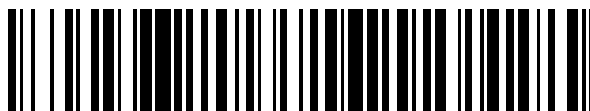


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 146**

51 Int. Cl.:

**C07F 5/00** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07D 213/36** (2006.01)  
**C09K 11/07** (2006.01)  
**C09K 11/06** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**G01N 33/533** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2013** **PCT/FI2013/050912**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14044916**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2013** **E 13783074 (1)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2897967**

54 Título: **Quelatos, agentes quelantes, sus derivados conjugados y su uso**

30 Prioridad:

**24.09.2012 FI 20120311**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2017**

73 Titular/es:

**Qi Wang (100.0%)**  
**Suurpääntäti 35 A 2**  
**20610 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**WANG, QI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 634 146 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Quelatos, agentes quelantes, sus derivados conjugados y su uso

**Campo**

- 5 Esta invención se refiere a quelatos de lantánido(III) luminiscentes estable y a biomoléculas marcadas con estos quelatos. Esta invención se refiere adicionalmente al uso de los quelatos en un método para llevar a cabo un ensayo de unión biospecífica.

**Antecedentes**

- 10 Los quelatos de lantánido(III) luminiscentes tienen varias propiedades especiales que los hacen excelentes herramientas en ensayos de bioafinidad especialmente homogéneos. Su gran desviación de Stokes tiene un efecto de disminución en fenómenos de dispersión. El prolongado decaimiento de fluorescencia después de la excitación de estas moléculas permite la detección de la señal con resolución temporal, que elimina completamente la luminiscencia de fondo que se origina, por ejemplo, de componentes tampón, plásticos y biomateriales. Las líneas de emisión muy estrechas permiten el uso de filtros efectivos que disminuyen el fondo. Además, dado que los quelatos de lantánido(III) no padecen apagado por concentración es posible tener varios quelatos muy cerca lo que  
15 permite el multimarcado. Este fenómeno permite también el desarrollo de quelatos que tienen varios restos que absorben luz.

- 20 Sin embargo, el uso de quelatos estables en ensayos de bioafinidad demanda optimización de la estructura del quelato. El quelato de lantánido luminiscente óptimo debe ser estable en presencia de quelantes adicionales incluso a bajo pH y alta temperatura. El quelato debe tener óptimo perfil de emisión, alta hidrofilia, pequeño tamaño, buena biocompatibilidad, poco efecto sobre biomoléculas y buenas propiedades de transferencia de energía. Además, el quelato debe ser viable para diferentes aceptores de energía, y cuando sea posible, la síntesis de la molécula debe ser simple, barata y escalable.

- 25 El quelato de europio(III) de 4-[2-(4-isotiocianatofenil)etnil]-2,6-bis[[N,N-bis(carboximetil)-amino]metil]piridina [US 4.920.195] es uno de los más comúnmente usados reactivos de marcado de biomoléculas, dado que cumple casi todos los requerimientos anteriormente mencionados. El inconveniente más serio de este quelato así como de otros quelatos de lantánido(III) heptadentados es que exhibe bastante baja estabilidad del quelato lo que limita su uso en aplicaciones que implican tratamientos a elevada temperatura, bajo pH, y en presencia de agentes quelantes adicionales tales como EDTA.

- 30 La estabilidad del quelato se puede incrementar usando restos quelantes cíclicos [US 4.920.195; WO2005058877; WO2005021538] pero la neutralización de la carga neta disminuye la solubilidad en agua del quelato. La solubilidad disminuida de los quelatos cíclicos se puede mejorar usando grupos hidrófilos en la unidad aromática [WO2009030819]. La estabilidad del quelato se puede mejorar también incrementando el número de ácidos carboxílicos quelantes [WO2008020113, US2004166585]. Sin embargo, todos los métodos de la técnica anterior para incrementar la estabilidad del quelato de quelatos que incluyen la subunidad de piridina también incrementan el  
35 tamaño del quelato y/o disminuyen la solubilidad del quelato.

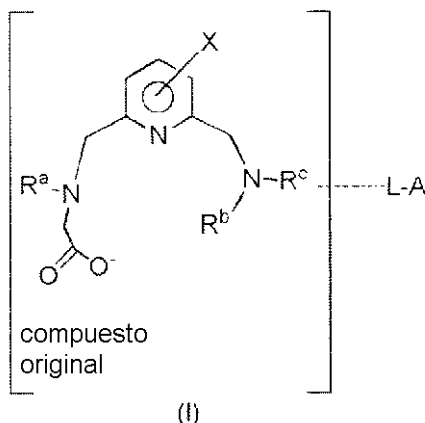
El documento WO2010055207 describe agentes quelantes y quelatos que incluyen la subunidad de 4-(N-alquilpirrolo)piridina, biomoléculas marcadas con estos quelatos y agentes quelantes así como soportes sólidos conjugados con estos quelatos, agentes quelantes y biomoléculas marcadas.

- 40 Hakala et al. describen el desarrollo de quelatos de Sm(III) luminiscentes que contienen ligandos de hexadentados a nonadentados (J. Luminiscence, 113, no. 1-2, 2005, pp 17-26).

**Sumario**

Un objetivo de la presente tecnología es aliviar y eliminar los problemas relacionados con los quelatos de lantánido luminiscentes de la técnica anterior.

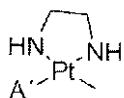
- 45 Según un aspecto esta tecnología se refiere a quelatos que incluyen un ion lantánido(III) seleccionado de europio, terbio, samario y disprosio y a un ligando quelante de fórmula (I)



en la que X se selecciona de grupos feniletinilo, furilo, tienilo, fenilo, y pirrol, y sus derivados substituidos, en la que dichos substituyentes se seleccionan de grupos alquilo y grupos alcoxi.

5 L es un conector formado de uno a diez restos, siendo seleccionado cada resto del grupo que consiste en fenileno, alquileo que contiene 1-12 átomos de carbono, etinidilo ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), etilenodilo ( $-\text{C}=\text{C}-$ ), éter ( $-\text{O}-$ ), tioéter ( $-\text{S}-$ ), amida ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{CO}-\text{NR}'-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-$  y  $-\text{NR}'-\text{CO}-$ ), carbonilo ( $-\text{CO}-$ ), éster ( $-\text{COO}-$  y  $-\text{OOC}-$ ), disulfuro ( $-\text{SS}-$ ), sulfonamida ( $-\text{SO}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{SO}_2-\text{NR}'-$ ), sulfona ( $-\text{SO}_2-$ ), fosfato ( $-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-$ ), diaza ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), y amina terciaria, en las que R' representa un grupo alquilo que contiene menos de 5 átomos de carbono, y reemplazando L a un hidrógeno en cualquier parte del compuesto inicial o no está presente,

10 A es un grupo reactivo seleccionado de isotiocianato, bromoacetamido, yodoacetamido, maleimido, 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, piridilditio, tioéster, aminooxi, azida, hidrazida, amino, alquino, un grupo metacrililo, ácido carboxílico, haluro de ácido, éster de arilo, éster de vinilo, y éster de hidroxiamina,



15 en la que A' es un grupo de escisión seleccionado de Cl,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , y  $\text{NO}_3$  en la que - es la posición del conector L y



en la que - es la posición de un conector L,

y reemplazando A a un hidrógeno del X cuando no está presente el conector L, y

$\text{R}^a$  se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  y  $-(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que n es 2 o 3, y

20  $\text{R}^b$  es  $-(\text{CH}_2)_m\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que m es 2 o 3, y

$\text{R}^c$  se selecciona de  $\text{CH}_2\text{COO}^-$ , y  $-(\text{CH}_2)_l\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que l es 2 o 3.

Según otro aspecto esta tecnología se refiere a una molécula detectable tal como una biomolécula conjugada con un quelato según la presente tecnología en la que la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en oligopéptido, oligonucleótido, ADN, ARN, oligo- o poli-nucleótido modificado, proteína, oligosacárido, polisacárido, fosfolípido, APN, ANB, anticuerpo, antígeno, esteroide, biotina, hapteno, fármaco, ligando de unión a receptor, y lectina.

Según otro aspecto la presente tecnología se refiere a un método para llevar a cabo un ensayo de bioafinidad específica usando una biomolécula conjugada de la presente tecnología con un analito a determinar.

Según otro aspecto la presente tecnología se refiere al uso de una biomolécula conjugada según la presente tecnología en un ensayo de unión de bioafinidad específica que utiliza determinación fluorométrica o fluorométrica con resolución temporal de una luminiscencia específica.

Se han descrito aspectos adicionales de la presente tecnología en las reivindicaciones dependientes.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 describe las estructuras del quelato de la técnica anterior (1) y dos quelatos representativos según la presente tecnología (6, 7).

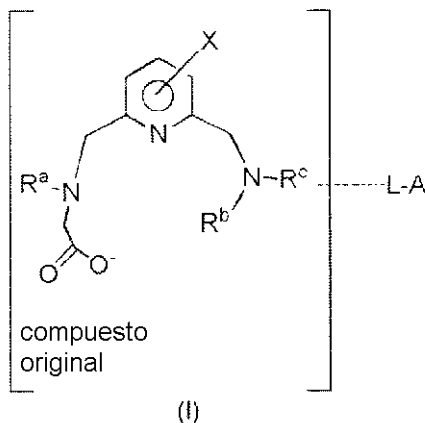
- 5 La Figura 2 describe los espectros UV-Vis de absorción, excitación ( $\lambda_{em} = 615$  nm) y emisión ( $\lambda_{exc} = 319$  nm) de 1b en tampón TRIS/HCl 0,01 M a pH 7,4.

La Figura 3 describe espectros de emisión de los complejos 1b, 6b y 7b (de abajo a arriba) en tampón de TRIS/HCl (0,01 M, pH 7,4;  $\lambda_{exc} = 318$  nm).

- 10 La Figura 4 describe inmunoensayos de hCRP con quelatos de europio conjugados con biotina: 1c (■), 6c (●) y 7c (▲). Los límites inferiores para las detecciones de los quelatos de biotina eran 6,5, 1,5 y 1,9  $\mu\text{g/l}$ , respectivamente.

### Descripción detallada

- 15 En esta invención, se observó que la estabilidad de un quelato de lantánido que incluye una subunidad de piridina se puede mejorar sin necesidad de incrementar significativamente el tamaño del ligando quelante. Según una realización, la presente tecnología se refiere a quelatos que incluyen un ion de lantánido(III) seleccionado de europio, terbio, samario y disprosio y un ligando quelante de fórmula (I)

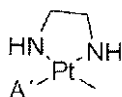


en la que

X se selecciona de grupos feniletinilo, furilo, tienilo, fenilo y pirrol, y sus derivados sustituidos, en la que dichos sustituyentes se seleccionan de grupos alquilo y grupos alcoxi.

- 20 L es un conector formado de uno a diez restos, siendo seleccionado cada resto del grupo que consiste en fenileno, alquileo que contiene 1-12 átomos de carbono, etinidilo ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), etilenodilo ( $-\text{C}=\text{C}-$ ), éter ( $-\text{O}-$ ), tioéter ( $-\text{S}-$ ), amida ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{CO}-\text{NR}'-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-$  y  $-\text{NR}'-\text{CO}-$ ), carbonilo ( $-\text{CO}-$ ), éster ( $-\text{COO}-$  y  $-\text{OOC}-$ ), disulfuro ( $-\text{SS}-$ ), sulfonamida ( $-\text{SO}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{SO}_2-\text{NR}'-$ ), sulfona ( $-\text{SO}_2-$ ), fosfato ( $-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-$ ), diaza ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), y amina terciaria, en las que R' representa un grupo alquilo que contiene menos de 5 átomos de carbono, y reemplazando L a un hidrógeno en cualquier parte del compuesto inicial o no está presente,

25 A es un grupo reactivo seleccionado de isotiocianato, bromoacetamido, yodoacetamido, maleimido, 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, piridilditio, tioéster, aminooxi, azida, hidrazida, amino, alquino, un grupo metacrililo, ácido carboxílico, haluro de ácido, y un éster activo,



- 30 en la que A' es un grupo de escisión seleccionado de Cl,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , y  $\text{NO}_3$ , en la que — es la posición del conector L y



en la – es la posición del conector L,

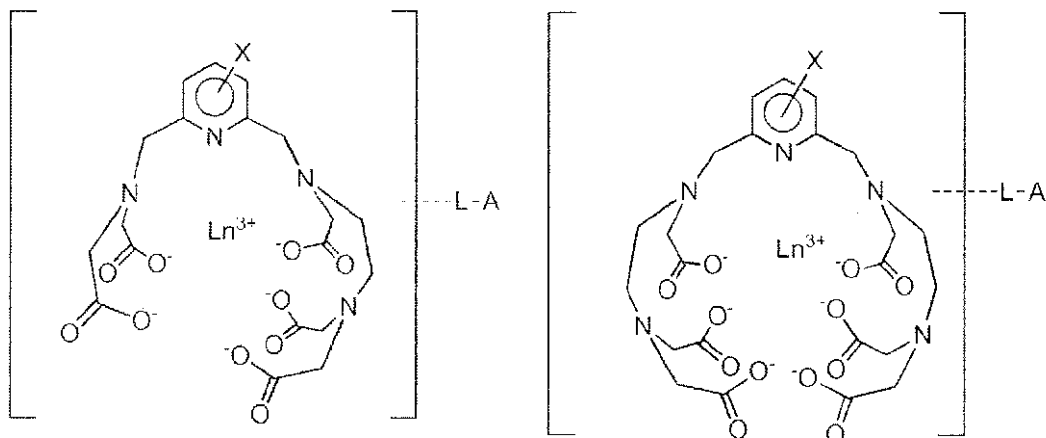
y reemplazando A a un hidrógeno del X cuando el conector L no está presente, y

$R^a$  se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  y  $-(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que n es 2 o 3, y

5  $R^b$  es  $-(\text{CH}_2)_m\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que m es 2 o 3, y

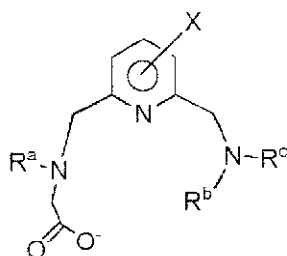
$R^c$  se selecciona de  $\text{CH}_2\text{COO}^-$ , y  $-(\text{CH}_2)_l\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , en la que l es 2 o 3.

Según una realización preferible  $R^a$  se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  y  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ ,  $R^b$  es  $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ , y  $R^c$  es  $\text{CH}_2\text{COO}^-$ . Según esta realización los quelatos de la presente tecnología tienen las siguientes estructuras



10 En las que X, L y A son como se define anteriormente, y Ln se selecciona de Eu, Tb, Sm y Dy.

Tal como se define aquí, el “compuesto inicial” es la parte del ligando quelante de fórmula (I) que está entre los corchetes. Por consiguiente, se entiende que el compuesto original es

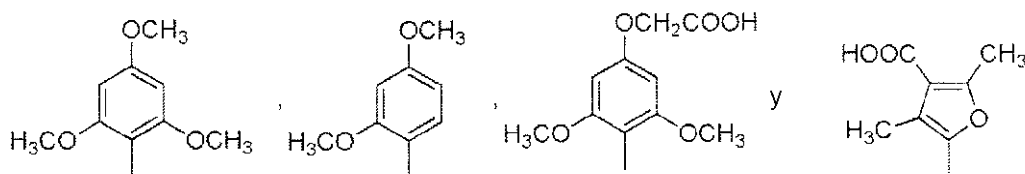


15 Los grupos X apropiados para la presente tecnología son grupos feniletinilo, furilo, tienilo, fenilo, y pirrol, y sus derivados sustituidos. Los substituyentes ejemplares son grupos alquilo y grupos alcoxi. Los métodos para sintetizar las piridinas con grupo X son conocidos en la técnica. Los métodos ejemplares se describen en Bioconjugate Chemistry, 2009, vol 20, página 405, Esquema 1.

20 Tal como se define aquí, “grupo alquilo” es un grupo lineal o ramificado como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo y sec-butilo. El grupo alquilo se puede ligar también a otros grupos como grupos hidroxilo, ácido carboxílico, carbohidrato y ácido sulfónico.

Tal como se define aquí, “grupo alcoxi” es un grupo lineal o ramificado como metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxilo, t-butoxilo y sec-butoxilo. El grupo alcoxi se puede ligar también a otros grupos como grupos hidroxilo, carbohidrato, ácido carboxílico y ácido sulfónico.

Las unidades aromáticas sustituidas con alcoxi y alquilo ejemplares son



en las que – es la posición en la que la unidad aromática está conectada a la unidad de piridina y en la que los grupos –CH<sub>2</sub>COOH y –COOH son grupos A reactivos ejemplares.

El grupo X está conectado a la posición 3 o preferentemente 4 de la unidad de piridina.

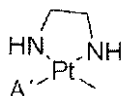
- 5 El quelato debe llevar un grupo A reactivo para permitir la unión covalente a una molécula detectable tal como una biomolécula.

Según una realización, el grupo reactivo A se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato, bromoacetamido, yodoacetamido, maleimido, 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, piridiltio, tioéster, aminooxi, azida, hidrazida, amino, alquino, o un grupo polimerizable tal como grupo metacriloilo, y un ácido carboxílico o haluro de ácido carboxílico o unos de sus ésteres activos. Tal como se define aquí, “éster activo” es un éster de arilo, éster de vinilo, o éster de hidroxiamina. Los ésteres activos ejemplares son éster de nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo y éster de N-hidroxisuccinimidilo.

- 10

Se ha propuesto [U.S. 5.985.566] que los oligonucleótidos, ADN, ARN, oligopéptidos, proteínas y lípidos se pueden transformar estadísticamente usando moléculas marcadas unidas a derivados de platino. En ácidos nucleicos estas moléculas reaccionan predominantemente en N7 de restos guanina. Cuando los quelatos de la presente tecnología se usan para estos propósitos de marcado un grupo A reactivo ejemplar es

- 15



en la que A' es un grupo de escisión seleccionado de Cl, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, H<sub>2</sub>O, y NO<sub>3</sub> en la que – es la posición del conector L.

- 20 Cuando el quelato de la presente tecnología se usa para bioconjugación de uniones fosfodiéster un grupo A reactivo ejemplar es

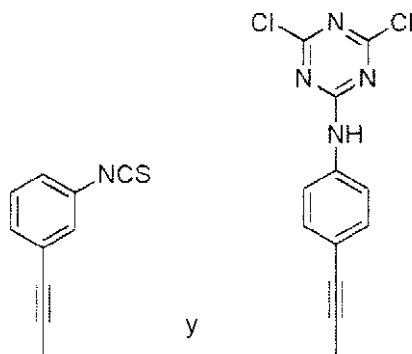


en la que – es la posición del conector L.

- 25 En el caso de que el quelato se deba unir a una micropartícula o nanopartícula durante el procedimiento de fabricación de dichas partículas, el grupo A reactivo es un grupo polimerizable, tal como un grupo metacriloilo.

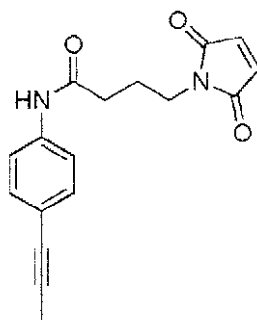
En el caso de que el quelato se vaya a unir a soportes sólidos que incluyen nanomateriales, biomoléculas, y varias moléculas orgánicas usando la reacción de cicloadición [2+3] de Huisgen-Sharpless catalizada por cobre(I), el grupo A reactivo tiene que ser o azida o alquino terminal.

- 30 El grupo A reactivo se puede unir al compuesto original directamente o vía un conector L. Cuando el grupo reactivo está unido al compuesto original directamente, la posición preferible es el grupo X. Las posiciones ejemplares son las posiciones 3 y 4 de la unidad de feniletinilo. Según una realización preferible el grupo A reactivo está unido a la posición 4 del grupo feniletinilo y se selecciona de grupos amino, isotiocianato, yodoacetamido y 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino. Según realizaciones ejemplares en las que los grupos reactivos están unidos directamente al X son



en la que - es la posición de la unidad de piridina y X es un grupo feniletilnilo.

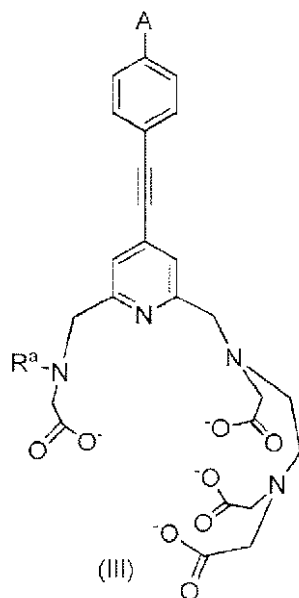
Según una realización el grupo reactivo está unido al compuesto original vía un conector L. El conector está formado de uno a diez restos, siendo seleccionado cada resto del grupo que consiste en fenileno, alquileo que contiene 1-12 átomos de carbono, etinodiilo ( $-C\equiv C-$ ), etilenodiilo ( $-C=C-$ ), éter ( $-O-$ ), tioéter ( $-S-$ ), amida ( $-CO-NH-$ ,  $-CO-NR'-$ ,  $-NH-CO-$  y  $-NR'-CO-$ ), carbonilo ( $-CO-$ ), éster ( $-COO-$  y  $-OOC-$ ), disulfuro ( $-SS-$ ), sulfonamida ( $-SO_2-NH-$ ,  $-SO_2-NR'-$ ), sulfona ( $-SO_2-$ ), fosfato ( $-O-PO_2-O-$ ), diaza ( $-N=N-$ ), y amina terciaria, en las que R' representa un grupo alquilo que contiene menos de 5 átomos de carbono, y que reemplaza a un hidrógeno en cualquier parte del compuesto inicial. Las posiciones ejemplares son la unidad de piridina, el grupo X y las unidades  $CH_2$  de la parte quelante. La posición preferible del conector es el grupo X. El conector está preferentemente en aplicaciones en las que se necesita un espacio entre el quelato y la molécula detectable. Una combinación ejemplar de conector y grupo A reactivo es



en la que - es la posición de la unidad de piridina.

Aunque los quelantes orgánicos y sus sustituyentes tienen un efecto significativo sobre las propiedades fotofísicas de los quelatos de lantánido(III), no hay reglas generales disponibles para la estimación de estos efectos. Se ha propuesto [US 4.761.481] que los sustituyentes dadores de electrones en el resto aromático de 2,6-[N,N-di(carboxialquil)aminoalquil]piridinas sustituidas con fenilo y naftilo tienen efectos ventajosos sobre las propiedades fotofísicas en sus quelatos con iones lantánido. Sin embargo, no se dio ninguna evidencia experimental. Después se ha mostrado que este es el caso con varios quelatos de terbio(III) y disprosio(III) [solicitud de patente de EE.UU. No. de serie 11/004.061] pero los correspondientes quelatos de europio(III) son prácticamente no luminiscentes [Hemmilä et al., J. Biochem. Biophys. Methods, 1993, 26, 283]. Por consiguiente, está claro para una persona experta en la técnica que la elección de ion lantánido depende de la naturaleza del cromóforo.

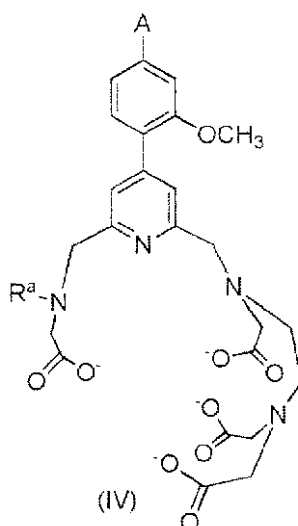
Los quelatos ejemplares según la presente tecnología tienen el ligando quelante de fórmula (III)



en la que el grupo A reactivo se selecciona de amino, yodoacetamido, isotiocianato y 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, y el lantánido se selecciona de europio y samario, preferentemente europio, y  $R^a$  se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  y  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ . Según una realización,  $R^a$  es  $\text{CH}_2\text{COO}^-$ .

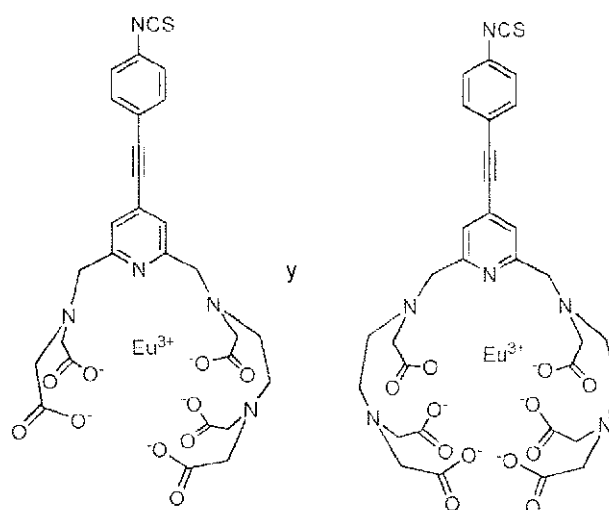
- 5 Es evidente que aunque los grupos ácido carboxílico quelantes de los ligandos quelantes de fórmulas de esta descripción, tales como fórmula (I) y fórmula (III), se dibujan en forma desprotonada (es decir,  $-\text{COO}^-$ ), las fórmulas son solo ilustrativas y el alcance de la invención abarca ligandos quelantes en los que uno o más de los grupos ácido carboxílico están protonados (es decir,  $-\text{COOH}$ ).

- 10 Los quelatos ejemplares según la presente tecnología tienen el ligando quelante de fórmula (IV) y en la que el grupo A reactivo se selecciona de amino, yodoacetamido, isotiocianato y 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, y grupo carboxilo, y el lantánido se selecciona de terbio y disprosio. Según una realización el lantánido es terbio.



Los quelatos ejemplares según la presente tecnología son

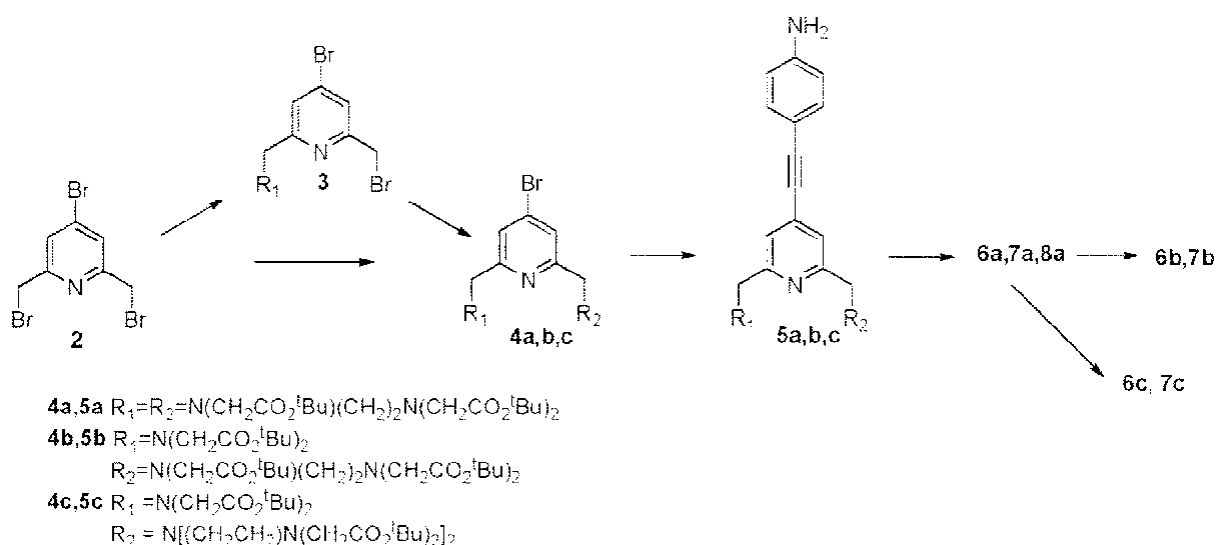




- Según otra realización la presente tecnología se refiere a una molécula detectable tal como una biomolécula conjugada con un quelato según la presente tecnología. La biomolécula se selecciona del grupo que consiste en oligopéptido, oligonucleótido, ADN, ARN, oligo- o poli-nucleótido modificado, proteína, oligosacárido, polisacárido, fosfolípido, APN, ANB, anticuerpo, antígeno, esteroide, biotina, hapteno, fármaco, ligando de unión a receptor, y lectina. La biomolécula se puede marcar con el quelato de la presente tecnología usando métodos conocidos en la técnica. La posición de marcado y el número de quelatos conjugados se pueden escoger por las condiciones de reacción empleadas y escogiendo el grupo A reactivo según las demandas de la aplicación y la molécula detectable a marcar.
- La biomolécula conjugada con un quelato según esta invención es un oligopéptido, oligonucleótido, ADN, ARN, oligo- o poli-nucleótido modificado, tal como fosforomonotioato, fosforoditioato, fosforoamidato y/o oligo- o poli-nucleótido modificado con azúcar o base, proteína, oligosacárido, polisacárido, fosfolípido, APN, ANB, anticuerpo, esteroide, hapteno, fármaco, ligando de unión a receptor y lectina.
- Según otra realización la presente tecnología se refiere a un método para llevar a cabo un ensayo de bioafinidad específica usando una biomolécula conjugada con un quelato de la presente tecnología con un analito a determinar.
- Según otra realización la presente tecnología se refiere al uso de biomoléculas conjugadas con los quelatos de la presente tecnología en un ensayo de unión de bioafinidad específica que utiliza la determinación fluorométrica o fluorométrica con resolución temporal de una luminiscencia específica. El ensayo de bioafinidad específica se selecciona preferentemente de un inmunoensayo heterogéneo, un inmunoensayo homogéneo, un ensayo de hibridación de ADN, un ensayo de unión a receptor, un ensayo inmunológico y un ensayo inmunohistoquímico.
- La diferencia esencial en la estructura de los quelatos de la técnica anterior que incluyen una sola subunidad de piridina y los quelatos de la presente tecnología se puede ver en la Fig. 1. Aunque no se desea estar relacionado con ninguna teoría, se cree que la presencia de grupos quelantes de ácido carboxílico adicional mejora la estabilidad y el rendimiento cuántico comparado con los quelatos de la técnica que comprende un cromóforo similar.
- La invención se iluminará con los siguientes ejemplos no restrictivos

### Ejemplos

Las rutas sintéticas empleadas en la parte experimental se representan en el Esquema 1. Las fórmulas de compuestos 6a-c y 7a-c se muestran en la Figura 1.



### Esquema 1

#### Procedimientos experimentales

Todos los reactivos y disolventes usados fueron de grado reactivo. Los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker Avance de 600 MHz que funcionaba a 600,1337 MHz y 150,9179 MHz para  $^1H$  y  $^{13}C$ , respectivamente. Los espectros de masas de HR se registraron en un espectrómetro de masas Bruker micrOTOF-Q. Los espectros de absorción UV-visible se registraron en un espectrómetro Specord 205 (Analytik Jena). Los espectros de emisión y excitación en estado estacionario se registraron en un espectrómetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3 que trabajaba con una lámpara continua de Xe de 450W. La detección se realizó con un fotomultiplicador Hamamatsu R928. Todos los espectros se corrigieron para las funciones instrumentales. Cuando era necesario, se usó un filtro de corte de 399 nm para eliminar los artefactos de segundo orden. Los tiempos de vida de fosforescencia se midieron en el mismo instrumento trabajando en el modo de fosforescencia, con 50  $\mu s$  de tiempo de retardo y una ventana de integración de 100 ms.

Los perfiles de decaimiento de emisión se ajustaron a una función mono-exponencial y bi-exponencial usando el programa FAST de Edinburgh Instrument o con el software Datastation de Jobin Yvon. Los números de hidrataciones,  $q$ , se obtuvieron usando la ecuación (1), en la que  $\tau_{H_2O}$  y  $\tau_{D_2O}$ , respectivamente, se refieren a los tiempos de vida de decaimiento de la luminiscencia medidos (en ms) en agua y agua deuterada, usando  $A_{Eu} = 1,2$  y  $a_{Eu} = 0,25$  para  $Eu^{III}$ :

$$q = A_{Ln} (1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O} - a_{Ln}) \quad (1)$$

Los rendimientos cuánticos de luminiscencia se midieron según procedimientos convencionales, con disoluciones diluidas (densidad óptica  $<0,05$ ), usando  $[Ru(bipy)_3]Cl_2$  en agua no desgasificada ( $\Phi = 4,0\%$ ) como referencia. El error relativo estimado es  $\pm 15\%$ .

#### Ejemplo 1.

Síntesis de 2,2',2'',2'''-[[[4-bromopiridin-2,6-diil]bis(metilen)]bis([2-(terc-butoxi)-2-oxoetil]azanodiil)]bis(etano-2,1-diil)]bis(azanotriil)]tetraacetato de tetra-terc-butilo (4a).

Una mezcla de 4-bromo-2,6-bis(bromometil)piridina (2; 344 mg, 1,0 mmol), terc-butil-[[bis(terc-butoxicarbonilmetil)aminoetil]amino]tris(acetato) (843 mg, 2,10 mmol) y carbonato de potasio seco (1,38 g, 10 mmol) en acetonitrilo seco (50 ml) se agitó durante la noche a 55°C. El sólido se retiró por filtración. El disolvente se evaporó a vacío y el producto se purificó en una columna de gel de sílice usando trietilamina al 1% (v/v) en diclorometano como eluyente. El rendimiento era de 0,56 g (57%).  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  7,59 (s, 2H), 3,79 (ancho, 4H), 3,39 (s, 8H), 3,33 (ancho, 4H), 2,84 (ancho, 8H), 1,40 (s, 18H), 1,38 (s, 36H).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  170,48, 160,79, 134,32, 124,09, 80,88, 59,79, 56,05, 53,40, 52,63, 52,06, 28,12, 28,10. HR-MS para  $C_{47}H_{81}BrN_5O_{12}^+$  requerido 986,5060 y 988,5040, encontrado 986,4993 y 988,4985

#### Ejemplo 2

Síntesis de 2,2'-[[6-[[2-(bis[2-(terc-butoxi)-2-oxoetil]amino)etil][2-(terc-butoxi)-2-oxoetil]amino]metil]-4-bromopiridin-2-il]metil]azanodiil]diacetato de di-terc-butilo (4b).

2,2'-[[4-bromo-6-(bromometil)piridin-2-il]metilenonitrilo]bis(acetato) de di-terc-butilo (3) (385 mg, 0,76 mmol),

[[bis(terc-butoxicarbonilmetil)aminoetil]amino]acetato de terc-butilo (319 mg, 0,80 mmol) y carbonato de potasio (seco) (524 mg, 3,80 mmol) se agitó durante la noche a 55°C. El sólido se retiró por filtración. El disolvente se evaporó a vacío y el producto se purificó en una columna de gel de sílice usando acetato de etilo al 20% (v/v) en éter de petróleo como eluyente. El rendimiento era de 562 mg (89%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,69 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 3,94 (s, 4H), 3,41 y 3,40 (2s, 10H), 2,86 (s ancho, 4H), 1,41 (s, 27H), 1,38 (s, 18H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 170,45, 170,29, 160,60, 134,49, 124,39, 124,26, 81,10, 81,00, 59,65, 59,42, 56,01, 55,81, 52,64, 51,88, 28,13, 28,11. HR-MS para C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>: requerido 829,3957 y 831,3937, encontrado 829,4050 y 831,4038.

#### Ejemplo 3

Síntesis de 2,2',2'',2'''-((((4-((4-aminofenil)etil)piridina-2,6-diil)bis(metileno)bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)azanodiil))bis(etano-2,1-diil))-bis(azanotriil))-tetraacetato de tetra-terc-butilo (5a)

Se desaireó el compuesto 4a (364 mg, 0,37 mmol) y 4-etilanilina (52 mg, 0,44 mmol) en la mezcla de THF (10 ml) y DIPEA (10 ml) con nitrógeno durante 5 min. Se añadieron Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10,4 mg, 0,015 mmol) y CuI (2,9 mg, 0,015 mmol) como catalizadores, y la mezcla de reacción se agitó durante la noche en nitrógeno a 60°C. Los disolventes se retiraron a vacío y el producto se purificó en una columna de gel de sílice usando una mezcla de 20-30% (v/v) de acetato de etilo en éter de petróleo que contiene trietilamina al 1% (v/v) como eluyente. El rendimiento era de 290 mg (76%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50°C): δ 7,44 (s, 2H), 7,30 (d, J = 8,45 Hz, 2H), 6,61 (d, J = 8,50 Hz, 2H), 3,96 (s ancho, 4H), 3,43 (s, 8H), 3,40 (s ancho, 4H), 2,90 (b, 8H), 1,46 (s, 18H), 1,42 (s, 36H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50°C): δ 170,55, 158,78, 147,56, 133,32, 132,57, 122,66, 114,54, 111,47, 85,87, 80,83, 80,75, 60,07, 56,24, 52,88, 52,47, 28,17, 28,13. HR-MS para C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>: requerido 1023,6376, encontrado 1023,6308.

#### Ejemplo 4

Síntesis de 2,2'-(((4-((4-aminofenil)etil)-6-((2-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)amino)etil)(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)amino)metil)piridin-2-il)metil)azanodiil)diacetato de di-terc-butilo (5b)

La síntesis se realizó como anteriormente para el compuesto 5a pero usando 4b (562 mg, 0,68 mmol) como material de partida. El rendimiento era de 421 mg (72%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,45 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,18 (d, J = 8,46 Hz, 2H), 6,51 (d, J = 8,52 Hz, 2H), 4,17 (s ancho, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,81 (s, 2H), 3,38 (s, 4H), 3,35 (s, 4H), 3,27 (s, 2H), 2,77 (t, d, J = 6,54, 25,21 Hz, 4H), 1,37 (s, 27H), 1,33 (s, 18H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 170,68, 170,55, 170,38, 159,06, 158,64, 147,93, 133,18, 133,15, 122,47, 122,38, 114,38, 110,70, 94,80, 85,66, 80,89, 80,72, 80,70, 60,21, 60,08, 59,63, 56,14, 56,09, 55,71, 52,55, 52,16, 28,09, 28,07, 28,04. HR-MS para C<sub>47</sub>H<sub>72</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>: requerido 866,5274, encontrado 866,5294.

#### Ejemplo 5.

Preparación del complejo 6a.

El compuesto 5b (220 mg, 0,215 mmol) se disolvió en TFA (2 ml) y la mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 2 horas. Todos los volátiles se retiraron a vacío. El residuo se disolvió en agua (2 ml), se añadió una disolución de EuCl<sub>3</sub> (0,236 mmol en 0,5 ml de agua) y se agitó durante 10 min. El pH se ajustó a 7,0 con trietilamina y la mezcla se agitó durante otros 10 minutos. El pH se ajustó a 9,0 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sat. El precipitado formado se retiró por centrifugación. El pH de la disolución se ajustó a 7,0 con ácido acético. Se añadió acetona (45 ml) y la mezcla se agitó durante 1 min. El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con acetona (50 ml) y se secó con flujo de aire. HR-MS para C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>EuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>: requerido 732,0961 y 734,0975, encontrado 732,1024 y 734,1032. El precipitado se disolvió en agua (1 ml). Se añadieron cloroformo (1 ml) y tiofosgeno (0,33 ml, 4,3 mmol) y se agitó la mezcla vigorosamente durante 5 minutos. El pH se controló y se mantuvo a 7,0 con disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 15%. El cloroformo se retiró seguido de la adición de acetona (50 ml) con agitación. El precipitado formado se aisló por centrifugación, se lavó con acetona (50 ml) y se secó. HR-MS para C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>EuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sup>-</sup>: requerido 774,0526 y 776,0539, encontrado 774,0649 y 776,0694.

#### Ejemplo 6.

Preparación de complejo 7a

El compuesto del título se preparó como se describe anteriormente para el compuesto 6a pero usando el compuesto 5a (234 mg, 0,27 mmol) como material de partida. HR-MS para la forma amino de C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>EuN<sub>6</sub>O<sub>12</sub><sup>2-</sup>: requerido 416,0683 y 417,0690, encontrado 416,0721 y 417,0740. HR-MS para la forma isotiocianato de C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>EuN<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sup>2-</sup>: requerido 437,0465 y 438,0472, encontrado 437,0521 y 438,0512.

#### Ejemplo 7

Preparación de los complejos de glicina 1b, 6b y 7b.

Los isotiocianatos (1a, 6a, 7a; 20 mg cada uno) se dejaron reaccionar con glicina (300 mg) a pH ca 7. El producto se purificó por HPLC (columna Supelco Ascentis RP-Amide, 21,2 mm x 25 cm, partícula 5 µm, caudal 8,0 ml/min,

eluyente tampón TEAA 20 mM en acetonitrilo al 2-25%, v/v). Las fracciones se recogieron y se concentraron. Las sales se retiraron en HPLC usando el sistema anteriormente mencionado omitiendo el componente tampón del eluyente.

HR-MS para 1b  $C_{26}H_{22}EuN_5O_{10}S_2^{2-}$ : requerido 373,5148 y 374,5155, encontrado 373,5163 y 374,5173.

5 HR-MS para 6b  $C_{30}H_{29}EuN_6O_{12}S_2^{2-}$ : requerido 424,0387 y 425,0393, encontrado 424,0398 y 425,0380.

HR-MS para 7b  $C_{34}H_{36}EuN_7O_{14}S_2^{2-}$ : requerido 474,5625 y 475,5632, encontrado 474,5676 y 475,5690.

Ejemplo 8.

Preparación de complejos de biotina de 1c, 6c y 7c.

10 Los isotiocianatos (1a, 6a, 7a, 1 mg cada uno) se dejaron reaccionar con N-biotinil-3-aminopropilamina (sal TFA, 5 mg cada uno) a pH ca 8,0. El producto se purificó por HPLC (columna: Supelco Ascentis RP-Amide, 4,6 mm x 15 cm, partícula 5  $\mu$ m, caudal 1,0 ml/min, eluyente tampón de TEAA 20 mM a pH 7,0 con metanol al 2-60%, v/v). Las fracciones se recogieron y se secaron a vacío.

HR-MS para 1c  $C_{37}H_{41}EuN_8O_{10}S_2^{2-}$ : requerido 486,0798 y 487,0805, encontrado 486,0764 y 487,0780.

HR-MS para 6c  $C_{41}H_{48}EuN_9O_{12}S_2^{2-}$ : requerido 536,6037 y 537,6044, encontrado 536,6014 y 537,6023.

15 HR-MS para 7c  $C_{45}H_{55}EuN_{10}O_{14}S_2^{2-}$ : requerido 587,1275 y 588,1282, encontrado 587,1251 y 588,1260.

Ejemplo 9

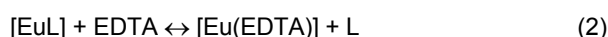
Preparación del complejo 8a

20 El quelato de isotiocianato 8a se sintetiza como se describe anteriormente para 7a, es decir, partiendo de 3, pero usando 2,2',2'',2'''-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(azanotriil-)tetraacetato de tetra-terc-butilo sintetizado como se describe en Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1505-1509.

Ejemplo 10

Determinación de las constantes de estabilidad condicional.

25 En un experimento típico, se mezclaron lotes de 2 ml de disoluciones ca  $2 \times 10^{-5}$  M de los complejos de europio en tampón TRIS a pH = 7,4 con varias cantidades de una disolución patrón de EDTA (o DOTA)  $5 \times 10^{-2}$  M en el mismo tampón, de modo que la relación de EDTA añadido por complejo de Eu varía de 0 a 450000. Para cada disolución se midió el espectro de emisión y se ajustó la disminución de intensidad a la ecuación (2) usando el análisis de regresión no lineal del software SPECFIT.



$$\text{con } K = \frac{[Eu(EDTA)] \times [L]}{[EDTA] \times [EuL]} = \frac{K_{cond, EDTA}}{K_{cond, L}}$$

30 La constante de estabilidad condicional se podría determinar usando valores de  $K_{cond, EDTA}$  calculados de datos de la bibliografía.

Ejemplo 11

Inmunoensayo hCRP

35 La proteína C reactiva humana (CRP) se obtuvo de (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia) y el anticuerpo monoclonal anti-CRP 6404 era de Medix Biochemica (Kauniainen, Finlandia). Pocillos maxi Nunc C12 con bajo contenido de flúor (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca) se revistieron con 150 ng de anticuerpo 6404 en 40  $\mu$ l de tampón de fosfato 50 mM a pH 7,4 durante 16 h a 4°C. Los pocillos se lavaron dos veces usando tampón de lavado de Kaivogen Oy (Turku, Finlandia). El bloqueo final de la superficie del pocillo se llevó a cabo con 200  $\mu$ l de BSA al 0,1% en el tampón de fosfato durante 2 horas a 25°C. El mismo anticuerpo 6404 se conjugó con éster NHS de d-biotina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) usando un exceso de 20 veces en tampón de fosfato 50 mM pH 7,8. Después de la conjugación, el anticuerpo se purificó con columna NAP-5 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) usando tampón TBS (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). Se incubaron tres replicas de 0-10 mg/l de hCRP durante 60 minutos en 50  $\mu$ l de tampón TBS en pocillos revestidos con 6404 prelavados. Los pocillos se lavaron una vez, y se añadieron 50 ng de anticuerpo 6404 biotinilado a los pocillos en 50  $\mu$ l de TBS y se incubaron durante 60 min. Los pocillos se lavaron una vez y se añadieron 50 ng de estreptavidina (BioSpa, Milán, Italia) en 50  $\mu$ l de TBS, se

incubaron durante 10 minutos y se lavaron una vez. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de quelatos de europio biotinilados 40 nM y se incubaron durante 10 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces y se midieron con un contador multilabel 1420 Victor<sup>2</sup> (PerkinElmer, Wallac OY, Turku, Finlandia) en modo de luminiscencia con resolución temporal usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 615 nm, un retardo de 400  $\mu$ s y tiempos de integración de 400  $\mu$ s.

Propiedades espectroscópicas de los quelatos. Las propiedades espectroscópicas de los complejos se midieron en tampón TRIS/HCl 0,01M a pH 7,4 en los complejos funcionalizados con glicina (1b, 6b, 7b), y los parámetros más importantes se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos espectroscópicos para los complejos Eu en tampón TRIS/HCl 0,01M a pH 7,4

Compuesto	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}/\text{ms}$	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}/\text{ms}$	q	$\Phi_{\text{Ov}}$	$\eta_{\text{eff}}$	$\Phi_{\text{Eu}}$
1b	319	16350	0,39	2,10	2,2	0,06	0,54	0,11
6b	317	24350	1,15	1,96	0,1	0,14	0,45	0,31
7b	318	20900	1,07	1,69	0,1	0,12	0,41	0,29

Los espectros de absorción UV-Vis de los tres complejos de Eu son muy similares, mostrando una banda de absorción fuerte centrada a ca 318 nm, que corresponde a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  en los anillos piridilo (véase la Figura 2 para 1b). La presencia de la sustitución de para-(tiourea)-toluilo dio como resultado un desplazamiento batocrómico fuerte de esta banda de absorción, cuando se compara con piridinas no sustituidas para las que el máximo de absorción se puede encontrar a 265-267 nm. Tras la excitación en las bandas de absorción  $\pi \rightarrow \pi^*$ , todos los complejos muestran bandas de emisión bien resueltas entre 575 y 730 nm asociadas a transiciones f-f en el átomo de europio. Estas bandas de emisión corresponden a las transiciones  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$  con J = 0 (banda única a 575 nm), J = 1 (entre 578 y 600 nm), J = 2 (fuerte, de 605 a 625 nm), J = 3 (débil alrededor de 650 nm) y J = 4 (de 690 a 715 nm). Los espectros de excitación correspondientes son perfectamente superponibles con los espectros de absorción, evidenciando un eficiente proceso de transferencia de energía del ligando al metal que es un buen efecto de antena. Los perfiles de decaimiento de la luminiscencia, medidos al máximo de emisión se ajustaron todos perfectamente con funciones monoexponenciales, apuntando a la presencia de especies únicas en disolución. El complejo obtenido a partir del ligando heptadentado de 1b mostró la vida útil más corta (0,39 ms), estando la esfera de coordinación del europio probablemente insaturada. Esto se confirmó mediante el cálculo de los números de hidratación de los complejos según el método desarrollado por Horrocks usando los coeficientes de Beeby (Tabla 1). Aunque el ligando heptadentado de 1b libera el lugar para dos moléculas de agua de la esfera interna, la sustitución de una o dos funciones acetato por las de iminodiacetato dio como resultado la finalización de la esfera de coordinación y la retirada de moléculas de disolvente de la primera esfera de coordinación.

Los espectros de emisión centrados en Eu de los complejos se presentan en la Figura 3. La transición  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  representa la banda de emisión más intensa. Las principales variaciones en la serie se observan en esta transición y en el patrón de la transición de  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$ , volviéndose más intensa esta transición (comparando aquellos con J = 0 a 3) para 7b.

Basado en los espectros de emisión de los tres complejos (Figura 2), fue posible determinar el rendimiento cuántico centrado en europio,  $\Phi_{\text{Eu}}$  del que se puede calcular la eficiencia de sensibilización,  $\eta_{\text{eff}}$ , que refleja la capacidad del ligando para transferir la energía absorbida al europio, usando la ecuación

$$\Phi_{\text{Ov}} = \eta_{\text{eff}} \times \Phi_{\text{Eu}}$$

En la que  $\Phi_{\text{Ov}}$  es el rendimiento cuántico de luminiscencia total medido por un método directo (Tabla 1).

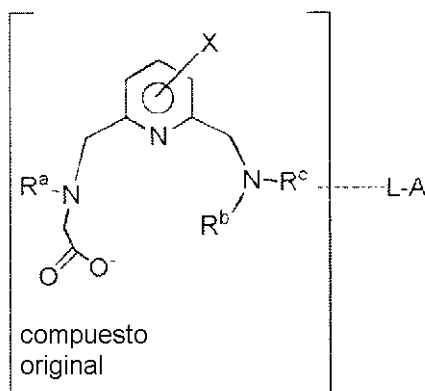
Los valores calculados de  $\eta_{\text{eff}}$  y  $\Phi_{\text{Eu}}$  evidenciaban que la sensibilización es casi la misma para todos los compuestos variando del 41 al 54%, como se esperaba para una unidad de antena similar. Por el contrario, el rendimiento cuántico centrado en el metal de 1b se ve afectado en gran parte por la presencia de las dos moléculas de agua de la esfera interna, perdiendo dos tercios del valor obtenido cuando la esfera de coordinación está saturada.

Determinación de las constantes de estabilidad condicional. La determinación de las constantes de estabilidad condicional de los diferentes complejos se abordó mediante experimentos de competición con EDTA y DOTA. Sólo en el caso de 1b fue posible desplazar el equilibrio en presencia de EDTA. Considerando una constante de estabilidad condicional de 14,53 unidades logarítmicas para EDTA a este pH, el ajuste dio como resultado una constante de estabilidad condicional de 16,7 unidades logarítmicas para 1b a pH = 7,4. Tanto para 6b como para 7b, incluso en presencia de un gran exceso de EDTA, no fue posible desplazar el equilibrio y extraer el átomo de Eu de su ligando coordinante. Incluso el DOTA, que se sabe que forma complejos muy estables con cationes de Ln, no fue capaz de desmetalizar los quelatos de la presente tecnología incluso después de tres días a 80°C.

- 5 Conjugación a Moléculas Bioactivas e inmunoensayo de hCRP. La aplicabilidad de los quelatos se demostró en un inmunoensayo de hCRP de tipo sándwich. Por lo tanto, los quelatos 1b, 6b y 7b se conjugaron con N-Biotinil-3-aminopropilamina. Los quelatos sintetizados 6c y 7c funcionaron igualmente bien en el ensayo de hCRP. El quelato de biotina 1c dio como resultado una señal de luminiscencia inferior a la de 6c y 7c que está de acuerdo con los rendimientos cuánticos y las vidas útiles de emisión medidas. Los límites de detección analítica para 1c, 6c y 7c eran de 6,5, 1,5 y 1,9  $\mu\text{g/l}$  respectivamente, calculados a partir de 3 SD por encima de la media de la concentración nula de hCRP y de las ecuaciones 1c:  $y = 32515x - 34$ ,  $R^2 = 0,96$ ; 6c:  $y = 87730x + 16$ ,  $R^2 = 0,99$ ; 7c:  $y = 90760x - 31$ ,  $R^2 = 0,99$ .

## REIVINDICACIONES

1. Un quelato que comprende un ion lantánido(III) seleccionado de europio, terbio, samario y disprosio y un ligando quelante de fórmula (I)



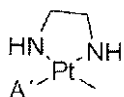
(I)

5 en la que

X se selecciona de grupos feniletinilo, furilo, tienilo, fenilo, y pirrol, y sus derivados sustituidos y en la que dichos substituyentes se seleccionan de grupos alquilo y grupos alcoxi.

10 L es un conector formado de uno a diez restos, siendo seleccionado cada resto del grupo que consiste en fenileno, alquileo que contiene 1-12 átomos de carbono, etinodiilo ( $-C\equiv C-$ ), etilenodiilo ( $-C=C-$ ), éter ( $-O-$ ), tioéter ( $-S-$ ), amida ( $-CO-NH-$ ,  $-CO-NR'-$ ,  $-NH-CO-$  y  $-NR'-CO-$ ), carbonilo ( $-CO-$ ), éster ( $-COO-$  y  $-OOC-$ ), disulfuro ( $-SS-$ ), sulfonamida ( $-SO_2-NH-$ ,  $-SO_2-NR'-$ ), sulfona ( $-SO_2-$ ), fosfato ( $-O-PO_2-O-$ ), diaza ( $-N=N-$ ), y amina terciaria, en las que R' representa un grupo alquilo que contiene menos de 5 átomos de carbono, y reemplazando L a hidrógeno en cualquier parte del compuesto inicial, o no está presente,

15 A es un grupo reactivo seleccionado de isotiocianato, bromoacetamido, yodoacetamido, maleimido, 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, piridilditio, tioéster, aminooxi, azida, hidrazida, amino, alquino, un grupo metacriloilo, ácido carboxílico, haluro de ácido, éster de arilo, éster de vinilo y éster de hidroxiamina,



20 en la que A' es un grupo de escisión seleccionado de Cl,  $(CH_3)_2SO$ ,  $H_2O$ , y  $NO_3$  en la que — es la posición del conector L y



en la que — es la posición del conector L,

y reemplazando A a un hidrógeno del grupo X cuando el conector L no está presente, y

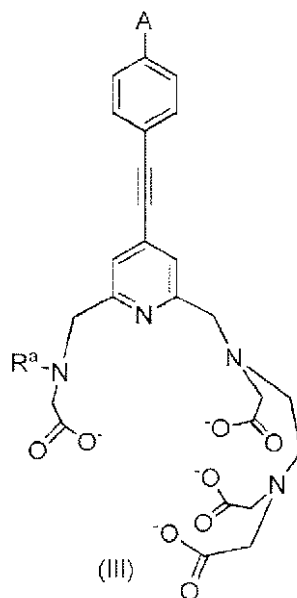
$R^a$  se selecciona de  $-CH_2COO^-$  y  $-(CH_2)_nN(CH_2COO^-)_2$ , en la que n es 2 o 3, y

25  $R^b$  es  $-(CH_2)_mN(CH_2COO^-)_2$ , en la que m es 2 o 3, y

$R^c$  se selecciona de  $CH_2COO^-$ , y  $-(CH_2)_lN(CH_2COO^-)_2$ , en la que l es 2 o 3.

2. El quelato según la reivindicación 1, en el que  $R^a$  se selecciona de  $-CH_2COO^-$  y  $-CH_2CH_2N(CH_2COO^-)_2$ ,  $R^b$  es  $-CH_2COO^-$ , y  $R^c$  es  $-(CH_2)_2N(CH_2COO^-)_2$ .

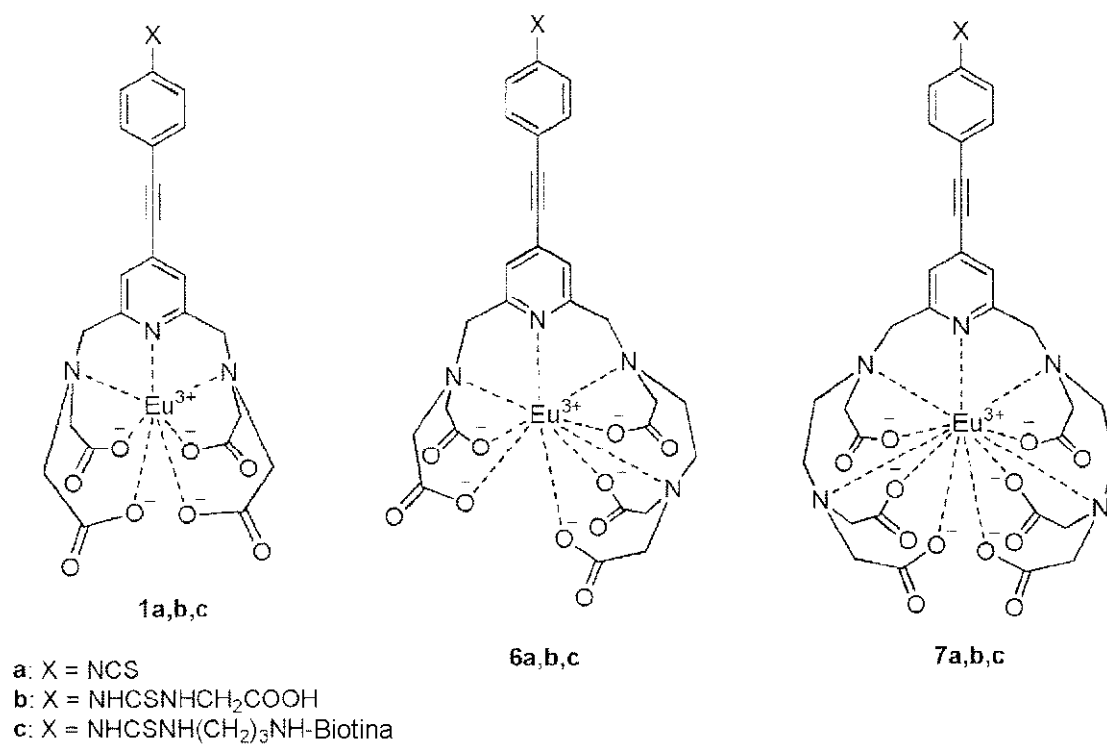
3. El quelato según la reivindicación 1, en el que el ligando quelante tiene la fórmula (III)



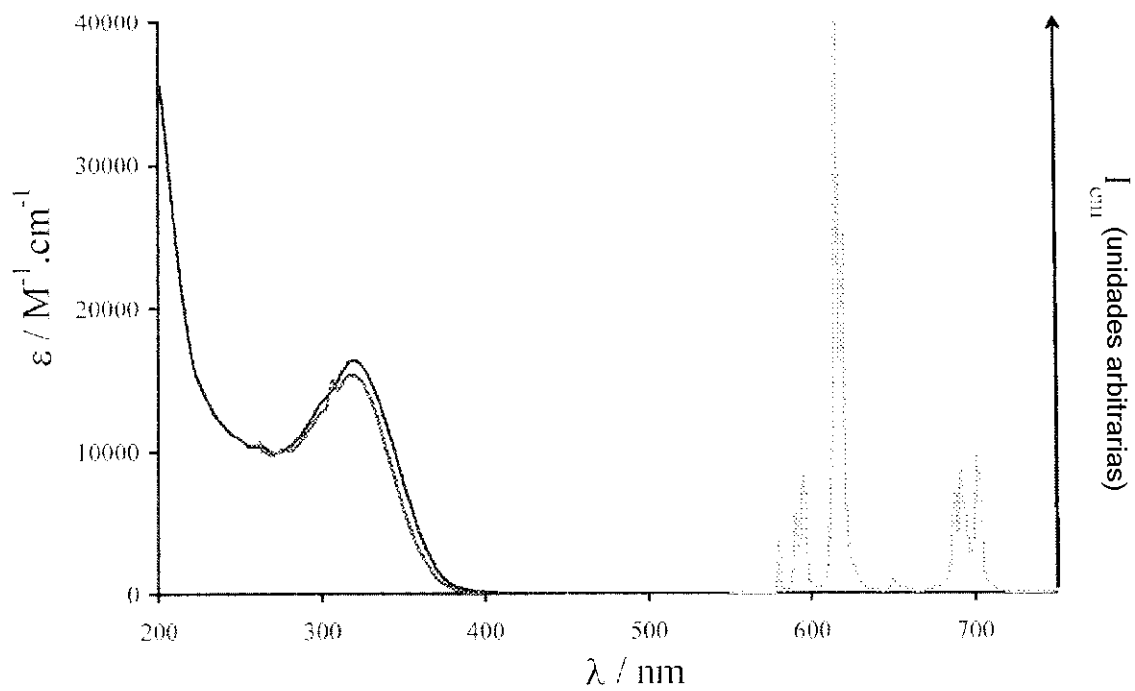
en la que el grupo A reactivo se selecciona de amino, yodoacetamido, isotiocianato y 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, y el lantánido se selecciona de europio y samario.

4. El quelato según la reivindicación 2 o 3, en el que el lantánido es europio.
5. El quelato según la reivindicación 1, en el que X es un grupo alcoxifenilo y el lantánido se selecciona de terbio y disprosio.
6. El quelato según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que  $R^a$  es  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ .
7. Una biomolécula conjugada con un quelato según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en oligopéptido, oligonucleótido, ADN, ARN, oligo- o polinucleótido modificado, proteína, oligosacárido, polisacárido, fosfolípido, APN, ANB, anticuerpo, antígeno, esteroide, biotina, hapteno, fármaco, ligando de unión a receptor, y lectina.
8. Un método para llevar a cabo un ensayo de bioafinidad específica usando una biomolécula de la reivindicación 7 con un analito a determinar.
9. El uso de una biomolécula según la reivindicación 7 en un ensayo de unión de bioafinidad específica que utiliza determinación fluorométrica o fluorométrica con resolución temporal de una luminiscencia específica.
10. El uso según la reivindicación 9, en el que el ensayo de bioafinidad específica se selecciona de un inmunoensayo heterogéneo, un inmunoensayo homogéneo, un ensayo de hibridación de ADN, un ensayo de unión a receptor, un ensayo inmunológico y un ensayo inmunohistoquímico.

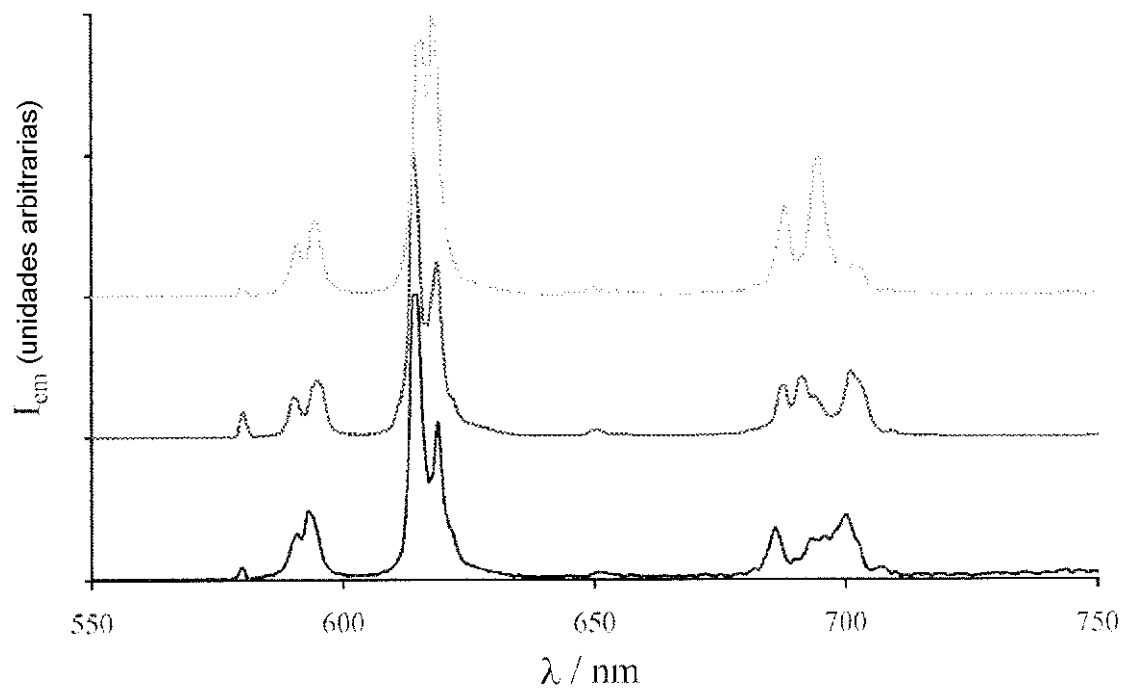




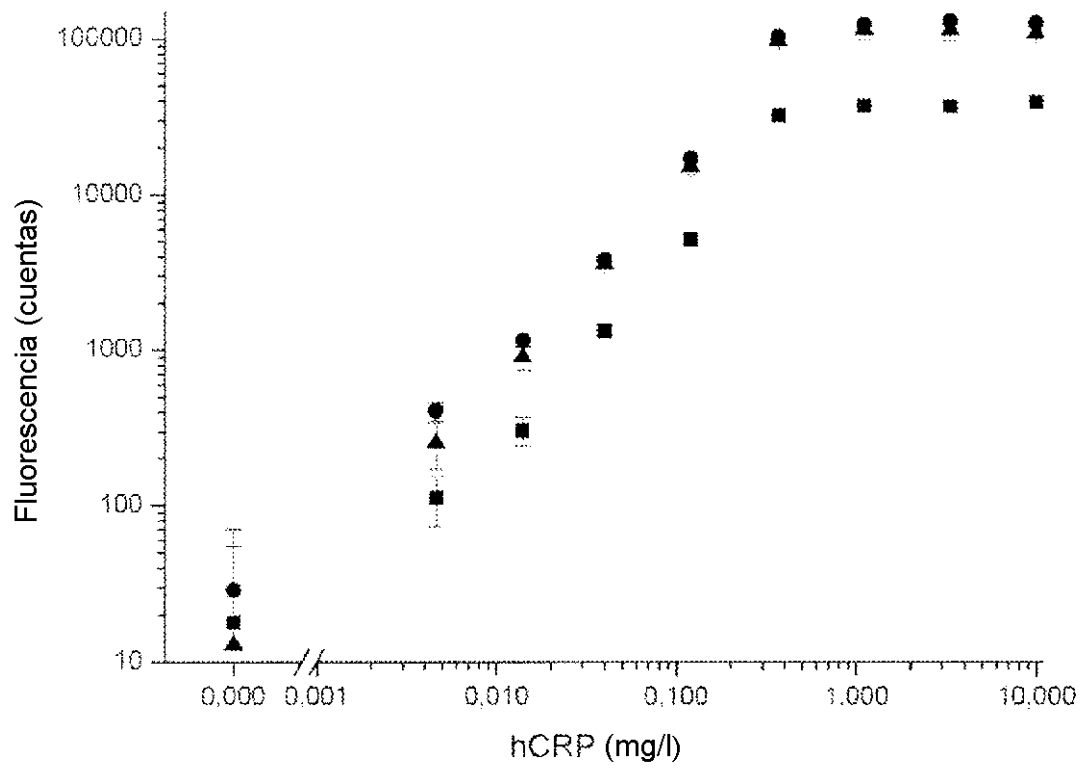
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**