

Marcatori fluorescenti nell'infrarosso

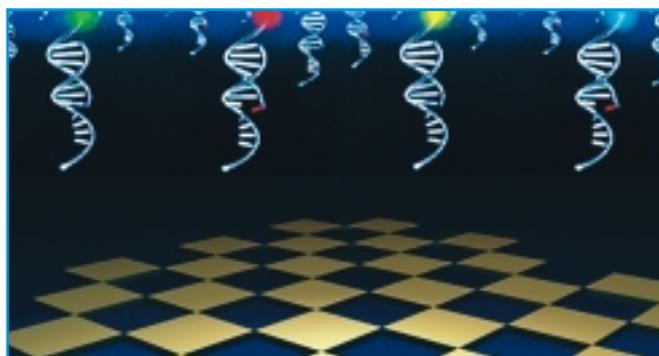
Sonde per le nanotecnologie

di Leopoldo Della Ciana

La crescente miniaturizzazione dei sistemi analitici richiede metodi di rivelazione di estrema sensibilità.

La regione spettrale del vicino infrarosso è molto conveniente per misure di fluorescenza.

Tra i pochi marcatori fluorescenti nel vicino infrarosso, le cianine sono sicuramente i più importanti, con applicazioni in immunoassay, citometria, HPLC, elettroforesi capillare e analisi del DNA.



La crescente miniaturizzazione nei sistemi analitici ("lab-on-a-chip", "DNA-chip") richiede molto spesso metodi di rivelazione di estrema sensibilità. Le tecniche di fluorescenza convenzionali, seppure considerate molto sensibili, non raggiungono il limite di rivelabilità (DL) di 10^{-10} M. Sono stati recentemente sviluppati alcuni metodi che permettono di superare questo limite. In un caso, la sorgente di eccitazione, normalmente una lampada tungsteno-alogeno o allo xeno, è stata sostituita con un laser, inizialmente un laser allo ione argo. Questa tecnica è nota come Fluorescenza Indotta da Laser (LIF), e permette di ridurre il DL di 2-3 ordini di grandezza. Un aumento analogo di sensibilità è stato ottenuto fornendo l'energia necessaria ad eccitare il marcatore fluorescente non tramite onde elettromagnetiche come la luce, ma per via elettrochimica. Questo metodo è noto come chemiluminescenza elettrogenata, o ECL. L'autore ha sintetizzato marcatori ECL basati sui composti del rutenio oltre quindici anni fa, presso Igen, Inc., di Rockville, MD, Usa. L'ECL è stato impiegato per la rivelazione dei prodotti della PCR (Polymerase Chain Reaction) tramite uno stru-

mento noto come QPCR, commercializzato da Perkin-Elmer durante gli anni Novanta. Recentemente, la Roche Diagnostics ha immesso sul mercato uno strumento per immunoassay basato sull'ECL, l'Elecsys. Il tempo totale di analisi richiesto dall'Elecsys è di circa dieci minuti, rispetto alle circa due ore e mezzo necessarie per un saggio convenzionale Elisa. Tuttavia, ci sono casi in cui il metodo ECL è difficile da impiegare, per esempio quando è necessario analizzare una grande moltitudine di microcampioni. Inoltre il metodo ECL richiede soluzioni corrosive per rigenerare la superficie dell'elettrodo. Per questi motivi, ho deciso, circa dieci anni fa, di trovare il modo di ridurre i costi e aumentare ulteriormente la sensibilità della LIF, dato che questa tecnica è più semplice da applicare, soprattutto in quanto richiede una fluidica più semplice. Un analogo programma di ricerca fu iniziato nello stesso periodo dal prof. Gabor Patonay della Georgia State University di Atlanta e dal prof. Alan Waggoner della Carnegie Mellon University di Pittsburgh. Lo scopo di queste ricerche era mirato a sviluppare nuovi marcatori fluorescenti eccitabili con diodi laser di piccole dimensioni, come quelli utilizzati nei lettori di codici a barre ($\lambda=633$ nm) e lettori e scrittori di CD ($\lambda=633$ nm). Un vantaggio

ulteriore di questa zona dello spettro è la considerevole diminuzione delle due principali sorgenti di rumore. Una di queste è il rumore dovuto allo scattering di Raman. Il rumore di Raman è inversamente proporzionale alla quarta potenza della lunghezza d'onda ed è quindi vantaggioso lavorare a lunghezze d'onda maggiori. Un'altra importante sorgente di rumore è dovuta alla fluorescenza della matrice analitica. Tuttavia, la stragrande maggioranza delle biomolecole è fluorescente nell'ultravioletto o nel visibile. In altri termini, la regione del vicino infrarosso (NIR) è una finestra spettrale molto conveniente per misure di fluorescenza.

Chimica e proprietà delle cianine

Tra le poche classi di composti in grado di fornire possibili candidati per lo sviluppo di marcatori fluorescenti, le cianine, o coloranti polimetinici sono sicuramente i più importanti. Le cianine hanno una lunga storia di utilizzo in alta tecnologia. È stato detto che le cianine hanno reso possibile la fotografia a colori e quella ad

Articolo presentato all'incontro "Le micro/nanotecnologie nei settori biomedicale, farmaceutico, biotecnologico: la rivoluzione industriale appena iniziata?" (Federchimica - Cnr), Milano, maggio 2001.

L. Della Ciana, Innosense - Via Ribes, 5 - 10010 Colletterto Giacosa (TO).

alta velocità. Durante la guerra fredda sono state molto importanti come sensibilizzatori fotografici nel vicino infrarosso. I satelliti spia erano in grado di ottenere fotografie di impianti militari e strategici ad oltre 650 km di distanza, anche in presenza di nubi. Verso la fine degli anni Ottanta le cianine hanno trovato crescente impiego nella registrazione ottica, e quindi nei CD-R e i CD-RW. Le cianine sono anche usate nei laser a colorante nel vicino infrarosso. Le stesse caratteristiche che rendono le cianine utili in questi campi possono essere sfruttate per le nuove applicazioni bioanalitiche nel ruolo di marcatori. In particolare, le cianine hanno coefficienti di estinzione molare estremamente elevati, in alcuni casi superiori a $250.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Su questa caratteristica, unita a rese quantiche di fluorescenza medie o alte (talvolta superiori al 50%) è basata la loro estrema sensibilità. Un vantaggio meno ovvio della chimica delle cianine è la modularità, che permette di progettare composti capaci di far fronte ad una varietà di requisiti.

Per capire meglio le regole di progettazione di questi composti è necessario approfondire lo studio della loro struttura e delle loro caratteristiche.

Le cianine hanno la formula di struttura riportata in Figura 1. In accordo al principio della triade, sviluppato dal prof. S. Daehne, i composti organici coniugati sono caratterizzati dall'appartenenza a tre stati ideali: lo stato aromatico, il polienico e il polimetinico. La differenza principale fra i tre stati ideali è la forte delocalizzazione degli elettroni π presente sia nei composti aromatici sia in quelli polimetinici. Di conseguenza, entrambi gli stati hanno lo stesso ordine di legame in tutto il sistema coniugato, al contrario dell'alternanza di ordine di legame riscontrata nei polieni. D'altra parte, la forte alternanza di densità elettronica π dei polimetinici è assente negli aromatici e nei polieni. Un'altra importante caratteristica dei composti polimetinici è il loro coefficiente di estinzione molare elevatissimo, in contrasto a quello medio oppure medio-alto dei polieni o degli aromatici. Infine, al contrario dei polieni, sia gli aromatici sia i polimetinici posseggono una considerevole energia di risonanza. Le cianine possono essere considerate una buona approssimazione dello stato polimetinico ideale. La previsione delle loro proprietà spettroscopiche e della reattività delle cianine è stato l'argomento di molti lavori, anche per il fatto

che si possono considerare un'approssimazione del colorante ideale. Anche metodi quantomeccanici semplici, come il Free Electron Molecular Orbital (FEMO), meglio noto come "l'elettrone nella scatola" hanno avuto un successo notevole nella previsione delle energie di transizione elettronica. In termini qualitativi, un aumento di lunghezza della scatola di un'unità vinilica produce un aumento di circa 100 nm nella lunghezza d'onda del massimo di assorbimento e di emissione. La teoria più accurata e completa sviluppata finora è l'Approssimazione di Catena Lunga Polimetinica, o LP-CA. Secondo questa teoria, la lunghezza effettiva della "scatola" è determinata dalla natura dei gruppi terminali (nel caso delle cianine, eterocicli azotati).

Molti eterocicli azotati sono stati utilizzati per la preparazione di cianine. I più comuni sono la 2,3,3-trimetilindolenina, il 2-metilbenzossazolo e il 2-metilbenzotiazolo. Soprattutto per coloranti con catene polimetiniche lunghe, come gli eptapolimetini, la maggior parte dei lavori si è concentrata sui derivati dell'indolenina. Le cianine derivate da questi precursori sono note come indocianine. Le indocianine sono più difficili da ossidare (o ridurre) e quindi sono più stabili in presenza di ossigeno. Tuttavia, le eptapolimetinindocianine più semplici, quali ad esempio il verde indocianina, si ossidano ancora molto facilmente in soluzione acquosa. Sono anche soggette a "photobleaching". Un modo per ridurre molto la resistenza sia all'ossidazione sia alla luce è quello di legare assieme gli atomi di carbonio adiacenti al gruppo metinico centrale. Il nuovo anello così ottenuto non deve avere nessuna coniugazione con il cromoforo polimetinico, al fine di evitare di perturbare lo stato polimetinico. Recentemente, sono stati proposti alcuni criteri volti a favorire la ricerca di cianine con resa quantica elevata. Alcuni di questi criteri sono gli stessi utilizzati nella progettazione di altri coloranti fluorescenti. Ad esempio, è meglio evitare di introdurre atomi pesanti nella struttura molecolare. Analogamente, l'uso di ambienti organizzati (detergenti) o di solventi deuterati o viscosi in genere permette di aumentare la fluorescenza di molti composti. Altri criteri, quali l'incorporazione di gruppi carichi nel cromoforo sono più specifici per le cianine. La repulsione elettrostatica prodotta da tali gruppi carichi permette di ridurre le interazioni di impilamento fra molecole di colorante, che sono spesso responsabili

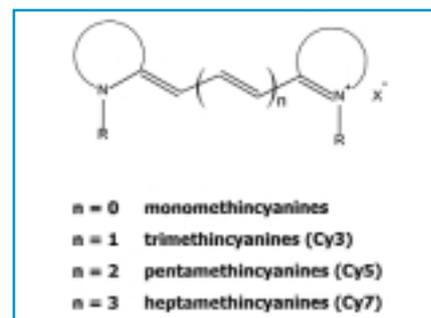


Figura 1 - Formula di struttura delle cianine

per una forte riduzione dell'efficienza di fluorescenza. L'aggiunta di ulteriori anelli aromatici agli eterocicli terminali causa non solo un aumento significativo di resa quantica di fluorescenza, ma anche uno spostamento verso il rosso del massimo di assorbimento e di emissione di circa 15 nm per anello. Questo effetto è utile per aggiustare le proprietà spettroscopiche del colorante. Da questa breve discussione dovrebbe essere chiaro che la flessibilità e modularità della chimica delle cianine è tale che dovrebbe essere possibile coprire tutta la regione spettrale dall'ultravioletto al vicino infrarosso utilizzando solamente questa classe di coloranti. In effetti, ad Innosense è in atto una linea di ricerca volta a sintetizzare nuove cianine in grado di sostituire i marcatori fluorescenti tradizionali quali la fluoresceina e la rodamina. I nuovi coloranti dovranno in particolare essere più stabili e indipendenti dal pH.

Le cianine come marcatori fluorescenti

Per utilizzare le cianine come marcatori, è necessario introdurre nella struttura molecolare dei bracci che portino dei gruppi funzionali o attivi nella loro estremità distale. La maggior parte di questi gruppi funzionali sono gli esteri attivi (specialmente gli esteri della *N*-idrossisuccinimide) e i fosforamiditi. Gli esteri attivi sono utilizzati per la coniugazione con proteine o con molecole dotate di gruppi amminici primari, mentre i fosforamiditi trovano impiego nei sintetizzatori automatici di oligonucleotide. Altri gruppi funzionali, come ad esempio, ammine primarie, tioli o maleimmidi sono stati introdotti nella struttura delle cianine per altri tipi di coniugazione. Un aspetto importante che riguarda l'introduzione di un braccio funzionalizzato nel colorante riguarda il punto preciso di attacco. Le cianine simmetriche hanno un piano di simmetria che taglia la molecola nel suo



Figura 2 - Cromatografia su colonna a fase inversa RP18 di una eptametincianina (banda verde)

punto centrale, il gruppo metinico *meso*. Pertanto, a meno di legare il braccio funzionalizzato a questo carbonio metinico, esistono sempre due punti identici di attacco per molecola. Per questo motivo, uno schema di sintesi semplice che parte da due molecole di eterociclo quaternarizzato sull'azoto e un intermedio (poli)metinico quali una difenilformamidina, una malondialdeide, una glutaconaldeide o un loro derivato produce, in presenza di basi deboli, una trimetin-, una pentametin- o una eptametincianina simmetrica con due bracci funzionali. Tali bracci sono generalmente legati agli anelli eterociclici o agli azoti quaternarizzati. Un marcatore di questo tipo è adatto a marcare proteine, in quanto si può utilizzare in largo eccesso in modo da minimizzare la formazione di legami crociati. Tuttavia non è adatto ad essere legato a piccole molecole, quali i nucleotidi o ad apteni. In questo caso sono disponibili due strategie. O si lega il braccio funzionalizzato al carbonio in posizione *meso*, come illustrato in precedenza, oppure è necessario sintetizzare una cosiddetta emicianina, facendo reagire una mole dell'eterociclo quaternarizzato con una mole dell'intermedio (poli)metinico in assenza di base. L'emicianina ottenuta è poi fatta reagire con una mole di un eterociclo quaternarizzato differente in presenza di base. Ovviamente, solo uno dei due eterocicli quaternarizzati deve possedere il braccio funzionalizzato. Questo metodo è più complesso del precedente, e tende inoltre a dare basse rese del

marcatore. Ciò è in parte dovuto ad un certo grado di reversibilità presente nell'emicianina e in parte a problemi di purificazione della cianina asimmetrica. In generale, la grande reattività degli eterocicli quaternarizzati tende a produrre molti sottoprodotti altamente colorati. In Figura 2 è mostrata una cromatografia su colonna a fase inversa RP18 di una eptametincianina (banda verde).

Un altro aspetto importante nella progettazione di marcatori è la solubilità in ambiente acquoso. A questo scopo, gruppi solfonato sono stati introdotti in varie parti della struttura molecolare della cianina, specialmente in fondo alla catena *N*-alchilica o direttamente sui terminali eterociclici. Una carica totale negativa è spesso preferibile, al fine di minimizzare le interazioni non specifiche con superfici o biomolecole, dato che entrambe sono generalmente, portatrici di cariche negative. D'altra parte la presenza di gruppi solforici va evitata nei fosforamiditi di cianine, in quanto ne impedisce la solubilità in acetonitrile, il solvente utilizzato nella sintesi di oligonucleotide. La carica totale della molecola è particolarmente importante in tecniche elettroforetiche. Se si considerano poi le interazioni possibili con biomolecole, quali gli enzimi, le cose si complicano ulteriormente. In questo caso la strategia migliore rimane la sintesi di un gran numero di marcatori tra cui scegliere il più adatto per una data situazione. Come per i farmaci, la più piccola variazione nella struttura può avere grandi conseguenze. Questi problemi diventano ancor più gravi se si considerano i coniugati con piccole molecole. Molto sforzo è richiesto per non perturbare le proprietà di queste ultime. Nel sequenziamento del DNA è necessario preparare quattro coniugati, uno per base, con quattro marcatori diversi. I nucleotidi sono modificati al fine di terminare la formazione della catena dell'oligonucleotide, ma devono mantenere intatta la capacità di formare legami idrogeno con i nucleotidi complementari e la loro percentuale di incorporazione deve essere simile a quella dei nucleotidi naturali. In Figura 3 è mostrato il modello di un oligonucleotide (in viola) marcato con una eptametincianina (in verde) ibridizzato all'oligonucleotide complementare (colori per tipo di atomo).

Applicazioni

Le applicazioni dei marcatori basati sulle cianine vanno da settori relativamente

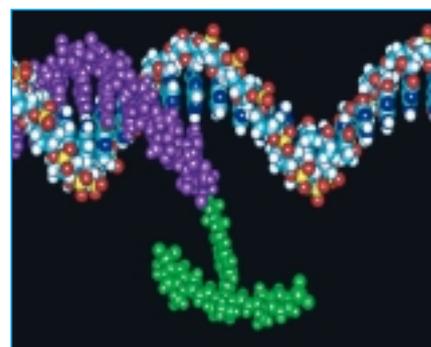


Figura 3 - Modello di un oligonucleotide (in viola) marcato con una eptametincianina (in verde) ibridizzato all'oligonucleotide complementare (colori per tipo di atomo)

più tradizionali, quali la microscopia in fluorescenza, gli immunoassay in fluorescenza, la citometria a flusso attivata dalla fluorescenza, l'HPLC, a settori più recenti, quali l'elettroforesi capillare e le tecniche del DNA. In tutti questi campi, le cianine permettono di abbassare di molto il limite di rivelabilità. Ad esempio, un detector per HPLC dotato di sorgente laser nell'infrarosso è in grado di rivelare concentrazioni di cianina dell'ordine di 10^{-13} M. Un detector per elettroforesi capillare con una sorgente di eccitazione simile è capace di rivelare 15 attomoli di colorante in un gel. Per quanto riguarda le tecniche del DNA, molte società sono state fondate, specialmente negli Stati Uniti, con l'obiettivo di produrre dispositivi delle dimensioni di una carta di credito per la tipizzazione automatica del DNA. Nella maggior parte dei casi, l'uso di cianine fluorescenti nel vicino infrarosso è una parte essenziale della tecnologia. Ad Innosense siamo impegnati a fornire questi nuovi strumenti indispensabili per la nuova corsa all'oro (genetico) che sta iniziando.

Bibliografia

- [1] T. Imasaka *et al.*, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 1077.
- [2] G. Patonay, Near-infrared Fluorescence: an Emerging New Method, in *Advances in the Near-Infrared Measurements*, G. Patonay (Ed.), JAI Press, Greenwich, CN, 1993, Vol. 1, 114.
- [3] R.B. Mujumdar *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1993, **4**, 105.
- [4] Near-Infrared Dyes for High Technology Applications, S. Daehne *et al.* (Eds.), Nato ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
- [5] *US Pat.* 6,136,612, 2000.
- [6] *EP* 1,065,250, 2001.