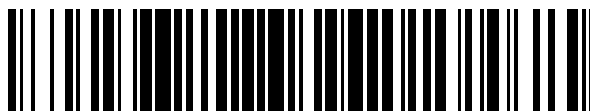


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 449**

51 Int. Cl.:
C07D 213/22 (2006.01) **C07D 213/81** (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01) **C07D 213/34** (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) **C07F 15/00** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/58** (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07F 9/58 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
C07D 213/30 (2006.01)
C07D 213/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02749629 .8**
96 Fecha de presentación: **21.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1409459**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Marcadores de ECL que tienen propiedades de enlace no específico mejoradas, métodos de uso y kits que los contienen**

30 Prioridad:
29.06.2001 US 896974

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
BIOVERIS CORPORATION (100.0%)
16020 Industrial Drive
Gaithersburg, Maryland 20877, US

72 Inventor/es:
SIGAL, GEORGE, B.;
TJIONG, HOWIE;
DONG, LIWEN;
MASOOD, ATHAR y
TITMAS, RICHARD, C.

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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).

ES 2 390 449 T3

DESCRIPCIÓN

Marcadores de ECL que tienen propiedades de enlace no específico mejoradas, métodos de uso y kits que los contienen

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Se hace referencia a las siguientes patentes publicadas: Patentes de EE.UU. núms. 5.310.687; 5.591.581; 5.597.910; 5.705.402; 5.846.485; 6.066.448; 6.214.552 y 6.207.369.

Campo de invención

- 10 La presente invención se refiere a marcadores, preferiblemente marcadores que contienen metal para usar en ensayos. En particular, la invención se refiere a marcadores metálicos que tienen ligandos sustituidos con grupos hidrófilos y/o cargados que evitan el enlace no específico ("NSB") de sustancias marcadas a otros materiales. La invención se refiere además a métodos para llevar a cabo ensayos, preferiblemente ensayos de luminiscencia, que usan estos marcadores y a kits y composiciones que contienen estos marcadores.

Antecedentes de la invención

Los documentos citados en esta solicitud se refieren al estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 15 La detección de electroquimioluminiscencia (ECL) ha llegado a ser una importante técnica analítica y se ha aplicado en procedimientos de análisis general y diagnóstico. La electroquimioluminiscencia implica especies electrogeneradas y la emisión de luz. Por ejemplo, la electroquimioluminiscencia puede implicar luminiscencia generada mediante un procedimiento en que se generan uno o más reactivos de forma electroquímica y experimentan una o más reacciones químicas para producir especies que emiten luz, preferiblemente de forma repetida.

- 20 En la práctica, la mayoría de ensayos basados en ECL implican el uso de compuestos electroquimioluminiscentes como marcadores. La presencia de una sustancia marcada o la participación de una sustancia marcada en una reacción de enlace se determina por medio de la detección de electroquimioluminiscencia a partir del marcador de ECL. Los ensayos para los analitos basados en el uso de reactivos de enlace marcados específicos para un analito de interés pueden ser homogéneos en la naturaleza (véase la Patente de EE.UU. núm. 5.591.581 y la Solicitud PCT Publicada WO87/06706) o pueden implicar reacciones de enlace que se dan en una fase sólida tal como una partícula magnética (véase la Patente de EE.UU. núm. 5.705.402) o una superficie de electrodo (véanse las Patentes de EE.UU. núms. 6.066.448 y 6.207.369 y la Solicitud PCT Publicada WO98/12539).

- 30 Una clase importante de marcadores de ECL es la de complejos organometálicos de rutenio, osmio o renio que tienen uno o más ligandos que contienen nitrógeno, heterocíclicos, polidentados (por ejemplo, bipyridina, fenantrolina, bipyrazina, bipyrimidina, etc., o derivados sustituidos de los mismos), tales como los descritos en las Patentes de EE.UU. núms. 5.310.687; 5.597.910 y 5.591.581 y la Solicitud PCT Publicada WO87/06706. Estos tipos de marcadores (en particular, marcadores basados en complejos de tris-bipiridil-rutenio) han encontrado un uso considerable por su estabilidad y la eficacia a la que producen ECL.

- 35 En instrumentación de ECL comercial, la ECL desde estos marcadores se produce típicamente por oxidación de los marcadores en presencia de un co-reactivo de ECL, tal como tripropilamina. El co-reactivo de ECL se oxida también en el electrodo para producir un reductor fuerte (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 5.846.485). La reacción altamente energética del reductor y el marcador oxidado lleva a la reducción y excitación del marcador a un estado excitado luminiscente. La emisión de un fotón regenera el marcador en su estado original y permite la detección del marcador.

- 40 La electroquimioluminiscencia es una técnica de detección extremadamente sensible. La sensibilidad de la técnica de detección no es a menudo, sin embargo, el factor determinante para la sensibilidad de un ensayo particular. En los ensayos que implican la interacción de enlace específico entre un reactivo de enlace marcado y un compañero de enlace (por ejemplo, un analito), la sensibilidad está a menudo limitada por la señal de fondo resultante a partir del enlace no específico (NSB) del reactivo de enlace marcado con sustancias distintas del compañero de enlace, por ejemplo, otros componentes de muestras en bruto, otros reactivos de ensayo, o en el caso de ensayos de enlace en fase sólida, la fase sólida en sí misma. En algunos casos, el NSB puede llevar además a una disminución de señales a través de la pérdida de reactivo en las superficies de envases, pipetas, etc. Mientras los marcadores de ECL tienen generalmente mejores propiedades de NSB que otras clases de marcadores, bajo ciertas condiciones, el NSB puede ser un factor limitante en la sensibilidad del ensayo. Esto se da, por ejemplo, en i) ensayos de ECL que usan reactivos de enlace marcados, donde el reactivo de enlace en sí mismo muestra altos niveles de NSB; ii) ensayos de ECL que usan reactivos de enlace marcados con números grandes de marcadores y iii) ensayos de ECL llevados a cabo usando bajas concentraciones de bloqueantes de NSB (tales como proteínas de bloqueo o detergentes) o llevados a cabo en ausencia de dichos bloqueantes.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a bipyridinas y fenantrolinas sustituidas que tienen al menos uno y preferiblemente dos sustituyentes, comprendiendo los sustituyentes grupos cargados de forma negativa, preferiblemente grupos sulfato o sulfonato. Estas bipyridinas y fenantrolinas sustituidas, cuando están presentes como un ligando en un complejo metálico, reducen el NSB del complejo respecto a bipyridinas o fenantrolinas no sustituidas análogas. Además, la presente invención se refiere a complejos organometálicos que comprenden dichos ligandos y reactivos de ensayo marcados que comprenden dichos complejos organometálicos.

La presente invención se refiere además a complejos metálicos luminiscentes que tienen la estructura



en donde

M es Os o Ru;

L^1 es L^2 como se describe debajo o un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituida que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a i) un material biológico y/o un reactivo de ensayo útil en un ensayo o ii) un resto que puede participar en una reacción con un material biológico y/o un reactivo de ensayo útil en un ensayo para así formar dicha unión covalente; y

L^2 es un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituida que comprende un grupo cargado de forma negativa, preferiblemente un grupo sulfato o sulfonato, actuando dicho grupo para reducir el NSB del complejo respecto al complejo análogo en que L^2 es bipyridina o fenantrolina no sustituida. De forma alternativa, L^2 es un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituida que comprende un grupo hidrófilo neutro, preferiblemente un grupo hidroxilo o una carboxamida, o un grupo cargado de forma positiva, preferiblemente, un grupo guanidinio.

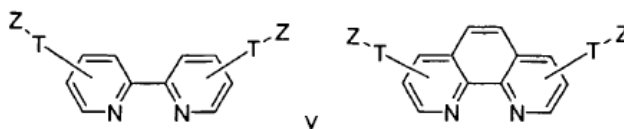
La presente invención se refiere además a complejos metálicos luminiscentes que tienen la estructura



en donde

M es Os o Ru;

L^2 es un ligando metálico seleccionado a partir del grupo que consiste en:

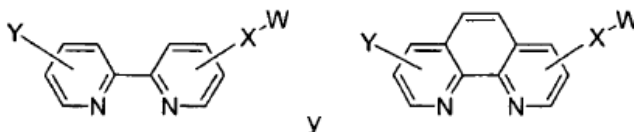


en donde,

T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3^{2-}$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y R es alquilo; y

L^1 es un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituida que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a i) un material biológico y/o un reactivo de enlace útil en un ensayo o ii) un resto que puede participar en una reacción con un material biológico y/o un reactivo de enlace útil en un ensayo para así formar dicha unión covalente; y L^1 se selecciona, preferiblemente, a partir del grupo que consiste en



en donde,

X es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo y

W es un grupo funcional que está unido a una molécula biológica, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo, o W es un grupo funcional que cuando está presente en el ligando es adecuado para conjugar el ligando a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo.

- 5 La presente invención se refiere además a materiales marcados que tienen uno o más complejos metálicos de la invención, preferiblemente complejos metálicos luminiscentes, unidos a un material. En una realización, la invención se refiere a materiales marcados que tienen la estructura $[A]_i[B]_j$, en donde A es un complejo metálico luminiscente de la invención, B es una sustancia (preferiblemente un material biológico y/o un reactivo de ensayo útil en un ensayo) unido de forma covalente a uno o más A, i es un número entero mayor que cero y j es un número entero mayor que cero (preferiblemente, uno). Preferiblemente, A es un complejo metálico con la estructura $ML^1L^2_2$ como se describe anteriormente y A y B están unidos de forma covalente por medio de un grupo funcional en L^1 .

- 10 La presente invención se refiere además al uso de complejos metálicos luminiscentes de la invención para la generación de luminiscencia. Los complejos pueden usarse en ensayos basados en luminiscencia tal como ensayos basados en la medida de la intensidad de fotoluminiscencia, fotoluminiscencia resuelta en el tiempo, transferencia de energía de luminiscencia, apagado de luminiscencia, tiempo de vida de luminiscencia, polarización de luminiscencia, quimioluminiscencia o, preferiblemente, electroquimioluminiscencia. La invención incluye además el uso de complejos de la invención en ensayos no luminiscentes tales como ensayos electroquímicos (es decir, ensayos que implican la medida de corriente o voltaje asociada con la oxidación o reducción de los complejos) que incluyen ensayos electroquímicos que usan el complejo metálico como un marcador redox y ensayos electroquímicos que usan el complejo metálico como un mediador redox para medir la reducción u oxidación de un analito (por ejemplo, ADN). Preferiblemente, el uso de los complejos metálicos de la invención lleva a la realización del ensayo mejorada a través de enlace no específico bajo del complejo respecto a complejos análogos que no presentan grupos funcionales con bajo NSB.

- 15 La presente invención se refiere además a métodos de medida de materiales marcados de la invención que comprenden las etapas de i) poner en contacto los materiales marcados con un reactivo de enlace y, opcionalmente, un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el reactivo de enlace, los materiales marcados, y, opcionalmente, el soporte en fase sólida, iii) inducir a los materiales marcados a producir una señal, preferiblemente, luminiscencia, más preferiblemente ECL y iv) medir la señal para así medir el complejo metálico luminiscente. Preferiblemente, el uso de los complejos metálicos de la invención lleva a la realización mejorada del ensayo a través de enlaces no específicos bajos del complejo metálico respecto a complejos metálicos análogos que no presentan grupos funcionales de bajo NSB.

- 20 La presente invención se refiere además a métodos de medida de un analito en una muestra que comprende las etapas de i) poner en contacto la muestra con un reactivo de enlace marcado y opcionalmente un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el reactivo de enlace, el analito y, opcionalmente, el soporte en fase sólida; iii) inducir a los marcadores en el reactivo de enlace marcado a producir una señal, preferiblemente, luminiscencia, más preferiblemente ECL y iv) medir la señal para así medir el analito en la muestra; en donde el reactivo de enlace marcado comprende uno o más de los marcadores de bajo NSB a los descritos anteriormente unidos de forma covalente a un reactivo de enlace específico para el analito. Preferiblemente, el uso de los marcadores de la invención lleva a la realización mejorada del ensayo a través de enlace no específico bajo de los marcadores respecto a los marcadores análogos que no presentan grupos funcionales de bajo NSB.

- 25 La presente invención se refiere además a métodos para medir un analito en una muestra que comprenden las etapas de i) poner en contacto la muestra con un análogo marcado del analito, un reactivo de enlace y, opcionalmente, un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el análogo marcado del analito, el reactivo de enlace y, opcionalmente, el soporte en fase sólida; iii) inducir a los marcadores en el análogo marcado del analito a producir una señal, preferiblemente, luminiscencia, más preferiblemente ECL y iv) medir la señal para así medir el analito en la muestra; en donde el análogo marcado del analito comprende uno o más de los marcadores de bajo NSB descritos anteriormente unidos de forma covalente a un análogo del analito, y en donde dicho análogo del analito compite con el analito para unirse al reactivo de enlace. Preferiblemente, el uso de los marcadores de la invención lleva a la realización mejorada del ensayo a través de enlace no específico bajo del complejo respecto a marcadores análogos que no presentan grupos funcionales de bajo NSB.

- 30 La presente invención se refiere además a métodos de medida de un analito o una actividad química o biológica en una muestra que comprenden las etapas de i) poner en contacto una muestra que contiene el analito o la actividad química o biológica (o una muestra que contiene sustratos o productos de la actividad) con un complejo metálico de bajo NSB de la invención; ii) inducir al complejo metálico a producir una señal, preferiblemente luminiscencia, más preferiblemente electroquimioluminiscencia y iii) medir la señal para así detectar o medir la actividad química o biológica.

La presente invención se refiere además a métodos para mejorar ensayos existentes que emplean complejos metálicos sustituyendo los complejos metálicos o ligandos en los complejos metálicos con los marcadores de NSB bajo o ligandos de la invención.

La invención se refiere además a kits y composiciones que contienen los ligandos de NSB bajo y complejos metálicos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra los resultados de una comparación de inmunoensayos tipo sándwich basados en ECL en electrodos de compuesto de carbono que usan anticuerpos marcados con complejos **20**, **8** y **10**. La figura muestra las señales no específicas y específicas como una función del número de marcadores por anticuerpo.

La Figura 2 muestra los resultados de una comparación de inmunoensayos tipo sándwich basados en ECL en electrodos de compuesto de carbono que usan anticuerpos marcados con complejos **20**, **2**, **15**, **12**, **17** y **15**. La figura muestra las señales no específicas y específicas como una función del número de marcadores por anticuerpo.

10 La Figura 3 muestra los resultados de una comparación de inmunoensayos tipo sándwich basados en ECL llevados a cabo en partículas magnéticas que usan anticuerpos marcados con complejos **20** y **2**. La figura muestra las señales no específicas y específicas como una función del número de marcadores por anticuerpo.

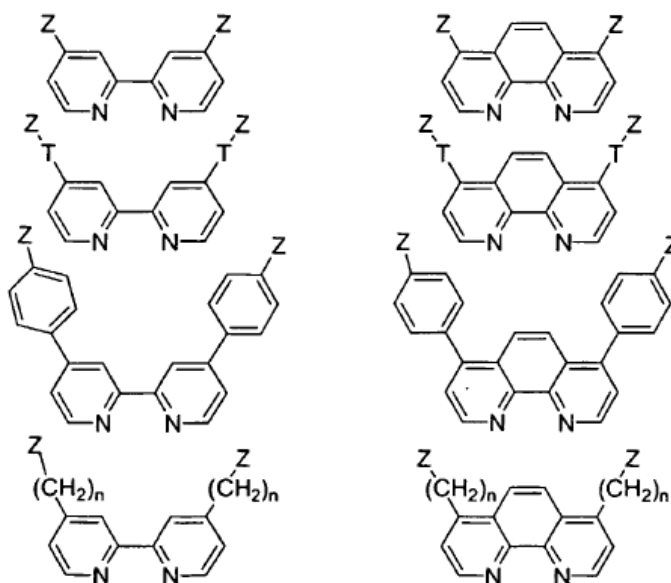
Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a marcadores mejorados para usar en ensayos para la medida de un analito de interés. La palabra "medida" y las formas verbales de "medir" como se usan en este documento se refieren a determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. Se entiende que "medida" incluye la comparación de una cantidad respecto a uno o más valores umbral o patrones, además de determinaciones llevadas a cabo para detectar la presencia de alguna y/o la incidencia de un suceso (por ejemplo, la presencia de un analito o marcador en una disolución o la emisión de luminiscencia). Una realización preferida de la invención se refiere a complejos organometálicos luminiscentes útiles como marcadores en ensayos de ECL. Los complejos comprenden uno o más
20 ligandos metálicos de fenantrolina o bipyridina sustituida, teniendo al menos uno de los ligandos metálicos sustituyentes que evitan el enlace no específico del ligando (dichos ligandos se denominan en adelante como ligandos de bajo NSB). Los sustituyentes de bajo NSB preferidos comprenden grupos cargados de forma negativa. Los grupos cargados de forma negativa se entiende que incluyen grupos cargados de forma positiva o neutra que
25 pueden desprotonarse en agua a un estado cargado de forma negativa (es decir, que tienen pK_as entre 0 y 14). Grupos cargados de forma negativa adecuados incluyen carboxilatos, fosfatos, fosfonatos, sulfatos y sulfonatos (además de sus formas protonadas). Preferiblemente, el grupo cargado de forma negativa no reaccionará bajo las condiciones usadas para combinar aminas y ácidos carboxílicos mediante enlaces amida. Grupos cargados de forma negativa preferidos incluyen sulfatos y, lo más preferiblemente, grupos sulfonato debido a su alta estabilidad,
30 bajo pK_a, y relativa insensibilidad a las condiciones y reactivos usados para combinar aminas y ácidos carboxílicos para formar enlaces amida (por ejemplo, un sulfonato en un ligando de un complejo metálico no interferirá con el uso de una carbodiimida para combinar un ácido carboxílico en otro ligando con un reactivo que contiene amina. Los fosfatos y fosfonatos son también útiles, aunque reaccionarán con algunos reactivos activadores de ácido carboxílico tales como carbodiimidas; cuando estas reacciones se dan bajo condiciones acuosas, los productos de estas
35 reacciones son a menudo inestables y no afectan al resultado final de una reacción de conjugación. En una realización alternativa de la invención, los ligandos de bipyridina o fenantrolina se sustituyen con sustituyentes que comprenden grupos hidrófilos neutros, preferiblemente grupos hidroxilo o carboxamidas, o grupos cargados de forma positiva, preferiblemente, grupos guanidinio (dichos ligandos son además los elegidos más preferiblemente ya que son insensibles a las condiciones estándar usadas para hacer enlaces amida).

40 Los ligandos se diseñan de manera que los complejos organometálicos que comprenden los ligandos darán, respecto a los complejos organometálicos análogos que comprenden bipyridinas o fenantrolinas no sustituidas, menor enlace no específico mientras, preferiblemente, dan además señales de ECL comparables (con un factor de 2) o mejores en una base por marcador. Los grupos cargados de forma negativa, preferiblemente, no están unidos directamente a los anillos de fenantrolina o bipyridina aunque están unidos a través de uniones tales como uniones
45 alquilo, alqueno, alquino y/o fenilo para así no tener efecto perjudicial en las propiedades de ECL de los complejos organometálicos que comprenden el ligando (por ejemplo, afectando las propiedades redox, rendimientos cuánticos de luminiscencia, energía de los estados excitados o estabilidad del marcador). Dichas uniones pueden incluir heteroátomos en la cadena de unión o como sustituyentes, aunque estos heteroátomos, preferiblemente, no están unidos directamente a los anillos de bipyridina o fenantrolina (por ejemplo, carbonos en una cadena de unión alquilo
50 puede sustituirse con oxígenos para formar una o más uniones alquileter o uniones oligo-etilenglicol). Uniones preferidas son grupos fenilo y alquilo. Se prefieren especialmente grupos alquilo cortos (uno a cinco carbonos) debido a su relativamente menor influencia en la ECL y su relativa incapacidad para abrir o desnaturalizar proteínas cuando se incorporan en marcadores organometálicos unidos a la proteína. Son las más preferidas las uniones de carbono único ya que apantallan los restos bipyridina o fenantrolina del grupo funcional de bajo NSB mientras que no proporcionan área superficial hidrófoba adicional o aumentan sustancialmente el volumen efectivo del marcador.
55

Los ligandos están preferiblemente disustituidos en las posiciones 5 y 5' o, lo más preferiblemente, las posiciones 4 y 4' por ligandos bipyridilo o las 3 y 8 o, más preferiblemente, las posiciones 4 y 7 para ligandos fenantrolilo; en complejos metálicos, estas posiciones tienen alta accesibilidad de disolvente y muestran impedimento estérico limitado. Se muestran debajo ligandos de bajo NSB ejemplares para bipyridinas sustituidas en las posiciones 4 y 4' y

fenantrolinas sustituidas en las posiciones 4 y 7. No se muestran otros patrones de sustitución pero pueden definirse por analogía.



donde

- 5 T = un grupo de unión, preferiblemente, una unión alquilo, alqueno, alquino o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene opcionalmente uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo

Z = $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3^{2-}$, $-\text{PO}_3\text{H}^-$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $[\text{NHC}(\text{NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$

n = un número entero, preferiblemente, entre 1-5, lo más preferiblemente 1

- 10 R = alquilo, preferiblemente metilo.

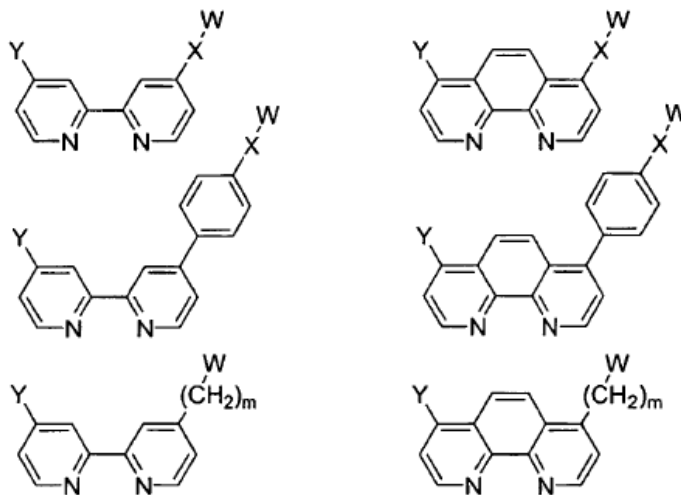
La presente invención se refiere a complejos organometálicos que comprenden uno de los ligandos de bajo NSB mencionados anteriormente quelados a un átomo metálico, por ejemplo, Co, Ni, Cu, Ru, Rh, Pd, Ag, Re, Os, Ir, Pt, Fe, Tc, Cr, Mo y W. Una clase importante de dichos complejos es la de complejos activos por ECL luminiscentes de Ru y Os, preferiblemente en los estados de oxidación Ru(II) o Os(II). La invención incluye complejos con la fórmula ML_2^3 , donde L^2 es un ligando de bajo NSB de la invención M es Ru o Os, preferiblemente en los estados de oxidación Ru(II) o Os(II). Se entiende que las notaciones como ML_2^3 o ML^1L_2^2 , como se usan en este documento, no excluyen a los complejos de tener una carga neta total (como se determina por el estado de carga de los ligandos y el estado de oxidación del metal), y que los complejos pueden asociarse con contraiones para así formar una composición con una carga neutra total. La clase de complejos ML_2^3 es especialmente útil en aplicaciones que usen compuestos activos por ECL no conjugados, libres, (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. núm. 5.641.623) y reducirían la adsorción de complejo en la mayoría de superficies del electrodo.

En aplicaciones que usan complejos activos por ECL como marcadores, una clase particularmente útil de complejos tienen la fórmula ML^1L_2^2 , donde M es Ru o Os (preferiblemente en los estados de oxidación Ru(II) o Os(II)), L^2 es un ligando de bajo NSB como se describe anteriormente, y L^1 es una bipyridina o fenantrolina sustituida que está unida de forma covalente a una molécula biológica, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo (es decir, para formar un reactivo marcado, donde "marcador" se refiere al componente de complejo metálico del reactivo marcado) o, de forma alternativa, tiene un sustituyente que es capaz de conjugarse de forma covalente a una molécula biológica, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para así formar un reactivo marcado. Dichos ligandos pueden denominarse en este documento como ligandos de unión.

Los materiales biológicos se refieren en este documento a materiales de origen biológico o análogos sintéticos de los mismos, por ejemplo, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos (y peptidomiméticos), ácidos nucleicos (además de análogos que tienen bases modificadas o uniones no naturales, por ejemplo, PNAs), hormonas, vitaminas, azúcares, mensajeros secundarios, polisacáridos, esteroides, lípidos, fosfolípidos, células, orgánulos, fragmentos subcelulares, virus, priones, etc. Los reactivos de enlace son reactivos capaces de participar en una interacción de enlace específico con otro material. Ejemplos de reactivos de enlace incluyen: enzimas, anticuerpos (y fragmentos de los mismos), receptores, ligandos de receptores biológicos, ligandos metálicos, ácidos

nucleicos, intercaladores de ácidos nucleicos, aglutinantes de los surcos mayor y menor del ácido nucleico, haptenos, avidina, estreptavidina, biotina, etiquetas de purificación (tales como FLAG, myc, glutatión S-transferasa, His-tag, etc.), compañeros de enlace de etiquetas de purificación (tales como anticuerpos específicos, glutatión, ácido nitrilotriacético, ácido iminodiacético, etc.), etc. Los sustratos enzimáticos incluyen moléculas que se transforman en reacciones catalizadas por enzimas e incluyen cofactores, ácidos nucleicos que se unen o rompen por enzimas, y péptidos que se unen o rompen por enzimas.

Ejemplos de grupos funcionales que cuando están presentes en el ligando son adecuados para conjugar el ligando a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo, incluyen grupos funcionales conocidos en la técnica de la química de conjugación tales como: aminas, tioles, hidrazidas, ácidos carboxílicos, ácidos carboxílicos activados (por ejemplo, cloruros de acilo y ésteres activos tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida), hidroxilos, haluros de alquilo, isocianatos, isotiocianatos, cloruros de sulfonilo, fosfatos, fosfonatos o fosforamidas activados, alquenos, alquinos, carbamatos y carbonatos activos, aldehídos, cetonas, maleimidas, disulfuros, carbonilos α,β -insaturados, carbono unido a grupos salientes tales como haluros, mesilo, tosilato, tresilo, etc. Para información adicional sobre grupos funcionales útiles para conjugar marcadores a reactivos y técnicas útiles de conjugación, el lector se dirige a G. Hermanson, A. Mallia y P. Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques* (Academic Press, San Diego, 1992) y G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, San Diego, 1996). Los grupos funcionales preferidos incluyen aminas, ácidos carboxílicos, ésteres activos y, lo más preferiblemente, ésteres de N-hidroxisuccinimida. Preferiblemente, dichos grupos funcionales están unidos a un anillo de bipyridina o fenantrolina por medio de una cadena de unión que comprende grupos alquilo, alqueno, alquino y/o fenilo para así limitar el efecto del grupo funcional en la ECL. Dichas uniones pueden incluir heteroátomos en la cadena de unión o como sustituyentes, aunque estos heteroátomos están, preferiblemente, no enlazados directamente a los anillos de bipyridina o fenantrolina (por ejemplo, los carbonos en una cadena de unión alquilo pueden sustituirse con oxígenos para formar alquiléteres o uniones de oligo(etilenglicol)). Los ligandos se sustituyen preferiblemente en las posiciones 5 y/o 5' o lo más preferiblemente, en las posiciones 4 y/o 4' para ligandos bipyridilo o preferiblemente sustituidos en la 3 y/o 8 o lo más preferiblemente, en las posiciones 4 y/o 7 para ligandos fenantrolina; en complejos metálicos, estas posiciones muestran impedimento estérico limitado. Ejemplos de ligandos de unión adecuados se muestran debajo. Los ligandos se muestran como estando sustituidos en las posiciones 4 y 4' para bipyridina o las posiciones 4 y 7 para fenantrolina, sin embargo, las estructuras de ligandos con otros patrones de sustitución están claros por analogía.



donde

X = un grupo de unión, preferiblemente, una unión alquilo, alqueno, alquino o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene opcionalmente un carbono de la cadena sustituido con un heteroátomo

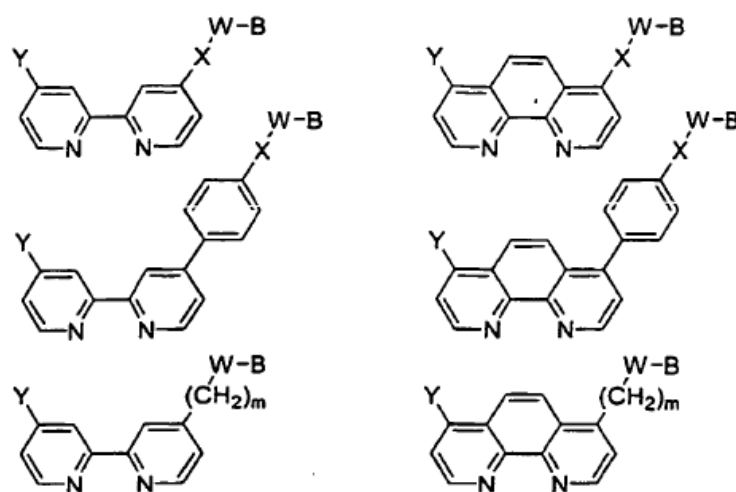
Y = H o alquilo, preferiblemente, $-CH_3$

W = un grupo funcional que está unido a una molécula biológica, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo, o un grupo funcional que cuando está presente en el ligando es adecuado para conjugar el ligando a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo

m = un número entero, preferiblemente, entre 1-5.

En algunas realizaciones de la invención, los marcadores de la invención están unidos de forma covalente a otra sustancia (por ejemplo, un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo) y se usan como marcadores para permitir la medida de la sustancia. Una realización preferida se refiere a materiales

marcados que tienen la estructura $[A]_i[B]_j$, en donde A es un complejo metálico luminiscente de la invención, B es una sustancia (preferiblemente, un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo) unido de forma covalente a uno o más A, i es un número entero mayor que cero y j es un número entero mayor que cero (preferiblemente, uno). La unión covalente puede proporcionarse mediante una variedad de uniones covalentes conocidas en la técnica de la química de conjugación, por ejemplo, enlaces amida, uniones amina, éteres, tioéteres, carbamatos, ureas, tioureas, Bases de Schiff, enlaces carbono-carbono, ésteres, ésteres de fosfato, sulfonamidas, etc. Lo más preferiblemente, A es un complejo metálico con la estructura ML^1L^2 , en donde M es Ru o Os (preferiblemente en los estados de oxidación Ru(II) o Os(II)), L^2 es un ligando de bajo NSB de la invención como se describe anteriormente, y A y B están unidos de forma covalente por medio de un grupo funcional en un ligando de unión L^1 como se describe anteriormente. Otra realización de la invención se refiere a una sustancia marcada con la estructura $ML^1L^2_2$, en donde M es Ru o Os (preferiblemente en los estados de oxidación Ru(II) o Os(II)), L^2 es un ligando de bajo NSB de la invención y L^1 es un ligando de unión que está unido a otra sustancia (preferiblemente, un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo). Ejemplos de L^1 adecuados según este aspecto de la invención, se muestran debajo. Los ligandos se muestran como estando sustituidos en las posiciones 4 y 4' para bipiridina o las posiciones 4 y 7 para fenantrolina, sin embargo, las estructuras de ligandos con otros patrones de sustitución están claras por analogía.



donde

X = un grupo de unión, preferiblemente, una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, habiendo sustituido opcionalmente un carbono de la cadena por un heteroátomo

Y = H o alquilo, preferiblemente, -CH₃

B = una sustancia, preferiblemente, una molécula biológica, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo

W = un grupo funcional que está unido a B

m = un número entero, preferiblemente, entre 1-5.

Los marcadores y materiales marcados de la invención son útiles en una amplia variedad de formatos de ensayo conocidos que emplean complejos metálicos, preferiblemente, complejos metálicos luminiscentes, por ejemplo, ensayos basados en la medida de intensidad de fotoluminiscencia, fotoluminiscencia resuelta en el tiempo, transferencia de energía de luminiscencia, apagado de luminiscencia, tiempo de vida de luminiscencia, polarización de luminiscencia, quimioluminiscencia o, preferiblemente, electroquimioluminiscencia. Para ejemplos de métodos para llevar a cabo ensayos de ECL, el lector se dirige hacia las Patentes de EE.UU. núms. 5.591.581; 5.641.623; 5.643.713; 5.705.402; 6.066.448; 6.165.708; 6.207.369 y 6.214.552 y las Solicitudes PCT Publicadas WO87/06706 y WO98/12539. Preferiblemente, el uso de los complejos metálicos luminiscentes de la invención lleva a la realización mejorada del ensayo a través de enlace no específico bajo del complejo respecto a los complejos análogos que no presentan grupos funcionales de bajo NSB. El uso de los complejos metálicos luminiscentes, preferiblemente, lleva a una mejora en un ensayo dado en la relación de señal específica a no específica de más que o igual a un factor de dos, o más preferiblemente, más que o igual a un factor de 5.

En algunas aplicaciones, los complejos metálicos luminiscentes de la invención se usan como marcadores para permitir la monitorización de reactivos de ensayo tales como sustratos enzimáticos o reactivos de enlace. Se ha

encontrado que los reactivos marcados con los complejos metálicos luminiscentes de la invención (especialmente complejos que presentan grupos cargados de forma negativa) muestran significativas disminuciones en el enlace no específico respecto a reactivos marcados con complejos análogos que no presentan grupos funcionales de bajo NSB. El uso de los complejos metálicos luminiscentes de la invención reduce significativamente la necesidad de reactivos de bloqueo para reducir el enlace no específico, reduce la pérdida de reactivos en las superficies de los envases y líneas fluidicas, y reduce las señales no específicas debido a las interacciones no específicas de reactivos de enlace marcados. Estos efectos son más pronunciados cuando los reactivos, por ejemplo, anticuerpos y otras proteínas, están unidos a múltiples marcadores. Se han preparado reactivos unidos a 4-7, 7-10, 10-15, 15-20 y más de 20 marcadores y se han observado solo cantidades menores de enlace no específico. Yendo a mayores números de marcadores por reactivo, las señales de ensayo pueden aumentarse (respecto a ensayos que usan complejos metálicos luminiscentes que no presentan grupos funcionales de bajo NSB) de 2-5 veces, 5-10 veces o más, mientras mantienen relaciones equivalentes o mejoradas significativamente de señales específicas a no específicas. De forma alternativa, bajo condiciones que dan señales específicas equivalentes, la relación de señal específica a no específica se mejora grandemente.

Muchos formatos de ensayo emplean soportes en fase sólida para así combinar la medida de un analito o actividad a la separación de reactivos marcados en partes soportadas en fase de disolución y fase sólida. Ejemplos incluyen ensayos de enlace en fase sólida que miden la formación de un complejo de un material y su compañero de enlace específico (estando uno del par inmovilizado, o capaz de inmovilizarse, en el soporte en fase sólida), la formación de complejos tipo sándwich (que incluyen un reactivo de captura que se inmoviliza, o capaz de inmovilizarse, en el soporte en fase sólida), la competición de dos competidores por un compañero de enlace (inmovilizándose el compañero de enlace o uno de los competidores, o capaz de inmovilizarse, en el soporte en fase sólida), la rotura enzimática o química de un marcador (o material marcado) desde un reactivo que está inmovilizado, o capaz de inmovilizarse en un soporte en fase sólida y la unión enzimática o química de un marcador (o material marcado) a un reactivo que está inmovilizado o capaz de inmovilizarse en un soporte en fase sólida. La cantidad de analito o actividad se determina midiendo la cantidad de marcador en el soporte en fase sólida y/o en disolución, llevándose a cabo las medidas típicamente por medio de una técnica selectiva de superficie, una técnica selectiva en disolución, o después de la separación de las dos fases. El término "capaz de inmovilizarse" se usa en este documento para referirse a reactivos que pueden participar en reacciones en disolución y capturarse posteriormente en una fase sólida durante o antes de la etapa de detección. Por ejemplo, el reactivo puede capturarse usando un compañero de enlace específico del reactivo que se inmoviliza en la fase sólida. De forma alternativa, el reactivo se une a un resto de captura y un compañero de enlace específico del resto de captura se inmoviliza en la fase sólida. Ejemplos de pares útiles de resto de captura-compañero de enlace incluyen biotina-estreptavidina (o avidina), anticuerpo-hapteno, receptor-ligando, ácido nucleico-ácido nucleico complementario, etc.

Es particularmente importante en los ensayos de enlace en fase sólida que los reactivos marcados no enlacen de forma no específica a la fase sólida porque ese enlace puede dar por resultado una señal no específica y reducir de forma significativa la sensibilidad de los ensayos. Se han ensayado reactivos marcados con marcadores de la invención en ensayos de ECL que usan partículas magnéticas como soportes en fase sólida y los ensayos de ECL que usan electrodos como soportes en fase sólida. En ambos casos, las comparaciones a ensayos que usan marcadores que no presentan grupos funcionales de bajo NSB mostraron que los ensayos que usan los marcadores de la invención podrían optimizarse para funcionar con reactivos marcados de forma más pesada (por ejemplo, 4-7, 7-10, 10-15, 15-20 y más que 20 marcadores por reactivo), para dar señales mayores (por ejemplo, mejoras de 2-5 veces, 5-10 veces o más) y para producir relaciones mayores de señales específicas a no específicas (por ejemplo, mejoras de 1-2 veces, 2-5 veces o más de 5 veces). Los marcadores de la invención han probado que son particularmente beneficiosos en evitar el enlace no específico de marcadores y reactivos marcados a electrodos que contienen carbono usados como soportes para ensayos de fase sólida y/o como electrodos para inducir la ECL. Dichos electrodos incluyen electrodos que comprenden fibrillas de carbono u otras partículas de carbono tales como electrodos de compuestos plásticos que comprenden fibrillas de carbono o partículas de carbono dispersas en una matriz polimérica. Se han observado también efectos beneficiosos en ensayos llevados a cabo en electrodos que comprenden una capa fina de tinta de carbono soportada en un soporte (como se describe en la solicitud anexa publicada mientras tanto como Patente de EE.UU. núm. 6.977.722, titulada "Assay Plates, Reader Systems and Methods for Luminiscence Test Measurements", presentada en la misma fecha).

Otro aspecto de la invención se refiere a kits para usar en ensayos conductores, preferiblemente ensayos de luminiscencia, más preferiblemente ensayos de electroquimioluminiscencia, que comprenden los ligandos y/o complejos metálicos de la invención y al menos un componente de ensayo seleccionado del grupo que consiste en: (a) al menos un co-reactivo de electroquimioluminiscencia; (b) uno o más reactivos de enlace; (c) uno o más tampones de pH; (d) uno o más reactivos de bloqueo; (e) uno o más conservantes; (f) uno o más agentes de estabilización; (g) una o más enzimas; (h) uno o más sustratos enzimáticos; (i) una o más partículas magnéticas; (j) uno o más electrodos adecuados para inducir la ECL y (k) uno o más detergentes. Preferiblemente, al menos uno de dichos componentes de ensayo está unido de forma covalente a un ligando o complejo metálico de la invención.

Preferiblemente, el equipo comprende los ligandos y/o complejos metálicos de la invención y al menos un componente(s) de ensayo en uno o más, preferiblemente dos o más, más preferiblemente tres o más envases.

Según una realización, el equipo comprende los ligandos y/o complejos metálicos de la invención y uno o más de los componentes de ensayo en uno o más envases en forma seca.

Según una realización, los ligandos y/o complejos metálicos de la invención y los componentes de ensayo están en envases separados.

- 5 Una realización preferida se refiere a un equipo para usar en la realización de ensayos de electroquimioluminiscencia que comprenden al menos un marcador según la invención y al menos un co-reactivo de electroquimioluminiscencia.

- 10 Según una realización preferida, el equipo comprende el marcador de la invención y comprende además al menos un biorreactivo seleccionado de: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, enzimas, sustratos enzimáticos, inhibidores, cofactores, antígenos, haptenos, lipoproteínas, liposacáridos, células, componentes sub-celulares, receptores celulares, virus, ácidos nucleicos, antígenos, lípidos, glicoproteínas, carbohidratos, péptidos, aminoácidos, hormonas, ligandos de enlace a proteínas, agentes farmacológicos o combinaciones de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones que comprenden el ligando metálico o complejo metálico de la invención unido a una sustancia de realización del ensayo.

- 15 Una realización de la invención se refiere a una composición para la detección de un analito de interés presente en una muestra, cuya composición comprende:

- (i) el complejo metálico de la invención que contiene un grupo funcional y
- (ii) una sustancia de realización del ensayo unida a dicho grupo funcional, siendo dicha sustancia de realización del ensayo capaz de unirse al analito de interés o estar unida al analito de interés.

- 20 Preferiblemente, la composición comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en

- (i) analito de interés añadido o análogo de dicho analito añadido;
- (ii) un compañero de enlace de dicho analito o un compañero de enlace de dicho análogo; y
- (iii) un componente reactivo capaz de unirse con (i) o (ii).

- 25 Aún otra realización de la invención se refiere a una composición para la detección de un analito de interés presente en una muestra, cuya composición comprende:

- (a) el complejo metálico de la invención y
- (b) una sustancia de realización del ensayo unida a dicho complejo, en donde dicha sustancia de realización del ensayo contiene al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en:

- 30
- (i) analito de interés añadido o análogo de dicho analito añadido;
 - (ii) un compañero de enlace de dicho analito o un compañero de enlace de un análogo de dicho analito; y
 - (iii) un componente reactivo capaz de unirse con (i) o (ii).

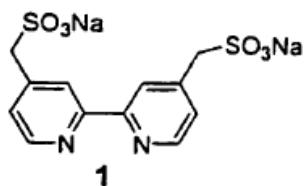
Una realización aún adicional de la invención se refiere a una composición de materia para usar como un reactivo en un ensayo que comprende el ligando metálico o complejo metálico de la invención unido a una sustancia de realización del ensayo y al menos otro componente seleccionado del grupo que consiste en:

- 35
- (a) electrolito;
 - (b) analito de interés o un análogo del analito de interés;
 - (c) un compañero de enlace del analito de interés o de su análogo;
 - (d) un componente reactivo capaz de reaccionar con (b) o (c); y
 - (e) un co-reactivo de ECL y
- 40

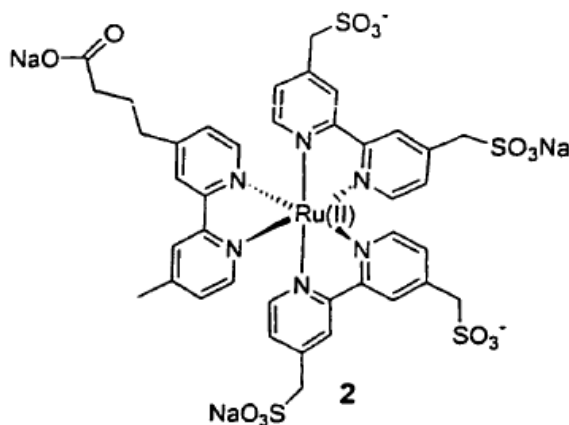
con la condición que, sin embargo, dos componentes contenidos en cualquier composición reactiva no sean reactivos el uno con el otro durante el almacenaje para así afectar su función en el ensayo previsto.

EJEMPLOSInstrumentación de ECL

Los ejemplos de ECL presentados en este documento se llevaron a cabo en una variedad de instrumentación de ECL. Algunos métodos usaron partículas magnéticas como soportes en fase sólida para ensayos de enlace como se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 5.935.779; 6.133.043 y 6.200.531. Dichas medidas de ECL implican la recogida de las partículas magnéticas en un electrodo de platino, aplicación de energía eléctrica al electrodo y medida de la luminiscencia emitida. Otros ejemplos emplearon electrodos compuestos que comprendían fibrillas de carbono dispersas en una matriz polimérica tanto para el soporte en fase sólida para ensayos de enlace como el electrodo para la inducción de ECL (como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 6.207.369 y la Solicitud PCT Publicada WO98/12539). Por las diferencias en los electrodos, instrumentación, detectores de luz, beneficios del detector, etc., las señales de ECL presentadas en los diferentes ejemplos no deberían compararse directamente.

Ejemplo 1. Síntesis del Ligando 1

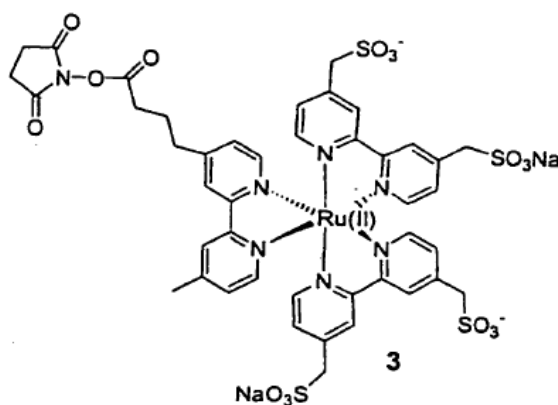
Se añadió sulfito sódico (1,3 g) a una suspensión que contenía 1,7 g de 4,4'-bis-bromometilbipiridina (Fraser et al., *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 9314-9317) en 250 mL de una mezcla 7:3 de agua/metanol. La mezcla se puso a reflujo durante 60 min, se enfrió, y después se concentró a ~50% de su volumen original por evaporación rotatoria. La disolución acuosa restante se lavó con 2 x 20 mL de acetato de etilo. La fase acuosa se concentró hasta sequedad por evaporación rotatoria. El material sólido restante se secó adicionalmente en alto vacío. El producto se extrajo a partir del material sólido en 3 x 100 mL partes de agua hirviendo al 1%/metanol (agitando el sólido en cada parte durante 5 min antes de recoger el sobrenadante por filtración). Los filtrados se combinaron y se concentraron por evaporación rotatoria para dar un producto sólido en bruto. El producto se purificó por recristalización a partir de agua/isopropanol y se lavó con 1:4 de agua/isopropanol, isopropanol y éter para dar un sólido blanco puro. Los rendimientos típicos son ~50% aunque pueden mejorarse recuperando producto del sobrenadante de recristalización.

Ejemplo 2. Síntesis del Complejo 2

La primera etapa de la síntesis implicó preparar el complejo del ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico con RuCl_3 mediante una modificación del procedimiento de Anderson et al. (*J. Chem. Research (S)* **1979**, 74-75). Se combinó hidrato de RuCl_3 (0,94 g) con 4 mL de HCl 1N y 8 mL de agua y se disolvió mediante mezcla vigorosa. Mientras se mezcla la disolución resultante, se añadieron 1,02 g del ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico (Solicitud PCT Publicada núm. WO87/06706). La mezcla se mezcló vigorosamente durante 36 horas, tiempo durante el que el complejo ligando- RuCl_3 precipitó a partir de la disolución. La suspensión del producto se enfrió y el producto se recogió por filtración, se lavó con HCl 1N, agua y éter, y se secó al vacío. Los rendimientos típicos fueron aproximadamente 60%.

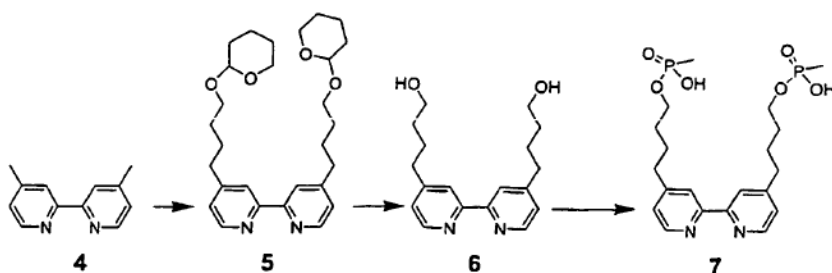
El complejo resultante (0,47 g) se combinó con 0,78 g del ligando **1** de bipyridina que contiene sulfonato en 75 mL de etilenglicol. La disolución se puso a reflujo y se monitorizó por adsorción visible a 455 nm para determinar cuando se completó la formación de producto (menos de 2,5 horas). El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria (usando una temperatura de baño <100°C) y el residuo se disolvió en 15 mL de NaOH 1N y se incubó en la oscuridad durante 2 horas para hidrolizar cualquier éster que pudiera haberse formado durante la formación del complejo. La disolución se diluyó a 750 mL con ácido fórmico 10 mM y se cargó en una columna de 100 mL de QAE-Sephadex A-25 (equilibrada previamente con NaCl 500 mM, ácido fórmico 10 mM y después se lavó con cantidades copiosas de ácido fórmico 10 mM). El producto se eluyó usando un gradiente de NaCl 0-250 mM en ácido fórmico 10 mM. La fracción de producto se concentró por evaporación rotatoria. La mayoría de la sal se eliminó extrayendo el producto sólido en 5 x 10 mL de metanol frío (con la adición de una pequeña cantidad de agua si es necesario), concentrando el extracto y repitiendo el procedimiento de extracción una vez más. El producto se purificó entonces en sílice en fase inversa usando 5:95:0,1 de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético como el eluyente. El producto purificado en fase inversa se disolvió en ~2 mL de agua y el pH se ajustó a 6-8 con NaOH 1N. La disolución resultante se aplicó a una columna de 100 mL de Sephadex G-15 y se eluyó con agua. La fracción de producto se liofilizó para dar el producto como un sólido naranja puro. Los rendimientos típicos fueron ~50%. Las tres etapas de cromatografía podrían sustituirse con una única purificación en QAE-Sephadex A-25 usando un gradiente de una sal volátil tal como acetato de amonio.

Ejemplo 3. Síntesis del Complejo **3**



Se activó el complejo **2** como el éster de NHS mediante el siguiente procedimiento. Se disolvió el complejo **2** (22 mg) en 1 mL de HCl 40 mM. Mientras se mezclaba, se añadieron 5,8 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) seguido por 39 mg de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). La reacción se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente después de lo cual se pasó inmediatamente a través de una columna de 30 mL de Sephadex G-15 (preequilibrada a 4°C en agua) y se eluyó con agua. La fracción de producto se congeló inmediatamente y se liofilizó para dar el producto como un sólido naranja puro.

Ejemplo 4. Síntesis del Ligando **7**



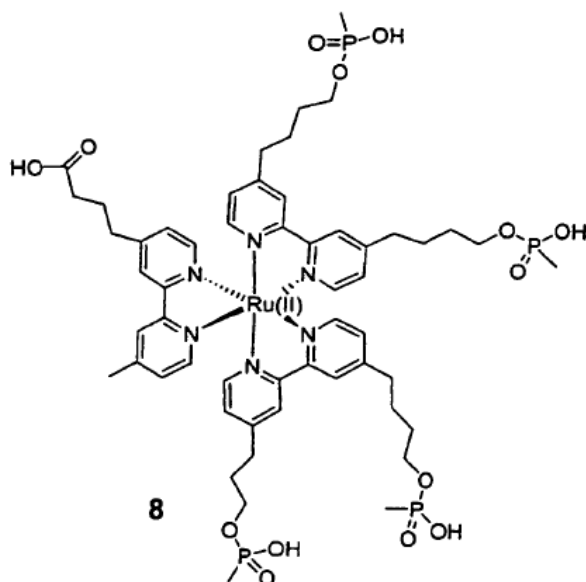
Se preparó el intermedio **5** a partir del compuesto **4** en dos etapas de alquilación separadas. Se preparó una disolución que contenía 1,38 g de 4,4-dimetil-2,2'-bipyridina en 60 mL de THF seco bajo atmósfera inerte y se enfrió a 0°C. Se añadieron 5,25 mL de diisopropilamina de litio (LDA, disolución 1,5 M en ciclohexano) en gotas con agitación y se incubó durante 30 min a 0°C. Se añadieron 1,4 mL de 2-(3-bromopropilo)tetrahidro-2H-pirano y se incubó 3 horas más a 0°C. La reacción se apagó con NH₄Cl saturado y se concentró a presión reducida para eliminar el THF. La disolución acuosa restante se extrajo con cloruro de metileno. Las fracciones orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se concentraron y se purificaron por cromatografía de sílice usando metanol al 4%/cloruro de metileno como el eluyente para dar el producto mono-alquilado en 95%. El producto mono-alquilado (1,925 g) se disolvió en THF seco y se hizo reaccionar con 4 mL de LDA y 1,05 mL de 2-(3-bromopropilo)tetrahidro-2H-pirano bajo las condiciones usadas para la primera alquilación. La reacción se preparó apagando con NH₄Cl saturada, ajustando el pH a ~8 con

carbonato de potasio, extrayendo el producto en cloruro de metileno, secando sobre MgSO_4 y purificando por cromatografía en alúmina básica (actividad I) usando acetato de etilo al 10%/hexano como eluyente. El rendimiento total del intermedio **5** dialilado a partir del material de partida **4** fue 73%.

El intermedio **5** se desprotegió para dar diol **6** bajo condiciones ácidas. El intermedio **5** (1,277 g) se disolvió en 17 mL de 1:1 HCl 1N/metanol. La disolución se incubó toda la noche a temperatura ambiente. El pH de la disolución se ajustó a ~9 con hidróxido de amonio concentrado y el producto se extrajo en cloruro de metileno, se secó sobre MgSO_4 , y se purificó por cromatografía sobre alúmina básica usando metanol al 3%/cloruro de metileno como eluyente. El diol **6** se recogió en rendimiento de 84%.

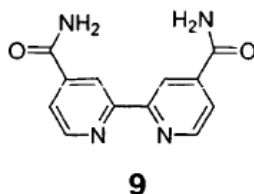
La preparación del éster de difosfonato **7** se alcanzó haciendo reaccionar el diol **6** con diclorofosfito de metilo. Se disolvió diol **6** (60 mg) en ~8 mL de piridina. La mayoría de la piridina se destiló dejando ~1 mL de disolución. La disolución restante se añadió en gotas con agitación a una disolución congelada (0°C) que contenía 106 mg de diclorofosfito de metilo en 0,5 mL de cloruro de metileno. La reacción se dejó proceder durante 45 min a 0°C. La reacción se apagó mediante la adición de 2 mL de carbonato de potasio 2M. La disolución se concentró a sequedad por evaporación rotatoria. Se añadió agua y se evaporó varias veces para eliminar toda la piridina. El producto se purificó por cromatografía de HPLC en una columna de fase inversa C18 usando un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%.

Ejemplo 5. Síntesis del Complejo **8**

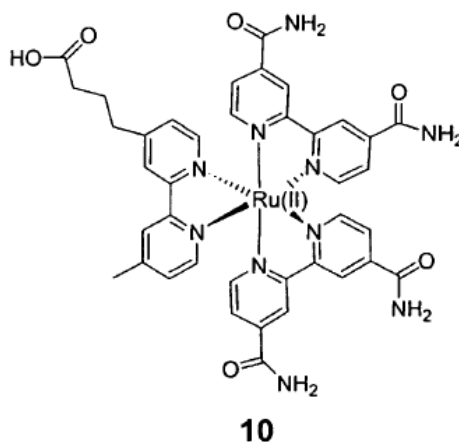


El complejo **8** se preparó a partir del ligando **7**, el ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico y RuCl_3 mediante un procedimiento análogo al usado para preparar el complejo **2** a partir del ligando **1**. La purificación se alcanzó por cromatografía en sílice en fase inversa usando acetonitrilo al 30%/agua + TFA al 0,1% como eluyente, cromatografía de intercambio de iones en QAE-Sephadex A25 usando un gradiente de acetato de trietilamonio, pH 5,5 como eluyente, y desalando en una columna de sílice en fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua + TFA al 0,1% como eluyente para dar la sal de TFA.

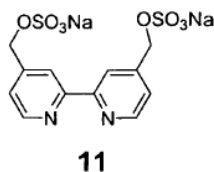
Ejemplo 6. Síntesis del Ligando **9**



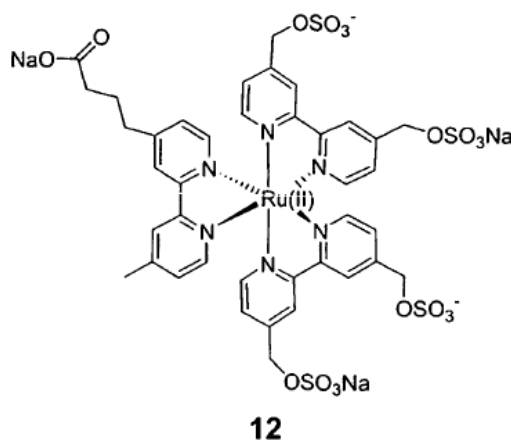
Una suspensión que contenía 1,02 g de 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridindimetiléster en 200 mL de metanol se calentó hasta ebullición para disolver todo el dimetiléster que sea posible. Después de permitir que la disolución se enfríe a temperatura ambiente, se burbujeó gas amoníaco en la disolución. La reacción se dejó proceder hasta que el TLC mostró la desaparición del material de partida. El producto insoluble **9** se recogió por filtración.

Ejemplo 7. Síntesis del Complejos 10

Se combinó ligando **9** (300 mg) con 162 mg de hidrato de RuCl_3 en DMF y se puso a reflujo toda la noche. El intermedio de RuL_2Cl_2 insoluble se recogió por filtración y se lavó con acetona y agua. Una parte del intermedio (49,8 mg) se combinó con 21,8 mg del ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico en ~100-150 mL de 1:1 metanol/agua y la mezcla se puso a reflujo toda la noche. La disolución resultante se decantó para eliminar impurezas insolubles y se concentró por evaporación rotatoria. La purificación se alcanzó por cromatografía de sílice usando metanol saturado con NaCl como el eluyente. Después de la eliminación del disolvente por evaporación rotatoria, el producto se disolvió en hexafluorofosfato de amonio concentrado. La disolución se aplicó a una columna de sílice C18. Se usó agua para lavar la sal en exceso. El producto **10** puro (como la sal de PF_6) se eluyó entonces usando acetonitrilo.

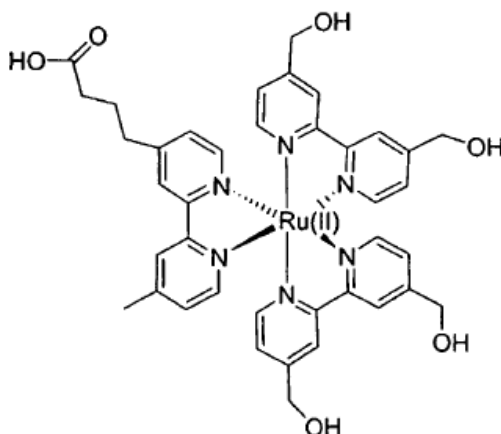
Ejemplo 8. Síntesis del Ligando 11

El ligando **11** se preparó mediante la reacción de 4,4'-bis-hidroximetil-2,2'-bipiridina (preparada por la reducción de borohidruro sódico de 4,4'-bis-carboxi-2,2-bipiridin-dimetil-éster en etanol en reflujo) con complejo de trióxido de azufre piridina ($\text{SO}_3 \text{ pyr}$). Se añadió $\text{SO}_3 \text{ pyr}$ (107 mg) a 35,3 mg de 4,4'-bis-hidroximetil-2,2'-bipiridina en 0,75 mL de DMF. Después de 1,5 horas, el producto se precipitó con cloroformo y se volvió a disolver en agua. La disolución acuosa se lavó con cloroformo, se neutralizó con disolución de NaOH y se liofilizó a un polvo. El producto se purificó por HPLC en fase inversa usando una columna C18 y un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1%.

Ejemplo 9. Síntesis del Complejo 12

Se combinó hidrato de RuCl_3 (11,7 mg) con 37,6 mg de ligando **11** en 75 mL de 4:1 metanol/agua. La mezcla se puso a reflujo durante 4 horas. Se añadió el ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico (10,3 mg) y la mezcla se puso a reflujo toda la noche. La disolución se filtró y el filtrado se concentró por evaporación rotatoria. El producto se purificó por cromatografía en fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua y cromatografía en gel de sílice usando metanol en acetonitrilo como eluyente.

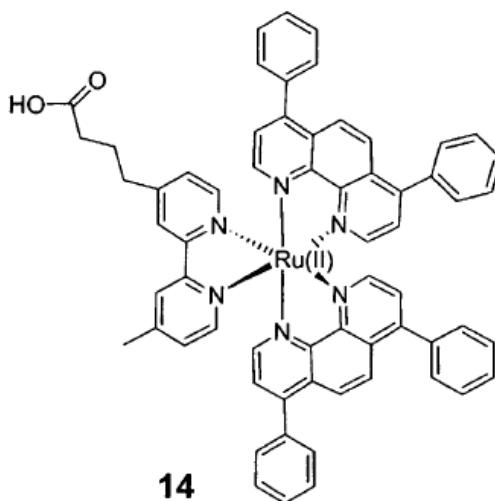
Ejemplo 10. Síntesis del Complejo **13**



13

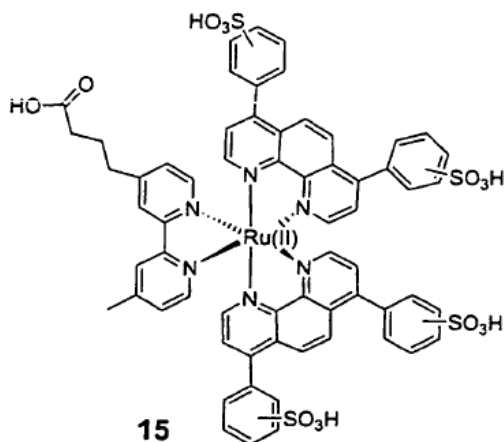
Se combinó el ligando 4,4'-bis-hidroximetil-2,2'-bipiridina (58,7 mg) con 58,1 mg del complejo del ligando ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridin-4'-il)-butírico con RuCl_3 (véase el Ejemplo 2) en 50 mL de 1:1 metanol/agua. La disolución se puso a reflujo toda la noche. La disolución se filtró entonces y se concentró al vacío. El producto se disolvió en acetonitrilo al 5%/agua, se cargó en una columna de sílice C18 y se eluyó con acetonitrilo al 66%/agua. El producto se disolvió de nuevo en acetonitrilo al 5%/agua que contenía hexafluorofosfato de amonio, se cargó en sílice C18 y se eluyó con acetonitrilo al 40%/agua para dar el complejo puro en rendimiento del 45%.

Ejemplo 11. Síntesis del Complejo **14**

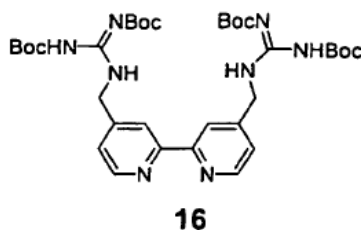


14

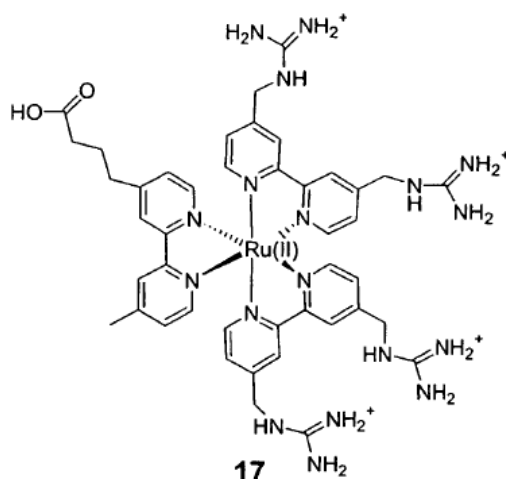
Se combinó hidrato de RuCl_3 con dos equivalentes de 4,7-difenilfenantrolina en DMF y se puso a reflujo toda la noche para dar el intermedio de dicloruro de bis-difenilfenantrolin-rutenio como un precipitado sólido negro. El precipitado se recogió por filtración, se secó y se combinó con un equivalente de ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridin-4'-il)-butírico en 1:1 dioxano/agua y se puso a reflujo toda la noche. El producto se purificó por HPLC en fase inversa en sílice C18 usando un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1%.

Ejemplo 12. Síntesis del Complejo **15**

Se preparó el complejo **15** a partir de ácido 4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico (sal sódica) y [ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico]RuCl₃ usando un procedimiento análogo al que se presentó anteriormente para la preparación del complejo **2**, excepto que la purificación se alcanzó por una única purificación en HPLC en fase inversa usando una columna de sílice C18 y un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1%.

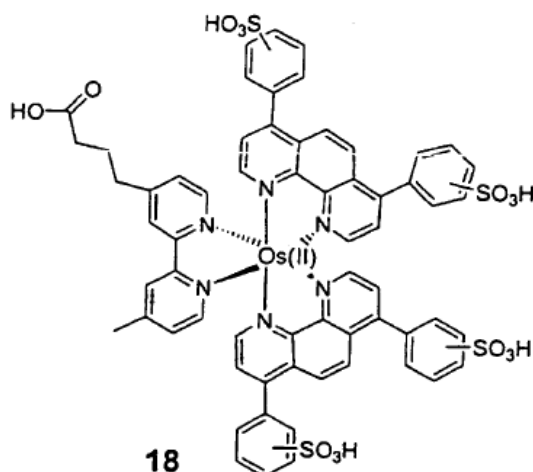
Ejemplo 13. Síntesis del Ligando **16**

Se combinó el ligando 4,4'-bis-hidroximetil-2,2'-bipiridina (108 mg) con 520 mg de *N,N'*-bis-butiloxycarbonil-guanidina y 393 mg de trifetilfosfina en 20 mL de 1:1 THF/tolueno y se enfrió a 0°C. Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (300 uL) durante el curso de 30 min. La mezcla se agitó durante 3 horas a 0°C y 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se apagó con 5 mL de agua y el disolvente se eliminó al vacío. La trituración con una mezcla 1:1 de metanol y acetonitrilo dio un sólido blanco. El producto se usó sin purificación adicional. La estructura del producto se muestra como teniendo la guanidina unida a la bipiridina por medio del nitrógeno no protegido; la unión puede haberse dado por medio de uno de los nitrógenos protegidos.

Ejemplo 14. Síntesis del Complejo **17**

Se desprotegió el ligando **16** (28,8 mg) en 0,8 mL de 1:1 TFA/CH₂Cl₂. El disolvente se eliminó a vacío reducido y el ligando desprotegido se usó sin purificación adicional. El ligando desprotegido se combinó con el complejo [ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico]Ru(II)(DMSO)₂Cl₂ (preparado mediante la reacción toda la noche de 4,8 mg de ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridina-4'-il)-butírico con 10,2 mg de Ru(DMSO)₄Cl₂ en 0,6 mL de metanol a temperatura ambiente) en 1,0 mL de etanol y la mezcla de reacción se puso a reflujo durante 4 horas. El producto se purificó por intercambio iónico en SP-Sephadex C25 usando un gradiente de TFA en agua y por cromatografía en fase inversa en sílice en fase inversa usando una mezcla de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% como el eluyente.

Ejemplo 15. Síntesis del Complejo **18**



Se preparó una mezcla combinando 1 g de (NH₄)₂OsCl₂ y ácido 4,7-difenil-1,10-fenatrolindisulfónico (sal sódica) en 40 mL de HCl 3N. La mezcla se calentó durante 2 horas a 80°C. La disolución se enfrió y se añadió carbonato de potasio acuoso hasta que el pH alcanzó ~9. La disolución se concentró al vacío hasta sequedad. Se añadió otro equivalente de ácido 4,7-difenil-1,10-fenatrolindisulfónico (sal sódica) en 20 mL de DMF. La disolución se puso a reflujo durante 8 horas. Después de enfriar, se añadieron 200 mg de ditionita sódica en una pequeña cantidad de agua. La disolución se concentró al vacío a ~10 mL, después de lo cual el intermedio de dicloruro de *bis*-difenilfenantrolin-osmio se precipitó por la adición de acetona. El material se purificó una vez más por precipitación del producto desde metanol por la adición de acetona.

Una parte (266 mg) del intermedio de dicloruro de *bis*-difenilfenantrolin-osmio se combinó con 60 mg de ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridin-4'-il)-butírico en 1:1 dioxano/agua y se puso a reflujo durante 18 horas. La disolución se concentró hasta sequedad al vacío y el residuo se disolvió de nuevo en 10 mL de agua. Después de la adición de 200 mg de hexafluorofosfato de amonio, la disolución se concentró de nuevo hasta sequedad y el residuo se lavó con partes de 10 mL de acetonitrilo. El producto se purificó en sílice en fase inversa usando metanol como el eluyente.

Ejemplo 16. Síntesis de Ésteres de NHS

El éster de NHS de [ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridin-4'-il)-butírico]Ru(II)[bpy]₂ (Complejo **19**) se obtuvo en forma purificada (NHS TAG, IGEN International) o se preparó en forma en bruto a partir del ácido carboxílico correspondiente (Complejo **20**) mediante uno de los métodos descritos debajo. El complejo **3** que contenía éster de NHS se hizo en forma purificada según el Ejemplo 3 o se preparó en forma en bruto a partir del complejo **2** mediante uno de los métodos descritos debajo. Los ésteres de NHS podrían prepararse en forma en bruto bajo condiciones apróticas o en agua. Típicamente, se usarían condiciones apróticas si fuera posible. Los complejos solubles en agua que eran insolubles en disolventes apróticos típicos se prepararon bajo condiciones acuosas.

Condiciones apróticas: El complejo que contiene ácido carboxílico se disolvió en cloruro de metileno al que se añadió un pequeño exceso de NHS y EDC. Algunos complejos que no eran solubles en cloruro de metileno se hicieron reaccionar en acetonitrilo o DMF o mezclas de estos disolventes con cloruro de metileno. Después de permitir que la reacción llegara a completarse (como se determina por HPLC o TLC), el disolvente se eliminó al vacío y el producto en bruto se volvió a disolver en DMF o DMSO para proporcionar una disolución madre para usar en reacciones de marcado.

Condiciones acuosas: A una disolución acuosa 20 mM del complejo que contenía ácido carboxílico se añadió, en orden de adición: i) tampón de ácido morfolino-etanosulfónico (MES) 100 mM, pH 6,0, NHS 50 mM y EDC HCl 200 mM. La reacción se incubó de 15-30 minutos. El producto de éster de NHS podría usarse como está. En algunos experimentos, el exceso de EDC se eliminó inmediatamente después de la preparación del éster de NHS mediante uno de los métodos siguientes: i) purificación del producto por cromatografía de exclusión por tamaño en Sephadex G-15 usando agua como el eluyente; ii) paso del producto a través de una columna corta de SP-Sephadex C25 en la

forma sódica y elución con agua o iii) carga del producto en un medio de cromatografía en fase inversa y elución con agua/acetronitrilo. El éster de NHS hecho bajo una de estas condiciones acuosas se usó inmediatamente después de la preparación/purificación (como se describe en el Ejemplo 17).

Ejemplo 17. Marcado de Anticuerpos con Ésteres de NHS

- 5 Se disolvieron anticuerpos en tampón PBS-1 (fosfato de potasio 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8) a concentraciones mayores que o iguales a 2 mg/mL. Los marcadores de ECL funcionalizados con ésteres de NHS (preparados como se describe en el Ejemplo 16) se añadieron en agua, DMF o DMSO (la concentración fina de disolvente orgánico permanecería <20%) y la reacción se dejó continuar durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Las proteínas marcadas se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño en Sephadex G-25 (complejos cargados de forma positiva o neutros) o Sephadex G-50 (complejos cargados de forma negativa). Una variedad de relaciones molares de marcador a proteína se intentaron generalmente ya que la eficacia de la reacción de unión podría variar de marcador a marcador. El número promedio de marcadores por proteína en el producto purificado se determinó usando un ensayo de proteína colorimétrica (Ensayo BCA o Ensayo de Azul de Coomassie, Pierce Chemicals) para determinar la concentración de proteína y la absorbancia visible (típicamente a 455 nm para marcadores basados en rutenio) para determinar la concentración de marcadores.

Ejemplo 18. Una comparación de inmunoensayos en sándwich en electrodos de carbono usando anticuerpos marcados con complejos 20, 8 y 10.

- 20 Los electrodos de compuestos de plástico que comprenden nanotubos de carbono (fibrillas) dispersos en etileno-co-acetato de vinilo (EVA) se trataron con un amoniaco/plasma de nitrógeno para exponer así fibrillas en la superficie e introducir grupos amina. Una fase inmovilizada de estreptavidina se introdujo tratando la superficie con SMCC (Pierce Chemical) y después haciendo reaccionar la superficie con estreptavidina (marcada con reactivo de Traut para introducir grupos tiol).

- 25 Los inmunoensayos en sándwich para α -fetoproteína (AFP) se llevaron a cabo usando discos de 3/16" de los electrodos recubiertos con estreptavidina como soportes de fase sólida y usando anticuerpos, diluyentes de anticuerpo y diluyentes de calibrador del Ensayo Elecsys AFP (Roche Diagnostics). El equipo Roche usa un anticuerpo de captura marcado con biotina y un anticuerpo de detección marcado con complejo 20. Para comparar los marcadores de la invención, el anticuerpo de detección marcado del equipo se reemplazó con el mismo anticuerpo aunque marcado con cantidades variables de marcadores 20, 8 y 10 como se describe en el Ejemplo 17. El electrodo recubierto de estreptavidina se puso en contacto con el anticuerpo de captura, uno de los anticuerpos de detección marcados y una muestra que contenía diluyente calibrador (un sustituto de suero artificial que contiene albúmina de suero bovino e IgG bovino) se pinchó con 1864 ng/mL de AFP. Un control negativo se hizo marchar además usando diluyente de calibrador no pinchado. Las mezclas de ensayo se incubaron sobre los electrodos para dejar que el complejo en sándwich se formara después de lo cual los discos se lavaron con tampón fosfato y se transfirieron a una celda de ECL. La ECL se midió poniendo en contacto el electrodo de compuesto con una disolución que contenía tripropilamina (Tampón de Ensayo ORIGEN, IGEN) y escaneando el potencial al electrodo compuesto a ~2,3 V.

- 40 La Figura 1 muestra la señal no específica (es decir, la señal en ausencia de analito) y la señal específica (la diferencia entre la señal en presencia de analito y la señal en ausencia de analito). La figura muestra que los marcadores 8 (que presentan grupos éster de fosfonato cargados de forma negativa) y 10 (que presentan grupos carboxamida hidrófilos neutros) dieron aproximadamente la misma señal específica que el marcador de ECL convencional 20 y que la señal específica aumentó aproximadamente de forma lineal con el número de marcadores por proteína. Los marcadores mostraron diferencias significativas e inesperadas, sin embargo, en la cantidad de enlace no específico. La señal no específica del marcador 20 aumentó exponencialmente con el número de marcadores por proteína. En contraste, el marcador 10 que presenta grupos carboxamida hidrófilos neutros mostró menos NSB y el marcador 8 que presenta carga de forma negativa mostró NSB insignificante incluso a altos números de marcadores por proteína. La señal del ensayo (S) además de la señal del ensayo al fondo (S/B) puede mejorarse usando el marcador 8 porque el número de marcadores por anticuerpo pueden aumentarse (respecto a los marcadores convencionales) sin aumentar las señales de NSB. El pico S/B medido con marcador 8 fue mayor que dos veces del medido con marcador 20. Usando las relaciones óptimas de marcador a proteína (como se determina por S/B), la señal medida con marcador 8 fue ocho veces mayor que la medida con marcador 20.

Ejemplo 19. Una comparación de inmunoensayos en sándwich en electrodos de carbono usando anticuerpos marcados con complejos 20, 2, 15, 12, 17 y 15.

- 55 Los ensayos AFP se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 18 excepto en que el anticuerpo de captura se adsorbió directamente en electrodos de compuesto EVA-fibrilla tratados con plasma de oxígeno antes de llevar a cabo el ensayo y los calibradores (0 a 2200 ng/mL) se prepararon en suero humano. La Figura 2 muestra que las señales específicas de anticuerpos marcados con complejos 20, 2 y 15 fueron aproximadamente similares excepto por los anticuerpos altamente marcados con batofenantrolina que contiene complejo 15; se plantea la hipótesis de que a altas relaciones de marcado la estructura aromática plana grande era capaz tanto de bloquear estéricamente el enlace o desnaturalizar el anticuerpo y afectar a su actividad. Como se observa además en el Ejemplo 18, la

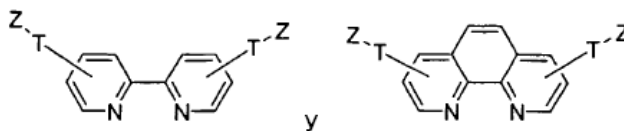
Figura 2 muestra que las señales no específicas de anticuerpos marcados con complejos que tienen ligandos cargados de forma negativa fueron incluso bajas a altos números de marcadores por anticuerpo, mientras que la señal no específica procedente del marcador **20** convencional subió de forma exponencial con el número de marcadores por anticuerpo. La S/B optimizada obtenida usando el marcador **2** fue mayor que 5 veces la S/B optimizada obtenida con el marcador **20**. Usando las relaciones óptimas de marcador a proteína (como se determina por S/B), la señal medida con el marcador **2** fue más de tres veces mayor que la medida con el marcador **20**. En ensayos similares (no se muestran datos), los anticuerpos marcados con un complejo que presenta grupos sulfato (complejo **12**) se comporta de forma similar a los marcados con complejo **2**. Los anticuerpos marcados con el análogo de Os del complejo **15**, en general, mostraron bajo enlace no específico similar aunque las señales específicas tendieron a ser aproximadamente 30-50% del complejo de Ru. Los anticuerpos marcados con la versión no sulfonada del complejo **15** (es decir, complejo **14**), en general, dieron mayores señales de fondo y menores señales incluso a relaciones bajas de marcador a proteína. Se plantea la hipótesis de que el complejo altamente hidrófobo interfirió con la función del anticuerpo. En ensayos similares, el complejo **17** altamente cargado de forma positiva dio señales no específicas extremadamente altas (a ~5-6 marcadores por anticuerpo, la señal no específica fue más que 100 veces la señal no específica procedente de anticuerpos marcados con complejo **2**). Este resultado muestra que el excelente comportamiento de los complejos cargados de forma negativa no es simplemente debido a tener grupos cargados hidrófilos, sino que la señal de la carga es importante. Se plantea la hipótesis de que el complejo **17** encontraría uso en algunas aplicaciones seleccionadas donde los ensayos se llevan a cabo cerca de superficies altamente cargadas de forma positiva (la carga positiva sería beneficiosa en esas condiciones para evitar el NSB). El complejo **17** y otros complejos que tienen el ligando **16** pueden además encontrar uso en aplicaciones que necesitan la adsorción de un marcador luminiscente a un electrodo (por ejemplo, en sensores basados en luminiscencia, detectores de HPLC basados en ECL o pantallas de ECL que usan marcadores de ECL adsorbidos en electrodos o en películas, tales como películas de Nafion, depositadas en un electrodo).

Ejemplo 20. Una comparación de inmunoensayos en sándwich en partículas magnéticas que usan anticuerpos marcados con complejos **20** y **2**.

Los ensayos AFP se llevaron a cabo usando los reactivos del Ensayo Elecsys AFP (Roche Diagnostics) excepto que el anticuerpo de detección estándar se sustituyó con el mismo anticuerpo aunque marcado con cantidades variables de complejos **20** o **2**. Una muestra (0,007 mL) que contiene una concentración conocida de AFP (0 o 1000 ng/mL) en una disolución tamponada que contiene proteínas de bloqueo se combinó con 0,035 mL del anticuerpo de captura marcado con biotina (0,0045 mg/mL) y 0,035 mL del anticuerpo de detección (0,012 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos después de lo que se añadieron 0,035 mL de partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina (0,72 mg/mL) y 0,139 mL de una disolución tamponada de tripropilamina (Tampón de Ensayo ORIGEN, IGEN International). La mezcla de reacción se incubó durante unos 15 minutos adicionales, después de lo cual se analizó la suspensión usando un Instrumento ORIGEN M-8 (IGEN International) y detección de ECL. La Figura 3 muestra que el marcador **2** dio ligeramente menos señal específica que el marcador **20**, aunque drásticamente menos señal no específica, especialmente para anticuerpos marcados de forma pesada. La S/B optimizada obtenida usando marcador **2** fue más de dos veces la S/B optimizada obtenida con el marcador **20**.

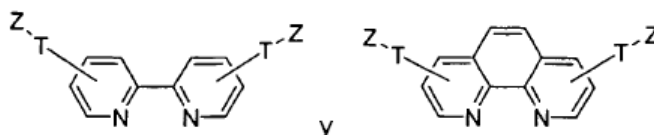
REIVINDICACIONES

1. Un ligando de bipyridina o fenantrolina seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

- 5 T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;
 Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y
 R es alquilo,
 con la condición que el ligando no sea un anión radical de 4,4'-dipropilsulfonato-2,2'-bipiridinio.
- 10 2. El ligando según la reivindicación 1, en donde T es $-(\text{CH}_2)_n-$ y n es un número entero entre 1 y 5.
3. El ligando según la reivindicación 1 o 2, en donde Z es $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{SO}_3\text{H}$.
4. El ligando según la reivindicación 1 o 2, en donde Z es $-\text{OSO}_3^-$ o $-\text{OSO}_3\text{H}$.
5. El ligando según la reivindicación 1 o 2, en donde Z es $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2^-$ o $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2\text{H}$.
6. El ligando según la reivindicación 1 o 2, en donde Z es $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$.
- 15 7. Un complejo metálico luminiscente que comprende el ligando según la reivindicación 2, y un átomo metálico, estando el átomo metálico unido a los nitrógenos anulares del ligando.
8. Un método para llevar a cabo un ensayo basado en luminiscencia que comprende las etapas de:
- (a) usar un complejo metálico luminiscente que comprende un ligando seleccionado del grupo que consiste en



20 en donde,

- T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;
 Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$;
 R es alquilo; y
- 25 dicho complejo metálico comprende un átomo metálico que está unido a los nitrógenos del anillo de dicho ligando;
- (b) inducir a dicho complejo metálico a emitir luminiscencia; y
- (c) medir la luminiscencia emitida.

9. Un método como se enumera según la reivindicación 8, en donde dicho complejo metálico muestra enlace no específico reducido en dicho ensayo respecto al complejo análogo que tiene $\text{Z} = \text{H}$.

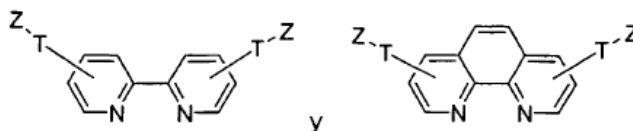
- 30 10. Un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura



en donde

M es Os o Ru; y

L^1 es un ligando seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

- 5 T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y

R es alquilo.

11. Un método para llevar a cabo un ensayo basado en luminiscencia que comprende las etapas de:

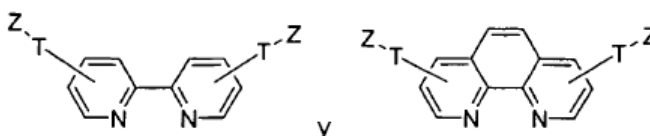
- 10 (a) usar un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura



en donde

M es Os o Ru; y

L^1 es un ligando seleccionado del grupo que consiste en:



15

en donde,

T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y

- 20 R es alquilo;

(b) inducir a dicho complejo metálico a emitir luminiscencia; y

(c) medir la luminiscencia emitida.

12. Un método como se enumera según la reivindicación 11, en donde dicho complejo metálico muestra enlace no específico reducido en dicho ensayo respecto al complejo análogo que tiene $Z = \text{H}$.

- 25 13. Un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

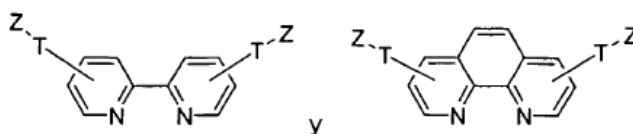


en donde

M es Os o Ru;

- 30 L^1 es un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que puede reaccionar con un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para así formar una unión covalente; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

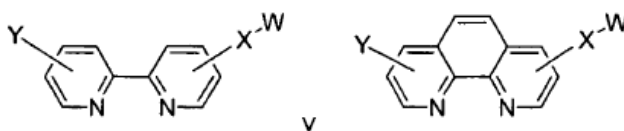
T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

- 5 Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)(NH}_2)$; y

R es alquilo; y en donde

- 10 el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

14. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde L^1 se selecciona a partir del grupo que consiste en



en donde,

- 15 X es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo y

W es un sustituyente que puede reaccionar con el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para así formar una unión covalente.

- 20 15. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde Z es $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{SO}_3\text{H}$.

16. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde Z es $-\text{OSO}_3^-$ o $-\text{OSO}_3\text{H}$.

17. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde Z es $-\text{OPO}_3^{2-}$, OPO_3H^- , OPO_3H_2 , $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2^-$ o $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2\text{H}$.

18. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde Z es $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)(NH}_2)$.

- 25 19. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde M es Ru.

20. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde W es un cloruro de acilo o un éster de N-hidroxisuccinimida.

21. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 13, en donde W es un grupo ácido carboxílico, un grupo amina o un grupo hidroxilo.

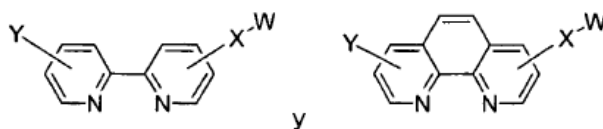
- 30 22. Un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura



en donde

M es Os o Ru;

L^1 se selecciona del grupo que consiste en



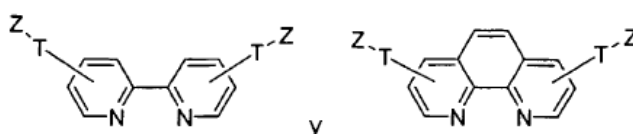
en donde,

X es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo y

- 5 W es un grupo funcional que puede reaccionar con un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para así formar una unión covalente; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

- 10 T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo; y

Z es $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{SO}_3\text{H}$; y en donde

15 el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

23. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde M es Ru.

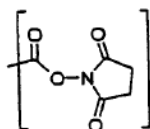
24. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde T es $-(\text{CH}_2)_n-$, X es $-(\text{CH}_2)_m-$ y n y m son cada uno números enteros entre 1 a 5.

- 20 25. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde L^2 es un ligando fenantrolina sustituido en las posiciones 4 y 7 o L^2 es un ligando bipyridina sustituido en las posiciones 4 y 4'.

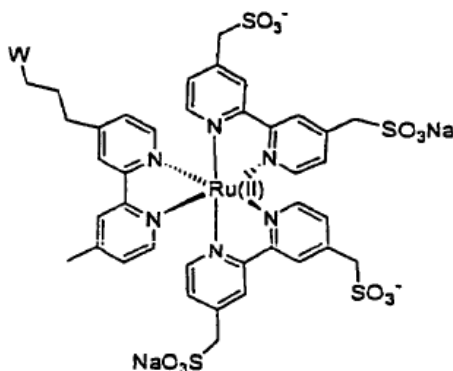
26. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde W es un cloruro de acilo o un éster de N-hidroxisuccinimida.

27. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde W es un grupo ácido carboxílico, un grupo amino o un grupo tiol.

- 25 28. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 22, en donde W es



29. Un complejo metálico luminiscente con la estructura:



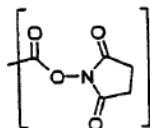
en donde W es un grupo funcional que puede reaccionar con un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para así formar una unión covalente; y en donde

5 el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

30. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 29, en donde W es un cloruro de acilo o un éster de N-hidroxisuccinimida.

10 31. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 29, en donde W es un grupo ácido carboxílico, un grupo amino o un grupo hidroxilo.

32. El complejo metálico luminiscente según la reivindicación 29, en donde W es



33. Un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

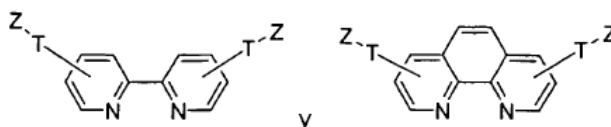
15 ML^1L^2

en donde

M es Os o Ru;

L^1 es un ligando bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo; y

20 L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

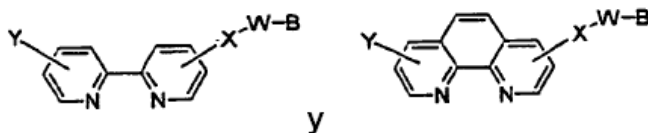
T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueniilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

25 Z es $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-OSO_3^-$, $-OSO_3H$, $-OPO_3^{2-}$, $-OPO_3H^-$, $-OPO_3H_2$, $-OP(R)O_2^-$, $-OP(R)O_2H$, $-[NHC(NH_2)_2]^+$ o $-NHC(NH)NH_2$; y

R es alquilo; y en donde

el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

34. El material marcado según la reivindicación 33, en donde L^1 se selecciona del grupo que consiste en



5

en donde,

X es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueniilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo;

10 B es el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo; y

W es un grupo funcional que se une a B.

35. El material marcado según la reivindicación 33, en donde Z es $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{SO}_3\text{H}$.

36. El material marcado según la reivindicación 33, en donde Z es $-\text{OSO}_3^-$ o $-\text{OSO}_3\text{H}$.

15 37. El material marcado según la reivindicación 33, en donde Z es $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2^-$ o $-\text{OP}(\text{Me})\text{O}_2\text{H}$.

38. El material marcado según la reivindicación 33, en donde Z es $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$.

39. El material marcado según la reivindicación 33, en donde M es Ru.

40. El material marcado según la reivindicación 33, en donde el complejo muestra menos enlace no específico que el complejo análogo en que Z es H.

20 41. El material marcado según la reivindicación 33, en donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a cinco o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

42. El material marcado según la reivindicación 33, en donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a diez o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

43. Un método para llevar a cabo un ensayo basado en luminiscencia que comprende las etapas de:

25 (a) usar un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

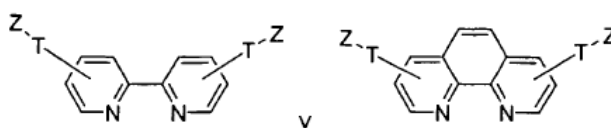


en donde

M es Os o Ru;

30 L^1 es un ligando de bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

35 T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueniilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)}_2\text{NH}_2$; y

R es alquilo;

(b) inducir a dicho complejo metálico a emitir luminiscencia; y

5 (c) medir la luminiscencia emitida; y en donde

el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

10 44. El método según la reivindicación 43, en donde dicho material marcado muestra enlace no específico reducido en dicho ensayo respecto al material marcado análogo que tiene Z = H.

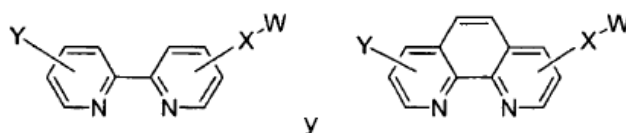
45. Un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura



en donde

M es Os o Ru;

15 L^1 se selecciona del grupo que consiste en



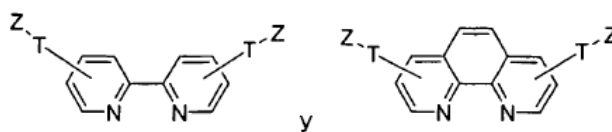
en donde,

X es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo y

20 W es un grupo funcional que está unido a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

25 T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo; y

Z es $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{SO}_3\text{H}$; y en donde

el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

30 46. El material marcado según la reivindicación 45, en donde M es Ru.

47. El material marcado según la reivindicación 45, en donde T es $-(\text{CH}_2)_n-$, X es $-(\text{CH}_2)_m-$ y n y m son cada uno número enteros entre 1 a 5.

35 48. El material marcado según la reivindicación 45, en donde L^2 es un ligando fenantrolina sustituido en las posiciones 4 y 7 o L^2 es un ligando bipyridina sustituido en las posiciones 4 y 4'.

49. El material marcado según la reivindicación 45, en donde el complejo muestra menos enlace no específico que el complejo análogo en que Z es H.

50. El material marcado según la reivindicación 45, en donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a 5 o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

5 51. El material marcado según la reivindicación 45, en donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a 10 o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

52. Un método para llevar a cabo un ensayo basado en luminiscencia que comprende las etapas de:

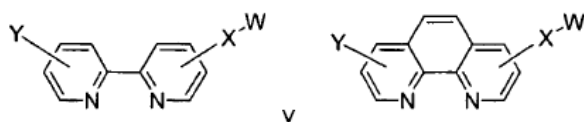
(a) usar un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura



10 en donde

M es Os o Ru;

L¹ se selecciona del grupo que consiste en



en donde,

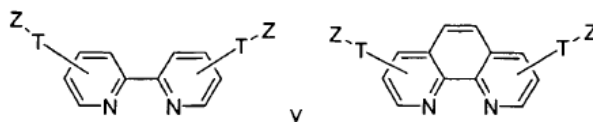
15 X es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Y es H o alquilo; y

W es un grupo funcional que está unido a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo;

20 seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos y

L² es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

25 T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo; y

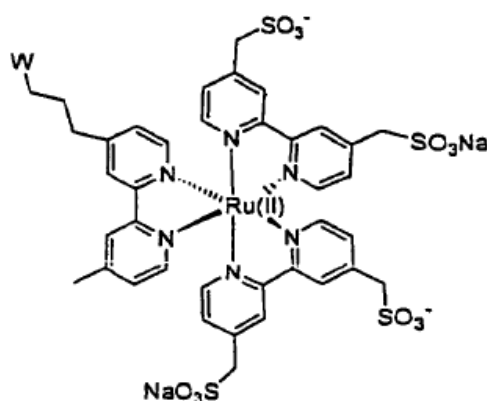
Z es -SO₃⁻ o -SO₃H;

(b) inducir a dicho complejo metálico a emitir luminiscencia; y

(c) medir la luminiscencia emitida.

30 53. El método según la reivindicación 52, en donde dicho material marcado muestra enlace no específico reducido en dicho ensayo respecto al material marcado análogo que tiene Z = H.

54. Un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente con la estructura:



en donde W es un grupo funcional que está unido a un material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo; y en donde

el material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y ácidos peptidonucleicos.

55. El material marcado según la reivindicación 54, en donde (i) W es $-C(O)-$ y (ii) dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a W por medio de un enlace amida.

56. El material marcado según la reivindicación 54, donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a 5 o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

57. El material marcado según la reivindicación 54, en donde dicho material biológico, reactivo de enlace, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo se une a 10 o más de dichos complejos metálicos luminiscentes.

58. Un método para llevar a cabo un ensayo basado en luminiscencia que comprende las etapas de:

(a) usar el material marcado según la reivindicación 54

(b) inducir a dicho material marcado a emitir luminiscencia; y

(c) medir la luminiscencia emitida.

59. El método según la reivindicación 58, en donde dicho material marcado muestra enlace no específico reducido en dicho ensayo relativo al material marcado análogo que tiene $Z = H$.

60. Un método de medida de un analito, actividad química o actividad biológica en una muestra que comprende las etapas de i) poner en contacto una muestra que contiene el analito, actividad química, actividad biológica, un producto de la actividad biológica o un producto de la actividad química con el complejo metálico luminiscente de la reivindicación 13; ii) inducir al complejo metálico a emitir luminiscencia y iii) medir la luminiscencia para así detectar o medir la actividad química o biológica.

61. El método según la reivindicación 60, en donde dicho material marcado muestra menos enlace no específico en dicho ensayo cuando se compara a un material marcado que tiene un ligando análogo que no presenta grupos funcionales que reducen el enlace no específico.

62. El método según la reivindicación 60 o 61, en donde dicha luminiscencia es electroquimioluminiscencia.

63. Un método de medida de un material marcado que comprende las etapas de i) poner en contacto el material marcado con un reactivo de enlace y, opcionalmente, un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el reactivo de enlace, el material marcado, y, opcionalmente, el soporte en fase sólida; iii) inducir al material marcado a emitir luminiscencia y iv) medir la luminiscencia emitida para así medir el material marcado; en donde el material marcado se prepara a partir del metal luminiscente según la reivindicación 13.

64. El método según la reivindicación 63, en donde dicho material marcado se pone en contacto con dicha fase sólida y dicho complejo de enlace se forma en dicha fase sólida.

65. El método según la reivindicación 63, en donde dicho material marcado muestra menos enlace no específico en dicho ensayo cuando se compara a un material marcado análogo que tiene un ligando análogo que no presenta grupos funcionales que reducen el enlace no específico;

en donde los grupos funcionales que reducen el enlace no específico se seleccionan del grupo que consiste en $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$.

66. El método según la reivindicación 63, en donde dicha luminiscencia es electroquimioluminiscencia.

5 67. Un método de medida de un analito en una muestra que comprende las etapas de i) poner en contacto la muestra con un reactivo de enlace marcado y opcionalmente un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el reactivo de enlace, el analito y, opcionalmente, el soporte en fase sólida, iii) inducir a los marcadores en el reactivo de enlace marcado a emitir luminiscencia, preferiblemente ECL y iv) medir la luminiscencia emitida para así medir el analito en la muestra; en donde dicho reactivo de enlace marcado se prepara a partir del complejo metálico luminiscente de la reivindicación 13.

68. El método según la reivindicación 67, en donde dicho complejo de enlace se forma en dicha fase sólida.

69. El método según la reivindicación 67, en donde dicho reactivo de enlace marcado se pone en contacto con dicha fase sólida y dicho complejo de enlace se forma en dicha fase sólida.

15 70. El método según la reivindicación 67, en donde dicho reactivo de enlace marcado muestra menos enlace no específico en dicho ensayo cuando se compara con los reactivos de enlace marcados análogos que no tiene marcadores que presenten grupos funcionales reductores de enlace no específico.

71. El método según la reivindicación 67, en donde dicha luminiscencia es electroquimioluminiscencia.

72. El método según la reivindicación 67, en donde dicho ensayo es un ensayo en sándwich.

73. El método según la reivindicación 67, en donde dicho ensayo es un ensayo competitivo.

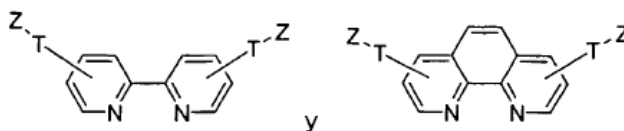
20 74. Un método de medida de un analito en una muestra que comprende las etapas de i) poner en contacto la muestra con un análogo marcado del analito, un reactivo de enlace y, opcionalmente, un soporte en fase sólida; ii) formar un complejo de enlace que comprende el análogo marcado del analito, el reactivo de enlace y, opcionalmente, el soporte en fase sólida; iii) inducir a los marcadores en el análogo marcado del analito a emitir luminiscencia, preferiblemente ECL y iv) medir la luminiscencia emitida para así medir el analito en la muestra; en donde dicho análogo marcado del analito se prepara a partir del complejo metálico luminiscente de la reivindicación 13.

75. El método según la reivindicación 74, en donde dicho análogo marcado del analito se pone en contacto con dicha fase sólida y dicho complejo de enlace se forma en dicha fase sólida.

30 76. El método según la reivindicación 74, en donde dicho análogo marcado del analito muestra menos enlace no específico en dicho ensayo cuando se compara con los reactivos análogos que no presentan grupos funcionales reductores del enlace no específico.

77. El método según la reivindicación 74, en donde dicha luminiscencia es electroquimioluminiscencia.

35 78. Un método para mejorar un ensayo de luminiscencia que emplea un complejo metálico luminiscente que contiene un ligando bipyridina, fenantrolina, bipyridina sustituida o fenantrolina sustituida, comprendiendo dicho método la etapa de sustituir dicho ligando con un ligando seleccionado del grupo que consiste en



en donde,

T es una unión alquilo que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

40 Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y

R es alquilo.

79. El método según la reivindicación 78, en donde dicha sustitución mejora la señal del ensayo al fondo mediante un factor de dos o más.

80. Un equipo que comprende, en uno o más envases, un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

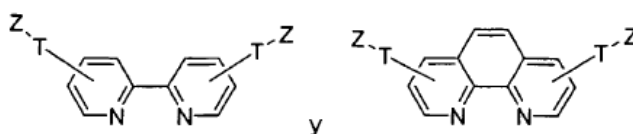


en donde

5 M es Os o Ru;

L^1 es un ligando bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a una sustancia de realización del ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



10 en donde,

T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueno, alquino o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y

15 R es alquilo; y

al menos un componente del ensayo seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un co-reactivo de electroquimioluminiscencia;
- (b) uno o más reactivos de enlace;
- (c) uno o más tampones de pH.

20 81. Un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

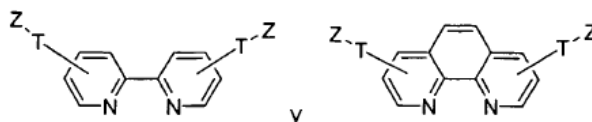


en donde

M es Os o Ru;

25 L^1 es un ligando bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a una sustancia de realización del ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

30 T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueno, alquino o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)NH}_2$; y

R es alquilo.

82. Un material marcado según la reivindicación 81, en donde dicha sustancia de realización del ensayo se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) analito de interés añadido;
- (b) un compañero de enlace de dicho analito; y
- (c) un componente reactivo capaz de enlazar con (a) o (b).

83. Una composición de materia para usar como un reactivo en un ensayo que comprende:

(a) un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

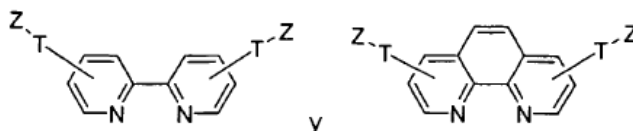


en donde

M es Os o Ru;

L^1 es un ligando bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a una sustancia de realización del ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alqueniilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)}_2\text{NH}_2$; y

R es alquilo; y

(b) al menos un componente de ensayo adicional seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) electrolito;
- (ii) analito de interés;
- (iii) un compañero de enlace del analito de interés;
- (iv) un componente reactivo capaz de reaccionar con (ii) o (iii); y
- (v) un co-reactivo de ECL,

con la condición que, sin embargo, no sean dos componentes contenidos en cualquier composición reactiva, reactivos el uno con el otro durante el almacenaje para así perjudicar su función en el ensayo pretendido.

84. Una composición de materia para la detección de un analito de interés presente en una muestra, cuya composición comprende un material marcado que comprende un complejo metálico luminiscente que tiene la estructura

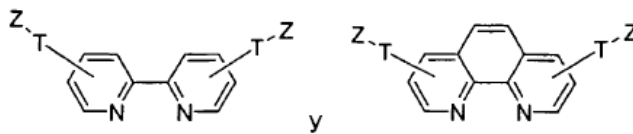


en donde

M es Os o Ru;

L^1 es un ligando bipyridina o fenantrolina sustituido que tiene al menos un sustituyente que está unido de forma covalente a una sustancia de realización del ensayo; y

L^2 es un ligando metálico seleccionado del grupo que consiste en:



en donde,

T es un grupo de unión que comprende una unión alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo, o una combinación de los mismos, que tiene, opcionalmente, uno o más carbonos de la cadena sustituidos con un heteroátomo;

- 5 Z es $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2^-$, $-\text{OP}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$, $-\text{[NHC(NH}_2)_2]^+$ o $-\text{NHC(NH)}_2\text{NH}_2$; y

R es alquilo,

siendo dicha sustancia de realización de ensayo capaz de enlazar al analito de interés o enlazarse al analito de interés.

- 10 85. Una composición de materia según la reivindicación 84, en donde dicha composición contiene al menos una sustancia adicional seleccionada del grupo que consiste en

- (i) analito de interés añadido;
- (ii) un compañero de enlace de dicho analito; y
- (iii) un componente reactivo capaz de enlazar con (i) o (ii).

- 15 86. El ligando según la reivindicación 3, en donde $n = 1$.

87. El complejo luminiscente según la reivindicación 22, en donde M es Os.

88. El material marcado según la reivindicación 35, en donde M es Ru.

89. El material marcado según la reivindicación 45, en donde M es Os.

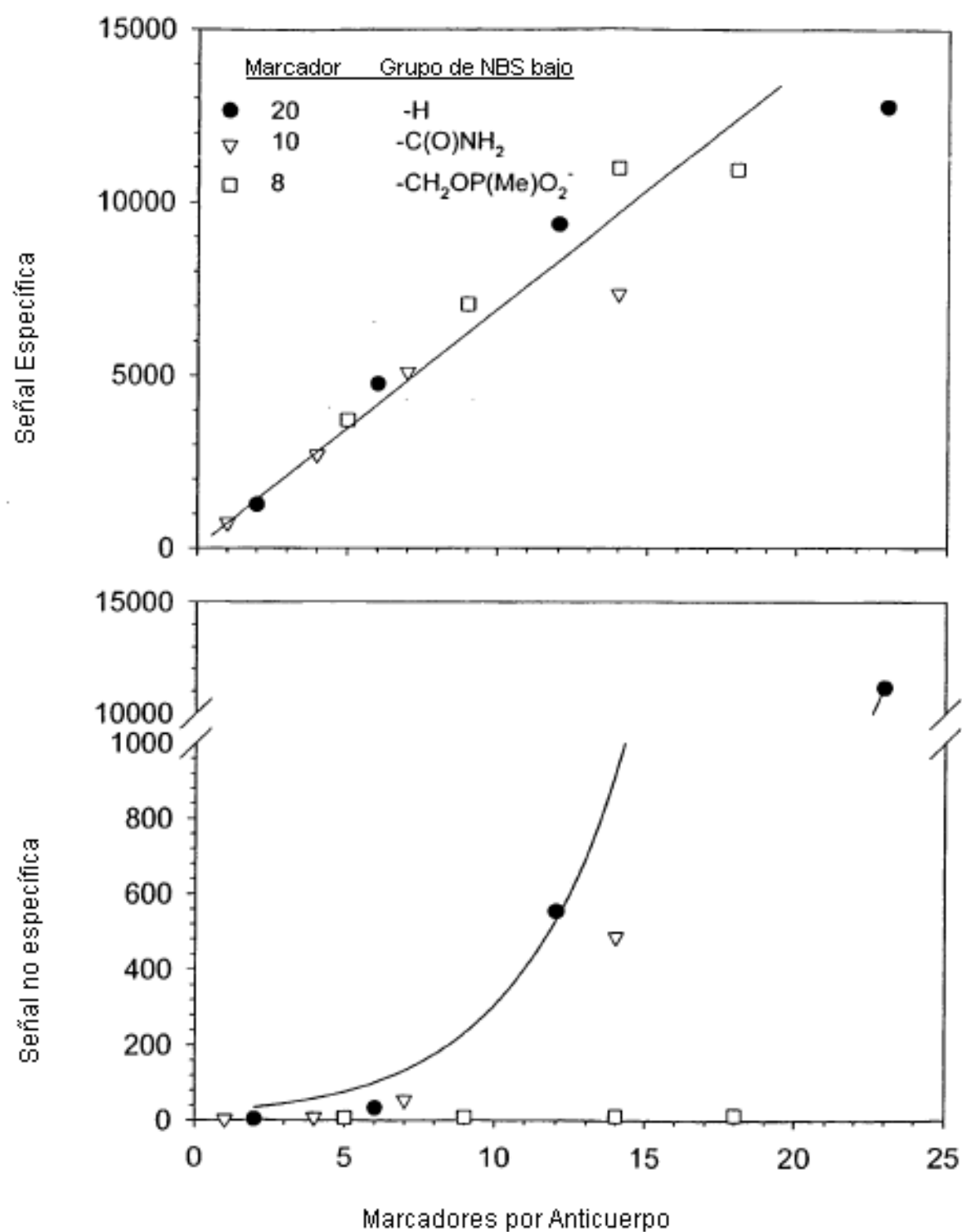


Figura 1.

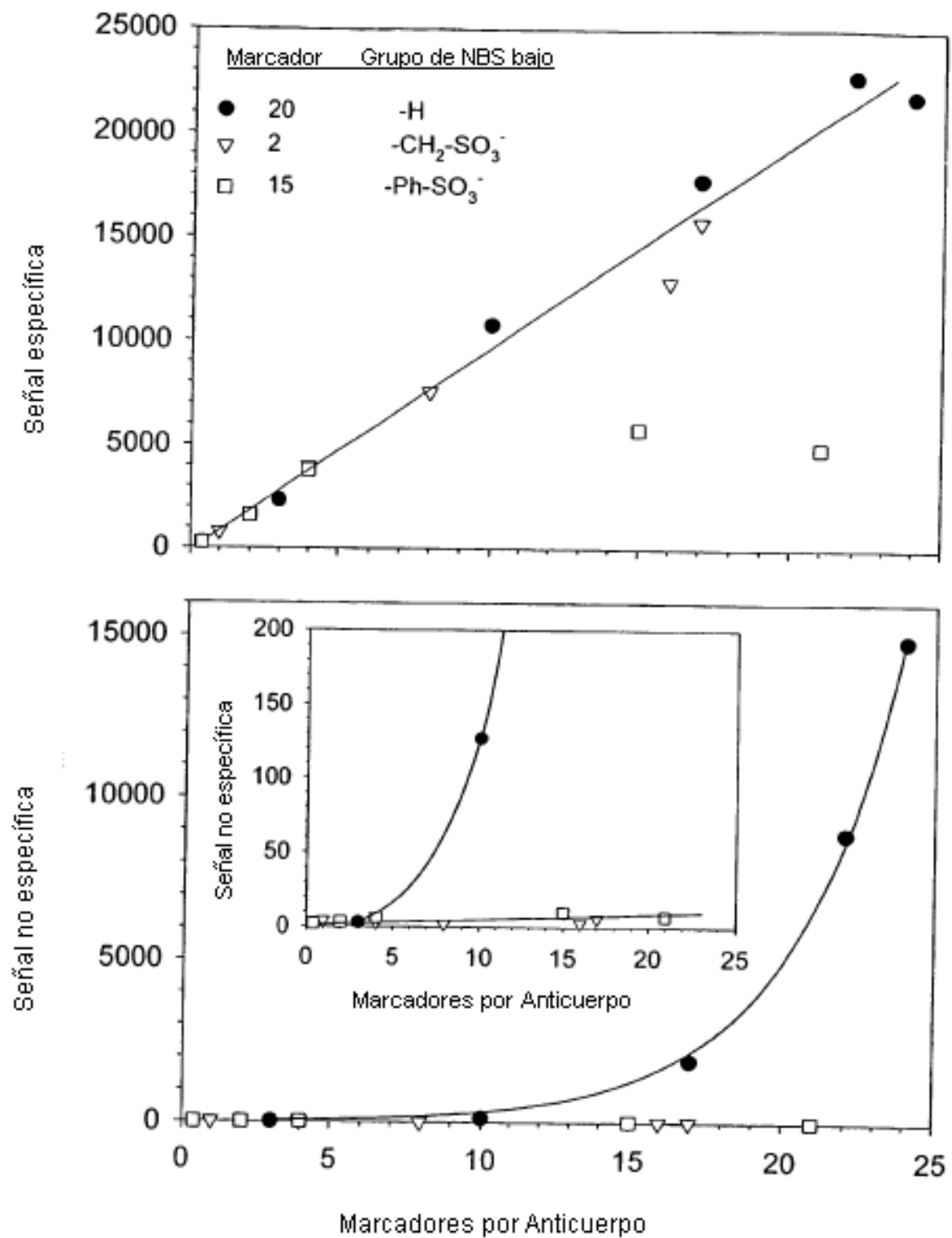


Figura 2.

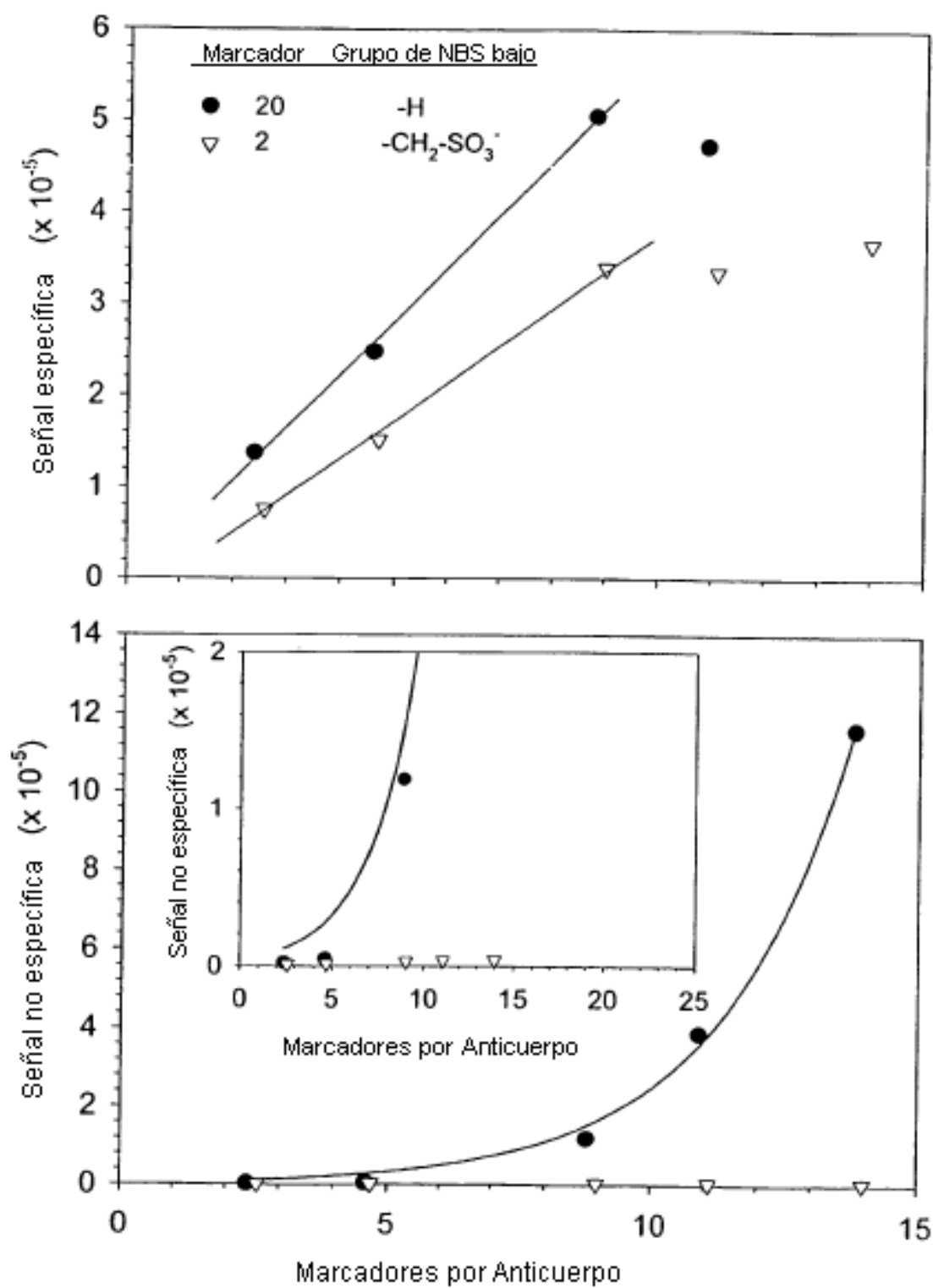


Figura 3.