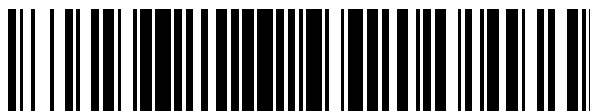


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 952**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/533** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 401/14** (2006.01)

**C07F 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04396007 .9**

96 Fecha de presentación: **03.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1447666**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Agentes reaccionantes de unión bioespecífica marcados con nuevos quelatos luminiscentes de lantánidos y su utilización**

30 Prioridad:

**13.02.2003 US 365637**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**03.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**03.12.2012**

73 Titular/es:

**DHR FINLAND OY (100.0%)  
Biolinja 12  
20750 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**TAKALO, HARRI y  
ROSENBERG, JAANA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 391 952 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

Agentes reaccionantes de unión bioespecífica marcados con nuevos quelatos luminiscentes de lantánidos y su utilización.

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas detectables que comprenden quelatos de lantánidos unidos a un agente reaccionante de unión bioespecífica, y a la utilización de dichas moléculas detectables en ensayos de unión a base de bioafinidad. La invención se refiere además a nuevos quelatos luminiscentes de lantánidos, útiles en la preparación de dichas moléculas detectables.

10

**Antecedentes de la invención**

Se usan aquí publicaciones y otros materiales para iluminar los antecedentes de la invención, y en particular se usan casos para proporcionar detalles adicionales respecto de la práctica.

15

En ensayos de unión específica, tales como, por ejemplo, inmunoensayos, ensayos de hibridación de ADN, ensayos de unión a receptores, y ensayos de unión celular, generalmente los analitos a medir están presentes a concentraciones muy bajas. Por lo tanto, se han desarrollado diversos compuestos marcadores que permiten que el agente reaccionante marcador se detecte y se cuantifique con sensibilidad elevada. En inmunoensayos y en ensayos de hibridación de ADN, es bien conocida la espectroscopía de luminiscencia resuelta en el tiempo que usa quelatos de lantánidos (por ejemplo Hemmilä, T. Stålborg, 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 fotoluminiscentes (denominados en el contexto de esta memoria descriptiva simplemente como luminiscentes) estables de lantánidos también tienen otras aplicaciones, por ejemplo microscopía de fluorescencia y citometría. Por lo tanto, se ha realizado un número de intentos para desarrollar nuevos quelatos muy luminiscentes adecuados para esos tipos de aplicaciones fluorométricas resueltas en el tiempo. Estos incluyen, por ejemplo, quelatos estables compuestos de derivados de piridina (documentos US 4.920.195; US 4.801.722; US 4.761.481; US 5.571.897; US 5.859.215; Latva, M., Takalo, H., Mikkala, V.-M., Matachescu, C., Rodriguez-Ubis, J.C. y Kankare, J., 1997, J. Luminescence, 75, 149; Takalo, H., Hemmilä, I., Sutela, T. y Latva, M., 1996, Helv. Chim. Acta, 79, 789), 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 42508A/89) como grupos mediadores de la energía, y ácidos policarboxílicos como partes quelantes. Además, en las solicitudes de patentes y/o patentes, se han descrito 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. y Shinkai, S., 1993, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 621; Steemers, F.J., Verboom, W., Reinboudt, D.N., van der Tol, E.B. y Verhoeven, J.W., 1995, J. Am. Chem. Soc., 117, 9408), conjugado de DTPA carbostril 124 (Selvin, P.R., Rana, T.M. y Hearst, J.E., 1994, J. Am. Chem. Soc., 116, 6029) y bases de Schiff macrocíclicas (documento EP 0 369 000).

20

25

30

35

40

También se han descrito quelatos para ensayos de unión específica en, por ejemplo, los documentos EP 0 770 610; EP 0 649 020; EP 0 967 205; EP 1 152 010; WO 93/11433; Lemmetyinen et al. (2000) Luminescence 15, 341-350; Takalo et al. (1997) Helv. Chim. Acta 80, 372-387; Mikkala et al. (1997) J. Alloys & Compounds 225, 507-510; Karsilayan et al. (1997) Bioconj. Chem. 8, 71-75; Latva et al. (1997) J. Luminescence 75, 149-169; Hemmilä et al. (1997) J. Alloys & Compounds 249, 158-162; Takalo et al. (1994) Bioconj. Chem. 5, 278-282 y Mikola et al. (1995) Bioconj. Chem. 6, 235-241.

45

Es sabido que los quelatos luminiscentes de lantánidos se desactivan en una disolución acuosa. Cuando moléculas de agua se coordinan en la esfera interna de quelatos, la desactivación es un resultado de un proceso de decaimiento eficiente sin radiación que implica el acoplamiento de vibración del estado excitado del lantánido y la oscilación del OH. El proceso es aditivo con respecto al número de osciladores de OR, y por tanto el decaimiento de la luminiscencia está relacionado de forma inversa con el número de moléculas de agua unidas. Se han desarrollado diversos sistemas para evitar este fenómeno, tal como la utilización de detergentes y compuestos sinérgicos, la utilización de concentración elevada de iones de flúor, la eliminación de agua mediante secado antes de la medición, la utilización de una matriz polimérica, o la medición de la luminiscencia en un disolvente orgánico o en óxido de deuterio. Una forma ideal para evitar la desactivación acuosa directa es usar agentes quelantes estables, preferiblemente nonadentados, que no permiten la coordinación de agua con el ion quelado. En los quelatos mencionados anteriormente, el ion de lantánido está normalmente coordinado a 7, 8 ó 9 heteroátomos, formando respectivamente un quelato hepta-, octa- o nonadentado. Los quelatos hepta- y octadentados contienen de dos a una moléculas de agua, y de este modo sufren la desactivación acuosa. Generalmente se supone que átomos de coordinación adicionales en quelatos nonadentados – que no tienen molécula de agua en la primera esfera de coordinación – no tienen ningún efecto positivo adicional con respecto a la desactivación acuosa.

50

55

60

Durante un proceso de transferencia de energía desde un ligando excitado a un ion de lantánido, la energía sufre un cruzamiento entre sistemas a uno de los estados de triplete del ligando. La siguiente etapa es una transición de la

65

energía prohibida por spin, provocando la fosforescencia del ligando, o una transferencia de energía intramolecular al ion de lantánido. El decaimiento térmico, tal como, por ejemplo, el movimiento y rotación térmicos moleculares, es un proceso de desactivación no radioactiva conocido del estado de triplete mencionado. Los quelatos marcadores de lantánidos contienen normalmente un grupo funcional reactivo para acoplar el marcador a un agente reaccionante de unión biospecífica. De este modo, en una biomolécula marcada, el marcador puede rotar, y la desactivación no radioactiva del estado del triplete del ligando es un fenómeno posible.

La visión general es que varios grupos de unión radioactivos en una molécula marcadora provocan reacción cruzada y formación de los agregados de agente reaccionante de unión biospecífica durante el proceso de marcaje, y de este modo producen problemas de purificación y un menor rendimiento del material marcado.

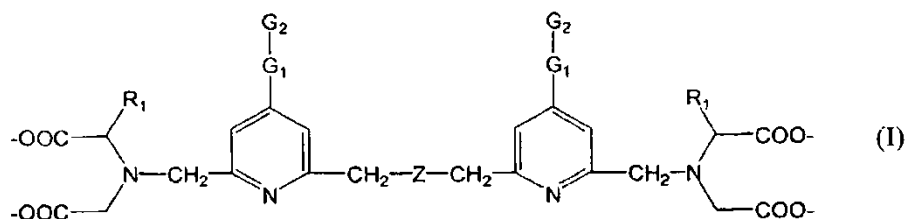
### Sumario de la invención

Un objetivo de esta invención es proporcionar un quelato luminiscente de lantánido mejorado, que comprende un ion lantánido y un ligando quelante.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una molécula detectable mejorada, que comprende un agente reaccionante de unión biospecífica unido al quelato luminiscente de lantánido, útil para ensayos de unión específica a base de bioafinidad.

Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de marcaje mejorado de un agente reaccionante de unión biospecífica usando el marcador de quelato luminiscente de lantánido.

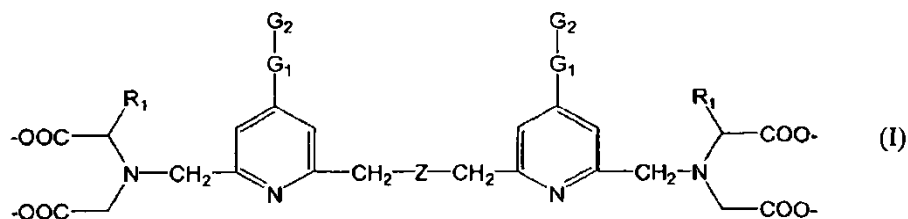
De este modo, según un aspecto, esta invención proporciona un quelato luminiscente de lantánido que comprende un ion lantánido y un ligando quelante de la fórmula (I)



en la que

- a) R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>COOH y -CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>;
- b) G<sub>1</sub> es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodíilo (-C≡C-), etenileno (-CH=CH-), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;
- c) G<sub>2</sub> es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión biospecífica que se selecciona del grupo que contiene grupos amino, aminooxi, carbonilo, aldehído o mercapto, o una forma activada obtenida de ellos;
- d) Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina, éter, tioéter, carbonilo y metilo no sustituido o sustituido, en el que el grupo R<sub>2</sub> se selecciona de un grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo; y
- e) el ion lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio(III), terbio(III), disprosio(III) y samario(III).

Según otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula detectable que comprende un agente reaccionante de unión biospecífica unido a un quelato luminiscente de lantánido que comprende un ion lantánido y un ligando quelante de la fórmula (I)



en la que

- 5 a)  $R_1$  se selecciona del grupo que consiste en H,  $-COOH$ ,  $-COO^-$ ,  $-CH_2COOH$  y  $-CH_2COO^-$ ;
- 10 b)  $G_1$  es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo, etenileno, fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;
- 15 c)  $G_2$  es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que contiene grupos tiourea, aminoacetamida, amida, tioéter alifático, disulfuro o 6-sustituida-1,3,5-triazin-2,4-diamina;
- d) Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina, éter, tioéter, carbonilo y metilo no sustituido o sustituido, en el que el grupo  $R_2$  se selecciona de un grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo; y
- 20 e) el ion lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio(III), terbio(III), disprosio(III) y samario(III).

Según todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para llevar a cabo un ensayo de unión bioespecífica. El procedimiento usa la molécula detectable de la presente invención.

Según todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de utilización de una molécula detectable según la invención en un ensayo de unión específica a base de bioafinidad que utiliza determinación fluorométrica o fluorométrica resuelta en el tiempo de una luminiscencia específica.

### Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 ilustra un perfil de purificación de una proteína marcada con un quelato de europio (III) de la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

35 Según la presente invención, la provisión de un quelato de lantánido nona- o decadentado con dos grupos de unión disminuye la desactivación acuosa, incluso en comparación con los quelatos hepta a nonadentados de la técnica anterior. Se evita un proceso de desactivación no radioactiva del estado triplete provocado por la rotación del marcador, y se hace posible un quelato más luminiscente de lantánido, y además, al mismo tiempo, se pueden retener todas las otras características importantes de marcadores y biomoléculas marcadas sin ninguna formación

40 adicional de agregados ni problemas de purificación.

El objetivo de la presente invención es proporcionar unos medios para obtener marcadores de quelatos de lantánidos mejorados a usar en ensayos de unión específica basados en bioafinidad, tales como inmunoensayos (tanto ensayos heterogéneos como homogéneos), ensayos de hibridación de ADN, ensayos de unión a receptores,

45 ensayos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos que utilizan determinación fluorométrica o fluorométrica resuelta en el tiempo de la luminiscencia específica.

Los quelatos de esta invención combinan varias características importantes en un solo marcador, tal como

- 50 1. elevada absorptividad a una longitud de onda adecuada, preferiblemente alrededor de 300 nm,
2. varias partes absorbentes de UV separadas (cromóforos) en la misma estructura del ligando, preferiblemente dos cromóforos,
- 55 3. transferencia eficaz de energía desde la parte absorbente de UV (sensibilizador de triplete) al ion lantánido,
4. una parte fuertemente quelante para crear a) la estabilidad termodinámica requerida para almacenar los agentes reaccionantes marcados durante períodos de tiempo prolongados, y b) elevada estabilidad cinética para

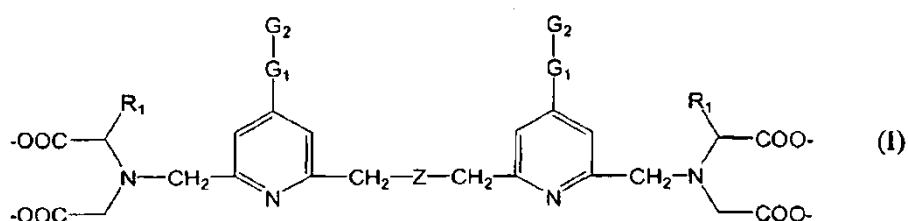
permitir la utilización de agentes reaccionantes en condiciones en las que pueden estar presentes iones metálicos rivales o agentes quelantes,

5 5. una parte quelante que forma una protección del ion quelado tan completa como sea posible, preferiblemente un ligando nonadentado, y más preferiblemente un ligando decadentado,

10 6. un grupo funcional que permite el acoplamiento eficaz del quelato a usar como un agente reaccionante de unión (por ejemplo, anticuerpo) sin destruir sus propiedades de unión ni disminuir las propiedades de luminiscencia del marcador, evitando preferiblemente dos de dichos grupos funcionales la rotación del marcador después del acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica.

Además, el quelato es muy hidrófilo y posee una baja afinidad de unión no específica por proteínas o superficies usadas en el análisis.

15 La presente invención proporciona un quelato luminiscente de lantánido que comprende un ion lantánido y un agente quelante de la fórmula (I)



20 en la que

a) R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>COOH y -CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>;

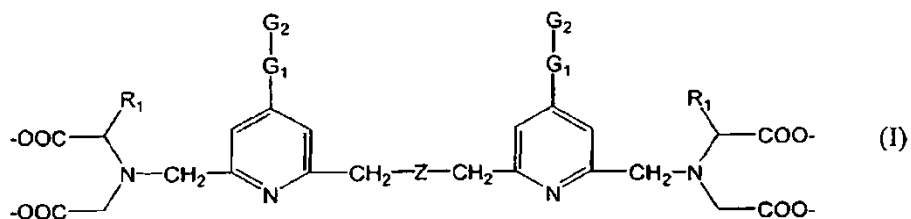
25 b) G<sub>1</sub> es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo (-C≡C-), etenileno (-CH=CH-), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;

30 c) G<sub>2</sub> es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que contiene grupos amino, aminooxi, carbonilo, aldehído y mercapto, y una forma activada de ellos, tal como isocianato, isotiocianato, diazonio, bromoacetamido, yodoacetamido, ésteres reactivos, piridil-2-ditio o 4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino 6-sustituido;

35 d) Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina {-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH]- o -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COO<sup>-</sup>]-, en el que n = 1, 2, 3, 4, 5 ó 6}, éter (-O-), tioéter (-S-), carbonilo (-CO-) y metilo no sustituido o sustituido (-CR<sub>2</sub>-), en el que el grupo R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxialquilo [- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH o - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO<sup>-</sup>, en el que m = 1, 2, 3, 4, 5 ó 6]; y

40 e) el ion lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio(III), terbio(III), disprosio(III) y samario(III).

La presente invención también proporciona una molécula detectable que comprende un agente reaccionante de unión bioespecífica unido a un quelato luminiscente de lantánido que comprende un ion lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)



45 en la que

a) R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>COOH y -CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>;

50

b)  $G_1$  es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo (-C≡C-), etenileno (-CH=CH-), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;

c)  $G_2$  es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que consiste en tiourea (-NH-CS-NH-), aminoacetamida (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), amida (-NH-CO-, -CO-NH-, -NCH<sub>3</sub>-CO- y -CO-NCH<sub>3</sub>-), tioéter alifático (-S-), disulfuro (-S-S-) o 1,3,5-triazin-2,4-diamina 6-sustituida;

d) Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina {-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH]- o -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COO]-}, en el que n = 1, 2, 3, 4, 5 ó 6}, éter (-O-), tioéter (-S-), carbonilo (-CO-) y metilo no sustituido o sustituido (-CR<sub>2</sub>-), en el que el grupo R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo [-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH o -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO], en el que m= 1, 2, 3, 4, 5 ó 6]; y

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

La presente invención se refiere además a la utilización de una molécula detectable como se define anteriormente en ensayos de unión bioespecífica.

El agente reaccionante de unión bioespecífica se selecciona de un grupo que consiste en un anticuerpo, un antígeno, un ligando de receptor, una proteína o péptido de unión específica, una sonda de ADN o una sonda de ARN.

Los sustituyentes en la 6-sustituida-1,3,5-triazin-2,4-diamina y 4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino 6-sustituido se pueden seleccionar del grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi, ariloxi, amino, alquilo inferior (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), amino sustituido y tioésteres, y se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en cloro, fluoro, etoxi, 2-metoxietoxi, 2-cianoetoxi, 2,2,2-trifluoroetoxi, tiofenoxi y etoxicarbonilmetoxi.

El término "luminiscente" debe entenderse en esta invención que significa "fotoluminiscente", como ya se señala anteriormente.

Según una realización preferible de la invención, el ion lantánido es europio(III) o terbio(III).

La invención se ejemplifica además mediante los siguientes ejemplos, que demuestran el efecto de la rotación evitada del marcador mediante dos grupos de unión junto con una estructura de quelato decadentado sobre la intensidad de la luminiscencia y los tiempos de decaimiento.

Las estructuras y la ruta sintética empleadas en la parte experimental se muestran en el esquema de reacción 1a y 1b. Los esquemas ilustran la síntesis del compuesto 5 ejemplificada mediante los ejemplos 1 a 5. El esquema 2 ilustra las estructuras de los compuestos marcadores 6 y 7 de referencia. El compuesto 6 es un marcador de europio(III) heptadentado. El compuesto 7 es un marcador de europio(III) nonadentado con dos cromóforos separados y un grupo de unión. El perfil de purificación, mostrado en la figura 1, de la proteína marcada según la invención demuestra baja agregación y la ausencia de quelato marcador, y de este modo muestra que la proteína marcada con un compuesto de la presente invención, es decir, usando varios grupos de unión reactivos en una molécula marcadora, no provoca sorprendentemente problemas de purificación ni reduce el rendimiento del material marcado.

Se debería señalar que aunque se han descrito anteriormente y en los ejemplos a continuación sólo quelatos simétricos (es decir, ambos grupos  $G_1$  son el mismo grupo, ambos grupos  $G_2$  son el mismo grupo, y ambos grupos  $R_1$  son el mismo grupo) y moléculas detectables simétricas, también son en principio alternativas posibles los quelatos no simétricos. Estas alternativas no simétricas deberían comprender alternativas en las que uno o varios de los pares no sería el mismo grupo. Estas alternativas tendrían la desventaja de ser más complicadas de sintetizar.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Síntesis de 2,2',2''-{(etoxicarbonil)metilimino}bis(metilen)bis(4-bromopirid-5-in-6,2-diil)bis(metilenonitrilo)}tetraquis (acetato) de tetra(terc-butilo) (1)

Se disolvió 2,2'-[4-bromo-6-(bromometil)piridin-2-il]metilenonitrilo}bis-(acetato) de di(terc-butilo) (2,04 g, 4,014 mmoles) en acetonitrilo seco (40 ml). A la mezcla se añadió hidrocloreto de glicinato de etilo (0,28 g, 2,006 mmoles) y diisopropiletilamina (2,8 ml, 16,07 mmoles). Después de agitar durante 4 horas a 48°C, la mezcla se evaporó. El residuo se disolvió en cloroformo (120 ml) y se lavó dos veces con agua (2 x 30 ml), se secó con sulfato de sodio, y se evaporó. El producto se purificó con cromatografía ultrarrápida (sílice, primero 20% de acetato de etilo en éter de

petróleo y finalmente 50%) El rendimiento fue 0,82 g (43%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,75 (2H, s), 7,63 (2H, s), 4,1 (2H, q, J=7,04 Hz), 4,00 (4H, s), 3,93 (4H, s), 3,37 (10H, s), 1,46 (36H, s), 1,29 (3H, t, J=7,04 Hz).

### Ejemplo 2

5 Síntesis de 2,2',2'',2'''-[[etoxicarbonil]metilimino]bis-(metilen)bis[[4-[(4-amino)fenil]etnil]piridin-6,2-diil]bis (metilenonitrilo)}tetraquis(acetato) de tetra(terc-butilo) (2)

10 Una mezcla del compuesto 1 (0,3 g, 0,313 mmoles), cloruro de bis(trifenilfosfina)-paladio(II) (8,8 mg, 0,0126 mmoles) y yoduro de cobre(I) (4,8 mg, 0,0252 mmoles) en trietilamina seca (4 ml) y tetrahidrofurano (4 ml) se desaireó con argón. Se añadió [(4-amino)fenil]acetileno (88 mg, 0,751 mmoles) a la mezcla, y la reacción se agitó toda la noche a 51°C, después de lo cual se filtró, y el filtrado se evaporó. El residuo se disolvió en cloroformo (45 ml) y se lavó dos veces con agua (2 x 15 ml), se secó con sulfato de sodio y se evaporó. El producto se purificó con cromatografía ultrarrápida (sílice, primero desde 1% hasta 10% de metanol en diclorometano, y finalmente metanol) El rendimiento fue 0,24 g (75%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,56 (2H, s), 7,53 (2H, s), 7,32 (4H, d, J=8,56 Hz), 6,58 (4H, d, J=8,56 Hz), 4,17 (2H, q, J=7,2 Hz), 4,01 (4H, s), 3,97 (4H, s), 3,48 (10H, s), 1,46 (36H, s), 1,28 (3H, t, J=7,2 Hz).

### Ejemplo 3

20 Síntesis de ácido 2,2',2'',2'''-[[etoxicarbonil]metilimino]bis(metilen)bis[[4-[(4-amino)fenil]etnil]piridin-6,2-diil]bis (metilenonitrilo)}tetraquis(acético) (3)

25 Una disolución del compuesto 2 (0,1 g, 0,097 mmoles) en ácido trifluoroacético (2 ml) se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras evaporar sin calentamiento, la mezcla se trituró con éter dietílico (10 ml) y se filtró. La filtración dejó un producto puro. El rendimiento fue 0,13 g. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): 7,32 (4H, s), 7,11 (4H, d, J=8,3 Hz), 6,42 (4H, d, J=8,3 Hz), 3,94 (2H, q, J=7,1 Hz), 3,82 (8H, s), 3,37 (10H, s), 1,06 (3H, t, J=7,1 Hz).

### Ejemplo 4

30 Síntesis de {2,2',2'',2'''-[[carboximetil]imino]bis(metilen)-bis[[4-[(4-amino)fenil]etnil]piridin-6,2-diil]bis(metilenonitrilo)}tetraquis(acetato)}europio(III) (4)

35 Una mezcla del compuesto 3 (180 mg, 0,164 mmoles), hidróxido de potasio 0,5 M en etanol (10 ml) y agua (4,5 ml) se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras evaporar, el residuo se disolvió en agua (4,5 ml) y el pH se ajustó hasta 6,5 con hidrócloruro 6 M. Se añadió cloruro de europio(III) hexahidratado (66 mg, 0,18 mmoles) en agua (1,9 ml) en 10 minutos y el pH se mantuvo a 6,5 con carbonato de sodio sólido. Tras agitar la reacción durante 1 hora, el pH se elevó hasta 8,5 con hidróxido de sodio 1 M, y el precipitado se eliminó mediante centrifugación. El filtrado se trató con acetona, y el producto se recogió mediante centrifugación y se lavó con acetona. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación. El rendimiento fue 300 mg. UV (agua): 339, 257 y 247 nm. ESI-TOF-MS masa para C<sub>40</sub>H<sub>34</sub>EuN<sub>7</sub>O<sub>10</sub> M<sup>-</sup> (monoisotópico): calculado 924,70, encontrado 924,04.

### Ejemplo 5

45 Síntesis de {2,2',2'',2'''-[[carboximetil]imino]bis(metilen)-bis[[4-[(4-isotiocianato)fenil]etnil]piridin-6,2-diil]bis (metilenonitrilo)}tetraquis(acetato)}europio(III) (5)

50 El compuesto 4 (360 mg, 0,374 mmoles) en agua (6,0 ml) se añadió lentamente a una mezcla de tiosfogeno (230 µl, 3,027 mmoles), hidrogenocarbonato de sodio (315 mg, 3,750 mmoles) y cloroformo (6,0 ml). Después de agitar durante 1 hora, la fase acuosa se lavó dos veces con cloroformo (2 x 12 ml). El pH de la disolución acuosa se ajustó hasta 7,0 con ácido acético 1 M, y se añadió acetona a la fase acuosa. El producto se recogió mediante centrifugación y se lavó con acetona. El rendimiento fue 490 mg. UV (agua): 333, 319 y 228 nm. ESI-TOF-MS masa para C<sub>42</sub>H<sub>30</sub>EuN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> M<sup>-</sup> (monoisotópico): calculado 1008,83, encontrado 1007,96.

### Ejemplo 6

55 Acoplamiento del quelato 5, 7 y quelatos de Eu heptadentados y nonadentados (6 y 7 en el Esquema 2) a proteína

60 El marcado se llevó a cabo en tampón de borato 10 mM, pH 8,6-9,0, usando excesos molares de 15 (para el quelato 5), 50 (para el quelato 6) y 150 veces (para el quelato 7). Las reacciones se llevaron a cabo normalmente toda la noche a +4°C, o a temperatura ambiente. Los anticuerpos marcados se purificaron en columnas de filtración en gel Superdex 200 HR 10/30 o Superdex 200 HiLoad 26/60 (Farmacia Biotech) usando Tris-disolución salina-azida (6,1 g/l de Tris, 9,0 g/l de NaCl, y 0,5 g/l de NaN<sub>3</sub>), pH 7,75, como tampón de elución. Las fracciones que contienen el anticuerpo se reunieron, y las concentraciones de europio se midieron frente a un calibrador de europio (Innotrac Diagnostics Oy). El conjugado de anticuerpo purificado y la relación de marcado (quelatos por proteína) se cuantificaron calculando el rendimiento proteico o midiendo la absorbancia a 280 nm y restando la absorción provocada por el quelato añadido.

**Ejemplo 7**

Las medidas de luminiscencia de los anticuerpos marcados con quelato

- 5 Los parámetros de luminiscencia para los anticuerpos marcados con Eu se midieron en tampón que contiene 5 mM de Hepes, 2,1 g/l de NaCl, 0,1 mM de EDTA, 0,055 g/l de Tween 20 y 1 g/l de Germall II, pH 7,75. Los espectros de excitación y de emisión, las intensidades de luminiscencia y los tiempos de decaimiento se midieron usando un espectrómetro de luminiscencia LS55 (PerkinElmer Instruments), mientras que los coeficientes de extinción molar (absorbancia) se determinaron con un espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu). Adicionalmente, los tiempos de decaimiento también se midieron a partir de anticuerpo unido a una fase sólida tras aspirar el tampón y secar los pocillos. Las determinaciones en fase sólida se llevaron a cabo usando el espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian). Las medidas de luminiscencia se estandarizaron usando 0,1  $\mu\text{M}$  de Eu(III) en disolución potenciadora Wallac Delfia (absortividad molar 37600, rendimiento cuántico 70%, y rendimiento de luminiscencia 26320). Las intensidades de emisión se midieron usando la línea de emisión más intensa a aprox. 613 nm.

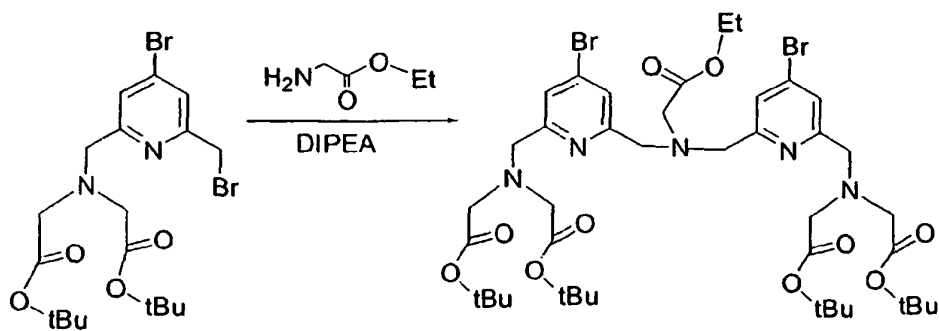
15 Tabla 1. Máximos de emisión ( $\lambda_{exc}$ ), tiempos de decaimiento de la luminiscencia ( $\tau$ ) y rendimientos de la luminiscencia ( $\epsilon \cdot \Phi$ ) de los quelatos de Eu(III) 5, 6 y 7 en proteína en tampón de Hepes, pH 7,75.

Quelato	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\tau$ [ $\mu\text{s}$ ]	$\epsilon \cdot \Phi$
5	328	1120	8025
6	329	390	1337
7	325	1000	4787

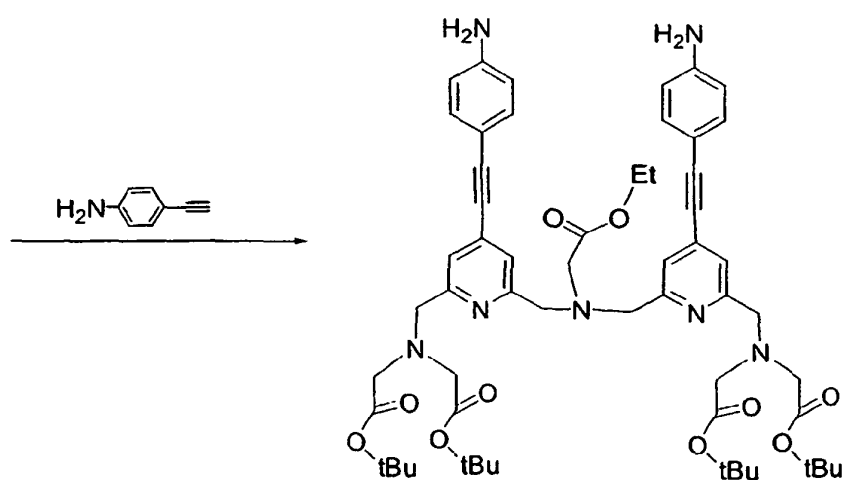
20 Tabla 2. Tiempos de decaimiento ( $\tau$ ) de los quelatos de Eu(III) 5, 6 y 7 acoplados en proteína en diversos entornos

Quelato	$\tau$ [ $\mu\text{s}$ ]/Hepes	$\tau$ [ $\mu\text{s}$ ]/superficie húmeda	$\tau$ [ $\mu\text{s}$ ]/superficie seca
5	1120	1130	1290
6	390	490	1150
7	1000	1000	990

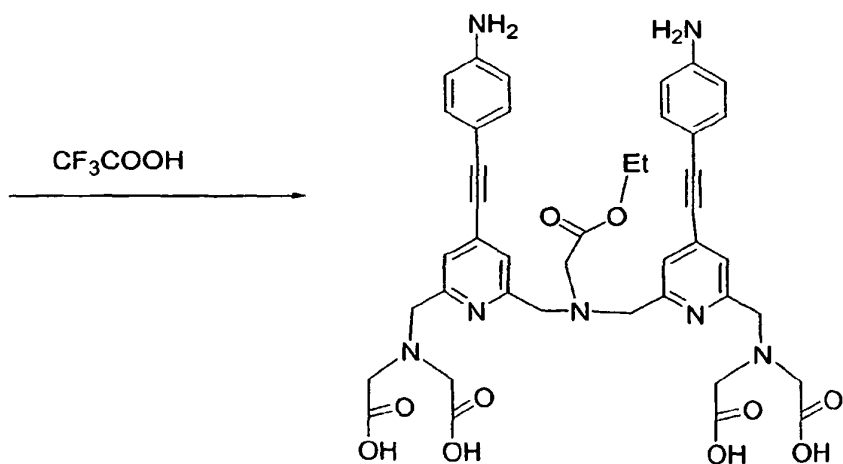




1

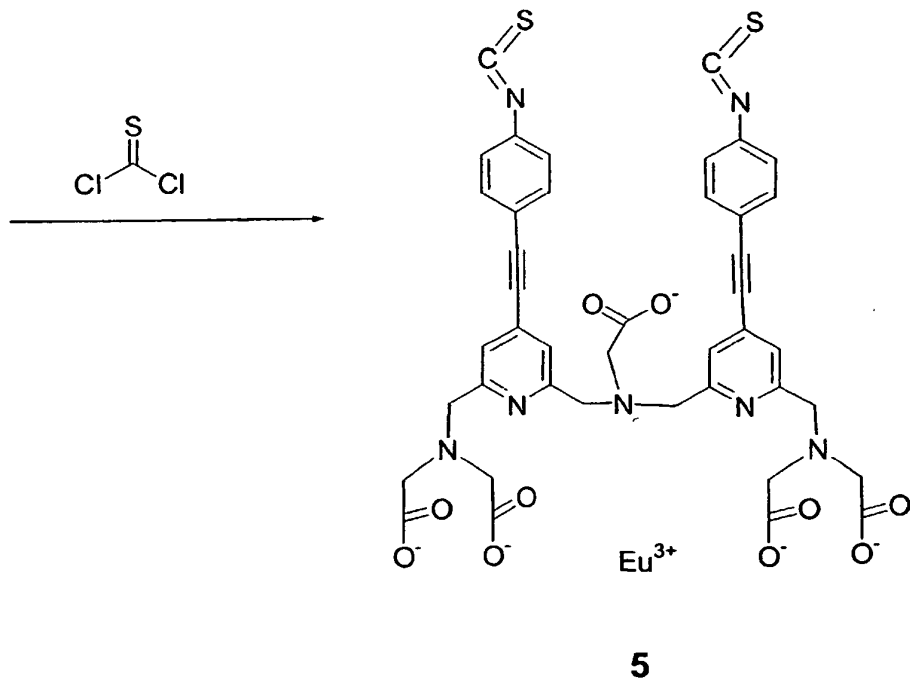
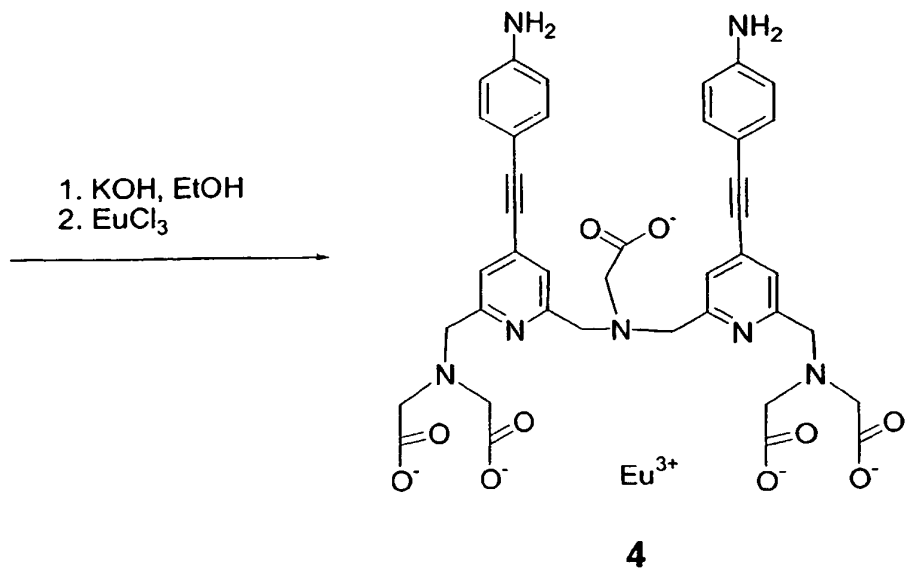


2

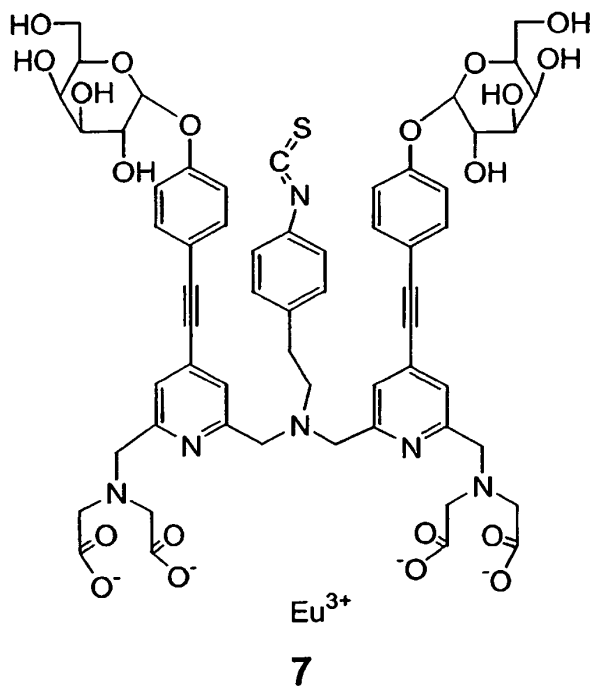
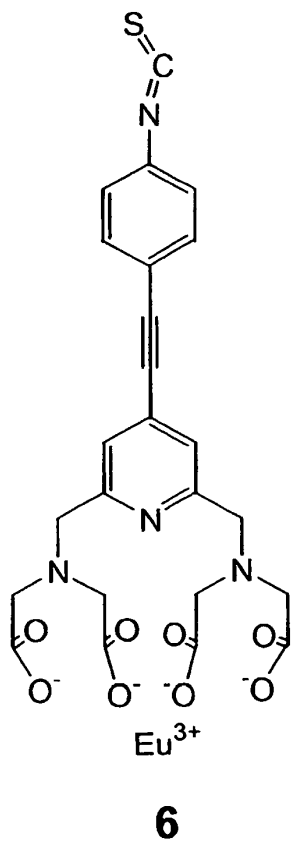


3

Esquema 1A



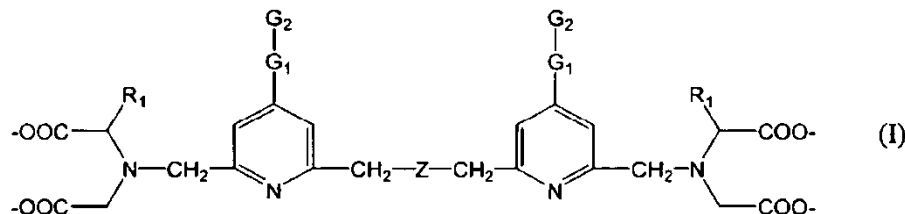
Esquema 1b



Esquema 2

## REIVINDICACIONES

1. Quelato luminiscente de lantánido, caracterizado porque comprende un ion lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)



en la que

10  $R_1$  se selecciona del grupo que consiste en H,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$  y  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ;

$G_1$  es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), etenileno ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;

15

$G_2$  es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que consiste en grupos amino, aminooxi, carbonilo, aldehído o mercapto, y formas activadas obtenidas de ellos;

$Z$  se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina  $\{-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]-$  o  $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-]-$ , en el que  $n = 1, 2, 3, 4, 5$  ó  $6\}$ , éter ( $-\text{O}-$ ), tioéter ( $-\text{S}-$ ), carbonilo ( $-\text{CO}-$ ) y metilo no sustituido o sustituido ( $-\text{CR}_2-$ ), en el que el grupo  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo  $[-(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$  o  $-(\text{CH}_2)_m\text{COO}^-$ , en el que  $m = 1, 2, 3, 4, 5$  ó  $6\}$ ; y

20

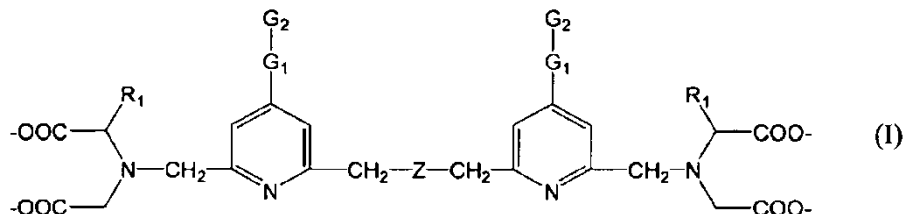
25 el ion lantánido se selecciona del grupo que consiste en europio(III), terbio(III), disprosio(III) y samario(III).

2. Quelato de lantánido según la reivindicación 1, caracterizado porque  $G_2$  es una forma activada seleccionada del grupo que consiste en isocianato, isotiocianato, diazonio, bromoacetamido, yodoacetamido, ésteres reactivos, piridil-2-ditio y 4-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino 6-sustituido.

30

3. Quelato de lantánido según la reivindicación 1, caracterizado porque el ligando quelante es  $\{2,2',2'',2'''-\{[(\text{carboximetil})\text{imino}]\text{bis}(\text{metileno})\text{-bis}\{4-\{4\text{-isotiocianato}\}\text{fenil}\}\text{etil}\}\text{piridin-6,2-diid}\}\text{bis}(\text{metileno})\text{nitrido}\}$ tetraquis(acetato)europio(III).

35 4. Molécula detectable, caracterizada porque comprende un agente reaccionante de unión bioespecífica unido a un quelato luminiscente de lantánido que comprende un ion lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)



40 en la que

$R_1$  se selecciona del grupo que consiste en H,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$  y  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ;

$G_1$  es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), etenileno ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;

45

G<sub>2</sub> es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que consiste en tiourea (-NH-CS-NH-), aminoacetamida (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), amida (-NH-CO-, -CO-NH-, -NCH<sub>3</sub>-CO- y -CO-NCH<sub>3</sub>-), tioéter alifático (-S-), disulfuro (-S-S-) o 1,3,5-triazin-2,4-diamina 6-sustituida;

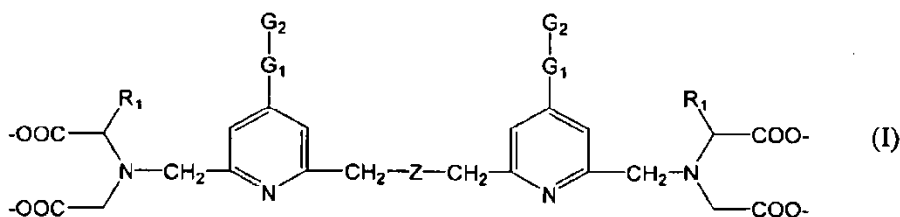
5 Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina {-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH]- o -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COO]<sup>-</sup>}, en el que n = 1, 2, 3, 4, 5 ó 6}, éter (-O-), tioéter (-S-), carbonilo (-CO-) y metilo no sustituido o sustituido (-CR<sub>2</sub>-), en el que el grupo R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo [- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH o - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO<sup>-</sup>, en el que m= 1, 2, 3, 4, 5 ó 6]; y

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

5. Molécula detectable según la reivindicación 4, caracterizada porque el agente reaccionante de unión bioespecífica se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un antígeno, un ligando de receptor, una proteína de unión específica, una sonda de ADN y una sonda de ARN.

15 6. Molécula detectable según la reivindicación 4, caracterizada porque el quelato luminiscente de lantánido unido a un agente reaccionante de unión bioespecífica es {2,2',2'',2'''-[[ (carboximetil)imino]bis(metilen)-bis[[4-[(4-isotiocianato)fenil]jetinil]piridin-6,2-diil]bis(metilenonitrilo)]tetraquis(acetato)}europio(III).

20 7. Procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión bioespecífica que usa una molécula detectable para un analito que se va a determinar, caracterizado porque dicha molécula detectable que comprende un agente reaccionante de unión bioespecífica unido a un quelato luminiscente de lantánido comprende un ion lantánido y un ligando quelante de fórmula (I)



25 en la que

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>COOH y -CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>;

30 G<sub>1</sub> es un grupo que consiste en uno o dos restos, seleccionándose cada resto del grupo que consiste en etinodiilo (-C≡C-), etenileno (-CH=CH-), fenileno, bifenileno, naftileno, piridileno, pirazinileno, pirimidinileno, piridazinileno, furileno, tienileno, pirrolileno, imidazolileno, pirazolileno, tiazolileno, isotiazolileno, oxazolileno, isoxazolileno, furazanileno, 1,2,4-triazol-3,5-ileno y oxadiazolileno;

35 G<sub>2</sub> es un grupo para el acoplamiento a un agente reaccionante de unión bioespecífica que se selecciona del grupo que consiste en tiourea (-NH-CS-NH-), aminoacetamida (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), amida (-NH-CO-, -CO-NH-, -NCH<sub>3</sub>-CO- y -CO-NCH<sub>3</sub>-), tioéter alifático (-S-), disulfuro (-S-S-) o 1,3,5-triazin-2,4-diamina 6-sustituida;

40 Z se selecciona del grupo que consiste en carboxialquilamina {-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH]- o -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COO]<sup>-</sup>}, en el que n = 1, 2, 3, 4, 5 ó 6}, éter (-O-), tioéter (-S-), carbonilo (-CO-) y metilo no sustituido o sustituido (-CR<sub>2</sub>-), en el que el grupo R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo y carboxilalquilo [- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH o - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO<sup>-</sup>, en el que m= 1, 2, 3, 4, 5 ó 6]; y

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

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente reaccionante de unión bioespecífica se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un antígeno, un ligando de receptor, una proteína de unión específica, una sonda de ADN o de ARN.

50 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el quelato luminiscente de lantánido unido a un agente reaccionante de unión bioespecífica es {2,2',2'',2'''-[[ (carboximetil)imino]bis(metilen)-bis[[4-[(4-isotiocianato)fenil]jetinil]piridin-6,2-diil]bis(metilenonitrilo)]tetraquis(acetato)}europio(III).

55 10. Utilización de una molécula detectable según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en un ensayo de unión a base de bioafinidad específica que utiliza determinación fluorométrica o fluorométrica resuelta en el tiempo de una luminiscencia específica.

11. Utilización según la reivindicación 10, caracterizada porque el ensayo de unión a base de bioafinidad específica es un inmunoensayo heterogéneo u homogéneo, un ensayo de hibridación de ADN, un ensayo de unión a receptor, un ensayo inmunocitoquímico o un ensayo inmunohistoquímico.

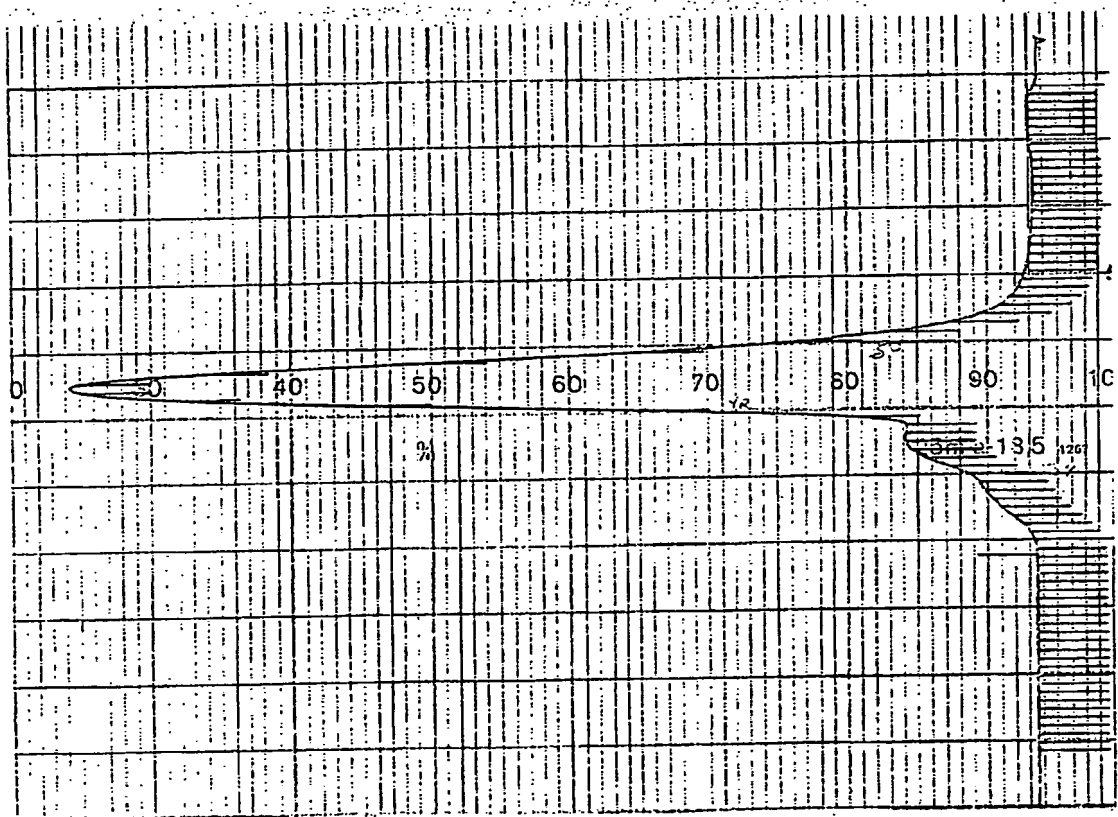


Figura 1