



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 021**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07D 213/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07803692 .8**  
96 Fecha de presentación : **17.08.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2052252**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.2009**

54 Título: **Reactivos de marcaje de lantánido luminiscentes y su uso.**

30 Prioridad: **18.08.2006 FI 20060735**  
**18.08.2006 US 838430 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.04.2011**

73 Titular/es: **ABACUS DIAGNOSTICA Oy**  
**Tykistökatu 4 D**  
**20520 Turku, FI**

72 Inventor/es: **Takalo, Harri;**  
**Kankare, Jouko y**  
**Tienari, Elina**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 356 021 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).

**DESCRIPCION**

Reactivos de marcaje de lantánido luminiscentes y su uso

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a quelatos de lantánido  
5 detectables que van a unirse a un reactante de unión  
bioespecífico para formar moléculas detectables y al uso de  
las moléculas detectables en ensayos de unión basados en  
bioafinidad.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En ensayos de unión bioespecíficos, tales como, por  
ejemplo inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos  
nucleicos, ensayos de unión a receptores, y ensayos de unión  
celular, los analitos que van a medirse generalmente están  
15 presentes a concentraciones muy bajas. Se han desarrollado  
diversos compuestos de marcaje que permiten que se detecten y  
se cuantifiquen reactantes de marcaje con alta sensibilidad.  
La espectroscopía de luminiscencia con resolución temporal que  
usa quelatos de lantánido se ha aplicado durante varios años  
20 en inmunoensayos y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos  
[por ejemplo, I. Hemmilä, T. Stålberg y P. Mottram (eds.),  
"Bioanalytical Applications of Labelling Technologies",  
Wallac, Turku, 1994 y D. Wild (eds), "The Immunoassay  
Handbook", Nature Publishing Group, 2001]. Los quelatos de  
25 lantánido fotoluminiscentes estables (denominados en el  
contexto de esta memoria descriptiva simplemente  
luminiscentes) también tienen otras aplicaciones, por ejemplo  
citometría y microscopía de fluorescencia. Por tanto, se han  
realizado varios intentos de desarrollar nuevos quelatos  
30 altamente luminiscentes adecuados para esos tipos de  
aplicaciones fluorométricas con resolución temporal. Éstos  
incluyen por ejemplo quelatos estables que se componen de  
derivados de piridina (documentos US 4.920.195; US 4.801.77;  
US 4.761.481; Bush. C.E. *et al.* 1992, *Anal. Biochem.*, 202,146;  
35 documento WO 92/14841; Hemmilä, *et al.*, 1993, *J. Biochem.*

Biophys. Methods, 26, 283; documentos US 5.571.897; US 5.859.215, Latva, M. *et al.*, 1997, J. Luminescence, 75, 149; Takalo, H. *et al.*, 1996, Helv. Chim. Acta, 79, 789; von Lode, P. *et al.*, 2003, Anal. Chem. 75, 3193; documentos US 5 7.018.851; WO 2005/021538; US 2005/0181393); bipyridinas (documento US 5.216.134), terpiridinas (documentos US 4.859.777; US 5.202.423; US 5.324.825) o diversos compuestos fenólicos (documentos US 4.670.572; US 4.794.191; IT 1235668) como los grupos de mediación de energía y ácidos 10 policarboxílicos como las partes quelantes. Además, se han dado a conocer diversos derivados de dicarboxilato (documentos US 5.032.677; US 5.055.578; US 4.772.563), criptatos macrocíclicos (documentos US 4.927.923; WO 93/5049; EP 0 493 745), calixarenos (Sato, N. *et al.*, 1993, J. Chem. Soc. Perkin 15 Trans. 2, 621; Steemers, F.J. *et al.*, 1995, J. Am. Chem. Soc., 117, 9408), conjugado de DTPA-carboestirilo 124 (Selvin, P.R., *et al.*, 1994, J. Am. Chem. Soc., 116, 6029) y bases de Schiff macrocíclicas (documento EP 0 369 000) en solicitudes de patentes y/o patentes.

20 Desde la publicación de quelatos, que contienen dos y tres restos de 4-(feniletinil)piridina separados (Takalo, H. *et al.*, Helv. Chim. Acta, 79, 789), se han aplicado las estructuras quelantes diseñadas en solicitudes de patentes y publicaciones en las que se han reemplazado los sustituyentes 25 feniletinilo por 2-furilos y triarcoxifenilos (documentos WO 2005/021538; US 2005/0181393, Jaakkola, L. *et al.* 2005, Bioconjugate Chem., 16, 700). Además, combinando dos grupos funcionales reactivos para el acoplamiento del marcador a un reactante de unión bioespecífico, se han obtenido quelatos 30 altamente luminiscentes (documento US 7.018.851). Los quelatos con cromóforos de 2,4,6-trimetoxipiridina han mostrado alta luminiscencia especialmente con iones Tb (III) y Dy (III) (documento US 4.761.481; Hemmilä, *et al.*, 1993, J. Biochem. Biophys. Methods, 26, 283; Latva, M. *et al.*, 1997, J. 35 Luminescence, 75, 149, documento US 2005/0181393; Jaakkola, L.

et al. 2005, *Bioconjugate Chem.*, 16, 700). El nivel de energía del estado triplete del ligando, la naturaleza del cromóforo y el grupo de unión a la biomolécula tienen efectos significativos sobre las propiedades luminiscentes de los marcadores de Tb (III) (véase, por ejemplo, Sabbatini, N. et al., 1991, *J. Luminescence* 48 y 49: 463; Hemmilä, et al., 1997, *J. of Alloys and Compounds* 249, 158). Por tanto, incluso pequeños cambios en la estructura del quelato pueden reducir significativamente la luminiscencia de los marcadores de Tb (III).

Se conoce que la adición de cromóforos disminuye la solubilidad de los ligandos y quelatos en agua, aumenta la formación de agregados de reactante de unión bioespecífico durante el proceso de marcaje y las propiedades de unión no específica de las biomoléculas marcadas. Los agregados producirán problemas de purificación y una reducción del rendimiento del material marcado. Además, el aumento de la unión no específica de la biomolécula marcada intensificará la luminiscencia de fondo de los ensayos bioespecíficos y por tanto reduce la sensibilidad del ensayo.

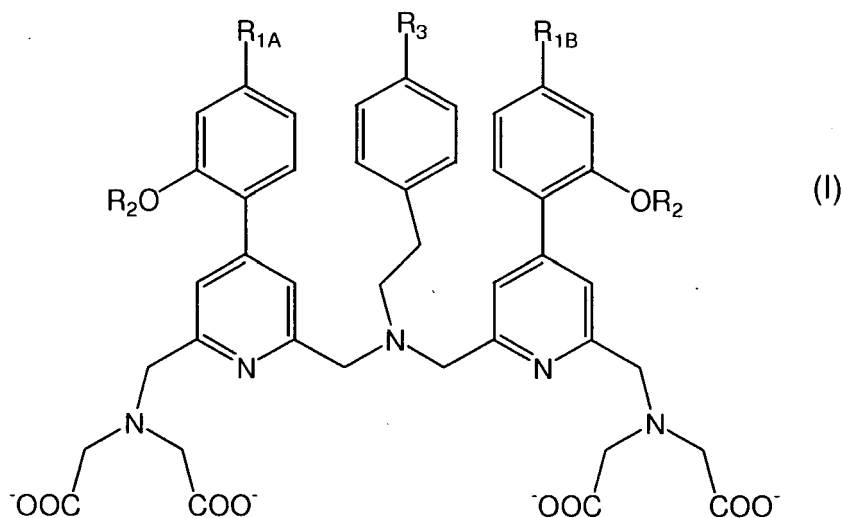
#### OBJETOS Y SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar una molécula detectable que comprende un reactante de unión bioespecífico unido a un quelato de lantánido luminiscente.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un quelato de lantánido luminiscente.

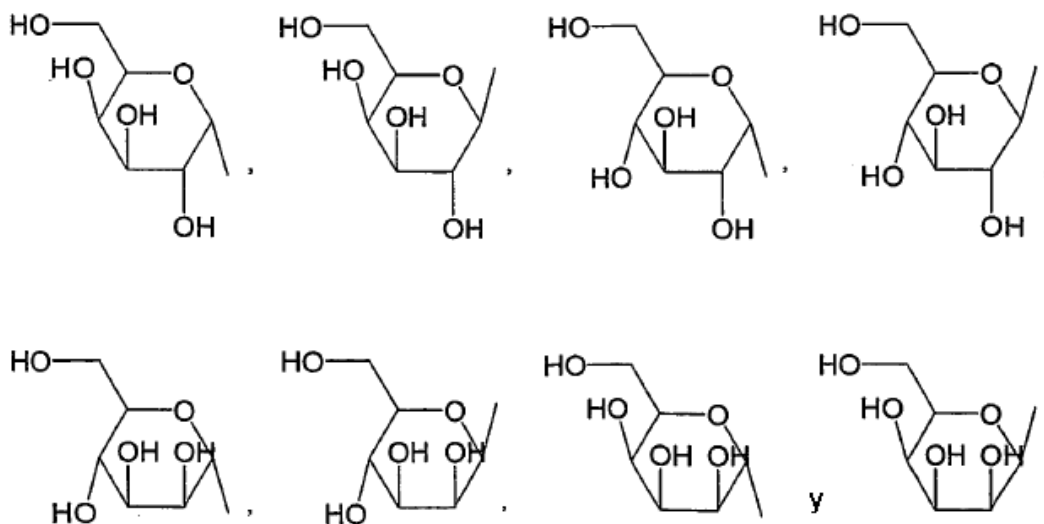
Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar el uso de la molécula detectable de la invención en un ensayo de unión bioespecífico.

Por tanto, esta invención proporciona una molécula detectable que comprende un reactante de unión bioespecífico unido a un quelato de lantánido luminiscente que comprende un ión lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)



en la que,

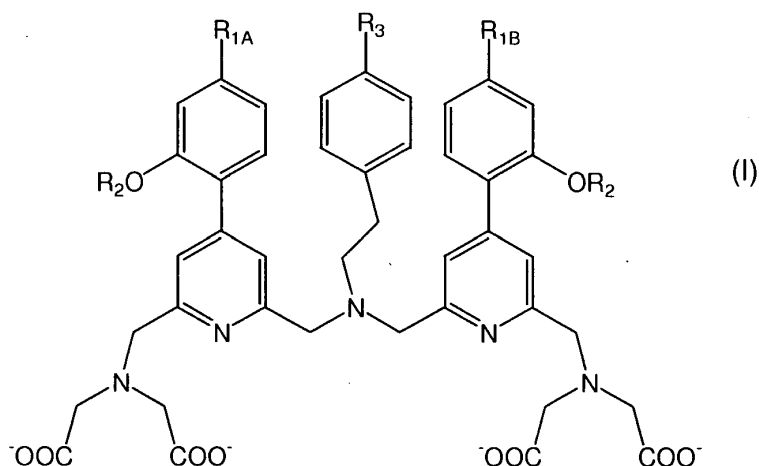
- a)  $R_{1A}$  y  $R_{1B}$  se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ , hidroxilo u  $\text{OR}_2$ ;
- 5 b)  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{C}(\text{CR}_4)_3$ , en el que  $R_4$  es un alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ,



- 10 c)  $R_3$  es un conector para el acoplamiento a un reactante de unión bioespecífico seleccionado del grupo que consiste en tiourea ( $-\text{NH-CS-NH-}$ ), aminoacetamida ( $-\text{NH-CO-CH}_2\text{-NH-}$ ), amida ( $-\text{NH-CO-}$  y  $-\text{CO-NH-}$ ), tioéter alifático ( $-\text{S-}$ ), disulfuro ( $-\text{S-S-}$ ) y 6-sustituido-1,3,5-triazin-2,4-diamina; y

d) el ión lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio (III), terbio (III), disprosio (III) y samario (III).

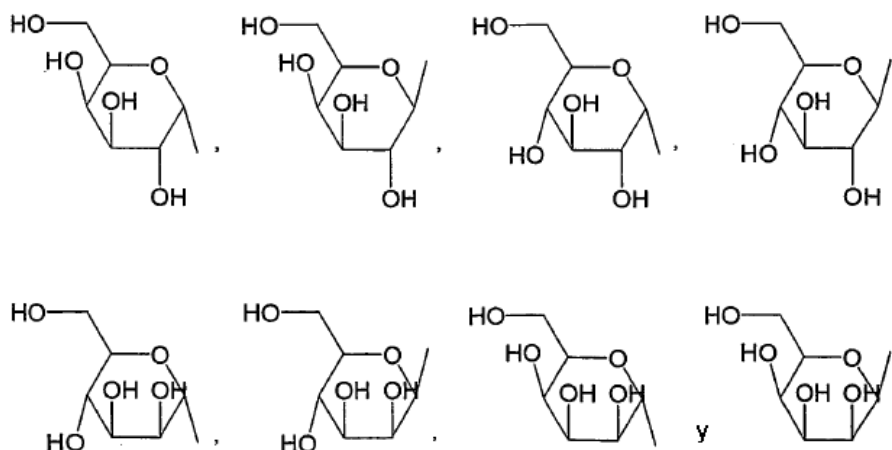
La invención también proporciona un quelato de lantánido  
 5 luminiscente que comprende un ión lantánido y un ligando  
 quelante de fórmula (I)



en la que,

a)  $R_{1A}$  y  $R_{1B}$  se seleccionan independientemente entre sí del  
 grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo,  $-COOH$ ,  $-COO^-$ ,  
 10  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ , hidroxilo u  $OR_2$ ;

b)  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $-CH_3$ ,  $-C(CH_3)_3$ ,  
 $-C(CR_4)_3$ , en el que  $R_4$  es un alquilo con de 1 a 6 átomos de  
 carbono,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ ,



15 c)  $R_3$  es un conector para el acoplamiento a un reactante de  
 unión bioespecífico seleccionado del grupo que consiste en

grupos amino, aminooxilo, carboxilo, aldehído o mercapto y derivados activados de los mismos; y

d) el ión lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio (III), terbio (III), disprosio (III) y samario (III).

5 La invención proporciona además el uso de la molécula detectable según la invención en un ensayo de unión bioespecífico.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 El objetivo de la presente invención es proporcionar medios para obtener marcadores de quelato de lantánido mejorados que van a usarse en ensayos de unión basados en bioafinidad específicos, tales como inmunoensayos (ensayos tanto heterogéneos como homogéneos), ensayos de hibridación de  
15 ácidos nucleicos, ensayos de unión a receptores, ensayos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos que utilizan determinación fluorométrica o fluorométrica con resolución temporal de la luminiscencia específica.

Los quelatos de esta invención tienen como objetivo  
20 combinar varias características importantes en un solo marcador, tales como

1. alta absorción a una longitud de onda adecuada, preferible mayor que 300 nm,
2. varias partes de absorción de UV separadas (cromóforos)  
25 en la misma estructura de ligando, preferible dos cromóforos,
3. transferencia de energía eficaz desde la parte de absorción de UV (sensibilizador de triplete) al ión lantánido,
4. una parte fuertemente quelante para crear a) la estabilidad termodinámica requerida para almacenar los  
30 reactantes marcados durante periodos de tiempo prolongados, y b) alta estabilidad cinética para permitir el uso de reactantes en condiciones en las que pueden estar presentes agentes quelantes o iones metálicos competidores,
5. una parte quelante para la protección más completa  
35 posible del ión quelado, preferible un ligando nonadentado,

6. un grupo funcional que permite un acoplamiento eficaz del quelato que va a usarse como reactante de unión (por ejemplo, anticuerpo) sin destruir sus propiedades de unión ni disminuir las propiedades de luminiscencia del marcador,

5 7. grupos funcionales para permitir una alta solubilidad en agua e impedir la formación de agregados durante el marcaje de biomoléculas y su unión inespecífica de biomoléculas marcadas.

La presente invención se refiere a moléculas detectables que comprenden un reactante de unión bioespecífico unido a un  
10 quelato de lantánido luminiscente tal como se definió anteriormente.

Se dan a conocer métodos aplicables para unir el reactante de unión bioespecífico al lantánido luminiscente en la técnica anterior, por ejemplo en Bioconjugate Techniques,  
15 G.T. Hermanson, Academic Press (1996).

Preferiblemente,  $R_{1A}$  y  $R_{1B}$  son iguales.

La expresión *reactante de unión bioespecífico*, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia o molécula que puede unirse a otra molécula. El  
20 reactante de unión bioespecífico se selecciona normalmente de un grupo que consiste en un anticuerpo, un antígeno, un ligando receptor, un péptido o una proteína de unión específica, una molécula de ácido nucleico, y una sonda de ácido desoxirribonucleico (ADN), una sonda de ácido  
25 ribonucleico (ARN), derivados de ácido nucleico [tales como ácido nucleico peptídico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA)] y moléculas quiméricas que comprenden ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) y/o derivados de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitarse a moléculas de sondas quiméricas que comprenden  
30 ADN, ARN, PNA y/o LNA.

La expresión *ensayo de unión bioespecífico*, tal como se usa en el presente documento, se refiere a métodos y técnicas que se usan para determinar la presencia o la presencia y cantidad de una molécula de analito en una muestra. Los  
35 ensayos de unión bioespecíficos incluyen pero no se limitan a



inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, basados por ejemplo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en  
5 secuencias de ácido nucleico (NASBA) o reacción de amplificación por círculo rodante, ensayos de unión a receptores y ensayos de unión celular. Los ensayos de unión bioespecíficos pueden ser homogéneos o heterogéneos. En los  
10 ensayos homogéneos, todos los componentes del ensayo están presentes en una fase de disolución y no es necesario separar físicamente las moléculas de marcador unidas de las moléculas de marcador no unidas para detectar acontecimientos de unión bioespecíficos, mientras que, en los ensayos heterogéneos, los acontecimientos de unión bioespecíficos sólo se vuelven  
15 detectables tras la separación del marcador unido del marcador no unido.

La presente invención también se refiere al uso de las moléculas detectables de la invención en ensayos de unión bioespecíficos. En estos ensayos, la mejora en comparación con  
20 la técnica anterior comprende usar la molécula detectable de la invención en lugar de las moléculas detectables de la técnica anterior.

La presente invención se refiere además a un quelato de lantánido luminiscente tal como se definió anteriormente.

25 Si el grupo conector  $R_3$  de la invención es un derivado activado de un grupo amino, aminoóxilo, carbonilo, aldehído o mercapto, puede seleccionarse del grupo que consiste en un isocianato, isotiocianato, diazonio, bromoacetamido, yodoacetamido, ésteres reactivos, piridil-2-ditio y 6-  
30 sustituido-4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino.

Los sustituyentes en 6-sustituido-1,3,5-triazin-2,4-diamina y 6-sustituido-4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino pueden seleccionarse del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alcoxilo, ariloxilo, amino, alquilo con de 1 a 6 átomos de  
35 carbono, amino o tioéteres sustituidos, y preferiblemente se

seleccionan del grupo que consiste en cloro, fluoro, etoxilo, 2-metoxietoxilo, 2-cianoetoxilo, 2,2,2-trifluoroetoxilo, tiofenoxilo o etoxicarboniltiomtoxilo. El amino o tioéter sustituido está preferiblemente mono o disustituido, preferiblemente seleccionándose independientemente cada sustitución del grupo que consiste en un alquilo o alcoxilo con de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo, carbonilo y carboxilo.

Si el grupo  $R_3$  va a unirse a un soporte sólido, preferiblemente tiene un grupo reactivo, que es un grupo de polimerización.

Si el ligando quelante va a usarse en la síntesis de oligonucleótidos o péptidos como medio para preparar un péptido marcador o un oligonucleótido marcado tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 2005/0181393, el puente entre dos cromóforos, es decir  $R_3$ -Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, se prefiere que el puente comprenda un grupo funcional tal como describe, por ejemplo, el documento US 2005/0181393.

Según una realización preferida de la invención, el ión lantánido es o bien terbio (III) o bien disprosio (III).

Los siguientes ejemplos demuestran la idoneidad de los reactivos de marcaje para los bioensayos. El ejemplo 8 da a conocer un ensayo de hibridación homogéneo basado en extinción y el ejemplo 9 una detección homogénea de un producto de PCR.

Es digno de mención que un compuesto que corresponde al quelato 7 de los ejemplos con dos restos 2,4,6-trimetoxifenilpiridina, es decir  $\{2,2',2'',2'''-\{[2-(4\text{-isotiocianatofenil)etilimino]bis(metilen)bis[4-(2,4,6-trimetoxifenil)piridin-6,2-diil]bis(metilen-nitrilo)}\}-tetrakis(acetato)\}$ terbio (III), tiene una solubilidad acuosa muy baja, y por tanto, es inadecuado como reactivo de marcaje.

Las estructuras y la vía sintética empleadas en los ejemplos se muestran en un esquema de reacción 1. El esquema ilustra la síntesis del compuesto 7 mostrado a modo de ejemplo mediante los ejemplos 1 a 7.

**Ejemplos**Ejemplo 1**Síntesis de 4-yodo-3-metoxifenol (1)**

Se disolvió 3-metoxifenol (2,0 ml, 18,2 mmoles) en DMF  
 5 seca (50 ml). Se añadieron yoduro de sodio (3,3 g, 21,9  
 mmoles) y cloramina-T (5,0 g, 21,9 mmoles) a la mezcla y se  
 agitó la reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se  
 diluyó la mezcla de reacción con agua (150 ml), se acidificó  
 con disolución de ácido clorhídrico al 5% y se extrajo con  
 10 acetato de etilo (2 x 100 ml). Se lavó la fase orgánica con  
 disolución de tiosulfato de sodio al 5% (200 ml) y se secó  
 sobre sulfato de sodio. Se purificó el producto mediante  
 cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice dos veces (en  
 primer lugar con diclorometano, después con acetato de etilo  
 15 al 20% en éter de petróleo). El rendimiento fue de 0,82 g  
 (18%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 7,52 (1H, d, J=8,5 Hz), 6,63  
 (1H, d, J=3,0 Hz), 6,37 (1H, dd, J=8,5 Hz, 3,0 Hz), 5,27 (1H,  
 s), 3,81 (3H, s).

20 Ejemplo 2**Síntesis de (4-yodo-3-metoxifenoxi)acetato de terc-butilo (2)**

Se disolvió el compuesto 1 (0,8 g, 3,19 mmoles) en DMF  
 seca (30 ml). Se añadió carbonato de potasio secado (1,32 g,  
 9,57 mmoles) y se desaireó la mezcla con argón. Se añadió  
 25 bromoacetato de terc-butilo (0,71 ml, 4,78 mmoles) a la mezcla  
 y se agitó la reacción durante la noche a 70°C. Se enfrió la  
 mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con  
 agua (20 ml). Se extrajo el producto con dietil éter (3 x 50  
 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Se purificó el producto  
 30 mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando  
 diclorometano como eluyente. El rendimiento fue de 1,1 g  
 (96%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 7,66 (1H, d, J=8,5 Hz), 6,39  
 (1H, dd, J=8,5 Hz, 2,5 Hz), 6,34 (1H, d, J=2,5), 4,57 (2H, s),  
 3,79 (3H, s), 1,51 (9H, s).

Ejemplo 3**Síntesis de [3-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoxi]acetato de terc-butilo (3)**

Se disolvió el compuesto 2 (1,05 g, 2,88 mmoles) en DMF  
 5 seca (20 ml). Se añadieron bis(pinacolato)diboro (0,88 g, 3,46  
 mmoles) y acetato de potasio (0,85 g, 8,64 mmoles) y se  
 desaireó la mezcla de reacción con argón. Se añadió acetato de  
 paladio (19,3 mg, 0,086 mmoles) y se agitó la reacción durante  
 10 tres horas a 85°C. Se enfrió la mezcla de reacción hasta  
 temperatura ambiente y se diluyó con agua (40 ml) y acetato de  
 etilo (40 ml). Se eliminaron las partículas negras mediante  
 filtración a través de un lecho de Celite. Se separó la fase  
 orgánica, se lavó con agua (30 ml) y se secó sobre sulfato de  
 sodio. Se purificó el producto mediante cromatografía  
 15 ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol al 3% en  
 diclorometano como eluyente. El rendimiento fue de 0,26 g  
 (25%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 7,79 (1H, d, J=8,5 Hz), 6,59  
 (1H, dd, J=8,5 Hz, 2,5 Hz), 6,31 (1H, d, J=2,5 Hz), 4,54 (2H,  
 s), 3,83 (3H, s), 1,55 (9H, s), 1,28 (12 H, s).

20

Ejemplo 4**Síntesis de 2,2',2'',2'''-{[2-(4-aminofenil)etilimino]-bis-(metilen)bis{4-{2-metoxi-4-[(terc-butoxicarbonil)-metoxi]fenil}-piridin-6,2-diil}bis(metilen-nitrilo)}tetra-**  
**kis(acetato) de tetra(terc-butilo) (4)**

Se disolvieron el compuesto 3 (0,11 g, 0,30 mmoles) y  
 2,2',2'',2'''-{[2-(4-aminofenil)etilimino]-bis(metilen)bis(4-  
 bromopiridin-6,2-diil)bis(metilen-nitrilo)}-tetrakis(acetato)  
 de tetra(terc-butilo) (0,10 mg, 0,10 mmoles) en DMF seca (5  
 30 ml) y se desaireó la mezcla con argón. Se añadieron carbonato  
 de cesio (0,11 g, 0,34 mmoles) y tetrakis(trifenilfosfina)-  
 paladio (4,6 mg, 0,004 mmoles) a la mezcla y se agitó la  
 reacción durante la noche a 80°C. Se enfrió la mezcla de  
 reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con agua (10  
 35 ml) y acetato de etilo (10 ml). Se eliminaron las partículas

negras mediante filtración a través de un lecho de Celite. Se separó la fase orgánica, se lavó con salmuera (20 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (en primer lugar metanol al 5% en diclorometano y finalmente al 10%). El rendimiento fue de 90,0 mg (69%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 7,63-7,72 (4H, m), 7,24 (2H, s), 6,90 (2H, d), 6,55 (2H, d), 6,50 (2H, d), 6,41 (2H, s), 4,42 (4H, s), 4,08 (4H, s), 3,96 (4H, s), 3,83 (6H, s), 3,53 (8H, s), 2,68-2,97 (4H, m), 1,45 (54H, m).

#### Ejemplo 5

**Síntesis de 2,2',2'',2'''-{[2-(4-aminofenil)etilimino]-bis(metilen)bis{4-[2-metoxi-4-(carboximetoxi)fenil]piridin-6,2-diil}bis(metilen-nitrilo)}-tetrakis(ácido acético) (5)**

Se agitó una disolución de compuesto 4 (40,0 mg, 0,031 mmoles) en ácido trifluoroacético (0,40 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras evaporación sin calentamiento, se trituró la mezcla con dietil éter (10 ml) y se filtró. La filtración dejó un producto puro. El rendimiento fue de 53 mg. <sup>1</sup>H-RMN (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ 7,87 (2H, m), 7,75 (2H, s), 7,38 (2H, m), 7,17 (2H, m), 6,99 (2H, m), 6,68 (2H, d), 6,61 (2H, m), 4,74 (4H, s), 4,54 (4H, s), 4,09 (4H, m), 3,80 (6H, s), 3,56 (8H, s), 3,09 (4H, m).

25

#### Ejemplo 6

**Síntesis de {2,2',2'',2'''-{[2-(4-aminofenil)etilimino]-bis(metilen)bis{4-[2-metoxi-4-(carboximetoxi)fenil]piridin-6,2-diil}bis(metilen-nitrilo)}-tetrakis(acetato)}terbio (III) (6)**

Se disolvió el compuesto 5 (49,2 mg, 0,038 mmoles) en agua (1 ml) y se ajustó el pH a 6,5 con hidrogenocarbonato de sodio sólido. Se añadió cloruro de terbio (III) hexahidratado (15,4 mg, 0,041 mmoles) en agua (0,2 ml) en un plazo de 10 minutos y se mantuvo el pH en 6,5 con hidrogenocarbonato de

35

sodio sólido. Tras agitar la reacción a temperatura ambiente durante dos horas, se elevó el pH hasta 8,5 con hidróxido de sodio 1 M y se retiró el precipitado mediante centrifugación. Se trató el filtrado con acetona y se recogió el producto mediante centrifugación y se lavó con acetona. Se usó el producto en la siguiente etapa sin purificación. El rendimiento fue de 19,6 mg (47%). UV (tampón carbonato 50 mM, pH 9,8): 308, 281. EM-MALDI TOF para  $C_{48}H_{48}N_6O_{16}Tb$ : calculado 1123,85, hallado 1122,85 (M-1)<sup>-</sup>.

10

Ejemplo 7

**Síntesis de {2,2',2'',2'''-[2-(4-isotiocianatofenil)-etilimino]bis(metilen)-bis{4-[2-metoxi-4-(carboximetoxi)-fenil]piridin-6,2-diil}bis(metilen-nitrilo)}tetrakis-(acetato)}terbio (III) (7)**

15

Se añadió lentamente el compuesto 6 (18,4 mg, 0,016 mmoles) en agua (0,5 ml) a una mezcla de tiofosgeno (5,0  $\mu$ l, 0,066 mmoles), hidrogenocarbonato de sodio (6,9 mg, 0,082 mmoles) y cloroformo (0,5 ml). Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, se lavó la fase acuosa con cloroformo (3 x 1 ml). Entonces se ajustó el pH de la disolución acuosa a 7,0 con ácido acético 1 M y se añadió acetona. Se recogió el producto mediante centrifugación y se lavó con acetona. El rendimiento fue de 16,1 mg (84%). UV (tampón carbonato 50 mM, pH 9,8): 310, 278. EM-MALDI TOF para  $C_{49}H_{46}N_6O_{16}STb$ : calculado 1165,91, hallado 1164,84 (M-1)<sup>-</sup>.

20

25

Ejemplo 8**Eficiencia de extinción**

Para caracterizar la idoneidad del quelato de terbio desarrollado para ensayos de hibridación homogéneos basados en extinción, se marcó una sonda de oligonucleótido modificada en el extremo 5'-amino que tenía la secuencia 5'-AAT TTA GAA GTC ATT AGC GAG CAG GCT ACC G-3' (SEQ ID NO 1) y se purificó en dos reacciones de marcaje y purificación diferentes con dos

35

quelatos de lantánido diferentes: con el quelato según la presente invención (compuesto 7) y con 2,2',2'',2'''-{{6,6'-{4''-[2-(4-isotiocianatofenil)etil]-1H-pirazol-1'',3''-diil}-bis(piridina)-2,2'-diil}bis(metilen-nitrilo)}tetrakis(acetato) 5 terbio (III) (documento US 5.859.215). La expresión "ensayo de hibridación homogéneo basado en extinción", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos tal como han descrito, por ejemplo, Kiviniemi *et al.* (Clin Biochem. Nov 2003;36(8):633-10 40. A homogeneous high-throughput genotyping method based on competitive hybridization. Kiviniemi M, Nurmi J, Turpeinen H, Lovgren T, Ilonen J.) Se marcó la sonda y se purificó con cada quelato tal como describen Nurmi *et al.* (Anal Chem. 15 Jul 2002;74(14):3525-32. High-performance real-time quantitative 15 RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. Nurmi J, Wikman T, Karp M, Lovgren T.). Más adelante en el presente documento, las dos sondas con la misma secuencia de bases pero que portan diferentes quelatos de terbio como marcadores se denominan sonda 1 para la sonda 20 marcada con el quelato de la presente invención (compuesto 7) y sonda 2 para la sonda marcada con el quelato según la técnica anterior.

Con el fin de determinar con cuánta eficacia podían extinguirse las señales producidas por la sonda 1 y la sonda 2 25 con una sonda de extinción complementaria, se prepararon los cuatro tipos de reacciones siguientes:

1. Una reacción de 50 µl que contenía sonda 1 17 nM en tampón para PCR II 1 X y MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.).
- 30 2. Una reacción de 50 µl que contenía sonda 1 17 nM y sonda de extinción 170 nM en tampón para PCR II 1 X y MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La sonda de extinción, que era complementaria a la sonda 1 y la sonda 2, tenía la secuencia 5'-TCG CTA ATG ACT TCT AAA TT-3' (SEQ ID No 35 2) y en su extremo 3' portaba el marcador de extinción QSY7.

3. Una reacción de 50  $\mu$ l que contenía sonda 2 17 nM en tampón para PCR II 1 X y  $MgCl_2$  2,5 mM (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.).

4. Una reacción de 50  $\mu$ l que contenía sonda 2 17 nM y sonda de extinción 170 nM en tampón para PCR II 1 X y  $MgCl_2$  2,5 mM (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.).

Tras haberse preparado las reacciones, se midieron sus señales de terbio usando los parámetros de medición de terbio por defecto de un contador Victor 2 Multilabel (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Wallac, Finlandia). Se determinaron las máximas relaciones señal/ruido que pueden obtenerse en un ensayo de hibridación homogéneo basado en extinción con la sonda 1 y la sonda 2 dividiendo la señal obtenida a partir de la reacción 1 entre la señal de la reacción 2 (para la sonda 1) y dividiendo la señal obtenida a partir de la reacción 3 entre la señal de la reacción 4 (para la sonda 2).

Los resultados se muestran en la tabla 1. Tal como puede observarse en la tabla, la intensidad de señal emitida por la sonda 1 sola [597241 cuentas por segundo (cps)] es mayor que la señal emitida por la sonda 2 (134716 cps), lo que indica que el quelato según la presente invención (compuesto 7) es superior en comparación con el quelato según la técnica anterior porque puede proporcionar una mayor intensidad de fluorescencia de larga vida útil. Además, la señal emitida por la sonda 1 se extingue de manera más eficaz por una sonda de extinción complementaria que la señal emitida por la sonda 2: la máxima relación señal/ruido que puede obtenerse usando la sonda 1 en un ensayo basado en extinción es de aproximadamente 65 mientras que la sonda 2 teóricamente sólo podría proporcionar una relación señal/ruido de aproximadamente 14. Por tanto, puede concluirse que el quelato según la presente invención es muy adecuado para su uso como marcador en un ensayo de hibridación basado en extinción.



Tabla 1. Eficiencias de extinción que pueden obtenerse con las sondas 1 y 2. La sonda 1 sola (reacción 1), marcada con el quelato de la presente invención (compuesto 7), proporciona una mayor señal que la sonda 2 sola (reacción 3), marcada con un quelato descrito en la técnica anterior. La relación de señal entre la sonda 1 marcada libre (reacción 1) y la sonda 1 extinguida (reacción 2) es mayor que la relación entre las señales obtenidas a partir de una sonda 2 libre (reacción 3) y una sonda 2 extinguida (reacción 4), lo que indica que el quelato según la presente invención es más adecuado para su uso como marcador en un ensayo de hibridación basado en extinción homogéneo que el quelato descrito en la técnica anterior.

Reacción	Contenido	Señal de terbio promedio
1	Sonda 1 sola	597 241
2	Sonda 1 y sonda de extinción	9 134
3	Sonda 2 sola	134 716
4	Sonda 2 y sonda de extinción	9 640
Máxima relación señal/ruido teórica para la sonda 1: 65		
Máxima relación señal/ruido teórica para la sonda 2: 14		

#### 15 Ejemplo 9

#### **Idoneidad del quelato de la presente invención para la detección homogénea de un producto de PCR**

Con el fin de caracterizar la idoneidad del quelato de terbio según la presente invención (compuesto 7) para la detección homogénea de un producto de PCR, se comparó la sonda 1 (descrita anteriormente en el ejemplo 8) con la sonda 2 (descrita anteriormente en el ejemplo 8) en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es específico para la bacteria *Listeria monocytogenes*. El principio de generación de señales del ensayo de PCR lo han descrito Nurmi et al. (Anal Chem. 15 Jul 2002;74(14):3525-32. High-

performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual temperature hybridization assay. Nurmi J, Wikman T, Karp M, Lovgren T.)

5 Con el fin de obtener una comparación entre los dos quelatos diferentes, se prepararon cuatro tipos diferentes de reacciones tal como sigue:

1. Reacciones de control negativas con la sonda 1 que no contenían ningún ADN de *Listeria monocytogenes*
2. Reacciones de control positivas con la sonda 1 que  
10 contenían 1000 copias de ADN de *Listeria monocytogenes* para amplificarse en la reacción
3. Reacciones de control negativas con la sonda 2 que no contenían ningún ADN de *Listeria monocytogenes*
4. Reacciones de control positivas con la sonda 2 que  
15 contenían 1000 copias de ADN de *Listeria monocytogenes* para amplificarse en la reacción

Las reacciones de PCR de 30 µl consistieron en tampón Taq HotMaster 1 X (Eppendorf, Alemania), dNTP 0,2 mM, cebador directo (5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3'; SEQ ID NO 3) 0,3  
20 µM, cebador inverso (5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G-3'; SEQ ID NO 4) 0,3 µM, sonda 1 o sonda 2 28 nM, sonda de extinción 280 nM (descrita anteriormente en el ejemplo 1) y 1 unidad de ADN polimerasa Taq HotMaster (Eppendorf). Se realizó el ciclado térmico en una placa de 96 pocillos en un aparato DNA  
25 Engine PTC 200 (MJ Research, EE.UU.). El protocolo de ciclado térmico consistió en una etapa de desnaturalización de 2 minutos inicial a 94°C seguida por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C y 1 minuto a 65°C, tras lo cual se enfriaron las reacciones hasta 4°C. Se registraron las señales de terbio  
30 tras el ciclado térmico usando un contador Victor 2 Multilabel usando los parámetros de medición de terbio por defecto del instrumento. Se calcularon las relaciones señal/ruido (S/N) para las reacciones de control positivas (reacciones 2 y 4) dividiendo la señal de terbio promedio de la reacción 2 ó 4

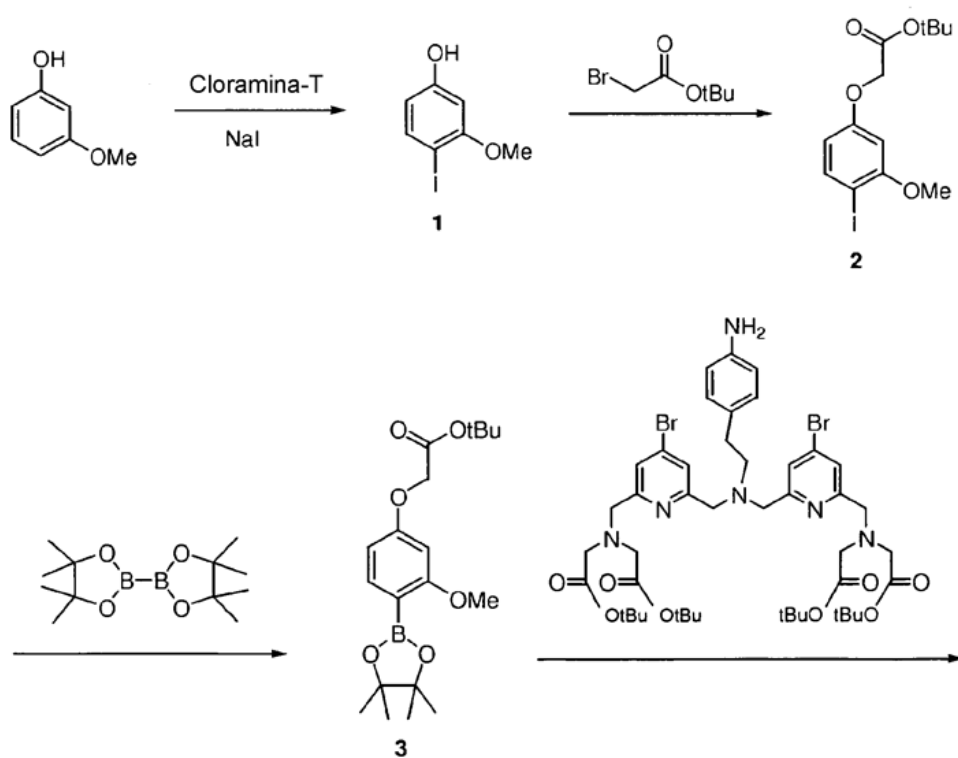
entre la señal de terbio promedio de la reacción 1 ó 3, respectivamente.

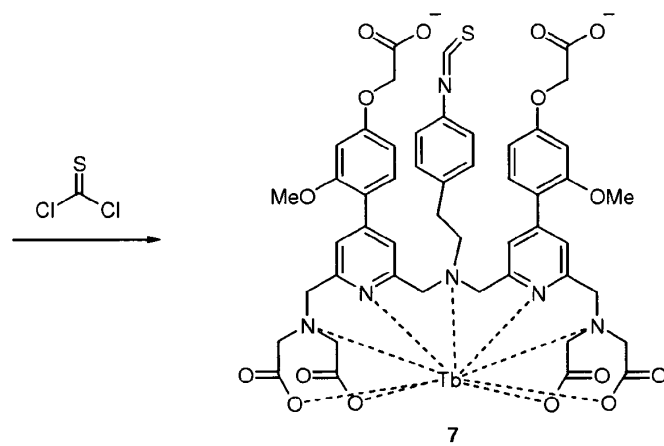
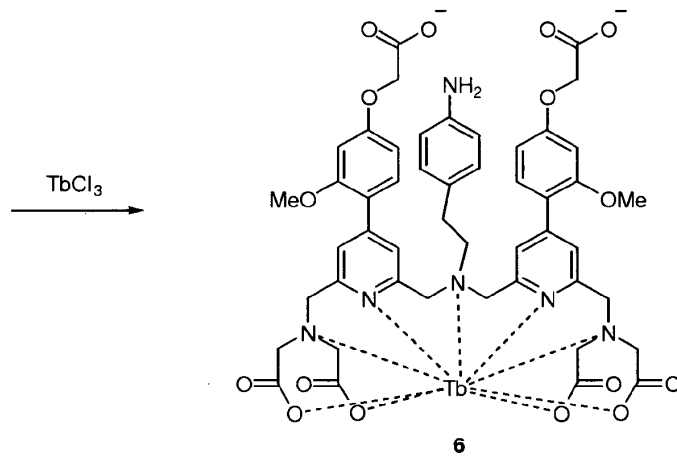
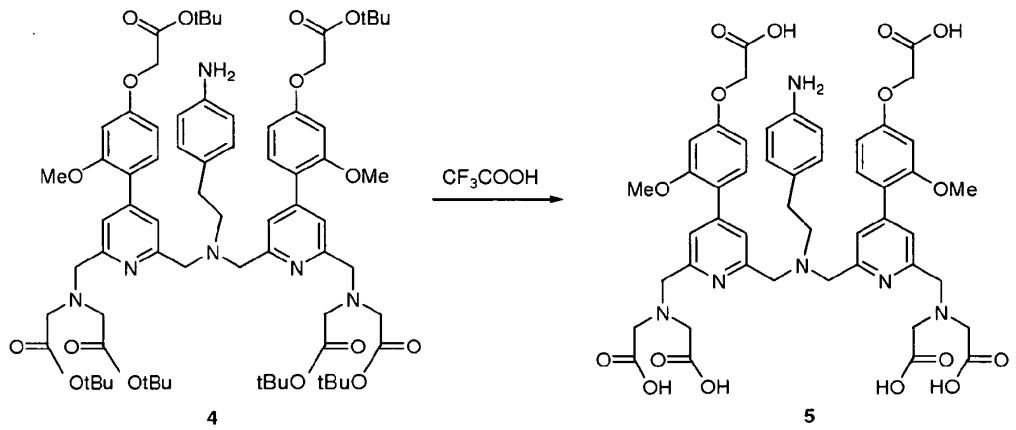
Los resultados del experimento se muestran en la tabla 2. Tal como puede observarse en la tabla, las reacciones de control negativas que contenían la sonda 1 proporcionaron una señal promedio de 80864 cps, mientras que las reacciones de control positivas respectivas que contenían la sonda 1 produjeron una señal de 1 342 566 cps, dando como resultado una relación señal/ruido de 16,6. La mayor señal en las reacciones de control positivas es indicativa de la amplificación de la secuencia de ADN objetivo y claramente demuestra que el quelato según la presente invención es muy adecuado para su uso como marcador en un ensayo de PCR homogéneo. Cuando se usó la sonda 2 en lugar de la sonda 1, las intensidades de señal y las relaciones señal/ruido fueron menores que con la sonda 1: la señal promedio obtenida a partir de las reacciones de control negativas fue de 32 976 cps mientras que las reacciones de control positivas proporcionaron una señal promedio de 248 393 cps, dando como resultado una relación señal/ruido de 7,5. La clara diferencia entre las relaciones señal/ruido obtenidas con la sonda 1 (S/N 16,6) y la sonda 2 (S/N 7,5) indica que el quelato de la presente invención es superior en comparación con el quelato usado en la sonda 2 porque es más adecuado para su uso como marcador en ensayos de PCR homogéneos: puede proporcionar una mayor intensidad de señal y una mayor relación señal/ruido, lo que permite una detección más sensible de ácidos nucleicos objetivo y permite una discriminación más fácil entre las reacciones positivas y negativas.

Tabla 2. Señales de terbio y relaciones señal/ruido obtenidas a partir de las reacciones de PCR 1, 2, 3 y 4.

Reacción	Señal de terbio promedio	S/N
1	80 864	-
2	1 342 556	16,6
3	32 976	-
4	248 393	7,5

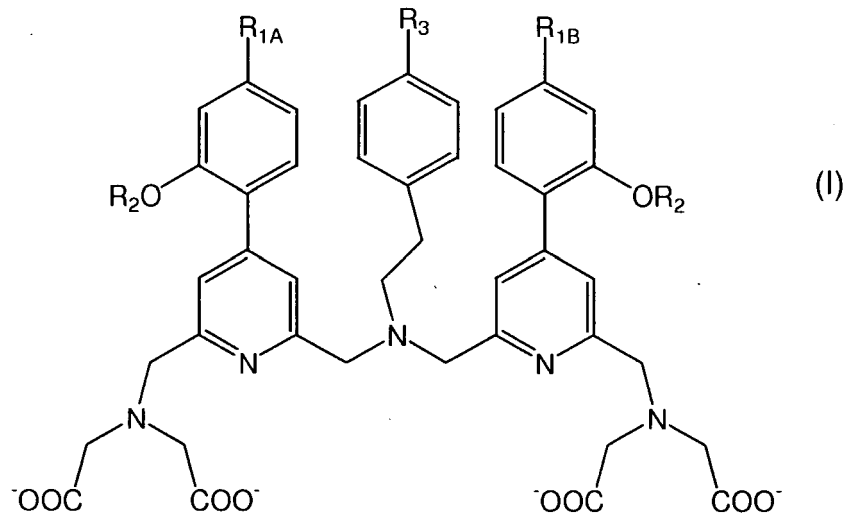
### Esquema 1





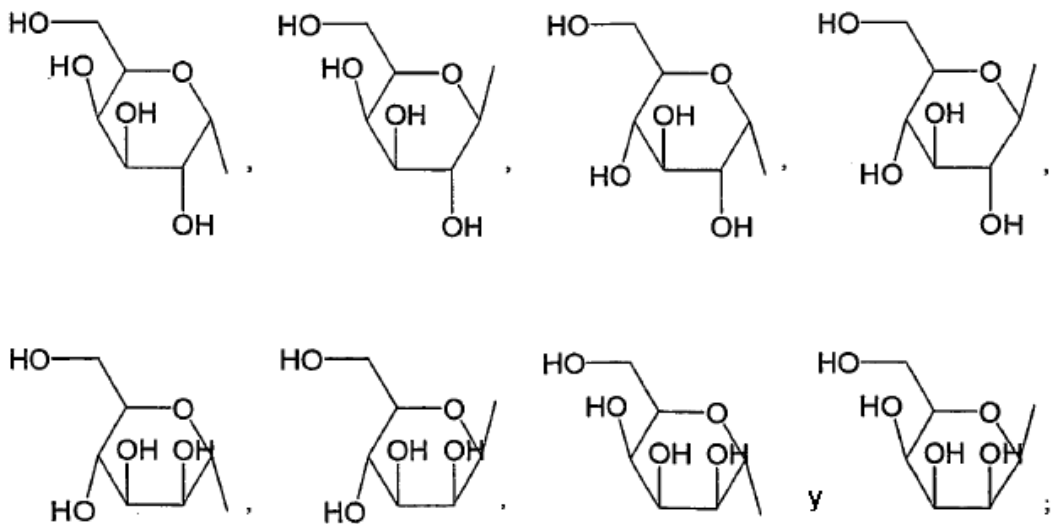
REIVINDICACIONES

1. Molécula detectable que comprende un reactante de unión bioespecífico unido a un quelato de lantánido luminoso que comprende un ión lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)

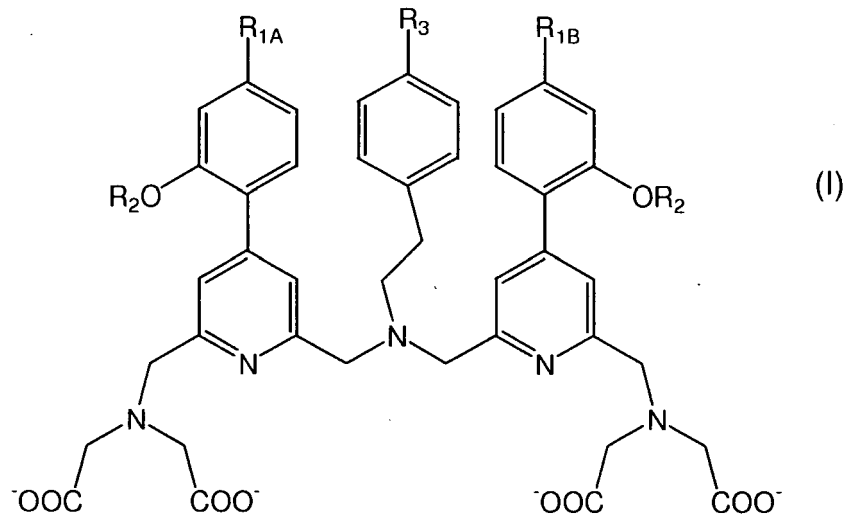


en la que,

- a)  $R_{1A}$  y  $R_{1B}$  se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo,  $-COOH$ ,  $-COO^-$ ,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ , hidroxilo u  $OR_2$ ;
- b)  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $-CH_3$ ,  $-C(CH_3)_3$ ,  $-C(CR_4)_3$ , en el que  $R_4$  es un alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ ,

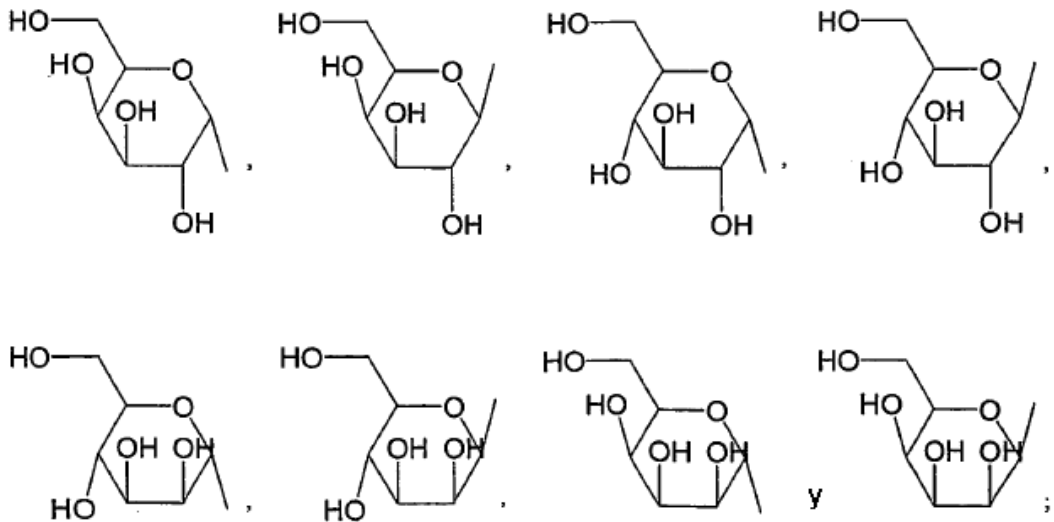


- c)  $R_3$  es un conector para el acoplamiento a un reactante de unión bioespecífico seleccionado del grupo que consiste en tiourea (-NH-CS-NH-), aminoacetamida (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), amida (-NH-CO- y -CO-NH-), tioéter alifático (-S-), disulfuro (-S-S-) y 6-sustituido-1,3,5-triazin-2,4-diamina; y
- d) el ión lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio (III), terbio (III), disprosio (III) y samario (III).
- 10 2. Molécula detectable según la reivindicación 1, caracterizada porque el reactante de unión bioespecífico se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, antígeno, un ligando receptor, un péptido o una proteína de unión específica, una molécula de ácido nucleico, una sonda de ARN o ADN, derivados de ácido nucleico y moléculas quiméricas que comprenden ácidos nucleicos y/o derivados de ácido nucleico.
- 15 3. Molécula detectable según la reivindicación 1, caracterizada porque el quelato de lantánido unido al reactante de unión bioespecífico es {2,2',2'',2'''-{[2-(4-isotiocianatofenil)-etilimino]bis(metilen)bis{4-[2-metoxi-4-(carboxi-metoxi)fenil]piridin-6,2-diil}-bis(metilen-nitrilo)}}tetrakis(acetato)}terbio (III).
- 20 4. Molécula detectable según la reivindicación 1, caracterizada porque el conector  $R_3$  es 6-sustituido-1,3,5-triazin-2,4-diamina y la sustitución en 6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alcoxilo, ariloxilo, amino, alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono, amino o tioéteres sustituidos, y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en cloro, fluoro, etoxilo, 2-metoxietoxilo, 2-cianoetoxilo, 2,2,2-trifluoroetoxilo, tiofenoxilo y etoxicarboniltiomtoxilo.
- 30 5. Quelato de lantánido luminiscente que comprende un ión lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)
- 35



en la que,

- 5 a)  $R_{1A}$  y  $R_{1B}$  se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo,  $-COOH$ ,  $-COO^-$ ,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ , hidroxilo u  $OR_2$ ;
- b)  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $-CH_3$ ,  $-C(CH_3)_3$ ;  $-C(CR_4)_3$ , en el que  $R_4$  es un alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2COO^-$ ,



- 10 c)  $R_3$  es un conector para el acoplamiento a un reactante de unión bioespecífico seleccionado del grupo que consiste en grupos amino, aminooxilo, carboxilo, aldehído o mercapto y derivados activados de los mismos;
- y



- d) el ión lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio (III), terbio (III), disprosio (III) y samario (III).
- 5 6. Quelato de lantánido luminiscente según la reivindicación 5, caracterizado porque el conector R<sub>3</sub> es un derivado activado seleccionado del grupo que consiste en isocianato, isotiocianato, diazonio, bromoacetamido, yodoacetamido, ésteres reactivos, piridil-2-ditio y 6-sustituido-4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino.
- 10 7. Quelato de lantánido luminiscente según la reivindicación 5, caracterizado porque el conector R<sub>3</sub> es un 6-sustituido-4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino y la sustitución en 6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alcoxilo, ariloxilo, amino, alquilo con de 1 a 6 átomos de carbono, amino o tioéteres sustituidos, y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en cloro, fluoro, etoxilo, 2-metoxietoxilo, 2-cianoetoxilo, 2,2,2-trifluoroetoxilo, tiofenoxilo y etoxicarboniltiomtoxilo.
- 15 8. Uso de la molécula detectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un ensayo de unión bioespecífico.
- 20