

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 765**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 21/76 (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/EP2012/051996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012 E 12702549 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2673284**

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

30 Prioridad:

09.02.2011 EP 11153913

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

07.12.2017

73 Titular/es:

**F. 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 2 645 765 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 novedosos 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 que 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 los describieron 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, análisis de alimentos y de aguas y detección de armas biológicas.

20 Existe un número tremendo de compuestos que parecen ser de interés para su uso en dispositivos orgánicos emisores de luz (OLED). Estos compuestos son adecuados para su uso en materiales sólidos o se pueden disolver en líquidos 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.

25 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 ion metálico.

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.

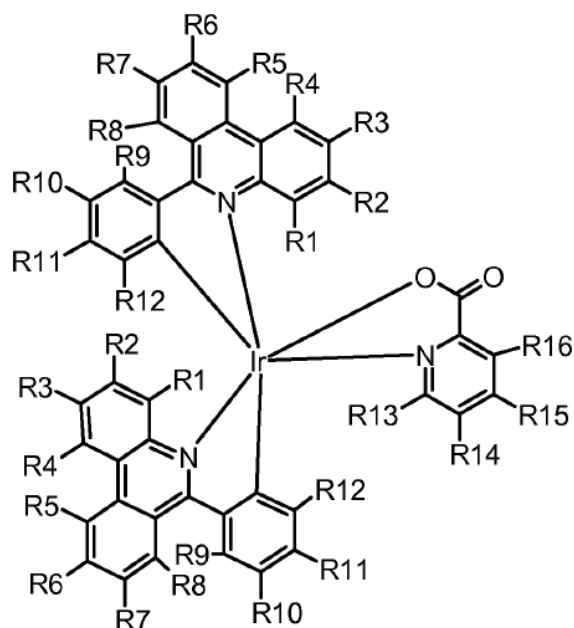
30 El documento JP 2007 169474 A divulga ciertos complejos electroquimioluminiscentes basados en Ir. Estos complejos de Ir se utilizan en la fabricación de un material polimérico emisor de luz.

Véase también el documento WO2005/118606.

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

Resumen de la invención

40 La presente invención divulga un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I



5 en la que R1-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, 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 o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo como amino, alquilamino, alquilamino 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 o,

15 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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 o,

20 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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 y,

25 en el que al menos uno de R13-R16 es -Q-Y, en el que Q representa un conector e Y es un grupo funcional.

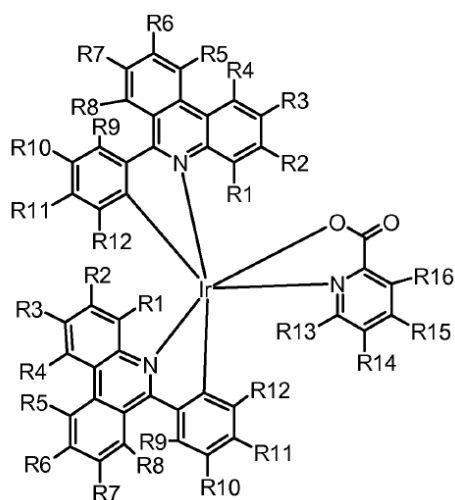
30 La presente invención también divulga un conjugado que comprende el compuesto anterior y, unido covalentemente al mismo, un agente de unión por afinidad.

35 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.

40 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 sabe que comprende el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo con la presente invención en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de conjugado de analito y (c) medir el complejo formado en la etapa (b) y obtener de este modo una medida del analito.

Descripción detallada de la invención

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



en la que R1-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino,

5 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 o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo como amino, alquilamino, alquilamino 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 o, en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, 10 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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 o, en la que en R1-R12 y/o en R13-R16, respectivamente, 15 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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 y en el que al menos uno de R13-R16 es -Q-Y, en el que Q 20 representa un conector e Y es un grupo funcional.

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.

25 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.

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, 35 alquilamonio con alquilo siendo como se ha definido anteriormente y, preferentemente siendo un residuo 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, sulfóxido, sulfodióxido, fosfonato, fosfinato. 40

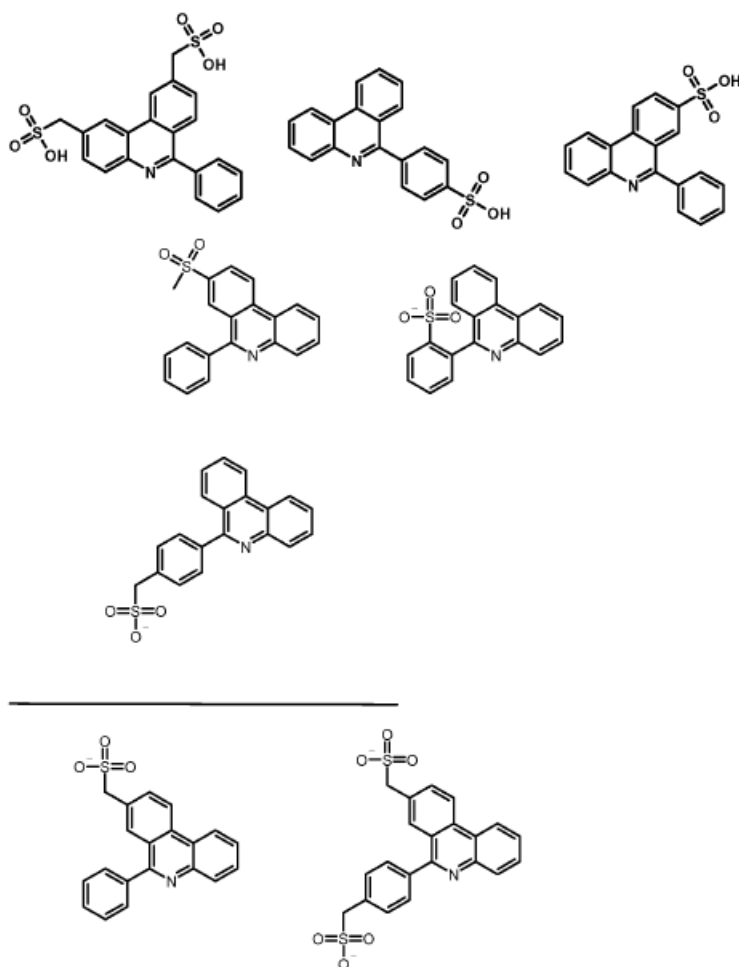
45 Preferentemente, dicho grupo hidrófilo se selecciona entre amino, alquilamino, alquilamino sustituido, arilamino, arilamino sustituido, alquilamonio, alquilamonio sustituido, carboxi, hidroxilo, sulfo, sulfeno, sulfonamida, sulfóxido, sulfodióxido y fosfonato, cuando sea aplicable, cada uno preferentemente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

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

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

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.

55 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.



- En el compuesto de acuerdo con la presente invención, el conector Q tiene preferentemente 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 conector Q 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 de fenileno representa una longitud de cuatro átomos de carbono), 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, 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 que comprende al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos). En un modo de realización, el conector Q en un compuesto de acuerdo con la presente invención es una cadena alquilo C1-C12 saturada, o una cadena arilalquilo C1-C12, o una cadena de 1 a 12 átomos con una cadena principal que consta de átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S, 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 que comprende al menos un grupo arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido (en el que, por ejemplo, un anillo de fenileno representa una longitud de cuatro átomos).
- En 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, alquililo, azida y fosforamidita.
- Un conjugado que comprende un compuesto electroquimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I como se divulga y se 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, glucoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.
- 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.

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 un análogo de ácido nucleico y un ácido nucleico complementario, un nucleótido, un polinucleótido, un ácido nucleico peptídico (PNA), un polisacárido, un agente secuestrador de iones metálicos, un agonista 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 es llamado por el experto en la técnica, un socio o miembro de un par de unión específica.

Un agente de unión por afinidad tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol por su diana, por ejemplo, un miembro de un par de unión 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.

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.

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 a 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.

Los análogos de biotina son aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina.

El término "oligonucleótido" o "ácido nucleico", como se usa 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.

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

Un análogo de ácido nucleico puede contener, por ejemplo, un nucleótido sustituido que lleva un sustituyente en las bases estándar desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitosina (dC), desoxitimidina (dT), desoxiuracilo (dU). Ejemplos de 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.

Un análogo de ácido nucleico puede contener un nucleótido o un análogo de nucleósido. Es decir, las nucleobases naturales se pueden intercambiar usando análogos de nucleobases como 5-nitroindol-d-ribósido; 3-nitro-pirrol-d-ribósido, desoxiinosina (dI), deoxixantosa (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 pirolo-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')).

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 internucleosídico 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; 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); alritol (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).

También se sabe que un gran número de modificaciones del resto fosfato internucleosídico no 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 un esqueleto sin fosfato ni d-ribosa) también se puede usar como un análogo de ADN.

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.

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.

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 N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, 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 glucoproteínas 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 denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "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 β , conectadas por tres HVR, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . 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.

5 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

10 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 and Mol. Immunology, 4.^a ed., W.B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser
15 una o más de otras proteínas o péptidos.

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

25 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.

30 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 genera un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

35 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en 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 cadena pesada mediante un conector 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 interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis
40 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.

45 El fragmento Fab contiene los dominios 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 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.
50

55 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 conector 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 scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994) páginas 269-315.

60 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 conector 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 0404 097; WO 1993/01161; en Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y en Holliger, P. *et al.*, PNAS USA 90
65

(1993) 6444-6448. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

5 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. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. 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 de 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.

25 Como se ha mencionado, los compuestos y conjugados divulgados en el presente documento tienen propiedades bastante favorables. Por ejemplo, los compuestos o conjugados divulgados, respectivamente, muestran una alta eficacia ECL. Esta alta eficacia 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 eficacia 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 eficaz en una solución acuosa.

30 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.

40 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.

45 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, glucoproteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, metabolitos celulares, haptenos, hormonas, sustancias farmacológicas, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

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

55 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 del 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.

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

65 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 sabe que comprende el analito, (b) poner en contacto dicha muestra con un conjugado de acuerdo entre un

agente de unión por afinidad y un compuesto de acuerdo con la Fórmula 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.

- 5 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.

Ejemplo 1

10

Síntesis de fenil-fenantridinas sustituidas

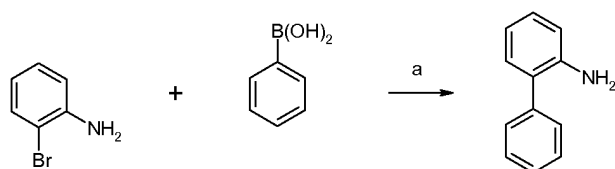
Ejemplo 1.1

15 Procedimiento general para la síntesis de 2-aminobifenilos sustituidos:

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

20

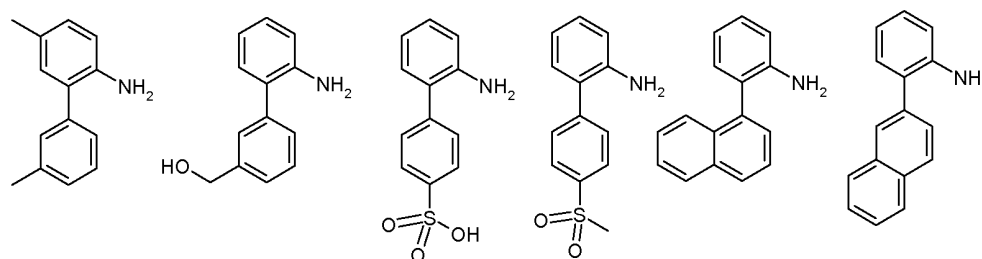
Procedimiento típico:



25

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

Otros ejemplos:



30

Ejemplo 1.2

35 Procedimiento general para la síntesis de fenantridinas sustituidas:

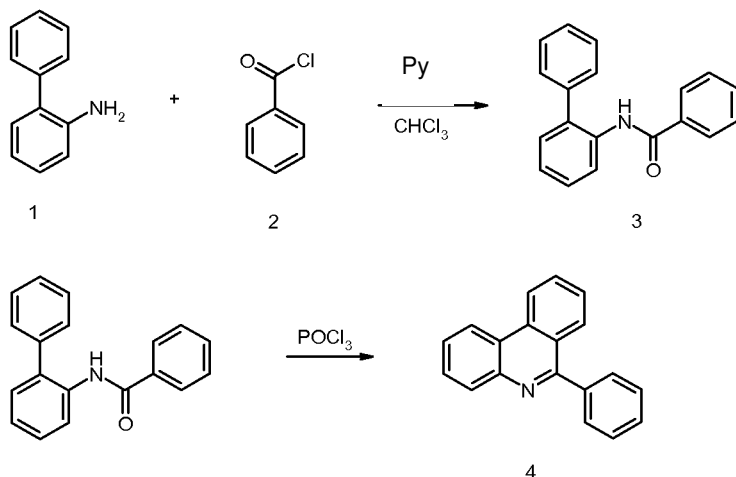
35

A la solución enfriada con hielo de 2-arilnilina **1** (0,01 mol) en cloroformo (20 ml) se añadió cloruro de ácido de arilo **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. 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 secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El producto 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 de un 66 %.

40

Se sometieron a reflujo benzamido-2-bifenilo **3** (0,01 mol) y POCl₃ (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 CH₂Cl₂ (30 ml) y se vertió sobre hielo, se lavó con NH₄OH al 25 % y agua destilada. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío, seguido de cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 1:1) para dar el producto **4** 6-fenilfenantridina.

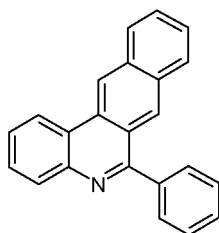
45



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

5

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

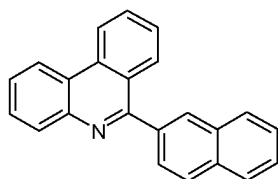


10 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,64 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H), 8,29 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 8,92$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 7,48$ Hz, 1H), 7,79-7,75 (m, 2H), 7,69 (t, $J = 14,0, 8,2$ Hz, 1H), 7,63-7,61 (m, 2H), 7,53-7,46 (m, 4H), 7,19 (t, $J = 14,3, 7,2$ Hz, 1H).

15

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

Utilizando cloruro de naftaleno-carbonilo en lugar de cloruro de benzoilo:



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

25

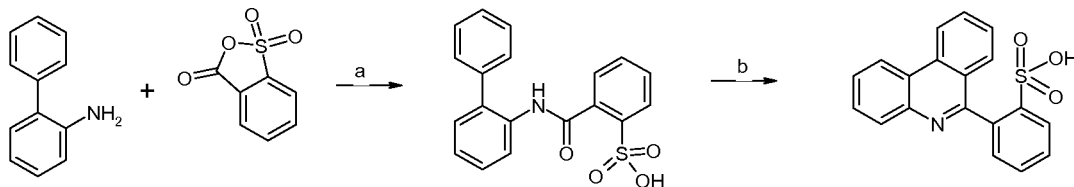
EM: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306,3

Ejemplo 1.3

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

30 La 6-(2-sulfofenil)-fenantridina se puede sintetizar por calentamiento suave de arilánilina (0,01 mol) con anhídrido cíclico del ácido 2-sulfobenzoico (0,01 mol) en CH_3CN durante 6 horas utilizando el procedimiento descrito por Nicolai, E., en Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1617-1630.

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



5

Ejemplo 1.4

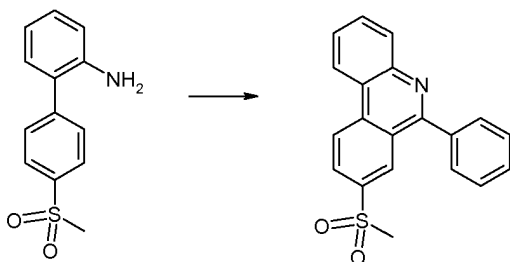
Procedimiento para la síntesis de 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina

10

La 6-fenil-alquilsulfonil-fenantridina se puede sintetizar por calentamiento suave de 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 1.2.

15

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



20 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,92 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8,75 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8,68 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8,35 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H), 8,30 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7,89 (t, $J = 15.3, 7.1$ Hz, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,64-7,56 (m, 3H), 3,12 (s, 3H).

25

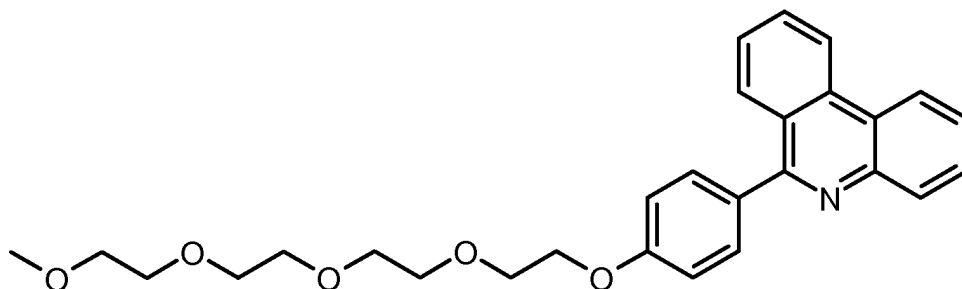
EM: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334,3

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

Ejemplo 1.5

30

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



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

Procedimiento: (JACS, 2007, 129, 13364) A una solución de 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol (7 g, 33,6 mmol) y trietilamina (4,9 ml, 35,3 mmol) en CH_2Cl_2 seco (100 ml) se añadieron cloruro de 4-toluenosulfonilo (6,7 g,

35,3 mmol) y DMAP (120 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se lavó con 80 ml de HCl (1 M) y 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.

5 **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).

10 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:

15 **Procedimiento:** (JACS, 2007, 129, 13364) Una mezcla del compuesto 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-il-4-metilbencenosulfonato 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 a 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 %).

25 **RMN:**

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01-7,84 (m, 2H), 6,96-6,85 (m, 2H), 4,29 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 4,12 (dd, J = 5,4, 4,3 Hz, 2H), 3,82 (dd, J = 5,4, 4,2 Hz, 2H), 3,71-3,56 (m, 10H), 3,51-3,45 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 1,32 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

30 ¹³C{¹H}-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 166,29 (s), 162,47 (s), 131,45 (s), 123,01 (s), 114,11 (s), 71,90 (s), 70,84 (s), 70,60 (s), 70,59 (s), 70,58 (s), 70,48 (s), 69,51 (s), 67,54 (s), 60,57 (s), 58,98 (s), 14,35 (s).

EM(+):

35 [M+Na]⁺ calculado: 379,1727, hallado: 379,1743.

Síntesis de ácido 4-PEG4-benzoico:

40 **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/H₂O (1:1 v/v) se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con HCl (2 N). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc y se evaporó hasta sequedad. El sólido blanco resultante se recristalizó en EtOAc/hexanos.

Rendimiento: 5,3 g (85 %).

45 **RMN:**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 11,17 (s, 1H), 8,14-7,89 (m, 2H), 7,03-6,75 (m, 2H), 4,29-4,02 (m, 2H), 3,92-3,81 (m, 2H), 3,78-3,57 (m, 10H), 3,57-3,46 (m, 2H), 3,35 (s, 3H).

50 ¹³C{¹H}-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 171,46 (s), 163,24 (s), 132,30 (s), 121,98 (s), 114,33 (s), 71,96 (s), 70,91 (s), 70,67 (s), 70,66 (s), 70,64 (s), 70,54 (s), 69,55 (s), 67,66 (s), 59,08 (s).

EM(-):

55 [M-H]⁻ calculado: 327,1438, hallado: 327,1456.

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

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

65 Una solución de 2-fenilnilina (1,6 g) y piridina (2,4 ml) en cloroformo (80 ml) bajo atmósfera inerte se enfrió a 0°C. Se añadió lentamente cloruro de fenil-4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)benzoilo (3,1 g, 9,14 mmol) en 20 ml a la solución y se dejó que la mezcla final alcanzara temperatura ambiente. La solución se calentó a reflujo durante 2 h y

se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con HCl (1 M, 2 x 100 ml), NaHCO₃ (100 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/hexano).

5 **Rendimiento:** 4,1 g (90 %).

RMN:

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

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

EM(+):

[M+H]⁺ calculado: 480,2386, hallado: 480,2383; [M+Na]⁺ calculado: 502,2200, hallado: 502,2204.

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

25 **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 h. Se dejó que la mezcla alcanzara 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, acetato de etilo/hexano 1:1, Rf = 0,14).

30 **Rendimiento:** 1 g (25 %).

RMN:

35 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).

40 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 (s), 70,62 (s), 69,80 (s), 67,68 (s), 59,15 (s).

40 **EM(+)** JM358-F5, [M+H]⁺ calculado: 462,2280, hallado: 462,2275.

Ejemplo 2

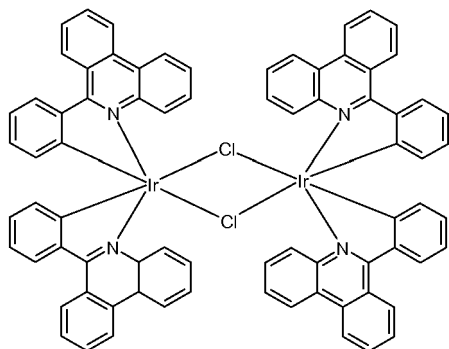
45 **Procedimiento general para la síntesis del complejo dimérico reticulado con cloro:**

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

50 Los dímeros de iridio se sintetizaron de la siguiente manera: 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 2.1

55 **Complejo con fenilfenantridina no sustituida**

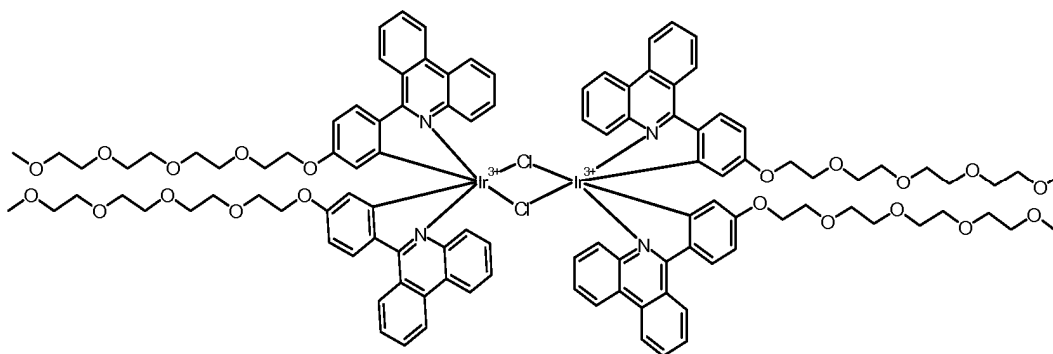


[(6-fenilfenantridina)₂IrCl]₂.

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

Ejemplo 2.2

10 Complejo con fenilfenantridina sustituida



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

20 **Rendimiento:** 550 mg (50 %).

25 **RMN:**

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

30 **EM (ESI-EM(+)):**

[M+2Na⁺]²⁺ calculado: 1171,3463, hallado 1171,3473; [(C^N)₂Ir]⁺ calculado: 1113,3877, hallado: 1113,3892.

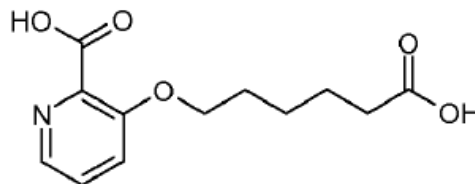
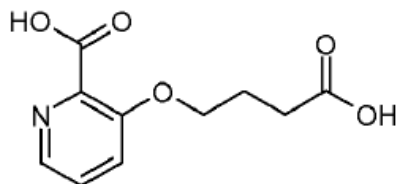
35 **Ejemplo 3**

A) Síntesis de derivados del ácido carboxialquiloxi-picolínico:

40 Una mezcla del ácido 3-hidroxi-2-piridincarboxílico (0,01 mol), 4-bromobutanoato de etilo o 6-bromohexanoato de etilo (0,021 mol) y una mezcla de carbonato de potasio (5 equiv.) en DMF (20 ml) se calentó a 90 °C durante 20 horas bajo nitrógeno. Después de enfriar, la mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de hielo y agua y se

extrajo tres veces con diclorometano (30 ml), se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. Se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, hexano/acetato de etilo 3:1) para proporcionar el producto (basado en la patente US 5.219.847).

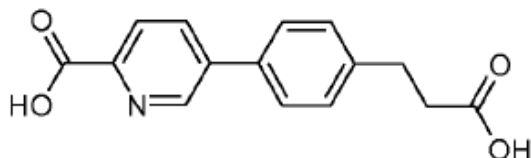
- 5 El éster formado se hidrolizó mediante adición de NaOH en MeOH (pH = 10). El pH de la solución se ajustó después a 6,0 y se agitó a t.a. durante una noche. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se cristalizó en hexano/acetona para dar el producto deseado.



- 10 Ácido 3-(carboxi-pentiloxi)-piridin-2-carboxílico Rendimiento: 51 %. Sólido gris. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 1,39-1,45 (m, 2H), 1,51-1,57 (m, 2H), 1,67-1,74 (m, 2H), 2,19-2,23 (m, 2H), 4,04-4,07 (m, 2H), 7,47-7,50 (m, 1H), 7,61 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,13 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H).

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

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



- 25 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,00 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 8,25 (dd, $J = 8,2, 2,3$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,41 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 2,91 (t, $J = 15, 7,5$ Hz, 2H), 2,61 (t, $J = 15,1, 7,6$ Hz, 2H).

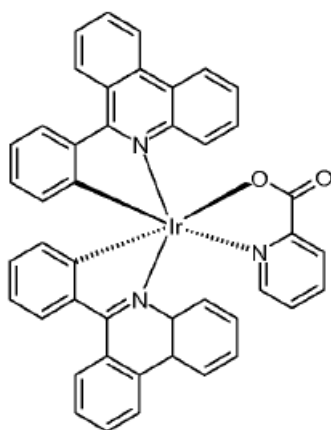
- 30 **EM:** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272,3.

Ejemplo 4

Procedimiento general para la síntesis de complejos de iridio

- 35 Un complejo dimérico reticulado con cloro (0,5 mmol), picolinato (1,25 mmol) y Na_2CO_3 (3 mmol) se mezclaron 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 Et_2O . El producto se purificó por cromatografía en columna (sílice, n-hexano/diclorometano) para dar un polvo rojo.

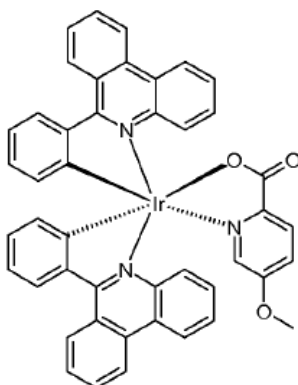
- 40 (Basado en Lamansky, S., Inorg. Chem. 40 (2001) 1704-1711).

Ácido Ir(6-fenilfenantridin)₂-piridin-2-carboxílico:

5 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,17 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 9,09 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,62 (t, *J* = 14,8, 7,8 Hz, 2H), 8,43-8,33 (m, 4H), 8,23 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,92-7,77 (m, 4H), 7,65 (t, *J* = 15, 7,9 Hz, 2H), 7,57-7,46 (m, 3H), 7,36 (t, *J* = 14,8, 7,8 Hz, 1H), 7,19-7,16 (m, 2H), 7,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,04 (t, *J* = 14,2, 6,8 Hz, 1H), 6,92 (t, *J* = 14,1, 6,7 Hz, 1H), 6,80 (t, *J* = 13,7, 6,8 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 13,7, 6,6 Hz, 1H), 6,51 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H).

10

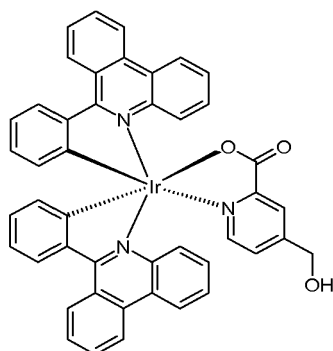
EM: [M+H]⁺ 826,4.

15 Ácido Ir(6-fenilfenantridin)₂-5-(metoxi)piridin-2-carboxílico:

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

20

EM: [M+H]⁺ 854,2.

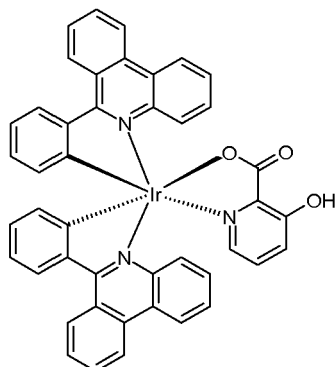


25

Ácido Ir(6-fenilfenantridin)₂-4-(hidroximetil)piridin-2-carboxílico:

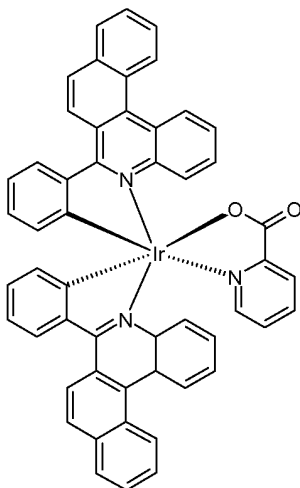
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,14 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 8,96 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,87 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,51 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,37 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,26-8,24 (m, 2H), 8,10 (t, *J* = 14,7, 7,3 Hz, 1H), 8,02-7,96 (m, 3H), 7,68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

EM: [M+H]⁺ 854,2.

Ácido Ir(6-fenilfenantridin)₂-3-hidroxipiridin-2-carboxílico:

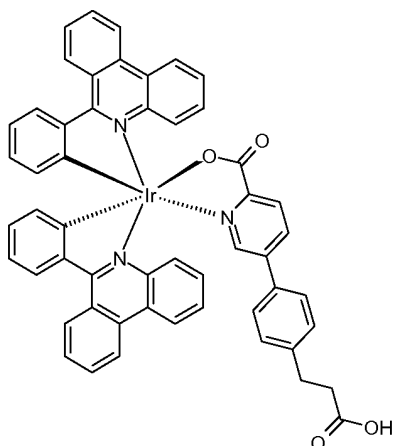
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,15 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 9,06 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,65-8,57 (m, 3H), 8,46-8,41 (m, 2H), 8,34 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,21 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,94-7,78 (m, 5H), 7,72 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,58-7,55 (m, 2H), 7,40 (t, *J* = 14,0, 7,0 Hz, 1H), 7,15 (t, *J* = 15,2, 7,0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

EM: [M+H]⁺ 839,2.

Ácido Ir(6-fenil-benzofenantridin)₂-piridin-2-carboxílico:

¹H-MN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,04 (m, 4H), 8,82 (m, 2H), 8,77-8,70 (m, 1H), 8,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,29-8,27 (m, 2H), 8,15-8,09 (m, 4H), 7,85 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,78-7,71 (m, 4H), 7,65 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,62-7,553 (m, 2H), 7,45-7,40 (m, 2H), 7,23-7,17 (m, 1H), 7,13-7,05 (m, 3H), 7,05-7,00 (m, 1H), 6,83 (dd, *J* = 10,8, 4,0 Hz, 1H), 6,68 (dd, *J* = 10,9, 3,8 Hz, 1H), 6,51 (dd, *J* = 7,6, 0,9 Hz, 1H).

EM: [M+H]⁺ 924,2.



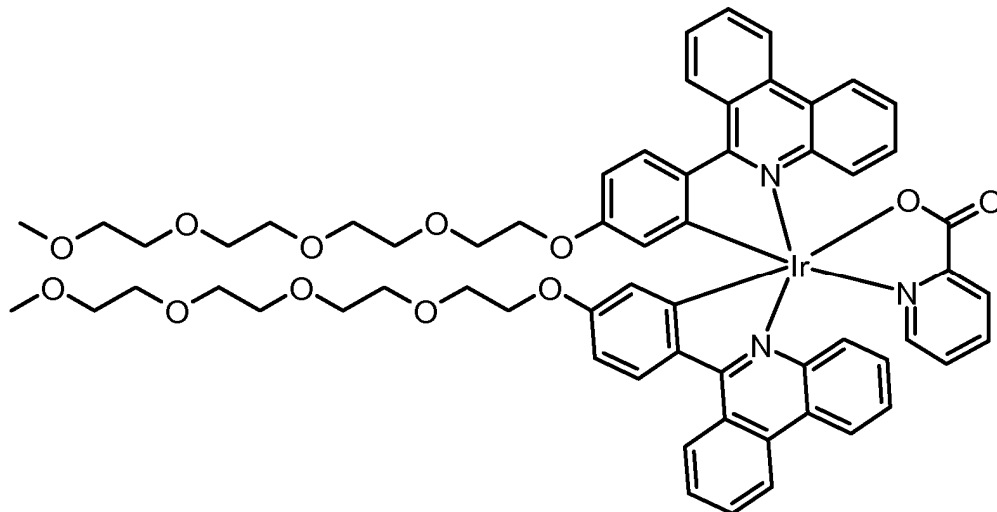
Ácido Ir(6-fenilfenantridin)₂-2-(carboxietil-fenil)piridin-2-carboxílico:

5 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,24 (m, 1H), 9,15 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,88 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,68 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,50 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,45 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 8,34 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,28 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 8,13-8,00 (m, 4H), 7,92 (dd, *J* = 8,1, 2,1 Hz, 1H), 7,63 (t, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 2H), 7,54-7,42 (m, 3H), 7,35 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,17 (t, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 1H), 7,10-7,06 (m, 3H), 7,02 (t, *J* = 15,7, 7,3 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 6,77 (t, *J* = 14,0, 7,1 Hz, 1H), 6,71 (t, *J* = 14,8, 7,0 Hz, 1H), 6,45 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 2,86 (t, *J* = 15,2, 7,5 Hz, 2H), 2,55 (t, *J* = 15,4, 7,7 Hz, 2H).

EM: [M+H]⁺ 972,3.

Síntesis de JM 360:

15



JM360

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

Rendimiento: 30 %.

25 RMN:

30 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,06 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,98 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,61 (m, 3H), 8,46-8,21 (m, 4H), 8,13 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,83 (m, 4H), 7,61 (m, 2H), 7,57-7,41 (m, 3H), 7,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,24-7,12 (m, 1H), 6,89 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J* = 8,9, 2,5 Hz, 1H), 6,61 (dd, *J* = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 6,54 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,99 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 3,85-3,41 (m, 32H), 3,34 (s, 3H), 3,33 (s, 3H).

EM: $[2M+2Na+]^{2+}$ calculado: 1258,4012, hallado: 1258,4030. $[M+H]^+$ calculado: 1236,4197, hallado: 1236,4227.

Ejemplo 5

5 ECL con un novedoso complejo de iridio

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

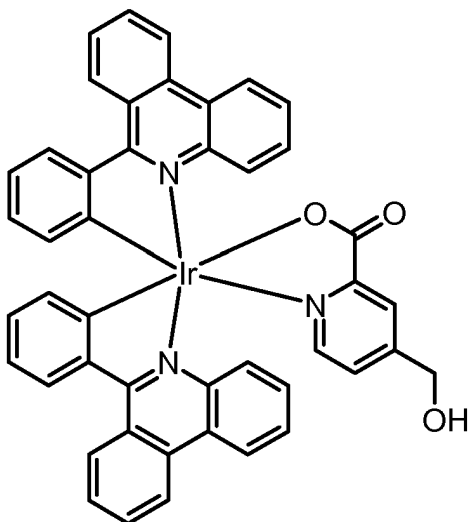
15 Resultados de la ECL:

Referencia Ru(bpy)₃ = 10 000 en total en concentración 10 nM

20 - JM 360 = 31 258 en total en concentración 10 nM

- RC 72 = 45 512 en total en concentración 10 nM

RC 72



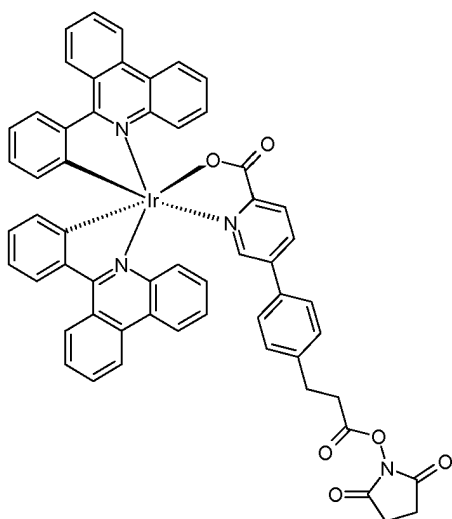
25

Ejemplo 6

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

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

35



Éster N-succinimidílico del ácido Ir(6-fenilferantridin)₂-2-(carboxietil-fenil)piridin-2-carboxílico:

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

10

EM: [M+H]⁺ 1069,3

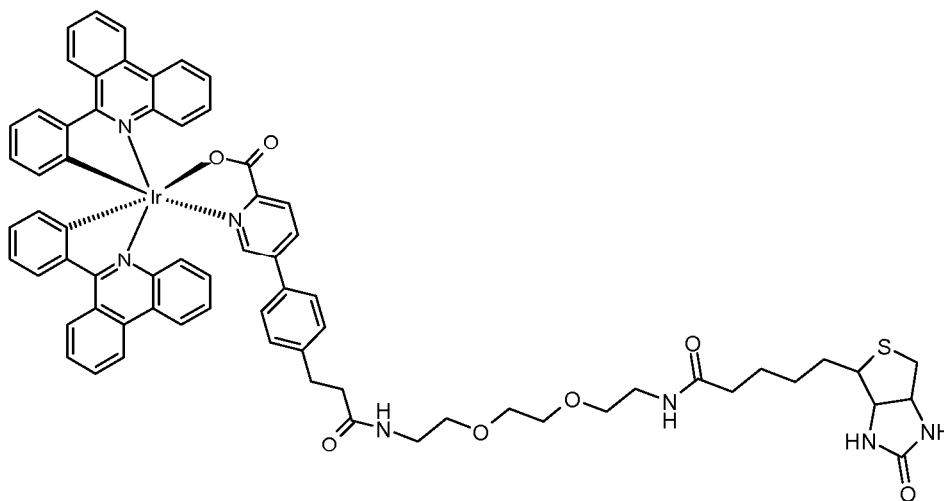
Ejemplo 7

15

Síntesis de un complejo de iridio conjugado con biotina

20

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



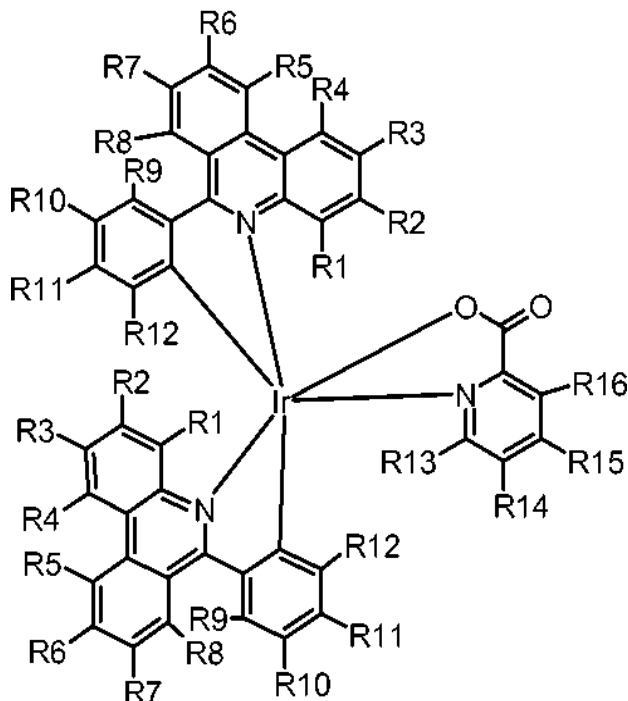
25

EM: [M+H]⁺ 1328,6

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto quimioluminiscente basado en iridio de Fórmula I

5



en la que R1-R16 es hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, 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 o R17, en la que R17 es arilo, arilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilo ramificado sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, en el que el sustituyente se selecciona entre hidrógeno, haluro, grupo ciano o nitro, un grupo hidrófilo como amino, alquilamino, alquilamino 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 o,

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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 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 como amino, alquilamino, alquilamino 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 y,

en el que al menos uno de R13-R16 es -Q-Y, en el que Q representa un conector e Y es un grupo funcional y en el que el grupo funcional Y se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida, grupo amino, halógeno, sulfhidrilo, maleimido, alquinilo, azida y fosforamidita.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conector 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.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conector 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.

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

10 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.

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.

15 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.

20 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.

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.

25 10. 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 sabe que comprende el analito,

30 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.