

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 900**

51 Int. Cl.:

C07D 219/04 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07871162 .9**

96 Fecha de presentación: **15.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2074101**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Ésteres de acridinio estables con emisión de luz rápida**

30 Prioridad:

13.10.2006 US 829363 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(33.3%)

511 BENEDICT AVENUE

TARRYTOWN, NY 10591, US;

JIANG, QINGPING (33.3%) y

SHARPE, DAVID (33.3%)

72 Inventor/es:

JIANG, QINGPING;

SHARPE, DAVID y

NATRAJAN, ANAND

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 392 900 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

Ésteres de acridinio estables con emisión de luz rápida

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a ésteres de acridinio quimioluminiscentes útiles como marcadores en inmunoensayos y similares. Los ésteres de acridinio quimioluminiscentes son hidrolíticamente estables y de emisión de luz rápida.

10

Antecedentes de la invención

Los compuestos de acridinio quimioluminiscentes son marcadores extremadamente útiles que se han usado ampliamente en inmunoensayos y ensayos de ácidos nucleicos. Una revisión reciente, Pringle, M. J., *Journal of Clinical Ligand Assay* vol. 22, págs. 105-122 (1999) resume desarrollos pasados y actuales en esta clase de compuestos quimioluminiscentes.

15

El trabajo fundamental realizado por McCapra, F. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* vol. 43, págs. 3167-3172 (1964) y Rahut *et al.* *J. Org. Chem.* vol. 301, págs. 3587-3592. (1965) dio a conocer que la quimioluminiscencia a partir de ésteres fenólicos de sales de acridinio podría desencadenarse mediante peróxido alcalino. Desde estos estudios iniciales, ha aumentado el interés en los compuestos de acridinio debido a su utilidad como marcadores quimioluminiscentes. Simpson, J.S.A. *et al.*, *Nature* vol. 279, págs. 646-647 (1979) dieron a conocer la aplicación del éster de acridinio, bromuro de 9-carboxifenil-N-metilacridinio, en un inmunoensayo. Este éster de acridinio es bastante inestable debido a la hidrólisis del enlace éster entre el anillo de acridinio y el fenol, limitando de ese modo su utilidad comercial a menos que se tomen precauciones especiales para proteger el enlace éster de la hidrólisis. Por ejemplo Arnold *et al.* en la patente estadounidense n.º 4.950.613 han demostrado que la estabilidad hidrolítica de los ésteres de acridinio inestables puede paliarse un poco con aditivos.

20

25

Se han descrito diferentes estrategias para aumentar la estabilidad hidrolítica de los compuestos de acridinio alterando sus estructuras. Law *et al.*, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, vol. 4, págs. 88-89 (1989) notificaron que los fenoles que contienen dos grupos metilo flanqueando el grupo fenólico proporcionaban ésteres de acridinio que son más resistentes a la hidrólisis. Se encontró que el éster de acridinio DMAE-NHS [10-metilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidilooxicarbonil)fenilo] tenía la misma producción de luz que un éster de acridinio que carece de los dos grupos metilo, pero era significativamente más resistente a la hidrólisis. Las patentes estadounidenses n.ºs 4.918.192 y 5.110.932 describen DMAE y sus aplicaciones. La patente estadounidense n.º 5.656.426 concedida a Law *et al.* da a conocer una versión hidrófila de DMAE denominada éster de NSP-DMAE-NHS donde el grupo metilo en el nitrógeno del anillo de acridinio se sustituye con un grupo sulfopropilo. Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2 dieron a conocer derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrofílicos unidos al fenol.

35

40

Se ha descrito una clase diferente de compuestos de acridinio quimioluminiscentes estables por Kinkel *et al.*, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* vol. 4, págs. 136-139 (1989) y Mattingly, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* vol. 6, págs. 107-114 (1991) y la patente estadounidense n.º 5.468.646. En esta clase de compuestos, el enlace de éster fenólico se sustituye por un resto de sulfonamida, que se notifica que confiere estabilidad hidrolítica sin comprometer la producción de luz. La estructura de DMAE-NHS y la estructura generalizada de una sulfonamida de acridinio se ilustran en la figura 1, junto con el sistema de numeración usado comúnmente para el éster de acridinio. Los restos de sulfonamida y fenol también se denominan comúnmente grupos salientes. También se han dado a conocer compuestos de acridinio quimioluminiscentes que contienen otros grupos salientes tales como oximas. Véase Renotte *et al.* *Luminescence* 2000, 15, 311-320.

45

50

Los compuestos de acridinio, en disolución acuosa, existen en equilibrio con aductos formados por la adición de agua a C-9 del anillo de acridinio. Este aducto se denomina comúnmente la pseudobase. El equilibrio acridinio-pseudobase, que se ilustra en la figura 2, está fuertemente influido por el pH del medio acuoso. En disoluciones ácidas, la forma de acridinio se ve favorecida, mientras que en disolución básica la forma predominante es la pseudobase. El equilibrio acridinio-pseudobase también resulta afectado por la estructura del compuesto de acridinio. Los ésteres de acridinio que contienen grupos donadores de electrones en C-2 y/o C-7, reducen la electrofilicidad de C-9 y elevan el pH al que tiene lugar la transición de la forma de acridinio en la pseudobase. Las sulfonamidas de acridinio también son menos propensas a la formación de pseudobase que los ésteres de acridinio.

55

Quimioluminiscencia a partir de los compuestos de acridinio normalmente se desencadena con peróxido de hidrógeno. Se cree que el mecanismo de emisión de luz implica la adición de peróxido de hidrógeno a C-9 del anillo de acridinio seguido por la escisión del grupo saliente y la formación concomitante de un compuesto intermedio de dioxetanona, de alta energía. Se supone que la rápida descomposición del compuesto intermedio de dioxetanona conduce a la formación de la acridona en un estado electrónicamente excitado. La emisión de luz se produce cuando la acridona en el estado excitado se invierte al estado de base. La formación del compuesto intermedio de dioxetanona no se ha demostrado de manera concluyente y un reciente estudio teórico postula que la escisión del

65

grupo saliente y la formación de la acridona en estado excitado pueden producirse simultáneamente. (Rak *et al.* J. Org. Chem. 1999, 64, 3002-3008).

En la práctica, la emisión de luz a partir de de compuestos de acridinio y sus conjugados usando peróxido de hidrógeno se lleva a cabo normalmente mediante un tratamiento inicial con ácido acuoso para efectuar la conversión completa de la pseudobase a la forma de acridinio, seguido por la adición de la base acuosa. El tratamiento ácido es necesario porque la pseudobase no puede reaccionar con peróxido de hidrógeno. La duración del tratamiento ácido y la fuerza del ácido que debe usarse dependen de la estructura del compuesto de acridinio. La adición de base ioniza la molécula de peróxido de hidrógeno para formar el ion hidroperóxido, que entonces se añade a C-9 del anillo de acridinio e inicia la emisión de luz. Por conveniencia, el peróxido de hidrógeno a menudo se añade junto con el ácido acuoso como un único reactivo. Normalmente, la emisión de luz a partir de del compuesto de acridinio o su conjugado se produce durante un periodo de tiempo de algunos segundos.

La cinética o velocidad de emisión de luz a partir de del compuesto de acridinio o su conjugado depende de varios factores. Tanto las concentraciones de peróxido de hidrógeno así como las de la base pueden afectar a la duración de emisión de luz. La presencia de tensioactivos también puede afectar a la velocidad de emisión de luz así como al rendimiento cuántico. Además, la estructura del compuesto de acridinio también tiene un profundo efecto sobre la cinética de emisión de luz. Aunque los sustituyentes en el anillo de acridinio, en el nitrógeno de acridinio y en el grupo saliente pueden afectar todos ellos a la cinética de emisión de luz, se ha notificado más ampliamente el efecto de diversas características estructurales del grupo saliente sobre la emisión de luz. Por ejemplo, Adamczyk *et al.* (Tetrahedron 1999, 55, 10899-10914) a partir de un estudio de diversas sulfonamidas de acridinio, han demostrado que la cinética de emisión de luz puede variarse por la variación estructural del grupo saliente de sulfonamida sin afectar a la cantidad total de luz emitida por estos compuestos. Estos investigadores concluyeron a partir de su estudio que los factores estéricos influían más en variar la velocidad de emisión de luz que el pKa del grupo saliente de sulfonamida. El aumento de la congestión estérica en el nitrógeno de sulfonamida de acridinio condujo a una emisión de luz lenta mientras que la liberación de tal impedimento estérico aceleró la emisión de luz.

Nelson *et al.* (Biochemistry 1996, 35, 8429-8438) notificaron un estudio similar sobre ésteres fenílicos de acridinio. A partir de su estudio, los autores concluyeron que el pKa del grupo saliente de fenol tenía un efecto más significativo sobre la cinética de emisión de luz que los efectos estéricos. Los grupos de retirada de electrones en el anillo de fenilo condujeron a una aceleración en la velocidad de emisión de luz, mientras que los grupos donadores de electrones condujeron a una supresión de la velocidad. Los ésteres de acridinio descritos por Nelson son bastante propensos a hidrólisis aunque muestran emisión de luz rápida. Los "ensayos de protección de hibridación" descritos por Nelson, de hecho, se aprovechan del hecho de que los ésteres de acridinio conjugados con sondas de ácido nucleico y no hibridados con sus dianas, pueden hidrolizarse a velocidades mucho más rápidas que las sondas hibridadas marcadas.

Los efectos estéricos también desempeñan un papel importante en la cinética de emisión de luz de los ésteres fenílicos de acridinio. Por ejemplo Woodhead *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.656.207 han notificado que la cinética de emisión de luz de un éster de acridinio que contiene grupos metilos en los átomos de carbono 2' y 6' en el fenol puede diferenciarse de un éster de acridinio análogo que carece de estos dos sustituyentes mediante una cuidada selección de reactivos desencadenantes de luz.

Los ésteres de acridinio que contienen grupos metilo en los carbonos 2' y 6' emiten luz más lentamente que los ésteres de acridinio que carecen de estos sustituyentes. Por otra parte, la presencia de los grupos metilo confiere una estabilidad hidrolítica mucho mayor sobre el éster de acridinio tal como observaron Law *et al.*, (Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 4, págs. 88-89 (1989) que compararon la estabilidad hidrolítica de DMAE-NHS con un éster de acridinio análogo que carece de los grupos metilo en 2' y 6'. La estabilidad hidrolítica es especialmente importante para aplicaciones comerciales de los ésteres de acridinio en instrumentos de inmunoquímica automatizados, porque está ligada a la estabilidad de los reactivos. A menudo se prefieren los reactivos con una vida útil de almacenamiento larga porque producen menos variaciones diarias en el rendimiento del ensayo y no crean tantos desechos.

Los ésteres de acridinio hidrolíticamente estables, tales como NSP-DMAE descrito en la patente estadounidense n.º 5.656.426, cuando se conjugan con proteínas o moléculas pequeñas, normalmente emiten luz durante un periodo de cinco segundos cuando su quimioluminiscencia se desencadena con peróxido alcalino.

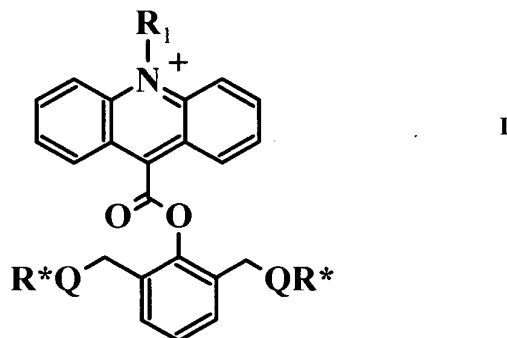
En vista de lo anterior, existe la necesidad en la técnica de ésteres de acridinio que muestren tanto estabilidad hidrolítica como emisión de luz rápida. Por tanto un objeto de la invención es proporcionar ésteres de acridinio que sean hidrolíticamente estables, por ejemplo, comparables a NSP-DMAE, pero que también muestren una emisión de luz mucho más rápida, es decir, del orden de uno a dos segundos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la velocidad de de emisión de luz a partir de ésteres de acridinio puede aumentarse sorprendentemente sin comprometer su estabilidad hidrolítica. Los ésteres de acridinio

de la presente invención tienen características estructurales novedosas que los distinguen de los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida descritos anteriormente que normalmente son hidrolíticamente inestables. Los ésteres de acridinio inventivos ofrecen por tanto ventajas considerables con respecto a los ésteres fenílicos de acridinio no sustituidos, que son bastante propensos a hidrólisis aunque muestran emisión de luz rápida.

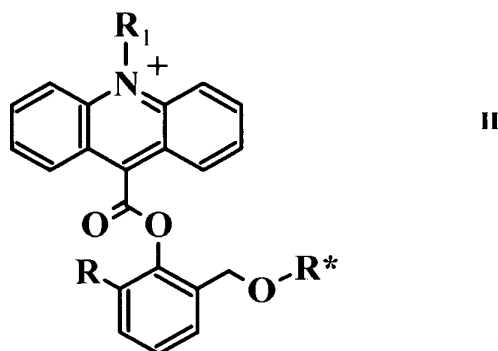
5 En un aspecto de la invención, se proporcionan compuestos de acridinio quimioluminiscentes de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables, que comprenden la estructura de fórmula I:



10 en la que Q se selecciona independientemente cada vez que aparece de un enlace (es decir, Q no está presente) o un heteroátomo o grupo que contiene heteroátomos, seleccionado de -O-, -S- o -N(R*)-; en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen

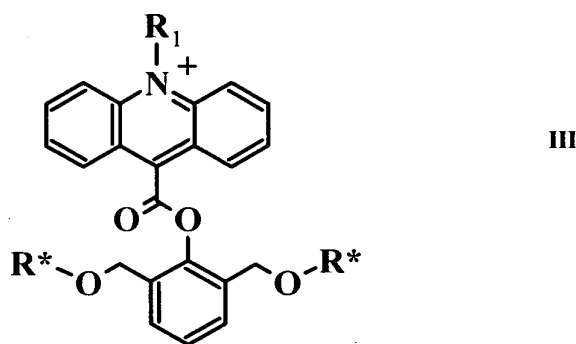
15 opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; con la condición de que al menos una Q debe ser -O-, -S- o -N(R*)-; y en la que R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

20 En otro aspecto de la invención, se proporcionan compuestos de acridinio quimioluminiscentes de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables que comprende la estructura de fórmula II:



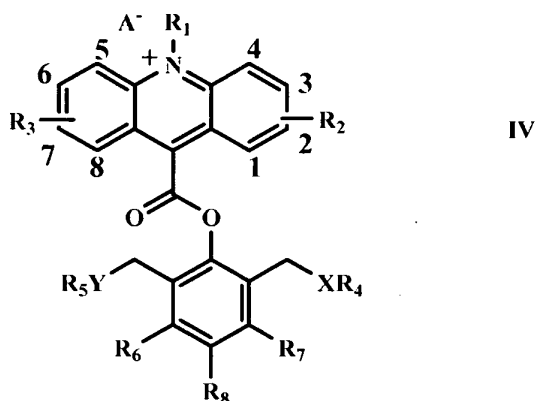
25 en la que R y R* se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y en la que R₁ es tal como se definió anteriormente.

30 Todavía en otro aspecto de la invención, se proporcionan compuestos de acridinio quimioluminiscentes de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables que comprenden la estructura de fórmula III:



5 en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y en la que R₁ es tal como se definió anteriormente.

10 En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan compuestos de acridinio quimioluminiscentes de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables de fórmula IV:



15 en la que,

R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos; y preferiblemente R₁ es un grupo metilo, sulfopropilo o sulfobutilo;

20 R₂ es un grupo funcional en cualquiera de C₁ a C₄ y R₃ es un grupo funcional en cualquiera de C₅ a C₈, seleccionándose R₂ y R₃ independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno;

25 X e Y se seleccionan independientemente cada vez que aparecen de un enlace, -O-, -S- o -N(R*); en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; con la condición de que o bien X o Y o bien ambos deben ser -O-, -S- o -N(R*);

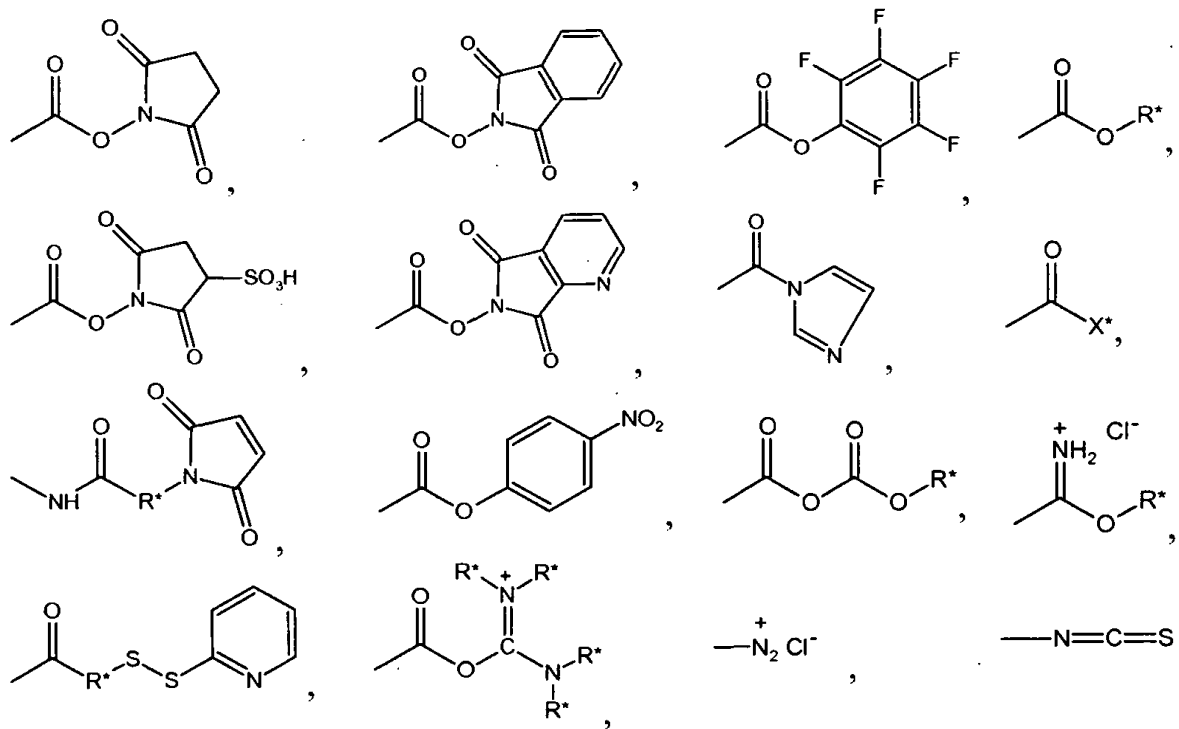
30 R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno;

35 R₆ y R₇ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo, alquil-arilo, alcoxilo (-OR), alquiltiol (-SR) y -NR₂ en los que R en el nitrógeno puede ser igual o diferente, R es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

R₈ es intercambiable con R₆ y R₇ y es un grupo -R₉-R₁₀,

40 en la que R₉ representa un enlace o un grupo alquilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido que contiene hasta 20 heteroátomos, y

R₁₀ es un grupo funcional electrófilo o nucleófilo seleccionado de los siguientes:



-N₃, -SO₂Cl, -NCO, -NH₂, -SH, -OH, -NH-NH₂ y -O-NH₂;

10 en las que X* es un halógeno; y R* se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y

15 A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

20 La invención también proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito. En otro aspecto de la invención, un ensayo para la detección o cuantificación de un analito comprende las siguientes etapas:

- 25 (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) un éster de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que comprende la estructura de fórmula I o fórmula II;
- 30 (b) proporcionar un soporte sólido sobre el que está inmovilizada una segunda molécula de unión específica para dicho analito;
- (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;
- (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;
- (e) desencadenar quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;
- 35 (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un conjugado de un analito con un éster de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que comprende la estructura de fórmula I o fórmula II;

(b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;

(c) mezclar el conjugado, soporte sólido y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

(d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;

(e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;

(f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y

(g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras una lectura de la siguiente descripción detallada de la invención, incluyendo las realizaciones, ejemplos y figuras ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura de los ésteres de acridinio DMAE-NHS y NSP-DMAE-NHS junto con el sistema de numeración usado comúnmente para los ésteres de acridinio. También se muestra la estructura generalizada de una sulfonamida de acridinio.

La figura 2 ilustra el equilibrio entre la forma de acridinio y la forma de pseudobase de un compuesto de acridinio.

Descripción detallada

Tal como se usan en el presente documento, todos los términos tienen su significado habitual en la técnica, a menos que se definan explícitamente.

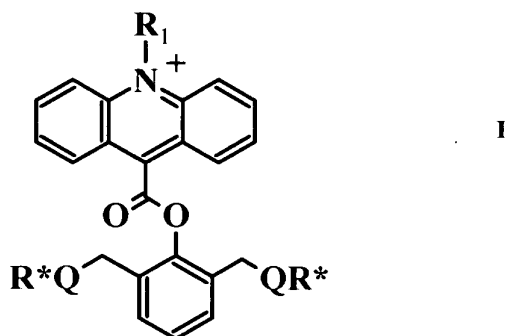
Por "compuesto de acridinio quimioluminiscente que comprende la estructura" de fórmula I o fórmula II se quiere decir que el compuesto de acridinio quimioluminiscente incluye como parte o en la totalidad de su estructura, la estructura de fórmula I o II, y por tanto incluye compuestos en los que la estructura específica contiene opcionalmente uno o más sustituyentes adicionales en cualquier posición disponible del núcleo de acridinio, incluyendo el nitrógeno de anillo, y el anillo de fenilo, así como sales de los mismos. Los sustituyentes pueden seleccionarse de, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen normalmente desde uno hasta 50 átomos de carbono, y que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen sin limitación, grupo alquilo, alquenilo o alquinilo C₁-C₂₀ de cadena lineal o ramificada, incluyendo sin limitación metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo, terc-pentilo, hexilo, vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, propinilo, butinilo, pentinilo; cicloalquilo, heterocicloalquilo, haloalquilo, bencilo, alquil-arilo; grupos arilo o heteroarilo sustituidos o no sustituidos; acilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbamida, ciano, oxo, oxa, halógeno y similares, y combinaciones de los mismos, incluyendo opcionalmente la sustitución adicional con uno o más heteroátomos, incluyendo, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos.

Por "de emisión de luz rápida" se quiere decir, en el caso de los ésteres de acridinio en un estado libre (es decir, no conjugados con otra molécula) que al menos aproximadamente el 90% de la producción total de luz a partir de la reacción quimioluminiscente se produce en el plazo de dos segundos de la adición de la base; y en el caso de los conjugados de éster de acridinio, que al menos aproximadamente el 90% de la producción total de luz a partir de la reacción quimioluminiscente se produce en el plazo de un segundo de la adición de la base, en las condiciones especificadas en el presente documento.

El término "molécula pequeña" se refiere a cualquier molécula orgánica que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 3.000, preferiblemente inferior a aproximadamente 2.000 y más preferible inferior a aproximadamente 1.000 daltons.

Los compuestos de acridinio de la presente invención logran emisión de luz rápida y estabilidad hidrolítica a través de la presencia de heteroátomos en los carbonos de metileno del anillo de fenilo. En una realización, el compuesto de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable comprende la estructura de

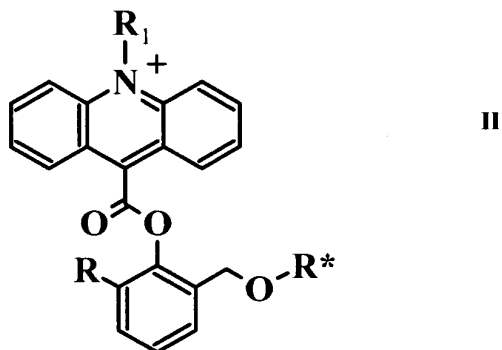
fórmula I:



5 en la que Q se selecciona independientemente cada vez que aparece de un enlace, -O-, -S- o -N(R*)-; en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; con la condición de que al menos una Q debe ser -O-, -S- o -N(R*)-. En una realización preferida, uno o ambos sustituyentes de Q son -O-. R₁ es un grupo alquilo, alqueno, alquino, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos. Preferiblemente, R₁ es un grupo metilo o un grupo sulfo-alquilo, incluyendo sin limitación grupos sulfopropilo y sulfobutilo.

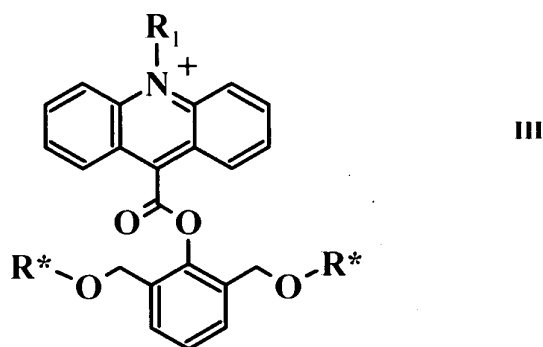
15 Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que cuando un heteroátomo que tiene al menos un par de electrones no enlazantes (es decir, un "par solitario"), tal como -O-, -S- o -N(R*)-, y en particular -O-, se une directamente a cualquiera o ambos de los sustituyentes de metileno en los carbonos 2' y 6' del anillo de fenilo, el heteroátomo actúa como una base para catalizar la reacción quimioluminiscente del éster de acridinio con peróxido.

20 En otra realización, el compuesto de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable comprende la estructura de fórmula II:



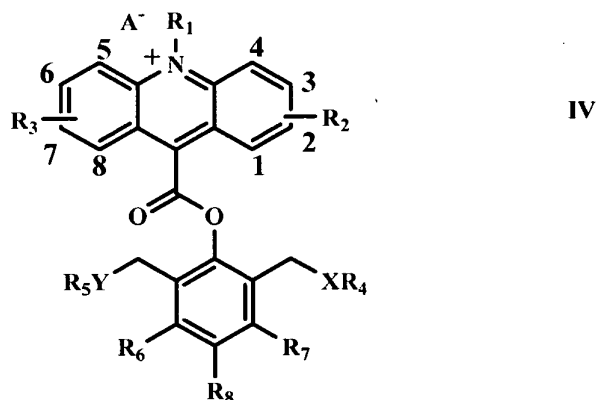
25 en la que R y R* se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y en la que R₁ es tal como se definió anteriormente. En una realización preferida R es un grupo alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido, preferiblemente metilo.

30 En otra realización, el compuesto de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable comprende la estructura de fórmula III:



5 en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y en la que R₁ es tal como se definió anteriormente.

10 En otra realización de la invención, se proporciona el compuesto de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que tiene la estructura de fórmula IV:



15 en la que cada uno de los sustituyentes especificados se definen tal como sigue.

R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos; y preferiblemente R₁ es un grupo metilo, sulfopropilo o sulfobutilo.

20 R₂ es un grupo funcional en cualquiera de C₁ a C₄ y R₃ es un grupo funcional en cualquiera de C₅ a C₈, seleccionándose R₂ y R₃ independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno. Se entenderá que los heteroátomos pueden comprender cualquier parte de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo y por tanto pueden formar parte de la estructura principal del grupo, como por ejemplo en el grupo alcoxilo, éter o heteroalilo, o el grupo que contiene un heteroátomo o heteroátomos puede ser colgante de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo, como en el caso de una cetona, halógeno o similares. Específicamente, las sustituciones de heteroátomos contempladas incluyen aquellas en las que R₂ y/o R₃ están conectados al núcleo de acridinio a través de un átomo de oxígeno (es decir, R₂ y/o R₃ son sustituyentes de alcoxilo) y aquellas en las que R₂ y/o R₃ comprenden además una estructura de éter o poliéter, incluyendo, por ejemplo, poliéteres de la forma general -(CH₂-CH₂-O)_n. En una variante interesante, el poliéter se une al anillo de acridinio a través de un oxígeno y R₂ y/o R₃ por tanto son de la forma -O-(CH₂-CH₂-O)_n. El poliéter puede terminarse mediante cualquier grupo, incluyendo grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo. En una realización preferida R₂ y/o R₃ tendrán la forma -O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₃ en la que n es un número entero entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 10.

35 X e Y se seleccionan independientemente de un enlace (es decir, el grupo no está presente y por tanto R₄ y R₅ se unen directamente al núcleo de acridinio), oxígeno, azufre o nitrógeno. En realizaciones preferidas, al menos uno de X e Y es -O-. En el caso en el que X y/o Y son átomos de nitrógeno, el átomo de nitrógeno puede formar, junto con el núcleo de acridinio y R₄ y/o R₅, una amina secundaria, o el átomo de nitrógeno puede formar junto con el núcleo de acridinio y R₄ y/o R₅ y un grupo R*, una amina terciaria, siendo R* un grupo tal como se define en el presente documento.

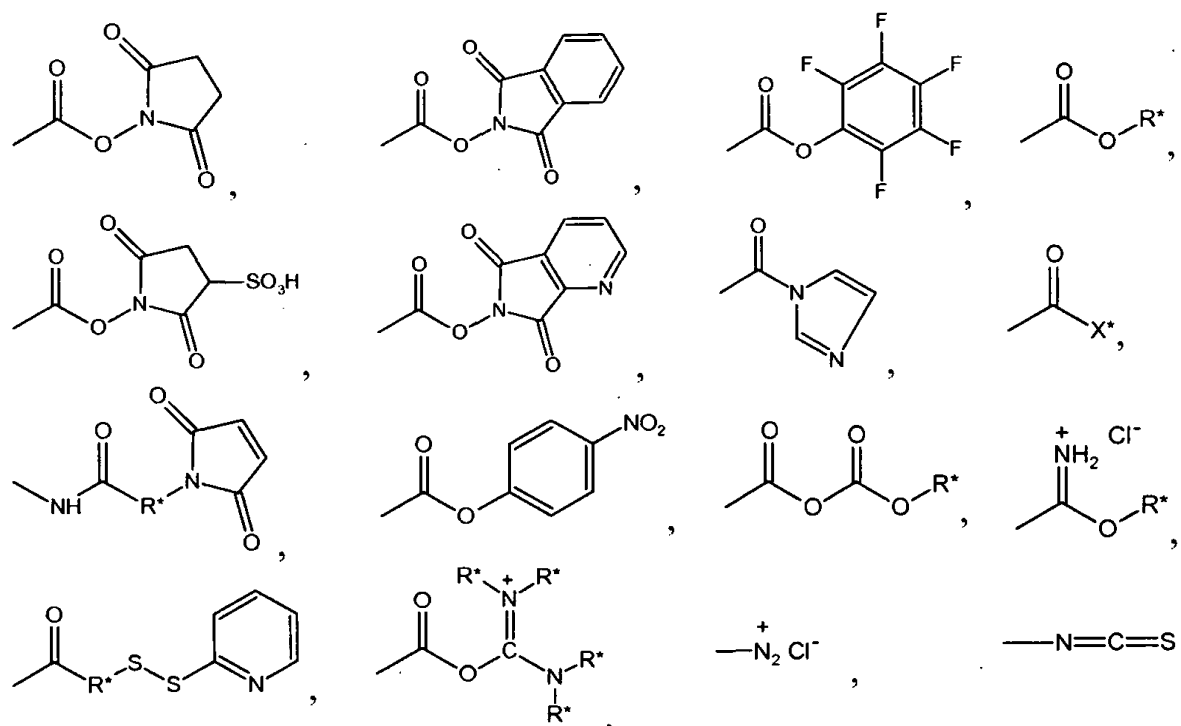
R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno. R₄ y/o R₅ pueden comprender, por ejemplo, una estructura de éter o poliéter, incluyendo, por ejemplo, poliéteres de la forma general -(CH₂-CH₂-O)_n. En una variante interesante, en la que X y/o Y es -O-, el poliéter se une al anillo de acridinio a través de un oxígeno para formar, junto con X y/o Y, un radical del tipo -O-(CH₂-CH₂-O)_n. El poliéter puede terminarse mediante cualquier grupo, incluyendo grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo. En una realización preferida R₄ y/o R₅ tendrán la forma -(CH₂-CH₂-O)_n-CH₃ en la que n es un número entero entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 10, y junto con X y/o Y formarán un grupo -O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₃. Otros sustituyentes adecuados para R₄ y R₅ incluyen, sin limitación, alquilo C₁-C₁₀ de cadena lineal o ramificada, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo y similares, que comprende opcionalmente cualquier número de heteroátomos, preferiblemente átomos de oxígeno, que cuando están presentes pueden comprender, por ejemplo, funcionalidades de éter o poliéter.

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alqueno, alquino, aril-alquilo, alquil-arilo, alcoxilo (-OR), alquitol (-SR) y -NR₂ en los que R en el nitrógeno puede ser igual o diferente, R es un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

R₈ es un grupo -R₉-R₁₀,

en la que R₉ representa un enlace o un grupo alquilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido que contiene hasta 20 heteroátomos, y

R₁₀ es un grupo funcional electrófilo o nucleófilo seleccionado de los siguientes:

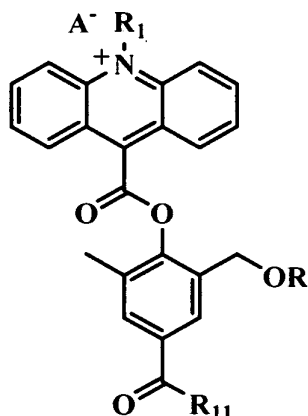


-N₃, -SO₂Cl, -NCO, -NH₂, -SH, -OH, -NH-NH₂ y -O-NH₂;

en las que X* es un halógeno; y R* se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y

A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

Los ésteres de acridinio particularmente interesantes de la presente invención tienen la siguiente estructura:

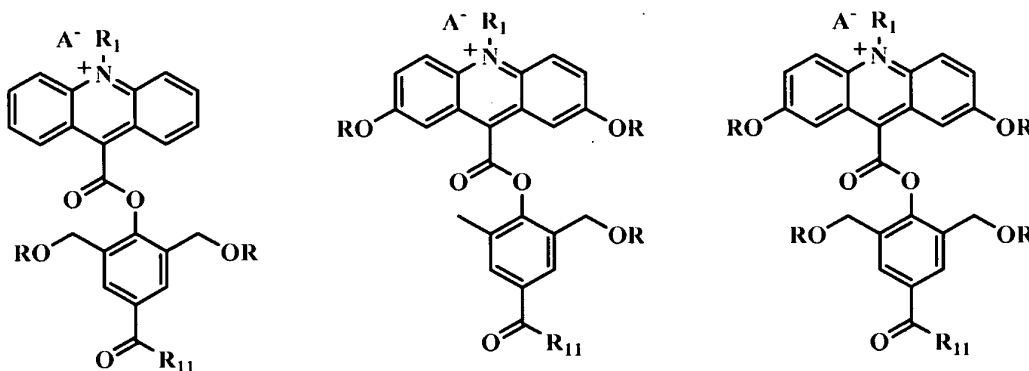


en la que R₁ es -Me o -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻;

5 R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR y en las que A⁻ es tal como se describió anteriormente.

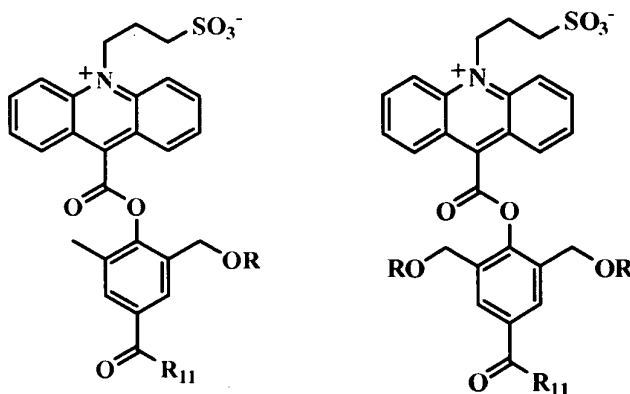
10 Los ésteres de acridinio a modo de ejemplo de la presente invención incluyen, sin limitación, los siguientes:



en los que R₁, R, R₁₁ y A⁻ son iguales a los descritos anteriormente.

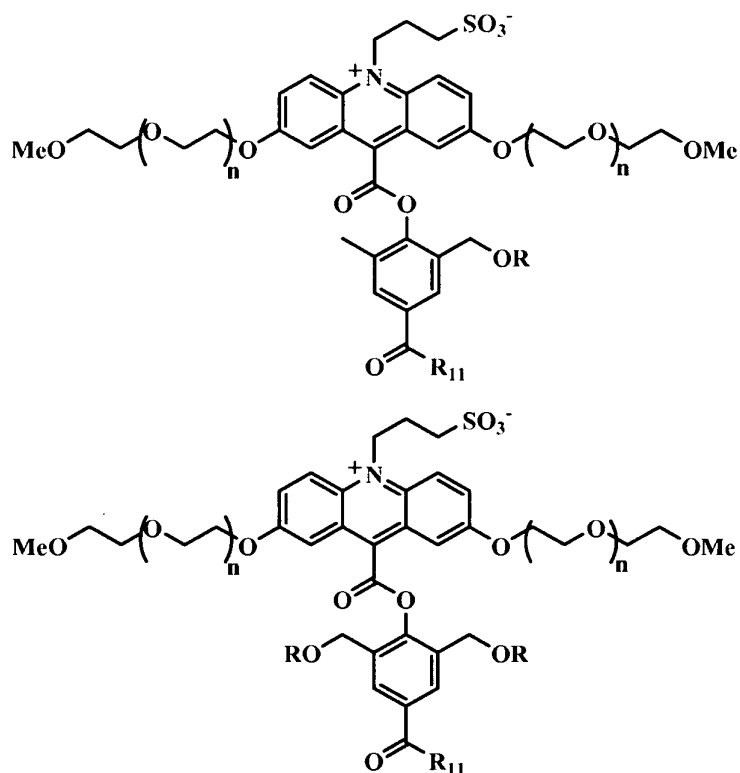
15

Los ésteres de acridinio de la presente invención también pueden tener la siguiente estructura:



20 en la que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂ y -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe, -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, n = 1-5 y R₁₁ es tal como se describió anteriormente.

Otros ésteres de acridinio a modo de ejemplo de la presente invención incluyen los siguientes:



5 en los que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe y -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, en las que n = 1-5 y R₁₁ es tal como se describió anteriormente.

Los compuestos de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables de la invención son útiles como
 10 marcadores en ensayos para la determinación o cuantificación de analitos. Los compuestos de acridinio se usan
 ampliamente en inmunoensayos y ensayos de ácidos nucleicos. Los analitos que se miden normalmente en tales
 ensayos son a menudo sustancias de cierta relevancia clínica y pueden abarcar un amplio intervalo de moléculas
 desde macromoléculas grandes tales como proteínas, ácidos nucleicos, virus, bacterias, etc. hasta moléculas
 pequeñas tales como etanol, vitaminas, esteroides, hormonas, fármacos terapéuticos, etc. Un inmunoensayo de tipo
 "sándwich" normalmente implica la detección de una molécula grande, también denominada analito macromolecular,
 15 usando dos moléculas de unión tales como anticuerpos. Un anticuerpo se inmoviliza o se une a una fase sólida tal
 como una partícula, perla, membrana, placa de microtitulación o cualquier otra superficie sólida. Los métodos para la
 unión de moléculas de unión tales como anticuerpos a fases sólidas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo,
 un anticuerpo puede unirse covalentemente a una partícula que contiene aminas sobre su superficie usando una
 molécula de reticulación tal como glutaraldehído. La unión puede ser no covalente y puede implicar la simple
 20 adsorción de la molécula de unión a la superficie de la fase sólida, tal como perlas de poliestireno y placas de
 microtitulación. El segundo anticuerpo a menudo se une covalentemente con una molécula quimioluminiscente o
 fluorescente denominada a menudo marcador. El marcaje de moléculas de unión tales como anticuerpos y otras
 proteínas de unión también se conoce bien en la técnica y se denominan comúnmente reacciones de conjugación y
 el anticuerpo marcado se denomina a menudo un conjugado. Normalmente, un resto reactivo con amina en el
 25 marcador reacciona con una amina en el anticuerpo para formar un enlace de amina. También se conocen bien
 otros enlaces tales como tioéter, éster, carbamato y similares, entre el anticuerpo y el marcador. En el ensayo, los
 dos anticuerpos se unen a diferentes regiones del analito macromolecular. El analito macromolecular puede ser,
 por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus,
 receptores o polímeros sintéticos. Las moléculas de unión pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos
 30 nucleicos, péptidos, proteínas de unión o polímeros de unión sintéticos. Por ejemplo, la proteína de unión a folato
 ("FBP") se une al analito folato. Las moléculas de unión sintéticas que pueden unirse a una variedad de analitos
 también se han dado a conocer por Mossbach *et al.* Biotechnology vol. 14, págs. 163-170 (1995).

35 Cuando la fase sólida con el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo marcado se mezcla con una muestra que
 contiene el analito, se forma un complejo de unión entre el analito y los dos anticuerpos. Este tipo de de ensayo a
 menudo se denomina ensayo heterogéneo debido a la implicación de una fase sólida. Entonces puede medirse la
 señal quimioluminiscente o fluorescente asociada con el complejo de unión y puede deducirse la presencia o
 ausencia del analito. Habitualmente, el complejo de unión se separa del resto de los componentes de la reacción de
 40 unión tal como anticuerpo marcado en exceso, antes de la generación de la señal. Por ejemplo, si el complejo de
 unión se asocia con una perla magnética, puede usarse un imán para separar el complejo de unión asociado con la
 perla de la disolución a granel. Mediante el uso de una serie de "patrones", es decir, concentraciones conocidas del

analito, puede generarse una curva "de respuesta a la dosis" usando los dos anticuerpos. Por tanto, la curva de respuesta a la dosis correlaciona una determinada cantidad de señal medida con una concentración específica de analito. En un ensayo de tipo sándwich, cuando aumenta la concentración del analito, también aumenta la cantidad de señal. La concentración del analito en una muestra desconocida puede calcularse entonces comparando la señal generada por una muestra desconocida que contiene el analito macromolecular, con la curva de respuesta a la dosis.

De manera similar, los dos componentes de unión también pueden ser ácidos nucleicos que se unen o hibridan a diferentes regiones de un analito de ácido nucleico. Entonces puede deducirse la concentración del analito de ácido nucleico de manera similar.

Otra clase de inmunoensayos para analitos de molécula pequeña tales como esteroides, vitaminas, hormonas, fármacos terapéuticos o péptidos pequeños emplea un formato de ensayo que se denomina comúnmente un ensayo competitivo. Normalmente, en un ensayo competitivo, un conjugado está compuesto por el analito de interés y un marcador quimioluminiscente o fluorescente uniendo covalentemente las dos moléculas. El analito de molécula pequeña puede usarse como tal o su estructura puede can alterarse antes de la conjugación con el marcador. El analito con la estructura alterada se denomina un análogo. A menudo es necesario usar un análogo estructural del analito para permitir que se produzca la química de unión del marcador con el analito. A veces se usa un análogo estructural de un analito para atenuar o potenciar su unión a una molécula de unión tal como un anticuerpo. Tales técnicas se conocen bien en la técnica. El anticuerpo o una proteína de unión al analito de interés a menudo se inmoviliza sobre una fase sólida o bien directamente o bien a través de una interacción de unión secundaria tal como el sistema biotina-avidina.

La concentración del analito en una muestra puede deducirse en un ensayo competitivo permitiendo que la muestra que contiene el analito y el conjugado analito-marcador compitan por una cantidad limitada de molécula de unión inmovilizada a fase sólida. Cuando aumenta la concentración de analito en una muestra, disminuye la cantidad de conjugado analito-marcador capturado por la molécula de unión sobre la fase sólida. Empleando una serie de "patrones", es decir, concentraciones conocidas del analito, puede construirse una curva de respuesta a la dosis en la que la señal del conjugado analito-marcador capturado por la molécula de unión sobre la fase sólida se correlaciona inversamente con la concentración de analito. Una vez que se ha ideado una curva de respuesta a la dosis de esta manera, puede deducirse la concentración del propio analito en una muestra desconocida comparando la señal obtenida a partir de la muestra desconocida con la señal en la curva de respuesta a la dosis.

Otro formato del ensayo competitivo para analitos de moléculas pequeñas implica el uso de una fase sólida que está inmovilizada con el analito de interés o un análogo de analito y un anticuerpo o una proteína de unión específica para el analito que está conjugado con un marcador quimioluminiscente o fluorescente. En este formato, el conjugado anticuerpo-marcador se captura sobre la fase sólida a través de la interacción de unión con el analito o el análogo de analito sobre la fase sólida. El analito de interés presente en una muestra, se une entonces "de manera competitiva" al conjugado anticuerpo-marcador y por tanto inhibe o sustituye la interacción del conjugado anticuerpo-marcador con la fase sólida. De esta forma, la cantidad de señal generada a partir del conjugado anticuerpo-marcador capturado sobre la fase sólida se correlaciona con la cantidad del analito en la muestra.

Los ésteres de acridinio son marcadores quimioluminiscentes extremadamente útiles especialmente en instrumentos de inmunoquímica automatizados tales como ADVIA:Centaur™ y ACS:180™ de Bayer que usan los ésteres de acridinio hidrolíticamente estables DMAE y NSP-DMAE. Ambos instrumentos tienen alto rendimiento, mediante lo cual se quiere decir que puede realizar un gran número de pruebas de inmunoensayo, 240 y 180 pruebas respectivamente, cada hora. Los reactivos derivados de NSP-DMAE normalmente emiten luz durante un periodo de cinco segundos cuando se desencadena su quimioluminiscencia con la adición de ácido nítrico 100 mM que contiene peróxido de hidrógeno al 0,5% seguido por hidróxido de sodio 0,25 N que contiene un tensioactivo. Los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida y estables de la invención pueden usarse en instrumentos de inmunoquímica automatizados tales como ADVIA:Centaur™ para aumentar su rendimiento. Por "rendimiento aumentado" se quiere decir aumentar el número de pruebas que pueden realizarse en una cantidad dada de tiempo en comparación con otra prueba idéntica en cualquier caso que emplea los ésteres de acridinio DMAE y NSP-DMAE.

Un factor clave que puede afectar al rendimiento de un instrumento de inmunoquímica automatizado usando ésteres de acridinio quimioluminiscentes es el tiempo de medición de luz. En el dispositivo ADVIA:Centaur™, el tiempo de medición de luz es cuatro segundos para la recogida de toda la luz emitida por los reactivos de éster de acridinio. Los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida de la invención permiten reducir los tiempos de medición de luz desde 4 segundos hasta 1-2 segundos cuando se desencadena su quimioluminiscencia usando los reactivos desencadenantes ácido nítrico 100 mM que contiene peróxido de hidrógeno al 0,5% e hidróxido de sodio 0,25 N que contiene un tensioactivo.

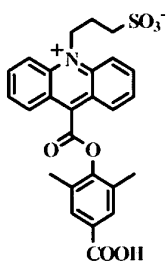
Más específicamente, se ha encontrado que la colocación de heteroátomos, tales como oxígeno, que tiene pares solitarios de electrones en los carbonos de metileno en C-2' y/o C-6' del grupo saliente de fenol, conduce a una emisión de velocidad más rápida a partir de los ésteres de acridinio correspondientes cuando se compara con los

ésteres de acridinio que carecen de estos sustituyentes cuando su quimioluminiscencia se desencadena usando los reactivos ácido nítrico 100 mM que contiene peróxido de hidrógeno al 0,5% e hidróxido de sodio 0,25 N que contiene un tensoactivo. Los carbonos de metileno C-2' y C-6' en el fenol son equivalentes debido a la rotación del grupo fenoxilo. Cuando el éster de acridinio contiene un grupo funcional o sustituyente en uno de estos carbonos, se denomina un sustituyente en el grupo metilo de C-2'.

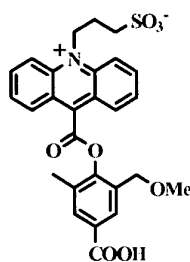
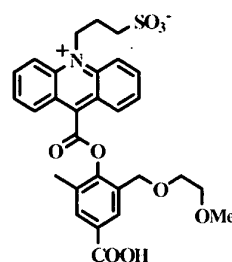
En la tabla 1, se resume la emisión de luz a partir de diversos ésteres de acridinio de la presente invención. Las estructuras químicas de los diversos compuestos de acridinio enumeradas en la tabla 1 se muestran más adelante. Los compuestos de acridinio enumerados en la tabla 1 se sintetizaron usando técnicas de química orgánica bien conocidas por los especialistas en el campo. Los ésteres de acridinio NSP-DMAE y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE (documento US 2005/0221390 A1), que no tienen ningún heteroátomo en los grupos metilo de C-2' o C-6' en el fenilo, se usaron como compuestos de referencia (entradas 1 y 2 en la tabla 1). Mientras que NSP-DMAE no tiene ningún sustituyente en el anillo de acridinio, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE tiene dos restos de O-metoxihexa(etilenglicol) (OMHEG) hidrófilos en los grupos metilo de C-2 y C-7 del anillo de acridinio. En la sección de ejemplos pueden encontrarse detalles de la síntesis relativos a los compuestos en la tabla 1. La emisión de luz a partir de cada compuesto se desencadenó mediante la adición de dos reactivos. El primer reactivo comprendía peróxido de hidrógeno al 0,5% en ácido nítrico 100 mM mientras que el segundo reactivo contenía un tensoactivo en hidróxido de sodio 0,25 N. La luz se midió usando un luminómetro equipado con un tubo fotomultiplicador como detector. La cantidad de luz emitida a partir de cada compuesto se midió en función del tiempo de medición, que se varió. La cantidad de luz emitida en cada tiempo de medición se notificó como unidades relativas de luz (URL) mediante el luminómetro. Se encontró que la cantidad de luz emitida como URL era máxima en un tiempo de medición de 10 s para los ésteres de acridinio más lentos y se asignó que era el 100% en este punto de tiempo para todos los ésteres de acridinio. La emisión de luz en tiempos de medición más cortos se representa como fracciones de este número y también se expresan como porcentajes en la tabla 1. En la sección de ejemplos pueden encontrarse otros detalles relativos a estas mediciones.

Tabla 1. % de URL en el tiempo de medición

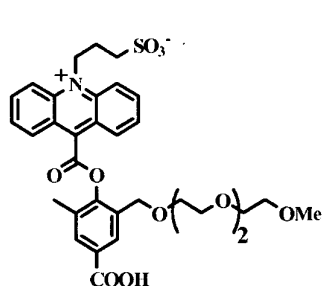
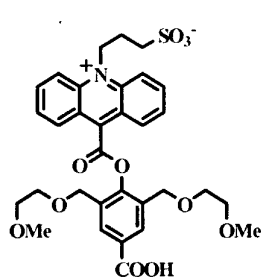
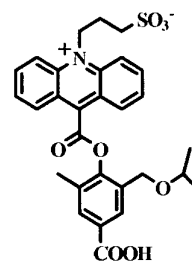
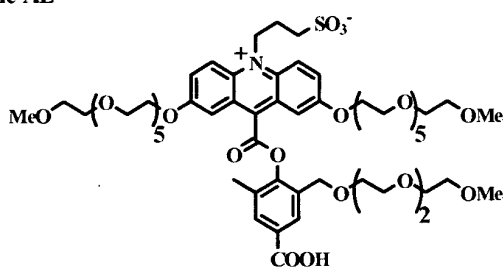
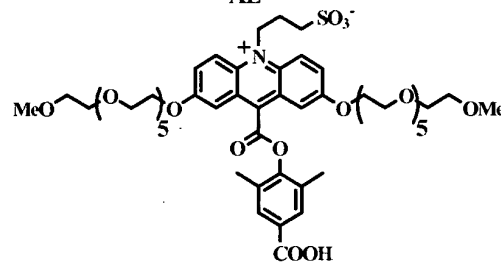
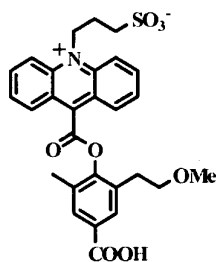
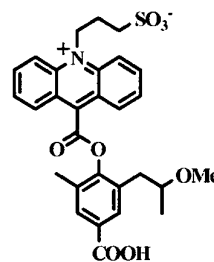
Entrada	Compuesto	0,5 s	1,0 s	2,0 s	5,0 s	10 s
1	NSP-DMAE	4,1	22	47	82	100
2	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE	3	22	50	85	100
3	NSP-2'-(CH ₂ OMc)-6'-Mc-AE	15	69	92	98	100
4	NSP-2'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE	15	80	96	98	100
5	NSP-2'-(CH ₂ O[CH ₂ CH ₂ O] ₂ CH ₂ CH ₂ OMc)-6'-Mc-AE	21	81	92	98	100
6	NSP-2',6'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe) ₂ Me-AE	86	98	99	100	100
7	NSP-2'-(CH ₂ OCH[Mc] ₂)-6'-Me-AE	27	83	93	99	100
8	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -2'-(CH ₂ O[CH ₂ CH ₂ O] ₂ CH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE	39	90	94	99	100
9	NSP-2'-(CH ₂ CH[OMe]Me)-6'-Me-AE	3	21	49	84	100
10	NSP-2'-(CH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE	5	35	68	92	100



NSP-DMAE

NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AENSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6-Mc-AE

30

NSP-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AENSP-2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-AENSP-2'-(CH₂OCH[Me]₂)-6'-Me-AENSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AENSP-2,7 (OMHEG)₂-DMAENSP-2'-(CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AENSP-2'-(CH₂CHOMe[Me])-6'-Me-AE

5 A partir de la inspección de los datos en la tabla 1, puede deducirse que los ésteres de acridinio que contienen los sustituyentes de éter, -OR, en los grupos metilo de C-2' y/o C-6' muestran emisión de luz acelerada, siendo R un grupo alquilo, con o sin heteroátomos adicionales y con o sin ramificación. Este punto es más claramente evidente considerando la cantidad de luz que se emite en el tiempo de medición de 2 segundos para todos los compuestos.

10 Para NSP-DMAE (entrada 1), que carece de sustituyentes -OR en los grupos metilo de C-2' y C-6', el 47% de la luz total se emite en 2 segundos. De manera similar, para NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE, (entrada 2), sólo el 50% de la luz total se emite en 2 segundos. En marcado contraste, el resto de los compuestos enumerados en la tabla 1 de las entradas 3-8, emiten >90% de su luz en el plazo de 2 segundos y todos contienen heteroátomos, en la forma de grupos -OR de éter, en los átomos de carbono de metileno C-2' y/o C-6'. Por ejemplo, los compuestos NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE y NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (entradas 3 y 4, respectivamente), emiten el 92% y el 96% de su luz, respectivamente en 2 segundos. El compuesto NSP-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE, que tiene una cadena de alquilo incluso mayor unida al metileno de C-2', también muestra emisión de luz rápida, emitiéndose el 92% de su luz en 2 segundos (entrada 5, tabla 1). Por tanto, la longitud del grupo alquilo R en el sustituyente -OR no tiene efecto sobre la aceleración de la velocidad, tal como se ilustra para las entradas 3, 4 y 5.

15 Además, la ramificación en R tampoco tiene efecto sobre la emisión de luz rápida. Por ejemplo, el compuesto NSP-2'-(CH₂OCH[Me]₂)-6'-Me-AE, (entrada 7, tabla 1) que tiene ramificación adicional en R, también muestra emisión de luz rápida, emitiéndose el 93% de su luz en 2 segundos. El compuesto NSP-2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-Me-AE (entrada 6, tabla 1) tiene dos sustituyentes de heteroátomo en los carbonos de metilo C-2' y C-6' y muestra una emisión de luz incluso más rápida que los ésteres de acridinio monosustituídos que sólo contienen un heteroátomo en el átomo de carbono de metileno C-2'. Esto es lo más evidente cuando se considera la cantidad de luz que se emite para cada compuesto en el tiempo de medición muy corto de 1,0 segundos. Este compuesto emite el 98% de su luz tras sólo un segundo. El resto de los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida que contienen un heteroátomo en el carbono de metileno C-2' (entradas 3-6, 8) emiten el 69-90% de su luz en un segundo. Los dos compuestos que carecen de heteroátomos en el carbono de metilo C-2', NSP-DMAE y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE (entradas 1 y 2) sólo emiten el 22% de su luz tras un segundo. Los resultados de la tabla 1 también muestran que los grupos funcionales en el anillo de acridinio no inhiben la capacidad de un grupo -OR en el carbono de metilo C-2' de acelerar la emisión de luz. Por tanto, el compuesto NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (entrada 8) emite el 94% de su luz en 2 segundos cuando el compuesto análogo NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE

20

25

30

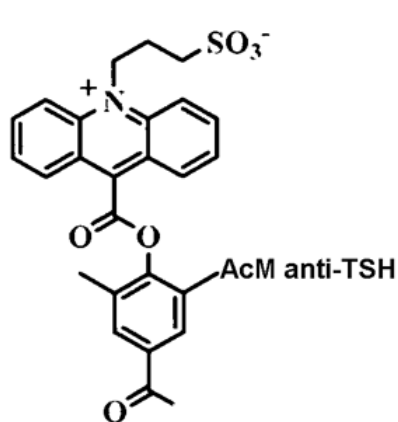
con los mismos grupos funcionales en el anillo de acridinio pero que carece del heteroátomo, emite sólo el 50% de su luz en el mismo tiempo. Finalmente, las entradas 9 y 10 ilustran que para obtener emisión de luz rápida, el grupo -OR de heteroátomo debe estar situado directamente en el carbono de metileno C-2'. Para los dos compuestos, NSP-2'-(CH₂CH[OMe]Me)-6'-Me-AE (entrada 9) y NSP-2'-(CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (entrada 10) que tienen átomos de carbono intermedios adicionales entre el carbono de metileno C-2' y el grupo -OR, la emisión de luz es mucho más lenta. Estos dos compuestos sólo emiten el 49% y el 68% de su luz, respectivamente, tras 2 segundos. Por tanto, el grupo funcional -CH₂OR en el carbono de metileno C-2' es ineficaz en acelerar la emisión de luz a partir de ésteres de acridinio que contienen este grupo funcional, mientras que el grupo -OR es eficaz. El grupo -OR no es único y también puede esperarse que otros heteroátomos con par(es) solitario(s) de electrones en grupos funcionales tales como tioéter (-SR) y amina (-NR₂) aceleren la emisión de luz a partir de ésteres de acridinio que contienen estos grupos funcionales en los átomos de carbono de metilo C-2' y/o C-6'. El grupo R, tal como se mostró anteriormente, no tiene ningún efecto sobre la emisión de luz y por tanto puede ser cualquier grupo alquilo o arilo o alguna combinación de éstos con o sin grupos funcionales adicionales ubicados en el grupo R.

Los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida de la presente invención también muestran emisión de luz rápida cuando se conjugan con macromoléculas tales como proteínas o moléculas pequeñas tales como esteroides. En la tabla 2 se resume la emisión de luz a partir de conjugados de éster de acridinio de un anticuerpo monoclonal anti-TSH (AcM anti-TSH) y conjugados de cortisol. Estas mediciones se realizaron tal como se describió anteriormente para los datos en la tabla 1, sólo en este caso se observó que la emisión de luz medida a los 5 segundos era máxima para los conjugados de éster de acridinio más lentos y se asignó que era el 100% para todos los conjugados. Los analitos TSH (hormona estimulante de la tiroides) y el esteroide cortisol se miden comúnmente mediante técnicas inmunoquímicas. Las estructuras de los ésteres de acridinio y los conjugados se ilustran en los dibujos tras la tabla 2. En la sección de ejemplos se describen en detalle detalles de la síntesis relativos a los conjugados.

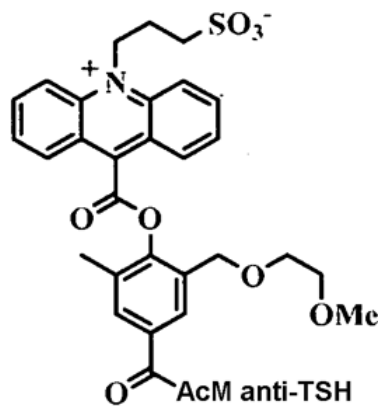
Tabla 2. % de URL en el tiempo de medición

Entrada	Conjugado	0,5 s	1,0 s	2,0 s	5,0 s
1	NSP-DMAE-AcM anti-TSH	21	69	87	100
2	NSP-DMAE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH	8	52	85	100
3	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE-AC-AcM anti-TSH	15	62	89	100
4	NSP-2'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH	68	94	98	100
5	NSP-2'-(CH ₂ OCHMe ₂)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH	66	98	98	100
6	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -2'-(CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-AC-AcM anti-TSH	66	98	98	100
7	NSP-2'-(CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH	48	94	97	100
8	NSP-2'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH	52	90	97	100
9	NSP-DMAE-HEG-Cortisol	5	38	78	100
10	NSP-2'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol	46	98	98	100
11	NSP-2'-(CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol	36	96	100	100

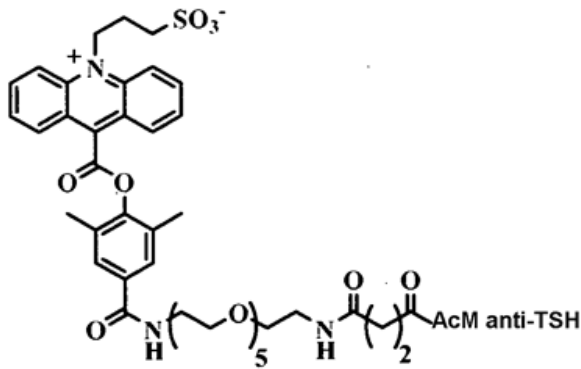
Se midió la quimioluminiscencia en un luminómetro Magic Lite Analyzer (MLA1, Bayer Diagnostics). Para las mediciones, se prepararon muestras de los diversos compuestos en fosfato 10 mM, pH 8, que contenía NaCl 150 mM, BSA al 0,05% y azida sódica al 0,01%.



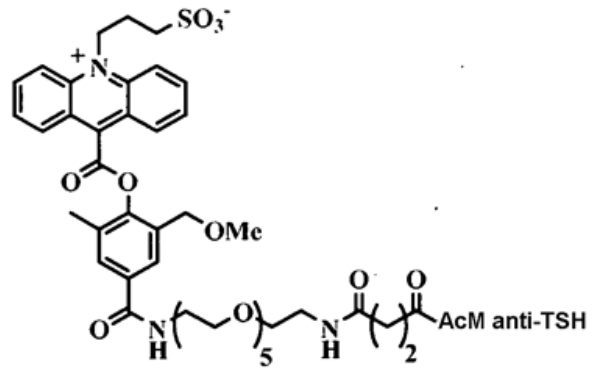
NSP-DMAE-AcM anti-TSH



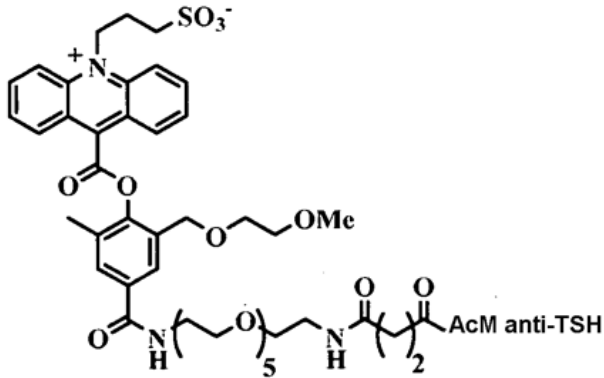
NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH



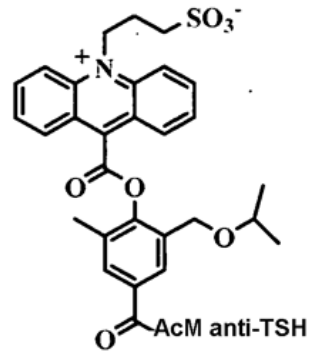
NSP-DMAE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH



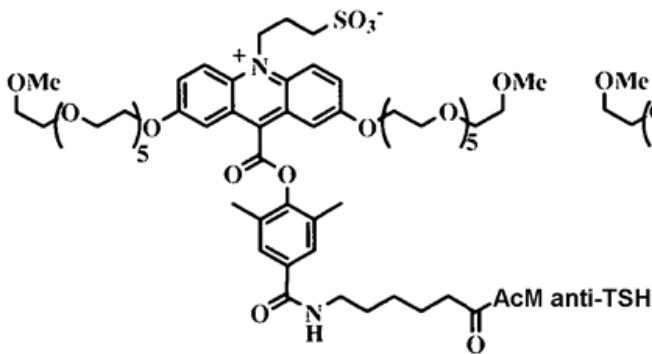
NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH



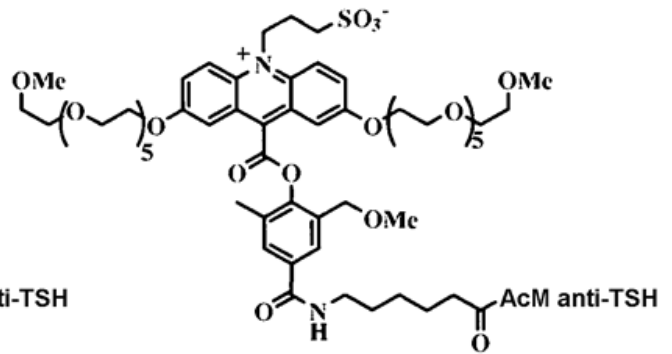
NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato-AcM anti-TSH



NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH

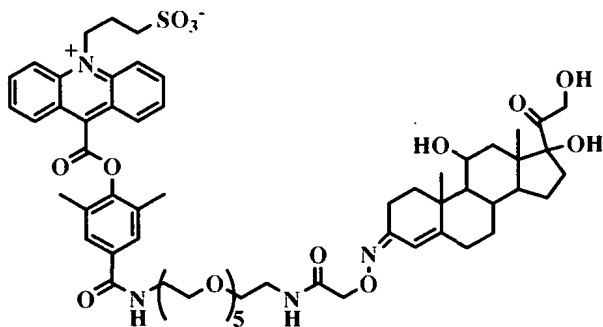


NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-AcM anti-TSH

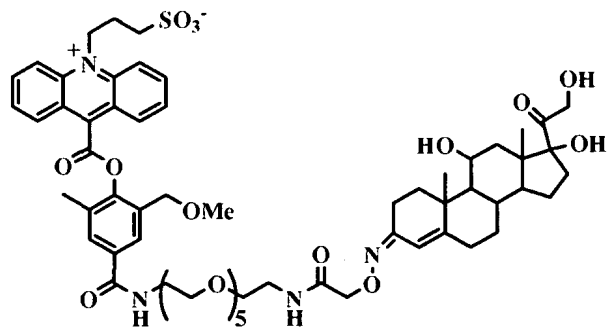


NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-AC-AcM anti-TSH

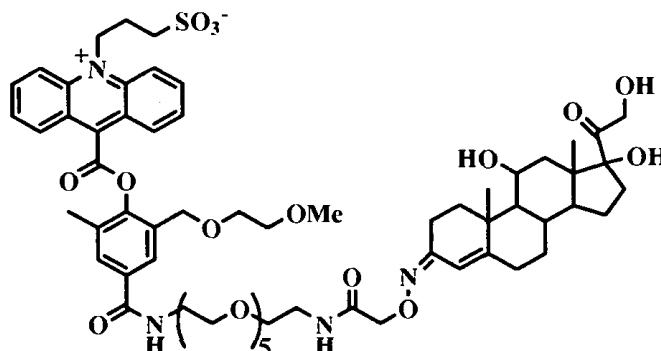
5



NSP-DMAE-HEG-Cortisol



NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol



NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol

Los datos en la tabla 2 muestran que los ésteres de acridinio que contienen heteroátomos en el carbono de metileno C-2' muestran emisión de luz rápida incluso cuando se conjugan con otras moléculas. Los ésteres de acridinio que carecen de heteroátomos en el carbono de metilo C-2' muestran emisión de luz más lenta. Por ejemplo, los conjugados de AcM anti-TSH derivados de NSP-DMAE (entrada 1, tabla 2) y NSP-DMAE-HEG-glutarato (entrada 2, tabla 2) emiten el 69% y el 52% de su luz en un segundo, respectivamente. De manera similar, el conjugado de AcM anti-TSH del éster de acridinio NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC, que contiene restos de -OMHEG en C-2 y C-7 en el anillo de acridinio pero no heteroátomos en el carbono de metilo C-2', emite el 62% de su luz en un segundo (entrada 3, tabla 2). Por el contrario, los conjugados de AcM anti-TSH derivados de compuestos que contienen heteroátomos en el carbono de metileno C-2' muestran todos emisión de luz rápida (entradas 4-8, tabla 2). Por tanto, el conjugado de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (entrada 4) emite el 94% de su luz en un segundo. De manera similar, los conjugados de NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE (entrada 5), NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato (entrada 7) y NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato (entrada 8) emiten el 94%, el 98% y el 90% de su luz, respectivamente, en un segundo. El conjugado de NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-AC, (entrada 6) que además de contener grupos funcionales OMHEG en el anillo de acridinio también contiene un heteroátomo en el carbono de metileno C-2' muestra también emisión de luz rápida, emitiéndose el 98% de su luz en un segundo.

Los conjugados de cortisol de los ésteres de acridinio muestran tendencias similares. El conjugado NSP-DMAE-HEG-Cortisol (véase la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2 para estructuras similares y síntesis de NSP-DMAE-HEG), que no contiene ningún heteroátomo en el carbono de metilo C-2', emite sólo el 38% de su luz en un segundo (entrada 9). Por el contrario, ambos conjugados NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol y NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol (entradas 10 y 11) que contienen oxígeno en el carbono de metileno C-2' emiten el 98% y el 96% de su luz en un segundo, respectivamente.

Además de mostrar emisión de luz rápida, los ésteres de acridinio de la presente invención también muestran buena estabilidad. Por "estabilidad" quiere decirse una pérdida mínima de URL (es decir, inferior al 25%, preferiblemente inferior al 20% y más preferiblemente inferior al 15%) cuando los compuestos o conjugados se almacenan en una disolución acuosa normalmente en el intervalo de pH de 7-8, que está dentro del pH fisiológico. Desde un punto de vista mecanístico, la hidrólisis del éster fenólico es la principal ruta por la que los ésteres de acridinio quimioluminiscentes dejan de ser quimioluminiscentes. Los conjugados estables garantizan una vida útil de almacenamiento larga para los reactivos de éster de acridinio y también garantizan que el rendimiento del ensayo no varíe mucho a lo largo de un periodo de tiempo dado. La estabilidad de diversos conjugados de éster de acridinio de la presente invención se enumera en la tablas 3 y 4. Se almacenaron disoluciones acuosas de los conjugados a temperatura ambiente en un tampón acuoso a pH 7,7 y se registraron periódicamente las URL. A las URL que se midieron en el punto de tiempo inicial, también denominado día 0, se les asignó un valor del 100%. Las URL que se midieron en otros puntos de tiempo se expresan como porcentajes de este número. En la sección de ejemplos pueden encontrarse otros detalles relativos a estas mediciones.

Tabla 3. % de URL

Tiempo (días)	NSP-DMAE-AcM anti-TSH	NSP-2'-(CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH	NSP-2'-(CH ₂ OCHMe ₂)-6'-Me-AE-AcM anti-TSH
0	100	100	100
7	95	95	97
13	97	93	94
20	93	87	90
27	92	82	93

Tabla 4. % de URL

Tiempo (días)	NSP-DMAE-HEG-Cortisol	NSP-2'-(CH ₂ OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol
0	100	100
1	101	106
2	99	104
6	102	105
9	105	108
14	108	102
23	98	91
27	104	95

5 Tal como puede observarse a partir de las tablas 3 y 4, los conjugados de AcM anti-TSH y cortisol de los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida de la presente invención son bastante estables al cambio de URL. Incluso tras 27 días a temperatura ambiente, los conjugados de AcM anti-TSH de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE y NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE conservan el 82% y el 93% de su señal quimioluminiscente inicial, respectivamente, en comparación con NSP-DMAE que conserva el 92% de su quimioluminiscencia inicial. Los conjugados de cortisol de NSP-DMAE y NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE de emisión de luz rápida muestran retención del 104% y el 95% de sus URL iniciales, respectivamente, tras el almacenamiento a temperatura ambiente durante 27 días.

Según lo anterior, un ensayo para la detección o cuantificación de un analito comprende, según una realización de la invención, las siguientes etapas:

15 (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) cualquiera de los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables de la invención que tienen heteroátomos, preferiblemente oxígeno, en el grupo metilo de C-2', tal como se define en el presente documento;

20 (b) proporcionar un soporte sólido sobre el que está inmovilizada una segunda molécula de unión específica para dicho analito;

(c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

25 (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;

(e) desencadenar quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;

30 (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y

(g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

35 En otra realización, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de:

40 (a) proporcionar un conjugado de un analito con cualquiera de los ésteres de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estables de la invención que tienen heteroátomos, preferiblemente oxígeno, en el grupo metilo de C-2', tal como se define en el presente documento;

(b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;

45 (c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

(d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;

50 (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;

(f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y

55 (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una

concentración conocida del analito.

Los analitos macromoleculares pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus, polímeros sintéticos y similares.

Los analitos de molécula pequeña pueden ser esteroides, vitaminas, hormonas, fármacos terapéuticos, péptidos pequeños y similares.

Las moléculas de unión en los ensayos pueden ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de unión, un ácido nucleico, un péptido, un receptor o una molécula de unión sintética.

Ejemplo 1

Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-NHS, NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG, éster de NHS de NSP-2'-(CH₂OCH₂OCH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-glutarato y NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-cortisol

a) Síntesis de 3,5-dimetil-4-hidroxibenzoato de metilo

Se enfrió una disolución de ácido 3,5-dimetil-4-hidroxibenzoico (2 g, 0,012 mol) en metanol anhidro (60 ml) en un baño de hielo y se añadió gota a gota cloruro de tionilo (5 ml) a esta disolución. Se agitó la reacción en el baño de hielo durante una hora y entonces se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Entonces se añadió bicarbonato de sodio sólido para neutralizar el ácido y luego se evaporó la mezcla hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se repartió el residuo entre acetato de etilo y agua (100 ml cada uno). Se separó la fase de acetato de etilo y se lavó una vez con salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 2,146 g, polvo blanco.

b) Síntesis de 4-acetoxi-3,5-dimetilbenzoato de metilo

Se enfrió una disolución de 3,5-dimetil-4-hidroxibenzoato de metilo (2,146 g) en piridina (20 ml) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota anhídrido acético (5 ml) y tras 30 minutos a 0°C, se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2-3 horas. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el producto bruto en acetato de etilo (50 ml). Se lavó esta disolución con HCl 1 N, agua y salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 2,4 g, polvo blanco.

c) Síntesis de 4-acetoxi-3-bromometil-5-metilbenzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-acetoxi-3,5-dimetilbenzoato de metilo (2,4 g) en tetracloruro de carbono (35 ml) con AIBN (azobisisobutironitrilo, 0,177 g, 0,1 equivalentes) y NBS (N-bromosuccinimida, 2,117 g, 1,1 equivalentes). Se calentó la reacción a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 6 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con cloroformo (30 ml). Se lavó esta disolución con agua (4 x 50 ml) y entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se recuperó un sólido ceroso, de color hueso. Rendimiento = 4,63 g. Se usó el bromuro bruto como tal para la siguiente reacción.

d) Síntesis de 3-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo

Se calentó una suspensión de 4-acetoxi-3-bromometil-5-metilbenzoato de metilo bruto (~0,5 g) en 5 ml de 2-metoxietanol junto con bicarbonato de sodio (0,765 g, ~5 equivalentes) a 90-95°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 2 horas, el análisis de CCF indicó conversión completa. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (40 ml) y agua (40 ml). Se separó la fase de acetato de etilo y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Entonces se filtró y se evaporó hasta sequedad proporcionando 338 mg de un aceite viscoso que se purificó mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 25%/hexanos. Rendimiento purificado = 83 mg (aceite viscoso).

e) Síntesis de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (66 mg, 0,6 mmol) en piridina (5 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (115 mg, 0,6 mmol). Tras agitar vigorosamente durante 10 minutos, se añadió una disolución de 3-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (76 mg, 0,3 mmol) en piridina (1 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo (40 ml). Se lavó esta disolución repetidamente con bicarbonato de sodio acuoso saturado hasta que la fase de bicarbonato era transparente. Entonces se lavó la fase de cloroformo una vez con HCl 1 N y salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (128 mg) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/cloroformo. Rendimiento purificado = 94 mg (70%).

f) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (94 mg, 0,21 mmol), 1,3-propanosulfona (2,6 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (0,17 g, 10 equivalentes) en un baño de aceite a 140-145°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 2 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con 30 ml de una mezcla 1:1 de acetato de etilo y hexanos. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo varias veces con acetato de etilo/hexanos y luego se secó a vacío proporcionando éster metílico de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE. EM MALDI-TOF 581,9 obs.

Se suspendió el éster de acridinio bruto en 4 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 2,5 h, el análisis de HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró producto, procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 13,4 minutos. (EM MALDI-TOF 567,2 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18, de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo del disolvente de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 77 mg (64%), polvo amarillo.

g) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-NHS

Se trató una disolución de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (7,1 mg, 12,5 umoles) en DMF (dimetilformamida, 1 ml) con diisopropiletilamina (6,4 ul, 3 equivalentes) y TSTU (tetrafluoroborato de O-N-succinimidilurano, 5,6 mg, 1,5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 15 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró conversión completa en producto eluyendo a 14,7 minutos (EM MALDI-TOF 665,2 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (f). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad.

h) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG

Se trató una disolución de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE (44 mg, 77,5 umoles) en DMF (dimetilformamida, 2 ml) con diisopropiletilamina (20 ul, 1,5 equivalentes) y TSTU (26 mg, 1,1 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró conversión completa en el éster de NHS. Entonces se añadió gota a gota esta disolución en DMF a una disolución de diamino-HEG (patente estadounidense n.º 6.664.043 B2, 0,1 g, 5 equivalentes) en DMF (2 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos adicionales, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró conversión completa en producto eluyendo a Rt = 12,5 minutos (EM MALDI-TOF 830,5 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (f). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 51 mg (70%), aceite viscoso amarillo.

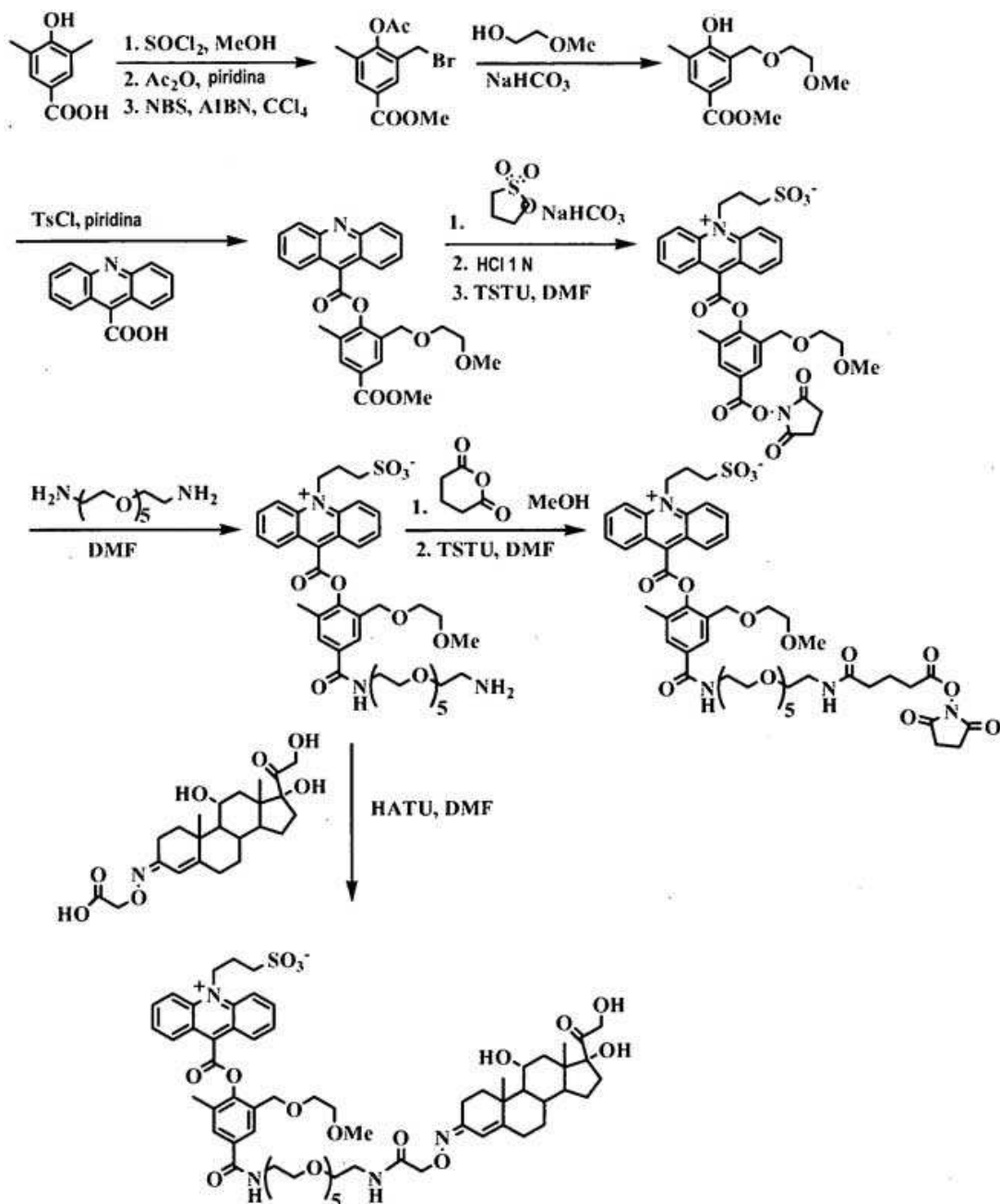
i) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarate y su éster de NHS

Se trató una disolución de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG (30 mg, 0,032 mmol) en metanol (3 ml) con diisopropiletilamina (28 ul, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (18 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró ~80% de conversión en producto eluyendo a Rt = 13,9 minutos. Se añadieron 2,5 equivalentes adicionales de cada uno de diisopropiletilamina (14 ul) y anhídrido glutárico (9 mg) y se continuó la reacción durante 30 minutos adicionales. Entonces se diluyó la reacción con tolueno (5 ml) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el residuo en DMF (2 ml) y se trató con diisopropiletilamina (28 ul, 5 equivalentes) y TSTU (48 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente y tras una hora, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró conversión completa en producto eluyendo a Rt = 15 minutos (EM MALDI-TOF 1042,0 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (f). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 21,6 mg (65%), sólido oleoso amarillo.

j) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol

Se trató una disolución de cortisol-3-CMO (Sigma, 4,6 mg, 10,6 umoles) en DMF (0,5 ml) con diisopropiletilamina (2,2 ul, 1,2 equivalentes) y HATU (4,8 mg, 1,2 equivalentes). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió una disolución de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG (5 mg, 5,3 umoles) en DMF (1 ml) junto con diisopropiletilamina (2 ul, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 2 horas, el análisis de HPLC tal como se describe en (f) mostró producto eluyendo a Rt = 17,8 minutos (EM MALDI-TOF 1249,2 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (f). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 4,8 mg (73%), polvo amarillo.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE-NHS, NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG, éster de NHS de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-glutarato y NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-cortisol.



Ejemplo 2

5

Síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE, NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG, éster de NHS de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-glutarato y NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-cortisol

10

a) Síntesis de 3-metoximetil-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo

15

Se mezcló una suspensión de 4-acetoxi-3-bromometil-5-metilbenzoato de metilo bruto (4,63 g, 0,00154 mol) en metanol (100 ml) con bicarbonato de sodio (6,48 g, 5 equivalentes). Se sometió a reflujo la mezcla bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 1,5 horas, el análisis de CCF mostró conversión completa. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). Se separó la fase de acetato de etilo y se lavó con agua. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (1,5 g) mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/hexanos como eluyente. Rendimiento purificado = 0,833 g (40%), sólido ceroso blanco.

b) Síntesis de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (0,423 g, 1,9 mmol) en piridina anhidra (15 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (362 mg, 1,9 mmol). Se agitó la reacción vigorosamente bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 10-15 minutos, se añadió una disolución de 3-metoximetil-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (0,2 g, 0,95 mmol) en piridina (5 ml) y se agitó la reacción resultante a temperatura ambiente durante 5 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo (50 ml). Se lavó la disolución en cloroformo repetidamente con bicarbonato de sodio acuoso saturado hasta que la fase acuosa era transparente. Entonces se lavó la disolución en cloroformo con HCl 1 N y agua. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida proporcionando 0,41 g de producto bruto que se purificó mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/cloroformo. Rendimiento purificado = 300 mg (76%), polvo amarillo, EM MALDI-TOF 414,9 obs.

c) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (0,1 g, 0,24 mmol), 1,3-propanosulfona (2,94 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (0,2 g, 10 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 45 minutos, la reacción solidificó. Se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm tal como se describe en el ejemplo 1 (f). Se observó producto eluyendo a Rt = 15,5 minutos. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se añadieron 25-30 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo varias veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 20 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 1,5 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 13,0 minutos. (EM MALDI-TOF 524,1 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 63,6 mg (60%), polvo amarillo.

d) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG

Se trató una disolución de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE (64 mg, 121,4 umoles) en DMF (6 ml) con diisopropiletilamina (32 ul, 1,5 equivalentes) y TSTU (40 mg, 1,1 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe en (c) mostró conversión completa en el éster de NHS eluyendo a Rt = 14 minutos. Entonces se añadió gota a gota esta disolución en DMF a una disolución de diamino-HEG (0,17 g, 5 equivalentes) en DMF (3 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 15 minutos adicionales, el análisis de HPLC tal como se describe en (c) mostró conversión completa en producto eluyendo a Rt = 12,4 minutos (EM MALDI-TOF 786,1 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (c). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 61 mg (64%), aceite viscoso amarillo.

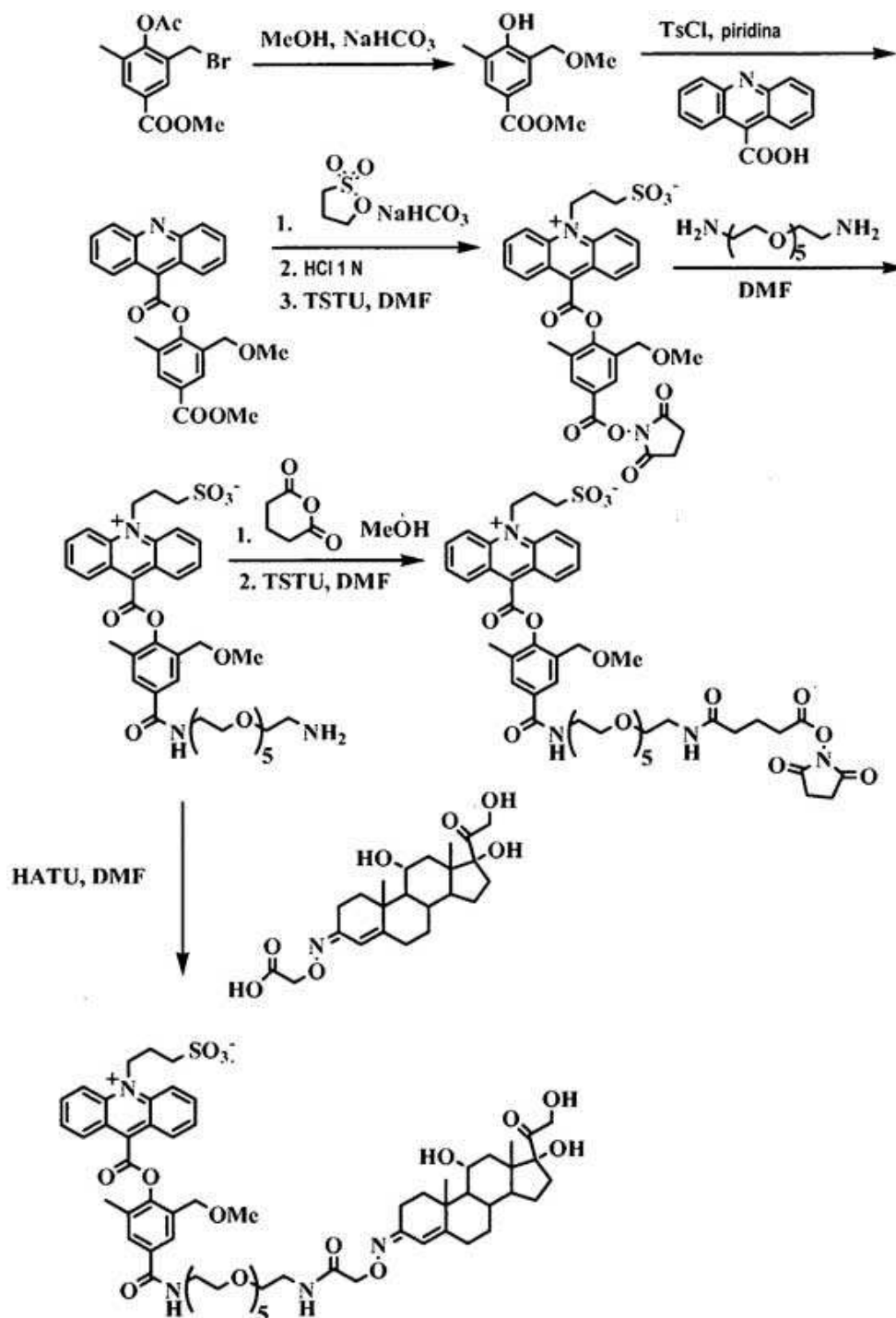
e) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-glutarato y su éster de NHS

Se trató una disolución de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG (30 mg, 33,4 umoles) en metanol (3 ml) con diisopropiletilamina (11,6 ul, 66,7 umoles) y anhídrido glutárico (7,6 mg, 66,7 umoles). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos, se añadieron diisopropiletilamina (11,6 ul) y anhídrido glutárico (7,6 mg) adicionales y se continuó la reacción durante 60 minutos adicionales. El análisis de HPLC tal como se describe en (c) mostró conversión limpia en producto eluyendo a Rt = 13,6 minutos (EM MALDI-TOF 899,0 obs.). Entonces se diluyó la reacción con tolueno (5 ml) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el residuo en DMF (2 ml) y se trató con diisopropiletilamina (29 ul, 5 equivalentes) y TSTU (57 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente y tras 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe en (c) mostró conversión completa en producto eluyendo a Rt = 14,9 minutos (EM MALDI-TOF 998,6 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (c). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 33,4 mg (100%), sólido oleoso amarillo.

f) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG-Cortisol

Se trató una disolución de cortisol-3-CMO (Sigma, 4,8 mg, 11,02 umoles) en DMF (0,5 ml) con diisopropiletilamina (2,1 ul, 1,1 equivalentes) y HATU (5,0 mg, 1,2 equivalentes). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió una disolución de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE-HEG (5 mg, 5,6 umoles) en DMF (1 ml) junto con diisopropiletilamina (2 ul, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 0,5 horas, el análisis de HPLC tal como se describe en (c) mostró producto eluyendo a Rt = 17,8 minutos (EM MALDI-TOF 1204,5 obs.). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa tal como se describe en (c). Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 5,1 mg (76%), polvo amarillo.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE, NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG, éster de NHS de NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-glutarato y NSP-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE HEG-cortisol.



5

Ejemplo 3

Síntesis de NSP-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

10 a) Síntesis de 3-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo

Se enfrió metoxitri(etilen)glicol (Aldrich, 0,295 g, 1,8 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 10 ml) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (72 mg, 1,8 mmol, dispersión al 60%). Se agitó la reacción a 0°C durante 20 minutos y entonces se añadió una disolución enfriada con hielo de 4-acetoxi-3-bromometil-5-metilbenzoato de metilo (0,9 mmol, 270 mg) en THF (3 ml). Se agitó la reacción a 0°C durante 30

15

minutos, momento en el que el análisis de CCF sobre sílice mostró el consumo completo del material de partida. Entonces se extinguió la reacción con metanol (5 ml) y acetato de etilo (5 ml). Luego se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se disolvió el residuo en cloroformo (50 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso y salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (0,44 g) mediante CCF preparativa usando metanol al 2%/cloroformo. Rendimiento = 0,118 g (40%), aceite, EM MALDI-TOF 366 obs. M + Na+.

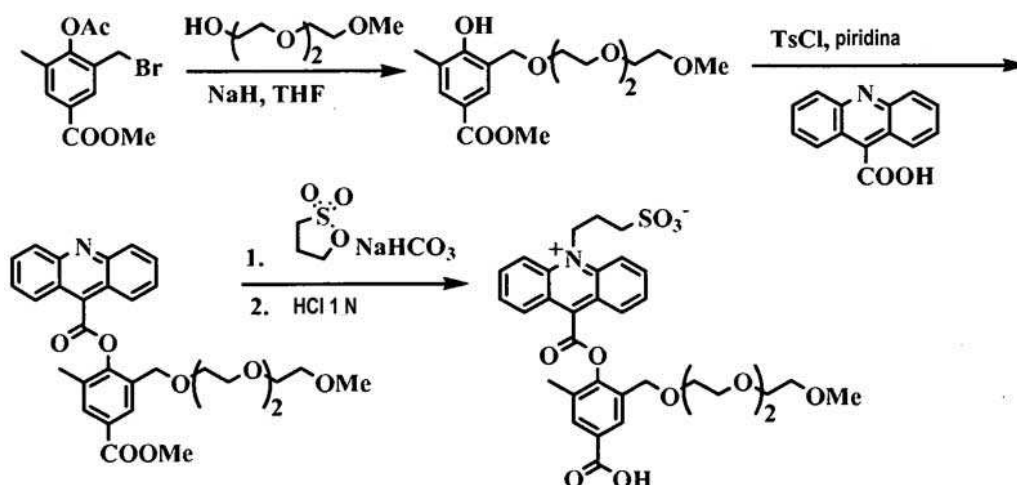
b) Síntesis de 9-carboxilato de acridin-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

Se trató una disolución de 3-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (20 mg, 58,5 umoles) en piridina (1 ml) a 0°C con cloruro de acridin-9-carbonilo (27 mg, 2 equivalentes). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente a medida que el baño de hielo se derretía y se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo (30 ml). Se lavó esta disolución con bicarbonato de sodio acuoso saturado, cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto mediante CCF preparativa sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 20%/cloroformo. Rendimiento = 11,6 mg (36%), EM MALDI-TOF 548,9 obs.

c) Síntesis de NSP-2'-(CH₂[OCH₂CH₂OCH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (11,6 mg, 21,2 umoles), 1,3-propanosulfona (0,5 g, 200 equivalentes) y bicarbonato de sodio (36 mg, 20 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 3 horas se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y detección por UV a 260 nm. Se observó producto eluyendo a Rt = 16,3 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con 10 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 3,5 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 1,5 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 13,6 minutos. (EM MALDI-TOF 657,9 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 4,5 (32%), polvo amarillo.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE.



40 **Ejemplo 4**

Síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE, NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMce)-6'-Me-AE y su éster de NHS

45 a) Síntesis de éster metílico de 2,7-dimetoxiacridina

Se suspendió ácido 2,7-dimetoxiacridin-9-carboxílico bruto (patente estadounidense n.º 5.521.103, 0,5 g) en cloruro de tionilo (5 ml) y se sometió a reflujo la suspensión bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras una hora, se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadieron hexanos (40 ml). Se recogió el sólido precipitado por filtración y se enjuagó

con hexanos. Entonces se secó el producto (~0,5 g) a vacío. Se disolvió entonces en una disolución enfriada con hielo de piridina/metanol 4:1 y se agitó la reacción a 0°C durante una hora y entonces se calentó hasta temperatura ambiente durante 36 h. Luego se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo (50 ml). Se lavó esta disolución con HCl 1 N seguido por bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. Entonces se secó la fase de cloroformo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 231 mg, polvo amarillo rojizo.

b) Síntesis de éster metílico de 2,7-hidroxiacridina

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dimetoxiacridina (0,23 g) en diclorometano (20 ml) con una disolución en diclorometano de tribromuro de boro (1 M, 15 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 48 h. Entonces se enfrió en un baño de hielo y se añadió lentamente metanol (20 ml). Tras la adición, se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. Entonces se neutralizó la reacción con la adición de bicarbonato de sodio sólido y se evaporó la suspensión hasta sequedad. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se separó la fase de acetato de etilo, se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Entonces se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 80 mg, EM MALDI-TOF 270,0 obs.

c) Síntesis de éster metílico de 2,7-(OMHEG)₂-acridina

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxiacridina (80 mg, 0,296 mmol) en THF anhidro (10 ml) con monotosilato de metoxihexa(etilen)glicol (documento US 2005/0221390 A1, 0,4 g, 3 equivalentes) y carbonato de cesio (96,5 mg, 3 equivalentes). Se sometió a reflujo la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 4 horas, el análisis de HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró conversión completa en producto eluyendo a 18,2 minutos (EM MALDI-TOF 827,0 obs.). Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. Se repartió el residuo entre cloroformo (30 ml) y disolución de cloruro de amonio acuosa saturada. Se separó la fase de cloroformo y se lavó una vez más con disolución de cloruro de amonio seguido por salmuera. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (0,32 g) mediante CCF preparativa sobre sílice usando metanol al 5%/cloroformo. Rendimiento = 40 mg (16%), sólido oleoso.

d) Síntesis de ácido 2,7-(OMHEG)₂-acridin-9-carboxílico

Se agitó una disolución de éster metílico de 2,7-(OMHEG)₂-acridina en hidróxido de potasio 2 N a temperatura ambiente durante 16 horas, momento en el que el análisis de CCF mostró hidrólisis completa. Entonces se enfrió la reacción en un baño de hielo y se neutralizó con HCl concentrado. Se evaporó esta disolución hasta sequedad y se disolvió el residuo en metanol (5 ml), se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 57 mg (100%).

e) Síntesis de 9-carboxilato de 2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

Se trató una disolución de ácido 2,7-(OMHEG)₂-acridin-9-carboxílico (54 mg, 66,4 umoles) en piridina (1 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (32 mg, 2,5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos y entonces se añadió 3-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (20 mg, 58,5 umoles) en piridina (1 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en MeCN (5 ml). El análisis de HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró ~50% de conversión en producto eluyendo a Rt = 22,6 minutos (MALDITOF MS 1140,6 obs.). Se purificó el producto mediante CCF preparativa sobre sílice usando metanol al 5%/cloroformo. Rendimiento = 10 mg, el 36% basándose en un 50% de conversión).

f) Síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-2-(CH₂O[CH₂CH₂O]CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

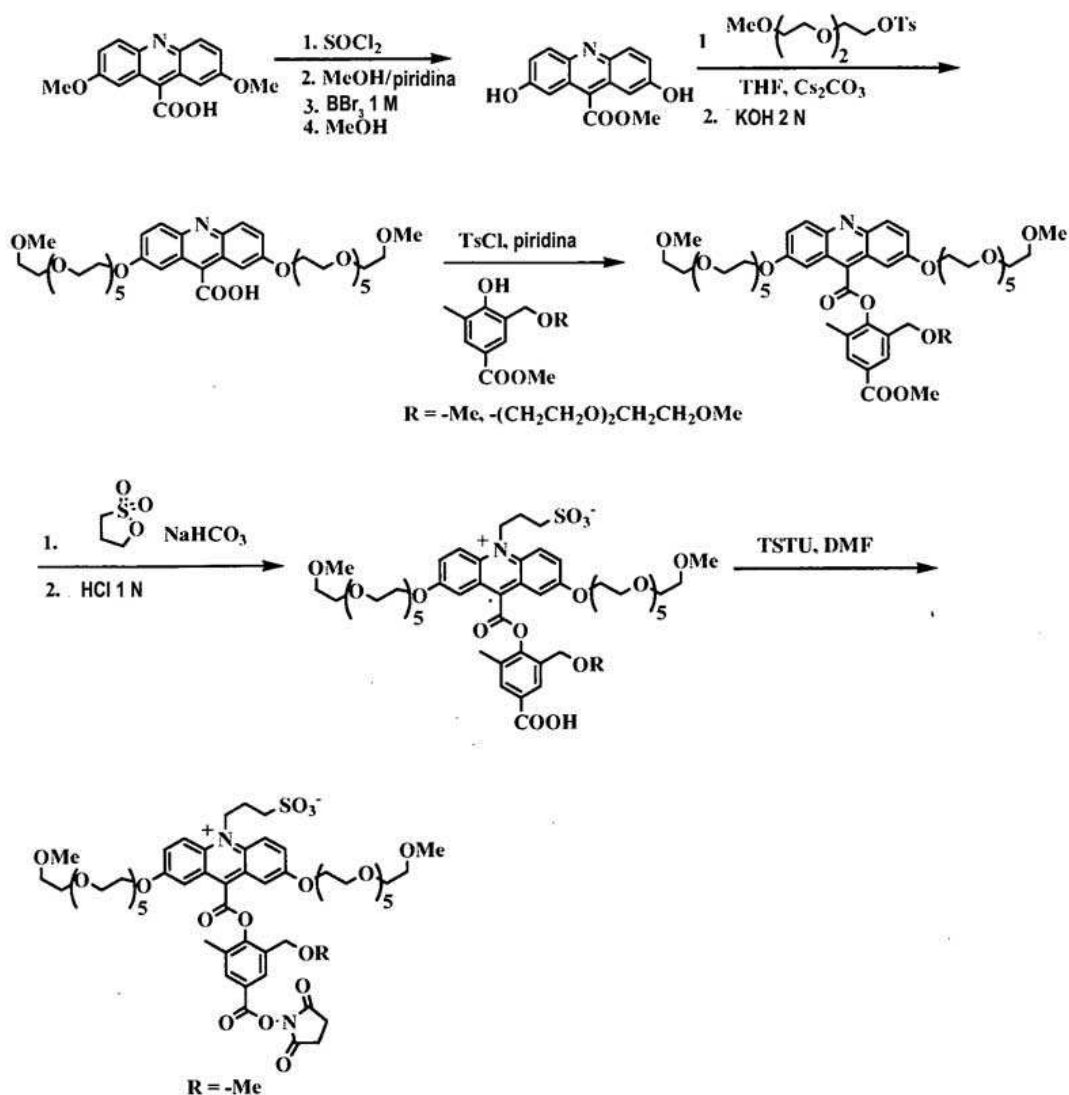
Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (10 mg, 8,8 umoles), 1,3-propanosulfona (0,2 g, 200 equivalentes) y bicarbonato de sodio (15 mg, 20 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras una hora, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 3,0 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 1,5 h, el análisis de HPLC tal como se describe en (e) mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 16,7 minutos. (EM MALDI-TOF 1249,7 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad.

g) Síntesis de 9-carboxilato de 2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

5 Se trató una disolución de ácido 2,7-(OMHEG)₂-acridin-9-carboxílico (120 mg, 146 umoles) en piridina (7 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (56 mg, 2,0 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 5 minutos y entonces se añadió 3-metoximetil-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (61 mg, 2 equivalentes) en piridina (3 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 5 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en tolueno (10 ml) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el residuo en cloroformo (5 ml). El análisis de HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró producto eluyendo a Rt = 22,8 minutos (EM MALDI-TOF 1005,8 obs.). Se purificó el producto mediante CCF preparativa sobre sílice usando metanol al 2%/cloroformo. Rendimiento = 70 mg, 62%, sólido oleoso amarillo rojizo.

h) Síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE y su éster de NHS

15 Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (70 mg), 1,3-propanosultona (1 g) y bicarbonato de sodio (75 mg) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 2 horas, se trató la reacción con 0,5 g adicionales de 1,3-propanosultona y 44 mg bicarbonato de sodio y se calentó durante una hora más. Entonces se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 20 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 1,5 h, el análisis de HPLC tal como se describe en (e) mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 16,5 minutos. (EM MALDI-TOF 1114,3 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 29,5 mg (39%). Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂O[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE, NSP-2,7-(OMHEG)₂-2'-(CH₂OMe)-6'-Me-AE y su éster de NHS.



Ejemplo 5

5 Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-6'-Me-AE

a) Síntesis de 4-acetoxi-3,5-bis(bromometil)benzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-acetoxi-3,5-dimetilbenzoato de metilo (1,13 g, 0,0051 mol) en tetracloruro de carbono (30 ml) con AIBN (210 mg, 0,25 equivalentes) y NBS (2,27g, 2,5 equivalentes). Se sometió a reflujo la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno durante 6 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con cloroformo (30 ml). Se lavó esta disolución con agua (4 x 50 ml). Entonces se secó la disolución en cloroformo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad dando el dibromuro bruto como un sólido ceroso. Rendimiento = 1,18 g. Se usó este material sin purificación en la siguiente reacción.

b) Síntesis de 3,5-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-4-hidroxibenzoato de metilo

Se mezcló 4-acetoxi-3,5-bis(bromometil)benzoato de metilo bruto (0,5 g) con monometil éter de etilenglicol (20 ml) y bicarbonato de sodio (0,55 g, 5 equivalentes). Se calentó la mezcla en un baño de aceite a 90°C durante 3 horas, momento en el que el análisis de CCF indicó que no quedaba material de partida. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se suspendió el residuo en acetato de etilo (30-40 ml) y se filtró. Se lavó el filtrado con disolución de cloruro de amonio acuosa saturada. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (0,194 g) mediante CCF preparativa sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 40%/hexanos. Rendimiento purificado = 52 mg (aceite viscoso).

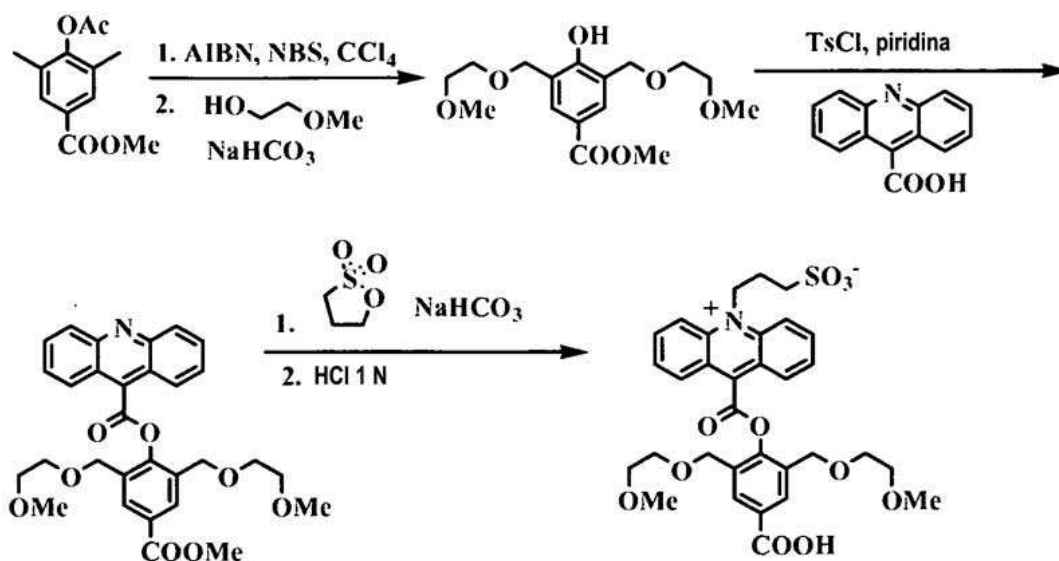
c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-4'-metoxicarbonilfenil-acridina

Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (71 mg, 0,317 mol) en piridina (15 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (60 mg, 0,317 mmol). Se agitó la reacción vigorosamente durante 10 minutos y entonces se añadió una disolución de 3,5-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-4-hidroxibenzoato de metilo (52 mg, 0,159 mmol) en piridina (5 ml). Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4 días. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo (40 ml), que entonces se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado, cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. Luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (74 mg) mediante CCF preparativa sobre sílice usando MeOH al 1%/cloroformo. Rendimiento = 51 mg (60%). EM MALDI-TOF 535,2 obs.

d) Síntesis de NSP-2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (50 mg, 94 umoles), 1,3-propanosultona (2,28 g, 200 equivalentes) y bicarbonato de sodio (158 mg, 20 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 2-3 horas se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm. Se observó producto eluyendo a Rt = 15,4 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con 30 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 20 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 2 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 13,0 minutos. (EM MALDI-TOF 643,5 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 30 mg (50%), polvo amarillo.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2',6'-(CH₂OCH₂CH₂OMe)₂-AE.



Ejemplo 6

Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE y su éster de NHS

a) Síntesis de 3-isopropiloximetil-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-acetoxy-3-bromometil-5-metilbenzoato de metilo bruto (120 mg, 0,314 mmol) en diclorometano (5 ml) con 2-propanol (0,12 ml, 5 equivalentes) seguido por triflato de plata (81 mg, 1 equivalente). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas y entonces se filtró para eliminar las sales de plata. Se evaporó el filtrado hasta sequedad. Se purificó el producto 3-isopropiloximetil-4-acetoxy-5-metilbenzoato de metilo mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/hexanos proporcionando 75 mg de un sólido oleoso que se disolvió en metanol y se trató con bicarbonato de sodio (113 mg, 5 equivalentes). Se sometió a reflujo la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno durante una hora y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el residuo en acetato de etilo (10-15 ml) y se filtró. Se evaporó el filtrado hasta sequedad proporcionando 56 mg de producto bruto que se usó como tal sin purificación.

b) Síntesis de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OCHMe₂)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

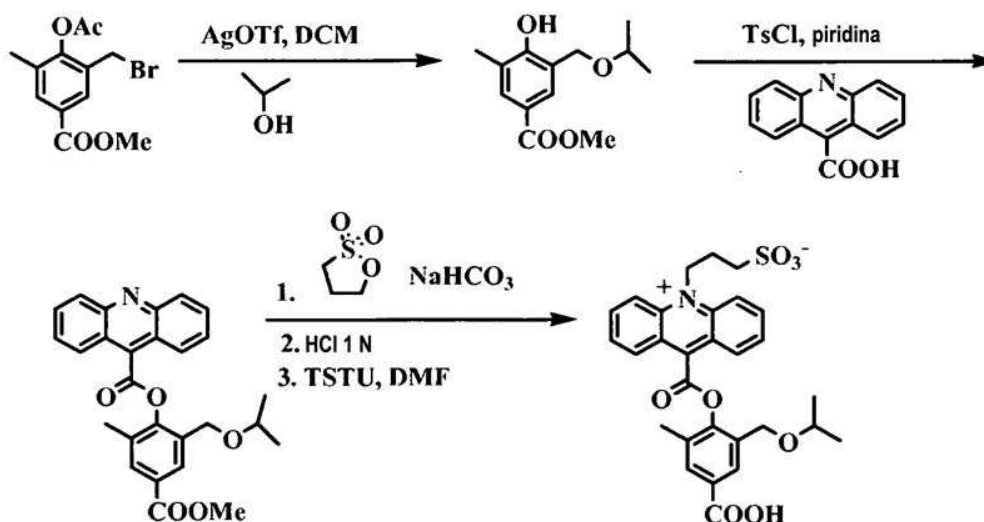
Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (112 mg, 0,5 mmol) en piridina (7 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (96,5 mg, 0,5 mmol). Se agitó la suspensión vigorosamente bajo una atmósfera de nitrógeno hasta que era transparente y entonces se añadió una disolución de 3-isopropiloximetil-4-hidroxi-5-metilbenzoato de metilo (56 mg, 0,25 mmol) en piridina (1 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días. El análisis de HPLC de la mezcla de reacción bruta usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró producto eluyendo a Rt = 25,2 minutos (EM MALDI-TOF 443,9 obs.). Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y se disolvió el residuo en cloroformo (30 ml). Se lavó esta disolución con HCl 1 N, bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (75 mg) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/cloroformo. Rendimiento = 32 mg (30%), sólido oleoso.

c) Síntesis de NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE y su éster de NHS

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂OCHMe₂)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (32 mg, 72 umoles), 1,3-propanosulfona (0,88 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (61 mg, 10 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 2 horas se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm. Se observó producto eluyendo a Rt = 17,5 minutos (EM MALDI-TOF 565,8 obs). Se diluyó la mezcla de reacción con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 10 ml de HCl al 10% y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 2 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 14,4 minutos. (EM MALDI-TOF 643,5 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 19,8 mg (50%), polvo amarillo.

Se disolvió el éster de acridinio en DMF (2 ml) y se trató con diisopropiletilamina (9,4 ul, 1,5 equivalentes) y TSTU (13 mg, 1,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Tras 30 minutos, el análisis de HPLC mostró conversión completa en el éster de NHS eluyendo a Rt = 16,6 minutos (EM MALDI-TOF 649 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad. Rendimiento = 12 mg (51%), polvo amarillo.

La siguiente reacción describe la síntesis de NSP-2'-(CH₂OCHMe₂)-6'-Me-AE y su éster de NHS.

**Ejemplo 7**a) Síntesis de 4-hidroxi-3-metilbenzoato de metilo

Se disolvió una disolución de ácido 4-hidroxi-3-metilbenzoico (Matrix Scientific, 1 g) en metanol y se enfrió en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió lentamente cloruro de tionilo (5 ml). Se agitó la reacción a 0°C durante una hora y entonces se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Entonces se añadió bicarbonato de sodio sólido para neutralizar el ácido y se evaporó la mezcla hasta sequedad. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (75 ml) y agua (100 ml). Se secó la fase de acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad proporcionando 1,0 g de producto.

b) Síntesis de 3-O-alil-4-metilbenzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-hidroxi-3-metilbenzoato de metilo (1 g, 0,006 mol) en acetona (50 ml) con carbonato de potasio anhidro (1,656 g, 0,012 mol) y bromuro de alilo (0,78 ml, 0,009 mol). Se sometió a reflujo la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 3 horas, el análisis de CCF indicó conversión completa. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. Se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se secó la fase de acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento = 1,138 g (aceite de color marrón claro).

c) Síntesis de 4-hidroxi-3-alil-5-metilbenzoato de metilo

Se calentó una disolución de 3-O-alil-4-metilbenzoato de metilo (1,138 g) en N,N-dietilanilina (5 ml) en un baño de aceite a 200°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 8 horas el análisis de HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm, mostró -80% de conversión. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (75 ml). Se lavó esta disolución con 300 ml de HCl al 10% seguido por bicarbonato de sodio acuoso saturado. Entonces se secó la fase de acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (1,11 g) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 30%/hexanos. Se obtuvo el producto como un polvo de color tostado, rendimiento = 0,843 g (75%).

d) Síntesis de 4-acetoxi-3-alil-5-metilbenzoato de metilo

Se enfrió una disolución de 4-hidroxi-3-alil-5-metilbenzoato de metilo (157 mg) en piridina (5 ml) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con anhídrido acético (1 ml). Se agitó la reacción en el baño de hielo durante una hora y entonces se calentó hasta temperatura ambiente durante 4 horas. Entonces se eliminó el disolvente a presión reducida y se suspendió el residuo en tolueno anhidro (5-10 ml) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el producto bruto en acetato de etilo (30 ml) y se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad dando un aceite marrón. Rendimiento = 0,176 g (cuantitativo).

e) Síntesis de 4-hidroxi-3-(2-metoxipropil)-5-metilbenzoato de metilo

Se enfrió una disolución de 4-acetoxi-3-alil-5-metilbenzoato de metilo (175 mg, 0,75 mmol) en metanol (2 ml) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con trifluoroacetato mercúrico (322 mg, 1 equivalente). Se agitó la reacción en el baño de hielo durante una hora momento en el que el análisis de CCF mostró consumo completo del material de partida. Entonces se trató la reacción con 1 ml de NaOH 3 N y tras agitar vigorosamente durante 2 minutos, se añadió una disolución de borohidruro de sodio (0,5 M, 1 ml) en NaOH 3 N. Se agitó la suspensión anterior durante 5 minutos en el baño de hielo y entonces se añadió acetato de etilo (25 ml). Tras agitar durante 5 minutos adicionales, se decantó la disolución de acetato de etilo y entonces se lavó dos veces con cloruro de amonio acuoso saturado. Luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (141 mg, aceite) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 15%/hexanos. Rendimiento purificado = 82 mg (~50%), MALDI-TOF 239 obs.

f) Síntesis de 9-carboxilato de 2'-(CH₂CH[OMe]Me)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

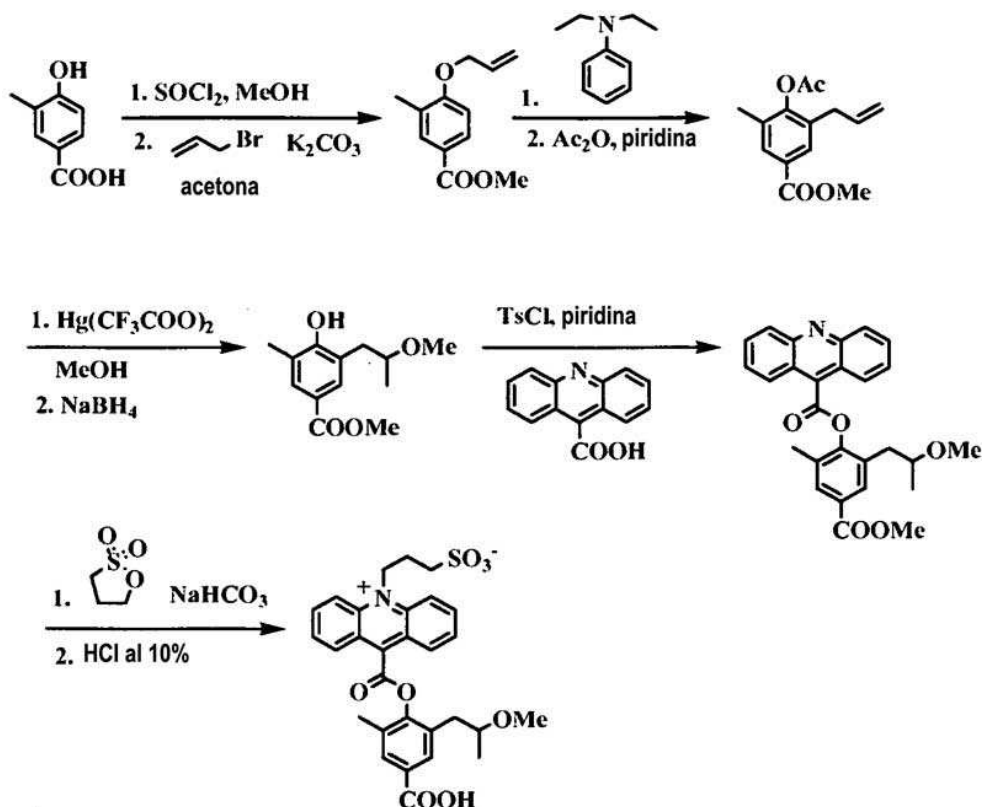
Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (154 mg, 0,689 mmol) en piridina (10 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (131 mg, 0,689 mmol). Se agitó la suspensión vigorosamente bajo una atmósfera de nitrógeno hasta que era transparente y entonces se añadió una disolución de 4-hidroxi-3-(2-metoxipropil)-5-metilbenzoato de metilo (82 mg, 0,345 mmol) en piridina (2 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y se disolvió el residuo en cloroformo (30 ml). Se lavó esta disolución con HCl 1 N, bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (167 mg) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 10%/cloroformo. Rendimiento = 29 mg (20%), sólido oleoso. EM MALDI-TOF 443,8 Obs.

g) Síntesis de NSP-2'-(CH₂CH[OMe]Me)-6'-Me-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂CH[OMe]Me)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (29 mg, 66 umoles), 1,3-propanosulfona (0,80 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (55 mg, 10 equivalentes) en un

baño de aceite a 140-150°C. Tras 2 horas se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 → 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y detección por UV a 260 nm. Se observó producto eluyendo a Rt = 16,2 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 10 ml de HCl al 10% y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 2 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 13,7 minutos. (EM MALDI-TOF 643,5 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad dando un polvo amarillo.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2'-(CH₂CH[OMe]Me)-6'-Me-AE.



Ejemplo 8

20 Síntesis de NSP-2'-(CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

a) Síntesis de 4-(terc-butildimetilsililoxi)-3-alil-5-metilbenzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-hidroxi-3-alil-5-metilbenzoato de metilo (157 mg, 0,762 mmol) en diclorometano (5 ml) con trietilamina (0,21 ml, 2 equivalentes) y cloruro de terc-butildimetilsililo (172 mg, 1,5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 días, momento en el que el análisis de CCF mostró conversión completa. Se diluyó la reacción con acetato de etilo (30 ml) y se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y bicarbonato de sodio acuoso saturado. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad proporcionando el producto como un aceite marrón. Rendimiento = 0,239 g (98%).

b) Síntesis de 4-(terc-butildimetilsililoxi)-3-(2-hidroxietil)-5-metilbenzoato de metilo

Se trató una disolución de 4-(terc-butildimetilsililoxi)-3-alil-5-metilbenzoato de metilo (0,239 g, 0,742 mmol) en dioxano/agua (3:1, 16 ml) con 2,6-lutidina (173 µl, 1,484 mmol), tetróxido de osmio (3,8 mg, 0,0148 mmol) que se añadió como disolución en acetona (1 ml) seguido por peryodato de sodio (635 mg, 2,97 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras 2 horas, el análisis de CCF mostró en su mayor parte producto, entonces se diluyó la reacción con acetato de etilo (20 ml) y agua (10 ml). Se separó la fase de acetato de

etilo y se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo (10 ml). Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados con salmuera. Entonces se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se recuperó un aceite marrón (0,255 g). Entonces se redujo inmediatamente el aldehído muy inestable disolviéndolo en primer lugar en metanol (5 ml) y tras enfriar en un baño de hielo, añadiendo borohidruro de sodio (50 mg, 2 equivalentes). Se agitó esta reacción en el baño de hielo y tras 10 minutos el análisis de CCF indicó conversión completa en el alcohol. Entonces se extinguió la reacción con acetona (2 ml) y se agitó durante 10 minutos. Entonces se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y se disolvió el residuo en acetato de etilo (30 ml) y entonces se lavó una vez con cloruro de amonio acuoso saturado y luego bicarbonato de sodio acuoso saturado. Entonces se secó la disolución de acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se recuperó un aceite viscoso marrón oscuro que se purificó mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 25%/hexanos. Se obtuvo el producto como un aceite viscoso, transparente. Rendimiento 138 mg (58%).

c) Síntesis de 4-hidroxi-3-(2-metoxietil)-5-metilbenzoato de metilo

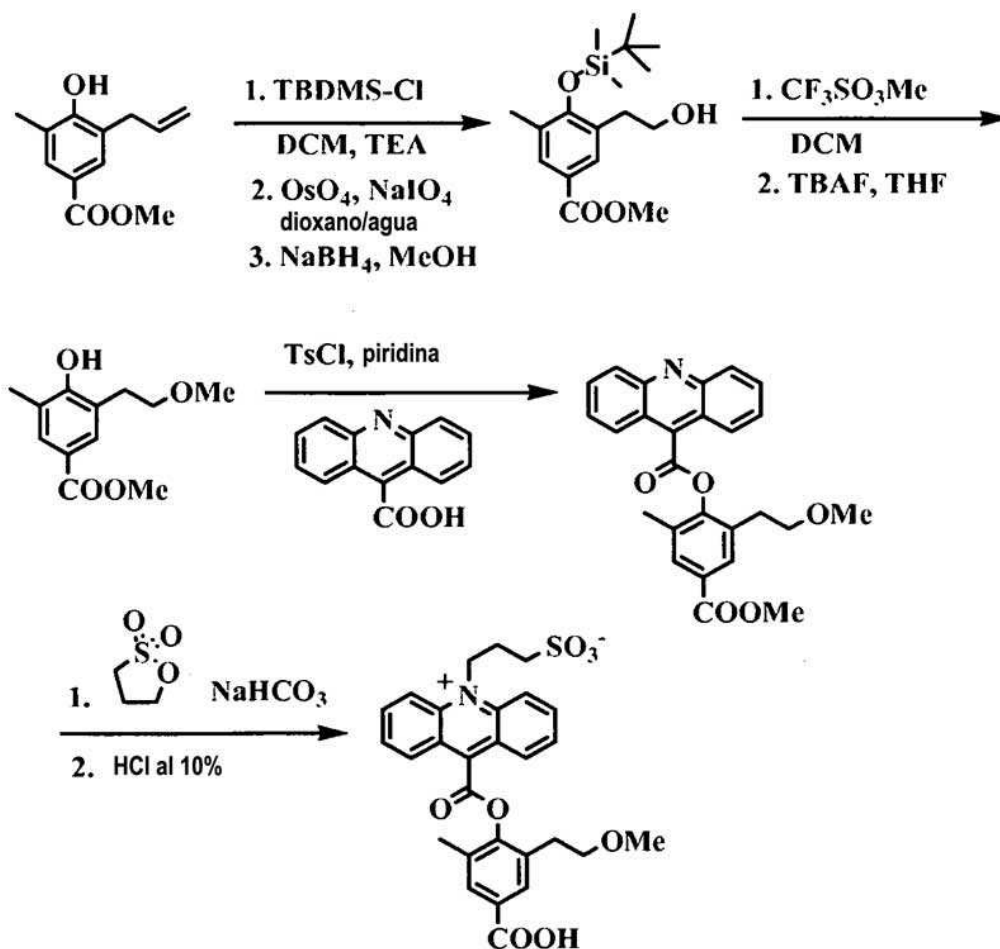
Se trató una disolución de 4-(terc-butildimetilsililoxi)-3-(2-hidroxietil)-5-metilbenzoato de metilo (48 mg, 0,148 mmol) en diclorometano (3 ml) con bicarbonato de sodio (60 mg, 4 equivalentes) y triflato de metilo (68 μ l, 4 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 h, momento en el que el análisis de CCF indicó ~50% de conversión. Entonces se diluyó la reacción con acetato de etilo (20 ml) y se filtró. Se evaporó el filtrado hasta sequedad. Se disolvió el residuo en THF (5 ml) y se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (60 mg, 1,5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente, tras 5 minutos, el análisis de CCF indicó conversión completa. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en acetato de etilo (1 ml) y se purificó mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo al 25%/hexanos. Rendimiento = 13 mg (40%).

d) Síntesis de 9-carboxilato de 2'-(CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina

Se trató una suspensión de ácido acridin-9-carboxílico (39 mg, 174 μ moles) en piridina (2 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (33 mg, 174 μ moles). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 10-15 minutos hasta que era transparente y entonces se añadió una disolución de 4-hidroxi-3-(2-metoxietil)-5-metilbenzoato de metilo (13 mg, 58 μ moles) en piridina (2 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días y entonces se evaporó hasta sequedad, se disolvió el residuo en cloroformo (25 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado y HCl al 10%. Entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento bruto 11,3 mg. EM MALDI-TOF 429 obs. Se usó este material sin purificación en la siguiente reacción.

e) Síntesis de NSP-2'-(CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE

Se calentó una mezcla de 9-carboxilato de 2'-(CH₂CH₂OMe)-4'-metoxicarbonilfenil-6'-Me-acridina (11,3 mg, 26,3 μ moles), 1,3-propanosulfona (0,642 g, 200 equivalentes) y bicarbonato de sodio (44 mg, 20 equivalentes) en un baño de aceite a 140-150°C. Tras 2 horas se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción, se disolvió en metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna C18 (4,6 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN/agua 10 \rightarrow 70% (conteniendo cada uno TFA al 0,05%), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. y detección por UV a 260 nm. Se observó producto eluyendo a Rt = 15,8 minutos. Se diluyó la mezcla de reacción con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1. Se sonicó la mezcla para dispersar la goma en un polvo amarillo y tras asentarse el polvo, se decantó el disolvente. Se enjuagó el polvo amarillo dos veces con acetato de etilo/hexanos y entonces se secó a vacío. Se suspendió el éster de acridinio bruto en 10 ml de HCl al 10% y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Tras 2 h, el análisis de HPLC mostró producto procedente de la hidrólisis completa del éster metílico, eluyendo a Rt = 14,0 minutos. (EM MALDI-TOF 537,9 obs.). Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 de 30 x 300 mm y el gradiente anterior a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Se recogió la fracción de producto, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad dando un polvo amarillo. Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2'-(CH₂CH₂OMe)-6'-Me-AE.



Ejemplo 9

5 Procedimiento general para marcar AcM anti-TSH con éster de acridinio. Se diluyó una disolución madre del anticuerpo (5 mg/ml, 200 μ l, 1 mg, 6,67 nmoles) con tampón fosfato 0,1 M pH 8 (300 μ l) y se enfrió hasta 4°C en una caja fría. A esta disolución fría se le añadieron 10 equivalentes del éster de NHS de acridinio como una disolución en DMF (1 mg/ml). Por ejemplo, en el caso de NSP-DMAE-NHS, se añadieron 39,4 μ l (66,7 nmoles) a la disolución de proteína. Se agitaron suavemente las reacciones de marcaje a temperatura ambiente durante 3-4 horas y entonces se diluyeron con agua desionizada (1,5 ml). Entonces se transfirieron estas disoluciones diluidas a filtros Centricon™ de 2 ml (punto de corte de PM 30.000) y se centrifugaron a 4500 G para reducir el volumen hasta ~0,2 ml. Se repitió este procedimiento tres veces más. Finalmente se diluyeron los conjugados filtrados en un volumen total de 0,5 ml de agua desionizada para el análisis de espectros de masas y mediciones de URL. Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF de Voyager DE y se usó el anticuerpo sin marcar como referencia. Se mezclaron aproximadamente 2 μ l de la disolución de conjugado con 2 μ l de disolución de matriz de ácido sinapínico (HP) y se dispuso en puntos sobre una placa de MALDI. Tras el secado completo, se registraron los espectros de masas. A partir de la diferencia en los valores de masa para el anticuerpo sin marcar y los conjugados, podía medirse el grado de incorporación de AE. Normalmente, en estas condiciones de marcaje, se incorporaban 2-4 marcadores de AE en el anticuerpo.

Ejemplo 10

Procedimiento general para las mediciones de luz

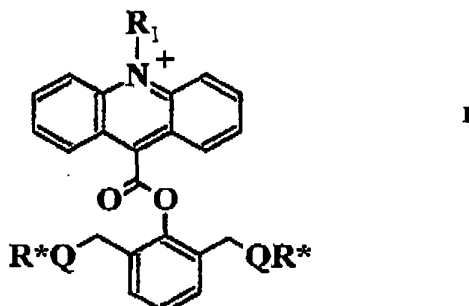
25 Se realizaron todas las mediciones de luz en o bien MLA1™ o bien MLA2™ (mediciones de la estabilidad de AE), Bayer Diagnostics. Para la medición de las URL a partir de los ésteres de acridinio, se diluyeron secuencialmente disoluciones en DMF 1 mg/ml de los compuestos purificados por HPLC diluidos 10⁶-10⁷ veces en fosfato 10 mM, NaCl 150 mM pH 8 que contenía también BSA al 0,05% y azida sódica al 0,1%. Se diluyeron los conjugados de proteína y los conjugados de cortisol purificados por HPLC de la misma manera. Las mediciones de luz usaron 25 μ l de muestra y se iniciaron en el instrumento con la adición de 0,350 ml de reactivo 1 que contenía peróxido de hidrógeno al 0,5% en ácido nítrico 0,1 N seguido por la adición de 0,35 ml de reactivo 2 que contenía un tensioactivo en NaOH 0,25 N. Se usó un tiempo de retardo muy corto de 0,1 s entre la adición del reactivo 1 y el reactivo 2. Para

la medición de la cinética, el tiempo de medición varió desde 0,5 s hasta 10 s para los ésteres de acridinio y de 0,5 s a 5 s para los conjugados de cortisol y proteína. Se notificó la cantidad de luz emitida a cada tiempo de medición como URL por los instrumentos, que entonces se convirtieron en porcentajes asignando un valor del 100% para las URL registradas a 10 s para los ésteres de acridinio y 5 s para los conjugados. Para las mediciones de la estabilidad de AE, se usó un tiempo de medición de 5 segundos.

REIVINDICACIONES

1. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que comprende la estructura de fórmula I:

5



en la que Q se selecciona independientemente cada vez que aparece de un enlace, -O-, -S- o -N(R*)-; en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; con la condición de que al menos una Q debe ser -O-, -S- o -N(R*)-; en la que R₁ es un grupo alquilo, alqueno, alquino, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

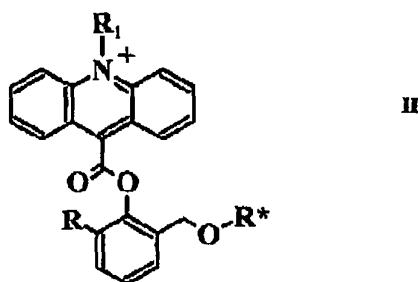
10

15

2. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 1, en el que una Q representa -O- y la otra Q representa un enlace.
3. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 2, en el que R* es metilo.
4. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 1, en el que ambos casos de Q representan -O-.
5. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que comprende la estructura de fórmula II:

20

25



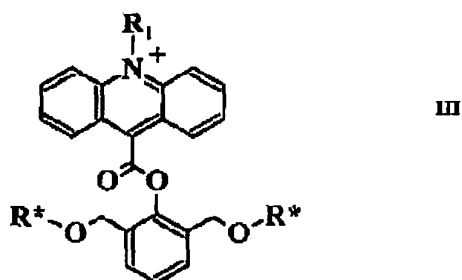
en la que R y R* se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; y en la que R₁ es un grupo alquilo, alqueno, alquino, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

30

35

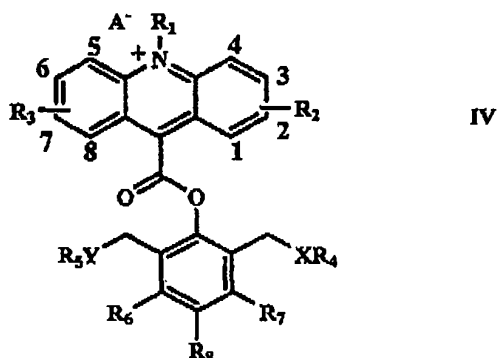
6. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 5, en el que R es metilo.
7. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable que comprende la estructura de fórmula III:

40



en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos, y en la que R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

8. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable de fórmula IV:



en la que,

R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos;

R₂ es un grupo en cualquiera de C₁ a C₄ y R₃ es un grupo en cualquiera de C₅ a C₈;

en la que en los grupos R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno;

X e Y se seleccionan independientemente cada vez que aparecen de un enlace, -O-, -S- o -N(R*)-; en la que R* se selecciona independientemente cada vez que aparece de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos, que contienen opcionalmente desde uno hasta 20 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos; con la condición de que o bien X o Y o bien ambos deben ser -O-, -S- o -N(R*)-;

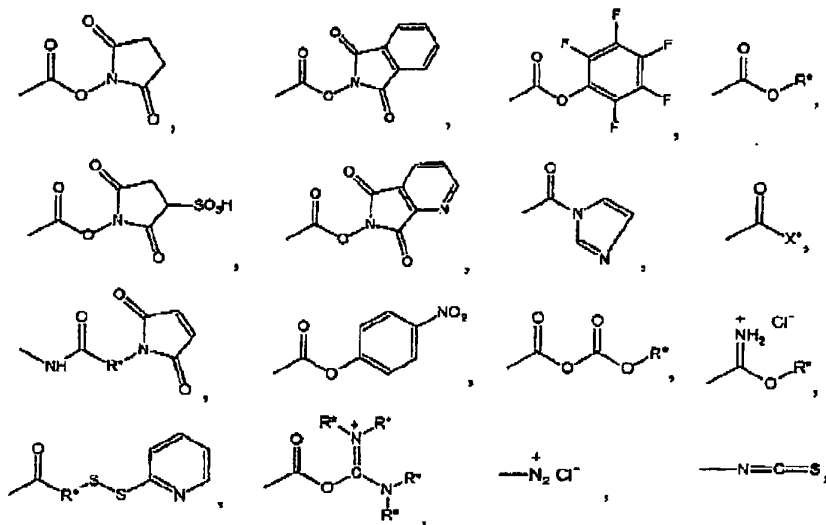
R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contienen hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógeno;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, aril-alquilo, alquil-arilo, alcoxilo (-OR), alquiltiol (-SR) y -NR₂ en los que R en el nitrógeno puede ser igual o diferente y es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos;

R₈ es un grupo intercambiable con R₆ y R₇ y es un grupo -R₉-R₁₀;

R₉ representa un enlace o un grupo alquilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido que contiene hasta 20 heteroátomos;

R₁₀ es un grupo funcional electrófilo o nucleófilo seleccionado de los siguientes:



5

-N₃, -SO₂Cl, NCO, NH₂, -pH, -OH, -NH-NH₂ y -O-NH₂;

10

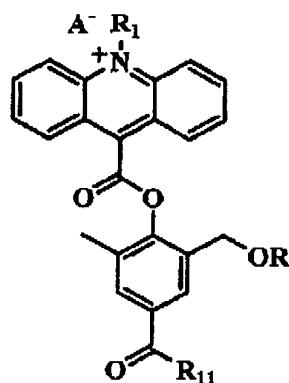
en las que X* es un halógeno, y R* se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alquil-arilo o aril-alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, y combinaciones de los mismos que contienen opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, halógeno, y combinaciones de los mismos y

15

A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

20

9. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, en el que R₁ es un grupo metilo, sulfopropilo o sulfobutilo.
10. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



25

en la que R₁ es -Me o -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻;

R es un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

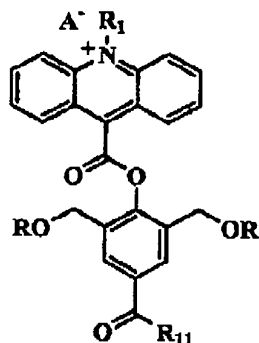
30

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR; y

35

A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

11. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8. que tiene la estructura:



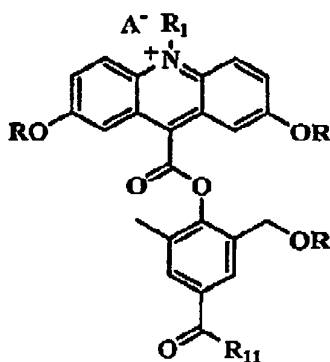
en la que R₁ es -Me o -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻;

5 R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

10 R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR; y

15 A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

12. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



20 en la que R₁ es -Me o -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻;

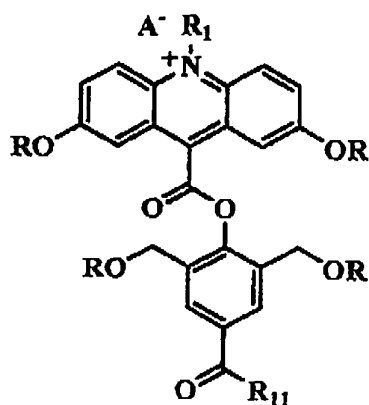
25 R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR; y

30 A⁻ es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₄O₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

13. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:

35



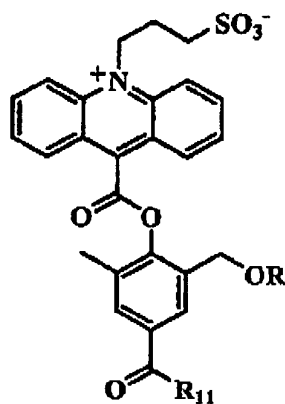
en la que R₁ es -Me o -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻;

5 R es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aril-alquilo o alquil-arilo que contiene hasta 20 heteroátomos,

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR; y

10 A es un contraión que se introduce para formar un par con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo que consiste en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻ y NO₃⁻.

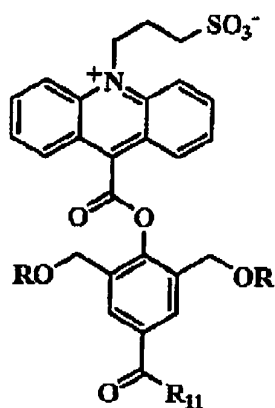
15 14. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



20 en la que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂ y -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe, -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, n = 1-5 y

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR.

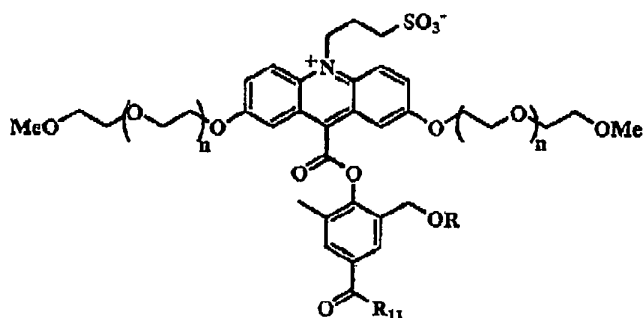
25 15. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



en la que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂ y -(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe, -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, n = 1-5 y

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR.

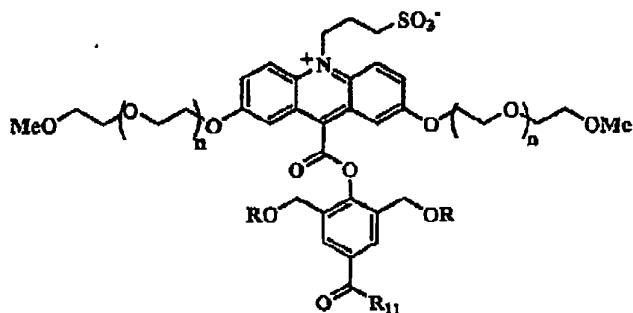
16. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



en la que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe y -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, en las que n = 1-5 y

R₁₁ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o NH-R-NHR.

17. Éster de acridinio quimioluminiscente de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según la reivindicación 8, que tiene la estructura:



en la que R se selecciona de -Me, -CH₂CH₂OMe, -CHMe₂-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe y -CH[CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OMe]₂, en las que n = 1-5 y

R₁₁, es -OH, -O-N-succinimidilo -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-O-N-succinimidilo en las que n = de 0 a 5, o -NH-R-NHR.

18. Ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) un éster de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
- 5 (b) proporcionar un soporte sólido sobre el que está inmovilizada una segunda molécula de unión específica para dicho analito;
- (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;
- 10 (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido,
- (e) desencadenar quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;
- 15 (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro, y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 20
19. Ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un conjugado de un analito con un éster de acridinio de emisión de luz rápida, hidrolíticamente estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
- 25 (b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;
- (c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;
- 30 (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;
- (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;
- 35 (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida a partir de la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis patrón que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 40
20. Conjugado de los ésteres de acridinio según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, con un analito.
- 45 21. Conjugado según la reivindicación 20, en el que el analito es un analito de molécula pequeña seleccionado de esteroides, vitaminas, hormonas, fármacos terapéuticos y péptidos pequeños.
22. Conjugado según la reivindicación 20, en el que el analito es un analito macromolecular seleccionado de proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus y polímeros sintéticos.
- 50

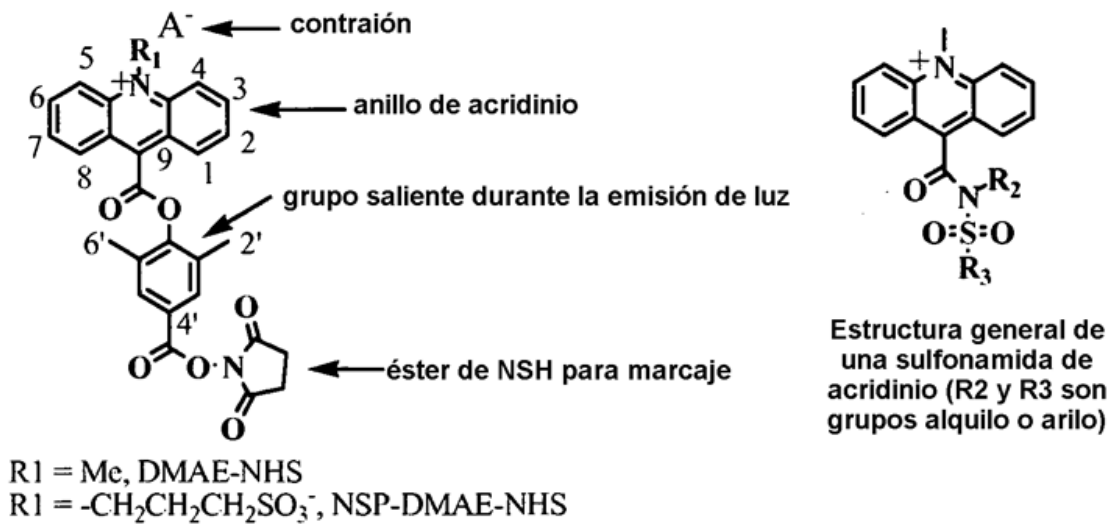
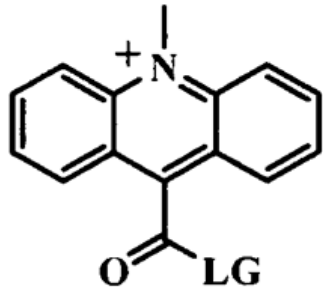


FIG. 1

Forma de acridinio



LG = Grupo saliente

Forma de pseudobase



FIG. 2