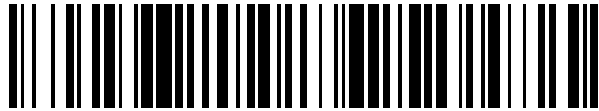


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 414**

51 Int. Cl.:

C07F 15/00 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

C09K 11/07 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/EP2013/002322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13744979 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2882764**

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

30 Prioridad:

02.08.2012 EP 12179050

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

19.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK;
CYSEWSKI, ROBERT;
DE COLA, LUISA;
DZIADEK, SEBASTIAN;
FERNANDEZ HERNANDEZ, JESUS, MIGUEL;
JOSEL, HANS-PETER y
SEIDEL, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 625 414 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos complejos basados en iridio para ECL

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

10 La quimioluminiscencia electrogenerada (también llamada electroquimioluminiscencia y abreviada ECL) es el proceso por el cual las especies generadas en los electrodos experimentan reacciones de transferencia de electrones de alta energía para formar estados excitados que emiten luz. Los primeros estudios detallados de ECL fueron descritos por Hercules y Bard et al., a mediados de los años sesenta. Después de unos 50 años de estudio, 15 la ECL se ha convertido en una técnica analítica muy potente y es ampliamente utilizada en las áreas de, por ejemplo, inmunoensayo, pruebas para alimentos y agua y detección de agentes biológicos.

Hay un número tremendo de compuestos que parece ser de interés para su uso en dispositivos emisores de luz orgánicos (OLED). Estos compuestos son adecuados para 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 el requerido, por ejemplo, para la detección de un analito a partir de una muestra biológica.

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

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

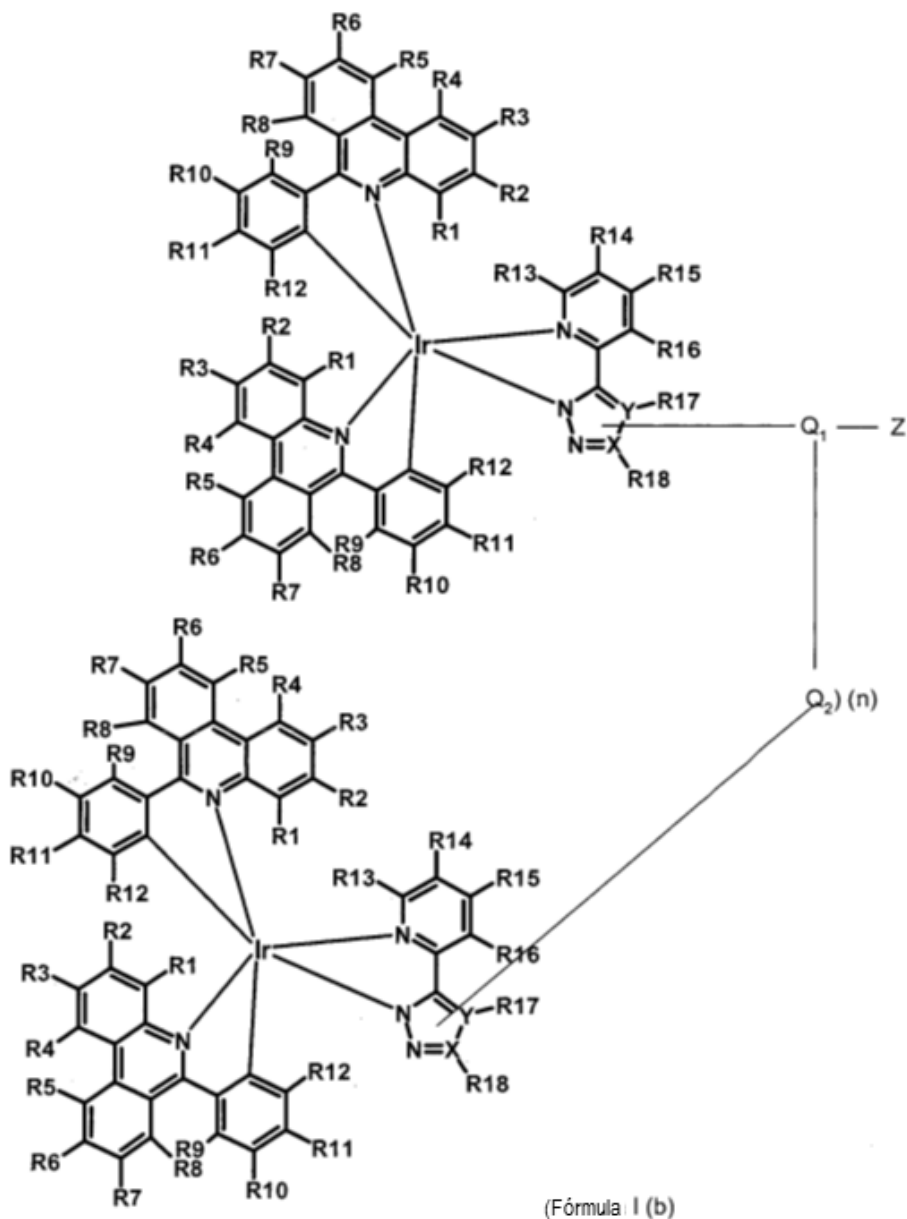
30 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que ciertos complejos luminiscentes Ir(III+) basados en iridio, representan marcadores muy prometedores para futuros métodos de detección basados en ECL de alta sensibilidad.

Los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio son conocidos, por ejemplo, a partir del documento JP2007169474 A (compuesto D1).

35 RESUMEN DE LA INVENCION

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

Fórmula I (a)



5 en la que en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R19, en los que R19 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, aminoariloxi sustituido,

15 en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico,

carbamoilo, hidroxi, 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, hidroxifosfinilo, hidroxilalquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

5 en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxi, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido,
10 arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinilo, hidroxilalquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

en la que, 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 hidrófilo, como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxi, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietileno, polipropileno, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfona, hidroxifosfinilo, hidroxilalquilfosfinilo, fosfonato, fosfinato,

20 en la que alquilo como se usa aquí 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 de O, N, P y S, en donde 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,

25 en la que X representa C o N,

en la que Y representa C o N,

en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (a) es -Q1-Z y en donde Q1 es un enlazante,

30 en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (b) es Q2, y cada Q2 independientemente es un enlazante o un enlace covalente,

en la que (n) es un número entero de 1 a 50,

35 y en la que Z es un grupo funcional.

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

40 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.

45 Además, la presente invención describe un método para medir un analito mediante un método *in vitro*, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una muestra de la que se sospecha o se sabe que contiene 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.

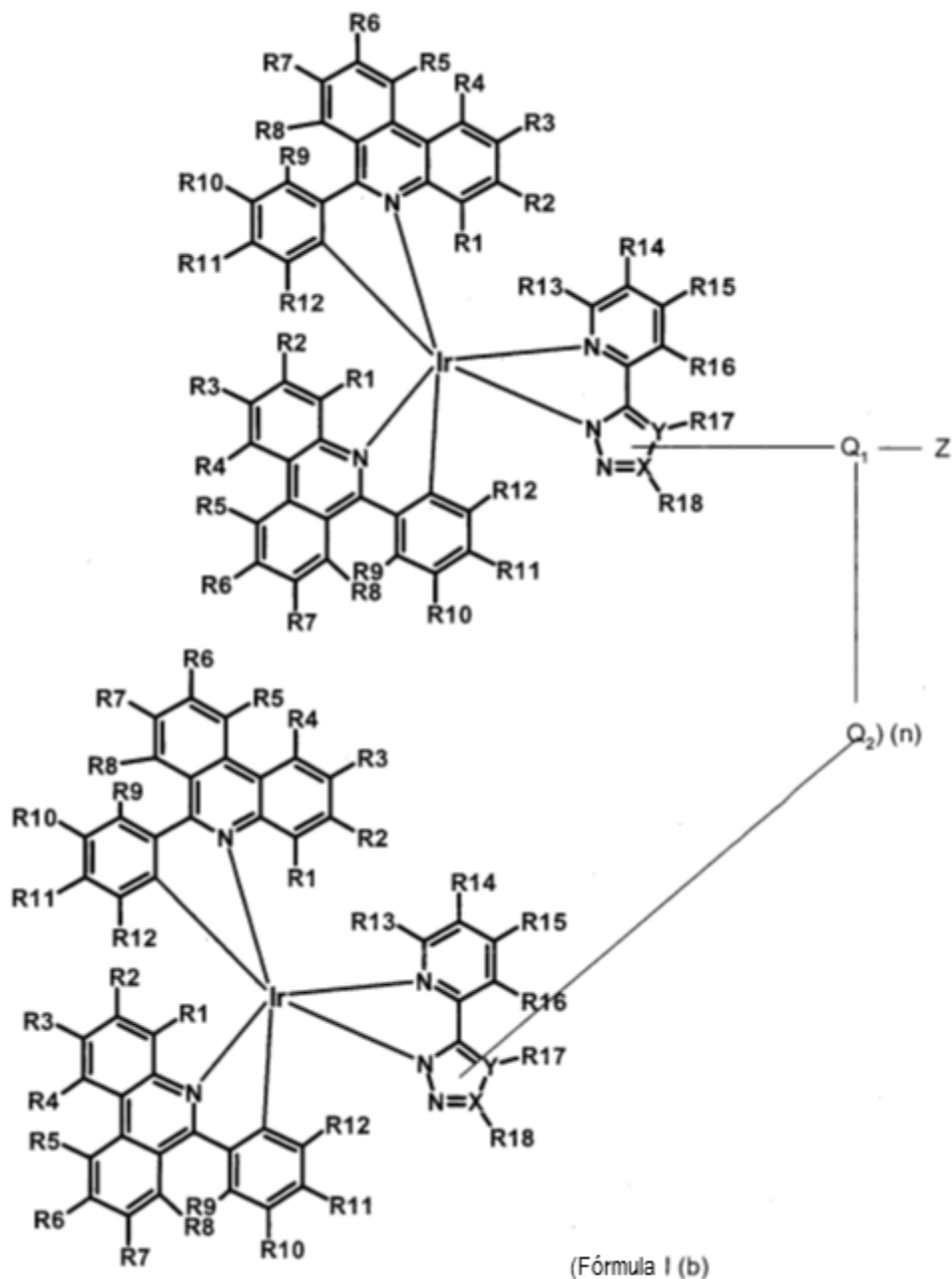
50 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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

55 Nuevos compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de la fórmula ii

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

Fórmula I (a)



5 en la que en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectiva e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R19, en los que R19 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituida, aminoarilo, aminoarilo sustituido, aminoariloxi, aminoariloxi sustituido,

10

15 en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo,

- alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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, hidroxifosfinilo, hidroxil-alquil-fosfinilo, fosfonato, fosfinato o,
- 5 en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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, hidroxifosfinilo, hidroxilalquilfosfinilo, fosfonato, fosfinato o,
- 10 en la que, 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 hidrófilo, como un amino, alquilamino, alquilamonio, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi, arilalquiloxi, ariloxi, alquilariloxi, polietilenoxi, polipropilenoxi, sulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo, sulfóxido, fosfono, hidroxifosfinilo, hidroxilalquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 15 en la que alquilo como se usa aquí es una cadena alquímica 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 de O, N, P y S, en donde 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,
- 20 en la que X representa C o N,
- en la que Y representa C o N,
- 25 en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (a) es -Q1-Z y en donde Q1 es un enlazante,
- en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (b) es Q2, y cada Q2 independientemente es un enlazante o un enlace covalente,
- 30 en la que (n) es un número entero de 1 a 50,
- y en la que Z es un grupo funcional.
- 35 En una realización, uno de R13 a R18 de la Fórmula I (a) es Q1-Z.
- 40 En una realización, uno de R13 a R18 en cada una de la Fórmula I (b) es Q2.
- En una realización uno de R17 o R18 de la Fórmula I (a) es -Q1-Z.
- 45 En una realización uno de R17 o R18 en cada una de la Fórmula I (b) es Q2.
- En una realización, uno de R13 a R18 de la Fórmula I (a) es Q1-Z y uno de R13 a R18 en cada una de la Fórmula I (b) es Q2.
- 50 En una realización, uno de R17 o R18 de la Fórmula I (a) es Q1-Z y uno de R17 o R18 en cada una de la Fórmula I (b) es Q2.
- 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.
- 55 Como es conocido por un experto en la técnica, los sustituyentes en R1-R19 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.
- 60 Como se usa aquí, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, los sustituyentes tienen los significados conocidos comúnmente por el experto en la materia.
- Alquilo, preferiblemente, es una cadena alquilo 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
- 65

grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, tert-butilo, los pentilos isoméricos, los hexilos isoméricos, los heptilos isoméricos, los octilos isoméricos y dodecilo. En una realización preferida particular, alquilo es metilo o etilo.

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

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

15 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.

20 En una forma de realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo no sustituido, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

25 En una forma de realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfonato, sulfinato, sulfenato, sulfamoilo o sulfóxido.

30 En una realización, en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, alquiloxi sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo sustituido o no sustituido, arilsulfonilo sustituido o no sustituido, sulfonato o sulfóxido.

En una realización, al menos uno de R1 a R18 del compuesto de acuerdo con la Fórmula I (a) y/o fórmula I (b) está sustituido por al menos un grupo hidrófilo.

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

40 Los grupos hidrófilos 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, tert-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 unidades estructurales hidroxipropilo o hidroxietilo, arilamino, con arilo referido a una unidad estructural 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 hidrófilo, alquilamonio, con alquilo tal como se ha definido anteriormente y preferiblemente un residuo de trimetilamonio o una unidad estructural 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 arriba 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 o fosfinato.

55 Preferentemente, dicho grupo hidrófilo se selecciona entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato, cuando sea aplicable, preferentemente tal como se define en el párrafo anterior. En una realización preferida, el grupo hidrófilo se selecciona de alquilamino, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfamoilo, sulfóxido y fosfonato.

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

65 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, sulfino-alquilo, sulfino-arilo, sulfino-alcoxi, sulfino-ariloxi, sulfino, sulfenoalquilo, sulfeno-arilo, sulfeno-alcoxi, sulfeno-ariloxi, sulfeno, sulfamoil-alquilo, sulfamoil-arilo, sulfamoil-alcoxi, sulfamoilariloxi, sulfamoilo, alcanosulfonil-alquilo, alcanosulfonil-arilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo-alquilo, o

arenosulfonil-arilo, o arenosulfonilo, sulfoamino-alquilo, sulfoamino-aril, sulfoamino-alcoxi, sulfoamino-ariloxi, sulfoamino, sulfinoaminoalquilo, sulfinoamino-arilo, sulfinoamino-alcoxi, sulfinoamino-ariloxi, sulfinoamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilamino-alquilo, arenosulfonilamino-arilo, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, fosfonoalquilo, fosfonoarilo, fosfonoalquiloxi, fosfonoariloxi, fosfono, hidroxifosfinoilalquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinilo, hidroxialquil-fosfinil-alquilo, hidroxialquil-fosfinil-arilo, hidroxialquil-fosfinil-alquilo, hidroxialquil-fosfinil-ariloxi, hidroxialquil-fosfinilo, fosfonoamino-alquilo, fosfonoamino-arilo, fosfonoaminoalcoxi, fosfonoamino-ariloxi, fosfonoamino, o, cuando se hace coincidir químicamente, una sal de los sustituyentes descritos anteriormente, en donde "alquilo" es una cadena alquilo lineal o ramificada con una longitud de 1-20 átomos de carbonos o una cadena heteroalquilo con la longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados de O, N, P y S y en donde "arilo" tal como se usa en el presente documento 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 un grupo sustituido o no sustituido seleccionado entre sulfoalquilo, sulfo-arilo, sulfo-alcoxi, sulfo-ariloxi, sulfo, sulfamoil-alquilo, sulfamoil-arilo, sulfamoil-alcoxi, sulfamoil-ariloxi, sulfamoilo, alcanosulfonil-alquilo, alcanosulfonil-arilo, alcanosulfonilo, arenosulfonil-alquilo, arenosulfonil-arilo, arenosulfonilo, alcanosulfonilamino-alquilo, alcanosulfonilamino-arilo, alcanosulfonilamino-alcoxi, alcanosulfonilamino-ariloxi, alcanosulfonilamino, arenosulfonilaminoalquilo, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino-alcoxi, arenosulfonilamino-ariloxi, arenosulfonilamino, fosfonoalquilo, fosfonoarilo, fosfonoalquiloxi, fosfonoariloxi, fosfono, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-arilo, hidroxifosfinoil-alquilo, hidroxifosfinoil-ariloxi, hidroxifosfinilo, hidroxialquil-fosfinoil-alquilo, hidroxialquil-fosfinoil-arilo, hidroxialquil-fosfinoil-alquilo, hidroxialquil-fosfinoil-ariloxi, hidroxialquil-fosfinilo, o, cuando se combina químicamente, una sal de los sustituyentes anteriormente descritos, en la 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 de O, N, P y S y en donde "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 la que el contraión es preferiblemente un catión del grupo de los 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 la que el contraión es un catión del grupo de los metales alcalinos.

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

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

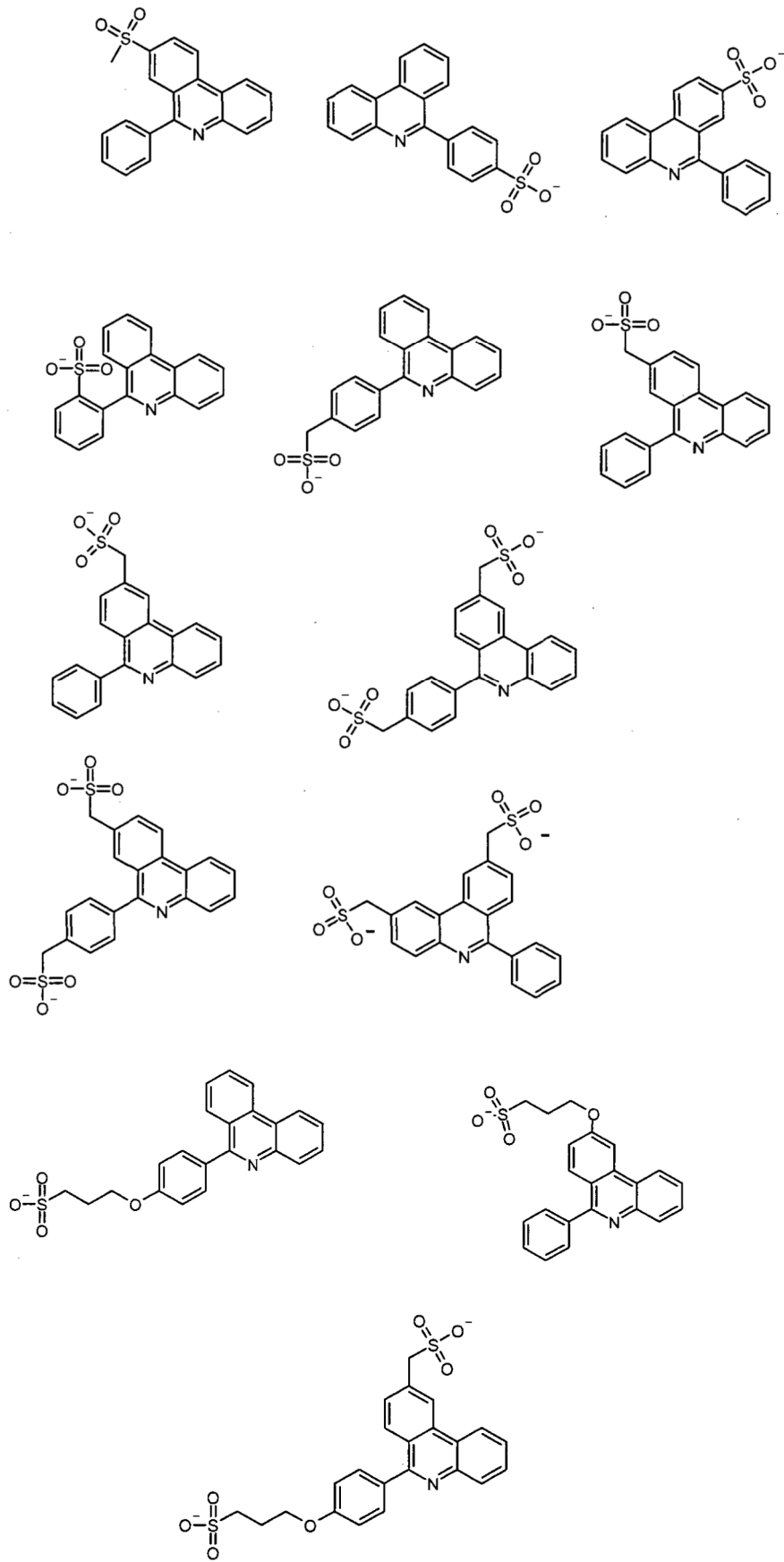
En una realización, de uno a tres de R1 a R12 no son hidrógeno.

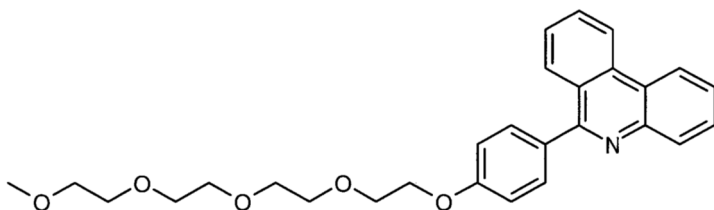
En una realización, el contraión es un catión de metal alcalino seleccionado del grupo que consiste en catión de litio, catión de sodio, catión de potasio y catión de cesio.

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 residuos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I (a) y/o la Fórmula I (b) se seleccionan entre las fenilfenantridinas sustituidas que se dan a continuación.





En una realización preferida en la Fórmula I (a) y fórmula I (b), respectivamente, X e Y no representan simultáneamente N.

5

En una realización en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente, X representa C, e Y representa N.

En una realización en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente, Y representa C, y X representa N.

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

15 En el compuesto de acuerdo con la presente invención, el enlazante Q1 tiene preferiblemente una longitud de cadena principal entre 1 y 200 átomos. Como el experto en la técnica apreciará fácilmente el enlazante Q1 de fórmula II comprende n sitios de ramificación en los que Q2 está unido. Con otras palabras, la conexión más corta entre un sistema de anillo del tercer ligando en la Fórmula I (a) y el grupo funcional Z consiste en 1 a 200 átomos.

20 En una realización, Q1 tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos de carbono 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

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

30 En una realización, el enlazante Q1 tiene como cadena principal una cadena de 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

35 En una realización, el enlazante Q1 tiene como cadena principal 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

40 En una realización adicional, el enlazante Q1 tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados a partir de O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena tal como se ha descrito anteriormente con la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

45 En una realización, el enlazante Q1 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 de carbono con una cadena principal que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S o N, P sustituido o átomos de S, o una cadena de 1 a 20 átomos de carbono, o con una cadena principal 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, al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en la que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos).

55

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

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 una realización, el enlazante 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 atómica de 1 a 12 con una cadena principal que consta de 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 12 átomos de carbono con una cadena principal constituida por 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 la 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 con (n) un número entero de 1-50. Cada uno de estos (n) Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 200 átomos de carbono constituida por átomos de carbono, carbono sustituido átomos de carbono 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 es independientemente es un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 50 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos de carbono 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 la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

En una realización, cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C12 saturada o una cadena atómica de 1 a 12 con una cadena principal que consta de 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 enlazante Q1 comprende uno o más aminoácidos.

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

En una realización ambos enlazantes Q1 y Q2 comprenden uno o más aminoácidos.

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

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

En una realización, tanto los enlazantes Q1 como Q2 comprenden uno o más nucleótidos.

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.

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.

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

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

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

10 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 aldehído, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, epóxido, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, hidrazina, hidroxilo, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

15 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 ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

20 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.

25 Ahora se ha descubierto sorprendente e inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula II son adecuados como marcadores para futuros métodos de detección basados en ECL de alta sensibilidad.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula II,

30 en donde la Fórmula I (a) y fórmula I (b) son iguales, excepto para Q1-Y en la Fórmula I (a) y en Q2 en la Fórmula I (b), respectivamente, en donde en la Fórmula I(a) y fórmula I(b), respectivamente, uno a tres de R1 a R12 son independientemente sulfoalquilo, sulfoarilo, sulfoalcoxi, sulfoariloxi, sulfo, o una sal de los mismos (=sulfonato), en donde el contraión es preferiblemente un catión del grupo de los metales alcalinos, y los otros grupos R1 a R12 son hidrógeno,

35 en la que X representa C o N,

en la que Y representa C o N,

40 en la que uno de R13-R18 en la Fórmula I (a) es -Q1-Z, y los otros grupos R13 a R18 en la Fórmula I (a) son hidrógeno,

en la que uno de R13-R18 en la Fórmula I (b) es Q2, los otros grupos R13 a R18 en la Fórmula I (a) son hidrógeno, en donde Q1 es un enlazante y Q2 es un enlazante o un enlace covalente,

45 donde (N) es un número entero de 1 a 50, y

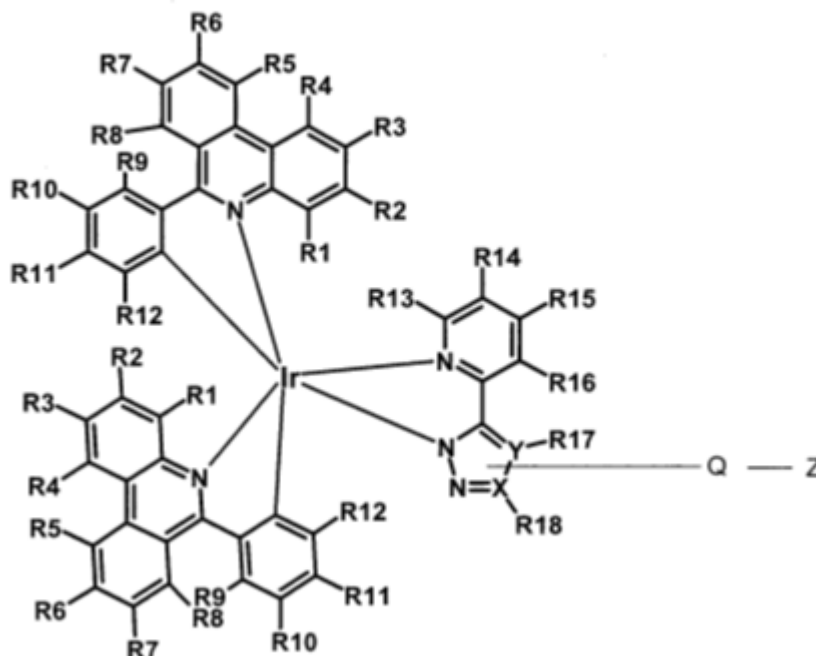
Z es un grupo funcional.

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

NUEVOS COMPUESTOS QUIMIOLUMINISCENTES BASADOS EN IRIDIO DE LA FÓRMULA I

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

Fórmula I



en la que cada R1-R18 es independientemente hidrógeno, haluro, ciano o grupo 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinilo, fosfonato, fosfinato o R19, en la que R19 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, aminoalcoxi, aminoalcoxi sustituido, amino-arilo, amino-arilo sustituido, amino-ariloxi, amino-ariloxi sustituido,

en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato,

en la que, 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 hidrófilo 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinilo, fosfonato, fosfinato,

en la que alquilo como se usa aquí es una cadena alquílica 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 de O, N, P y S, en donde 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,

5 en la que X representa C o N,

en la que Y representa C o N,

10 en donde al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I es -Q-Z y donde Q-Z es maleimida o donde Q es un enlace covalente, o una cadena alquilo C21-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida lineal o ramificada, o una cadena alquilo de 21 a 200 átomo 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 y en donde Z es un grupo funcional.

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

20 En otras realizaciones, R1 a R19 tienen los mismos significados que los descritos anteriormente para R1 a R19 de los compuestos de fórmula II.

En una realización, Q-Z es maleimida.

25 En una realización, Q es un enlace covalente.

En una realización, Q es una cadena alquilo C21-C200 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 21 a 200 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre átomos de O, N, P y S o átomos de N, P y S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente con la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

30 En una realización, Q es una cadena alquílica C21-C100 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 21 a 100 átomos de carbono con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre átomos de N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente con la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

40 En una realización Q es una cadena alquilo C21-C50 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 21 a 50 átomos de carbono con una cadena principal que consta de átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre átomos de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente con la cadena principal que contiene uno o más sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos cíclicos o heterocíclicos.

45 En una realización, el grupo funcional Z comprendido en un 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, maleimida, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

50 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, maleimida, alquinilo, azida, isocianato, isotiocianato y fosforamidito.

55 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 de, éster de N-hidroxisuccinimida, y maleimida

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

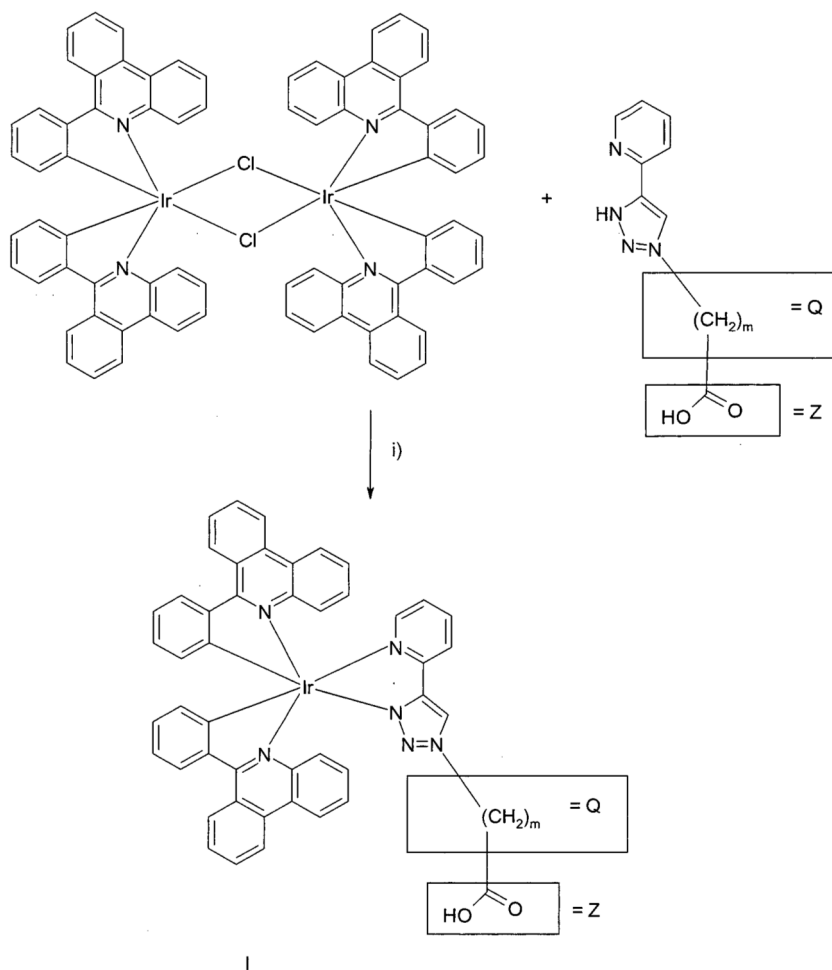
60 Ahora se ha descubierto sorprendente e inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes basados en iridio de fórmula I son adecuados como marcadores para futuros métodos de detección basados en ECL de alta sensibilidad.

65 Procedimientos para la preparación de compuestos de fórmula II y I

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

5 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula I pueden ser sintetizados, por ejemplo (con base en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711) como sigue: Síntesis del complejo de dímero iridio fenilfenantridina sustituido; hacer reaccionar este dímero con un precursor de Q-Z para dar un producto de acuerdo con la Fórmula I.

10 De acuerdo con este procedimiento, los compuestos de fórmula I pueden ser obtenidos, por ejemplo, como se muestra en el Esquema 1 a continuación.



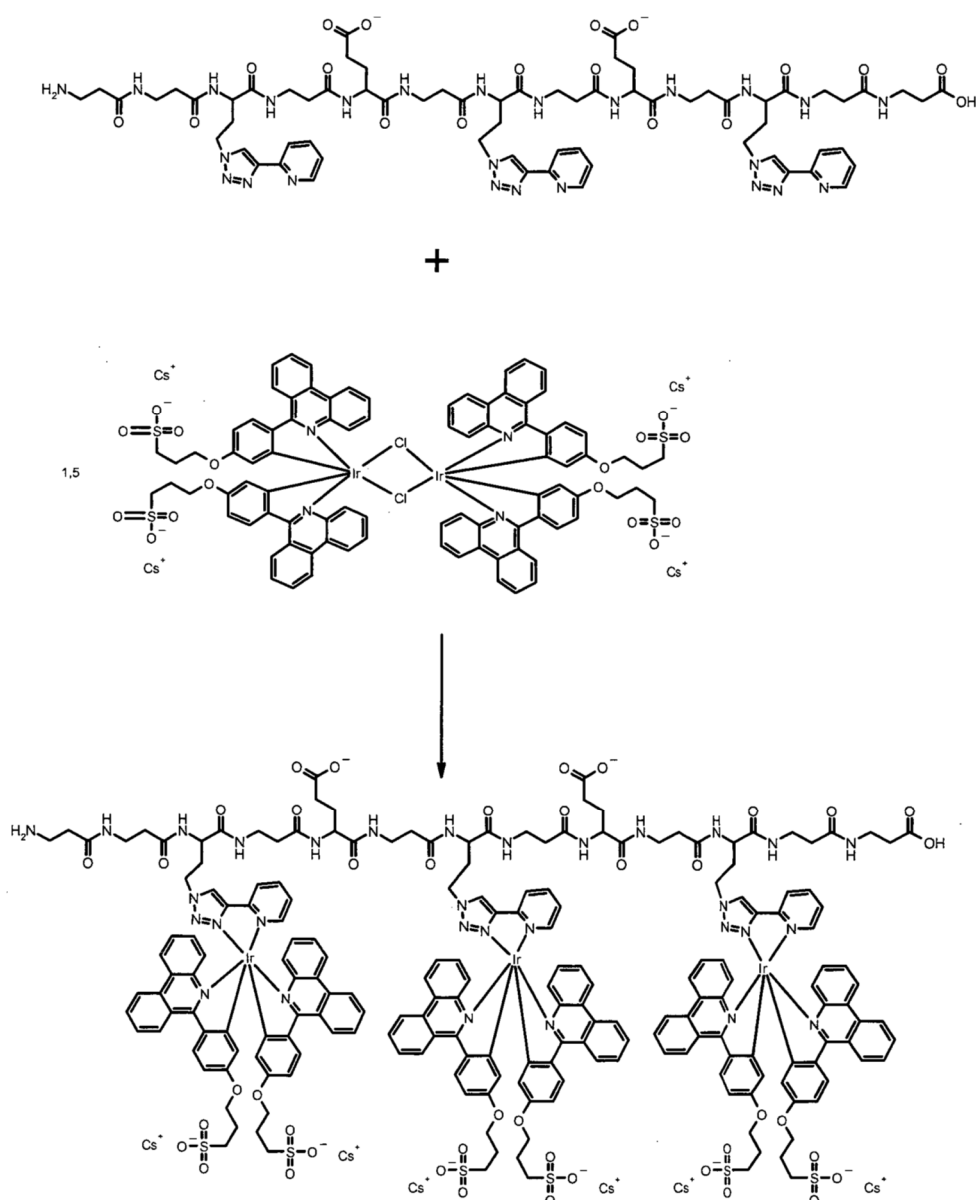
Esquema 1: Síntesis de un compuesto de fórmula I. Reactivos y condiciones: (i): Na_2CO_3 , 2-etoxietanol; m es un número entero de 1 a 20.

15 El complejo de dímero de iridio de fenilfenantridina sustituido usado como material de partida puede obtenerse por un proceso como el que se muestra por ejemplo en los Ejemplos (véase Ejemplo 2) y como se ha descrito, por ejemplo en EP 12179056.2.

20 Los compuestos, que se utilizan como materiales de partida para la preparación de complejos de dímero de iridio de fenilfenantridina, están comercialmente disponibles o pueden obtenerse por procedimientos conocidos por el experto en la materia, como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos (véase el Ejemplo 1).

25 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula II pueden ser sintetizados, por ejemplo (con base en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711) como sigue: Síntesis del complejo de dímero iridio fenilfenantridina sustituido; hacer reaccionar este dímero con un precursor del enlazante Q que contiene 2-50 unidades estructurales piridinil-azolilo para dar un producto de acuerdo con la Fórmula II.

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



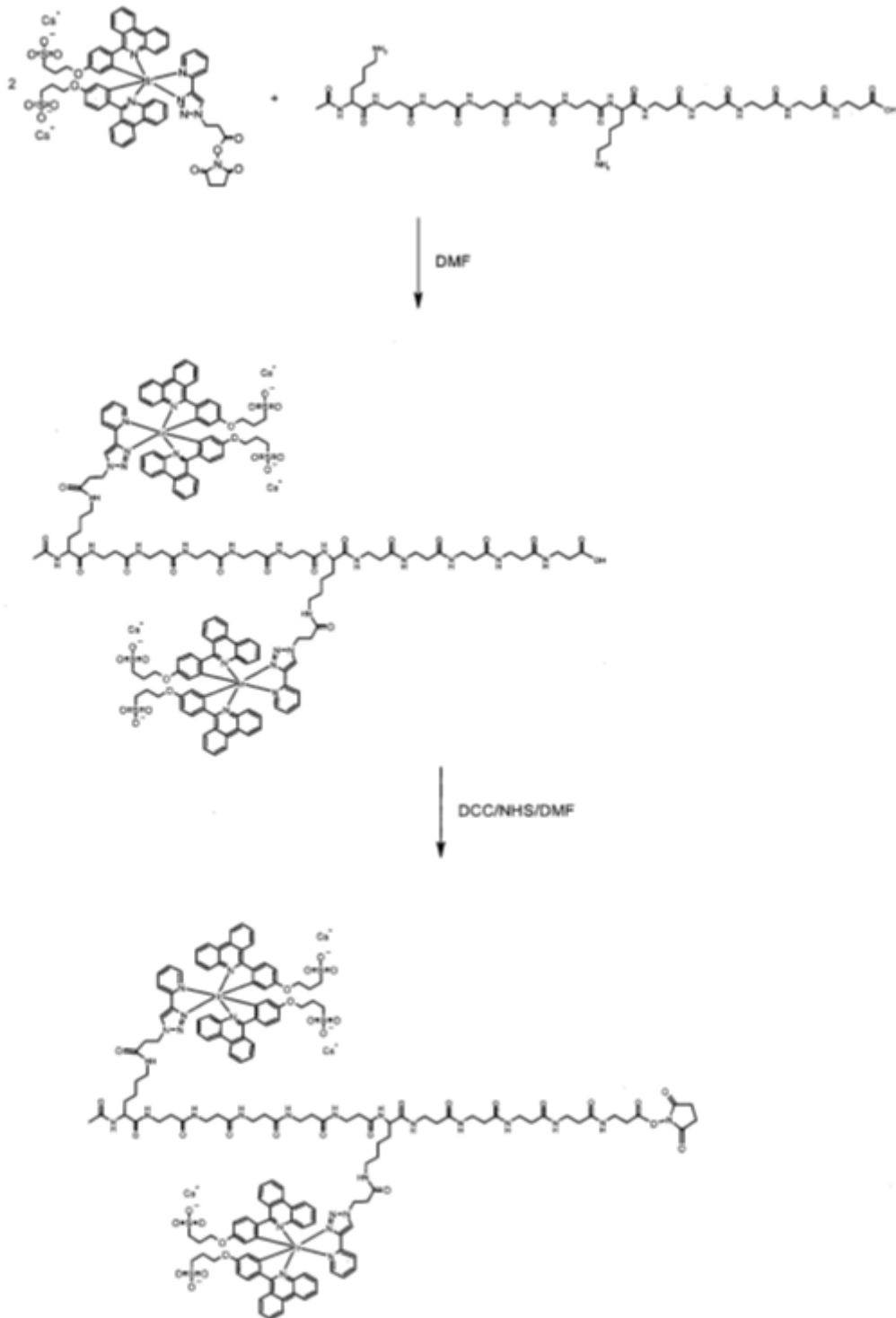
Esquema 2: Síntesis de un compuesto de Fórmula II. Reactivos y condiciones: Cs_2CO_3 , DMF

5 El complejo de dímoro de iridio de fenilfenantridina sustituido utilizado como material de partida puede obtenerse mediante un proceso como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos (véase Ejemplo 2) y como se ha descrito, por ejemplo en EP 12179056.2.

10 Los compuestos, que se usan como materiales de partida para la preparación de complejos de dímoro de iridio de fenilfenantridina, están comercialmente disponibles o pueden obtenerse por procedimientos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo como se muestra en los Ejemplos (véase el Ejemplo 1).

15 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula II también se pueden sintetizar de otra manera: El complejo de dímoro de iridio de fenilfenantridina sustituido (véase, por ejemplo, el ejemplo 2.2) se hace reaccionar adicionalmente con un derivado de azolil-piridina que contiene un grupo funcional (-Q-) Z para dar como resultado un complejo monómero de iridio. Un complejo monómero de iridio es por ejemplo dado en la Fórmula I. Sin embargo, para uso en la síntesis de un complejo de acuerdo con la Fórmula II, el compuesto como se da en la Fórmula I además incluirá aquellos en los que el enlazante Q es Q2 como se define para la Fórmula II. El complejo de iridio monomérico se hace reaccionar posteriormente con un precursor de Q2 que contiene 2-50 grupos que pueden hacerse reaccionar con el grupo funcional del complejo monómero de iridio 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.

20 De acuerdo con este procedimiento, los compuestos de fórmula II pueden ser obtenidos, por ejemplo, como se muestra en el Esquema 3 a continuación.



Esquema 3: Síntesis de un compuesto de Fórmula II

Conjugados que comprenden los nuevos compuestos de fórmula ii o fórmula i y otros aspectos de la invención

- 5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente basado en iridio de fórmula I, o de fórmula II, respectivamente, tal como se describe y define en el presente documento y 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.

5 En una realización, la sustancia biológica de un conjugado de acuerdo con la presente invención, es decir, enlazada covalentemente a un compuesto de acuerdo con la Fórmula II, o de Fórmula I, respectivamente, es un agente de unión de afinidad. Un agente de unión de afinidad es una molécula capaz de enlazamiento molecular a otra molécula debido a la interacción atrayente entre estas moléculas que da lugar a una asociación estable en la que las
10 moléculas están cerca la una a la otra. El resultado de la unión molecular es la formación de un complejo molecular. La unión atrayente entre los componentes de un complejo es normalmente más débil que en un enlace covalente. En el presente caso, el agente de unión es un agente de unión por afinidad, lo que significa que es capaz de unirse a un complejo de afinidad, es decir, un complejo estable bajo las condiciones respectivas, por ejemplo en condiciones normales. Las moléculas que pueden participar en la unión molecular incluyen, pero no se limitan a, proteínas,
15 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-ADN, proteína-hormona, proteína-fármaco, antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-avidina o estreptavidina, ácido nucleico-ácido nucleico complementario o receptor- agonista (ant) del receptor.

20 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 II, o de Fórmula I, respectivamente, se ha utilizado para formar un enlace covalente con un grupo sobre el agente de unión de afinidad y ya no está presente como tal. En el caso de que un reactivo de unión a 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 de afinidad basándose en procedimientos bien establecidos.

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 II o de fórmula I con un grupo reactivo apropiado de un agente de unión de afinidad como se define aquí con el grupo funcional Z.

30 Este proceso puede ser llevado a cabo por el experto en la materia utilizando métodos estándar conocidos por el experto en la materia.

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

No deseando limitarse adicionalmente, pero en aras de la claridad, el agente de unión de 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 secuestrante de iones metálicos, un agonista del receptor o un antagonista del receptor. Por ejemplo, el agente de unión de afinidad puede ser un asociado de un par de unión específico, donde el otro socio de dicho par de unión está asociado con o es el objetivo sobre una superficie celular o una estructura intracelular.

45 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de fórmula II o fórmula I y un agente de unión de 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 secuestrante de iones metálicos, un agonista del receptor o un antagonista del receptor.

50 Preferiblemente, un agente de unión de afinidad es un asociado o miembro de un par de unión de afinidad, o como también es llamado por el experto en la técnica, un asociado o miembro de un par de unión específica.

55 Un agente de unión por afinidad tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol respecto a su objetivo, por ejemplo un miembro de un par de unión específica, como un anticuerpo, al otro miembro del par de unión específica, 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 objetivo.

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

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

5 En una realización, el conjugado comprende un compuesto de fórmula II o fórmula I y una proteína, un antígeno, un anticuerpo, biotina, un análogo de biotina, avidina, 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 nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrante de iones metálicos, un agonista del receptor, un antagonista del receptor, o cualquier otra combinación de los mismos.

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

15 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 o 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 o 30 nucleótidos.

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

25 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, aminoalilo dU o dC, 5- (aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o -dC, 5-halogeno-dU o -dC; N pirimidinas sustituidas como N4-etil-dC; N purinas sustituidas como N6-etil-dA, N2-etil-dG; 8 purinas sustituidas como 8-[6-amino)-hex-1-il]-8-amino-dG o -dA, 8 dA o dG, 8-alquil dG o dA halogenados; y dA sustituido en 2 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-ribosido; 3-nitro-pirrol-d-ribosida, desoxiinosina (dI), desoxixantosa (dX); 7 deaza -dG, -dA, -dI o -dX; 7-deaza-8-aza-dG, -dA, -dI o -dX; 8-aza-dA, -dG, -dI o -dX; d-formicina; pseudo dU; pseudo iso dC; 4 tio dT; 6 tio dG; 2 tio dT; iso dG; 5-metil-iso-dC; 8-aza-7-deaza-dA 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-metil-iso-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 unidad estructural fosfato internucleósido y/o ser un PNA.

Un oligonucleótido puede contener por ejemplo un nucleótido con una desoxirribosa sustituida como 2'-metoxi, 2'-fluoro, 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; (2'-O, 4'-C metileno)- enlazado en 2',4' similar a ribosa (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); alritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclico en la que los átomos C3' y C5' están conectados por un puente de etileno que se fusiona con un anillo de ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN); glicerina (oligómero conocido como GNA); glucopiranososa (oligómero conocido como ADN Homo); carbaribosa (con una subunidad ciclopentano en lugar de tetrahidrofurano); hidroximetilmorfolina (oligómeros conocidos como ADN morfolino).

También se sabe que un gran número de modificaciones de la unidad estructural fosfato internucleósido interfieren con las propiedades de hibridación y tales modificaciones del esqueleto también pueden combinarse con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótidos. Ejemplos son fosforotioato, fosforoditioato, fosforamido y metilfosfonato de oligonucleótidos.

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

Los nucleótidos modificados anteriormente mencionados, análogos de nucleótidos así como modificaciones de estructura principal 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 específicamente cubre 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 los anticuerpos biológicos deseados exhiban actividad.

Un anticuerpo "aislado" es aquel 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 proteínicos 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 mancha de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos no estará presente un componente del entorno natural del anticuerpo. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) 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 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 extensamente 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 la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones del 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, Fifth Edition, National Institute of Health, 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 se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (K) y lambda (λ), con base 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 en general 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 otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se usan en el presente documento de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no 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 parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a 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 de 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 reticular antígeno.

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

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 de anticuerpo. Fab'-SH es la designación de la presente invención para Fab' en la que en la unidad estructural(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.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en la que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlace 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, In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), páginas 269-315.

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 (VH-VL). Mediante el uso de un enlace 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 otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. et al., PNAS USA 90 (1993) 6444-6448. Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

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 como no siendo una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia de polipéptido de unión a 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 ADN 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 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 único determinante sobre un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

Como se ha mencionado, los compuestos y conjugados descritos en la presente invención tienen propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados descritos, respectivamente, muestran una alta eficiencia ECL. Esta alta eficiencia también está presente si las mediciones correspondientes se realizan en un sistema acuoso en comparación con muchas etiquetas ECL que sólo han mostrado una alta eficiencia ECL 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.

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 electroquimioluminiscente en una solución acuosa. Una solución acuosa es cualquier solución que comprende al menos 90% de agua (peso a peso). Obviamente, tal solución acuosa puede contener además ingredientes como compuestos reguladores, detergentes y por ejemplo aminas terciarias como tripropilamina como donador de electrones en la reacción ECL.

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.

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 células, virus, partículas subcelulares, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

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 por 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 ADN o ARN 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 de la que se sospecha o se sabe que contiene el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con un agente de unión de afinidad y un compuesto de acuerdo con la Fórmula II como se describe en la presente invención bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo conjugado de analito, (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener así una medida del analito.

En una realización medir un analito significa 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. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones identificadas en el presente documento se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Ejemplo 1

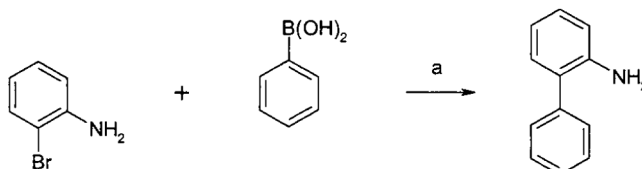
Síntesis de fenilfenantridinas sustituidas

Ejemplo 1.1

Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

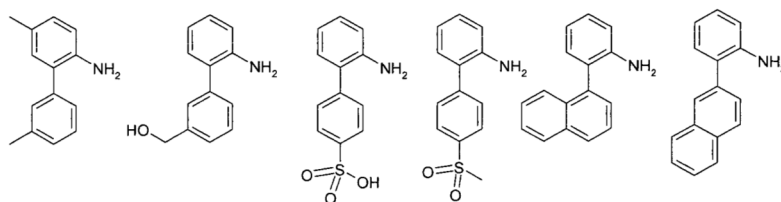
- 5 Con la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura como se describe por Youn, S.W., en *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 4598-4601, entre los derivados de 2-bromoanilina comercialmente disponibles y el correspondiente ácido arilborónico, se pueden sintetizar los 2-aminobifenilos apropiados, los cuales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

- 10 Procedimiento típico:



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

- 15 Otros ejemplos:

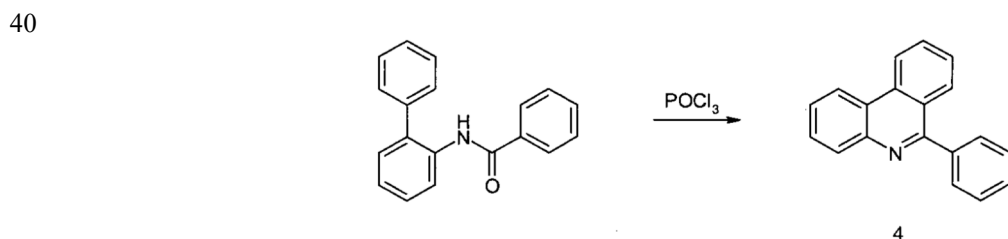
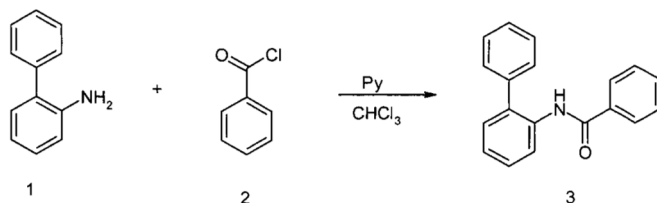


20 Ejemplo 1.2

Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

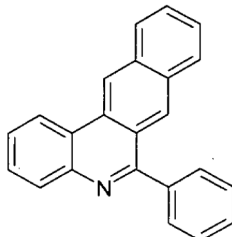
- 25 A la solución de 2-amilanilina enfriada con hielo 1 (0.01 mol) en cloroformo (20 ml) se añadió cloruro de arilo ácido 2 (0.01 mol) y se agitó en condiciones inertes durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo con agitación durante las 2 horas siguientes. 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 en vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, hexano/acetato de etilo 3:2 para dar el producto 3 puro con un rendimiento del 66%.

- 30 Se sometieron a reflujo benzamido-2-bifenil 3 (0.01 mol) y POCl₃ (5 ml) en 20 ml de tolueno 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 sobre hielo, se lavó con NH₄OH al 25% y agua destilada. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío, seguido de cromatografía ultrarrápida (sílica gel, hexano/acetato de etilo 1:1) dando el producto 4,6-fenilfenantridina.



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

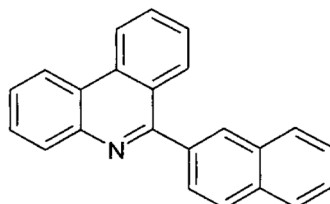
Utilizando 2-naftalen-2-il-fenilamina en lugar de 2-aril-anilina se obtienen:



^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.64 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 8.29 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.92 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 7.48 Hz, 1H), 7.79-7.75 (m, 2H), 7.69 (t, J = 14.0, 8.2 Hz, 1H), 7.63-7.61 (m, 2H), 7.53-7.46 (m, 4H), 7.19 (t, J = 14.3, 7.2 Hz, 1H).

MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.3

Usando cloruro de naftaleno-carbonilo en lugar de cloruro de ácido fenílico se obtienen:



^1H -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).

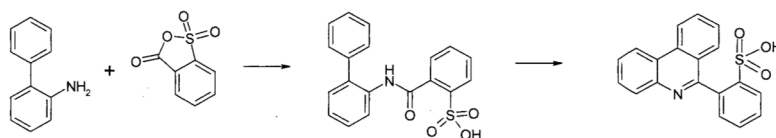
MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.3

Ejemplo 1.3

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

La 6-(2-sulfofenil) fenantridina puede sintetizarse calentando suavemente arilanilina (0.01 mol) con anhídrido cíclico de ácido 2-sulfobenzoico (0.01 mol) en CH_3CN durante 6 horas usando el procedimiento descrito por Nicolai, E., en Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1617-1630.

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

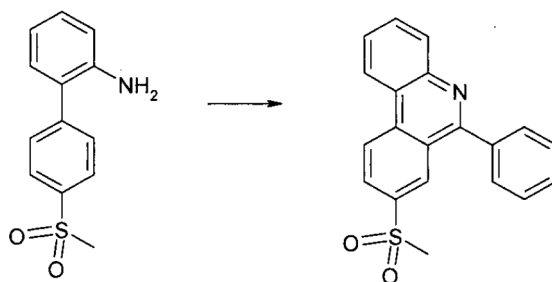


Ejemplo 1.4

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

La 6-fenil-alkilsulfonil-fenantridina puede sintetizarse 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.



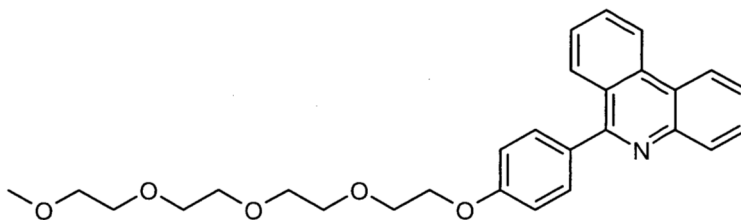
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.75 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.68 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.35 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.89 (t, J = 15.3, 7.1 Hz, 1H), 7.81-7.73 (m, 3H), 7.64-7.56 (m, 3H) 3.12 (s, 3H).

MS: [M+H]⁺ 334,3

La 6-(4-metilsulfonil) 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 CH₂Cl₂ seco (100 ml), se añadieron cloruro de 4-toluenosulfonilo (6.7 g, 35.3 mmol) y DMAP (120 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se lavó con 80 ml de HCl (1M) y después con agua. El extracto se secó sobre MgSO₄ 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 (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 - 7.64 (m, 2H), 7.31 - 7.26 (m, 2H), 4.16 - 4.06 (m, 2H), 3.62 (m 2H), 3.59 - 3.40 (m, 10H), 3.30 (s, 3H), 2.38 (s, 3H).

¹³C{¹H} RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 144.75 (s), 132.90 (s), 129.77 (s), 127.8 (s), 71.82 (s), 70.60 (s), 70.48 (s), 70.47 (s), 70.41 (s), 70.39 (s), 69.23 (s), 68.55 (s), 58.90 (s), 21.53 (s).

Síntesis de 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), éster etílico del ácido 4-hidroxibenzoico (3.7 g, 22.3 mmol), K₂CO₃ (15.4 g, 111.5 mmol) y 18-corona-6 (0.59 g, 2.2 mmol) se calentó a reflujo en acetona (120 ml) durante 22 h. La mezcla de reacción se concentró y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con H₂O, se secó sobre MgSO₄ 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%)

ES 2 625 414 T3

RMN:

5 ^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), 3.32 (s, 3H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (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).

10 MS(+):

$[\text{M}+\text{Na}]^+ = \text{calc. } 379.1727, \text{ encontrado } 379.1743$

Síntesis de ácido 4-PEG4-benzoico:

15 Procedimiento: (JACS, 2007, 129, 13364) Una mezcla de 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 mantuvo 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 sequedad. El sólido blanco resultante se recrystalizó en EtOAc/hexano.

20 Rendimiento: 5.3 g (85%)

RMN:

25 ^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).

30 MS(-):

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

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

40 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 hora. La solución se concentró hasta sequedad. El residuo oleoso se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

45 Se enfrió a 0°C una solución de 2-fenilnilina (1.6 g), piridina (2.4 mL) en cloroformo (80 mL) en atmósfera inerte. Cloruro de (fenil-4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoilo) (3.1 g, 9.14 mmol) en 20 mL se agregó 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 con MgSO_4 y se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/hexano).

50 Rendimiento: 4,1 (90%)

RMN:

55 ^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).

60 MS(+)

$[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{calc. } 480.2386 \text{ encontrado. } 480.2383; [\text{M}+\text{Na}]^+ = \text{calc. } 502.2200, \text{ encontrado } 502.2204$

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

Procedimiento: N-bifenil-2-il-4-(2-[2-(2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-benzamida (4 g, 8.34 mmol), POCl₃ (10 ml) en 10 ml de tolueno se sometieron a reflujo durante 20 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de diclorometano. La solución se vertió sobre hielo y la mezcla se neutralizó con NH₄OH (20%). La fase orgánica se extrajo y se lavó sucesivamente con agua destilada y salmuera, y se secó sobre MgSO₄. La solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, en acetato de etilo/hexano 1:1, R_f = 0.14).

10 Rendimiento: 1 g (25%)

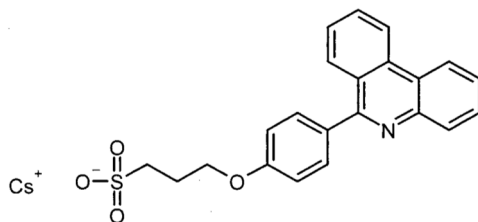
RMN:

15 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.59 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 8.23 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 7.84 (ddd, J = 8.3, 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.79 - 7.57 (m, 5H), 7.15 - 7.03 (m, 2H), 4.29 - 4.19 (m, 2H), 3.93-3.90 (m, 2H), 3.80 - 3.60 (m, 12H), 3.59 - 3.49 (m, 2H), 3.37 (s, 3H).

20 ¹³C{¹H} RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 160.92 (s), 159.45 (s), 143.84 (s), 133.59 (s), 131.26 (s), 130.61 (s), 130.26 (s), 129.05 (s), 128.90 (s), 127.19 (s), 126.85 (s), 125.39 (s), 123.70 (s), 122.29 (s), 122.01 (s), 114.68 (s), 72.02 (s), 70.97 (s), 70.74 (s), 70.72 (s), 70.69, 70.62 (s), 69.80 (s), 67.68 (s), 59.15 (s).

MS (+) JM358-F5, [M+H]⁺ calc = 462.2280, encontrado 462.2275

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



30 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), 7.97 (ddd, J = 8.3, 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.86 - 7.62 (m, 5H), 7.23 - 7.07 (m, 2H), 3.88 (s, 3H).

35 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.70 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.61 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.18 (dd, J = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 7.86 (ddd, J = 8.3, 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.81 - 7.56 (m, 5H), 7.18 - 7.02 (m, 2H), 3.92 (s, 3H).

40 ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 160.95 (s), 160.33 (s), 143.72 (s), 133.67 (s), 132.12 (s), 131.36 (s), 130.71 (s), 130.20 (s), 129.13 (s), 128.97 (s), 127.23 (s), 126.92 (s), 125.40 (s), 123.73 (s), 122.33 (s), 122.03 (s), 114.03 (s), 55.57 (s).

EM [ESI-MS (+)]: [M+H]⁺ encontrado 286,1231, calc. 286.1226

45 4-fenantridin-6-il-fenol: La desprotección de la 6-(4-metoxifenil)fenantridina se consiguió usando HBr. Se sometió a reflujo una suspensión de 6-(4-metoxifenil)fenantridina (1 g, 3.5 mmol) en 15 mL (HBr, 47%) a 100°C durante 12 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre agua helada y se neutralizó con Na₂CO₃. El precipitado resultante se separó por filtración y se lavó con agua y Et₂O. El sólido se purificó mediante columna de cromatografía utilizando diclorometano/MeOH. Rendimiento: 90%.

50 RMN: 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, 2H).

MS [ESI-MS (-)]: [M-H]⁻ encontrado 270.0922, calc. 270.0924

55 A una solución de 4-(fenantridina-6-il)fenol (320 mg, 1.18 mmol) en DMF (4 ml), Cs₂CO₃ (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 a 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).

5 MS [EI-MS (-)]: $[\text{M-Cs}^+]$ calc 392.0956. Encontrado 392.0962

Ejemplo 2

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

10

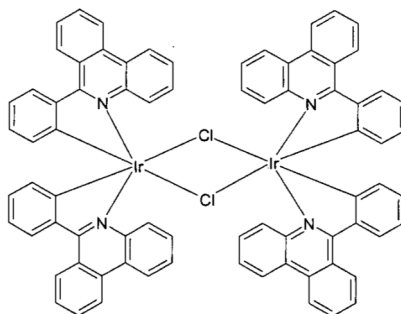
El procedimiento general fue publicado por Nonoyama, M., J. Organomet. Chem. 86 (1975) 263-267.

Los dímeros de iridio se sintetizaron como sigue: $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 2.5 equivalentes 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 separó por filtración y se lavó sucesivamente con metanol y Et_2O , se secó para proporcionar el dímero deseado.

15

Ejemplo 2.1

20 Complejo con fenilfenantridina no sustituida



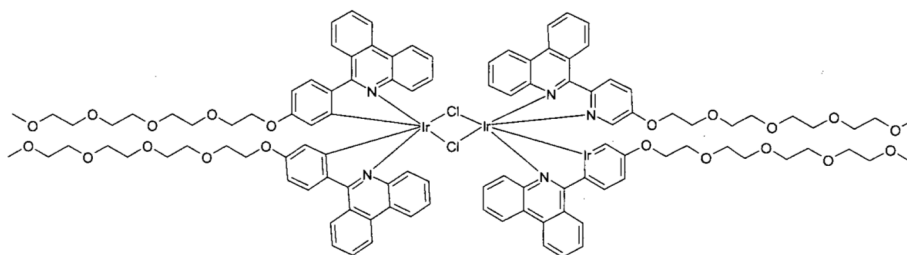
25 $[(6\text{-fenilfenantridina})_2\text{IrCl}]_2$.

25

Rendimiento: 71%. Sólido marrón. ^1H RMN (DMSO-d_6 , 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).

30 Ejemplo 2.2

Complejo con fenilfenantridina sustituida



35

Una mezcla de 6-[4-(2-(2-(2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-fenil]-fenantridina (1 g, 2.16 mmol), $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (346 mg, 0.98 mmol) en 16 ml de 2-EtOEtOH: H_2O (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 oleoso. 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 pardusco. El sólido se filtró y se lavó con agua (50 ml) y Et_2O (30 ml). El sólido marrón se disolvió en la menor cantidad de diclorometano y se precipitó tras la adición de Et_2O . Se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

40

Rendimiento: 550 mg (50%)

45

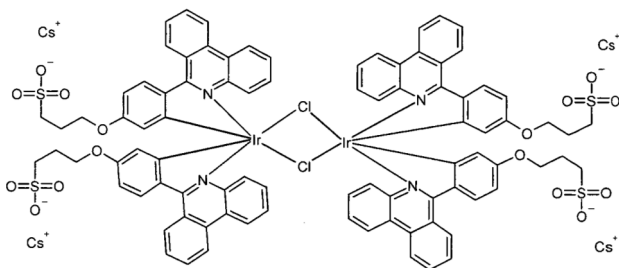
RMN:

5 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 8.36 (dd, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 8H), 7.90 (dd, $J = 14.7, 7.7$ Hz, 8H), 7.81 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.79 - 7.67 (m, 4H), 6.78 - 6.65 (m, 4H), 6.32 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 4H), 5.89-5.83 (m, 4H), 5.28 (d, $J = 2.5$ Hz, 4H), 3.67-3.10 (m, 100H, cadena PEG, contiene algunas impurezas)

MS(ESI-MS(+)):

10 $[\text{M}+2\text{Na}^+]^{2+}$ calc. 1171.3463, encontró 1171.3473; $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Ir}]^+$ = calc. 1113.3877, encontró 1113.3892

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



15 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 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 a sequedad. El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 MS [ESI-MS(-)]: $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{C}^{\wedge}\text{S}]^-$ calc 975.13858, encontró 975.13882

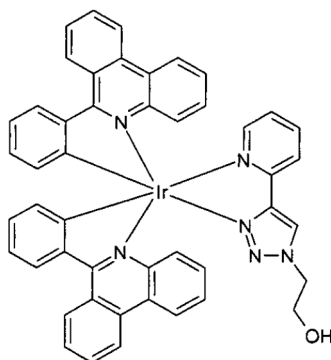
Ejemplo 3

25 Síntesis de complejos de iridio

Complejo a) (6-fenilfenantridina) $_2\text{Ir}$ (2-(4-piridin-2-il-[1,2,3] triazol-1-il)):

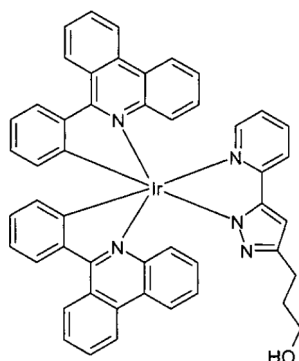
30 50 mg $[(6\text{-fenilfenantridina})_2\text{IrCl}]_2$, 16 mg de 2-(4-piridin-2-il-[1,2,3]triazol-1-il)-etanol, sintetizado como se describe en WO 2011/067401 A1 y 18 mg de Na_2CO_3 se mezclaron sobre 2-etoxietanol (02 ml) y se calentaron a 135°C durante 18 horas bajo atmósfera de gas inerte. A la mezcla enfriada se añadió agua destilada (20 ml), el producto bruto se extrajo luego con DCM, las fases orgánicas se secaron y el disolvente se evaporó a una solución de 5 ml. Se añadió éter etílico y el residuo se separó por filtración y se lavó con una solución de éter:metanol al 2%. La disolución en DCM y la precipitación con hexano produjeron 32 mg de un polvo rojo.

35 (Basado en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711)



40 Rendimiento: 68%. Sólido rojo. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.95-3.97 (m, 2H), 4.53-4.55 (m, 2H), 6.77-6.93 (m, 4H), 7.03-7.30 (m, 5H), 7.37-7.66 (m, 4H), 7.82-7.95 (m, 5H), 8.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.34 (t, $J = 7.8, 14.4$ Hz, 3H), 8.46 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.56 (t, $J = 7.6, 14.2$ Hz, 2H), 9.07 (dd, $J = 8.2, 16.0$ Hz, 2H), 9.46 (s, 1H).

b) (6-fenilfenantridina) $_2\text{Ir}$ (3-(5-piridin-2-il-1H-pirazol-3-il)-propan-1-ol):



El compuesto se sintetizó en las condiciones descritas en el Ejemplo 3 a)

5 Rendimiento: 71%. Sólido rojo. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.47-1.49 (m, 2H), 2.35-2.49 (m, 2H), 3.30-3.35 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 6.71-6.74 (m, 3H), 6.81-6.99 (m, 3H), 7.07-7.31 (m, 6H), 7.37-7.41 (m, 1H), 7.73-7.85 (m, 5H), 8.25-8.35 (m, 5H), 8.45-8.54 (m, 3H), 9.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 9.29-9.32 (m, 1H).

Ejemplo 4

10

Síntesis de un polimarcador de iridio

Alaninil- β -alaninil- β -alaninil- β -alaninil-glutaminil- β -alaninil-azidohomoalaninil- β -alaninilglutaminil- β -alaninil-azidohomoalaninil- β -alaninil- β -alanina o $\text{NH}_2\text{-UUZUEUZUEZUU-OH}$ (F)

15

El compuesto (F) se prepara mediante síntesis de péptidos en fase Fmoc-(fluorenilmetoxicarbonil) sólida en un sintetizador de múltiples péptidos SYRO II de Multisynthec en varios recipientes de reacción de 15 mg de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi-resina de Novabiochem/Merck con una carga de 0.5 mmol/g. Para cada posición con Y en la secuencia de aminoácidos N-Fmoc-azidohomoalanina (Azido-Abu está Fmoc-prottegido por métodos de la técnica) (Bachem), para cada posición con U Fmoc- β -alanina y para cada posición con E el ácido Fmoc-glutámico (tert-butiléster) se acopla al péptido en crecimiento inmovilizado sobre la resina de síntesis. De cada aminoácido N-Fmoc se añaden 90 μmol dos veces disolviéndolo junto con 100 μmol de 1-hidroxibenzotriazol en 270 μl de dimetilformamida, añadiendo después 100 μmol de N,N-diisopropilcarbodiimida como reactivo de acoplamiento y dispersando luego la resina en esta solución en los recipientes de reacción del sintetizador de péptidos. Cada paso de acoplamiento dura 1 hora. La escisión del grupo Fmoc temporal después de cada etapa de acoplamiento se realiza con una solución al 50% de piperidina en dimetilformamida durante 20 minutos. Después de cada etapa de reacción se lleva a cabo una etapa de lavado con dimetilformamida. La escisión del péptido finalizado (F) de la resina y la escisión de los grupos protectores permanentes de tert-butiléster tras la síntesis se realiza mediante una mezcla de ácido trifluoroacético al 95% y etanoditol al 5% durante 2 horas. Después de filtrar las perlas de resina, el producto se precipita añadiendo diisopropiléter frío, el precipitado se aísla por filtración, se redisuelve en ácido acético y se seca por liofilización. El material bruto resultante se purifica mediante HPLC en fase reversa hasta al menos un 95% de material puro. La caracterización se realiza mediante HPLC analítica de fase reversa y ESI-MS.

20

25

30

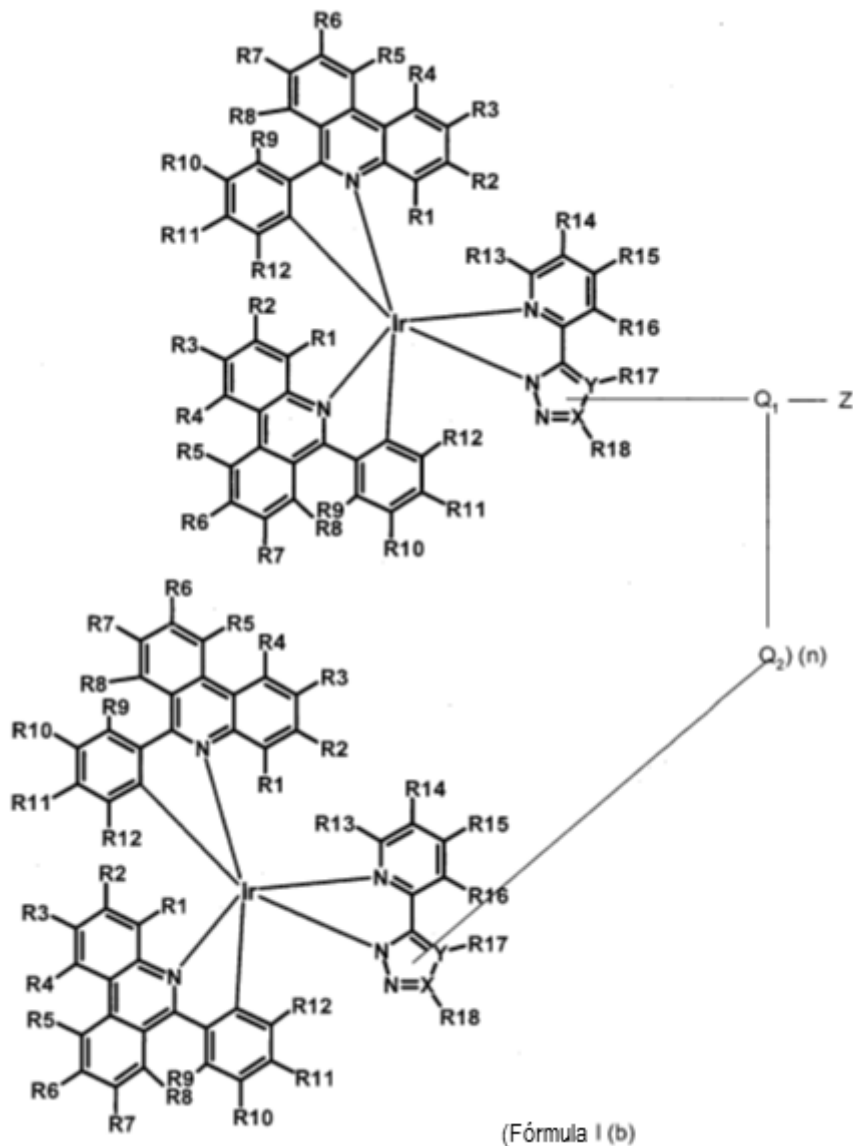
35

40

Los derivados de 2-(1H-[1,2,3]triazol-4-il)-piridina del enlazante Q se pueden sintetizar por "Click-chemistry" como una cicloadición de Huisgen catalizada con cobre como se describe para la síntesis de 2-(4-piridin-2-il-1,2,3] triazol-1-il)- etanol en el documento WO 2011/067401 A1. En un paso siguiente, un dímero complejo de iridio como se ha descrito anteriormente se hace reaccionar adicionalmente en exceso molar con el enlazante que contiene 2-(1H-[1,2,3]triazol-4-il)-piridina en DMF, a 80°C bajo nitrógeno durante la noche. El derivado de enlazante de iridio puede purificarse por cromatografía en fase reversa y el producto se caracteriza por HPLC-ESI MS.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de fórmula II y fórmula I (a)



5

en la que en la Fórmula I (a) y en la Fórmula I (b), respectivamente e independientemente, cada R1-R18 independientemente es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxi, 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o R19, en los que R19 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, aminiariloxi, aminiariloxi sustituido,

10

15

en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, como amino, amino sustituido, alquilamino, alquilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, carboxilato, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxi, 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, hidroxifosfinilo, hidroxialquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato o,

20

- 5 en la que en R1-R12, y/o en R13-R16, y/o con R17 y R18, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en la que el sustituyente se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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, hidroxilalquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato,
- 10 en la que, 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 hidrófilo 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, hidroxilalquilfosfinoilo, fosfonato, fosfinato, en la
- 15 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 heteroalquilo con la longitud de 1-20 átomos que comprende 1-4 heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S, en donde 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,
- 20 en la que X representa C o N,
 en la que Y representa C o N,
 en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (a) es -Q1-Z y en donde Q1 es un enlazante,
- 25 en la que al menos uno de R13-R18 en la Fórmula I (b) es Q2, y cada Q2 independientemente es un enlazante o un enlace covalente,
 en la que (n) es un número entero de 1 a 50,
- 30 y en la que Z es un grupo funcional.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el enlazante Q1 tiene como esqueleto una cadena alquilo C1-C200 lineal o ramificada, saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos
- 35 constituida por átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P, S sustituidos o una cadena como se describió anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el enlazante Q1 tiene como cadena principal una
- 40 cadena alquilo C1-C100 lineal o ramificada, saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, 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 conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 45 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el enlazante Q1 tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C50 lineal o ramificada, saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, 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 conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 50 5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el enlazante Q1 tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C20 lineal o ramificada, saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos, consistente de 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 conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.
- 55 6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C200 lineal o ramificada, saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 200 átomos que contiene átomos de
- 60 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 ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos, en los que Q2 está presente (n) veces y en donde (n) es un número entero de 1-50.
- 65 7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que cada Q2 es independientemente un enlace covalente o un enlazante que tiene como cadena principal una cadena alquilo C1-C20 lineal o ramificada

saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, o una cadena de 1 a 20 átomos que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados de O, N, P y S o átomos de N, P o S sustituidos, o una cadena como se ha descrito anteriormente conteniendo la cadena principal uno o más sistemas de anillo cíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos.

5 8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que Q2 es independientemente un enlace covalente o tiene como cadena principal una cadena de alquilo C1-C12 saturada y/o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consiste en átomos de carbono, átomos de carbono sustituidos y/o uno o más átomos seleccionados entre O, N, P y S, o átomos de N, P o S sustituidos.

10 9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la 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 fosforamidita.

15 10. Un conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y unido covalentemente a éste un agente de unión por afinidad.

20 11. El conjugado de la reivindicación 10, en la que el agente de unión de afinidad se selecciona del grupo que consiste en antígeno y anticuerpo, biotina o análogo de biotina y avidina o estreptavidina, azúcar y lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario y receptor y ligando.

25 12. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que dicho agente de unión por afinidad es un ácido nucleico o un anticuerpo.

30 13. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para realizar una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa.

35 14. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en un método de detección basado en electroquimioluminiscencia.

15. Un método para medir un analito por un método *in vitro*, comprendiendo el método las etapas de

35 a) proporcionar una muestra sospechosa o conocida por comprender el analito,

b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo conjugado de analito, y

40 c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener así una medida del analito.