

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 816**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2012 PCT/EP2012/051997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012 E 12702046 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2673283**

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

30 Prioridad:

09.02.2011 EP 11153912

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

30.11.2017

73 Titular/es:

**HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CYSEWSKI, ROBERT;
DE COLA, LUISA;
FERNANDEZ HERNANDEZ, JESUS MIGUEL;
JOSEL, HANS-PETER;
LOPEZ-CALLE, ELOISA y
ZARNT, TORALF**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 644 816 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos complejos basados en iridio para ECL

5 **Antecedentes de la invención**

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

10 La quimioluminiscencia electrogenerada (también llamada electroquimioluminiscencia y abreviada como ECL) es el procedimiento mediante 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 aproximadamente 40 años de estudio, la ECL se ha convertido en una técnica analítica muy potente y es ampliamente utilizada en las áreas de, por ejemplo, inmunoensayo, pruebas de alimentos y agua y detección de agentes de guerra biológica.

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

En general, los procedimientos 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 conseguidas en las últimas décadas, todavía existe una tremenda necesidad de ensayos de diagnóstico *in vitro* más sensibles basados en electroquimioluminiscencia.

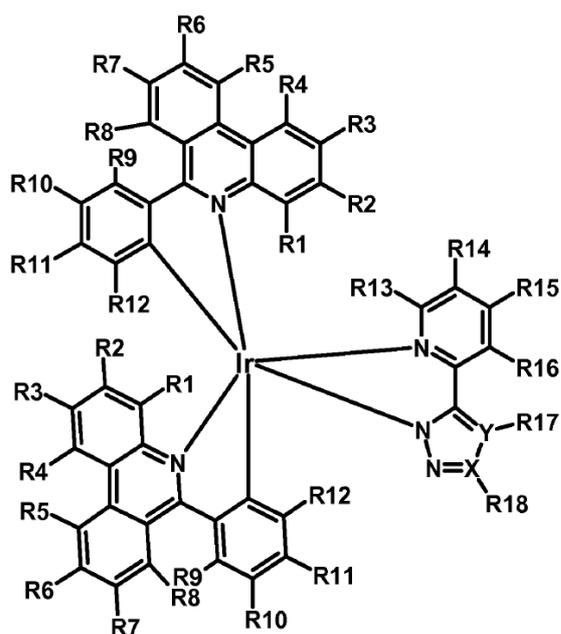
30 El documento WO 2005/118606 divulga complejos de Ir que comprenden fenil-piridina sustituida con flúor como un ligando.

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

35 **Resumen de la invención**

La presente invención divulga un compuesto luminiscente o electroquimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I

40



en la que R1-R12 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo o R19, en el que R19 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido,

alquilarilo, alquilarilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

en la que R13-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, -Q-Y o R19, en el que R19 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo

5 sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

en la que R17-R18 representa hidrógeno, alquilo, arilo y alquilo sustituidos, sistema de anillo heteroaromático, anillo o sistema de anillo no aromático, imidazolio, ciclodextrina o -Q-Y, o

10 en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, o

en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

15 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 es -Q-Y,

en la que Q representa un enlazador e Y es un grupo funcional y,

20 en la que dicho grupo funcional Y se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquino, azida y fosoramidita.

La presente invención también divulga un conjugado que comprende el compuesto anterior y se une covalentemente a un agente de unión por afinidad.

25 La presente invención se refiere además al uso de un compuesto o de un conjugado como se divulga 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.

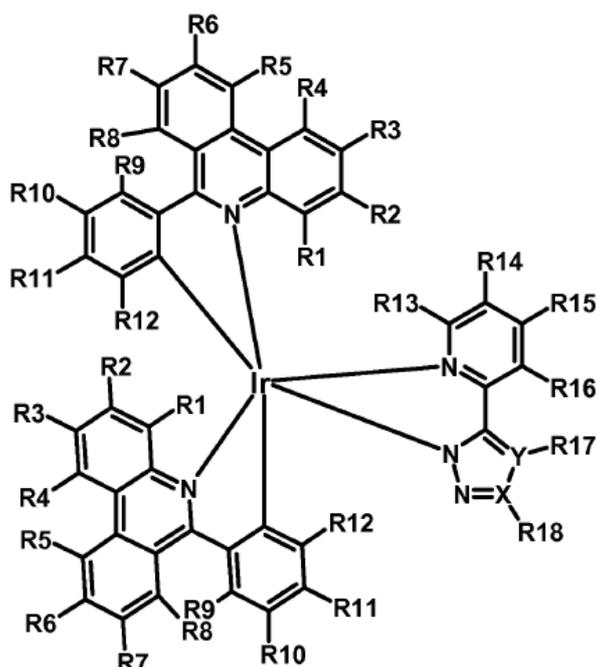
30 Además la presente invención divulga un procedimiento para medir un analito mediante un procedimiento *in vitro*, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) proporcionar una muestra que se sospecha o se conoce que comprende el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con la presente invención en 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.

35

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto luminiscente o electroquimioluminiscente basado en iridio de

40



5 en la que R1-R12 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, o R19, en el 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, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, en la que R13-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, -Q-Y, o R19, en el 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, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, en la que R17-R18 representa hidrógeno, alquilo, arilo, arilo y alquilo sustituidos, sistema de anillo heteroaromático, anillo o sistema de anillo no aromático, imidazolio, ciclodextrina, o -Q-Y, en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo aromático o un anillo aromático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, 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 es -Q-Y, en la que Q representa un enlazador e Y es un grupo funcional y en la que dicho grupo funcional Y se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida y fosforamida.

20 En un modo de realización, al menos uno de R17 o R18 es -Q-Y.

En un modo de realización, uno de R13 a R18 es ciclodextrina. Preferentemente, esa ciclodextrina es una beta-ciclodextrina. También se prefiere que la ciclodextrina sea permitilada.

25 En un modo de realización al menos uno de R1 a R16 del compuesto de acuerdo con la Fórmula I está sustituido por al menos un grupo hidrófilo.

30 Los grupos hidrófilos preferentes son amino, alquilamino con alquilo significando una cadena lineal tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o una cadena alquilo ramificada tal como isopropilo, isobutilo, *terc*-butilo, preferentemente 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 hidrófilo adicional tal como hidroxilo o sulfo, preferentemente este alquilamino sustituido contiene dos residuos hidroxipropilo o hidroxietilo, arilamino, en el que arilo se refiere a un residuo aromático tal como fenilo o naftilo, preferentemente fenilo, arilamino sustituido con arilo siendo como se ha definido anteriormente y un residuo adicional formado por un grupo hidrófilo, alquilamonio con alquilo siendo como se ha definido anteriormente y, preferentemente siendo un residuo de trimetilamonio o trietilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, éster de ácido carboxílico, preferentemente un éster de alquilo tal como éster de metilo o etilo, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido con alquilo y alquilo sustituido siendo como se ha definido anteriormente o ariloxi o ariloxi sustituido con arilo y arilo sustituido siendo como se ha definido anteriormente, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonamida, sulfóxido, sulfodióxido, fosfonato, fosfinato.

35 Preferentemente, dicho grupo hidrófilo se selecciona entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfonamida, sulfóxido, sulfodióxido y fosfonato, cuando sea aplicable, cada uno preferentemente como se ha definido en el párrafo anterior.

45 En un modo de realización, el grupo hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en un amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, éster de ácido carboxílico, carbamoilo, hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido, sulfanilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfo, sulfino, sulfeno, sulfonamida, sulfóxido, sulfodióxido, fosfonato, fosfinato.

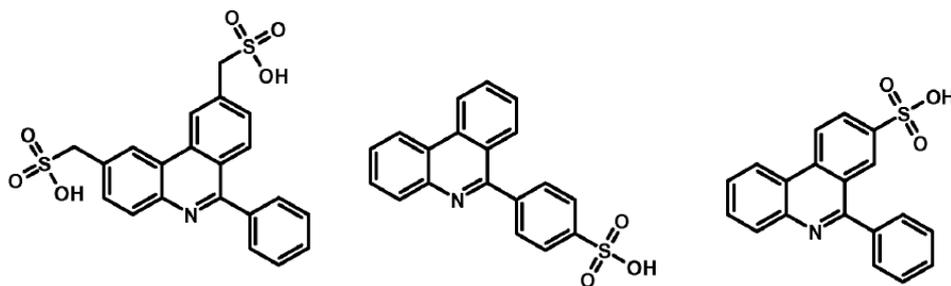
50 En un modo de realización, los sustituyentes preferentes para alquiloxi sustituido son cadenas de etilenoxi que comprenden 1-40 unidades de etilenoxi, o que comprenden 1-20 unidades de etilenoxi o que comprenden 1-10 unidades de etilenoxi.

55 En un modo de realización adicional, el grupo hidrófilo se selecciona entre sulfo, sulfonamida o sulfodióxido.

En un modo de realización, al menos uno de los grupos R1 a R12 de Fórmula I es un grupo sulfo.

60 En un modo de realización, al menos uno de R1 a R12 de los residuos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I está sustituido por al menos un grupo hidrófilo.

En un modo de realización, los residuos de fenilfenantridina comprendidos en la Fórmula I se seleccionan entre las fenilfenantridinas sustituidas que se proporcionan a continuación.



5 En el compuesto de acuerdo con la presente invención, el enlazador Q tiene preferiblemente una longitud de cadena principal de entre 1 y 20 átomos. En otras palabras, la conexión más corta entre el anillo de piridilo de Fórmula I y el grupo funcional Y consiste en de 1 a 20 átomos. En un modo de realización, el enlazador Q en el complejo electroquimioluminiscente de la presente invención es una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida, sustituida, lineal o ramificada, o una cadena de 1 a 20 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

10 En un modo de realización, el enlazador Q en un compuesto de acuerdo con la presente invención es una cadena alquilo C1-C12 saturada o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

15 En un modo de realización, el grupo funcional Y comprendido en el complejo basado en iridio 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 y fosoramidita.

20 Un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I tal como se divulga y define en el presente documento y unido covalentemente a 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.

25 En un modo de realización, la sustancia biológica de un conjugado de acuerdo con la presente invención, es decir, unida covalentemente a un compuesto de acuerdo con la Fórmula I es un agente de unión por afinidad. Como apreciará el experto en la técnica, en un conjugado de acuerdo con la presente invención, el grupo funcional Y del compuesto de acuerdo con la Fórmula I se ha utilizado para formar un enlace covalente con un grupo sobre el agente de unión por afinidad. En el caso de que un reactivo de unión por afinidad no contenga en sí mismo un grupo apropiado para unirse o reaccionar con el grupo Y, dicho grupo se puede introducir fácilmente en el agente de unión por afinidad basándose en procedimientos bien establecidos.

35 Sin desear mayor limitación, pero en aras de la claridad, el agente de unión por afinidad puede comprender cualquiera de los siguientes; un antígeno, una proteína, un anticuerpo, biotina o análogo de biotina y avidina o estreptavidina, azúcar y lectina, una enzima, un polipéptido, un grupo amino, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico y un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista de receptor, un antagonista de receptor o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el agente de unión por afinidad puede ser un socio de un par de unión específica, en el que el otro socio de dicho par de unión está asociado con o es la diana sobre una superficie celular o una estructura intracelular.

Preferentemente, un agente de unión por afinidad es un socio o miembro de un par de unión por afinidad o, como también se denomina por el experto en la técnica, un socio o miembro de un par de unión específica.

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

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

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

En un modo de realización, el conjugado de acuerdo con la presente invención comprende unirse covalentemente un compuesto de acuerdo con la Fórmula I como se divulga y define anteriormente en el presente documento y un agente de unión por afinidad que es un oligonucleótido o un anticuerpo.

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

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

15 El término oligonucleótido se debe entender de forma amplia e incluye ADN y ARN así como análogos y modificación de los mismos.

20 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 dichas nucleobases sustituidas son: pirimidinas 5-sustituidas como 5-metil-dC, aminoalil-dU o -dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o -dC, dU o -dC 5-halogenada; pirimidinas N-sustituidas como N4-etil-dC; purinas N-sustituidas como N6-etil-dA, N2-etil-dG; purinas 8-sustituidas como 8-[6-amino]-hex-1-il]-8-amino-dG o -dA, dA o dG 8-halogenada, 8-alkil-dG o -dA; y dA 2-sustituida como 2-amino-dA.

25 Un análogo de ácido nucleico puede contener un nucleótido o un análogo de nucleósido. Es decir, las nucleobases naturales se pueden intercambiar utilizando análogos de nucleobases como 5-nitroindol-d-ribósido; 3-nitro-pirrol-d-ribósido, desoxiinosina (dI), deoxiantosina (dX); 7-desaza-dG, -dA, -dI o -dX; 7-desaza-8-aza-dG, -dA, -dI o -dX; 8-aza-dA, -dG, -dI o -dX; d-formicina; pseudo-dU; pseudo-iso-dC; 4-tio-dT; 6-tio-dG; 2-tio-dT; iso-dG; 5-metil-iso-dC; 8-aza-7-desaza-dA unido por N8; 5,6-dihidro-5-aza-dC; y eteno-dA o piolo-dC. Como es obvio para el experto en la técnica, la nucleobase en la hebra complementaria se tiene que seleccionar de tal manera que la formación de dúplex sea específica. Si, por ejemplo, se usa 5-metil-iso-dC en una hebra (por ejemplo (a)), la iso-dG tiene que estar en la hebra complementaria (por ejemplo (a')).

35 En un análogo de ácido nucleico, el esqueleto del oligonucleótido se puede modificar para contener residuos de azúcares sustituidos, análogos de azúcar, modificaciones en el resto 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).

40 Los análogos de azúcar son por ejemplo xilosa; ribosa con un puente 2',4' como (2'-O,4'-C- metileno) (oligómero conocido como LNA) o (2'-O,4'-C-etileno) (oligómero conocido como ENA); L-ribosa, L-d-ribosa, hexitol (oligómero conocido como HNA); ciclohexenilo (oligómero conocido como CeNA); altritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclica en el que los átomos C3' y C5' están conectados por un puente de etileno que se fusiona con un anillo de ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN); glicerina (oligómero conocido como GNA); glucopiranososa (oligómero conocido como ADN homo); carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de una subunidad de tetrahidrofurano); hidroximetilmorfolina (oligómeros conocidos como ADN morfolino).

50 También se sabe que un gran número de modificaciones del resto fosfato internucleósido interfieren con las propiedades de hibridación y dichas modificaciones de la cadena principal también se pueden combinar con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótidos. Ejemplos son oligonucleótidos de fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato y metilfosfonato.

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

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

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

65 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un

- 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el procedimiento de Lowry y, en algunos modos de realización hasta más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de cubilete giratorio o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que 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 se puede designar como "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede designar como "VL". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.
- El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de las 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 y Mol. Immunology, 4^a 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 de otras proteínas o péptidos.
- Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se definen a continuación. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.
- Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo 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 anticuerpo.
- La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada y cercana asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden unir covalentemente un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada mediante un enlazador peptídico flexible, de tal manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura “dimérica” análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VF. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena 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 terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan 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 monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios de VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios de VH y VL, que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., editorial Springer, Nueva York (1994), páginas 269-315.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 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 triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa 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 que se producen de forma natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertos modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único entre una pluralidad de clones, como un grupo de clones del hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

Como se ha mencionado, los compuestos y conjugados divulgados en la presente invención tienen propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados divulgados, 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 muchos, muchos marcadores ECL que sólo han mostrado una alta eficiencia ECL cuando se analizan en un disolvente orgánico. Por ejemplo, muchos colorantes OLED se analizan habitualmente en acetonitrilo y, o no son solubles en una solución acuosa o, si son solubles, no muestran electroquimioluminiscencia eficiente en una solución acuosa.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado,

respectivamente, como se divulga en la presente invención para llevar a cabo una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa. Una solución acuosa es cualquier solución que comprende al menos un 90 % de agua (en peso/peso). Obviamente, dicha solución acuosa puede contener además ingredientes como compuestos tampón, detergentes y, por ejemplo, aminas terciarias como tripropilamina como donante de electrones en la reacción de ECL.

En un modo de realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como se divulga en la presente invención en un procedimiento de detección basado en electroquimioluminiscencia.

En un modo de realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto o de un conjugado, respectivamente, como se divulga 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 se puede seleccionar del grupo que consiste en un polipéptido, un carbohidrato y una molécula de fármaco inorgánico u orgánico.

Un polipéptido o proteína es una molécula que está esencialmente compuesta de aminoácidos y que tiene al menos dos aminoácidos unidos por enlace peptídico. En el caso de que el analito de interés que se va a investigar en un procedimiento descrito en el presente documento, el polipéptido constará preferentemente de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25 y 30 hasta aproximadamente 10 000 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido contendrá de 5 a 2000, también preferentemente de 10 a 1000 aminoácidos.

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

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

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

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo 1:

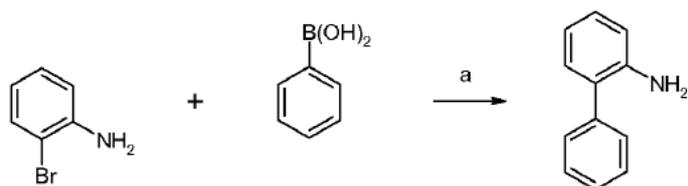
Síntesis de fenil-fenantridinas sustituidas

Ejemplo 1.1:

Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

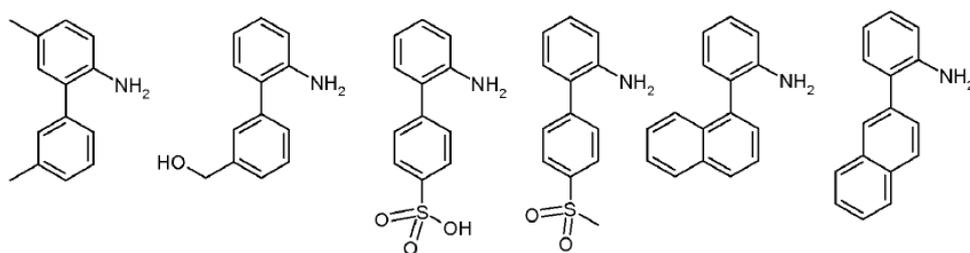
Con la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura, tal como se describe por Youn, S.W., en *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 4598-4601, entre derivados de 2-bromoanilina comercialmente disponibles y el correspondiente ácido arilborónico se pueden sintetizar los 2-aminobifenilos apropiados, que se requieren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

Procedimiento típico:



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

5 Ejemplos:



Ejemplo 1.2:

10

Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

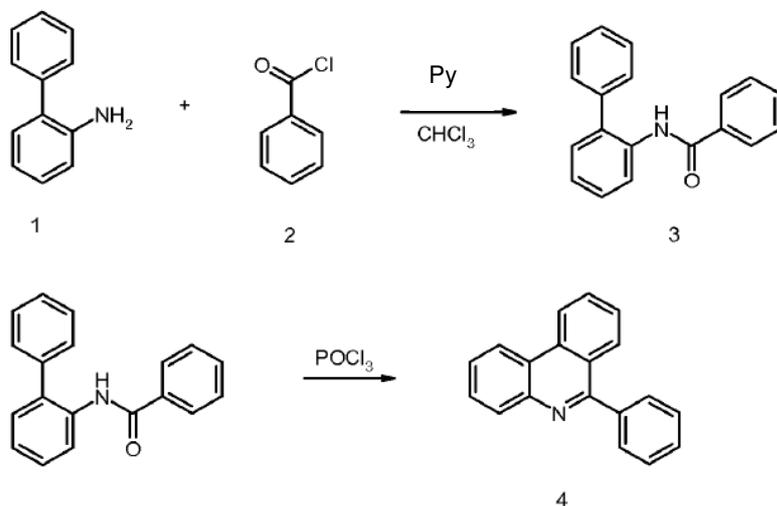
15

A la solución enfriada con hielo de 2-arilanilina **1** (0,01 mol) en cloroformo (20 ml) se añadió cloruro de ácido arílico **2** (0,01 mol) y se agitó en condiciones inertes durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió 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. Se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se lavó bien con HCl 0,5 M, se seca sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice, hexano/acetato de etilo 3:2 para dar el producto **3** puro con un rendimiento de un 66 %.

20

Se sometieron a reflujo benzamido-2-bifenilo **3** (0,01 mol) y POCl_3 (5 ml) en 20 ml de tolueno y la mezcla se agitó 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 CH_2Cl_2 (30 ml) y se vertió sobre hielo, se lavó con NH_4OH al 25 % y agua destilada. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío, seguido de cromatografía flash (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 1:1) para dar el producto **4** 6-fenilfenantridina.

25



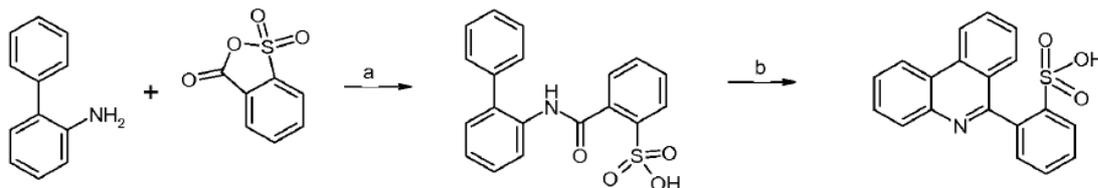
Rendimiento: 52 %. Sólido blanco. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,54-7,85 (m, 9H), 8,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,28 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,67 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)

Ejemplo 1.3:

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

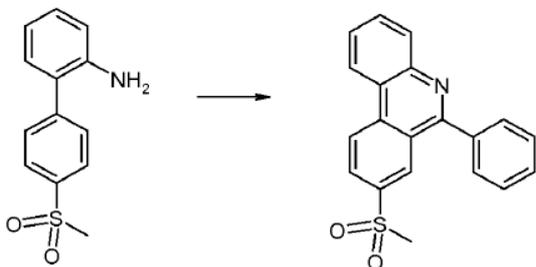
5 La 6-(2-sulfofenil)-fenantridina se puede sintetizar por calentamiento suave de arilanilina (0,01 mol) con anhídrido cíclico del ácido 2-sulfobenzóico (0,01 mol) en CH₃CN durante 6 horas utilizando el procedimiento como describe por Nicolai, E., en Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1617-1630.

10 Después de la purificación, el producto se puede convertir en la fenantridina apropiada basándose en el procedimiento descrito en el ejemplo 1.2.

**Ejemplo 1.4:****Procedimiento para la síntesis de 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina:**

15 La 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina se puede sintetizar por calentamiento suave alquilsulfonil-arilanilina (0,01 mol) con cloruro de benzoilo (0,01 mol) en cloroformo usando el procedimiento descrito por Lion, C., en Bull. Soc. Chim. Belg. 98 (1989) 557-566, véase el ejemplo 2.

20 Después de la purificación, el producto se puede convertir en la fenantridina apropiada basándose en el procedimiento descrito en el ejemplo 1.2.



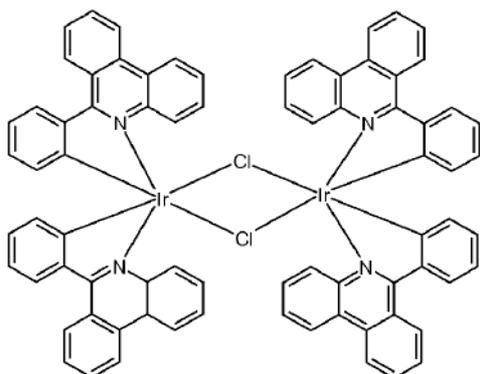
25 La 6-(4-metilsulfofenil)fenantridina se puede preparar también siguiendo el procedimiento descrito por Cymerman, J., en J. Chem. Soc. (1949) 703-707.

Ejemplo 2:**Procedimiento general para la síntesis del complejo dimérico reticulado con cloro:**

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

35 Los dímeros de iridio se sintetizaron como sigue: IrCl₃ • 3H₂O y 2,5 equiv de 6-fenilfenantridina se calentaron a 120 °C durante 18 h bajo nitrógeno en una mezcla 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 Et₂O, se secó para dar el dímero deseado.

Ejemplo:



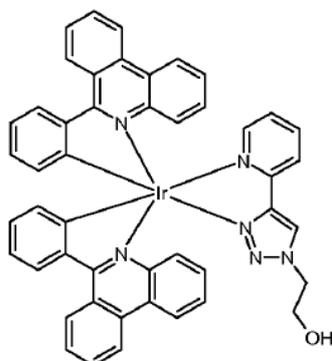
5 [(6-fenilfenantridina)₂IrCl]₂. Rendimiento: 71 %. Marrón sólido. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 6,45 (d, J = 6,8, 4H), 6,58 (t, J = 7,1, 13,9 Hz, 4H), 6,95 (t, J = 7,1, 14,2 Hz, 4H), 7,56 (t, J = 7,4, 16,0 Hz, 4H), 7,68 (t, J = 8,1, 16,2 Hz, 4H), 7,93 (t, J = 8,0, 14,6 Hz, 4H), 8,07-8,13 (m, 8H), 8,80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

Ejemplo 3:

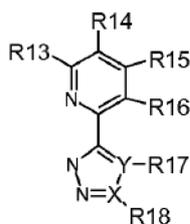
Procedimiento general para la síntesis de complejos de iridio

10 Se mezclaron un complejo dimérico reticulado con cloro (0,5 mmol), picolinato (1,25 mmol) y Na₂CO₃ (3 mmol) en 2-etoxietanol (12 ml) y la mezcla se calentó a 120 °C durante 15 horas. A la mezcla enfriada se añadió agua destilada (25 ml), el producto bruto se separó luego por filtración y se lavó con agua, seguido de porciones de n-hexano y Et₂O. El producto se purificó por cromatografía en columna (sílice, n-hexano/diclorometano) para dar un polvo rojo.

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



20 Ir(6-fenilfenantridina)₂ C₉H₁₀N₄O. Rendimiento: 68 %. Sólido rojo. ¹H-RMN (CDCl₃, 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).

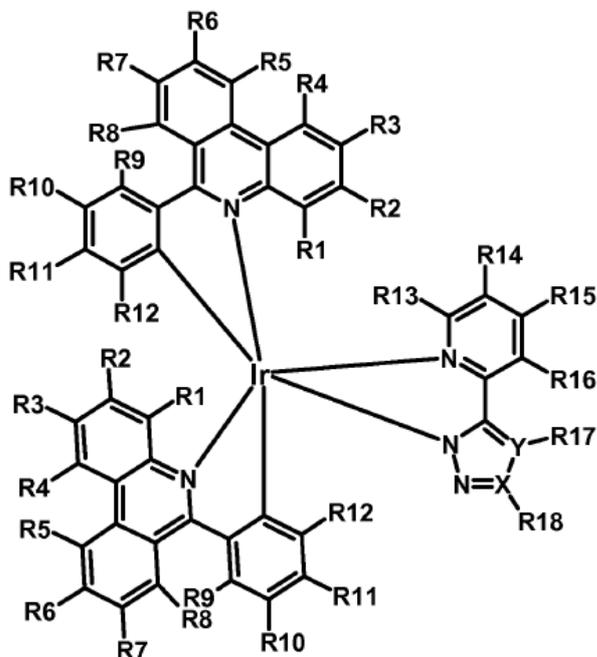


25 Ir(6-fenilfenantridina)₂ C₁₁H₁₃N₃O. Rendimiento: 71 %. Sólido rojo. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,47-1,49 (m, 2H), 2,35-2,49 (m, 2H), 3,30-3,35 (m, 2H), 5,76 (s, 1H), 6,71-6,74 (m, 3H), 6,81-6,99 (m, 3H), 7,07-7,31 (m, 6H), 7,37-7,41 (m, 1H), 7,73-7,85 (m, 5H), 8,25-8,35 (m, 5H), 8,45-8,54 (m, 3H), 9,09 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 9,29-9,32 (m, 1H).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto luminiscente o electroquimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I

5



en la que R1-R12 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo o R19, en el 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, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

10

en la que R13-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo, -Q-Y o R19, en el 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, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

15

en la que R17-R18 representa hidrógeno, alquilo, arilo, arilo y alquilo sustituidos, sistema de anillo heteroaromático, anillo o sistema de anillo no aromático, imidazolio, ciclodextrina o Q-Y, o

20

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

25

en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, dos R adyacentes pueden formar un anillo alifático o un anillo alifático sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo,

30

en la que X representa C o N,

35

en la que Y representa C o N,

en la que al menos uno de R13-R18 es -Q-Y,

en la que Q representa un enlazador e Y es un grupo funcional y,

en el que dicho grupo funcional Y se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida y fosoramidita.

40

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador Q es una cadena alquilo C1-C20 saturada, insaturada, no sustituida o sustituida, lineal o ramificada o una cadena de 1 a 20 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

35

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador Q es una cadena alquilo C1-C12 saturada o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

40

4. Un conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y unido covalentemente a un agente de unión por afinidad.

5. El conjugado de la reivindicación 4, en el que el agente de unión por 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.

5 6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicho agente de unión por afinidad es un ácido nucleico o un anticuerpo.

10 7. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para realizar una reacción de electroquimioluminiscencia en una solución acuosa.

10 8. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en un procedimiento de detección basado en electroquimioluminiscencia.

15 9. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en la detección de un analito.

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

- 20 a) proporcionar una muestra que se sospecha o se conoce que comprende el analito,
b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de conjugado de analito,
c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de este modo una medida del analito.