorescencia de nanocrystal Qdot™ o conjugados Qdot™.

Para determinar el efecto de la concentración del tensioactivo, Tween® 20 se evaluó en un intervalo del 0,0025 % en peso al 0,20 % en peso en tampón borato 50 mM, pH 8,3. Las concentraciones del 0,005 % en peso al 0,050 % en peso presentaron una mayor estabilidad de la fluorescencia que las concentraciones más bajas o más altas. Triton® X-100 fue eficaz a concentraciones similares. Por lo tanto, en algunos modos de realización, la composición QSB puede incluir un detergente no iónico con una concentración desde mayor que cero a un 0,05 % en peso, tal como del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso o del 0,005 % en peso al 0,01 % en peso.

En ciertos modos de realización, la inclusión de un tensioactivo en la composición QSB aumenta la estabilidad de la fluorescencia de un punto cuántico o conjugado de punto cuántico almacenado en la composición QSB.

E. Conservante

En algunos modos de realización, la composición QSB incluye un conservante, tal como un agente antibacteriano. Conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, isotiazolinonas, glicoles, azidas, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de conservantes incluyen ProClin® 300 (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 2,30 %, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 0,70 %, carboxilato de alquilo al 2-3 % (un estabilizador) y glicol modificado al 93-95 %; disponible de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ProClin® 950 (2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 9,5-9,9 %, Sigma-Aldrich) y azida de sodio. Sobre la base de otras composiciones de tampón comerciales, ProClin® 300 al 0,01 % en peso se seleccionó inicialmente y se evaluó. Sin embargo, la concentración baja no proporcionó una protección antibacteriana adecuada en el tampón de estabilización de Qdot™. Se encontró que una concentración de un 0,05 % en peso era un conservante eficaz, pero redujo la fluorescencia de nanocristales Qdot™.

La azida de sodio se evaluó también como conservante potencial y se comparó con ProClin® 300. Composiciones que incluían ProClin® 300 al 0,05 % en peso o azida de sodio al 0,08 % en peso se evaluaron con ocho diferentes nanocristales Qdot™. Aunque el cambio relativo en la fluorescencia varió entre los nanocristales Qdot™, la pérdida global de fluorescencia fue menor cuando la composición incluía azida de sodio en comparación con la composición que incluía ProClin® 300. Se obtuvieron resultados similares con conjugados Qdot™-anticuerpo.

Por lo tanto, en algunos modos de realización, la composición QSB incluye un conservante. En ciertos modos de realización, la composición QSB incluye una cantidad efectiva de azida de sodio, tal como una concentración a partir de mayor que cero a un 0,2 % en peso, tal como del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso o del 0,05 % en peso al 0,1 % en peso. En un modo de realización particular, la composición QSB incluye azida de sodio al 0,08 % en peso.

F. Tampón de estabilización de Qdot™

Ciertos modos de realización divulgados de una composición tampón de estabilización de Qdot™ incluyen una sal (de 0,02 M a 0,5 M), una amina (25-200 mM), una proteína (del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso), un tensioactivo (del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso) y un conservante (del 0,05 % en peso al 0,1 % en peso). La composición QSB tiene un pH en el intervalo de 7 a 9. En algunos modos de realización, la sal es borato (de 0,02 M a 0,5 M), la amina es una N-etanolamina sustituida (de 50 a 100 mM) y el pH está en el intervalo de 8 a 9. En modos de realización particulares, la composición QSB incluye borato 0,32 M, trietanolamina 50 mM, proteína al 1,1 % en peso (*por ejemplo*, hidrolizados ácidos de caseína, hidrolizados básicos de caseína, hidrolizados de albúmina de pollo, triptona vegetal, peptona de salmón, gelatina de piel de pescado o combinaciones de los mismos), azida de sodio al 0,08 % en peso y tensioactivo al 0,005 % en peso (*por ejemplo*, Tween® 20, Triton® X-100 o Brij 35), con un pH de 8 a 8,5.

Un estudio de varios conjugados Qdot™-anticuerpo en composiciones QSB deconstruidas (*es decir*, composiciones en las que se eliminó un componente) demostró que la composición QSB completa (tampón borato 0,32 M (pH = 8,3), TEA 50 mM, hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso, azida de sodio al 0,08 % en peso y Tween® 20 al 0,005 % en peso) proporciona la mejor estabilidad global de la fluorescencia para los conjugados. La presencia de proteína en el tampón tuvo el mayor efecto sobre la estabilidad de la fluorescencia. (Véase el Ejemplo 9, Tabla 22).

Sin embargo, al menos algunos de los componentes pueden tener un efecto sinérgico cuando se utilizan en combinación. Por ejemplo, en tampón PBS 10 mM, la adición de trietanolamina 50 mM (pH del tampón = 9,3) o de hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso (pH del tampón = 7,8) tuvo escaso efecto sobre la estabilidad de la fluorescencia de nanocristales Qdot™ 655-30N en comparación con un tampón PBS 10 mM (pH = 7,4) solo. (Véase, *por ejemplo*, el Ejemplo 3, Tabla 6). Sin embargo, cuando se añadieron la trietanolamina 50 mM y los hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso al tampón (pH = 9,1), se observó una disminución de la fluorescencia relativa de tan sólo un 2,6 % después de 50 horas en comparación con una disminución de la fluorescencia relativa de un 16,1 % en PBS 10 mM solo. En tampón borato 0,32 M (pH = 8,3), los nanocristales Qdot™ 655-30N exhibieron una disminución de la fluorescencia de un 23,6 %. La adición de TEA 50 mM (pH de tampón final = 8,8) produjo una disminución de la fluorescencia de un 14,1 %, mientras que la adición de hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso (pH del tampón = 8,5) produjo una disminución de tan sólo un 6,4 %. No obstante, la adición de TEA y de hidrolizados básicos de caseína a un tampón borato 0,32 M (pH = 9,0) aumentó significativamente la estabilidad con una disminución de la fluorescencia relativa de tan sólo un 0,3 % después de 50 horas. De hecho, el cambio en el rendimiento cuántico de los nanocristales fue mínimo incluso después de 4 meses. El efecto sinérgico de los componentes del tampón combinados proporciona un entorno compatible para los nanocristales de modo que se minimiza la agregación y se conserva la fluorescencia de los nanocristales.

G. Aplicaciones

La fluorescencia de los conjugados Qdot™-anticuerpo en tampones comercialmente disponibles disminuye con el tiempo. Por ejemplo, los conjugados Qdot™-anticuerpo (Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno) diluidos en la Solución A y utilizados en un ensayo de hibridación *in situ* fluorescente mostraron una pérdida notable de la intensidad de la

fluorescencia después de un mes de almacenamiento a 4 °C. (Véase el Ejemplo 11B). Los conjugados Qdot™-anticuerpo diluidos en un modo de realización de la composición QSB divulgada, sin embargo, no mostraron ninguna pérdida de fluorescencia después de tres meses de almacenamiento y exhibieron sólo una ligera pérdida de fluorescencia después de cuatro meses de almacenamiento. Por lo tanto, algunos modos de realización de la composición de estabilización de Qdot™ estabilizan la intensidad de fluorescencia de los conjugados Qdot™-anticuerpo durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos cuatro meses de almacenamiento a 4 °C.

Los modos de realización de la composición QSB divulgada son adecuados para almacenar los conjugados Qdot™-anticuerpo utilizados en hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en la que el conjugado se utiliza para detectar una sonda marcada hibridada para aplicaciones de inmunohistoquímica (IHC) de fluorescencia y/o de tejido en las que el conjugado se utiliza para detectar antígenos de proteína en el tejido. En algunos modos de realización, el conjugado punto cuántico-anticuerpo se almacena a una concentración de 0,5 nM a 150 nM, de 1 nM a 125 nM, de 5 nM a 100 nM, de 25 nM a 75 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM o 100 nM en la composición QSB divulgada. En ciertos modos de realización, el conjugado punto cuántico-anticuerpo se almacena a una concentración de 50 nM en la composición QSB divulgada.

VI. Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de la trietanolamina sobre la estabilidad de Qdot™

La estabilidad relativa de la fluorescencia de nanocristales Qdot™ 655-30N y sus bioconjugados con anticuerpos se examinó en solución para diversas condiciones de elución de cromatografía a temperatura ambiente. Una alícuota de 50 µl de una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ en tampón de unión por afinidad (PBS 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM a pH = 7,0) se suspendió en una alícuota de 150 µl de una mezcla de una solución acuosa de trietanolamina (TEA, pH = 10,5) y tampón de unión por afinidad.

La fluorescencia relativa de la solución Qdot™ se monitorizó como una función del tiempo usando un lector de placas multimodo de barrido espectral Thermo Varioskan (disponible de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con una $\lambda_{ex} = 400$ nm y 525 nm con una $\lambda_{em} = 655$ nm. Se monitorizaron 4 réplicas de 200 µl de la solución de nanocristales Qdot™ 655-30N en una placa de baja capacidad de unión (*es decir*, una placa que incluye una superficie que minimiza la unión celular, la absorción de proteínas, la activación de enzimas y la activación celular). La fluorescencia se representó gráficamente frente al tiempo (FIGS. 1 y 2) y se comunicó como un porcentaje de cambio en los puntos temporales establecidos (Tabla 1). Los valores de la Tabla 1 corresponden al porcentaje de pérdida de fluorescencia a 655 nm a las 18 horas. El tampón de elución contiene concentraciones variables de TEA (como se muestra en la Tabla 1) a pH 10,5.

Tabla 1

[TEA] en tampón de elución (B)	Gradiente de elución (% B)	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %
25 mM	Concentración TEA (mM)	0,0	4,7	9,4	14,1	18,8
	% cambio en fluorescencia	47,08	27,59	22,91	16,62	25,00
50 mM	Concentración TEA (mM)	0,0	9,4	18,8	28,2	37,5
	% cambio en fluorescencia	42,59	18,38	20,68	19,82	11,36
100 mM	Concentración TEA (mM)	0,0	18,8	37,5	56,3	75,0
	% cambio en fluorescencia	43,70	26,97	21,22	22,04	15,96
200 mM	Concentración TEA (mM)	0,0	37,6	73,0	112,6	150,0
	% cambio en fluorescencia	41,90	25,83	22,36	30,10	28,22

La adición de trietanolamina al tampón de unión por afinidad provocó un aumento de la estabilidad de la fluorescencia observada para nanocristales Qdot™ 655-30N y un menor porcentaje de cambio en la fluorescencia con el tiempo. Un aumento en la proporción entre la trietanolamina y el tampón de unión por afinidad provocó, en general, un aumento de

la estabilidad de fluorescencia observada. Un examen inicial de concentraciones variables de trietanolamina a pH = 10,5 mostró que el máximo beneficio se logró con soluciones de trietanolamina 50 o 100 mM, en las que la concentración 50 mM fue muy similar o ligeramente más beneficiosa que la concentración 100 mM.

Se realizaron experimentos adicionales con trietanolamina 50 mM en tampón de elución de pH variable (FIG. 3, Tabla 2). Los valores de la Tabla 2 corresponden al porcentaje de pérdida de fluorescencia a 655 nm con el tiempo tras 18 horas.

Tabla 2

% de gradiente de elución B [Concentración TEA (mM)]		% cambio en fluorescencia (655 nm)				
		0 % (0,0 mM)	25 % (9,4 mM)	50 % (18,8 mM)	75 % (28,2 mM)	100 % (37,5 mM)
pH del tampón de elución TEA 50 mM (B)	pH = 7,5	40,12	26,77	20,47	22,32	25,06
	pH = 8,5	41,88	25,11	22,52	24,70	26,84
	pH = 9,5	45,95	31,22	27,25	26,03	27,69
	pH = 10,5	42,59	18,38	20,68	19,82	11,36

La adición de trietanolamina acuosa 50 mM a pH = 10,5 a soluciones de nanopartículas Qdot™ en tampón de unión por afinidad resultó en una menor disminución de la fluorescencia observada de las muestras de Qdot™ en comparación con las nanopartículas en tampón de unión por afinidad sin dicha adición. Este examen inicial del pH de las soluciones de trietanolamina mostró que los mayores beneficios se lograron con pH = 10,5. Sin embargo, un pH de 10,5 no es adecuado para la estabilidad de los anticuerpos a largo plazo. A pH = 8,5 se observó un modesto aumento de la estabilidad de fluorescencia. Dicho aumento de la estabilidad de fluorescencia también se observó al añadir trietanolamina 50 mM a una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 655-30N en un tampón borato 0,42 M (pH = 8,3).

Ejemplo 2

Efecto de las aminas sobre la estabilidad de Qdot™

Los puntos cuánticos pueden incluir defectos superficiales, que afectan a la luminiscencia. Algunos ligandos pueden pasivar estos defectos superficiales, aumentando así el rendimiento cuántico luminiscente de los puntos cuánticos. Bullen y Mulvaney investigaron los efectos de las aminas sobre la intensidad de la luminiscencia, y llegaron a la conclusión de que "la longitud de la cadena de ligando alquilamina no tiene un efecto claro sobre la intensidad de la luminiscencia para cadenas de alquilo en un intervalo de C₂ a C₁₈. Más significativamente, la luminiscencia sigue claramente esta tendencia: aminas primarias >> secundarias > terciarias". (*Langmuir*, 2006, 22:3007-3013, p. 3009). El efecto se atribuye, al menos en parte, al efecto que tienen las dimensiones de los ligandos sobre la máxima cobertura posible del ligando de superficie: "Esto sugiere que, mientras que un aumento de la hidrofobicidad del ligando aumenta la afinidad superficial, no compensa la mayor huella de adsorción. En la saturación, se adsorbe más cantidad del ligando primario". (Bullen, p. 3012).

Se investigaron varias aminas 1^a, 2^a y 3^a con grupos funcionales variables como aditivos de amina alternativos a una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 655-30N en tampón borato 0,42 M a pH = 8,3. Se evaluaron trietanolamina, N-metildietanolamina, N,N-dimetiletanolamina, tris(2-(2-metoxietoxi)etil)amina, N,N,N,N-tetrametilendiamina, N,N-dimetilglicina, 3-dimetilaminopropionitrilo, bicina (N,N-bis(2-hidroxi)etil)glicina y bis-TRIS (bis(2-hidroxi)etil)amino tris(hidroxi)metil)metano). Cada amina se añadió a una concentración final de 50 mM. El cambio en la fluorescencia relativa de una solución de nanopartículas Qdot™ 655-30N se midió utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la FIG. 4 y en la Tabla 3. Los valores de datos de la Tabla 3 se representan como porcentaje de disminución de la fluorescencia de Qdot™ en solución con el tiempo.

Tabla 3

Aditivo de amina 50 mM en tampón borato 0,42 M	pH de la solución	% cambio en fluorescencia (655 nm)	
		t = 2,5 h	t = 19,75 h
Tampón borato 0,42 mM únicamente	8,5	16,0	27,1
Trietanolamina	8,9	11,5	13,2
<i>N</i> -Metildietanolamina	9,1	12,4	13,4
<i>N,N</i> -Dimetiletanolamina	9,4	13,4	15,3
Tris(2-(2-metoxietoxi)etil)amina	8,8	15,5	27,2
<i>N,N,N,N</i> -Tetrametiletildiamina	9,5	23,4	23,9
<i>N,N</i> -Dimetilglicina	8,6	17,5	25,0
3-Dimetilaminopropionitrilo	8,8	15,8	19,5
Bicina	8,1	17,9	20,2
Bis-TRIS	8,3	19,8	21,5

5 En marcado contraste con los resultados obtenidos por Bullen y Mulvaney, la máxima estabilidad en la intensidad de la fluorescencia se obtuvo con trietanolamina, una amina terciaria. Un efecto de estabilidad de fluorescencia similar al de la trietanolamina se observó con otros aditivos de aminas 2^a y 3^a. Sin embargo, trietanolamina proporcionó la mayor estabilización de la fluorescencia para los modos de realización divulgados. Otras aminas *N*-alquiladas que contenían un sustituyente *N*-etanol, principalmente *N*-metildietanolamina y *N,N*-dimetiletanolamina, proporcionaron una estabilidad comparable.

10 Se observó que un aminoácido *N*-etanol funcionalizado, a saber, bicina o *N,N*-bis(2-hidroxi)etil)glicina, aumentó la estabilidad de la fluorescencia de la solución de QdotTM. La sustitución de los sustituyentes *N*-etanol de bicina por sustituyentes metilo en la *N,N*-dimetilglicina redujo la estabilidad global de la fluorescencia, pero no disminuyó la fluorescencia de la solución de QdotTM.

15 El bloqueo (capping) del grupo hidroxilo de los sustituyentes *N*-etanol con un 2-metoxietoxi éter como el que se encuentra en la tris(2-(2-metoxietoxi)etil)amina produce el mismo resultado que con el tampón borato solo. La sustitución de un grupo *N*-etanol por un grupo tris(hidroxi)etil)metano como el que se encuentra en el bis-TRIS, bis(2-hidroxi)etil)amino-tris(hidroxi)etil)metano aumenta la estabilidad global de fluorescencia con respecto al tampón borato solo. Por lo tanto, parece que el grupo funcional -OH facilita la estabilidad de la fluorescencia.

Ejemplo 3

Efecto de las sales tampón sobre la estabilidad de QdotTM

20 La estabilidad de fluorescencia de nanocristales QdotTM 655-30N 50 nM se evaluó en diversas composiciones tampón. Las composiciones tampón incluyeron borato 0,42 M (pH 8,3), borato 0,42 M con trietanolamina 50 mM (TEA) (pH 8,6), 10X PBS (fosfato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), 10X PBS con TEA 50 mM (pH 8,3), aditivo FortéBio Kinetics Buffer (en 10X PBS), Pierce Starting Block (pH 7,5, disponible de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), Pierce SEA BLOCK (pH 7,5) y Pierce Super Block (pH 7,5). Los resultados se muestran en la FIG. 5 y en la Tabla 4. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los valores de datos a 19,0 h y 91,0 h se representan como porcentaje de disminución de la fluorescencia de la solución de QdotTM con el tiempo. Los valores a 0 h son los valores iniciales de fluorescencia.

Tabla 4

Composición del tampón (pH)	Fluorescencia de Qdot (655 nm)		
	0 h	19,0 h	91,0 h
Borato 0,42 M (8,3)	1099,0	15,2	24,6
Borato 0,42 M, TEA 50 mM (8,6)	1055,7	12,7	14,4
10X PBS (7,5)	1002,1	14,1	24,2
10X PBS, TEA 50 mM (8,3)	990,7	13,2	18,7
10X PBS + adit. ForteBio Kin. Tamp. (7,4)	1008,5	8,7	9,8
Pierce Starting Block (7,5)	1027,0	14,9	26,4
Pierce Sea Block (7,5)	942,0	7,8	18,6
Pierce Super Block (7,5)	1071,9	23,2	39,8
Solución A (7,5)	1041,7	14,8	15,5

- 5 El aditivo FortéBio Kinetics Buffer contiene 0,1 mg/ml de BSA como proteína de bloqueo, Tween® 20 a ~ 0,002 % en peso como tensioactivo, y azida de sodio a ~ 0,005 % en peso como agente antibacteriano. La Solución A es una solución acuosa que comprende hidrolizados básicos de caseína al 1,5 % en peso y azida de sodio al 0,08 % en peso, que previamente se había determinado que eran necesarios para una tinción FISH eficiente utilizando conjugados Qdot™-anticuerpo. Se llevó a cabo una evaluación inicial de estos aditivos mediante la formulación de variantes de tres sistemas tampón (PBS 10 mM, 10X PBS y borato 0,42 M) con hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso, trietanolamina 50 mM, Tween® 20 al 0,005 % en peso y ProClin® 300 al 0,008 % en peso sin ajuste de pH. La concentración de los hidrolizados básicos de caseína en % en peso se redujo inicialmente, en comparación con la concentración de caseína en la Solución A, para evitar la potencial agregación de proteínas. La concentración del tensioactivo se aumentó hasta alcanzar niveles por encima de concentración micelar crítica (CMC) (*es decir*, la concentración por encima de la cual se forman micelas de forma espontánea). Además, se evaluaron la Solución A, SEA BLOCK y MAXblock™ (un agente de bloqueo no mamífero en PBS, pH 7,4, con azida de sodio al 0,09 %, disponible de Active Motif® (Carlsbad, CA).
- 10
- 15 Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la FIGS. 6 a 8 y en las Tablas 5 y 6. La Tabla 5 proporciona las formulaciones tampón utilizadas en la Tabla 6. Los valores de datos de la Tabla 6 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia de la solución de Qdot™ con el tiempo.

Tabla 5

Tampón	Formulaciones de tampón
A	Sal tampón base
B	A + TEA 50 mM
C	A + hidrolizados básicos de caseína al 1,05 %
D	C + TEA 50 mM
E	C + ProClin 300 al 0,008 % + Tween 20 al 0,005 %
F	E + TEA 50 mM

Tabla 6

Tampón base	Formulación	pH	Fluorescencia de Qdot (655 nm)		
			4,0 h	7,75 h	22,75 h
PBS 10 mM	A	7,4	8,7	9,2	12,6
	B	9,3	12,4	12,2	14,2
	C	7,8	9,4	9,1	10,7
	D	9,1	2,4	1,9	2,1
	E	7,6	5,5	5,5	7,6
	F	9,2	3,5	2,7	2,7
10X PBS	A	7,5	7,6	8,6	13,3
	B	8,3	7,3	8,4	12,7
	C	7,9	2,3	1,8	3,1
	D	9,1	1,5	0,6	1,0
	E	7,9	1,8	1,6	3,1
	F	9,3	3,2	2,5	3,1
Borato 0,32 M	A	8,3	10,5	12,1	18,9
	B	8,8	8,6	9,4	12,6
	C	8,5	5,0	4,2	4,9
	D	9,0	1,8	0,9	0,6
	E	8,7	4,6	4,3	6,1
	F	8,9	7,1	6,2	6,6
Sea Block	n/d	7,5	0,5	1,7	6,3
MAX BLOCK	n/d	7,5	6,9	6,8	10,0
Solución A	n/d	7,5	2,9	2,5	3,4

Los resultados iniciales demostraron que la máxima estabilidad de la fluorescencia de la solución de Qdot™ se observó con la adición de trietanolamina 50 mM y de hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso. La estabilidad de fluorescencia fue más pronunciada en tampón borato 0,32 M. La adición de ProClin® 300 y Tween® 20 pareció depreciar el aumento observado en la estabilidad de fluorescencia.

5

Para confirmar que estas observaciones no estaban relacionadas con las variaciones del pH, la fluorescencia de soluciones de 50 nM de nanopartículas Qdot™ 655-30N se monitorizó en los tres sistemas tampón (0,1X PBS – pH 7,4, 1X PBS – pH 7,5 y borato 0,32 M – pH 8,3) con hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % y trietanolamina 50 mM, ambos con y sin Tween® 20 al 0,005 % y ProClin® 300 al 0,008 %. En cada caso, el pH se ajustó al pH del tampón "matriz". Los datos se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en la FIG. 9. Los valores de la Tabla 7 corresponden al porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo. Los valores negativos representan un aumento de la fluorescencia relativa.

10

Tabla 7

Tampón	Fluorescencia de Qdot (655 nm)		
	2,5 h	18,75 h	42,5 h
Borato 0,32 M	5,0	9,7	13,7
Borato 0,32 M + A	-1,8	-1,4	0,0
Borato 0,32 M + B	-3,3	-2,4	-3,0
PBS 10 mM + A	-3,9	2,4	4,8
PBS 10 mM + B	-0,5	4,6	7,6

10X PBS + A	5,1	10,7	13,2
10X PBS + B	-1,5	3,0	5,8
Solución A	3,9	7,7	10,6

A = hidrolizados básicos de caseína A al 1,05 % y TEA 50 mM

B = A + ProClin® 300 al 0,008 % y Tween® 20 al 0,005 %

La máxima estabilidad de fotoluminiscencia de Qdot™ se produjo con la adición de trietanolamina 50 mM y de hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso a un tampón borato 0,32 M.

- 5 Se examinaron adicionalmente los efectos de estos diluyentes sobre los conjugados Qdot™-anticuerpo. Se evaluó el cambio de fluorescencia relativa para nanopartículas Qdot™ 655-30N y para un conjugado Qdot™ 655-30N-Ms MAb en diversos tampones (Solución A, PBS 10 mM y borato 0,32 M) con varias combinaciones de aditivos (caseína al 1,05 %, TEA 50 mM, ProClin® 300 al 0,008 % y Tween® 20 al 0,005 %). Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la FIG. 10 y en las Tablas 8 y 9. La Tabla 8 proporciona las formulaciones tampón evaluadas en la FIG. 10 y en la Tabla 9. Los valores de datos de la Tabla 9 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 8

Diluyente	Formulaciones de tampón
A	Solución A
B	PBS 10 mM, caseína, TEA, pH = 7,5
C	Borato 0,32 M, caseína, TEA, pH = 8,3
D	Borato 0,32 M, caseína, ProClin 300, Tween 20, TEA, pH = 8,3

Tabla 9

Muestra	Diluyente	Fluorescencia de Qdot™ (655 nm)					
		2 h		16,5 h		25 h	
		400 nm	535 nm	400 nm	535 nm	400 nm	535 nm
Conjugado Qdot™ 655-30N-Ms MAb	A	6,07	5,83	6,07	5,04	7,48	7,06
	B	15,47	16,31	16,95	17,09	19,44	20,31
	C	13,49	14,30	9,90	9,82	15,87	16,40
	D	-2,17	-0,42	-7,36	-6,63	-8,11	-6,85
Nanocristales Qdot™ 655-30N	A	8,07	8,42	6,29	6,95	10,25	10,72
	B	16,60	17,10	14,52	15,45	19,95	20,19
	C	7,92	7,67	4,04	3,44	7,53	7,24
	D	3,81	3,87	3,35	3,75	7,20	7,85

- 15 Estos resultados mostraron que la estabilidad de fluorescencia era comparable a la de conjugados Qdot™-anticuerpo. En el caso del conjugado Qdot™ 655-30N-Ms MAb, el tampón borato 0,32 M con hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % y trietanolamina 50 mM, Tween® 20 al 0,005 % y ProClin® 300 al 0,008 % (FIG. 10, Tabla 9) proporciona una estabilidad mayor que el resto de los tampones y se eligió como el tampón de base para desarrollar el Tampón de la Estabilización Qdot™ (QSB).

Ejemplo 4

Efecto del pH y la molaridad del tampón borato sobre la estabilidad de Qdot™

La estabilidad de fluorescencia de una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 565-30N se exploró usando tampón borato con molaridades de sales de borato variables. La molaridad de borato se varió de 0,025 M a 0,42 M mientras se mantenía el pH = 8,3. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. La excitación se realizó a 400 nm, y se repitió a 475 nm para confirmar los resultados. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10 y en la FIG. 11. Los valores a 0 h de la Tabla 10 son los valores iniciales de fluorescencia. Los valores de los datos para otros puntos de tiempo se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 10

Molaridad de borato		Fluorescencia de Qdot™ (565 nm)					
		0,42 M	0,3 M	0,2 M	0,1 M	0,05 M	0,025 M
0 h	400 nm	88,522	62,172	89,555	79,213	73,916	97,579
1,0 h	475 nm	22,3	21,3	18,1	16,7	13,6	17,4
	400 nm	20,1	20,4	16,9	15,8	12,7	16,9
3,5 h	475 nm	34,6	28,4	29,2	23,8	17,0	19,0
	400 nm	32,4	27,5	27,9	22,6	16,4	19,2
6,0 h	475 nm	35,4	26,7	30,5	25,1	18,9	20,9
	400 nm	33,5	26,2	29,2	24,1	17,6	19,9
24,5 h	475 nm	37,9	26,8	33,9	27,3	18,3	23,4
	400 nm	35,6	25,8	32,8	26,3	17,3	23,2
29,5 h	475 nm	39,0	27,4	35,9	29,0	20,5	25,0
	400 nm	37,2	26,2	35,2	27,8	19,2	25,3

Parece que la molaridad de borato tiene muy poco efecto sobre la estabilidad de fluorescencia de los nanocristales Qdot™ 565-30N con el tiempo. Cualquier cambio en la fluorescencia de Qdot™ fue rápido y se produjo principalmente en las primeras 3 horas. Una menor concentración de sal puede ayudar a estabilizar las proteínas y a minimizar la agregación. Se eligió una concentración de borato de 50 mM para examinar otras variables.

A continuación, la estabilidad de fluorescencia de una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 565-30N se exploró adicionalmente en tampón borato 50 mM con pH variable. El pH del tampón borato se varió entre pH = 7,0 y 9,5 para optimizar la estabilidad de la fotoluminiscencia de Qdot™. La concentración de sal de borato se mantuvo en 50 mM con respecto a los resultados anteriores de la Tabla 10. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados del experimento se muestran a continuación en la Tabla 11 y en la FIG. 12. Los valores a 0 h de la Tabla 11 son los valores iniciales de fluorescencia. Los valores de los datos para otros puntos de tiempo se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 11

pH del tampón		Fluorescencia de Qdot™ (565 nm)						
		7,0	7,5	8,0	8,3	8,5	9,0	9,5
0 h	400 nm	140,684	125,188	69,484	100,586	85,879	80,797	93,217
1,0 h	475 nm	15,9	23,7	19,5	13,6	13,8	15,5	14,6
	400 nm	17,2	22,0	15,8	12,7	13,0	14,6	13,7
3,5 h	475 nm	21,9	24,2	12,9	17,0	18,5	21,6	25,1
	400 nm	23,4	24,0	10,4	16,4	17,7	20,2	23,6
6,0 h	475 nm	23,0	27,0	11,7	18,9	19,5	21,7	26,5
	400 nm	24,5	26,8	8,5	17,6	19,1	20,9	25,3
24,5 h	475 nm	28,6	26,6	7,8	18,3	22,3	23,3	33,6
	400 nm	30,0	25,8	5,2	17,3	21,2	22,0	32,1
29,5 h	475 nm	30,2	28,9	10,4	20,5	24,5	25,4	34,2
	400 nm	32,2	28,2	8,4	19,2	23,9	24,2	33,4

5 A medida que el pH del tampón se redujo, se observó una disminución en la estabilidad de fluorescencia con el tiempo. Cuando se redujo el pH, se produjo una disminución continua de la fluorescencia de Qdot™; sin embargo, a un pH más aceptable, la fotoluminiscencia era estable. La estabilidad óptima del pH se observó a pH = 8,0. Un intervalo adecuado para conjugados Qdot™-anticuerpo sería de 8 a 9.

Ejemplo 5

Efecto de la concentración y la fuente de proteínas sobre la estabilidad de Qdot™

10 Estudios de estabilidad anteriores mostraron que la agregación de proteínas era responsable del agotamiento de los conjugados Qdot™-anticuerpo de la solución. Por lo tanto, los experimentos se diseñaron para determinar la concentración más baja a la que la caseína aún tendría una influencia sobre la estabilidad de fluorescencia. La estabilidad de la fluorescencia de una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 565-30N se exploró usando tampón borato 50 mM a pH = 8,3 con la concentración de hidrolizados básicos de caseína variando del 0,066 % en peso al 1,05 % en peso. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12 y en la FIG. 13. Los valores a 0 h de la Tabla 12 son los valores iniciales de fluorescencia. Los valores de los datos para otros puntos de tiempo se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 12

% en peso Caseína		Fluorescencia de Qdot (565 nm)							
		1,05	0,79	0,53	0,26	0,13	0,066	A	B
0 h	400 nm	250,1910	240,0527	247,4338	255,3527	237,4321	251,7085	244,9113	222,9374
0,75 h	475 nm	4,3	4,2	2,7	2,8	2,5	1,2	8,3	9,2
	400 nm	4,1	4,1	2,3	2,4	1,9	1,0	7,3	8,2
1,5 h	475 nm	8,2	8,8	5,8	5,9	4,3	4,1	9,8	13,2
	400 nm	8,2	8,2	5,6	5,8	4,2	4,0	9,3	12,2
2,0 h	475 nm	10,5	11,3	6,7	6,9	5,6	4,6	11,1	14,3
	400 nm	9,9	10,9	5,8	6,8	5,4	4,4	10,2	13,8
18,25 h	475 nm	13,7	14,1	11,3	11,0	7,8	5,7	13,1	15,7
	400 nm	12,5	12,5	10,2	9,9	7,0	4,6	11,0	14,2

19,25 h	475 nm	18,5	21,0	13,9	15,3	12,9	8,7	16,9	19,9
	400 nm	17,9	20,3	13,0	14,6	11,9	8,3	15,3	18,6
22,75 h	475 nm	21,9	24,7	17,1	17,7	15,6	11,1	19,4	22,7
	400 nm	20,7	23,8	15,7	17,0	14,7	10,5	17,6	21,5
23,75 h	475 nm	24,6	29,4	16,6	19,8	18,0	12,3	21,1	24,6
	400 nm	23,6	28,2	15,8	18,9	16,9	12,0	19,8	23,4

A: Tampón borato 50 mM; B: Tampón borato 0,42 M

La variación de la concentración de hidrolizados básicos de caseína tenía una influencia sobre la estabilidad de fluorescencia de nanocristales Qdot™ 565-30N. Las composiciones que contienen cantidades más pequeñas de caseína proporcionan mayor estabilidad de fluorescencia.

- 5 Otras fuentes de proteínas al 1,05 % en peso en tampón borato 50 mM a pH = 8,3 se examinaron como sustitutos potenciales de hidrolizados básicos de caseína. Las fuentes de proteínas se enumeran en la Tabla 13. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y en la FIG. 14. Los valores de datos de la Tabla 14 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

10

Tabla 13

Diluyente	Fuente de proteínas	Diluyente	Fuente de proteínas
1	Triptona vegetal	9	Peptona de salmón
2	Hidrolizado ácido de proteína vegetal	10	Peptona de tipo I
3	Hidrolizado ácido de proteína de soja	11	Proteína globulina de cabra
4	Glicina peptona máx.	12	Hidrolizado de albúmina de pollo
5	Hidrolizado ácido de caseína	13	Albúmina de suero bovino
6	Peptona de caseína	14	Tampón borato 50 mM
7	Hidrolizado enzimático de gelatina	15	Tampón borato 0,42 M
8	Gelatina de piel de pescado		

Tabla 14

		Fluorescencia de Qdot (565 nm)														
Tampón proteína	de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1,0 h	475 nm	13,9	21,2	26,3	18,8	17,4	22,0	22,0	17,2	9,5	27,0	12,9	17,0	27,1	9,0	13,1
	400 nm	12,6	19,3	24,7	17,5	15,4	20,4	20,3	16,0	9,2	25,5	12,7	15,0	26,2	7,7	11,6
18,0 h	475 nm	26,8	38,2	54,1	35,3	27,5	41,5	38,3	27,5	27,4	51,9	35,5	27,2	42,2	13,0	25,7
	400 nm	24,7	35,6	54,6	32,8	25,5	39,3	36,4	26,2	25,9	50,4	34,5	24,9	39,7	11,7	24,3
40,75 h	475 nm	28,2	40,9	61,5	38,7	28,0	40,3	36,2	25,7	28,5	52,4	36,3	29,2	45,9	17,6	28,4
	400 nm	25,3	37,9	61,9	36,0	25,2	37,8	33,6	23,9	26,9	50,3	34,7	26,4	43,2	16,1	26,1

A una concentración de proteínas del 1,05 % en peso, las fuentes de proteínas con el mejor potencial como sustitutos de hidrolizados básicos de caseína fueron triptona vegetal, hidrolizados ácidos de caseína y gelatina de piel de pescado.

Ejemplo 6

Efecto de los tensioactivos sobre la estabilidad de Qdot™

5 Debido a las preocupaciones relacionadas con la posible agregación de proteínas y conjugados Qdot™-anticuerpo, se investigó el uso de tensioactivos para impedir la agregación y estabilizar aún más los nanocristales Qdot™. La estabilidad de la fluorescencia de una solución 50 nM de nanocristales Qdot™ 565-30N se exploró usando tampón borato 50 mM a pH = 8,3 con concentraciones variables de Tween® 20. La concentración de Tween® 20 se varió del 0,0025 % en peso al 0,20 % en peso. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 15 y en la FIG. 15. Los valores a 0 h de la Tabla 15 son los valores iniciales de fluorescencia. Los valores de los datos para otros puntos de tiempo se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 15

		Fluorescencia de Qdot (565 nm)						
% en peso de Tween 20		0,20	0,10	0,050	0,010	0,0050	0,0025	Borato
0 h	400 nm	84,497	102,604	92,132	113,090	84,949	127,598	73,916
	475 nm	17,7	16,1	15,5	13,9	22,6	19,7	13,6
1,0 h	400 nm	16,8	16,4	15,8	13,5	22,1	18,1	12,7
	475 nm	23,4	24,3	19,1	19,8	24,3	25,6	17,0
3,5 h	400 nm	22,3	24,8	19,4	19,9	23,2	24,8	16,4
	475 nm	25,7	27,7	20,5	22,5	24,4	28,2	18,9
6,0 h	400 nm	25,7	28,4	21,0	22,7	24,1	27,4	17,6
	475 nm	32,6	35,1	23,4	28,1	24,8	33,6	18,3
24,5 h	400 nm	32,3	35,9	24,1	28,1	24,1	32,4	17,3
	475 nm	34,8	38,7	26,0	31,4	28,1	36,0	20,5
29,5 h	400 nm	34,8	39,6	26,5	31,5	27,7	35,5	19,2

15 La concentración de Tween 20® tuvo un cierto efecto sobre la estabilidad de fluorescencia de nanocristales Qdot™ 565-30N. La adición de cualquier cantidad de Tween® 20 a una solución de tampón borato 50 mM a pH = 8,3 redujo la estabilidad de fluorescencia relativa en comparación con el tampón borato solo. Tween® 20 parece ser más tolerable cuando la concentración se mantiene entre 0,005 y 0,05 % en peso. Una concentración de Tween® 20 del 0,05 % en peso podría potencialmente proporcionar mayor estabilidad de fluorescencia para conjugados Qdot™-anticuerpo que una concentración de 0,005 % en peso. Se contempla que el tensioactivo estabiliza la proteína, evitando de esta manera la agregación de Qdot™.

20 Dado que Tween® 20 parece tener un impacto negativo sobre la estabilidad de fluorescencia de nanocristales Qdot™ 565-30N en tampón borato 50 mM a pH 8,3, se examinaron otros tensioactivos como posibles alternativas. En experimentación previa, se descubrió que los nanocristales Qdot™ son más estables con tensioactivos no iónicos. Se formularon una variedad de tensioactivos no iónicos a una concentración del 0,05 % en peso en tampón borato 50 mM a pH 8,3. Los tensioactivos se enumeran en la Tabla 16. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y en la FIG. 16. Los valores a 0 h de la Tabla 17 son los valores iniciales de fluorescencia. Los valores de los datos para otros puntos de tiempo se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo.

Tabla 16

Tampón	Tensioactivo	Tampón	Tensioactivo
1	Tween 20	6	Tergitol 15-S-7
2	Tween 40	7	Tergitol 15-S-9
3	Tween 80	8	Barnet BT-9
4	Triton X-100	9	Borato 50 mM
5	Brij 35	10	Borato 0,42 M

Tabla 17

		Fluorescencia de Qdot (565 nm)									
Tensioactivo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0 h	400 nm	251,6299	254,3890	253,7050	220,4611	237,6370	221,1766	224,6263	226,9742	219,5009	208,3340
	475 nm	7,8	13,1	10,4	9,3	9,7	13,0	8,5	11,8	14,6	21,9
1,25 h	400 nm	8,3	12,7	10,1	9,1	9,3	13,0	8,8	11,4	13,4	20,6
	475 nm	21,6	34,8	28,2	20,5	18,1	31,8	22,6	28,4	20,7	33,8
18,25 h	400 nm	20,8	34,0	27,4	19,9	17,5	30,7	22,1	27,8	19,2	32,2
	475 nm	22,6	36,8	30,4	20,9	18,8	32,7	23,3	30,2	21,4	36,4
19,0 h	400 nm	21,7	35,6	29,3	20,9	18,2	31,8	23,1	29,2	20,7	34,6
	475 nm	22,2	36,8	30,4	20,9	18,8	32,7	23,3	30,2	21,4	36,4
25,75 h	400 nm	21,7	35,6	29,3	20,9	18,2	31,8	23,1	29,2	20,7	34,6
	475 nm	23,7	39,8	34,3	22,4	20,2	35,7	25,1	32,8	23,2	39,0
26,5 h	400 nm	22,7	38,9	33,6	21,9	19,6	34,8	25,2	32,2	22,4	37,6
	475 nm	24,3	42,1	37,3	24,2	21,6	37,7	27,2	34,9	24,3	39,6
42,0 h	400 nm	23,9	41,7	36,6	23,5	20,7	36,6	27,1	34,1	23,4	38,3
	475 nm										

5 Brij 35 (polioxietilenglicol dodecil éter) al 0,05 % en peso, proporcionó mejor estabilidad de fluorescencia que Tween® 20 y estabilizó los nanocristales en mayor medida que el tampón borato 50 mM solo. Triton® X-100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter) proporcionó una influencia de fluorescencia comparable a Tween® 20.

Ejemplo 7

Formulación inicial del tampón de estabilización de Qdot™ (QSB)

10 Utilizando los ingredientes activos utilizados para evaluar la estabilidad de conjugados Qdot™ 655-anticuerpo mostrados en la FIG. 10 (Tabla 8), se utilizó la siguiente formulación inicial de QSB basada en tampón borato 0,42 M a pH = 8,3. A continuación se describe la formulación para 100 ml de tampón:

75 ml de tampón borato 0,42 M, pH = 8,3 (conc. final de borato de ~ 0,32 M)

25 ml de hidrolizados básicos de caseína (42 mg/ml de caseína, conc. final de caseína de ~ 1,05 % en peso)

664 µl de trietanolamina (~ 50 mM)

8 µl de ProClin® 300 (~ 0,01 % en peso)

5 µl de Tween® 20 (~ 0,005 % en peso)

Se formularon y evaluaron variaciones posteriores, como se describe en los siguientes ejemplos.

5 *Ejemplo 8*

Efecto de los reactivos antibacterianos sobre la estabilidad de Qdot™

A. Estabilidad de nanopartículas Qdot™-30N y sus conjugados en QSB con ProClin® 300 al 0,05 % o 0,01 %.

10 Inicialmente, se seleccionó ProClin® 300 al 0,01 % en peso, pero no proporcionó una protección antibacteriana adecuada. Los estudios demostraron que una concentración de 0,05 % en peso proporciona una protección adecuada. Posteriormente, se prepararon formulaciones QSB que comprenden 0,007 % y 0,05 %, y se evaluó el efecto de la concentración de ProClin® 300 sobre la fluorescencia de Qdot™.

Se prepararon tres tampones:

A: Solución A (hidrolizados básicos de caseína al 1,5 % en peso, azida de sodio al 0,08 % en peso)

B: QSB con ProClin® 300 al 0,007 % ("borato parcial")

15 C: QSB con ProClin® 300 al 0,05 % ("borato total")

Los datos se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral ThermoFisher Varioskan. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 18 y 19 y en las FIGS. 17-18. Los valores de datos de las Tablas 18 y 19 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo. Los valores negativos indican un aumento de la fluorescencia.

20

Tabla 18

Muestra	Tampón	Fluorescencia de Qdot (565 nm)					
		t = 2,0 h		t = 17,25 h		t = 42,25 h	
		400 nm	500 nm	400 nm	500 nm	400 nm	500 nm
Nanocristal Qdot 565-30N	A	19,50	18,56	18,95	17,86	20,51	19,77
	B	3,82	3,32	0,25	-0,04	3,75	3,45
	C	5,89	4,37	1,72	0,90	8,49	7,97
Conjugado Qdot 565-30N-Ms MAb	A	12,16	10,14	4,18	2,63	6,09	3,65
	B	8,18	6,08	-5,88	-6,87	-6,62	-7,60
	C	9,03	7,40	-2,26	-2,95	4,95	3,26

Tabla 19

Muestra	Tampón	Fluorescencia de Qdot (655 nm)					
		t = 2,0 h		t = 17,25 h		t = 42,25 h	
		400 nm	500 nm	400 nm	500 nm	400 nm	500 nm
Nanocristal Qdot 655-30N	A	19,50	18,56	15,19	14,77	19,41	18,56
	B	3,82	3,32	4,75	4,69	12,42	11,77

	C	5,89	4,37	14,94	14,32	24,03	23,15
Conjugado Qdot 655-30N-Ms MAb	A	12,16	10,14	14,11	12,91	14,41	13,28
	B	8,18	6,08	-5,07	-6,70	-3,61	-5,47
	C	9,03	7,40	-1,61	-2,72	-2,30	-3,76

El análisis de la señal fluorescente de nanopartículas Qdot™ y sus conjugados en solución a temperatura ambiente mostró que un aumento de los niveles de ProClin® 300 del 0,01 % en peso al 0,05 % en peso en QSB causó una disminución de la estabilidad de fluorescencia observada respecto a todos los materiales Qdot™. Ambas composiciones QSB proporcionaron un cambio en la fluorescencia observada menor que la Solución A para los nanocristales Qdot™ 565. Sin embargo, para los nanocristales Qdot™ 655, el QSB con ProClin® 300 al 0,05 % en peso produjo mayor pérdida de fluorescencia que la Solución A. En el caso del conjugado Qdot™ 655-30N-Ms MAb, el aumento de la concentración de ProClin® 300 del 0,01 % en peso al 0,05 % en peso en QSB causó solamente una pequeña disminución de la estabilidad de fluorescencia. Sin embargo, para la conjugado Qdot™ 565-30N-Ms MAb, el QSB con ProClin® 300 al 0,05 % en peso fue comparable a la Solución A.

10 B. Estabilidad de nanopartículas Qdot™-30N en QSB con ProClin® 300 al 0,05 % o azida de sodio al 0,08 %

El intervalo de estabilidad de pH eficaz en la bibliografía para ProClin® 300 es de pH = 3,0 a 8,5 (por ejemplo, según Sigma-Aldrich). A un pH cercano o por encima de pH = 8,5, las propiedades antibacterianas eficaces de ProClin® 300 se reducen. La caída adicional de la estabilidad de fluorescencia observada para nanocristales Qdot™ en QSB con ProClin® 300 al 0,05 % en peso dio lugar a la investigación del uso de azida de sodio al 0,08 % como un sustituto. Dado que no existían diferencias en la estabilidad de fluorescencia observada para nanocristales Qdot™ 565 y Qdot™ 655-30N con ProClin® 300, la influencia de estos reactivos se examinó en nanocristales Qdot™ adicionales a temperatura ambiente. Las nanopartículas Qdot™-30N se evaluaron en QSB con ProClin® 300 al 0,05 % en peso o con azida de sodio al 0,08 % en peso. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan. Los datos se muestran a continuación en las Tablas 20A-B y en las FIGS. 19-22. Los valores de datos de las Tablas 20A-B se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo. Los valores negativos indican un aumento de la fluorescencia.

Tabla 20A

Qdot™	t = 1,75 h		t = 17,25 h		t = 18,0 h	
	Azida	ProClin® 300	Azida	ProClin® 300	Azida	ProClin® 300
525	-1,63	1,30	0,72	-0,11	0,42	-0,88
565	3,46	8,43	1,82	5,87	3,23	6,98
585	5,21	10,32	7,25	10,12	10,16	12,68
605	1,06	7,13	2,93	6,35	4,28	8,54
625	0,62	3,98	-2,31	0,79	0,38	3,18
655	5,57	14,45	2,07	10,53	5,21	14,42
705	4,56	9,23	-1,28	4,49	1,76	7,59
800	-6,38	-4,89	-17,41	-14,85	-14,95	-11,09

Tabla 20B

Qdot™	t = 25,0 h		t = 42,0 h	
	Azida	ProClin® 300	Azida	ProClin® 300
525	3,47	1,96	7,39	4,02
565	7,03	8,73	8,33	9,43
585	15,66	16,33	19,10	17,68
605	7,71	11,16	10,90	13,07
625	3,08	5,22	3,60	5,81
655	8,30	19,28	9,26	21,10
705	4,46	10,48	5,87	12,69
800	-12,62	-6,62	-13,24	-5,79

Se observó un menor cambio en la fotoluminiscencia relativa de nanocristales Qdot™ en el QSB que contenía azida de sodio al 0,08 % en peso que en el QSB que contenía ProClin® 300 al 0,05 % en peso. Además, la tasa relativa de cambio varió para cada nanocristal Qdot™. La mayor pérdida de fluorescencia observada se obtuvo con nanocristales Qdot™ 585-30N. Se produjo un incremento neto de la fluorescencia relativa en los nanocristales Qdot™ 800-30N.

C. Estabilidad de conjugados Qdot™-30N-Ms MAb en QSB con ProClin® 300 al 0,05 % o azida de sodio al 0,08 %

La fluorescencia relativa de tres conjugados Qdot™ de anticuerpos se examinaron en la Solución A o QSB que contenía azida de sodio al 0,08 % en peso o ProClin® 300 al 0,05 % en peso a temperatura ambiente. Para proporcionar la influencia máxima en la fluorescencia observada, para este experimento se seleccionaron conjugados Qdot™ 800 y Qdot™ 585-30N-Ms MAb. Estos conjugados se compararon con el conjugado Qdot™ 565-30N-Ms MAb para evaluar la coherencia de los conjuntos de datos con respecto a los conjuntos de datos anteriores. La excitación se realizó a 400 nm. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan. Los datos se muestran a continuación en la Tabla 21 y en la FIG. 23. Los valores de datos de la Tabla 21 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo. Las lecturas de fluorescencia para los tres conjugados se tomaron a 565 nm, 585 nm y 800 nm, respectivamente. Los valores negativos indican un aumento de la fluorescencia.

Tabla 21

Conjugado Qdot XXX-30N-Ms MAb	Diluyente del conjugado	Fluorescencia de Qdot (% de cambio)				
		1,25 h	3,25 h	7,0 h	23,5 h	24,5 h
565	A	11,18	13,50	18,78	16,99	19,93
565	B	10,47	10,58	14,51	17,57	19,98
565	C	7,30	7,62	13,77	16,23	20,39
585	A	10,44	13,28	17,84	17,96	19,46
585	B	10,08	11,26	15,77	17,51	19,60
585	C	7,47	8,76	12,94	15,80	17,80
800	A	-12,52	-13,53	-9,67	-18,66	-13,36
800	B	-11,70	-14,47	-10,82	-18,87	-14,71
800	C	-14,01	-16,13	-12,53	-19,76	-14,51

Se observó un cambio similar en la fluorescencia para los conjugados Qdot™-anticuerpo con respecto a los datos de los nanocristales de la Tabla 19. La mayor pérdida de fluorescencia observada se obtuvo con el conjugado Qdot™ 585-30N-Ms MAb. Se observó un aumento de la fluorescencia relativa para el conjugado Qdot™ 800-30N-Ms MAb. Para cada conjugado Qdot™-anticuerpo existía un tampón diferente en el que produjo la menor disminución de la fluorescencia. Además, se observó una sedimentación neta de material para algunos conjugados. En el caso de los conjugados Qdot™ 585 y Qdot™ 800, la mezcla aumentó la fluorescencia relativa de la muestra. Claramente, la agregación y la sedimentación de estos conjugados se están produciendo en solución en condiciones diluidas.

Ejemplo 9

Estabilidad de conjugados Qdot™ 565-30N-30N-MsAntiNP en tampones de estabilización de Qdot™ deconstruidos

Se realizó un estudio para examinar el cambio relativo en la fluorescencia observada de conjugados Qdot™-anticuerpo en versiones deconstruidas del QSB que contenían azida de sodio al 0,08 % en peso. En cada caso, el tampón QSB se reformuló mediante la eliminación de un único componente del tampón y realizando pruebas frente a los mismos conjugados Qdot™-30N-Ms MAb que en el Ejemplo 8C. Los datos de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas multimodo de barrido espectral Varioskan. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 22 y 23 y en las FIGS. 24 y 26. En la FIG. 24, $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 565 \text{ nm}$; en la FIG. 25, $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$; en la FIG. 26, $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$. Los valores de datos de la Tabla 22 se representan como el porcentaje de disminución de la fluorescencia con el tiempo. Los valores negativos indican un aumento de la fluorescencia.

Tabla 22

Conjugado Qdot	Formulaciones de tampón	1,75 h	20,75 h	25,0 h	CLASIFICACIÓN FINAL
Qdot 565-30N-Ms Mab	A	18,40	26,15	20,05	6
	B	0,84	-0,69	-3,14	2
	C	3,41	5,98	6,74	4
	D	4,07	2,26	0,91	3
	E	-0,71	-3,41	-7,83	1
	F	18,36	20,92	10,43	5
Qdot 585-30N-Ms Mab	A	14,37	20,58	14,35	5
	B	4,81	3,53	-1,75	1
	C	2,95	3,27	-0,62	2
	D	5,63	4,81	1,40	4
	E	6,14	5,74	-0,13	3
	F	18,60	24,00	15,74	6
Qdot 800-30N-Ms Mab	A	-8,57	-17,79	-13,69	4
	B	-16,00	-24,48	-18,25	2
	C	-19,04	-23,40	-12,58	5
	D	-20,30	-26,56	-18,34	1
	E	-17,84	-23,81	-15,42	3
	F	0,49	-0,04	7,04	6

Tabla 23

Formulaciones de tampón	Puntuación total	Clasificación final
A: Tampón borato 50 mM	15	5
B: Nuevo tampón de estabilización de Qdot	5	1
C: Nuevo tampón de estabilización de Qdot sin azida de sodio	11	4
D: Nuevo tampón de estabilización de Qdot sin Tween 20	8	3
E: Nuevo tampón de estabilización de Qdot sin trietanolamina	7	2
F: Nuevo tampón de estabilización de Qdot sin hidrolizados básicos de caseína	17	6

En cada caso, los tampones se clasifican de 1 (mejor) a 6 (peor) en relación con el cambio global de fluorescencia del conjugado. Se creó un valor total sumando las puntuaciones para los tres conjugados. En la Tabla 23 se muestra un resumen de la clasificación final. Para todos los conjugados Qdot™-30N-Ms MAb, se observó una tendencia similar en el cambio de fluorescencia relativa para cada sistema tampón con pequeñas variaciones en el orden de clasificación. En general, el mejor tampón fue el tampón de estabilización de Qdot™ que contiene azida de sodio al 0,08 % en peso. En un par de casos, el tampón QSB con un componente eliminado proporcionó un resultado mejor que el QSB completo debido a las características de estabilidad individuales de cada nanocristal Qdot™, como se discutió anteriormente. En ambos casos, el QSB completo proporcionó el segundo mejor resultado. El componente principal que parece tener la mayor influencia en la estabilidad de los conjugados Qdot™-anticuerpo son los hidrolizados básicos de caseína. En la Tabla 6 se demostró en varios tampones que la intensidad de la señal de fluorescencia de Qdot™ se estabiliza en la solución mediante adición de hidrolizados básicos de caseína. Esto se demostró de nuevo en el control de pH de los diluyentes.

Varios componentes, incluyendo trietanolamina, hidrolizados básicos de caseína, Tween® 20 y azida de sodio, parecen aumentar la fluorescencia de al menos algunos Qdot™ y conjugados de Qdot™. Por ejemplo, una composición QSB que comprende trietanolamina 50 mM aumentó la fluorescencia inicial de un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms MAB en un 6 % con respecto a una composición QSB con la misma composición excepto por la ausencia de trietanolamina. Después de 25 horas, la fluorescencia del conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab en la composición QSB con trietanolamina era un 10 % mayor que la fluorescencia en la composición QSB sin trietanolamina.

Un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB que comprende hidrolizados básicos de caseína al 1,05 % en peso durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 14 % mayor que la fluorescencia de un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con la misma composición excepto por la ausencia de hidrolizados básicos de caseína. Del mismo modo, un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con hidrolizados básicos de caseína durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 20 % mayor que la fluorescencia en una composición QSB sin hidrolizados básicos de caseína, y un conjugado Qdot™ 585-30N-Ms Mab tenía una fluorescencia que era un 27 % mayor que la fluorescencia en una composición QSB sin hidrolizados básicos de caseína. La presencia de hidrolizados básicos de caseínas estabiliza la fluorescencia, minimizando la agregación de puntos cuánticos y manteniendo la solubilidad de los puntos cuánticos en la solución.

Un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con Tween® 20 al 0,005 % en peso tenía una fluorescencia inicial que era un 6 % mayor que la fluorescencia de un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con la misma composición excepto por la ausencia de Tween® 20. El conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con Tween® 20 al 0,005 % en peso durante 25 horas también tenía una fluorescencia que era un 6 % mayor que la fluorescencia en una composición QSB sin Tween® 20. Un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB que comprende Tween® 20 al 0,005 % en peso durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 6 % mayor que la fluorescencia de un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB sin Tween® 20. Un conjugado Qdot™ 585-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB que comprende Tween® 20 al 0,005 % en peso durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 5% mayor que la fluorescencia de un conjugado Qdot™ 585-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB sin Tween® 20.

Un conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con azida de sodio al 0,08 % en peso tenía una fluorescencia inicial que era un 6 % mayor que la fluorescencia en una composición QSB sin azida de sodio. El conjugado Qdot™ 800-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con azida de sodio al 0,08 % en peso

5 durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 14 % mayor que la fluorescencia en una composición QSB sin azida de sodio. Un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB que comprende azida de sodio al 0,08 % en peso durante 25 horas tenía una fluorescencia que era un 14 % mayor que la fluorescencia de un conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Mab almacenado en una composición QSB con la misma composición excepto por la ausencia de azida de sodio.

Ejemplo 10

Formulación final del tampón de estabilización de Qdot™

La formulación final del QSB se muestra a continuación para una alícuota de QSB de 100 ml que contiene azida de sodio al 0,08 % en peso. El pH final se ajustó a pH = 8,3.

- 10 75 ml de tampón borato 0,42 M, pH = 8,3 (conc. final de borato de ~ 0,32 mM)
 25 ml de hidrolizados básicos de caseína (42 mg/ml de caseína madre, conc. final de ~ 1,05 % en peso)
 664 µl de trietanolamina (~ 50 mM)
 80 mg de azida de sodio (~ 0,08 % en peso)
 5 µl de Tween® 20 (~ 0,005 % en peso)

15 Ejemplo 11

Tinción de conjugados Qdot™-anticuerpo

A. Parámetros para evaluar la tinción de conjugados Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno

20 El rendimiento funcional del conjugado Qdot™ 565-30N-SMCC-Ms Anti-Hapteno se evaluó en un ensayo de FISH diluido en tampón de estabilización de Qdot™ (QSB) o en Solución A. El ensayo de FISH se realizó de manera completamente automatizada en un instrumento BenchMark XT.

Muestra de ensayo: se utilizó una sección de xenoinjerto FFPET (tejido embebido en parafina y fijado en formalina) de 4 µm de espesor determinada para exhibir una translocación genómica correlacionada con el cáncer de próstata. La línea celular de cáncer de próstata se originó de la metástasis vertebral de un caso de cáncer de próstata. Las células presentan polisomía, rotura 3'-ERG-5'-ERG y amplificación 3'-ERG.

25 Ensayo de FISH: la hibridación se realizó a 52 °C durante 8 h, y los lavados de astringencia se realizaron a 72 °C en 2X SSC (3 x 8 min).

Sonda: se usó una sonda de 5'-ERG-hapteno de agotamiento repetido a una concentración de 40 µg/ml.

30 Detección: la solución de conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno se diluyó a una concentración de 50 nM en QSB (formulación del Ejemplo 10) o en la Solución A. Después de la formulación, la solución de conjugado diluida se almacenó a 4 °C. Las muestras se sometieron mensualmente a ensayo FISH automatizado en un instrumento BenchMark XT. Se obtuvieron imágenes espectrales compuestas a una magnificación de 40x.

B. Resultados de la tinción del conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno en el tampón de estabilización de Qdot™ (QSB)

35 El conjugado Qdot™ 565-30N-Ms Anti-Hapteno produce una señal FISH más brillante en QSB durante todo el período de tiempo de 6 meses observado. Las representaciones de la tinción FISH de tejidos se encuentran en las FIGS. 27-33. Las FIGS. 27-33 son imágenes espectrales combinadas (IEC) a una magnificación 40X. La FIG. 34 es una imagen FISH estándar. (Una imagen FISH es una imagen secuencial adquirida con filtros micrónicos de banda estrecha. La imagen de IEC es una imagen espectral compuesta de adquisición de todo el espectro visible a intervalos regulares de muestreo.) Los resultados en QSB y en la Solución A se evaluaron a 0 días (FIGS. 27-28), a 1 mes (FIGS. 29-30) y a 3 meses (FIGS. 31-32). Las FIGS. 33-34 ilustran los resultados en QSB a los 6 meses. En el punto de tiempo de 1 mes, la intensidad de la señal FISH comenzó a disminuir notablemente para el conjugado en la Solución A. El QSB mantuvo la intensidad de la señal original hasta el punto de tiempo de 3 meses. A los 6 meses se detectó un leve descenso de la intensidad de la señal.

45 La tinción se evaluó utilizando criterios de puntuación de la patología. Una señal positiva se considera como una mancha brillante y redonda (diámetro de ~ 0,1 µm – 0,5 µm) en el núcleo de las células. Las manchas aparecen en un fondo oscuro, y se presentan como una configuración única, doble o múltiple. La intensidad de la luminosidad en un campo

oscuro se puntuó en una escala de 0 a 3, como se indica en la Tabla 24. En la Tabla 25 se proporciona un resumen de los resultados.

Tabla 24

Puntuación	Criterios de puntuación
3+	Señal muy fuerte y luminosa en todo el campo de visión, prácticamente cualquier núcleo contiene la señal
2+	Luminosidad media en todo el campo de visión, prácticamente cualquier núcleo contiene la señal
1+	Baja luminosidad, y presente sólo de manera focal

Tabla 25

Punto de tiempo	Diluyente de tinción	
	QSB	Solución A
0 días	3+	3+
1 mes	3+	2+
2 meses	2+	1+
3 meses	3+	0
4 meses	2+	0
5 meses	2+	0
6 meses	2+	0

5 La puntuación de patología se realizó en una escala de 0 a 3, en la que 3 representa la mayor intensidad de la señal.

10 Además de los resultados de tinción presentados anteriormente, se analizaron todas las muestras que no pudieron proporcionar una tinción adecuada para los posibles cambios en su fluorescencia, actividad cinética de anticuerpos y agregación. En ninguno de los casos de fracaso se observaron cambios significativos en la luminiscencia relativa o longitud de onda para la emisión fluorescente en cualquier tampón. Además, el análisis de las muestras por interferometría de biocapa (BLI) no reveló ninguna pérdida significativa de la avidéz del anticuerpo por el marcador de la sonda con haptenos.

15 Se evaluaron dos conjugados en la Solución A en condiciones de estrés. Una alícuota del conjugado en las condiciones de estrés se dispensó y cubrió en un portaobjetos. Las muestras se sometieron a estrés durante 10 días a 37 °C, y se almacenaron a 4 °C. Se observó que se formaban agregados discretos del conjugado en la muestra, y que se reducía la tinción. La agregación inhibe muy probablemente la tinción al limitar la cantidad de reactivo en la solución y al hacer que el conjugado sea demasiado grande para entrar en una célula. Por el contrario, cuando se evaluaron conjugados de Qdot™ en tampón QSB en las mismas condiciones, se producía menos agregación de los conjugados.

20 Los modos de realización de una composición para la estabilización de una partícula fluorescente incluyen (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína, en el que al menos una de la amina o la proteína y/o el hidrolizado de proteína está presente en una concentración eficaz para estabilizar y/o aumentar la intensidad de fluorescencia de una partícula fluorescente almacenada en la composición con respecto a la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente almacenada en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína. En algunos modos de realización, la composición

comprende además un tampón borato, y la composición tiene un pH mayor que o igual a 7. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede incluir además un conservante y un tensioactivo.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede comprender borato 0,02 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso, amina 25 mM a 200 mM, conservante del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso y tensioactivo del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una amina sustituida que tiene la fórmula $R_nNH_{(3-n)}$, en donde $n = 1, 2$ o 3 , y en donde cada R es independientemente un grupo alifático, un grupo heteroalifático, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo alquilarilo o un grupo arilalquilo, y al menos un R está sustituido. En algunos modos de realización, al menos un R está sustituido con uno o más grupos $-OH$, $-OR_1$, $-CO_2R_1$, $-CN$ o combinaciones de los mismos, en donde R_1 es un grupo alifático o arilo sustituido o no sustituido.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una alcanolamina. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una amina *N*-etanol sustituida, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metildietanolamina, *N,N*-dimetiletanolamina, o una combinación de las mismas. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una amina *N*-etanol sustituida con una concentración en el intervalo de 50 mM a 100 mM.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una alquilamina terciaria sustituida.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la proteína y/o el hidrolizado de proteína puede ser triptona vegetal, peptona de salmón, hidrolizados de caseína, hidrolizados de albúmina de pollo, gelatina de piel de pescado, o una combinación de los mismos. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, el conservante puede ser a) azida de sodio, b) una composición conservante que comprende 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 9,5 a 9,9 %, c) una composición conservante que comprende 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 2,3 %, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 0,7 %, carboxilato de alquilo al 2-3 % y glicol modificado al 93-95 %, o d) una combinación de los mismos.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, el tensioactivo puede ser un tensioactivo no iónico. En algunos modos de realización, el tensioactivo es un glicol de alquileo o glicol de alquileo oxigenado, tal como monolaurato de polioxietilensorbitano, polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter) o polioxietilenglicol dodecil éter.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede tener un pH de 7 a 9, o un pH de 8 a 9.

En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede incluir además una partícula fluorescente, en la que la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente aumenta con respecto a la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína. En algunos modos de realización, la intensidad de fluorescencia, en un momento posterior a la mezcla de la partícula fluorescente con la composición, aumenta en al menos un 5 % con respecto a la intensidad de fluorescencia de la partícula fluorescente en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.

En algunos modos de realización, la partícula fluorescente es un punto cuántico o conjugado de punto cuántico, y la composición incluye borato 0,32 M, hidrolizados de caseína al 1,05 % en peso, trietanolamina 50 mM, azida de sodio al 0,08 % en peso y monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,005 % en peso, y la composición tiene un pH de 8 a 8,5.

Modos de realización de un procedimiento para estabilizar una partícula fluorescente incluyen proporcionar una solución de partículas fluorescentes que comprende al menos una partícula fluorescente, y diluir la solución de partículas fluorescentes en una composición para proporcionar una solución diluida de partículas fluorescentes, en la que la composición comprende (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína, en el que al menos una de la amina o la proteína y/o el hidrolizado de proteína está presente en una concentración eficaz para estabilizar y/o aumentar la fluorescencia de la partícula fluorescente.

En algunos modos de realización, la dilución de la solución de partículas fluorescentes en la composición aumenta la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de partículas fluorescente con respecto a la intensidad de fluorescencia de una solución diluida de partículas fluorescentes obtenida diluyendo la solución de partículas fluorescentes en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína. En modos de realización particulares, la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de partículas fluorescentes, en un momento posterior a la dilución de la solución de partículas fluorescentes en la composición, aumenta en al menos un 5 % con respecto a la intensidad de fluorescencia

de una solución diluida de partículas fluorescentes obtenida diluyendo la solución de partículas fluorescentes en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.

5 En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede comprender además un tampón borato, un conservante y un tensioactivo, y la composición puede tener un pH mayor que o igual a 7. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la composición puede incluir borato 0,05 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,1 % en peso, amina 50 mM a 100 mM, conservante del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso y tensioactivo no iónico del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso. En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la amina puede ser una amina *N*-etanol sustituida.

10 En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, el procedimiento incluye además el almacenamiento de la solución diluida de partículas fluorescentes a 4 °C. En algunos modos de realización, la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de partículas fluorescentes sigue siendo sustancialmente la misma después de un almacenamiento a 4 °C durante un mes. En ciertos modos de realización, la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de partículas fluorescentes sigue siendo sustancialmente la misma después de un almacenamiento a 4 °C durante tres meses.

15 En cualquiera o en todos los modos de realización anteriores, la solución de partículas fluorescente puede ser una solución de conjugado de punto cuántico que comprende al menos un conjugado de punto cuántico, y la solución de conjugado de punto cuántico se diluye a una concentración de 0,5 nM a 150 nM para proporcionar una solución diluida de conjugado de punto cuántico.

20 En algunos modos de realización, la solución diluida de conjugado de punto cuántico se utiliza para detectar una sonda hibridada a una diana. En ciertos modos de realización, el conjugado de punto cuántico es un conjugado punto cuántico-anticuerpo, y el procedimiento incluye además la hibridación de la sonda a la diana para proporcionar una sonda hibridada; proporcionar una solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo, en el que la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo comprende conjugado punto cuántico-anticuerpo 5 nM a 100 nM, borato 0,05 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,1 % en peso, amina *N*-etanol sustituida 50 mM a 100 mM, azida de sodio del 0,05 % en peso al 0,1 % en peso y tensioactivo no iónico del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso y que tiene un pH de 8-9, en el que el conjugado punto cuántico-anticuerpo es capaz de unirse a la sonda; combinar la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo con la sonda hibridada; y detectar la fluorescencia del conjugado punto cuántico-anticuerpo.

30 En algunos modos de realización, la solución diluida de conjugado de punto cuántico se utiliza para detectar un antígeno de proteína en una muestra de tejido. En ciertos modos de realización, el conjugado de punto cuántico es un conjugado punto cuántico-anticuerpo, y el procedimiento incluye además proporcionar una solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo, en el que la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo comprende conjugado punto cuántico-anticuerpo 5 nM a 100 nM, borato 0,05 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,1 % en peso, amina *N*-etanol sustituida 50 mM a 100 mM, azida de sodio del 0,05 % en peso al 0,1 % en peso y tensioactivo no iónico del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso y que tiene un pH de 8-9, en el que el conjugado punto cuántico-anticuerpo es capaz de unirse al antígeno de proteína; combinar la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo con la muestra de tejido; y detectar la fluorescencia del conjugado punto cuántico-anticuerpo.

40 En algunos modos de realización, la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo tiene un pH en el intervalo de 8 a 8,5 y comprende conjugado punto cuántico-anticuerpo 5 nM a 100 nM, borato 0,32 M, hidrolizados de caseína al 1,0 % en peso, trietanolamina 50 mM, azida de sodio al 0,08 % en peso y monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,005 % en peso. En algunos modos de realización, la solución diluida de conjugado de punto cuántico se almacena a 4 °C antes de su uso. En algunos modos de realización, la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo sigue siendo sustancialmente la misma después de un mes de almacenamiento a 4 °C. En ciertos modos de realización, la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de conjugado punto cuántico-anticuerpo sigue siendo sustancialmente la misma después de tres meses de almacenamiento a 4 °C.

45 En vista de los numerosos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, se debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solamente ejemplos de la invención preferentes y no se deben tomar como limitativos del alcance de la invención. En cambio, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la estabilización de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico, que comprende:
- (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida; o
- (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína; la composición comprende además:
- 5 (c) un tampón borato;
- (d) un conservante; y
- (e) un tensioactivo;
- en la que la composición tiene un pH mayor que o igual a 7, y
- 10 en la que al menos una de la amina o la proteína y/o el hidrolizado de proteína está presente en una concentración eficaz para estabilizar y/o aumentar la intensidad de fluorescencia de un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico almacenado en la composición con respecto a la intensidad de fluorescencia del punto cuántico o el conjugado de punto cuántico almacenado en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende:
- 15 borato 0,02 M a 0,5 M;
- proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,5 % en peso;
- amina 25 mM a 200 mM;
- conservante del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso; y
- tensioactivo del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso.
- 20 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la amina es una amina sustituida que tiene la fórmula $R_nNH_{(3-n)}$, en donde $n = 1, 2$ o 3 , y en donde cada R es independientemente un grupo alifático, un grupo heteroalifático, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo alquilarilo o un grupo arilalquilo, y al menos un R está sustituido; opcionalmente,
- 25 en donde al menos un R está sustituido con uno o más grupos $-OH$, $-OR_1$, $-CO_2R_1$, $-CN$ o combinaciones de los mismos, en los que R_1 es un grupo alifático o arilo sustituido o no sustituido; opcionalmente,
- en donde la amina comprende una alcanolamina; opcionalmente,
- en donde la amina comprende una amina *N*-etanol sustituida; opcionalmente,
- en donde la amina *N*-etanol sustituida tiene una concentración en el intervalo de 50 mM a 100 mM; opcionalmente,
- 30 en donde la amina es etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metildietanolamina, *N,N*-dimetiletanolamina, o una combinación de las mismas; opcionalmente,
- en donde la amina es una alquilamina terciaria sustituida.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína y/o hidrolizado de proteína es triptona vegetal, peptona de salmón, hidrolizados de albúmina de pollo, hidrolizados de caseína, gelatina de piel de pescado, o una combinación de los mismos.
- 35 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el conservante es azida de sodio, una composición conservante que comprende 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 9,5 a 9,9 %, una composición conservante que comprende 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 2,3 %, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona al 0,7 %, carboxilato de alquilo al 2-3 %, glicol modificado al 93-95 %, o una combinación de los mismos.
- 40 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico; opcionalmente,

en donde el tensioactivo es un glicol de alquileo o glicol de alquileo oxigenado; opcionalmente,

en donde el tensioactivo es monolaurato de polioxietilensorbitano, polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter) o polioxietilenglicol dodecil éter.

5 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la composición tiene un pH de 7 a 9; opcionalmente,

en donde la composición tiene un pH de 8 a 9.

10 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además un punto cuántico o un conjugado de punto cuántico, en el que la intensidad de fluorescencia del punto cuántico o el conjugado de punto cuántico aumenta con respecto a la intensidad de fluorescencia del punto cuántico o el conjugado de punto cuántico en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína; opcionalmente,

15 en donde la intensidad de fluorescencia, en un momento posterior a la mezcla del punto cuántico o el conjugado de punto cuántico con la composición, aumenta en al menos un 5 % con respecto a la intensidad de fluorescencia del punto cuántico o el conjugado de punto cuántico en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.

9. La composición de la reivindicación 8, que comprende:

borato 0,32 M;

hidrolizados de caseína al 1,05 % en peso;

trietanolamina 50 mM;

20 azida de sodio al 0,08 % en peso; y

monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,005 % en peso, en el que la composición tiene un pH de 8 a 8,5.

10. Un procedimiento para estabilizar un conjugado de punto cuántico, que comprende:

proporcionar una solución de punto cuántico, en donde la solución de punto cuántico es una solución de conjugado de punto cuántico que comprende al menos un conjugado de punto cuántico; y

25 diluir la solución de conjugado de punto cuántico a una concentración de 0,5 nM a 150 nM en una composición para proporcionar una solución diluida de conjugado de punto cuántico, en el que la composición comprende (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína, en el que al menos una de la amina o la proteína y/o el hidrolizado de proteína está presente en una concentración eficaz para estabilizar y/o aumentar la fluorescencia del punto cuántico o del conjugado de punto cuántico; opcionalmente, en donde la dilución de la solución de punto cuántico en la composición aumenta la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de punto cuántico con respecto a la intensidad de fluorescencia de una solución diluida de punto cuántico obtenida diluyendo la solución de punto cuántico en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína; opcionalmente,

35 en donde la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de punto cuántico, en un momento posterior a la dilución de la solución de punto cuántico en la composición, aumenta en al menos un 5 % con respecto a la intensidad de fluorescencia de una solución diluida de punto cuántico obtenida diluyendo la solución de punto cuántico en una composición desprovista de (a) una amina sustituida que no sea un aminoácido o una alquilamina alquil-sustituida o (b) una amina y una proteína y/o un hidrolizado de proteína.

40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde la composición comprende además un tampón borato, un conservante y un tensioactivo, y en el que la composición tiene un pH mayor que o igual a 7; opcionalmente,

en donde la composición comprende borato 0,05 M a 0,5 M, proteína y/o hidrolizado de proteína del 0,05 % en peso al 1,1 % en peso, amina 50 mM a 100 mM, conservante del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso y tensioactivo no iónico del 0,005 % en peso al 0,05 % en peso; opcionalmente, en donde la amina es una amina *N*-etanol sustituida.

45 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, que comprende además el almacenamiento de la solución diluida de conjugado de punto cuántico a 4 °C.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en donde la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de conjugado de punto cuántico sigue siendo sustancialmente la misma después de un almacenamiento a 4 °C durante un mes; opcionalmente,

5 en donde la intensidad de fluorescencia de la solución diluida de conjugado de punto cuántico sigue siendo sustancialmente la misma después de un almacenamiento a 4 °C durante tres meses.

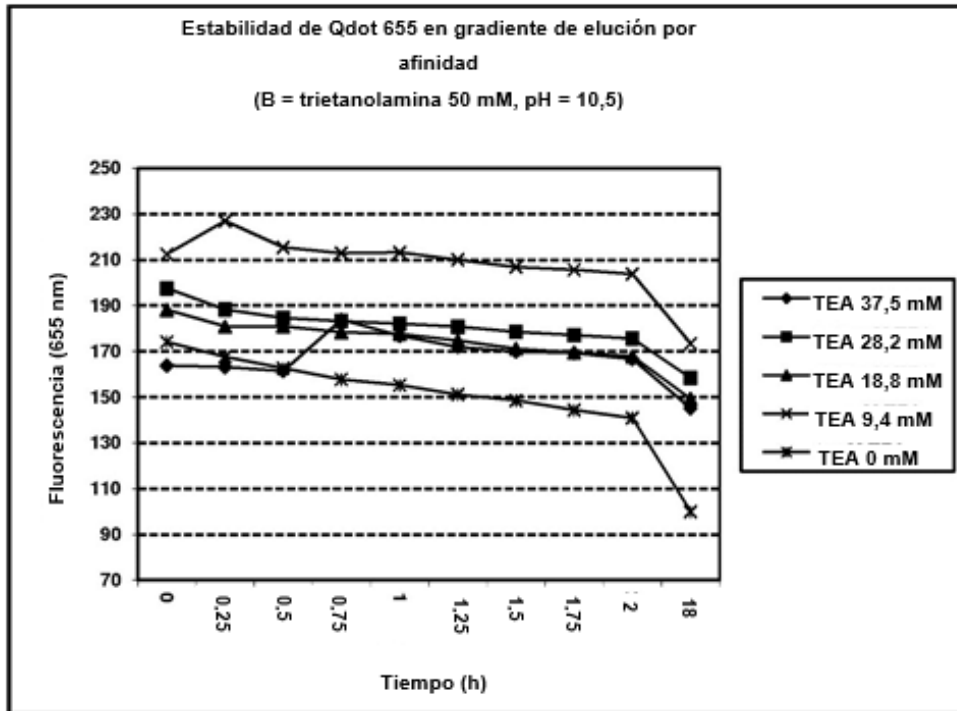


FIG. 1

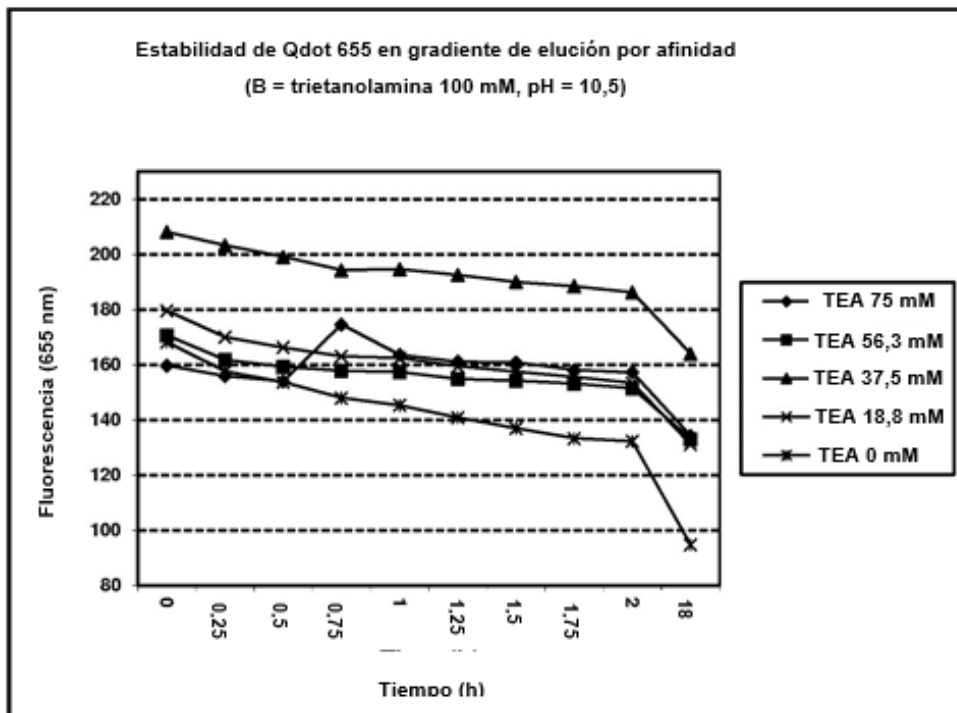


FIG. 2

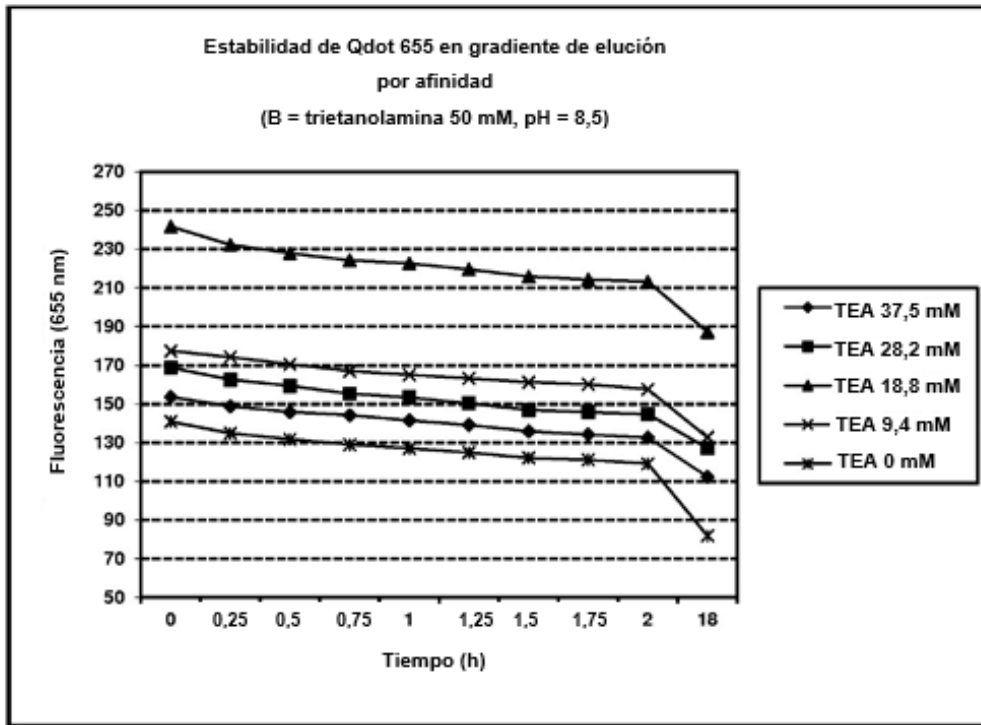


FIG. 3

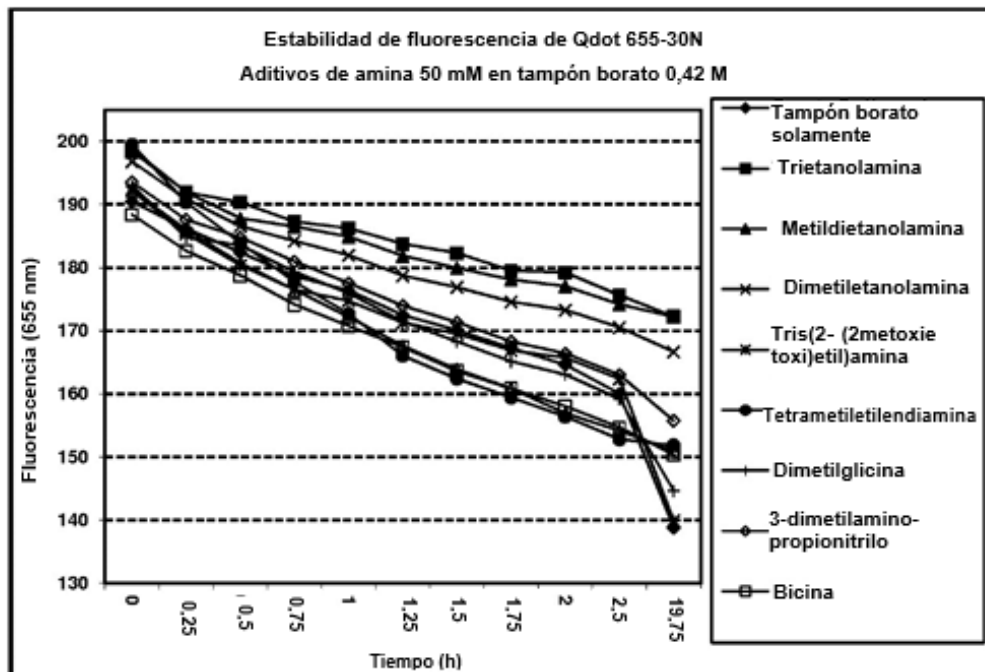


FIG. 4

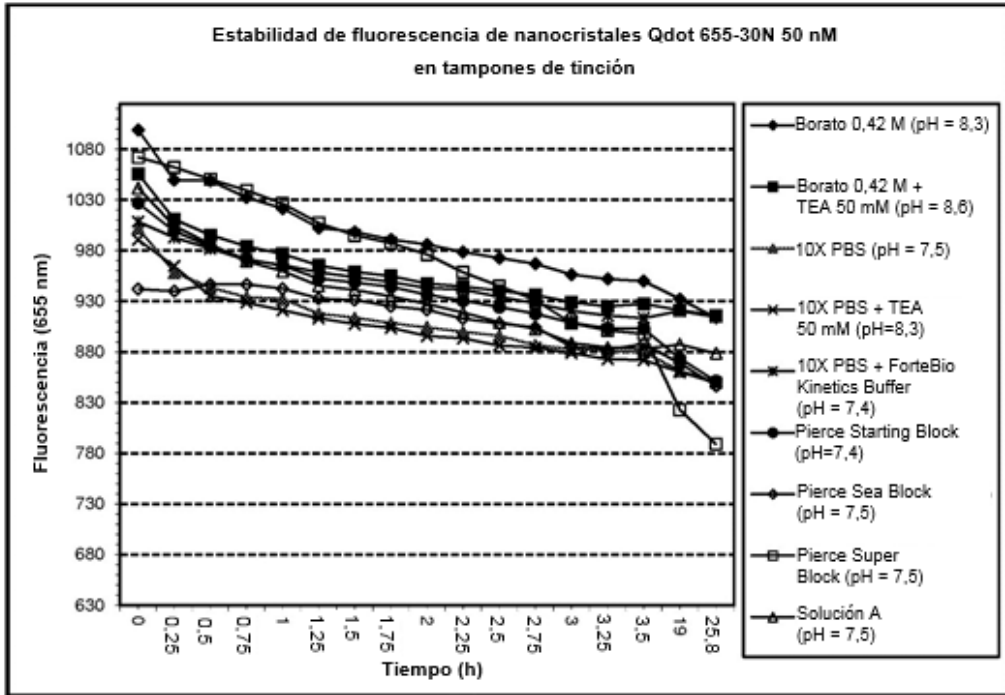


FIG. 5

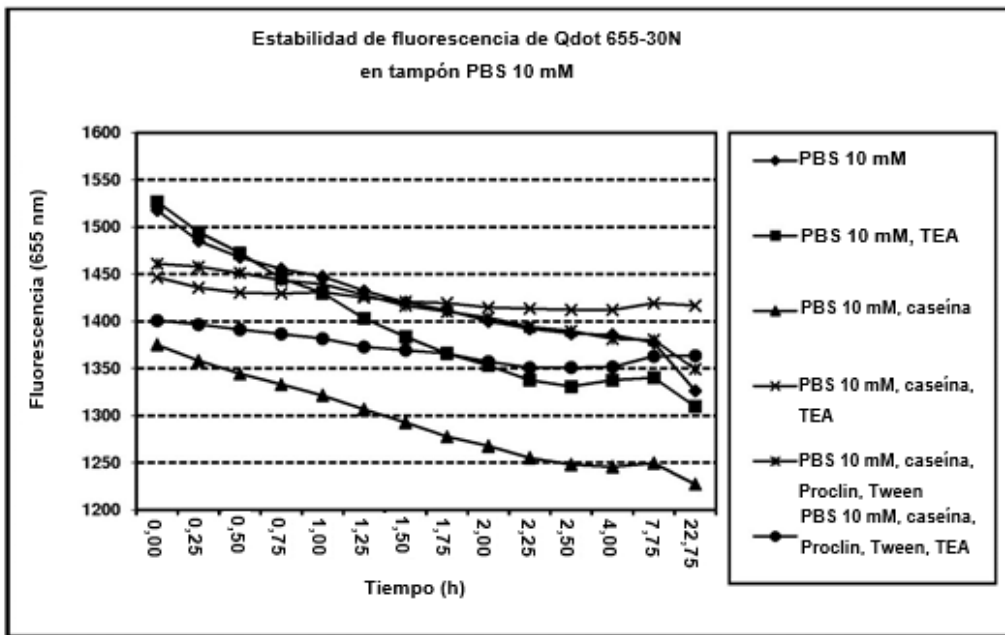


FIG. 6

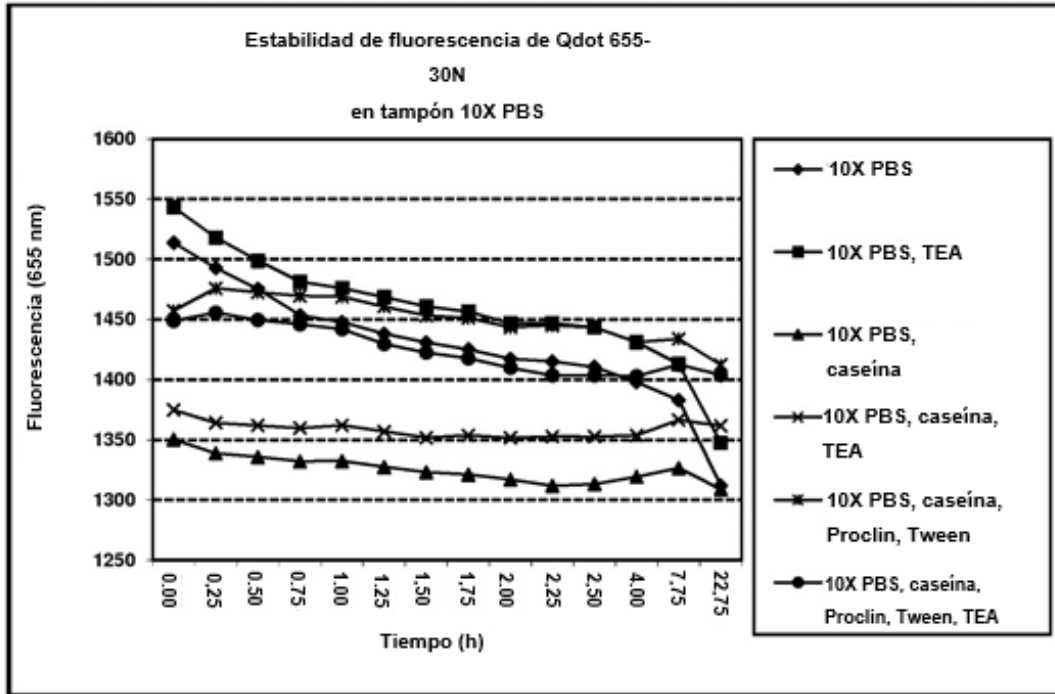


FIG. 7

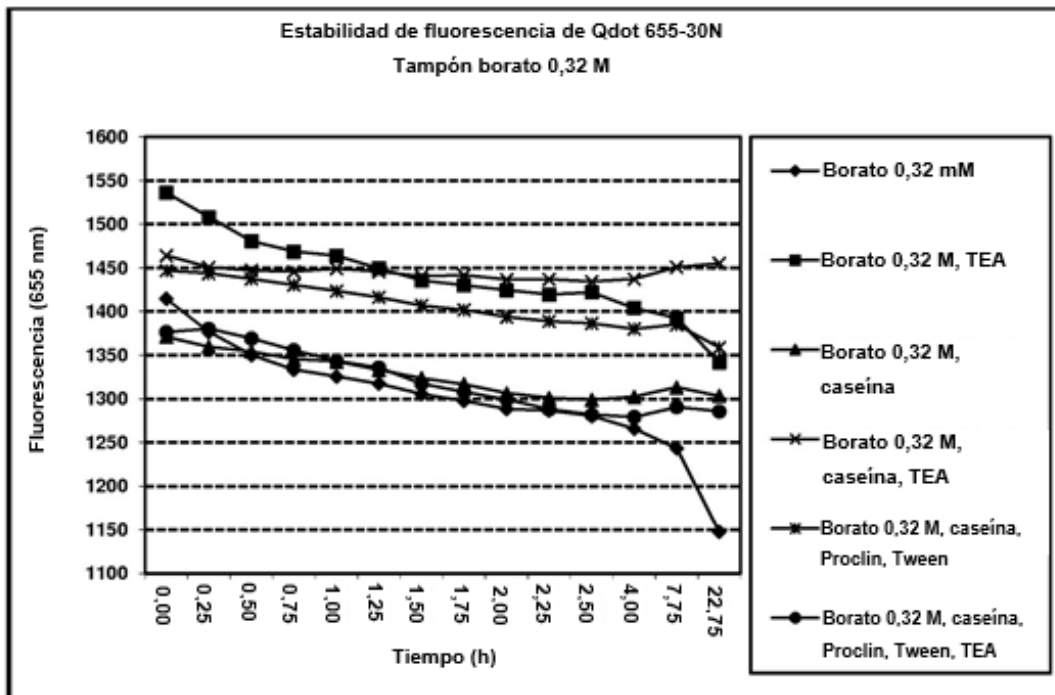


FIG. 8

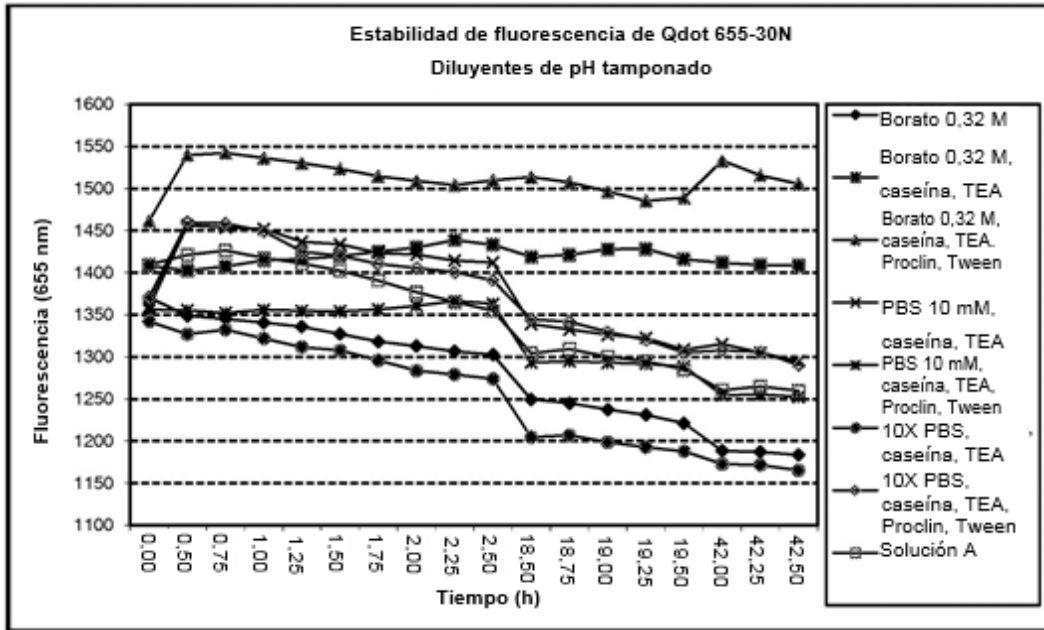


FIG. 9

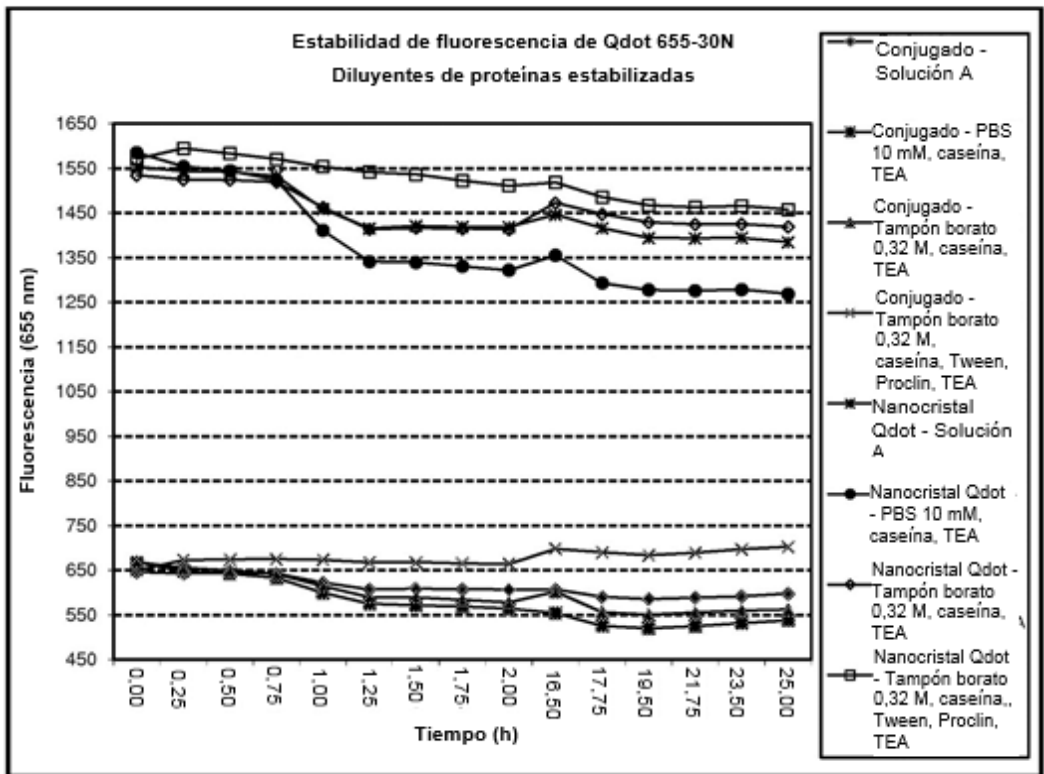


FIG. 10

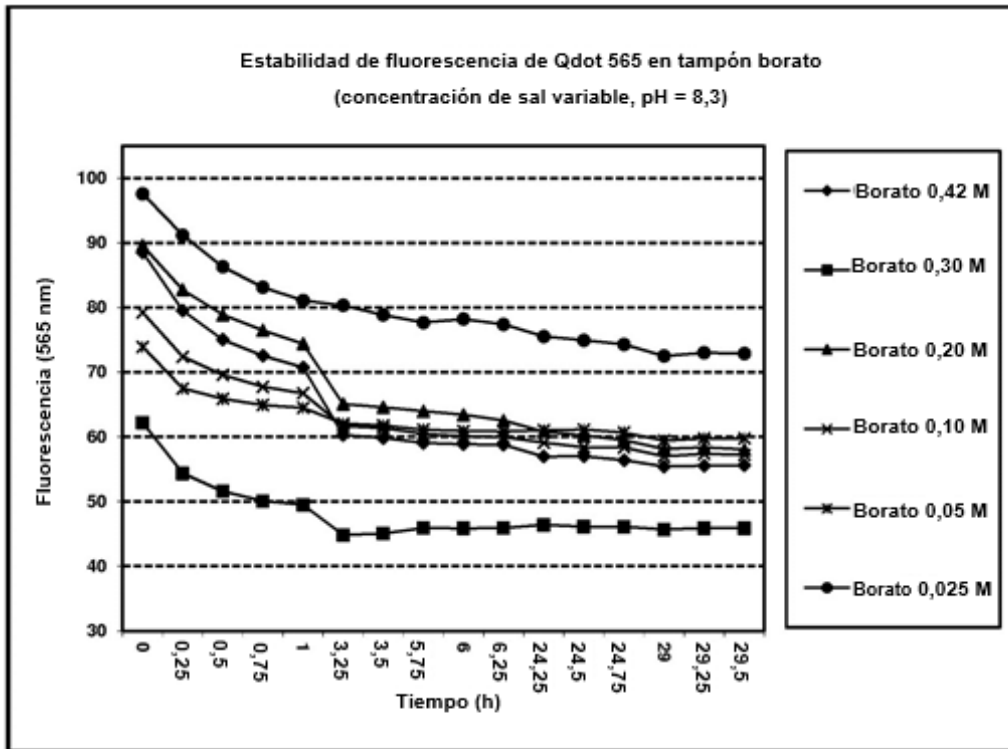


FIG. 11

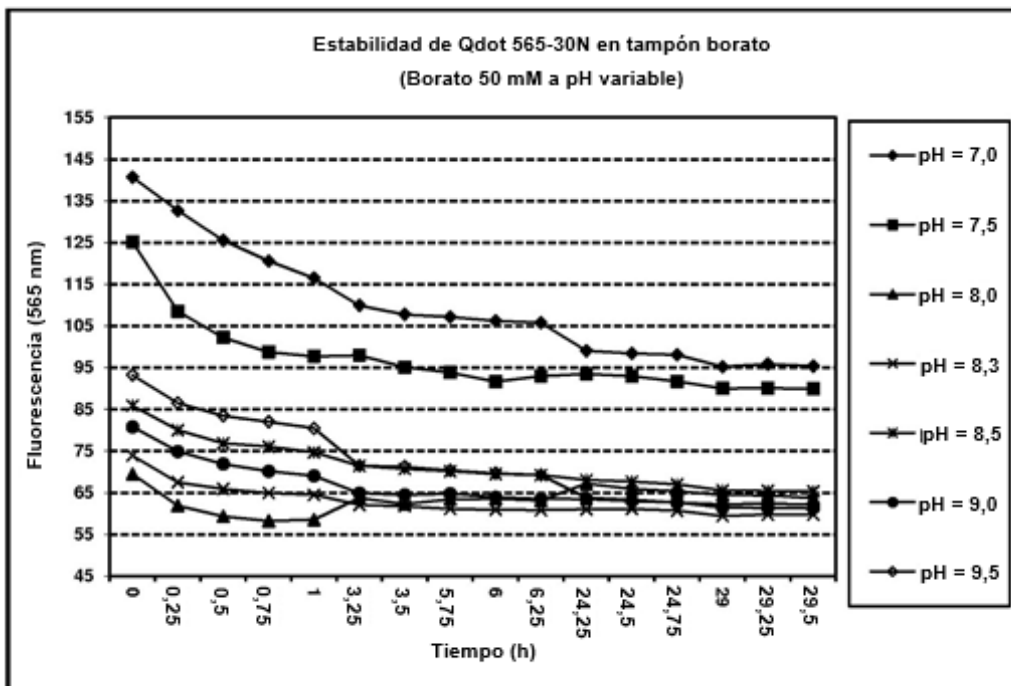


FIG. 12

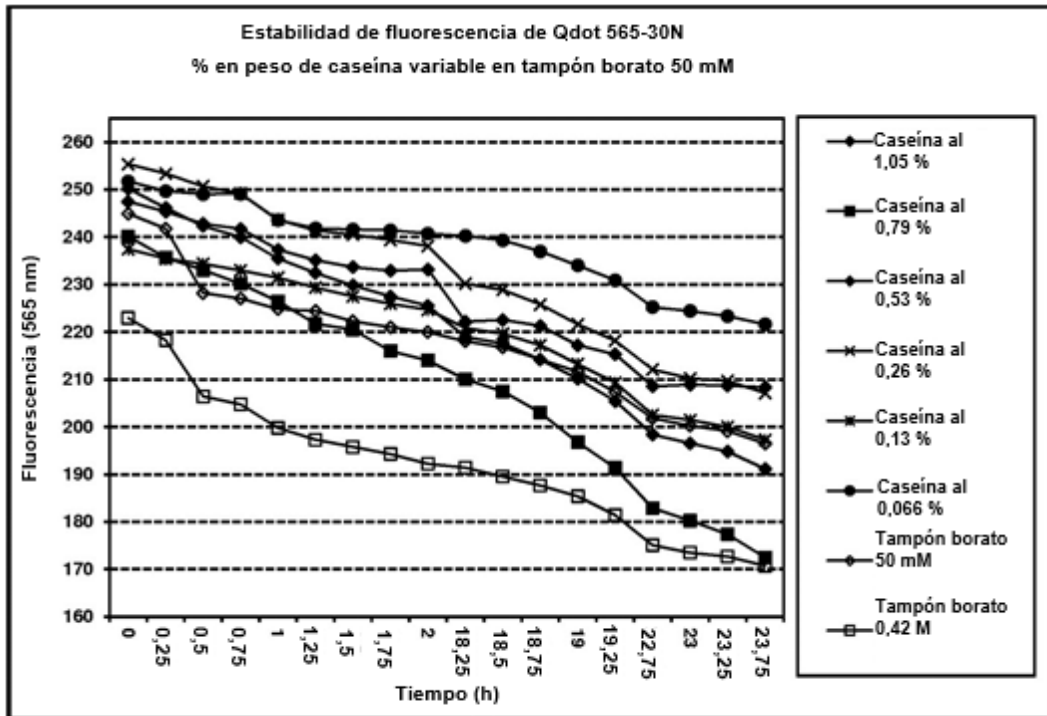


FIG. 13

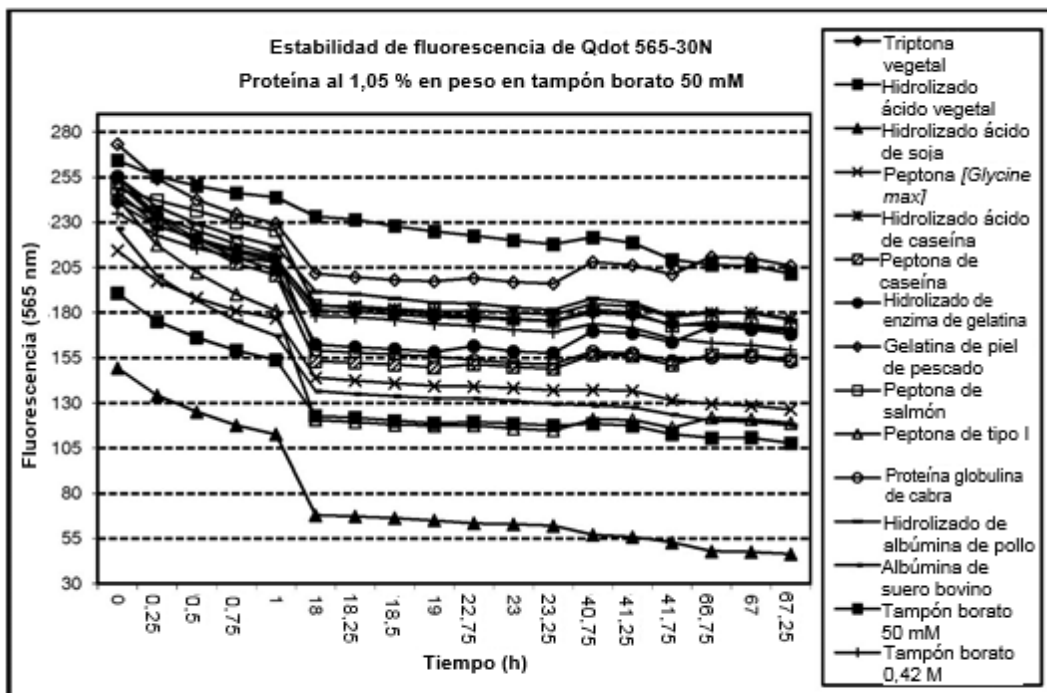


FIG. 14

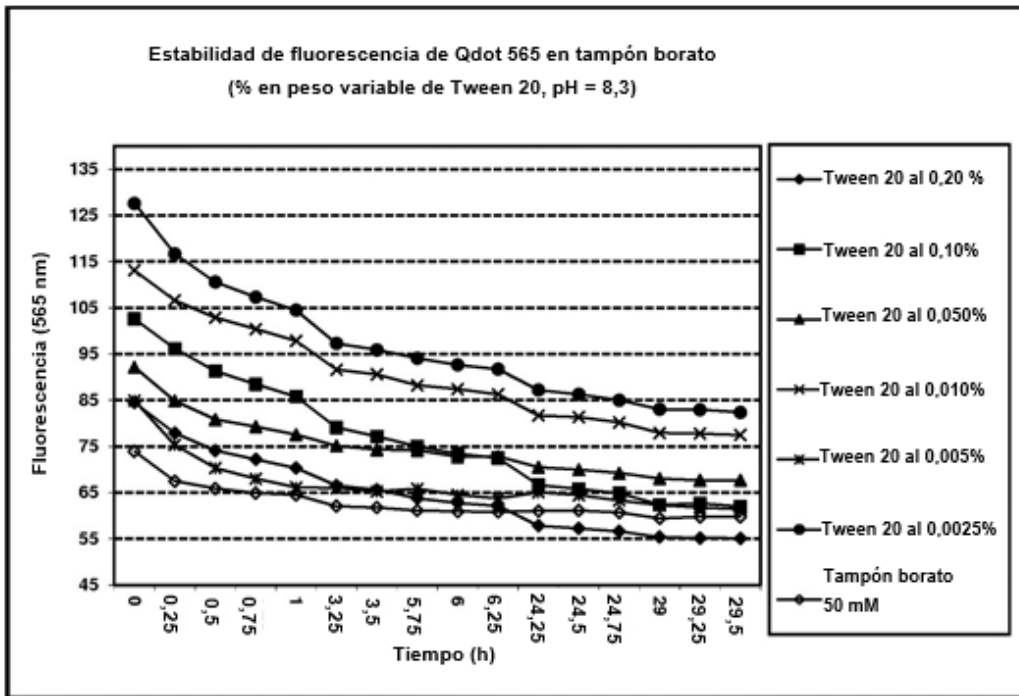


FIG. 15

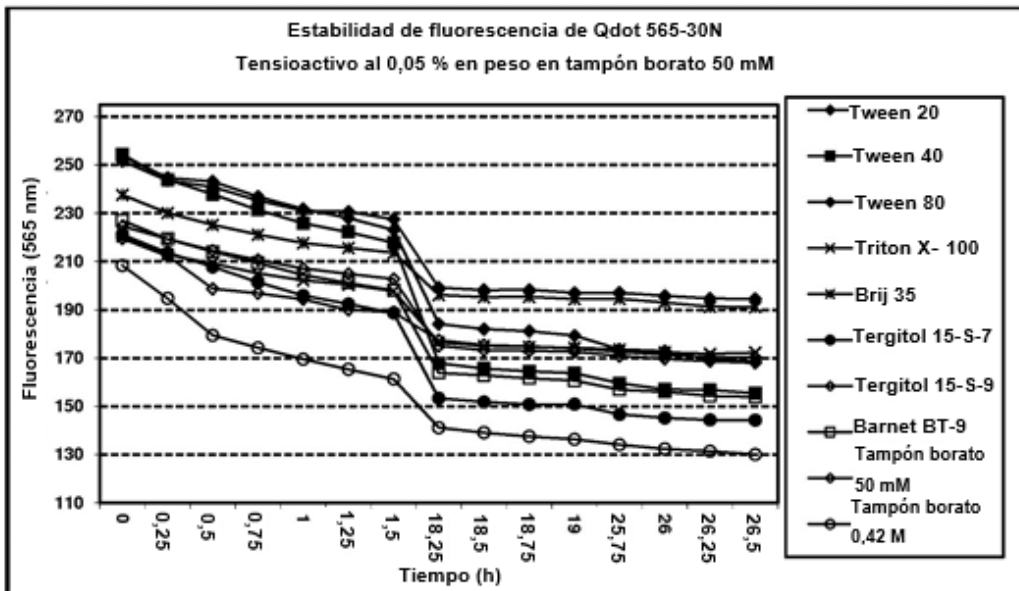


FIG. 16

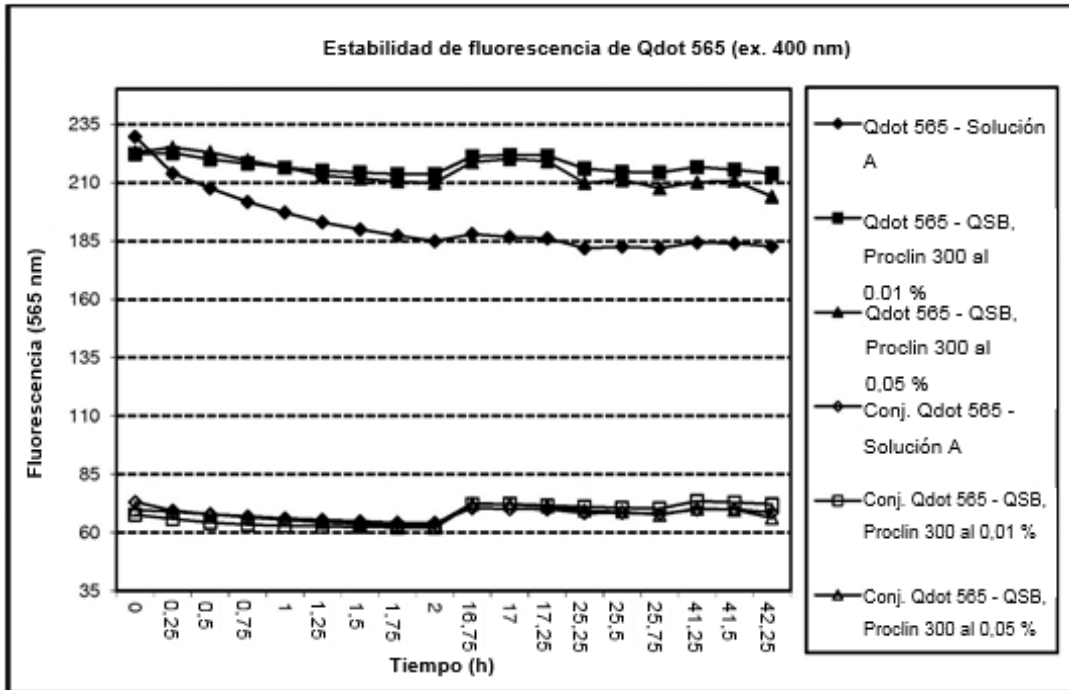


FIG. 17

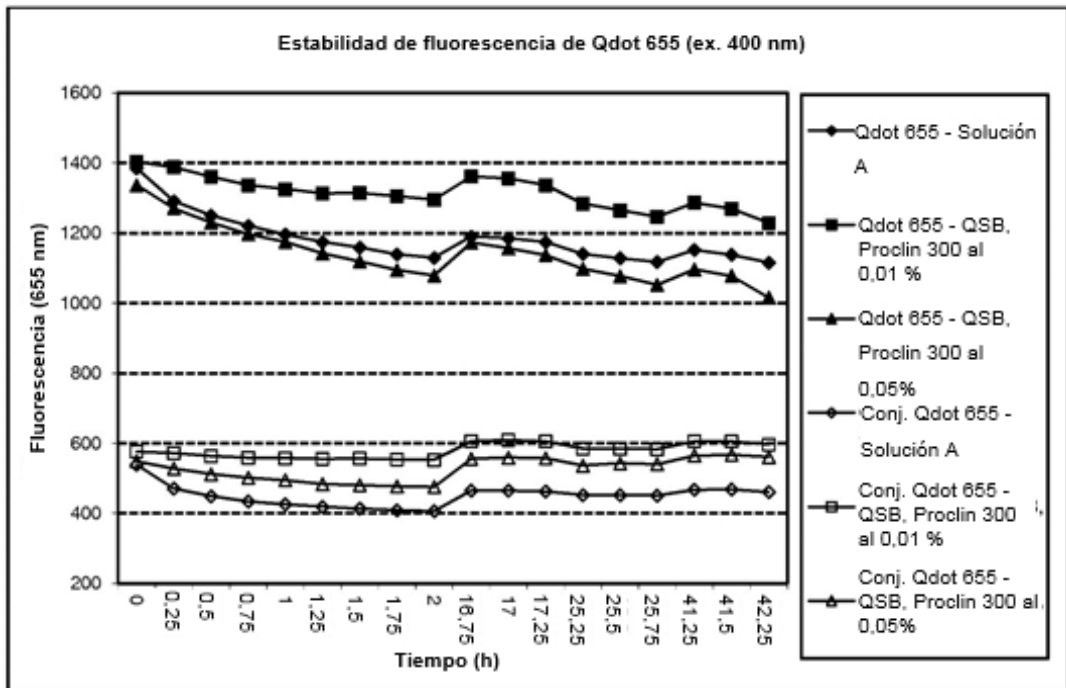


FIG. 18

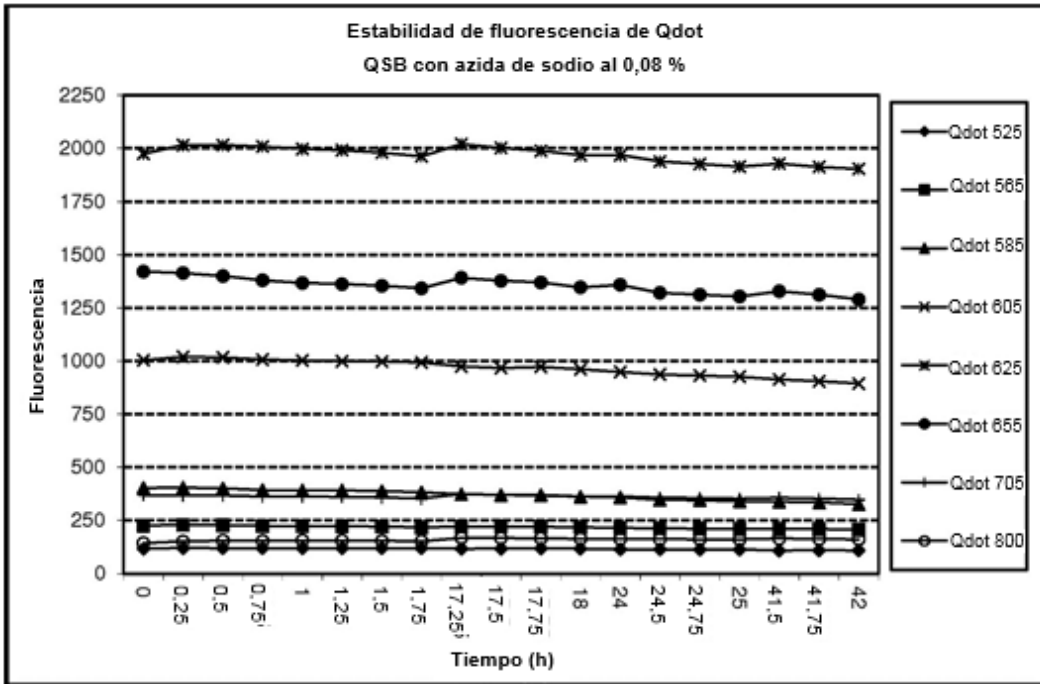


FIG. 19

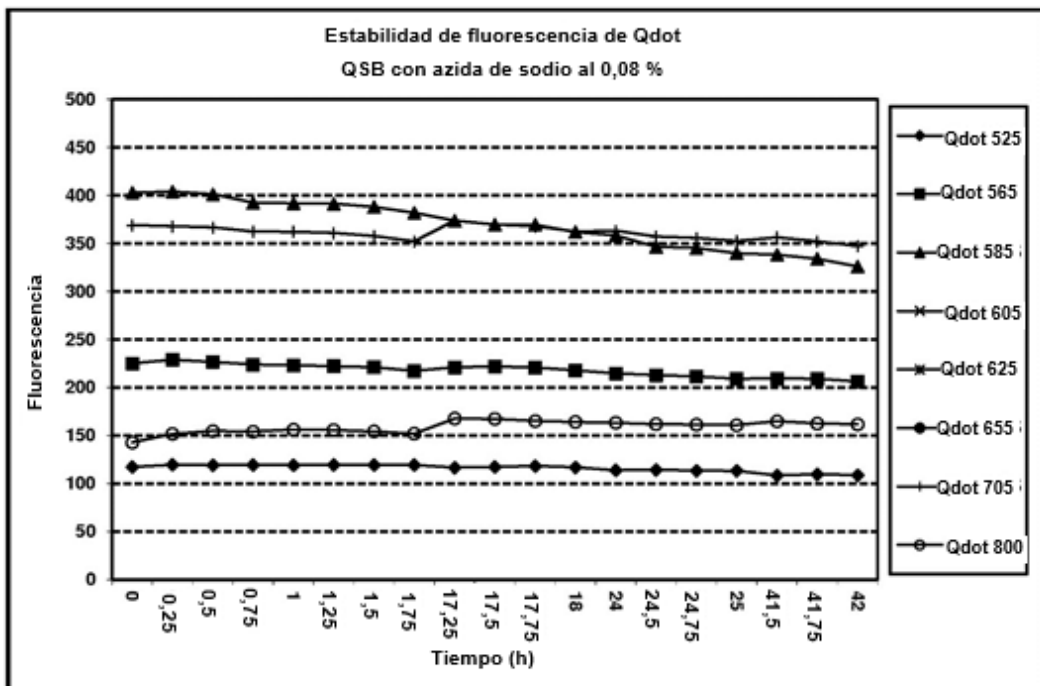


FIG. 20

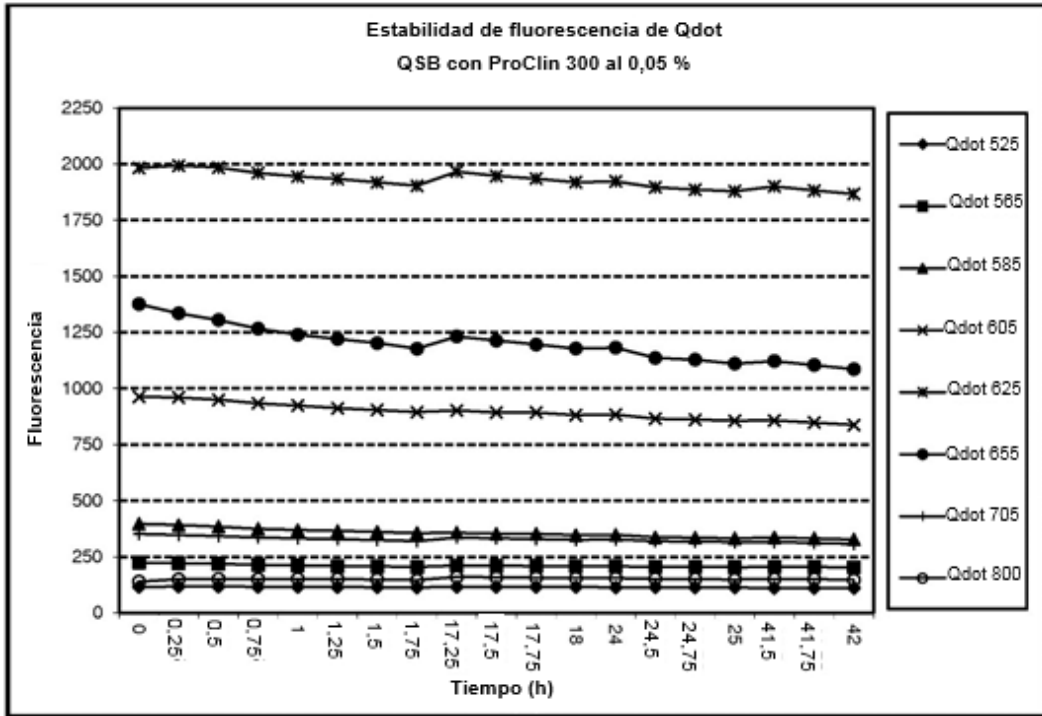


FIG. 21

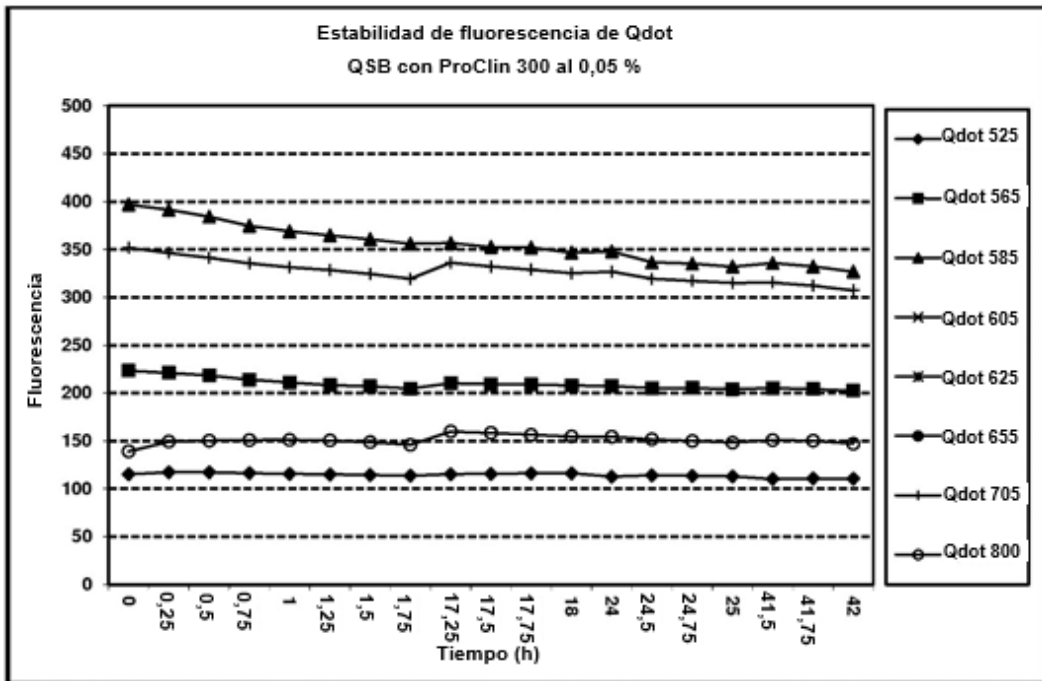


FIG. 22

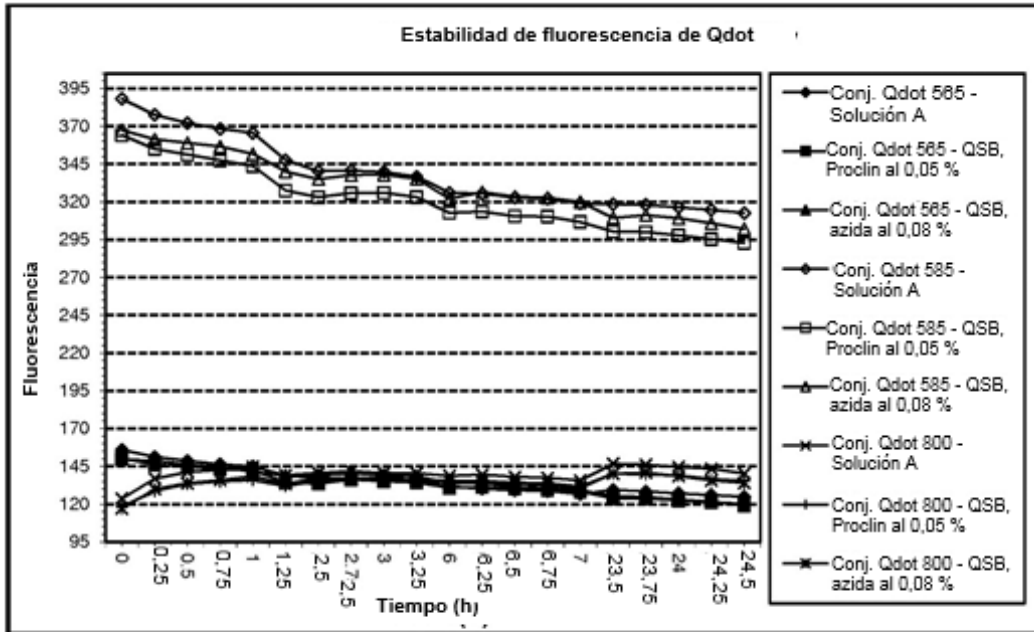


FIG. 23

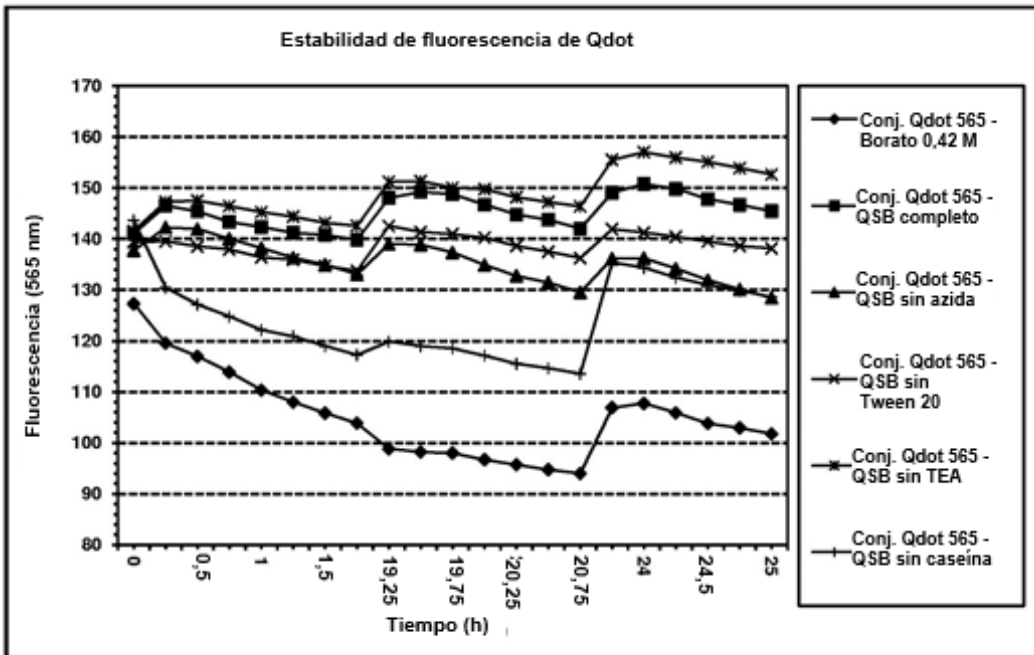


FIG. 24

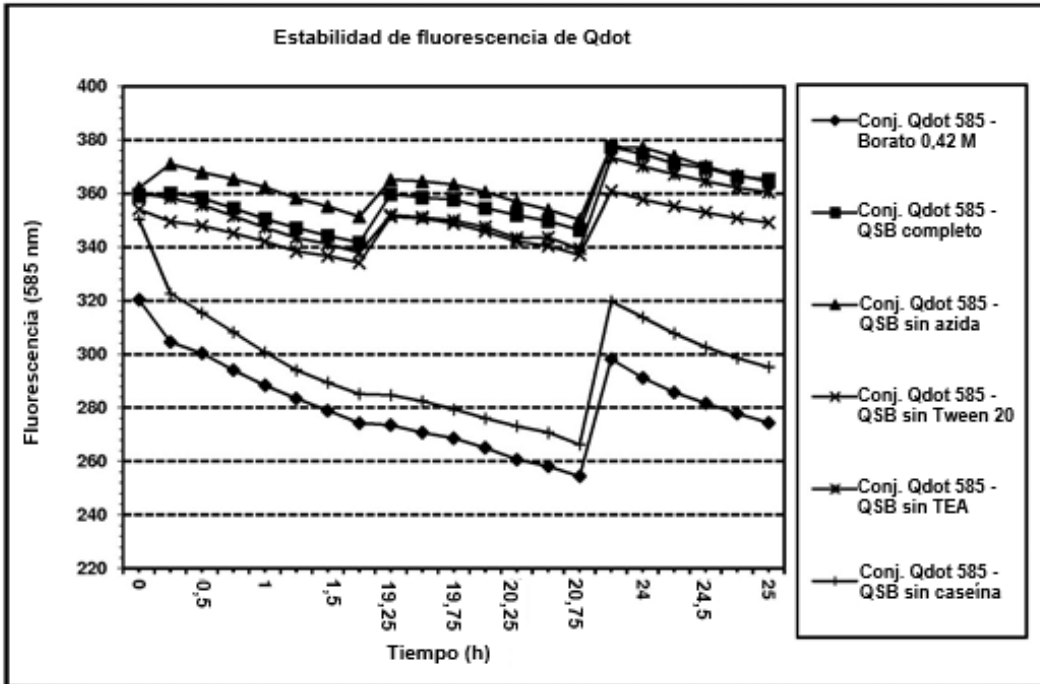


FIG. 25

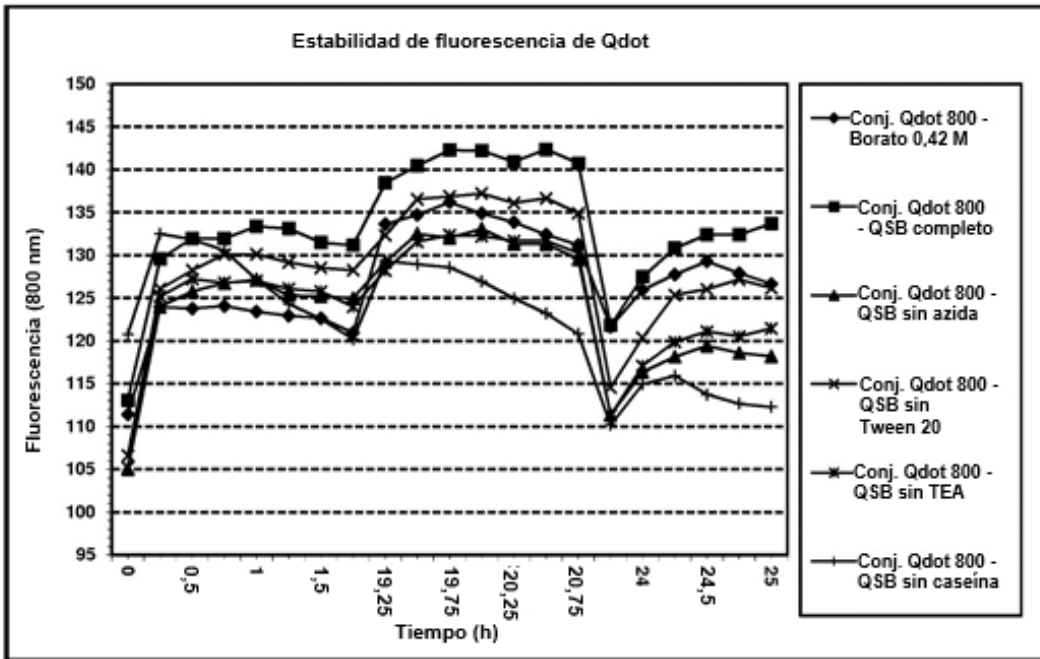


FIG. 26

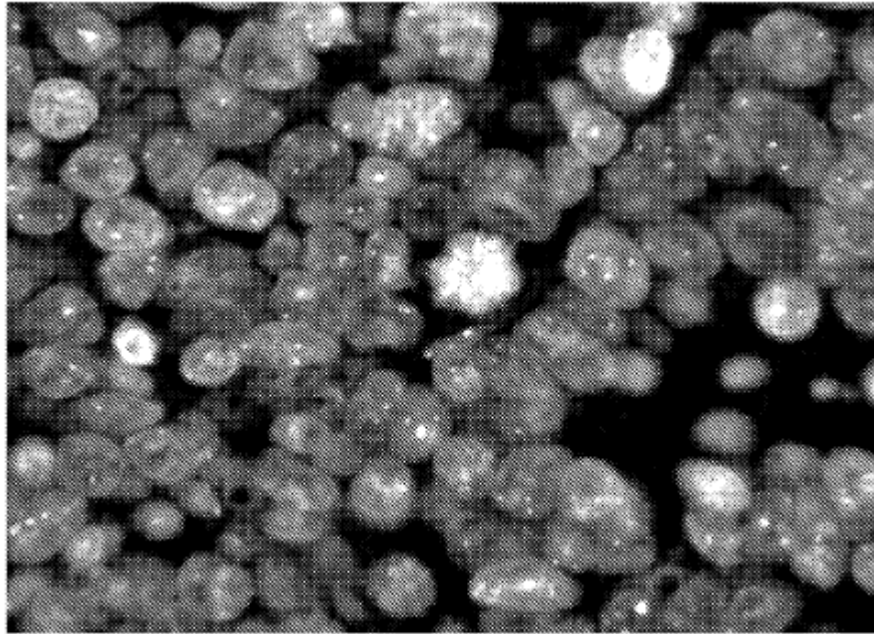


FIG. 27

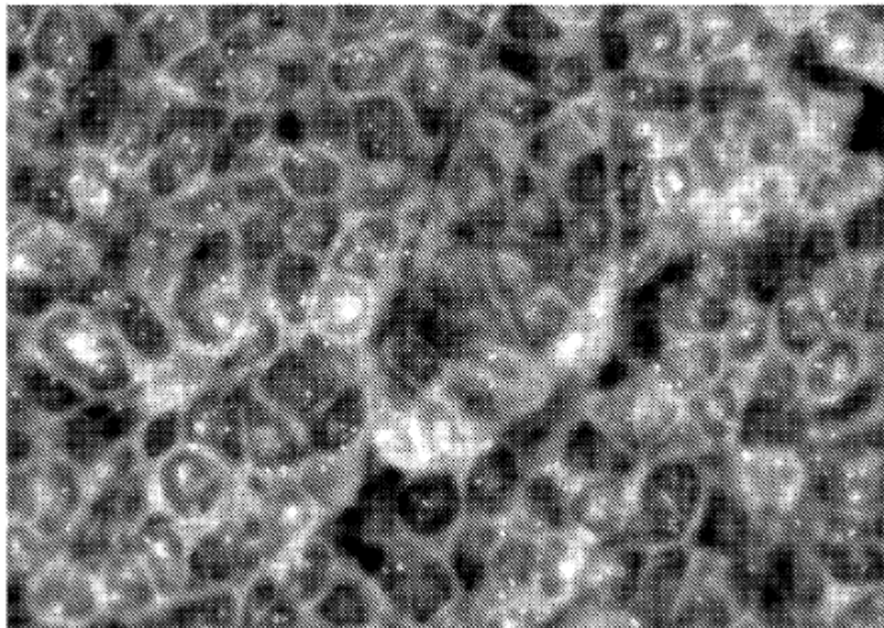


FIG. 28

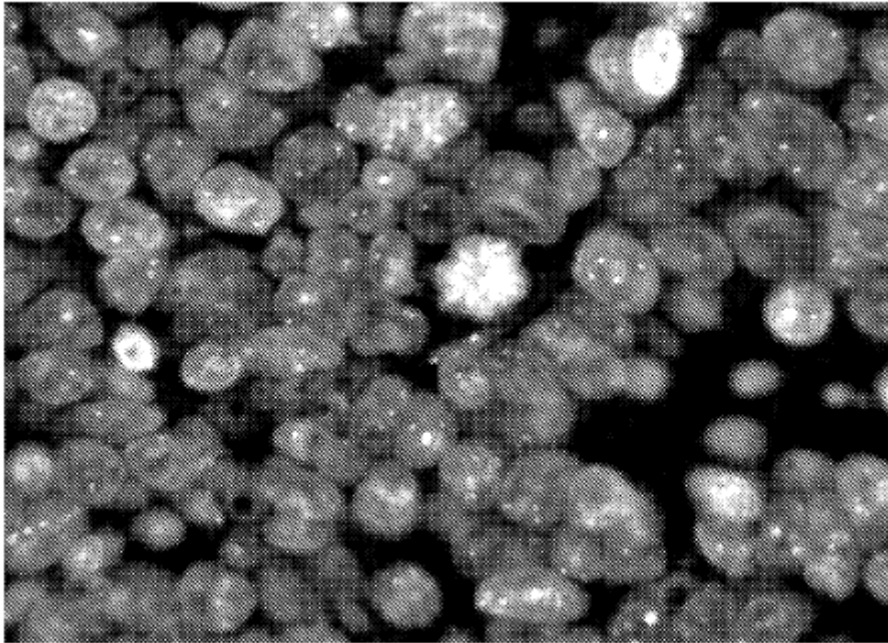


FIG. 29

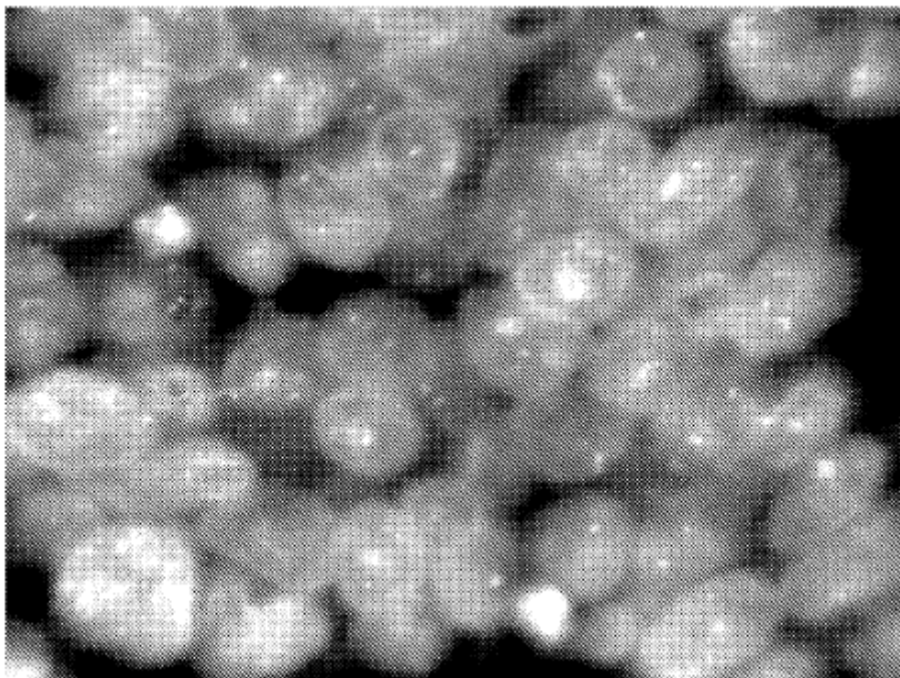


FIG. 30

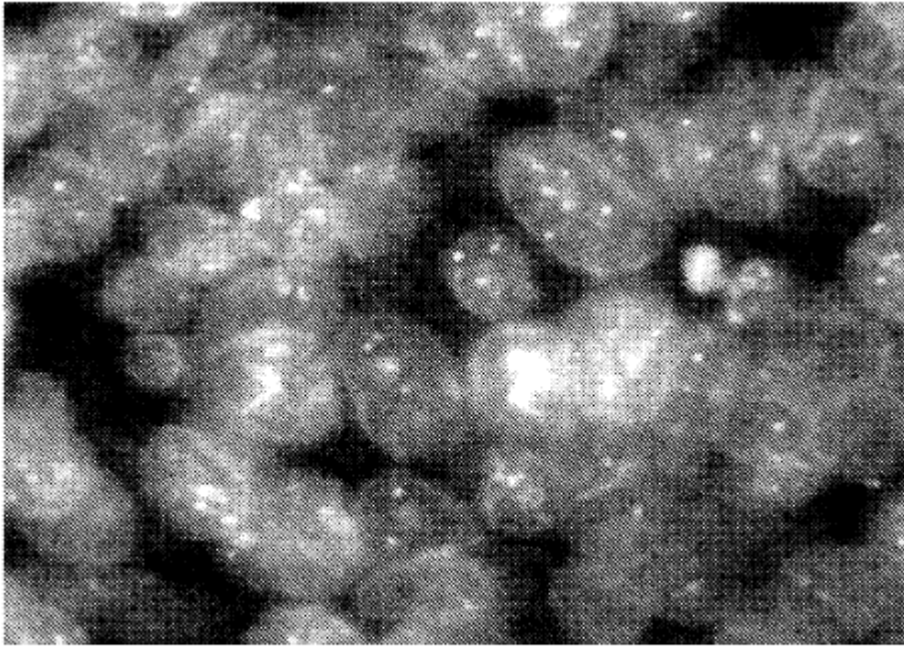


FIG. 31

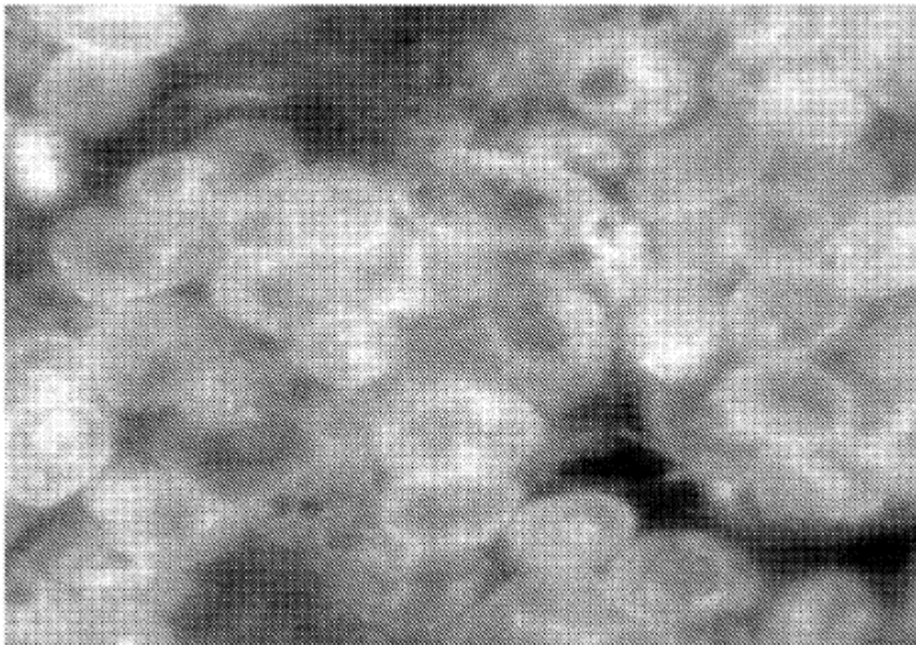


FIG. 32

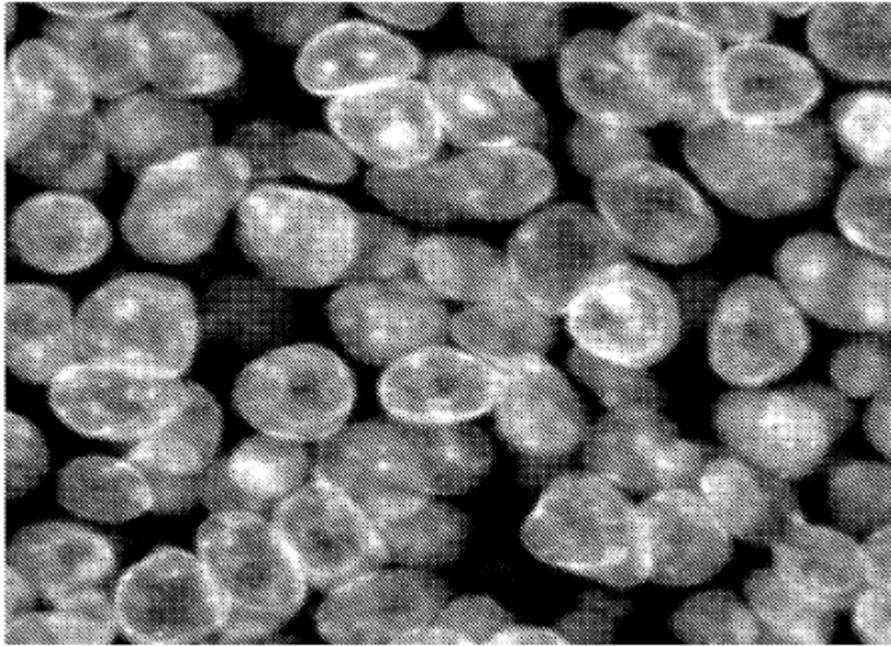


FIG. 33

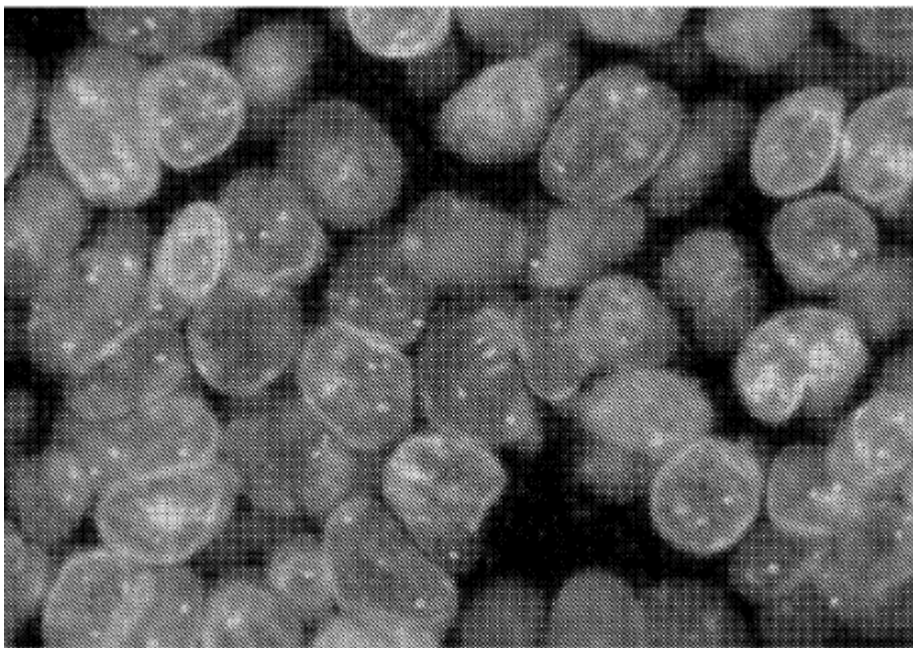


FIG. 34