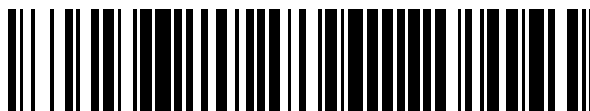


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 507**

51 Int. Cl.:

C09K 11/06 (2006.01)

C09K 11/07 (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/EP2013/002323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13750504 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2882823**

54 Título: **Nuevos complejos a base de iridio para EQL**

30 Prioridad:

02.08.2012 EP 12179054

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

04.07.2017

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;
FERNANDEZ HERNANDEZ, JESUS MIGUEL;
JOSEL, HANS-PETER y
SEIDEL, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 507 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 a base de iridio para EQL

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a nuevos complejos luminiscentes a base de Ir(III), a conjugados que comprenden dichos complejos como marcaje y a la aplicación de los mismos, por ejemplo en la detección basada en la electroquimioluminiscencia de un analito.

10 La quimioluminiscencia electrogenerada (también denominada electroquimioluminiscencia y abreviadamente EQL) es el proceso por el que las especies generadas en los electrodos experimentan reacciones de alta energía de transferencia de electrones formando estados excitados que emiten luz. El primer estudio detallado de la EQL es de Hercules y Bard et al., a mediados de los 1960. Tras aproximadamente 50 años de investigación, la EQL se ha convertido actualmente en una técnica analítica muy potente y es ampliamente utilizada en las áreas de, por ejemplo, inmunoensayo, análisis de alimentos y agua, y en la detección de agentes de guerra biológica.

20 Existe un número enorme de compuestos que aparentemente resultan interesantes para la utilización en dispositivos orgánicos emisores de luz (OLED, por sus siglas en inglés). Estos compuestos resultan apropiados para la utilización en materiales sólidos o pueden disolverse en líquidos orgánicos. Sin embargo, no puede extraerse ninguna conclusión en relación a su utilidad en un medio acuoso, tal como se requiere, por ejemplo, para la detección de un analito de una muestra biológica.

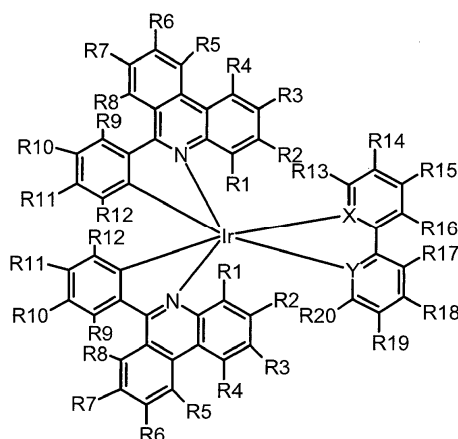
25 En general, los métodos basados en la detección de EQL se basan en la utilización de complejos de rutenio solubles en agua que comprenden Ru(II+) como ión metálico.

A pesar de las mejoras significativas realizadas en las últimas décadas, todavía existe una necesidad muy grande de ensayos diagnósticos in vitro basados en la electroquimioluminiscencia más sensibles.

30 Ahora se ha encontrado inesperadamente que determinados complejos luminiscentes a base de iridio Ir(III+) representan marcajes muy prometedores para futuros métodos de detección basados en la EQL de alta sensibilidad. Se conocen complejos similares a los de la presente invención a partir de, por ejemplo, los documentos nº JP2007169474A y nº US2006237714A1.

35 Descripción resumida de la invención

La presente invención da a conocer un compuesto quimioluminiscente a base de iridio de fórmula I



40 en la que cada R¹-R²⁰ 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 no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfeno, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R²¹, en el que R²¹ es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquiniilo, alquiniilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxi sustituido, en la que, en R¹-R¹², y/o en R¹³-R¹⁶ y/o en R¹⁷-R²⁰, respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo

hidrofilico, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxialquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o en la que en R¹-R¹² y/o en R¹³-R¹⁶ y/o en R¹⁷-R²⁰, respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxialquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato en el que, en caso de que en cualquiera de entre R¹ y R²¹ se encuentre presente una sustitución, se selecciona independientemente cada sustituyente en R¹-R²¹ de entre un grupo haluro, ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como 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, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxialquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en el que el alquilo tal como se utiliza en la presente memoria es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y 20 átomos de carbono o una cadena heteroalquilo con una longitud de entre 1 y 20 átomos que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S, en el que arilo es un sistema de anillos arilos de 5, 6 o 7 elementos o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, en el que por lo menos uno de entre R¹³ y R²⁰ es -Q-Z, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y, en el que por lo menos uno de entre X e Y es N y el otro X o Y independientemente es N o C.

La presente invención da a conocer además un conjugado que comprende el compuesto anteriormente indicado y unido covalentemente al mismo un agente de unión por afinidad.

La presente invención se refiere además a la utilización de un compuesto o de un conjugado tal como se da a conocer 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.

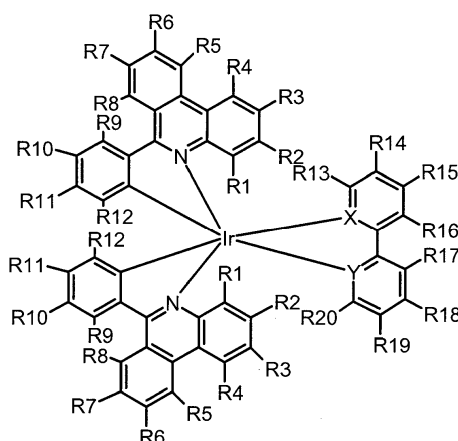
Además, la presente invención da a conocer un método para medir un analito mediante un método in vitro, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una muestra que se sospecha o se conoce que comprende el analito, (b) puesta en contacto de dicha muestra con un conjugado según la presente invención bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo conjugado de analitos, y (c) medición del complejo formado en la etapa (b) y obtención de esta manera de una medición del analito.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha indicado anteriormente, existe una necesidad de nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en metales, que resulten adecuados para la utilización en ensayos diagnósticos in vitro.

Nuevos compuestos quimioluminiscentes a base de iridio de fórmula I

La presente invención se refiere a un compuesto quimioluminiscente a base de iridio de fórmula I



en la que cada R^1 - R^{20} 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 no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R^{21} , en el que R^{21} es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxi sustituido, en el que, en R^1 - R^{12} y/o en R^{13} - R^{16} y/o en R^{17} - R^{20} , respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o, en el que, en R^1 - R^{12} y/o en R^{13} - R^{16} y/o en R^{17} - R^{20} , respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en el que, en el caso de que en cualquier de entre R^1 y R^{21} se encuentre presente una sustitución, cada uno de los sustituyentes en R^1 - R^{21} se selecciona independientemente de entre haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como 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, sulfamilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en el que alquilo tal como se utiliza en la presente memoria es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y 20 átomos que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S, en el que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6 o 7 elementos, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, en el que por lo menos no de entre R^{13} y R^{20} es -Q-Z, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y en el que por lo menos uno de entre X e Y es N y el otro de X o Y es independientemente N o C.

Un compuesto de fórmula I comprende dos ligandos derivados de fenilfenantridina tal como se define mediante las definiciones proporcionadas para la fórmula I y un tercer ligando.

En una realización, uno de entre R^{13} y R^{20} de fórmula I es -Q-Z.

Tal como es conocido del experto en la materia, los sustituyentes en R^1 a R^{21} pueden sustituirse adicionalmente, por ejemplo un grupo alquilo en un grupo aminoalquilo puede sustituirse adicionalmente con un grupo hidroxilo, amino, carboxi o sulfo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, los sustituyentes presentan los significados comúnmente conocidos por el experto en la materia.

El alquilo, preferentemente es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y 20 átomos de carbono, preferentemente con una longitud de entre 1 y 10 átomos de carbono, particularmente preferentemente con una longitud de entre 1 y 6 átomos de carbono, o una cadena heteroarilo con una longitud de entre 1 y 20 átomos, preferentemente con una longitud de entre 1 y 10 átomos de carbono, que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S. Entre los ejemplos de grupos alquilo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, los pentilos isoméricos, los hexilos isoméricos, los heptilos isoméricos, los octilos isoméricos y dodecilo. En una realización particularmente preferente el alquilo es metilo o etilo.

Los términos alcoxi y alquiloxi, así como alquilo sustituido y alcoxi sustituido, respectivamente, pueden utilizarse intercambiamente. Los términos "alcoxi" y "alquiloxi" se refieren a una fracción de fórmula -OR, en la que R preferentemente es una fracción alquilo tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria. Entre los ejemplos de fracciones alcoxi se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metoxi, etoxi e isopropoxi.

En una realización, los sustituyentes preferentes para alquiloxi sustituido son cadenas etileno que comprenden 1 a 40 unidades etileno o que comprenden 1 a 20 unidades etileno o que comprenden 1 a 10 unidades etileno.

El arilo, preferentemente es un sistema de anillos arilo de 5, 6 o 7 elementos, preferentemente un sistema de anillos

arilo de 6 elementos, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, preferentemente un sistema de anillos heteroarilo de 6 elementos. En una realización preferente particular, arilo es fenilo.

5 En una realización, en la fórmula I cada R^1 a R^{20} independientemente es hidrógeno, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

10 En una realización, en la fórmula I cada R^1 a R^{20} independientemente es hidrógeno, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

15 En una realización, en la fórmula I cada R^1 a R^{20} independientemente es hidrógeno, alquiloxi sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfonato o sulfóxido.

En una realización, por lo menos uno de entre R^1 y R^{20} del compuesto según la fórmula I se sustituye con por lo menos un grupo hidrofílico.

20 En una realización, por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} de los residuos fenilfenantridina comprendidos en la fórmula I, fórmula I(a) y/o fórmula I(b) de fórmula II tal como se define en la presente memoria, respectivamente, se sustituye con por lo menos un grupo hidrofílico, en particular con por lo menos un grupo hidrofílico tal como se define posteriormente.

25 Los grupos hidrofílicos preferentes son amino, alquilamino, significando alquilo una cadena lineal, tal como una cadena metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o una cadena de alquilo ramificado, tal como isopropilo, isobutilo, terc-butilo, preferentemente una cadena alquilo lineal, tal como metilo o etilo, alquilamino sustituido, ello contiene, por ejemplo, una o dos cadenas ramificadas o lineales unidas al átomo de N, que se sustituyen con un grupo hidrofílico adicional, tal como hidroxilo o sulfo, preferentemente dicho alquilamino sustituido contiene dos residuos hidroxipropilo o hidroxietilo, arilamino, refiriéndose arilo a un residuo aromático, tal como fenilo o naftilo, preferentemente fenilo, arilamino sustituido, siendo arilo tal como se ha definido anteriormente y un residuo adicional formado por un grupo hidrofílico, alquilamonio, siendo alquilo tal como se ha definido anteriormente y siendo preferentemente un residuo trimetilamonio o un residuo trietilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, éster de ácido carboxílico, preferentemente un éster de alquilo, tal como éster de metilo o etilo, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido siendo alquilo y alquilo sustituido tal como se ha definido anteriormente o ariloxi o ariloxi sustituido, siendo arilo y arilo sustituido tal como se ha definido anteriormente, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato y fosfinato.

40 Preferentemente dicho grupo hidrofílico se selecciona de entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato, en donde proceda, siendo cada uno preferentemente tal como se ha definido en el párrafo anterior.

45 En una realización preferente, el grupo hidrofílico se selecciona de entre alquilamino, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato.

En una realización preferente particular adicional, el grupo hidrofílico se selecciona de entre un grupo sulfo y un grupo sulfamoilo.

50 En una realización, por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de 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, alcanosulfoniloamino-arilo, alcanosulfoniloamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfoniloamino-alquilo, arenosulfoniloamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, fosfono-alquilo, fosfono-arilo, fosfono-alquiloxi, fosfono-ariloxi, fosfono, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquiloxi, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-arilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquiloxi, hidroxil-alquilo-fosfinoil-ariloxi, hidroxil-alquilo-fosfinoilo, fosfonoamino-alquilo, fosfonoamino-arilo, fosfonoamino-alcoxi, fosfonoamino-ariloxi, fosfonoamino o, en el caso de correspondencia química, una sal de los sustituyentes anteriormente indicados, en la que alquilo es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y 20 átomos de carbono o una cadena heteroalquilo con una longitud de entre 1 y 20 átomos que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S, y en la que arilo tal como se utiliza en la

presente memoria es un sistema de anillos arilo de 5, 6 o 7 elementos, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N.

5 En una realización por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre sulfo-alquilo, sulfo-aril, 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, 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, en caso de correspondencia química, una sal de los sustituyentes anteriormente indicados, en los que alquilo es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y 20 átomos de carbono o una cadena heteroalquilo con una longitud de entre 1 y 20 átomos que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S y en los que arilo tal como se utiliza en la presente memoria es un sistema de anillos arilo de 5, 6 o 7 elementos o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N.

20 En una realización por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} es sulfoalquilo, sulfoarilo, sulfoalcoxi, sulfoariloxi, sulfo o una sal del mismo (=sulfonato), en el que el contraión preferentemente es un catión del grupo de los metales alcalinos.

En una realización por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} es sulfoalquilo, sulfoalcoxi, sulfo o una sal del mismo (=sulfonato), en el que el contraión es un catión del grupo de los metales alcalinos.

25 En una realización por lo menos uno de entre R^1 y R^{12} es sulfometilo, sulfoalcoxi con una cadena alquilo C2 a C4 o una sal del mismo (=sulfonato), en el que el contraión es un catión del grupo de los metales alcalinos.

En una realización, por lo menos uno de los grupos R^1 a R^{12} de fórmula I es un grupo sulfo.

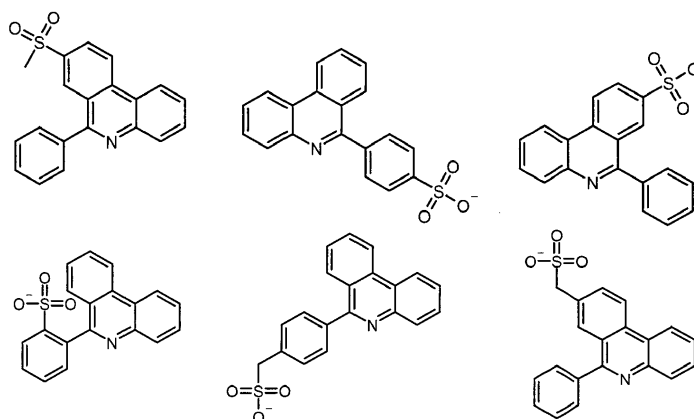
30 En una realización, uno a tres de entre R^1 y R^{12} no son hidrógeno.

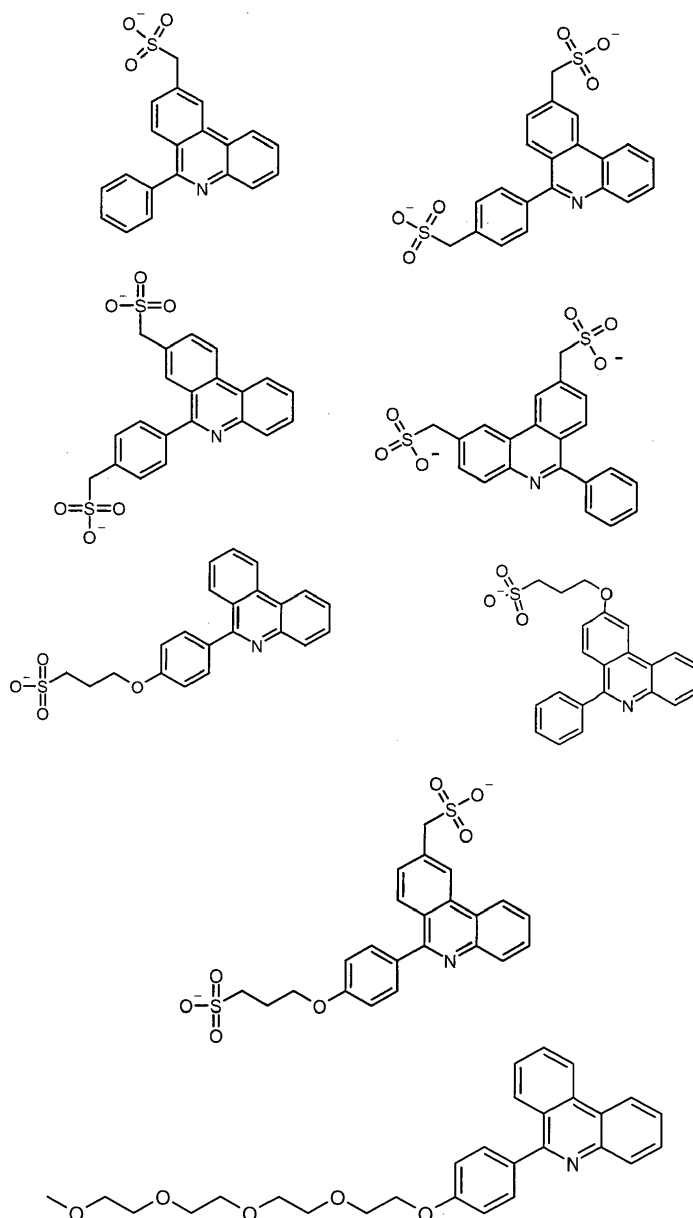
En una realización, el contraión es un catión metal alcalino seleccionado de entre el grupo que consiste de catión litio, catión sodio, catión potasio y catión cesio.

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

En una realización, el contraión es un catión cesio.

40 En una realización, los residuos fenilfenantridina comprendida en la fórmula I se selecciona de entre las fenilfenantridinas sustituidos proporcionados posteriormente.





5

El término "conector" tal como se utiliza en la presente memoria presenta el significado conocido por el experto en la materia y se refiere a una molécula o grupo de moléculas que se utilizan para unir fragmentos de moléculas. Los conectores se caracterizan porque presentan dos o más funcionalidades químicamente ortogonales en un andamiaje flexible o rígido. Un enlace covalente no es un conector en el sentido de la presente invención.

10

En el compuesto según la presente invención, Q es un enlace covalente o un conector que presenta una longitud del esqueleto de entre 1 y 200 átomos. En otras palabras, en el caso de que la longitud del esqueleto sea de entre 1 y 200 átomos, la conexión más corta entre un anillo aromático del tercer ligando de fórmula I y el grupo funcional Z consiste de 1 a 200 átomos.

15

En el caso de que se encuentre presente un sistema de anillos, se considera el número más bajo de átomos en el sistema de anillos al evaluar la longitud del conector. A título de ejemplo, un anillo fenilo supone una longitud de cuatro átomos del conector.

20

En una realización, Q es un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₂₀₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

25

En una realización, Q es un enlace covalente o un conector y presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₁₀₀

lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

5 En una realización, Q es un enlace covalente o un conector y presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₅₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

10 En una realización adicional, Q es un enlace covalente o es un conector y presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₂₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

15 En una realización, Q, por ejemplo el conector Q, en el complejo electroquimioluminiscente de la presente invención, es una cadena alquilo C₁-C₂₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena arilalquilo C₁-C₂₀ (en la que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos de carbono) o una cadena de 1 a 20 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 20 átomos, o con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden por lo menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos).

20 En una realización, Q, por ejemplo el conector Q en un compuesto según la presente invención es una cadena alquilo C₁-C₁₂ lineal o ramificada saturada o una cadena arilalquilo C₁-C₁₂ o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden por lo menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos).

25 En una realización Q es un enlace covalente. En el caso de que Q sea un enlace covalente, el grupo funcional Z es por lo menos uno de entre R¹³ y R²⁰. En una realización, uno de entre R¹³ y R²⁰ es Z.

30 En una realización, Q-Z es maleimida.

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

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

45 En una realización, tanto X como Y en la fórmula I son N.

50 En una realización, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula I según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidita.

55 En una realización, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula I según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidita.

60 En una realización preferente particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula I según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de ácido carbocíclico, éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

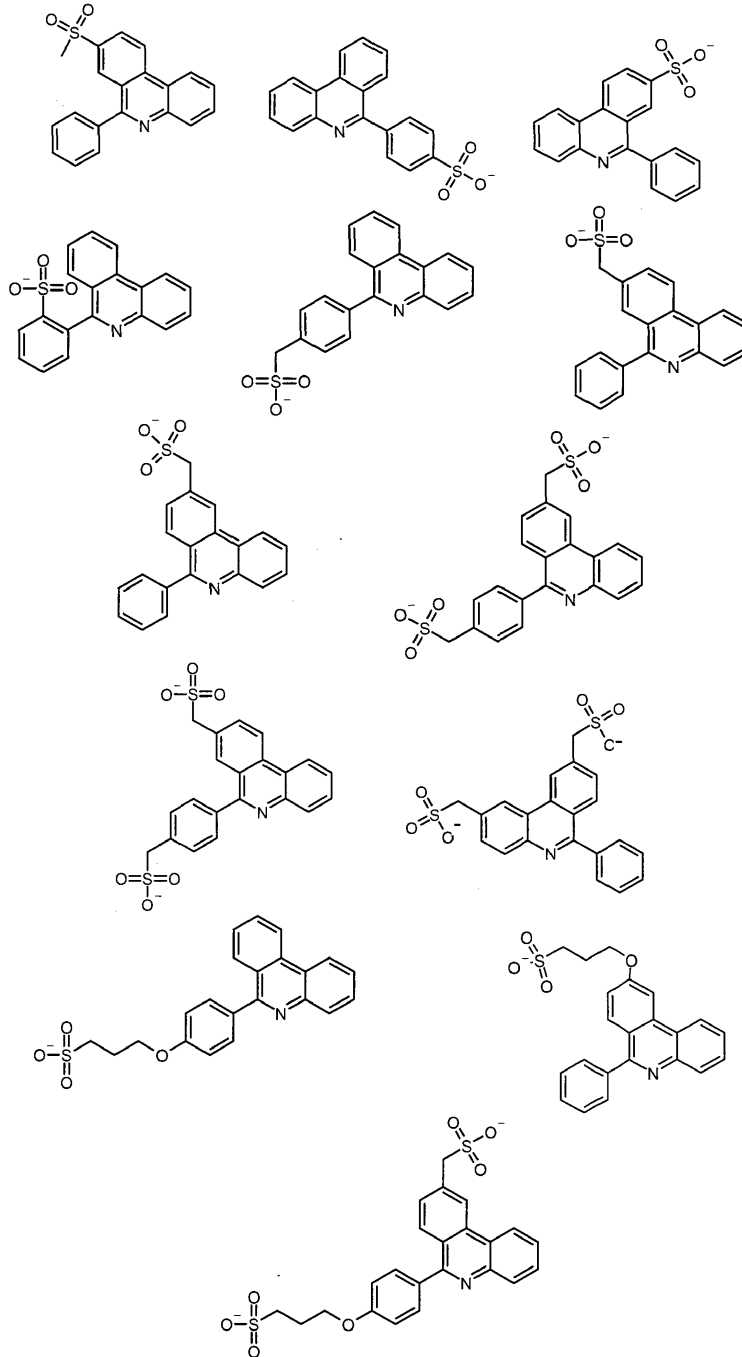
65 En una realización preferente particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula I según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en la que uno a tres de entre R¹ y R¹² de los residuos fenilfenantridina son, independientemente, sulfoalquilo, sulfoarilo, sulfoalcoxi, sulfoariloxi, sulfo o una sal de los mismos (=sulfonato), en los que el contraión preferentemente es un catión del grupo de metales

alcalinos y los otros grupos R^1 a R^{12} son hidrógeno, en los que R^{13} a R^{20} es $-Q-Z$, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y los otros grupos R^{13} a R^{20} en la fórmula I son hidrógenos o R^{21} , en el que R^{21} es alquilo, y en el que X e Y son N.

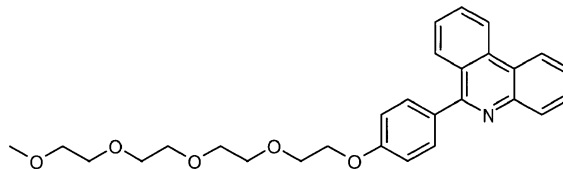
5 En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en la que los residuos fenilfenantridina comprendidos en la fórmula I se seleccionan de entre las fenilfenantridinas sustituidas proporcionadas posteriormente.

10



15

y



en la que uno de entre R^{13} y R^{20} es $-Q-Z$, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y los otros grupos R^{13} a R^{20} en la fórmula I son hidrógenos o R^{21} , en el que R^{21} es alquilo, y en el que X e Y son N.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en la que R^1 a R^{12} son hidrógeno, en la que uno de entre R^{13} y R^{20} es $-Q-Z$, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional, preferentemente ácido carboxílico y los otros grupos R^{13} a R^{20} en la fórmula I son hidrógenos o R^{21} , en el que R^{21} es alquilo, y en el que X e Y son N.

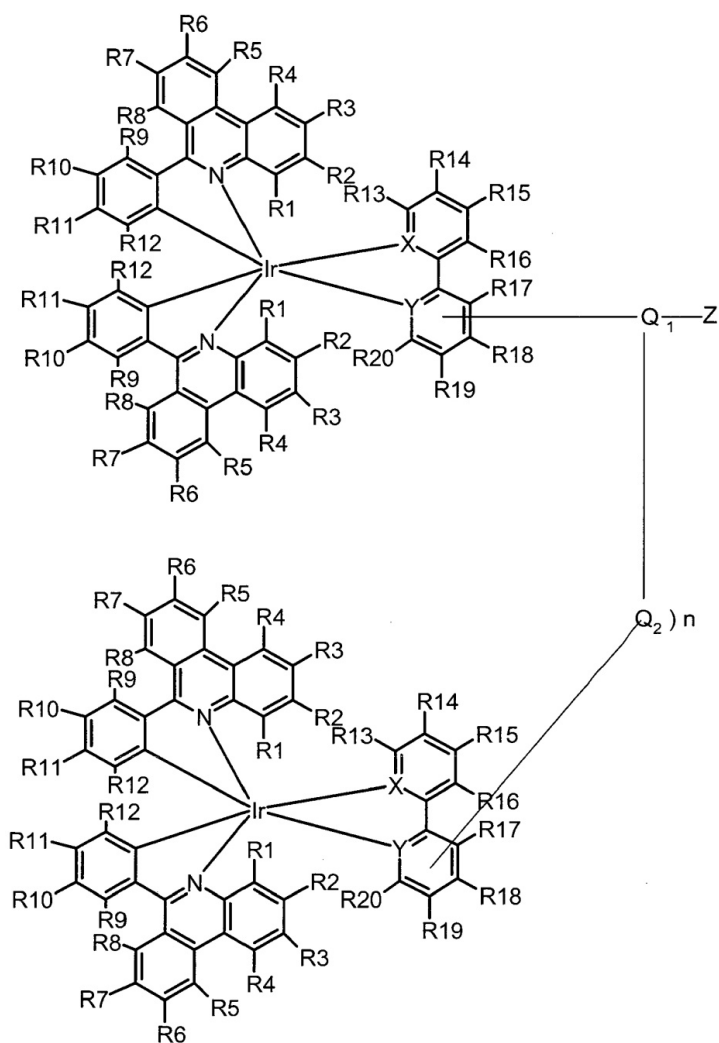
10 Cualesquiera combinaciones de cualesquiera realizaciones de los compuestos de fórmula I tal como se han definido anteriormente se considera que se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención.

15 Ahora se ha encontrado sorprendente e inesperadamente que determinados complejos quimioluminiscentes a base de iridio de fórmula I resultan adecuados como marcajes para futuros métodos de detección basados en EQL de alta sensibilidad.

Nuevos compuestos quimioluminiscentes a base de iridio de fórmula II

20 En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II:

FÓRMULA I(a)



FÓRMULA I(b)

25 en la que en la fórmula I(a) y en la fórmula I(b), respectiva e independientemente, R^1 a R^{20} son tal como se ha definido para la fórmula I, con la excepción de que Q de la fórmula I es Q_1 o Q_2 en la fórmula II, respectivamente, en

la que Q_1 es un conector, preferentemente en el que por lo menos uno de entre R^{13} y R^{20} en la fórmula I(a) es $-Q_1-Z$ y en el que Q_1 es un conector, en el que por lo menos uno de entre R^{13} y R^{20} en la fórmula I(b) es Q_2 y cada Q_2 es independientemente un conector o un enlace covalente, en el que (n) es un número entero entre 1 y 50.

en la que X e Y son tal como se ha definido para la fórmula I,
y en la que Z es un grupo funcional.

En una realización, uno de entre R^{13} y R^{20} de fórmula I(a) en la fórmula II es $-Q_1-Z$.

En una realización, uno de entre R^{13} y R^{20} en cada uno de fórmula I(b) en la fórmula II es Q_2 .

En una realización, uno de entre R^{13} y R^{20} de fórmula I(a) en la fórmula II es Q_1-Z y uno de entre R^{13} y R^{20} en cada uno de fórmula I(b) en la fórmula II es Q_2 .

Un compuesto de fórmula I(a) y de fórmula I(b), respectivamente comprende dos ligandos derivados de fenilfenantridina tal como se define mediante las definiciones proporcionadas anteriormente para la fórmula I y un tercer ligando.

En una realización, R^1 a R^{20} presentan los mismos significados indicados anteriormente para R^1 a R^{20} para los compuestos de fórmula II.

En una realización, las fórmulas I(a) y I(b) son iguales, excepto por Q_1-Z en la fórmula I(a) y Q_2 en la fórmula I(b), respectivamente.

Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, el conector Q_1 de fórmula II comprende n sitios de ramificación en los que se encuentra unido Q_2 .

En una realización, Q_1 de fórmula II presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{200} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, Q_1 de fórmula II presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{100} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, el conector Q_1 de fórmula II presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{50} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización adicional, el conector Q_1 de fórmula II presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{20} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, el conector Q_1 de fórmula II en el complejo electroquimioluminiscente de la presente invención es una cadena alquilo C_1-C_{20} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena arilalquilo C_1-C_{20} (en la que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos de carbono) o una cadena de 1 a 20 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 20 átomos, o con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden por lo menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos).

En una realización, Q_1 , por ejemplo el conector Q_1 en un compuesto según la presente invención es una cadena alquilo C_1-C_{12} saturada o una cadena arilalquilo C_1-C_{12} o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden por lo menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido

(en el que, por ejemplo, un anillo fenileno supone una longitud de cuatro átomos).

La fórmula I(b) y Q_2 se encuentran presentes (n) veces en un compuesto según la fórmula II, en la que (n) es un número entero entre 1 y 50. Cada uno de dichos (n) Q_2 es independiente un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{200} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, Q_2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{100} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, Q_2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{50} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, Q_2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{20} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q_2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1-C_{12} saturada o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, el conector Q_1 comprende uno o más aminoácidos.

En una realización, el conector Q_1 comprende una cadena peptídica.

En una realización, el conector Q_2 comprende uno o más aminoácidos.

En una realización, tanto el conector Q_1 como el Q_2 comprenden uno o más aminoácidos.

En una realización, el conector Q_1 comprende uno o más nucleótidos.

En una realización, el conector Q_2 comprende uno o más nucleótidos.

En una realización, tanto el conector Q_1 como el Q_2 comprenden uno o más nucleótidos.

En una realización, el conector Q_2 se selecciona de entre el grupo que consiste de $-C_6H_4-(CH_2)_2-$ y $-C_6H_4-(CH_2)_2-CO-$.

En la fórmula II, (n) es un número entero entre 1 y 50, que indica que la fórmula I(b) y Q_2 se encuentran presentes (n) veces en el compuesto según la fórmula II. En determinadas realizaciones, (n) es un número entero entre 2 y 50, o entre 1 y 40, o entre 2 y 40, o entre 3 y 31.

En la fórmula II, (n) es un número entero entre 1 y 50, que indica que la fórmula I(b) y Q_2 se encuentran presentes (n) veces en el compuesto según la fórmula II. En determinadas realizaciones (n) es un número entero entre 1 y 49, entre 1 y 48, entre 1 y 47, entre 1 y 46, entre 1 y 45, entre 1 y 44, entre 1 y 43, entre 1 y 42, entre 1 y 41, entre 1 y 40, entre 2 y 50, entre 2 y 49, entre 2 y 48, entre 2 y 47, entre 2 y 46, entre 2 y 45, entre 2 y 44, entre 2 y 43, entre 2 y 42, entre 2 y 41, entre 2 y 40, entre 3 y 39, entre 3 y 38, entre 3 y 37, entre 3 y 36, entre 3 y 35, entre 3 y 34, entre 3 y 33, entre 3 y 32, entre 3 y 31, entre 3 y 30, entre 4 y 29, entre 4 y 28, entre 4 y 27, entre 4 y 26, entre 4 y 25, entre 4 y 24, entre 4 y 23, entre 4 y 22, entre 4 y 21, entre 4 y 20, entre 5 y 19, entre 5 y 18, entre 5 y 17, entre 5 y 16, entre 5 y 15, entre 5 y 14, entre 5 y 13, entre 5 y 12, entre 5 y 11 o entre 5 y 10.

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

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

5

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

10 En una realización, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula II según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidita.

15 En una realización, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula II según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidita.

20 En una realización preferente particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo a base de iridio de fórmula II según la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste de éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

Cualesquiera combinaciones de cualesquiera realizaciones de los compuestos de fórmula II tal como se han definido anteriormente se considera que se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención.

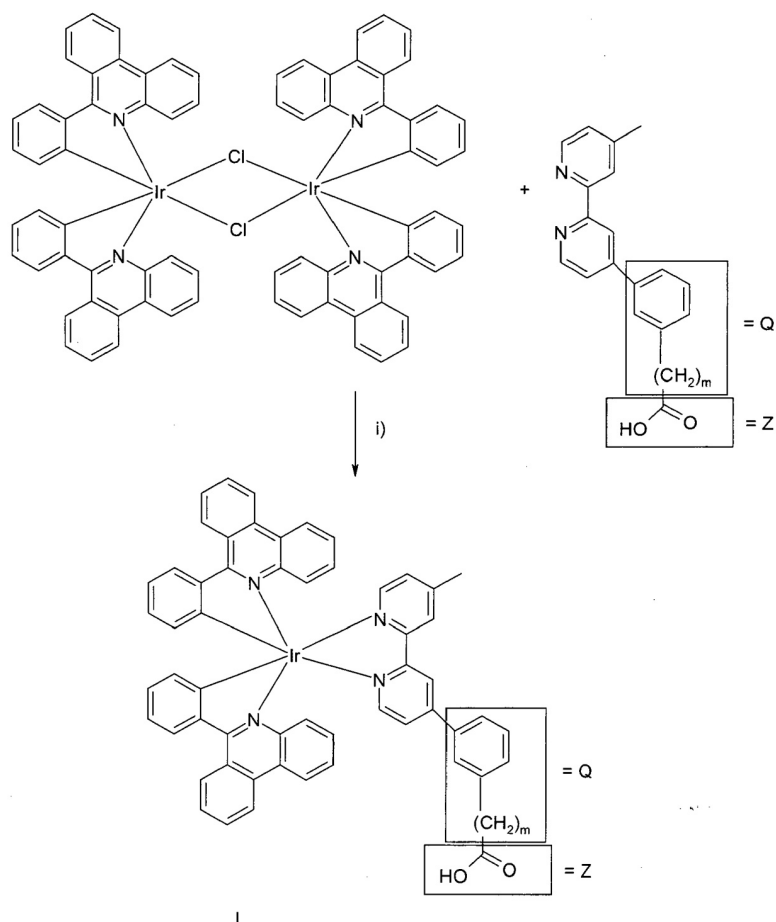
25 Ahora se ha encontrado sorprendente e inesperadamente que determinados complejos quimioluminiscentes a base de iridio de fórmula II resultan adecuados como marcajes para futuros métodos de detección basados en EQL de alta sensibilidad.

Procedimientos para la preparación de compuestos de fórmulas I y II:

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

35 Los compuestos según la fórmula I pueden sintetizarse, por ejemplo (basado en Lamansky S., Inorg. Chem. 40:1704-1711, 2001) de la manera siguiente: síntesis del complejo dímero fenil-fenantridina iridio sustituido; reacción de dicho dímero con un precursor de Q-Z proporcionando un producto según la fórmula I.

Según dicho procedimiento, los compuestos de fórmula I pueden obtenerse, por ejemplo, tal como se muestra en el Esquema 1, a continuación.

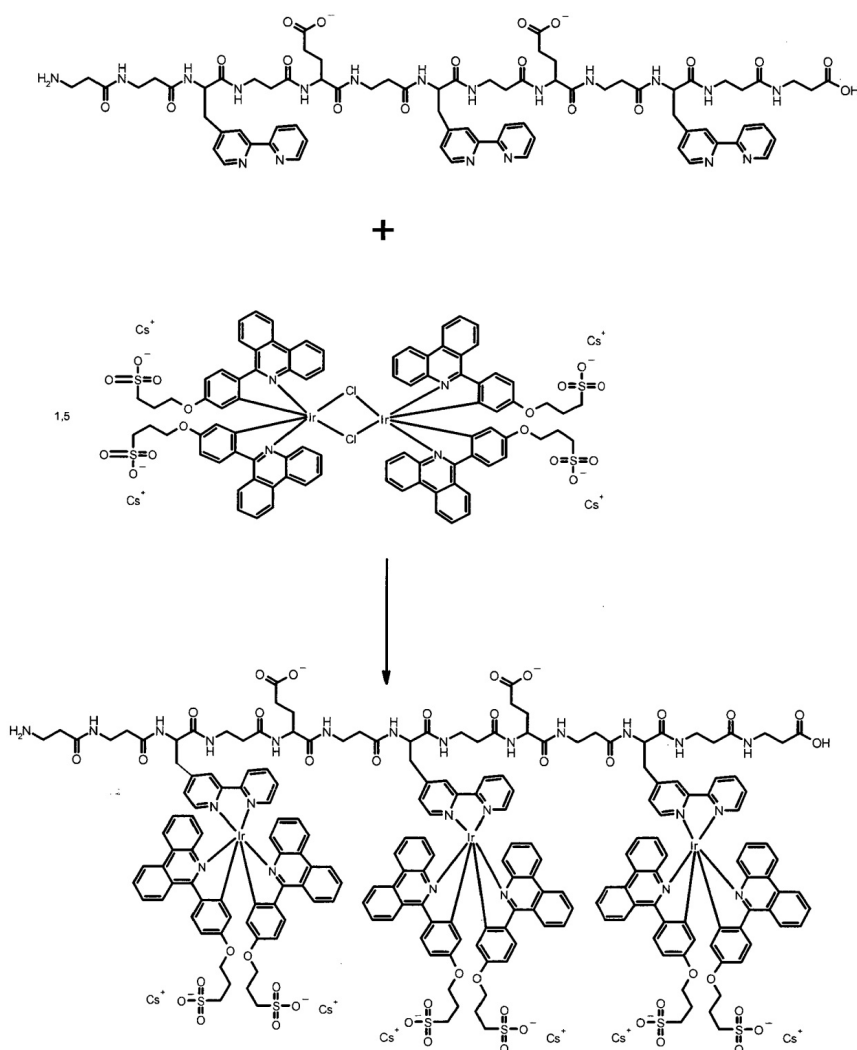


Esquema 1: síntesis de un compuesto de fórmula I. Reactivos y condiciones: (i) Na_2CO_3 , 2-etoxietanol; m es un número entero entre 1 y 17.

El complejo de dímero fenilo-fenantridina iridio sustituido que se utiliza como material de partida puede obtenerse mediante procedimientos tales como se muestran en, por ejemplo, los Ejemplos (ver el Ejemplo 2) y tal como se indica en, por ejemplo, el documento nº EP 12179056.2.

Los compuestos según la fórmula II pueden sintetizarse, por ejemplo (basado en Lamansky S., Inorg. Chem. 40:1704-1711, 2001) de la manera siguiente: síntesis del complejo dímero fenil-fenantridina iridio sustituido; reacción de dicho dímero con un precursor del conector Q que contiene 1 a 50 fracciones de tercer ligando, proporcionando un producto según la fórmula II.

Según dicho procedimiento, los compuestos de fórmula II pueden obtenerse, por ejemplo, tal como se muestra en el Esquema 2, a continuación.

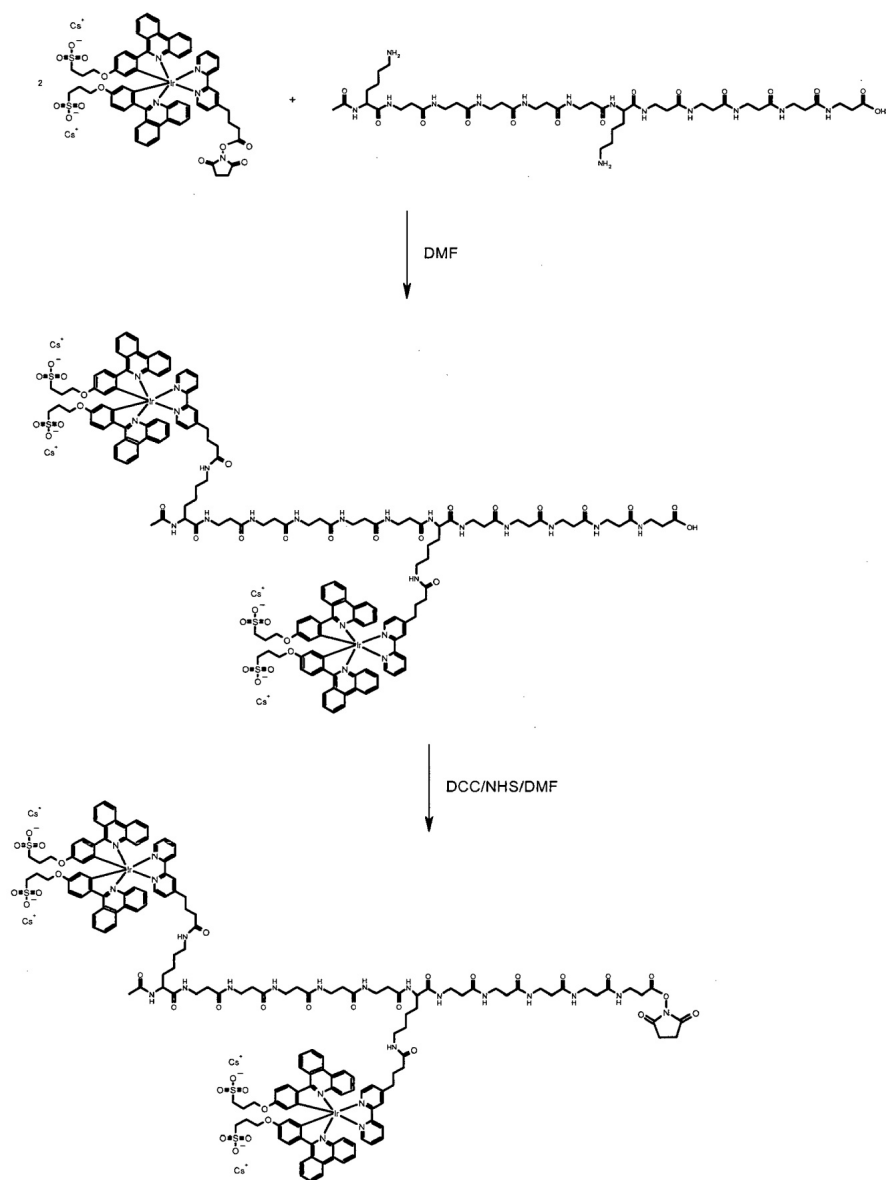


Esquema 2: síntesis de un compuesto de fórmula II. Reactivos y condiciones: Cs_2CO_3 , DMF

El complejo de dímero fenilo-fenantridina iridio sustituido que se utiliza como material de partida puede obtenerse mediante procedimientos tales como se muestran en, por ejemplo, los Ejemplos (ver el Ejemplo 2) y tal como se indica en, por ejemplo, el documento nº EP 12179056.2.

Los compuestos según la fórmula II también pueden sintetizarse de otra manera: el complejo dímico fenilo-fenantridina iridio sustituido (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2.2) en primer lugar se hace reaccionar con un derivado del tercer ligando que contiene un grupo funcional (-Q-)Z, resultando en un complejo monomérico de iridio. En la fórmula I se proporciona, por ejemplo, un complejo monomérico de iridio. A continuación, el complejo monomérico de iridio se hace reaccionar adicionalmente con un precursor de Q que contiene 1 a 50 grupos que pueden hacerse reaccionar con el grupo funcional del complejo monomérico de iridio formando enlaces covalentes; de esta manera, tras la formación de los enlaces covalentes nuevamente se obtiene un compuesto según la fórmula II.

Según dicho procedimiento, los compuestos de fórmula II pueden obtenerse, por ejemplo, tal como se muestra en el Esquema 3, a continuación.



Esquema 3: síntesis de un compuesto de fórmula II.

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

- 5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente a base de iridio de fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, tal como se da a conocer y se ha definido anteriormente en la presente memoria y covalentemente unido al mismo una sustancia biológica. Son ejemplos de sustancias biológicas adecuadas, células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glucoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, ácidos péptido nucleicos (APN), oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

15 En una realización, la sustancia biológica de un conjugado según la presente invención, es decir, unida covalentemente a un compuesto según la fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, es un agente de unión por afinidad. Un agente de unión por afinidad es una molécula capaz de unión molecular a otra molécula debido a la interacción de atracción entre estas moléculas, resultando en una asociación estable en la que las moléculas se encuentran próximas entre sí. El resultado de la unión molecular es la formación de un complejo molecular. La unión de atracción entre los componentes de un complejo normalmente es más débil que en un enlace covalente. En el presente caso, el agente de unión es un agente de unión por afinidad, lo que implica que es capaz de unión a un complejo de afinidad, es decir, un complejo estable bajo las condiciones respectivas, por ejemplo un medio acuoso bajo condiciones estándares. Entre las moléculas que pueden participar en la unión molecular se incluyen, aunque

sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas orgánicas pequeñas, tales como fármacos. Por lo tanto, entre los tipos de complejos que se forman como resultado de la unión molecular se incluyen: proteína - proteína, proteína - ADN, proteína - hormona, proteína - fármaco, antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-avidina o estreptavidina, ácido nucleico-ácido nucleico complementario o receptor-(ant)agonista de receptor.

5 Tal como apreciará el experto en la materia, en un conjugado según la presente invención el grupo funcional Z del compuesto según la fórmula I o de fórmula II, respectivamente, ha sido utilizado para formar un enlace covalente con un grupo en el agente de unión por afinidad y ya no se encuentra presente como tal. En el caso de que el reactivo de unión por afinidad no contenga por sí mismo un grupo apropiado para la unión o la reacción con el grupo Z, dicho grupo puede introducirse fácilmente en el agente de unión por afinidad basándose en procedimientos bien establecidos.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a la preparación de un conjugado mediante la reacción del grupo funcional Z de un compuesto de fórmula I o de fórmula II con un grupo reactivo apropiado de un agente de unión por afinidad tal como se define en la presente memoria con el grupo funcional Z.

15 Dicho procedimiento puede ser llevado a cabo por el experto en la materia utilizando métodos estándares conocidos por el experto en la materia.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado obtenible mediante el procedimiento para la preparación de un conjugado indicado anteriormente.

25 Sin deseo de limitarse adicionalmente, aunque 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 análogo de biotina y avidina o estreptavidina, sacárido y lectina, un enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido péptido nucleico (APN), un polisacárido, un agente secuestrante de iones metálicos, un agonista de receptor o un antagonista de receptor. Por ejemplo, el agente de unión por afinidad puede ser un componente de una pareja de unión específica, en la que el otro componente de dicha pareja de unión está asociado o es la diana sobre la superficie celular o una estructura intracelular.

30 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de fórmula I o fórmula II y un agente de unión por afinidad unido al mismo seleccionado de entre el grupo que consiste de una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, estreptavidina, sacárido, lectina, un enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido péptido nucleico (APN), un polisacárido, un agente secuestrante de iones metálicos, un agonista de receptor o un antagonista de receptor.

35 Preferentemente, un agente de unión por afinidad es una pareja o un elemento de una pareja de unión por afinidad o, tal como también es denominado por el experto en la materia, un componente o elemento de una pareja de unión específica.

40 Un agente de unión por afinidad presenta una afinidad de por lo menos 10^7 l/mol para su diana, por ejemplo un elemento de una pareja de unión específica, tal como un anticuerpo, al otro elemento de la pareja de unión específica, tal como su antígeno. Un agente de unión por afinidad preferentemente presenta una afinidad de 10^8 l/mol o todavía más preferentemente de 10^9 l/mol para su diana.

45 En una realización, la presente invención se refiere a un conjugado en el que el agente de unión por afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste de antígeno, anticuerpo, biotina o análogo de biotina, avidina o estreptavidina, sacárido, lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario, receptor y ligando.

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

55 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de fórmula I o fórmula II y una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, estreptavidina, sacárido, lectina, un enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido péptido nucleico (APN), un polisacárido, un agente secuestrante de iones metálicos, un agonista de receptor o un antagonista de receptor.

60 En una realización, el conjugado según la presente invención comprende unido covalentemente un compuesto según la fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, tal como se da a conocer y se define anteriormente en la presente memoria y un agente de unión por afinidad que es un oligonucleótido o un anticuerpo.

65

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

El término "oligonucleótido" o "ácido nucleico", tal como se utilizan en la presente memoria, generalmente se refieren a polinucleótidos cortos generalmente de cadena sencilla que comprenden por lo menos 8 nucleótidos y como máximo aproximadamente 1.000 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ó 30 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 ó 30 nucleótidos.

El término oligonucleótido debe entenderse ampliamente e incluye ADN y ARN así como análogos y modificaciones de los mismos.

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

Un análogo de ácido nucleico puede contener un nucleótido o un análogo de nucleósido, es decir, las nucleobases naturales pueden intercambiarse mediante la utilización de análogos de nucleobase como 5-nitroindol-D-ribosa, 3-nitropirrol-D-ribosa, desoxiinosina (dI), desoxixantosa (dX), 7-deaza-dG, -dA, -dI o -dX, 7-deaza-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-deaza-dA unido en N8, 5,6-dihidro-5-aza-dC y eteno-dA o pirrolo-dC. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, la nucleobase en la cadena complementaria debe seleccionarse de manera que la formación del dúplex sea específica. En el caso de que, por ejemplo se utilice 5-metil-iso-dC en una cadena (por ejemplo (a)), iso-dG debe encontrarse presente en la cadena complementaria (por ejemplo (a')).

En un análogo de ácido nucleico, el esqueleto oligonucleótido puede modificarse para contener residuos sacáridos sustituidos, análogos de azúcar, modificaciones en la fracción fosfato internucleósido y/o puede ser un APN.

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

Son análogos de azúcar, por ejemplo, xilosa, ribosa puenteada en 2',4', tal como (2'-O,4'-C-metileno)-(oligómero conocido como ALN) o (2'-O, 4'-C-etileno)-(oligómero conocido como ANE); L-ribosa, L-D-ribosa, hexitol (oligómero conocido como ANH); ciclohexenilo (oligómero conocido como ANCe), altritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclico en el que los átomos C3' y C5' se encuentran conectados mediante un puente etileno que se encuentra fusionado con un anillo ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN), glicerina (oligómero conocido como ANG), glucopiranososa (oligómero conocido como homo-ADN), carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de una subunidad tetrahidrofurano), hidroximetil-morfolina (oligómero conocido como morfolino-ADN).

Un gran número de modificaciones de la fracción fosfato internucleosídica también es conocido que no interfiere con las propiedades de hibridación y dichas modificaciones del esqueleto también pueden combinarse con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótido. Son ejemplos los oligonucleótidos fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato y metilfosfonato.

El APN (que presenta un esqueleto sin fosfato ni D-ribosa) también puede utilizarse como un análogo de ADN.

Los nucleótidos modificados y análogos de nucleótido anteriormente indicados, así como las modificaciones del esqueleto oligonucleótido pueden combinarse como se desee en un oligonucleótido en el sentido de la presente invención.

El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos con la condición de que muestren la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y entre ellos pueden incluirse enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purifica (1) a más de 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry y, en algunas realizaciones, a más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o tinción de plata.

El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que no se encontrará presente por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

5 Los "anticuerpos nativos" habitualmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y cada cadena ligera también presenta puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se encuentra alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se encuentra alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que algunos residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

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

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se encuentra distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (RHV) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas 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, adoptando mayoritariamente una configuración de lámina beta, conectada mediante tres RHV, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las RHV en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad gracias a las regiones FR y, con las RHV de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., National Institute of Health, Bethesda, MD, 1991). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se dividen en clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulina son bien conocidas y se describen de manera general en, por ejemplo, Abbas et al., Cellular y Mol. Immunology, 4a ed., W.B. Saunders, Co., 2000. Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión de mayor tamaño, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otra u otras proteínas o péptidos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo tal como se definen posteriormente. Las expresiones en particular se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, dímeros, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos ligantes de antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, el nombre del cual refleja su capacidad de cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')₂ que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

Un fragmento "Fv" es un fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión de antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), puede

- unirse covalentemente un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera mediante un conector peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres RHV de cada dominio variable interactúan definiendo un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL.
- 5 Colectivamente las seis RHV confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres RHV específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque habitualmente a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.
- 10 El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas ligera y pesada y también 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 cuantos residuos al extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab' en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios cisteína portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como parejas de fragmentos Fab' que presentaban cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- 15 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios se encuentran presentes en una única cadena polipeptídica. 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 de antígeno. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthuen, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York (1994), páginas 269-315.
- 20 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un conector excesivamente corto para permitir el apareamiento los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la patente EP nº 404.097 y el documento nº WO 1993/01161; Hudson P.J. et al., *Nat. Med.* 9:129-134, 2003, y Holliger P. et al., *PNAS USA* 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se encuentran descritos en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.
- 25 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo las mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador "monoclonal" caracteriza al anticuerpo como no formando una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a única diana de entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon de entre una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones fágicos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en 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 también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales resultan ventajosas en el aspecto de que típicamente no se encuentran contaminadas por otras inmunoglobulinas.
- 30 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un conector excesivamente corto para permitir el apareamiento los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la patente EP nº 404.097 y el documento nº WO 1993/01161; Hudson P.J. et al., *Nat. Med.* 9:129-134, 2003, y Holliger P. et al., *PNAS USA* 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se encuentran descritos en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.
- 35 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo las mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador "monoclonal" caracteriza al anticuerpo como no formando una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a única diana de entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon de entre una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones fágicos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en 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 también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales resultan ventajosas en el aspecto de que típicamente no se encuentran contaminadas por otras inmunoglobulinas.
- 40 Tal como se ha indicado, los compuestos y conjugados tales como los datos a conocer en la presente memoria presentan propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados dados a conocer, respectivamente, muestran una elevada eficiencia de EQL. Dicha elevada eficiencia también se encuentra presente en el caso de que las mediciones correspondientes se lleven a cabo en un sistema acuoso, en comparación con muchos marcajes de EQL que sólo han mostrado una eficiencia elevada de EQL al analizarlos en un solvente orgánico. Por ejemplo, muchos pigmentos de OLED habitualmente se analizan en acetonitrilo y no son solubles en una solución acuosa o, en caso de ser solubles, no muestran una electroquimioluminiscencia eficiente en solución acuosa.
- 45 Tal como se ha indicado, los compuestos y conjugados tales como los datos a conocer en la presente memoria presentan propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados dados a conocer, respectivamente, muestran una elevada eficiencia de EQL. Dicha elevada eficiencia también se encuentra presente en el caso de que las mediciones correspondientes se lleven a cabo en un sistema acuoso, en comparación con muchos marcajes de EQL que sólo han mostrado una eficiencia elevada de EQL al analizarlos en un solvente orgánico. Por ejemplo, muchos pigmentos de OLED habitualmente se analizan en acetonitrilo y no son solubles en una solución acuosa o, en caso de ser solubles, no muestran una electroquimioluminiscencia eficiente en solución acuosa.
- 50 En una realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, tal como se da a conocer en la presente invención para llevar a cabo una reacción de
- 55
- 60
- 65

electroquimioluminiscencia en una solución acuosa. Una solución acuosa es cualquier solución que comprende por lo menos 90% de agua (peso:peso). Evidentemente dicha solución acuosa puede contener además ingredientes tales como compuestos tampón, detergentes y, por ejemplo, amins terciarias tales como tripropilamina como donante de electrones en la reacción de EQL.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, tal como se da a conocer en la presente invención en un método de detección basado en la electroquimioluminiscencia.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, tal como se da a conocer en la presente invención en la detección de un analito.

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

15 El analito puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de un polipéptido, un carbohidrato y una molécula farmacológica inorgánica u orgánica.

Un polipéptido o proteína es una molécula que está compuesta esencialmente de aminoácidos y que presenta por lo menos dos aminoácidos unidos mediante enlace peptídico. En el caso de que el analito de interés deba investigarse en un método dado a conocer en la presente memoria, el polipéptido preferentemente consistirá de entre por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 y 30 y hasta aproximadamente 10.000 aminoácidos. Preferentemente el polipéptido contiene entre 5 y 2.000, también preferentemente entre 10 y 1.000 aminoácidos.

20 En el caso de que el analito sea un ácido nucleico, dichos ácidos nucleicos preferentemente son oligonucleótidos de ADN o ARN naturales.

30 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 conoce que comprende el analito, (b) puesta en contacto de dicha muestra con un conjugado entre un agente de unión por afinidad y un compuesto según la fórmula I o de fórmula II, respectivamente, bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de conjugado del analito y (c) medición del complejo formado en la etapa (b) y obtención de esta manera de una medición del analito.

35 En una realización, la medición de un analito se refiere a la detección de la cantidad del analito en una muestra.

40 En una realización, la medición en el método anteriormente indicado para la detección de un analito se lleva a cabo mediante la utilización de un procedimiento de detección basado en electroquimioluminiscencia. También preferentemente el método se pone en práctica en una solución acuosa.

45 Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

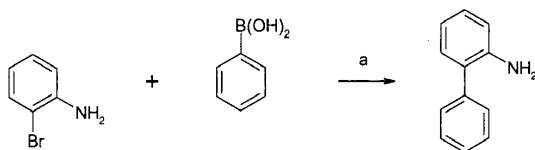
Ejemplo 1

Síntesis de fenil-fenantridinas sustituidas

Ejemplo 1.1

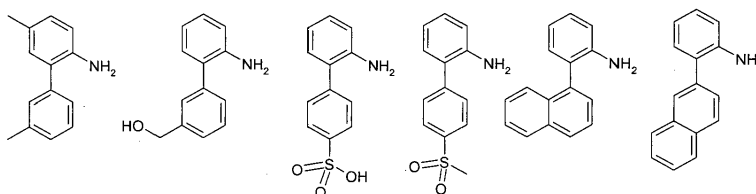
Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

60 Con la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura tal como se describe en Youn S.W., Tetrahedron Lett. 50:4598-4601, 2009, entre derivados 2-bromoanilina disponibles comercialmente y el ácido arilborónico correspondiente, pueden sintetizarse los 2-aminobifenilos apropiados, los cuales resultan necesarios para reacciones adicionales con fenantridinas.

Procedimiento típico:

5

a: 10% molar de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, K_2CO_3 , DMF/ H_2O (5/1), 80°C , 24 h

Otros ejemplos:

10

Ejemplo 1.2Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

15

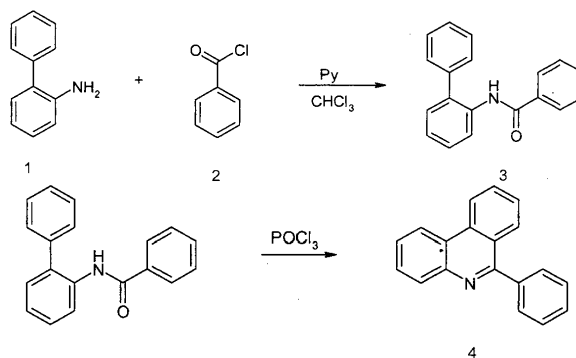
A la solución helada de 2-aryl-anilina 1 (0,01 moles) en cloroformo (20 ml) se añadió cloruro de ácido de arilo 2 (0,01 moles) y se agitó bajo condiciones inertes durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió a reflujo bajo agitación durante las siguientes 2 horas. La mezcla de reacción se trató mediante la adición gota a gota de piridina (0,02 moles en 10 ml de cloroformo) durante un periodo de 60 minutos. Se dejó que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se lavó bien con HCl 0,5 M, se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice, hexano/acetato de etilo 3:2, proporcionando producto puro 3 con un rendimiento de 66%.

20

25

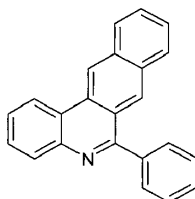
Se sometió a reflujo benzamido-2-bifenilo 3 (0,01 moles) y POCl_3 (5 ml) en 20 ml de tolueno y se agitó bajo nitrógeno durante 18 horas, siguiendo el procedimiento descrito en Lion C., Bull. Soc. Chim. Belg. 98:557-566, 1989. La mezcla de reacción fría se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml) y se vertió en hielo, se lavó con NH_4OH al 25% y agua destilada. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío, seguido de cromatografía flash (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 1:1), proporcionando el producto 4,6-fenilfenantridina.

30



Rendimiento: 52%. Sólido blanco. $\text{RMN-}^1\text{H}$ (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).

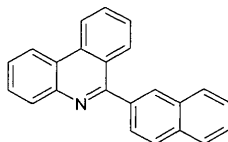
35

Utilización de 2-naftalén-2-il-fenilamina en lugar de 2-aryl-anilina:

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

5 EM: [M+H]⁺ 306,3

La utilización de cloruro de naftaleno-carbonilo en lugar de cloruro de ácido de fenilo rindió:



10 RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

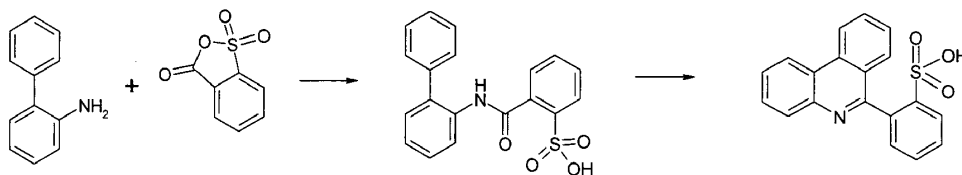
15 EM: [M+H]⁺ 306,3

Ejemplo 1.3

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

20 La 6-(2-sulfofenil)fenantridina puede sintetizarse mediante calentamiento suave de arilanilina (0,01 moles) con anhídrido cíclico de ácido 2-sulfobenzoico (0,01 moles) en CH₃CN durante 6 horas utilizando el procedimiento descrito por Nicolai E., Chem. Pharm. Bull. 42:1617-1630, 1994.

25 Tras la purificación, el producto puede convertirse en la fenantridina apropiada basándose en el método descrito en el Ejemplo 1.2.

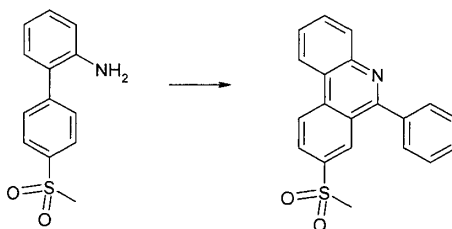


Ejemplo 1.4

Procedimiento para la síntesis de 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina

35 La 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina puede sintetizarse mediante calentamiento suave de alquilsulfonil-arilanilina (0,01 moles) con cloruro de ácido benzoico (0,01 moles) en cloroformo utilizando el procedimiento descrito por Lion C., Bull. Soc. Chim. Belg. 98:557-566, 1989; ver el Ejemplo 1.2.

Tras la purificación, el producto puede convertirse en la fenantridina apropiada basándose en el método descrito en el Ejemplo 1.2.



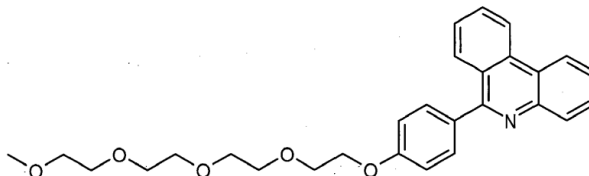
40 RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,92 (d, J=8,7 Hz, 1H), 8,75 (d, J=1,9 Hz, 1H), 8,68 (d, J=7,0 Hz, 1H), 8,35 (dd, J=8,7, 2,0 Hz, 1H), 8,30 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,89 (t, J=15,3, 7,1 Hz, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,64-7,56 (m, 3H) 3,12 (s, 3H).

45 EM: [M+H]⁺ 334,3

La 6-(4-metilsulfofenil)fenantridina también puede prepararse siguiendo el procedimiento descrito por Cymerman J., J. Chem. Soc., 703-707, 1949.

Ejemplo 1.5Síntesis de 6-[4-(2-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina

5

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

10 Procedimiento: (JACS 129:13364, 2007) A una solución de 2,5,8,11-tetraoxatridecán-13-ol (7 g, 33,6 mmoles) y trietilamina (4,9 ml, 35,3 mmoles) en CH₂Cl₂ seco (100 ml), se añadió cloruro de 4-toluenosulfonilo (6,7 g, 35,3 mmoles) y DMAP (120 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con 80 ml de HCl (1 M) y después con agua. El extracto se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el filtrado. El residuo se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

15 Rendimiento: 11,0 g (90%).

RMN:

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

20 RMN-¹³C{¹H} (101 MHz, CDCl₃) 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 etil-éster de ácido 4-PEG4-benzoico:

25 Procedimiento: (JACS 129:13364, 2007) Una mezcla del compuesto 2,5,8,11-tetraoxatridecán-13-il-4-metilbencenosulfonato de etilo (8,1 g, 22,3 mmoles), etil-éster de ácido 4-hidroxibenzoico (3,7 g, 22,3 mmoles), K₂CO₃ (15,4 g, 111,5 mmoles) y 18-corona-6 (0,59 g, 2,2 mmoles) se sometió 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 H₂O, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se filtró. Se evaporó el filtrado a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (diclorometano/metanol=100:1), obteniendo el compuesto (1,93 g, 88%).

30 Rendimiento: 7 g (88%).

RMN:

35 RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01-7,84 (m, 2H), 6,96-6,85 (m, 2H), 4,29 (q, 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-¹³C{¹H} (101 MHz, CDCl₃) 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).

EM(+):

40 [M+Na⁺]⁺ = calc. 379,1727, observado: 379,1743.

Síntesis de ácido 4-PEG4-benzoico:

45 Procedimiento: (JACS 129:13364, 2007) Una mezcla del compuesto 4-(2,5,8,11-tetraoxatridecán-13-iloxi)benzoato de etilo (7 g, 19,6 mmoles) y KOH (2,3 g, 41,24 mmoles) en 200 ml de EtOH/H₂O (1:1 v/v) se sometió a reflujo durante la noche. Tras el enfriamiento, la mezcla se neutralizó con HCl (2 N). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc y se evaporó a sequedad. El sólido blanco resultante se recristalizó en EtOAc/hexano.

50 Rendimiento: 5,3 g (85%).

RMN:

55 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) 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-¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃) 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).

EM(-):

60 [M-H]⁻=calc. 327,1438, observado: 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-tetraoxatridecán-13-iloxi)benzoico (3 g, 9,14 mmoles), 0,2 ml de DMF en 30 ml de DCM seco a 0°C, se añadió cloruro de oxalilo (1,05 ml, 12,34 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La solución se concentró a sequedad. El residuo aceitoso se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

Una solución de 2-fenilalanina (1,6 g), piridina (2,4 ml) en cloroformo (80 ml) bajo una atmósfera inerte se enfrió a 0°C. Se añadió lentamente cloruro de (fenil-4-(2,5,8,11-tetraoxatridecán-13-iloxi)benzoilo (3,1 g, 9,14 mmoles) en 20 ml a la solución y la mezcla final se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. La solución se sometió a reflujo durante 2 h y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con HCl (1 M, 2x100 ml), NaHCO₃ (100 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se purificó mediante 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).

EM(+): [M+H]⁺=calc. 480,2386; observado: 480,2383; [M+Na]⁺=calc. 502,2200, observado: 502,2204.

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

Procedimiento: se sometió a reflujo durante 20 h N-bifenil-2-il-4-(2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benzamida (4 g, 8,34 mmoles), POCl₃ (10 ml) en 10 ml de tolueno. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de diclorometano. La solución se vertió en hielo y la mezcla se neutralizó con NH₄OH (al 20%). Se extrajo la fase orgánica y se lavó sucesivamente con agua destilada y solución hipersalina, y se secó sobre MgSO₄. La solución resultante se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, en acetato de etilo/hexano 1:1, R_f=0,14).

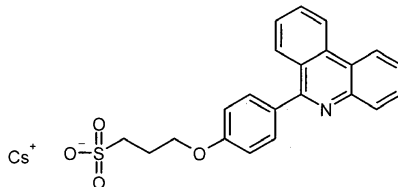
Rendimiento: 1 g (25%).

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).

EM (+): JM358-F5, [M+H]⁺ calc.=462,2280, observado: 462,2275.

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

Se preparó 6-(4-metoxifenil)fenantridina mediante ciclización de la N-(bifenil-2-il)-4-metoxibenzamida (2 g, 6,59 mmoles) siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. El compuesto se purificó mediante cromatografía en diclorometano/hexano (gradiente 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).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) 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-¹³C (75 MHz, CDCl₃) 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).

5 EM [IEP-EM (+)]: [M+H⁺] observado: 286,1231, calc.: 286,1226

4-Fenantridín-6-il-fenol: la desprotección de la 6-(4-metoxifenil)fenantridina se consiguió mediante la utilización de HBr. Una suspensión de 6-(4-metoxifenil)fenantridina (1 g, 3,5 mmoles) en 15 ml (HBr, al 47%) se sometió a reflujo a 100°C durante 12 h. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en agua helada y se neutralizó con Na₂CO₃. El precipitado resultante se separó mediante filtración y se lavó con agua y Et₂O. El sólido se purificó mediante cromatografía de columna utilizando diclorometano/MeOH. Rendimiento: 90%.

10 RMN:

15 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).

EM [IEP-EM (-)]:

20 [M+H⁺] observado: 270,0922, calc.: 270,0924.

A una solución de 4-(fenantridín-6-il)fenol (320 mg, 1,18 mmoles) en DMF (4 ml), se añadió Cs₂CO₃ (482,2 mg, 1,48 mmoles) y 1,3-propilsulfona (159 mg, 1,30 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna (sílice) utilizando diclorometano/MeOH (gradiente 10:1 a 5:1).

25 Rendimiento: 72%

RMN:

30 RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆) 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).

EM [EM-EP (-)]:

35 [M-Cs⁺] calc.: 392,0956; observado: 392,0962.

Ejemplo 2

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

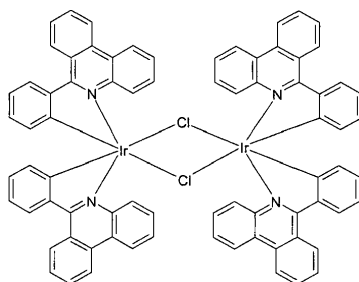
40 El procedimiento general ha sido publicado por Nonoyama M., J. Organomet. Chem. 86:263-267, 1975.

Se sintetizaron dímeros de iridio de la manera siguiente: se calentó IrCl₃•3H₂O y 2,5 equiv. de 6-fenilfenantridina a 120°C durante 18 h bajo nitrógeno en una mezcla de 2-etoxietanol/agua (3:1, v/v). Tras el enfriamiento hasta la temperatura ambiente, se separó el precipitado mediante filtración y se lavó sucesivamente con metanol y Et₂O, y se secó, proporcionando el dímero deseado.

Ejemplo 2.1

Complejo con fenilfenantridina no sustituida

50

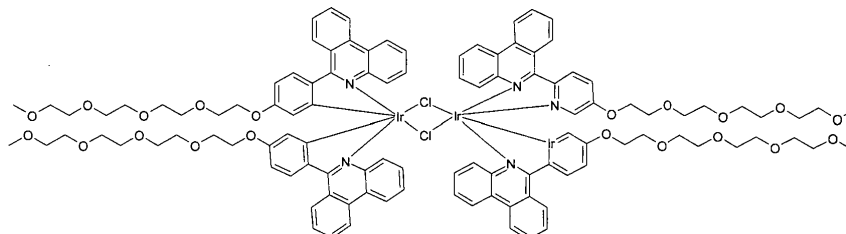


[IrCl₂(6-phenylphenanthridine)]₂

55 Rendimiento: 71%. Sólido marrón. 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 2.2Complejo con fenilfenantridina sustituida

5



Una mezcla de 6-[4-(2-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-fenil]-fenantridina (1 g, 2,16 mmoles), $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (346 mg, 0,98 mmoles) en 16 ml de 2-EtOEtOH:H₂O (12:4) se sometió a reflujo durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadieron 60 ml de agua, obteniendo un precipitado aceitoso. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 50 ml de agua al residuo. La mezcla se agitó durante 1 h, obteniendo un precipitado rojo-parduzco. El sólido se filtró y se lavó con agua (50 ml) y Et₂O (30 ml). Se disolvió el sólido marrón en la cantidad más pequeña de diclorometano y se precipitó al añadir Et₂O. Se utilizó directamente en la etapa siguiente sin purificación adicional.

10

15

Rendimiento: 550 mg (50%).

RMN:

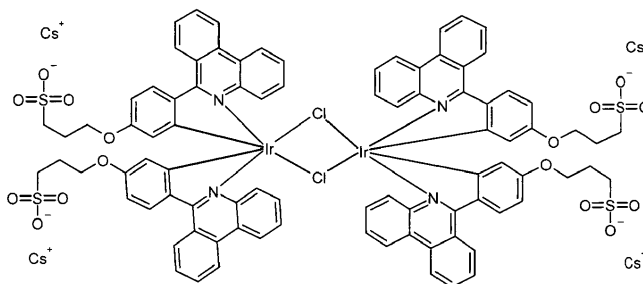
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,74 (d, J=8,1 Hz, 4H), 8,36 (dd, J=8,0, 5,2 Hz, 8H), 7,90 (dd, J=14,7, 7,7 Hz, 8H), 7,81 (d, J=9,0 Hz, 4H), 7,79-7,67 (m, 4H), 6,78-6,65 (m, 4H), 6,32 (dd, J=8,8, 2,5 Hz, 4H), 5,89-5,83 (m, 4H), 5,28 (d, J=2,5 Hz, 4H), 3,67-3,10 (m, 100H, cadena PEG, contenía algunas impurezas)

20

EM (IEP-EM (+)):

$[\text{M}+2\text{Na}^+]^{2+}$ calc.: 1.171,3463; observado: 1171,3473; $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Ir}]^+$ calc.: 1113,3877, observado: 1113,3892.

25

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

30

Una mezcla del ligando 3-(4-(fenantridín-6-il)fenoxi)propán-1-sulfonato de cesio (500 mg, 0,92 mmoles) e IrCl_3 (159,5 mg, 0,45 mmoles) en mezcla de 2-EtOEtOH:agua (3:1, 16 ml) se sometió a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 36 h. Se filtró la mezcla de reacción y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

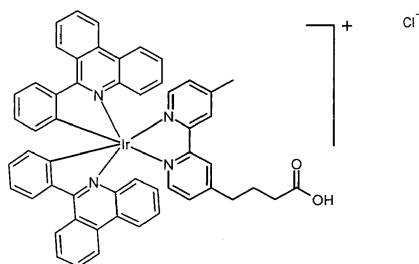
35

EM [IEP-EM (-)]:

$[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2-2\text{Cs}^+]$ calc.: 975,13858; observado: 975,13882.

40

Ejemplo 3:Síntesis de complejo de Ir(6-fenilfenantridina)₂-carboxipropilfenil-bipiridina en forma de sal cloruro



Una mezcla del dímero [(6-fenilfenantridina)₂IrCl]₂ (163 mg, 0,110 mmoles), ácido 4-(4-metil-2,2-bipiridín-4'-il)-butírico (60 mg, 0,232 mmoles) en 2-etoxietanol (15 ml) se calentó bajo reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante la noche. El producto se precipitó con agua y se separó mediante filtración. Se lavó el residuo con Et₂O. El complejo presentaba una R_f=0,57 en la CCF (diclorometano/MeOH 10:1). El producto se purificó mediante cromatografía de columna (sílice) utilizando diclorometano/MeOH (gradiente 10:1 a 5:1). Rendimiento: 25%

RMN:

10 RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,22-89,17 (t, J=6,0 Hz, 2H), 8,86-8,80 (t, J=9,0 Hz, 2H), 8,66-8,60 (t, J=6,0 Hz, 2H), 8,53-8,48 (m, 2H), 8,40-8,38 (m, 2H), 8,11-7,99 (m, 6H), 7,62-7,59 (d, J=9,0 Hz, 2 H), 7,52-7,46 (t, J=9,0 Hz, 2H), 7,38-7,34(t, J=6,0 Hz, 2H), 7,29-7,24(t, J=9,0 Hz, 2H), 7,13-7,09 (m, 2H), 6,90-6,85 (m, 2H), 6,90-6,85 (m, 2H), 6,88-6,75 (t, J=9,0 Hz, 2H), 2,21-2,17 (m, 2H), 1,83-1,77 (m, 2H), 1,55-1,42 (m, 2H).

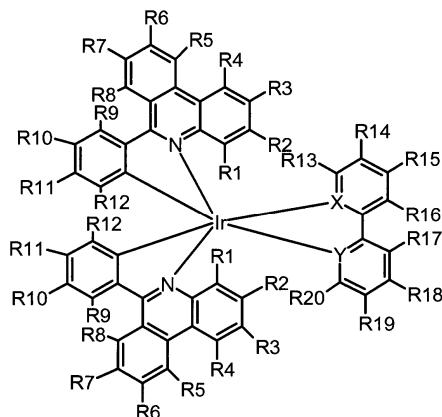
15 EM [IEP-EM (+)]:

[M]⁺ calc.: 957,27936; observado: 957,27754.

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto quimioluminiscente a base de iridio de fórmula I:



5

en la que cada R^1 - R^{20} 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 no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R^{21} , en el que R^{21} es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxi sustituido, en el que, en R^1 - R^{12} y/o en R^{13} - R^{16} y/o en R^{17} - R^{20} , respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato o, en el que, en R^1 - R^{12} y/o en R^{13} - R^{16} y/o en R^{17} - R^{20} , respectivamente, dos R contiguos pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en el que, en el caso de que en cualquier de entre R^1 y R^{21} se encuentre presente una sustitución, cada uno de los sustituyentes en R^1 - R^{21} se selecciona independientemente de entre haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, tal como amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquilo, arilalquilo, arilo, alquilarilo, polietileno, polipropileno, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxil-alquil-fosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en el que alquilo tal como se utiliza en la presente memoria es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de entre 1 y -20 átomos que comprende 1 a 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N, P y S, en el que arilo es un sistema de anillos arilo de 5, 6 o 7 elementos, o un sistema de anillos heteroarilo de 5, 6 o 7 elementos que comprende 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, en el que por lo menos no de entre R^{13} y R^{20} es -Q-Z, en el que Q es un conector o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y en el que por lo menos uno de entre X e Y es N y el otro de X o Y es independientemente N o C.

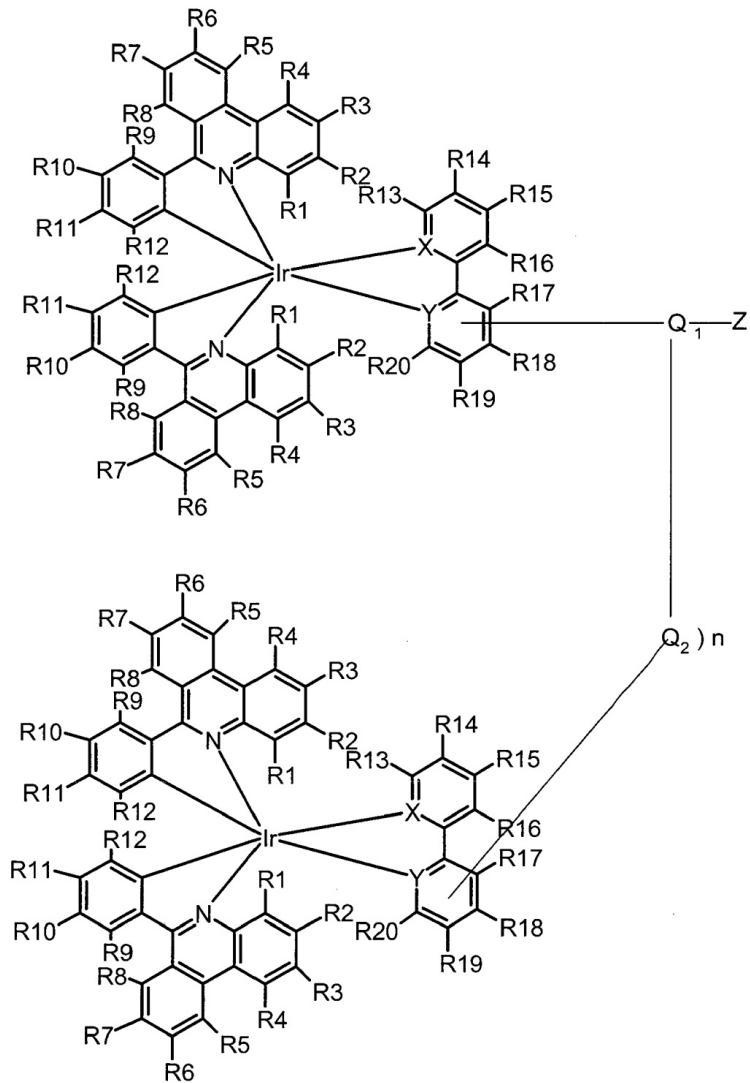
45

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Q es un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C_1 - C_{200} lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

50

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Q es un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₁₀₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que Q es un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₅₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Q es un enlace covalente o un conector que presenta como esqueleto una cadena alquilo C₁-C₂₀ lineal o ramificada, saturada o insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de entre O, N y S, o una cadena tal como se ha indicado anteriormente, conteniendo el esqueleto uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo funcional Z se selecciona de entre el grupo que consiste de aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquínilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamida.
7. Conjugado que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 unido covalentemente a un agente de unión por afinidad.
8. Conjugado según la reivindicación 7, en el que el agente de unión por afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste de antígeno y anticuerpo, biotina o análogo de biotina, avidina o estreptavidina, sacárido y lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario, y receptor y ligando.
9. Conjugado según la reivindicación 7 o 8, en el que dicho agente de unión por afinidad es un ácido nucleico o un anticuerpo.
10. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para la realización de una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa.
11. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en un método de detección basado en la electroquimioluminiscencia.
12. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en la detección de un analito.
13. 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 conoce que comprende el analito,
b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de conjugado de analito, y
c) medir el complejo formado en la etapa (b) y, de esta manera, obtener una medida del analito.
14. Compuesto quimioluminiscente según la fórmula II:

FÓRMULA I(a)



FÓRMULA I(b)

5 en la que R¹ a R²⁰ son tal como se ha definido para la fórmula 1 en la reivindicación 1, con la excepción de que Q en la fórmula I es Q₁ o Q₂ en la fórmula II, respectivamente, en la que Q₁ es un conector, en el que por lo menos uno de entre R¹³ y R²⁰ en la fórmula I(b) es Q₂ y cada Q₂ es, independientemente, un conector o un enlace covalente, en el que (n) es un número entero entre 1 y 50, en el que X e Y son tal como se ha definido para la fórmula I y en la que Z es un grupo funcional.