

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 026**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/IB2011/051282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11722878 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2553431**

54 Título: **Método para aumentar el número de fotones detectables durante la formación de imágenes de un marcador biológico**

30 Prioridad:

26.03.2010 EP 10290158

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

10.10.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ROGERS, KELLY;
SHORTE, SPENCER L.;
DRAGAVON, JOSEPH y
BLAZQUEZ, SAMANTHA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 026 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

Método para aumentar el número de fotones detectables durante la formación de imágenes de un marcador biológico

5 La presente invención se refiere a un nuevo método para desplazar hacia el rojo una señal óptica procedente de un marcador biológico. En particular, la presente invención se refiere a un mecanismo de excitación entre un marcador biológico luminiscente y un fluoróforo. La presente solicitud de patente también se refiere a kits para ejecutar un método según la presente invención y al uso de un fluoróforo no unido para producir un fotón que está desplazado hacia el rojo en comparación con un fotón producido por un marcador biológico.

10 El uso de marcadores biológicos que producen una señal óptica ha revolucionado varios aspectos de las ciencias de la vida y, en particular, ha permitido la observación a tiempo real de fenómenos *in vivo*, tales como la endocitosis, el desarrollo embrionario, las infecciones, el desarrollo de tumores y la señalización del calcio. Cada vez más, estas mismas tecnologías también se están utilizando para visualizar más y más procesos biológicos y farmacéuticos *in situ* dentro de una célula diana, de un tejido aislado o de un organismo completo.

15 Fundamentalmente, existen tres mecanismos para generar una señal óptica basada en la emisión de luz empleando un marcador biológico:

1. Bioluminiscencia.
2. Quimioluminiscencia.
3. Fluorescencia.

20 La bioluminiscencia es la producción y emisión de luz por un organismo vivo, o uno de sus fragmentos, tales como una enzima. La bioluminiscencia es una forma natural de quimioluminiscencia (véase a continuación), en la que la energía es liberada por una reacción química en forma de emisión de luz. La adenosina trifosfato (ATP) está implicada en la mayoría de las reacciones bioluminiscentes y, por tanto, en general las reacciones bioluminiscentes se producen *in vivo*.

25 La quimioluminiscencia es la emisión de luz como resultado de una reacción química. Es diferente de la bioluminiscencia porque los componentes de la reacción química no aparecen necesariamente *in vivo*.

La fluorescencia es la emisión de luz por una sustancia que ha absorbido radiación de una longitud de onda diferente. En la mayoría de los casos, la absorción de luz de una longitud de onda concreta induce la emisión de luz con una longitud de onda mayor. La molécula fluorescente en general se denomina fluoróforo, y no hay ninguna reacción química implicada en la emisión de luz después de la excitación.

30 Tomando como ejemplo la bioluminiscencia, el uso de organismos que han sido genéticamente modificados con genes que codifican sondas bioluminiscentes, tales como aequorina o diversas luciferasas, permite la visualización no invasiva de muchos procesos biológicos dentro de organismos vivos y en modelos de animales pequeños (1-3). La formación de imágenes de bioluminiscencia es muy sensible, porque las señales pueden ser detectadas ópticamente dentro de los organismos intactos, tales como ratones, debido a los niveles muy bajos de bioluminiscencia intrínseca de los tejidos de mamíferos (4). Se han incorporado sondas bioluminiscentes, tales como aequorina (5, 6) o la enzima luciferasa (de bacteria, de luciérnaga, *Cypridina* (7) o *Renilla* (8)) en células hospedantes o patógenos para la formación de imágenes bioluminiscentes. Estas herramientas se han aplicado a estudios que varían desde la infección y el desarrollo de tumores hasta la señalización del calcio. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores biológicos emiten luz en la región del azul-verde-amarillo (400-650 nm) del espectro de color (9), que se solapa con los principales espectros de absorción de los tejidos de mamíferos y, en particular, con los espectros de absorción de la oxihemoglobina, la desoxihemoglobina y la melanina, con lo que se disminuye la eficacia de la detección (1, 10). Debido a la presencia de estos absorbentes, un importante desafío de la formación de imágenes ópticas *in vivo* consiste en obtener unos niveles más altos de sensibilidad mediante el desarrollo de sondas ópticas que emiten luz en el espectro del rojo al infrarrojo cercano (NIR) (650-900 nm), que los tejidos vivos de mamífero solo absorben débilmente.

45 Incluso con estos inconvenientes, el uso de esta tecnología se ha aplicado fácilmente a experimentos que incluyen modelos, tales como roedores pequeños, anestesiados y no anestesiados/de movimiento libre (21). Tal como se indicó anteriormente, en modelos de roedores pequeños (y, más en general, en mamíferos), la presencia de diversas hemoglobinas y tejidos que absorben con facilidad en la región del azul-amarillo del espectro de color reduce la capacidad de excitar y detectar fluoróforos, o de controlar la señal luminiscente producida por bacterias y células modificadas si esta se encuentra en el mismo espectro.

50 Los esfuerzos significativos para mejorar el número de fotones detectables procedentes de una fuente bioluminiscente ha conducido al desarrollo de una inmensa gama de técnicas y sondas bioluminiscentes nuevas y/o mejoradas que aumentan el número de fotones emitidos en la región del rojo del espectro de color (>650 nm). Se ha demostrado que no resulta demasiado difícil diseñar fluoróforos o proteínas fluorescentes que son excitados y que

emiten en el rojo al infrarrojo cercano (NIR) (22).

Sin embargo, lograr un desplazamiento al rojo similar para la emisión bioluminiscente ha demostrado ser más difícil. Un método dirigido al establecimiento del desplazamiento al rojo deseado ha consistido en desarrollar variantes de la luciferasa que son capaces de emitir en esta parte del rojo-NIR del espectro de la luz. Sin embargo, la mayoría de los mutantes/mutaciones desarrollados hasta la fecha han conducido a emisiones en la región del amarillo-verde (9) y solo hay unos pocos ejemplos de producción con éxito de bioluminiscencia roja (11), y estas proteínas modificadas para rojo-NIR en general producen significativamente menos señal que las versiones del amarillo-verde no modificadas.

Dada la dificultad para producir bioluminiscencia en el rojo-NIR, se han tratado de crear metodologías aplicables a la producción de un desplazamiento al rojo en los fotones emitidos empleando la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia ("bioluminescence resonance energy transfer" (BRET)) (13). Varios grupos ya han demostrado el éxito de esta técnica que emplea luciferasas unidas a QD (8) u otros fluoróforos (7) con grandes desplazamientos de Stokes.

En estos métodos previos, los investigadores han investigado BRET conjugando un variante de ocho mutaciones de *Renilla reniformis* a un punto cuántico, y *R. reniformis* actúa como donador de energía y los puntos cuánticos ("quantum dot" (QD)) como aceptor de energía, logrando así un pico de emisión a 655 nm desde los QD tras la transferencia de energía (8). En fechas más recientes, una luciferasa de *Cypridina* biotinilada se ha conjugado con un derivado de indocianina fluorescente en el rojo lejano, proporcionando un pico de emisión a 675 nm (7). Sin embargo, en BRET, el donador y el aceptor deben estar muy cerca (menos de 10 nm (12-15)), puesto que implica una transferencia de energía no radiante desde el donante luminiscente al aceptor.

El uso de BRET ha tenido mucho éxito pero puede ser difícil de ejecutar, puesto que deben utilizarse diversas técnicas sintéticas para conjugar las luciferasas donadoras al QD aceptor, u otro fluoróforo, para lograr la transferencia de energía de resonancia deseada. La necesidad de unir el marcador biológico a un QD u otro aceptor emisor de fotones 'rojos' puede hacer que el marcador biológico sea menos eficaz como medio para visualizar *in vivo* una célula, un tejido o un organismo. Esto puede ser el resultado de la interferencia con la función o la capacidad del marcador biológico para producir una señal y/o para moverse libremente para asociarse con su diana, cuando sea apropiado.

En esta solicitud de patente, los inventores presentan una alternativa a la transferencia de energía de resonancia (RET) que no requiere que las fuentes de donadores y aceptores estén en proximidad molecular y aún puede proporcionar el desplazamiento al rojo deseado en los fotones emitidos desde el marcador biológico. Este fenómeno, denominado fluorescencia por excitación no unida desde luminiscencia ("Fluorescence by Unbound Excitation from Luminescence", FUEL), se diferencia de RET porque no es necesario que el donador y el aceptor estén en proximidad molecular y la FUEL puede producirse en distancias sustancialmente más grandes (uno o más micrómetros o más allá).

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la presencia de un marcador biológico productor de fotones en una célula, un tejido o un organismo de interés, o sobre su superficie, que comprende las etapas definidas en la reivindicación 1.

La FUEL implica el uso de una pareja de sondas de FUEL (FPP) que consiste en dos componentes: la FPP-inferior (FPP-L) y la FPP-superior (FPP-U), cualquiera de las cuales puede ser el marcador biológico.

Por ejemplo, un parásito marcado con RFP puede ser introducido en células marcadas con GFP susceptibles y estudiarse la infección de las células. En este caso, una FPP-L, tal como QD, también está presente en el sistema que se está estudiando, que emite fotones que excitan a RFP, lo cual conduce a la emisión de más fotones de RFP que pueden ser detectados. Por tanto, el marcador biológico es el parásito marcado, que también es la FPP-U.

Como alternativa, las células marcadas con pueden ser la FPP-L. Cuando se suministran las condiciones que provocan la emisión de fotones, tales como una fuente interna o externa de luz excitante, estos fotones de GFP entonces excitan a la FPP-U dispuesta en proximidad cercana a las células, en donde los fotones procedentes de FPP-U son entonces detectados.

En ambos casos, la presencia de un marcador biológico se detecta empleando FUEL.

La FPP-L puede ser el marcador biológico luminiscente, y este marcador biológico es una sonda luminiscente que incluye proteínas fluorescentes. La FPP-U también es una molécula luminiscente que consiste en fluoróforos/sonda fluorescente que incluye puntos cuánticos, proteínas fluorescentes, nanotubos de carbono, nanodiamantes o metaloporfirinas.

Es necesario que el espectro de emisión de la FPP-L se solape con el espectro de excitación de la FPP-U para asegurar una producción adecuada de fotones desplazados al rojo.

Según otro aspecto de la presente invención, una pluralidad de FPP intermedias pueden estar intercaladas en una

cascada de excitación y emisión de fotones entre el marcador biológico y la FPP-U final que produce el fotón observado. Por tanto, en concreto, la presente invención se refiere a un conjunto de FPP, cada una de las cuales tiene un espectro de excitación que se solapa con el espectro de emisión del miembro previo en la cascada y, a su vez, produce un fotón que está dentro del espectro de excitación del siguiente miembro de la cascada.

- 5 Según este aspecto de la presente invención, se proporciona un método de 'cascada' para determinar la presencia de un marcador biológico luminiscente productor de fotones en una célula, un tejido o un organismo de interés, o sobre su superficie, que comprende las etapas definidas en la reivindicación 10.

Cualquiera de las características específicas detalladas en la presente relacionadas con las propiedades de las FPP-L o FPP-U es aplicable a la pluralidad de FPP empleadas en este método de 'cascada'.

- 10 Este método implica el uso de FPP-U que son suficientemente excitadas por fotones emitidos por un marcador biológico, tal como una bacteria bioluminiscente, como medio para potenciar la detección no invasiva del marcador biológico *in vivo*. Los puntos cuánticos son nanocristales (con un tamaño de 10-40 nm) que consisten en un material de núcleo semiconductor (por ejemplo, CdSe) y un revestimiento de polímero anfílico modificado covalentemente con un polietilenglicol (PEG) funcionalizado u otro revestimiento externo (16). Los QD tienen un aspecto de absorbanza característicamente amplio pero un perfil de emisión estrecho para casi todas las longitudes de onda de excitación aplicables (17), con unas eficacias cuánticas que varían del 60-85% (18, 19).

- 15 Los nanotubos de carbono son alótropos del carbono con una estructura cilíndrica y son miembros de la familia estructural del fullereno. Los nanotubos de pared única pueden tener un diámetro de aproximadamente 1 nm. Los nanotubos de carbono presentan un desplazamiento de Stokes grande que puede ser excitado comenzando aproximadamente en 600 nm y emiten por encima de 900 nm (28).

Las proteínas fluorescentes se usan con mucha frecuencia. La proteína fluorescente verde, purificada en un primer momento de *Aequorea victoria*, ahora se clona habitualmente en muchas células y animales. Se han desarrollado una multitud de derivados para casi todas las longitudes de onda de excitación y emisión. Estas proteínas pueden tener una gran eficacia cuántica pero, en general, no presentan un gran desplazamiento de Stokes.

- 25 Los nanocristales de diamante, o nanodiamantes, se producen a partir de materiales de diamante que tienen un alto contenido en nitrógeno. Estos diamantes ricos en nitrógeno son irradiados con electores de alta energía que crean centros de vacancia de nitrógeno cargados negativamente. Los diamantes irradiados después pueden asociarse a altas temperaturas para potenciar los centros. Estos materiales pueden tener un tamaño nominal de 100 nm, con una absorción centrada en 560 nm, y emiten con eficacia a 700 nm. Se ha indicado que tienen una eficacia cuántica cercana a 1, son química y biológicamente inertes, y pueden realizarse sobre ellos químicas de superficie (29, 30).

- 30 Las metaloporfirinas, en particular la platino-, paladio-, y rutenio-porfirina, tienen varias propiedades interesantes. Todas son habitualmente excitables a 400 nm o menos, mientras que emiten a unas longitudes de onda mayores que 650 nm. Muchas metaloporfirinas tienen un intervalo de excitación secundario entre 500-550 nm. Las metaloporfirinas listadas anteriormente también son sensibles al oxígeno, de modo que su intensidad de luminiscencia y tasas de descomposición de tiempo de vida son una función de la concentración local de oxígeno (31-33).

- 35 En la presente solicitud de patente, las expresiones "energía de un fotón" y "longitud de onda de una señal de luz" se emplean para describir diversos aspectos del fotón/señal emitido por la FPP-L y FPP-U. Puesto que se considera que una radiación electromagnética es una partícula (fotón) y una onda electromagnética, el mismo fotón/onda tendrá, por tanto, un valor de energía así como una longitud de onda. La relación entre estos diferentes valores es directa y, en términos generales, cuanto menor sea la energía de un fotón, mayor será la longitud de onda. Por tanto, cuando se indica que el segundo fotón producido por la FPP-U tiene menor energía que el primer fotón producido por la FPP-L, también es verdad o puede decirse, como alternativa, que la longitud de onda del segundo fotón es mayor que la longitud de onda del primer fotón.

- 45 Según la presente solicitud de patente, el marcador biológico puede ser la FPP-L de la FPP empleada para desplazar al rojo la señal óptica empleando FUEL. Como alternativa, el marcador biológico puede ser la primera de una serie de FPP que en último término, a través de una serie de excitaciones intermedias, conducen al desplazamiento al rojo de la señal óptica.

- 50 Por tanto, las referencias al marcador biológico pueden ser una referencia a la FPP-L o a la primera de una serie de FPP. Como alternativa, el marcador biológico puede ser la FPP-U que es excitada por una FPP-L presente en el sistema que se está estudiando o, como alternativa, puede ser una FPP en una cascada de FPP.

Según la presente invención, la expresión "*in vitro*" se refiere a cualquier mezcla o disolución de células, tejidos, organismos u otros materiales derivados de un organismo vivo o muerto, en combinación con productos químicos, reactivos, bajo condiciones predefinidas.

- 55 Según la presente invención, la expresión "*in vivo*" se refiere a cualquier operación realizada empleando cualquier mezcla o disolución de células, tejidos, organismos u otros materiales derivados de un organismo vivo o muerto, en

combinación con productos químicos, reactivos, bajo condiciones predefinidas, cuando se realiza en un animal intacto.

Según la presente invención, las condiciones adecuadas para que el marcador biológico produzca al menos un fotón variarán dependiendo del marcador biológico seleccionado. Por ejemplo, en el caso de un marcador biológico bioluminiscente, tal como luciferasa, es necesario inducir/permitir la expresión de esta enzima y después proporcionar las condiciones mediante las cuales la enzima pueda producir una señal de luz *in vivo*, *in vitro* o *in situ* proporcionando, si es necesario, todos los reactivos componentes que pueda necesitar emplear la luciferasa. De modo similar, para un marcador biológico quimioluminiscente, es necesario que todos los reactivos componentes necesarios para la reacción estén presentes o, en el caso de un marcador biológico fluorescente, es necesario que esté presente una fuente de luz de excitación adecuada.

Según la presente invención, el marcador biológico puede estar en el interior de la célula, tejido u organismo diana; o estar dispuesto sobre alguna o todas sus superficies; o ambos, dentro y sobre la superficie de estas dianas.

Según la presente invención, la FPP-U se encuentra en proximidad a la célula, tejido u organismo diana y puede estar localizado, en particular, dentro de estas estructuras y/o sobre su superficie y/o estar dentro del medio que rodea a estas estructuras, en condiciones en las que no se produce RET. En particular, la FPP-U debe estar lo suficientemente cerca del marcador biológico para que los fotones producidos por el marcador biológico puedan excitar la FPP-U que, a su vez, puede producir al menos un segundo fotón.

Según la presente invención, el marcador biológico y la FPP-U no están unidos covalentemente, ni por cualquier otro medio, entre sí, lo cual significa que no están asociados entre sí en la célula, tejido u organismo diana de una manera en que pueda producirse RET.

Según la presente solicitud de patente, un marcador biológico puede ser cualquier molécula, compuesto o enzima bioluminiscente, fluorescente o quimioluminiscente u otra estructura que produzca fotones de una naturaleza definida. Por ejemplo, una *Escherichia coli* bioluminiscente (denominada RT57) (20) que porta un plásmido que expresa el operón luxCDABE que comprende genes que codifican productos bioluminiscentes con una emisión centrada en 480 nm se emplea en algunos de los ejemplos detallados en la presente para excitar puntos cuánticos en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Tal como se indicó anteriormente, los inventores ahora han demostrado que BRET no es una etapa necesaria en el desplazamiento al rojo de la emisión de un marcador biológico. Por ejemplo, en la tabla 1 de la presente, que emplea el filtro Cy5.5, se observa que aunque se advierte una emisión significativa desde la FPP-U, QD705, cuando se permite que las bacterias bioluminiscentes, RT57 y QD705 se depositen juntos, se sigue observando un aumento sustancial cuando ambos componentes están separados a casi 3 cm de distancia en total, incluyendo 10 mm de agar ($6,10 \pm 1,79$ frente a $2,21 \pm 1,00$), produciendo FUEL. La figura 4 muestra el fenómeno de FUEL a una distancia mucho mayor de la que produciría la aparición de una transferencia de energía de resonancia.

Esta comparación indica que (1) las bacterias bioluminiscentes son capaces de excitar los QD desde una distancia considerable, y (2) no son necesarias unas condiciones de BRET intencionadas para lograr la excitación eficaz de la FPP-U. La probabilidad de que se produzca BRET cuando la fuente luminiscente y las sondas fluorescentes no estén unidas entre sí es mínima en el mejor de los casos, dado el tamaño relativo del emisor de fotones y el fluoróforo, en comparación con el volumen global en el que están contenidos. Así, el hecho de que se produzcan más fotones rojos cuando la bacteria luminiscente y QD705 están en proximidad cercana es debido, muy probablemente, al mayor número de fotones disponibles para excitar la FPP-U. En otras palabras, el flujo de fotones observado es mayor cuanto más cerca esté la FPP-U del marcador biológico, y se aumenta la probabilidad de excitación de FPP-U por los fotones emitidos por el marcador biológico.

A la inversa, cuanto mayor sea la distancia entre la FPP-L y la FPP-U, menor será la probabilidad de excitación, lo cual explica el descenso en fotones rojos. Dadas las grandes distancias de excitación ($\mu\text{m-cm}$, figuras 3-6), la excitación de la FPP-U es un proceso radiante y no implica la interacción de dipolo-dipolo necesaria para RET.

El método descrito en la presente, aunque se describe en particular con respecto a la bioluminiscencia, puede extenderse a otros sistemas de transferencia de energía radiante, tales como fluorescencia o quimioluminiscencia.

Puede sostenerse que la falta de contacto directo entre el marcador biológico y la FPP-U que está produciendo la señal detectada, tras un examen inicial, indica que existe una falta de especificidad en el método FUEL, pero, tal como se muestra en las figuras 3-6 y en la tabla 1, la presencia de un absorbente (en este caso, rojo Congo) demuestra la dependencia de la distancia entre el marcador biológico y la FPP-U. Así, FUEL es capaz de identificar la presencia de bacterias bioluminiscentes en una localización específica o, potencialmente, la interacción entre una bacteria y una célula "marcada". También a partir de las figuras 3, 4, 7 se puede inferir que la detección de estas bacterias podría producirse a una titulación menor, debido al desplazamiento al rojo en los fotones de FPP-U, lo cual aumentaría la sensibilidad global de la imagen de bioluminiscencia.

En la presente solicitud de patente, los inventores también presentan un conjunto de experimentos *in vivo* que se realizaron para determinar la viabilidad de FUEL bajo condiciones experimentales típicas. Tal como puede

observarse de las figuras 9 y 10 y las tablas 3 y 4, existen pruebas muy fuertes que indican que el fenómeno de FUEL puede utilizarse con facilidad. Sin embargo, la eficacia y la utilidad de FUEL para la formación de imágenes de bioluminiscencia dependen en gran medida de la FPP-U.

5 Los inventores consideran que los QD son adecuados para un uso a corto plazo como la FPP-U según la tecnología FUEL descrita en la presente, y que existen muchas razones para utilizar QD para la formación de imágenes de bioluminiscencia, que incluyen un ancho espectro de absorción, un estrecho espectro de emisión, un desplazamiento de Stokes significativo y una eficacia cuántica cercana a 1. Los QD deben estar presentes en el hospedante o en la diana en el momento de la medición o mediciones. En el caso de la figura 9, se tomaron
10 imágenes de los ratones inmediatamente después de la inyección (los controles han demostrado que no produce una difusión significativa a lo largo de varias horas que podría alterar la cuantificación de las bacterias, los puntos cuánticos o su interacción FUEL).

Por tanto, los inventores han demostrado que no es necesario emplear BRET para desplazar al rojo los fotones bioluminiscentes hasta el rojo profundo o NIR, más deseables desde el punto de vista óptico. Una excitación no unida procedente de la luminiscencia puede aparecer y aparece entre un marcador biológico, tal como una bacteria bioluminiscente, y una FPP-U, concretamente un QD, y esta transferencia se produce a una distancia considerable si no está presente un absorbente bioluminiscente.
15

Los inventores han demostrado que el uso de FUEL puede aumentar sustancialmente el número de fotones rojos en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, aumentando con ello la sensibilidad de la formación de imágenes bioluminiscentes.

Según otros aspectos de la presente invención, el marcador biológico, por tanto, es bioluminiscente.

20 En la actualidad se emplean de forma habitual multitud de moléculas bioluminiscentes para marcar, aislar y controlar los diversos componentes de células, virus y materiales relacionados. Los ejemplos incluyen aequorina o enzimas que producen fotones como producto de la reacción que catalizan, tales como las luciferasas procedentes de diversos organismos. Todos estos marcadores bioluminiscentes y sus variantes pueden emplearse como la FPP-L según la presente solicitud de patente.

25 Como alternativa, el marcador biológico es quimioluminiscente.

Como alternativa, el marcador biológico es fluorescente.

En particular, el marcador biológico emite fotones con una longitud de onda menor que 650 nm.

Más en particular, el marcador biológico emite fotones con una longitud de onda de 400-650 nm.

30 En particular, la FPP-U emite fotones con una longitud de onda más larga que la longitud de onda de los fotones emitidos por la FPP-L.

En particular, la FPP-U el marcador biológico emite fotones con una longitud de onda de 650-900 nm.

Aunque se proporcionan unos intervalos de emisión específicos para la FPP-L y la FPP-U, estos componentes no se ven necesariamente limitados por intervalos de longitudes de onda, y las características técnicas clave son que cada FPP-L tiene una longitud de onda más corta que su FPP-U, que el espectro de emisión de la FPP-L se solapa con el espectro de excitación/absorción de la FPP-U, y que, de modo global, el fotón emitido por el marcador biológico (la FPP-L o la FPP-U) se detecta con más facilidad.
35

Según otro aspecto de la presente invención, el marcador biológico y/o la FPP-U pueden estar presentes como una sola copia o como múltiples copias dentro de la célula, el tejido o el organismo con el que se está trabajando.

40 Según otro aspecto de la presente invención, el método comprende determinar la presencia de al menos dos marcadores biológicos productores de fotones en una célula, un tejido o un organismo; en el que cada uno de dichos al menos dos marcadores biológicos emite fotones en un intervalo no solapante de longitudes de onda que excitan al menos uno de dos subconjuntos de dicha FPP-U que emite al menos un fotón, en el que dicho al menos un fotón emitido por cada subconjunto de FPP-U está en un intervalo no solapante de longitudes de onda.

45 Además de utilizar FUEL para transducir la señal desde un único tipo de marcador biológico, también sería posible transducir varias señales no solapantes procedentes de varios marcadores biológicos proporcionando diferentes subconjuntos de FPP-U. Además, cada uno de estos subtipos de FPP-U emite señales no solapantes, permitiendo así visualizar las diferentes señales biológicas.

Según este aspecto concreto de la presente invención, los diferentes subconjuntos de FPP-U pueden ser el mismo tipo de molécula o, como alternativa, puede ser diferentes tipos de moléculas. En una realización preferida, un subconjunto de las FPP-U es un QD, y el otro subconjunto es un nanotubo de carbono.
50

En particular, las FPP-U comprenden medios para dirigir las a porciones específicas de dicha célula, tejido u organismo.

- 5 Están disponibles una diversidad de medios para dirigir una molécula o compuesto concreto hasta una localización intra- o extracelular, que incluyen señales de localización nuclear, péptidos penetrantes en la células, anticuerpos y aptámeros. La combinación de dicho componentes con la FPP-U permitiría, por tanto, colocar la FPP-U en una localización óptima para recibir (si están presentes) los fotones procedentes del marcador biológico y transformarlos en una señal detectable.
- En particular, el marcador biológico puede estar libre o asociado con un componente de la célula, tejido u organismo diana. Por ejemplo, el marcador biológico puede ser parte de una proteína de fusión.
- En particular, la FPP-U se dispone dentro de la célula, tejido u organismo.
- Como alternativa, la FPP-U se dispone fuera de la célula, tejido u organismo.
- 10 Como alternativa, la FPP-U se dispone dentro y fuera de la célula, tejido u organismo.
- Empleando los mecanismos específicos listados anteriormente para colocar una FPP-U dentro o fuera de una célula, tejido u organismo de interés, o simplemente eligiendo el momento de la etapa de visualización para permitir que la FPP-U se difunda totalmente hasta la diana, el presente método permite colocar, según sea apropiado, la FPP-U para determinar mejor la señal producida por el marcador biológico.
- 15 Según otro aspecto de la presente invención, el marcador biológico (FPP-L) y su pareja (FPP-U) pueden asociarse entre sí, como componentes de una molécula más grande, pero la FPP-L y la FPP-U no están asociadas entre sí de modo que pueda producirse una RET.
- Se describe un kit para realizar el método según la presente invención, que comprende, al menos:
- al menos una FPP-U según la presente invención; e
- 20 instrucciones para la realización del método según la presente invención,
- en el que al menos una FPP-U tiene un espectro de excitación que se solapa con el espectro de emisión de un marcador biológico y de modo que, cuando se dispone en proximidad al marcador biológico en un sistema que está estudiando, emitirá fotones a través del mecanismo FUEL que, a su vez, pueden detectarse.
- En particular, se describe que el kit puede comprender al menos un marcador biológico según la presente invención.
- 25 En particular, se describe que el kit comprende además un compuesto que absorbe los fotones producidos por dicho marcador biológico.
- Mediante el suministro de un absorbente de los fotones producidos por el marcador biológico, el usuario del kit, mientras está realizando el método, puede controlar la distancia entre el marcador biológico y la FPP-U que permitiría que la FPP-U se excite, ya que la presencia del absorbente reduce esta distancia en función de su concentración. Se conocen una multitud de posibles absorbentes para cada longitud de onda de emisión concebible del marcador biológico, y todos estos absorbentes se incluyen en la presente solicitud de patente.
- 30 Se describe un kit para realizar el método según la presente invención, que comprende:
- al menos una FPP-L según la presente invención; e
- instrucciones para la realización del método según la presente invención,
- 35 en el que al menos una FPP-L tiene un espectro de emisión que se solapa con el espectro de excitación de un marcador biológico y de modo que, cuando se dispone en proximidad al marcador biológico en un sistema que está estudiando, provoca que el marcador biológico emita fotones a través del mecanismo FUEL que, a su vez, pueden detectarse.
- También se describe un kit que comprende una pluralidad de FPP con espectros de emisión y excitación secuencialmente solapantes que pueden utilizarse en un sistema de FPP de cascada según se detalla en la presente.
- 40 También se describe el uso de una FPP-U, por ejemplo QD no unidos, para determinar la presencia de un marcador biológico productor de fotones en una célula, un tejido o un organismo de interés, en el que se produce FUEL entre el marcador biológico y los QD no unidos, lo cual conduce a un desplazamiento al rojo de la señal emitida por el marcador biológico.
- 45 También se describe el uso de una of FPP-L para producir un fotón y determinar la presencia de un marcador biológico productor de fotones en una célula, un tejido o un organismo de interés, en el que se produce FUEL entre la FPP-L y el marcador biológico, lo cual conduce a un desplazamiento al rojo de la señal.
- Para comprender mejor la invención y para mostrar cómo puede llevarse a cabo, a continuación se ofrecen, solo

como ejemplo, realizaciones específicas, métodos y procesos según la invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: Espectros de absorción y emisión de diferentes elementos del experimento.

5 A. Espectro de emisión de RT57, espectros de excitación y emisión de QD705, y espectro de absorción del rojo Congo. La región rayada (///) indica el solapamiento espectral entre la emisión de RT57 y la excitación de QD705.

B. Espectro de absorción de pulmón, sangre e hígado de ratón.

10 Figura 2: Excitación no unida de QD705 empleando *E. coli* bioluminiscente. Se formaron partes alícuotas de agua fisiológica (columna 1), RT57 (columna 2), QD705 (columna 3), y una mezcla de RT57 y QD705 (columna 4) y se introdujeron en distintos tubos Eppendorf de 1,5 ml y se observó la luminiscencia resultante empleando conjuntos de filtros Open y Cy5.5 (filas 1 y 2, respectivamente) ajustándose el tiempo de exposición a 5 s. Con el conjunto de filtros Openset se observaron niveles similares de luminiscencia para RT57 y RT57+QD705, mientras que no se observó luminiscencia para los dos controles. Se observó un aumento sustancial en el número de fotones para la mezcla de RT57+QD705, comparado con RT57 por sí solo, cuando se observan con el conjunto de filtros Cy5.5. Se confirmó la presencia de QD705 mediante excitación de fluorescencia empleando un tiempo de exposición de 0,25 s (fila 3).

Figura 3: Montaje experimental para la determinación de la dependencia de la distancia de FUEL.

A. Diagrama esquemático que muestra la colocación de las placas y la localización de RT57 y QD705. Se indican las distancias entre las bacterias y QD705.

20 B. Fotografía del montaje de placas de la condición 1 (cuatro placas de agar) y la condición 2 (dos placas de agar y dos placas de CRAgar).

Figura 4: Experimento de crecimiento durante la noche para la condición 2.

A. Curva de crecimiento durante la noche de bacterias bioluminiscentes bajo la condición 2.

B. Ejemplo de la imagen de último punto de tiempo para la condición 2.

C. Comparación de las columnas 2, 3, y 4 con la columna 1 que muestra la potenciación de los fotones detectables.

25 Figura 5: Dependencia de la distancia del efecto FUEL. Una parte alícuota de *E. coli* bioluminiscente (no visible: cubierta por un trozo de papel negro) se coloca entre dos cubetas rellenas con QD705 (izquierda) o agua (derecha) a distancias crecientes y se detecta la luminiscencia resultante. Intensidades luminiscentes normalizadas del efecto FUEL como una función de la distancia. La dependencia de la distancia del efecto FUEL se repitió por triplicado empleando tres cultivos bacterianos diferentes.

30 Figura 6: Excitación a distancia de QD705 empleando RT57. Una parte alícuota de una disolución madre de RT57 se colocó en el centro de una placa Petri. Se colocaron partes alícuotas de QD705 a intervalos crecientes de 0,5 cm (de centro a centro) desde RT57 hasta una distancia de trabajo total de 2 cm. (A) Luminiscencia resultante con el conjunto de filtros Cy5.5. (B) Verificación de las localizaciones de las partes alícuotas de QD705 empleando excitación de fluorescencia. (C) Disminución de la emisión de QD705 como función de la distancia desde RT57.

35 Figura 7: Se determinó el aumento en la generación de fotones rojos por la adición de QD705 empleando varias condiciones experimentales establecidas empleando dos cubetas en tándem de cuarzo separadas por un trozo de papel negro. Se cortó una pequeña ventana en el papel para permitir pasar a los fotones bioluminiscentes.

40 Figura 8: Detección de la luminiscencia mejorada a través de muestras *ex vivo*. Se observó la luminiscencia de tres mezclas de RT57+QD705 distintas a través de MWB, hígado homogeneizado o pulmón homogeneizado, y se normalizó a la luminiscencia observada de RT57 por sí solo bajo las mismas condiciones. Aunque se descubrió un aumento en el número de fotones observados para la mezcla con el conjunto de filtros Open (izquierda), se observó un aumento bastante grande en el número de fotones rojos con el conjunto de filtros Cy5.5 (derecha).

45 Figura 9: Ejemplo *in vivo* de potenciación de fotones detectables en presencia de QD705. Las imágenes se adquirieron con conjuntos de filtros Open, 610LP, y Cy5.5 después de una inyección intramuscular en el muslo de bacterias y bacterias+QD705.

Figura 10: Demostración *In vivo* de FUEL. Dos perlas de agar diferentes se insertaron de modo subcutáneo en el muslo izquierdo y derecho de un ratón hembra. Cada perla consiste en un núcleo de agarosa+RT57. Una segunda capa de agarosa o de una mezcla de QD705 en agarosa se añade al núcleo de la perla, creando la perla control o FUEL, respectivamente. Después los ratones se colocan en el sistema de formación de imágenes y se observan en posición ventral y dorsal a través de ambos conjuntos de filtros Open y QD705. Tal como puede advertirse, se observa una potenciación de fotones rojos limitada cuando los ratones se observan en posición ventral con el conjunto de filtros Open. Debido a la presencia de tan solo una capa delgada de piel, solo se espera un efecto FUEL

limitado. Sin embargo, el efecto FUEL se observa con facilidad con el filtro QD705. Los ratones después se dieron la vuelta de modo que la luminiscencia de las perlas tendría que atravesar el muslo entero del ratón antes de alcanzar el detector. En este caso, la potencia de FUEL puede observarse con facilidad como un aumento significativo en el número total de fotones observados, en ambos conjuntos de filtros Open y QD705.

- 5 Figura 11A: Representación esquemática del modelo FUEL *in vivo*. La *E. coli* bioluminiscente irradia luz en todas las direcciones. En ausencia de QD705, algunos de los fotones emitidos serán absorbidos por cualquier extintor (por ejemplo, hemoglobina) que esté presente *in vivo*. Cuando QD705 están cerca de RT57, algunos de los fotones emitidos incidirán sobre QD705, con lo que se induce un acontecimiento fluorescente que produce protones desplazados al rojo que son poco absorbidos por los mismos extintores. La mayor producción de fotones rojos conduce a un aumento en la especificidad y la señal luminiscente roja para la formación de imágenes de animales completos.

15 A continuación se describirá como ejemplo un modo específico ejecutado por los inventores. En la siguiente descripción se ofrecen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión a fondo. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que la presente invención puede llevarse a cabo sin limitación a estos detalles específicos. En otros casos no se han descrito métodos y estructuras conocidos para no complicar innecesariamente la descripción.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Reactivos habituales

20 La *E. coli* bioluminiscente que porta el plásmido que expresa el operón lux (pUC18-mini-Tn7T-Gm-lux indicado como RT57) se describe en Choi *et al.* (20) y se denomina RT57 en lo sucesivo. Los puntos cuánticos no dirigidos Qtracker 705 se adquirieron en Invitrogen y se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C hasta su uso (denominados QD705). Para preparar las placas de agar se añadieron 25 ml de agar estéril caliente a una placa Petri de 10 cm bajo condiciones estériles y se dejó enfriar. El rojo Congo (Sigma) se preparó al 1% en p/v en H₂O estéril. Se empleó agarosa de bajo punto de fusión (Lonza, Francia) para la construcción de las perlas. Se preparó disolución salina fisiológica normal (NaCl al 0,9%, denominada PS) en el laboratorio y se empleó para todas las diluciones. Para el rojo Congo + placas de agar (CRAgar), se añadieron 4 ml of rojo Congo al 1% en p/v (Sigma) en H₂O estéril a 400 ml de agar estéril caliente para una concentración final del tinte del 0,01% en agar. La disolución se mezcló a fondo y después se añadieron 25 ml a una placa Petri de 10 cm y se dejó enfriar. Las placas resultantes contenían una capa de 5 mm de espesor de agar o CRAgar. Después de que el agar y CRAgar hubieran solidificado, las placas preparadas se invirtieron y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Para todos los experimentos animales se emplearon ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad (Janvier, Francia).

Preparación de bacterias

35 El día antes de la formación de imágenes se estableció un cultivo durante la noche de RT57. A la mañana siguiente se adquirió la DO₆₀₀ y, cuando fue necesario, se cultivó en placa dependiendo de la dilución apropiada realizada para lograr una concentración final de 1000 bacterias/5 µl de disolución salina. Las bacterias después se cultivaron en placa dependiendo de la orientación deseada (en general, una matriz 3 x 4 de partes alícuotas de 5 µl).

Excitación a larga distancia de QD705

40 Se empleó cinta adhesiva negra para crear dos ventanas ópticas de 2 mm x 3 mm en una cubeta desechable de volumen reducido (Ratiolab, Alemania), con las dos ventanas situadas en las caras opuestas de la cubeta y localizadas cerca de la base, pero separadas de esta. Esta cubeta modificada se rellenó con 1 ml de disolución madre de RT57 procedente de un cultivo durante la noche, se cubrió con un trozo de papel negro y se colocó en el sistema de formación de imágenes Ivis. El papel negro inhibe la observación de la bioluminiscencia de RT57. Dos cubetas de volumen reducido no modificadas se rellenaron con 1 ml de PS, o 1 ml de la disolución de QD705 previamente descrita, y después se colocaron a cada lado de la cubeta modificada que contiene RT57, de modo que las tres cubetas estaban alineadas axialmente y a una distancia de 10 mm entre las cubetas central y exterior (enfrentadas). Se observó la luminiscencia resultante para los conjuntos de filtros Open y QD705. Después de la adquisición, la distancia entre las dos cubetas no modificadas y la cubeta central aumentó en 5 mm, y se observó la luminiscencia. Esto se repitió hasta una separación total de 30 mm para tres cultivos bacterianos diferentes.

50 En un experimento alternativo, una parte alícuota de 5 µl de una disolución madre de RT57 se colocó en el centro de una placa Petri vacía. Comenzando a una distancia de 5 mm (de centro a centro) desde las bacterias, se colocaron partes alícuotas de 2 µl de QD705 irradiando hacia fuera, aumentando en intervalos de 5 mm hasta una distancia total de 2 cm. Se formaron imágenes de la placa durante 300 s empleando el conjunto de filtros específicos para QD705. Se adquirió una imagen de fluorescencia para verificar la localización de QD705.

Aumento en la generación de fotones rojos por la adición de QD705.

55 Se establecieron múltiples condiciones experimentales empleando dos cubetas en tándem de cuarzo (tabla insertada en la figura 7, PS: disolución salina fisiológica; QD705: disolución de QD705; RT57: *E. coli* bioluminiscente;

CR: rojo Congo) separadas por un trozo de papel negro. Se cortó una pequeña ventana en el papel para permitir pasar a los fotones bioluminiscentes. El papel también proporciona una separación física entre las dos cubetas para asegurarse de que no pueda establecerse contacto físico entre QD705 y RT57. Se observó la intensidad de luminiscencia para cada condición con conjuntos de filtros específicos de RT57 y de QD705 (indicado como 480 y QD705, respectivamente), realizándose cada condición por triplicado.

Adquisición espectral

Se empleó un espectrómetro de dos recorridos de UV/visible Perkin-Elmer con una anchura de ranura de 1 nm y ajustado a una velocidad de barrido de 480 nm/min para adquirir los espectros de absorción para el rojo Congo, sangre de ratón completa, hígado y pulmón (figura 1). Se empleó agua estéril como referencia. Para cada adquisición se añadió 1 ml de cada analito a una cubeta de plástico de 1 ml con una longitud de recorrido de 1 cm. Se registró el espectro de emisión bioluminiscente de RT57 con un espectrofluorómetro PTI Quanta-Master QM4CW (PTI, Lawrenceville, NJ) empleando una cubeta de cuarzo con una longitud de recorrido de 1 cm termostatazada a 25 °C. Se registró la luminiscencia de 400 a 750 nm con anchuras de ranura de 5 nm. Los espectros de excitación y emisión de QD705 se adquirieron con anchuras de ranura de 5 nm.

Formación de imágenes de bioluminiscencia *in vitro*

Se empleó un sistema de formación de imágenes de animales completos IVIS 100 (Xenogen Corporation, Caliper Life Sciences, Alameda, CA) equipado con un CCD enfriado y una rueda de filtros, para adquirir todas las imágenes bioluminiscentes. Los filtros empleados fueron un filtro de paso largo 610 (610LP) y un filtro de paso de banda Cy5.5 (695 nm-770 nm, también denominado filtro de QD705). Una localización dentro de la rueda de filtros se mantuvo vacía para la detección de la luz total, denominándose conjunto de filtros Open. Para cada experimento, el CCD se enfrió hasta -105 °C y la cámara oscura se calentó hasta 37 °C. A menos que se indique lo contrario, los ajustes de adquisición para el software Living Image (Xenogen) versión 3.1 se ajustaron como sigue: tiempo de adquisición de 5 minutos para los tres conjuntos de filtros, 8x bin, campo de visión C (20 cm), y f-stop 1. En el caso de un experimento a lo largo del tiempo, se estableció una secuencia de imágenes de modo que las imágenes de Open, 610LP, y Cy5.5 se adquirieron secuencialmente y después se deja un retraso de 45 minutos, creando así un ciclo de imágenes de una hora. Este ciclo se repitió hasta que el punto deseado.

Excitación a distancia de puntos cuánticos empleando bacterias bioluminiscentes no unidas

Se establecieron dos condiciones diferentes para medir el efecto de la distancia sobre la producción de fotones de RT57-QD705, realizándose la condición 1 con cuatro placas de agar y la condición 2 con dos placas de agar y dos placas de CRAgar (figura 3). Antes de la colocación de las bacterias y QD705, las placas requeridas se retiraron de la conservación a 4 °C, se dejó que se calentasen hasta la temperatura ambiente y se comprobó si existía contaminación. Para la condición 1, doce partes alícuotas de 5 µl de la disolución bacteriana se pipetearon en una matriz de 3 filas por 4 columnas (3 x 4) sobre una placa de agar con gentamicina a una concentración final de 50 µg/ml. Se dejó que las gotas de bacterias, que contenían 1000 células cada una, se asentase en el agar (placa 1). Una segunda placa de agar se guardó hasta la construcción final del apilamiento de placas (placa 2). Entonces se pipetearon tres partes alícuotas de 2 µl de QD705 sobre la tercera placa de agar (placa 3) de modo que, cuando se apilan sobre la placa que contiene las bacterias (placa 1), cada parte alícuota de QD705 está verticalmente alineada con cada parte alícuota de bacterias para la columna 3. Un segundo conjunto de partes alícuotas de QD705 se colocó en la cuarta placa de agar (placa 4) alineándose cada parte alícuota con la correspondiente columna 4 de bacterias en la placa 1. Por último, después de asegurarse de que las bacterias estaban asentadas en el agar, se añadió una parte alícuota de 2 µl de QD705 directamente sobre cada parte alícuota de bacterias localizadas en la columna 2 de la placa 1. Las placas se invirtieron y se apilaron en orden, con la placa 1 en la parte inferior, después la placa 2 vacía, seguido de las placas 3 y 4. El apilamiento después se colocó en el Ivis 100 y se comenzó con la secuencia de imágenes. Para la condición 2 se siguió el mismo procedimiento, excepto que las placas 2 y 3 consistían en CRAgar en lugar de agar. La altura total de la placa medida fue de 14 mm con una profundidad del agar o CRAgar de 5 mm (figura 3). La distancia total entre RT57 y la correspondiente parte alícuota de QD705 fue la siguiente: 0 mm para la columna 2, 28 mm para la columna 3, y 42 mm para la columna 4.

Excitación no unida de QD705

Para determinar si las RT57 bioluminiscentes eran capaces de excitar a QD705 sin que fuera necesaria una unión física, se prepararon una serie de tubos Eppendorf de 1,5 ml. El primer tubo incluía 10 µl de la disolución madre bacteriana diluida hasta 100 µl empleando disolución salina fisiológica (PS). Se preparó un segundo tubo empleando 10 µl de disolución madre bacteriana, 4 µl de QD705, y 86 µl de PS. Se establecieron dos controles luminiscentes, y el primero incluía 4 µl de QD705 diluido hasta 100 µl, y el segundo consistía solo en 100 µl de PS. Los cuatro tubos se mezclaron suavemente con una pipeta para crear disoluciones homogéneas y se colocaron en el sistema de formación de imágenes con separadores de plástico negro colocados entre cada tubo para minimizar el cruzamiento de señales. La bioluminiscencia resultante se observó durante 5 s con ambos conjuntos de filtros. Se confirmó la presencia de QD705 empleando la formación de imágenes de fluorescencia.

Formación de imágenes bioluminiscentes *ex vivo*

5 Tres ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad se anestesiaron con quetamina/xilazina. Se realizó una punción cardíaca en cada ratón para obtener aproximadamente 1 ml de sangre. Se retiró el hígado y se colocó en 2 ml de PBS enfriado. Por último, los pulmones también se retiraron y se colocaron en 1 ml de PBS enfriado. Los órganos después se homogeneizaron empleando un homogeneizador mecánico y, junto con la sangre, se mantuvieron en hielo hasta su uso. Cada ratón se sacrificó mediante dislocación cervical. Los órganos después se homogeneizaron empleando un homogeneizador mecánico y, junto con la sangre, se mantuvieron en hielo hasta su uso. Todos los experimentos con animales se realizaron según las normas éticas francesas.

10 Antes de la preparación del ratón, una placa de vidrio de 96 pocillos de fondo negro se alteró de modo que la base de la placa pudiese apoyarse sin bascular sobre una placa Petri de 10 cm. Un trozo de papel negro que tenía doce orificios de 1,5 mm de diámetro en una orientación 3 x 4 se colocó entre la placa de 96 pocillos y una placa de agar, de modo que los orificios estuviesen correctamente alineados con los pocillos de la placa de 96 pocillos. Entonces se pipetearon 5 µl de partes alícuotas de la disolución madre bacteriana sobre el agar, directamente alineadas con los orificios y los pocillos. Después de dejar un tiempo de asentamiento, se colocaron partes alícuotas de 2 µl de QD705 sobre la segunda y la cuarta columna de bacterias. El montaje se colocó en el Ivis 100 a 37 °C y se confirmó la bioluminiscencia. Después, partes alícuotas de 50 µl de sangre, hígado homogeneizado o pulmón homogeneizado procedentes de cada ratón se distribuyeron de modo apropiado y se adquirió la secuencia de imágenes previamente descrita.

Formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo*

20 Ratones Balb/c hembra se anestesiaron con isoflurano (al 2,5%). Bajo la anestesia, los ratones recibieron una inyección intramuscular en el muslo izquierdo hasta una profundidad de 3 mm de 25-50 µl de suspensión bacteriana con o sin QD y se formaron imágenes empleando el IVIS 100. Primero se tomó una imagen de campo claro y después se tomaron las imágenes bioluminiscentes con los filtros Open, 610LP, y Cy5.5. Las imágenes se analizaron empleando el software Living Image (v 3.1, Xenogen Corp.).

25 Formación de imágenes FUEL *in vivo* empleando "perlas"

30 Para demostrar la FUEL *in vivo*, se construyeron perlas de agarosa al 2% que consistían en un núcleo con una base de RT57 revestido de agarosa o una mezcla de agarosa y QD705. Brevemente, para crear una "perla" individual, se mezclaron 12,5 µl de disolución madre de RT57 con 12,5 µl de agarosa al 4% caliente y se pipeteó sobre parapelícula. Después de dejar enfriar el núcleo de la perla de 25 µl, se pipeteó una mezcla de 5 µl de PS o 5 µl de disolución madre de QD705 y 7,5 µl de agarosa al 5% sobre el núcleo de la perla, para formar las perlas control y FUEL, respectivamente. Después de la construcción de las perlas, tres ratones Balb/c hembra de seis semanas de edad se anestesiaron químicamente empleando quetamina/xilazina. Entonces se afeitaron las patas traseras, tanto el lado dorsal como ventral, de los tres ratones empleando una afeitadora eléctrica. Se realizó una pequeña incisión en el interior de ambas patas traseras, para permitir la colocación subcutánea de la perla control (RT57) o FUEL (RT57 y QD705). Después los ratones se colocaron en Ivis 100 y se observó la luminiscencia desde el lado ventral con los conjuntos de filtros Open y QD705. Después se dio la vuelta a los ratones y se observó la luminiscencia desde el lado dorsal con ambos conjuntos de filtros.

Ejemplo 2: Resultados

Comparación espectral

40 En la figura 1A puede verse un diagrama de absorbancia de UV/visible normalizado del rojo Congo (CR) superpuesto con el espectro de emisión de bioluminiscencia de RT57 y el espectro de excitación/emisión de QD705. Tal como se muestra, el espectro de excitación de QD705 se solapa en gran medida con la emisión bioluminiscente, mientras que la emisión de fluorescencia de QD705 está centrada en 703 nm. Para adquirir un espectro de absorbancia útil, se diluyó sangre en 300 veces en H₂O estéril, mientras que el hígado y el pulmón se diluyeron en 45 200 veces cada uno, también en H₂O estéril (figura 1B).

Tal como puede observarse de las figuras 1A y 1B, la emisión de QD705 está localizada en una región de absorción y dispersión mínima por la sangre, el hígado y el pulmón, mientras que la emisión bioluminiscente de RT57 se ve muy perturbada por los agentes de dispersión/absorción. Las localizaciones de estos máximos de emisión ilustran, en gran medida, la ventaja de desplazar al rojo los fotones emitidos.

50 Excitación no unida de QD705 por bacterias bioluminiscentes en suspensión

Para determinar si *E. coli* bioluminiscente puede excitar a QD705 sin necesidad de emplear una química de acoplamiento o unión, se distribuyeron disoluciones de RT57 y QD705 por sí solas o mezcladas en tubos separados, y la producción de luminiscencia resultante se comparó con tres controles (RT57 solo, QD705 solo, y PS) con dos conjuntos de filtros de emisión diferentes (Open y Cy5.5).

55 Tal como puede observarse en la figura 2, ambos RT57 y RT57+QD705 emiten fotones en presencia del filtro Open.

Tal como se esperaba, no se observó luminiscencia desde los controles bioluminiscentes (QD705 o PS solo; columnas 1 y 3, filas 1 y 2). En presencia de RT57 se observó una señal bioluminiscente robusta comparable en ausencia de los filtros de emisión (columnas 2 y 4, fila 1), solo con bacterias (columna 2, fila 1) y con RT57+QD705 (columna 4, fila 1).

- 5 Sin embargo, por contraste, cuando se observa a través del filtro de emisión Cy5.5, se observa una señal aproximadamente diez veces mayor procedente de RT57+QD705 (columna 4, fila 2), comparado con las bacterias luminiscentes por sí solas (columna 2, fila 2), lo cual sugiere que la presencia de QD705 ha provocado un desplazamiento en la longitud de onda de la luz emitida, de modo que parte de esta ahora pasa a través de un filtro de emisión de rojo profundo. No se observó luminiscencia de los controles. Esto sugiere con gran fuerza que las bacterias bioluminiscentes por sí solas son capaces de excitar a QD705. Se muestra un espectro de emisión de bioluminiscencia normalizado de RT57 y el espectro de excitación/emisión de QD705 (figura 1). El espectro de excitación de QD705 se solapa con el pico de emisión de la bioluminiscencia de RT57, mientras que la emisión de fluorescencia de QD705 está centrada, tal como se esperaba, en 705 nm. A la vista del solapamiento espectral y de los resultados presentados en la presente, la bioluminiscencia de RT57 por sí sola es suficiente para excitar a QD705.

Dependencia de la distancia de la pareja de sondas FUEL de luciferasa bacteriana-QD705

- Se desarrolló un modelo sencillo que imita la absorción óptica de la sangre, el hígado y los pulmones de ratón para demostrar la importancia del desplazamiento al rojo de los fotones bioluminiscentes a través de una excitación trivial. Se descubrió que el pigmento de uso habitual rojo Congo (CR) tenía una espectro de absorción que, siendo similar a la sangre, hígado y pulmones de ratón, se solapa con RT57. El CR también muestra muy poca absorbancia a 705 nm. Se observó el efecto del absorbente CRAgar sobre los fotones detectables apilando placas de agar y CRAgar sobre partes alícuotas de RT57 y RT57+QD705 bajo dos condiciones diferentes (figura 3). Tal como se describió previamente, se adquirieron tres adquisiciones de 5 minutos consecutivas empleando un conjunto de filtros diferente para las dos condiciones diferentes. La condición 1 incluye el uso de cuatro placas de agar convencionales, mientras que en la condición 2 se sustituyen las dos placas de agar centrales por placas de CRAgar (figuras 3A y 3B). Los experimentos de crecimiento se repitieron por triplicado para cada condición y se observaron empleando el Ivis 100. La figura 4A muestra el aumento en el flujo total de fotones para la condición 2 a lo largo del tiempo, mientras que la figura 4B muestra una imagen bioluminiscente típica adquirida al final de un experimento de crecimiento para la condición 2. Tal como puede observarse, la columna 2 (RT57+QD705) es significativamente más brillante que las otras columnas. Esta diferencia puede observarse más claramente en la figura 4C. En este caso, el flujo total de fotones para las columnas 2, 3, y 4 se normalizó a la columna 1 (RT57 solo). Se observa un aumento significativo en el flujo total de fotones para la columna 2, un pequeño incremento para la columna 3, y prácticamente ningún incremento en la columna 4.

- Tal como puede observarse en la tabla 1, existe un aumento en el flujo de fotones para la columna 2 en ambas condiciones con el conjunto de filtros Open. También se observa un aumento similar para la columna 3 en la condición 1, mientras que se observa un aumento menor para la condición 2. Esto puede explicarse debido a la presencia de las placas de CRAgar en la condición 2. La placa de CRAgar situada entre la placa 1 y la placa 3 disminuye el número de fotones de RT57 disponibles para excitar las QD705 que se encuentran en la placa 3. Esto es importante, porque este efecto sugiere que QD705 debe estar ópticamente disponible para RT57 para que se produzca el desplazamiento en los fotones. Se observan más pruebas de esto cuando la columna 4 se compara con la columna 1 en la condición 2. En este caso, la proporción entre las columnas se centra alrededor de 1, lo cual indica que no se produce potenciación cuando las dos placas de CRAgar están presentes. No obstante, en la condición 1 se observa una ligera potenciación incluso con dos placas de agar entre RT57 y QD705 (columna 4). Así, sin el absorbente, no existe especificidad por la excitación de QD705. Las bacterias pueden estar a una distancia considerable. Esto no se desea cuando se observa el desarrollo bacteriano dentro de un animal. En cada condición y para cada conjunto de filtros, la potenciación máxima se observa para la columna 2 (RT57+QD705). El aumento en la potenciación observado para los conjuntos de filtros 610LP y Cy5.5 verifica el desplazamiento al rojo de los fotones bioluminiscentes debido a la presencia de QD705.

Tabla 1. Dependencia de la distancia de la excitación de QD705 con RT57 bioluminiscente.*

	Columna	Distancia (mm)	Open	610LP	Cy5.5
Agar	2	0	1,43 ± 0,43	2,57 ± 0,68	6,10 ± 1,79
	3	28	1,46 ± 0,60	1,97 ± 0,88	2,21 ± 1,00
	4	42	1,09 ± 0,27	1,17 ± 0,30	1,13 ± 0,31
CRAgar	2	0	1,75 ± 0,20	2,35 ± 0,24	5,41 ± 1,22
	3	28	1,24 ± 0,09	1,28 ± 0,11	1,62 ± 0,60
	4	42	0,99 ± 0,08	1,02 ± 0,12	1,01 ± 0,23

* Cada columna se normalizó a la columna 1 de la correspondiente condición, n = 24.

Sin embargo, cuando se contempla la proporción de mejora en la tabla 1, no debe suponerse que el conjunto de filtros Cy5.5 es ideal, porque realmente se detectan muchos menos fotones debido al paso de banda. Este filtro es mucho más específico para la emisión de QD705. Aunque 610LP permite que muchos más fotones alcancen el CCD que Cy5.5, aún son menos que con Open. Por tanto, aunque la proporción de mejora es menor, el número de fotones detectado es mucho mayor. Con el conjunto de filtros Open se consigue aumentar la sensibilidad, adquirir los fotones emitidos desde QD705 y cualquiera de RT57 no absorbidos y no dispersados, mientras que el uso de 610LP o Cy5.5 permite conseguir una mayor especificidad por QD705.

En otro conjunto de experimentos, una parte alícuota de *E. coli* bioluminiscente (no visible: cubierta por un trozo de papel negro) se coloca entre dos cubetas rellenas con QD705 (izquierda) o agua (derecha) a distancias crecientes y se observa la luminiscencia resultante con los conjuntos de filtros específicos Open o QD705. Tal como se observa con ambos conjuntos de filtros, la luminiscencia de QD705 disminuye en función de la distancia, mientras que no se observa luminiscencia procedente del agua. Los resultados se muestran en la figura 5A. Estos resultados indican que (1) en ausencia de cualquier absorbente, el efecto FUEL puede producirse a través de distancias considerables, y (2) que el efecto FUEL se produce mediante un proceso de radiación de luz puesto que no existe ninguna conexión física entre la fuente bioluminiscente y el indicador fluorescente.

Las intensidades luminiscentes normalizadas se calcularon como una función de la distancia. La dependencia de la distancia del efecto FUEL se repitió por triplicado empleando tres cultivos bacterianos diferentes. La luminiscencia resultante para el conjunto de filtros QD705 se normalizó al valor más intenso, que aparece a una distancia de 1 cm (parte superior). Tal como puede observarse en la figura 5B, la varianza en las intensidades normalizadas fue bastante insignificante. Se ajusta una curva polinómica en la intensidad luminiscente con una concordancia significativa.

Aumento en la generación de fotones rojos por la adición de QD705.

Se establecieron múltiples condiciones experimentales empleando dos cubetas en tándem de cuarzo separadas por un trozo de papel negro. Estas condiciones se muestran de modo esquemático en la figura 7, en la que PS: disolución salina fisiológica; QD705: disolución de QD705; RT57: *E. coli* bioluminiscente; CR: rojo Congo.

Se cortó una pequeña ventana en el papel para permitir pasar a los fotones bioluminiscentes. El papel también proporciona una separación física entre las dos cubetas para asegurarse de que no pueda establecerse contacto físico entre QD705 y RT57. Se observó la intensidad de la luminiscencia para cada condición con conjuntos de filtros específicos de RT57 y de QD705 (indicado como 480 y QD705, respectivamente), realizándose cada condición por triplicado.

Tal como puede observarse, en ausencia de QD705 (condición control) se observaron muy pocos fotones rojos. Sin embargo, se observa un aumento en casi 8 veces en la producción de fotones rojos mediante la simple adición de QD705 al recorrido óptico (condición 1). En presencia de un absorbente, CR (condición 2), este aumento sigue siendo el mismo, lo cual ilustra la potente potenciación de contraste debido al efecto FUEL en presencia de un absorbente. Además, cuando el absorbente se coloca entre la fuente bioluminiscente y QD705 (condición 3), la producción total de fotones se reduce notablemente y la producción de fotones rojos es similar a la del control, lo cual indica que el efecto FUEL ya no se está produciendo. Esto también destaca la especificidad de FUEL puesto que FPP-L y FPP-U deben estar muy cerca en presencia de un absorbente, pero no necesariamente en proximidad molecular. Como control positivo, se observaron valores similares en ausencia de QD705, y la presencia de CR (condición 4) verifica que la pérdida del efecto FUEL en la condición 3 es debida a la absorbancia de luz azul del CR entre las bacterias y los QD.

Transmisión de fotones a través de muestras *ex vivo*

Antes de inyectar a los ratones los QD y las bacterias, se emplearon, por triplicado y procedentes de tres ratones diferentes, MWB (sangre completa de ratón), hígado homogeneizado y pulmón homogeneizado para imitar las condiciones *in vivo*. En este caso se preparó una placa de agar con RT57 y RT57+QD705 como se describió previamente. Se colocó un trozo de papel negro que contenía un orificio sobre una placa de agar, de modo que el orificio estuviese correctamente alineado con las partes alícuotas de RT57 y RT57+QD705. Por último, se colocó una placa de 96 pocillos negra sobre la parte superior del papel negro y la placa de agar.

Tal como puede observarse en la figura 8 y la tabla 2, en presencia de MWB con el filtro Open, las RT57+QD705 presentaron un aumento en casi 4 veces del flujo total de fotones, comparado con las bacterias solas. Sin embargo, se observó un aumento mínimo en el flujo total de fotones para el hígado y los pulmones. Por contraste, la proporción aumenta notablemente cuando se emplea el filtro Cy5.5, con lo que se verifica la excitación de QD705 que produce un aumento sustancial en la producción de fotones rojos. Los resultados de este experimento *in vitro* sugieren con fuerza que la presencia de QD705 desplaza al rojo los fotones RT57, alejándolos de los máximos de absorción de MWB y aumentando, con ello, el número total de fotones detectables.

Tabla 2. Transmisión mejorada de fotones en presencia de sangre y tejido.*

	Sangre	Hígado	Pulmón
Open	3,98 ± 0,58	1,26 ± 0,25	1,14 ± 0,19
610LP	4,59 ± 0,38	2,61 ± 0,42	4,75 ± 0,64
Cy5.5	14,62 ± 3,98	10,01 ± 2,06	11,44 ± 1,95

*La transmisión mejorada a través de cada absorbente se normalizó al número de fotones detectado procedentes de RT57 por sí solo, n = 3.

Pruebas de excitación de QD *in vivo* empleando bacterias bioluminiscentes

Para demostrar las capacidades de esta técnica, se realizó un estudio demostrativo preliminar *in vivo*. Se inyectaron secuencialmente QD705 y una suspensión bacteriana en el muslo de un ratón anestesiado. Un segundo ratón recibió una inyección solo con bacterias y se empleó como control para la producción de bioluminiscencia convencional. La productividad de bioluminiscencia para cada ratón se recogió simultáneamente con los tres conjuntos de filtros diferentes (figura 9). Tal como puede advertirse, se observa un aumento en la bioluminiscencia medida para el ratón inyectado con QD705 con cada conjunto de filtros. La tabla 3 muestra el desplazamiento significativo en los fotones detectados cuando QD705 están presentes.

Tabla 3. Demostración de la excitación de QD705 *in vivo*

	610LP/Open	Cy5.5/Open
Control	0,247	0,077
QD705	0,690	0,604

Tal como puede observarse en la tabla 3, solo 25% de los fotones bioluminiscentes detectados están por encima de 610 nm procedentes de las bacterias bioluminiscentes solas. Aún resulta más notable que menos del 10% de los fotones bioluminiscentes aparecen con el conjunto de filtros Cy5.5. Existe una diferencia muy grande cuando QD705 se inyectan secuencialmente con RT57. En este caso, casi 70% de los fotones detectados están por encima de 610 nm, y 60% aparecen con el conjunto de filtros Cy5.5 (695-770 nm). Además, cuando se calcula la mejora en los fotones detectables, se observa un aumento similar en el número de fotones detectados para los tres conjuntos de filtros para los conjuntos de datos *in vivo* (tabla 3) e *in vitro* (tabla 1) cuando QD705 está presente.

Tabla 4. Mejora en la transmisión de fotones con una inyección en el muslo de un ratón

	QD705/Control
Open	1,373
610LP	3,839
Cy5.5	10,773

Excitación larga no convencional de QD705 por RT57

Puesto que la luminiscencia de RT57 provoca la emisión de QD705 bajo condiciones en disolución en las que no se ha aplicado ninguna química covalente, esto sugiere que el mecanismo del fenómeno detectado no puede explicarse por un mecanismo BRET (que, de forma característica, no es radiante), limitado por el criterio de una proximidad molecular íntima.

Más bien, esto plantea la posibilidad de que la responsable sea una excitación-emisión radiante. Para ensayar esta idea, se estudió después la capacidad de la luminiscencia de RT57 para excitar parte alícuotas de QD705 a distancias macroscópicas. En una serie de experimentos, se colocaron 5 µl de una disolución madre de RT57 en el centro de placas Petri. Después se colocaron partes alícuotas (2 µl) de QD705 sobre la placa Petri, a distancias radiales crecientes hacia afuera desde el centro, en incrementos de 5 mm hasta una distancia total de 2 cm (es decir, la distancia entre RT57 y QD705, de centro a centro; figura 6A). Después se observó la luminiscencia resultante durante 300 s solo con el conjunto de filtros Cy5.5 debido a su especificidad por la emisión de QD705, y se verificó la localización de QD705 empleando la formación de imágenes de fluorescencia (figura 6B). Tal como puede observarse, la intensidad de la posterior emisión de QD705 disminuyó en función de la distancia de las RT57 bioluminiscentes. Sin embargo, el emisión QD705 pudo detectarse con facilidad hasta una distancia de 2 cm (figura 6C).

Uso de FUEL para potenciar la detección de señales *in vivo*

5 Bacterias de *E. coli* bioluminiscentes suspendidas en 50 μ l de esferas de agarosa al 2% solidificada se implantaron de modo subcutáneo en la parte interior del muslo izquierdo de un ratón BALB/c. Se prepararon otros 50 μ l de esferas de bacterias en agarosa y se revistieron con una capa de 10 μ l de puntos cuánticos que tienen una longitud de onda de emisión en el rojo a 705 nm. Esta segunda esfera se implantó de modo subcutáneo en la parte interior del muslo derecho del mismo ratón.

10 En presencia de las bacterias, los puntos cuánticos son excitados y desplazan la luz bioluminiscente desde una longitud de onda de 480 nm a 705 nm. La luminiscencia a 480 nm de las bacterias es visible desde ambas patas sin un filtro colocado (figura 10) y las intensidades de ambas patas son casi equivalentes. Cuando se aplica un filtro Cy5.5 (695-770 nm), la luz de las bacterias se bloquea de la vista y solo puede observarse la fluorescencia procedente de los puntos cuánticos excitados desde el muslo derecho (figura 10).

15 La piel del ratón es bastante fina y la luz puede atravesarla con facilidad. Sin embargo, cuando el ratón se da la vuelta, las emisiones de las bacterias y los puntos cuánticos deben atravesar la musculatura de la pierna, que absorbe mucha luz y produce mucha dispersión, antes de alcanzar el detector. A diferencia de la luz azul de las bacterias, la luz roja no es susceptible a la absorción por los cromóforos del tejido, tales como hemoglobina, oxihemoglobina, melanina, lípidos y agua. La luz desplazada de la esfera que contiene los puntos cuánticos en el muslo derecho es casi cuatro veces más intensa que la luz que proviene de la esfera que solo contiene bacterias en el muslo izquierdo cuando no se coloca ningún filtro (figura 10). Cuando se aplica el filtro Cy5.5, la emisión de la pata derecha es más de veintidós veces más grande que la de la pata izquierda (figura 10).

20 El mecanismo FUEL

Los inventores han demostrado, por tanto, que, mezcladas en suspensión, las bacterias bioluminiscentes son capaces de excitar QD debido al significativo solapamiento espectral entre el pico de emisión bioluminiscente con el amplio espectro de absorción de QD705, por el que el fenómeno se manifiesta por el desplazamiento al rojo paradójico de la bioluminiscencia bacteriana que, por lo demás, tiene un color azul característico.

25 En la medida en que cualitativamente puede preverse el mismo efecto si este sistema se modifica para que pueda producirse BRET, esto ciertamente no es el caso bajo las condiciones descritas en la presente por las siguientes razones. En primer lugar, el fenómeno aparece en suspensión, en ausencia de químicas covalentes, lo cual hace poco probable que los restos fotónicos se acerquen y logren una proximidad molecular suficiente para conseguir una BRET. En segundo lugar, el fenómeno puede reproducirse con eficacia bajo condiciones en las que los restos están físicamente separados por distancias macroscópicas, lo cual es más característico de una excitación-emisión radiante.

30 Los inventores han demostrado que el efecto FUEL puede producirse a través de distancias de milímetros, muchísimo más allá de lo que puede lograr ningún proceso de transferencia de energía intermolecular. Por tanto, resulta interesante que este desplazamiento al rojo resultante de la emisión de fotones se propague tanto a través de un tejido preparado *in vitro*. En este caso, la mala propagación de la luz desde las bacterias solas es debida a un comportamiento biofotónico característico de la luz azul, concretamente, una elevada dispersión y absorbancia en tejidos. Por contraste, los inventores han demostrados que la FUEL basada en QD produce fotones luminiscentes rojos a través de un filtro Cy5.5 y han demostrado que es esta propiedad la que produce una potenciación de un orden de magnitud de la detección de luz en presencia de tejido *in vitro*, puesto que la luminiscencia desplazada al rojo sufre una dispersión y absorción mínimas comparado con la luz azul-verde. Se muestra una representación esquemática de FUEL en la figura 11.

35 Por tanto, las propiedades de FUEL tienen el potencial de ser particularmente ventajosas para aplicaciones y para experimentos y técnicas realizados *in vivo*, tales como la diseminación bacteriana o interacciones y respuestas de hospedante-patógeno. Quizá de forma sorprendente, es evidente que la presencia de un absorbente óptico, tal como sangre o tejido, realmente aumenta la especificidad de FUEL en la medida en que las bacterias bioluminiscentes deben estar cerca de los QD, pero no necesariamente dentro de la distancia molecular que pueda ser equiparada con BRET. Los protones desplazados al rojo de FUEL son más capaces de pasar a través de sangre y tejidos, produciéndose la potenciación más significativa en MWB.

40 Basándose en el fenómeno y las propiedades indicadas en la presente, FUEL tiene una aplicación valiosa concreta en experimentos y técnicas realizados *in vivo*.

45 Los inventores han demostrado la capacidad de una *E. coli* bioluminiscente de excitar QD a distancias considerables, creando un desplazamiento al rojo en los fotones detectados a través de un proceso que han denominado FUEL. Los fotones se desplazan alejándose de las regiones de alta absorción de la hemoglobina (en sus diversas formas) y de los tejidos, hasta la región ópticamente transparente de 700-900 nm. Se observa un aumento significativo en el número de fotones detectables cuando QD705 está presente bajo condiciones *ex vivo*.

55 Además, los inventores han demostrado que FUEL se diferencia de BRET en la medida en que las distancias de trabajo demostradas en la presente son mucho mayores (μ m-cm) que las condiciones de BRET aceptadas (<10 nm).

Por último, los inventores han logrado un desplazamiento en los fotones emitidos sin el uso de ninguna química de acoplamiento.

La FUEL puede utilizarse como una técnica complementaria a BRET. Empleando BRET, se pueden observar interacciones de proteínas específicas, que es un nivel de resolución que no puede lograrse con facilidad en la formación de imágenes de bioluminiscencia de animales completos. Sin embargo, FUEL tiene una resolución espacial más en la escala de órganos individuales, lo cual resulta más pertinente para la BLI de animales completos. Como tales, las dos técnicas, aunque comparten principios similares, tienen aplicaciones y escalas de operación muy diferentes. Además, los inventores sugieren que el efecto FUEL puede aplicarse a escenarios *in vivo*.

Referencias bibliográficas

- 10 1. Contag, C. H.; Ross, B. D., It's not just about anatomy: *in vivo* bioluminescence imaging as an eyepiece into biology, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2002, 16 (4), 378-387.
2. Troy, T.; Jekic-McMullen, D.; Sambucetti, L.; Rice, B., Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models, *Molecular imaging: official journal of the Society for Molecular Imaging*, 2004, 3 (1), 9-23.
- 15 3. Hutchens, M.; Luker, G. D., Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases, *Cell Microbiol.*, 2007, 9 (10), 2315-2322.
4. Welsh, D. K.; Kay, S. A., Bioluminescence imaging in living organisms, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, 16 (1), 73-78.
5. Rogers, K. L.; Picaud, S.; Roncali, E.; Boisgard, R.; Colasante, C.; Stinnakre, J.; Tavitian, B.; Brûlet, P., Non-invasive *in vivo* imaging of calcium signaling in mice, *PLoS ONE*, 2007, 2 (10), e974.
- 20 6. Curie, T.; Rogers, K. L.; Colasante, C.; Brûlet, P., Red-shifted aequorin-based bioluminescent reporters for *in vivo* imaging of Ca²⁺ signaling, *Molecular Imaging*, 2007, 6(1), 30-42.
7. Wu, C.; Mino, K.; Akimoto, H.; Kawabata, M.; Nakamura, K.; Ozaki, M.; Ohmiya, Y., *In vivo* far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from *Cypridina* bioluminescence to an organic dye, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106 (37), 15599-15603.
- 25 8. So, M.; Xu, C.; Loening, A.; Gambhir, S.; Rao, J., Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging, *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (3), 339-343.
9. Loening, A. M.; Dragulescu-Andrasi, A.; Gambhir, S. S., A red-shifted *Renilla* luciferase for transient reporter-gene expression, *Nat. Meth.*, 2010, 7 (1), 5-6.
- 30 10. Colin, M.; Moritz, S.; Schneider, H.; Capeau, J.; Coutelle, C.; Brahimi-Horn, M. C., Haemoglobin interferes with the *ex vivo* luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression *in vivo*, *Gene Ther.*, 2000, 7 (15), 1333-1336.
11. Branchini, B. R.; Ablamsky, D. M.; Davis, A. L.; Southworth, T. L.; Butler, B.; Fan, F.; Jathoul, A. P.; Pule, M. A., Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications, *Analytical Biochemistry*, 2010, 396 (2), 290-297.
- 35 12. Wu, P.; Brand, L., Resonance energy transfer: methods and applications, *Analytical Biochemistry*, 1994, 218 (1), 1-13.
13. Pflieger, K. D.; Eidne, K. A., New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors, *Pituitary*, 2003, 6 (3), 141-151.
- 40 14. Takanishi, C. L.; Bykova, E. A.; Cheng, W.; Zheng, J., GFP-based FRET analysis in live cells, *Brain Res.*, 2006, 1091 (1), 132-139.
15. Dacres, H.; Wang, J.; Dumancic, M. M.; Trowell, S. C., Experimental determination of the Förster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs, *Anal. Chem.*, 2010, 82 (1), 432-435.
- 45 16. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, *Science*, 2005, 307 (5709), 538-544.
17. Clapp, A. R.; Medintz, I. L.; Mauro, J. M.; Fisher, B. R.; Bawendi, M. G.; Mattoussi, H., Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126 (1), 301-310.
- 50 18. Bang, J. H.; Kamat, P. V., Quantum dot sensitized solar cells. A tale of two semiconductor nanocrystals: CdSe and CdTe, *ACS nano*, 2009, 3 (6), 1467-1476.

19. Reiss, P.; Bleuse, J.; Pron, A., Highly luminescent CdSe/ZnSe core/shell nanocrystals of low size dispersion, In *Nano Lett.*, 2002; vol. 2, pp. 781-784.
20. Choi, K. H.; Schweizer, H. P., mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*, *Nat. Protoc.*, 2006, 1 (1), 170-178.
- 5 21. Rogers, K. L.; Martin, J. R.; Renaud, O.; Karplus, E.; Nicola, M. A.; Nguyen, M.; Picaud, S.; Shorte, S.; Brûlet, P., Electron-multiplying charge-coupled detector-based bioluminescence recording of single-cell Ca²⁺, *J. Biomed. Opt.*, 2008, 13 (3), 031211.
22. Shu, X.; Royant, A.; Lin, M. Z.; Aguilera, T. A.; Lev-Ram, V.; Steinbach, P.; Tsien, R., Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome, *Science*, 2009, 324 (5928), 804-807.
- 10 23. Yang, R.; Chang, L.; Wu, J.; Tsai, M.; Wang, H.; Kuo, Y.; Yeh, T.; Yang, C.; Lin, P., Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in *Mice: ICP-MS Quantitative Assessment*, *Environ. Health Perspect.*, 2007, 5.
24. Hardman, R., A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environ. Health Perspect.*, 2006, 114 (2), 165-172.
- 15 25. Smith, A. M.; Duan, H.; Mohs, A. M.; Nie, S., Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60 (11), 1226-1240.
26. Tsay, J. M.; Michalet, X., New light on quantum dot cytotoxicity, *Chemistry & Biology*, 2005, 12 (11), 1159-1161.
27. Cai, W.; Shin, D. W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S. X.; Gambhir, S.; Chen, X., Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects, *Nano Lett.*, 2006, 6 (4), 669-676.
- 20 28. Welsher, K.; Liu, Z.; Sherlock, S. P.; Robinson, J. T.; Chen, Z.; Daranciang, D.; Dai, H., A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, 4 (11), 773-780.
29. Krueger, A., New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials, *Chemistry*, 2008, 14 (5), 1382-1390.
- 25 30. Yu, S.-J.; Kang, M.-W.; Chang, H.-C.; Chen, K.-M.; Yu, Y.-C., Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (50), 17604-17605.
31. Song, B.; Wang, G.; Tan, M.; Yuan, J., A europium(III) complex as an efficient singlet oxygen luminescence probe, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128 (41), 13442-13450.
32. Strovas, T. J.; Dragavon, J. M.; Hankins, T. J.; Callis, J. B.; Burgess, L. W.; Lidstrom, M., Measurement of respiration rates of *Methylobacterium extorquens* AM1 cultures by use of a phosphorescence-based sensor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72 (2), 1692-1695.
- 30 33. Soini, A. E.; Seveus, L.; Meltola, N. J.; Papkovsky, D. B.; Soini, E., Phosphorescent metalloporphyrins as labels in time-resolved luminescence microscopy: effect of mounting on emission intensity, *Microsc. Res. Tech.*, 2002, 58 (2), 125-131.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para determinar la presencia de un marcador biológico luminiscente en una célula, un tejido o un organismo de interés, o sobre su superficie, que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar las condiciones adecuadas para que dicho marcador biológico produzca al menos un primer fotón mediante luminiscencia;
- b) proporcionar una FPP-U dispuesta en dicha célula, tejido u organismo, o sobre su superficie y/o en el medio que los rodea, en el que dicha FPP-U es un fluoróforo o una sonda fluorescente que tiene un espectro de excitación que se solapa con el espectro de emisión del marcador biológico, y en el que dicho al menos un primer fotón de la etapa a) excita a dicha FPP-U, que emite al menos un segundo fotón, y la emisión de dicho al menos un segundo fotón es el resultado de la excitación de la FPP-U por dicho al menos un primer fotón;
- 10 c) determinar la presencia de dicho marcador biológico en la célula, el tejido o el organismo, o sobre su superficie, mediante la detección de dicho al menos un segundo fotón; y
- dicho método se caracteriza porque dicho marcador biológico y dicha FPP-U no están unidos entre sí, y porque cada uno de dichos al menos un segundo fotón o fotones tienen una longitud de onda más larga que cada uno de dichos al menos un primer fotón o fotones.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho marcador biológico es bioluminiscente.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho marcador biológico es quimioluminiscente.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho marcador biológico es fluorescente.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho marcador biológico emite fotones con una longitud de onda menor que 650 nm.
- 20 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha FPP-U emite fotones con una longitud de onda de 650-900 nm.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho método comprende determinar la presencia de al menos dos marcadores biológicos luminiscentes en una célula, un tejido o un organismo, o sobre su superficie; en el que cada uno de dichos al menos dos marcadores biológicos emite fotones en un intervalo no solapante de longitudes de onda que excitan uno de al menos dos subconjuntos de dicha FPP-U que emite cada uno al menos un fotón, en el que dicho al menos un fotón emitido por cada uno de dichos subconjuntos de FPP-U está en un intervalo no solapante de longitudes de onda.
- 25 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha FPP-U comprende un medio para dirigirla a una porción específica de dicha célula, tejido u organismo.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha FPP-U se selecciona del grupo: puntos cuánticos, nanotubos de carbono, proteínas fluorescentes, nanocristales de diamante, metaloporfirinas.
- 10.- Un método para determinar la presencia de un marcador biológico luminiscente en una célula, un tejido o un organismo de interés, o sobre su superficie, que comprende las etapas de:
- 35 a) proporcionar las condiciones adecuadas para que una primera FPP produzca al menos un primer fotón;
- b) proporcionar una segunda FPP dispuesta en dicha célula, tejido u organismo, sobre su superficie y/o en el medio que los rodea, en el que dicho al menos un primer fotón de la etapa a) excita a dicha segunda FPP, que emite al menos un segundo fotón, y la emisión de dicho al menos un segundo fotón es el resultado de la excitación de la segunda FPP por dicho al menos un primer fotón;
- 40 en el que la etapa b) se repite al menos una vez más, en el que por cada etapa adicional se dispone otra FPP, distinta de dicha primera o segunda FPP, en dicha célula, tejido u organismo, sobre su superficie y/o en el medio que los rodea, en el que la FPP adicional es excitada específicamente por dicho al menos un primer fotón emitido en la etapa previa y que, a su vez, emita el menos un fotón adicional, y la emisión de dicho al menos un fotón adicional es el resultado de la excitación de la FPP adicional por dicho al menos un fotón emitido en la etapa previa;
- 45 en el que, en una etapa final, se determina la presencia de dicho marcador biológico en la célula, el tejido o el organismo, o sobre su superficie, detectando dicho al menos un fotón adicional;
- en el que dicho marcador biológico es dicha primera o dicha segunda FPP, y en el que cada una de las otras FPP es un fluoróforo o sonda fluorescente, y;
- dicho método se caracteriza porque dicha pluralidad de FPP no están unidas entre sí, porque el espectro de excitación de la segunda FPP y de cada FPP adicional se solapa con el espectro de emisión de la FPP de la etapa
- 50

previa, y porque cada uno de dicho segundo fotón o fotones, o fotón o fotones adicionales, tienen una longitud de onda más larga que cada uno de dichos al menos un primer fotón o fotones, un segundo fotón o fotones, o un fotón o fotones adicionales, de la etapa previa.

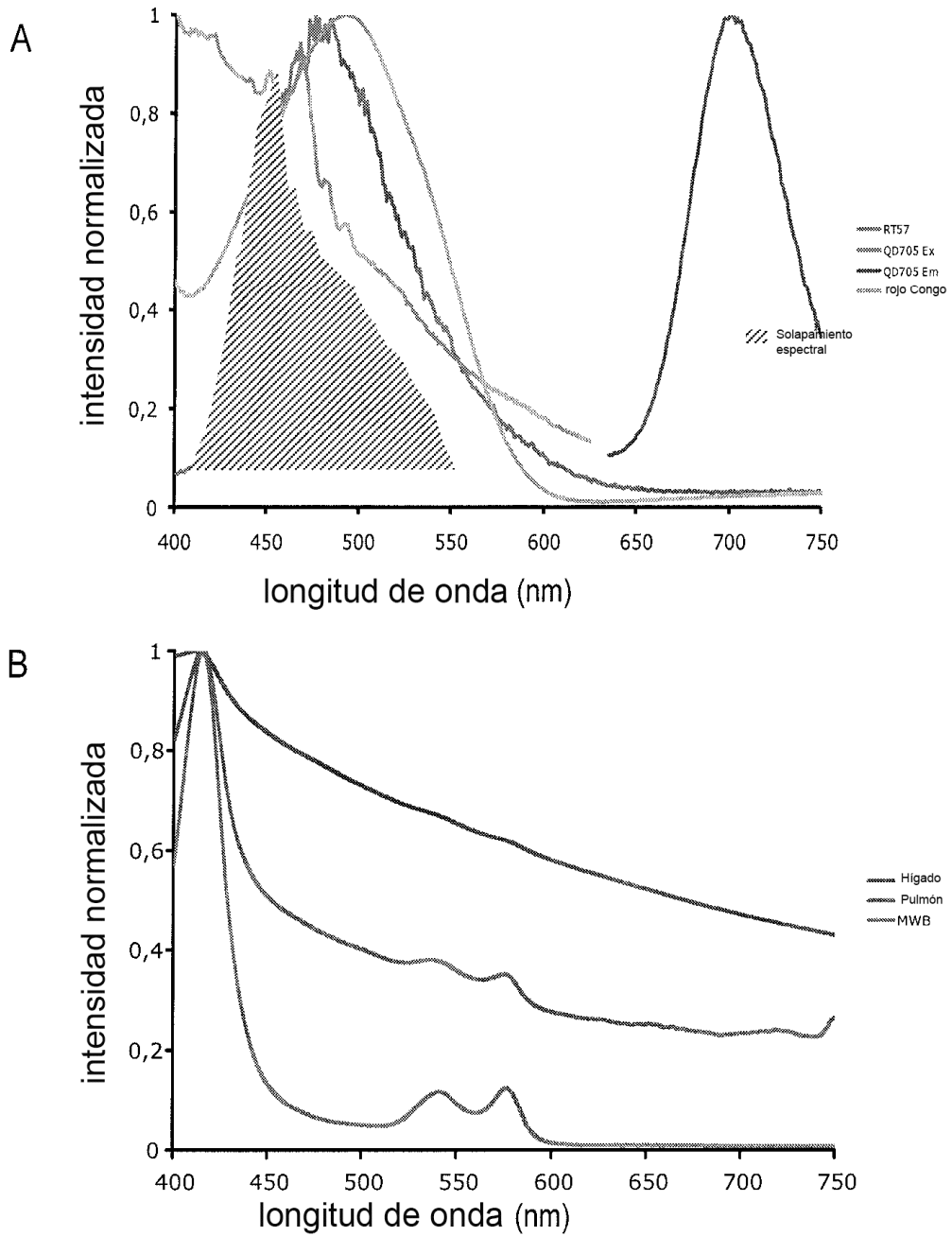


FIGURA 1

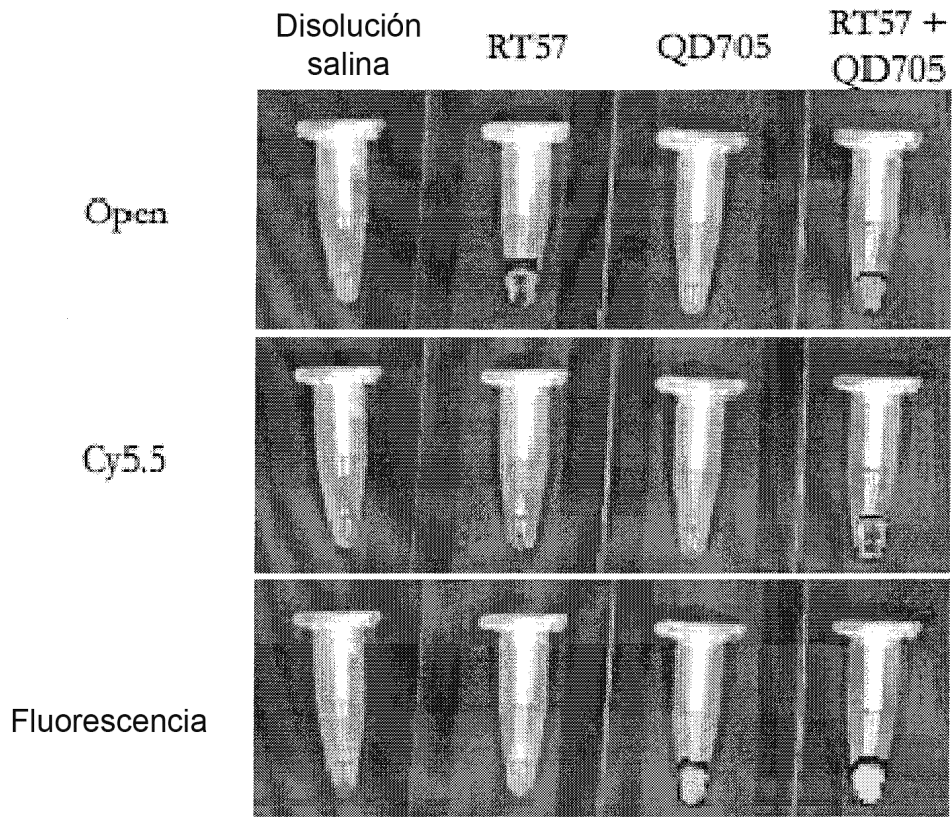


FIGURA 2

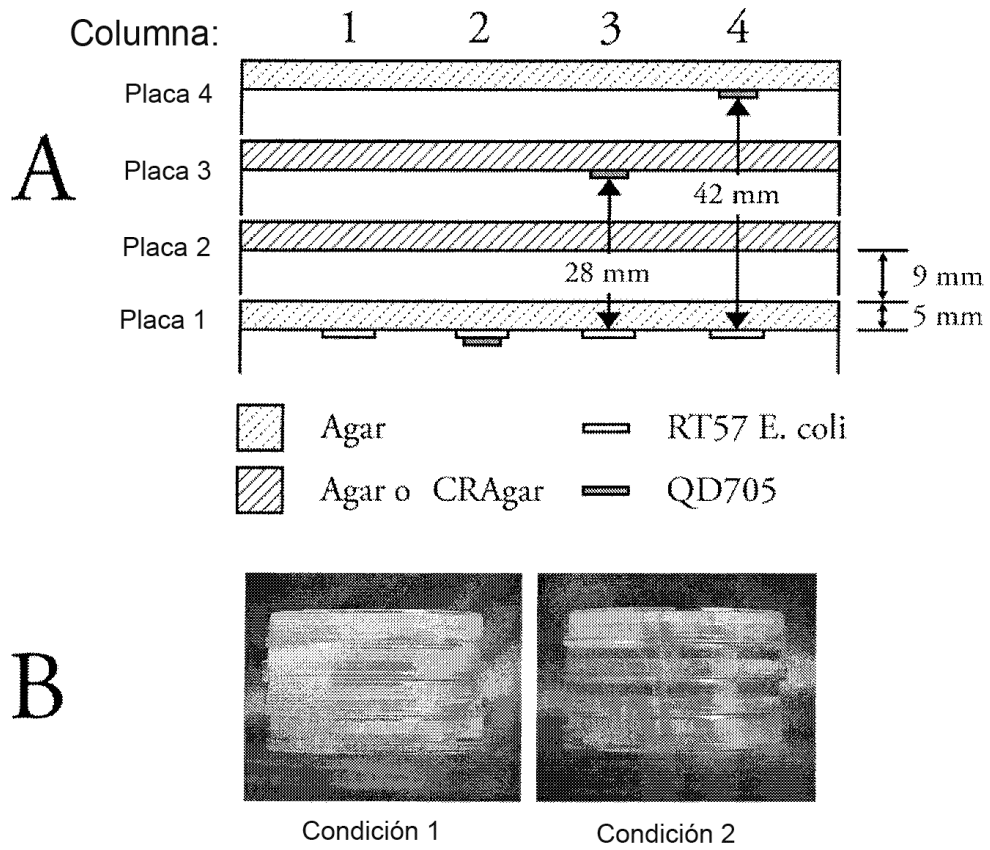
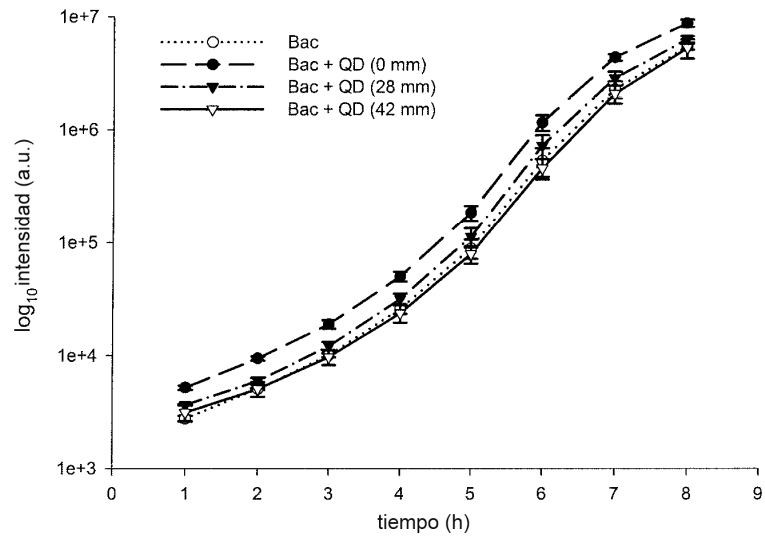
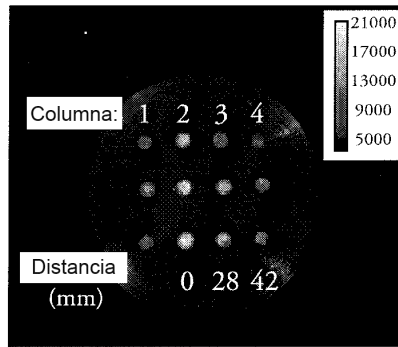


FIGURA 3

A



B



C

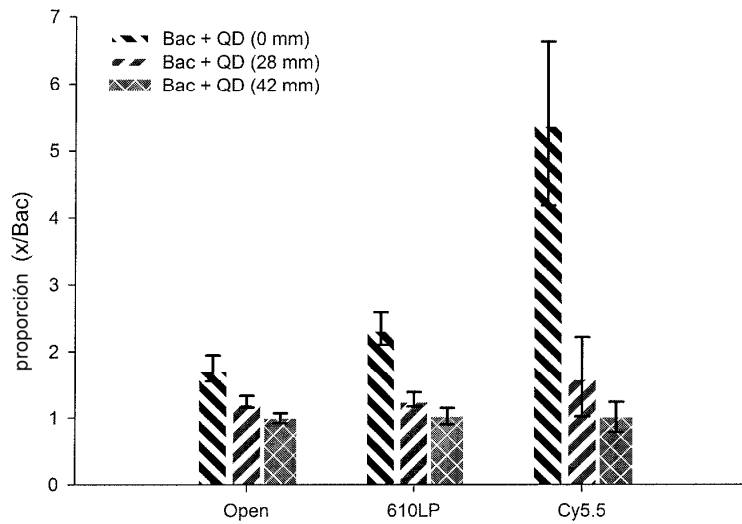


FIGURA 4

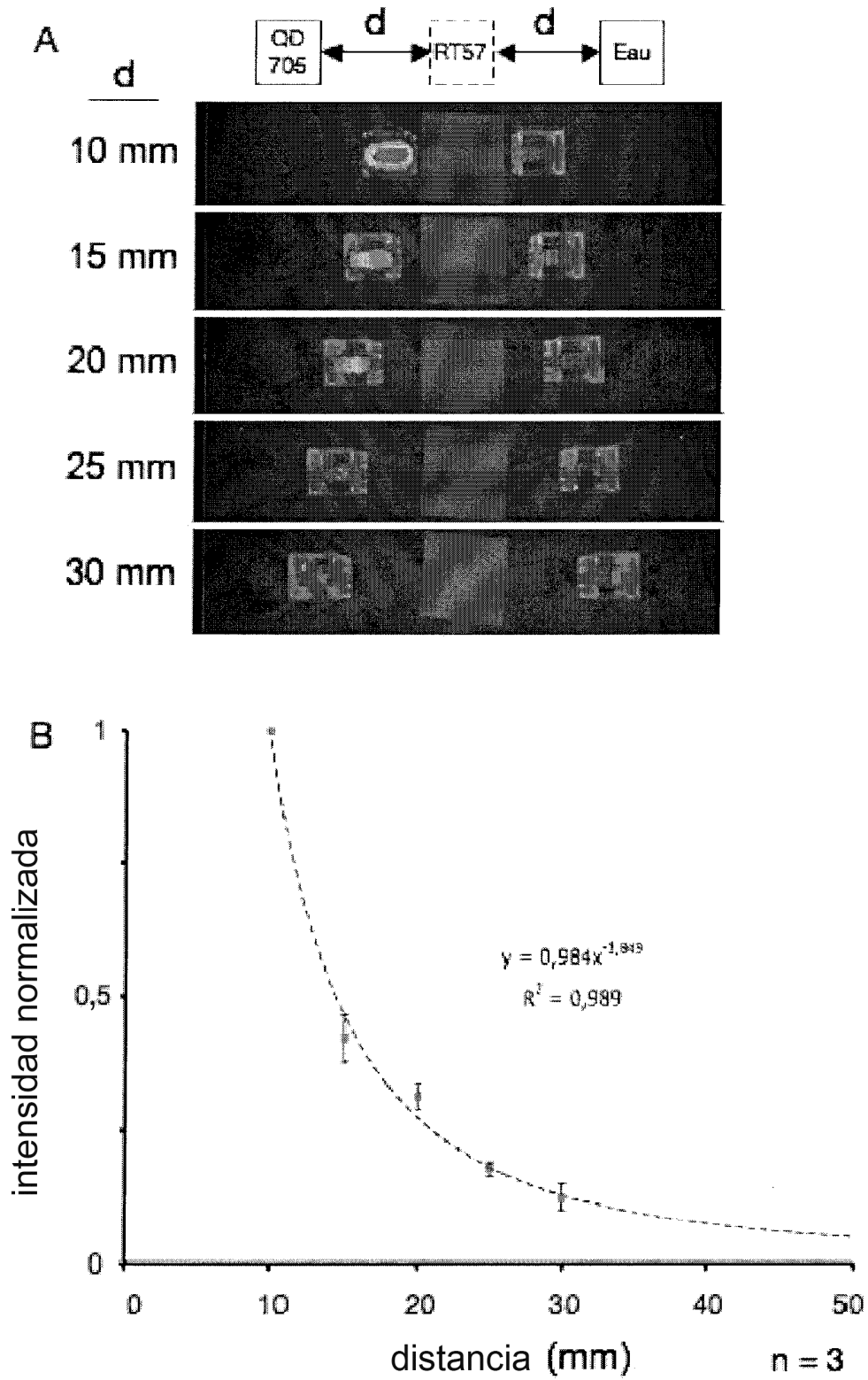


FIGURA 5

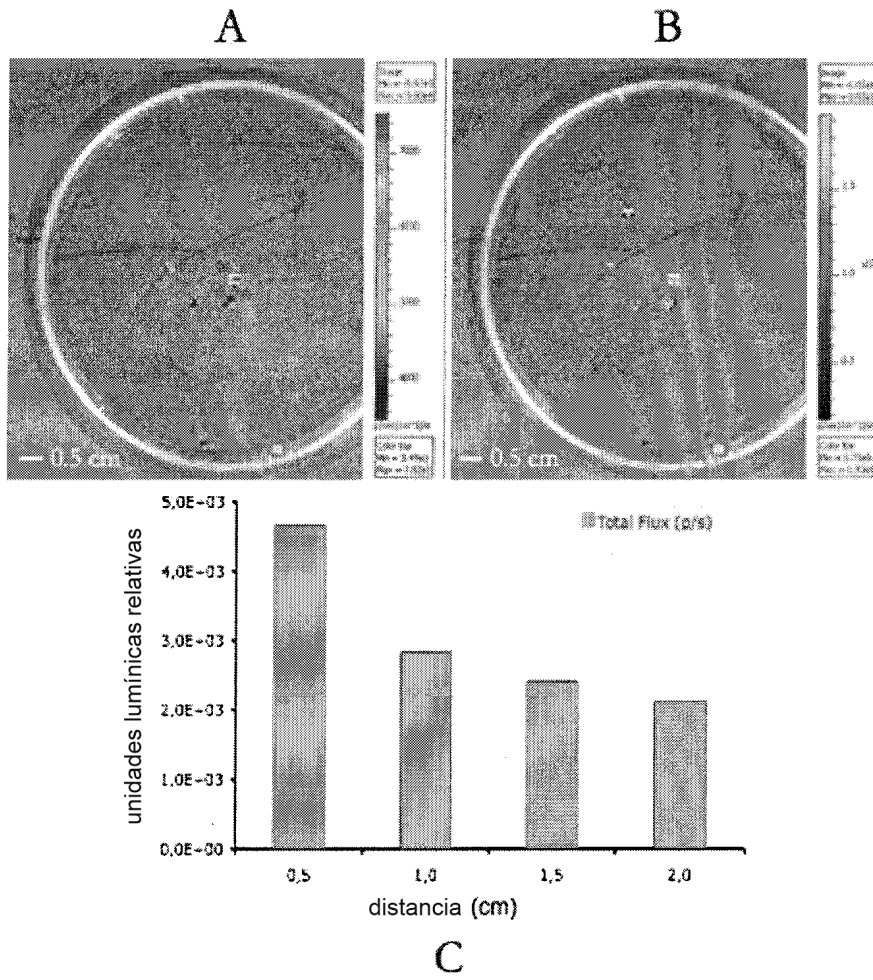
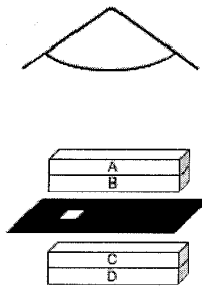


FIGURA 6



Definiciones de las condiciones:

	Control	1	2	3	4
A	PS	PS	CR	QD705	PS
B	PS	QD705	QD705	CR	CR
C	PS	PS	PS	RT57	PS
D	RT57	RT57	RT57	PS	RT57

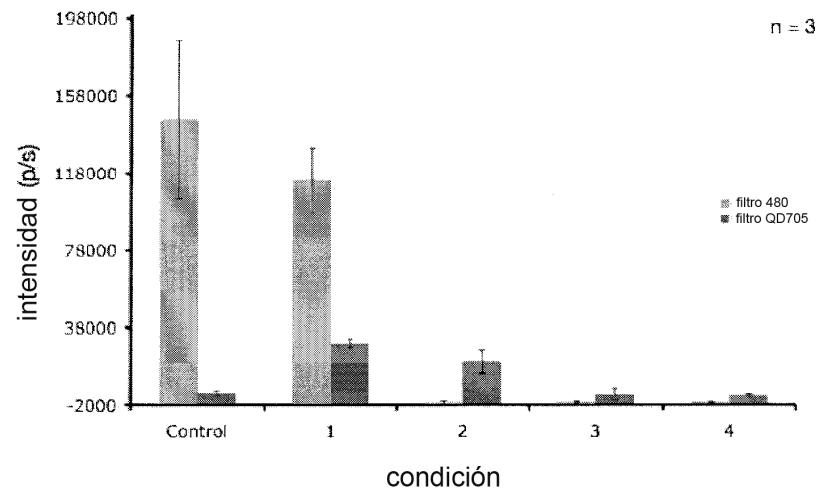


FIGURA 7

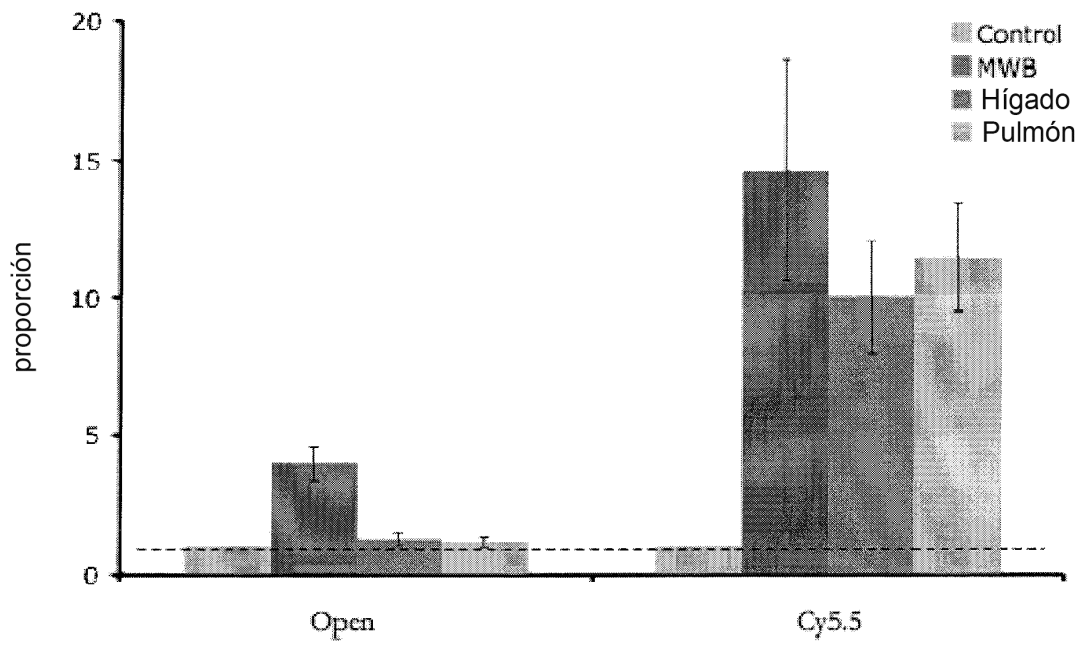


FIGURA 8

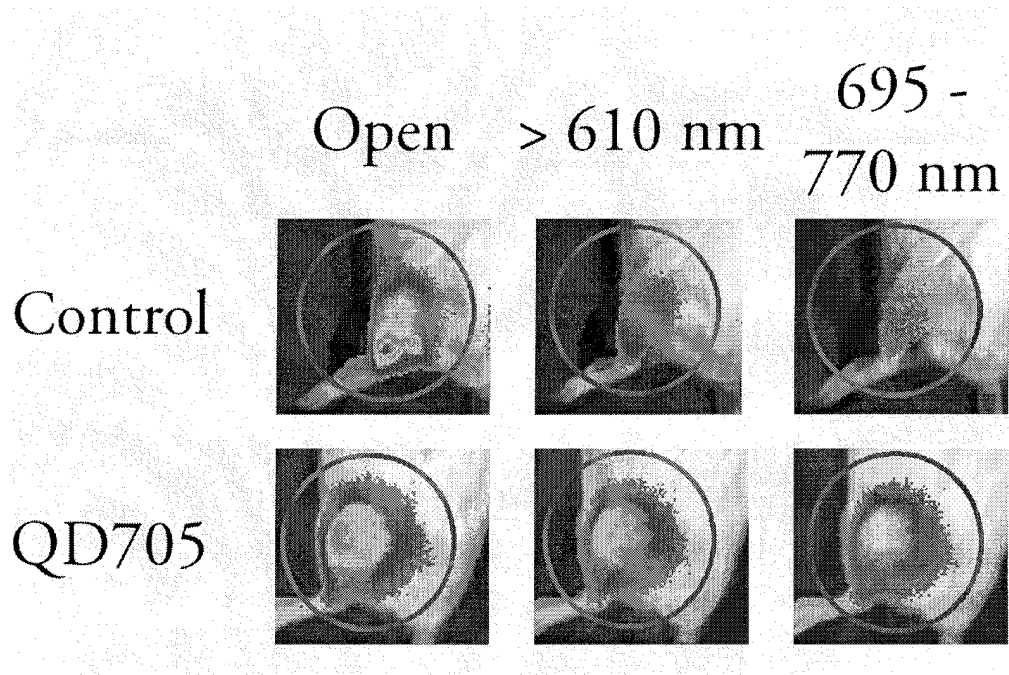
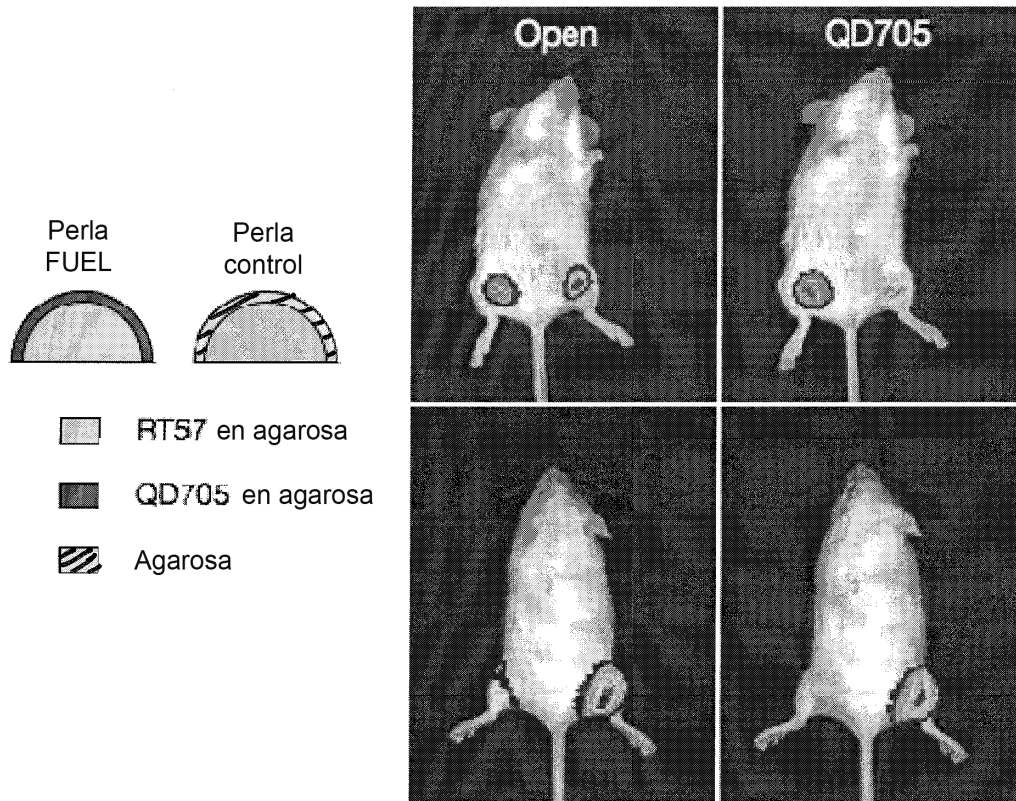


FIGURA 9



Potenciación de fotones rojos a través de tejidos *in vivo*

Filtro	Boca arriba		Boca abajo	
	Promedio	PEE	Promedio	PEE
Open	1,14	0,14	3,95	0,56
QD705	14,67	0,79	11,79	1,32

n = 3

FIGURA 10

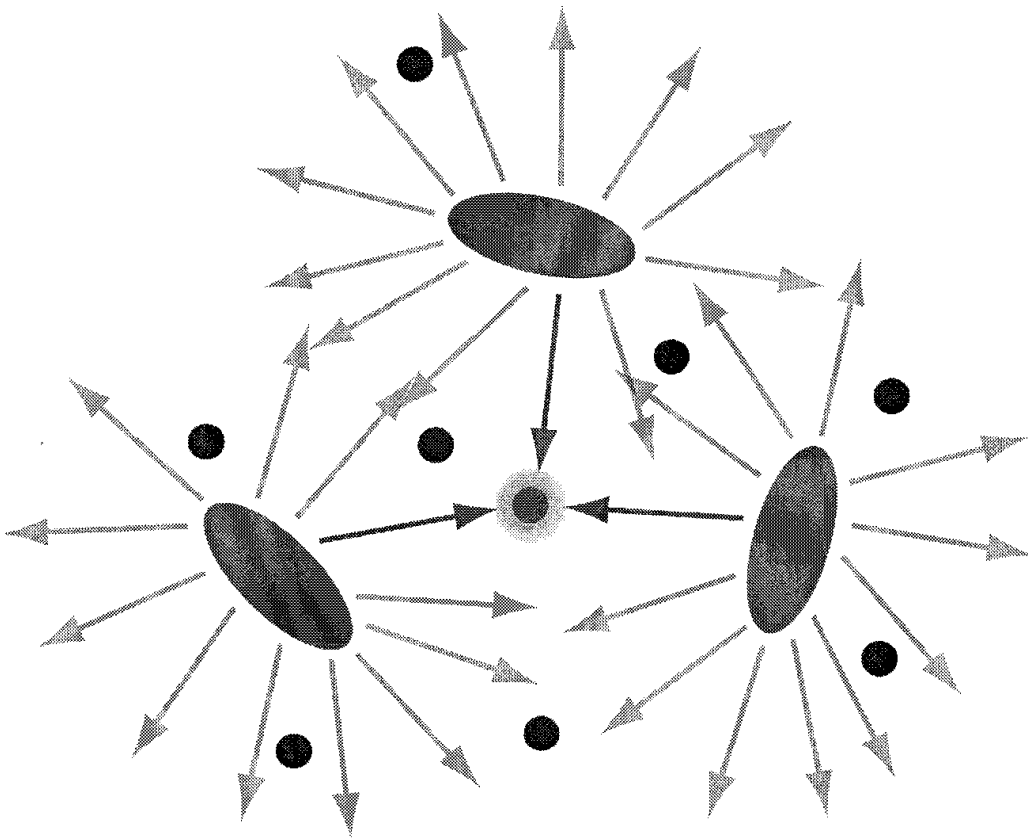


FIGURA 11