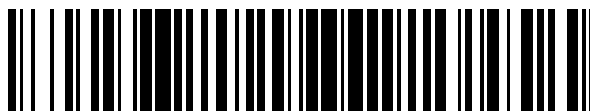


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 998**

51 Int. Cl.:

C07F 15/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/EP2013/002325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13744980 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2880042**

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

30 Prioridad:

02.08.2012 EP 12179057

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

10.07.2017

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;
LONGHI, ELENA y
SEIDEL, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 622 998 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos complejos basados en iridio para EQL

5 Antecedentes de la invención

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

10 La quimioluminiscencia electrogenerada (también llamada electroquimioluminiscencia y abreviada como EQL) es el proceso por el cual las especies generadas en electrodos experimentan reacciones de transferencia de electrones de alta energía para formar estados excitados que emiten luz. Los primeros estudios detallados de EQL fueron descritos por Hercules y Bard et al. a mediados de los años sesenta. Después de unos 50 años de estudio, la EQL se ha convertido en una técnica analítica muy potente y es ampliamente utilizada en las áreas de, por ejemplo, inmunoensayo, análisis de alimentos y agua y detección de agentes biológicos.

Hay un número tremendo de compuestos que parecen ser de interés para su uso en dispositivos emisores de luz orgánicos (OLED). Estos compuestos son adecuados para su uso en materiales sólidos o pueden disolverse en fluidos orgánicos. Sin embargo, no se puede sacar ninguna conclusión con respecto a su utilidad en un medio acuoso como, por ejemplo, requerido para la detección de un analito a partir de una muestra biológica.

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

25 El documento EP 1 418 217 A1 describe un dispositivo electroluminiscente orgánico, un material emisor de luz y un compuesto orgánico. El compuesto orgánico puede ser un complejo de iridio, que lleva dos ligandos de 6-fenilfenantridina y un ligando de 6-piridincarboxilato.

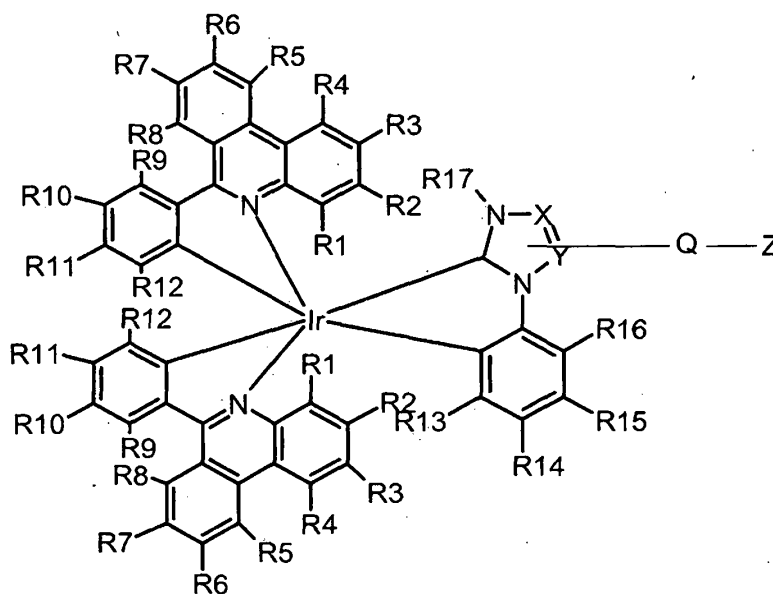
30 El documento JP 2007 169 474 A describe materiales poliméricos emisores de luz, elementos electroluminiscentes orgánicos y pantallas.

A pesar de las mejoras significativas hechas durante las últimas décadas, todavía existe una tremenda necesidad de ensayos de diagnóstico in vitro basados en electroquimioluminiscencia más sensibles.

35 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que ciertos complejos luminiscentes basados en iridio Ir(III+), representan marcadores muy prometedores para futuros métodos de detección basados en EQL de alta sensibilidad.

40 Resumen de la invención

La presente invención describe un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de fórmula I



I

en el que X e Y son C-R18 y C-R19, respectivamente, o donde X es N e Y es C-R19, o donde Y es N y X es C-R18, en el que cada R1-R19 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R20, donde R20 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxilo sustituido,

en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

en donde, si en cualquiera de R1-R19 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R19 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, un grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietilenoxi, polipropilenoxi, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfinato,

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

en el que al menos uno de R13-R19 es -Q-Z, en el que Q es un enlazador o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional.

La presente invención también describe un conjugado que comprende el compuesto anterior y unido covalentemente a éste un agente de unión de afinidad.

La presente invención se refiere además al uso de un compuesto o de un conjugado como se describe en la presente invención para realizar una medición de luminiscencia o una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa, especialmente, en un dispositivo electroquimioluminiscente o sistema de detección electroquimioluminiscente.

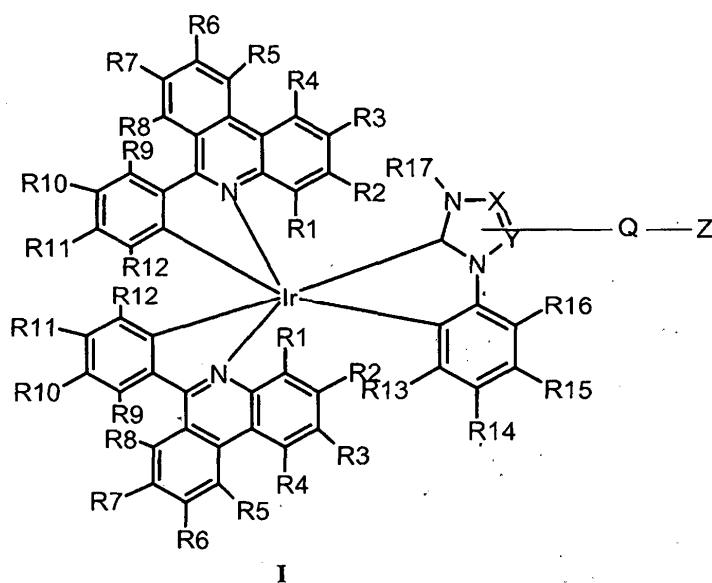
Además, la presente invención describe un método para medir un analito por un método in vitro, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una muestra sospechosa o conocida por comprender el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con la presente invención bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de conjugado de analito, y (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de este modo una medida del analito.

Descripción detallada de la invención

Como se ha indicado anteriormente, existe una necesidad de nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en metales, que son adecuados para uso en ensayos de diagnóstico in vitro.

Nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula I

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



en el que X e Y son C-R18 y C-R19, respectivamente, o donde X es N e Y es C-R19, o donde Y es N y X es C-R18,

5 en el que cada R1-R19 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, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R20, donde R20 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxilo sustituido,

15 en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

25 en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

30 en donde, si en cualquiera de R1-R19 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R19 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, un grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquilo, ariloxi, alquilariloxi, polietileno, polipropileno, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfinato,

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

en el que al menos uno de R13-R19 es -Q-Z, en el que Q es un enlazador o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional.

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

En una realización, uno de R13 a R19 de fórmula I es-Q-Z.

Como es conocido por un experto en la materia, los sustituyentes en R1-R20 pueden estar además sustituidos, por ejemplo, un grupo alquilo en un grupo aminoalquilo puede estar además sustituido por un grupo hidroxilo, amino, carboxi o sulfo.

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

Alquilo, preferiblemente, es una cadena alquílica lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono, preferiblemente con una longitud de 1-10 átomos de carbono, particularmente preferida con una longitud de 1-6 átomos de carbono; o una cadena heteroalquilo con una longitud de 1-20 átomos, preferiblemente con una longitud de 1-10 átomos de carbono, que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, los pentilos isoméricos, los hexilos isoméricos, los heptilos isómeros, los octilos isoméricos y dodecilo. En una realización preferida particular, alquilo es metilo o etilo.

Los términos alcoxi y alquiloxi, así como alquilo sustituido y alcoxi sustituido, respectivamente, se pueden usar indistintamente. Alcoxi y alquiloxi significan una porción de la fórmula -OR, en la que R es preferiblemente una porción alquilo como se ha definido anteriormente en este documento. Ejemplos de porciones alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi e isopropoxi.

En una realización, los sustituyentes preferidos para alquiloxi sustituido son cadenas de etilenoxi que comprenden 1-40 unidades de etilenoxi, o que comprenden 1-20 unidades de etilenoxi o que comprenden 1-10 unidades de etilenoxi.

Arilo, preferiblemente, es un sistema de anillo arilo de 5, 6 o 7 miembros, preferiblemente un sistema de anillo arilo de 6 miembros o un sistema de anillo heteroarilo de 5, 6 o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados de O, S y N, preferiblemente un sistema de anillo heteroarilo de 6 miembros. En una realización preferida particular, arilo es fenilo.

En una forma de realización, en la fórmula I, cada R1-R19 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, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

En una forma de realización, en la fórmula I cada R1-R19 es independientemente hidrógeno, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo, sulfonato, sulfonato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido sustituido o no sustituido.

En una realización, en la fórmula I cada R1-R19 independientemente es hidrógeno, alquiloxi sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo, sulfonato o sulfóxido sustituido o no sustituido.

En una realización, al menos uno de R1 a R19 del compuesto de acuerdo con la fórmula I está sustituido por al menos un grupo hidrofílico.

En una realización, al menos uno de R1 a R12 de los residuos de fenilfenantridina comprendidos en la fórmula I, Fórmula I (a) y/o Fórmula I (b) de fórmula II, como se define aquí, respectivamente, está sustituido por al menos un grupo hidrofílico, en particular por al menos un grupo hidrofílico como se define a continuación.

Los grupos hidrofílicos preferidos son amino, alquilamino, con alquilo que significa una cadena lineal tal como metilo, etilo, propilo, butilo, cadena de pentilo o una cadena de alquilo ramificada tal como isopropilo, isobutilo, terc-butilo, preferiblemente una cadena alquilo lineal tal como metilo o etilo, alquilamino sustituido, éste contiene por ejemplo una o dos cadenas ramificadas o lineales unidas al átomo de N, que están sustituidas con un grupo hidrofílico adicional tal como hidroxilo o sulfo, preferiblemente este alquilamino sustituido contiene dos porciones hidroxipropilo o hidroxietilo, arilamino, con arilo referido a un residuo aromático, tal como fenilo, o naftilo, preferiblemente fenilo, arilamino sustituido, con arilo como se ha definido anteriormente y un residuo adicional formado por un grupo hidrofílico, alquilamonio, con alquilo tal como se ha definido anteriormente y preferiblemente un residuo de trimetilamonio o un residuo de trietilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, éster de ácido carboxílico, preferiblemente un éster de alquilo tal como éster de metilo o etilo, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido con alquilo y alquilo sustituido como se define anteriormente o ariloxi o ariloxi sustituido con arilo y arilo sustituido como se ha definido anteriormente, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato. Preferentemente, dicho grupo hidrofílico se selecciona entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato, cuando sea aplicable, cada uno preferiblemente como se define en el párrafo

anterior.

En una realización preferida, el grupo hidrofílico se selecciona de alquilamino, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxil, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato.

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

En una realización, al menos uno de R1-R12 es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado entre sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, sulfinoalquilo, sulfino-arilo, sulfino-alcoxi, sulfino ariloxi, sulfino, sulfeno-alquilo, sulfenoarilo, sulfeno-alcoxi, sulfeno-ariloxi, sulfeno, sulfamoil-alquilo, sulfamoil-arilo, sulfamoilo-alcoxi, sulfamoil-ariloxi, sulfamoilo, alcanosulfonilo-alquilo, alcanosulfonilo-arilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo alquilo, o arenosulfonilo-arilo, o arenosulfonilo, sulfoamino-alquilo, sulfoamino-arilo, sulfoamino-alcoxi, sulfoaminoariloxi, sulfoamino, sulfinoamino-alquilo, sulfinoamino-arilo, sulfinoamino-alcoxi, sulfinoamino-ariloxi, sulfinoamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilsulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilaminoariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilaminoalquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, fosfono-alquilo, fosfono-arilo, fosfono-alquilo, fosfono-ariloxi, fosfono, alquilo hidroxifosfinoil-, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinoil-,hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-arilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquilo, hidroxialquilo fosfinoil-ariloxi, hidroxil-alquilo-fosfinoil, fosfonoamino-alquilo, fosfonoamino-arilo, fosfonoaminoalcoxi, fosfonoamino-ariloxi, fosfonoamino o, cuando se combina químicamente, una sal de los sustituyentes descritos anteriormente, en la que alquilo es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o un heteroalquilo con la longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados de O, N, P y S y en el que arilo, tal como se usa en el presente documento, es un sistema de anillo arilo de 5, 6 ó 7 miembros o un sistema de anillo heteroarilo de 5, 6 o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N.

En una realización, al menos uno de R1 a R12 es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado entre sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, sulfamoilalquilo, 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-alquilo, fosfono-ariloxi, fosfono, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinoil, hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-arilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-alquilo, hidroxil-alquilo-fosfinoil-ariloxi, hidroxil-alquilo-fosfinoil, hidroxil-alquilo-fosfinoil o cuando existe una coincidencia química, una sal de los sustituyentes descritos anteriormente, en el que alquilo es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena heteroalquilo con la longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S y en el que el arilo como se usa aquí es un sistema de anillo arilo de 5, 6 o 7 miembros o un sistema de anillo heteroarilo de 5, 6 o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N .

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

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

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

En una realización, al menos uno de los grupos R1 a R12 de la fórmula I es un grupo sulfo.

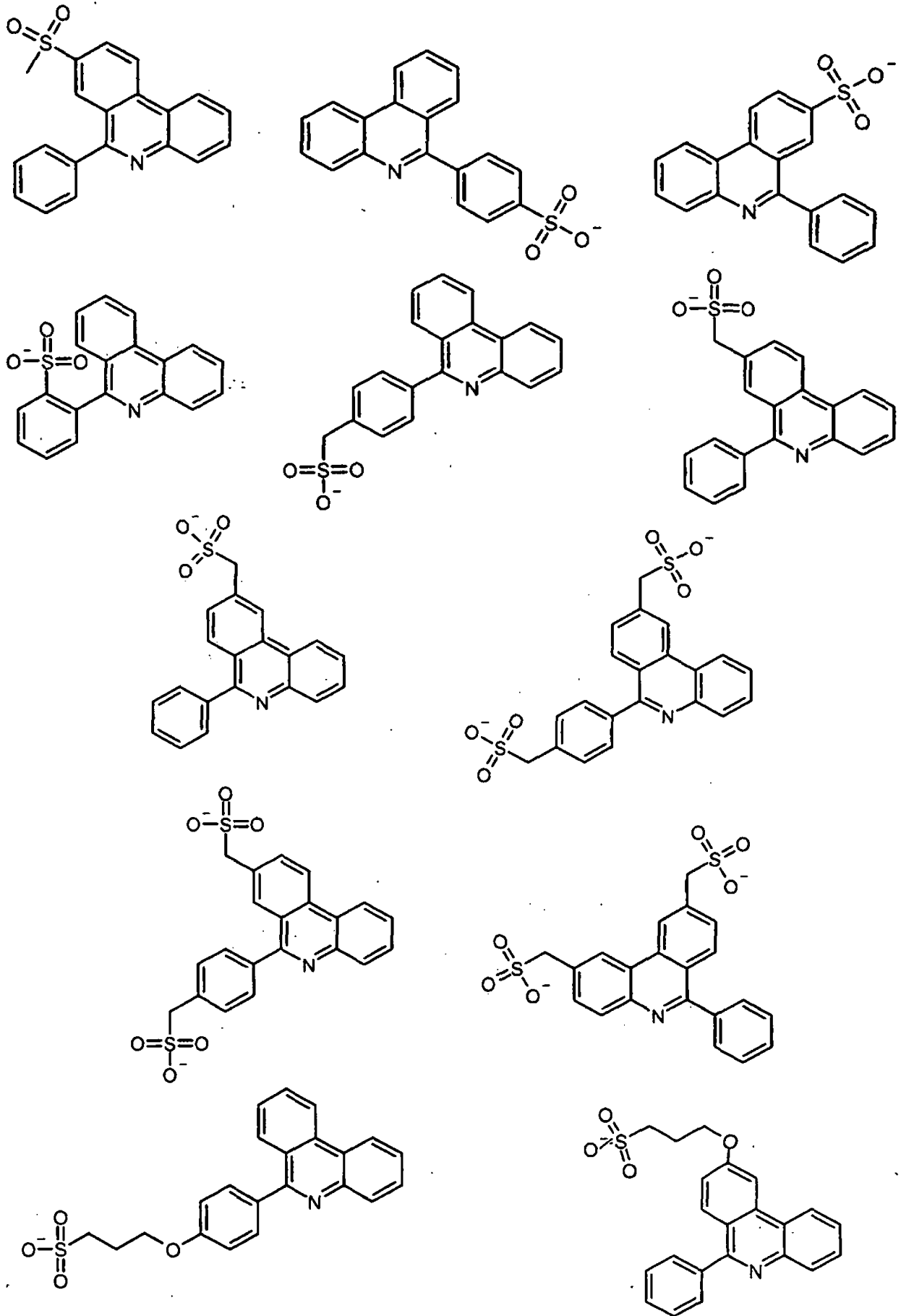
En una realización, de uno a tres de R1 a R12 no son hidrógeno.

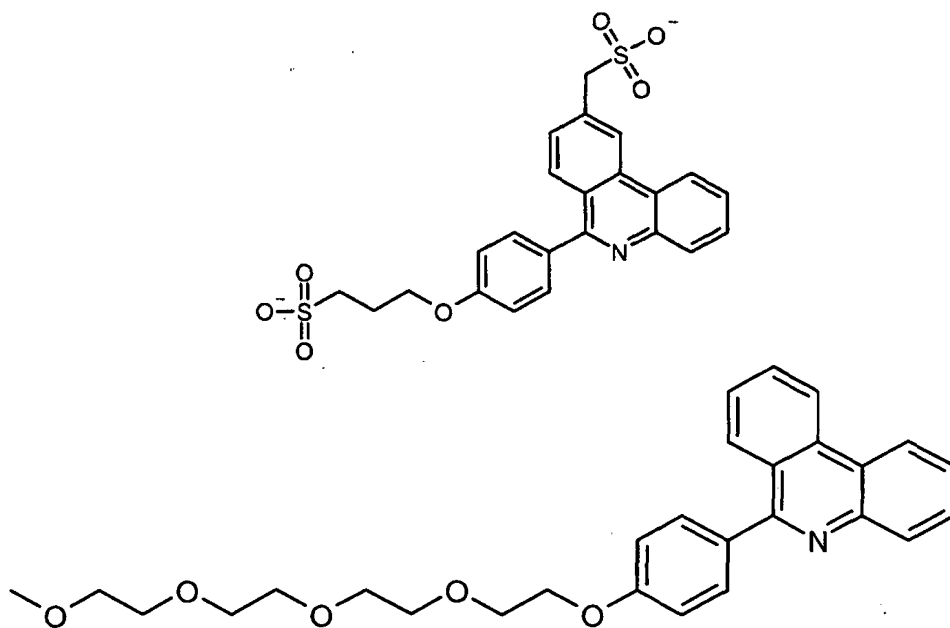
En una realización, el contraión es un catión de metal alcalino seleccionado del grupo que consiste en catión de litio, catión de sodio, catión de potasio y catión de cesio.

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

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

En una realización, los restos de fenilfenantridina comprendidos en la fórmula I se seleccionan entre las fenilfenantridinas sustituidas que se dan a continuación.





5 El término "enlazador", tal como se utiliza en el presente documento, tiene el significado conocido por una persona experta en la técnica y se refiere a una molécula o grupos de moléculas, que se usan para enlazar fragmentos de moléculas. Los enlazadores se caracterizan por tener dos o más funcionalidades químicamente ortogonales sobre un armazón flexible o rígido. Un enlace covalente no es un enlazador en el sentido de la presente invención.

10 En el compuesto de acuerdo con la presente invención, Q es un enlace covalente o un enlazador que tiene una longitud de esqueleto entre 1 y 200 átomos. Con otras palabras, si la longitud del esqueleto está entre 1 y 200 átomos, la conexión más corta entre un sistema de anillo del tercer ligando de fórmula I y el grupo funcional Z consiste en 1 a 200 átomos.

15 En el caso de que esté presente un sistema de anillos, se toma el número más corto de átomos en el sistema de anillos cuando se evalúa la longitud del enlazador. Como ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos en un enlazador.

20 En una realización Q es un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, sustituida o no sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

25 En una realización, Q es un enlace covalente o es un enlazador y tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C100 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 100 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

30 En una realización, Q es un enlace covalente o es un enlazador y tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 50 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

35 En una realización adicional, Q es un enlace covalente o es un enlazador y tiene como esqueleto una cadena de alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

40 En una realización, Q, por ejemplo el enlazador Q, en el complejo electroquimioluminiscente de esta invención es una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena arilalquilo C1-C20 (en la que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos de carbono), o una cadena de 1 a 20 átomos de carbono con una esqueleto que consta de átomos de carbono, átomos

de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 20 átomos de carbono, o con un esqueleto que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos).

En una realización Q, por ejemplo, el enlazador Q, en un compuesto de acuerdo con la presente invención, es una cadena alquilo C1-C12 saturada, o una cadena arilalquilo C1-C12, o una cadena de 1 a 12 átomos con un esqueleto que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena de 1 a 12 átomos de carbono con un esqueleto que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos que comprenden al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos):

En una realización, Q es un enlace covalente. En el caso de que Q sea un enlace covalente, el grupo funcional Z es al menos uno de R13 a R20. En una realización, uno de R13 a R20 es Z.

En una realización, Q-Z es maleimida.

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

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

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

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

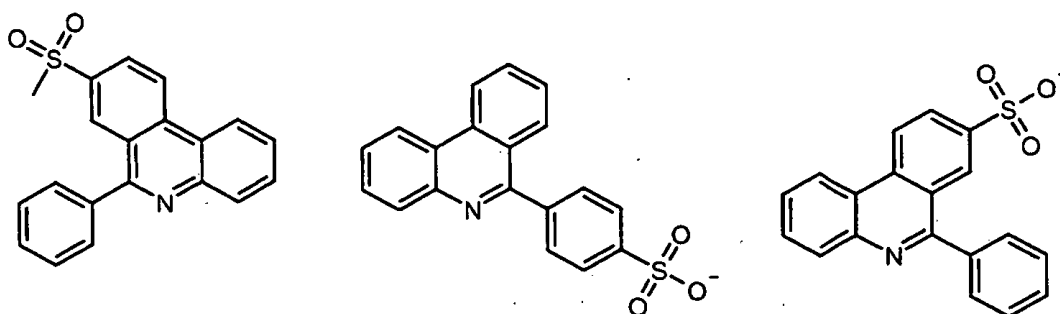
En una realización, el grupo funcional Z comprendido en el complejo basado en iridio de fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato,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

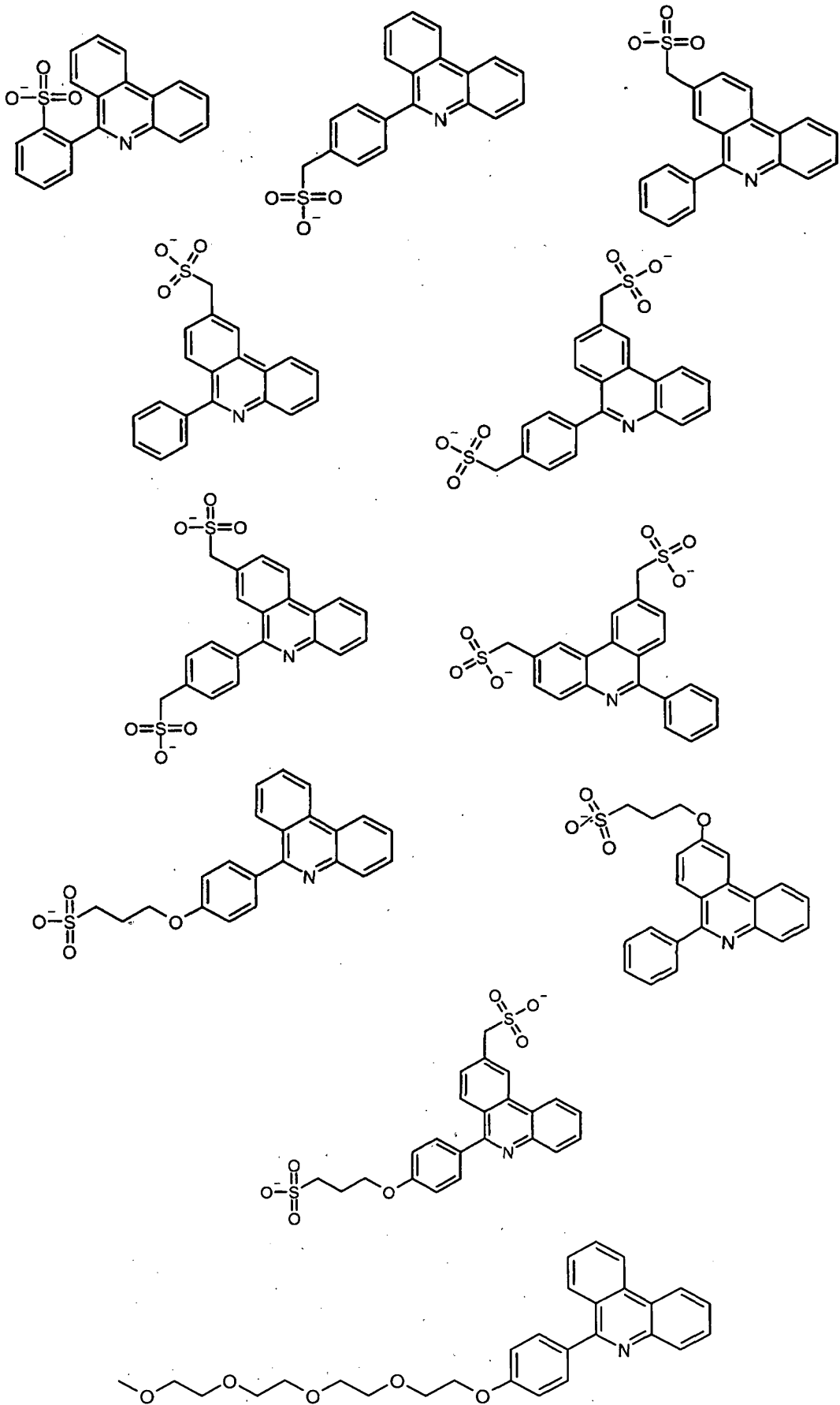
En una realización preferida particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo basado en iridio de fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

En una realización preferida particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo basado en iridio de fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, en el que de uno a tres de R1 a R12 de los residuos fenilfenantridina son independientemente sulfo-alquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo o una sal de los mismos (= sulfonato), en el que el contraión es preferiblemente un catión del grupo de metales alcalinos y los otros grupos R1 a R12 son hidrógeno, en el que uno de R13-R19 es -Q-Z, en el que Q es un enlazador o un enlace covalente, y en el que Z es un grupo funcional y los otros grupos R13 a R19 en la fórmula I son hidrógeno o R20, en el que R20 es alquilo y en el que X e Y son N.

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





En el que uno de R13-R19 es -Q-Z, en el que Q es un enlazador o un enlace covalente y en el que Z es un grupo funcional y los otros grupos R13 a R19 en la fórmula I son hidrógeno o R20, en el que R20 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 el que R1 a R12 son hidrógeno, en el que uno de R13-R20 es -Q-Z, en el que Q es un enlace o un enlace covalente, y en el que Z es un enlace, preferiblemente ácido carboxílico, y los otros grupos R13 a R20 en la fórmula I son hidrógeno o R21, en el que R21 es alquilo, y en el que X e Y son N.

10 Se considera que todas las combinaciones de cualesquiera realizaciones de los compuestos de fórmula I como se han definido anteriormente están dentro del alcance de la invención.

15 Se acaba de descubrir de manera sorprendente e inesperada que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula I son adecuados como marcadores para futuros métodos de detección basados en EQL de alta sensibilidad.

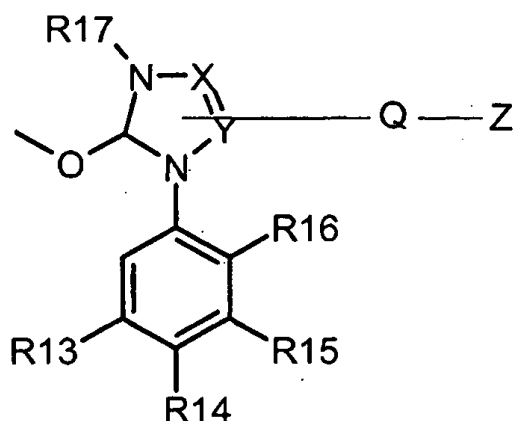
Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula I

20 La invención, en un aspecto, se refiere a un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula I.

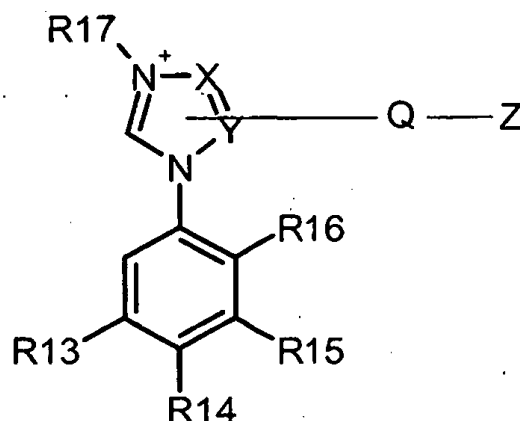
Los compuestos de acuerdo con la fórmula I pueden sintetizarse, por ejemplo como sigue y por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 3.

25 Los compuestos de fórmula I se sintetizan generando primero un carbeno a partir de un precursor de un compuesto de fórmula III (a) o fórmula III (b), en la que R13-R17, X, Y, Z y Q son como se han definido anteriormente a través de las definiciones para el compuesto de fórmula I, ya sea por calentamiento o usando, por ejemplo, óxido de plata.

Los precursores se basan en las estructuras generales III (a) y III (b):



30 **III (a)**



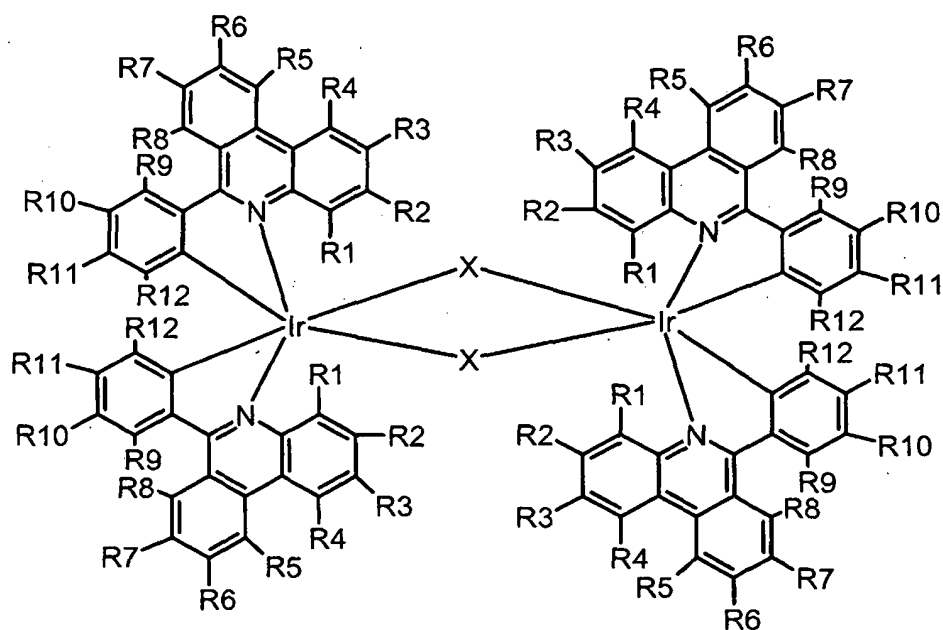
III (b)

en la que R13-R17, X, Y, Z y Q son como se han definido anteriormente a través de las definiciones para el compuesto de fórmula I.

35 El derivado de carbeno se hace reaccionar adicionalmente con un complejo de dímero de iridio (complejo bis-iridio).

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I que comprende las siguientes etapas:

- 40 (a) preparar un carbeno de un compuesto de fórmula III (a) o de fórmula III (b) y
 (b) hacer reaccionar el carbeno así obtenido con un complejo dímero de iridio (complejo de bis-iridio de fórmula IV)



IV,

en la que cada X es independientemente cloro, bromo, yodo, hidroxilo, metoxi, etoxi, fenoxi, cianato o difenilfosfanilo y en el que R1-R12 son como se definieron anteriormente a través de las definiciones para el compuesto de fórmula I para obtener un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente.

En la etapa (a) del procedimiento, el carbeno puede obtenerse calentando un compuesto de fórmulas III (a) o III (b), en el que R13-R17 son como se han definido anteriormente a través de las definiciones para el compuesto de fórmula I o haciendo reaccionar dicho compuesto de Fórmulas III (a) o III (b) con una base, preferiblemente con óxido de plata, eventualmente en presencia de un disolvente.

En una realización, la etapa del procedimiento (a) se lleva a cabo en dioxano.

El complejo de dímeros de iridio (complejo bis-iridio de fórmula IV) usado como material de partida en la etapa (b) del proceso puede sintetizarse, por ejemplo, sobre la base de Nonoyama, M., J. Organomet, Chem. 86 (1975) 263-267 y como se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 2 y como se describe, por ejemplo, en PE 12179056.2.

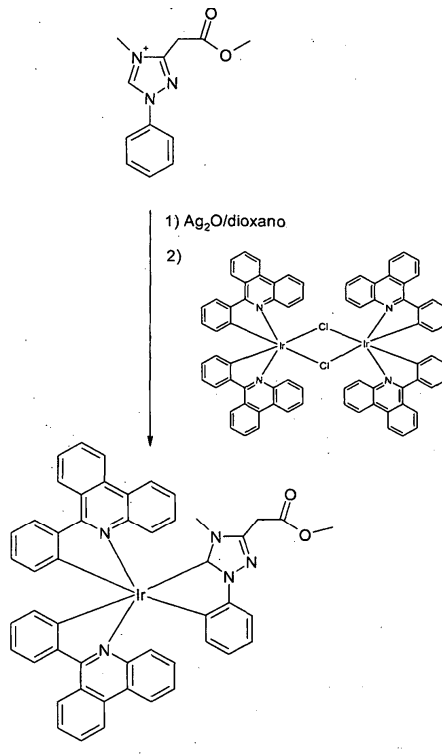
En una realización, cada uno de los dos "grupos puente" X en la fórmula IV se selecciona independientemente del grupo que consiste en cloro, bromo, yodo, hidroxilo, metoxi y cianato.

En una realización, cada uno de los dos "grupos puente" X en la fórmula IV se selecciona independientemente del grupo que consiste en cloro, bromo y yodo.

En una realización cada uno de los dos "grupos puente" X en la fórmula IV es cloro.

Como podrá apreciar el experto en la técnica, en ciertas realizaciones, los dos "grupos puente" X en la fórmula IV serán los mismos y como se han definido anteriormente.

De acuerdo con este procedimiento, un compuesto de fórmula I puede obtenerse, por ejemplo, tal como se muestra en el esquema 1 a continuación.



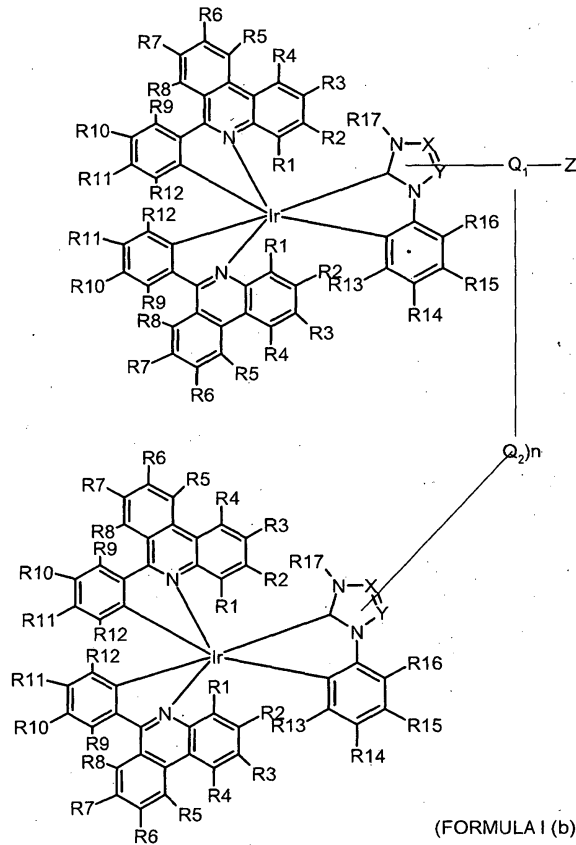
Esquema 1: síntesis de un compuesto de fórmula I

Nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula II

5

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula II

FORMULA I (a)



- 5 en el que en la fórmula I (a) y en la fórmula I (b), respectivamente e independientemente, R1 a R19 son como se definieron para la fórmula I con la excepción de que Q de la fórmula I es Q1 o Q2 en la fórmula II, respectivamente, en el que Q1 es un enlazador, preferiblemente, en el que al menos uno de R13-R19 en la fórmula I (a) es -Q1-Z y en el que Q1 es un enlazador;
- 10 en el que al menos uno de R13-R19 en la fórmula I (b) es Q2 y cada Q2 es independientemente un enlazador o un enlace covalente,
- 15 en el que X e Y son como se definen para la fórmula I,
- en el que (n) es un número entero de 1 a 50, y
- en el que Z es un grupo funcional.
- En una realización, uno de R13 a R19 de fórmula I (a) en la fórmula II es Q1-Z.
- En una realización, uno de R13 a R19 en cada una de la fórmula I (b) en la fórmula II es Q2.
- 20 En una realización, uno de R13 a R19 de fórmula I (a) en la fórmula II es Q1-Z y uno de R13 a R19 en cada uno de fórmula I (b) y fórmula II es Q2.
- Un compuesto de fórmula I (a) y fórmula I (b), respectivamente, comprende dos ligandos derivados de fenilfenantridina como se define mediante las definiciones dadas anteriormente para la fórmula I y un tercer ligando.
- 25 En otras realizaciones, R1 a R19 tienen los mismos significados que se han descrito anteriormente para R1 a R19 de los compuestos de fórmula I.
- En una realización, la fórmula I (a) y la fórmula I (b) son iguales, excepto para Q1-Z en la fórmula I (a) y Q2 en la fórmula I (b), respectivamente.
- 30 Como el experto en la técnica apreciará fácilmente el enlazador Q1 de fórmula II comprende n sitios de ramificación en los que Q2 está unido.
- 35 En una realización, Q1 de fórmula II tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
- 40 En una realización, el enlazador Q1 de fórmula II tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C100 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 100 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
- 45 En una realización, el enlazador Q1 de fórmula II tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 50 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
- 50 En una realización adicional, el enlazador Q1 de fórmula II tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
- 55 En una realización, el enlazador Q1 de fórmula II en el complejo electroquimioluminiscente de esta invención es una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida, sustituida, lineal o ramificada, o una cadena arilalquilo C1-C20 (en la que, por ejemplo, un anillo fenileno representa una longitud de cuatro átomos de carbono), o una cadena de 1 a 20 átomos con un esqueleto constituido por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de 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 consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, que comprende al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro

átomos).

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

La fórmula I (b) y Q2 están presentes (n) veces en un compuesto de acuerdo con la fórmula II siendo (n) un número entero de 1-50. Cada uno de estos (n) Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P, S sustituidos o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos .

En una realización, cada Q2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C100 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 100 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos, cíclicos o heterocíclicos.

En una realización cada Q2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 50 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos, cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q2 de fórmula II es independientemente es un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena de alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos, cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q2 de fórmula II es independientemente un enlace covalente o un enlazador que tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C12 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 12 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se describió anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos, cíclicos o heterocíclicos.

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

En una realización, el enlazador Q1 comprende uno o más aminoácido(s).

En una realización, el enlazador Q1 comprende una cadena peptídica.

En una realización, Q2 es un enlazador y comprende uno o más aminoácidos.

En una realización tanto Q1 como Q2 son enlazadores y comprenden uno o más aminoácidos.

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

En una realización, Q2 es un enlazador y comprende uno o más nucleótidos.

En una realización tanto Q1 como Q2 son enlazadores y comprenden uno o más nucleótidos.

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

En la fórmula II (n) es un número entero de 1-50, indicando que la fórmula I (b) y Q2 están presentes (n) veces en el

compuesto de acuerdo con la fórmula II. En ciertas realizaciones (n) es un número entero de 2 a 50, o de 1 a 40, o de 2 a 40, o de 3 a 31.

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

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

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

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

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

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

30 En una realización preferida particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo basado en iridio de fórmula I de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

En una realización preferida particular, el grupo funcional Z comprendido en el complejo basado en iridio de fórmula II de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en éster de N-hidroxisuccinimida y maleimido.

35 Se considera que todas las combinaciones de cualesquiera realizaciones de los compuestos de fórmula II como se han definido anteriormente están dentro del alcance de la invención.

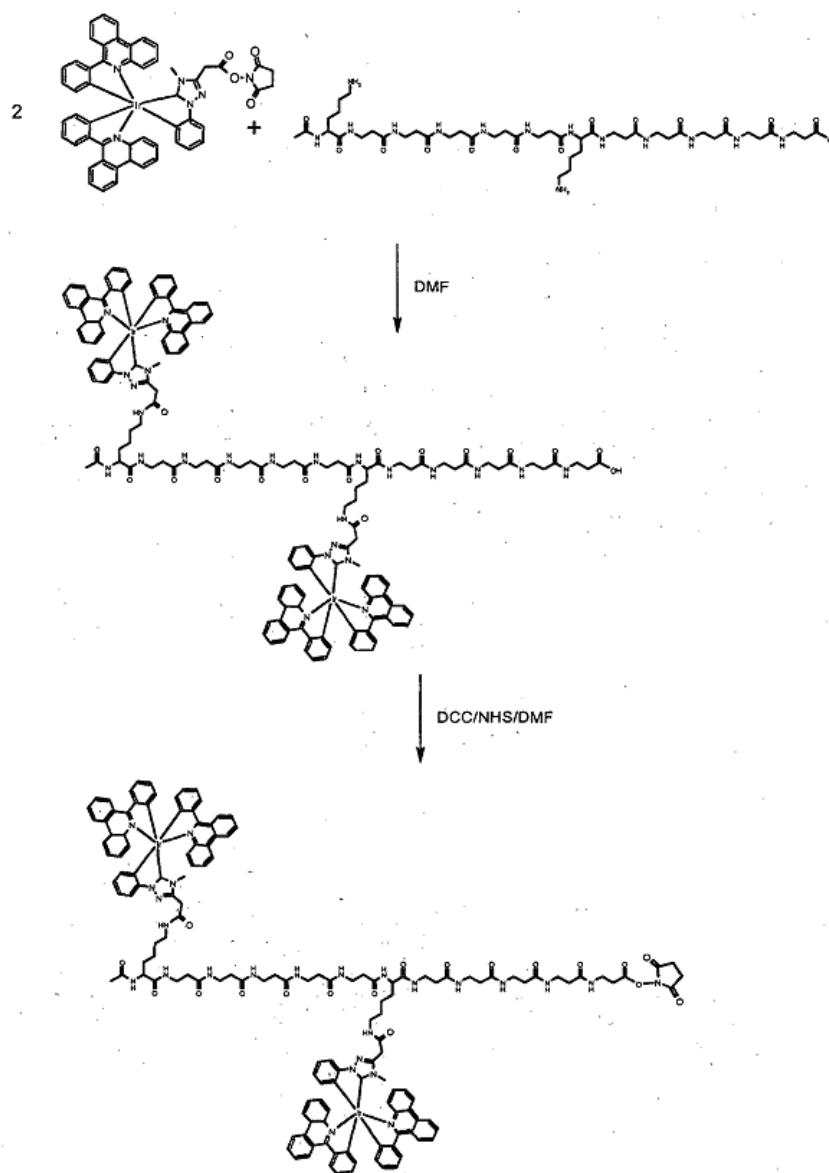
40 Se ha encontrado ahora sorprendentemente e inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula II son adecuados como marcadores para futuros métodos de detección basados en EQL de alta sensibilidad.

Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula II

45 La invención, en un aspecto, se refiere a un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula II.

50 Los compuestos de acuerdo con la fórmula II se pueden sintetizar en una realización de la siguiente manera: El complejo de iridio de fenilfenantridina sustituido (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2.2) se hace reaccionar en primer lugar además con un derivado del tercer ligando que contiene un grupo funcional (-Q-)Z para dar lugar a un complejo de iridio monomérico. Un complejo de iridio monomérico se proporciona, por ejemplo, en la fórmula I. El complejo de iridio monomérico se hace reaccionar después con un precursor de Q que contiene 1-50 grupos que pueden hacerse reaccionar con el grupo funcional del complejo de iridio monomérico para formar enlaces covalentes; de este modo, después de la formación de los enlaces covalentes se obtiene de nuevo un compuesto de acuerdo con la fórmula II.

55 De acuerdo con este procedimiento, los compuestos de fórmula II pueden obtenerse por ejemplo, como se muestra en el Esquema 2 a continuación.



Esquema 2: síntesis de un compuesto de fórmula II

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

En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente basado en iridio de fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, tal como se describe y define en el presente documento y está unido covalentemente al mismo una sustancia biológica. Ejemplos de sustancias biológicas adecuadas son células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

10

15 En una realización, la sustancia biológica de un conjugado de acuerdo con la presente invención, es decir, unida covalentemente a un compuesto de acuerdo con la fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, es un agente de unión por afinidad. Un agente de unión por afinidad es una molécula con capacidad de unión molecular a otra molécula debido a la interacción atractiva entre estas moléculas que da lugar a una asociación estable en la que las moléculas están cerca una de otra. El resultado de la unión molecular es la formación de un complejo molecular. La unión atractiva entre los componentes de un complejo es normalmente más débil que en un enlace covalente.

20 En el presente caso, el agente de unión es un agente de unión por afinidad que significa que es capaz de unirse a un complejo de afinidad, es decir, un complejo estable bajo las correspondientes condiciones, por ejemplo, en medio acuoso bajo condiciones normales. Las moléculas que pueden participar en la unión molecular incluyen, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas orgánicas pequeñas tales como fármacos.

Por lo tanto, los tipos de complejos que se forman como resultado de la unión molecular incluyen: proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-hormona, proteína-fármaco, antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-avidina o estreptavidina, ácido nucleico-ácido nucleico complementario o receptor-(ant)agonista del receptor.

5 Como el experto en la técnica apreciará en un conjugado de acuerdo con la presente invención, el grupo funcional Z del compuesto de acuerdo con la fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, se ha utilizado para formar un enlace covalente con un grupo sobre el agente de unión por afinidad y ya no está presente como tal. En el caso de que un reactivo de unión por afinidad no contenga en sí mismo un grupo apropiado para unirse o reaccionar 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 haciendo reaccionar el 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 como se define aquí con el grupo funcional Z.

15 Este proceso puede llevarse a cabo por el experto en la materia utilizando métodos estándar 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 descrito anteriormente.

25 No deseando limitarse más, pero en aras de la claridad, el agente de unión por afinidad puede comprender cualquiera de los siguientes; un antígeno, una proteína, un anticuerpo, biotina o análogo de biotina y avidina o estreptavidina, azúcar y lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico y un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista del receptor o un antagonista del receptor. Por ejemplo, el agente de unión por afinidad puede ser una pareja de un par de unión específico, donde la otra parte de dicho par de unión está asociado con o es la diana sobre una 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 a éste seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, estreptavidina, azúcar, lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de metal, un agonista del receptor o un antagonista del receptor.

35 Preferiblemente, un agente de unión por afinidad es, una pareja o miembro de un par de unión de afinidad, o como también es llamado por el experto en la técnica, una pareja o miembro de un par de unión específico.

40 Un agente de unión por afinidad tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol respecto a su diana, por ejemplo, un miembro de un par de unión específico, como un anticuerpo, respecto al otro miembro del par de unión específico, como su antígeno. Un agente de unión por afinidad tiene preferiblemente una afinidad de 10^8 l/mol o incluso más preferida 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 del grupo que consiste en antígeno, anticuerpo, biotina o análogo de biotina, avidina o estreptavidina, azúcar, 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 del grupo que consiste en 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, azúcar, lectina, una enzima, un polipéptido, un amino, un ácido nucleico, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista del receptor o un antagonista del receptor.

60 En una realización, el conjugado de acuerdo con la presente invención comprende enlazar covalentemente un compuesto de acuerdo con la fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, tal como se describe y define anteriormente en el presente documento y un agente de unión por afinidad que es un oligonucleótido o un anticuerpo.

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

El término "oligonucleótido" o "ácido nucleico" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente

a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, que comprenden al menos 8 nucleótidos y como máximo aproximadamente 1000 nucleótidos. En una realización preferida, un oligonucleótido tendrá una longitud de al menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ó 30 nucleótidos. En una realización preferida, un oligonucleótido tendrá una longitud de no más de 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 ó 30 nucleótidos.

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

Un análogo de ácido nucleico puede contener por ejemplo un nucleótido sustituido que lleva un sustituyente en las bases estándar desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitosina (dC), desoxitimidina (dT), desoxiuracilo (dU). Ejemplos de tales nucleobases sustituidas son: pirimidinas 5-sustituidas como 5 metil dC, aminoalil dU o dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o -dC, 5-dU o -dC halogenadas; pirimidinas N sustituidas como N4-etil-dC; purinas N sustituidas como N6-etil-dA, N2-etil-dG; purinas 8 sustituidas como 8-[6-amino]-hex-1-il]-8-amino-dG o -dA, 8 dA o dG, 8-alquil dG o dA; y 2 dA sustituido 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 utilizando análogos de nucleobases como el 5-nitroindol-d-ribósido; 3-nitro-pirrol-d-ribósido, desoxiinosina (dI), desoxixantosina (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 unida a N8; 5,6-dihidro-5-aza-dC; y eteno-dA o pirrolo-dC. Como es obvio para el experto en la materia, la nucleobase en la cadena complementaria tiene que seleccionarse de tal manera que la formación de dúplex sea específica. Si, por ejemplo, se usa 5-metiliso-dC en una cadena (por ejemplo (a)) iso dG tiene que estar en la cadena complementaria (por ejemplo, (a')).

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

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

Los análogos de azúcar son por ejemplo xilosa; ribosa con puentes en 2',4' como (2'-O, 4'-C metileno)- (oligómero conocido como LNA) o (2'-O, 4'-C etileno)- (oligómero conocido como ENA); L-ribosa, L-d-ribosa, hexitol (oligómero conocido como HNA); ciclohexenilo (oligómero conocido como CeNA); cltritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclico en el que los átomos C3' y C5' están conectados por un puente de etileno que se fusiona con un anillo de ciclopropano (oligómero conocido como tricicloDNA); glicerina (oligómero conocido como GNA); glucopiranos (oligómero conocido como DNA de Homo); carbaribosa (con una subunidad ciclopentano en lugar de tetrahidrofurano); hidroximetilmorfolina (oligómeros conocidos como DNA morfolino)

También se sabe que un gran número de modificaciones de la porción fosfato internucleósido interfieren con las propiedades de hibridación y tales modificaciones del esqueleto también se pueden combinar con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótidos. Ejemplos son oligonucleótidos de fosfortioato, fosforoditioato, fosforamidato y metilfosfonato.

También se puede usar PNA (que tiene un esqueleto sin fosfato y d-ribosa) como un análogo de DNA.

Los nucleótidos modificados mencionados anteriormente, análogos de nucleótidos así como modificaciones de esqueleto de oligonucleótido se pueden combinar como se desee en un oligonucleótido en el sentido de la presente invención.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con la investigación, diagnósticos o usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, en el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más del 99% en peso; (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

"Anticuerpos nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por 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 ligera también tiene puentes disulfuro intracadenas regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

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

El término variable se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), tanto en la cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja beta. Las HVR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las cadenas ligeras de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos (inmunoglobulinas) a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas et al., *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed., W.B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes.

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

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

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

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión al antígeno. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y una cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un enlazador peptídico flexible de tal manera que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las

seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

5 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y contiene 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 por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación de la presente invención para Fab' en la que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

15 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), 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, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VHVL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, PE 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. et al., *PNAS USA* 90 (1993) 6444-6444. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson, P.J. et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134.

30 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo no siendo una mezcla de anticuerpos individuales. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia de polipéptido de unión diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de DNA recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogenicidad in vivo, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

50 Como se ha mencionado, los compuestos y conjugados como se describen en la presente invención tienen propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados descritos, respectivamente, muestran una alta eficiencia EQL. Esta alta eficiencia también está presente si las mediciones correspondientes se realizan en un sistema acuoso en comparación con muchos marcadores de EQL que sólo han mostrado una alta eficiencia de EQL cuando se analizan en un disolvente orgánico. Por ejemplo, muchos colorantes OLED usualmente se analizan en acetonitrilo y tampoco son solubles en una solución acuosa o, si son solubles, no muestran electroquimioluminiscencia eficiente en una solución acuosa.

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

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

65 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como

se describe en la presente invención en la detección de un analito.

Un analito de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula inorgánica u orgánica, incluyendo cualquier sustancia biológica de interés. Ejemplos de sustancias biológicas adecuadas que representan un analito en el sentido de la presente invención son sacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

El analito puede seleccionarse del grupo que consiste en un polipéptido, un carbohidrato y una molécula de fármaco inorgánico u orgánico.

Un polipéptido o proteína es una molécula que está esencialmente compuesta de aminoácidos y que tiene al menos dos aminoácidos unidos por enlace peptídico. En el caso de que el analito de interés que se va a investigar en un método descrito aquí, el polipéptido preferiblemente consistirá de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 y 30 hasta aproximadamente 10.000 aminoácidos. Preferiblemente, el polipéptido contendrá de 5 a 2.000, también se prefiere de 10 a 1.000 aminoácidos.

En el caso de que el analito sea un ácido nucleico, estos ácidos nucleicos preferiblemente son oligonucleótidos de DNA o RNA de origen natural.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para medir un analito por un método in vitro, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una muestra sospechosa o conocida por comprender el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con un agente de unión por afinidad y un compuesto de acuerdo con la fórmula I o de fórmula II, respectivamente, como se describe en la presente invención en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de analito conjugado, y (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obteniendo así una medida del analito.

En una realización que mide un medio analito que detecta la cantidad de un analito en una muestra.

En una realización, la medición en el método anterior para la detección de un analito se lleva a cabo utilizando un procedimiento de detección basado en electroquimioluminiscencia. También se prefiere el método en una solución acuosa.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

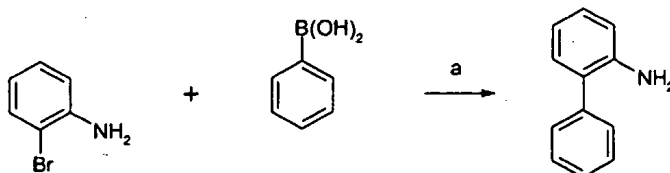
Síntesis de fenilfenantridinas sustituidas

Ejemplo 1.1

Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

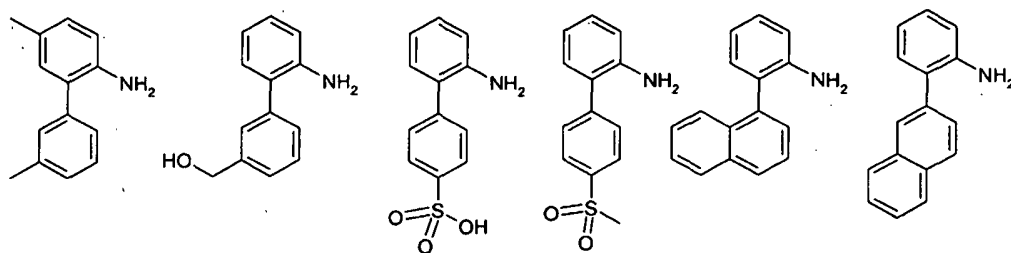
Con la reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura como se describe por Youn, S.W., en Tetrahedron Lett. 50 (2009) 4598-4601 entre derivados de 2-bromoanilina comercialmente disponibles y el correspondiente ácido arilborónico, se pueden sintetizar los 2-aminobifenilos apropiados, los cuales son necesarios para reacciones adicionales a fenantridinas.

Procedimiento típico:



a: 10 mol % de PdCl₂ (PPh₃)₂, K₂CO₃, DMF/H₂O (5/1), 80°C, 24 h

Otros Ejemplos:



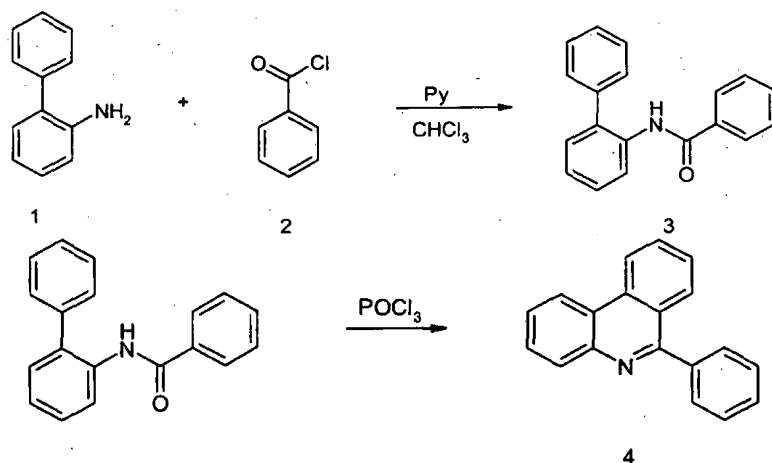
Ejemplo 1.2

5 Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

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

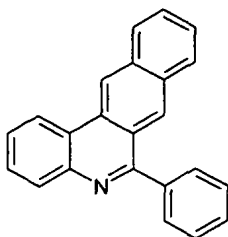
15 Benzamido-2-bifenil 3 (0,01 mol) y POCl₃ (5 ml) en 20 ml de tolueno se sometieron a reflujo y se agitaron bajo nitrógeno durante 18 horas, siguiendo el procedimiento descrito por Lion, C. en Bull. Soc. Chim. Belg. 98 (1989) 557-566. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con CH₂Cl₂ (30 ml) y se vertió en hielo, se lavó con NH₄OH al 25% y agua destilada. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío, seguido de cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 1:1) proporcionó el producto 4,6-fenilfenantridina.

20



25 Rendimiento: 52%. Sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 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).

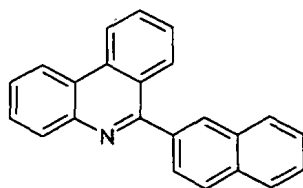
Usando 2-naftalen-2-il-fenilamina en lugar de 2-aryl-anilina se obtiene:



30 ¹H RMN (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) (M, 2H), 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).

35 EM: [M+H]⁺ 306,3

Utilizando cloruro de naftaleno-carbonilo en lugar de cloruro de ácido fenílico se obtiene:



5 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,74 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,65 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,97-7,94 (m, 2H), 7,90-7,85 (m, 2H), 7,80-7,69 (m, 2H), 7,62 (t, $J = 14,2$, 7,1 Hz, 1H), 7,59-7,55 (m, 2H).

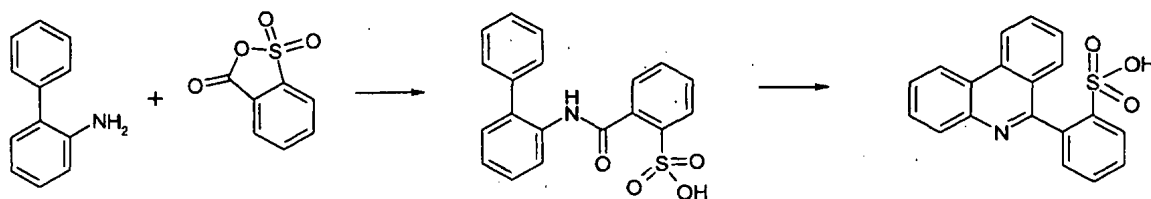
10 EM: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306,3

Ejemplo 1.3

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

15 La 6-(2-sulfofenil)fenantridina puede sintetizarse calentando suavemente arilanilina (0,01 mol) con anhídrido cíclico de ácido 2-sulfobenzóico (0,01 mol) en CH_3CN durante 6 horas usando el procedimiento descrito por Nicolai, E., en Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1617-1630.

20 Después de la purificación, el producto puede convertirse en la fenantridina apropiada basándose en el método descrito en el ejemplo 1.2.

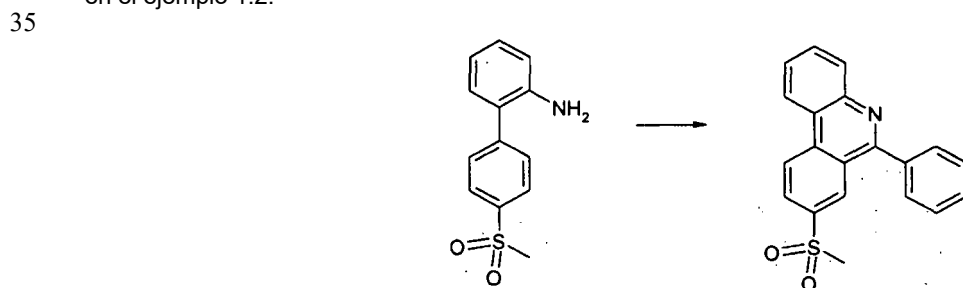


25 Ejemplo 1.4

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

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

Después de la purificación, el producto puede convertirse en la fenantridina apropiada basada en el método descrito en el ejemplo 1.2.



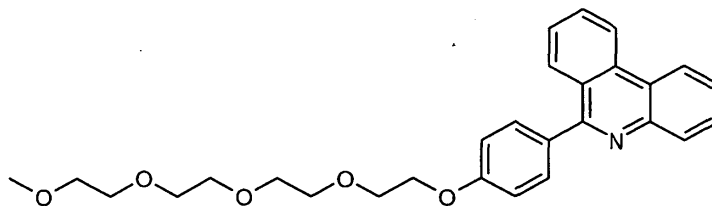
40 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,75 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 8,68 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 8,35 (dd, $J = 8,7$, 2,0 Hz, 1H), 8,30 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,89 (t, $J = 15,3$, 7,1 Hz, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,64-7,56 (m, 3H), 3,12 (s, 3H).

EM: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334,3

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

Ejemplo 1.5

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



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

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

Rendimiento: 11,0 g (90%)

RMN:

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

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

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

Procedimiento: (JACS, 2007, 129, 13364) una mezcla del compuesto 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il-4-metilbenzenosulfonato de etilo (8,1 g, 22,3 mmol), 4-hidroxibenzoato de etilo (3,7 g, 22,3 mmol), K_2CO_3 (15,4 g, 111,5 mmol) y 18-corona-6 (0,59 g, 2,2 mmol) se 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 H_2O , se secó sobre MgSO_4 anhidro y se filtró. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (diclorometano/metanol = 100:1) para obtener el compuesto (1,93 g, 88%).

Rendimiento: 7 g (88%)

RMN:

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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), 1,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

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

EM(+):

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

Síntesis de ácido 4-PEG4-benzoico:

Procedimiento: (JACS, 2007, 129, 13364) una mezcla de compuesto 4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi) benzoato de etilo (7 g, 19,6 mmol) y KOH (2,3 g, 41,24 mmol) en 200 ml de EtOH/ H_2O (1:1 v/v) se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con HCl (2N). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc y se evaporó hasta la sequedad. El sólido blanco resultante se recristalizó en EtOAc/hexano.

Rendimiento: 5,3 g (85%)

RMN:

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

2H), 3,78-3,57 (m, 10H), 3,57-3,46 (m, 2H), 3,35 (s, 3H).

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

EM (-):

$[\text{M}-\text{H}]^-$ = calc. 327.1438, encontrado 327.1456

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

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

Una solución de 2-fenilnilina (1,6 g), piridina (2,4 ml) en cloroformo (80 ml) bajo una atmósfera inerte se enfrió a 0 °C. Cloruro de (fenil-4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoilo (3,1 g, 9,14 mmol) en 20 ml se añadió lentamente a la solución y se dejó que la mezcla final alcanzara la temperatura ambiente. La solución se sometió a reflujo durante 2 horas y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con HCl (1 M, 2 x 100 ml), NaHCO_3 (100 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc/hexano).

Rendimiento: 4,1 g (90%)

RMN:

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) 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).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (101 MHz, CDCl_3) 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 (+)

$[\text{M}+\text{H}]^+$ = calc. 480,2386 encontrado 480,2383; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = calc. 502,2200, encontrado 502,2204

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

Procedimiento: N-bifenil-2-il-4-(2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi-benzamida (4 g, 8,34 mmol) POCl_3 (10 ml) en 10 ml de tolueno se sometieron a reflujo durante 20 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de diclorometano. La solución se vertió en hielo y la mezcla se neutralizó con NH_4OH (20%). La fase orgánica se extrajo y se lavó sucesivamente con agua destilada y salmuera, y se secó sobre MgSO_4 . La solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, en acetato de etilo/hexano 1:1, $R_f = 0,14$).

Rendimiento: 1 g (25%)

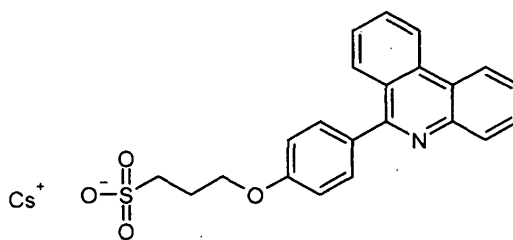
RMN:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) 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).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 160,92 (s), 159,45 (s), 143,84 (s), 133,59 (s), 131,26 (s), 130,61 (s), 130,26 (s), 129,05 (s), 128,90 (s), 127,19 (s), 126,85 (s), 125,39 (s), 123,70 (s), 122,29 (s), 122,01 (s), 114:68 (s), 72,02 (s), 70,97 (s), 70,74 (s), 70,72 (s), 70,69, 70,62 (s), 69,80 (s), 67,68 (s), 59,15 (s).

MS (+) JM358-F5, $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado = 462,2280, encontrado 462,2275

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



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

RMN: ^1H -RMN (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) $J = 8,3, 7,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,86-7,62 (m, 5H), 7,23-7,07 (m, 2H), 3,88 (s, 3H).

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

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

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

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

^1H -RMN (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, 3H).

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

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

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

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

Ejemplo 2

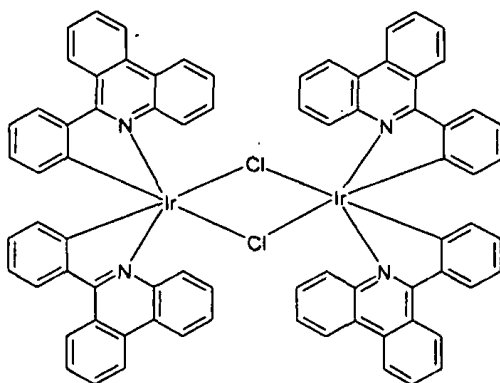
Procedimiento general para la síntesis de complejo de dímero unido con cloro:

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

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

Ejemplo 2.1

Complejo con fenilfenantridina no sustituida



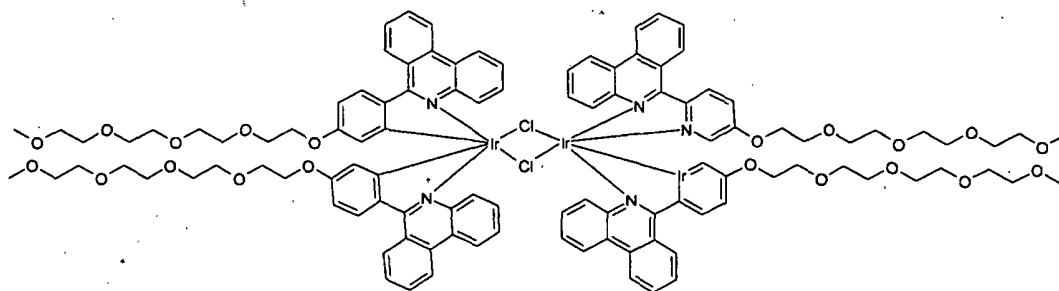
[(6-fenilfenantridina)₂IrCl]₂.

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

Ejemplo 2.2

10

Complejo con fenilfenantridina sustituida



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

Rendimiento: 550 mg (50%)

25 RMN:

¹H-RMN (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 7,89 (d, 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, contiene algunas impurezas)

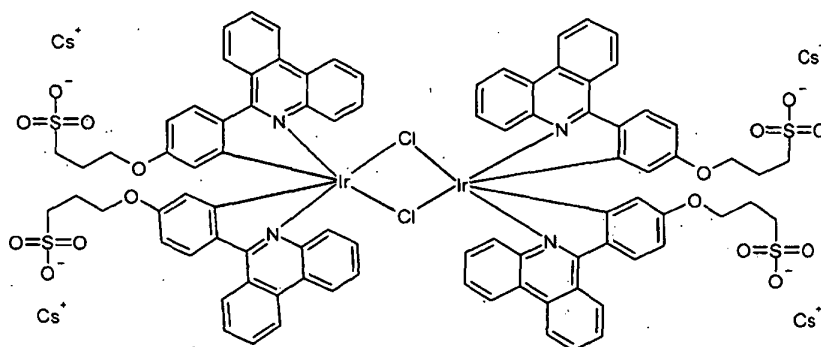
30

EM (ESI-EM (+)):

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

35

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

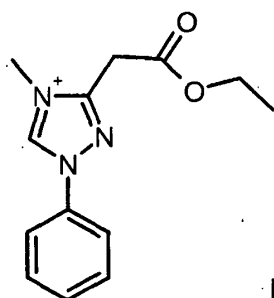


Una mezcla del ligando 3-(4-(fenantridin-6-il)fenoxi)propano-1-sulfonato de cesio (500 mg, 0,92 mmol) e IrCl_3 (159,5 mg, 0,45 mmol) en una mezcla de 2-EtOEtOH:agua (3:1, 16 ml), se sometió a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 36 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró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

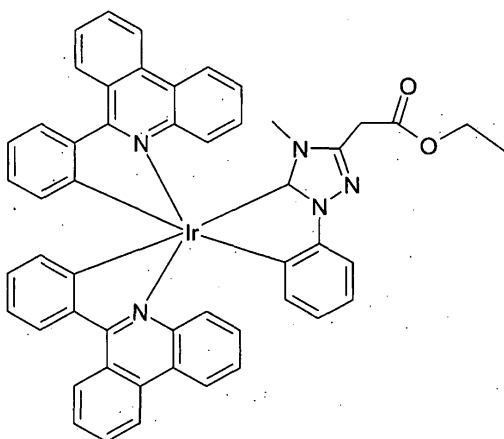
EM [ESI-EM (-)]: $[\text{Ir}(\text{CN})_2\text{-}2\text{Cs}^+]^-$ calculado 975,13858, encontrado 975,13882

10 Ejemplo 3

El precursor de la sal de yoduro de 3-etoxicarbonilmetil-4-metil-1-fenil-1H-[1,2,4] triazol-4-io del ligando de carbeno puede sintetizarse de acuerdo con el procedimiento descrito por Moderhack, D. et al., J. Heterocyclic Chem. 44 (2007) 393.



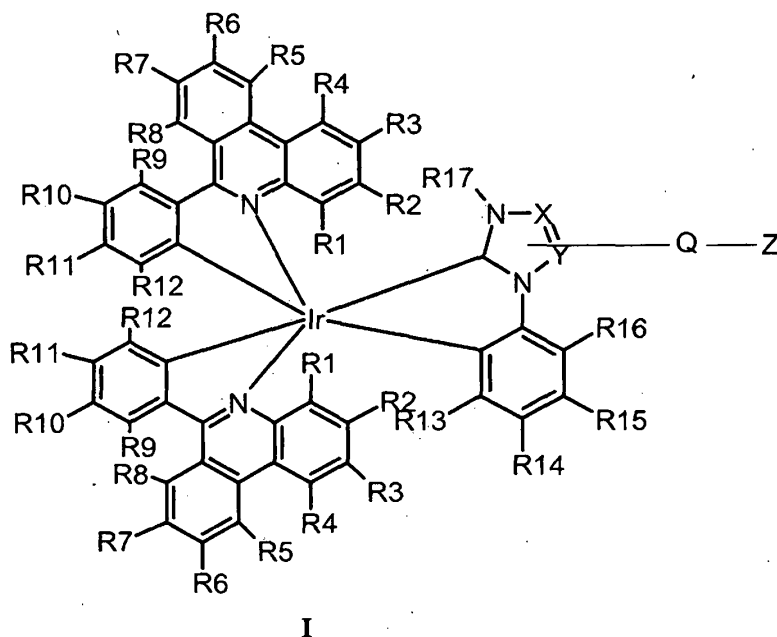
Síntesis del complejo $(6\text{-fenilfenantridina})_2\text{Ir-}$ (3-etoxicarbonilmetil-4-metil-1-fenil-1H-[1,2,4]triazol)



Se agitan 50 mg de sal yoduro de 3-etoxicarbonilmetil-4-metil-1-fenil-1H-[1,2,4] triazol-4-io y 20 mg de Ag_2O en 5 ml de dioxano a temperatura ambiente durante 40 horas bajo una atmósfera de gas inerte. Se añaden 25 mg de $(6\text{-fenilfenantridina})_2\text{IrCl}_2$ y la mezcla se somete a reflujo durante 24 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el residuo se separa por filtración y puede purificarse adicionalmente mediante HPLC preparativa.

REIVINDICACIONES

1. un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de fórmula I



5

en el que X e Y son C-R18 y C-R19, respectivamente, o donde X es N e Y es C-R19, o donde Y es N y X es C-R18, en el que cada R1-R19 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R20, donde R20 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxilo sustituido,

10

15

20

25

en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

30

en el que dentro de R1-R12, o/y dentro de R13-R16, o/y dentro de R17-R19, o/y entre R16 y R19, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, 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, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

35

40

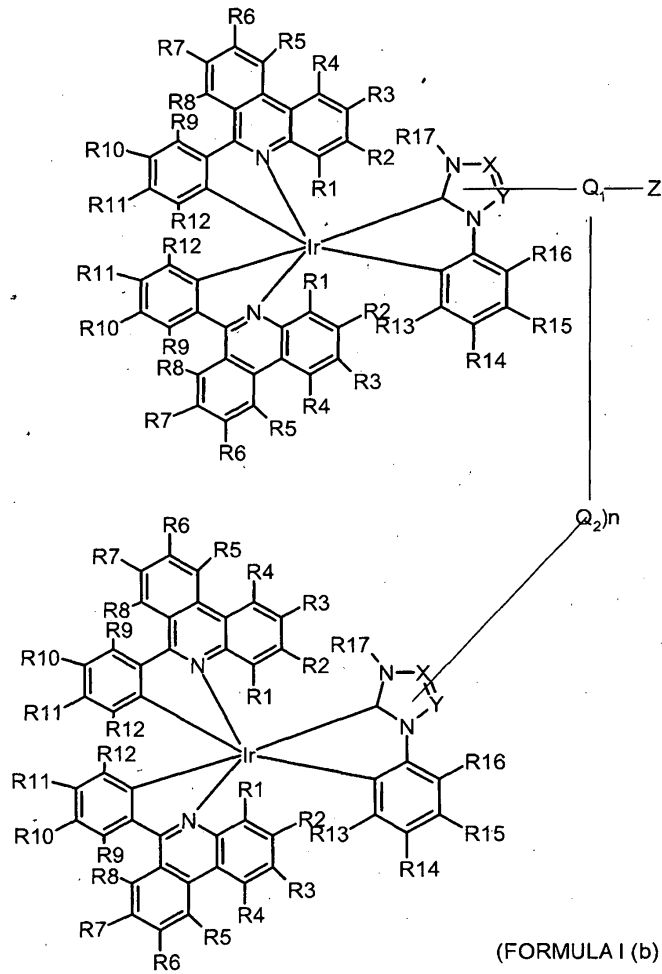
en donde, si en cualquiera de R1-R19 está presente una sustitución, el sustituyente en R1-R19 se selecciona cada uno independientemente entre un haluro, un grupo ciano o nitro, un grupo hidrofílico, como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquilo, ariloxi, alquilariloxi, polietileno, polipropileno, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinoilo, hidroxialquifosfinoilo, fosfinato, en el que alquilo tal como se usa aquí es una cadena alquímica lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbono o una cadena de heteroalquilo con la longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S, en el que arilo es un sistema de anillo arilo de 5, 6 o 7 miembros o un sistema de anillo heteroarilo de 5, 6 o 7 miembros que comprende 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,

en el que al menos uno de R13-R19 es -Q-Z, en el que Q es un enlazador o un enlace covalente, y en el que Z es un

grupo funcional.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Q es un enlace covalente o tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Q es un enlace covalente o tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C100 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 100 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que Q es un enlace covalente o tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 50 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Q es un enlace covalente o tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N y S, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con el esqueleto que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.
6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo funcional Z se selecciona del grupo que consiste en aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquililo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamido.
7. Un conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 unido covalentemente a un agente de unión por afinidad.
8. El conjugado de la reivindicación 7, en el que el agente de unión por afinidad se selecciona del grupo que consiste en antígeno y anticuerpo, análogo de biotina o biotina y avidina o estreptavidina, azúcar y lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario y receptor y ligando.
9. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho agente de unión por afinidad es un ácido nucleico o un anticuerpo.
10. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para llevar a cabo una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa.
11. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en un método de detección basado en electroquimioluminiscencia.
12. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en la detección de un analito.
13. Un método para medir un analito mediante un método in vitro, comprendiendo el método las etapas de
- proporcionar una muestra sospechosas o que se sabe que comprende el analito,
 - poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de analito conjugado, y
 - medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de este modo una medida del analito.
14. Un compuesto de acuerdo con la fórmula II

FORMULA I (a)



5 en la que R1 a R20 son como se definió para la fórmula I en la reivindicación 1 con la excepción de que Q de fórmula I es Q1 o Q2 en la fórmula II, respectivamente, en el que Q1 es un enlazador, en el que al menos uno de R13-R20 en la fórmula I (b) es Q2 y cada Q2 es independientemente un enlace o un enlace covalente, en el que (n) es un número entero de 1 a 50 y en el que Z es un grupo funcional.

10 15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la fórmula I (a) y la fórmula I (b) son iguales, excepto para Q1-Z en la fórmula I (a) y Q2 en la fórmula I (b), respectivamente.