



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 953**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

C07D 213/38 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95925435 .0**

86 Fecha de presentación : **29.06.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0767912**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.1997**

54 Título: **Quelatos de lantánidos luminiscentes y procedimientos de uso.**

30 Prioridad: **29.06.1994 US 269162**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es:
The Regents of the University of California
12th Floor, 1111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US

72 Inventor/es: **Selvin, Paul, R. y**
Hearst, John

74 Agente: **González Palmero, Fe**

ES 2 290 953 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

Quelatos de lantánidos luminiscentes y procedimientos de uso.

5 **Campo de la invención**

El campo de esta invención es quelatos de lantánidos luminiscentes.

Antecedentes

Los marcadores luminiscentes (que incluyen fluorescentes y fosforescentes) encuentran una amplia variedad de aplicaciones en la ciencia, medicina e ingeniería. En muchos casos, estos marcadores proporcionan sustituciones competentes por radiomarcadores, cromógenos, colorantes opacos a la radiación, etc. Han aumentado las mejoras en instrumentación fluorimétrica que pueden conseguirse con sensibilidades y análisis cuantitativos permitidos.

Quizás la única limitación más significativa al uso de marcadores luminiscentes es generar una relación señal a ruido aceptable. Las propiedades dependientes de marcadores tales como máximos de absorción y emisión, desplazamiento de Stoke, rendimiento de cuantos, etc. llevan a cabo la facilidad de distinguir la señal de autofluorescencia o fluorescencia de fondo. Por tanto, existe una necesidad continua de proporcionar marcadores luminiscentes mejorados; especialmente marcadores luminiscentes con luminiscencia de larga duración y/o un gran desplazamiento de Stoke con largas emisiones de longitud de onda. Otras propiedades útiles y deseables incluyen; síntesis fácil y rentable; estabilidad química, especialmente en un entorno acuoso; capacidad de unión conveniente a una amplia variedad de macromoléculas que incluye proteínas y ácidos nucleicos; excitabilidad eficiente mediante un láser conveniente; capacidad de intensa luminiscencia; la capacidad de trabajar como buenos donantes de transferencia de energía por resonancia luminiscente, permitiendo la determinación de distancias moleculares más allá de 100 Å; y utilidad como fluorófos endurecidos por radiación en microscopía de rayos X.

Bibliografía relevante

Patentes relevantes incluyen las patentes de los EE.UU. números 4.637.988 (1987) y 4.837.169 (1989). Para una solicitud de patente que usa criptatos de lantánidos como donantes de transferencia de energía véase la patente de los EE.UU. 5.512.493 (1996).

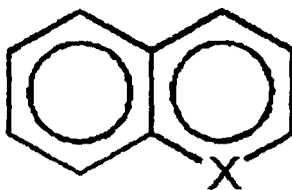
Bailey y col. (1984) *Analyst* 109, 1449-1450 informan de DTPA-pAS-Tb. Para artículos previos sobre otros quelantes de lantánidos véase **Diamandis** (1992) *Analyst* 117, 1879-1884, **Canfi** y col. (1989) *Analyst* 114, 1405-1406, **Ando** y col. (1993) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1102, 186-194, **Georges** y **Ghazarian** (1993) *Analytica Chimica Acta*, 276, 401-409, **Mathis** y col. (1993) *Clin. Chem.*, 39, 1953 y **Desai** y col. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11032, **Seveus** y col. (1992) 13, 329-338, **Saavedra** y **Picozza** (1989) *Analyst* 114, 835-838, de **Brenndorff** y col. (1993) en Proceedings, 4th Intl Conf on X-ray Microscopy, Chemogolovoka, Moscow District, Rusia, **Clark** y col. (1993) *Analytical Biochemistry* 210, 1-6.

Para una revisión actualizada de la transferencia de energía por resonancia fluorescente, véase Selvin (1994) *Fluorescent Resonance Energy Transfer*, en *Biochemical Spectroscopy*, un tomo de *Methods in Enzymology*, Academic Press, Ed. Kenneth Sauer, en prensa.

Resumen de la invención

La invención proporciona:

- un quelato de lantánido que comprende un quelante de lantánido covalentemente unido a un sensibilizador, en el que dicho quelante comprende una pluralidad de grupos carboxilato o fosfonato, en el que dicho quelato puede unir un lantánido con una constante de equilibrio de al menos 10^6 M^{-1} , en el que un complejo de dicho quelato y dicho lantánido puede mejorar la luminiscencia del lantánido y en el que dicho sensibilizador está representado por la fórmula general:



en la que X comprende un átomo del grupo 5 ó 6 del sistema periódico, en el que un primer átomo de carbono en la posición 2-8 de dicho sensibilizador que es el átomo de carbono en la posición 2 ó 4 está sustituido con un átomo de oxígeno mediante un doble enlace covalente, y un segundo átomo de carbono sencillo en la posición 2-8 de dicho sensibilizador que es el átomo de carbono en la posición 7 está sustituido con un grupo de enlace a través del que dicho sensibilizador está covalentemente unido a dicho quelante,

ES 2 290 953 T3

en el que un complejo de dicho quelato y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^6 M^{-1} puede ser de intensidad de luminiscencia al menos superior al 500% de la de dicho lantánido;

- una marca molecular que comprende un quelato de la invención covalentemente unido a un reactivo selectivo por analito;

- un procedimiento para mejorar la luminiscencia de un lantánido, comprendiendo dicho procedimiento: formar una mezcla de un quelato de lantánido de la invención y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} mediante el que se forma un complejo de quelato de lantánido-lantánido luminiscente;

- un procedimiento para detectar un analito que puede estar presente en una parte de una muestra mediante luminiscencia, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

poner en contacto una parte de muestra con un complejo luminiscente de un quelato de lantánido de la invención y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} , en el que dicho quelato está covalentemente unido a un reactivo que puede unir selectivamente dicho analito;

incubar dicha parte de muestra en condiciones en las que dicho reactivo pueda unir selectivamente dicho analito;

exponer dicha parte de muestra a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en dicho quelato;

detectar una emisión de luz de dicha parte de muestra a una segunda longitud de onda, en el que dicha segunda longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en dicho quelato;

en el que la detección de dicha emisión de luz está relacionada con la presencia de dicha parte de muestra de analito; y

- un procedimiento para detectar una distancia entre una primera posición y una segunda posición en una parte de una muestra mediante transferencia de energía por resonancia usando un donante de quelato de lantánido luminiscente y un aceptor orgánico de energía por resonancia, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

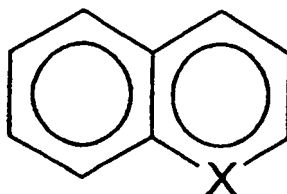
exponer una parte de muestra que comprende dicho donante localizado en dicha primera posición y dicho aceptor localizado en dicha segunda posición a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en dicho donante, en el que dicho donante comprende un complejo de un quelato de lantánido de la invención y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} , y en el que el solapamiento espectral de la emisión del donante y la absorción del aceptor es suficiente para permitir la transferencia de energía de dicho donante a dicho aceptor como se mide mediante extinción detectable de la intensidad de luminiscencia del donante o tiempo de vida o aumento detectable en la intensidad de luminiscencia del aceptor o tiempo de vida;

detectar al menos uno de:

la intensidad de una primera emisión de luz de dicha parte de muestra a una segunda longitud de onda, en el que dicha segunda longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en dicho donante, en el que la intensidad de dicha primera emisión de luz está relacionada inversamente con una distancia entre dicha primera y segunda posición de dicha parte de muestra; y

la intensidad de una segunda emisión de luz de dicha parte de muestra a una tercera longitud de onda, en el que dicha tercera longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una transición electrónica en dicho aceptor, en el que la intensidad de dicho segundo emisión de luz está relacionada con una distancia entre dicha primera y segunda posición de dicha parte de muestra.

Por tanto, los quelatos de lantánidos de la invención comprenden un quelante de lantánido que está covalentemente unido a un sensibilizador aromático heterocíclico polinuclear de fórmula general:



en la que X comprende un átomo del grupo 5 ó 6 del sistema periódico.

El sensibilizador tiene un primer átomo de carbono sustituido en la posición 2-8 con un átomo de oxígeno mediante un doble enlace covalente y un segundo átomo de carbono sencillo en la posición 2-8, diferente del primer átomo de carbono en la posición 2-8, sustituido con un grupo de enlace a través del que el sensibilizador está covalentemente unido al quelante. En quelatos preferidos, el sensibilizador tiene un tercer átomo de carbono sustituido en la posición 2-8, diferente del primer y segundo átomo de carbono en la posición 2-8. El primer átomo de carbono en la posición 2-8 es el átomo de carbono en la posición 2 ó 4 y el segundo átomo de carbono es el átomo de carbono en la posición 7. Frecuentemente, el sensibilizador y quelante están unidos mediante un grupo amina o carboxilo, y/o el tercer átomo de carbono en la posición 2-8 es el carbono en la posición 4 y está sustituido con un hidrocarburo o hidrocarburo sustituido con halógeno. Sensibilizadores a modo de ejemplo incluyen 2- o 4-quinolonas, 2- o 4-coumarinas, o derivados de las mismas, por ejemplo carboestirilo 124 (7-amino-4-metil-2-quinolona), coumarina 120 (7-amino-4-metil-2-coumarina), coumarina 124 (7-amino-4-(trifluorometil)-2-coumarina), etc.

Los quelatos pueden formar complejos de alta afinidad con lantánidos, tales como terbio o europio, mediante grupos quelantes, tales como DTPA. Los quelantes comprenden una pluralidad de grupos aniónicos estructuralmente impedidos tales como grupos carboxilato o fosfonato. Las disoluciones de complejos quelato-lantánido pueden ser de luminiscencia intensa. Los quelatos pueden acoplarse a una amplia variedad de compuestos para crear marcadores, sondas, reactivos diagnósticos y/o terapéuticos específicos, etc.

Los complejos quelato-lantánido son útiles como marcadores detectables en una amplia variedad de aplicaciones. Generalmente, los procedimientos implican poner en contacto una parte de muestra con un complejo luminiscente; exponer la parte de muestra a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en el quelato; y detectar una emisión de luz de la parte de muestra a una segunda longitud de onda que es más larga que la primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en el quelato. Analitos específicos en la muestra pueden detectarse acoplando el quelato a un reactivo que puede unir selectivamente analito.

Los quelatos también se usan en transferencia de energía por resonancia entre complejos quelato-lantánido y otro agente luminiscente, frecuentemente un fluorescente no metálico basado en aceptor de energía por resonancia. Por ejemplo, acoplando el donante del complejo quelato-lantánido a un átomo y el aceptor a un segundo átomo puede medirse una distancia entre dos átomos. Generalmente, el solapamiento espectral de la emisión del donante y la absorción del aceptor es suficiente para permitir la transferencia de energía del donante al aceptor como se mide mediante extinción detectable de la intensidad de luminiscencia del donante del tiempo de vida o aumento detectable en la luminiscencia del aceptor.

Si los átomos están en la misma molécula, los procedimientos proporcionan información útil sobre la estructura o conformación de la molécula. Por ejemplo, los procedimientos se usan para monitorizar el estado de una reacción en cadena de la polimerasa acoplando el donante y el aceptor a átomos separados de un oligonucleótido de diagnóstico. Como aumenta la concentración de ADN diana, el porcentaje de oligonucleótidos de diagnóstico hibridados a ADN diana aumenta, que a su vez aumenta la distancia media entre los átomos marcados. Este aumento en la distancia media se detecta como una disminución en la transferencia de energía entre el donante y el aceptor. Si los átomos están en diferentes moléculas, los procedimientos proporcionan información útil sobre las interacciones o localizaciones relativas de las dos moléculas.

Descripción de realizaciones específicas

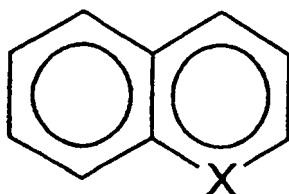
Se ha sintetizado una serie de nuevos compuestos químicos que se unen a elementos lantánidos que incluyen terbio y europio, y los sensibiliza eficientemente, es decir, permite que se exciten eficientemente y posteriormente luminescen eficazmente. Los compuestos también permiten acoplarse convenientemente a macromoléculas. Estos compuestos se llaman quelatos de lantánidos.

La importancia de la invención es múltiple: primero, los quelatos de lantánidos pueden usarse como sustituciones no isotópicas para marcadores radioactivos. Segundo, pueden usarse como alternativas a tintes fluorescentes convencionales, especialmente en aplicaciones de obtención de imágenes, con potencial para contraste aumentado. Este contraste aumentado se produce debido a que la luminiscencia de lantánidos es extremadamente larga (0,6-2,3 milisegundos). Si se usa una fuente de excitación por pulsos y detección controlada (resuelta en el tiempo), la autofluorescencia intensa (ruido) decaerá con los marcadores todavía emitiendo. Tal autofluorescencia evita actualmente imágenes fluorescentes de muchas muestras de tejido. Tercero, debido a que todos los quelatos están excitados en la misma región espectral son posibles dos obtenciones de imágenes en color. Cuarto, los quelatos de lantánidos pueden usarse como donantes extremadamente eficaces en análisis de transferencia de energía luminiscente. Este uso permite mediciones de distancias más allá de 100 Å, distancias que actualmente no pueden medirse con técnicas habituales de transferencia de energía de fluorescencia, pero de importancia en biología estructural y medicina.

Los quelatos tienen varias ventajas importantes: 1. Son fáciles de sintetizar y unir a macromoléculas; 2. Se excitan eficazmente por un láser de nitrógeno (a 337 nm); 3. Algunos de ellos (por ejemplo, DTPA-cs124) pueden sensibilizar tanto terbio como europio; 4. La luminiscencia de lantánidos de los quelatos es extremadamente intensa; por ejemplo, el quelato de terbio ilustrado más adelante luminesce aproximadamente sesenta y cinco veces más intensamente que paraaminosalicilato de DTPA (DTPA-pAS) cuando se excita a 337 nm; 5. Son químicamente estables; 6. Pueden usarse para marcar ácidos nucleicos y proteínas en condiciones químicas usadas en sintetizadores automatizados (por

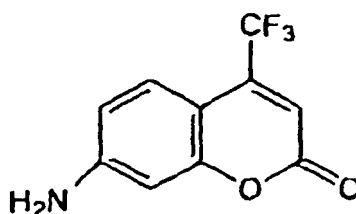
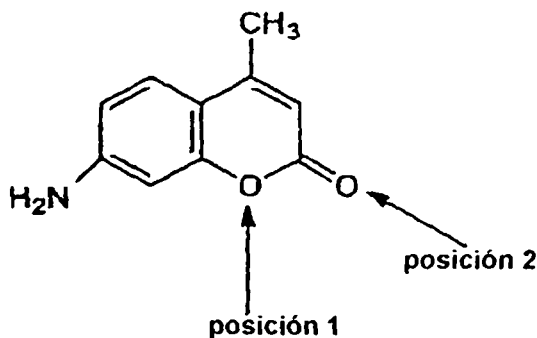
ejemplo en la creación de fosforamiditos en tecnología de ADN/ARN o tecnología de proteínas); 7. Son donantes de transferencia de energía por resonancia extremadamente buenos. Un elemento importante en el éxito de los quelatos en la transferencia de energía es el hecho de que hay muy poco solapamiento espectral o temporal entre la emisión del sensibilizador y la emisión del lantánido. A diferencia, DTPA-pAS tiene un solapamiento temporal y espectral muy significativo y proporciona un donante pobre de transferencia de energía; y, 8. Son útiles como fluoróforos endurecidos por radiación en microscopía de rayos X.

Los quelatos de lantánidos comprenden un sensibilizador aromático heterocíclico polinuclear de fórmula general:



en la que X comprende un átomo del grupo 5 ó 6 del sistema periódico.

Sensibilizadores adecuados pueden incluir una variedad de estructuras adicionales que incluyen estructuras en las que la fórmula general anterior comprende una parte estructuralmente menor del sensibilizador. Al menos uno de los átomos de carbono en la posición 2-8, en particular la posición 2 ó 4, se oxida, preferentemente a un carbonilo (es decir, con doble enlace a un átomo de oxígeno). Las posiciones se enumeran convencionalmente: en el sentido contrario a las agujas del reloj desde el heteroátomo que es la posición número 1. Frecuentemente, otro átomo de carbono en la posición 2-8, preferentemente la otra posición 2 ó 4, se sustituye (es decir, se reemplaza un átomo de hidrógeno) con un grupo que comprende un grupo alquilo, vinilo, oxi (que incluye hidroxilo, alcoxi, carboxilo), carbonilo o nitrógeno sustituido (por ejemplo nitro, amino que incluye aminas sustituidas, etc.), ciano, acetato, etc., o un derivado de los mismos, particularmente derivados de haluro. Sensibilizadores a modo de ejemplo incluyen rodamina 560, 575 y 590, fluoresceínas, 2- o 4-quinolonas, 2- o 4-coumarinas, o derivados de las mismas, por ejemplo coumarina 445, 450, 490, 500 y 503, 4-trifluorometilcoumarina (TFC), 7-dietil-amino-cumarin-3-carbohidrizida, etc., y especialmente carboestirilo 124 (7-amino-4-metil-2-quinolona), coumarina 120 (7-amino-4-metil-2-coumarina), coumarina 124 (7-amino-4-(trifluorometil)-2-coumarina), aminometiltrimetilsoralenos:



Como sensibilizadores puede usarse una amplia variedad de derivados de la fórmula general anterior, siempre y cuando el quelato resultante proporcione la unión de lantánido requerida y mejora de la luminiscencia. Por luminiscencia mejorada se indica que una disolución del quelato complejoado con un lantánido, cuando se expone a luz a una longitud de onda, el lantánido complejoado emite luz de mayor intensidad o tiempo de vida que una muestra idéntica ausente de quelato. La mejora es normalmente de intensidad superior a al menos el 50%, preferentemente al menos el 500%, más preferentemente al menos el 5000%, lo más preferido al menos el 50.000%, en al menos un conjunto de

ES 2 290 953 T3

condiciones (por ejemplo concentración especificada, sistema de disolvente, etc.), por ejemplo, véanse las condiciones descritas en este documento.

Para excitar eficazmente el lantánido vecino, los quelatos proporcionan generalmente máximos de absorción entre 150 y 750 nm, normalmente entre 200 y 650 nm, más normalmente entre 250 y 550 nm, lo más normal entre 300 y 450 nm. Generalmente, las emisiones detectadas son al menos 50 nm, normalmente al menos 100 nm, más normalmente al menos 150 nm superiores a la luz incidente. Por ejemplo, emisiones detectadas preferidas para terbio y europio son 492 y 546 nm y 617 y 695 nm, respectivamente. Los coeficientes de extinción generalmente superan 5.000, normalmente 8.000, más normalmente 11.000.

La selección de combinaciones quelante-sensibilizador particulares depende de la aplicación prevista. Los criterios incluyen el lantánido seleccionado, fuentes de fluorescencia de fondo potencial, agentes de extinción, la fuente de luz incidente, etc. Funcionalmente, los quelatos adecuados para un lantánido dado se identifican acoplando un sensibilizador candidato a un quelante tal como DTPA, complejándolo con el lantánido e identificando complejos que pueden mejorar al lantánido luminiscente. Los detalles del ensayo se describen más adelante.

Los quelatos pueden formar complejos de alta afinidad con lantánidos, tales como terbio o europio. Los quelatos unen al menos un lantánido, preferentemente al menos uno de terbio y europio, con una constante de equilibrio de al menos 10^6 M^{-1} , preferentemente al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^{10} M^{-1} en al menos un conjunto de condiciones descritas en este documento. Puede usarse una amplia variedad de restos estructurales para proporcionar la afinidad de unión del lantánido requerido, siempre y cuando el quelato resultante proporcione la luminiscencia requerida. Sin embargo, el lantánido está normalmente unido iónicamente mediante grupos aniónicos tales como grupos carboxilato o fosfonato.

Frecuentemente, los quelatos comprenden una o más partes quelantes estructuralmente distintas. Estas partes quelantes comprenden una pluralidad de grupos aniónicos estructuralmente impedidos tales como grupos carboxilato o fosfonato. En una realización preferida, estas partes se seleccionan de compuestos que por sí solos pueden funcionar como quelantes de lantánidos con las afinidades de unión anteriormente mencionadas. Por ejemplo, tales partes quelantes incluyen EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc. y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc. La afinidad del lantánido de quelato también puede ser un resultado cooperativo (sinérgico) de la interacción de una pluralidad de grupos funcionales. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo glicina, del quelato pueden colocarse estructuralmente para unir sitios de coordinación vacantes del lantánido para mejorar la afinidad de unión global.

Si el quelato comprende una parte quelante estructuralmente distinta, normalmente está unido covalentemente a la parte de sensibilizador, normalmente mediante un grupo de enlace. Pueden usarse cualquier grupo de enlace que pueda ligar covalentemente el sensibilizador con el quelante y no excluya la unión de lantánido y luminiscencia requerida. Por tanto, el grupo de enlace puede comprender una amplia variedad de estructuras. Frecuentemente, el grupo de enlace comprende un grupo nitrógeno, carboxilo, carbonilo o alcohol o un derivado de nitrógeno o carboxilo y está covalentemente unido a un átomo de carbono en la posición 2-8 en la fórmula general. El grupo de enlace está frecuentemente unido covalentemente a uno de los átomos de carbono anteriores en la posición 2-8, frecuentemente en la posición 7. Grupos de enlace comunes son aminas alifáticas y aromáticas, que pueden ser primarias o secundarias, carboxilos y sulfhidrilos. El quelante y sensibilizador se unen frecuentemente mediante un enlace amida, anhídrido, disulfuro, tio-urea, tioéter, etc.

Los quelatos pueden sintetizarse de cualquier modo conveniente. Muchos de los sensibilizadores y sensibilizadores de quelantes descritos están comercialmente disponibles - otros se sintetizan o modifican a partir de materiales de partida comerciales según procedimientos convencionales. Los dos pueden acoplarse mediante cualquier química conveniente, aunque se acoplan más frecuentemente directamente mediante grupos funcionales como se describen en este documento - por ejemplo, algunos de los quelatos preferidos se basan en una reacción entre un anhídrido (por ejemplo de ácido dietilenotriaminapentaacético, caDTPA) y un sensibilizador (el DTPA actúa como el quelante, uniendo fuertemente el lantánido y evitando la desactivación no radiativa mediante agua, y el compuesto orgánico actúa como un sensibilizador, permitiendo una excitación eficiente del lantánido). Estos quelatos pueden hacerse mediante una modificación del procedimiento de Bailey y col. (1984) Analyst 109, 1449-1450, en el que un sensibilizador que contiene amina reemplaza pAS. El anhídrido de DTPA se disuelve separadamente en un disolvente orgánico anhidro, normalmente dimetilsulfóxido seco. Entonces, el anhídrido y el sensibilizador seleccionado se mezclan y se dejan reaccionar durante aproximadamente una hora. El anhídrido reacciona con la amina sobre el sensibilizador para formar un enlace amida estable.

Si se desea, el quelato puede acoplarse a un reactivo específico por analito, polímero orgánico, macromolécula (especialmente biomoléculas similares a ácidos nucleicos y proteínas), etc. de cualquier modo. Por ejemplo, para acoplamiento covalente a una proteína (u otra amina que contiene macromolécula), el quelato puede formarse originalmente usando el dianhídrido de DTPA. Después de acoplarse al sensibilizador, la mezcla se añade entonces a la macromolécula que contiene amina, bien en un disolvente orgánico o en un disolvente inorgánico. Entonces, el segundo dianhídrido reacciona con la(s) amina(s) sobre la macromolécula, formando otro enlace amina. La reactividad de la amina es suficientemente grande para que esa reacción pueda realizarse en un medio acuoso (aún cuando el agua compita por la reacción con el anhídrido).

Alternativamente puede usarse un ligador bifuncional para acoplar el quelato y la macromolécula. Por ejemplo, un ligador adecuado puede comprender tanto un grupo reactivo de tiol (por ejemplo maleinida, haluro de acetilo, etc.) como un grupo reactivo de amina (por ejemplo tiourea, isotiocianato, etc.). Por ejemplo, el mono-anhídrido de DTPA puede acoplarse a una proteína reaccionando con hidrazida de 3-(2-piridilditio)propionilo (PDPH).

Los complejos quelato-lantánido son útiles como marcadores detectables en una amplia variedad de aplicaciones. Generalmente, los procedimientos implican poner en contacto una parte de muestra con un complejo luminiscente de un quelato y un lantánido; exponer la parte de muestra a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en el quelato; y detectar, ventajosamente con un retardo en el tiempo para minimizar la detección de luminiscencia de fondo de vida más corta, una emisión de luz de la parte de muestra a una segunda longitud de onda que es más larga que la primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en el quelato. Analitos específicos en la muestra pueden detectarse acoplando el quelato a un reactivo que puede unir selectivamente analito.

Los procedimientos pueden adaptarse a una amplia variedad de muestras que incluyen muestras y extractos biológicos (tales como fluidos fisiológicos, disoluciones de ácidos nucleicos y/o proteináceas, cultivos microbianos, etc.), muestras medioambientales (tales como fuentes de agua), reactivos industriales, especialmente químicos, productos y desechos, etc. Los quelatos pueden estar libres en disolución o contenidos en una variedad de formas. Por ejemplo, los quelatos pueden fraccionarse preferencialmente en o sobre una fase, sólida o líquida, tal como adsorbidos sobre una superficie sólida o membrana o contenidos dentro de una perla (por ejemplo microesferas de látex). Por tanto, los procedimientos son útiles conjuntamente con clasificación (por ejemplo clasificación celular), cromatografía, separaciones electroforéticas, osmóticas y centrífugas. Los quelatos estables al calor y organoestables se seleccionan para aplicaciones que implican temperatura elevada (por ejemplo destilaciones, combustiones, etc.) y extracciones orgánicas.

La primera longitud de onda (la de la luz incidente) se selecciona para optimizar la última relación señal a ruido de la emisión de lantánido. Frecuentemente, la luz incidente se proporciona en una forma para minimizar la absorción de ruido. Fuentes útiles incluyen láser (por ejemplo láser de nitrógeno, helio-cadmio, láser de colorante, etc.) y lámparas de arco (por ejemplo de alta presión, de mercurio, xenón, cuarzo, etc.). Se prefieren particularmente los láser de nitrógeno porque su frecuencia de emisión de 337 nm está próxima a un máximo de absorción de lantánido. Similarmente, la segunda longitud de onda se selecciona para optimizar la relación señal a ruido y en vista de la instrumentación disponible.

Los quelatos objeto pueden acoplarse a una amplia variedad de compuestos para crear marcadores, sondas, reactivos diagnósticos y/o terapéuticos, etc. Ejemplos incluyen biomoléculas tales como proteínas (anticuerpos, enzimas, receptores, etc.), ácidos nucleicos (ARN, ADN, etc.), moléculas bioactivas (fármacos, toxinas, etc.); sustratos sólidos tales como vidrio o perlas poliméricas, láminas, fibras, membranas (por ejemplo nailon, nitrocelulosa), portaobjetos (por ejemplo vidrio, cuarzo) y sondas; etc.

Muchos de los quelatos son particularmente susceptibles a lo que se denomina transferencia de energía por resonancia de luminiscencia, o LRET. LRET es una versión generalizada de transferencia de energía por resonancia fluorescente, o FRET, una técnica ampliamente basada en ciencia de polímeros, bioquímica y biología estructural. FRET puede usarse para medir las distancias entre dos puntos que están marcados con colorantes fluorescentes y están separados aproximadamente 10-75 Å. La técnica es valiosa debido a que las mediciones pueden hacerse en condiciones fisiológicas (u otras) con resolución casi de Angstrom y con la exquisita sensibilidad de mediciones de fluorescencia. FRET se basa en una transferencia de energía dependiente de una distancia de un colorante fluorescente - el donante - a otros colorantes de absorción o fluorescentes - el aceptor. El donante y aceptor están situados específicamente en el sitio en los dos puntos que se desee medir la distancia.

Aunque los lantánidos no fluorescen, el uso de quelatos les permite que se exciten eficazmente. Entonces, una transición de cuantos no fluorescentes del lantánido puede efectuar una transferencia de energía no radiativa a un aceptor adecuado y apropiadamente distanciado. Para efectuar la transferencia, en la absorción del aceptor debe superponerse una emisión de lantánidos. El par quelato-aceptor se selecciona para solapamiento óptimo: para mediciones de grandes distancias se prefiere mayor solapamiento. Debido a que los lantánidos tienen tiempos de vida del orden de un milisegundo, la relación señal a ruido de emisión sensibilizada del aceptor en LRET mejora mediante la detección de emisión mediante resolución en el tiempo (retardo del pulso) o modulación de fase. La transferencia de energía puede detectarse mediante extinción del donante o, preferentemente luminiscencia del aceptor.

Usando quelantes de lantánidos luminiscentes como donantes (en lugar de colorantes convencionales), y colorantes fluorescentes convencionales como aceptores, se ha mejorado aproximadamente 100 veces la señal respecto al ruido de LRET. Esta mejora permite mediciones más allá de 100 Å, una distancia que actualmente no se puede medir usando colorantes fluorescentes pequeños convencionales. Este régimen de distancia es importante en muchos problemas biológicos. Usando quelantes de lantánidos como donantes también se hacen más exactas las mediciones de distancias debido a que los quelantes minimizan la incertidumbre en la dependencia de la orientación de la transferencia de energía. También se ha demostrado la medición del primer tiempo de vida de la emisión sensibilizada del aceptor, una medición de LRET que elimina problemas asociados con el marcado no específico o incompleto.

Son útiles una amplia variedad de aceptores con los donantes de quelato. Generalmente, el aceptor seleccionado tendrá un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 25 nm y 250 nm mayor que el del quelato donante. Aceptores a modo de ejemplo incluyen colorantes de xanteno tales como fluorescentas y rodaminas, coumarinas, colorantes de bencimida, colorantes de fenantridina, colorantes de etidio, colorantes de acridina, colorantes de cianina tales como naranja de tiazol, azul de tiazol, Cy5, Cy5.5, Cy3, etc., colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de quinolona, proteínas ficobílicas, por ejemplo aloficocianina, R-ficoeritrina, B-ficoeritrina, colorantes Bodipy, etc. Los aceptores emiten generalmente en intervalos visibles o infrarrojos.

LRET es particularmente útil para obtener información estructural y cinética sobre macromoléculas en disolución, en tiempo real. Por ejemplo, los oligonucleótidos marcados en los dos extremos proporcionan señalización de LRET detectable cuando están unidos por proteínas de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo factores de transcripción. Por consiguiente, los procedimientos se usan para seleccionar potenciales agentes terapéuticos que alteran la estructura o interacciones de biomoléculas; por ejemplo, los agentes antivirales se seleccionan para la capacidad de alterar las alteraciones inducidas por el factor de transcripción viral en conformación de ácido nucleico.

El procedimiento general basado en LRET para detectar la distancia entre una primera posición y una segunda posición en una parte de una muestra implica: exponer una parte de muestra que comprende el complejo lantánido donante-quelato localizado en la primera posición y el aceptor localizado en la segunda posición a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en el donante. El solapamiento espectral de la emisión del donante y la absorción del aceptor es suficiente para permitir la transferencia de energía del donante al aceptor como se mide mediante extinción detectable de intensidad de luminiscencia del donante o tiempo de vida o aumento detectable en la intensidad de luminiscencia del aceptor o tiempo de vida. Entonces se detecta la intensidad de una primera emisión de luz de la parte de muestra a una segunda longitud de onda, siendo la segunda longitud de onda más larga que la primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en el donante, en el que la intensidad de la primera emisión de luz está relacionada con una distancia entre la primera y segunda posición. En otras palabras, cuanto más cerca estén las posiciones, mayor es la transferencia de energía y mayor es la extinción del donante. Alternativamente puede detectarse la intensidad de una segunda emisión de luz de parte de muestra a una tercera longitud de onda, siendo la tercera longitud de onda más larga que la primera longitud de onda y resulta de una transición electrónica en el aceptor, en el que la intensidad de la segunda emisión de luz está relacionada inversamente con la distancia entre la primera y la segunda posición de la parte de muestra. En otras palabras, cuanto más cerca estén las posiciones, mayor es la transferencia de energía y mayor es la luminiscencia del aceptor.

Este procedimiento general tiene gran aplicación, siempre que la distancia estática o dinámica entre dos posiciones, por ejemplo dos átomos o moléculas, sea de interés. En una realización específica, el procedimiento se usa para monitorizar el estado de una reacción en cadena de la polimerasa. En este documento, la parte de muestra comprende una cadena de ácido nucleico diana que comprende una primera parte de cadena y una cadena de ácido nucleico de diagnóstico marcada proximal a un extremo con el aceptor y proximal al otro extremo con el donante (es decir, que comprende un primer átomo covalentemente unido al donante y un segundo átomo covalentemente unido al aceptor, estando el primer y segundo átomo separados por una segunda parte de cadena). La primera y segunda parte de cadena son suficientemente complementarias para hibridarse en condiciones de apareamiento, y la segunda parte de cadena es de longitud suficiente para proporcionar una diferencia detectable en la transferencia de energía total del donante al aceptor cuando la primera y segunda parte de cadena se hibridan como se compara con la transferencia de energía total del donante al aceptor cuando la primera y segunda parte de cadena no están hibridadas. La diferencia detectable se mide como al menos un aumento de una extinción detectable de luminiscencia del donante o aumento detectable en la luminiscencia del aceptor, y la distancia entre el primer y segundo átomo indica si las cadenas de ácido nucleico se han hibridado. Por tanto, a medida que avanza la reacción, el aumento progresivo en la cantidad de ácido nucleico diana se refleja en una disminución progresiva en la transferencia de energía.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo se ilustra la técnica de transferencia de energía por resonancia luminiscente (LRET) introduciendo un quelato de terbio luminiscente como donante, y un colorante orgánico, tetrametilrodamina, como aceptor. Los resultados concuerdan con una teoría de Förster de transferencia de energía, siempre que se usen los parámetros apropiados. En general, el uso de donantes de lantánidos y, en particular, este par, tiene muchas ventajas respecto a pares de FRET más convencionales que se basan mucho en colorantes orgánicos. La distancia a la que se produce el 50% de transferencia de energía (R_0) es grande, 65 Å; el tiempo de vida del donante es exponencial sencillo y largo (milise-gundo), haciendo fáciles y exactas las mediciones del tiempo de vida; la incertidumbre en el factor de orientación (κ^2) que crea incertidumbre en las distancias medidas se minimiza por las múltiples transiciones electrónicas del donante y el largo tiempo de vida; la emisión sensibilizada del aceptor puede medirse con poco o sin fondo interferente, dando una mejora > 25 veces en la señal respecto al fondo respecto a pares donante-aceptor habituales. Se espera que estas mejoras hagan distancias mayores de 100 Å que pueden medirse mediante LRET. También se informa de la medición del tiempo de vida de la emisión sensibilizada, una medición que es completamente insensible a la concentración total y marcado incompleto.

En FRET, una molécula de donante fluorescente transfiere energía mediante una interacción dipolo-dipolo no radiativa a una molécula de aceptor (que normalmente es una molécula fluorescente). FRET es una técnica espectroscópica habitual para medir distancias en el intervalo de 10-70 Å. Con la transferencia de energía, que depende de la distancia R^{-6} entre el donante y el aceptor, se reducen el tiempo de vida del donante y el rendimiento de cuantos, y aumenta la fluorescencia del aceptor, o se sensibiliza (1). FRET se usa frecuentemente tanto en la ciencia de los polímeros como en biología estructural y se ha usado recientemente para estudiar complejos macromoleculares de ADN, ARN y proteínas (2-4).

A pesar de estos éxitos, FRET ha tenido varios errores graves que han limitado su utilidad. Primero, la distancia máxima que puede medirse ha sido inferior a la óptima para muchas aplicaciones biológicas. Segundo, el tiempo de vida de fluoróforos donantes comúnmente usados es corto (normalmente unos pocos nanosegundos) y multiexponencial, haciendo difíciles las mediciones del tiempo de vida y de exactitud limitada. Tercero, la relación señal a ruido de la emisión sensibilizada ha sido baja debido a fluorescencia interferente del donante y de excitación directa del aceptor. Cuarto, han sido difíciles distancias precisas para determinar porqué la eficiencia de transferencia de energía depende no sólo de la distancia R^{-6} entre el donante y aceptores, sino también de su orientación relativa, como se expresa por el factor κ^2 . (La eficiencia de transferencia de energía = $1/(1+R^6/R_0^6)$, en la que R_0 es una función de κ^2 : véase el apéndice).

Los elementos lantánidos luminiscentes terbio y europio son donantes de FRET atractivos porque vencen potencialmente muchos de estos problemas. Debido a que la emisión de lantánidos no se produce de una transición singlete a singlete, la transferencia de energía usando donantes de lantánidos se llama más exactamente transferencia de energía por resonancia de luminiscencia (LRET). Los lantánidos se han usando principalmente en FRET potenciada por difusión (5) y como sustituciones isomorfas en proteínas de unión a calcio (6-8). Además, Mathis ha usado criptatos de europio con la alofocianina multicromófora para lograr una R_0 extremadamente larga de 90 Å (9). Recientemente se han presentado resultados que muestran numerosas ventajas de usar un policarboxilato-quelato de europio como donante conjuntamente con un colorante orgánico tal como CY-5 como aceptor (10). En este documento se amplían estos resultados al uso de terbio como donante.

Como un sistema de modelo, se une covalentemente donante y aceptor a los extremos 5' de una serie de oligómeros de ADN de cadena doble de longitud variable. El uso de ADN en un sistema de modelo tal se ha mostrado previamente como válido para las mediciones de transferencia de energía entre colorantes orgánicos (11).

Material y procedimientos

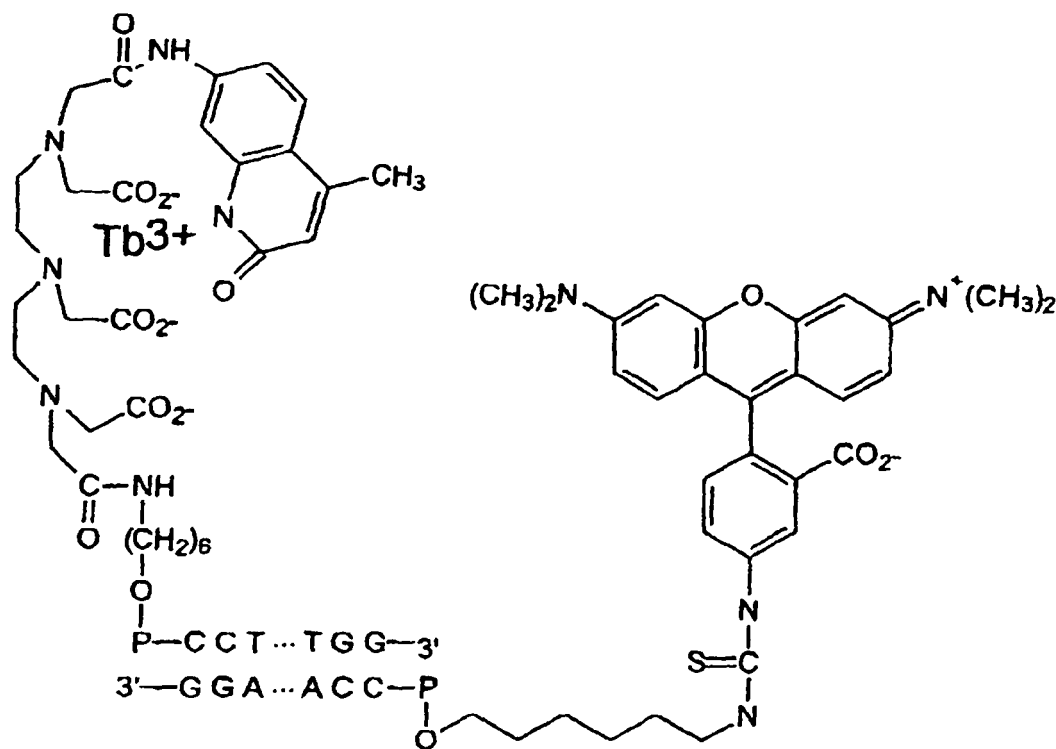
Síntesis de oligómeros de ADN marcados. Los ADN complementarios de 10, 12, 14 bases de longitud se sintetizaron usando procedimientos de fosforamidita habituales. Se incorporó un grupo amino unido mediante un ligador de seis carbonos (Glen Research) en el extremo 5'. La secuencia del aceptor fue la usada por Clegg y col. (11): 5'-CCA-CTC-TAG-G-3' (10 pb); 5'-CCA-CTG-GCT-AGG-3' (12 pb); 5'-CCA-CTG-CTG-CTA-GG-3' (14 pb). El 5-isómero de tetrametilrodamina-isotiocianato (sondas moleculares, T-1480; abreviatura: TMR) se unió mediante procedimientos habituales y se purificó mediante HPLC de fase inversa. Los coeficientes de extinción para TMR unida a ADN se determinaron que eran $\epsilon_{260} = 33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{556} = 93 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La cadena de donante estaba constituida por ADN complementario marcado en el extremo 5' con un quelato de terbio. El quelato es ácido dietilenotriaminapentaacético acoplado a un colorante láser, carboestirilo 124 (DTPA-cs124). Los detalles de la síntesis de quelatos de donantes se presentarán en cualquier sitio. También se sintetizaron los oligómeros de ADN sin marcar.

Condiciones de hibridación: las cadenas de donante y aceptor se mezclaron en relación deseada en un tampón basado en D_2O que contiene Tris 10 mM, pH 8,0, MgCl_2 10 mM, NaCl 150 mM. Los experimentos también se realizaron en un tampón basado en H_2O . La concentración de cadena de donante fue de aproximadamente 200 nM. Los oligómeros se apartaron mediante calentamiento hasta 75°C y se enfriaron hasta la temperatura final (22°C o 5°C) durante 15 minutos.

Espectroscopia: las mediciones de absorción se hicieron en un espectrómetro Hewlett Packard 8452A. Las mediciones de fluorescencia en estado estacionario fueron en un fluorímetro SPEX Fluorolog. Las mediciones de luminiscencia resuelta en el tiempo y controlada se hicieron en un espectrómetro construido en laboratorio utilizando detección de ángulo recto con un láser de nitrógeno pulsado Laser-Photonics (ancho de pulsos de 5 ns, velocidad de repetición de 40 Hz), un detector de conteo de fotones de arseniuro de galio, un discriminador controlado (Ortec 584) y un contador multicanal con 2 μs de resolución en el tiempo. También se realizaron estudios de polarización, aunque los experimentos de transferencia de energía que se realizaron sin un analizador dieron los mismos resultados que aquellos usando un analizador. Por tanto, rutinariamente se omitió un analizador. Se usó un portacubetas regulado por temperatura y una cubeta de 3 mm x 3 mm de cuarzo. Los datos del tiempo de vida se ajustaron usando el software TableCurve (Jandel Scientific).

Resultados y discusión

La estructura del quelato donante, DTPA-cs124-Tb, y el sistema de modelo usado para la transferencia de energía se muestra a continuación:



El quelato donante tiene varias características importantes. Primera, el quelato une terbio (y europio) extremadamente fuerte - la titulación con un exceso de 100 veces de EDTA ($K_b \leq 10^{17} \text{ M}^{-1}$) no puede desplazar una cantidad medible de terbio. Esto está de acuerdo con otros quelantes basados en DTPA (12) y garantiza que no hay terbio libre. Segundo, el quelato permite unión específica a sitio de terbio a macromoléculas. Tercera, el quelato protege el terbio de mecanismos de desexcitación no radiativa, dando probablemente como resultado un rendimiento de cuantos para luminiscencia de terbio próxima a la unidad en D_2O (véase el apéndice I). Finalmente, la unión covalente del colorante láser carboestirilo 124 supera la sección transversal de absorción extremadamente baja de terbio ($< 1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (6). La cs124 absorbe luz ($\epsilon_{328} = 11,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{338} = 8,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y debido a su íntima proximidad al terbio, transfiere energía al lantánido (13, 14).

Los resultados muestran las características espectrales del quelato de terbio y la tetrametilrodamina que lleva a transferencia de energía eficiente y una R_0 larga de $65 \text{ \AA}$ en D_2O ($60 \text{ \AA}$ en H_2O). R_0 se calcula a partir de ecuaciones habituales (véase el apéndice). En este documento se mencionan dos aspectos inusuales de usar un quelato de lantánido como donante: 1) puede ajustarse la eficiencia de transferencia de energía, y por tanto optimizarse R_0 para el sistema particular que está midiéndose, simplemente variando la relación de H_2O a D_2O en el disolvente. La relación $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ afecta la eficiencia de transferencia de energía alterando el rendimiento de cuantos del lantánido (q_D) en el quelato ($q_D = 1$ en D_2O ; $q_D = 0,6$ en H_2O ; véase el apéndice I) (15). 2) se minimiza la dependencia de la orientación del procedimiento de transferencia de energía porque el terbio tiene múltiples transiciones electrónicas degeneradas y, por tanto, es un donante isotrópico, aunque estacionario. Esto minimiza la incertidumbre en la distancia medida debido a efectos de orientación de $\pm 12\%$ en el peor caso (16).

Los resultados también muestran la naturaleza con sumamente muchas puntas de la emisión de terbio. La extinción del donante puede medirse sin interferencia de la emisión del aceptor a 492 nm y 546 nm . Similarmente, la emisión sensibilizada del aceptor puede medirse sin interferencia significativa de la luminiscencia del donante debido a que el terbio es casi silencioso a aproximadamente 570 nm , en el que la TMR es un 70% de su máximo de emisión. La señal del terbio a 570 nm es 240 veces inferior a su máximo, 546 nm .

Cuando se mida la emisión sensibilizada también podemos eliminar la fluorescencia directa del aceptor mediante discriminación temporal. Se usa excitación por pulsos y sólo se recogen datos después de un retraso de $90 \mu\text{s}$, tiempo durante el que ha decaído la fluorescencia directa de la rodamina. (La fluorescencia del aceptor, con un tiempo de vida de unos pocos nanosegundos, decae rápidamente; también se encontró un pequeño componente - probablemente o fluorescencia retrasada o un artefacto detector - que decae dentro del retardo de $90 \mu\text{s}$.) El donante, debido a su tiempo de vida de milisegundos, permanece excitado y puede transferir energía al final del periodo de retardo. Por

consiguiente, cualquier señal que aparece aproximadamente a 570 nm después del retardo sólo es debida la emisión sensibilizada, es decir, fluorescencia del aceptor debido a transferencia de energía.

Los resultados muestran los resultados de un experimento de transferencia de energía en un ADN 10-mero parcialmente hibridado. La transferencia de energía media es el 77%. La señal respecto al fondo de la emisión sensibilizada a 570 nm es 54:1. En comparación, la señal respecto al fondo para la emisión sensibilizada cuando se usa fluoresceína-rodamina como pares de transferencia de energía en el mismo ADN es aproximadamente 1. Debido al ruido es tan pequeño en nuestro caso, las señales pequeñas pueden medirse y, por tanto, se espera que sean posibles las distancias mucho mayores que R_0 . Horrocks y Bruno, por ejemplo, han demostrado la capacidad para medir distancias de $4R_0$ ($R_0 = 3,1 \text{ Å}$) utilizando la emisión sensibilizada de fondo oscuro de la transferencia de energía de tirosina respecto a terbio (6).

Se puede aislar la señal de emisión sensibilizada de la luminiscencia del donante incluso en regiones en las que la luminiscencia del donante es significativa. En un procedimiento análogo al usado por Clegg y col. (11), la luminiscencia del donante puede restarse a todas las longitudes de onda, quedando la señal de señal de emisión sensibilizada. Entonces, la eficiencia de energía transferida es simplemente el área de la emisión sensibilizada corregida dividida por el área corregida total:

$$\text{Eficiencia de transferencia de energía} = (f_A/q_A) / (f_A/q_A + f_D) \quad (1)$$

en la que f_A es el área bajo la curva de emisión sensibilizada, q_A es el rendimiento de fluorescencia de cuantos del aceptor y f_D es el área bajo la curva de la luminiscencia del donante. Puede determinarse el rendimiento de cuantos del aceptor mediante una comparación con los datos de extinción del donante. Basado en un rendimiento de cuantos de 0,174 para TMR (véase el apéndice II), la ecuación 1 da una transferencia de energía media del 77%.

Los resultados muestran los datos de tiempos de vida en una serie de oligómeros de ADN 10-meros. La señal (de ADN de cadena sencilla) con sólo donante es exponencial sencilla con un tiempo de vida de 2,14 ms. (Un oligómero de ADN marcado con terbio hibridado a su complemento es exponencial sencilla con un tiempo de vida de 2,80 ms. La diferencia en el tiempo de vida entre ADN con sólo terbio de cadena doble y de cadena sencilla es probablemente debido a las diferentes velocidades relativas que se producen de simetrías diferentes que rodean el terbio, en vez de diferentes rendimientos de cuantos). Una titulación con cantidades crecientes de cadena de aceptor muestra extinción biexponencial del donante. El componente de largo tiempo de vida se corresponde con ADN de cadena sencilla con sólo donante sin hibridar; el componente corto se corresponde con aquellas cadenas de terbio que están hibridadas con cadenas de aceptor. Como se espera, aumentar la cantidad de cadena de aceptor aumenta la amplitud del componente corto y disminuye la amplitud del componente largo, mientras que sus tiempos de vida permanecen invariables. Que el componente de largo tiempo iguale la señal con sólo donante es un control interno importante que muestra que la transferencia intermolecular de energía no es significativa. El tiempo de vida del componente corto se corresponde con una transferencia de energía en el complejo donante-aceptor del 88% ($1-331 \mu\text{s}/2809 \mu\text{s}$). En comparación, la transferencia de energía en el mismo ADN 10-mero con los mismos ligadores de seis carbonos usando el par fluoresceína-TMR es del 23% (11).

En el cálculo de la eficiencia de transferencia de energía basada en la curva de emisión sensibilizada se ignora el componente de tiempo corto ya que esto es debido a señal residual que se produce de la fluorescencia directa del aceptor. (Para estos datos no se usó control). Múltiples experimentos muestran que el componente de tiempo largo puede repetirse dentro del 10% en el peor caso, y normalmente puede repetirse dentro de un pequeño porcentaje. Sin embargo, el componente de tiempo corto es sumamente variable debido a que hay una punta muy corta, muy larga debido a fluorescencia directa que no puede resolverse.

En un exceso de dos veces de cadena de aceptor todavía hay un componente sin hibridar al 10-12%. Se ha observado un fenómeno similar con oligómeros marcados con colorante (17) y en experimentos de FRET con europio sustituido en el quelato (10). En este caso no parece ser un simple fenómeno de la temperatura de fusión ya que está presente tanto a 5°C como a 22°C. La razón para esto está en investigación. Es improbable que esta señal residual de donante sin extinguir sea debida a fotofísica fundamental del lantánido ya que esto requeriría una transición de dipolo magnético sin acoplar, una situación que no está presente ya que toda la luminiscencia del terbio (y europio) se produce a partir del mismo estado excitado (18, 19).

Los resultados también muestran el tiempo de vida de la emisión sensibilizada a 570 nm correspondiente a la extinción biexponencial del donante. El decaimiento de la emisión sensibilizada puede ajustarse exactamente a la ecuación: $y = 33\% \exp(-t/45 \mu\text{s}) + 67\% \exp(-t/326 \mu\text{s})$. El componente de 45 ms se corresponde con la fluorescencia directa del aceptor o un artefacto detector (que puede eliminarse mediante supresión). El componente de 326 μs es debido a la transferencia de energía en el complejo donante-aceptor y concuerda extremadamente bien con la extinción de 329-331 μs del componente del donante. Obsérvese que después de aproximadamente 90 μs , las únicas especies que contribuyen a la señal de emisión sensibilizada es el complejo donante-aceptor - no contribuyen el donante solo o el aceptor solo. Esto minimiza significativamente el problema de marcado incompleto. La señal del tiempo de vida de la emisión sensibilizada también es insensible a concentración total, a rendimientos de cuantos y a efectos de transferencia de no energía que pueden producir extinción del donante.

La tabla 1 resume los datos de tiempo de vida y transferencia de energía en dúplex de ADN marcados con donante-aceptor de 10, 12 y 14 pb de longitud.

TABLA 1

	Tiempo de vida (μ s)	Eficiencia de transferencia de energía	Distancia calculada ($\text{\AA}$)	Distancia ($\text{\AA}$) de Clegg y col.
10-mero	336	0,88	46,6	55,5
12-mero	724	0,74	54,6	56,4
14-mero	1154	0,59	61,2	61,0

Los datos de múltiples experimentos que muestran tiempos de vida de extinción del donante y emisión sensibilizada para un ADN de longitud dada siempre concuerdan dentro del 10%, normalmente dentro de un pequeño porcentaje. Como se espera, hay una disminución en la transferencia de energía con distancias crecientes. Para comparar se incluyen las distancias determinadas por Clegg y col. usando fluoresceína-TMR (11). Ambos resultados concuerdan con la geometría de doble hélice del ADN, aunque diferentes condiciones de sales y tiempos de vida del donante conducen a diferentes posiciones del colorante, y por tanto a diferentes distancias medidas. Se ha ajustado las distancias usando el modelo de Clegg y col. de la hélice de ADN y se han unido colorantes. Con sólo tres puntos de datos no es posible resolver únicamente todos los parámetros en el modelo, pero sin embargo, se logra un buen ajuste a su modelo si se supone que el quelato de terbio y/o aceptor están bastante próximos a la hélice de ADN. Esto reduce la modulación vista en sus datos de FRET, que se produce debido a la geometría helicoidal del ADN y al hecho de que su donante y aceptor estén alejados de la hélice (19 Å y 13 Å, respectivamente). Esta diferencia es cualitativamente razonable debido a que se espera el tiempo de vida largo del donante permita la difusión forzada del donante y aceptor dentro de los límites colocados por los ligadores de seis carbonos, y debido a la gran fuerza fónica usada aquí, que minimiza la repulsión de cargas.

En resumen, los datos concuerdan con la geometría del ADN de doble hélice si los datos de transferencia de energía están derivados basados en el mecanismo dipolo-dipolo de tipo Förster. Numerosas ventajas técnicas de transferencia de energía por resonancia de luminiscencia hacen que ésta sea una técnica muy apta para mediciones en macromoléculas biológicamente interesantes.

Apéndice I

Cálculo de R_0 : R_0 , la distancia a la que el 50% de la energía del estado excitado del donante se transfiere al aceptor, se calcula a partir de ecuaciones habituales (1):

$$R_0 = (8,79 \times 10^{-5} J \kappa^{-2} n^{-4} q_D)^{1/6} \text{ \AA} \quad (2)$$

en la que q_D es el rendimiento de cuantos de luminiscencia para la emisión del donante en ausencia de aceptor, J es el solapamiento espectral de la emisión del donante (f_D) y la absorción del aceptor (e_A) ($J = \int f_D e_A \lambda^4 d\lambda$), n es el índice de refracción y κ^2 es un factor geométrico relacionado con los ángulos relativos de los dos dipolos. En este documento se evalúa cada uno de los términos en la ecuación 2 y se trata su incertidumbre.

El índice de refracción, n , varía de 1,33 para agua a 1,39 para muchas moléculas orgánicas. Se ha usado 1,33.

Una integración numérica lleva a una integral del solapamiento J de $3,8 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1}$. Éste es un límite superior para J ya que el pico de terbio a 546 nm puede producirse a partir de dipolo magnético, además de transiciones de dipolo eléctrico (19), y el primero no transfiere significativamente energía (18). La fracción de contribución de dipolo magnético puede calcularse teóricamente (20, 21), o el problema puede evitarse usando la línea de terbio a 492 nm, que es conocida por ser exclusivamente una transición de dipolo eléctrico (20).

Si se usan colorantes orgánicos en FRET, κ^2 es frecuentemente una fuente significativa de incertidumbre y en el peor caso puede variar de 0 a 4 (22). Sin embargo, con terbio, la emisión se produce de múltiples transiciones electrónicas que limitan κ^2 : $1/3 < \kappa^2 < 4/3$. Además, es probable que el aceptor pueda experimentar movimiento rotacional durante el tiempo de vida del donante de milisegundos. Esto limita adicionalmente κ^2 y se asume $\kappa^2 = 2/3$, correspondiente a una orientación al azar que rota rápidamente dentro del tiempo de vida del donante.

El rendimiento de cuantos de luminiscencia del terbio, q_D , es difícil de determinar con exactitud debido a la absorbancia intrínsecamente baja del terbio. Sin embargo, q_D , está probablemente muy próximo a 1 en D_2O (véase

más adelante). Obsérvese que cuando se calcula R es importante usar el rendimiento de cuantos de terbio (= 1 en D₂O), no el rendimiento de cuantos de todo el quelato. El rendimiento de cuantos de todo el quelato es igual al rendimiento de cuantos de lantánido por la fracción de energía absorbida por la cs 124 que se transfiere al lantánido.

5 Rendimiento de cuantos de emisión de lantánidos: hay varias líneas de evidencia (indirecta) que argumentan $q_D = 1$ en D₂O. Primera, la emisión se produce de electrones de la corteza interna 4f-4f que están protegidos del disolvente y otras fuentes de desexcitación no radiativa por el quelato. Las 1,2 moléculas de H₂O en la esfera de coordinación primaria del terbio en el quelato (datos no mostrados) son la fuente primaria de desexcitación no radiativa, pero éstas están sustituidas por D₂O, que no desactivan significativamente terbio (15, 23). Los ligandos no acuosos, grupos
10 carboxilato y nitrógenos de amina son extremadamente ineficientes en la desactivación del estado excitado del terbio (23). Mediante estudios de temperatura (24) también se ha buscado extinguir los efectos de la cs124 y no se ha encontrado ninguno.

Una segunda línea de evidencia que soporta $q_D = 1$ en D₂O procede del trabajo de Elbanowski y colaboradores, que
15 midieron directamente el rendimiento de cuantos de una mezcla 1:3 de terbio:EDTA en H₂O y encontraron un valor de 0,54 (25). Esta medición es difícil y de exactitud desconocida, pero sin embargo sugiere un alto rendimiento de cuantos incluso en H₂O, y se espera que el rendimiento de cuantos en D₂O sea considerablemente mayor. (Probablemente hay 2 moléculas de agua coordinadas con el terbio en su complejo (23)).

20 La tercera línea de evidencia procede de los experimentos de transferencia de energía usando terbio como donante en termolisina (8, 26), y como aceptor en calmodulina invertebrada (6), en la que la suposición (algunas veces implícita) de rendimiento de cuantos unidad en D₂O concuerda bien con datos de cristalografía de rayos X.

Apéndice II

25 Cálculo del rendimiento de cuantos de fluorescencia del aceptor: comparando los datos del tiempo de vida de extinción del donante con las áreas y usando la ecuación es posible medir el rendimiento de cuantos del aceptor. Esto en un procedimiento general y nuevo para medir rendimientos de cuantos de cualquier colorante cuya absorción solape la emisión de terbio (o europio). Tiene la ventaja respecto a más procedimientos convencionales de medir rendimientos
30 de cuantos en los que la medición sólo implica una muestra - la muestra actual de interés - en vez de comparar una referencia con la muestra.

Para evaluar el rendimiento de cuantos de TMR se supone que la incógnita en la ecuación 1 es q_A y la eficiencia de transferencia de energía media toma el 77,6%. Basado en las áreas integradas (620 para f_A y 1032 para f_D , en unidades
35 arbitrarias), esto da $q_A = 0,174$. En comparación, tetrametilrodamina libre en solución salina tamponada con fosfato tiene un rendimiento de cuantos de 0,25, como se mide mediante técnicas habituales (27).

Bibliografía entre paréntesis del ejemplo 1

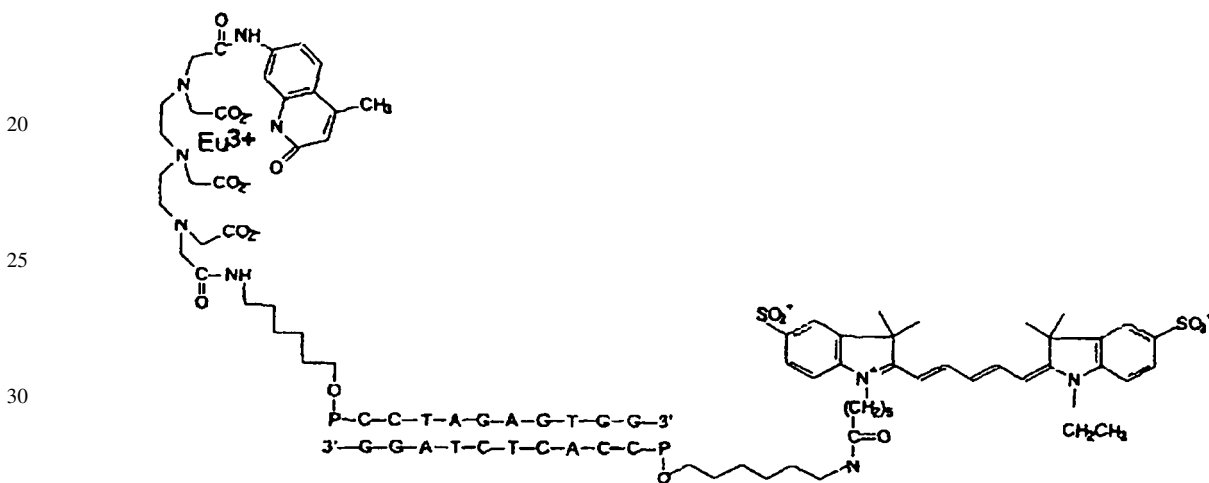
40 1) **Cantor y Schimmel**, (1980) *Biophysical Chemistry*. (W. H. Freeman y Co., San Francisco); 2) **Clegg**, (1992) *Methods Enzymol.* 211:353-388; 3) **Selvin**, (1994) *Methods Enzymol.* 246, (en prensa); 4) **Coker** y col., (1994) *Resonance Energy Transfer*. (VCH Publishers, Inc.) (en prensa); 5) **Stryer** y col., (1982) *Annu. Rev. of Biophys. y Bioengin.* 11:203-222; 6) **Bruno** y col., (1992) *Biochem.* 31:7016-7026; 7) **Cronce y Horrocks**, (1992) *Biochem.* 31:7963-7969; 8) **Horrocks**, y col., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4764-4768; 9) **Mathis**, (1993) *Clin. Chem.* 39:1953-1959;
45 10) **Selvin** y col., (1994) *JACS* (en prensa); 11) **Clegg** y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.* 90:2994-2998; 12) **Oser** y col., (1990) *Anal. Biochemistry* 191:295-301; 13) **Abusaleh y Meares**, (1984) *Photochem. & Photobiol.* 39:763-769; 14) **Kirk** y col., (1993) *J. Phys. Chem.* 97:10326-10340; 15) **Horrocks** y col., (1977) *JACS* 99:2378-2380; 16) **Stryer**, (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47:819-46; 17) **Cooper y Hagerman**, (1990) *Biochemistry* 29:9261-9268; 18) **Dexter**, (1953) *J. Chem. Phys.* 21:836-850; 19) **Bunzli**, (1989) *Luminescent Probes*, ed. Bunzli, J.-C.G., Choppin, G.R (Elsevier, Nueva York), pp. 219-293; 20) **Carnall** y col., (1968) *J. Chem. Phys.* 49:4412-4423; 21) **Gorller-Walrand** y col., (1991) *J. Phys. Chem.* 95:3099-3106; 22) **Dale** y col., (1979) *Biophys. J.* 26:161-194; 23) **Horrocks y Sudnick**, (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101:334-350; 24) **Alpha** y col., (1990) *Photochem. y Photobiol.* 52:299-306; 25) **Elbanowski** y col., (1989) *Monat. Chem.* 120:699-703; 26) **Berner** y col., (1975) *Biochem. & Biophys. Res. Commun.* 66:763-768; y 27) **Waggoner**, (1994) *Methods Enzymol.* 246 (en prensa).
55

Ejemplo 2

En este ejemplo se ilustra la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) introduciendo un quelato de europio como donante y un colorante orgánico, CY-5, como aceptor. En general, el uso de
60 donantes de lantánidos y, en particular, este par, tiene muchas ventajas respecto a pares de FRET más convencionales que se basan mucho en colorantes orgánicos. R_0 es larga, 70 Å; el tiempo de vida del donante es exponencial sencillo y largo (2,5 ms en D₂O); el factor de orientación que crea incertidumbre en distancias medidas se minimiza por las múltiples transiciones electrónicas del donante y largo tiempo de vida; la emisión sensibilizada del aceptor puede medirse con poco o sin fondo interferente, dando una mejora > 50 veces en la señal respecto al fondo respecto a pares donante-
65 aceptor habituales. Se espera que esta mejora en 1 señal respecto al fondo haga factibles mediciones de distancias mayores de 100 Å. También se mide el tiempo de vida de la emisión sensibilizada, una medición es completamente independiente de la concentración total y marcado incompleto.

Se ha usado un quelato de europio luminiscente como donante y un colorante orgánico, CY-5, como aceptor. Esta transferencia de energía por resonancia de luminiscencia (LRET) tiene varias ventajas respecto a la FRET2 más convencional. La distancia a la que el 50% de la energía se transfiere (R_0) es larga, 70 Å; el tiempo de vida del donante es exponencial sencillo y largo (0,63 ms en H_2O ; 2,5 ms en D_2O), haciendo las mediciones del tiempo de vida fácil y sumamente exactas; la dependencia de la orientación (κ^2) de transferencia de energía se minimiza por las múltiples transiciones electrónicas del donante y largo tiempo de vida, limitando la incertidumbre en la distancia medida debido a efectos de orientación hasta $\pm 12\%$ en el peor caso³; la emisión sensibilizada del aceptor puede medirse con poco o sin fondo interferente, dando una mejora > 50 veces en la señal respecto al fondo respecto a pares donante-aceptor habituales y permitiendo que se midan distancias de varias veces R_0 ⁴. También se mide el tiempo de vida de la emisión sensibilizada que, en este caso, es independiente de la concentración total y marcado incompleto.

Se ha usado tanto terbio⁵ como europio como donantes, y los resultados para europio se presentan en este documento. A continuación se muestra un diagrama esquemático sistema de modelo donante-aceptor que comprende ADN de cadena doble con quelato de europio (donante) en un extremo 5' y CY-5 en el otro extremo 5'.



El quelato de europio, (ácido dietilenotriaminapentaacético-carboestirilo 124-Eu: nombre trivial, DTPA-cs124-Eu) se hizo mediante una modificación del procedimiento de Bailey¹², partiendo con el dianhídrido de DTPA (Sigma), carboestirilo 124 (Aldrich) y el ADN sintético protegido por base y en la columna para garantizar que el marcado se produce en el grupo amino de 5'. La cs 124 aumenta eficazmente la sección transversal de absorción del europio hasta aproximadamente $8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 337 nm, cuando se excita el donante con un láser de nitrógeno pulsado. Un exceso de 100 veces de EDTA no eliminó ninguna cantidad perceptible de europio del quelante de DTPA-cs124. El aceptor se marcó en 5' con CY-513 (Biological Detection Systems) mediante procedimientos habituales. Los oligómeros de ADN complementarios sin marcar se hicieron como controles. Todo el ADN se purificó por HPLC en fase inversa. En este sistema, el oligómero de ADN de cadena doble sirve como una cadena rígida para establecer una distancia definida entre el donante de europio y el aceptor de CY5. Los puntos de unión del donante y aceptor están separados por 42 Å, aunque las posiciones del colorante retienen variabilidad limitada debido a los flexibles ligadores de seis carbonos usado para la unión 6,7.

Los resultados muestran las características espectrales que conducen a la R_0 excepcionalmente larga de 70 Å en D_2O (56 Å en H_2O). R_0 se determina a partir de ecuaciones habituales basadas en un solapamiento espectral (J) calculado de $6,55 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ nm}^4$, un factor de orientación (κ^2) de 2/3, un índice de refracción de 1,33 y un rendimiento de cuantos para luminiscencia de europio en D_2O de uno (0,25 en H_2O)⁸. En el cálculo de R_0 es importante usar el rendimiento de cuantos de la emisión de lantánidos, y no el rendimiento de cuantos de todo el quelato, e incluir en el cálculo del solapamiento espectral (J) sólo aquellas transiciones que son dipolo eléctrico. Se ha mostrado que la emisión de europio a 617 nm, que se usa en aquí para la transferencia de energía, es un dipolo eléctrico "forzado"⁹ y por tanto puede aplicarse la teoría de transferencia de energía de Förster. La emisión de europio a 596 nm no puede acoplarse a un aceptor porque es una transición de dipolo magnético y por tanto no está incluida en el cálculo de solapamiento espectral¹⁰.

Puede medirse la emisión sensibilizada del aceptor sin interferencia significativa de ninguna emisión de donante o fluorescencia directa del aceptor. A 668 nm, el europio es casi silencioso (emisión de europio a 668 nm es 125 veces inferior que a su máximo de 617 nm) y usando excitación por pulsos y supresión del detector durante 90 ms, la fluorescencia directa del sensibilizador de carboestirilo en el complejo del donante y la fluorescencia directa del CY-5 se eliminan completamente, mientras que el europio permanece excitado y puede transferir energía¹¹.

Los resultados muestran un experimento de emisión sensibilizada de fondo oscuro. En este caso, a relación de donante respecto a cadenas de aceptor es aproximadamente 1:0,6; intencionadamente se añade menos aceptor que donante para mostrar la capacidad del sistema para analizar señales heterogéneas. La fracción media de transferencia

de energía en estos resultados es el 57%. La señal a 668 nm se produce a partir de emisión sensibilizada de CY-5, es decir, fluorescencia debida solamente a la transferencia de energía. Se calcula que señal/ruido a 668 nm es 94:1 (en la que el ruido es una pequeña cantidad de luminiscencia de europio), un factor de mejora del 50-100 en señal/ruido respecto a la señal de emisión sensibilizada de fluoresceína-rodamina, uno de los mejores pares donante-aceptor, unido al mismo 10-mero.

Los datos del tiempo de vida muestran que la señal con sólo donante es exponencial sencilla con un tiempo de vida de 2,52 ms. La señal de extinción del donante se ajusta extremadamente bien a un biexponente ($r^2 = 0,998$): $y = 63\% \exp(-t/0,22 \text{ ms}) + 37\% \exp(-t/2,40 \text{ ms})$. El componente de tiempo largo se corresponde con las especies con sólo donante. Que el componente de largo tiempo casi iguale el tiempo de vida con sólo donante es un control interno que muestra que la transferencia intermolecular de energía es como mucho el 5%. El componente de tiempo corto se produce a partir de transferencia intramolecular de energía en el complejo donante-aceptor hibridado y se corresponde con la extinción del 91% (1-0,2,2 ms/2,52 ms) y una distancia donante-aceptor de 46 Å. (Fluoresceína-rodamina en el mismo ADN con ligadores de 6 C da 22% de transferencia de energía'.) Una titulación con concentración de aceptores creciente aumenta la fracción del componente de tiempo corto, pero no cambia su tiempo de vida, como se espera. A un exceso de dos veces de cadena de aceptor permanece un componente del 10% correspondiente a señal con sólo donante, supuestamente debido a cadenas de donante sin hibridar.

Los resultados también muestran el tiempo de vida de la emisión sensibilizada. La señal del tiempo de vida de emisión sensibilizada se ajusta a una biexponencial ($r^2 = 0,999$): $y = 40\% \exp(-t/59 \mu\text{s}) + 60\% \exp(-t/0,25 \text{ ms})$. El componente de tiempo corto es debido a fluorescencia directa del aceptor y puede eliminarse suprimiendo el detector. El componente de 0,25 ms es debido a una transferencia de energía del 90% (1-0,25/2,52 ms), en excelentes concordancia con el componente de tiempo corto de la extinción del donante. Puede observarse un componente de tiempo muy pequeño ($\approx 1\%$) debido a fluorescencia directa del donante.

En resumen, la transferencia de energía de luminiscencia da resultados que concuerdan con una teoría de Förster que supone que se usan parámetros apropiados. Basado en la R_0 larga, la facilidad y reproducibilidad de las mediciones del tiempo de vida y la excelente señal respecto al fondo pueden medirse distancias significativamente mayores a 100 Å.

Bibliografía al pie de página en el ejemplo 2

(1) **Cantor y Schimmel**, (1980) *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman y Co., San Francisco, volumen 2; (2) Los lantánidos en la transferencia de energía se han usado en FRET potenciada por difusión (**Stryer**, L., **Thomas**, D. D., **Meares**, C. F. (1982) en *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, L. J. Mullins, Ed., Annual Reviews, Inc., Palo Alto, CA, 11: 203-222). También se ha usado con alofocianina multicromófora (**Mathis**, (1993) *Clin- Chem*, 39:1953) y como sustituciones isomorfas en proteínas de unión a calcio (**Horrocks** y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* (1975), 72:4764; **Cronce y Horrocks**, (1992) *Biochem.* 31:7963); (3) **Stryer**, (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47:819-846; (4) La capacidad para medir transferencia de energía más allá de R_0 usando emisión sensibilizada se ha mostrado por Bruno y Horrocks. Usaron terbio como aceptor y tirosina como donante. Con una R_0 de 3 Å midieron hasta 12 Å. (**Bruno** y col., (1992) *Biochem.* 31:7016); (5) **Selvin y Hearst**, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (presentado), (6) **Cardullo** y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:8780; (7) **Clegg** y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2994; (8) El rendimiento de cuantos exacto es difícil de determinar, aunque la vida de largo tiempo y la falta de mecanismos de desactivación no radiativa hacen probablemente que el rendimiento de cuantos sea próximo a uno en D20. Esta suposición ha dado distancias que concuerdan con estudios de cristalografía por rayos X (véase referencia 4). En H_2O , el rendimiento de cuantos disminuye porque hay 1,3 moléculas de agua en la esfera de coordinación primaria del lantánido en el quelato (**Horrocks** y **Sudnick**, (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101:334); (9) **Bunzli**, J.-C.G. (1989) en *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences, Theory and Practice Luminescent Probes*; Bunzli, J.-C.G. & Choppin, G.R. Ed., Elsevier, Nueva York, páginas 219-293; (10) **Dexter**, (1953) *J. Chem. Phys.* 21: 836; (11) Morrison ha usado integración controlada para aumentar la señal respecto al fondo de la emisión sensibilizada con colorantes orgánicos. **Morrison**, (1988) *Anal. Biochem.* 174:101; (12) **Bailey** y col., (1984) *Analyst* 109:1449; y (13) **Mujumdar** y col., (1993) *Bioconj. Chem.* 4:105.

Ejemplo 3

Transferencia de energía de quelato de terbio a fluoresceína

Este ejemplo empleó un quelato de terbio (terbio-ácido dietilenotriaminapentaacético acoplado a carboestirilo 124) que transfiere energía a fluoresceína. El donante y aceptor están separados por un oligonucleótido de dúplex de ADN 8-mero modificado con una amina primaria en el extremo 5'. El aceptor está unido al extremo 5' de un oligonucleótido complementario. La emisión sensibilizada se mide sin ruido a aproximadamente 520 nm. Además, hay solapamiento excelente entre la línea de emisión del donante de 492 nm y la absorbancia de fluoresceína, conduciendo a una gran R_0 . Usando una fuente de excitación por pulsos y monitorizando a 520 nm, cualquier señal sólo se produce de emisión sensibilizada. El oligonucleótido 8-mero se usa para separar rígidamente el donante y aceptor, y el complejo se sumerge en una disolución viscosa de sacarosa para eliminar interacciones intermoleculares, aunque la disolución de sacarosa generalmente no es necesaria cuando la concentración de oligonucleótido se mantiene por debajo de aproximadamente 0,25 μM . La relación de señal de emisión sensibilizada respecto al fondo a 520 nm es aproximadamente 400:1. El grado de transferencia de energía basado tanto en la extinción de la intensidad del donante como en el área de emisión

sensibilizada integrada es del 70%. Las mediciones del tiempo de vida del donante sin extinguir (1,5 ms) en ausencia de aceptor, y el tiempo de vida de la emisión sensibilizada en el complejo donante-aceptor (tiempo de vida 250 us), indican una extinción del 85%. La diferencia entre el 70 y el 85% es debida a la pequeña fracción de ADN marcado con donante sin hibridar que no puede transferir energía.

5

Ejemplo 4

Ensayo de actividad enzimática (proteolítica)

10 Se ha usado la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para estudiar la actividad enzimática, en la que la distancia entre dos puntos marcados cambia como una función de esta actividad. En general, si se ha usado FRET, también puede usarse LRET, frecuentemente con mejoras significativas. Por ejemplo, Matayoshi y col. (1990) Science 247:954-958, usaron FRET para medir actividad de la proteasa del VIH marcando un péptido de sustrato con un donante y aceptor sobre cualquier lado de un sitio de unión/corte de proteasa. Debido a la íntima
15 proximidad del donante y aceptor, la fluorescencia del donante en el péptido intacto se extinguió sumamente. Con la adición de una proteasa se escindió el péptido, el donante y aceptor difunden el uno del otro y la fluorescencia del donante aumentó aproximadamente cuarenta veces. La sensibilidad del ensayo se determina en gran parte por el grado de extinción del donante en el péptido intacto. La falta de extinción al 100% produce fluorescencia de fondo incluso en ausencia de actividad proteolítica. Los autores observan que usaron un donante con un tiempo de vida relativamente
20 largo (decenas de nanosegundos) porque esto ayuda a aumentar la extinción del donante del péptido intacto. (La razón es que el péptido es flexible y un tiempo de vida largo permite que el tiempo del péptido tiempo se flexibilice tal que el donante y aceptor se acerquen, dando como resultado la extinción del donante.)

La sustitución de un donante fluorescente habitual con un quelato de lantánido proporciona ruido significativamente reducido y, por tanto, mejor sensibilidad. El quelato de lantánido tiene un tiempo de vida que es $>10^5$ veces más largo que el fluoróforo orgánico, que conduce a mayor extinción del donante debido a la flexibilidad del péptido. Además, puede discriminarse cualquier luminiscencia residual del donante usando excitación por pulsos y desconectando el detector durante alguna fracción de un milisegundo después del pulso. Si el donante se enfría, por ejemplo, el
25 90% en el péptido intacto, el 10% restante de luminiscencia tendrá un tiempo de vida 1/10 del quelato sin extinguir, o aproximadamente 100 us. Suprimiendo el detector durante unos pocos cientos de microsegundos se evita que esta luminiscencia residual del donante alcance el detector, mientras que la luminiscencia sin extinguir que se produce después de la proteólisis, que tiene aproximadamente un tiempo de vida de milisegundos, se ve relativamente poco afectada por la supresión. Finalmente, la excepcional eficiencia de transferencia de energía de los quelatos de lantánidos respecto a aceptores permite que los puntos de unión del donante y aceptor se sitúen lo más apartados posibles
30 sobre el péptido de lo que es posible con colorantes habituales. Esto es una consideración importante cuando el sitio de unión de la enzima es grande.

Ejemplo 5

Detección de genes y secuencias de ADN

Se ha usado FRET para detectar secuencias de ADN específicas, Morrison y col. (1989) Analytical Biochemistry 183: 231-244, y Lee y col. (1993) Nucleic Acids Research 21:3761-3766. La ventaja principal de usar FRET en esta aplicación es que la técnica es potencialmente sensible (es decir, puede detectar uno o unas pocas secuencias de ADN
45 “diana”) y puede hacerse en un formato homogéneo. La misma técnica descrita por Lee y col. es ahora un producto comercialmente disponible de Applied Biosystems conocido como “Taq-Man”. En esta aplicación, una sonda de ADN complementaria a la secuencia de ADN diana se hace con donante y aceptor unido. Si la sonda está intacta y es de una única cadena, el donante se extingue sumamente porque el aceptor está en íntima proximidad. Si la sonda hibrida al ADN diana, la sonda se degrada por una endo o exonucleasa específica. Entonces, el donante es libre para difundir
50 de la molécula de aceptor, y aumenta la fluorescencia del donante. Si no hay ADN diana, no se produce degradación específica y no se produce aumento específico en la fluorescencia del donante.

Este sistema también puede aprovecharse de amplificación: hay muchas moléculas de ADN sonda y cada vez una una, la sonda en el producto de cadena doble se hidroliza por la nucleasa y aumenta la fluorescencia. Tan pronto
55 como una sonda se degrada, otra molécula de sonda puede unir y la enzima repite el procedimiento. Por tanto, para sólo una sonda, la fluorescencia puede generarse de muchas moléculas de sondas. Una variedad de exonucleasas y endonucleasas son compatibles con la amplificación; por ejemplo, Applied Biosystems utiliza polimerasa para marcar, que tiene una actividad exonucleasa en 5'. Si la sonda comprende ARN, puede usar RNAasaH para aprovecharse de amplificación.

60

En cualquiera de estos sistemas basados en FRET para la detección de ADN, la sustitución del donante del colorante orgánico con un quelato de lantánido mejora el ensayo. El grado de extinción del donante en la sonda de cadena sencilla intacta se considerablemente mayor debido al tiempo de vida largo del lantánido y transferencia de energía eficiente. Cualquier luminiscencia residual del donante puede discriminarse con la supresión del tiempo. El resultado es ruido significativamente reducido (exactamente análogo al experimento de la proteasa explicado brevemente
65 anteriormente).

Ejemplo 6

Colorantes confeccionados al tiempo de vida

Como se trata anteriormente, los lantánidos pueden usarse como marcadores luminiscentes en microscopía y detección en general. Usando excitación con pulsos y detección retardada en el tiempo, el tiempo de vida largo del estado excitado del lantánido (milisegundos) permite aislar la señal de fluorescencia de fondo, que tiende a ser de duración de nanosegundos. Sin embargo, el largo tiempo de vida tiene el inconveniente de que la señal de intensidad por molécula es necesariamente débil: una molécula con un tiempo de vida del estado excitado de 1 ms puede emitir como mucho 1.000 fotones/s. Esto es particularmente significativo a altas intensidad de iluminación, en las que las moléculas de baja emisión pueden saturarse. A baja intensidad de iluminación, el largo tiempo de vida no es perjudicial porque ningún lantánido está siendo excitado a una velocidad inferior a la inversa del tiempo de vida. Idealmente, uno tendría una marca de luminiscencia en la que el tiempo de vida puede confeccionarse al tiempo de vida de la escala de tiempo óptima suficiente para que el ruido pueda disminuir, tan suficiente no se comprometa significativamente la intensidad de señal. Debido a que el ruido tiende a tener un tiempo de vida de nanosegundos, una sonda con, por ejemplo, un tiempo de vida de microsegundos todavía tendría un tiempo de vida mil veces más largo, permitiendo la discriminación en función del tiempo de la señal, pero potencialmente podría emitir 1.000 veces más fotones/s que el lantánido de milisegundos. Tales colorantes confeccionados al tiempo de vida puede hacerse utilizando transferencia de energía de luminiscencia entre un quelato de lantánido (como donante) y un aceptor fluorescente. La señal será la emisión del aceptor debido a la transferencia de energía. El tiempo de vida de esta emisión (τ) será igual al tiempo de vida del donante extinguido y será:

$$\tau = \tau_0 (1-E) \quad (1)$$

en el que τ_0 es el tiempo de vida del quelato de lantánido en ausencia de aceptor y E es la fracción de energía transferida (también llamada la eficiencia de energía transferida). La distancia entre el donante y aceptor (R) para conseguir una τ dada puede calcularse fácilmente usando la fórmula habitual para FRET, Cantor y col. (1980) Biophysical Chemistry, WH Freeman y Co, SF, una fórmula que se ha mostrado que puede aplicarse a LRET (Selvin y col., (1994) PNAS USA 91:10024-10028; Selvin y col. J. Amer. Chem. Soc. 116:6029-6030; Selvin y col. (1994) Methods in Enzymology, K Sauer, ed., Academic Press, Orlando):

$$E = 1 / [1 + (R/R_0)^6] \quad (2)$$

en la que R_0 puede calcularse de las propiedades espectrales del donante y aceptor. Combinando las ecuaciones 1 y 2 da el tiempo de vida como una función de la distancia entre donante y aceptor:

$$\tau = \tau_0 / [1 + (R/R_0)^6] \quad (3)$$

Si τ_0 es 1,5 ms, entonces con 90% de transferencia de energía la emisión sensibilizada decaerá con un tiempo de vida de 150 us. Con 99% de transferencia de energía, el tiempo de vida es 15 us. Si se desea una marca luminiscente con un tiempo de vida de 15 us, entonces el donante y aceptor debe colocarse tal que se produzca ese 99% de transferencia de energía. Esto se corresponde con una distancia de $0,465 \times R_0$. Para quelato de Tb como donante y tetrametilrodamina como aceptor (Selvin, y col. 1995, antes), en el que $R_0 = 60 \text{ \AA}$, esto se corresponde con $28 \text{ \AA}$. Puede conseguirse una sonda con un tiempo de vida de 1,5 us separando el donante y aceptor $0,316 R_0$ durante el 99,9% de transferencia de energía, o $19 \text{ \AA}$ para quelato de Tb y tetrametilrodamina.

Obsérvese que los colorantes confeccionados a tiempo de vida pueden hacerse para emitir a cualquier color diferente. Es posible cualquier aceptor que pueda tomar energía del quelato de lantánido luminiscente. La absorción del aceptor no necesita solapar con la línea de emisión principal del lantánido, el solapamiento con líneas menos intensas todavía pueda dar transferencia de energía muy eficiente siempre y cuando el aceptor se coloque suficientemente próximo. Un par donante/aceptor con una R_0 de sólo $30 \text{ \AA}$ todavía tendrá 99,9% de transferencia de energía a una distancia de $9,5 \text{ \AA}$. Además, obsérvese que puede producirse transferencia de energía eficiente aunque el donante lantánido tenga un rendimiento de cuantos para emisión relativamente pobre. Aunque los rendimientos de cuantos de Tb y Eu tienden a ser realmente altos en el quelato apropiado, otros lantánidos y elementos de transición con rendimientos de cuantos insignificativamente menores, tales como Pr, Nd, Sm, Dy, Ho, Er, Tm y Ru, Os, y Sm, también llegan a ser donantes útiles. Finalmente obsérvese que, debido a la eficiencia de transferencia de energía, casi cualquier protón que hubiera sido emitido del lantánido en general será alto (>90%), ahora es emitido por el aceptor, pero en un periodo de tiempo más corto. La única pérdida significativa de fotones se produce del rendimiento distinto de la unidad de cuantos del aceptor. Esto puede minimizarse eligiendo aceptores con alto rendimiento de cuantos.

Puede usarse una amplia variedad de diferentes moléculas ligadoras para crear estos colorantes confeccionados a tiempo de vida. Generalmente, los ligadores objeto proporcionan distancias de separación de aproximadamente 4 a 60, preferentemente de aproximadamente 9 a aproximadamente $30 \text{ \AA}$. La composición del ligador se selecciona basada en las necesidades de la aplicación, por ejemplo pueden usarse ligadores poliméricos hidrófobos para proporcionar colorantes permeables de membrana. Los péptidos se sintetizan fácilmente a longitudes útiles y sus extremos de N y C

pueden usarse para unir el donante y aceptor. Mediante la introducción de aminofenilalanina interna (o una lisina) se genera un isotiocianato reactivo para unir el complejo a una macromolécula biológica (u otra). Los péptidos también tienen la ventaja de que las propiedades del péptido pueden optimizarse para una aplicación particular; por ejemplo, poliprolina es muy rígida e hidrófoba; polilisina es hidrófila y carga sumamente positiva; mientras que poliglutamato o poliaspartato son hidrófilos y cargados negativamente. Otros ligadores incluyen polímeros tales como polisacáridos, que tienen excelente solubilidad y reactividad, poliimidaz y ácidos nucleicos. Los polímeros pueden derivatizarse para proporcionar sitios de unión mejorados, por ejemplo una amina primaria puede insertarse en una cadena de ácido nucleico y convertirse en un grupo isotiocianato para unirse a macromoléculas.

Bibliografía citada en la descripción

Esta lista de bibliografía citada por el solicitante sólo es para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto mucho cuidado en recabar la bibliografía, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP niega cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4637988 A [0004]
- US 5512493 A [0004]
- US 4837169 A [0004]

Bibliografía que no es de patentes citada en la descripción

- BAILEY y col. *Analyst*, 1984, vol. 109, 1449-1450 [0005] [0025]
- DIAMANDIS. *Analyst*, 1992, vol. 117, 1879-1884 [0005]
- CANFI y col. *Analyst*, 1989, vol. 114, 1405-1406 [0005]
- ANDO y col. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1102, 186-194 [0005]
- GEORGES; GHAZARIAN. *Analytica Chimica Acta*, 1993, vol. 276, 401-409 [0005]
- MATHIS y col. *Clin. Chem*, 1993, vol. 39, 1953 [0005]
- DESAI y col. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, 11032 [0005]
- SAAVEDRA; PICOZZA. *Analyst*, 1989, vol. 114, 835-838 [0005]
- BRENNENDORFF y col. *Proceedings, 4th Intl Conf on X-ray Microscopy, Chemogolovoka, Moscow District, Rusia*, 1993 [0005]
- CLARK y col. *Biochemistry*, 1993, vol. 210, 1-6 [0005]
- Fluorescence Resonance Energy Transfer. SELVIN. *Biochemical Spectroscopy, a volume of Methods in Enzymology. Academic Press*, 1994 [0006]
- CANTOR; SCHIMMEL. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman y col., 1980 [0071]
- CLEGG. *Methods Enzymol.*, 1992, vol. 211, 353-388 [0071]
- SELVIN. *Methods Enzymol.* 1994, vol. 246 [0071]
- COKER y col. *Resonance Energy Transfer*. VCH Publishers, Inc, 1994 [0071]
- STRYER y col. *Annu. Rev. of Biophys. and Bioengin.*, 1982, vol. 11, 203-222 [0071]
- BRUNO y col. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 7016-7026 [0071]
- CRONCE; HORROCKS. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 7963-7969 [0071]
- HORROCKS y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, vol. 72, 4764-4768 [0071]
- MATHIS. *Clin. Chem.*, 1993, vol. 39, 1953-1959 [0071]
- SELVIN y col. *JACS*. 1994 [0071]

ES 2 290 953 T3

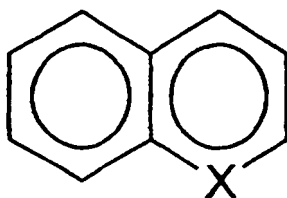
- **CLEGG** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 1993, vol. 90, 2994-2998 [0071]
- **OSER** y col. *Anal. Biochemistry*, 1990, vol. 191, 295-301 [0071]
- 5 • **ABUSALEH; MEARES**. *Photochem. & Photobiol.*, 1984, vol. 39, 763-769 [0071]
- **KIRK** y col. *J. Phys. Chem.*, 1993, vol. 97, 10326-10340 [0071]
- **HORROCKS** y col. *JACS*, 1977, vol. 99, 2378-2380 [0071]
- 10 • **STRYEZ**. *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, vol. 47, 819-46 [0071]
- **COOPER; HAGERMAN**. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, 9261-9268 [0071]
- 15 • **DEXTER**. *J. Chem. Phys.*, 1953, vol. 21, 836-850 [0071]
- **BUNZLI**. *Luminescent Probes*. Elsevier, 1989, 219-293 [0071]
- **CARNALL** y col. *J. Chem. Phys.*, 1968, vol. 49, 4412-4423 [0071]
- 20 • **GORLLER-WALRAND** y col. *J. Phys. Chem.*, 1991, vol. 95, 3099-3106 [0071]
- **DALE** y col. *Biophys. J.*, 1979, vol. 26, 161-194 [0071]
- 25 • **HORROCKS; SUDNICK**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, vol. 101, 334-350 [0071]
- **ALPHA** y col. *Photochem. and Photobiol.*, 1990, vol. 52, 299-306 [0071]
- **ELBANOWSKI** y col. *Monat. Chem.*, 1989, vol. 120, 699-703 [0071]
- 30 • **BERNER** y col. *Biochem. & Biophys. Res. Commun.*, 1975, vol. 66, 763-768 [0071]
- **WAGGONER**. *Methods Enzymol.* 1994, vol. 246 [0071]
- 35 • **CANTOR; SCHIMMEL**. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Co, 1980, vol. 2 [0082]
- **STRYER, L.; THOMAS, D. D.; MEARES, C. F.** en Annual Review of Biophysics and Bioengineering. Annual Reviews, Inc, 1982, vol. 11, 203-222 [0082]
- 40 • **MATHIS**. *Clin- Chem*, 1993, vol. 39, 1953 [0082]
- **HORROCKS** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 1975, vol. 72, 4764 [0082]
- **CRONCE; HORROCKS**. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 7963 [0082]
- 45 • **STRYER**. *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, vol. 47, 819-846 [0082]
- **BRUNO** y col. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 7016 [0082]
- 50 • **SELVIN; HEARST**. *Proc. Natl. Acad. Sci, EE.UU.*, 1994 [0082]
- **CARDULLO** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 1988, vol. 85, 8780 [0082]
- **CLEGG** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU*, 1993, vol. 90, 2994 [0082]
- 55 • **HORROCKS; SUDNICK**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, vol. 101, 334 [0082]
- In Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences. **BUNZLI, J.-C.G.** Theory and Practice Luminescent Probes; Bunzli. Elsevier, 1989, 219-293 [0082]
- 60 • **DEXTER**. *J. Chem. Phys.*, 1953, vol. 21, 836 [0082]
- **MORRISON**. *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 174, 101 [0082]
- 65 • **BAILEY** y col. *Analyst*, 1984, vol. 109, 1449 [0082]
- **MUJUMDAR** y col. *Bioconj. Chem.*, 1993, vol. 4, 105 [0082]

ES 2 290 953 T3

- **MATAYOSHI** y col. *Science*, 1990, vol. 247, 954-958 [0084]
- **MORRISON** y col. *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 183, 231-244 [0086]
- 5 • **LEE** y col. *Nucleic Acids Research*, vol. 21, 3761-3766 [0086]
- **CANTOR** y col. *Biophysical Chemistry*. WH Freeman and Co, 1980 [0089]
- 10 • **SELVIN** y col. *PNAS USA*, 1994, vol. 91, 10024-10028 [0089]
- **SELVIN** y col. *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 116, 6029-6030 [0089]
- **SELVIN** y col. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1994 [0089]

REIVINDICACIONES

1. Un quelato de lantánido que comprende un quelante de lantánido covalentemente unido a un sensibilizador, en el que dicho quelante comprende una pluralidad de grupos carboxilato o fosfonato, en el que dicho quelato puede unir un lantánido con una constante de equilibrio de al menos 10^6 M^{-1} , en el que un complejo de dicho quelato y dicho lantánido puede mejorar la luminiscencia del lantánido, y en el que dicho sensibilizador está representado por la fórmula general:



en la que X comprende un átomo del grupo 5 ó 6 del sistema periódico, en el que un primer átomo de carbono en la posición 2-8 de dicho sensibilizador que es el átomo de carbono en la posición 2 ó 4 está sustituido con un átomo de oxígeno mediante un doble enlace covalente, y un segundo átomo de carbono sencillo en la posición 2-8 de dicho sensibilizador que es el átomo de carbono en la posición 7 está sustituido con un grupo de enlace a través del que dicho sensibilizador está covalentemente unido a dicho quelante,

en el que un complejo de dicho quelato y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^6 M^{-1} puede ser de intensidad de luminiscencia al menos superior al 500% de la de dicho lantánido.

2. Un quelato según la reivindicación 1, en el que dicho grupo de enlace está constituido esencialmente por un grupo amina o carboxilo.

3. Un quelato según la reivindicación 1 ó 2, en el que un tercer átomo de carbono en la posición 2-8 de dicho sensibilizador, diferente de dicho primer y segundo átomo de carbono en la posición 2-8, está sustituido.

4. Un quelato según la reivindicación 3, en el que dicho tercer átomo de carbono en la posición 2-8 es el carbono en la posición 4 y está sustituido con un hidrocarburo o hidrocarburo sustituido con halógeno.

5. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho sensibilizador comprende una 2- o 4-quinolona o una 2- o 4-coumarina.

6. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho sensibilizador comprende carboestirilo 124 (7-amino-4-metil-2-quinolona), coumarina 120 (7-amino-4-metil-2-coumarina) o coumarina 124 (7-amino-4-(trifluorometil)-2-coumarina).

7. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que un complejo de dicho quelato y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} puede ser de intensidad de luminiscencia al menos superior al 5.000% de la de dicho lantánido.

8. Un quelato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una primera disolución que comprende complejos de dicho quelato y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} puede ser de intensidad de luminiscencia al menos superior al 5.000% de la de una segunda disolución que comprende dicho lantánido, en el que dicha primera y segunda disolución son idénticas, excepto por la presencia de dicho quelato en dicha primera disolución y ausencia de dicho quelato en dicha segunda disolución.

9. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho lantánido es terbio o europio.

10. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho quelante puede unir dicho lantánido con una constante de equilibrio de al menos 10^{10} M^{-1} .

11. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho quelante comprende EDTA, DTPA, DOTA, NTA o HDTA o un análogo de fosfonato correspondiente a DTPP, EDTP, HDTP o NTP.

12. Un quelato según la reivindicación 11, en el que dicho quelante comprende DTPA.

13. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho quelato está covalentemente unido a una macromolécula.

14. Un quelato según una de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mejora de la luminiscencia del lantánido es de intensidad superior a al menos el 50.000%.

15. Una marca molecular que comprende un quelato según una de las reivindicaciones precedentes unida covalentemente a un reactivo selectivo por analito.

16. Un procedimiento para mejorar la luminiscencia de un lantánido, comprendiendo dicho procedimiento: formar una mezcla de un quelato de lantánido según una de las reivindicaciones precedentes y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} , mediante el que se forma un complejo de quelato de lantánido-lantánido luminiscente.

17. Un procedimiento para detectar un analito que puede estar presente en una parte de una muestra mediante luminiscencia, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

poner en contacto una parte de muestra con un complejo luminiscente de un quelato de lantánido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} , en el que dicho quelato está covalentemente unido a un reactivo que puede unir selectivamente dicho analito;

incubar dicha parte de muestra en condiciones en las que dicho reactivo pueda unir selectivamente dicho analito;

exponer dicha parte de muestra a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en dicho quelato;

detectar una emisión de luz de dicha parte de muestra a una segunda longitud de onda, en el que dicha segunda longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en dicho quelato;

en el que la detección de dicha emisión de luz está relacionada con la presencia de dicha parte de muestra de analito.

18. Un procedimiento para detectar una distancia entre una primera posición y una segunda posición en una parte de una muestra mediante transferencia de energía por resonancia usando un donante de quelato de lantánido luminiscente y un aceptor orgánico de energía por resonancia, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

exponer una parte de muestra que comprende dicho donante localizado en dicha primera posición y dicho aceptor localizado en dicha segunda posición a luz a una primera longitud de onda que puede inducir una primera transición electrónica en dicho donante, en el que dicho donante comprende un complejo de un quelato de lantánido según una de las reivindicaciones precedentes y un lantánido que puede unir dicho quelato con una constante de equilibrio de al menos 10^8 M^{-1} , y en el que el solapamiento espectral de la emisión del donante y la absorción del aceptor es suficiente para permitir la transferencia de energía de dicho donante a dicho aceptor como se mide mediante extinción detectable de intensidad de luminiscencia del donante o tiempo de vida o aumento detectable en la intensidad de luminiscencia del aceptor o tiempo de vida;

detectar al menos uno de:

la intensidad de una primera emisión de luz de dicha parte de muestra a una segunda longitud de onda, en el que dicha segunda longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una segunda transición electrónica en dicho donante, en el que la intensidad de dicha primera emisión de luz está relacionada inversamente con la distancia entre dicha primera y segunda posición de dicha parte de muestra; y

la intensidad de una segunda emisión de luz de dicha parte de muestra a una tercera longitud de onda, en el que dicha tercera longitud de onda es más larga que dicha primera longitud de onda y resulta de una transición electrónica en dicho aceptor, en el que la intensidad de dicha segunda emisión de luz está relacionada con la distancia entre dicha primera y segunda posición de dicha parte de muestra.

19. Un procedimiento según la reivindicación 18 usado para monitorizar el estado de una reacción en cadena de la polimerasa, en el que

dicha parte de muestra comprende una cadena de ácido nucleico diana que comprende una primera parte de cadena y una cadena de ácido nucleico de diagnóstico que comprende un primer átomo covalentemente unido a dicho donante y un segundo átomo covalentemente unido a dicho aceptor, estando dicho primer y segundo átomo separado por una segunda parte de cadena, en el que dicha primera y segunda parte de cadena son suficientemente complementarias para hibridarse en condiciones de apareamiento; dicha segunda parte de cadena es de longitud suficiente para proporcionar una diferencia detectable en la transferencia de energía total de dicho donante a dicho aceptor cuando dicha primera y segunda parte de cadena se hibridan como se compara con la transferencia de energía total de dicho donante a dicho aceptor cuando dicha primera y segunda parte de cadena no están hibridadas,

en el que dicha diferencia detectable se mide como al menos un aumento de una extinción detectable de luminiscencia del donante o aumento detectable en la luminiscencia del aceptor, y dicha distancia entre dicho primer y segundo átomo indica si dichas cadenas de ácido nucleico se han hibridado.