

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 427**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2010 PCT/FI2010/050222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10109065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10715281 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2411809**

54 Título: **Método de ensayo de luminiscencia**

30 Prioridad:

24.03.2009 FI 20095302
24.03.2009 US 162752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.08.2017

73 Titular/es:

OY ARCTIC PARTNERS AB (100.0%)
Yliopistonkatu 2 H 155
20100 Turku, FI

72 Inventor/es:

SOUKKA, TERO y
LAMMINMÄKI, URPO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 631 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de ensayo de luminiscencia

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de bioensayo para detectar y/o cuantificar un analito.

5 Antecedentes de la invención

Se han desarrollado una gran cantidad de ensayos basados en reacciones de unión por bioafinidad o reacciones catalizadas enzimáticamente para analizar compuestos importantes biológicamente a partir de su actividad o de su efecto biológico o su modulación inducida mediante varias muestras biológicas, muestras en estudios medioambientales, procesos industriales y estudios de compuestos. Algunos de estos ensayos se basan en reacciones de reconocimiento por bioafinidad específica, donde por ejemplo, se usan componentes de unión biológica natural, compuestos de unión producidos artificialmente o impresiones de plástico moldeado (impresión molecular) como elementos de reconocimiento para formar el ensayo de unión específico. Otros estudios se basan en la actividad o modulación de la actividad de compuestos presentes en la muestra o añadidos en la reacción (por ejemplo, enzimas activas biológicamente, compuestos químicos con actividad sobre moléculas biológicas, sustratos enzimáticos, activadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, compuestos de modulación enzimática) etcétera. Tales ensayos se basan generalmente en un marcador o en una combinación de múltiples marcadores que generan señales para, por ejemplo, cuantificar los complejos formados después del reconocimiento y de reacciones de unión. En ensayos heterogéneos generalmente se requiere una etapa de separación (separaciones como la precipitación y centrifugación, filtración, recolección por afinidad hacia, por ejemplo, superficies plásticas, tales como tubos de ensayo recubiertos, portaobjetos o micropartículas, extracción con disolvente, filtración en gel, u otros sistemas cromatográficos, etcétera) antes de poder medir, por ejemplo, la fracción de unión o libre de la señal del marcador. En ensayos homogéneos la señal del marcador o marcadores se modula o forma debido a la reacción de unión o a la actividad enzimática u otro efecto medido, y no es necesaria la etapa de separación antes de medir la señal del marcador. Tanto en los ensayos heterogéneos como homogéneos, la medición de la señal del marcador a partir de la fracción de unión o fracción libre del marcador permite generalmente el cálculo del analito o la actividad en la muestra directa o indirectamente, generalmente a través de la utilización de una serie de estándares que se comparan con los no conocidos en las muestras. Se ha revisado varios métodos de ensayo de unión en *Principles and Practice of Immunoassay*, 2ª ed., C. P. Price y D. J. Newman, eds., Palgrave Macmillan, Hampshire, Reino Unido, 2001; y *The Immunoassay Handbook*, 2ª ed., David Wild, ed., Nature Publishing Group, Nueva York, NY, 2001.

El desarrollo de ensayos hibridación de ácidos nucleicos multiplexados, simples, sensibles, y cuantitativos, preferiblemente homogéneos, han sido un objetivo importante en la evolución de marcadores fluorescentes y en técnicas de detección. Los métodos homogéneos han recibido mucha atención, debido a que eliminan la necesidad de complicadas etapas de separación del marcador de unión o libre, y simplifican significativamente la construcción de un instrumento requerido para realizar un ensayo automáticamente. Además, los métodos homogéneos que se requieren para, por ejemplo, técnicas que implican monitorear el tiempo real de reacciones de amplificación de ácido nucleico [Higuchi, R., et al. (1992) *Biotechnology* 10: 413-417; Higuchi, R., et al. (1993) *Biotechnology* 11:1026-1030]. En la actualidad las tecnologías disponibles de marcaje adecuadas para monitorizar la hibridación de ácido nucleico no separativa y homogénea, se ven afectadas aún por la interferencia de las matrices de la muestra, las tecnologías no se pueden utilizar universalmente, por ejemplo, no son adecuadas para ensayos de 5' nucleasas [US 5.210.015], o simplemente no son capaces de realizar una detección suficientemente sensible utilizando una lectura rápida requerida, o la instrumentación requerida para la detección es demasiado compleja o cara para construirla o miniaturizarla de forma viable.

Las técnicas de detección homogéneas basadas en la fotoluminiscencia han recibido mucha atención, ya que se pueden emplear varios tipos de interacciones físicas y químicas para modular la emisión de marcadores fotoluminiscentes debido a la formación de complejos biomoleculares específicos. Los métodos que se emplean comúnmente se basan en la polarización de la luz emitida o de la transferencia de energía no radiactiva (transferencia de energía de resonancia) entre dos compuestos fotoluminiscentes (donador y aceptor) o entre un compuesto fotoluminiscente y uno no luminiscente (donador y inactivador (quencher de aquí en lo sucesivo)) [Hemmilä I, *Clin Chem* 1985;31:359-370].

Transferencia de energía de resonancia

La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) es una distancia fuertemente dependiente (para la razón inversa de la sexta potencia) del mecanismo de transferencia de energía no radiactiva entre dos moléculas fluorescentes elegidas adecuadamente presentes en una proximidad cercana [Förster, T (1948) *Ann Physik* 2: 55-75]. La transferencia de energía de resonancia (RET) aparece en la eficacia práctica cuando un fluoróforo donador y uno aceptor están dentro del radio de Förster (valores típicos 4-7 nm) y el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor se superponen. El RET se monitorea normalmente bien mediante la medición de un descenso de la intensidad de emisión del donador o bien mediante un aumento de la intensidad de emisión del

aceptor (conocida como emisión del aceptor sensibilizado) [Selvin, PR (1995) *Biochem Spectroscopy* 246: 300-334] resultantes de la proximidad del donador y el aceptor. En caso de que el aceptor sea no fluorescente (conocido como quencher) se monitorea un cambio en la intensidad de emisión del donador.

5 Aunque la FRET es una técnica esencial y que se emplea ampliamente en muchas aplicaciones, tiene graves limitaciones de rendimiento [Hemmilä, I (1985) *Clin Chem* 31: 359-370] y, en la práctica, las sondas RET no cumplen con los estrictos requerimientos de las sondas de proximidad eficaces. Las sondas de proximidad es una técnica capaz de detectar la cercanía de las dos sondas de proximidad y se emplea para la detección específica, sensible y rápida de varias biomoléculas. Una sonda de proximidad consiste normalmente en un resto de unión (elemento de reconocimiento) u otro lugar de reconocimiento (con afinidad específica por la molécula diana, es decir, el analito) y la molécula diana es capaz de dirigir la unión directa de dos sondas de proximidad iguales o diferentes dentro de posiciones adyacentes. La proximidad entre las sondas se proporciona, por tanto, cuando las dos sondas se unen, por ejemplo, a sus respectivos sitios de unión en una molécula diana. Características de las sondas de proximidad eficaces es que no generen ninguna señal significativa (es decir, no sean detectables) cuando el par de la sonda no se dirige en una proximidad inmediata mediante la molécula diana, pero el par de la sonda se activa a un estado detectable debido a los sucesos de reconocimiento específicos en presencia de la molécula diana. Se han descrito sondas de proximidad empleando sondas de proximidad monovalentes, realizadas en disolución sin etapas de lavado, en WO 01/61037; Schallmeiner et al. (2006) *Nature Methods* 4:135-137 y WO/2003/044231.

Los ensayos basados en FRET convencional son susceptibles de i) dirigir la excitación del aceptor (el aceptor se excita débilmente a la misma longitud de onda cuando se excita el donador), ii) solapar la emisión del donador (el donador tiene algo de emisión en la misma longitud de onda donde se mide la emisión del aceptor), iii) transferir la energía radiactiva (menos dependiente de la distancia; inversa a la segunda potencia) a través de la absorción de la emisión del donador (fotones) mediante los fluoróforos aceptores no necesariamente en proximidad, y iv) dispersar la excitación de la luz y la fluorescencia (a partir de la muestra, de otros componentes del ensayo, plásticos y de la detección del propio instrumento) generando la señal de fondo. Por tanto, los fluoróforos convencionales y las sondas RET no proporcionan la generación de la señal específica requerida para el principio de unión de la sonda de proximidad. Además, es difícil medir más de dos parámetros simultáneamente en un ensayo basado en FRET multiparamétrico, debido a la amplia cobertura espectral de un par donador-aceptor individual.

Fluorimetría en tiempo resuelto

La sensibilidad de detección de las técnicas basadas en la fluorescencia convencional se limita mediante autofluorescencia, excitación dispersa de la luz y absorbancia de matrices de una muestra biológica, y a ensayos basados en la transferencia de energía de resonancia basados en el aceptor, así como también al solapamiento de la emisión del donador en la longitud de onda de emisión específica del aceptor y la excitación directa del aceptor en la longitud de onda de excitación específica del donador. Muchos compuestos y proteínas que se presentan en los fluidos biológicos o en la sangre son fluorescentes de forma natural, y el empleo de fluoróforos convencionales conduce a serias limitaciones de sensibilidad [Soini E y Hemmilä I (1979) *Clin Chem* 25: 353-361; Wu P y Brand L (1994) *Anal Biochem* 218:1-13]. Otro gran problema cuando se emplean técnicas de fluorescencia homogéneas basadas en mediciones de intensidad, es el efecto de filtrado interno y la variabilidad de las propiedades ópticas de una muestra. La dilución de la muestra se ha empleado para corregir este inconveniente, pero siempre a expensas de la sensibilidad analítica. La viabilidad de la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia en las aplicaciones de ensayo, se mejoró significativamente cuando se emplearon como donadores criptatos y quelatos de lantánido con una emisión de vida larga y con un gran desplazamiento de Stokes, en los años 90 [Mathis G (1993) *Clin Chem* 39:1953-1959; Wu P y Brand L (1994) *Anal Biochem* 218, 1-13; Selvin PR et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91:10024-10028; Stenroos J et al. (1998) *Cytokine* 10:495-499; WO 98/15830; US. 5.998.146; WO 87/07955; Blomberg, K et al. (1999) *Clin Chem* 45:855-61].

Los quelatos y criptatos de lantánido, debido a su detectabilidad mejorada en comparación con los fluoróforos orgánicos tradicionales, se emplean ampliamente hoy en día en el análisis de varias moléculas biológicas. Los quelatos de lantánidos luminiscentes (alcalinotérreos, por ejemplo, europio trivalente, terbio, samario y disprosio) son un grupo excepcional de compuestos fotoluminiscentes [Bünzli, JCG y Piguet, C (2005) *Chem Soc Rev* 34: 1048-1077]. Los mismos iones de lantánido tienen una absorción muy baja y, además, el estado excitado del lantánido se extingue eficazmente mediante moléculas de agua coordinadas. Por tanto, la sola disolución viable para su excitación se emplea en un ligando coordinador que comprende un resto de fotocaptación, tal como un cromóforo antena orgánico en el quelato de lantánido (III) intrínsecamente luminiscente. En la práctica, la eficacia fotoluminiscente (producto del coeficiente de absorción y rendimiento cuántico) del ion quelato de lantánido para un ligando antena eficiente, que desplaza todas las moléculas de agua coordinadas, puede mejorar fácilmente hasta 100.000 veces en comparación con un ion descubierto. Además, las distintas bandas de emisión características del ion lantánido permiten la medición simultánea de hasta cuatro lantánidos diferentes con un solapamiento espectral mínimo. Las propiedades de luminiscencia de los lantánidos permiten también la separación eficiente del ruido de fondo desde la materia biológica, y por tanto, incrementan la sensibilidad del ensayo [J. Yuan, G. Wang (2005) *J Fluoresc.* 15, 559].

Los complejos de iones de lantánido para un quelato adecuado (por ejemplo, ácido aminopolicarboxílico) que contienen un resto antena de fotocaptación o cromóforo, poseen características de fluorescencia inusuales en

comparación con los fluoróforos convencionales: gran desplazamiento de Stokes (150-300 nm), distintas bandas estrechas de emisión y características para iones lantánidos, y larga vida de luminiscencia (hasta 2000 microsegundos). La excepcional vida de fluorescencia permite una separación de fondo eficiente mediante la selección de tal entrada temporal (normalmente cientos de microsegundos) que realizan la detección sólo cuando la fluorescencia de fondo (de corta vida) ha decaído, mientras que la luminiscencia del lantánido es aún razonablemente intensa. Por otra parte, el gran desplazamiento de Stokes y las bandas estrechas de emisión permiten que una longitud de onda eficiente se filtre para seleccionar espectralmente el lantánido luminiscente, dando como resultado una tecnología marcadorora altamente sensible (igual rendimiento para enzima amplificada por quimioluminiscencia) y que posibilita la medición multiparamétrica. La tecnología emplea un método de detección especializado conocido como (microsegundo) fluorometría en tiempo resuelto [Soni E y Kojola H (1983) *Clin Chem* 29: 65-68]. La gran vida de fluorescencia de los quelatos lantánidos luminiscentes se excita normalmente a una luz ultravioleta o azul visible [Yang C, et al. (2004) *Angew Chem Intl Ed* 43: 5010-5013] y la emisión se detecta en longitudes de onda verde y roja visible. En el caso del erbio, neodimio e iterbio, la excitación puede ser en longitudes de onda visibles y las emisión de onda visibles o infrarrojas [Werts, M.H.V., et al. (1997). *Chem Phys Lett* 276: 196-201]. También deberían considerarse el platino (III) y el paladio (III) por tener similares propiedades espectrales y temporales cuando se acomplejan a porfirinas [de Haas, R.R., et al (1999) *J Histochem Cytochem* 47: 183-196].

El mecanismo de excitación de los quelatos de lantánido(III), cuando se emplea una antena de fotocaptación orgánica para excitar el ión lantánido(III) emisor a través de transferencia de energía, es excepcional entre marcadores fluorescentes [Hemmilä, I. y Laitala, V.(2005) *J Fluoresc* 15: 529-542]. Los quelatos de lantánido (III) luminiscentes comprenden un grupo reactivo, una antena de fotocaptación y grupos quelantes, cuyo ión lantánido(III) del quelato se une mediante enlaces de coordinación. El cromóforo de fotocaptación orgánico se excita primero desde un estado singlete fundamental (S_0) hasta un primer estado singlete (S_1) mediante absorción de la luz, y el cromóforo experimenta la transición hasta el estado triplete (T_1) mediante cruce intersistema (ISC, de sus siglas en inglés). El estado triplete del cromóforo antena puede transferir la energía de excitación hasta un nivel apropiado de energía 4f del ión lantánido(III). Después, el ión lantánido produce una luminiscencia de transición f-f característica con diferentes bandas de emisión y con una vida de luminiscencia larga debido a una transición prohibida.

El desarrollo de una estructura de quelato lantánido estable que contiene una antena de fotocaptación eficiente resulta difícil inicialmente. El problema se evitó en ensayos heterogéneos mediante el marcaje del enlazador biomolecular con un quelato transportador iónico y empleando una disolución quelante separada (con pH bajo) para disociar el ión del quelato transportador para formar un nuevo complejo lantánido altamente fluorescente. El quelato transportador iónico empleado para el marcaje contiene, además del ión lantánido y el quelato transportador, un grupo reactivo para el acoplamiento covalente.

Los complejos quelato de metales (compuestos de coordinación) se forman a través de la unión del ligando (o molécula quelante) al ión metálico a través de grupos coordinados. El número total de puntos de unión del ligando al ión metálico central se denomina número de coordinación. Los ligandos se pueden caracterizar por puntos de unión, enumerándolos como monodentado, bidentado, etc., donde el concepto de dientes (dent) refleja el número de átomos unidos al metal central en el quelato. El quelato (o complejo quelato) es un compuesto que comprende al menos un solo ligando, que tiene al menos dos dientes (llamado bidentado), y al menos un ión metálico unido mediante el ligando. La estabilidad de los complejos quelato en disolución se describe mediante la magnitud de la constante de estabilidad (o formación) para la asociación del metal (cationes) a los ligandos (neutral o aniónico). La mayor constante de estabilidad (o formación), se acompleja con la mayor proporción del metal en presencia del ligando. Para la unión de múltiples ligandos se pueden definir constantes de estabilidad gradual y la constante de estabilidad es después el producto de las constantes de estabilidad gradual. Ya que las constantes de estabilidad pueden variar en decenas de magnitudes, el valor se expresa normalmente como logaritmo ($\log 10$). Los ligandos multidentados forman complejos de iones metálicos más fuertes que los de ligandos monodentados. Normalmente la constante de estabilidad aumenta con el número dentados de coordinación del ligando, pero así mismo la estructura del ligando es importante. Las estructuras en anillo o cíclicas reducen la libertad de las conformaciones del ligando de unión, a menudo también dan como resultado constantes de estabilidad mayores. La determinación de constantes de estabilidad para complejos de europio(III), se describe por ejemplo, por Wu, SL y Horrocks, WD (1997) *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 1497-1502. Normalmente los lantánidos cercanos en la tabla periódica (por ejemplo, Eu (III) y Gd (III)) tienen constantes de estabilidad muy similares con el mismo ligando.

La constante de estabilidad (o formación) describe la estabilidad máxima del quelato lantánido en condiciones alcalinas, donde el ligando está totalmente desprotonado y los protones no compiten significativamente con la unión del ión metálico. Las constantes de estabilidad condicional (también conocidas como constantes de formación eficaces), considerando el pH y la protonación del ligando, son más apropiadas para describir la estabilidad actual del complejo a, por ejemplo, pH fisiológico y condiciones predominantes normalmente en bioensayos. La descripción de los términos "Determinación de las constantes de estabilidad condicional para complejos de europio(III)" se describe, por ejemplo, por Siaugue, J.M. et al. (2003) *J Photochem Photobiol A: Chem* 156: 23-29.

Ejemplos de ambas constantes de estabilidad y constantes de estabilidad condicional a pH fisiológico, así como datos de estabilidad cinética, se describen en Morcos, S.K. (2007) "Chelates and stability", pp. 155-160 en *Medical*

Radiology, 2ª edición revisada por Thomsen, H.S y Webb, J.A.W, Springer, Berlín, 2009. Se recopila una gran colección de constantes de estabilidad para la base de datos de la constante de estabilidad IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) disponible comercialmente en Academic Software, Yorks, Reino Unido.

5 La técnica basada en un quelato transportador iónico y una disolución quelante separada se conoce como ensayo de fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos [US. 4.565.790; Hemmilä, I et al. (1984) *Anal Biochem* 137: 335-343; Soini, E y Lövgren, T (1987) *CRC Crit Rev Anal Chem* 18: 105-154; y Siitari, H et al. (1983) *Nature* 301: 258-260]. La tecnología se aplica ampliamente en ensayos de unión biomoleculares heterogéneos y después, se mejora la velocidad de la disociación mediante la utilización de un ligando antena que es capaz de formar el complejo lantánido a un pH inferior [WO 2003/076939, US 7.211.440, US 7.381.567 y EP 1 483 582]. Los ensayos basados en el aumento utilizan normalmente quelatos de transportadores iónicos de lantánido (III) basados en un aminopolicarboxilato moderadamente fuerte (tales como los derivados de EDTA y DTPA, descritos en, por ejemplo, US 4.822.594 y US 6.190.923) como reactivos marcadores y ligandos antenas basados en beta-dicetona en disolución aumentada para crear luminiscencia. También se han presentado quelatos transportadores iónicos y reactivos marcadores basados en DOTA y TETA [Hemmilä, I. (1995) *J. Alloys Comp* 225: 480-485]. Para derivar el ligando del marcador, por ejemplo, un ácido carboxílico de DOTA, se puede reemplazar por un grupo que se une a biomoléculas. Sin embargo, la estabilidad de los quelatos del transportador del ión lantánido(III) empleado para el aumento de la disociación, debería ser sólo moderada y las cinéticas de disociación bastante rápida a pH especialmente bajo, ya que en caso contrario, el ión no se libera lo suficientemente rápido para aumentar la fluorescencia. Por otra parte, el desarrollo de quelatos transportadores muy estables para el ión gadolinio(III), han sido el foco del desarrollo de agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética [Brücher, E (2002) *Topics in Current Chemistry* 221: 103-122; Morcos, S.K (2007) "Chelates and stability", pp. 155-160 en *Medical Radiology*, 2ª edición revisada por Thomsen, H.S. y Webb, J.A.W, Springer, Berlín, 2009; y Woods, M. et al. (2006) *Journal of Supramolecular Chemistry*, Vol 2., 1-15].

25 Se han desarrollado varios quelatos lantánidos intrínsecamente fluorescentes [Alpha, B et al. (1987) *Angew Chem Int Ed Engl* 26: 1266-1267; H. Takalo et al. *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 278; Takalo, H et al. (1997) *Helv Chim Acta* 80: 372-387; von Lode, P et al. (2003) *Anal Chem* 75: 3193-3201, Beeby, A. (2000) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1281-1283; Hakala, H. et al. (2002) *Inorg Chem Comm* 5: 1059-1062; Li, M. y Selvin, P.R. (1995) *JACS* 117: 8132-8138; y WO 2005/021538]. Estos complejos lantánidos luminiscentes y estables incluyen tanto a criptatos como a quelatos altamente luminiscentes (principalmente estructuras quelantes basadas en aminopolicarboxílico) para varios lantánidos [europio(III), terbio(III), samario(III) y disprosio(III)]. Los ligandos quelantes se diseñan para combinar una unión moderadamente fuerte o fuerte del ión lantánido (III) y la parte de fotocaptación a la misma molécula y se pueden utilizar como donadores en ensayos basados en FRET. En muchos de los quelatos, la parte de fotocaptación (que absorbe la energía) y la parte mediadora se compone de una piridina derivada o de múltiples piridinas. Algunas estructuras de antena contienen otras estructuras en anillo conjugado heteroatómico, tal como pirazol. Además del ión lantánido, del resto orgánico de fotocaptación y del ligando transportador, los complejos de lantánido intrínsecamente luminiscentes que se emplean para el marcaje, contienen un grupo reactivo para conjugación covalente.

40 El rendimiento de luminiscencia del lantánido se puede mejorar mediante co-luminiscencia basado en el aumento utilizando ligandos antena adicionales e iones lantánido no luminiscentes [por ejemplo, itrio(III) o gadolinio(III)] para absorber la excitación luminosa y transferir la energía a través de la migración triplete-triplete hasta un ligando antena coordinado a un ión lantánido luminiscente [por ejemplo, europio(III)], que se presenta bien en el mismo complejo lantánido polimérico auto-ensamblado o bien en el mismo ambiente micelar. La migración de la energía intermolecular mejora enormemente la cantidad de antenas de fotocaptación eficaces por lantánido luminiscente, y dan como resultado un aumento de la intensidad de luminiscencia de determinados iones lantánidos luminiscentes hasta cien veces o incluso más [Xu, YY et al. (1991) *Analyst* 116: 1155-1158; Latva, M et al. (1995) *J Chem Soc Perkin Trans 2* 995-999].

RET basado en lantánido

50 Se han introducido dos nuevos métodos basados en la transferencia de energía de resonancia empleando diferentes marcadores basados en lantánidos fotoluminiscentes [Mathis, G (1993) *Clin Chem* 39: 1953-1959; Blomberg, K et al. (1999) *Clin Chem* 45: 855-861] para resolver en gran medida los principales problemas asociados a los ensayos homogéneos basados en FRET convencional. Ambos métodos proporcionan significativamente ventajas en comparación con los métodos convencionales, pero la especificidad en la generación de la señal se limita aún por la transferencia de energía radiactiva (absorción de la emisión del donador), especialmente cuando las sondas marcadas se presentan en una concentración elevada (por ejemplo, para alcanzar un gran intervalo dinámico, o para facilitar la unión en caso de interacciones débiles) [H. Bazin, M. et al. (2001) *Spectrochim. Acta, Part A*, 57]. El exceso de aceptor sin unir da como resultado una señal de fondo radiactiva que decae lentamente hasta la señal de onda específica para el aceptor, pero la interacción del donador en la longitud de onda de medida puede incrementar la señal de fondo a menos que se utilice una resolución espectral suficiente. La utilización de un aceptor sin solapamiento (sin solapamiento FRET) con un donador quelato lantánido [Hemmilä, I. y Laitala, V. (2005) *Anal Chem.* 77:1483-1487; Laitala, V. y Hemmilä I. (2005) *Analytica Chimica Acta* 551: 73-78] puede eliminar además un posible fondo a través de la reabsorción de la emisión del donador.

En caso de un quelato (o criptato) lantánido fluorescente de vida larga como un donador en combinación con un aceptor fluorescente de vida corta, convencional [Mathis, G (1993) *Clin Chem* 39: 1953-1959; Blomberg, K et al. (1999) *Clin Chem* 45: 855-861] la transferencia de energía excitada por la emisión del aceptor, se puede resolver temporalmente (con fluorometría en tiempo resuelto) a partir de una vida corta, excitada directamente por la fluorescencia del aceptor y la fluorescencia de fondo. La interacción de la emisión del donador a la longitud de onda de emisión del aceptor se evita también casi por completo, debido a las estrechas bandas de emisión de "similar línea" de la emisión del donador. Se obtiene las mismas ventajas empleando la conversión ascendente de compuestos de matriz de lantánido (fotoluminiscente anti-Stokes) [Heer, S et al. (2004) *Adv Mater* 16: 2102-2105; Kuningas, K et al. (2005) *Anal Chem* 77: 7348-7355] como donadores en combinación con un aceptor fluorescente, convencional, y midiendo la transferencia de energía excitada específicamente por la emisión del aceptor en longitudes de onda visibles bajo excitación infrarroja del donador. La iluminación infrarroja que no excita directamente al aceptor fluorescente convencional no generan ninguna autofluorescencia a longitudes de onda visibles, y la emisión del donador de banda estrecha elimina eficazmente la interacción potencial.

La emisión anti-Stokes de nanocristales de matriz de lantánido de conversión ascendente aparece a longitudes de onda más cortas (a longitudes de onda visibles) que a la excitación infrarroja, proporcionando un gran desplazamiento anti-Stokes (hasta por encima de los 300 nm) y una separación espectral eficiente de la luz de excitación dispersa y autofluorescente (sin resolución temporal) a partir de la emisión a longitudes de onda visibles [Soukka, T. et al. (2005) *J Fluorescence* 15: 513-528]. La conversión ascendente es una característica única de determinados materiales basados en lantánido (a excepción de unos pocos metales de transición) capaz de convertir el infrarrojo a luz visible a través de una absorción no coincidente secuencial de dos fotones infrarrojos con una eficacia enormemente mejorada en comparación con la absorción de dos fotones simultáneos. El mecanismo de conversión ascendente se basa bien en un tipo de ión lantánido o bien en dos iones próximos de lantánido diferentes. Los iones de matriz de lantánido tienen estados excitados de vida larga, que funcionan como estados metaestables excitados a partir de un estado fundamental para excitarse de nuevo hasta un estado de emisión, o energía de transferencia, para otro ión lantánido. La conversión ascendente basada en lantánido puede proporcionar una detectabilidad extrema, como la que se observa en la fotoluminiscencia de fondo que es equivalente a la que se alcanza en la luminiscencia limitada incluso únicamente por la oscuridad y la sensibilidad del detector.

La conversión ascendente de quelatos se ha descrito en US 5.891.656, Xiao, X. et al. (2002) *Opt Lett.* 30: 1674-1676; y Faris GW y Hryndza M, *Proc SPIE – Int Soc Opt Eng* 2002; 4626: 449-452. En una conversión ascendente de un quelato de lantánido, un solo ión alcalinotérreo [por ejemplo, Er(III), Tm(III) o Ho(III)] o una combinación de diferentes iones lantánidos, está quelada a un ligando complejante mono o multinuclear o a ligandos múltiples [WO 2004/086049 y Soukka, T. et al. (2008) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1130: 188-200]. El ligando puede contener o no un ligando de estructura de fotocaptación. La eficacia de la colección luminosa de los iones individuales y de los ligandos quelados sin una estructura de fotocaptación es pobre, y requiere de una intensidad de excitación luminosa relativamente alta. Por lo tanto, la conversión ascendente de quelatos alcalinotérreos se puede diseñar para que contenga un ligando con estructuras de fotocaptación orgánicas o inorgánicas, por ejemplo, incorporar otro ión, tal como Yb(III). Las energías recogidas de dos o más fotones se transfieren uno después de otro, mediante procesos no radiativos intramoleculares desde el estado singlete hasta el estado triplete de la estructura orgánica, después del estado triplete hasta el nivel emisivo del ión alcalinotérreo secuencialmente, el cual emite entonces un único fotón de emisión característica.

Los ensayos de hibridación de ácido nucleico basado en la fluorescencia homogénea, se basan normalmente o bien en una sonda silenciada (donador y quencher en una sonda oligonucleótida que se disocia) [US 5.538.848] o dos sondas de transferencia de energía (sondas marcadas separadas, donadora y aceptora, que hibridan una a la otra en posiciones adyacentes). La Figura 1 describe una sonda que transfiere energía en base a un ensayo de hibridación, donde las dos sondas oligonucleótidas (1 y 2), marcadas con fluoróforos donador y aceptor (4 y 5, respectivamente) hibridan (6) en posiciones adyacentes en una secuencia diana complementaria (3). El aceptor se excita a una longitud de onda (λ_1) y se detecta la emisión del aceptor sintetizado (transferencia de energía excitada) (8), que es dependiente de la hibridación (7), a otra longitud de onda (λ_2). Aunque, la fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (FRET) es una tecnología extremadamente versátil, se limita especialmente en el ensayo basado en la sonda de transferencia de energía por la eficacia de la transferencia de energía (señal relativamente baja) y fondo a través de la reabsorción de la emisión del donador (limitado intervalo dinámico). Además, el ensayo basado en la sonda silenciadora requiere el marcaje específico con dos tintes diferentes, y es dependiente de la especificidad de sólo un único suceso de hibridación.

Se han presentado diferentes métodos para la monitorización a tiempo real de la amplificación de ácido nucleico por Koch, W.H (2004) *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 749-761. Por ejemplo, se ha presentado un par FRET que emplea un tinte acoplado a un cebador y otro acoplado a una sonda que hibrida adyacentemente, por Lay, M. J. et al. (1997) *Clinical Chemistry* 43: 2262-2267; un par FRET que emplea dos sondas marcadas de forma diferente que hibridan adyacentemente por Bernard, P.S., et al. (1998) *American Journal of Pathology* 153: 1055-1061; y el par FRET de hibridación competitiva marcado con sondas complementarias por Kiviniemi, et al. (2005) *Clinical Biochemistry* 38: 1015-1022.

La viabilidad de la tecnología de marcaje de lantánidos en ensayos basados en fluorescencia de extinción, ha sido descrita [Karvinen J et al. (2002) *J Biomol Screen* 7:223-231; Karvinen, J et al. (2004) *Anal Chem.* 76:1429-36; Karvinen, J et al (2004) *Anal Biochem.* 325: 317-25].

5 Se han presentado dos planteamientos para la hibridación dependiente de la formación de complejos de lantánido fluorescentes. El primer planteamiento se basó en un par de oligonucleótidos que forman un complejo de terbio(III) fluorescente tras la hibridación; un oligonucleótido se marcó con DTPA-terbio(III) (quelato de terbio no fluorescente) y el otro con salicilato donador de energía (ligando de fotocaptación) [Oser A y Valet G (1990) *Angew Chem Int Ed Engl* 29: 1167-1169]. El segundo planteamiento se basó en la formación similar de un complejo europio(III) fluorescente pero que requiere la hibridación de una sola sonda; la sonda oligonucleótida se marcó con EDTA-terbio(III) (quelato de europio no fluorescente) y se acopló un compuesto donador de energía a un agente intercalante capaz de unirse al ADN bicatenario [Coates et al. (1994) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2311-2312; Mullins ST et al. (1996) *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1991: 85-81; Coates J et al. *J Chem Soc, Chem Commun* 1995: 2311-2312; US 5.827.653 y WO 95/08642]. El primer planteamiento se ha empleado también después [Wang et al. (2001) *Analytical Biochemistry* 299, 169-172; Yuang y Wang (2005) *Journal of Fluorescence* Vol. 15, N° 4, Julio, 559-568; Kitamura Y. et al. (2008) *Journal of Inorganic Biochemistry* Vol 102, N° 10, 1921-1931; y Kitamura, Y. et al. (2006) *Nucleic Acids Symposium Series*, N° 50, 105-106].

Las sondas sensor basadas en complejo de lantánido, se han descrito para la detección de iones metálicos, por ejemplo, por Leonard, J.P. y Gunnlaugsson, T. (2005) *Journal of Fluorescence*, 15:585-595 y Viquier y Hulme (2006) *Biology, J. Am. Chem. Soc.*, 128: 11370-11371. Para cationes metálicos estos sensores funcionan de una manera competitiva y empleando un efecto antena, donde la unión del ligando antena al ión lantánido se bloquea mediante otro ión metálico presente en la disolución.

El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa basada en la 5'-nucleasa (TaqMan; Applied Biosystems, Ciudad de Foster, CA) es un método de detección de la secuencia de ácido nucleico, en donde una sonda oligonucleótida auto-extinguible monocatenaria, que contiene tanto un resto fluorescente como un resto silenciador, se separa por la acción nucleasa de la polimerasa de ácido nucleico en la hibridación durante la amplificación del ácido nucleico [Lie YS, Petropoulos CJ. (1998) *Curr Opin Biotechnol.* 9: 43-48; y Orlando C et al. (1998) *Clin Chem Lab Med.* 36: 255-269].

Las balizas moleculares son sondas de hibridación oligonucleótidas monocatenarias que forman una estructura de horquilla [Tan W et al. (2004) *Curr Opin Chem Biol.*; 8: 547-553; y Tan W et al. (2000) *Chemistry*; 6: 1107-1111]. El bucle contiene una secuencia en la sonda de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia diana, y la horquilla se forma por reasociación de los brazos de las secuencias complementarias que se localizan en cada lado de la secuencia de la sonda. Un resto fluorescente se une covalentemente al extremo de un brazo, y el quencher se une covalentemente al extremo del otro brazo. Debido a la proximidad de un resto fluorescente y un resto quencher a las balizas moleculares con un resto quencher, no es fluorescente cuando están en disolución libre. Sin embargo, cuando se hibridan a una cadena de ácido nucleico complementaria que contiene una secuencia diana, se someten a un cambio conformacional que incrementa la distancia entre el resto fluorescente y el resto quencher, que hace posible que la sonda se vuelva fluorescente. En ausencia de una secuencia diana complementaria, la sonda baliza se mantiene cerrada y no hay fluorescencia debido a la extinción intramolecular.

Tanto las sondas fluorescentes auto-extinguibles como las balizas moleculares se utilizan también para procesos de amplificación de ácido nucleico en un termociclador, por ejemplo, en una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, la cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado, o tras el ciclo, depende de la cantidad de producto específico. Las sondas se unen a la diana amplificada después de cada ciclo de amplificación dando como resultado una señal en la hibridación, y en el caso de sondas Taqman en la separación, que es proporcional a la cantidad de la secuencia oligonucleótida amplificada. La fluorescencia se mide durante cada etapa de reasociación, cuando la baliza molecular se une a su diana complementaria, o después de la etapa de elongación, cuando se separa la sonda Taqman. Después se utiliza la información durante la PCR cuantitativa o RT-PCR cuantitativa (PCR transcriptasa inversa) en experimentos para cuantificar el número de copia inicial de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada basada en un número de ciclo límite. Para el análisis final, las reacciones PCR o RT-PCR que contienen balizas moleculares pueden correr sobre cualquiera de los 96 pocillos del termociclador, y leerse después en un lector de fluorescencia.

El análisis de proteínas basado en sondas de proximidad específica y sensitiva, se ha descrito en el diagnóstico médico y potencial por Gustafsdottir, S.M. (2005) *Anal Biochem* 345: 2-9 utilizando la unión de proximidad de dos sondas oligonucleótidas.

Objetivo y compendio de la invención

55 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de bioensayo para detectar y/o cuantificar un analito.

La presente invención proporciona un método de bioensayo para detectar y/o cuantificar un analito, como se presenta en la reivindicación 1 independiente adjunta.

Un método de bioensayo para detectar y/o cuantificar un analito que emplea un primer grupo que comprende un quelato transportador iónico de lantánido y un primer elemento de reconocimiento, en donde dicho quelato transportador de ión lantánido comprende un ligando transportador iónico lantánido y un ión lantánido; y un segundo grupo que comprende un ligando antena y un segundo elemento de reconocimiento; en donde dicho quelato transportador de ión lantánido se une, en las condiciones predominantes en dicho método de bioensayo, lo suficientemente fuerte a dicho lantánido, para dar como resultado un ión lantánido presente esencialmente en forma no libre, es decir, que es menos de 1 nmol/L, preferiblemente menos de 10 pmol/L, y un agente que se acompleja a dicho ión lantánido a una concentración de al menos 1 pmol/L que se emplea adicionalmente; y dicho ligando antena se une débilmente a dicho ión lantánido, es decir, dicho ligando antena es bien monodentado, bidentado, tridentado o tetradentado; y en donde el reconocimiento de dicho analito mediante dicho primer elemento de reconocimiento de dicho primer grupo y mediante dicho segundo elemento de reconocimiento de dicho segundo grupo da como resultado o bien

- i) un quelato de complementación, es decir, la formación de un complejo quelato de lantánido mixto a través de la complementación de dicho quelato transportador de ión lantánido que transporta dicho lantánido con dicho ligando antena, y por consiguiente, incrementa la fluorescencia; o bien
- ii) un quelato de discomplementación, es decir, dicho quelato transportador de ión lantánido que transporta dicho lantánido, se separa de dicho ligando antena, y por consiguiente, desciende la fluorescencia.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un ensayo de hibridación basado en un par de sondas de transferencia de energía y la medición de la energía de transferencia entre el donador y el aceptor después de la hibridación. El par de sondas se hibrida a la secuencia diana próxima la una a la otra.

La Figura 2 ilustra un ensayo de complementación de un quelato lantánido dirigido a un oligonucleótido utilizando dos sondas separadas que hibridan la una a la otra en una secuencia diana (planteamiento de la sonda de proximidad) facilitando que los restos marcados formen un complejo fluorescente.

La Figura 3 ilustra un ensayo de complementación de un quelato lantánido dirigido a un oligonucleótido utilizando una sonda marcada dualmente con extremos terminales que hibridan la una a la otra en una secuencia diana (sonda tipo candado) facilitando que los restos marcados formen un complejo fluorescente.

La Figura 4 ilustra un ensayo de complementación de un quelato lantánido dirigido a un oligonucleótido utilizando una sonda marcada dualmente con extremos terminales que tienen secuencias complementarias que hibridan el uno al otro (sonda de tipo baliza molecular) facilitando que los restos marcados formen un complejo fluorescente. Las secuencias de en medio hibridan a una secuencia diana dando como resultado un cambio conformacional de la sonda que retira el complejo fluorescente y da como resultado un descenso de la fluorescencia.

Las Figuras 5/i-iv muestran ejemplos de estructuras químicas esquemáticas de ligandos antena de fotocaptación aplicables a la complementación del quelato lantánido. Las abreviaturas L y Z se emplean para representar partes alternativas de las estructuras químicas.

La Figura 6 muestra ejemplos de estructuras esquemáticas para partes alternativas L (a-h) y Z (j-l) de las antenas de fotocaptación presentadas en las Figuras 5/i-iv.

Las Figuras 7/i-iii muestran ejemplos de estructuras químicas esquemáticas de quelatos transportadores de lantánido(III), las estructuras f) a n) presentan las estructuras de quelato macrocíclico iónico aplicables a la complementación del quelato de lantánido según la invención.

La Figura 8 muestra estructuras esquemáticas de a) un quelato transportador de europio(III) N^1 -(4-isotiocianatobenzil)dielilenotriamina- N^1, N^2, N^3, N^3 -tetrakis(acetato)europio(III) (Eu^{3+} -N1; quelato transportador iónico) y b) un ligando antena de fotocaptación, ácido 4-((isotiocianatofenil)etilnil)piridina-2,6-dicarboxílico (antena-3d) empleado en los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 5; intrínsecamente fluorescente c) quelato de europio(III) $\{2,2',2'',2'''\text{-}[[4\text{-isotiocianatofenil}]\text{etilnil}]\text{piridina-2,6-diil}\text{-bis}(\text{metileno-nitrilo})\text{tetraquis}(\text{acetato})\text{europio(III)}$ (Eu^{3+} -7d; quelato de lantánido fluorescente) empleado en el Ejemplo 2 y d) quelato de transportador de europio(III), quelato de europio(III) de ácido 2,2',2''-(10-(3-isotiocianatobenzil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)-triacético empleado en el Ejemplo 8.

La Figura 9 presenta los resultados del ensayo de hibridación homogéneo descrito en el Ejemplo 1. La fluorescencia en tiempo resuelto después de la hibridación del par de sonda marcada (10 nM: cuadrado; 50 nM: círculo) con incremento de la concentración del oligonucleótido diana. *Cts* se refiere a los *recuentos*. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

La Figura 10 ilustra el espectro de emisión de fluorescencia de un a) complejo dirigido hacia oligonucleótido formado por una sonda A- Eu^{3+} -N1 y una sonda B-antena-3d con 0 nM (línea discontinua) y 10 nM (línea continua gruesa) de

oligonucleótido diana, y b) una sonda C-Eu³⁺-7d obtenida en el Ejemplo 2. El espectro de extinción de la emisión instalada del complejo que se forma de la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena-3d con 10 nM de oligonucleótido diana, y el espectro de extinción de la sonda C-Eu³⁺-7d, se presentan en los insertos de la figura. *A.u* se refiere a *unidad arbitraria*.

- 5 La Figura 11 presenta los resultados de un ensayo de hibridación heterogéneo basado en una sonda de proximidad descrito en el Ejemplo 4. La fluorescencia en tiempo resuelto después de la incubación de a) una sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena con un incremento de la concentración del oligonucleótido diana biotinilado, y b) la sonda A-Eu³⁺-7d con incremento de la concentración del oligonucleótido diana biotinilado. *Cts* se refiere a *recuentos*.

- 10 La Figura 12 ilustra los conjugados de biotina empleados en el ensayo basado en la sonda de proximidad para estreptavidina y avidina en el Ejemplo 5. a) antena (+)-biotinil-hexanodiamina-3d y b) (+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina- Eu³⁺-N1.

- 15 La Figura 13 presenta los resultados del ensayo de estreptavidina y avidina descrito en el Ejemplo 5. La fluorescencia en tiempo resuelto después de la incubación de la antena (+)-biotinil-hexanodiamina y b) (+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina- Eu³⁺-N1 con incremento de la concentración de a) estreptavidina o b) avidina. *Cts* se refiere a *recuentos*.

La Figura 14 muestra las estructuras de a) un quelato transportador de terbio(III) N¹-(4-isotiocianatobenzil)dielentriammina-N¹, N², N³, N³-tetraquis(acetato)terbio(III) (Tb³⁺-N1; quelato transportador), y b) ligando antena de fotocaptación de ácido 4-(3-(4-isotiocianatofenil)-2,4,6-trimetoxifenil)piridina-2,6-dicarboxílico (antena-TMP) empleado en el Ejemplo 6 y en el Ejemplo 7.

- 20 La Figura 15 presenta los resultados de un ensayo de hibridación homogéneo descrito en el Ejemplo 6. La fluorescencia en tiempo resuelto después de la hibridación del par de sonda marcada (10 nM: cuadrado; 50 nM: círculo) con incremento de la concentración del oligonucleótido diana. *Cts* se refiere a *recuentos*.

- 25 La Figura 16 muestra el espectro de emisión de fluorescencia del oligonucleótido dirigido al complejo formado por la sonda A-Tb³⁺-N1 y la sonda B-TMP-antena con 0 nM (línea discontinua) y 10 nM (línea continua gruesa) del oligonucleótido diana obtenido en el Ejemplo 7. En la figura inserta se presenta el espectro de extinción de emisión del complejo formado por la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena-3d con 10 nM del oligonucleótido diana.

- 30 La Figura 17 presenta los resultados del ensayo de complementación del quelato dirigido por el oligonucleótido (OCCA) descrito en el Ejemplo 8. Amplificación y detección de 100.000 (◇), 10.000 (+), 1.000 (Δ), 100 (□) y 0 (x) moléculas patrón. La gráfica muestra la señal de fluorescencia medida cada segundo del ciclo PCR comenzando en el ciclo 10.

Descripción detallada de la invención

- 35 Los ensayos bioanalíticos modernos para la medición del analito, se basan en el reconocimiento biomolecular y el empleo de un resto marcador detectable; por ejemplo, un marcador fluorescente, para facilitar una lectura rápida. Los avances en los marcajes y en las tecnologías de detección, han dado como resultado que el marcador per sé no limite la sensibilidad, pero que la señal se genere a través de interacciones no específicas del reactivo marcado. Estas interacciones dependen de factores poco controlables, y que son practicablemente imposibles de evitar.

- 40 La detección del analito de "copia única" se ha demostrado con tecnologías innovadoras recientes que facilitan la generación de una señal con especificidad mejorada. Estos métodos, tales como los ensayos de unión por proximidad, donde la generación de la señal es dependiente de la unión de dos sondas oligonucleótidas, es aún demasiado complicada para aplicaciones prácticas. El requerimiento absoluto para una modulación estricta de la señal del marcador desde un estado totalmente oscuro hasta un estado brillante inducido mediante el reconocimiento de dos eventos, es aún un problema sin resolver con tecnologías de marcaje simple. Sólo un contacto molecular basado en un mecanismo de conmutación del estado completo, permitirá una especificidad adecuada para la generación de la señal, e incluso los métodos de detección de proximidad basados en la mejor transferencia de energía de resonancia de Förster no cumplen con esto.

- 45 Los inventores han descubierto que los lantánidos pueden proporcionar un planteamiento único para realizar una tecnología de marcaje con un grado extraordinario de modulación, mediante la separación del quelato transportador de ión del lantánido y el ligando antena de fotocaptación para diferentes restos marcadores. Ellos han resuelto cómo construir un sistema de marcaje basado en una sonda de proximidad conmutable, donde el estado oscuro del marcador no produce fluorescencia, el cual ha sido un problema en la técnica descrita anteriormente. El enfoque propuesto supera las limitaciones de las FRET, y hace posible una fluorescencia real basada en una tecnología de marcaje dependiente de la proximidad, de alta actividad específica. La generación de la señal es estrictamente dependiente del auto-ensamblado y de la complementación del quelato (contacto molecular entre los dos restos marcadores) guiado por otros eventos de reconocimiento. Se puede construir, por tanto, un sistema de marcaje basado en un lantánido de complementación mediante la utilización de dos restos marcadores, un quelato transportador de iones no fluorescente, y un ligando antena separado, y auto-ensamblado del quelato luminiscente de larga vida (contacto molecular en la orientación correcta) a través de dos eventos de reconocimiento simultáneos

que guían los restos conjuntamente. Este enfoque basado en la fluorescencia de vida larga del lantánido, proporciona ventajas significativas sobre el estado de la técnica, y se pueden extender, además, a la conversión ascendente y a la fotoluminiscencia anti-Stokes.

5 Según una realización de la presente invención, el reconocimiento del analito mediante dos elementos de reconocimiento separados produce una proximidad cercana del quelato transportador del ión lantánido y el ligando antena, permitiendo la complementación del quelato, es decir, la formación de un complejo de lantánido mixto, y consecuentemente el incremento de la intensidad de la luminiscencia del lantánido en disolución acuosa.

10 Es característico de la presente invención que se facilite una conmutación completa de la luminiscencia del lantánido desde el estado oscuro (estado no luminiscente) hasta el estado luminoso (estado luminiscente) (o viceversa) y que no se presente una fluorescencia de fondo significativa, al contrario que en métodos de técnicas anteriores, donde la modulación de la luminiscencia del lantánido se limita mucho debido a la fluorescencia de fondo observable.

15 El principio de la complementación del quelato de lantánido dirigida mediante hibridación oligonucleótida, se ilustra en la Figura 2. Una sonda oligonucleótida (1) se marca con un quelato transportador del ión lantánido (4) y otra sonda (2) con un ligando antena de fotocaptación (5). Cuando se añade una secuencia nucleótida diana (3) con secuencias complementarias adyacentes a las dos sondas marcadas (6), se forma un ácido nucleico híbrido bicatenario (7) que dirige el auto ensamblado del quelato mixto, y la formación de un complejo altamente fluorescente (8). Las secuencias de las sondas (que incluyen el sitio de conjugación para el ligando) y los ligandos (longitud y composición, que incluyen orientación y rigidez) se seleccionan para que las dos partes del marcador, es decir, el quelato transportador iónico y el ligando antena, produzcan una proximidad cercana en la posición correcta para facilitar el auto ensamblado del quelato mixto. Cuando se forma el complejo, la fluorescencia se excita a una longitud de onda (λ_1) y se mide la emisión a otra longitud de onda (λ_2) al mismo tiempo o, en una fluorometría de tiempo resuelto, después de un breve retraso tras la excitación. Esta invención comprende combinaciones de quelatos de lantánido y estructuras de ligandos unidos a oligonucleótidos separados, y su empleo en un ensayo de complementación mejorado de un quelato de lantánido dirigido por un oligonucleótido. Los inventores han encontrado que la complementación del quelato de lantánido dirigido por oligonucleótido proporciona un enorme potencial a explorar. Los quelatos, ligandos y condiciones empleados se han seleccionado previamente con los mejores conocimientos, pero proporcionan un rendimiento deficiente (menos de 3 veces la modulación de la señal). [Oser, A y Valet, G (1990) *Angew Chem Int Ed Engl* 29: 1167-1169; Wang, GL et al. (2001) *Anal Biochem* 299: 169-172; y US 6.242.268]. El grado de modulación obtenido en todos los ejemplos anteriores han sido muy modestos (menos de tres veces), es decir, la conmutación de la fluorescencia del lantánido ha sido incompleta debido a la fluorescencia de fondo significativa y fácilmente observable desde el estado oscuro del sistema de marcaje, y no se han descrito mejoras a lo largo de los años. Los inventores han observado ahora que esta modulación de la fluorescencia se puede mejorar hasta 1.000 veces mediante la selección de una combinación apropiada del ligando antena de fotocaptación, del quelato transportador iónico, y de un compuesto quelante iónico adicional. Esto es una mejora enorme, como la mejor modulación típica obtenida en ensayos de hibridación tipo FRET convencional, alrededor de 20 veces, de la que sólo se había obtenido previamente una modulación de 3 veces basada en la formación de un complejo de quelato lantánido mixto. En ensayos de complementación de quelato de lantánido se alcanza un alto grado de modulación, a través de la utilización de un estricto requerimiento del quelato de complementación para la generación de la señal. Las mejoras dan como resultado que el ión lantánido que no está esencialmente libre, se presente disponible en disolución para formar complejos fluorescentes con múltiples ligandos antena. Los inventores han encontrado que estas mejoras son también esenciales para permitir que los ensayos de complementación del quelato se empleen, con un alto grado de modulación, a temperaturas elevadas, por ejemplo, en condiciones que prevalecen durante la reacción en cadena de polimerasa.

45 El complejo mecanismo de excitación del lantánido se puede considerar el trampolín para la presente invención de un nuevo sistema de marcaje basado en un lantánido de complementación: el quelato de lantánido(III) no-fluorescente (quelato transportador iónico) se conmuta a una forma altamente fluorescente mediante complementación del complejo de quelato con un ligando antena de fotocaptación adicional. Para el ensayo basado en el principio de la sonda de proximidad, el quelato transportador (que contiene el ión) y el ligando antena, se unen a dos sondas de unión biomolecular diferentes (por ejemplo, oligonucleótidos), que no interaccionan en disolución a concentraciones (submicromolares) que se emplean generalmente en ensayos bioanalíticos y, por tanto, no se observa fluorescencia en la excitación (el marcador está en un estado oscuro). Sin embargo, cuando las dos sondas se llevan a posiciones estrechamente próximas, como resultado del reconocimiento simultáneo de la molécula diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico complementario), el ligando antena se coordina al quelato transportador del ión lantánido (formando un quelato mixto) y el ión lantánido produce una fuerte fluorescencia en la excitación (el marcador se conmuta al estado fluorescente). La complementación del quelato transportador con el ligando antena requiere el contacto molecular en la orientación correcta entre el ligando antena y el ión lantánido central. El proceso es exactamente auto-ensamblante, cuando la concentración local eficaz favorece la unión incluso a través de interacciones débiles de coordinación, cuando tanto el quelato transportador como el ligando antena se anclan en una estrecha proximidad.

60 Según la invención, el quelato transportador iónico se tiene que diseñar para unir fuertemente el ión lantánido; es decir, para formar un complejo estable tanto termodinámica como cinéticamente, con una alta constante de estabilidad; el grado de coordinación preferido (número de dientes) es de cinco y preferiblemente mayor, tal como

seis o siete de un total de sitios de coordinación del ión lantánido de nueve, dejando por tanto, al menos uno, pero preferiblemente dos o tres sitios de coordinación, para la unión del ligando antena. La estabilidad de los ligando aumenta, por ejemplo, en series de EDTA, DTPA, DO3A, DOTA (el más estable). En ausencia del ligando antena, los sitios de coordinación libres del ión lantánido se ocupan por moléculas de agua, extinguiendo eficazmente cualquier fluorescencia del lantánido residual. El ligando antena, sin embargo, debe tener sólo una fuerza de unión débil; el grado de coordinación adecuado es el más similar a dos o tres (referente a ligandos bidentados o tridentados) y las estructuras adecuadas son, por ejemplo, los ligandos de fotocaptación descritos en una solicitud de patente reciente [WO 2005/021538] para la construcción de quelatos antena triples basados en aza-coronas. La estructura preferida del ligando de fotocaptación orgánico (nivel de energía del estado triplete) es dependiente del lantánido, y por tanto, se prefieren diferentes ligandos antena para, por ejemplo, iones terbio(III) y europio(III).

Según la invención, la señal es estrictamente dependiente de la proximidad del quelato transportador iónico y el ligando antena, y para alcanzar la alta especificidad de complementación del quelato, la concentración del ión lantánido libre se mantiene mínima, mediante la selección apropiada del quelato transportador iónico, o mediante la adición de un agente complejante para quelar el ión lantánido libre, y evitar la formación de complejos fluorescentes que no comprenden el quelato transportador iónico. El agente complejante se elige preferiblemente para que sea selectivo para el ión lantánido. Los inventores han observado, que la unión del ligando antena de fotocaptación al quelato transportador iónico (y también al ión quelado mediante el agente complejante) es más difícil que la unión al ión libre, y por tanto, es esencial mantener la mínima concentración del ión lantánido libre para llevar a cabo la generación de la señal estrictamente específica y dependiente sólo de la complementación del quelato, controlada mediante unión molecular y por la proximidad del quelato transportador iónico y del ligando antena.

La combinación del quelato transportador iónico y el ligando antena, se selecciona para que el ligando transportador iónico sea un ligando multidentado que forme un complejo estable (o muy estable) entre el ión lantánido, dejando al menos uno de los sitios de coordinación sin ocupar (pero preferiblemente no más de cuatro), facilitando, por tanto, la unión del ligando antena y la formación de un complejo, donde preferiblemente todos los sitios de coordinación del lantánido se ocupan por cualquiera de los ligandos, reemplazando de esta manera las moléculas de agua coordinadas. La combinación se puede seleccionar para que la unión completa del ligando antena pueda requerir opcionalmente el desplazamiento de uno o dos dentados del ligando transportador, pero preferiblemente sin dar como resultado la disociación del ión lantánido del quelato transportador iónico.

En caso de que el quelato transportador iónico no sea muy estable, puede aparecer algo de disociación del ión lantánido en condiciones predominantes durante el ensayo, y según la invención, en tales casos un agente complejante está presente en disolución para acomplejar a los iones lantánido libres, previniendo la formación de complejos fluorescentes entre el ión lantánido libre y el ligando antena. Los inventores han descubierto que esto da como resultado una enorme mejora en el rendimiento del ensayo sobre la técnica anterior. Esto se puede explicar, por ejemplo, debido a la formación de complejos multiligando altamente fluorescentes entre el ligando antena y el ión lantánido, es decir, un único ión lantánido libre se puede unir hasta a tres o cuatro ligandos antena, que producen un complejo que es significativamente más fluorescente que un único complejo quelato mixto formado mediante complementación de quelato del quelato transportador iónico de lantánido y el ligando antena. Los inventores han descubierto actualmente cómo proporcionar la conmutación completa de la fluorescencia del lantánido mediante la complementación del quelato, y resolver esencialmente este problema de la fluorescencia de fondo, que se presenta en los métodos de la técnica anterior.

Según una realización preferida de la invención, el quelato transportador del ión lantánido, se selecciona para que sea un complejo inerte, es decir, la disociación del ión lantánido del complejo debe ser lenta en las condiciones predominantes durante el ensayo. Se sabe que la presencia de otros iones y agentes complejantes en la disolución acuosa, y el incremento de la temperatura, darán normalmente como resultado un incremento en la disociación de complejos de coordinación, y por tanto, para determinadas aplicaciones, por ejemplo, para la monitorización de la reacción en cadena de la polimerasa, es esencial seleccionar un quelato transportador iónico muy estable que proporcione una tasa de disociación lenta, incluso a temperaturas elevadas. Normalmente el quelato transportador del ión lantánido y el ligando antena se emplean a concentraciones submicromolares, aumentando además la importancia de la estabilidad, y especialmente, la tasa de disociación lenta del complejo. Se prefieren los quelatos transportadores del ión lantánido que contienen estructuras de quelato macrocíclico iónico, tales como los derivados de 1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (DO3A) [Mishra, A. et al (2005) *Proc Intl. Soc Mag. Reson. Med.* 13: 2592] sobre las estructuras de quelato de cadena lineal abierta iónica, para proporcionar una tasa de disociación lenta [Morcos, S.K. (2007) *The British Journal of Radiology* 80: 73-76] en condiciones extremas predominantes durante algunas aplicaciones del bioensayo. Según una realización, el quelato transportador del ión lantánido, se selecciona para proporcionar estabilidad cinética con una vida media de disociación en las condiciones de ensayo predominantes a lo largo de 2 horas, preferiblemente durante 10 horas, y lo más preferiblemente durante 24 horas; por ejemplo, la vida media de disociación estimada de determinados quelatos macrocíclicos en condiciones fisiológicas puede ser de varios años [Schmitt-Willich, H. (2007) *British Journal of Radiology* 80: 581-582]. Las condiciones de bioensayos típicos tienen un pH próximo al valor neutral, por ejemplo, entre 6,0-9,0, y tienen una resistencia iónica entre 0,01 M y 1M. La temperatura típica predominante en los bioensayos es de 20-40 °C, pero ciertas aplicaciones requieren temperaturas de hasta 100 °C. La estabilidad cinética y termodinámica de ambos quelatos de galadino(III) de cadena abierta macrocíclica, se han descrito por Port M. et al. (2008) *Biomaterials* 21: 469-490. Los compuestos macrocíclicos, tales como DO3A y DOTA, han mostrado una disociación

significativamente más lenta del ión, que la de los quelatos de cadena abierta, tal como DTPA. Además, los quelatos iónicos (carga neta negativa) tenían mejor estabilidad que la de los no iónicos (carga neta neutral).

5 Según otra realización de la presente invención, se puede añadir en la disolución del bioensayo un ligando quencher de unión débil, para reemplazar el agua coordinada del ión lantánido presente en el quelato transportador iónico, y extinguir la fluorescencia potencialmente remanente del quelato transportador de ión lantánido que no participa en la complementación del quelato. Se seleccionará el ligando quencher monodentado, bidentado o tridentado, y que se reemplace rápidamente por el ligando antena que los lleva a una proximidad estrecha mediante un suceso de unión biomolecular.

10 Según otra realización de la presente invención, se emplea más de un ligando antena diferente en combinación con uno o múltiples quelatos transportadores iónicos que aún contienen el mismo lantánido, dando como resultado pares de quelato mixtos diferentes que producen luminiscencias de vidas características que facilitan la medición de parámetros adicionales.

15 Según algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la tasa de las constantes de estabilidad condicional del complejo formado por el ligando transportador iónico lantánido, y el complejo formado por el ligando antena y el ión lantánido, es al menos 10^4 , preferiblemente al menos 10^5 , y más preferiblemente al menos 10^6 , bajo las condiciones de la determinación del analito; es decir, el complejo formado por el ligando transportador del ión lantánido y el ión lantánido, es significativamente más estable.

Definiciones

20 El término "fluorescencia" y "luminiscencia" deberán entenderse que abarcan fotoluminiscente, es decir, la luminiscencia excitada mediante luz, fluorescencia, incluyendo la fluorescencia retardada con una vida de fluorescencia de microsegundos o milisegundos, fotoluminiscencia iónica, fotoluminiscencia anti-Stokes basada en conversión ascendente, y fosforescencia. Además, el término deberá abarcar la luminiscencia electrogenerada y la electroquimioluminiscencia.

25 El término "lantánido" e "ión lantánido" deberá entenderse aquí por ser equivalente a un "ión metálico alcalinotérreo" y por incluir sólo iones de lantánido trivalentes, y cualquier combinación de los diferentes elementos lantánidos de a continuación: neodimio, praseodimio, samario, europio, prometio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio e itrio, especialmente erbio, praseodimio, tulio, e iterbio.

30 En esta divulgación los términos "complejo lantánido luminiscente", "quelato lantánido luminiscente" y "quelato lantánido complementado" se deberán entender por incluir los complejos luminiscentes formados por un quelato transportador del ión lantánido, y un ligando antena de fotocaptación de complementación, cuando el ión lantánido se excita a través del ligando de fotocaptación u otra estructura ligando excitable o un ión lantánido no luminiscente o un ión lantánido sensibilizador. Un quelato lantánido complementado es un ejemplo de un quelato mixto que comprende un quelato transportador iónico y un ligando antena de fotocaptación.

35 El término "quelato transportador del ión lantánido", "quelato transportador iónico" y "quelato transportador" deberá entenderse por incluir como complejos tales como los de quelato lantánido no luminiscentes y sus derivados, que comprenden un ligando quelante, es decir, un ligando transportador iónico, y un ión lantánido luminiscente o un ión lantánido activador, pero que no comprende una estructura de fotocaptación eficaz u otra estructura excitable o ión lantánido sensibilizador esencial para la luminiscencia del lantánido. El ión lantánido en el quelato puede ser un único ión lantánido o una combinación de varios iones lantánidos iguales o diferentes. Representan ejemplos de quelatos transportadores iónicos lantánidos los quelatos de ácido aminopolicarboxílico cíclico y no cíclico de Eu(III), Sm(III), Tb(III) y Dy(III), con un número de coordinación preferiblemente igual a o mayor de 6 dentados, óptimamente de 7 u 8, pero que no contienen una estructura de fotocaptación eficaz u otra estructura excitable o un ión lantánido sensibilizador.

45 Los términos "sensibilizador" e "ión lantánido sensibilizador" deberá entenderse como el ión lantánido responsable de la absorción de la luz y que actúa como donador de energía para el ión lantánido activador, el cual actúa como aceptor de energía. Ejemplo de un sensibilizador es el terbio y cerio trivalente.

Los términos "activador" e "ión lantánido activador" deberá entenderse como el ión responsable de la emisión luminiscente y que actúa como aceptor de energía, aceptando energía del ión lantánido sensibilizador, que actúa como un donador de energía. Ejemplos de activadores son el erbio, tulio, holmio, y terbio trivalente.

50 La "constante de estabilidad" y la "constante de formación" del complejo entre el ligando transportador iónico y el ión lantánido (o el complejo entre el ligando antena y el ión lantánido; o el complejo entre el agente complejante y el ión lantánido) en disolución acuosa, deberá entenderse como la constante de equilibrio para la reacción de complejamiento entre el ligando y el ión metálico. Se puede encontrar una explicación detallada del término en las pp. 279-304 en Quantitative Chemical Analysis, D.C. Harris, 1991, 3ª Edición, Freeman y Colaboradores, Nueva York. El valor se expresa como el log K , donde K se puede calcular mediante la división de la concentración del complejo por el producto de las concentraciones de los tres ligandos (normalmente forma completamente desprotonada) y el ión metálico libre, prevaleciendo todo en estado de equilibrio a una temperatura y fuerza iónica

determinadas. La constante de estabilidad de mayor valor, se acompleja con el ligando del metal más fuerte. Esto implica que los quelatos transportadores del ión lantánido con mayores constantes de estabilidad, son más estables que aquellos con una constante de estabilidad más pequeña. Normalmente, las constantes de estabilidad se miden a temperatura ambiente (20-25 °C) y la fuerza iónica de 0,1 M. Se pueden encontrar ejemplos de valores del log K para complejos iónicos de lantánido(III) en Martell, A.E. y Smith, R.M., *Critical stability constants*, Vol 1, pp 204-211, Plenum Press, Nueva York, 1974; y Wu, S.L. Horrocks, W.D. (1997) *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 1497-1502.

La “constante de estabilidad condicional” y la “constante de formación condicional” y la “constante de formación eficaz” del complejo entre el ligando transportador iónico y el ión lantánido (o el complejo entre el ligando antena y el ión lantánido) en disolución acuosa, deberá entenderse como la constante de equilibrio para la formación de un complejo bajo un estado particular de un grupo de condiciones, tales como pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de especies complejantes auxiliares. Se puede encontrar una explicación detallada del término en la pp. 279-304 en *Quantitative Chemical Analysis*, D.C. Harris, 1991, 3ª Edición, Freeman y Colaboradores, Nueva York.

El término “ligando de complementación”, “antena de fotocaptación” o “ligando antena” se entenderán por incluir como tal a los ligandos quelantes no luminiscentes y a los quelatos lantánidos y sus derivados, que comprende una estructura de fotocaptación u otra estructura de ligando excitable sin un ión lantánido o complejos quelato de un ión lantánido no luminiscente, o un ión lantánido sensibilizador, y que son capaces de la complementación de un quelato transportador del ión lantánido para formar un complejo lantánido luminiscente. El ión lantánido que se incluye opcionalmente en el ligando antena, puede ser un único ión lantánido o una combinación de varios iones lantánidos iguales o diferentes. Ejemplos de tales iones lantánido que se utilizan para mejorar la absorción o la intensidad de emisión de la luz en el fenómeno de co-fluorescencia o en la conversión ascendente basada en lantánido son, por ejemplo, Gd(III), Y(III) e Yb(III). Ejemplos de ligandos antena [Latva, M. (1997) *J. Lumin* 75: 149-169] son estructuras orgánicas de fotocaptación capaces de coordinar los iones lantánido, preferiblemente con 4 dientes o menos, óptimamente de 3 a 2 dientes, y que normalmente pueden transferir su energía de excitación a través del estado triplete para iones lantánidos coordinados, tales como Eu(III), Sm(III), Tb(III) y Dy(III). Se han descrito también ejemplos de estructuras de ligandos antena adecuados para lantánidos que emiten cerca del infrarrojo, tales como Yb(III), Er(III) y Nd(III) [Hofstraat, J.W. et al. (1998) *J Fluorescence* 8: 301-307].

Los términos “no luminiscente” y “no fluorescente” deberán entenderse como una propiedad del compuesto que absorbe la luz para producir alguna o una cantidad significativa de un tipo de luminiscencia deseada, por ejemplo, luminiscencia de vida larga, cuando se excita y se relaja desde el estado excitado. Al contrario que los compuestos luminiscentes, la energía del estado excitado de un compuesto no luminiscente se relaja predominantemente a través de rutas no radiactivas, que producen normalmente calor en vez de luz, o una emisión rápida en vez de una emisión de extinción lenta o la excitación eficaz es escasa. El coeficiente de extinción molar o absorptividad molar de un compuesto no luminiscente es muy bajo, normalmente por debajo de $10 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o el rendimiento cuántico de fluorescencia de un compuesto no luminiscente es muy pobre, normalmente por debajo del 5 por ciento, o la vida de la luminiscencia es menor de 1 microsegundo, normalmente menos de 100 nanosegundos. Ejemplos de compuestos no luminiscentes son los quelatos lantánidos, que no contienen una estructura antena de fotocaptación para su excitación eficaz.

El término “luminiscencia de lantánido” y “luminiscencia” deberá entenderse como la luminiscencia (es decir, emisión de luz) obtenida a partir de la relajación emisiva de transiciones electrónicas del ión lantánido. La luminiscencia del lantánido se puede generar por excitación del ión lantánido mediante absorción de luz directa o indirecta, o mediante excitación química electrogenerada.

El término “quelato” se define como un complejo de coordinación donde un único ión central se coordina (o se coordinan iones centrales múltiples) con al menos un ligando con al menos un enlace de coordinación (cada uno). Estos complejos se pueden nombrar mediante diferentes principios, y se emplean nombres como quelatos, compuestos supramoleculares y complexonas. Tipos de quelatos especiales incluyen, por ejemplo, ácidos poliaminocarboxílicos, complejos macrocíclicos, ésteres corona, criptatos, calixarenos y porfirinas. El término “quelato mixto” se deberá entender como un quelato que comprende al menos dos ligandos diferentes coordinados con al menos un enlace de coordinación cada uno.

Los términos “fluorescencia de lantánido en tiempo resuelto”, “fluorescencia en tiempo resuelto”, “luminiscencia de lantánido de vida larga” y “fluorescencia de vida larga” deberá entenderse aquí como luminiscencia de lantánido, donde la vida de luminiscencia del compuesto luminiscente es igual o mayor de 1 microsegundo (la vida se calcula como el tiempo en donde la intensidad de emisión de luminiscencia decae hasta un valor relativo de $1/e$, es decir, hasta aproximadamente 37% de la intensidad de emisión luminiscente original). Ejemplos de compuestos capaces de incluir fluorescencia de larga media incluyen, pero no se limitan a, complejos quelato intrínsecamente fluorescentes de Eu(III), Sm(III), Tb(III) y Dy(III) que contienen una antena de fotocaptación apropiada.

Los términos “luz”, “excitación de luz” y “emisión de luz” deberán entenderse por abarcar la radiación electromagnética a longitudes de onda de 200 nm hasta 1600 nm. Estas longitudes de onda se llama luz ultravioleta

por debajo de 400 nm, luz cercana al ultravioleta entre 300-450 nm, luz visible entre 400-750 nm, luz cercana al infrarrojo entre 700-1000 nm y luz infrarroja por encima de 700 nm.

5 El término “fluorescencia de vida corta” y “compuesto fluorescente de vida corta” deberá entenderse por abarcar la fluorescencia y los compuestos fluorescentes con una vida media luminiscente de menos de 1 microsegundo, preferiblemente menos de 100 nanosegundos.

10 Los términos “conversión ascendente de lantánido”, “conversión ascendente” y “fotoluminiscencia anti-Stokes” deberá entenderse aquí como una luminiscencia de lantánido, donde la emisión fotoluminiscencia a partir de la luminiscencia del compuesto lantánido, se obtiene a una longitud de onda más corta que a la longitud de onda de excitación de la luz. La conversión ascendente de los compuestos de lantánido luminiscentes pueden, por tanto, convertir una menor energía luminosa de la luz incidente para una mayor energía de luz emitida. Esto se llama también fluorescencia anti-Stokes o fotoluminiscencia anti-Stokes. Ejemplos de tales compuestos son materiales completamente inorgánicos o híbridos que contienen Er(III) como activador y Yb(III) como sensibilizador que produce emisión verde o roja bajo excitación infrarroja.

15 Los términos “luminiscencia electrogenerada” y “electroquimioluminiscencia” deberán entenderse aquí como la luminiscencia de lantánido producida mediante excitación química electrogenerada empleando un electrodo, y aplicando una corriente eléctrica o voltaje al electrodo. Dependiendo del electrodo donde se produzca la reacción electroquímica aparece la electroquimioluminiscencia llamada electroquimioluminiscencia catódica o anódica. Los compuestos luminiscentes electrogenerados son compuestos capacitados con luminiscencia electrogenerada anódica o catódica. Un ejemplo es un compuesto que se calienta con un electrón excitado 2,6-bis[*N,N*-bis(carboximetil)-aminometil]-4-benzofenol-quelato Tb(III) que produce emisión verde [Kulmala, S. y Haapakka, K. (1995) *J Alloys Comp* 225: 502-506] pero hay otros complejos de lantánido capacitados de luminiscencia electrogenerada [Kulmala, S. et al. (1998) *Anal Chim Acta* 359: 71-86; y Jiang, Q. et al. (2006) *Anal Chim Acta* 558: 302-309]. La luminiscencia electrogenerada de los complejos de lantánido se puede medir también utilizando la resolución temporal para mejorar el límite de detección.

25 En esta divulgación, el término “bioensayo” deberá entenderse por referirse a la detección y/o cuantificación del analito basado en la luminiscencia del lantánido y la utilización de elementos de reacción. El analito se detecta y/o mide normalmente a partir de una muestra o una alícuota de una muestra, cuya muestra es, por ejemplo, una muestra biológica o medioambiental o una reacción de amplificación de ácido nucleico.

30 El término “bioensayo homogéneo” deberá entenderse por abarcar los bioensayos que no requieren etapas de separación. Las únicas etapas que se requieren son etapas simples o múltiples de cada una; adición de reactivos, incubación y medición. El término “etapa de separación” deberá entenderse por ser una etapa donde un reactivo del bioensayo marcado, se une a una fase sólida, tal como, por ejemplo, una micropartícula o un pocillo para microtitración, se separa y aísla fisiológicamente del reactivo marcado sin unir; por ejemplo, el pocillo para microtitración se lava (el líquido se elimina, para mejorar la separación, se añade líquido adicional y se vacía el pocillo) dando como resultado una separación del reactivo de bioensayo marcado unido a la fase sólida, del reactivo de bioensayo marcado no unido en la fase sólida.

40 El término “analito” deberá entenderse como una sustancia de interés, la cual se va medir o se va a medir el efecto de la misma mediante bioensayo. El analito puede ser, por ejemplo, una proteína, un antígeno de membrana celular, un receptor, un ácido nucleico, un hapteno, una hormona, un péptido, un oligonucleótido, un producto de amplificación de ácido nucleico, una forma conformacional o cambio de estructura específica de una molécula, tal como la separación a través de la actividad proteasa o nucleasa, o subunidades estructurales de multimerización, asociación o disociación de dos biomoléculas a través de interacciones de unión molecular.

45 El término “hapteno” deberá entenderse por referirse a una molécula pequeña que puede provocar una respuesta inmune sólo cuando se une a un gran transportador, tal como una proteína. Ejemplos de haptenos son hormonas esteroideas, vitaminas, péptidos, sacáridos, medicamentos y fármacos de abuso.

50 Los términos “muestra” y “muestra biológica” deberán entenderse por abarcar varias muestras biológicas sólidas o líquidas de las cuales se detecta el analito, tal como suero, sangre, plasma, orina, heces, plasma seminal, sudor, alcohol, líquido amniótico, tejido homogeneizado, líquido ascítico, muestras de estudios mediambientales (muestras de agua y suelo), procesos industriales (disoluciones de procesos) y bibliotecas de compuestos (cribado de bibliotecas que comprenden compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, productos naturales, extractos o resultados de la purificación de fuentes biológicas que contienen proteínas, péptidos, o ácidos nucleicos). La muestra puede ser también una reacción enzimática, tal como una reacción proteasa o nucleasa, u otra reacción de conversión, reacción en cadena de la polimerasa u otra reacción de amplificación de ácido nucleico.

55 El término “elemento de reconocimiento” se refiere a cualquier reactivo que se puede considerar que es específico para algún compuesto de relevancia en las circunstancias que se refieren, y debería entenderse por abarcar a los reactivos de unión bioespecífica, tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, armazones proteicos (por ejemplo darfinas, aficuerpos, monocuerpos), péptidos, aptámeros, proteínas de unión a hormonas naturales, sacáridos, lectinas, enzimas, receptores, estreptavidina, biotina, ácidos nucleicos naturales y artificiales (tal como ácidos

nucleicos o ácidos nucleicos peptídicos bloqueados) y derivados peptídicos, y anticuerpos genética o químicamente modificados, o composiciones quiméricas de cualquiera de lo anterior, que se pueden unir covalentemente o no covalentemente y reconocer biomoléculas a detectar. Los elementos de reconocimiento se emplean normalmente como reactivos de unión biospecífica en inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácido nucleico, ensayos de ligando-lectina y ensayos de ligando-receptor.

Los términos “agente complejante”, “agente complejante” y “agente quelante” deberán entenderse en este contexto como moléculas, que pueden formar varios enlaces de coordinación con un único ión metálico, es decir, son ligandos polivalentes. Los agentes complejantes más comunes y que se emplean más ampliamente, son aquellos que se coordinan a iones metálicos a través de átomos donadores de oxígeno o nitrógeno, o a través de ambos. Ejemplos de agentes complejantes son el ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DTPA), ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido ciclohexil 1,2-diamina tetra-acético (CDTA), ácido N,N'-bis(hidroxibenzil)-etilendiamino-N,N'-diacético (HBED), ácido trietileno tetramino hexaacético (TTHA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclodecane-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido hidroxietildiamino triacético (HEDTA) y derivados de cualquiera de estos quelantes.

El término “complejo lantánido de conversión ascendente” en este contexto significa un quelato mixto que comprende un único ión lantánido o una combinación de diferentes iones alcalinotérreos. El ligando antena puede contener o no un lantánido sensibilizante y/o una estructura de fotocaptación.

Realizaciones preferidas de la invención

Un método de bioensayo típico para detectar el analito y/o cuantificar la concentración de analito según la invención, emplea un primer grupo que comprende un quelato transportador del ión lantánido y un primer elemento de reconocimiento, en donde dicho quelato transportador del ión lantánido comprende un ligando transportador del ión lantánido y un ión lantánido; y un segundo grupo que comprende un ligando antena y un segundo elemento de reconocimiento; en donde dicho quelato transportador del ión lantánido se une, en las condiciones predominantes en dicho método de bioensayo, lo suficientemente fuerte a dicho lantánido, para dar como resultado que esencialmente no haya ión lantánido libre presente, es decir menos de 1 nmol/L, preferiblemente menos de 10 pmol/L, y se emplea adicionalmente un agente complejante de dicho ión lantánido a una concentración de al menos 1 pmol/L; y dicho ligando antena se une débilmente a dicho ión lantánido, es decir, dicho ligando antena es bien monodentado, bidentado, tridentado o tetradentado; y en donde el reconocimiento de dicho analito mediante dicho elemento de reconocimiento de dicho primer grupo y mediante dicho segundo elemento de reconocimiento de dicho segundo grupo se da como resultado bien

- i) un quelato de complementación, es decir, la formación de un complejo quelato de lantánido mixto a través de la complementación de dicho quelato transportador del ión lantánido que transporta dicho lantánido con dicho ligando antena, y por consiguiente, incrementa la fluorescencia; o
- ii) un quelato de discomplementación, es decir, dicho quelato transportador del ión lantánido que transporta dicho lantánido se separa de dicho ligando antena, y por consiguiente, desciende la fluorescencia.

En realizaciones preferidas del bioensayo

- a) el $\log K_{LnL1}$ es al menos 12, preferiblemente por encima de 18, en donde K_{LnL1} se refiere a la constante de estabilidad del complejo entre el ligando transportador iónico y el ión lantánido en disolución; o
- b) donde se emplea además el agente complejante de dicho ión lantánido
 - i) $\log K_{LnL2}$ es al menos 12, en donde K_{LnL2} se refiere a la constante de estabilidad del complejo entre el ligando transportador iónico y el ión lantánido en disolución; y
 - ii) $\log K_{LnL3}$ es al menos 8, en donde K_{LnL3} se refiere a la constante de estabilidad entre dicho agente complejante que acompleja dicho ión lantánido y el ión lantánido en disolución.

En realizaciones de la invención el quelato transportador iónico es hexadentado, heptadentado u octadentado.

El ión lantánido del quelato transportador iónico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en praseodimio(III), neodimio(III), samario(III), europio(III), terbio(III), disprosio(III), holmio(III), erbio(III), tulio(III), e iterbio(III). El primer y segundo elementos de reconocimiento son preferiblemente independientes entre sí, seleccionados del grupo que consisten de oligonucleótidos, aptámeros, péptidos, proteínas, haptenos, oligosacáridos.

El ligando antena es tetradentado, tridentado, bidentado o monodentado, preferiblemente tridentado o bidentado.

El $\log K_{LnL1}$ es normalmente de al menos 20, preferiblemente por encima de 22.

El agente complejante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en CDTA, EDTA, DOTA, DTPA, EGTA, HBED, HEDTA, NOTA, NTA, TETA y TTHA. Cuando se emplea un agente complejante del ión lantánido, dicho agente complejante es normalmente un enlazador más fuerte de dicho ión lantánido que el ligando antena, es decir, $\log K_{LnL3} > \log K_{LnL4}$, en donde K_{LnL4} se refiere a la constante de estabilidad del complejo entre dicho ligando antena y dicho ión lantánido en disolución; y preferiblemente un enlazador más débil del ión lantánido que el quelato transportador iónico, es decir, $\log K_{LnL3} < \log K_{LnL2}$.

El ligando transportador del ión lantánido se deriva normalmente de EDTA, DTPA, NOTA o DOTA, o se selecciona de las estructuras f) a n) que se presentan en las Figuras 7/i, 7/ii y 7/iii. El ligando antena comprende normalmente una estructura de fotocaptación que se selecciona del grupo que consiste en las estructuras a) a z) ilustradas en las Figuras 5/i, 5/ii, 5/iii y 5/iv.

El reconocimiento del analito da como resultado un aumento o descenso de la fluorescencia, y dicha fluorescencia se mide normalmente a una longitud de onda de entre 400 y 1600 nm.

El analito detectado y/o cuantificado se selecciona normalmente del grupo que consiste en estreptavidina, proteína, hapteno, una secuencia de ácido nucleico, células, virus y el producto de reacciones de amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa.

El reconocimiento del analito da como resultado un aumento o descenso de la fluorescencia, y normalmente dicha fluorescencia tiene una vida de fluorescencia larga, es decir, una vida $> 1\mu s$.

El reconocimiento del analito da como resultado un aumento o descenso de la fluorescencia, y preferiblemente dicha fluorescencia es una fluorescencia de conversión ascendente (es decir, fotoluminiscencia anti-Stokes, en donde la emisión se detecta a una longitud de onda más corta que la de excitación).

En muchas realizaciones preferidas las condiciones predominantes comprenden una temperatura de al menos 40 °C o superior.

Según una realización de la invención la tecnología de marcaje basada en lantánido se aplica en ensayos de hibridación, y en la monitorización del tiempo real en "tubo cerrado" de la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa o algún procedimiento de amplificación del ácido nucleico isotérmico [Gill, P. y Ghaemi, A. (2008) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27: 224-243]. Los enlazadores biomoleculares son, por ejemplo, oligonucleótidos u oligonucleótidos análogos, tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

El principio del ensayo de complementación del quelato de lantánido dirigido por oligonucleótido para ensayos de hibridación de ácido nucleico homogéneo se describe en la Figura 2; este principio facilita un ensayo basado en dos sondas (hibridadas una junto a la otra) para realizar sin utilizar FRET. Una de las sondas se marca con un quelato lantánido no fluorescente (4) y la otra con un ligando antena de complementación (5) acoplado a una estructura de fotocaptación adecuada; el quelato y el ligando juntos son capaces de formar un complejo lantánido fluorescente. Según otras realizaciones de la invención, el método se puede ampliar además a sondas de tipo candado o baliza molecular, como se describe en la Figura 3 y en la Figura 4, respectivamente.

En la Figura 3, la sonda tipo candado se compone de dos secuencias oligonucleótidas terminales conectadas con un enlazador (9) (por ejemplo, una secuencia oligonucleótida), y una secuencia terminal (1) que se marca con un quelato transportador del ión lantánido (4) y la otra secuencia terminal (2) con un ligando antena de fotocaptación (5). Cuando se añade una secuencia nucleótida diana (3) con secuencias complementarias adyacentes a los dos extremos terminales marcados (6), se forma un ácido nucleico bicatenario híbrido (10) que dirige el auto ensamblado del quelato mixto, y la formación de un complejo altamente fluorescente (8). La formación del complejo da como resultado un incremento de la fluorescencia a la longitud de onda de emisión (λ_2) excitada a la longitud de onda de excitación (λ_1).

La Figura 4 ilustra un ensayo de hibridación empleando una sonda de tipo baliza molecular, donde la sonda marcada, además de las secuencias específicas del analito (11b y 12b) contiene dos secuencias complementarias (11a y 12a) que, en ausencia de la secuencia del analito (3) produce que las partes del quelato, el ligando antena (5) y el quelato transportador iónico (4) acopladas cerca de las secuencias complementarias, en una proximidad cercana, permite la complementación del quelato y la formación de un complejo fluorescente (8). Cuando la secuencia del analito (3) se lleva en la disolución (14) las secuencias específicas del analito reconocen a sus secuencias complementarias formando una cadena bicatenaria parcial (13) que aparta el quelato mixto, y da como resultado una fluorescencia reducida en la longitud de onda de emisión (λ_2) excitada a la longitud de onda de excitación (λ_1).

Según otra realización de la invención, la tecnología de marcaje se aplica en la detección proteica y en la medición de las interacciones proteína-proteína. En estas aplicaciones el control de la orientación y la distancia entre las dos sondas puede utilizar ligandos naturales, pequeños péptidos de unión, o enlazadores artificiales diseñados *de novo* y/o enlazadores moleculares enriquecidos junto con químicas de acoplamiento específico de sitio. La invención es especialmente adecuada para la detección de proteínas multiméricas y complejos de proteínas multiméricas, que

incluyen, por ejemplo, proteínas de cápsidas víricas y proteína C-reactiva como se describe para pinzas moleculares [Heyduk E, et al. (2008) *Anal Chem.* 80: 5152-5159].

Según una realización de la invención, el método se aplica para la detección de la dimerización proteica (o multimerización) inducida por, por ejemplo, el cambio en la concentración iónica o en la presencia de un analito o pequeños ligandos, tales como antibióticos o esteroides. Un ejemplo de tal evento es la dimerización proteica dependiente del ión calcio [Appelblom H, et al. (2007) *J Biomol Screen* 12: 842-8]. La dimerización puede ser bien la formación de un heterodímero, o bien un homodímero. Se ha descrito otro ejemplo empleando la reasociación de dominios variables de anticuerpo dependiente de antígeno [Ueda, H. (2003) *J Immunol Methods* 279: 209-218].

Según la invención, tanto el quelato transportador como el ligando antena, se unen covalentemente al enlazador biomolecular empleando, por ejemplo, la activación de yodoacetamida, N-hidroxisulfosuccinimida, maleimida o activación de isotiocianato. Para la construcción de las sondas biomoleculares los restos marcadores se conjugan, por ejemplo, a enlazadores oligonucleótidos que comprenden, por ejemplo, un único amino de base modificada o con una modificación amino terminal. En caso de que los enlazadores proteicos recombinantes comprendan varios grupos amino (restos de lisina), la conjugación específica de sitio se puede obtener a través de grupos tiol (cisteínas adicionales) o mediante enfoques de "química-click" [Beatty, KE et al. (2005) *J Am Chem Soc* 127: 14150-14151; Hahn, ME y Muir, TW (2005) *Trends Biochem Sci* 30: 26-34]. La conjugación covalente del quelato transportador y el ligando antena se puede llevar también a cabo empleando un bloque de construcción especialmente diseñado de un ácido nucleico en fase sólida o mediante síntesis proteica [Jaakkola et al. (2007) Marcaje de oligonucleótido en fase sólida con DOTA. *Current protocols in nucleic acid chemistry*, editado por Beaucage, S.L. et al.; Capítulo 14: Unidad 4.31; publicación online por John Wiley e Hijos].

Según una realización preferida de la invención, el conjugado enlazador biomolecular del quelato transportador iónico o del ligando antena se purifica cuidadosamente a partir de restos no conjugados y especialmente del ión libre presente potencialmente en el reactivo del quelato transportador iónico. Ejemplos de métodos de purificación eficaces comprenden, la cromatografía en fase inversa, de afinidad, y de exclusión por tamaño (o filtración en gel) y diálisis. La extracción del ión libre se puede mejorar mediante la adición del agente complejante a la sonda en disolución, antes o durante la purificación. En ensayos de hibridación de oligonucleótidos la distancia recíproca de las sondas oligonucleótidas, y en más detalle, las posiciones de la base marcada y la estructura de los ligandos de acoplamiento que se emplean para la conjugación de los restos marcados, definen cómo se localizan espacialmente el quelato transportador y el ligando antena, después de que se hibriden las dos sondas. Si la estructura de la doble hélice es rígida y las posiciones de las bases de los dos restos marcados están demasiado lejos, o, por ejemplo, las longitudes de los enlazadores de acoplamiento son demasiado cortos, la complementación puede verse dificultada. Además de la longitud y de la estructura de los ligandos de acoplamiento y de la posición de las bases, se puede introducir una secuencia monocatenaria adicional no hibridada dentro del oligonucleótido patrón, entre localizaciones de la sonda adyacente. Esto permite además el ajuste, entre la libertad de movimiento y el auto ensamblado, del quelato mixto.

Según otra realización de la invención, la tecnología de marcaje se emplea en ensayos heterogéneos basados en el principio de la sonda de proximidad en fase sólida, donde la unión no específica de los marcadores define el rendimiento del ensayo. Mediante la generación de una señal de restricción sólo para aquellos marcadores presentes en el analito unido a las sondas e ignorando los marcadores (o sondas exactamente) que no se unen específicamente a la fase sólida, se resuelve la actual limitación del rendimiento. El ensayo en fase sólida puede comprender, por ejemplo, las mismas secuencias oligonucleótidas y las mismas sondas marcadas que en el ensayo homogéneo, pero emplea adicionalmente, por ejemplo, un ácido nucleico patrón biotinilado (analito) y una estreptavidina en fase sólida (preferiblemente un pocillo para microtitración) para capturar los complejos unidos. En lugar de medir la fluorescencia de la disolución, la lectura se hace ahora a partir de la fase sólida después de la etapa de lavado (separación de las sondas sin unir). El ensayo refleja el ensayo de unión de proximidad a la fase sólida [Fredriksson, S et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20: 473-477; y Gullberg, M et al. (2003) *Curr Opin Biotechnol* 14: 82-86] y puede proporcionar potencialmente incluso una mayor sensibilidad de detección del patrón oligonucleótido que el ensayo del modelo homogéneo.

La detección proteica es una aplicación complicada cuando los enlazadores no están disponibles, no proporcionan una posición u orientación fácilmente predecible, lo que se traduce, por tanto, en un control más difícil del auto-ensamblado del quelato complementado. Una realización de la invención emplea fragmentos de anticuerpo recombinante, armazones proteicos (por ejemplo, darfinas, aficuerpos, monocuerpos), aptámeros, enlazadores peptídicos, ligandos o haptenos como enlazadores combinados con el marcaje específico de sitio para facilitar el análisis de proteínas basado en la sonda de proximidad empleando la complementación del quelato lantánido. Se ha descrito el análisis de proteínas en base a la sonda de proximidad específica y sensitiva, y diagnósticos médicos potenciales por Gustafsdottir, S.M. (2005) *Anal Biochem* 345: 2-9 empleando la unión por proximidad de dos sondas oligonucleótidas.

Otra realización de la invención emplea proteína o, por ejemplo, un aptámero dirigido al reconocimiento biomolecular combinado con el oligonucleótido auto-ensamblado asistido por el marcaje fluorescente basado en la complementación del lantánido. El último enfoque se asemeja a la detección basada en la proximidad de unión, donde los extremos del oligonucleótido se unen a la proteína, o los enlazadores aptámeros se conectan en

presencia de un oligonucleótido complementario corto. Las proteínas enlazadoras se pueden derivar con los extremos oligonucleótidos, o más preferiblemente, se pueden producir como fragmentos de anticuerpo recombinantes con cremalleras de leucina que interactúan débilmente [Ohiro, Y et al. (2002) *Anal Chem* 74: 5786-5792] u otro par enlazador que interactúa de forma similar a las pinzas moleculares [Heyduk E, et al. (2008) *Anal Chem*. 80: 5152-5159], soportando la complementación del quelato de lantánido basado en el sistema de marcaje. La conjugación química aleatoria de los anticuerpos es un problema potencial, y se pueden emplear fragmentos de anticuerpos recombinantes y enfoques de “química click” para facilitar la conjugación específica de sitio.

Otra realización de la invención se dirige completamente por una proteína que se auto-ensambla por marcaje basado en la complementación del lantánido, el cual requiere un modelado molecular diseñado, pero proporciona un rendimiento mejorado. Un enfoque es un analito dirigido que se controla por la disociación proteica y el marcaje específico de sitio con el marcaje basado en la complementación del lantánido. La asociación proteica controlada se ha utilizado originalmente para la complementación enzimática con dominios de una cadena ligera y pesada de un fragmento de anticuerpo Fv [Ueda, H et al. (2003) *J Immunol Methods* 279: 209-218]. La interacción entre la cadena ligera y pesada se debilita artificialmente, para que la asociación sea dependiente de la presencia del antígeno. El marcaje específico del sitio se puede dirigir hacia restos de cisteína adicionales introducidos en los dominios Fv del C-terminal. Este enfoque, sin embargo, no se limita sólo a la estructura del anticuerpo, ya que el ligando que induce la multimerización es un fenómeno común que se observa especialmente con proteínas reguladoras, que podrían utilizarse como sensores específicos para sus ligandos naturales. Otro enfoque incluso más interesante, es el de utilizar como enlazadores péptidos sintéticos cortos relativamente derivados del marcador, que reconocen las posiciones adyacentes en, por ejemplo, el analito proteico multimérico [Appelblom, H et al. (2007) *J Biomol Screen* 12: 842-848].

Según otra realización de la invención, se emplea más de un ión de lantánido diferente en quelatos transportadores iónicos separados combinados con uno o múltiples ligandos antena de fotocaptación, facilitando de esta manera diseños de ensayo multiparamétrico.

Según otra realización, el quelato transportador del ión lantánido y el ligando antena pueden formar un complejo de lantánido de conversión ascendente. Las energías recogidas de dos o más fotones se transfieren secuencialmente desde el ligando antena mediante procesos no radiactivos intramoleculares hasta el ión lantánido en el quelato transportador, que después emite un único fotón de emisión característica.

Según otra realización de la invención, la intensidad de fluorescencia de los marcadores en base a la complementación de lantánido se pueden mejorar potencialmente mediante el empleo del fenómeno de columiniscencia [Xu, YY et al. (1992) *Analyst* 117: 1061-1069; y Latva, M et al. (1995) *J Chem Soc Perkin Trans 2* 995-999].

Ejemplos de ligandos antena de fotocaptación preferidos para complementación que contienen la estructura de fotocaptación, se ilustran en la Figura 5/i-iv, a)-z). Estas estructuras comprenden además un ligando quelante de un metal débil y un grupo reactivo con un enlazador/espaciador opcional que facilita la conjugación de enlazadores moleculares similares con el quelato transportador iónico. La abreviatura X se refiere a la estructura química descrita que facilita la conjugación del quelato transportador del ión lantánido(III) a los enlazadores moleculares, la abreviatura -A- se refiere a una secuencia enlazadora o espaciadora química, la abreviatura L se refiere a un resto químico que se selecciona independientemente de las estructuras esquemáticas ilustradas en la Figura 6, a)-h) y la abreviatura -Z se refiere al resto químico que se selecciona independientemente de la Figura 6, i)-l) o -Z no está presente (es decir, se reemplaza por hidrógeno). El grupo metoxilo (-OMe) incluido en las estructuras de la Figura 5/ii, i) y j) así como en la Figura 6, l) se pueden reemplazar con un grupo etoxilo (-OEt). En las Figuras 5/v, w)-z), la abreviatura -G se refiere bien a algún -CF₃, -CF₂CF₃ o -CF₂CF₂CF₃. Normalmente el enlazador se compone de uno o más cadenas de carbono alifáticas cortas, éter, carbonilo, amida, amina, éster tioéter, y/o fenileno, y el grupo reactivo es un grupo químico funcional, que puede ser, pero no se limita a, alcoholes, tioles, ácidos carboxílicos, aminas primarias o secundarias, vinilsulfonilos, aldehídos, epóxidos, hidrazidas, ésteres succinimidilo, maleimidias, restos carbonilo de halógeno alfa (tal como yodoacetilos), isocianatos, isotiocianatos, y aziridinas. El grupo funcional se elige preferiblemente de N-hidroxisuccinimidias, isotiocianato, maleimida, yodoacetilo y diclorotriazina. La activación del isotiocianato puede formar un enlace tiourea irreversible con un grupo amino primario de, por ejemplo, el aminoácido lisina, el amino terminal del péptido, o modificación del amino en el oligonucleótido.

Normalmente el ligando antena es un ligando monodentado, bidentado, tridentado o tetradentado, más preferiblemente un ligando bidentado o tridentado, la estructura orgánica de fotocaptación contiene anillos aromáticos o heterociclos, y las estructuras de fotocaptación tienen un nivel de energía en estado triplete adecuado para el ión lantánido trivalente presente en el quelato transportador iónico. Ejemplos de energías en estado triplete y de estructuras de fotocaptación para iones lantánido adecuadas, se presentan en la bibliografía [Latva, M. et al. (1997) *J Luminiscence* 75: 149-169]. Según una realización de la invención, la estructura orgánica de fotocaptación se basa en 7-amino-4-metil-2(1H)-quinolina (cs124), estructuras similares a quinolona o similares a cumarina [Li, M., y Selvin, P.R. (1997) *Bioconj Chem* 8.127-132, y US 5.622.821].

Ejemplos de estructuras esquemáticas preferidas para quelatos transportadores del ión lantánido(III) no fluorescentes adecuados para el ensayo de complementación, se ilustran en la Figura 7/i-iii, a)-p). Estas estructuras

comprenden un ligando quelante metálico y un grupo reactivo con un enlazador/espaciador opcional que facilita la conjugación de los enlazadores moleculares, tal como péptidos, proteínas o ácidos nucleicos a través de, por ejemplo, grupos amino primarios o grupos tiol. También son posibles otras químicas de conjugación, incluyendo métodos de conjugación de química click específicos del sitio. La abreviatura Ln^{3+} en las estructuras esquemáticas se refiere al ión lantánido trivalente y $-X$ al grupo reactivo que facilita la conjugación del quelato transportador del ión lantánido(III) a los enlazadores moleculares. En la Figura 7/i-iii, a)-p), la abreviatura $-A-$ se refiere a un enlazador o espaciador, por ejemplo, una cadena alquilo que contiene 1-12 átomos de carbono, y $-X$ a un grupo reactivo, por ejemplo, amino, aminoxilo, halogenoacetamido (donde el haluro es bromuro o yoduro), isotiocianato, 3,5-dicloro-2,4,6-triazinilamino, maleimido, un tioéster o un éster activo de ácido carboxílico, tal como N-hidroxisulfosuccinimida. En la Figura 7/ii, f)-g) el valor de n es bien 1 ó 2. Estructuras adicionales de quelatos transportadores iónicos para el marcaje de un oligonucleótido, se ilustran, por ejemplo, en US 6.949.639.

Según una realización de la invención, el quelato transportador iónico contiene uno o una pluralidad de grupos de ácido carboxílico, como se ilustra en la Figura 7/i-iii, a)-r). Según otra realización el grupo o pluralidad de grupos de ácido carboxílico en el quelato transportador iónico, se reemplaza por grupos quelantes neutrales, tales como $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONHR}_1$ o $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, donde R_1 y R_2 son estructuras químicas iguales o diferentes, como se describe en WO 2007/082996.

Las estructuras preferidas del ligando transportador iónico son ligandos hexadentados, heptadentados, u octadentados, capaces de formar preferiblemente complejos muy estables termodinámica y cinéticamente, o formar con iones lantánido(III), como se describe también, por ejemplo, en US 5.428.154, Carrera, C. et al. (2007) *Dalton Trans.* 4980-4987, Morcos, S.K. (2007) *The British Journal of Radiology* 80: 73-76; US 5.622.688 y EP 0 416 033. Preferiblemente, los átomos quelantes en el ligando transportador iónico son oxígeno y nitrógeno, y según una realización de la invención, el ligando quelante contiene una pluralidad de grupos ácidos carboxílicos. Métodos de derivación para ligandos quelantes, tales como DOTA, EDTA y DTPA para conjugar el enlazador y el grupo reactivo, se describen por Brücher, E. (2002) *Topics in Current Chemistry* 221: 103-122; Mishra, A. et al. (2005) *Proc Intl Soc Reson Med* 13: 2592; y en US 6.190.923. Por ejemplo, están disponibles comercialmente ligandos transportadores del ión lantánido macrocíclico adecuados que contienen el grupo reactivo (o sus respectivas formas no activadas) de Macrocyclics, Inc. (Dallas, TX); incluyen, por ejemplo, estructuras de ácido 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trieno-4-S-(4-isotiocianatobenzil)-3,6,9-triacético; ácido 1-Oxa-4,7,10-tetraazaciclododecano-5-S-(4-isotiocianatobenzil)-4,7,10-triacético; ácido[(R)-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)-ciclohexano-1,2-diamina-pentaacético; y ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo-dodecano-1,4,7,10-tetraacético o éster mono-N-hidroxisuccinimida. Cuando se emplea un agente complejante, el quelato transportador de ión lantánido se puede seleccionar para que tenga una constante de formación condicional al menos igual o más que el complejo EDTA a las condiciones predominantes en el bioensayo. En caso de que se prefiera no usar el agente complejante, el quelato transportador iónico se puede seleccionar para que tenga una constante de formación condicional o al menos igual o superior que el complejo DTPA a las condiciones predominantes en el bioensayo. Cuando no se emplea el agente complejante, el quelato transportador iónico, se selecciona preferiblemente para que tenga una disociación más lenta que la del complejo EDTA, más preferiblemente más lenta que la del complejo DTPA, a las condiciones predominantes en el bioensayo.

Preferiblemente, el quelato transportador iónico se elige a partir de las estructuras ilustradas en la Figura 7/i-iii y el ión lantánido(III) (Ln^{3+}) puede ser cualquiera de los iones trivalentes, pero se prefieren Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} y Dy^{3+} para los ensayos basados en fluorescencia de larga vida empleando fluorometría en tiempo resuelto y Er^{3+} y Tm^{3+} para los ensayos basados en la fluorescencia de conversión ascendente. El quelato transportador iónico que se elige preferiblemente, no contiene ninguna estructura de fotocaptación, en el caso de la fluorometría en tiempo resuelto, que deberá coordinarse al ión lantánido y absorberse a una longitud de onda en un intervalo superior a 300 nm, preferiblemente superior incluso a 280 nm.

Preferiblemente, tanto el quelato transportador del ión como el ligando antena, son solubles en agua, y los bioconjugados de los mismos son solubles en agua.

Según una realización de la presente invención, la solubilidad del ligando de fotocaptación se mejora mediante la adición de sustituyentes que mejoran la solubilidad de la estructura, mediante la adición de ácido carboxílico ($-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), ácido sulfónico, ácido fosfónico o un resto de azúcar (por ejemplo, un α -galactopiranoxilo) como se describe en EP 1 447 666 y WO 2008/020113. Preferiblemente, los átomos quelantes en el ligando antena son oxígeno y nitrógeno y según una realización de la invención, el ligando antena contiene uno o más grupos de ácido carboxílico.

Preferiblemente, la combinación óptima del quelato transportador del ión lantánido(III) y el ligando antena, que juntos son capaces de formar el complejo lantánido fluorescente, se selecciona para que la suma total de los sitios de coordinación del ligando (recuento de dientes) sea bien nueve o diez.

Preferiblemente, para Eu^{3+} y Sm^{3+} el ligando antena se elige a partir de las estructuras esquemáticas ilustradas en la Figura 5/i-ii, a)-j), y para Tb^{3+} y Dy^{3+} a partir de la Figura 5/i-ii, e)-j).

La tecnología de marcaje fluorescente basado en el lantánido de complementación es aplicable para la medición cuantitativa de ácidos nucleicos y proteínas. Ya que una señal se obtienen sólo cuando dos sondas, una marcada con el transportador del ión lantánido, y la otra con la antena que absorbe la luz, se unen de forma precisa en la posición adyacente a la molécula diana, y sólo cuando los componentes marcados están en un contacto muy estrecho, la generación de la señal es altamente específica. La larga vida de emisión del complejo lantánido facilita la medición en tiempo resuelto, que elimina la autofluorescencia y la unión específica derivadas de los anteriores. Este enfoque se puede emplear también para monitorizar varios analitos simultáneamente (enfoque multianalito) mediante el empleo de otros quelatos de ión lantánido y ligandos de fotocaptación adecuados, ya que los quelatos de lantánido tienen un espectro único y características temporales.

El método según la presente invención es adecuado para monitorizar tanto reacciones isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos [Van Ness, J., et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 100: 4504-4509], como de termociclado [Saiki et al. (1988) *Science* 239: 487-491]. Para la monitorización de la reacción en cadena de la polimerasa, es preferible utilizar un quelato transportador iónico termodinámica y cinéticamente muy estable.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método para incrementar el número de copias de una secuencia específica de ADN bicatenario (amplicón) determinada mediante oligonucleótidos cortos (cebadores) complementarios a las diferentes hebras del ADN diana. El PCR se basa en el incremento secuencial, exponencial, del número de copias del amplicón mediante la actividad de la ADNpolimerasa. La reacción cíclica incluye normalmente tres etapas principales, que normalmente se repiten de 30 a 45 ciclos. Esto se realiza en un ciclador automático, que puede calentar y enfriar la mezcla de reacción en un tiempo muy corto. Las etapas de reacción comunes son:

1. Desnaturalización a alta temperatura, normalmente 90 °C o superior, tal como 94 °C pero por debajo de 100 °C. Durante la desnaturalización, el ADN bicatenario se deshace y se abre hasta un ADN monocatenario, y todas las reacciones enzimáticas se paran (por ejemplo, la extensión de un ciclo previo).

2. Re-asociación a temperatura caliente, normalmente superior a 50 °C, pero inferior a 75 °C, por ejemplo, 54 °C. Durante la re-asociación, los cebadores se asocian con el ADN diana monocatenario complementario o con las secuencias del amplicón.

3. Extensión a temperatura media alta, normalmente superior a 60 °C, pero inferior a 75 °C, por ejemplo, 72 °C. Las bases (complementarias al patrón) se acoplan al cebador en el sitio 3' (la polimerasa añade dNTP's de 5'a 3', leyendo el patrón de 3' a 5', las bases se añaden complementariamente al patrón).

Las etapas 2 y 3 se pueden combinar en una sola etapa con condiciones semejantes a la de la etapa 2, pero combinando funciones de ambas etapas.

Normalmente cada etapa lleva un tiempo que varía desde unos pocos segundos hasta unos pocos minutos, comúnmente los tiempos van desde decenas de segundos hasta uno o dos minutos. Por tanto, la longitud de un recorrido PCR y la exposición de los contenidos de reacción a temperaturas calientes y altas, varía desde los varios segundos hasta unas pocas horas. Normalmente la longitud del PCR está entre los 15 minutos y 1 hora 30 minutos.

En el PCR cuantitativo a tiempo real o en el PCR de punto final homogéneo, se puede detectar el aumento del número de copias o la presencia del amplicón, empleando el método de la presente invención.

Cuando el método de la presente invención se emplea dentro de las condiciones predominantes PCR, es decir, la temperatura varía de 50 °C hasta 98 °C, o más comúnmente, de 60 °C hasta 98 °C, imponen requerimientos significativos en la estabilidad condicional del quelato transportador iónico. La disociación del ión lantánido desde el quelato transportador del ión debe ser insignificante en estas condiciones durante el PCR completo, es decir, al menos varios minutos, normalmente más de 15 minutos y hasta 2 horas.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan una estabilidad que permite la detección del producto PCR amplificado, tanto mediante tiempo real como por punto final, empleando el método de la presente invención. Las constantes de estabilidad condicional de los quelatos metálicos de los ligandos, son dependientes de las condiciones predominantes, incluyendo la temperatura. Se sabe que normalmente las constantes de estabilidad condicional de los quelatos metálicos descienden con el incremento de la temperatura. Esto es debido a que la disociación aumenta a temperaturas elevadas. Por tanto, sólo son adecuados para PCR los quelatos transportadores del ión que poseen una constante de formación condicional lo suficientemente alta también en las condiciones predominantes, es decir, a alta temperatura, y que son inertes cinéticamente, es decir, que tienen una disociación lenta a temperatura alta. La constante condicional suficientemente alta del quelato transportador iónico, da como resultado que el ión no se disocie del quelato transportador durante el PCR.

El quelato lantánido mixto complementado formado mediante el reconocimiento basado en la proximidad de la sonda, se puede emplear además como donador en la transferencia de energía de resonancia con un compuesto fluorescente luminiscente (aceptor) o no-luminiscente (quencher). El acepto se puede seleccionar también para que no tenga solapamiento espectral con la emisión del donador.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ensayo de hibridación homogéneo basado en la proximidad de la sonda

5 Se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI) un oligonucleótido de ADN diana sintético (5'-GATGCAGTAGCAGGAAGAGGATCGTAGCAATG-3'; SEQ ID NO: 1), una sonda A oligonucleótida con amino modificado (5'-CATTGCTACGATCC(C6dT)C-3'; SEQ ID NO: 2), y una sonda B oligonucleótida con amino modificado (5'-T(C2dT)CCTGCTACTGCATC-3'; SEQ ID NO: 3). La sonda A se marcó con el quelato transportador del ión Eu^{3+} , (N^1 -(4-iso-tiocianatobenzil)dielilenotriamina- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -tetraquis(acetato)europio(III) [Mukkala, V.-M. et al. (1989) *Anal Biochem.*, 176: 319], Eu^{3+} - N^1) en la modificación del grupo amino localizado cerca del extremo 3', y la sonda B se marcó con el ligando antena de fotocaptación (ácido 4-((isotio-cianatofenil)etnil)piridina- 2,6-dicarboxílico, antena-3d) cerca del extremo 5'. La sonda A, 25 nmol, se incubó con 20 veces más de exceso molar de Eu^{3+} - N^1 en 50 mM de tampón carbonato, pH 9,8, a +37 °C durante la noche. El volumen total de las reacciones de marcaje fue de 50 μL . Para el marcaje de la sonda B con la antena-3d, la antena-3d se disolvió en N,N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich) y se combinó con el oligonucleótido disuelto en agua, y después se añadió el tampón carbonato, pH 9,8, hasta una concentración de 50 mM. En la reacción de marcaje, el exceso molar de la antena-3d fue de 50 veces del volumen total de 110 μL . La reacción se incubó a +50 °C con rotación lenta durante la noche.

La purificación de las sondas marcadas se llevó a cabo con HPLC (instrumentación de Thermo Electron Corp., Waltham, MA, EE.UU.) empleando una columna Hypersil ODS C18 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) para la purificación de la sonda B marcada de la antena-3d, y una columna Luna C18 (2) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) para la purificación de la sonda A marcada del Eu^{3+} - N^1 . Ambas columnas eran de una longitud de 150 mm y diámetro de 4,6 mm. Las purificaciones se realizaron empleando un gradiente de 86% para A y 14% para B, hasta 70% para A y 30% para B, en 21 minutos con una velocidad de flujo de 0,5 mL min^{-1} (A, acetato de trietilamonio 50 mM acuoso (TEAA; Fluka Biochemica, Buchs, Suiza); B, TEAA 50 mM en acetonitrilo (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). El líquido de las fracciones recolectadas se evaporó a vacío (Hetovac VR-1, Heto-Holten A/S, Allerød, Dinamarca) y después se disolvió de nuevo en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), y NaCl 50 mM. Las sondas marcadas se caracterizaron mediante la medición de las lecturas de absorbancia a 260 y 330 nm y las concentraciones de Eu^{3+} total se midieron mediante tecnología DELFIA (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Wallac, Turku, Finlandia).

30 Los ensayos se realizaron empleando una Fluorescencia Baja en 96 pocillos Maxisorp para placas de microtitración adquiridas de Nunc (Roskilde, Dinamarca) en tampón de ensayo que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,75), NaCl 600 mM, Tween 20 0,1%, NaN_3 0,05%, y 30 μM de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA). La sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d (10 ó 50 nM) y el oligonucleótido diana (0-50 nM) se combinaron en un volumen total de 60 μL y se añadió a los pocillos. La placa se incubó primero en agitación lenta durante un período corto de tiempo y después sin agitación durante 15 y 60 minutos a temperatura ambiente. Las mediciones de la fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron con un Contador Multilabel Victor 1420 (Perkin-Elmer Life And Analytical Life Sciences, Turku, Finlandia) mediante el empleo de un filtro de excitación a 340 nm, un filtro de emisión a 615 nm, 400 μs de retardo, un tiempo de medición de 400 μs , y un recuento de 1000 ciclos de medición.

40 El principio del método de ensayo de complementación del quelato, se presenta en la Figura 1. Dos sondas de 16 monómeros, la sonda A marcada con un quelato transportador del ión europio(III), (N^1 -(4-iso-tiocianatobenzil)dielilenotriamina- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -tetraquis(acetato)europio(III) [Mukkala, et al. (1989)] Eu^{3+} - N^1 , estructura esquemática en la Figura 8a) en una timina con el grupo amino modificado localizado en un nucleótido interno del extremo 3', y la sonda B marcada con una antena de fotocaptación (ácido 4-((isotiocianatofenil)etnil)piridina- 2,6-dicarboxílico, antena-3d), estructura esquemática en la Figura 8b), en una timina con el amino modificado localizado en un nucleótido interno del extremo 5', se complementaron a un oligonucleótido diana de 32 monómeros. Ya que la afinidad de la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d es mínima una hacia la otra, no se puede detectar fluorescencia en ausencia del oligonucleótido diana complementario. En presencia del oligonucleótido diana, la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d hibridan en posiciones adyacentes al oligonucleótido diana, y Eu^{3+} - N^1 , y la antena-3d forman un complejo quelato mixto que será fluorescente a una específica longitud de onda con un desplazamiento de Stoke grande, un pico de emisión fuerte y una vida de fluorescencia larga.

55 Los resultados del experimento se ilustran en la Figura 9, donde se representa la fluorescencia específica de Eu^{3+} después de la hibridación de la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d con el oligonucleótido diana. Los cuadrados representan los resultados medidos a partir de las reacciones con concentraciones de 10 nM de la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d, y los círculos son los resultados de las reacciones con concentraciones de 50 nM de las mismas sondas. La cantidad de la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y de la sonda B-antena-3d era constante, mientras que la cantidad del oligonucleótido diana aumentó. El límite de detección, se define como la concentración que corresponde a los tres tiempos de desviación estándar de la señal de fondo, es de 13 pM (0,78 fmol por ensayo) cuando la cantidad de la sonda A- Eu^{3+} - N^1 y la sonda B-antena-3d era de 50 nM. El límite de detección de nuestro ensayo fue mejor que el presentado anteriormente [A. Oser, G. Valet (1990) *Angew. Chem.* 102, 1197; *Angew.*

(1990) *Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 1167], y especialmente la señal para la razón de fondo sobre mil (hasta 1400:1) y el nivel de la señal en nuestro ensayo destacó en comparación a la técnica anterior [Wang, G., Yuan, J., Matsumoto, K., y Hu, Z. (2001) *Anal. Biochem.* 299: 169], donde se habían presentado razones menores de 3 (menor de 3:1). Esto se consiguió empleando apropiadamente el quelato transportador iónico, el ligando antena, las secuencias enlazadoras, modificaciones de oligonucleótido seleccionados, y especialmente añadiendo el agente complejante para acomplejar prácticamente cualquier ión de europio(III) libre presente en la disolución. El intervalo dinámico en nuestro ensayo abarca cuatro órdenes de magnitud y la señal de fluorescencia fue estable durante al menos una hora.

En la Tabla 1 se ilustra el sorprendente efecto de la concentración de DTPA. En el ejemplo la concentración óptima de DTPA fue de 30 μM o superior. En ausencia de DTPA la señal de fondo con una concentración de la sonda de 10 nM era inferior a dos, mientras que con concentraciones de 30 y 100 μM de DTPA se obtuvieron razones superiores a 70. Esto ilustra la significativa mejora que se obtiene mediante la presente invención sobre la técnica anterior, donde se había observado el fondo de una forma clara. Los resultados indican que a las condiciones predominantes, la concentración del ión lantánido libre es originalmente nanomolar en ausencia del agente complejante, mientras que cuando se añade el agente complejante, la concentración del ión libre se puede reducir en un factor de al menos cien, potencialmente superior a mil, hasta a concentraciones picomolares, o concentraciones inferiores a uno picomolar. Esto dará como resultado un drástico descenso en el ensayo de fondo y un incremento significativo en la señal obtenida para la razón anterior.

Tabla 1. Efecto de la concentración de DTPA en el rendimiento del ensayo.

DTPA/microM	Fluorescencia (recuentos)				
	0	5	10	30	100
Sin patrón(fondo)	93317	8521	3139	839	649
Patrón 10 nM (señal)	166234	58486	55254	60170	49414
Razón S/B	1,8	6,9	17,6	71,7	76,1

Ejemplo 2

Especificidad en la generación de la señal

Se adquirió un oligonucleótido diana no-complementario (5'-CTGCTCTATCCACGGCGCCCGGGCTCCTCTC-3'; SEQ ID NO: 4) de Biomers.net (Ulm, Alemania). El experimento descrito en el Ejemplo 1 se repitió reemplazando el oligonucleótido diana por el oligonucleótido diana no-complementario. El reemplazo del oligonucleótido diana complementario con concentraciones variables de un oligonucleótido de 32 monómeros no-complementaria, dio como resultado la misma señal de fluorescencia que en la ausencia del oligonucleótido diana complementario; no se observaron diferencias en la señal detectable en presencia de concentraciones variables de oligonucleótidos diana no-complementarios en comparación con la concentración nula de oligonucleótidos diana; es decir, control en blanco. Esto indica que el mecanismo de generación de la señal en la presente invención es altamente específica y dependiente de los dos acontecimientos de reconocimiento biomolecular simultáneos.

Ejemplo 3

Espectro de emisión y vida de fluorescencia

Se adquirió una sonda adicional, una sonda C oligonucleótida con amino modificado (5'-CATTGCTACGATCC(C2dT)C-3'; SEQ ID NO: 5) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI) y marcada con 2,2',2''-[[4-[(4-isotiocianatofenil)-etinil]piridin-2,6-diil]bis(metilenonitrilo)]tetraquis(acetato)europio(III) intrínsecamente fluorescente (Eu³⁺-7d; estructura esquemática en la Figura 8c). La sonda C, 5 nmol, se incubó con un exceso molar de 20 veces de Eu³⁺-7d en tampón carbonato 50 mM, pH 9,8, a +37 °C durante la noche y se purificó como se describe para A-Eu³⁺-N1 en el Ejemplo 1.

El espectro y la vida de emisión de fluorescencia de una sonda C-Eu³⁺-7d marcada con un quelato-Eu³⁺ intrínsecamente fluorescente, y separado de un oligonucleótido diana dirigido por un complejo de la sonda A-Eu³⁺-N1, y una sonda B-antena-3d, se midieron con un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Varian Scientific Instruments, Mulgrave, Australia). El oligonucleótido diana (0 ó 10 nM) se mezcló con una sonda A-Eu³⁺-N1, y una sonda B-antena-3d (50 nM) en un tampón de ensayo, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la medición. El espectro de fluorescencia con 0 nM (línea estrecha) y 10 nM (línea gruesa) del oligonucleótido diana se ilustra en la Figura 10a. Para comparar las propiedades de fluorescencia del complejo con las propiedades de fluorescencia del quelato-Eu³⁺ fluorescente intrínsecamente, la sonda C-Eu³⁺-7d se diluyó hasta

una concentración de 50 nM en un tampón de ensayo y se midió el espectro. El espectro de fluorescencia de la sonda C-Eu³⁺-7d se muestra en la Figura 10b. El complejo que se formó en la presencia del oligonucleótido diana a partir de la sonda A-Eu³⁺-N1 y una sonda B-antena-3d generó un espectro de fluorescencia similar a la sonda intrínsecamente fluorescente C-Eu³⁺-7d con un pico de emisión principal a 615 nm. En ausencia del oligonucleótido diana, se detectó una emisión de fluorescencia de vida corta con la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena-3d, dando como resultado una línea horizontal en el espectro. El tiempo de extinción de fluorescencia del complejo formado por la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena-3d en presencia del oligonucleótido diana 10 nM fue de 618 μs (espectro de extinción insertado en la Figura 10a) y el tiempo de extinción de fluorescencia la sonda C-Eu³⁺-7d fue de 380 μs (insertado en la Figura 10b). Esto indica que el complejo del quelato mixto se protege mejor de las moléculas de agua que el ión intrínsecamente fluorescente del quelato heptadentado en la sonda C-Eu³⁺-7d.

Ejemplo 4

Ensayo heterogéneo de hibridación basado en la proximidad de la sonda

Se adquirieron sondas de oligonucleótidos con grupo amino modificado (sonda A, 5'-CATTGCTACGATCC-(C6dT)C-3', SEQ ID NO: 2 y la sonda B, 5'-T(C2dT)CCTGCTACTGCATC-3', SEQ ID NO: 3) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI). La sonda A se marcó con N¹-(4-iso-tiocianatobenzil)dielilenotriamina-N¹, N², N³, N³-tetraquis(acetato)europio(III) [V.-M. Mukkala, et al. (1989) *Anal Biochem.*, 176: 319], (Eu³⁺-N¹; estructura esquemática en la Figura 8a) y con un 2,2',2'',2'''-[4-[4-isotiocianatofenil]etilnil]piridina-2,6-diil]-bis(metileno-nitrilo)tetraquis(acetato)europio(III) intrínsecamente fluorescente [H. Takalo et al. (1994) *Bioconjugate Chem*, 5, 278] (Eu³⁺-7d; estructura esquemática en la Figura 8c), y la sonda B se marcó con ácido 4-((isotiocianatofenil)etilnil)piridina-2,6-dicarboxílico (antena; estructura esquemática en la Figura 8b). Se incubaron 25 nmol y 5 nmoles de la sonda A, con un exceso molar de 20 veces de Eu³⁺-N1 y Eu³⁺-7d, respectivamente, en tampón carbonato 50 nM, pH 9,8, a +37 °C durante la noche. El volumen total de las reacciones de marcaje fue de 50 μL. Para el marcaje de la sonda B con la antena, la antena se disolvió en N,N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich) y se combinó con oligonucleótido disuelto en agua, y después se añadió tampón carbonato, pH 9,8, hasta una concentración de 50 mM. En la reacción de marcaje, el exceso molar de la antena fue de 50 veces del volumen total de 110 μL. La reacción se incubó a +50 °C con rotación lenta durante la noche.

La purificación de las sondas marcadas se llevó a cabo con HPLC (instrumentación de Thermo Electron Corp., Waltham, MA, EE.UU.) empleando una columna Hypersil ODS C18 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) para la purificación de la sonda B marcada de la antena, y una columna Luna C18 (2) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) para la purificación de la sonda A marcada Eu³⁺-7d de Eu³⁺-N1. Las purificaciones se realizaron empleando un gradiente de 86% para A y 14% para B, hasta 70% para A y 30% para B en 21 minutos con una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹ [A, acetato de trietilamonio 50 nM acuoso (TEAA; Fluka Biochemica, Buchs, Suiza); B, TEAA 50 mM en acetonitrilo (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.)]. El líquido de las fracciones recolectadas se evaporó a vacío (Hetovac VR-1, Heto-Holten A/S, Allerød, Dinamarca), y después se disolvió de nuevo en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl 50 mM. Las sondas marcadas se caracterizaron mediante la medición de las lecturas de absorbancia a 260 y 330 nm y las concentraciones de Eu³⁺ total se midieron mediante sistema DELFIA (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac, Turku, Finlandia).

Se adquirió el oligonucleótido marcado biotilado (5'-biotina-TTGATGCAGTAGCAGGAAGAGGATCGTAGCAATG-3'; SEQ ID NO: 6) de Biomers.net GmbH (Ulm, Alemania). Los bioensayos se realizaron en placas Maxisorp White C8 (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que se revistieron [L. Välimaa et al. (2008) *Anal Bioanal. Chem.* 391, 2135] con N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) –activado [J. Ylikotila et al. (2008) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, doi:10.1016/j.colsurfb.2008.12.042] con estreptavidina (BioSpa, Milán, Italia). Todas las disoluciones se realizaron en un tampón de ensayo que contiene Tris-HCL 50 mM (pH 7,75), NaCl 600 mM, Tween 20 0,1% (v/v), NaN₃ 0,05% (p/v), ácido dietilenotriaminopentaacético 1 μM. Los pocillos se prelavaron una vez con Una Disolución de Lavado DELFIA (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac) enriquecido con NaCl hasta una concentración final de 600 mM. Se añadió el oligonucleótido diana biotilado, de 0-200 nM en 30 μL, y la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación lenta antes de añadir la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena o la sonda A-Eu³⁺-7d, 200 nM en 30 μL. Después de 30 minutos de agitación, la placa se lavó tres veces como anteriormente y se dejó secar a temperatura ambiente antes de la medición de la fluorescencia en tiempo resuelto con un Contador Multilabel Victor 1420 (Perkin-Elmer Life And Analytical Life Sciences, Turku, Finlandia) mediante el empleo de un filtro de excitación a 340 nm, un filtro de emisión a 615 nm, 400 μs de retardo, un tiempo de medición de 400 μs.

Los resultados obtenidos con el incremento de la concentración del oligonucleótido diana biotilado empleando la sonda A-Eu³⁺-N1 y la sonda B-antena se ilustran en la Figura 11a y los resultados empleando la sonda A-Eu³⁺-7d se muestran en la Figura 11b. El ensayo basado en la proximidad de la sonda con el enfoque del quelato de complementación como se describe en la presente invención, facilitó una menor fluorescencia de fondo con la misma señal de fluorescencia y dio como resultado un mejor límite de detección. Esto indica que la presente invención es aplicable a ensayos heterogéneos, que mejoran el rendimiento del ensayo. La generación de la señal se restringe sólo a los complejos de quelato mixtos, que requieren de dos acontecimientos de reconocimiento biomolecular adyacentes para su formación.

Ejemplo 5

Ensayo homogéneo basado en la proximidad de la sonda para estreptavidina y avidina

N-(6-aminohehexil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida((+)-biotinil-hexanodiamina) se acopló al ácido 4-((isotiocianatofenil)etil)-piridina-2,6-dicarboxílico (antena). La estructura esquemática del producto de reacción de acoplamiento se ilustra en la Figura 12a. Para el acoplamiento, se disolvieron y se combinaron (+)-biotinil-hexanodiamina, y la antenna en N,N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y después se añadió tampón carbonato, pH 9,8, hasta una concentración de 50 mM. En la reacción de acoplamiento, el exceso molar de (+)-biotinil-hexanodiamina era de 3 veces en un volumen total de 270 µl. La reacción se incubó a +50 °C con rotación lenta durante la noche.

La purificación de la reacción de acoplamiento se llevó a cabo con HPLC (instrumentación de Thermo Electron Corp., Waltham, MA, EE.UU.) empleando una columna Hypersil ODS C18 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) y un HPLC con Columna Oven 2155 (Pharmacia, LKB, Uppsala, Suecia). La purificación se realizó empleando un gradiente de 80% para A y 20% para B hasta 0% para A y 100% en B, en 30 minutos con una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹ [A, acetato de trietilamonio 50 mM acuoso (TEAA; Fluka Biochemica, Buchs, Suiza); B, TEAA 50 mM en acetonitrilo (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.) a +50 °C. El líquido de las fracciones recolectadas se evaporó a vacío (Hetovac VR-1, Heto-Holten A/S, Allerod, Dinamarca), y después se disolvió de nuevo en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, Na₃ 0,05% p/v. Las fracciones disueltas se caracterizaron mediante la medición de las lecturas de absorbancia a 330 nm.

N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) ((+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina) se conjuga con (N¹-(4-iso-tiocianatobenzil)dietilenotriamina-N¹, N², N³, N³-tetraquis(acetato)europio(III) [Mukkala, V.-M. et al. (1989) *Anal Biochem.*, 176: 319], Eu³⁺-N¹) adquirido de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Wallac Oy, Turku, Finlandia). La estructura esquemática del producto de la reacción de acoplamiento se ilustra en la Figura 12b. La reacción de conjugación y la purificación mediante HPLC se llevó a cabo como se describe anteriormente [Kuningas, T. et al. (2005) *Anal. Chem.* 77, 2826].

Los ensayos se realizaron en placas para microtitración Maxisorp white C8 adquiridos en Nunc (Roskilde, Dinamarca) en un tampón de ensayo que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, y ácido dietilenotriaminopentaacético 10µM. Los pocillos se bloquearon previamente con albúmina de suero bovino para prevenir la unión no específica de estreptavidina o avidina en las superficies de los pocillos. La estreptavidina de BioSpa (Milán, Italia) o la avidina de Sigma (0-100 nM) y la antenna ((+)-biotinil-hexanodiamina (estructura esquemática del conjugado en la Figura 12a) y (+)-biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina-Eu³⁺-N1 (estructura esquemática del conjugado en la Figura 12b) (20nM) se combinaron en un volumen total de 60 µL y se añadió a los pocillos. La placa se incubó primero a agitación lenta durante un corto período de tiempo, y después sin agitación durante 15 y 60 minutos a temperatura ambiente. Las mediciones de la fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron con un Contador Multilabel Victor 1420 (Perkin-Elmer Life And Analytical Life Sciences, Turku, Finlandia) mediante el empleo de un filtro de excitación a 340 nm, un filtro de emisión a 615 nm, 400 µs de retardo, y 400 µs de tiempo de medición.

Los resultados obtenidos con el incremento de concentración de estreptavidina se muestran en la Figura 13a y los resultados con avidina en la Figura 13b. Los resultados indican que la presente invención también es aplicable para la detección de proteínas multiméricas (estreptavidina y avidina son proteínas tetraméricas). Los restos marcados, es decir, el quelato transportador del ión lantánido, y el ligando antenna, se acoplan a tales elementos de reconocimiento biomolecular, que tienen sitios de unión separados en la molécula proteica a la distancia adecuada. En el ejemplo los sitios de unión de biotina eran idénticos, y había uno de ellos en cada monómero de estreptavidina.

Ejemplo 6

Ensayo homogéneo de hibridación empleando ión terbio(III)

Se adquirieron el oligonucleótido de ADN diana sintético (5'-GATGCAGTAGCAGGAAGAGGATCGTAGCAATG-3'; SEQ ID NO: 1) y el oligonucleótido de la sonda A con el grupo amino modificado (5'-CATTGCTACGATCC(C2dT)C-3'; SEQ ID NO: 2) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EE.UU.) y el oligonucleótido de la sonda B con el grupo amino modificado (5'-T(C2dT)CCTGCTACTGCATC-3'; SEQ ID NO: 3) se adquirió de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). La sonda A se marcó con el quelato transportador del ión Tb³⁺, (N¹-(4-iso-tiocianatobenzil)dietilenotriamina-N¹, N², N³, N³-tetraquis(acetato)terbio(III), Tb³⁺-N1) en la modificación del grupo amino primario localizado cerca del extremo 3' y la sonda B se marcó con el ligando antenna de fotocaptación, el ácido 4-(3-(4-isotio-cianatofenil)-2,4,6-trimetoxifenil)piridina-2,6-dicarboxílico (antena-TMP) cerca del extremo 5'. La sonda A, 10 nmol, se incubó con un exceso molar de 20 veces de Tb³⁺-N1 en tampón carbonato 50 mM, pH 9,8, a +37 °C durante la noche. El volumen total de las reacciones de marcaje fue de 50 µL. Para el marcaje de la sonda B con la TMP-antena, la TMP-antena se disolvió en N,N-dimetilformamida 75% (Sigma-Aldrich), se combinó con el oligonucleótido, y se añadió después tampón carbonato, pH 9,8, hasta una concentración de 50 mM. En la reacción de marcaje, el exceso molar de la

antena-TMP fue de 50 veces en un volumen total de 70 μL . La reacción se incubó a +50 $^{\circ}\text{C}$ con rotación lenta durante la noche.

La purificación de las sondas marcadas a partir de las reacciones de conjugación primero se llevaron a cabo con filtración en gel empleando columnas Sephadex NAP-5 (GE Healthgare, Buckinghamshire, Reino Unido) y después con HPLC (instrumentación de Thermo Electron Corp., Waltham, MA, EE.UU) empleando una columna Hypersil C18 ODS de Thermo Scientific para la purificación de la sonda B marcada con la antena-TMP, y una columna Luna C18 (2) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) para la purificación de la sonda A marcada con Tb^{3+} -N1. El eluido a partir de la filtración en gel, se evaporó a vacío (Hetovac, VR-1, Heto-Holten A/S, Allerød, Dinamarca), se disolvió en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM y se utilizó purificación HPLC. Las purificaciones mediante HPLC se realizaron empleando un gradiente del 86% para A y del 14% para B, hasta el 70% para A y del 30% para B en 21 minutos, con una velocidad de flujo de 0,5 mL min^{-1} (A, acetato de trietilamonio 50 mM acuoso (TEAA; Fluka Biochemica, Buchs, Suiza); B, 50 mM TEAA en acetonitrilo (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.)). El líquido de las fracciones recogidas, se evaporó a vacío y después se disolvió otra vez en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM. Las sondas marcadas se caracterizaron mediante la medición de las lecturas de absorbancia a 260 y 330 nm y las concentraciones de Tb^{3+} total se midieron mediante tecnología DELFIA (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac, Turku, Finlandia). La purificación de las reacciones de acoplamiento incluían dos métodos diferentes para mejorar la eficacia de la purificación.

El ensayo se realizó empleando Fluorescencia Baja en 96 pocillos Maxisorp de placas para microtitración adquiridos de Nunc (Roskilde, Dinamarca) en un tampón de ensayo que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,75), NaCl 600 mM, Tween 20 0,1%, NaN_3 0,05%, y ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 30 μM . La sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP (10 ó 50 nM) y el oligonucleótido diana (0-50 nM) se combinaron en un volumen total de 60 μL y se añadió a los pocillos. La placa se incubó primero en agitación lenta durante un corto periodo de tiempo y después sin agitación durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las mediciones de la fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron con un Contador Multilabel Victor 1420 (Perkin-Elmer Life And Analytical Life Sciences, Turku, Finlandia) mediante el empleo de un filtro de excitación a 340 nm, un filtro de emisión a 545 nm, 400 μs de retardo, un tiempo de medición de 1200 μs , y un recuento de 2000 ciclos de medición.

Para el ensayo de complementación del quelato de terbio, se emplearon dos sondas complementarias de 16 monómeros para un oligonucleótido diana de 32 monómeros: la sonda A marcada con un quelato transportador de un ión terbio (N^1 -(4-isotiocianatobenzil)dietilenotriamina- N^1 , N^2 , N^3 , N^3 -tetraquis(acetato)terbio(III), Tb^{3+} -N1, Figura 14a) en una timina con el grupo amino modificado localizado en un nucleótido interno del extremo 3', y la sonda B marcada con una antena de fotocaptación reactiva de ácido(4-(3-(4-isotiocianatofenil)-2,4,6-trimetoxifenil)piridina-2,6-dicarboxílico), antena-TMP, Figura 14b) en una timina con el grupo amino modificado localizado en un nucleótido interno del extremo 5'. Ya que la afinidad de la sonda A- Tb^{3+} -N1 hacia la sonda B-antena-TMP es mínima, no se puede detectar fluorescencia en ausencia del oligonucleótido diana complementario. En presencia del oligonucleótido diana, la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP se hibridan a la diana y el Tb^{3+} -N1 y antena-TMP forman un complejo que será fluorescente a una longitud de onda específica, con un desplazamiento Stoke grande, picos de emisión fuerte y una vida de fluorescencia larga.

En la Figura 15 se presenta la fluorescencia específica de Tb^{3+} después de la hibridación de la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP con el oligonucleótido diana. La cantidad de la sonda A- Tb^{3+} -N1 y de la sonda B-antena-TMP fue constante (bien para 10 nM, resultados mostrados con cuadrados, o 50 nM, resultados mostrados con círculos) aunque la cantidad de oligonucleótido diana variara. Se midió la emisión de tiempo resuelto en el principal pico de emisión a 545 nm. El límite de detección fue menor que la concentración 100 pmol/L del oligonucleótido diana, y el intervalo dinámico en nuestro ensayo cubrió hasta cuatro órdenes de magnitud. El DTPA estaba presente en una concentración de 30 μM . El resultado indica que la presente invención es fácilmente transferible a otros iones lantánidos luminiscentes mediante la selección adecuada del ligando antena de fotocaptación.

Ejemplo 7

Espectro de emisión y vida de fluorescencia con el ión terbio(III)

Se midió el espectro de fluorescencia y la vida de emisión del oligonucleótido diana dirigida por el complejo de la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP con un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Varian Scientific Instruments, Mulgrave, Australia). El oligonucleótido diana (0 ó 10 nM) se mezcló con la sonda A- Tb^{3+} -N1 (50nM) y la sonda B-antena-TMP (50 nM) en un tampón de ensayo, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente antes de la medición.

El complejo que se formó en presencia del oligonucleótido diana (Figura 16; línea gruesa) a partir de la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP generó un espectro de fluorescencia con el pico de emisión principal a 545 nm. En ausencia del oligonucleótido diana (línea fina), no se detectó emisión de fluorescencia con la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP. Se midió el tiempo de extinción del complejo formado por la sonda A- Tb^{3+} -N1 y la sonda B-antena-TMP en presencia del oligonucleótido diana 10 nM. Se encontró que la vida de la emisión (véase el espectro de extinción en la Figura 16 inserta) se duplicaba exponencialmente; el componente más corto tenía una vida de 105 μs y el componente más largo de 400 μs . Esto indica que los enlazadores de acoplamiento (que afectan la distancia

y la orientación de los restos marcadores) tienen que optimizarse para, por ejemplo, ligandos antena diferentes, dado que sus dimensiones estructurales varían afectando la eficacia de complementación del quelato dirigido por acontecimientos de reconocimiento biomoleculares.

Ejemplo 8

5 Ensayo de complementación de quelato dirigido por oligonucleótido (OCCA)

El rendimiento de la tecnología de detección se estudió por PCR en tiempo real en tubo cerrado mediante la amplificación de 0-10⁵ moléculas del patrón sintético (5' CTTCAGCGCTACACACGCTCAAATCATCGAGGAAAACCGTATGAGAAAACGGATCTAAGCTTGTCATTTGATAAAG CATCATGCAACATTAACCCGAGATACGATTTGTCCATATCTTTGATACGACGCCGCAAAGCTCTTCCCAAGCCG
 10 AGTCTACAG 3'; SEQ ID NO:7; Thermo Scientific, EE.UU.). El PCR en tiempo real se realizó empleando una placa PCR de 96 pocillos (Placa PCR Robotic 96 Thermo -Fast®, Thermo Scientific) cerrada con tapas ópticas (MicroAmp®, tiras de 8 tubos con tapa óptica, Applied Biosystems, EE.UU.). Cada 40 µL de la reacción PCR contenía cebadores 500 nM (5' cebador 5'CTGTAGACTCGGCTTGGGAAGAGC 3', SEQ ID NO: 8 y 3' cebador 5'AAGCCTTCCCTTATACGCTCAAGC 3', SEQ ID NO 9; Thermo Scientific), sonda A 50 nM (5'
 15 AATCGTATCTCGGGTTAATG[AmC7]; SEQ ID NO: 10; Thermo Scientific) marcada con el quelato transportador del ión Eu³⁺ no luminiscente del ácido 2,2',2''-(10-(3-isotiocianatobenzil)-1,4,7,10-tetraazaciclodecano-1,4,7-triil)-triacético; Figura 8d), sonda B 50 nM (5' T(AmC2dT)GCATGATGCTTTATCAAA 3' con 3'fosfato; SEQ ID NO: 11; Thermo Scientific) marcada con el ligando antena de fotocaptación (ácido 4-((4-isotiocianatofenil)etil)piridina-2,6-dicarboxílico) [U. Karhunen et al., Anal Chem, 82 (2010) 751], DTPA 30 µM, dNTPs 400 µM, 0,6 µl de ADN polimerasa Phire Hot Start (Finnzymes, Finlandia), Tampón de Reacción Phire (Finnzymes) y una cantidad variable del patrón de oligonucleótido monocatenario sintético. El ciclo térmico consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos y en una etapa de activación de la polimerasa a 98 °C, seguido de 8 ciclos de 15 segundos a 98 °C, 20 segundos a 60 °C y 15 segundos a 72 °C; 17 ciclos de 15 segundos a 98 °C, 20 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C, 15 segundos a 98 °C, 20 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C, 15 segundos a 94 °C y 30 segundos a 30
 25 °C. El ciclo térmico se realizó empleando un ciclador térmico PTC-200 (MJ Research, EE.UU.) y la fluorescencia en tiempo resuelto se midió a 30 °C a partir del ciclo 9 con un contador Multilabel Victor 1420 (Perkin Elmer Life Science, Finlandia) mediante el empleo de un filtro de excitación a 340 nm, un filtro de emisión a 615 nm, 400 µs de retardo, un tiempo de medición de 400 µs, y un recuento de 1000 ciclos de medición. La placa PCR se movió temporalmente para cada medición de fluorescencia del ciclador térmico PTC-200 al contador Multilabel Victor 1420.

30 Se amplificaron y midieron varias cantidades del patrón de oligonucleótido mediante PCR en tiempo real. En la Figura 17 se presenta la fluorescencia específica de Eu³⁺ después de la hibridación de la sonda A y la sonda B con el oligonucleótido diana. Se generaron gráficas de amplificación mediante el trazado de cada medición fluorescente como una función del número de ciclos PCR.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Arctic Partners Oy, c/o Timo Lövgren
- 5 <120> Método de ensayo de luminiscencia
<130> AP104139
- 10 <150> FI20095302
<151> 24-03-2009

<150> US61/162,752
<151> 24-03-2009
- 15 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> E1/E6 oligonucleótido de ADN diana

<400> 1
gatgcagtag caggaagagg atcgtagcaa tg 32
- 30 <210> 2
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<223> E1/E4/E6 sonda A

<400> 2
cattgctacg atcctc 16
- 40 <210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> E1/E4/E6 sonda B

<400> 3
ttcctgctac tgcac 16
- 50 <210> 4
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> E2 oligonucleótido diana

<400> 4
ctgctctatc cacggcgccc gcggtcctc tc 32
- 60 <210> 5
<211> 16

ES 2 631 427 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> E3 sonda C

 <400> 5
 cattgctacg atcctc 16

 10 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> E4 oligonucleótido diana biotinilado

 <400> 6
 ttgatgcagt agcaggaaga ggatcgtagc aatg 34

 20 <210> 7
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> E8 patrón

 <400> 7
 cttcagcgct acacacgctc aaatcatcga ggaaaaccgt atgagaaaacg gatctaagct 60
 tgtcatttga taaagcatca tgcaacatta acccgagata cgatttgtcc atatctttga 120
 30 tacgacgccc caaaagctct tcccaagccc agtctacag 159

 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> E8 5 cebador

 40 <400> 8
 ctgtagactc ggcttgggaa gagc 24

 <210> 9
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> E8 3 cebador

 50 <400> 9
 aagccttccc ttatcacgct caagc 25

 <210> 10
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> E8 sonda A

 <400> 10

ES 2 631 427 T3

aatcgtatct cgggtaatg 20

<210> 11
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> E8 sonda B
10

<400> 11
ttgcatgatg ctttatcaaa 20

REIVINDICACIONES

1. Un método de bioensayo para detectar y/o cuantificar un analito empleando un primer grupo que comprende un quelato transportador del ión lantánido y un primer elemento de reconocimiento, en donde dicho quelato transportador del ión lantánido comprende un ligando transportador del ión lantánido y un ión lantánido; un segundo grupo que comprende un ligando antena y un segundo elemento de reconocimiento; y se emplea adicionalmente un agente que acompleja dicho ión lantánido a una concentración de al menos 1 pmol/L; en donde dicho quelato transportador del ión lantánido se une a dicho lantánido; y dicho quelato transportador del ión lantánido es una estructura de quelato macrocíclico iónico y tiene un número de coordinación de seis, siete u ocho dientes; y dicho ligando antena es bien monodentado, bidentado, tridentado o tetradentado, y la combinación del quelato transportador iónico y del ligando antena se selecciona para que la suma total de sitios de coordinación del ligando, es decir, recuento de dientes, sea de nueve o diez; en donde el reconocimiento de dicho analito mediante dicho primer elemento de reconocimiento de dicho primer grupo y mediante dicho segundo elemento de reconocimiento de dicho segundo grupo da como resultado o bien
 - i) un quelato de complementación, es decir, la formación de un complejo quelato de lantánido mixto a través de la complementación de dicho quelato transportador del ión lantánido que transporta dicho ión lantánido con dicho ligando antena, y por consiguiente, incrementa la fluorescencia; o bien
 - ii) un quelato de discomplementación, es decir, dicho quelato transportador del ión lantánido que transporta dicho ión lantánido, se separa de dicho ligando antena, y por consiguiente, desciende la fluorescencia.
2. El bioensayo según la reivindicación 1, caracterizado en que la estructura del quelato macrocíclico iónico se selecciona del grupo que consiste en las estructuras f) a n) presentadas en la Figura 7.
3. El bioensayo según la reivindicación 1, caracterizado en que
 - i) $\log K_{LnL2}$ es al menos 12, en donde K_{LnL2} se refiere a la constante de estabilidad del complejo entre el ligando transportador iónico y el ión lantánido en disolución; y
 - ii) $\log K_{LnL3}$ es al menos 8, en donde K_{LnL3} se refiere a la constante de estabilidad entre dicho agente complejante que acompleja dicho ión lantánido y el ión lantánido en disolución.
4. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que el ión lantánido del quelato transportador iónico se selecciona del grupo que consiste en praseodimio(III), neodimio(III), samario(III), europio(III), terbio(III), disprosio(III), holmio(III), erbio(III), tulio(III), e iterbio(III).
5. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que el primer y el segundo elementos de reconocimiento se seleccionan independientemente el uno del otro del grupo que consiste en oligonucleótidos, aptámeros, péptidos, proteínas, haptenos, oligosacáridos.
6. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que dicho agente complejante se selecciona del grupo que consiste en CDTA, EDTA, DOTA, DTPA, EGTA, HBED, HEDTA, NOTA, NTA, TETA y TTHA.
7. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que dicho agente complejante es un enlazador más fuerte de dicho ión lantánido que el ligando antena, es decir, $\log K_{LnL3} > \log K_{LnL4}$, en donde K_{LnL4} se refiere a la constante de estabilidad del complejo entre dicho ligando antena y dicho ión lantánido en disolución; y preferiblemente, un enlazador más débil del ión lantánido que el quelato transportador iónico, es decir, $\log K_{LnL3} < \log K_{LnL2}$.
8. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que el ligando transportador iónico se deriva de EDTA, DTPA, NOTA o DOTA, o se selecciona de las estructuras f) a n) presentadas en las Figuras 7/i, 7/ii y 7/iii.
9. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que el ligando antena comprende una estructura de fotocaptación que se selecciona del grupo que consiste en las estructuras a) a z) presentadas en las Figuras 5/i, 5/ii, 5/iii y 5/iv.
10. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el reconocimiento del analito da como resultado un incremento o descenso de la fluorescencia, caracterizado en que dicha fluorescencia se mide a una longitud de onda entre 400 y 1600 nm.
11. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado en que el analito detectado y/o cuantificado, se selecciona del grupo que consiste en estreptavidina, proteína, hapteno, una

secuencia de ácido nucleico, células, virus, un producto de reacciones de amplificación de ácido nucleico y un producto de la reacción en cadena de polimerasa.

- 5
12. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el reconocimiento del analito da como resultado un incremento o descenso de la fluorescencia, caracterizado en que dicha fluorescencia tiene una vida larga, es decir, una vida $> 1\mu\text{s}$.
 13. El bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el reconocimiento del analito da como resultado un incremento o descenso de la fluorescencia, caracterizado en que dicha fluorescencia es fluorescencia de conversión ascendente, es decir, fotoluminiscencia anti-Stokes, en donde la emisión se detecta a una longitud de onda más corta que la excitación.

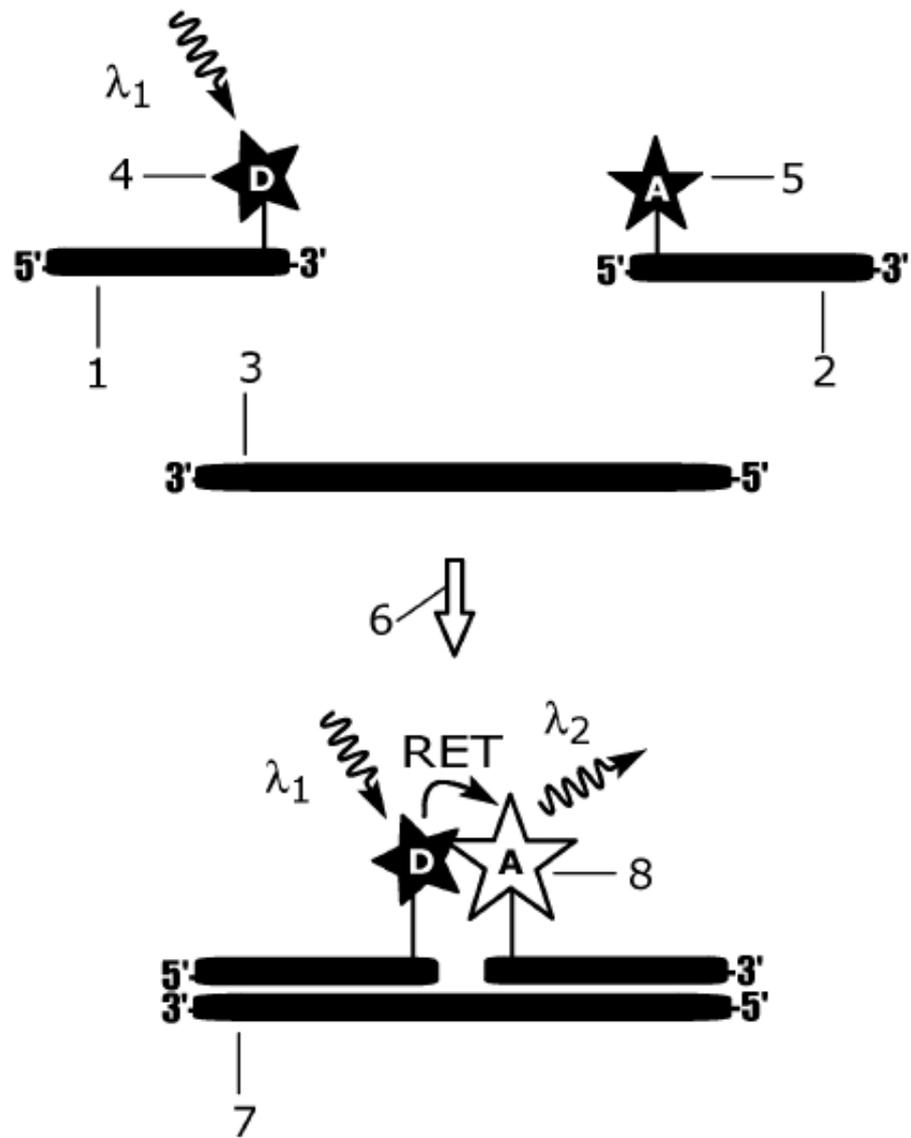


Figura 1

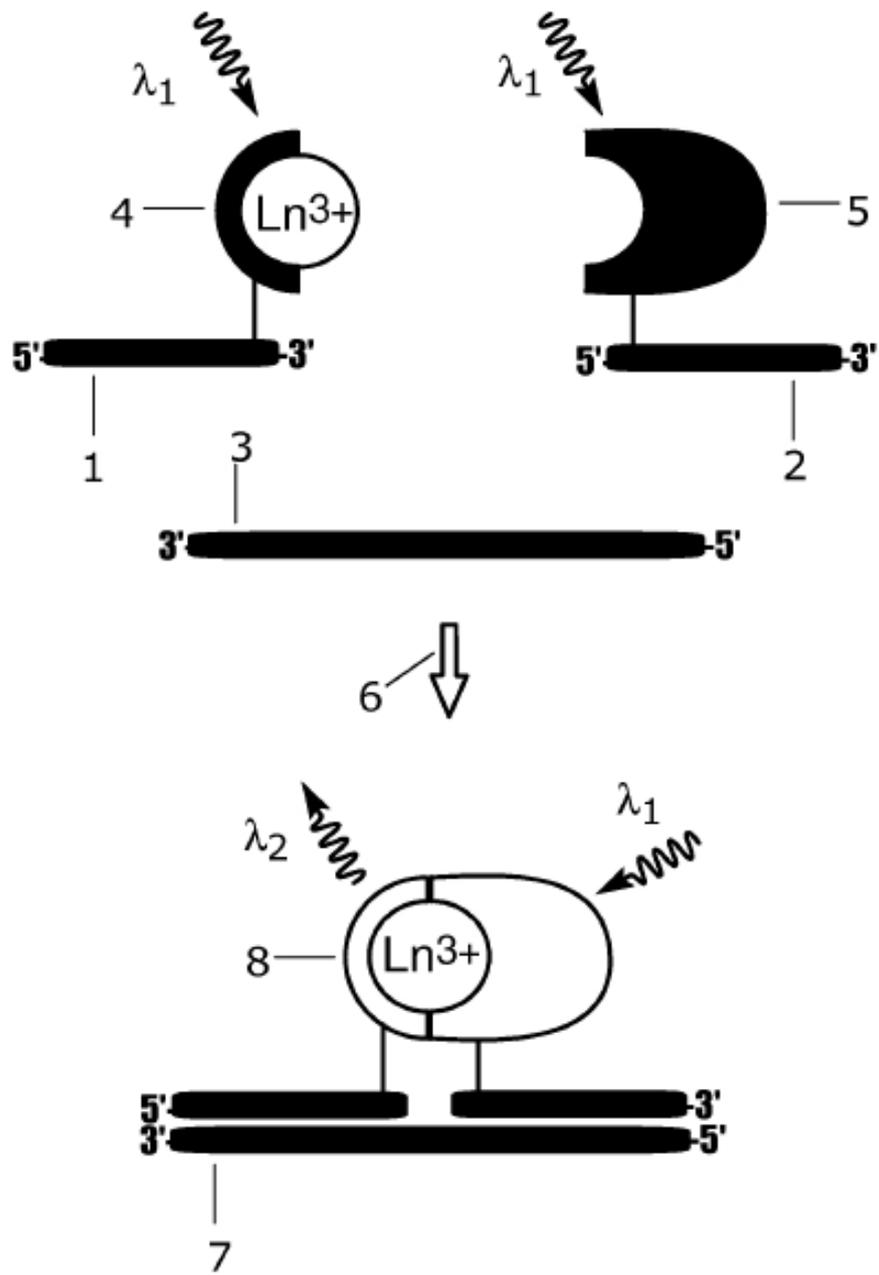


Figura 2

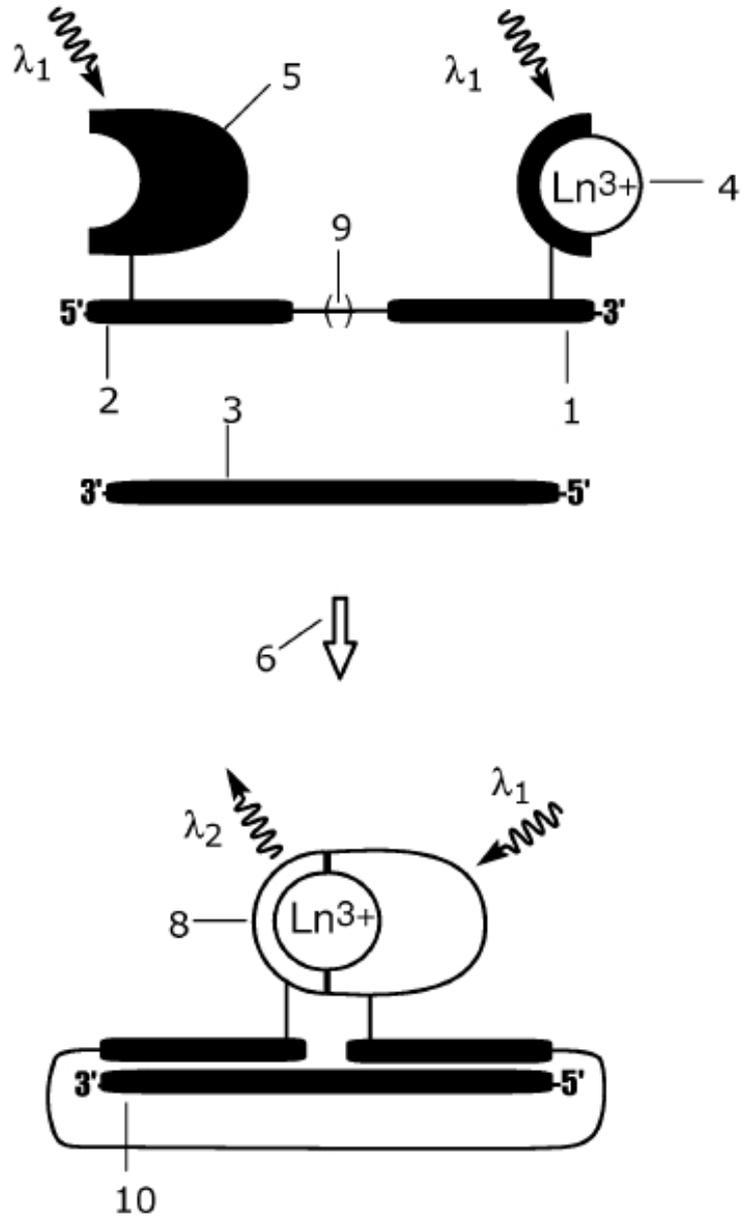


Figura 3

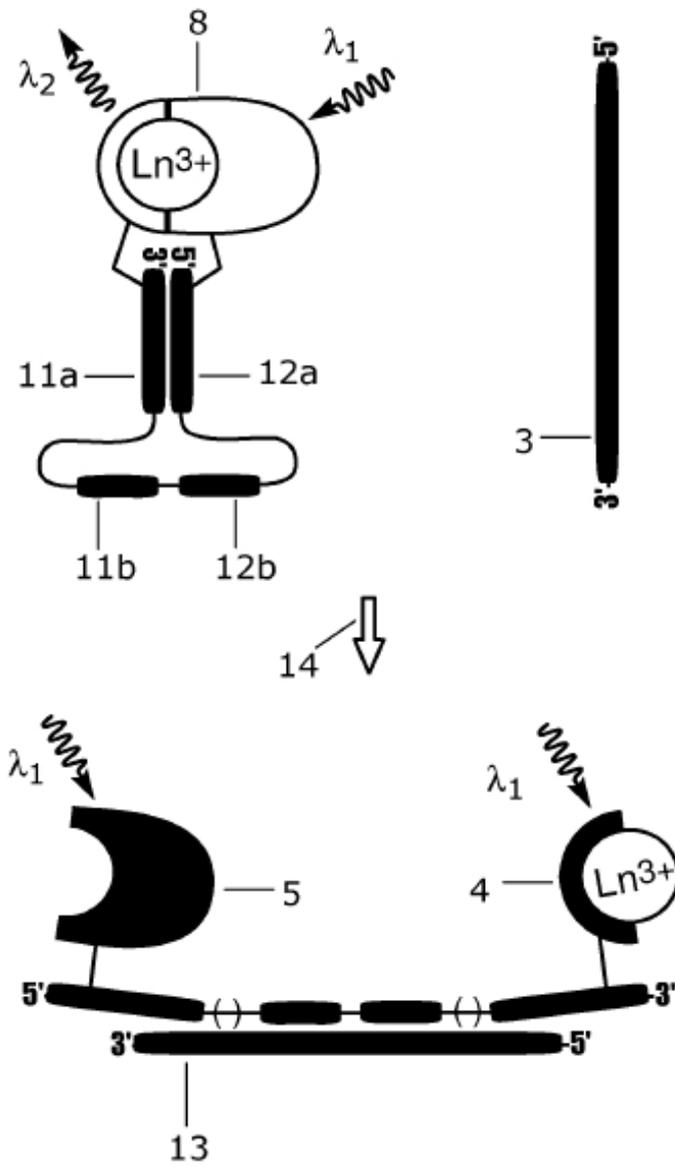
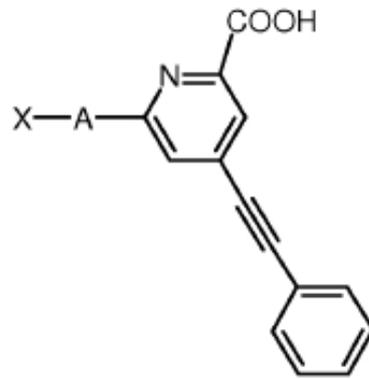
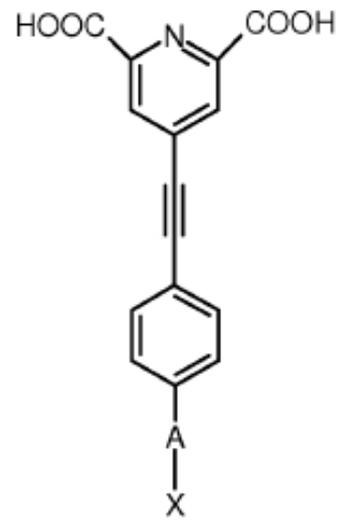


Figura 4

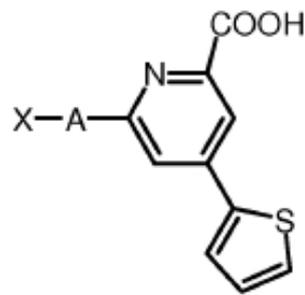
a)



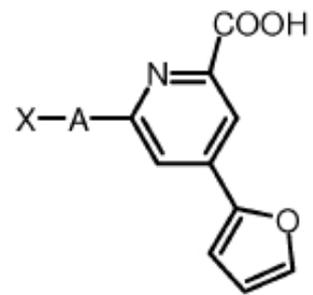
b)



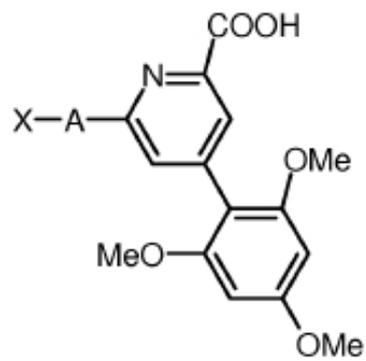
c)



d)



e)



f)

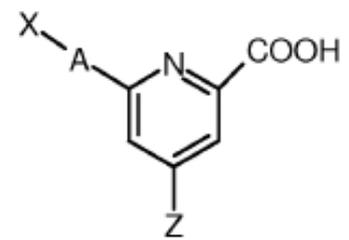
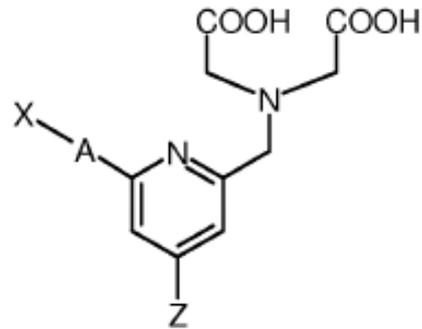
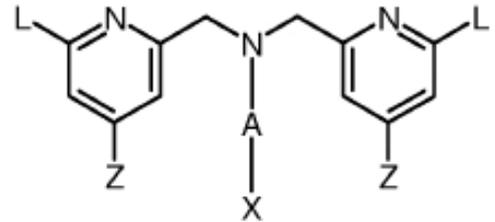


Figura 5/i

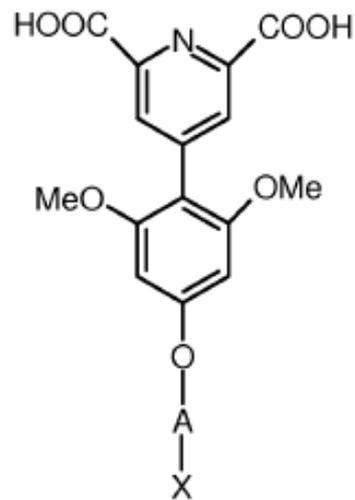
g)



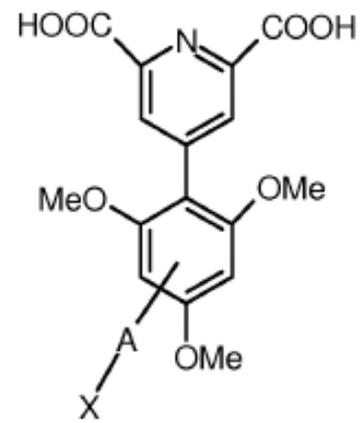
h)



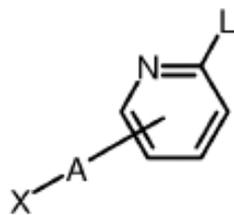
i)



j)



k)



l)

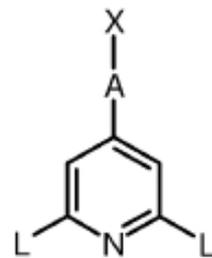


Figura 5/ii

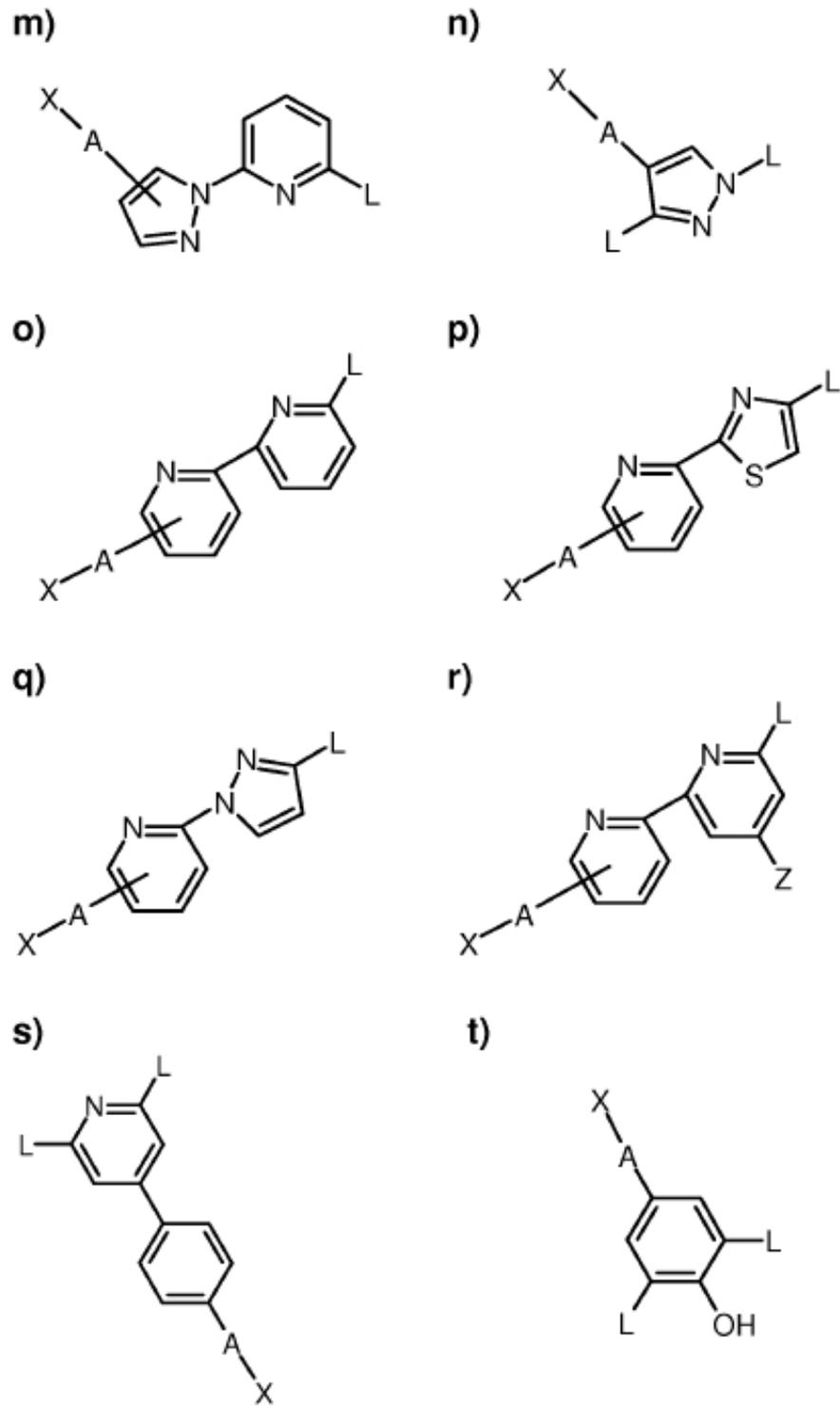
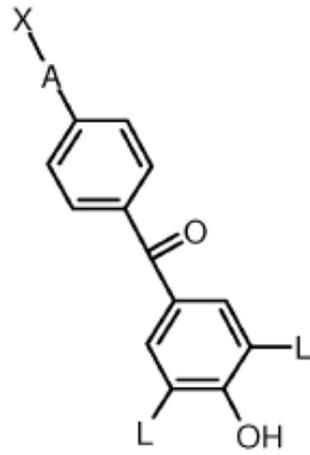
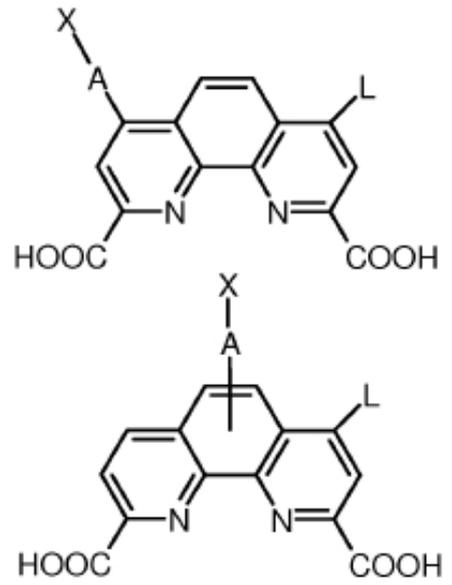


Figura 5/iii

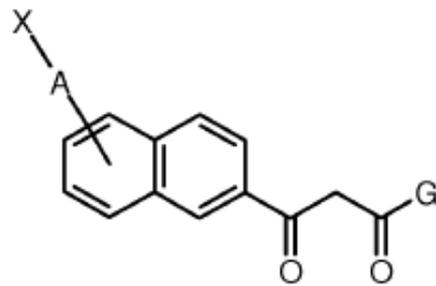
u)



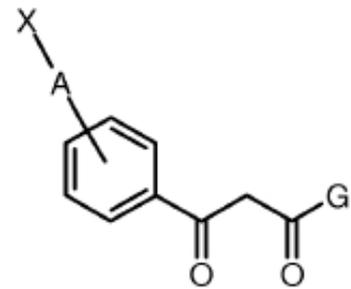
v)



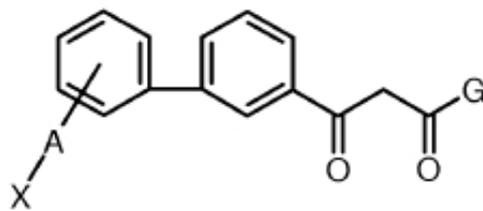
w)



x)



y)



z)

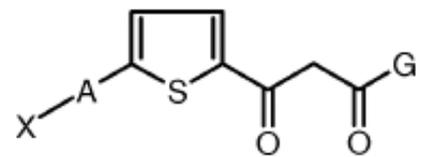


Figura 5/iv

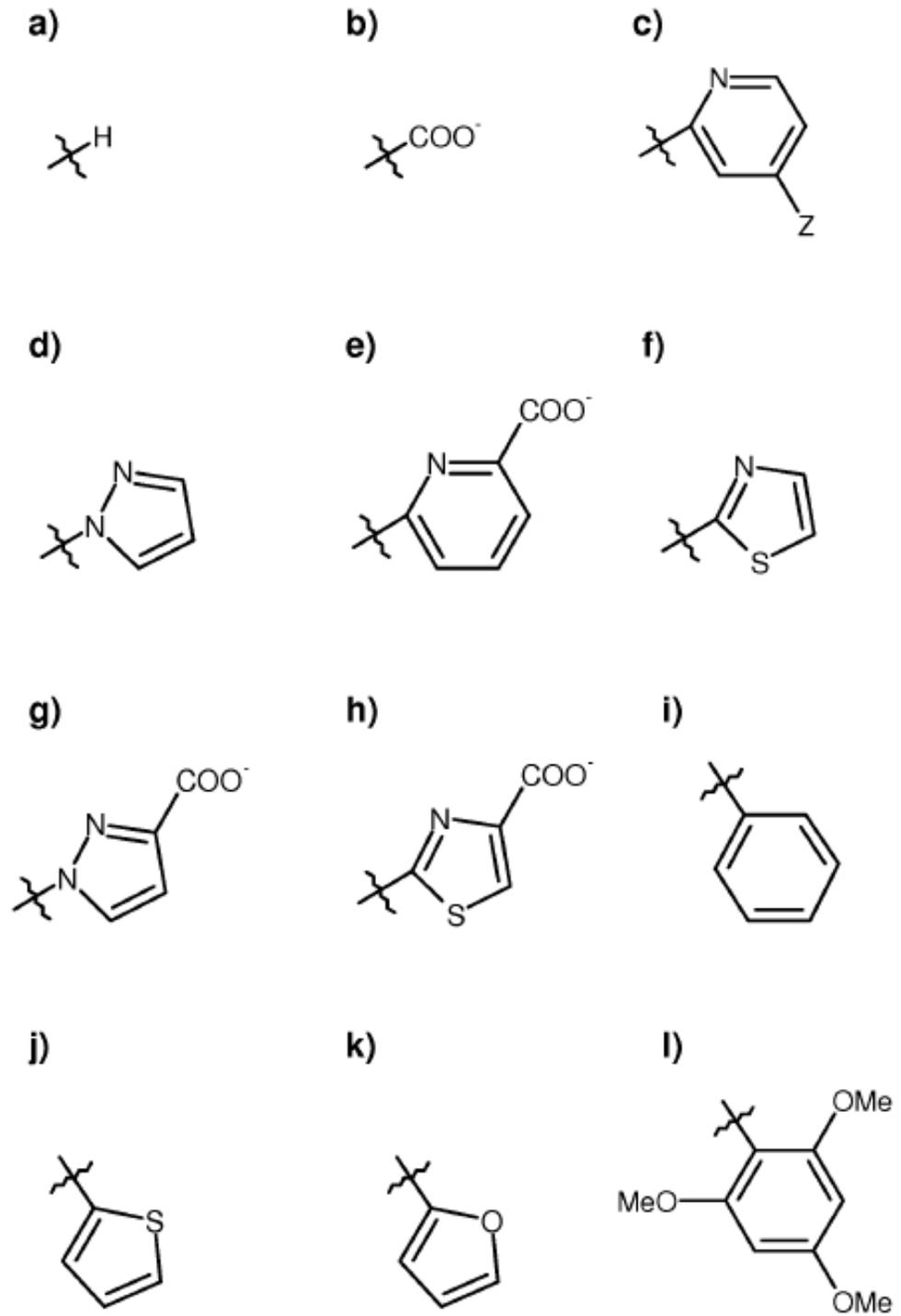


Figura 6

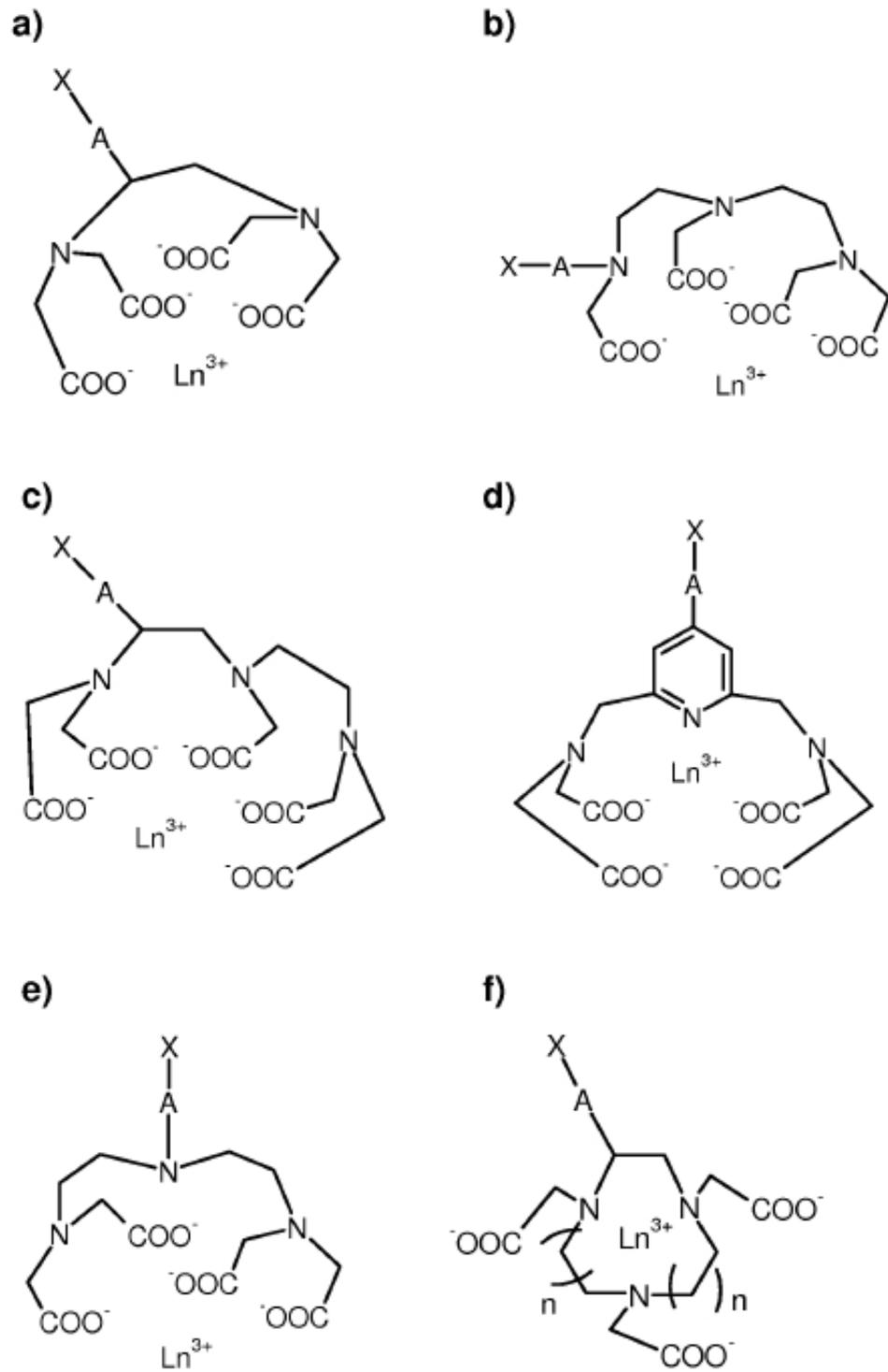


Figura 7i

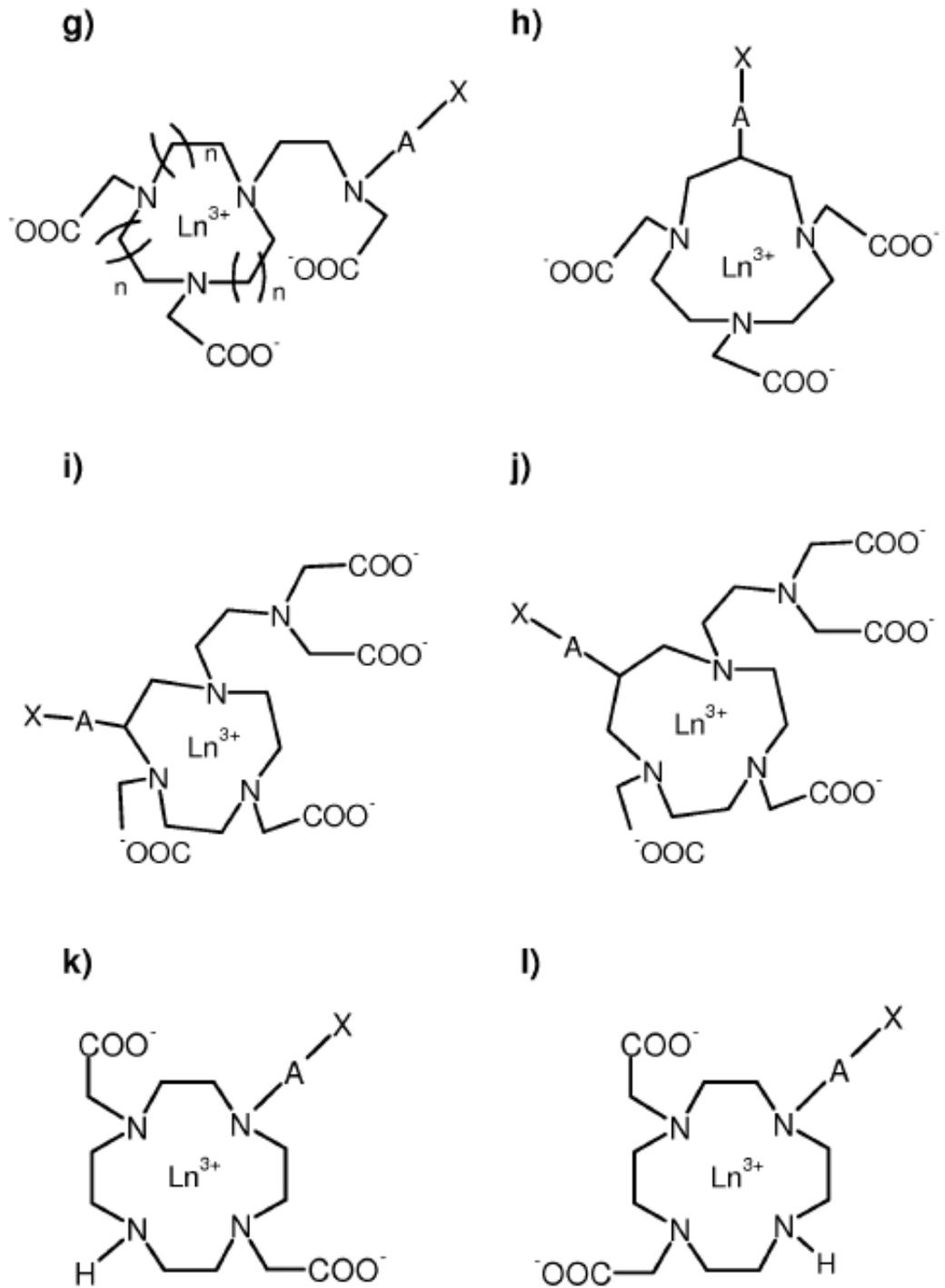


Figura 7/ii

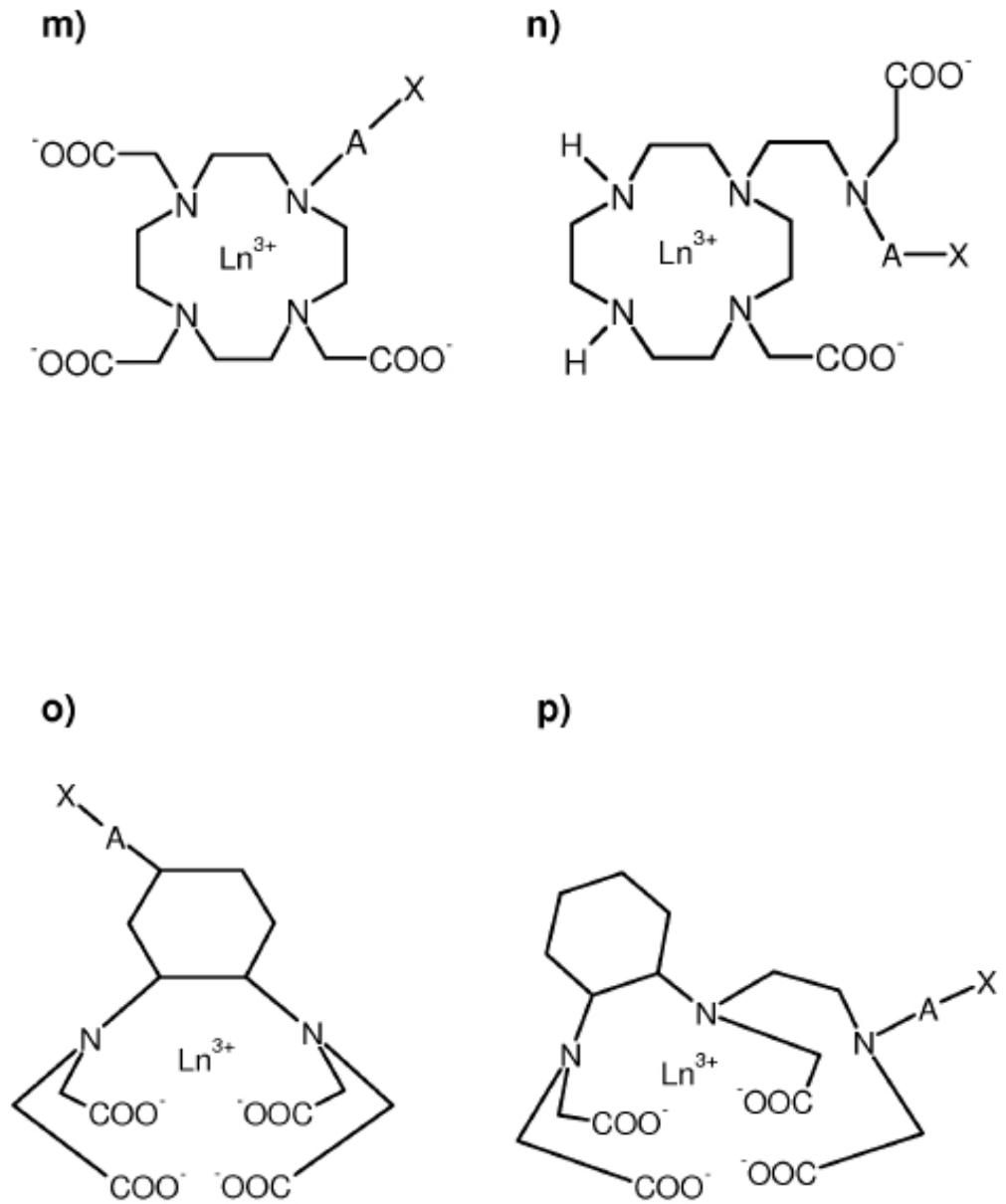


Figura 7/iii

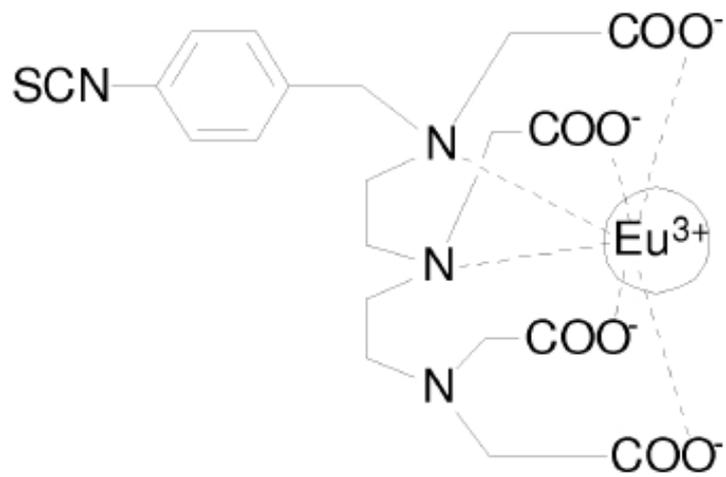


Figura 8 a

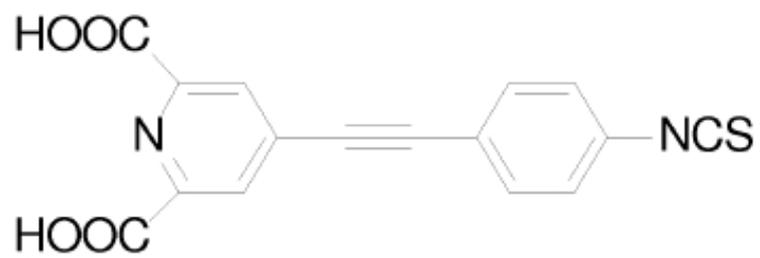


Figura 8 b

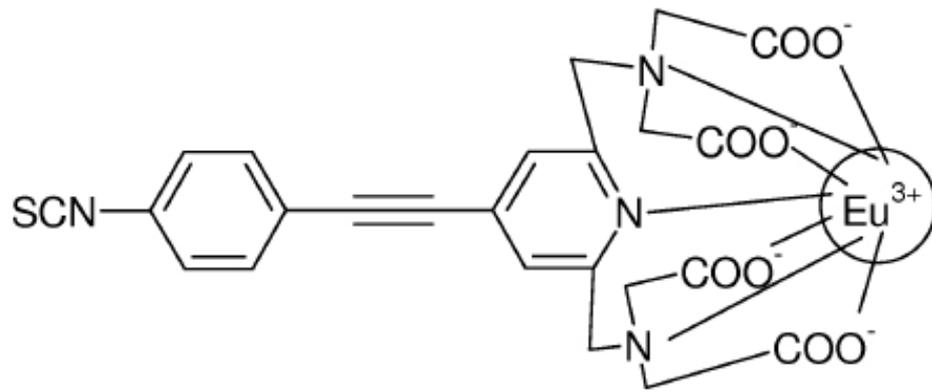


Figura 8 c

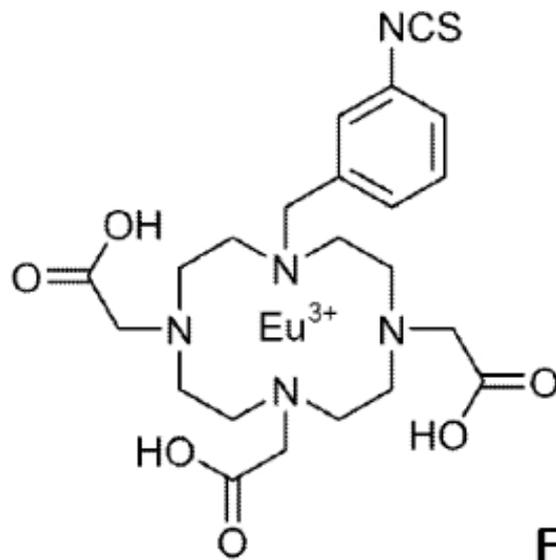


Figura 8 d

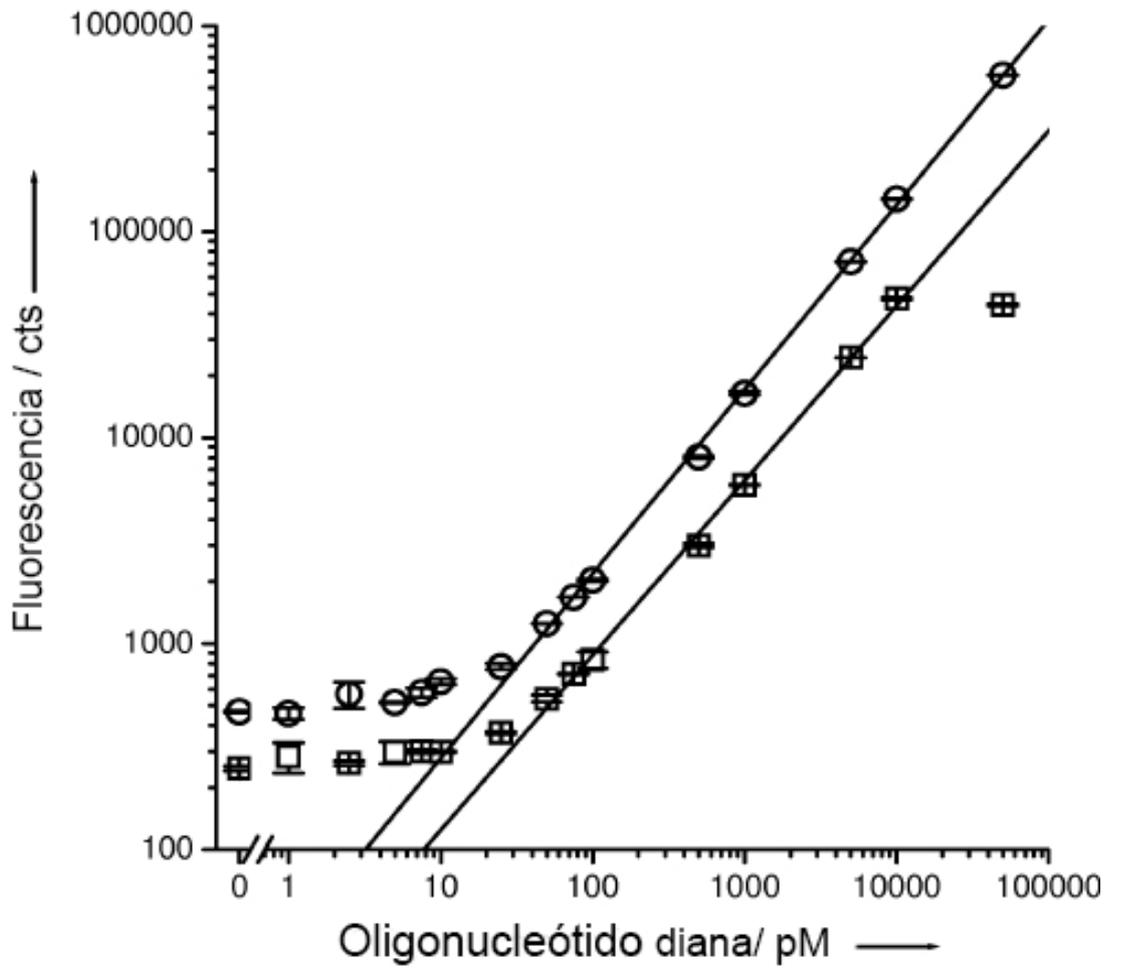


Figura 9

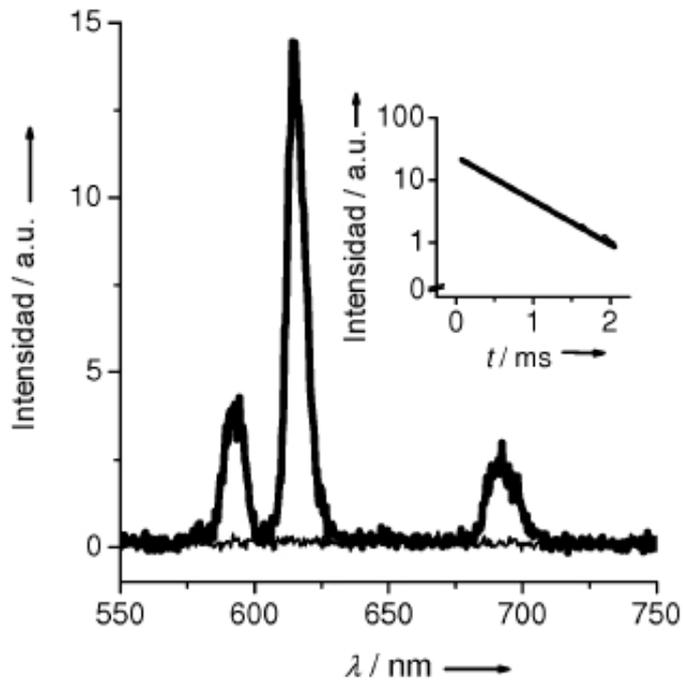


Figura 10 a

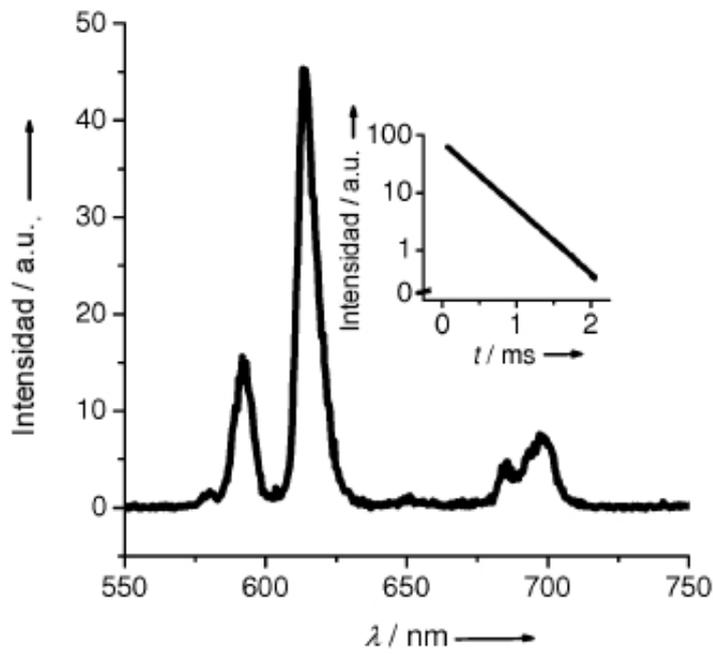


Figura 10 b

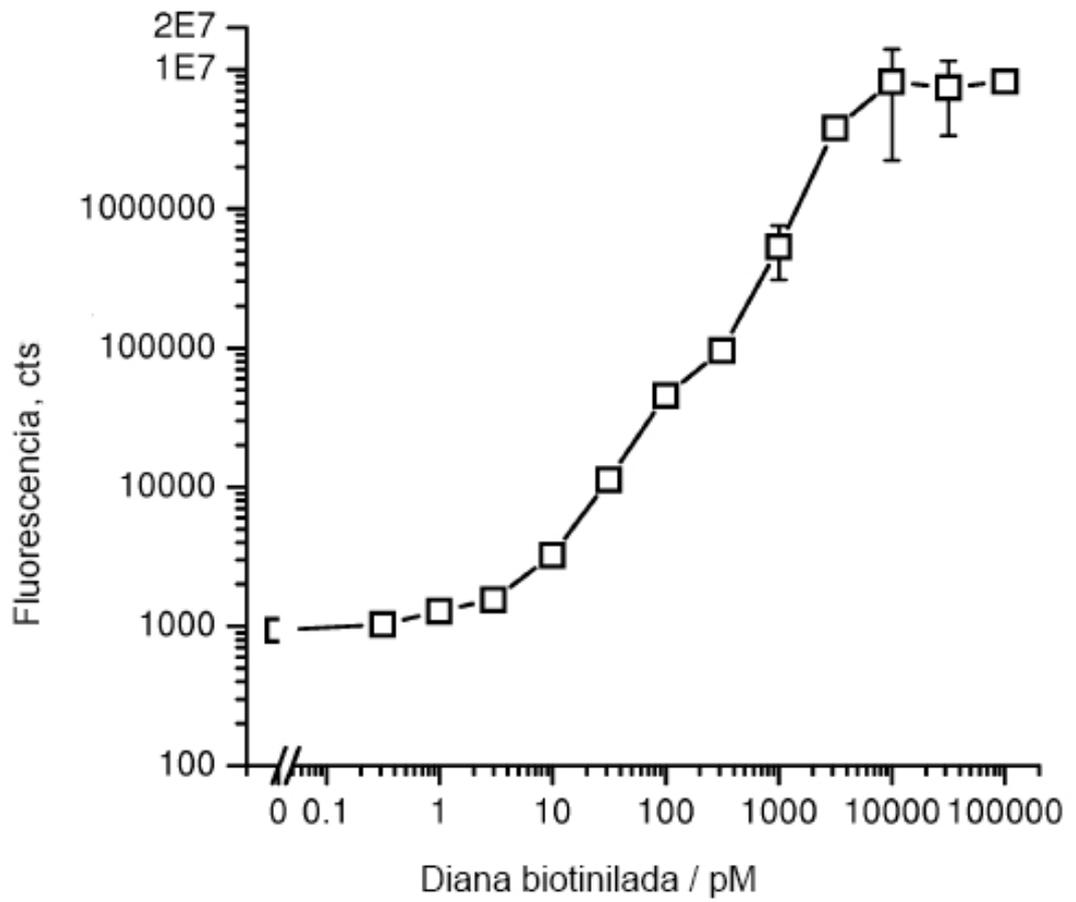


Figura 11 a

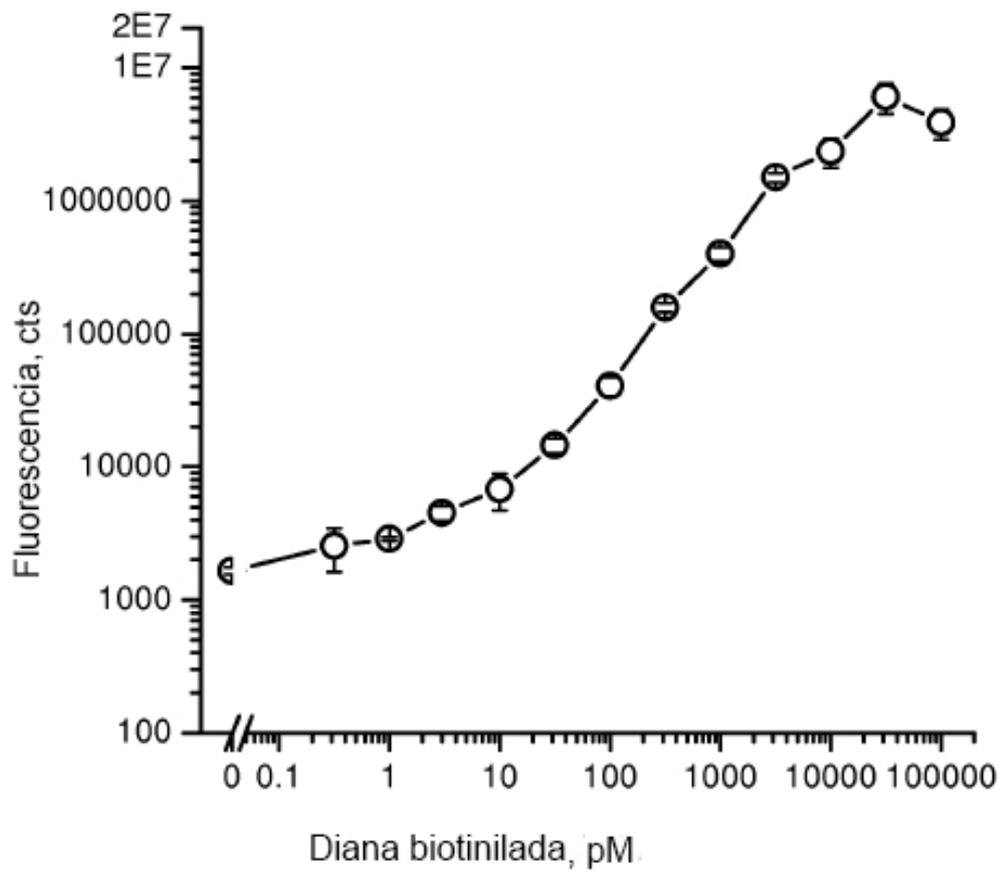


Figura 11 b

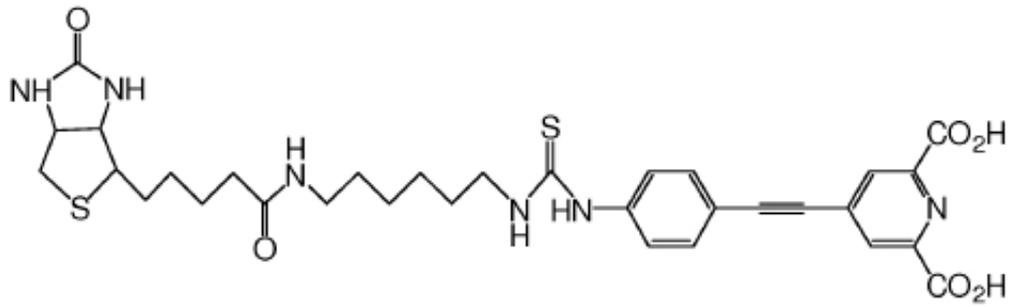


Figura 12 a

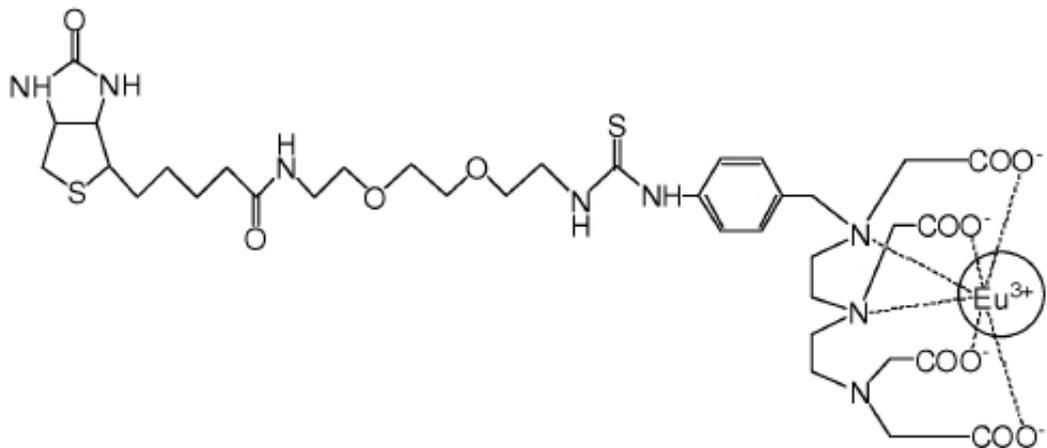


Figura 12 b

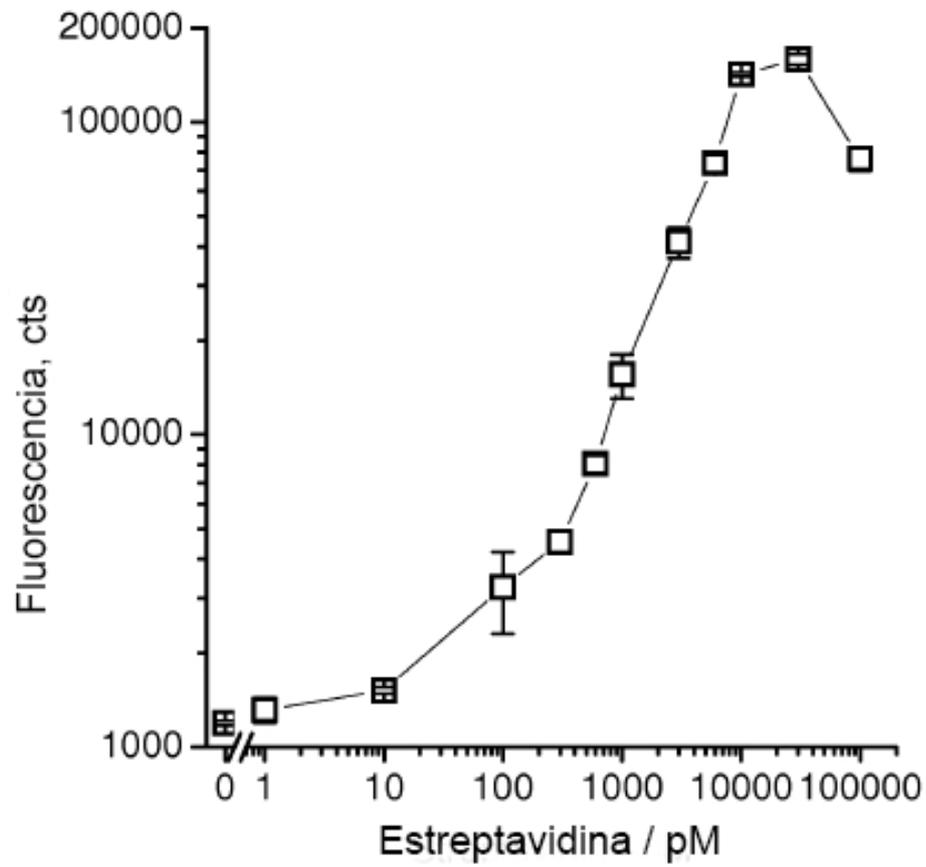


Figura 13 a

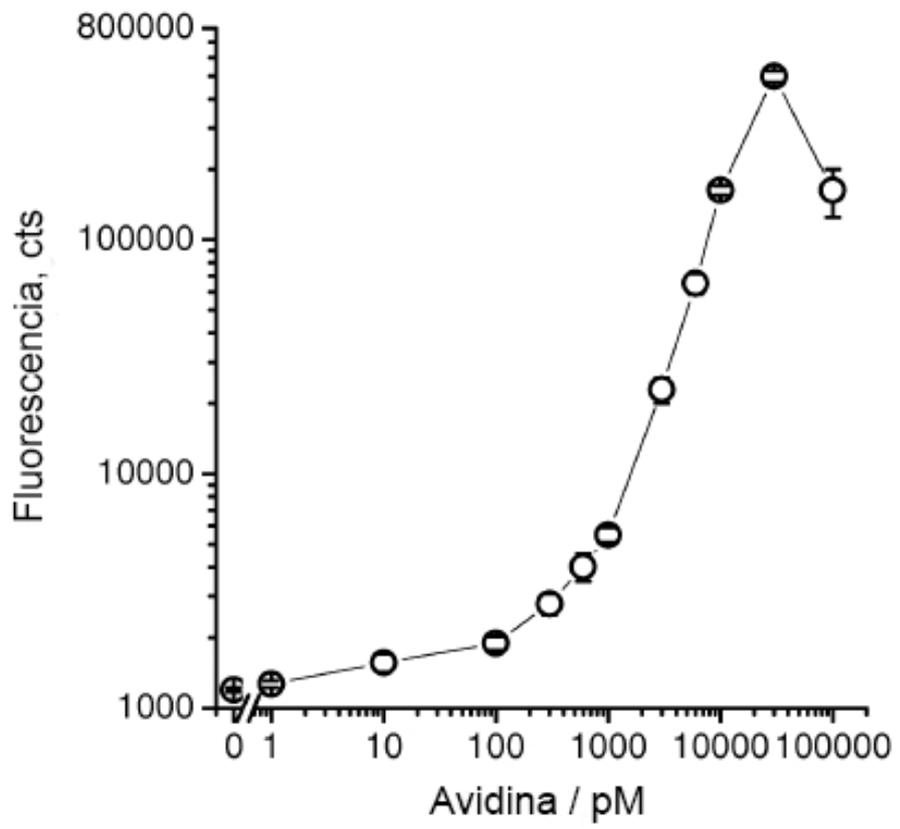


Figura 13 b

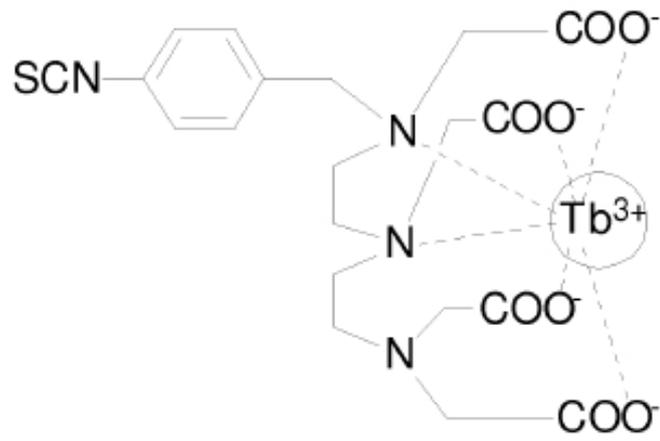


Figura 14 a

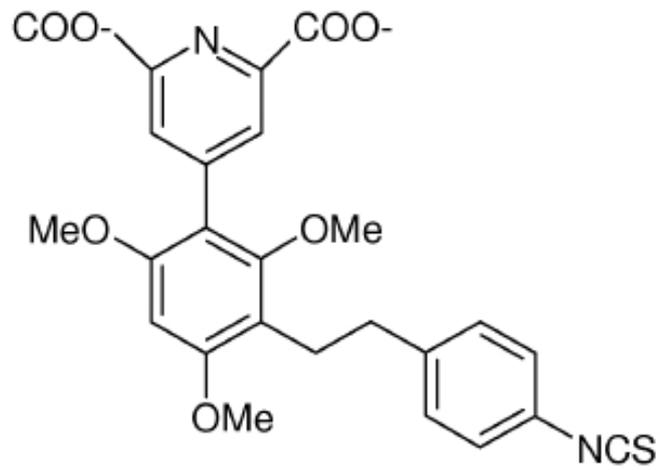


Figura 14 b

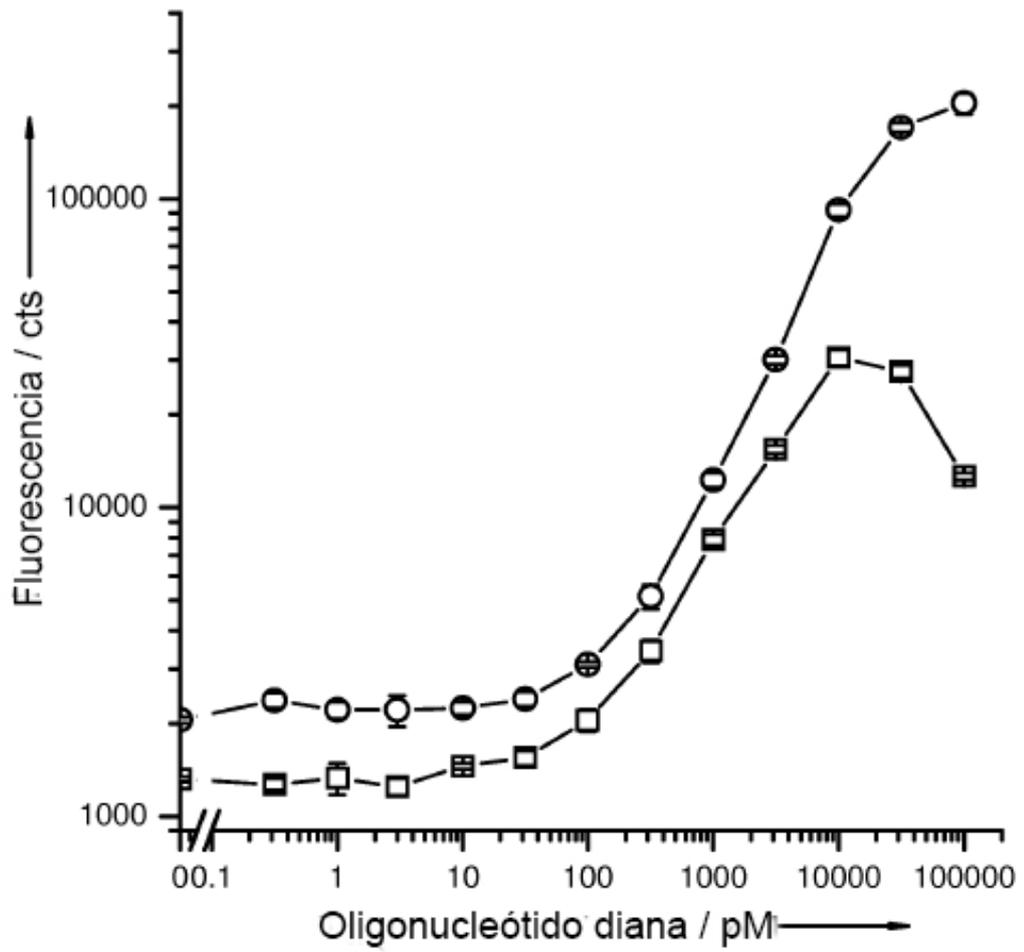


Figura 15

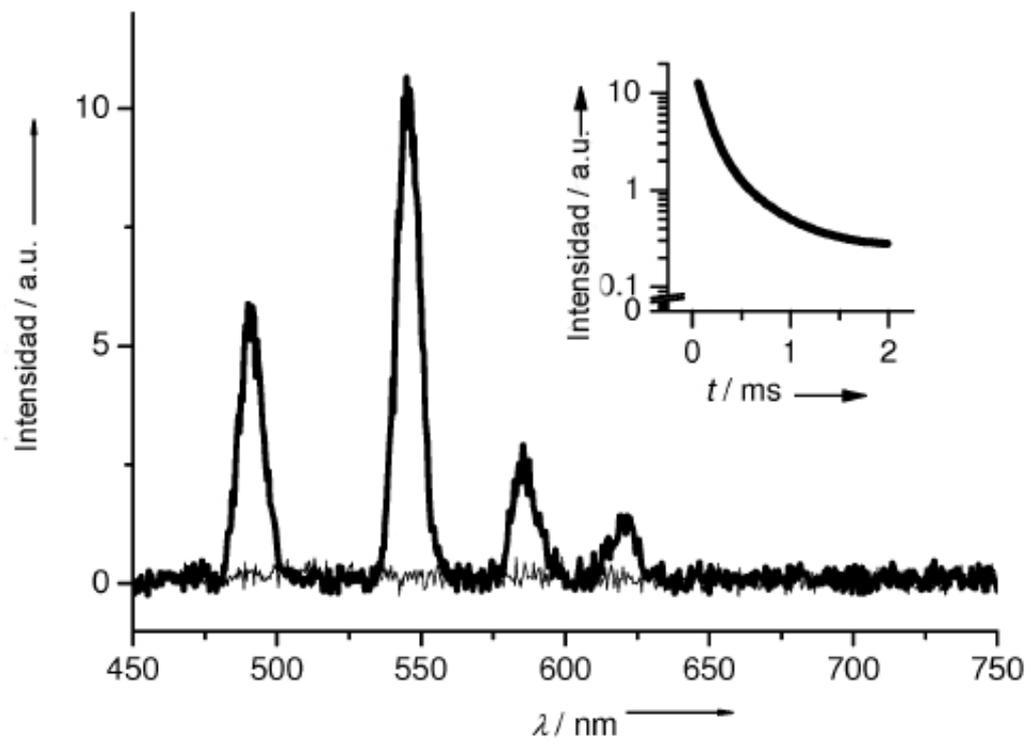


Figura 16

