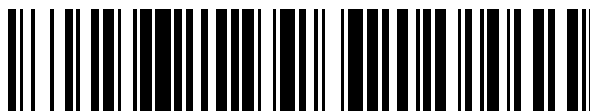


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 762**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C07F 5/00 (2006.01)

C09B 57/00 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09768868 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **16.03.2011 EP 2294159**

54 Título: **Complejos colorantes de transferencia de energía controlados por la distancia**

30 Prioridad:

26.06.2008 DE 102008029936

18.07.2008 DE 102008033871

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

05.02.2013

73 Titular/es:

**INBIO PROF. JÜRGEN BÜDDEFELD DR. PETER
KLAUTH PROF. MANFRED RIETZ GBR (100.0%)
Ringstrasse 3
47239 Duisburg, DE**

72 Inventor/es:

**KLAUTH, PETER y
RIETZ, MANFRED**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 394 762 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

Complejos colorantes de transferencia de energía controlados por la distancia

La presente invención se refiere al uso de al menos dos fluoróforos distintos entre sí para la formación de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (par FRET) según el preámbulo de la reivindicación 1.

- 5 Además, la presente invención se refiere a un complejo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (complejo FRET), que presenta al menos un primer fluoróforo (A) como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) como fluoróforo aceptor así como un resto orgánico especial, que se une a los fluoróforos (A) y (B).

10 Además, la presente invención se refiere al uso según la invención del complejo FRET según la invención para distintos fines, particularmente para la detección de un acontecimiento en una muestra o para la interacción con una molécula diana o una estructura diana y/o para la detección o identificación o para la verificación de una molécula diana o una estructura diana.

Además, la presente invención se refiere al uso del complejo FRET según la invención para otros fines de aplicación, por ejemplo como colorante, particularmente colorante de fluorescencia, o como respectivamente en biosensores o como respectivamente en (bio)sondas, particularmente sondas FRET.

- 15 Ciertos complejos organometálicos de las tierras raras, particularmente sus β -dicetonatos y sus carboxilatos aromáticos, han encontrado ya aplicaciones en distintos campos, en los que es ventajoso su mecanismo de luminiscencia único (denominado "efecto antena" o en inglés "*antenna effect*"), por ejemplo en biosensores.

20 La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) representa un procedimiento físico conocido en el estado de la técnica, en el que generalmente puede transmitirse energía de un colorante de fluorescencia excitado que se denomina de manera sinónima también donador o fluoróforo donador, a un segundo colorante de fluorescencia que se denomina de manera sinónima también aceptor o fluoróforo aceptor o inhibidor. La intensidad de la transferencia de energía o de FRET depende, a este respecto, particularmente de la distancia de los dos fluoróforos uno con respecto a otro. El principio básico de FRET puede observarse en que entre dos colorantes que están capacitados para la fluorescencia puede transmitirse la energía de un fluoróforo donador excitado a un fluoróforo aceptor, no realizándose esta transmisión de energía en forma de fluorescencia, sino sin radiación, por ejemplo a través de interacciones dipolo/dipolo, al aceptor fluorescente.

30 Para facilitar una transmisión de energía sin radiación de este tipo al aceptor por medio de FRET, deben cumplirse diversos criterios. Por un lado, el espectro de emisión del donador debería solaparse con el espectro de absorción del aceptor. Por otro lado, el donador por una parte y el aceptor por otra parte deberían presentar niveles de vibración electrónicos paralelos, y finalmente el donador y el aceptor deberían estar distanciados entre sí sólo uno o algunos nanómetros, dado que la intensidad de la señal de FRET disminuye con la sexta potencia de la distancia de los dos fluoróforos uno con respecto a otro. Dado que la intensidad de FRET depende, entre otras cosas, de la separación de los dos fluoróforos, se ha establecido el uso de FRET en cierto modo como medida nanométrica óptica particularmente en bioquímica y biología celular, pudiéndose detectar en este contexto particularmente una prueba de interacciones de proteína/proteína, proteína/ácido nucleico y ácido nucleico/ácido nucleico así como modificaciones de la estructura espaciales, tales como modificaciones de la conformación de biomoléculas. En este contexto puede realizarse basándose en el fenómeno de FRET también una verificación de una interacción, homo y heterodimerización u oligomerización de proteínas. También es posible la medición de modificaciones de la conformación de proteínas cuando el fluoróforo donador y aceptor están acoplados a la misma molécula. Igualmente se usa el principio de FRET en biología molecular en la cuantificación de ácidos nucleicos con ayuda de PCR en tiempo real (*Realtime-Polymerase Chain Reaction*) mediante el uso de sondas especiales en la práctica.

45 En este contexto existe una posibilidad de uso de FRET para la cuantificación de ácidos nucleicos en el uso de las denominadas sondas LightCycler[®] que representan sondas de hidrólisis especiales, usándose como sondas para la cuantificación de productos de PCR distintos oligonucleótidos marcados respectivamente con un donador o aceptor que se unen uno al lado de otro a la secuencia diana de una molécula de ácido nucleico y con ello se llevan el donador y el aceptor a una proximidad suficiente para la FRET.

50 Otra posibilidad usada con frecuencia de FRET consisten en la aplicación de las denominadas sondas TaqMan[®] que representan sondas de hidrólisis especiales, estando marcada la sonda en un extremo con un aceptor o inhibidor y en su otro extremo con un colorante de fluorescencia donador o indicador. La fluorescencia del fluoróforo donador se suprime con sondas de hidrólisis intactas por el inhibidor mediante transferencia de energía sin radiación (FRET). Durante un ciclo de PCR, la sonda híbrida con la cadena de ADN complementaria, permaneciendo suprimida inicialmente la fluorescencia del donador. La Taq-polimerasa suprime el extremo 5' de la sonda durante los ciclos de PCR. La fluorescencia del donador ya no se extingue ahora por el inhibidor y puede medirse.

55 Otra posibilidad de la cuantificación en tiempo real de productos de PCR con el uso de FRET ofrece el uso de las denominadas balizas moleculares como sondas. Las balizas moleculares son oligonucleótidos que están acoplados tanto con un donador como con un inhibidor o aceptor. Los nucleótidos en el extremo 5' de la sonda son complementarios a los nucleótidos en el extremo 3', de modo que puede formarse una estructura secundaria a modo

de bucle característica para balizas moleculares. En este estado denominado *Stem Loop* (horquilla), el donador no muestra ninguna fluorescencia mediante su baja distancia con respecto al aceptor. Mediante la adición de la región de bucle a una secuencia de ADN complementaria durante un ciclo de PCR se amplía la distancia entre el donador y el aceptor, de modo que puede observarse una fluorescencia de donador.

5 La estructura y el principio de funcionamiento de las balizas moleculares se describen detalladamente por Tyagi y Kramen (1996): "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" en *Nature Biotechnology* 14, 303-308. Igualmente son el objeto de la patente estadounidense 5.925.517, que se toma como referencia completamente por el presente documento para fines de revelación con respecto a la estructura y funcionamiento de balizas moleculares.

10 Como par fluoróforo/inhibidor se conoce el ácido 5'-(2-aminoetil)-aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS) en el extremo 5' y como inhibidor el ácido 4-(4'-dimetilamino)fenilazobenzoico (DABCYL) en el extremo 3'. Igualmente es adecuado también el uso de DABCYL en combinación con fluoresceína en el extremo 5' (G. Leone, von Schijndel H., van Gemen B., Kramen R. F. y Schön D. (1998) "Molecular Beacon Probes Combined with Amplification by NASBA Enable Homogeneous Real-time Detection of RNA" en: *Nucleic Acids Research* 26, 9, 2150-2155).

15 Dado que las balizas moleculares, debido a la extinción originada mediante FRET, en consecuencia no emiten o apenas emiten una radiación de fluorescencia u originan un desplazamiento espectral con el uso de dos fluoróforos y con ello alejan la señal de la zona de medición cuando la secuencia de muestra no se encuentra hibridada con la secuencia diana, han dado buen resultado las balizas moleculares en el pasado reciente especialmente como sondas en sistemas de verificación, en los que no es posible o no es deseable el lavado de sondas en exceso. Esto se aplica particularmente en la PCR en tiempo real o en la detección de ácidos nucleicos en células vivas (Liu X., Farmerie W., Schuster S., Tan W. (2000): "Molecular beacons for DNA Biosensors with a Micrometer to Submicrometer Dimension" en: *Analytical Biochemistry* 283, 56-63).

25 Precisamente en sistemas biológicos complejos, tales como las células vivas, ha resultado sin embargo la fluorescencia inespecífica por ejemplo de componentes celulares como fuente de errores sistemática esencial que reduce claramente en general el valor informativo y la especificidad de los propios procedimientos de verificación con las balizas moleculares conocidas o sondas FRET. Así muestran, por ejemplo, la hemoglobina o hidrocarburos aromáticos en la excitación con luz UV, una fluorescencia inespecífica que se hace notar negativamente como radiación de fondo. Por consiguiente, la verdadera señal de medición se solapa. Esta radiación de fondo se denomina también autofluorescencia del entorno de la muestra o del medio de la muestra.

30 En el contexto del procedimiento FRET, particularmente en cuanto a su aplicación en biología molecular, existe por consiguiente una gran necesidad de elevar la capacidad de rendimiento para las respectivas sondas FRET. A este respecto no sólo la elección concreta y coordinación de los colorantes usados proporciona un gran significado, sino también la formación de la sonda en vista de la separación espacial de los colorantes uno con respecto a otro. Entonces, tal como se mencionó anteriormente, el fenómeno de FRET tiene lugar sólo en separaciones muy pequeñas entre el donador y el aceptor y se reduce con la sexta potencia de la distancia de los colorantes o fluoróforos. Particularmente en vista de lo anterior no siempre ha dado buen resultado en el alcance total hasta ahora en el estado de la técnica proporcionar sondas eficaces, particularmente balizas moleculares. Entonces, las sondas del estado de la técnica no siempre presentan un espectro de emisión óptimo, particularmente en cuanto a la diferenciación del espectro de emisión en comparación con la autofluorescencia de una muestra de medición o de un medio de la muestra. Además, los tiempos de emisión no son con frecuencia óptimos en el sentido de que éstos por regla general disminuyen ya tras algunos nanosegundos tras realizar la excitación, de modo que en el contexto de una medición con resolución temporal debe realizarse el registro de la emisión de la sonda FRET simultáneamente con respecto a la señal de excitación, lo que es desfavorable con respecto al registro y a la evaluación de la señal. Además, no existe siempre un FRET óptimo en las sondas FRET conocidas en el estado de la técnica, de modo que no siempre es óptima la extinción del donador.

La patente alemana DE 102 59 677 B4 en la que se basa la propia parte solicitante se refiere a un procedimiento para la identificación y cuantificación de microorganismos en una muestra, en el que tras el aislamiento de los microorganismos y la transferencia de los microorganismos aislados a un recipiente para PCR se realiza una amplificación del ácido nucleico diana y se realiza una verificación del ácido nucleico diana por medio de una sonda especial con al menos dos sondas que forman un par FRET. La sonda FRET usada no emite una señal perceptible hasta la hibridación de la sonda con el nucleótido diana, que presenta una duración prolongada en comparación con la emisión de fluorescencia del entorno de la muestra, de modo que puede diferenciarse la señal de medición de la autofluorescencia del entorno de la muestra mediante una medición de la fluorescencia con resolución temporal. En este contexto, con respecto a la sonda FRET usada se coloca preferentemente en un par FRET especial basado en Euttaphen y Cy5. Una combinación de este tipo de colorantes de fluorescencia si bien presenta en comparación con el estado de la técnica una clara mejora con respecto al comportamiento de emisión, sin embargo las propiedades correspondientes a esto no son siempre óptimas. Particularmente, en el caso de las sondas descritas en la patente alemana se trata de un denominado ensayo de coloración que facilita información sólo en extensión limitada, particularmente con respecto a la separación de los correspondientes colorantes de fluorescencia uno con respecto a otro.

- 5 El documento US 5 118 349 A se refiere a fibras de seguridad y fibras textiles que presentan al menos un producto de marcación. El producto de marcación contiene quelatos de las tierras raras o sustratos a base de quelatos de las tierras raras, en el que el ion presente en los quelatos de las tierras raras se selecciona de dos tierras raras distintas entre sí. Una transferencia de energía que se realiza entre las dos tierras raras provoca una modificación de la longitud de onda de la fluorescencia de los quelatos, siempre que se expongan éstos a radiación ultravioleta, dependiendo la modificación de la temperatura del quelato. El producto de marcación se inserta en fibras o hilos por medio de un procedimiento de tinción, en el que las fibras o los hilos están descoloridos con radiación con luz solar o luz artificial y con la radiación UV pueden modificar su longitud de onda de fluorescencia dependiendo de la temperatura.
- 10 En vista de lo anterior, el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un complejo FRET que sea adecuado para las aplicaciones mencionadas anteriormente y particularmente que evite al menos parcialmente o sin embargo al menos atenúe los inconvenientes del estado de la técnica.
- 15 Particularmente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un complejo FRET que sea adecuado por ejemplo para procedimientos analíticos de biología molecular para la verificación cualitativa y cuantitativa de moléculas diana, tales como moléculas de ácido nucleico, por ejemplo en el contexto de una PCR en tiempo real, así como para la verificación de modificaciones de estructura por ejemplo en proteínas. A este respecto debe proporcionarse particularmente un complejo FRET con un comportamiento de emisión mejorado, particularmente con respecto a la duración de emisión y la anchura de las bandas de emisión, debiéndose facilitar particularmente una mejor diferenciabilidad o discriminación en comparación con la autofluorescencia de una muestra. Además debe
- 20 facilitarse información cualitativa mejorada basándose en el complejo FRET según la invención con respecto a la separación de los complejos de colorante y por consiguiente con respecto a la interacción con la molécula diana o la estructura diana.
- 25 Para resolver el planteamiento descrito anteriormente, la presente invención propone (según un primer aspecto de la presente invención) el uso de al menos dos fluoróforos distintos entre sí para la formación de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (par FRET) según la reivindicación 1. Otras configuraciones ventajosas del uso según la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes correspondientes a esto.
- Otro objeto de la presente invención (según un segundo aspecto de la presente invención) es el complejo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (complejo FRET) según la invención según la reivindicación 9.
- 30 Otro objeto de la presente invención (según un tercer aspecto de la presente invención) es el uso según la invención del complejo FRET según la invención para la detección de un acontecimiento en una muestra según la reivindicación 10.
- Por otra parte, otro objeto de la presente invención (según un cuarto aspecto de la presente invención) es el uso según la invención del complejo FRET según la invención para la interacción con una molécula diana o una estructura diana según la reivindicación 11.
- 35 Además es otro objeto de la presente invención (según un quinto aspecto de la presente invención) el uso según la invención del complejo FRET según la invención como colorante para fines de marcación o similares según la reivindicación 12.
- 40 Adicionalmente es otro objeto de la presente invención (según un sexto aspecto de la presente invención) el uso según la invención del complejo FRET según la invención en o como biosensores o sin embargo en o como (bio)sondas, particularmente sondas FRET, según la reivindicación 13.
- Se sobreentiende que las configuraciones, formas de realización, ventajas y similares que se mencionan a continuación sólo para un aspecto de la invención con el fin de evitar repeticiones, lógicamente son válidas correspondientemente también con respecto a los demás aspectos de la invención.
- 45 La parte solicitante ha descubierto ahora de manera sorprendente que el problema descrito anteriormente puede solucionarse debido a que se usa al menos dos fluoróforos especiales, distintos entre sí, tal como se definen a continuación, para la formación de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (denominado de manera sinónima también par FRET). El par FRET presenta a este respecto un primer fluoróforo (A) como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) como fluoróforo aceptor. El uso según la invención se caracteriza porque el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, están formados
- 50 respectivamente a base de un complejo organometálico de elementos de las tierras raras. A este respecto se seleccionan los fluoróforos (A) y (B) en el contexto de la presente invención de manera que éstos presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras.
- 55 El par FRET formado en el contexto del uso según la invención es adecuado particularmente para su uso en el contexto de procedimientos analíticos bioquímicos o de biología molecular, por ejemplo para la detección de moléculas dianas o estructuras dianas específicas, particularmente biomoléculas, tales como ADN, ARN, proteínas y similares, en una muestra y por consiguiente en cierto modo como sonda FRET, pudiendo presentar en este caso el

par FRET formado en el contexto del uso según la invención además secciones o componentes específicos que pueden interactuar con la molécula diana o la estructura diana. Además es adecuado el par FRET proporcionado en el contexto de la presente invención para el registro o la detección de modificaciones de conformación en moléculas, por ejemplo de proteínas o ácidos nucleicos. También pueden examinarse procesos de escisión y adición de biomoléculas con el par FRET proporcionado según la invención. Además es posible también un uso como colorante.

En el contexto de la presente invención se ha logrado a este respecto, mediante la elección específica de los fluoróforos (A) y (B) con elementos respectivamente distintos entre sí de las tierras raras así como de la configuración del sistema FRET adicional especial y que se describe aún a continuación, particularmente con respecto a la disposición espacial de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro, proporcionar un sistema eficaz o un complejo que sea adecuado en el contexto de un análisis FRET o estudio FRET en gran medida para su uso particularmente en el análisis de biología molecular o bioquímico para la detección o el descubrimiento así como para el análisis de modificaciones espaciales de moléculas diana o estructuras diana específicas.

A este respecto los pares FRET proporcionados en el contexto de la presente invención se caracterizan porque presentan un espectro de emisión definido con una banda de emisión muy estrecha, lo que conduce a una detectabilidad excelente, particularmente dado que el espectro de emisión de los pares FRET proporcionados según la invención se diferencia significativamente de la emisión de fluorescencia inespecífica de un entorno de la muestra y por consiguiente de la autofluorescencia, de modo que existe una discriminación excelente de la señal de medición deseada en comparación con la radiación de fondo inespecífica.

Esta propiedad de los pares FRET o sondas FRET proporcionados según la invención y por consiguiente en cierto modo de los complejos FRET que se describen aún a continuación se mejora aún más porque los pares FRET proporcionados según la invención presentan una duración de emisión muy larga, es decir los pares FRET o las sondas FRET proporcionados según la invención emiten, tras realizar la excitación mediante una señal de excitación correspondientemente adecuada, una señal de emisión temporalmente prolongada, lo que mejora además la detectabilidad. Así, la duración de la emisión de señal del par FRET proporcionado según la invención asciende a varios milisegundos, mientras que por ejemplo la fluorescencia parásita indeseada a base de una autofluorescencia del entorno de la muestra se atenúa ya en el intervalo de nanosegundos (por ejemplo aproximadamente 200 nanosegundos) tras la finalización de una señal de excitación. De esto resulta una mejora adicional de la diferenciabilidad o discriminación de la señal de medición por un lado, con respecto a la señal parásita por otro lado.

Otra ventaja decisiva del par FRET proporcionado según la invención puede observarse en que se trata según esto, debido a la elección específica de los fluoróforos (A) y (B), que presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras, de denominados ensayos de dos tinciones que pueden usarse para el análisis cualitativo y cuantitativo de interacciones o modificaciones de estructura y similares. Así, el sistema FRET proporcionado según la invención puede producir luminiscencia roja con el uso de complejos especiales de terbio y europio para los fluoróforos (A) y (B) con baja separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro y por consiguiente con transferencia de energía máxima, mientras que con separación grande de los fluoróforos existe una luminiscencia amarilla. En los estados intermedios (o sea con distancias medias de los fluoróforos), el par FRET proporcionado según la invención o la sonda FRET proporcionada según la invención produce luminiscencia en el intervalo de color de color naranja, y concretamente con una transición de color correspondiente del rojo al amarillo, según en cada caso la separación de los fluoróforos uno con respecto a otro. Esto es particularmente ventajoso también para el uso de los pares proporcionados según la invención como colorantes.

En vista de lo anterior, el par FRET proporcionado en el contexto de la presente invención o la sonda FRET y por consiguiente el sistema FRET o el complejo FRET según la invención es adecuado particularmente para su uso en el campo de la bioquímica o biología molecular y de la biología celular. Con respecto a esto, el par FRET proporcionado según la invención es adecuado particularmente para la verificación de interacciones de proteína/proteína, proteína/ácido nucleico y ácido nucleico/ácido nucleico así como modificaciones de conformación y procesos de escisión de o en biomoléculas, pudiéndose realizar debido a la configuración específica como ensayo de dos tinciones incluso un análisis cuantitativo de los acontecimientos respectivos. Particularmente, el sistema FRET proporcionado según la invención es adecuado en el contexto de la cuantificación de ácidos nucleicos, por ejemplo en el contexto de una PCR en tiempo real.

Por consiguiente es objeto de la presente invención (según un primer aspecto de la presente invención) el uso de al menos dos fluoróforos distintos entre sí para la formación de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (par FRET), en el que dentro del par FRET al menos un primer fluoróforo (A) sirve como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) sirve como fluoróforo aceptor. El uso según la invención se caracteriza porque el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, están configurados respectivamente a base de un complejo organometálico de elementos de las tierras raras, en el que los fluoróforos (A) y (B) presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras, seleccionados del grupo de europio y terbio. Adicionalmente, los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) están complejados respectivamente con al menos un ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos, siendo el ligando ácido picolínico, picolinato y/o sus derivados y presentando el ligando sustituyentes y/o grupos funcionales para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente de moléculas preferentemente orgánicas, seleccionándose los

sustituyentes y/o grupos funcionales del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo. Además, el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) están acoplados y/o unidos entre sí a través de un resto orgánico bivalente y/o divalente.

5 Por consiguiente, el principio básico de la presente invención puede observarse en que con respecto al par FRET se usa un primer fluoróforo (A) como donador que presenta un átomo central del grupo de las tierras raras. Además se usa según la invención un segundo fluoróforo (B) que comprende igualmente como átomo central un elemento de las tierras raras, tratándose según esto de un elemento distinto con respecto al primer fluoróforo (A). El uso dirigido de elementos de las tierras raras con respecto al primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B) con la condición de que en los respectivos fluoróforos se usan distintos elementos de este grupo, conduce de manera completamente sorprendente a las propiedades excelentes del par FRET proporcionado en el contexto del uso según la invención con respecto a sus propiedades de emisión, tales como bandas de emisión estrechas, duraciones de emisión o luminiscencia largas, modificación cuantitativa del espectro de emisión dependiendo de la distancia de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro en el contexto de un ensayo de dos tinciones y FRET excelente con baja separación de los fluoróforos uno con respecto a otro con inhibidores óptimos de la señal de donador.

15 En el contexto de la presente invención ha resultado especialmente ventajoso cuando el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B) se seleccionan de manera que con la influencia y/o acción y/o entrada de una energía de excitación se realiza una transferencia de energía desde el primer fluoróforo (A) hasta el segundo fluoróforo (B), realizándose particularmente la transferencia de energía desde el primer fluoróforo (A) hasta el segundo fluoróforo (B) al menos esencialmente sin radiación. Una transferencia de energía de este tipo existe particularmente con una baja separación de los fluoróforos uno con respecto a otro en el sentido de una FRET. Con separación creciente disminuye la FRET. En cuanto a la energía de excitación, puede usarse entonces correspondientemente a esto particularmente una radiación electromagnética con longitud de onda optimizada o ajustada con respecto al donador. Esto se conoce en sí por el experto.

25 A este respecto puede realizarse la transferencia de energía desde el primer fluoróforo (A) hasta el segundo fluoróforo (B) por ejemplo por medio de interacciones dipolo/dipolo. La existencia de una transferencia de energía puede detectarse particularmente por una reducción de la fluorescencia del fluoróforo (A) o del fluoróforo de donador y/o por un aumento de la fluorescencia del segundo fluoróforo (B) o del fluoróforo aceptor.

Como unidades de detección o medición se tienen en consideración de manera no limitativa microscopios de fluorescencia, fluorímetros o similares.

30 En cuanto a la transferencia de energía desde el primer fluoróforo (A) hasta el segundo fluoróforo (B), puede depender ésta entonces de la separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro. En este contexto, la transferencia de energía, particularmente la intensidad y/o la eficacia de la transferencia de energía, puede aumentar con la reducción de la separación espacial de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro. Con otras palabras, por consiguiente, una ampliación de la separación del primer fluoróforo (A) al segundo fluoróforo (B) conduce a una reducción de la transferencia de energía, que va acompañada de una modificación del espectro de emisión. Una modificación de este tipo de la separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro puede realizarse por ejemplo en el contexto de una interrelación o interacción o adición del par FRET a una molécula diana o a una estructura diana, provocando, particularmente ampliando esta interrelación o interacción o adición a la estructura diana la modificación de la distancia, particularmente la ampliación de la distancia, de los dos fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro. El respectivo acontecimiento puede distinguirse entonces en una modificación del espectro de emisión, aumentando la señal de donador y/o disminuyendo la señal de aceptor con separación creciente. Con la reducción de la distancia disminuye la señal de donador y aumenta la señal de aceptor correspondientemente mediante el efecto de extinción del aceptor.

45 En este contexto, por consiguiente, la transferencia de energía desde el primer fluoróforo (A) hasta el segundo fluoróforo (B) puede conducir a una reducción de la fluorescencia del primer fluoróforo (A) y a un aumento de la fluorescencia del segundo fluoróforo (B).

Según la invención es ventajoso cuando el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) presentan niveles de vibración electrónicos al menos esencialmente paralelos, lo que es particularmente importante entonces cuando el fluoróforo (A) por un lado y el fluoróforo (B) por otro lado están fijados (por ejemplo a la misma proteína). De esta manera, con la modificación de la posición de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro en el contexto de una interacción con una proteína o de una modificación de la conformación de la propia proteína, una modificación del sistema FRET puede dar información sobre la modificación de los niveles de vibración y con ello de la posición de los dos fluoróforos uno con respecto a otro.

55 Tal como se mencionó anteriormente, para facilitar una transferencia de energía, particularmente una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) deberían estar separados sólo un poco entre sí, debiendo ascender la separación generalmente a algunos nanómetros. Entonces la intensidad de la señal FRET disminuye con la sexta potencia de la distancia de los fluoróforos uno con respecto a otro. En este contexto, la eficacia de la transferencia de energía depende del denominado radio de transferencia del par de fluoróforos. El criterio de la baja distancia entre el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) conduce a que el par FRET

- proporcionado en el contexto del uso según la invención en cierto modo pueda actuar como “medida nanométrica óptica” y por consiguiente sea adecuado en el contexto de procedimientos de biología molecular o bioquímicos, por ejemplo para la determinación cualitativa y cuantitativa de la separación de los fluoróforos, para poder sacar conclusiones cualitativas y cuantitativas de esta manera sobre acontecimientos primarios respectivos, tales como
- 5 por ejemplo la interacción con una molécula diana o una estructura diana así como modificaciones de conformación.
- Con respecto a la transferencia de energía, particularmente transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, particularmente con baja separación de los fluoróforos (A) y (B), puede preverse también que los estados del primer fluoróforo (A) solapen con los estados del segundo fluoróforo (B) al menos parcialmente.
- Además, el primer fluoróforo (A) y/o el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, debería representar y/o
- 10 comprender respectivamente un colorante, particularmente un colorante de fluorescencia
- En el contexto de la presente invención es ventajoso cuando el primer fluoróforo (A) y/o el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, presentan respectivamente al menos un núcleo, preferentemente un núcleo compuesto de un elemento de las tierras raras. A este respecto se prefiere especialmente cuando el primer fluoróforo (A) y/o el
- 15 segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, se encuentran en forma de un complejo de coordinación o un compuesto de coordinación o en forma de un compuesto quelato, formándose el átomo central o los átomos centrales por el elemento de las tierras raras. A este respecto se prefiere especialmente en el contexto de la presente invención cuando (siempre que se usen complejos de coordinación de múltiples núcleos) dentro de un complejo y por consiguiente dentro de un fluoróforo se usan núcleos a base del mismo elemento de las tierras raras.
- En el contexto de la presente invención está previsto que el elemento de las tierras raras se seleccione de los
- 20 elementos de los lantánidos, concretamente del grupo de europio y terbio.
- Los lantánidos son metales de brillo plateado, relativamente blandos y altamente reactivos que se oxidan rápidamente en el aire y a este respecto se vuelven mate. En agua se descomponen de manera más o menos rápida con la liberación de hidrógeno gaseoso. En caso de los lantánidos se trata generalmente de 14 elementos en total del sexto periodo del sistema periódico que pueden considerarse como subgrupo del tercer grupo secundario.
- 25 Debido a la estructura similar de la capa de valencia, los lantánidos se comportan químicamente de manera comparable con los elementos del tercer grupo del sistema periódico, concretamente escandio e itrio. Con éstos forman los lantánidos el grupo de las tierras raras.
- Se obtienen resultados especialmente buenos con respecto al par FRET proporcionado en el contexto de la presente invención cuando el elemento de las tierras raras se selecciona del grupo de europio y terbio.
- 30 De manera correspondiente a esto, la parte solicitante ha descubierto de manera completamente sorprendente que resultan propiedades excelentes con respecto al par FRET cuando el fluoróforo (A) presenta terbio, particularmente en forma de terbio(III), como metal de las tierras raras.
- En este contexto igualmente ha resultado especialmente ventajoso cuando el fluoróforo (B) presenta europio, particularmente en forma de europio(III), como metal de las tierras raras.
- 35 Consecuentemente se prefiere especialmente en el contexto de la presente invención cuando el par FRET proporcionado en el contexto del uso según la invención comprende un fluoróforo (A) y un fluoróforo (B), presentando el fluoróforo (A) terbio, particularmente en forma de terbio(III), como metal de las tierras raras y presentando el fluoróforo (B) europio, particularmente en forma de europio(III), como metal de las tierras raras. Un par FRET de este tipo presenta propiedades excelentes con respecto al comportamiento de extinción con la
- 40 existencia de una transferencia de energía, particularmente transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, con una baja separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto al otro así como un comportamiento de emisión definido con bandas de emisión estrechas y duración de emisión prolongada, de modo que un par FRET de este tipo a base de terbio y europio es adecuado en especial medida para su uso analítico en el campo de la bioquímica o biología molecular.
- 45 En cuanto a la formación de los fluoróforos del par FRET proporcionado en el contexto del uso según la invención, está previsto entonces según la invención que los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) estén complejados respectivamente, y de manera concreta respectivamente con al menos un ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos, preferentemente varios ligandos, preferentemente cuatro ligandos. Según la invención se prefiere que los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B), independientemente entre sí,
- 50 estén unidos a al menos un ligando, particularmente a varios ligandos, preferentemente a cuatro ligandos, iónicamente, por coordinación y/o covalentemente, particularmente de manera covalente.
- En este contexto, el ligando, particularmente el formador de complejos y/o de quelatos, debería esta configurado de manera multidentada, particularmente de manera bidentada. En este contexto, el ligando puede contraer varios enlaces por coordinación, iónicos o covalentes con el núcleo o el átomo central a base de un metal de las tierras raras. Básicamente es posible en el contexto de la presente invención que con respecto a los fluoróforos (A) y (B) puedan usarse ligandos iguales o distintos. También dentro del propio fluoróforo (A) o (B) respectivo pueden usarse ligandos iguales o distintos.
- 55

Según la invención, el ligando es ácido picolínico, picolinatos y/o sus derivados, particularmente derivados sustituidos, preferentemente hidroxiderivados.

5 Para facilitar una unión de los fluoróforos con al menos otra molécula o resto orgánico, el ligando particularmente el ácido picolínico, picolinatos y/o sus derivados, presenta sustituyentes y/o grupos funcionales para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente de moléculas preferentemente orgánicas. De manera correspondiente a esto, los sustituyentes y/o grupos funcionales se seleccionan del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo. Por consiguiente, de esta manera se proporcionan, por así decirlo, puntos de conexión para otras moléculas o para al menos un resto orgánico en los respectivos fluoróforos (A) o (B). En caso de la molécula orgánica puede tratarse por ejemplo, tal como se menciona aún a continuación, de una unidad complementaria a una molécula diana o a una estructura diana o que puede interactuar con las mismas.

10 Según una forma de realización especialmente preferente, el sustituyente o el grupo funcional debería ser un grupo hidroxilo.

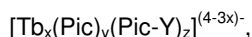
15 Adicionalmente es especialmente ventajoso en el contexto de la presente invención cuando el ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos es ácido hidroxipicolínico y/o hidroxipicolinato. En este contexto, al menos uno de los ligandos debería estar formado por los compuestos mencionados anteriormente, particularmente cuando se pretende un enlace covalente o un acoplamiento de moléculas preferentemente orgánicas a los fluoróforos (A) y/o (B).

Adicionalmente se prefiere especialmente en el contexto de la presente invención cuando el fluoróforo (A) es un complejo organometálico según la fórmula de la figura 5.

20 Además puede preverse según la invención que el fluoróforo (A) se selecciona de tetra(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III), tris(piridin-2-carboxilato)(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III), bis(piridin-2-carboxilato)-bis(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III), (piridin-2-carboxilato)-tris(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III) y/o sus derivados.

25 Con respecto a los compuestos para el fluoróforo (A) pueden usarse particularmente también las correspondientes sales, particularmente sales de sodio.

Además, el fluoróforo (A) puede ser un compuesto de fórmula general



en la que en la fórmula mencionada anteriormente

- Tb es terbio(III),
- 30 • Pic es picolinato,
- Y es un grupo funcional, particularmente seleccionado del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, preferentemente de un grupo hidroxilo,
- x es un número entero de 1 a 4, particularmente 1 ó 2, preferentemente 1, e
- y y z son respectivamente un número entero de 0 a 4 con $y + z = 4$.

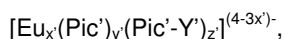
35 En cuanto al fluoróforo (B), puede ser este fluoróforo (B) entonces un complejo organometálico según la fórmula de la figura 4.

En este contexto se prefiere especialmente según la invención cuando el fluoróforo (A) es un complejo organometálico según la fórmula de la figura 5 y el fluoróforo (B) es un complejo organometálico según la fórmula de la figura 4.

40 Adicionalmente en cuanto al fluoróforo (B), puede seleccionarse éste entonces de tetra(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), tris(piridin-2-carboxilato)(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), bis(piridin-2-carboxilato)-bis(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), (piridin-2-carboxilato)-tris(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III) y/o sus derivados.

45 También en cuanto a los compuestos con respecto al fluoróforo (B) pueden usarse por ejemplo las correspondientes sales, particularmente sales de sodio.

Con respecto al fluoróforo (B) puede encontrarse también un compuesto de fórmula general



en la que en la fórmula mencionada anteriormente

- Eu es europio(III),
 - Pic³ es picolinato,
 - Y¹ es un grupo funcional, particularmente seleccionado del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, preferentemente de un grupo hidroxilo,
- 5
- x¹ es un número entero de 1 a 4, particularmente 1 ó 2, preferentemente 1, e
 - y¹ y z¹ son respectivamente un número entero de 0 a 4 con y¹ + z¹ = 4.

En el contexto de la presente invención está previsto que particularmente para la formación de un par FRET o de una sonda FRET el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) están acoplados y/o unidos entre sí a través de un resto orgánico bivalente y/o divalente, particularmente un ligador y/o espaciador.

- 10 De manera correspondiente a esto resulta, por consiguiente, una molécula o complejo de molécula que comprende el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) así como el resto. Mediante la elección dirigida al objetivo del resto orgánico y la coordinación con los fluoróforos (A) y (B) especiales puede optimizarse o adaptarse por consiguiente el par FRET o la sonda FRET en el sentido de que con baja separación de los fluoróforos (A) y (B) entre sí puede realizarse una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia óptima en el sentido de una extinción máxima de la señal
- 15 de donador y con separación creciente resulta una modificación bien definida del espectro de emisión con bandas agudas y duraciones de emisión largas.

Según esto debería seleccionarse el resto orgánico en el contexto de la presente invención de manera que entre el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) pueda producirse una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Esto se aplica particularmente para el caso de una baja separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro, por ejemplo cuando no existe ninguna interacción con una molécula diana o una estructura diana. Por consiguiente, mediante la elección dirigida del espaciador puede ajustarse o adaptarse la transferencia de energía de fluorescencia individualmente, conduciendo un espaciador pequeño, es decir particularmente una molécula con longitud de cadena pequeña, a una baja separación de los fluoróforos (A) y (B), lo que va acompañado de una alta transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Sin embargo, también un resto o espaciador grande puede conducir por ejemplo a través de procesos de plegamiento y/o adición o hibridación a una baja separación entre (A) y (B), tal como es el caso por ejemplo con una baliza molecular.

20

25

Debido al ajuste individual de la separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro mediante el resto orgánico puede ajustarse, por consiguiente, el espectro de emisión específicamente, resultando particularmente también con FRET espectros de emisión con longitudes de onda o bandas de emisión específicas, lo que es muy importante particularmente en el contexto de la preparación o del uso como colorantes, dado que las propiedades de color por así decirlo pueden ajustarse individualmente mediante el ajuste dirigido de la separación de los fluoróforos (A) y (B).

30

Por consiguiente, en conjunto mediante la longitud del resto orgánico, su estructura, disposición espacial o configuración puede ajustarse o adaptarse la separación de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro y por consiguiente la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia y con ello la longitud de onda de emisión del par FRET. La unión o el acoplamiento del resto orgánico a los fluoróforos puede realizarse por ejemplo de manera que el resto orgánico puede acoplarse y/o unirse a los respectivos sustituyentes y/o a los respectivos grupos funcionales del formador de complejos y/o del ligando, particularmente tal como se definió anteriormente.

35

A este respecto se prefiere en el contexto de la presente invención cuando el resto orgánico está unido preferentemente de manera covalente con el fluoróforo (A) y/o el fluoróforo (B), estando unido y/o acoplado particularmente el resto orgánico preferentemente de manera covalente a los grupos funcionales del o de los ligandos del fluoróforo (A) y/o (B) y/o presentando particularmente el resto orgánico grupos funcionales aptos para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente a los grupos funcionales del o de los ligandos.

40

A este respecto se realiza la unión o el acoplamiento del resto orgánico a los grupos funcionales particularmente de manera que los fluoróforos (A) y (B), independientemente entre sí, se unen o se acoplan preferentemente en los extremos al resto orgánico y por consiguiente en cierto modo al respectivo extremo del resto orgánico.

45

En este contexto puede unirse el resto orgánico covalentemente con el fluoróforo (A) y/o el fluoróforo (B) por ejemplo con la formación de grupos (poli)uretanos en los extremos particularmente con respecto al resto orgánico.

Una unión o un acoplamiento preferentemente en los extremos de los fluoróforos (A) y (B) a un resto orgánico existe por ejemplo entonces cuando el par FRET proporcionado según el uso según la invención se encuentra o debe usarse como sonda FRET según el tipo de una sonda de hidrólisis o según el tipo de una baliza molecular.

50

En cuanto al resto orgánico en general, puede ser el resto orgánico entonces un resto que puede entrar en interacción con una molécula diana y/o una estructura diana. El resto orgánico puede ser de manera que se trata de un resto que puede interaccionar con una molécula diana y/o una estructura diana.

En el contexto de la presente invención puede preverse que una interacción y/o interrelación del resto orgánico con la molécula diana y/o la estructura diana conduzca a una modificación, particularmente a una reducción, de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencias desde el fluoróforo (A) hasta el fluoróforo (B).

- 5 Esto se consigue particularmente porque debido a la interacción o interrelación se amplía la separación entre el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), de modo que disminuye la transferencia de energía entre los fluoróforos y por consiguiente se modifica el comportamiento de emisión. De esta manera puede verificarse la interacción o interrelación mediante el registro (de una modificación) del espectro de emisión de la muestra.

En cuanto al resto orgánico, éste puede ser entonces por ejemplo una secuencia de nucleótidos, particularmente una secuencia de ADN o ARN, preferentemente un oligonucleótido, o puede comprender ésta.

- 10 Esto puede ser el caso por ejemplo entonces cuando el par FRET proporcionado en el contexto del uso según la invención se usa como sonda de hibridación, sonda de hidrólisis y/o como baliza molecular.

- 15 Particularmente para el caso en el que se usa el par FRET proporcionado según el uso según la invención como baliza molecular, puede preverse que la secuencia de nucleótidos, particularmente en su extremo 5' y en su extremo 3', presente secciones de secuencia de nucleótidos complementarias, particularmente de modo que con interacción no presente con una molécula diana y/o una estructura diana resulta o existe una hibridación de las secciones de secuencia de nucleótidos complementarias. Mediante las secciones de extremo complementarias de la secuencia de nucleótidos resulta en cierto modo una autohibridación de los extremos de la secuencia de nucleótidos, de modo que la estructura descrita anteriormente y característica para balizas moleculares se encuentra en el sentido de una horquilla. En este estado, el fluoróforo (A) mediante su baja distancia al fluoróforo (B) no presenta ninguna fluorescencia o presenta una fluorescencia reducida. En el caso de una adición de la región de bucle o región de lazo a una secuencia de ADN complementaria como molécula diana o estructura diana, por ejemplo producida durante un ciclo de PCR, se amplía la distancia entre el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B), de modo que para este caso resulta, de manera condicionada por una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia reducida, una fluorescencia o una modificación de la fluorescencia con respecto al fluoróforo (A) y ésta puede observarse o detectarse con dispositivos o procedimientos en sí conocidos por el experto, pudiendo ir acompañada la modificación del espectro de emisión de un aumento de la fluorescencia del donador y una disminución de la fluorescencia del aceptor.

- 20 Tal como se mencionó anteriormente, en caso del par FRET proporcionado según el uso según la invención puede tratarse por ejemplo de una baliza molecular (BM). En este contexto está previsto que el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) formen una baliza molecular (BM) mediante la unión particularmente covalente a una secuencia de nucleótidos con secciones de secuencia de nucleótidos complementarias particularmente en su extremo 5' y extremo 3'.

Igualmente es posible, sin embargo, también en el contexto de la presente invención que el resto orgánico sea un péptido y/o una secuencia de aminoácidos, particularmente un oligopéptido, o comprenda éste o ésta.

- 35 Según esto puede tratarse por ejemplo de una enzima o de una secuencia de aminoácidos definida, alineada con una respectiva estructura diana o con una molécula diana. Igualmente puede tratarse sin embargo también de un péptido o de una secuencia de aminoácidos cuya estructura espacial propia deba registrarse.

Además puede preverse también en el contexto de la presente invención que el resto orgánico sea un resto de hidrocarburo saturado o insaturado, preferentemente un resto de hidrocarburo insaturado, ramificado o lineal o comprenda a éste.

- 40 En este contexto es especialmente ventajoso cuando el resto de hidrocarburo presenta una longitud de cadena de al menos 2 átomos de carbono, particularmente de 2 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 15 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 12 átomos de carbono.

- 45 También en este caso debería seleccionarse, tal como se mencionó anteriormente, la longitud del resto de hidrocarburo en vista de la transferencia de energía que va a ajustarse, particularmente transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, entre el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B).

Según una forma de realización especialmente preferente según la invención, el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) forman junto con un resto orgánico el complejo según la fórmula de la figura 3, en la que en la fórmula mencionada anteriormente n representa un número entero en el intervalo de 1 a 20, particularmente de 2 a 15, preferentemente de 2 a 12.

- 50 Según las fórmulas de las figuras 3 a 5 se forma el fluoróforo (A) por un complejo de terbio con cuatro hidroxipicolinatos así como el fluoróforo (B) por un complejo de europio con cuatro hidroxipicolinatos. Los fluoróforos están unidos entre sí mediante un resto de hidrocarburo en enlaces de uretano en los extremos.

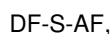
En cuanto al resto orgánico, éste puede representar entonces también una molécula mixta que contiene una secuencia de nucleótidos y/o una secuencia de aminoácidos y/o un resto de hidrocarburo.

La presente invención se explica más y puramente a modo de ejemplo por medio de la representación de figuras, sin embargo sin limitar sobre esto la invención. Muestra:

- la figura 1 un complejo FRET según la invención que presenta un complejo de terbio (Tb) como fluoróforo donador y un complejo de europio (Eu) como fluoróforo aceptor. Los dos fluoróforos están unidos entre sí a través de un resto orgánico ("espaciador" o "ligador"), pudiéndose tratar según esto particularmente de una secuencia de nucleótidos que presenta en sus extremos nucleótidos complementarios uno con respecto a otro, que están hibridados. La parte no hibridada de la secuencia de nucleótidos forma una región de bucle. El complejo representado en la figura 1 representa particularmente una baliza molecular (MB) que se encuentra en un estado cerrado, produciéndose en el presente caso con la radiación de una energía de excitación (Exc.) una transferencia de energía (ET) particularmente sin radiación del complejo de terbio al complejo de europio, acompañada de una emisión específica (Em.) mediante el complejo de europio.
- La figura 2 un espectro óptico del complejo FRET según la invención representado en la figura 3. Debido a la transferencia de energía eficaz del complejo de Tb al complejo de Eu existe una emisión significativamente reducida o sólo muy baja mediante el complejo de Tb.
- La figura 3 un complejo FRET según la invención a base de un complejo de Tb como fluoróforo (A) y de un complejo de europio como fluoróforo (B), estando unidos los complejos a través de un resto orgánico en forma de una cadena de hidrocarburo lineal por medio de puentes de uretano.
- La figura 4 un complejo de europio usado en el contexto de la presente invención como fluoróforo (B), que presenta cuatro hidroxipicolinatos como ligandos.
- La figura 5 un complejo de terbio usado en el contexto de la presente invención como fluoróforo (A), que presenta cuatro hidroxipicolinatos como ligandos.

Adicionalmente la presente invención se refiere (según un segundo aspecto de la presente invención) a un complejo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (complejo FRET), que presenta al menos un primer fluoróforo (A) como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) como fluoróforo aceptor. El complejo FRET según la invención se caracteriza porque el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, están configurados respectivamente a base de un complejo organometálico de elementos de las tierras raras, en el que los fluoróforos (A) y (B) presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras, seleccionados del grupo de europio y terbio. Adicionalmente, los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) están complejados respectivamente con al menos un ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos, siendo el ligando ácido picolínico, picolinato y/o sus derivados y presentando el ligando sustituyentes y/o grupos funcionales para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente de moléculas preferentemente orgánicas, seleccionándose los sustituyentes y/o grupos funcionales del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo. Además, el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) están acoplados y/o unidos entre sí a través de un resto orgánico bivalente y/o divalente, particularmente un ligador y/o espaciador.

Según una forma de realización preferente de la presente invención, el complejo FRET según la invención puede corresponder a la fórmula general



en la que en la fórmula mencionada anteriormente

- DF designa un fluoróforo donador, particularmente el fluoróforo (A),
- AF designa un fluoróforo aceptor, particularmente el fluoróforo (B), y
- S designa un resto orgánico particularmente bivalente y/o divalente, particularmente un ligador y/o espaciador.

Para otras realizaciones con respecto al complejo FRET según la invención puede remitirse a las realizaciones con respecto al uso según la invención mencionado anteriormente, que se aplican igualmente con respecto al complejo FRET según la invención.

El complejo FRET según la invención puede estar configurado por ejemplo en cuanto a procedimientos analíticos por ejemplo en forma de una sonda de hibridación, una sonda de hidrólisis o de una baliza molecular.

En total puede tratarse en caso de los complejos FRET según la invención de las sondas de hibridación, sondas de hidrólisis y balizas moleculares descritas ya anteriormente. En este contexto pueden ajustarse los complejos FRET según la invención a través de la selección especial de los fluoróforos (A) y (B) y del resto orgánico con respecto a sus parámetros o propiedades de transferencia de energía. Las propiedades de transferencia de energía así ajustadas pueden usarse para la calibración de distancias o separaciones intramoleculares en moléculas de

nucleótidos hibridadas particularmente en forma de balizas moleculares que están dotadas de los fluoróforos especiales (A) y (B) en los respectivos extremos, actuando por consiguiente el resto orgánico en forma de un oligonucleótido como espaciador o ligador. Mediante la inducción bioquímica por medio de una estructura o secuencia diana adecuada se abre la secuencia de nucleótidos cerrada en forma de bucle, de modo que resulta una respuesta de emisión modificada debido a una transferencia de energía modificada cuando los extremos del lazo se separan o se apartan.

Los complejos FRET según la invención presentan particularmente espectros de emisión bien definidos, encontrándose la duración de emisión tras la excitación mediante una señal registrada en el intervalo de milisegundos y siendo posible por consiguiente una discriminación adicional en comparación con una autofluorescencia inespecífica. Estos dos factores conducen a que pueda prescindirse de sistemas láser y de evaluación costosos para el análisis de las señales de medición. Además existe con baja separación de los fluoróforos una extinción óptima, lo que mejora además la calidad de la señal.

Adicionalmente en cuanto al complejo FRET según la invención, puede realizarse entonces en el contexto del correspondiente uso como biosensores un registro en tiempo real muy específico y de gran valor informativo, por ejemplo en el contexto de la amplificación de ácidos nucleicos diana, con un límite de detección bajo, particularmente en el contexto de la PCR en tiempo real en un termociclador compacto y configurado de manera sencilla.

El uso del complejo FRET según la invención no está limitado al acoplamiento a ácidos nucleicos. Así es posible igualmente que el complejo FRET según la invención se encuentre en forma de una proteína como resto orgánico que se une a los fluoróforos (A) y (B) y en el caso de una escisión de la proteína o también debido a una modificación de la conformación, por ejemplo en el caso de la unión a un ligando, resulta una modificación de la separación espacial de los fluoróforos (A) y (B), de modo que existe una modificación del espectro de emisión. Particularmente puede verificarse también en este caso la emisión de fluorescencia del fluoróforo donador y por consiguiente del fluoróforo (A). Por consiguiente puede usarse el complejo FRET según la invención también en el análisis químico de proteínas o péptidos.

Además pueden usarse los complejos FRET según la invención también en procedimientos de amplificación isotérmica, tales como *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA). Los complejos FRET según la invención pueden usarse también en la tecnología de matriz. Además es posible una adición o unión de los complejos FRET según la invención a un sustrato sólido, por ejemplo para su uso en biochips o biosensores. Además se tiene en consideración igualmente un uso de los complejos FRET según la invención en forma de aptámeros. En total se abre, por consiguiente, con respecto a los complejos FRET según la invención, el campo de aplicación muy grande del análisis y del diagnóstico médico, de biología molecular o bioquímico.

Para otras formas de realización en cuanto al tercer aspecto de la presente invención puede remitirse a las realizaciones anteriores con respecto al primer y segundo aspecto de la presente invención, que se aplican correspondientemente.

Otro objeto de la presente invención (según un tercer aspecto de la presente invención) es el uso según la invención del complejo FRET anteriormente definido según la invención para la detección de un acontecimiento en una muestra.

El término "acontecimiento", tal como se usa en el contexto de la presente invención, ha de entenderse de manera muy amplia. Así puede tratarse por ejemplo en el caso del acontecimiento de una interacción y/o interrelación y/o hibridación del complejo FRET con una secuencia de ADN o secuencia de ARN o un oligonucleótido, por ejemplo en el contexto de una verificación de ácido nucleico. En este caso, el resto orgánico del complejo FRET según la invención presenta preferentemente una secuencia de nucleótidos o está compuesto por ésta. Igualmente, el término "acontecimiento" comprende también una interacción y/o interrelación y/o adición del complejo FRET según la invención a un (poli)péptido o enzima. Igualmente, el acontecimiento puede ser también la escisión o sin embargo la unión de un péptido a un ligando. En este caso, el resto orgánico del complejo FRET según la invención debería ser preferentemente una secuencia de aminoácidos o un oligopéptido o polipéptido o debería comprender ésta o éste. Igualmente, el acontecimiento puede ser también una modificación de la estructura espacial, por ejemplo una modificación de la configuración o conformación, de una proteína o similares. Por consiguiente, el acontecimiento representa en general igualmente una actividad en una muestra de medición que conduce particularmente a una modificación de la disposición espacial o de la separación del fluoróforo (A) y del fluoróforo (B) uno con respecto a otro, existiendo particularmente como consecuencia o debido a esta modificación un registro preferentemente discriminativo de una señal de medición modificada, particularmente de una modificación en el espectro de emisión del complejo FRET que se debe por ejemplo a la señal creciente del fluoróforo (A) que actúa como donador y la señal decreciente del aceptor (condicionado por la ampliación de la separación espacial de los fluoróforos (A) y (B) con reducción de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia).

En cuanto al uso según la invención según este aspecto de la presente invención, puede experimentar entonces el complejo FRET una modificación de su espectro de emisión con la aparición del acontecimiento y/o como consecuencia del acontecimiento particularmente con la influencia y/o acción y/o entrada de una energía de

excitación. Además puede emitir el complejo FRET una señal detectable con la aparición del acontecimiento y/o como consecuencia del acontecimiento particularmente con la influencia y/o acción y/o entrada de una energía de excitación.

5 Por consiguiente, según la invención puede preverse que la disposición relativa de los fluoróforos (A) y (B) uno con respecto a otro se modifique mediante o como consecuencia del acontecimiento particularmente de manera que resulta una modificación del espectro de emisión del complejo FRET y/o que se emite una señal detectable.

Según la invención puede preverse además que la modificación del espectro de emisión y/o de la señal detectable se realice en sucesión temporal retrasada con respecto a la aparición del acontecimiento y/o que la modificación del espectro de emisión y/o de la señal detectable se realiza en sucesión temporal tras la aparición del acontecimiento.

10 Adicionalmente puede realizarse el registro de la modificación del espectro de emisión y/o de la señal detectable mediante una medición de fluorescencia con resolución temporal. De manera correspondiente a esto, la modificación del espectro de emisión o la señal detectable debería distinguirse de la autofluorescencia.

15 De manera correspondiente a esto es ventajoso cuando la señal detectable del complejo FRET está prolongada en comparación con la autofluorescencia de la muestra en un factor 2, particularmente en un factor 5, preferentemente en un factor 10, preferentemente en un factor 100.

20 Finalmente, el acontecimiento puede ser, tal como se mencionó anteriormente, una interrelación y/o interacción y/o hibridación del complejo FRET con una molécula diana y/o una estructura diana, particularmente una secuencia de nucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN o ARN, o un péptido y/o una secuencia de aminoácidos. Además, el acontecimiento puede ser una modificación espacial, particularmente una modificación de la configuración y/o conformación, del complejo FRET.

25 Otro objeto de la presente invención (según un cuarto aspecto de la presente invención) es el uso según la invención del complejo FRET según la invención, tal como se definió anteriormente, para la interacción con una molécula diana y/o una estructura diana y/o para la detección y/o identificación y/o para la verificación de una molécula diana y/o una estructura diana, particularmente mediante la interacción del complejo FRET por un lado con la molécula diana y/o la estructura diana por otro lado.

En cuanto a la molécula diana o la estructura diana, puede ser entonces ésta una secuencia de nucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN o ARN, un (poli)péptido y/o una secuencia de aminoácidos, particularmente una enzima o un anticuerpo.

30 Igualmente es posible también en el contexto de la presente invención detectar o registrar virus, microorganismos, particularmente bacterias, basándose en el complejo FRET según la invención. En este contexto, el complejo FRET según la invención debería estar configurado particularmente con respecto al correspondiente resto orgánico de manera que pudiera realizarse una interacción con virus, microorganismos, particularmente bacterias, anticuerpos y similares o con determinadas estructuras diana de los sistemas biológicos mencionados anteriormente.

35 Por ejemplo, el complejo FRET según la invención puede usarse para la identificación o cuantificación de microorganismos, particularmente de microorganismos en alimentos, pudiéndose realizar por ejemplo inicialmente un enriquecimiento de los microorganismos. Esto puede realizarse por ejemplo y de manera no limitativa con un soporte recubierto con ligandos, siendo específico el ligando para los microorganismos que van a identificarse o cuantificarse. Además puede realizarse el enriquecimiento también a través de micropartículas recubiertas con anticuerpos. A continuación, tras realizar eventualmente un lisado y purificación del ADN de los microorganismos
40 puede realizarse una amplificación de los correspondientes ácidos nucleicos diana usando los complejos FRET o las sondas FRET según la invención.

45 La presente invención comprende igualmente un procedimiento para el registro o detección de oligonucleótidos diana en un entorno de muestra, que comprende las siguientes etapas: en una primera etapa se realiza una incubación de un ácido nucleico diana usando el complejo FRET según la invención con radiación posterior de la mezcla de incubación y registro de la emisión de fluorescencia, particularmente por medio de medición de fluorescencia con resolución temporal. En este contexto, para la amplificación de los ácidos nucleicos diana puede usarse por ejemplo una PCR en tiempo real. Igualmente, de manera correspondiente a esto, puede estar unido el ácido nucleico diana o el complejo FRET según la invención como sonda FRET en un soporte.

50 Finalmente, la presente invención se refiere (según un quinto aspecto de la presente invención) al uso del complejo FRET según la invención tal como se definió anteriormente, como colorante, particularmente colorante de fluorescencia, particularmente para fines de marcación.

55 Entonces, debido a la estructura especial, acompañada de los fluoróforos especiales basados en metales de las tierras raras, pueden producirse coloraciones específicas de manera específica mediante la selección de los fluoróforos y el ajuste de la separación de los fluoróforos, de modo que los complejos FRET según la invención son adecuados también de manera excelente para su uso como colorantes.

Mediante las bandas de emisión agudas y estrechamente limitadas son posibles, con respecto a los colorantes, coloraciones definidas en un espectro estrechamente limitado.

5 En total puede usarse el principio en el que se basa la presente invención del aprovechamiento de la energía de transferencia o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre complejos de terbio por un lado y complejos de europio por otro lado como un medio valioso en el contexto de estudios estructurales, de una coordinación (fina) de la emisión así como de la mejora de las propiedades de biosensores o complejos de colorante. En esto se encuentra una clara ventaja de la presente invención.

10 Adicionalmente, la presente invención se refiere (según un sexto aspecto de la presente invención) al uso del complejo FRET según la invención, tal como se definió anteriormente, en o como biosensores o sin embargo en o como sondas, particularmente sondas FRET.

Para otras formas de realización en cuanto al aspecto cuarto a sexto de la presente invención puede remitirse a las realizaciones anteriores con respecto a los demás aspectos de la presente invención, que se aplican de manera correspondiente.

15 Otras configuraciones, modificaciones y variaciones de la presente invención pueden reconocerse y realizarse sin más por el experto con la lectura de la descripción, sin que a este respecto abandone el contexto de la presente invención.

La presente invención se explica por medio de los siguientes ejemplos de realización que sin embargo no limitan de ningún modo la presente invención.

Ejemplos de realización:

20 Modificación de ligandos:

Se disuelve ácido 3-aminopicolínico o ácido 3-hidroxipicolínico en agua destilada, se neutraliza con la correspondiente cantidad de disolución de NaOH 1 M y se recristaliza como sal de sodio del ácido 3-aminopicolínico o sal de sodio de ácido 3-hidroxipicolínico.

25 Se secan 0,3222 g de sal de sodio de ácido 3-aminopicolínico o sal de sodio de ácido 3-hidroxipicolínico (2 mmol) a vacío ($2 \cdot 10^{-3}$ kPa) a 110°C en el intervalo de 3 horas, se disuelven en aproximadamente 30 ml de DMF seca y se mezclan por ejemplo con 0,162 ml de diisocianato de hexametileno (HDI o OCN-(CH₂)₆-CNO) o por ejemplo 0,269 ml de diisocianato de dodecametileno (DMDI o OCN-(CH₂)₁₂-CNO), (1 mmol) bajo atmósfera de gas protector. La reacción se realiza, igualmente con gas protector, a 90°C en el intervalo de 24 horas o 70 horas con la conversión del 3-hidroxipicolinato de sodio. Se elimina DMF a vacío a 90°C.

30 Los productos tienen las composiciones NaOOC-C₅H₄N-NH-CO-NH-(CH₂)_n-NH-CO-NH-C₅H₄N-COO-Na (n = 6 para el producto con HDI y n = 12 para el producto con DMDI) con la conversión del 3-aminopicolinato de sodio y NaOOC-C₅H₄N-O-CO-NH-(CH₂)_n-NH-CO-O-C₅H₄N-COONa con la conversión del 3-hidroxipicolinato de sodio.

En la modificación comparativa de los ligandos con monoisocianatos (isocianato de fenilo o isocianato de butilo) e isotiocianato de butilo se añaden para la misma reacción correspondientemente 2 mmol del reactivo isocianato.

35 Síntesis de los compuestos de complejos:

Complejos de tetrapicolinato:

40 Se disuelven 0,4350 g de sal de sodio de ácido picolínico (3 mmol) y 0,1600 g de sal de sodio de 3-aminopicolínico (o sal de sodio de ácido 3-hidroxipicolínico) (1 mmol) en aproximadamente 30 ml de DMSO con calentamiento (en la síntesis de los complejos con sólo un tipo de ligando se añaden correspondientemente 4 mmol de la correspondiente sal de sodio). Se disuelven 0,3664 g de EuCl₃ · 6 H₂O (o sin embargo 0,3730 g de TbCl₃ · 6 H₂O o sin embargo 0,1832 g de EuCl₃ · 6 H₂O y 0,1865 g de TbCl₃ · 6 H₂O para los complejos mixtos) (1 mmol) en poco DMSO y se mezclan con la disolución de ligando. La mezcla se deja reaccionar en el intervalo de 2 horas a 90°C, entonces se elimina por destilación DMSO a la misma temperatura a vacío. El polvo de color beige así obtenido se lleva a ebullición en THF con reflujo durante 1 hora, se filtra y se seca a vacío a 80°C durante una hora.

45 En la síntesis de los compuestos de complejos con los ligandos modificados se añaden en lugar de 1 mmol de la sal de sodio de ácido 3-aminopicolínico correspondientemente 0,5 mmol del ligando modificado con el diisocianato (o 1 mmol del ligando modificado con el isocianato o isotiocianato).

50 Debido a la mala solubilidad del ligando modificado con DMDI se realiza la modificación de los isocianatos con los mismos complejos de las tierras raras: se secan 0,35 mmol de complejo NaEu_xTb_(1-x)(Pic)₃(Pic-Y) (x = 0 a 1, Pic = picolinato y Pic-Y = 3-amino o 3-hidroxipicolinato) a vacío ($2 \cdot 10^{-3}$ kPa) a 110°C en el intervalo de 3 horas, se disuelven en aproximadamente 20 ml de DMSO seco y se mezclan con 0,094 ml de DMDI (0,088 mmol) bajo atmósfera protectora. La reacción se realiza bajo argón a 90°C en el plazo de 24 horas (o 70 horas con la conversión de los 3-hidroxipicolinatos). Se elimina por destilación DMSO a la misma temperatura a vacío. El polvo de color

beige ahora obtenido se lleva a ebullición en THF con reflujo durante 1 hora, se filtra y se seca a vacío a 80°C durante una hora.

Complejos de tripicolinato:

5 Se disuelven 0,2900 g de sal de sodio de ácido picolínico (2 mmol) y 0,1600 g de sal de sodio de ácido 3-aminopicolínico (o sal de sodio de ácido 3-hidroxicolínico) (1 mol) en aproximadamente 30 ml de DMF con calentamiento (en la síntesis de los complejos con sólo un tipo de ligando se añaden 3 mmol de la correspondiente sal de sodio). Se disuelven 0,3664 g de $\text{EuCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (o sin embargo 0,3730 g de $\text{TbCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ o sin embargo 0,1832 g de $\text{EuCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1865 g de $\text{TbCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ para los complejos mixtos) (1 mol) en poca DMF y se mezclan con la disolución de ligando. El precipitado obtenido se filtra, se lava con etanol y se seca a vacío a 50°C durante una hora.

10 En la síntesis de los compuestos de complejos con los ligandos modificados se añaden en lugar de 1 mmol de la sal de sodio de ácido 3-aminopicolínico correspondientemente 0,5 mmol del ligando modificado con el diisocianato (o 1 mmol con el isocianato o isotiocianato).

15 En la síntesis de los compuestos de complejos con ligandos exclusivamente modificados, por ejemplo $\text{Eu}_2[\text{NaOOC-C}_5\text{H}_4\text{N-O-CO-NH-(CH}_2)_n\text{-NH-CO-O-C}_5\text{H}_4\text{N-COO}]_3$, no se produce el precipitado hasta calentar hasta de 90°C a 100°C.

Marcación de ADN modificado con isocianato:

20 El complejo $\text{NaEu}_x\text{Tb}_{(1-x)}(\text{Pic})_3(\text{Pic-Y})$ (por ejemplo $x = 0$ para la marcación con complejo que produce luminiscencia sólo verde; $x = 1$ para la marcación con complejo que produce luminiscencia sólo roja; $x = 0,5$ para la marcación con complejos que producen luminiscencia verde y roja; Pic = picolinato; Pic-Y = 3-amino o 3-hidroxicolinato) se seca a vacío ($2 \cdot 10^{-3}$ kPa) a 110°C en el intervalo de 3 horas, se disuelve en DMSO y se mezcla con la correspondiente cantidad de la disolución de ADN en DMSO seco (proporción molar de Pic-Y : NCO = 1 : 1) bajo atmósfera protectora. La reacción se realiza bajo argón a 90°C en el intervalo de 24 horas (o 70 horas con la conversión de los 3-hidroxicolinos). En caso necesario puede eliminarse por destilación el DMSO a la misma temperatura a vacío.

25 Marcación de ADN modificado con isotiocianato:

30 El complejo $\text{NaEu}_x\text{Tb}_{(1-x)}(\text{Pic})_3(\text{Pic-Y})$ (por ejemplo $x = 0$ para la marcación con complejo que produce luminiscencia sólo verde; $x = 1$ para la marcación con complejo que produce luminiscencia sólo roja; $x = 0,5$ para la marcación con complejos que producen luminiscencia verde y roja; Pic = picolinato; Pic-Y = 3-amino o 3-hidroxicolinato) se disuelve en DMSO y se mezcla con la correspondiente cantidad de la disolución de ADN en agua, DMSO o mezcla de DMSO/agua (proporción molar de Pic-Y : NCS = 1 : 1). La reacción se realiza en el intervalo de 24 horas (o 70 horas con la conversión de los 3-hidroxicolinos). En caso necesario puede eliminarse por destilación el DMSO o el agua a la misma temperatura a vacío.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos dos fluoróforos distintos entre sí para la formación de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (par FRET), en el que dentro del par FRET al menos un primer fluoróforo (A) sirve como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) sirve como fluoróforo aceptor,
 5 en el que el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, están configurados respectivamente a base de un complejo organometálico de elementos de las tierras raras, en el que los fluoróforos (A) y (B) presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras, seleccionados del grupo de europio y terbio, en el que los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) están complejados respectivamente con al menos un ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos, en el que el ligando es ácido picolínico,
 10 picolinatos y/o sus derivados y en el que el ligando presenta sustituyentes y/o grupos funcionales para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente de moléculas preferentemente orgánicas, en el que los sustituyentes y/o grupos funcionales se seleccionan del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, y
 15 en el que el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) están acoplados y/o unidos entre sí a través de un resto orgánico bivalente y/o divalente.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado**

porque el fluoróforo (A) presenta terbio en forma de terbio(III) como metal de las tierras raras y/o

porque el fluoróforo (B) presenta europio en forma de europio(III) como metal de las tierras raras.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado**

20 **porque** los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) están complejados a varios ligandos, preferentemente cuatro ligandos, y/o **porque** los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B), independientemente entre sí, están unidos al al menos un ligando, particularmente a varios ligandos, preferentemente a cuatro ligandos, iónicamente, por coordinación y/o covalentemente, particularmente de manera covalente, y/o

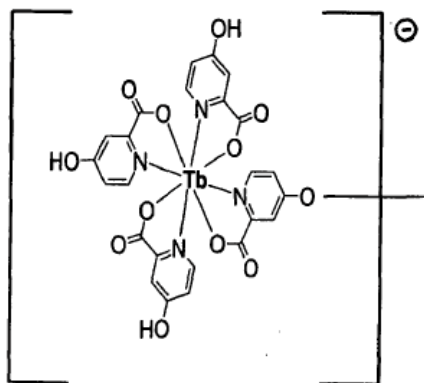
25 **porque** el ligando está configurado de manera multidentada, particularmente de manera bidentada y/o

porque el ligando, particularmente formador de complejos y/o formador de quelatos, es ácido picolínico, picolinatos y/o sus derivados, particularmente derivados sustituidos, preferentemente hidroxiderivados, y/o

porque el ligando es ácido hidroxipicolínico y/o hidroxipicolinato.

4. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**

30 **porque** el fluoróforo (A) es un complejo organometálico según la fórmula



y/o

35 **porque** el fluoróforo (A) se selecciona de tetra(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III), tris(piridin-2-carboxilato)(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)-terbio(III), bis(piridin-2-carboxilato)-bis(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)terbio(III), (piridin-2-carboxilato)-tris(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)-terbio(III) y/o sus derivados y/o **porque** el fluoróforo (A) es un compuesto de fórmula general

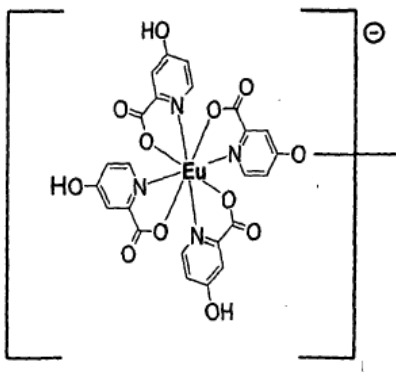


en la que en la fórmula mencionada anteriormente

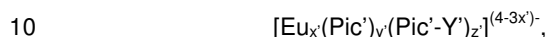
- 40
- Tb es terbio(III),
 - Pic es picolinato,
 - Y es un grupo funcional, particularmente seleccionado del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, preferentemente de un grupo hidroxilo,
 - x es un número entero de 1 a 4, particularmente 1 ó 2, preferentemente 1 e

- y y z son respectivamente un número entero de 0 a 4 con $y + z = 4$.

5. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el fluoróforo (B) es un complejo organometálico según la fórmula



5 y/o **porque** el fluoróforo (B) se selecciona de tetra(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), tris(piridin-2-carboxilato)(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), Bis(piridin-2-carboxilato)-bis(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III), (piridin-2-carboxilato)-tris(4-hidroxipiridin-2-carboxilato)europio(III) y/o sus derivados y/o **porque** el fluoróforo (B) es un compuesto de fórmula general



en la que en la fórmula mencionada anteriormente

- Eu es europio(III),
 - Pic' es picolinato,
 - Y' es un grupo funcional, particularmente seleccionado del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, preferentemente de un grupo hidroxilo,
 - x' es un número entero de 1 a 4, particularmente 1 ó 2, preferentemente 1 e
 - y' y z' son respectivamente un número entero de 0 a 4 con $y' + z' = 4$.
- 15

6. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**

20 **porque** el resto orgánico bivalente y/o divalente es un ligador y/o espaciador y/o **porque** el resto orgánico se selecciona de manera que entre el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) puede producirse una transferencia de energía de fluorescencia, y/o **porque** el resto orgánico está acoplado y/o unido a los respectivos sustituyentes y/o a los respectivos grupos funcionales del ligando, particularmente como se define en las reivindicaciones anteriores y/o **porque** el resto orgánico está unido preferentemente de manera covalente con el fluoróforo (A) y/o el fluoróforo (B), en el que particularmente el resto orgánico está unido y/o acoplado preferentemente de manera covalente a los grupos funcionales del o de los ligandos del fluoróforo (A) y/o (B) y/o en el que particularmente el resto orgánico presenta grupos funcionales aptos para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente a los grupos funcionales del o de los ligandos.

25

7. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**

30 **porque** el resto orgánico es una secuencia de nucleótidos, particularmente una secuencia de ADN o ARN, preferentemente un oligonucleótido, o comprende ésta, en el que particularmente la secuencia de nucleótidos, particularmente en su extremo 5' y extremo 3', presenta secciones de secuencia de nucleótidos complementarias, particularmente de modo que con interacción no presente con una molécula diana y/o estructura diana resulta una hibridación de las secciones de secuencia de nucleótidos complementarias.

35

8. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**

porque el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) mediante la unión particularmente covalente a una secuencia de nucleótidos con secciones de secuencia de nucleótidos complementarias particularmente en su extremo 5' y extremo 3' forman una baliza molecular (BM) y/o **porque** el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) con un resto orgánico forman una molécula de fórmula general según la figura 3, en la que en esta fórmula n representa un número entero en el intervalo de 1 a 20, particularmente de 2 a 15, preferentemente de 2 a 12.

40

9. Complejo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (complejo FRET), que presenta al menos un primer fluoróforo (A) como fluoróforo donador y al menos un segundo fluoróforo (B) como fluoróforo aceptor, en el que el primer fluoróforo (A) y el segundo fluoróforo (B), independientemente entre sí, están configurados respectivamente a base de un complejo organometálico de elementos de las tierras raras, en el que los fluoróforos (A) y (B) presentan elementos distintos entre sí de las tierras raras, seleccionados del grupo de europio y terbio, en el que los elementos de las tierras raras en los fluoróforos (A) y (B) están complejados respectivamente con al menos un ligando en forma de un formador de complejos y/o quelatos, en el que el ligando es ácido picolínico, picolinatos y/o sus derivados y en el que el ligando presenta sustituyentes y/o grupos funcionales para la unión y/o el acoplamiento preferentemente covalente de moléculas preferentemente orgánicas, en el que los sustituyentes y/o grupos funcionales se seleccionan del grupo de grupos amino, carboxilato, isocianato, tioisocianato, epoxi, tiol y hidroxilo, y en el que el fluoróforo (A) y el fluoróforo (B) están acoplados y/o unidos entre sí a través de un resto orgánico bivalente y/o divalente.
10. Uso de un complejo FRET según la reivindicación 9 para la detección de un acontecimiento en una muestra.
11. Uso de un complejo FRET según la reivindicación 9 para la interacción con una molécula diana y/o una estructura diana y/o para la detección y/o identificación y/o para la verificación de una molécula diana y/o una estructura diana, particularmente mediante la interacción del complejo FRET y/o del sistema FRET por un lado con la molécula diana y/o la estructura diana por otro lado.
12. Uso de un complejo FRET según la reivindicación 9 como colorante, particularmente colorante de fluorescencia, particularmente para fines de marcación.
13. Uso de un complejo FRET según la reivindicación 9 en o como biosensores o sin embargo en o como sondas, particularmente sondas FRET.

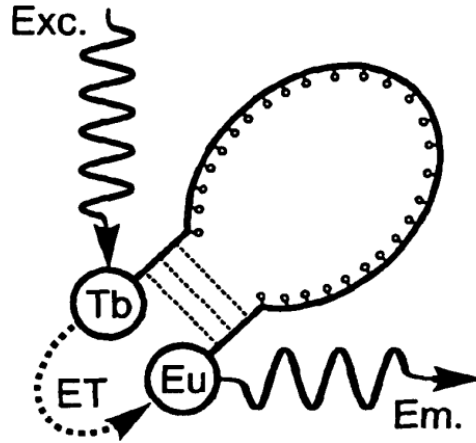


Fig. 1

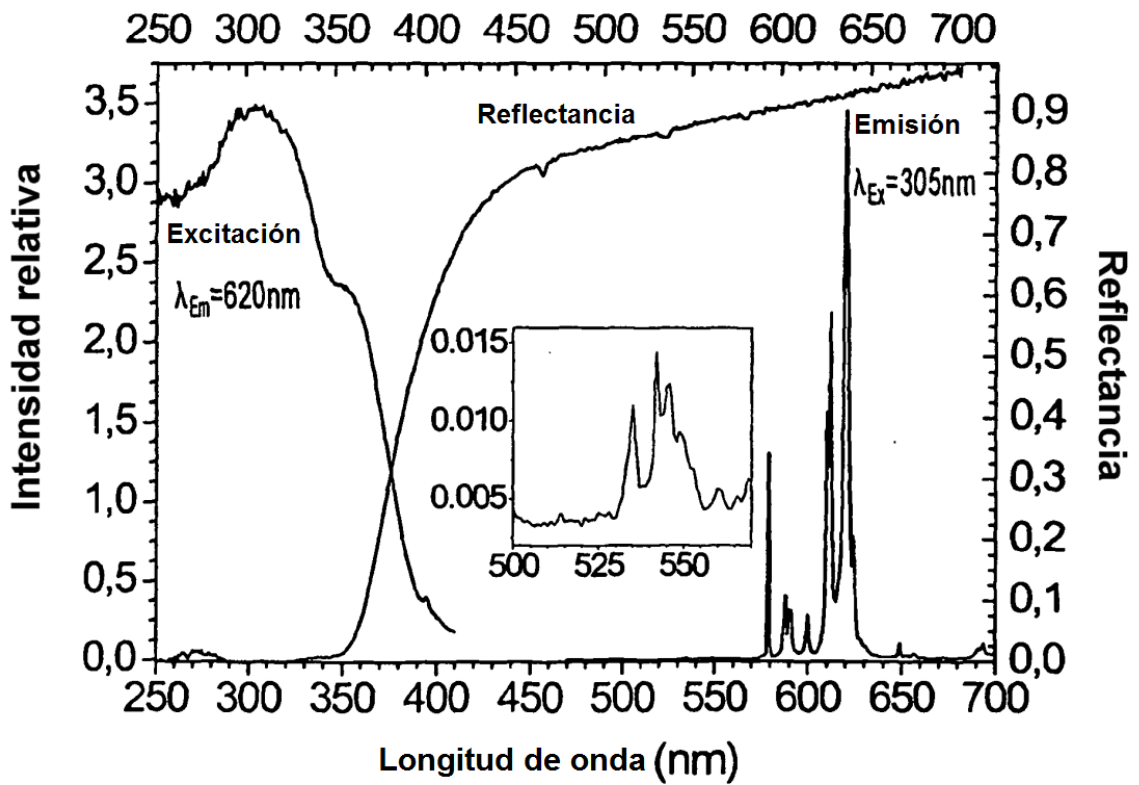


Fig. 2

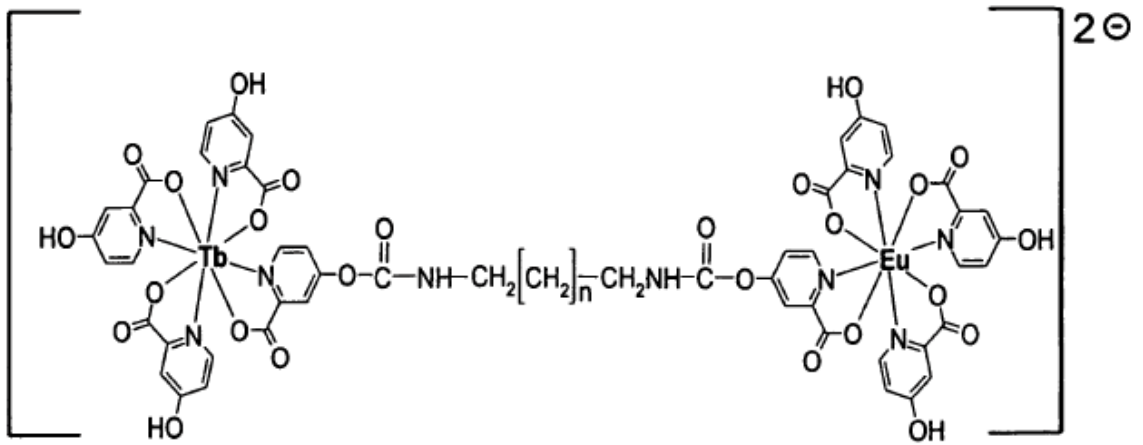


Fig. 3

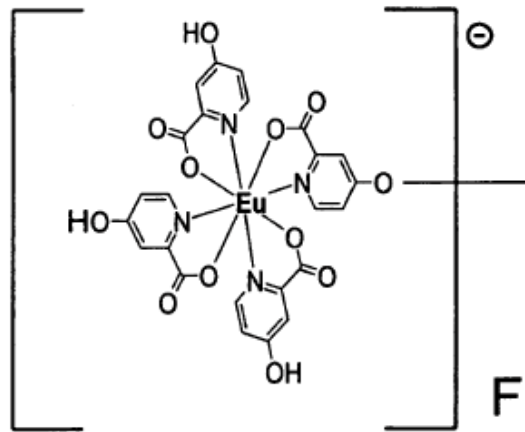


Fig. 4

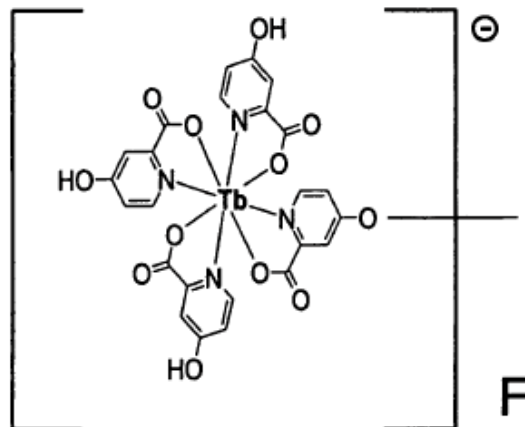


Fig. 5