

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 384**

51 Int. Cl.:

C09K 11/06 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/EP2013/002321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13744978 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2880123**

54 Título: **Nuevos complejos basados en iridio para ECL**

30 Prioridad:

02.08.2012 EP 12179048

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

14.03.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK;
CYSEWSKI, ROBERT;
DE COLA, LUISA;
DZIADEK, SEBASTIAN;
FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, JESÚS MIGUEL;
JOSEL, HANS-PETER y
SEIDEL, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 384 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos complejos basados en iridio para ECL

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a nuevos complejos luminescentes basados en iridio Ir(III), conjugados que comprenden estos complejos como marca y su aplicación, por ejemplo en la detección de un analito basada en electroquimioluminiscencia.

10 La quimioluminiscencia electrogenerada (también denominada electroquimioluminiscencia y de forma abreviada ECL) es el proceso mediante el que una especie generada en los electrodos experimenta reacciones de transferencia de electrones de alta energía para formar estados excitados que emiten luz. Los primeros estudios detallados de ECL fueron descritos por Hercules y Bard *et al.* a mediados de 1960. Después de aproximadamente 15 50 años de estudio, ECL se ha convertido en la actualidad en una técnica analítica muy potente y se usa ampliamente, por ejemplo, en las áreas de inmunoensayo, ensayo de alimentación y agua, y detección de agentes de guerra biológica.

20 Existe un gran número de compuestos que parece ser de interés para su uso en dispositivos orgánicos emisores de luz (OLED). Estos compuestos son apropiados para su uso en materiales sólidos o se pueden disolver en fluidos orgánicos. Sin embargo, no se puede extraer ninguna conclusión con respecto a su utilidad en medio acuoso, como por ejemplo el requerido para la detección de un analito de una muestra biológica.

25 En general, los métodos de detección basados en ECL se basan en el uso de complejos de rutenio solubles en agua, que comprenden Ru(II+) como ion metálico.

A pesar de las mejoras significativas en realizadas en las pasadas décadas, aún existe una gran necesidad de ensayos diagnósticos sensibles *in vitro* basados en electroquimioluminiscencia.

30 Ha sido sorprendente que los presentes inventores descubrieran que ciertos complejos luminescentes basados en iridio Ir(III+) representen marcajes muy prometedores para futuros métodos de detección sensibles basados en ECL.

Sumario de la Invención

35 La presente invención desvela un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de Fórmula II

alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxil, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

5 en la que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxil, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

10 en la que, si en cualquiera de R1-R17 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R17 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxil, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietilenoxi, polipropilenoxi, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

15 en la que alquilo como se usa en el presente documento es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S, en la que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,

20 en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (a) es -Q1-Y, en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (b) es Q2 en la que Q1 es un conector y cada Q2 es independientemente un conector o un enlace covalente, en la que (n) es un número entero de 1 a 50 y en la que Y es un grupo funcional.

25 La presente invención también desvela un conjugado que comprende el compuesto anterior y, unido covalentemente al mismo, un agente de unión por afinidad.

30 La presente invención también se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado como se desvela en la presente invención para llevar a cabo una medición de luminiscencia o una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa, especialmente en un dispositivo electroquimioluminiscente o un sistema de detección electroquimioluminiscente.

35 Además, la presente invención desvela un método para medir un analito mediante un método *in vitro*, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una muestra que se sospecha o se sabe que comprende el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con la presente invención en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de analito y conjugado, y (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de ese modo una medida del analito.

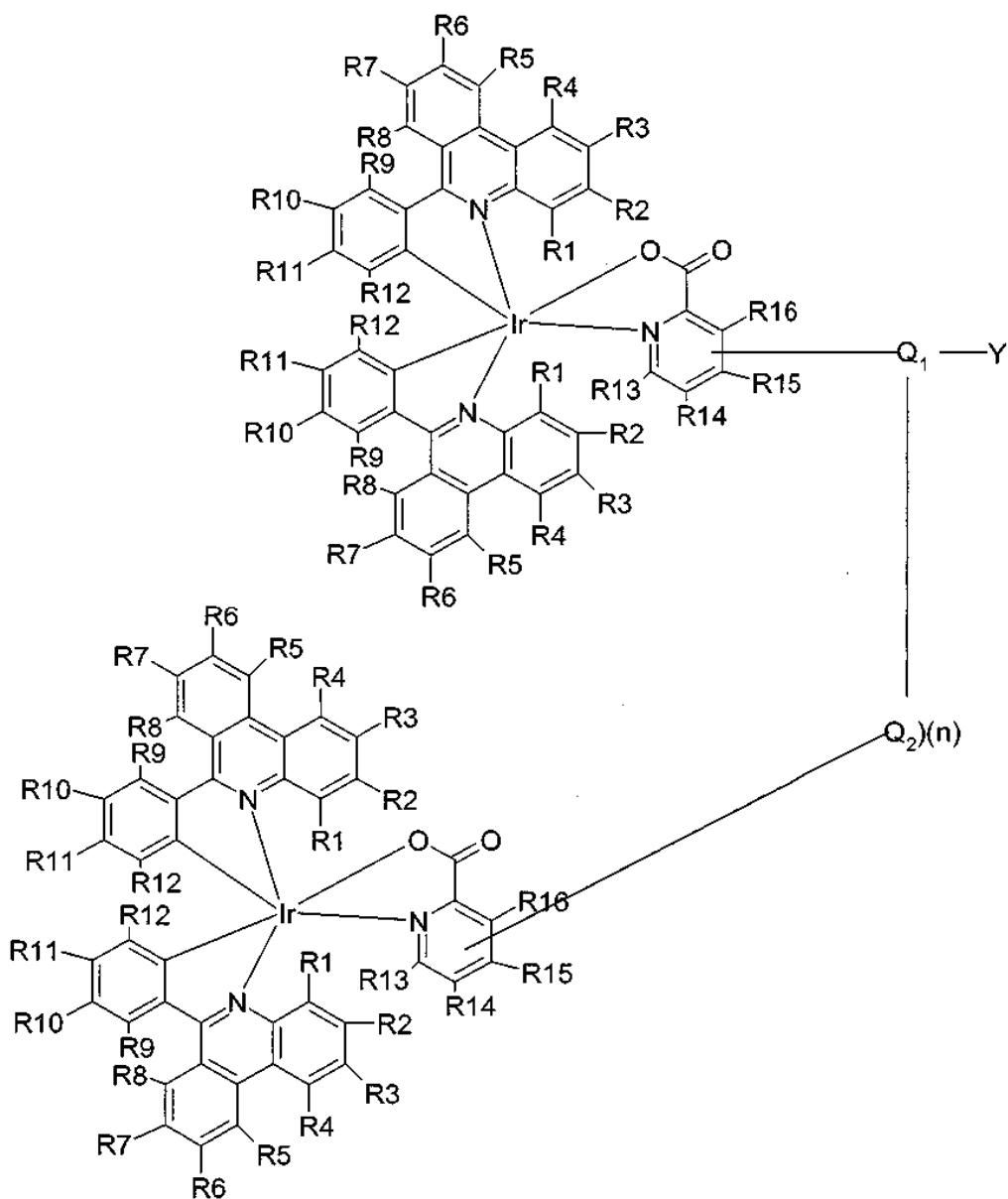
40 Descripción detallada de la invención

Como se ha indicado anteriormente, existe la necesidad de nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en metal, que sean adecuados para su uso en ensayos diagnósticos *in vitro*.

45 Nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de Fórmula II

La presente invención se refiere a un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de Fórmula II

FÓRMULA I (a)



(FÓRMULA I (b))

en la que en la Fórmula 1(a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R16 es independientemente hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfeno, hidroxifosfinoilo, hidroxilo-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, amino-alquilo, amino-alquilo sustituido, amino-alcoxi, amino-alcoxi sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido,

en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi

- sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,
- 5 en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxí, alquiloxi, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 10 en la que, si en cualquiera de R1-R17 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R17 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como un grupo amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxí, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietilenoxi, polipropilenoxi, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 15 en la que alquilo como se usa en el presente documento es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S, en la que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,
- 20 en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (a) es -Q1-Y, en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (b) es Q2 en la que Q1 es un conector y cada Q2 es independientemente un conector o un enlace covalente, en la que (n) es un número entero de 1 a 50 y en la que Y es un grupo funcional.
- 25 En una realización, uno de R13 a R16 de la Fórmula I (a) es Q1-Y.
- En una realización, uno de R13 a R16 en cada Fórmula I (b) es Q2.
- 30 En una realización, uno de R13 a R16 de la Fórmula I (a) es Q1-Y y uno de R13 a R16 en cada Fórmula I (b) es Q2.
- En una realización, la Fórmula I (a) y la Fórmula I (b) son iguales, excepto por Q1-Y en la Fórmula I (a) y Q2 en la Fórmula I (b), respectivamente.
- 35 Como conoce el experto en la materia, los sustituyentes en R1-R17 pueden estar sustituidos adicionalmente, por ejemplo, un grupo alquilo en un grupo aminoalquilo puede estar sustituido además con un grupo hidroxilo, amino, carboxi, o sulfo.
- 40 Como se usa en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones acompañantes, los sustituyentes tienen los significados conocidos habitualmente por la persona experta.
- 45 Alquilo es preferentemente una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono, preferentemente con una longitud de 1-10 átomos de carbono, de forma particularmente preferente con una longitud de 1-6 átomos de carbono; o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos, preferentemente con una longitud de 1-10 átomos de carbono, que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S.
- Algunos ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, los pentilos isómeros, los hexilos isómeros, los heptilos isómeros, los octilos isómeros, y dodecilo. En una realización preferente particular, alquilo es metilo o etilo.
- 50 Los términos alcoxi y alquiloxi así como alquilo sustituido y alcoxi sustituido, respectivamente, se pueden usar de forma intercambiable. Alcoxi y alquiloxi significan un resto de fórmula -OR, en la que R es preferentemente un resto alquilo como se ha definido anteriormente en el presente documento. Algunos ejemplos de restos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, e isopropoxi.
- 55 En una realización preferente, los sustituyentes para el alquiloxi sustituido son cadenas etilenoxi que comprenden 1-40 unidades de etilenoxi, o que comprenden 1-20 unidades de etilenoxi o que comprenden 1-10 unidades de etilenoxi.
- 60 Arilo es preferentemente un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7, preferentemente un sistema de anillos arilo de 6 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, preferentemente un sistema de anillos heteroarilo de 6 miembros. En una realización preferente particular, arilo es fenilo.
- 65 En una realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R16 es independientemente hidrógeno, hidroxí, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

En una realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R16 es independientemente hidrógeno, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

- 5 En una realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R16 es independientemente hidrógeno, alquiloxi sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfonato o sulfóxido.

- 10 En una realización, al menos uno de R1 a R16 del compuesto de acuerdo con la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) está sustituido con al menos un grupo hidrófilo, en particular con al menos un grupo hidrófilo como se define posteriormente.

- 15 En una realización, al menos uno de R1 a R12 de los restos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) está sustituido con al menos un grupo hidrófilo, en particular con al menos un grupo hidrófilo como se define posteriormente.

- 20 Los grupos hidrófilos preferentes son amino, alquilamino, significando alquilo una cadena lineal tal como una cadena de metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o una cadena de alquilo ramificado tal como una cadena de isopropilo, isobutilo, terc-butilo, preferentemente una cadena de alquilo lineal tal como metilo o etilo, alquilamino sustituido, conteniendo este por ejemplo una o dos cadenas ramificadas o lineales unidas al átomo de N, que están sustituidas con un grupo hidrófilo adicional tal como hidroxilo o sulfo, conteniendo preferentemente este alquilamino sustituido dos restos de hidroxipropilo o hidroxietilo, arilamino, refiriéndose arilo a un resto aromático, tal como fenilo, o naftilo, preferentemente fenilo, arilamino sustituido, siendo arilo como se ha definido anteriormente y un resto adicional formado por un grupo hidrófilo, alquilamonio, siendo alquilo como se ha definido anteriormente y siendo preferentemente un resto de trimetilamonio o un resto de trietilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, éster de ácido carboxílico, preferentemente un éster de alquilo tal como éster de metilo o etilo, carbamoilo, hidroxi, alquiloxi sustituido o sin sustituir siendo alquilo y alquilo sustituido como se han definido anteriormente o ariloxi o ariloxi sustituido siendo arilo y arilo sustituido como se han definido anteriormente, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato.

- 35 Preferentemente, tal grupo hidrófilo se selecciona entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxi, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato, cuando sea aplicable, cada uno preferentemente como se define en el párrafo anterior.

- En una realización preferente, el grupo hidrófilo se selecciona entre alquilamino, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxi, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato.

- 40 En una realización preferente particular adicional, el grupo hidrófilo se selecciona entre un grupo sulfo y un grupo sulfamoilo.

En una realización, al menos uno de R1 a R12 de los restos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I, la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) de la Fórmula II, respectivamente, está sustituido con al menos un grupo hidrófilo.

- 45 En una realización, al menos uno de R1-R12 es un grupo sustituido o sin sustituir seleccionado entre sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, sulfino-alquilo, sulfino-arilo, sulfino-alcoxi, sulfino-ariloxi, sulfino, sulfeno-alquilo, sulfeno-arilo, sulfeno-alcoxi, sulfeno-ariloxi, sulfeno, sulfamoil-alquilo, sulfamoil-arilo, sulfamoil-alcoxi, sulfamoil-ariloxi, sulfamoilo, alcanosulfonil-alquilo, alcanosulfonil-arilo, alcanosulfonilo, arenosulfonil-alquilo, o arenosulfonil-arilo, o arenosulfonilo, sulfoamino-alquilo, sulfoamino-arilo, sulfoamino-alcoxi, sulfoamino-ariloxi, sulfoamino, sulfinoamino-alquilo, sulfinoamino-arilo, sulfinoamino-alcoxi, sulfinoamino-ariloxi, sulfinoamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, fosfono-alquilo, fosfono-arilo, fosfono-alquiloxi, fosfono-ariloxi, fosfono, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquiloxi, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinoil, hidroxil-fosfinoil-alquilo, hidroxil-fosfinoil-arilo, hidroxil-fosfinoil-alquiloxi, hidroxil-fosfinoil-ariloxi, hidroxil-fosfinoil, fosfonoamino-alquilo, fosfonoamino-arilo, fosfonoamino-alcoxi, fosfonoamino-ariloxi, fosfonoamino, o, cuando corresponda químicamente, una sal de los sustituyentes descritos anteriormente, en los que "alquilo" es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S y en la que "arilo" como se usa en el presente documento es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N.

65

En una realización al menos uno de R1 a R12 es un grupo sustituido o sin sustituir seleccionado entre sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, sulfamoil-alquilo, sulfamoil-arilo, sulfamoil-alcoxi, sulfamoil-ariloxi, sulfamoilo, alcanosulfonil-alquilo, alcanosulfonil-arilo, alcanosulfonilo, arenosulfonil-alquilo, arenosulfonil-arilo, arenosulfonilo, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, 5 alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, fosfono-alquilo, fosfono-arilo, fosfono-alquiloxi, fosfono-ariloxi, fosfono, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquiloxi, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoil-alquilo, hidroxil-alquil-fosfinoil-arilo, hidroxil-alquil-fosfinoil-alquiloxi, hidroxil-alquil-fosfinoil-ariloxi, hidroxil-alquil-fosfinoilo, o, cuando corresponda químicamente, una sal de los 10 sustituyentes descritos anteriormente, en la que "alquilo" es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S y en la que "arilo" como se usa en el presente documento es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N.

15 En una realización, al menos uno de R1 a R12 es sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, o una sal del mismo (= sulfonato), en la que el contraión es preferentemente un catión del grupo de los metales alcalinos.

20 En una realización, al menos uno de R1 a R12 es sulfo-alquilo, sulfo-alcoxi, sulfo, o una sal del mismo (= sulfonato), en la que el contraión es un catión del grupo de los metales alcalinos.

En una realización, al menos uno de R1 a R12 es sulfo-metilo, sulfo-alcoxi con una cadena de alquilo C2 a C4, o una sal del mismo (= sulfonato) en la que el contraión es un catión del grupo de los metales alcalinos.

25 En una realización, al menos uno de los grupos R1 a R12 de la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) es un grupo sulfo.

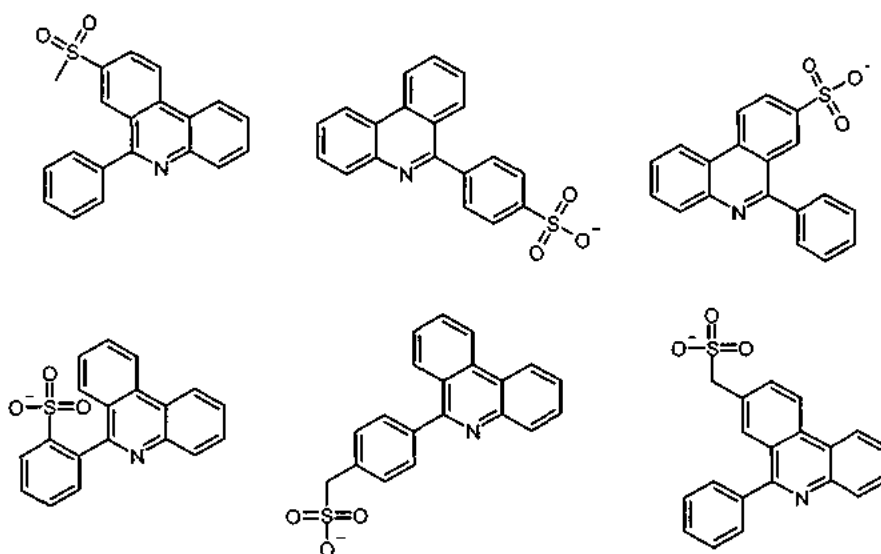
En una realización, uno a tres de R1 a R12 no son hidrógeno.

30 En una realización, el contraión es un catión de metal alcalino seleccionado entre el grupo que consiste en catión litio, catión sodio, catión potasio y catión cesio.

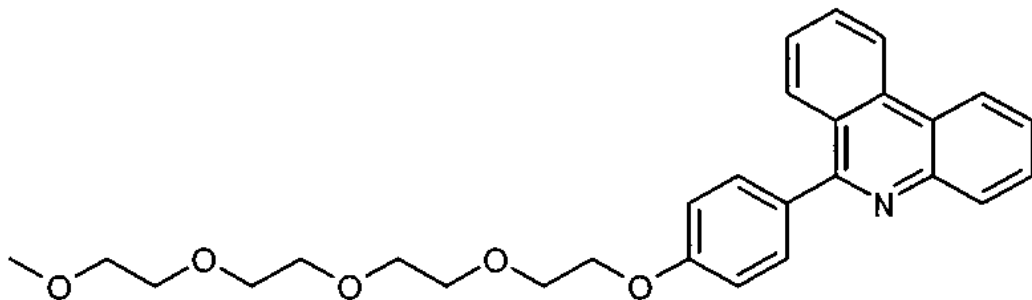
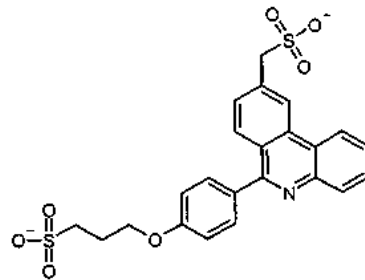
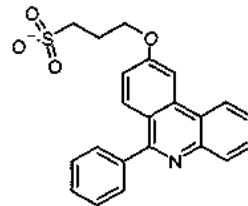
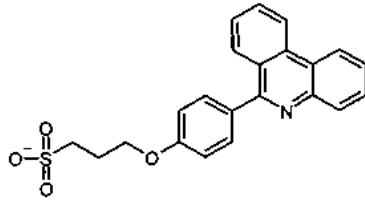
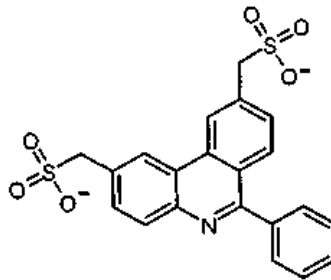
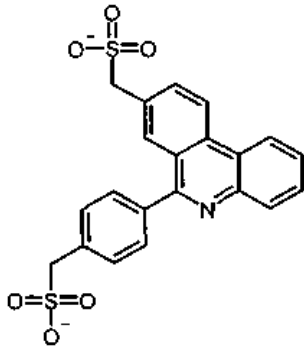
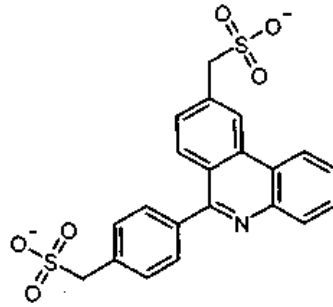
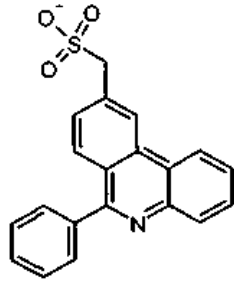
En una realización, el contraión es un catión de metal alcalino seleccionado entre el grupo que consiste en catión sodio y catión cesio

35 En una realización, el contraión es un catión cesio.

En una realización, los restos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) se seleccionan entre las siguientes fenilfenantridinas sustituidas dadas.



40



5 El término "conector", como se usa en el presente documento, tiene el significado conocido por el experto en la materia y se refiere a una molécula o grupo de moléculas que se usan para unir fragmentos de moléculas. Los conectores se caracterizan por tener dos o más funcionalidades químicamente ortogonales en una estructura flexible

o rígida. Un enlace covalente no es un conector en el sentido de la presente invención.

En el compuesto de acuerdo con la presente invención, el conector Q1 tiene preferentemente una longitud de cadena principal entre 1 y 200 átomos. Como entenderá fácilmente el experto en la materia, el conector Q1 de la Fórmula II comprende n sitios de ramificación a los que se une Q2. En otras palabras, la conexión más corta entre el anillo de piridilo de la Fórmula I (a) y el grupo funcional Y consiste en 1 a 200 átomos.

En una realización, Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

En el caso en el que esté presente un sistema de anillos, se toma el menor número de átomos del sistema de anillos cuando se evalúa la longitud del conector. A modo de ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos en un conector.

En una realización, el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C100 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

En una realización, el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C50 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

En una realización adicional, el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

En una realización, el conector Q1 en el complejo electroquimioluminiscente de la presente invención es una cadena de alquilo C1-C20 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir, sustituida, o una cadena de arilalquilo C1-C20 (en la que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos de carbono), o una cadena de 1 a 20 con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena de 1 a 20 átomos, o con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, que comprende al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en la que, por ejemplo, un grupo fenileno representa una longitud de cuatro átomos).

En una realización, el conector Q1 en un compuesto de acuerdo con la presente invención es una cadena de alquilo C1-C12 saturada, o una cadena de arilalquilo C1-C12, o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, que comprende al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en la que, por ejemplo, un grupo fenileno representa una longitud de cuatro átomos).

En una realización, el conector Q1 comprende una cadena de péptido.

En una realización, Q2 se selecciona entre el grupo que consiste en $-C_6H_4-(CH_2)_2-$ y $-C_6H_4-(CH_2)_2-CO-$.

La Fórmula I (b) y Q2 están presentes (n) veces en un compuesto de acuerdo con la Fórmula II siendo (n) un número entero de 1-50. Cada uno de estos (n) Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

5 En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C100 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

10 En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C50 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

15 En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

20 En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C12 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 12 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

25 En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C12 saturada o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos.

30 En una realización, el conector Q1 comprende uno o más aminoácidos.

En una realización, el conector Q2 comprende uno o más aminoácidos.

35 En una realización, ambos conectores Q1 y Q2 comprenden uno o más aminoácidos.

En una realización, el conector Q1 comprende uno o más nucleótidos.

40 En una realización, el conector Q2 comprende uno o más nucleótidos.

En una realización, ambos conectores Q1 y Q2 comprenden uno o más nucleótidos.

45 En la Fórmula II (n) es un número entero de 1-50, que indica que la Fórmula I (b) y Q2 están presentes (n) veces en el compuesto de acuerdo con la Fórmula II. En ciertas realizaciones (n) es un número entero de 2 a 50, o de 1 a 40, o de 2 a 40, o de 3 a 31.

50 En la Fórmula II (n) es un número entero de 1-50, que indica que la Fórmula I (b) y Q2 están presentes (n) veces en el compuesto de acuerdo con la Fórmula II. En ciertas realizaciones (n) es un número entero de 1 a 49, de 1 a 48, de 1 a 47, de 1 a 46, de 1 a 45, de 1 a 44, de 1 a 43, de 1 a 42, de 1 a 41, de 1 a 40, de 2 a 50, de 2 a 49, de 2 a 48, de 2 a 47, de 2 a 46, de 2 a 45, de 2 a 44, de 2 a 43, de 2 a 42, de 2 a 41, de 2 a 40, de 3 a 39, de 3 a 38, de 3 a 37, de 3 a 36, de 3 a 35, de 3 a 34, de 3 a 33, de 3 a 32, de 3 a 31, de 3 a 30, de 4 a 29, de 4 a 28, de 4 a 27, de 4 a 26, de 4 a 25, de 4 a 24, de 4 a 23, de 4 a 22, de 4 a 21, de 4 a 20, de 5 a 19, de 5 a 18, de 5 a 17, de 5 a 16, de 5 a 15, de 5 a 14, de 5 a 13, de 5 a 12, de 5 a 11, o de 5 a 10.

55 En una realización, en la Fórmula II, (n) es 1.

En una realización, en la Fórmula II, (n) es 2.

60 En una realización, en la Fórmula II, (n) es 3.

En una realización, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula II de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquínilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamido.

65

En una realización, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula II de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

- 5 En una realización preferente particular, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula II de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

- 10 Los presentes inventores han descubierto sorprendente e inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de Fórmula II son adecuados como marcas para futuros métodos de detección de alta sensibilidad basados en ECL.

- 15 En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula II, en la que la Fórmula I(a) y la Fórmula I(b) son iguales, excepto por Q1-Y en la Fórmula I(a) y Q2 en la Fórmula I(b), respectivamente, en la que en la Fórmula I(a) y en la Fórmula I(b), respectivamente, uno a tres de R1 a R12 son independientemente sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, o una sal del mismo (= sulfonato), en la que el contraión es preferentemente un catión del grupo de los metales alcalinos, y los demás grupos R1 a R12 son hidrógeno,

- 20 en la que uno de R13-R16 en la Fórmula I(b) es Q2, los demás grupos R13 a R16 en la Fórmula I(a) son hidrógeno, en la que Q1 es un conector y Q2 es un conector o un enlace covalente,

(n) es un número entero de 1 a 50, e

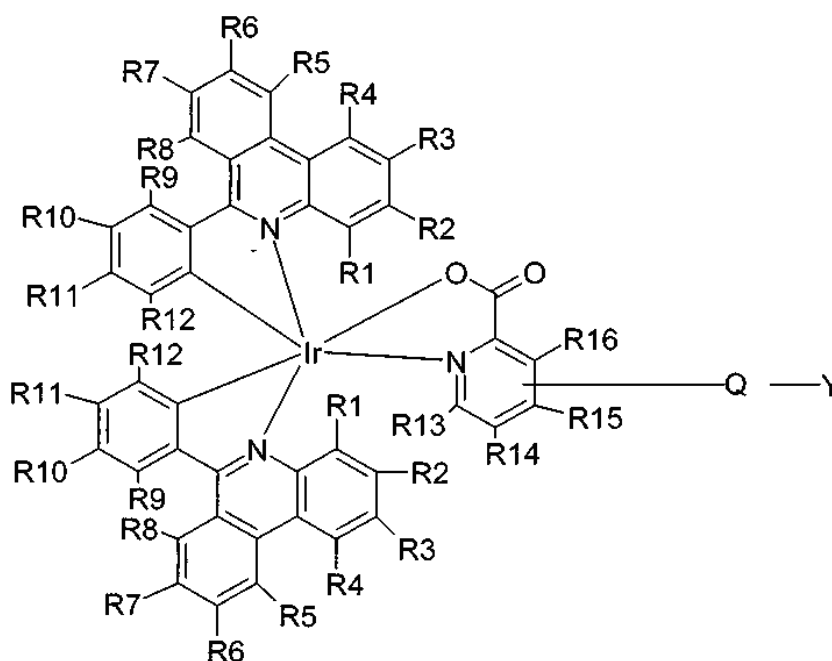
- 25 Y es un grupo funcional.

Cualquier combinación de cualquier realización de los compuestos de Fórmula II como se ha definido anteriormente se considera dentro del alcance de la invención.

- 30 Nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de Fórmula I

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la Fórmula I

FÓRMULA I



- 35 en la que R1-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido

- carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, amino-alquilo, amino-alquilo sustituido, amino-alcoxi, amino-alcoxi sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido, amino-ariloxi, amino-ariloxi sustituido,
- 5 en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,
- 10 en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,
- 15 en la que, si en cualquiera de R1-R17 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R17 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como un grupo amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietilenoxi, polipropilenoxi, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 20 en la que alquilo como se usa en el presente documento es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S, en la que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,
- 25 en la que al menos uno de R13-R16 es -Q-Y, en la que Q-Y es maleimida o en la que Q es un enlace covalente, o una cadena de alquilo C21-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 21 a 200 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos y en la que Y es un grupo funcional.
- 30
- 35
- 40 Un compuesto de Fórmula I, Fórmula I (a) y Fórmula I (b), respectivamente, comprende dos ligandos derivados de fenilfenantridina como se definen mediante las definiciones dadas para la Fórmula I y un tercer ligando.
- En otras realizaciones, R1 a R17 tienen los mismos significados que se han descrito anteriormente para R1 a R17 de los compuestos de Fórmula II.
- 45 En una realización, Q-Y es maleimida.
- En una realización, Q es un enlace covalente.
- 50 En una realización, Q es una cadena de alquilo C21-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 21 a 200 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 55 En una realización, Q es una cadena de alquilo C21-C100 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 21 a 100 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 60 En una realización, Q es una cadena de alquilo C21-C50 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 21 a 50 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 65

En una realización, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

5 En una realización, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

10 En una realización preferente particular, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio de Fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

15 Cualquier combinación de cualquier realización de los compuestos de Fórmula I como se ha definido anteriormente se considera que está dentro del alcance de la invención.

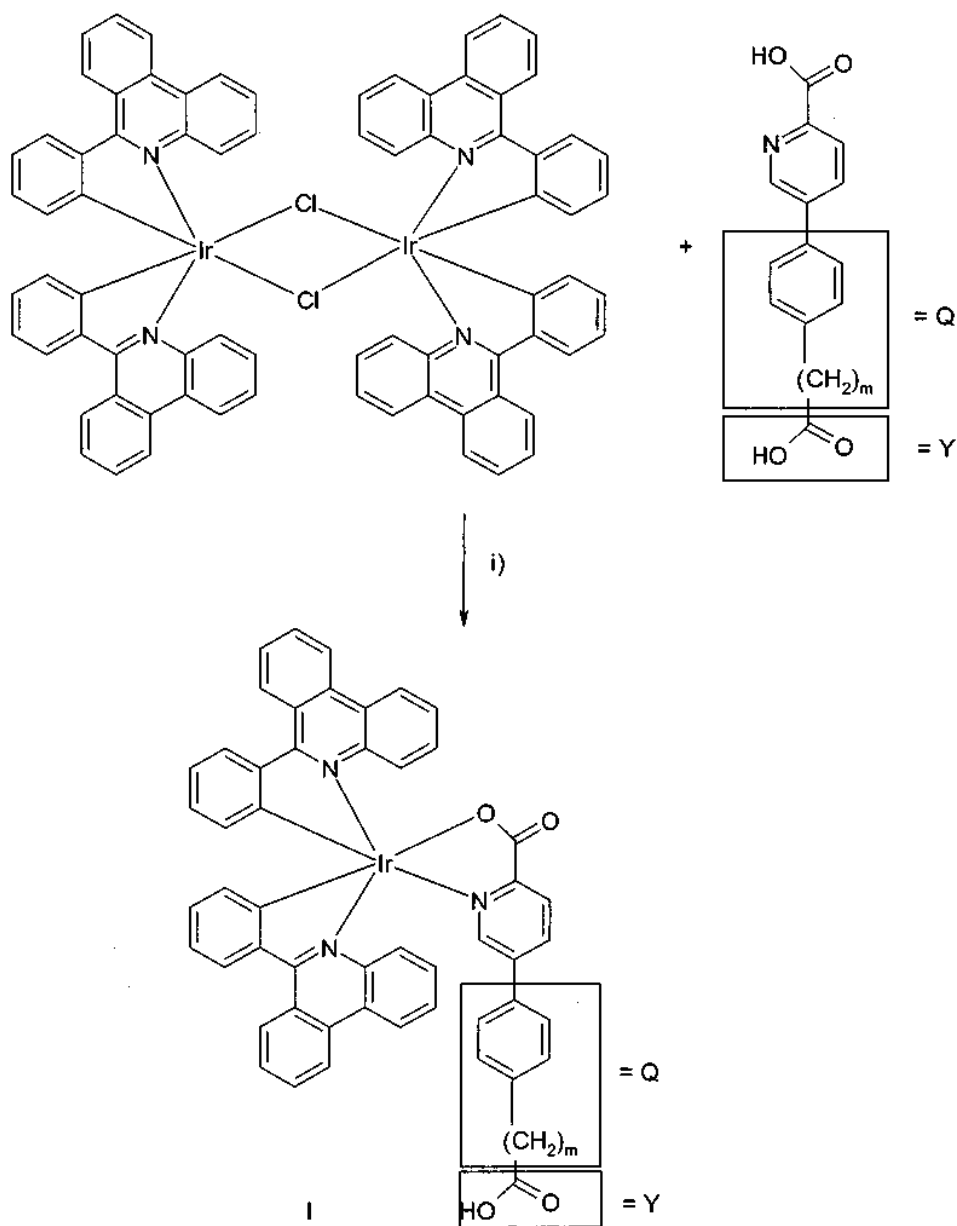
Los presentes inventores han descubierto sorprendente e inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de Fórmula I son adecuados como marcas para futuros métodos de detección de alta sensibilidad basados en ECL.

20 Procesos para la preparación de compuestos de Fórmula II y I

La invención, en un aspecto, se refiere a nuevos procesos para la preparación de compuestos de Fórmula I y compuestos de Fórmula II, respectivamente.

25 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula I se pueden sintetizar, por ejemplo, (basándose en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711) como sigue a continuación: síntesis del complejo de iridio dímero de fenil-fenantridina sustituida; reacción de este dímero con un precursor de Q-Y para dar un producto de acuerdo con la Fórmula I.

30 De acuerdo con este proceso, los compuestos de Fórmula I se pueden obtener, por ejemplo, como se muestra en el siguiente Esquema 1.



Esquema 1: síntesis de un compuesto de Fórmula I. Reactivos y condiciones:

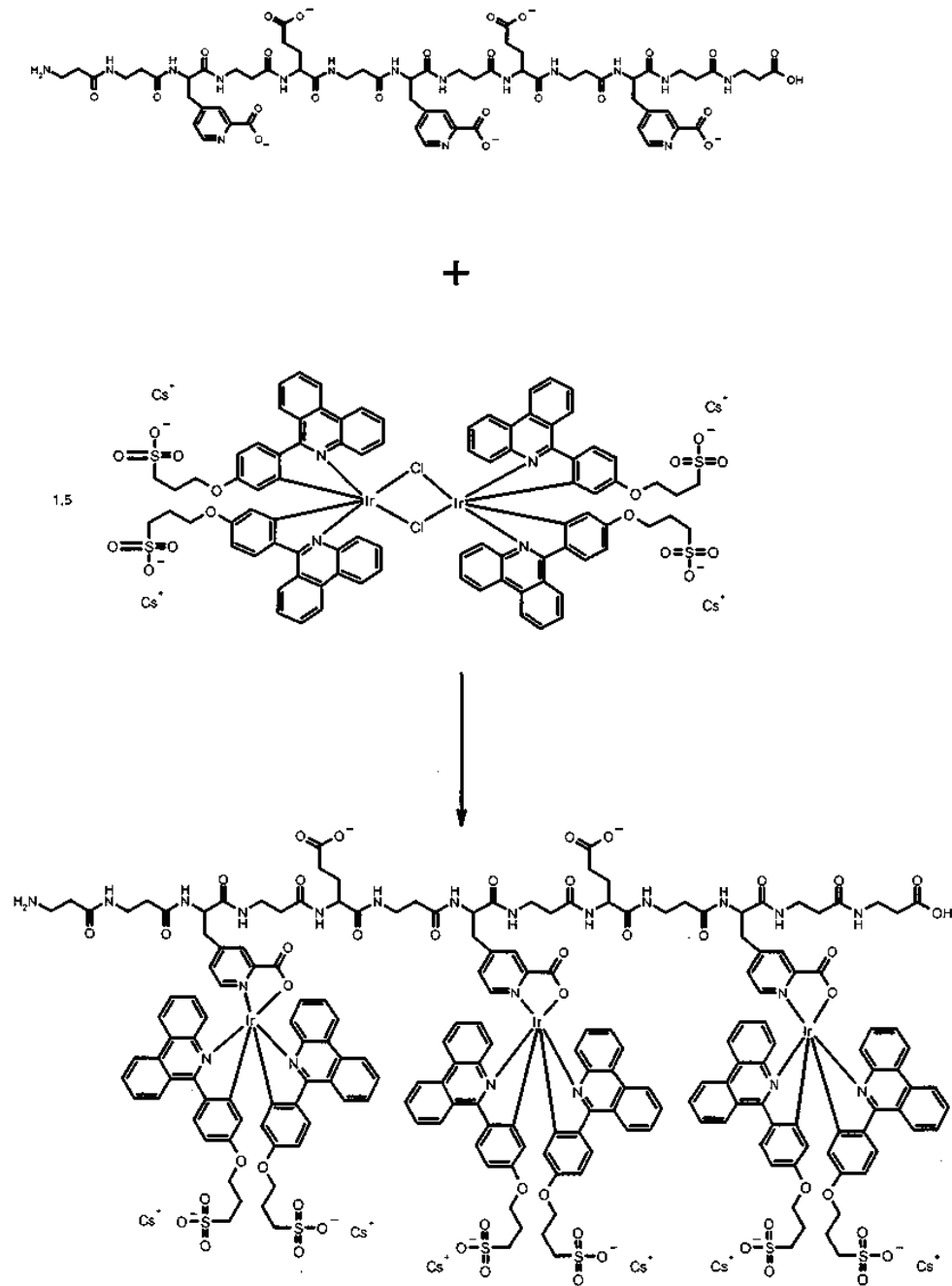
(i): Na₂CO₃/2-etoxietanol; m es un número entero de 1 a 15.

El complejo de iridio dímico de fenil-fenantridina sustituida usado como material de partida se puede obtener mediante un proceso como se muestra en los Ejemplos (véase el Ejemplo 2) y como se describe, por ejemplo, en el documento de Patente EP 12179056.2.

Los compuestos que se usan como materiales de partida para la preparación de complejos de iridio dímico de fenil-fenantridina están disponibles en el mercado o se pueden obtener mediante procesos conocidos por los expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos (véase el Ejemplo 1).

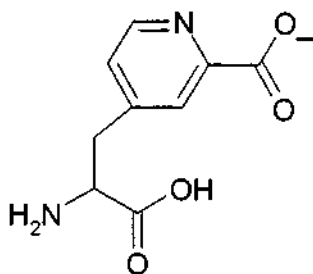
Los compuestos de acuerdo con la Fórmula II se pueden sintetizar, por ejemplo, (basándose en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711) como sigue a continuación: síntesis del complejo de iridio dímico de fenil-fenantridina sustituida; reacción de este dímico con un precursor del conector Q que contiene 2-50 restos de tercer ligando para dar un producto de acuerdo con la Fórmula II.

De acuerdo con este proceso, los compuestos de Fórmula (II) se pueden obtener, por ejemplo, como se muestra en el siguiente Esquema 2.



Esquema 2: síntesis de un compuesto de Fórmula II. Reactivos y condiciones: (i): Cs_2CO_3 , DMF;

En el compuesto $\text{NH}_2\text{-UUXUEUXUEUXUU-OH}$, U es un resto de beta-alanina, E es un resto de ácido glutámico y X es el siguiente resto:



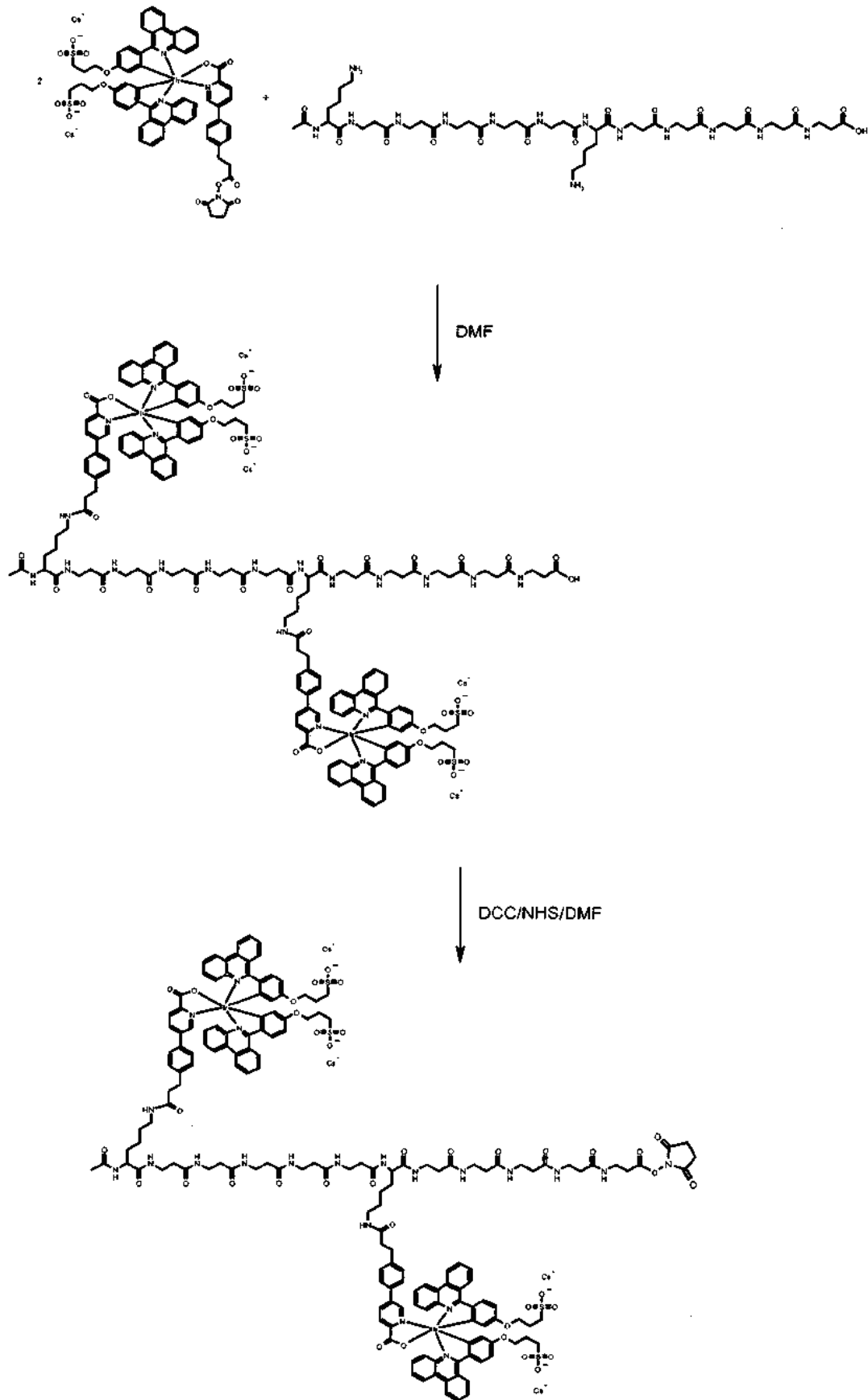
(2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina.

5 El complejo de iridio dímero de fenil-fenantridina sustituida usado como material de partida se puede obtener mediante procesos conocidos por los expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos (véase el Ejemplo 2).

10 Los compuestos que se usan como materiales de partida para la preparación de complejos de iridio dímero de fenil-fenantridina están disponibles en el mercado o se pueden obtener mediante procesos conocidos por los expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos (véase el Ejemplo 1).

15 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula II también se pueden sintetizar de otra forma: el complejo de iridio dímero de fenil-fenantridina sustituida (véase, por ejemplo, el ejemplo 2.2) se hace reaccionar en primer lugar además con un derivado del tercer ligando que contiene un grupo funcional (-Q-)Z para dar como resultado un complejo de iridio monomérico. Se da un complejo de iridio monomérico, por ejemplo, en la Fórmula I. Sin embargo, para su uso en la síntesis de un complejo de acuerdo con la Fórmula II, el compuesto que se da en la Fórmula I incluirá además aquellos en los que el conector Q es Q2 como se define para la Fórmula II. El complejo de iridio monomérico se hace reaccionar a continuación además con un precursor de Q2 que contiene 2-50 grupos que se pueden hacer reaccionar con el grupo funcional del complejo de iridio monomérico para formar enlaces covalentes; de esta forma se obtiene, después de la formación de enlaces covalentes nuevamente, un compuesto de acuerdo con la Fórmula II.

25 De acuerdo con este proceso, los compuestos de Fórmula II se pueden obtener, por ejemplo, como se muestra en el siguiente Esquema 3.



Esquema 3: síntesis de un compuesto de Fórmula II

Conjugados que comprenden los nuevos compuestos de Fórmula II o Fórmula I y aspectos adicionales de la invención

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente basado en iridio de Fórmula II, o de Fórmula I, respectivamente, como se desvelado y definido anteriormente en el presente documento y, unido covalentemente a este, una sustancia biológica. Algunos ejemplos de sustancias biológicas son células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, 10 vitaminas, aminoácidos y azúcares.

En una realización, la sustancia biológica de un conjugado de acuerdo con la presente invención, es decir, unida covalentemente a un compuesto de acuerdo con la Fórmula II, o la Fórmula I, respectivamente, es un agente de unión por afinidad. Un agente de unión por afinidad es la molécula capaz de unión molecular a otra molécula debido 15 a una interacción atractiva entre estas moléculas que da como resultado una asociación estable en la que las moléculas están cerca la una de la otra. El resultado de la unión molecular es la formación de un complejo molecular. La unión atractiva entre los componentes de un complejo es normalmente más débil que un enlace covalente. En el presente caso, el agente de unión es un agente de unión por afinidad, lo que significa que es capaz de unir un complejo por afinidad, es decir, un complejo estable en las condiciones respectivas, por ejemplo medio 20 acuoso en condiciones convencionales. Las moléculas que pueden participar en la unión molecular incluyen, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, y moléculas orgánicas pequeñas tales como fármacos. Por lo tanto, los tipos de complejos que forman como resultado de la unión molecular incluyen: proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-hormona, proteína-fármaco, antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-avidina o estreptoavidina, ácido nucleico-ácido nucleico complementario o receptor-(ant)agonista de receptor.

25 Como entenderá el experto la materia, en un conjugado de acuerdo con la presente invención, el grupo funcional Y del compuesto de acuerdo con la Fórmula II, o la Fórmula I, respectivamente, se ha usado para formar un enlace covalente con un grupo del agente de unión por afinidad y ya no está presente como tal. En el caso en que un reactivo de unión por afinidad no contuviera en el mismo un grupo apropiado para unirse o reaccionar con el grupo Y, tal grupo se puede introducir fácilmente en el agente de unión por afinidad basándose en procedimientos bien establecidos. 30

En un aspecto, la presente invención se refiere a la preparación de un conjugado por reacción del grupo funcional Y de un compuesto de Fórmula II o de Fórmula I, respectivamente, con un grupo reactivo apropiado de un agente de unión por afinidad como se define en el presente documento con el grupo funcional Y. El experto en la materia puede llevar a cabo este proceso usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. 35

En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado obtenible mediante el proceso para la preparación de un conjugado descrito anteriormente. 40

Sin el deseo de quedar limitados, pero en aras de la claridad, el agente de unión por afinidad puede comprender cualquiera de los siguientes; un antígeno, una proteína, un anticuerpo, biotina o un análogo de biotina y avidina o estreptoavidina, azúcar y lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un 45 polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista de receptor, o un antagonista de receptor. Por ejemplo, el agente de unión por afinidad puede ser un compañero de un par de unión específico, donde el otro compañero de dicho par de unión está asociado a o es la diana de una superficie celular o una estructura intracelular.

50 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de Fórmula II o Fórmula I, respectivamente, y un agente de unión por afinidad unido a este seleccionado entre el grupo que consiste en una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, estreptoavidina, azúcar, lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un 55 agonista de receptor, y un antagonista de receptor.

Preferentemente, un agente de unión por afinidad es un compañero o miembro de un par de unión por afinidad o, como también denomina el experto en la materia, un compañero o miembro de un par de unión específico.

60 Un agente de unión por afinidad tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol por su diana, por ejemplo, un miembro de un par de unión específico, tal como un anticuerpo, por el otro miembro del par de unión específico, tal como su antígeno. Un agente de unión por afinidad tiene preferentemente una afinidad de 10^8 l/mol o incluso más preferentemente de 10^9 l/mol por su diana.

65 En una realización, la presente invención se refiere a un conjugado en el que el agente de unión por afinidad se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno, anticuerpo, biotina o análogo de biotina, avidina o

estreptoavidina, azúcar, lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario, receptor y ligando.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un conjugado en el que el agente de unión por afinidad se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpo, biotina o análogo de biotina, avidina o estreptoavidina, y ácido nucleico.

10 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de Fórmula II o Fórmula I y una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, estreptoavidina, azúcar, lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista de receptor, o un antagonista de receptor.

15 En una realización, el conjugado de acuerdo con la presente invención comprende unido covalentemente un compuesto de acuerdo con la Fórmula II, o la Fórmula I, respectivamente, como se ha desvelado y definido anteriormente en el presente documento, y un agente de unión por afinidad que es un oligonucleótido o un anticuerpo.

20 Los análogos de biotina son aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina.

25 El término "oligonucleótido" o "ácido nucleico" como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, que comprenden al menos 8 nucleótidos y como máximo aproximadamente 1000 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido tendrá una longitud de al menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 o 30 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido tendrá una longitud de no más de 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos.

El término oligonucleótido se ha de entender ampliamente e incluye ADN y ARN así como análogos y modificaciones de los mismos.

30 Un análogo de ácido nucleico puede contener, por ejemplo, un nucleótido sustituido que porta un sustituyente en las bases desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitosina (dC), desoxitimidina (dT), desoxiuracilo (dU) convencionales. Algunos ejemplos de tales bases nitrogenadas sustituidas son: pirimidinas 5-sustituidas tales como 5-metil-dC, aminoalil-dU o dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o dC, dU o dC 5-halogenada; pirimidinas N-sustituidas tales como N4-etil-dC; purinas N-sustituidas tales como N6-etil-dA, N2-etil-dG; purinas 8-sustituidas tales como 8-[6-amino)-hex-1-il]-8-amino-dG o dA, dA o dG 8-halogenada, 8-alquil-dG o dA; y dA 2-sustituida tal como 2-amino-dA.

35

40 Un análogo de ácido nucleico puede contener un nucleótido o un análogo de nucleósido. Es decir, las bases nitrogenadas de origen natural se pueden intercambiar usando análogos de bases nitrogenadas tales como 5-nitroindol-d-ribósido; 3-nitro-pirrol-d-ribósido, desoxiinosina (dI), desoxixantosina (dX); 7-desaza-dG, dA, dI o dX; 7-desaza-8-aza-dG, dA, dI o dX; 8-aza-dA, dG, dI o dX; d-formicina; pseudo dU; pseudo iso-dC; 4-tio-dT; 6-tio-dG; 2-tio-dT; iso-dG; 5-metil-iso-dC; 8-aza-7-desaza-dA unida en N8; 5,6-dihidro-5-aza-dC; y eteno-dA o pirrolo-dC. Como resulta obvio para el experto en la materia, la base nitrogenada de la hebra complementaria se ha de seleccionar de un modo tal que la formación de la doble hebra sea eficaz. Si, por ejemplo, se usa 5-metil-iso-dC en una hebra (por ejemplo, (a)), tiene que estar iso-dG en la hebra complementaria (por ejemplo, (a')).

45

En un análogo de ácido nucleico, la cadena principal del oligonucleótido se puede modificar para que contenga restos de azúcar sustituido, análogos de azúcares, modificaciones en el resto fosfato internucleósido, y/o sea un PNA.

50

Un oligonucleótido puede contener, por ejemplo, un nucleótido con una desoxirribosa sustituida tal como 2'-metoxi, 2'-fluro, 2'-metilseleno, 2'-aliloxi, 4'-metil-dN (en el que N es una base nitrogenada, por ejemplo, A, G, C, T o U).

55 Algunos análogos de azúcares son, por ejemplo, xilosa; ribosa con un puente 2',4' tal como (2'-O, 4'-C metilen)-(oligómero conocido como LNA) o (2'-O, 4'-C etilen)-(oligómero conocido como ENA); L-ribosa, L-d-ribosa, hexitol (oligómero conocido como HNA); ciclohexenilo (oligómero conocido como CeNA); altritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclico donde los átomos C3' y C5' están conectados por un puente de etileno que está condensado a un anillo de ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN); glicerina (oligómero conocido como GNA); glucopiranososa (oligómero conocido como Homo ADN); carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de una unidad de tetrahidrofurano); hidroximetil-morfolina (oligómeros conocidos como morfolino ADN).

60

También se conoce un gran número de modificaciones del resto de fosfato internucleosídico que no interfiere en las propiedades de hibridación y tales modificaciones de la cadena principal también se pueden combinar con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótidos. Algunos ejemplos son fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato y metilfosfonato oligonucleótidos.

65

Un PNA (que tiene una cadena principal sin fosfato ni d-ribosa) también se puede usar como un análogo de ADN.

Los nucleótidos modificados, los análogos de nucleótido así como las modificaciones de la cadena principal del oligonucleótido mencionados anteriormente se pueden combinar según se desee en un oligonucleótido en el sentido de la presente invención.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos di-específicos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente que es su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en los usos en investigación, diagnóstico o terapéutico del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) más de un 95 % en peso del anticuerpo según se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry, y en algunas realizaciones, más de un 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción azul de Coomassie o de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes dado que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente, el anticuerpo aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intercadenas separados regularmente. Cada cadena pesada tiene al menos en un extremo un dominio variable (VH) seguido de diversos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren considerablemente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes con mayor grado de conservación de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina beta. Los HVR de cada cadena se mantienen juntos en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con los HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se puede asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de las unidades de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen en términos generales, por ejemplo, en Abbas *et al.*, Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed., W.B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo a una o más proteínas o péptidos distintos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no los fragmentos de anticuerpo que se definen posteriormente. Las expresiones se refieren particularmente un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno individual, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de unión cruzada a antígeno.

"Fv" es fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de doble cadena consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en fuerte asociación no covalente. En una especie Fv de cadena individual (scFv), un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente mediante un conector peptídico flexible de un modo tal que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de la especie Fv de doble cadena. Es en esta configuración en la que los tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad menor que la del sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para un Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena individual" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido individual. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994) pp. 269-315.

El término "dianticuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (VH) de cadena pesada conectado a un dominio variable (VL) de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Mediante el uso de un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los dianticuerpos pueden ser divalentes o diespecíficos. Los dianticuerpos se describen de forma más completa, por ejemplo, en los documentos de Patente EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. *et al.*, *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, *PNAS USA* 90 (1993) 6444-6448. También se han descrito trianticuerpos y tetraanticuerpos en Hudson, P.J. *et al.*, *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. De ese modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, al anticuerpo monoclonal incluye por lo general un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptido de unión a diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia de polipéptido de unión a diana individual entre una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon entre una pluralidad de clones, tal como una mezcla de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Se debería entender que una secuencia de unión a diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal, que por lo general incluyen diferentes

anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante individual en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en que por lo general no están contaminadas con otras inmunoglobulinas.

5 Como se ha mencionado, los compuestos y conjugados que se desvelan en el presente documento tienen propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados desvelados, respectivamente, muestran una alta eficacia de ECL. Esta alta eficacia también está presente si las correspondientes mediciones se llevan a cabo en un sistema acuoso en comparación con las numerosas marcas de ECL que solo han mostrado una
10 alta eficacia de ECL cuando se analizan en un disolvente orgánico. Por ejemplo, numerosos colorantes de OLED se analizan habitualmente en acetonitrilo y no son solubles en una solución acuosa o, si son solubles, no muestran una electroquimioluminiscencia eficaz en solución acuosa.

15 En una realización preferente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como se desvela en la presente invención, para llevar a cabo una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa. Una solución acuosa es cualquier solución que comprende al menos un 90 % de agua (peso/peso). Obviamente tal solución acuosa puede contener además ingredientes tales como compuestos tampón, detergentes y, por ejemplo, aminas terciarias tales como tripropilamina como donador de electrones en la reacción de ECL.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como se desvela en la presente invención, en un método de detección basado en electroquimioluminiscencia.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como se desvela en la presente invención, en la detección de un analito.

30 Un analito de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula inorgánica u orgánica, incluyendo cualquier sustancia biológica de interés. Algunos ejemplos de sustancias biológicas adecuadas que representan un analito en el sentido de la presente invención son células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

35 El analito se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un polipéptido, un carbohidrato, y una molécula farmacológica inorgánica u orgánica.

40 Un polipéptido o proteína es una molécula que está compuesta básicamente por aminoácidos y que tiene al menos dos aminoácidos unidos mediante una unión peptídica. En el caso en que el analito de interés se investigue en un método desvelado en el presente documento, el polipéptido consistirá preferentemente en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, y 30 hasta aproximadamente 10.000 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido contendrá de 5 a 2.000, también preferentemente de 10 a 1.000 aminoácidos.

45 En el caso en el que el analito sea un ácido nucleico, estos ácidos nucleicos son preferentemente oligonucleótidos de ADN o ARN de origen natural.

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para medir un analito mediante un método *in vitro*, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una muestra que se sospecha o se sabe que comprende el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo entre un agente de unión por afinidad y un compuesto de acuerdo con la Fórmula II como se desvela en la presente invención en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de analito y conjugado, (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de ese modo una medida del analito.

En una realización, medir un analito significa detectar la cantidad de un analito en una muestra.

55 En una realización, la medición del método anterior para detección de un analito se lleva a cabo usando un procedimiento de detección basado en electroquimioluminiscencia. También es preferente que el método se ponga en práctica en una solución acuosa.

60 Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de fenil-fenantridinas sustituidas

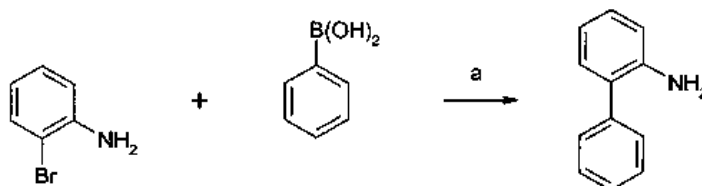
65

Ejemplo 1.1

Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

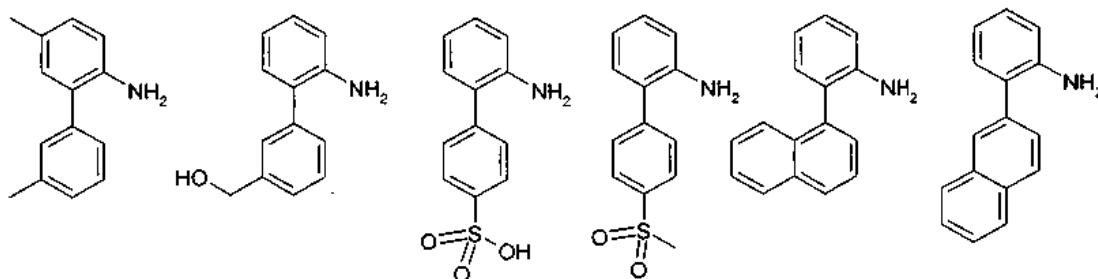
- 5 Con la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura que describe Youn, S.W., en *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 4598-4601, entre derivados de 2-bromoanilina disponibles en el mercado y el correspondiente ácido arilborónico, se pueden sintetizar los 2-aminobifenilos apropiados, que se requieren para las reacciones adicionales que conducen a fenantridinas.

- 10 Procedimiento habitual:



15 a: PdCl₂(PPh₃)₂ al 10 % en moles, K₂CO₃, DMF/H₂O(5/1), 80 °C, 24 h

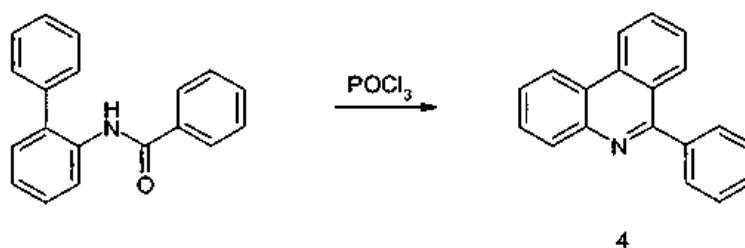
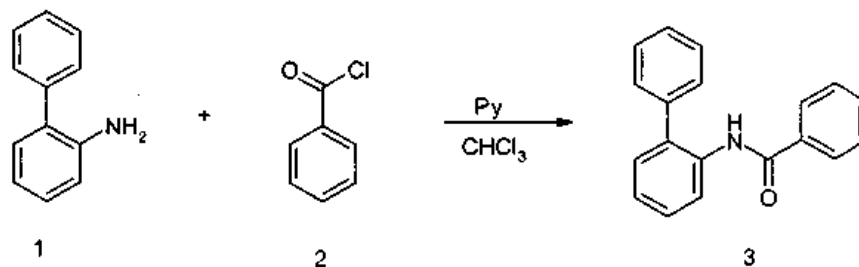
Otros ejemplos:

20 Ejemplo 1.2

Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

- 25 A una solución enfriada en hielo de la 2-amilanilina 1 (0,01 mol) en cloroformo (20 ml) se añadió cloruro de arilácido 2 (0,01 mol) y se agitó en condiciones inertes durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo con agitación durante las siguientes 2 horas. La mezcla de reacción se trató mediante la adición gota a gota de piridina (0,02 mol en 10 ml cloroformo) durante un periodo de 60 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La mezcla se lavó bien con HCl 0,5 M, se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, con hexano/acetato de etilo 3:2 para dar el producto puro 3 con un 66 % de rendimiento.

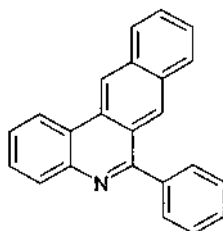
- 35 Se calentaron a reflujo el benzamido-2-bifenilo 3 (0,01 mol) y POCl₃ (5 ml) en 20 ml de tolueno y se agitaron en atmósfera de nitrógeno durante 18 horas, siguiendo el procedimiento que se describe en Lion, C, en *Bull. Soc. Chim. Belg.* 98 (1989) 557-566. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con CH₂Cl₂ (30 ml) y se vertió en hielo, y se lavó con NH₄OH al 25 % y agua destilada. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío, seguido de cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 1:1) para dar el producto de 4,6-fenilfenantridina.



Rendimiento: 52 %. Sólido de color blanco. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,54-7,85 (m, 9H), 8,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,28 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,67 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H).

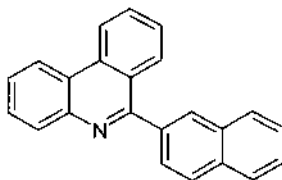
5

Usando 2-naftalen-2-il-fenilamina en lugar de 2-aril-anilina se produce:



10 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,64 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H), 8,29 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 8,92$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 7,48$ Hz, 1H), 7,79-7,75 (m, 2H), 7,69 (t, $J = 14,0, 8,2$ Hz, 1H), 7,63-7,61 (m, 2H), 7,53-7,46 (m, 4H), 7,19 (t, $J = 14,3, 7,2$ Hz, 1H).
MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ 306,3$.

15 Usando cloruro de naftaleno-carbonilo en lugar de cloruro de ácido de fenilo se produce:



20 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,74 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,65 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,97-7,94 (m, 2H), 7,90-7,85 (m, 2H), 7,80-7,69 (m, 2H), 7,62 (t, $J = 14,2, 7,1$ Hz, 1H), 7,59-7,55 (m, 2H).
MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ 306,3$.

Ejemplo 1.3

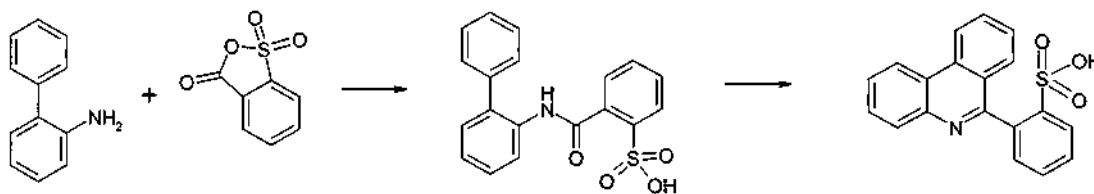
25

Procedimiento para la síntesis de 6-(2-sulfofenil)fenantridina

La 6-(2-sulfofenil)fenantridina se puede sintetizar mediante calentamiento suave de arilanilina (0,01 mol) con anhídrido cíclico de ácido 2-sulfobenzoico (0,01 mol) en CH_3CN durante 6 horas usando el procedimiento que se describe en Nicolai, E., en Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1617-1630.

30

Después de la purificación, el producto se puede convertir en la fenantridina apropiada basándose en el método que se describe en el ejemplo 1.2.



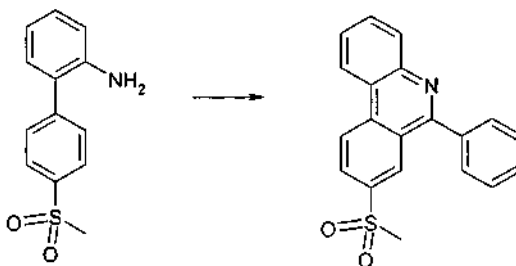
5

Ejemplo 1.4

Procedimiento para la síntesis de 6-fenil-alkilsulfonil fenantridina

- 10 La 6-fenil-alkilsulfonil fenantridina se puede sintetizar por calentamiento suave de alkilsulfonil-arilanilina (0,01 mol) con cloruro de ácido benzoico (0,01 mol) en cloroformo usando el procedimiento que se describe en Lion, C, en Bull. Soc. Chim. Belg. 98 (1989) 557-566, véase el ejemplo 1.2.

- 15 Después de la purificación, el producto se puede convertir en la fenantridina apropiada basándose en el método que se describe en el ejemplo 1.2.



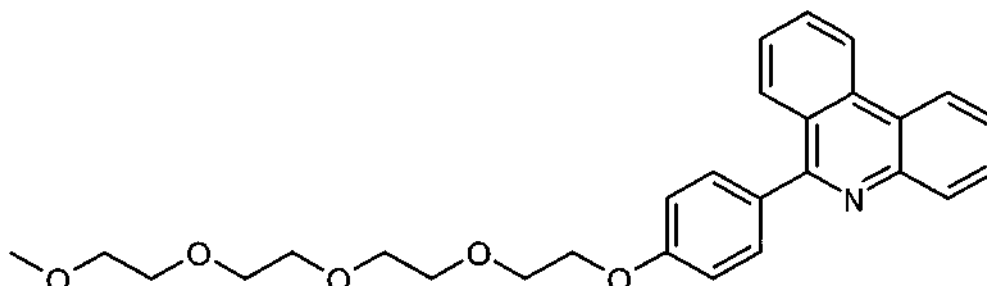
- 20 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,92 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,75 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 8,68 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 8,35 (dd, J = 8,7, 2,0 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,89 (t, J = 15,3, 7,1 Hz, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,64-7,56 (m, 3H) 3,12 (s, 3H).
MS: [M + H]⁺ 334,3.

- 25 La 6-(4-metilsulfofenil)fenantridina también se puede preparar siguiendo el procedimiento que se describe en Cymerman, J., en J. Chem. Soc. (1949) 703-707.

Ejemplo 1.5

Síntesis de 6-[4-(2-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina

30



Síntesis de tosilato de 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol:

Procedimiento: (JACS, 2007, 129, 13364) a una solución de 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol (7 g, 33,6 mmol) y trietilamina (4,9 ml, 35,3 mmol) en CH_2Cl_2 seco (100 ml), se añadieron cloruro de 4-toluenosulfonilo (6,7 g, 35,3 mmol) y DMAP (120 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se lavó con 80 ml de HCl (1 M) y a continuación agua. El extracto se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró, y el filtrado se evaporó. El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento: 11,0 g (90 %).

RMN:

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,75 - 7,64 (m, 2H), 7,31 - 7,26 (m, 2H), 4,16 - 4,06 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 3,59 - 3,40 (m, 10H), 3,30 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 144,75 (s), 132,90 (s), 129,77 (s), 127,8 (s), 71,82 (s), 70,60 (s), 70,48 (s), 70,47 (s), 70,41 (s), 70,39 (s), 69,23 (s), 68,55 (s), 58,90 (s), 21,53 (s).

Síntesis de éster de etilo del ácido 4-PEG4-benzoico:

Procedimiento: (JACS 129 (2007) 13364) una mezcla del compuesto 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il 4-metilbencenosulfonato de etilo (8,1 g, 22,3 mmol), éster de etilo del ácido 4-hidroxibenzoico (3,7 g, 22,3 mmol), K_2CO_3 (15,4 g, 111,5 mmol) y 18-corona-6 (0,59 g, 2,2 mmol) se calentó a reflujo en acetona (120 ml) durante 22 h. La mezcla de reacción se concentró y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con H_2O , se secó sobre MgSO_4 anhidro, y se filtró. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (diclorometano/metanol = 100:1) para obtener el compuesto (1,93 g, 88 %).

Rendimiento: 7 g (88 %).

RMN:

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,01 - 7,84 (m, 2H), 6,96 - 6,85 (m, 2H), 4,29 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,12 (dd, $J = 5,4, 4,3$ Hz, 2H), 3,82 (dd, $J = 5,4, 4,2$ Hz, 2H), 3,71-3,56 (m, 10H), 3,51-3,45 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 1,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166,29 (s), 162,47 (s), 131,45 (s), 123,01 (s), 114,11 (s), 71,90 (s), 70,84 (s), 70,60 (s), 70,59 (s), 70,58 (s), 70,48 (s), 69,51 (s), 67,54 (s), 60,57 (s), 58,98 (s), 14,35 (s).

MS(+):

$[\text{M} + \text{Na}]^+ = \text{calc. } 379,1727, \text{ encontrado } 379,1743.$

Síntesis de ácido 4-PEG4-benzoico:

Procedimiento: (JACS, 2007,129,13364) una mezcla del compuesto 4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoato de etilo (7 g, 19,6 mmol) y KOH (2,3 g, 41,24 mmol) en 200 ml de $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) se calentó a reflujo durante una noche. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con HCl (2 N). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc y se evaporó hasta sequedad. El sólido de color blanco resultante se recrystalizó en EtOAc/hexano.

Rendimiento: 5,3 g (85 %).

RMN:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 11,17 (s, 1H), 8,14 - 7,89 (m, 2H), 7,03 - 6,75 (m, 2H), 4,29 - 4,02 (m, 2H), 3,92 - 3,81 (m, 2H), 3,78 - 3,57 (m, 10H), 3,57 - 3,46 (m, 2H), 3,35 (s, 3H).

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 171,46 (s), 163,24 (s), 132,30 (s), 121,98 (s), 114,33 (s), 71,96 (s), 70,91 (s), 70,67 (s), 70,66 (s), 70,64 (s), 70,54 (s), 69,55 (s), 67,66 (s), 59,08 (s).

MS(-):

$[\text{M} - \text{H}]^- = \text{calc. } 327,1438, \text{ encontrado } 327,1456.$

Síntesis de N-bifenil-2-il-4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-benzamida:

Procedimiento: a una solución de ácido 4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoico (3 g, 9,14 mmol), 0,2 ml de DMF en 30 ml de DCM seco a 0 °C, se añadió cloruro de oxalilo (1,05 ml, 12,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La solución se concentró hasta sequedad. El residuo aceitoso se usó sin purificación

adicional en la siguiente etapa.

Una solución de 2-fenilnilina (1,6 g), piridina (2,4 ml) en cloroformo (80 ml) en atmósfera inerte se enfrió a 0 °C. Se añadió lentamente cloruro de (fenil-4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoílo) (3,1 g, 9,14 mmol) en 20 ml a la solución y se dejó que la mezcla final alcanzara la temperatura ambiente. La solución se calentó a reflujo durante 2 h y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con HCl (1 M, 2 x 100 ml), NaHCO₃ (100 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/hexano).

Rendimiento: 4,1 (90 %).

RMN:

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,49 (dd, *J* = 8,3, 0,9 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,61 - 7,35 (m, 9H), 7,33 - 7,25 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 6,91 - 6,84 (m, 2H), 4,16 - 4,10 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,77 - 3,58 (m, 10H), 3,56 - 3,49 (m, 2H), 3,36 (s, 3H).

RMN ¹³C{¹H} (101 MHz, CDCl₃) δ 164,56 (s), 161,65 (s), 138,18 (s), 135,12 (s), 132,32 (s), 129,97 (s), 129,39 (s), 129,22 (s), 128,66 (s), 128,57 (s), 128,16 (s), 127,13 (s), 124,18 (s), 121,23 (s), 114,57 (s), 71,95 (s), 70,89 (s), 70,64 (s), 70,63 (s), 70,54 (s), 69,54 (s), 67,63 (s), 59,04 (s), 53,51 (s).

MS(+)

[M + H]⁺ = calc. 480,2386, encontrado 480,2383; [M + Na]⁺ = calc. 502,2200, encontrado 502,2204.

Síntesis de 6-[4-(2-[2-(2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina:

Procedimiento: se calentaron a reflujo N-bifenil-2-il-4-(2-[2-(2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-benzamida (4 g, 8,34 mmol), y POCl₃ (10 ml) en 10 ml de tolueno durante 20 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se añadieron 100 ml de diclorometano. La solución se vertió en hielo y la mezcla se neutralizó con NH₄OH (20 %). La fase orgánica se extrajo y se lavó sucesivamente con agua destilada y solución salina saturada, y se secó sobre MgSO₄. La solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, en acetato de etilo/hexano 1:1, *f_R* = 0,14).

Rendimiento: 1 g (25 %).

RMN:

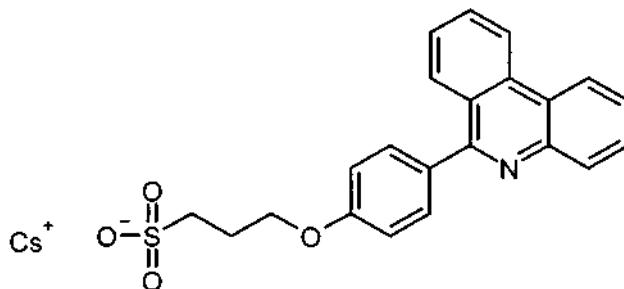
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,59 (dd, *J* = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 8,23 (dd, *J* = 8,1, 1,1 Hz, 1H), 8,15 (dd, *J* = 8,3, 0,7 Hz, 1H), 7,84 (ddd, *J* = 8,3, 7,1, 1,3 Hz, 1H), 7,79 - 7,57 (m, 5H), 7,15 - 7,03 (m, 2H), 4,29 - 4,19 (m, 2H), 3,93-3,90 (m, 2H), 3,80 - 3,60 (m, 12H), 3,59 - 3,49 (m, 2H), 3,37 (s, 3H).

RMN ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃) δ 160,92 (s), 159,45 (s), 143,84 (s), 133,59 (s), 131,26 (s), 130,61 (s), 130,26 (s), 129,05 (s), 128,90 (s), 127,19 (s), 126,85 (s), 125,39 (s), 123,70 (s), 122,29 (s), 122,01 (s), 114,68 (s), 72,02 (s), 70,97 (s), 70,74 (s), 70,72 (s), 70,69, 70,62 (s), 69,80 (s), 67,68 (s), 59,15 (s).

MS (+) JM358-F5, [M + H]⁺ calc = 462,2280, encontrado 462,2275.

Ejemplo 1.6:

Síntesis de sal de cesio de 3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato



Se preparó 6-(4-metoxifenil)fenantridina por ciclación de N-(bifenil-2-il)-4-metoxibenzamida (2 g, 6,59 mmol) siguiendo el procedimiento que se ha descrito anteriormente. El compuesto se purificó por cromatografía en diclorometano/hexano (gradiente de 1:5 a 1:1). Rendimiento: 87 %.

RMN: RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 8,94 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 8,84 (dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz, 1H), 8,18-8,05 (m, 2H), 7,97 (ddd, $J = 8,3, 7,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,86 - 7,62 (m, 5H), 7,23 - 7,07 (m, 2H), 3,88 (s, 3H).

5 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,70 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,61 (dd, $J = 8,1, 1,3$ Hz, 1H), 8,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,18 (dd, $J = 8,3, 0,7$ Hz, 1H), 7,86 (ddd, $J = 8,3, 7,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,81 - 7,56 (m, 5H), 7,18 - 7,02 (m, 2H), 3,92 (s, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 160,95 (s), 160,33 (s), 143,72 (s), 133,67 (s), 132,12 (s), 131,36 (s), 130,71 (s), 130,20 (s), 129,13 (s), 128,97 (s), 127,23 (s), 126,92 (s), 125,40 (s), 123,73 (s), 122,33 (s), 122,03 (s), 114,03 (s), 55,57 (s).

10 MS [ESI-MS (+)]: $[\text{M} + \text{H}^+]$ encontrado 286,1231, calc. 286,1226.

4-Fenantridin-6-il-fenol: la desprotección de 6-(4-metoxifenil)fenantridina se consiguió usando HBr. Una suspensión de 6-(4-metoxifenil)fenantridina (1 g, 3,5 mmol) en 15 ml (HBr, 47 %) se calentó a reflujo a 100 °C durante 12 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua enfriada y se neutralizó con Na_2CO_3 . El precipitado resultante se retiró por filtración y se lavó con agua y Et_2O . El sólido se purificó por cromatografía en columna usando diclorometano/MeOH. Rendimiento: 90 %.

20 RMN: RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 9,84 (s, 1H), 8,92 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 8,82 (dd, $J = 8,2, 1,2$ Hz, 1H), 8,20 - 8,11 (m, 1H), 8,08 (dd, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H), 8,02-7,88 (m, 1H), 7,84-7,64 (m, 3H), 7,64-7,49 (m, 2H), 7,06-6,89 (m, 2H).

MS [ESI-MS (-)]: $[\text{M} - \text{H}^+]$ encontrado 270,0922, calc. 270,0924.

25 A una solución de 4-(fenantridin-6-il)fenol (320 mg, 1,18 mmol) en DMF (4 ml), se añadieron Cs_2CO_3 (482,2 mg, 1,48 mmol) y 1,3-propilsultona (159 mg, 1,30 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía columna (sílice) usando diclorometano/MeOH (gradiente de 10:1 a 5:1). Rendimiento: 72 %.

30 RMN: RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,98 - 8,87 (m, 1H), 8,83 (dd, $J = 7,9, 1,6$ Hz, 1H), 8,12 (m, 2H), 7,97 (ddd, $J = 8,3, 7,0, 1,3$ Hz, 1H), 7,85 - 7,69 (m, 3H), 7,67 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,14 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,19 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,64 - 2,57 (m, 2H), 2,15-1,97 (m, 2H).

MS [EI-MS (-)]: $[\text{M} - \text{Cs}^+]$ calc 392,0956; encontrado 392,0962.

35 Ejemplo 2

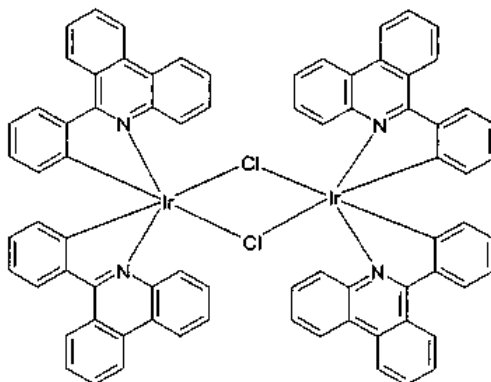
Procedimiento general para la síntesis de complejo de dímero reticulado con cloro:

El procedimiento general fue publicado por Nonoyama, M., J. Organomet. Chem. 86 (1975) 263-267.

40 Los dímeros de iridio se sintetizaron como sigue a continuación: se calentaron $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 2,5 equivalentes de 6-fenilfenantridina a 120 °C durante 18 h en atmósfera de nitrógeno en una mezcla de 2-etoxietanol/agua (3:1, v/v). Después de enfriarse a temperatura ambiente el precipitado se retiró por filtración y se lavó sucesivamente con metanol y Et_2O , y se secó para desear el dímero deseado.

45 Ejemplo 2.1

Complejo con fenilfenantridina sin sustituir

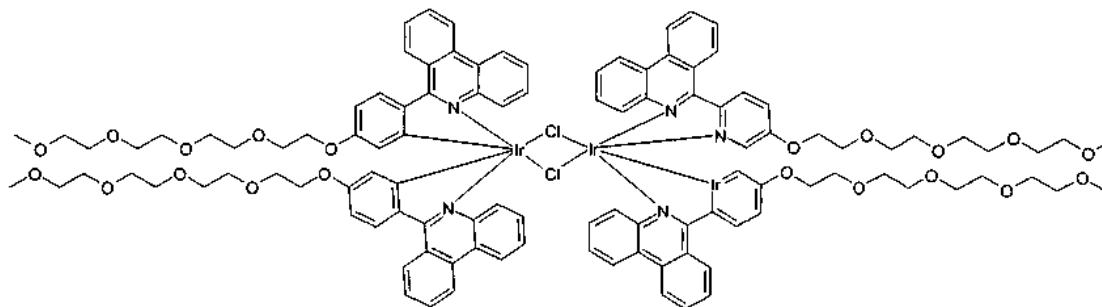


[(6-fenilfenantridina)₂IrCl]₂.

Rendimiento: 71 %. Sólido de color pardo. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 6,45 (d, J = 6,8, 4H), 6,58 (t, J = 7,1, 13,9 Hz, 4H), 6,95 (t, J = 7,1, 14,2 Hz, 4H), 7,56 (t, J = 7,4, 16,0 Hz, 4H), 7,68 (t, J = 8,1, 16,2 Hz, 4H), 7,93 (t, J = 8,0, 14,6 Hz, 4H), 8,07-8,13 (m, 8H), 8,80 (d, J = 7,3 Hz, 4H), 8,93-9,01 (m, 12H).

Ejemplo 2.2

Complejo con fenilfenantridina sustituida



Una mezcla de 6-[4-(2-[2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina (1 g, 2,16 mmol), IrCl₃·3H₂O (346 mg, 0,98 mmol) en 16 ml de 2-EtOEtOH:H₂O (12:4) se calentó a reflujo durante una noche en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 60 ml de agua para obtener un precipitado aceitoso. El sobrenadante se descartó y se añadieron 50 ml de agua al residuo. La mezcla se agitó durante 1 h para obtener un precipitado de color rojo-pardusco. El sólido se filtró y se lavó con agua (50 ml) y Et₂O (30 ml). Sólido de color pardo se disolvió en la menor cantidad de diclorometano y precipitó tras la adición de Et₂O. Se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 550 mg (50 %).

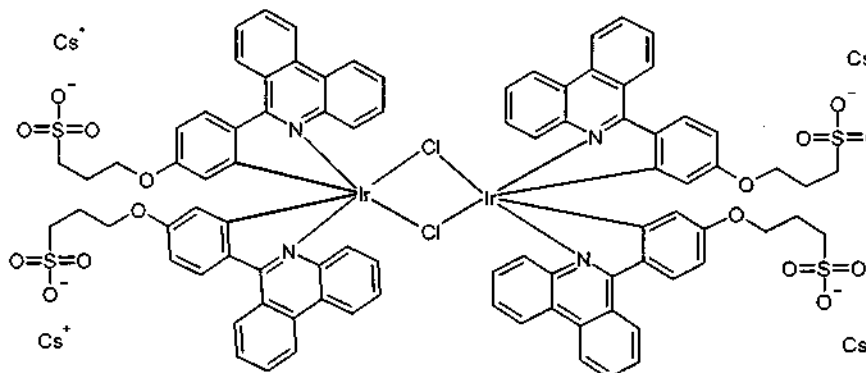
RMN:

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,74 (d, J = 8,1 Hz, 4H), 8,36 (dd, J = 8,0, 5,2 Hz, 8H), 7,90 (dd, J = 14,7, 7,7 Hz, 8H), 7,81 (d, J = 9,0 Hz, 4H), 7,79 - 7,67 (m, 4H), 6,78 - 6,65 (m, 4H), 6,32 (dd, J = 8,8, 2,5 Hz, 4H), 5,89-5,83 (m, 4H), 5,28 (d, J = 2,5 Hz, 4H), 3,67-3,10 (m, 100H, Cadena de PEG, contiene algunas impurezas).

MS(ESI-MS(+)):

[M + 2Na⁺]²⁺ calc. 1171,3463, encontrado 1171,3473; [(C^AN)₂Ir]⁺ = calc. 1113,3877, encontrado 1113,3892.

Síntesis de complejo de bis-iridio con sal de cesio de 3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato



Una mezcla del ligando 3-(4-(fenantridin-6-il)fenoxi)propano-1-sulfonato de cesio (500 mg, 0,92 mmol) e IrCl₃ (159,5 mg, 0,45 mmol) en una mezcla de 2-EtOEtOH:agua (3:1, 16 ml), se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 36 h. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
MS [ESI-MS(-)]: [Ir(C^AN)₂ - 2Cs⁺] calc 975,13858, encontrado 975,13882.

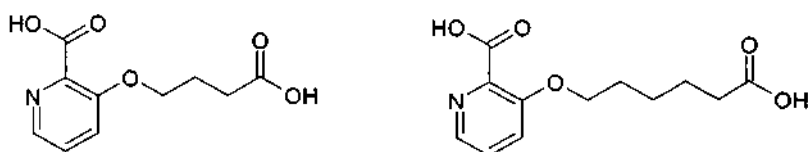
Ejemplo 3

A) Síntesis de derivados de ácido carboxialquilenoxi-picolínico:

- 5 Una mezcla de ácido 3-hidroxi-2-piridinacarboxílico (0,01 mol), 4-bromobutanoato de etilo o 6-bromo-hexanoato de etilo (0,021 mol), y una mezcla de carbonato potásico (5 eq.) en DMF (20 ml) se calentó a 90 °C durante 20 horas en atmósfera de nitrógeno. Después de un periodo de refrigeración, la mezcla de reacción se vertió en una mezcla de hielo-agua y se extrajo tres veces con diclorometano (30 ml), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró, y el disolvente se evaporó hasta sequedad. Se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, hexano/acetato de etilo 3:1) para proporcionar el producto (basado en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.219.847).

El éster reformado se hidrolizó con NaOH en MeOH (pH = 10). El pH de la solución se ajustó a continuación a 6,0 y se agitó a t.a. durante una noche. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se cristalizó en hexano/acetona para dar el producto deseado.

15

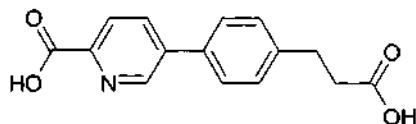


- 20 Ácido 3-(carboxi-pentiloxi)-piridina-2-carboxílico. Rendimiento: 51 %. Sólido de color gris. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,39-1,45 (m, 2H), 1,51-1,57 (m, 2H), 1,67-1,74 (m, 2H), 2,19-2,23 (m, 2H), 4,04-4,07 (m, 2H), 7,47-7,50 (m, 1H), 7,61 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 8,1 Hz, 1H).

B) Síntesis de ácido 5-[4-(2-carboxi-etil)-fenil]-piridina-2-carboxílico

- 25 En atmósfera de argón, a 4 ml de 1,2-dimetoxietano se añaden ácido 5-bromo-piridina-2-carboxílico (93 mg, 0,46 mmol), ácido 4-(2-carboxietil)bencenoborónico (106 mg, 0,55 mmol), 0,51 ml de una solución acuosa 2 M de carbonato sódico y diclorobis-(trifenilfosfina)paladio(II) (20 mg, 0,03 mmol). La mezcla se agita a 90 °C durante una noche, se enfría y se inactiva con agua. Se añade acetato de etilo y la mezcla se ajusta a pH = 2 con ácido clorhídrico 1 M. Después de extraer tres veces con acetato de etilo, las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran, y se evaporan al vacío. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol 5: 1).

30



- 35 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,00 (d, J = 2 Hz, 1H), 8,25 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 15, 7,5 Hz, 2H), 2,61 (t, J = 15,1, 7,6 Hz, 2H). MS: [M + H]⁺ 272,3.

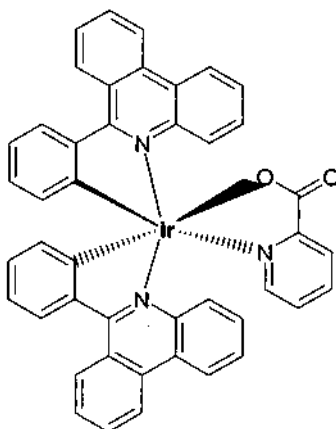
Ejemplo 4

40 Procedimiento general para la síntesis de complejos de iridio

- Se mezclaron 0,5 mmol de un complejo de dímero reticulado con cloro, 1,25 mmol de picolinato y 3 mmol de Na₂CO₃ en 2-etoxietanol (12 ml) y se calentaron a 120 °C durante 15 horas. A la mezcla enfriada, se añadió agua destilada (25 ml), el producto en bruto se retiró a continuación por filtración y se lavó con agua, seguido de porciones de n-hexano y Et₂O. El producto se purificó por cromatografía en columna (sílice, n-hexano/diclorometano) para dar un polvo de color rojo (basado en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711).

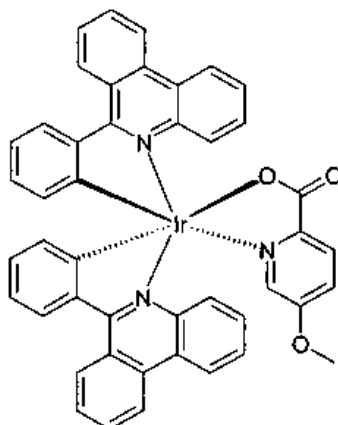
45

Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido piridina-2-carboxílico



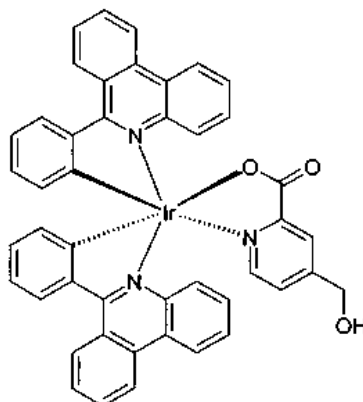
- 5 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,17 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 9,09 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,62 (t, *J* = 14,8, 7,8 Hz, 2H), 8,43-8,33 (m, 4H), 8,23 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,92-7,77 (m, 4H), 7,65 (t, *J* = 15, 7,9 Hz, 2H), 7,57-7,46 (m, 3H), 7,36 (t, *J* = 14,8, 7,8 Hz, 1H), 7,19-7,16 (m, 2H), 7,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,04 (t, *J* = 14,2, 6,8 Hz, 1H), 6,92 (t, *J* = 14,1, 6,7 Hz, 1H), 6,80 (t, *J* = 13,7, 6,8 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 13,7, 6,6 Hz, 1H), 6,51 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H).
 10 MS: [M + H]⁺ encontrado 824,1891, calc. 824,1886; [M+Na]⁺ encontrado 846,1701, calc. 846,1706.

Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 5-(metoxi)piridina-2-carboxílico:



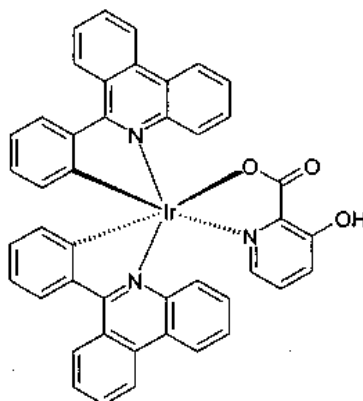
- 15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,15 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 9,09 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,70 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,61 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 8,44-8,35 (m, 3H), 8,21 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 2,7, 1H), 7,91-7,86 (m, 2H), 7,82-7,80 (m, 2H), 7,68 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,57-7,53 (m, 3H), 7,36 (t, *J* = 15,2, 7,2 Hz, 1H), 7,14 (t, *J* = 15,1, 7,6 Hz, 1H), 7,08-6,93 (m, 4H), 6,78 (t, *J* = 14,9, 7,6 Hz, 1H), 6,65 (t, *J* = 14,8, 7,6 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H).
 20 MS: [M + H]⁺ 854,2.

Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 4-(hidroximetil)piridina-2-carboxílico:



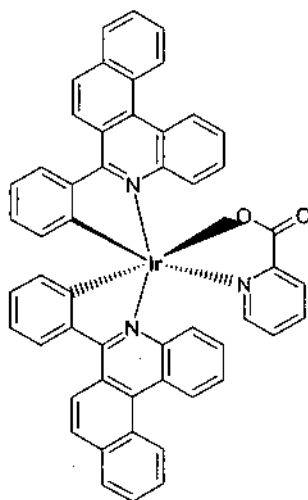
- 5 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,14 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 8,96 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,87 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,51 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,37 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,26-8,24 (m, 2H), 8,10 (t, *J* = 14,7, 7,3 Hz, 1H), 8,02-7,96 (m, 3H), 7,68 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,62 (t, *J* = 15,2, 7,1 Hz, 1H), 7,53-7,48 (m, 2H), 7,39-7,37 (m, 2H), 7,16 (t, *J* = 15,3, 7,2 Hz, 1H), 7,10-7,04 (m, 2H), 6,86 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 6,78 (t, *J* = 14,2, 7,1 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 14,9, 7,3 Hz, 1H), 6,35 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,33 (s, 2H).
- 10 MS: [M + H]⁺ 854,2.

Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 3-hidroxipiridina-2-carboxílico:



- 15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,15 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 9,06 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,65-8,57 (m, 3H), 8,46-8,41 (m, 2H), 8,34 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,21 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,94-7,78 (m, 5H), 7,72 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,58-7,55 (m, 2H), 7,40 (t, *J* = 14,0, 7,0 Hz, 1H), 7,15 (t, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 1H), 7,05-6,95 (m, 5H), 6,77 (t, *J* = 13,7, 7,0 Hz, 1H), 6,66 (t, *J* = 13,6, 6,4 Hz, 1H), 6,50 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H).
- 20 MS: [M + H]⁺ 839,2.

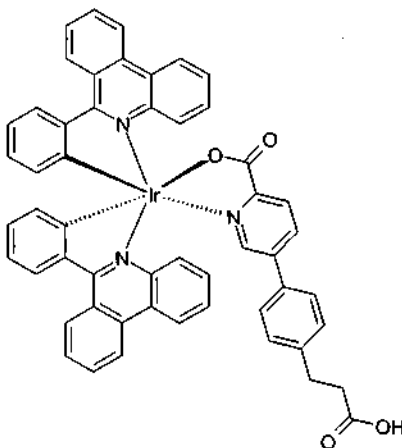
$\text{Ir}(\text{6-fenil-benzofenantridina})_2$ ácido piridina-2-carboxílico



- 5 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,04 (m, 4H), 8,82 (m, 2H), 8,77-8,70 (m, 1H), 8,41 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,29-8,27 (m, 2H), 8,15-8,09 (m, 4H), 7,85 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,78-7,71 (m, 4H), 7,65 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,62-7,553 (m, 2H), 7,45-7,40 (m, 2H), 7,23-7,17 (m, 1H), 7,13-7,05 (m, 3H), 7,05-7,00 (m, 1H), 6,83 (dd, $J = 10,8, 4,0$ Hz, 1H), 6,68 (dd, $J = 10,9, 3,8$ Hz, 1H), 6,51 (dd, $J = 7,6, 0,9$ Hz, 1H).
MS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 924,2.

10

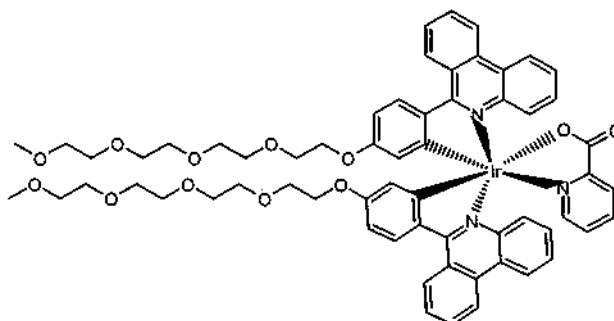
$\text{Ir}(\text{6-fenilfenantridina})_2$ ácido 2-(carboxietil-fenil)piridina-2-carboxílico:



- 15 RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,24 (m, 1H), 9,15 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,97 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,88 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,73 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 8,68 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 8,50 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,45 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,34 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,28 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,13-8,00 (m, 4H), 7,92 (dd, $J = 8,1, 2,1$ Hz, 1H), 7,63 (t, $J = 15,2, 7,0$ Hz, 2H), 7,54-7,42 (m, 3H), 7,35 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,17 (t, $J = 15,2, 7,0$ Hz, 1H), 7,10-7,06 (m, 3H), 7,02 (t, $J = 15,7, 7,3$ Hz, 1H), 6,89 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 6,77 (t, $J = 14,0, 7,1$ Hz, 1H), 6,71 (t, $J = 14,8, 7,0$ Hz, 1H), 6,45 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 2,86 (t, $J = 15,2, 7,5$ Hz, 2H), 2,55 (t, $J = 15,4, 7,7$ Hz, 2H).
MS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 972,3.

20

Síntesis de Ir(6-[4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-fenil]-fenantridina)₂ ácido piridina-2-carboxílico

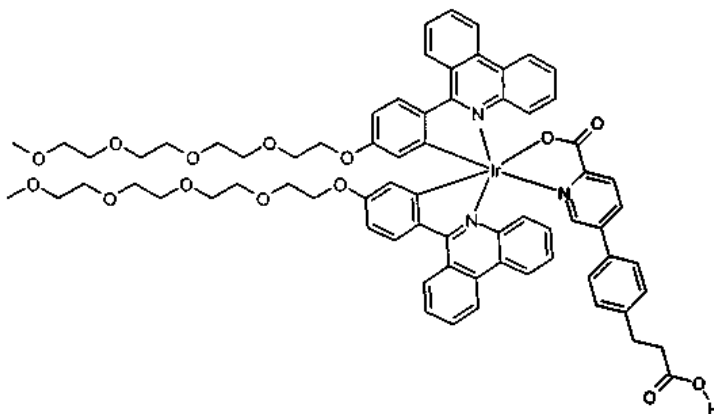


5 Una suspensión de dímero de Ir (150 mg, 0,065 mmol), ácido picolínico (17 mg, 0,137 mmol) y Na₂CO₃ (70 mg, 0,65 mmol) en 20 ml de diclorometano/etanol (4:1) se calentó a reflujo durante una noche. Después de enfriar, la mezcla se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en diclorometano/MeOH (gradiente de 100:0 a 10:1). El compuesto se recristalizó en diclorometano/Et₂O.
Rendimiento: 30 %.

10 RMN:

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9,06 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,98 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,61 (m, 3H), 8,46 - 8,21 (m, 4H), 8,13 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,83 (m, 4H), 7,61 (m, 2H), 7,57 - 7,41 (m, 3H), 7,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,24 - 7,12 (m, 1H), 6,89 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,76 (*dd*, *J* = 8,9, 2,5 Hz, 1H), 6,61 (*dd*, *J* = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 6,54 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,99 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 3,85 - 3,41 (m, 32H), 3,34 (s, 3H), 3,33 (s, 3H).
MS: [2M + 2Na]²⁺ calc. 1258,4012, encontrado 1258,4030. [M+H]⁺ calc. 1236,4197, encontrado 1236,4227.

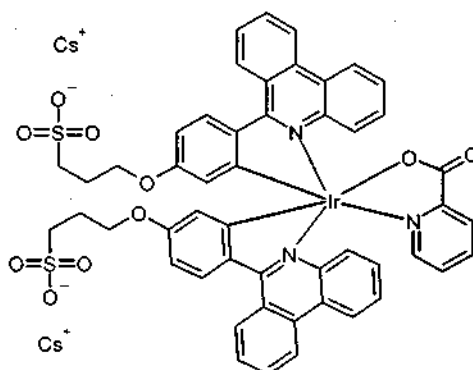
20 Síntesis de Ir(6-[4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-fenil]-fenantridina)₂ ácido carboxietilfenil-piridina-2-carboxílico



25 Una mezcla de dímero de Ir (complejo de bis-iridio con 6-[4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-fenil]-fenantridina (96 mg, 0,041 mmol), ácido 5-[4-(2-carboxi-etil)-fenil]-piridina-2-carboxílico (25 mg, 0,092 mmol) y Na₂CO₃ (28 mg, 0,26 mmol) en 12 ml de una mezcla de diclorometano:EtOH (5:1) se calentó a reflujo durante una noche. A la reacción enfriada se añadió diclorometano (30 ml). Se añadió agua a la mezcla y la fase de agua se acidificó hasta que se alcanzó pH 6. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se concentró hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílice, diclorometano/MeOH).
Rendimiento: 30 %

30 RMN: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,13 (s a, 1H), 9,23 - 9,11 (m, 1H), 9,07 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,98 - 8,90 (m, 1H), 8,89 - 8,78 (m, 1H), 8,75 - 8,67 (m, 1H), 8,70 - 8,62 (m, 2H), 8,47 (*dd*, *J* = 8,6, 1,3 Hz, 1H), 8,44 - 8,36 (m, 2H), 8,23 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,13 - 7,90 (m, 5H), 7,67 - 7,46 (m, 3H), 7,43 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,36 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,15 - 7,08 (m, 2H), 7,02 (*ddd*, *J* = 8,4, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 6,83 (*dd*, *J* = 9,0, 2,6 Hz, 1H), 6,73 (*dd*, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 6,31 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 5,89 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 3,76 (*dtd*, *J* = 36,3, 10,8, 5,3 Hz, 4H), 3,45 - 3,10 (m, 28 H), 3,17 (s, 3H), 3,14 (s, 3H), 2,87 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,60 - 2,50 (m, 2H).
MS: [M + H]⁺ calc. 1384,47231 encontrado 1384,47466. [M + Na]⁺ calc. 1406,45426, encontrado 1406,45556.

Síntesis de complejo de Ir(3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato)₂ ácido piridina-2-carboxílico como sal de cesio



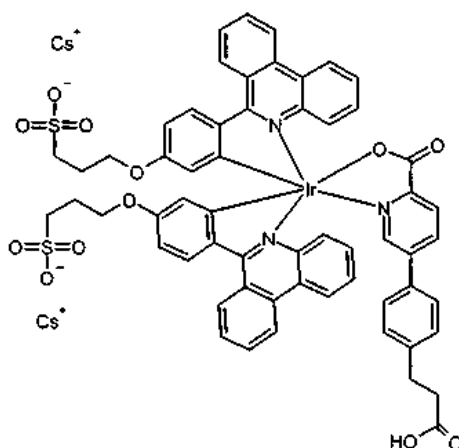
5 Una mezcla de compuesto de complejo de bis-iridio con sal de cesio de 3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato (100 mg, 0,039 mmol), ácido picolínico (10 mg, 0,082 mmol), y Cs₂CO₃ (35 mg, 0,107 mmol) en DMF (10 ml) se agitó a 80 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. La reacción se concentró hasta sequedad y se purificó con Sephadex LH-20 y DMF como eluyente. Rendimiento: 20 mg (20 %)

10 RMN: RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,15 - 9,00 (m, 2H), 8,91 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 8,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,66 (dd, *J* = 12,6, 8,6 Hz, 2H), 8,48 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,38 - 8,28 (m, 2H), 8,21 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,11 - 8,02 (m, 1H), 8,03 - 7,82 (m, 4H), 7,70 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,64 - 7,36 (m, 5H), 7,06 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,82 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H), 6,70 (dd, *J* = 8,7, 2,2 Hz, 1H), 6,32 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 5,81 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 3,97 - 3,54 (m, 4H), 2,41 - 2,22 (m, 4H), 1,91 - 1,55 (m, 4H).

15 MS [ESI-MS(-)]: [Ir(C^AN)₂(pic) - 2Cs⁺]²⁻ calc. 548,58196, encontrado 548,58446.

Resultados de ECL: 64978 (10 nmolar); referencia Ru(bpy)₃ = 10000 cuentas en una concentración 10 nmolar.

20 Síntesis de complejo de Ir(3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato)₂ ácido carboxietilfenil-piridina-2-carboxílico



25 Una mezcla de dímero de complejo de bis-iridio con sal de cesio de 3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato (100 mg, 0,0392 mmol), ácido 5-[4-(2-carboxi-etil)-fenil]-piridina-2-carboxílico (23 mg, 0,0823 mmol) y Cs₂CO₃ (64 mg, 0,196 mmol) en DMF (10 ml) se calentó a 80 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. La mezcla de reacción se retiró por filtración. El residuo se lavó con MeOH y ambos filtrados se concentraron hasta sequedad. El complejo tenía un *f*_R = 0,45 en TLC usando gel de sílice 60 RP-18 (MeOH:agua 1:1). El complejo se purificó

30 adicionalmente mediante HPLC preparativa usando una columna RP-18 y un gradiente de agua: acetonitrilo. MS [ESI-MS(-)]: [Ir(C^AN)₂(ácido 5-[4-(2-carboxi-etil)-fenil]-piridina-2-carboxílico) - 2Cs⁺ + Na⁺]⁻ calc. 1268,20571, encontrado 1268,20099.

35 MS [HPLC-MS(+)] : [Ir(C^AN)₂(ácido RC5-[4-(2-carboxi-etil)-fenil]-piridina-2-carboxílico) - 3Cs⁺ + 3H⁺]⁺ calc. 1248,4, encontrado 1248,4.

Ejemplo 5

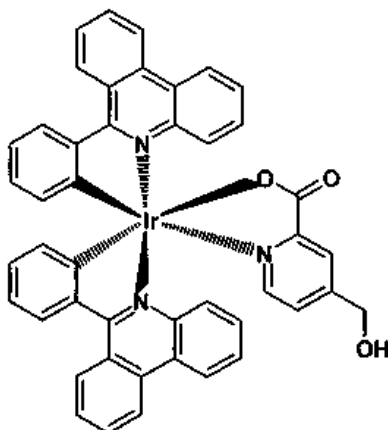
ECL con un nuevo complejo de iridio

- 5 Se evaluó la señal de electroquimioluminiscencia de varios complejos metálicos en un analizador ELECSYS® (Roche Diagnostics GmbH). Las mediciones se llevaron a cabo de forma homogénea en ausencia de micropartículas paramagnéticas revestidas con estreptoavidina. Las soluciones de trabajo de cada complejo metálico en 0,1 mg/ml de DMSO se diluyeron con tampón PBS dando como resultado soluciones 10 nM. Las soluciones 10 nM se manipularon como muestras en el analizador ELECSYS®. Se incubaron 20 µl de muestra junto con 90 µl de Reactivo 1 (ProCell) y 90 µl de Reactivo 2 (ProCell) durante 9 minutos a 37 °C y posteriormente se cuantificó la señal de electroquimioluminiscencia.

Resultados de ECL:

- 15 Referencia Ru(bpy)₃ = 10000 cuentas en una concentración 10 nmolar.
- Ir(6-[4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina)₂ ácido piridina-2-carboxílico ok = 31258 cuentas en una concentración 10 nmolar;
- 20 - Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 4-(hidroximetil)piridina-2-carboxílico = 45512 cuentas en una concentración 10 nmolar.

Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 4-(hidroximetil)piridina-2-carboxílico:



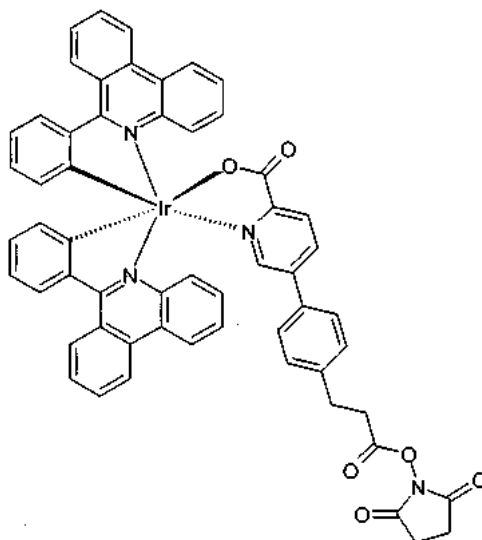
25

Ejemplo 6

Síntesis de un complejo de iridio con un grupo reactivo para bioconjugación

- 30 Se disolvió Ir(6-fenilfenantridina)₂ ácido 2-(carboxietil-fenil)piridina-2-carboxílico (15 mg) en una mezcla de 5 ml de acetonitrilo seco y 0,01 ml de piridina seca. Se añadió carbonato de disuccinimidilo (DSC) (1,5 eq.) y la mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. La solución se añadió a cloroformo (10 ml), se lavó con HCl 0,5 M (1 x 2 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (1 x 2 ml) y agua (2 x 5 ml), se secó sobre
- 35 MgSO₄, y se concentró al vacío para producir un polvo de color rojo.

Ir(6-fenilfenantridina)₂ éster de N-succinimidilo del ácido 2-(carboxietil-fenil)piridina-2-carboxílico:

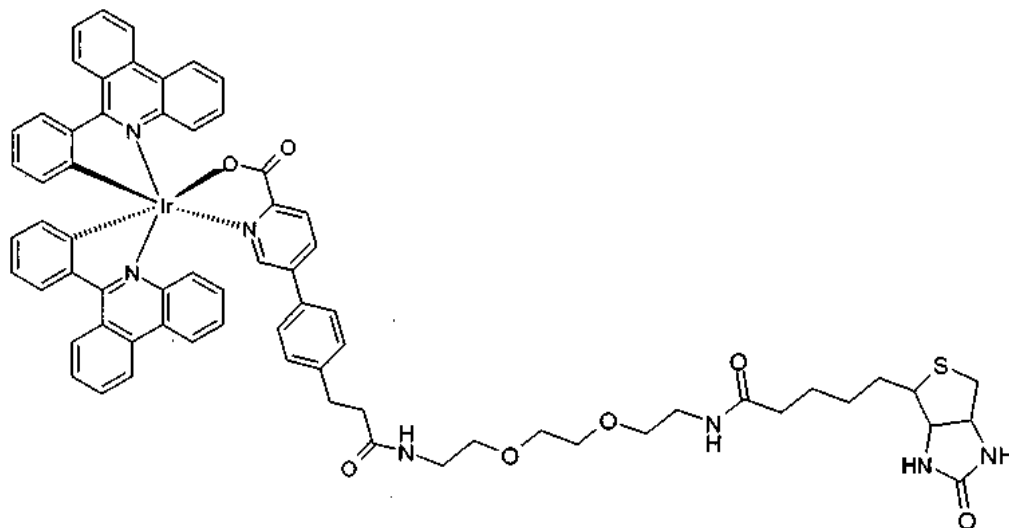


- 5 RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN) δ 9,25 (m, 1H), 9,17 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,83 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,75-8,68 (m, 1H), 8,60-8,54 (m, 3H), 8,47 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,43 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,30 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,06 (t, *J* = 15,4, 7,2 Hz, 1H), 7,97-7,95 (m, 3H), 7,77-7,70 (m, 2H), 7,61 (t, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 1H), 7,52-7,44 (m, 3H), 7,36 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,18 (t, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 1H), 7,12-7,09 (m, 3H), 7,04-6,98 (m, 2H), 6,78 (t, *J* = 14,9, 7,2 Hz, 1H), 6,71 (t, *J* = 14,8, 7,5 Hz, 1H), 6,57 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,07-3,01 (m, 4H), 2,80 (s, 4H).
- 10 MS: [M + H]⁺ 1069,3.

Ejemplo 7

Síntesis de un conjugado de complejo de iridio con biotina

15



- 20 Se disolvieron éster de NHS del ácido Ir(6-fenilfenantridina)₂ 2-(carboxietil-fenil)piridina-2-carboxílico (12 mg) y 4 mg de trifluoroacetato de N-biotinil-3,6-dioxaoctano-1,8-diamina en 5 ml de DMF seca. Se añadió piridina (0,016 ml en 2 ml de DMF) y la mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. La solución se añadió a cloroformo (10 ml), se lavó con HCl 0,5 M (1 x 2 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (1 x 2 ml) y agua (2 x 5 ml), se secó sobre MgSO₄, y se concentró al vacío para producir un polvo de color rojo. El producto se purificó por cromatografía en columna (sílice, n-hexano/acetato de etilo) para dar un polvo de color rojo.
- 25 MS: [M + H]⁺ 1328,6.

Ejemplo 8

Síntesis de una polimarca de iridio

5 N-Fmoc-3-(2-t-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina

Como se describe en Helvetica Chimica Acta 1987, p.1307-1311 por H. Hilpert, el aminoácido racémico protegido con bis-éster de etilo, éster de etilo de 3-(2-etoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina, se prepara a una escala cuatro veces mayor en comparación con la bibliografía y se producen 612 mg material. El compuesto se caracteriza como se describe mediante RMN ¹H. El aminoácido racémico éster de etilo de 3-(2-etoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina se disuelve a continuación en acetonitrilo y se trata con hidróxido sódico 0,1 N durante 5 horas con agitación vigorosa de la mezcla, con lo que se hidroliza preferentemente el grupo 2-etoxi. El compuesto de interés éster de etilo de 3-(2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina se aísla de la mezcla por cromatografía C4 preparativa en fase inversa con un gradiente convencional de acetonitrilo-agua con las series de elución de picos 3-(2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina,3-(2-etoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina y éster de etilo de 3-(2-etoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina. Se pueden recibir aproximadamente 250 mg de un liofilizado aceitoso incoloro después de liofilizar todas las fracciones unificadas que contienen éster de etilo de (2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina asignadas como éster de etilo de (2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina por TLC (cloroformo/metanol/ácido acético = 9:1:1; detección por UV). Para terc-butilar el grupo 2-carboxi del éster de etilo de (2-carboxi-4-piridil)-DL-alanina, se disuelven 240 mg en 10 ml de éster de terc-butilo de ácido acético. A continuación se añade una extensión 1,2 molar de una solución al 70 % de ácido perclórico en agua. Después de 5 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se extrae con ácido clorhídrico 0,5 N enfriado en hielo. El extracto se alcaliniza con hidróxido sódico 3 N y se extrae con cloruro de metileno. Después de secado con cloruro de magnesio, la fase orgánica se evapora y el líquido residual se destila, lo que produce aproximadamente 200 mg de éster de etilo de 3-(2-terc-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina. Para proteger reversiblemente el grupo amino del éster de etilo de 3-(2-terc-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina, se disuelven 180 mg de compuesto en 10 ml de dioxano, y a continuación se añaden 300 mg de Fmoc-OSu (Novabiochem/Merck) disuelto en dioxano. Finalmente, se añade una doble cantidad equivalente de bis-carbonato sódico con respecto al éster de etilo de 3-(2-terc-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina. Después de 3 horas de agitación vigorosa, el volumen de reacción se diluye con el mismo volumen de solución 1 N de hidróxido sódico para escindir el éster de etilo del grupo carboxi. Después de 5 horas, el volumen de la mezcla de reacción se reduce fuertemente por evaporación. La fase completa se acidifica y se extrae varias veces con éster de etilo de ácido acético. Después de secado con sulfato sódico, la fase orgánica se evaporó completamente para producir aproximadamente 200 mg de N-Fmoc-3-(2-t-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina (D) en forma de un aceite incoloro.

35 β-Alaninil-β-alaninil-3-(2-carboxi-4-piridil)-DL-alaninil-β-alaninil-glutaminil-β-alaninil-3-(2-carboxi-4-piridil)-DL-alaninil-β-alaninil-glutaminil-β-alaninil-3-(2-carboxi-4-piridil)-DL-alaninil-β-alaninil-β-alanina o NH₂-UUXUEUXUEXUU-OH (E)

El compuesto (E) se prepara mediante síntesis peptídica en fase Fmoc-(fluorenilmetoxicarbonil)-sólida en un sintetizador de péptidos múltiple SYRO II de Multisynthec en varios recipientes de reacción de 15 mg de resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi de Novabiochem/Merck con a una carga de 0,5 mmol/g. Se acopla para cada posición de X en la secuencia de aminoácidos N-Fmoc-3-(2-t-butoxicarbonil-4-piridil)-DL-alanina, para cada posición de U Fmoc-p-alanina y para cada posición de E ácido Fmoc-glutámico (éster de terc-butilo) en el péptido en crecimiento inmovilizado en la resina de síntesis. De cada N-Fmoc aminoácido, se acoplan 90 μmol dos veces disolviéndolo junto con 100 μmol de 1-hidroxibenzotriazol en 270 μl de dimetilformamida, después de esto se añaden 100 μmol de N,N-diisopropilcarbodiimida como reactivo de acoplamiento y a continuación se dispersa la resina en esta solución en los recipientes de reacción del sintetizador de péptidos. Cada etapa de acoplamiento dura 1 hora. La escisión del grupo Fmoc temporal después de cada etapa de acoplamiento se lleva a cabo con una solución al 50 % de piperidina en dimetilformamida en 20 minutos. Después de cada etapa de reacción, tiene lugar una etapa de lavado con dimetilformamida. La escisión del péptido (E) acabado de la resina y la separación por escisión de los grupos protectores éster de terc-butilo permanentes después de la síntesis se lleva a cabo con una mezcla de un 95 % de ácido trifluoroacético y un 5 % de etanoditiol en 2 horas. Después de retirar por filtración las perlas de resina, se hace precipitar el producto por adición de diisopropil éter frío, el precipitado se aísla por filtración, se redisuelve en ácido acético y se liofiliza mediante secado por congelación. Los 30 mg de material en bruto resultantes se purifican por HPLC en fase inversa y se producen aproximadamente 15 mg de un material al menos un 95 % puro. La caracterización se realiza mediante HPLC analítica en fase inversa y ESI-MS.

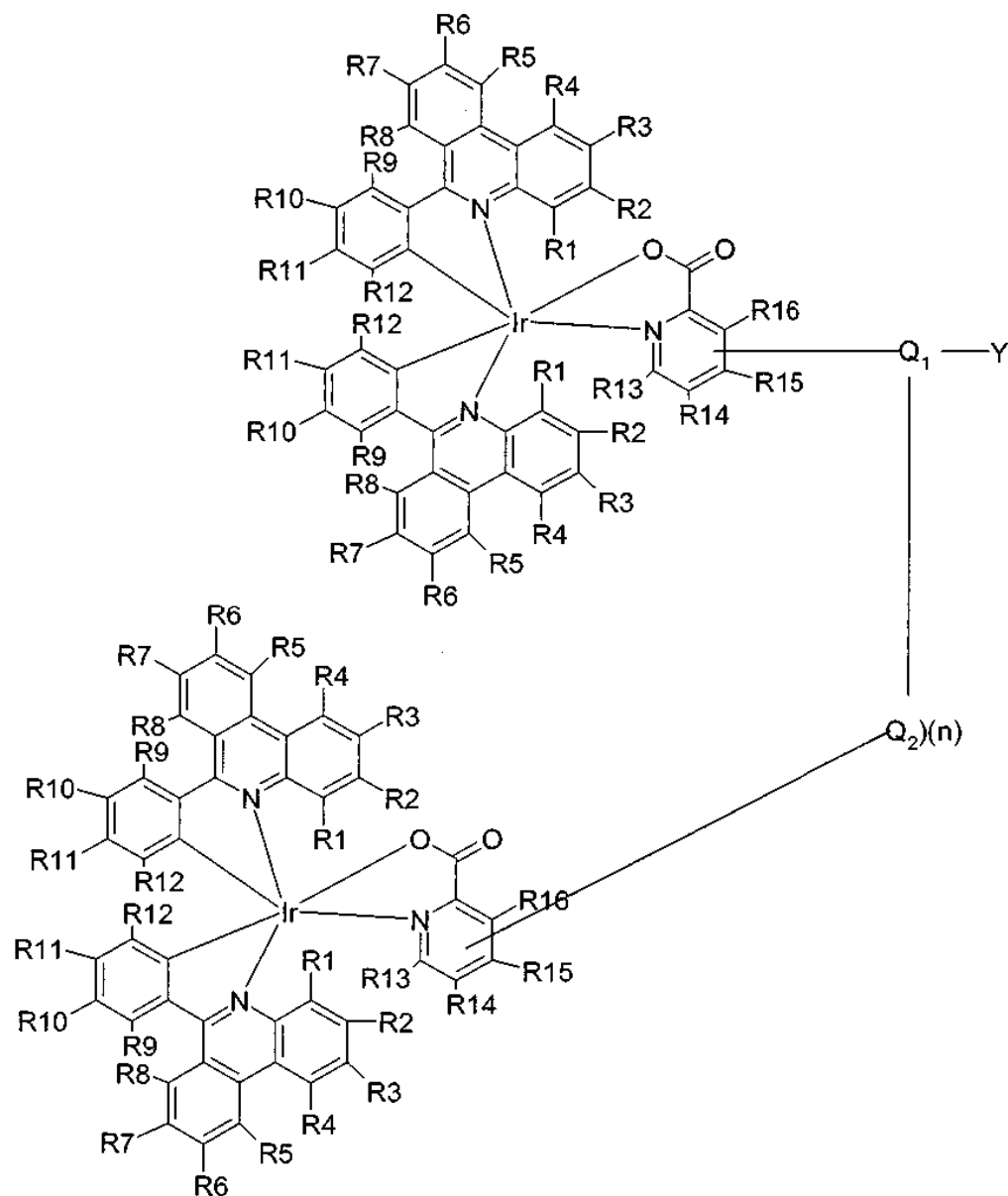
60 Síntesis de una polimarca basada en complejo de Ir(3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato)₂ (2-carboxi-4-piridil)-DL-alaninilo

Una mezcla de compuesto dímero de complejo de bis-iridio con sal de cesio de 3-(4-fenantridin-6-il-fenoxi)-propano-1-sulfonato en un exceso 1,5 molar, NH₂-UUXUEUXUEXUU-OH, Cs₂CO₃ (en un exceso tres veces molar con respecto al dímero o al bis-complejo) en DMF se agita a 80 °C en atmósfera de nitrógeno durante una noche. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad y además el producto de reacción se purifica por HPLC preparativa.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto quimioluminiscente basado en iridio de Fórmula II

FÓRMULA I (a)



(FÓRMULA I (b))

5

en la que en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R16 es independientemente hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinaoilo, hidroxilo-alquil-fosfinaoilo, fosfonato, fosfinato o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, amino-alquilo, amino-alquilo sustituido, amino-alcoxi, amino-alcoxi sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido,

15

- en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,
- 5 en la que en R1-R12, o/y en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o sin sustituir, ariloxi sustituido o sin sustituir, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 10 en la que, si en cualquiera de R1-R17 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R17 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, tal como un grupo amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietileno, polipropileno, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 15 en la que alquilo como se usa en el presente documento es una cadena de alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P, y S, en la que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6, o 7 miembros, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6, o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,
- 20 en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (a) es -Q1-Y, en la que al menos uno de R13-R16 en la Fórmula I (b) es Q2 en la que Q1 es un conector y cada Q2 es independientemente un conector o un enlace covalente, en la que (n) es un número entero de 1 a 50 y en la que Y es un grupo funcional.
- 25
- 30 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 35 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C100 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 40 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C50 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 45 5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conector Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 50 6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C200 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos, en el que Q2 está presente (n) veces y en el que (n) es un número entero de 1-50.
- 60 7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un conector que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 lineal o ramificada saturada, insaturada, sin sustituir o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillos cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 65

- 5 8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que Q2 es independientemente un enlace covalente o tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C12 saturada y/o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, o S sustituidos.
- 10 9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el grupo funcional Y se selecciona entre el grupo que consiste en aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.
- 15 10. Conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y unido covalentemente a este un agente de unión por afinidad.
- 20 11. El conjugado de la reivindicación 10, en el que el agente de unión por afinidad se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno y anticuerpo, biotina o análogo de biotina y avidina o estreptoavidina, azúcar y lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario y receptor y ligando.
- 25 12. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicho agente de unión por afinidad es un ácido nucleico o un anticuerpo.
- 30 13. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para llevar a cabo una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa.
- 35 14. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en un método de detección basado en electroquimioluminiscencia.
15. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en la detección de un analito.
16. Método para medir un analito mediante un método *in vitro*, comprendiendo el método las etapas de
- a) proporcionar una muestra que se sospecha o se sabe que comprende el analito,
 - b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de analito y conjugado, y
 - c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de ese modo una medida del analito.