

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 270**

51 Int. Cl.:

C07D 219/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2008 E 08851092 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2215063**

54 Título: **N-alquilación fácil de compuestos de acridina en líquidos iónicos**

30 Prioridad:

20.11.2007 US 989242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 BENEDICT AVENUE
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**NATRAJAN, ANAND y
WEN, DAVID**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 441 270 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

N-alquilación fácil de compuestos de acridina en líquidos iónicos.

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere generalmente a métodos sintéticos para preparar derivados de N-alquilo de compuestos heteroaromáticos. Más particularmente, la invención se refiere al uso de disolventes líquidos iónicos en la N-alquilación de acridinas y compuestos relacionados.

10

Antecedentes de la invención

Han surgido compuestos de acridinio quimioluminiscentes que son marcadores extremadamente útiles para inmunoensayos y ensayos de ácidos nucleicos. Ésteres de acridinio hidrófilos que contienen grupos N-sulfopropilo (NSP) son útiles para el marcaje de proteínas así como para la preparación de conjugados de moléculas pequeñas, tal como se describe por Law *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.656.426 y Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.664.043. Estos ésteres de acridinio hidrófilos ofrecen un rendimiento mejorado en inmunoensayos.

15

20

La síntesis de ésteres de acridinio que contienen grupos N-sulfopropilo conlleva la N-alquilación de los correspondientes ésteres de acridina con el potente carcinógeno 1,3-propanosultona. En general, esta reacción se lleva a cabo mediante calentamiento del éster de acridina con un gran exceso de propanosultona en ausencia de disolvente, tal como se describe por Law *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.656.426. Esta reacción se ilustra en la figura 1. La reacción descrita por Law para la síntesis del éster NSP-DMAE-NHS (figura 1, R = NHS) presenta varios inconvenientes que incluyen un rendimiento relativamente bajo de producto aislado (el 25%) y la necesidad de usar un gran exceso de propanosultona (50 veces) con respecto al precursor de acridina.

25

Tal como se notificó recientemente por Bolt y Golka en *Toxicology Lett.* 2004, 151, 251-254, la propanosultona es directamente alquilante, genotóxica y carcinogénica. Bolt y Golka observan que "los tumores malignos observados dentro de un grupo de personas expuestas a 1,3-propanosultona parecen concordar sorprendentemente con las expectativas a partir de los estudios con animales disponibles" y se caracterizan por tiempos de latencia de hasta 30-40 años o más después de periodos limitados de exposición pasada. Por tanto, son deseables transformaciones químicas en condiciones de reacción que limiten el uso de este reactivo tóxico.

30

35

Más recientemente, Evangelista *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.924.154, notificaron la síntesis de un éster de acridinio con un grupo N-sulfopropilo mediante calentamiento por microondas del correspondiente éster de acridina y un exceso de 20 veces de 1,3-propanosultona pura. Este procedimiento sintético requirió una segunda etapa para hidrolizar ésteres de acridinio polisulfonados formados en la reacción con ácido fuerte para convertirlos en el grupo monosulfonato-N-sulfopropilo, seguido por purificación cromatográfica extensa para dar un rendimiento global del 53% del éster de acridinio que contiene N-sulfopropilo. Claramente, si el éster de acridina contiene grupos funcionales sensibles a ácido, tales como el éster NHS, la etapa de hidrólisis ácida no puede realizarse y es probable que el rendimiento global del producto monosulfonato deseado sea bastante bajo, tal como se ha observado por Law en la patente estadounidense n.º 5.656.426. Además, la necesidad de purificación cromatográfica extensa del producto también es indeseable.

40

45

Adamczyk *et al.* en *J. Org. Chem.* 1998, 63, 5636-5639, notificaron que la introducción del grupo N-sulfopropilo en sulfonamidas de acridina puede realizarse usando el reactivo 3-trifloxiopropano-sulfonato de neopentilo. Aunque este procedimiento evita el uso de 1,3-propanosultona, el reactivo 3-trifloxiopropano-sulfonato tuvo que sintetizarse por separado y además la N-alquilación usando este reactivo requirió 7 días para dar un 34% de conversión a producto.

50

La bibliografía citada anteriormente indica la dificultad general para introducir el grupo N-sulfopropilo en compuestos de acridina lo que necesitan llevar a cabo la reacción en un reactivo alquilante puro, tal como propanosultona, a temperaturas elevadas seguido por tratamiento ácido para hidrolizar el material polisulfonado y la posterior purificación cromatográfica extensa del éster de N-sulfopropil-acridinio deseado. Claramente, resultaría beneficioso un medio de reacción adecuado y relativamente benigno que llevase a lograr esta transformación química con buenos rendimientos pero usando sólo cantidades limitadas de propanosultona y sin la necesidad de purificación cromatográfica extensa. Además, cualquier procedimiento que minimice la formación de polisulfonato permitirá la N-alquilación de ésteres de acridina que contienen grupos funcionales sensibles a ácido.

55

60

En los últimos años, los líquidos iónicos (LI) se han vuelto cada vez más populares para llevar a cabo reacciones químicas y se denominan comúnmente "disolventes verdes" no sólo porque pueden reciclarse sino también debido a su volatilidad extremadamente baja, baja toxicidad, no inflamabilidad, estabilidad térmica elevada y su capacidad para disolver una amplia gama de solutos. Una revisión de Holbrey y Seddon en *Clean Products and Processes* 1999, 1, 223-236, describe algunas de las propiedades de líquidos iónicos. Otra revisión de Hagiwara e Ito en *J. Fluorine Chem.* 2000, 105, 221-227, describe líquidos iónicos a temperatura ambiente de cationes alquilimidazolio y fluoroaniones. Hagiwara e Ito mencionan que "un líquido iónico a temperatura ambiente, o sal fundida, se define

65

como un material que sólo contiene especies iónicas sin ninguna molécula neutra y que tiene un punto de fusión de menos de 298K". Muchos líquidos iónicos derivados de cationes alquilimidazolio están disponibles comercialmente y dos en particular que se han usado en la bibliografía son hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] [PF₆] y tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] [BF₄].

Se han explorado líquidos iónicos como medios de reacción para diversas transformaciones orgánicas sintéticas incluyendo oxidaciones tal como se describe por Earle *et al.* en *Org. Lett.* 2004, 6, 707-710; reacción de Heck tal como se describe por Mo *et al.* en *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 751-760; N-alkilación de pirroles e indoles tal como se describe por Jorapur *et al.* en *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 2435-2438; N-alkilación de ftalimidas tal como se describe por Le *et al.* en *Synthesis* 2004, 2, 208-212; y síntesis de péptidos tal como se describe por Miao y Chan en *J. Org. Chem.* 2005, 70, 3251-3255. La publicación de patente estadounidense 2007/0142690 concedida a Elomari da a conocer la alquilación de olefinas con isoparafinas en líquidos iónicos. En la bibliografía no se ha notificado el uso de LI como medios de reacción para la N-alkilación de ésteres de acridina para dar ésteres de N-sulfopropil-acridinio.

Aunque los líquidos iónicos han encontrado utilidad en una variedad de transformaciones sintéticas, su uso hasta la fecha ha sido bastante limitado, particularmente con respecto a síntesis a escala comercial.

La solicitud de patente europea EP 609.885 A1 describe compuestos de acridina N-alkilados, su uso como agentes de marcaje de fluorescencia y su preparación por alquilación en diclorometano como disolvente.

La patente estadounidense 6.171.520 B1 da a conocer la N-alkilación de acridinas en disolventes tales como etil éter, tolueno, acetonitrilo y similares.

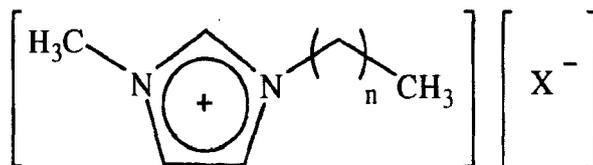
Sumario de la invención

Se ha descubierto sorprendentemente que compuestos de acridina se convierten eficientemente en compuestos de acridinio poniendo en contacto dichos compuestos de acridina con un reactivo alquilante en un disolvente líquido iónico. Mediante este método, la cantidad de reactivo alquilante se reduce enormemente en comparación con métodos anteriores, lo que es particularmente ventajoso cuando los reactivos alquilantes son altamente tóxicos y/o carcinogénicos.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la N-alkilación de un compuesto de acridina, comprendiendo el método proporcionar una mezcla de reacción que comprende el compuesto de acridina, un agente alquilante y un disolvente líquido iónico, y calentar la mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir el compuesto de acridina en un compuesto de N-alkil-acridinio. No hay esencialmente ninguna limitación en la estructura del compuesto de acridina, que puede comprender éster de acridina o sulfonamidas, ambos formados en la posición C-9 del núcleo de acridinio. En diversas realizaciones no limitativas, la razón molar del agente alquilante con respecto al compuesto de acridina es menor de aproximadamente 20:1, normalmente menor de aproximadamente 15:1 y preferiblemente menor de aproximadamente 10:1, y el disolvente líquido iónico está presente en una razón molar con respecto al compuesto de acridina de al menos aproximadamente 1:1, más normalmente al menos aproximadamente 2:1 y preferiblemente al menos aproximadamente 5:1.

El porcentaje global de conversión de acridina en acridinio que puede lograrse mediante los métodos de la invención supera a los de métodos conocidos, y normalmente será mayor de aproximadamente el 70%, más normalmente mayor de aproximadamente el 75%, preferiblemente mayor de aproximadamente el 80% e idealmente será mayor de aproximadamente el 85%. La alta eficiencia de conversión se debe en parte a la minimización de la polialquilación en los disolventes líquidos iónicos, lo que representa un avance sorprendente y útil con respecto a métodos conocidos.

Los disolventes líquidos iónicos preferidos según el método anterior tienen la forma:



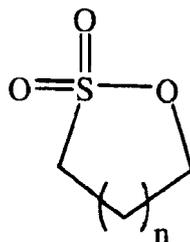
en la que n es un número entero de desde uno hasta nueve, preferiblemente desde 1 hasta 5 y más preferiblemente n=3; y

X representa un anión que puede ser un miembro del grupo que consiste en: tetracloroaluminato; hexafluoroantimoniato; dicianamida; tiocianato; nitrato, haluro; trifluoroacetato; tetrafluoroborato; hexafluorofosfato; metilsulfonato; trifluorometilsulfonato; tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato; bis(trifluorometilsulfonyl)imida o una

combinación de los mismos. Preferiblemente, X es tetrafluoroborato o hexafluorofosfato.

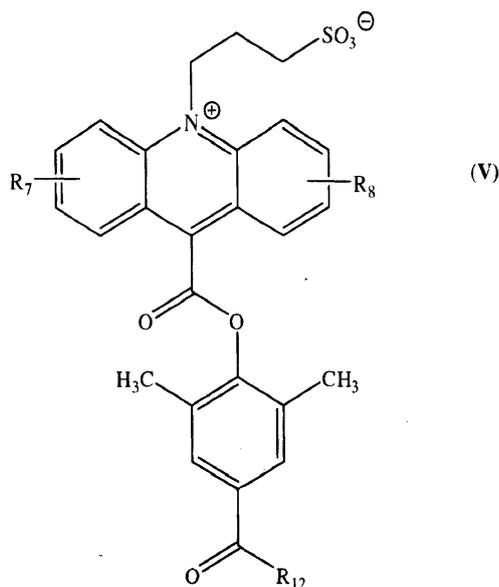
En diversas realizaciones, el disolvente iónico comprende [BMIM] [PF₆] (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio) o [BMIM] [BF₄] (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio), siendo cada uno un disolvente líquido iónico preferido en la práctica de la invención para uso solo o en combinación.

El agente alquilante no está particularmente limitado y puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en: sultonas; ésteres de ácido haloacético y haluros de alquilo o triflatos de alquilo, en los que los grupos alquilo opcionalmente comprenden uno o más heteroátomos y enlaces insaturados; siendo las sultonas los reactivos alquilantes preferidos, en particular las que tienen la estructura:



en la que $n = 1$ ó 2 , que por nombre son 1,3-propanosultona y 1,4-butanosultona, respectivamente, siendo 1,3-propanosultona el reactivo alquilante más preferido según la presente invención.

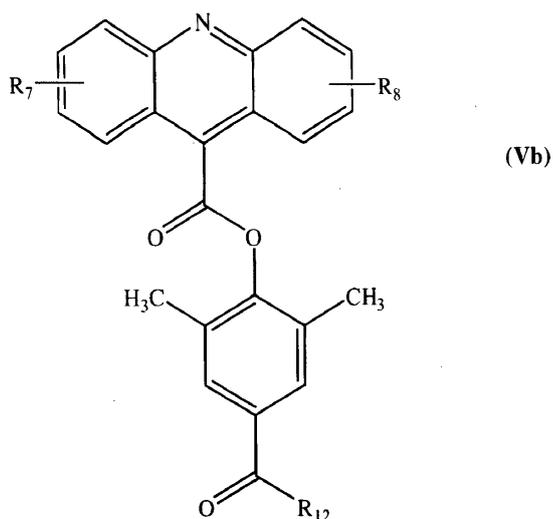
En otro aspecto de la invención, se ha encontrado que el método anterior es especialmente útil para la preparación de compuestos de éster de acridinio que tienen la estructura de la fórmula (V):



en la que R_7 y R_8 pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, -OR y R; en los que R es un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno; y en la que R_{12} se selecciona del grupo que consiste en:

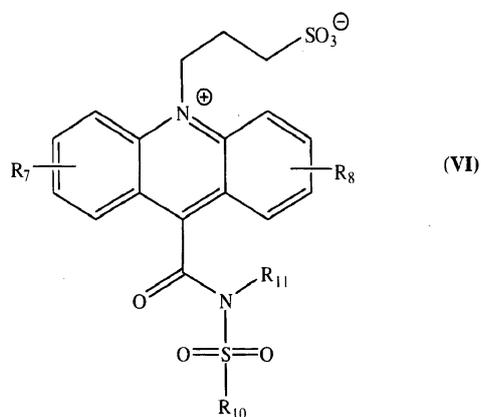
- (i) -OR;
- (ii) -O-N-succinimidilo;
- (iii) -NH-(CH₂)₅-C(=O)-O-N-succinimidilo; y
- (iv) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(=O)-(CH₂)₃-C(=O)-O-N-succinimidilo, en el que $n = 0$ a 5 .

El método según este aspecto comprende: (1) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un compuesto de acridina, 1,3-propanosultona y un disolvente líquido iónico, teniendo el compuesto de acridina la estructura de la fórmula (Vb):

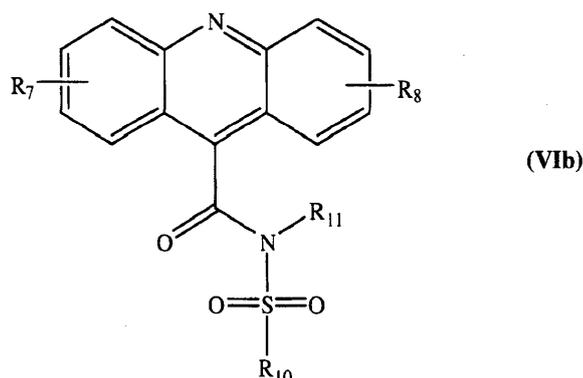


en la que R_7 , R_8 y R_{12} son tal como se definieron anteriormente; y

- 5 (2) calentar dicha mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir dicho compuesto de acridina de la fórmula (Vb) en dicho compuesto de éster de acridinio de la fórmula (V). Aunque se contempla que cualquier razón molar de 1,3-propanosultona con respecto a compuesto de acridina es útil, en diversas realizaciones no limitativas, la razón molar de 1,3-propanosultona con respecto al compuesto de acridina será menor de aproximadamente 20:1, normalmente menor de aproximadamente 15:1 y preferiblemente menor de aproximadamente 10:1. De manera similar, puede emplearse cualquier cantidad de disolvente líquido iónico, sin embargo, el disolvente líquido iónico está habitualmente presente en una razón molar con respecto al compuesto de acridina de al menos aproximadamente 1:1, más normalmente al menos aproximadamente 2:1 y preferiblemente al menos aproximadamente 5:1.
- 10
- 15 En un aspecto adicional, se proporciona un método para la preparación de un compuesto de acridinio-sulfonamida que tiene la estructura de la fórmula (VI):



- 20 en la que R_7 y R_8 pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, -OR y R; en los que R es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno; y en la que R_{10} y R_{11} pueden ser iguales o diferentes y representan grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo que contienen hasta 20 heteroátomos; comprendiendo el método:
- 25 (1) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un compuesto de acridina, 1,3-propanosultona y un disolvente líquido iónico, teniendo el compuesto de acridina la estructura de la fórmula (VIa):



en la que R_7 , R_8 , R_{10} y R_{11} son tal como se definieron anteriormente; y

- 5 (2) calentar la mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir el compuesto de acridina de la fórmula (VIb) en el compuesto de acridinio-sulfonamida de la fórmula (VI). Las cantidades relativas de 1,3-propanosultona, acridina y disolvente iónico no están particularmente limitadas, y pueden ser tal como se especificaron anteriormente.
- 10 Estos y otros aspectos de la invención se entenderán mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada, las figuras adjuntas y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 15 La figura 1 ilustra la N-alquilación de un éster de acridina con el potente carcinógeno 1,3-propanosultona en ausencia de disolvente para la síntesis de NSP-DMAE-NHS ($R = \text{NHS}$), tal como se describe por Law *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.656.426, y para la síntesis de NSP-DMAE-OMe ($R = \text{OMe}$).

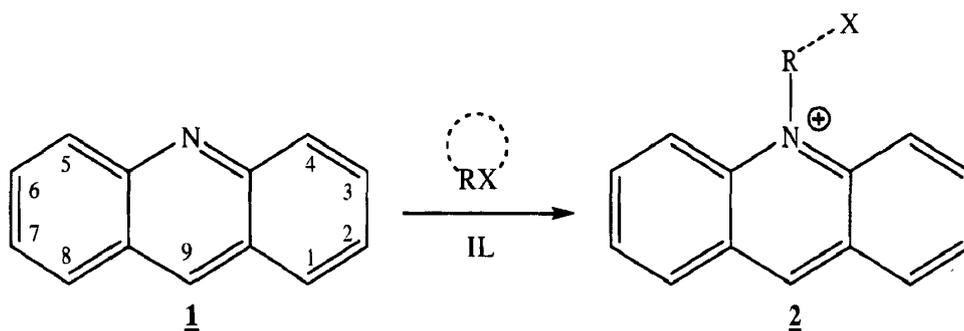
- 20 La figura 2A es un análisis de HPLC de la reacción del éster metílico de acridina en 1,3-propanosultona pura que muestra varios picos correspondientes a productos de polisulfonato. La figura 2B es un análisis de HPLC de la reacción del éster metílico de acridina con 1,3-propanosultona en el disolvente líquido iónico [BMIM] [PF₆], que muestra mucho menos producto de polisulfonato que lo observado en la figura 2A.

- 25 La figura 3 ilustra la transformación del ejemplo 5 en el que un éster metílico de acridina que tiene grupos funcionales alcoxilo (-OR) donadores de electrones en las posiciones C2 y C7 del núcleo de acridina se alquila con 1,3-propanosultona en el disolvente líquido iónico [BMIM] [PF₆] y en presencia de una base de piridina estéricamente impedida para proporcionar el éster metílico N-sulfopropil (NSP)-acridinio, que posteriormente se hidroliza en ácido.

Descripción detallada

- 30 Se pretende que todos los términos usados en el presente documento tengan su significado habitual en la técnica a menos que se especifique lo contrario. El término "líquido iónico" se refiere a un líquido iónico (o sal fundida) a temperatura ambiente o cercana a temperatura ambiente (por ejemplo, $\pm 20^\circ\text{C}$) que es un material que sólo contiene especies iónicas sin ninguna molécula neutra y que tiene un punto de fusión menor de 298 K. Por la frase "sin ninguna molécula neutra" quiere decirse que el líquido iónico consiste en un componente catiónico y aniónico en su nivel más fundamental, pero no se pretende que signifique que el sistema disolvente que comprende el disolvente líquido iónico no comprende especies neutras además del líquido iónico.

- 40 La presente invención se refiere generalmente a un procedimiento para la síntesis de compuestos de acridinio, en particular ésteres de acridinio y acridinio-sulfonamidas, mediante la N-alquilación de los correspondientes compuestos de acridina en líquidos iónicos (LI). El procedimiento es particularmente útil para la preparación de sulfonamidas y ésteres de acridinio hidrófilos. La transformación de la invención puede ilustrarse generalmente tal como sigue:

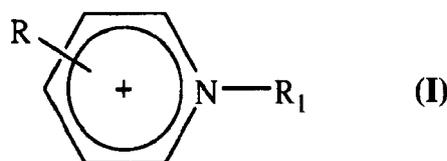


5 en la que el compuesto de acridina 1 se convierte en compuesto de acridinio 2 mediante tratamiento con un reactivo alquilante RX en un disolvente líquido iónico. El reactivo alquilante RX comprende una parte de alquilo R y un grupo saliente X. Tal como se indica mediante las líneas discontinuas, R puede ser un radical divalente que junto con X forma un anillo, de manera que X puede incluirse ventajosamente en el compuesto de acridinio 2 para conferir funcionalidad (por ejemplo, hidrofilia aumentada o como punto de partida para transformaciones adicionales). Aunque este esquema ilustra el caso simple de un compuesto de acridina no sustituido, las ventajas de la invención pueden apreciarse más plenamente cuando el compuesto de acridina lleva grupos funcionales de adición, tales como grupos éster o sulfonamida en la posición C-9 y/o grupos donadores de electrones en las posiciones C2 y/o C7 del núcleo de acridina que son más difíciles de alquilar.

15 Las ventajas del procedimiento de la invención incluyen la mejora de rendimientos de conversión química y aislamiento de producto, reducción en la formación de subproductos, tales como subproductos polisulfonados que resultan convencionalmente del uso de reactivos alquilantes de alquilosulfona, y reducción en el uso de agentes alquilantes altamente tóxicos, tales como el potente carcinógeno 1,3-propanosulfona. El presente procedimiento también ofrece un procedimiento general para la síntesis de alto rendimiento de ésteres de acridinio hidrófilos que contienen grupos N-sulfoalquilo, como grupos N-sulfopropilo, en una escala de gramos. También se contempla que la presente invención es útil en general para la N-alquilación de compuestos de acridina con otros agentes alquilantes.

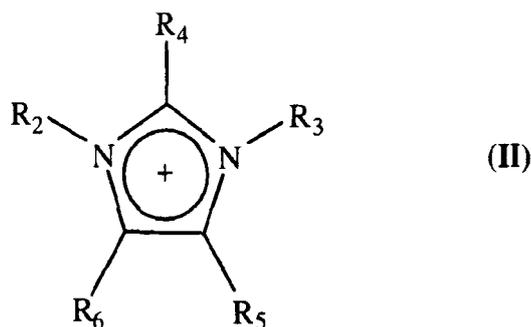
25 La mezcla de reacción comprenderá un líquido iónico que es líquido a, o cerca de, la temperatura ambiente. Los líquidos iónicos normalmente comprenden un catión y un anión, siendo el anión algunas veces, pero no siempre, una especie puramente inorgánica. El catión orgánico es normalmente un compuesto de amonio cuaternario, incluyendo tetra-alquilamonio, y más normalmente es una especie heteroaromática de N-alquilo, por ejemplo N-alquilpiridinio, 1,3-dialquilimidazolio, N-dialquilpirrolidinio o similares. Además, también pueden ser adecuados líquidos iónicos basados en fosfonio y sulfonio, aunque estos son cationes menos preferidos según la invención.

30 De los diversos cationes heteroaromáticos de N-alquilo, puede hacerse mención especial de los cationes N-alquilpiridinio y 1,3-dialquilimidazolio. Los cationes N-alquilpiridinio pueden representarse generalmente por la fórmula (I):



35 en la que R₁ es un radical hidrocarbonado C₁₋₂₀, tal como alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo y aralquilo (por ejemplo, bencilo), incluyendo cada uno opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de halógeno, oxígeno, azufre y combinaciones de los mismos, con la condición de que los heteroátomos no formen restos reactivos con el reactivo alquilante o con el compuesto de acridina; y en la que se pretende que R represente la sustitución opcional en uno o más átomos de carbono del anillo, y se seleccionará normalmente de hidrógeno, halógeno o alquilo (metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, etc.), y que también puede comprender uno o más heteroátomos, sujeto a la misma condición que anteriormente. Con frecuencia R₁ será un grupo alquilo C₁₋₂₀, más normalmente un grupo alquilo C₁₋₁₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₆, siendo metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, n-pentilo, neopentilo e isopentilo ilustrativos. R representa un sustituyente en cualquier átomo de carbono y es habitualmente hidrógeno, pero también puede ser metilo, etilo, propilo y similares. Representantes de los diversos cationes N-alquilpiridinio de la fórmula (I) son N-metilpiridinio, N-etilpiridinio, N-propilpiridinio, N-butilpiridinio, N-pentilpiridinio y N-hexilpiridinio, sin limitación.

50 En una realización preferida, el líquido iónico comprenderá un catión 1,3-dialquilimidazolio. Tales cationes tendrán normalmente la estructura mostrada en la fórmula (II):



- 5 en la que R_2 y R_3 representan independientemente radicales hidrocarbonados C_{1-20} , tales como alquilo, alqueniilo, alquiniilo, arilo y aralquilo (por ejemplo, bencilo), incluyendo cada uno opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de halógeno, oxígeno, azufre y combinaciones de los mismos, con la condición de que los heteroátomos no formen restos reactivos con el reactivo alquilante o con el compuesto de acridina; y R_4 , R_5 y R_6 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, alquilo (metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, etc.), y que también pueden comprender uno o más heteroátomos, sujeto a la misma condición que anteriormente. En las realizaciones preferidas, R_2 y R_3 serán independientemente grupos alquilo C_{1-20} , más normalmente grupos alquilo
- 10 C_{1-10} , preferiblemente grupos alquilo C_{1-6} , siendo metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, n-pentilo, neopentilo e isopentilo ilustrativos. Los radicales que incluyen uno o más heteroátomos, no reactivos en las condiciones de la invención, pueden mostrarse a modo de ejemplo mediante, por ejemplo, grupos alquilo que tienen sustitución oxa (es decir, éteres) y sustituyentes fluoroalquilo o perfluoroalquilo.
- 15 Los cationes 1,3-dialquilimidazolio representativos de la fórmula (II) incluyen, pero no se limitan a, los facilitados en la tabla 1.

Tabla 1. Cationes 1,3-dialquilimidazolio a modo de ejemplo de la fórmula (II)

R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
CH ₃	CH ₃	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂	CH ₃	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂	H	CH ₃	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂	H	H	CH ₃
CH ₃	CF ₃ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	CH ₃	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	H	CH ₃
CH ₃	CH ₃ OCH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	CH ₃	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	CH ₃
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	CH ₃
CH ₃	(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃	(C ₆ H ₅)CH ₂	H	H	H
CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	H	H
CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	CH ₃	H	H
CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	H	H
CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H	H	H
(C ₆ H ₅)CH ₂	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	H
(C ₆ H ₅)CH ₂	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	H
(C ₆ H ₅)CH ₂	(CH ₃ CH ₂)(CH ₃)CH	CH ₃	H	H
(C ₆ H ₅)CH ₂	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	H

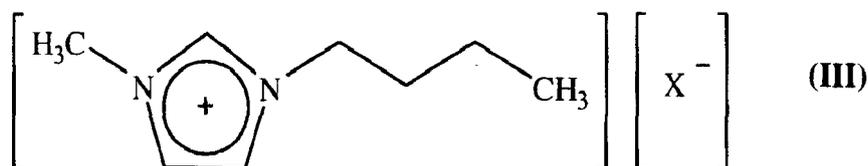
- 20 Se puede hacer mención especial de 1-etil-3-metilimidazolio, 1-propil-3-metilimidazolio, 1-butil-3-metilimidazolio, 1-pentil-3-metilimidazolio, 1-hexil-3-metilimidazolio, catión 1-heptil-3-metilimidazolio y 1-octil-3-metilimidazolio. El 1-butil-3-metilimidazolio, que con frecuencia se denomina [BMIM] en la bibliografía, es el catión actualmente preferido en los líquidos iónicos útiles en la práctica de la invención.

- 25 Otros cationes que se contempla que son adecuados incluyen, sin limitación, cationes pirrolidinio, tales como 1-butil-1-metilpirrolidinio, cationes alquilamonio, incluyendo tri(etil)hexilamonio y etildimetilpropilamonio, y cationes fosfonio, por ejemplo, tri(hexil)tetradecilfosfonio.

Puede emplearse una amplia variedad de aniones, que pueden ser especies inorgánicas u orgánicas, como contraión en el líquido iónico, incluyendo, sin limitación, aniones haluro de metal o metaloide, tales como tetracloroaluminato (AlCl_4^-), tetrabromoaluminato (AlBr_4^-), hexafluoroantimoniato (SbF_6^-), hexafluoroarseniato (AsF_6^-), por nombrar unos pocos. Otros aniones adecuados incluyen, sin limitación, iones haluro (Cl^- , Br^- y I^-), perclorato, hidróxido, $\text{F}(\text{HF})_n^-$, tetrafluoroborato (BF_4^-), tetracloroborato, hexafluorofosfato (PF_6^-), nitrato, trifluorometanosulfonato (triflato), metilsulfonato (mesilato), p-toluenosulfonato (tosilato), dicianamida, perfluorobutilsulfonato, trifluoroacetato (CF_3COO^-), $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COO}^-$, dibutilfosfato, carbonato, lactato, tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato $[(\text{C}_2\text{F}_5)_3\text{PF}_3]^-$, bis(trifluorometilsulfonyl)imida $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$, bis(perfluoroetilsulfonyl)imida, hidrogenosulfato, metilcarbonato, alquil(C_{1-16})sulfato, incluyendo por ejemplo, metilsulfato, etilsulfato y octilsulfato, 2-(2-metoxietoxi)etilsulfato, tiocianato, tris(trifluorometilsulfonyl)metido $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3\text{C}]^-$ y similares.

En una realización, el anión es un anión que contiene flúor. En otra realización, el anión es un ión inorgánico que contiene flúor. Preferiblemente, el anión es tetrafluoroborato (BF_4^-) o hexafluorofosfato (PF_6^-). Aunque se contempla que cualquier líquido iónico que está fundido a temperatura ambiente es útil según la invención, los líquidos iónicos preferidos serán sales de los cationes tetrafluoroborato (BF_4^-) o hexafluorofosfato (PF_6^-) según las fórmulas (I) y (II).

Los líquidos iónicos más preferidos según la invención, pueden describirse generalmente por la fórmula (III):



que se abrevia en el presente documento como [BMIM] $[\text{X}^-]$, en la que X^- representa cualquiera de los aniones indicados en el presente documento, dándose preferencia a tetrafluoroborato $[\text{BF}_4^-]$ y hexafluorofosfato $[\text{PF}_6^-]$ en vista de los excelentes resultados obtenidos con estos compuestos. Por tanto, los líquidos iónicos de estos dos aniones se designan [BMIM] $[\text{BF}_4^-]$ y [BMIM] $[\text{PF}_6^-]$, respectivamente. Líquidos iónicos a modo de ejemplo según la fórmula (III) incluyen, sin limitación:

- tetracloroaluminato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- hexafluoroantimoniato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- 1-butil-3-metilimidazolio-dicianamida;
- tiocianato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- nitrato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio;
- yoduro de 1-butil-3-metilimidazolio;
- trifluoroacetato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- metilsulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- trifluorometilsulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio;
- 1-butil-3-metilimidazolio-bis(trifluorometilsulfonyl)imida.

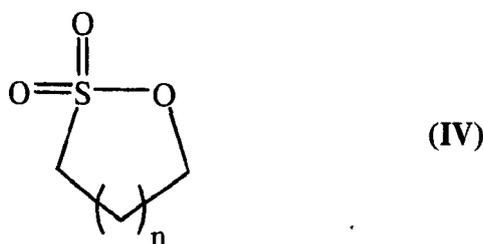
Otros ejemplos no limitativos de líquidos iónicos que se contempla que son útiles en la práctica de los métodos sintéticos descritos en el presente documento son aquellos en los que el grupo butilo de los líquidos iónicos anteriores se sustituye por otras cadenas de alquilo C_{1-10} , tales como metilo, etilo, propilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo. Ejemplos no limitativos adicionales de líquidos iónicos son aquellos distintos de líquidos iónicos de la fórmula (III), tales como:

- 5 tetrafluoroborato de tri(etil)hexilamonio;
 hexafluorofosfato de tri(etil)hexilamonio;
 hexafluoroantimoniato de tri(etil)hexilamonio;
 tri(etil)hexilamonio-bis(trifluorometilsulfonil)imida;
- 10 tetrafluoroborato de tri(hexil)tetradecilfosfonio;
 hexafluorofosfato de tri(hexil)tetradecilfosfonio;
 hexafluoroantimoniato de tri(hexil)tetradecilfosfonio;
- 15 tri(hexil)tetradecilfosfonio-bis(trifluorometilsulfonil)imida;
 tetracloroaluminato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
 hexafluoroantimoniato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
- 20 tetrafluoroborato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
 hexafluorofosfato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
- 25 metilsulfonato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
 trifluorometilsulfonato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
- 30 tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de 1-butil-1-metilpirrolidinio;
 1-butil-1-metilpirrolidinio-bis(trifluorometilsulfonil)imida;
- 35 tetracloroaluminato de N-butilpiridinio;
 hexafluoroantimoniato de N-butilpiridinio;
- 40 tetrafluoroborato de N-butilpiridinio;
 N-butilpiridinio-dicianamida;
- 45 tiociano de N-butilpiridinio;
 nitrato de N-butilpiridinio;
- 50 cloruro de N-butilpiridinio;
 yoduro de N-butilpiridinio;
- 55 hexafluorofosfato de N-butilpiridinio;
 trifluoroacetato de N-butilpiridinio;
 metilsulfonato de N-butilpiridinio;
- 60 trifluorometilsulfonato de N-butilpiridinio;
 tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de N-butilpiridinio;
- 65 N-butilpiridinio-bis(trifluorometilsulfonil)imida; y
 etildimetilpropilamonio-bis(trifluorometilsulfonil)imida;
 hexafluorofosfato de etildimetilpropilamonio;
- 65 tetrafluoroborato de etildimetilpropilamonio; y

hexafluoroantimoniato de etildimetilpropilamonio.

Los líquidos iónicos son preferiblemente de alta pureza, lo que quiere decir una pureza mayor del 95%, más preferiblemente pureza mayor del 97% y todavía más preferido pureza mayor del 98% y óptimamente será una pureza mayor del 99%. Se entenderá que la referencia a pureza en el presente documento quiere decir la ausencia de materiales de partida sin reaccionar y subproductos de las reacciones normalmente empleadas para formar los líquidos iónicos, pero no excluye necesariamente la presencia de co-disolventes, por ejemplo acetonitrilo, para modificar la viscosidad y la conductividad iónica del sistema disolvente, aunque en la práctica no se prefiere el uso de co-disolventes.

El agente alquilante puede ser cualquier resto orgánico que comprende un grupo saliente, pero se seleccionará normalmente de sultonas; ésteres de ácido haloacético (por ejemplo, bromoacetato de metilo); y compuestos de la fórmula RL en la que R es cualquier radical hidrocarbonado C₁₋₂₀ adecuado, opcionalmente sustituido con uno o más heteroátomos y que incluye opcionalmente enlaces insaturados, y L es cualquier grupo saliente, tal como halógeno (preferiblemente yodo) o triflato. Las sultonas tendrán la estructura general:



en la que n es un número entero normalmente de desde 1 hasta 4, más normalmente desde 1 hasta 3 y preferiblemente es 1 ó 2. Cuando n=1 la sultona es 1,3-propanosultona y cuando n=2 la sultona es 1,4-butanosultona. La 1,3-propanosultona representa el reactivo alquilante preferido según la invención, debido en parte a la conveniencia de ésteres de acridinio funcionalizados con grupos N-sulfopropilo en inmunoensayos quimioluminiscentes y similares. Por consiguiente, la siguiente discusión del desarrollo del método de la invención se describe en relación con 1,3-propanosultona pero se entenderá que puede extenderse generalmente a todos los reactivos alquilantes adecuados.

La presente invención resultó de extensos esfuerzos para identificar un medio de reacción propicio para llevar a cabo la N-alquilación de compuestos de acridina con reactivos alquilantes tales como 1,3-propanosultona en el que la conversión química para dar el producto N-alquilado sea de al menos el 70% y preferiblemente >80%. También se deseaba conseguir esta transformación química usando sólo cantidades limitadas del reactivo alquilante, preferiblemente no más de un exceso de 10 veces con respecto al compuesto de acridina, debido a la extrema toxicidad de 1,3-propanosultona, que hasta ahora se ha empleado en gran exceso en la reacción, habitualmente en ausencia de disolvente. Además se deseaba conseguir la reacción de N-alquilación usando 1,3-propanosultona en condiciones de reacción que minimicen la formación de polisulfonato de manera que no siempre se requiera la hidrólisis ácida del material polisulfonato formado en la reacción. Sin embargo, no se conocía ni resultaba fácilmente evidente ningún método para cumplir estos objetivos.

En los esfuerzos iniciales, se investigó la N-alquilación del éster metílico de acridina ilustrado en la figura 1 con un exceso de 10 veces de 1,3-propanosultona destilada en diversos disolventes a elevadas temperaturas para garantizar una conversión eficaz. Estas reacciones a pequeña escala se llevaron a cabo tal como se describe en el ejemplo 1 y el grado de formación de producto se estimó mediante análisis de HPLC (cromatografía de líquidos a alta presión) de las mezclas de reacción en bruto. Los disolventes que se investigaron oscilaban entre xileno no polar y disolventes polares apróticos tales como dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), dietil éter de dietilenglicol (DGDE), sulfolano y los líquidos iónicos tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] [BF₄] y hexafluorofosfato [BMIM] [PF₆]. También se investigó el efecto de añadir bases tales como 2,6-di-t-butilpiridina y 2,6-di-t-butil-4-metilpiridina en sulfolano sobre el grado de formación de producto. En la tabla 2 se resumen los resultados de estas mediciones.

Tabla 2. N-alquilación de éster metílico de acridina con propanosulfona				
Disolvente	T (°C)	horas	Base; (eq.)	% de conversión
Xileno	140	4	--	5
DMSO	155	1	--	<10
DMSO	155	16	--	0
DGDE	155	--	--	0
DMF	155	6	--	40
sulfolano	155	6	--	60
sulfolano	155	24	--	67
sulfolano	210	2	--	55
sulfolano	155	3	DtBP; (5)	60
sulfolano	155	4	DtBMP; (5)	60
[BMIM] [BF ₄]	155	16	--	82
[BMIM] [PF ₆]	155	24	--	87

El disolvente xileno condujo a una escasa conversión y en DMSO la formación de producto fue mínima a tiempos de reacción cortos de una hora observándose una descomposición sustancial a un tiempo de reacción más largo, de 16 horas. La reacción en DMF fue marginalmente mejor con un 40% de conversión mientras que no se observó apenas ninguna reacción en DGDE. El disolvente sulfolano proporcionó una conversión moderada a producto del 60% después de 6 horas lo que sólo mostró una mejora marginal hasta el 67% después de 24 horas a 155°C. Aumentar la temperatura de la reacción en sulfolano hasta 210°C no mejoró la conversión a producto, que se observó que era del 55%. También, la inclusión de las bases 2,6-di-t-butilpiridina (DtBP) o 2,6-di-t-butil-4-metilpiridina (DtBMP) en las reacciones en sulfolano no mejoró el grado de formación de producto que fue del 60% en ambos casos.

Sorprendentemente, al contrario que los otros disolventes, ambos líquidos iónicos demostraron ser medios excelentes para la N-alquilación del éster metílico de acridina usando una cantidad limitada de propanosulfona dando una conversión >80%, tal como se indica en los resultados en la tabla 2. Aunque las reacciones resumidas en la tabla 2 se llevaron a cabo a pequeña escala (25-50 mg de éster de acridina), el aumento a escala de la reacción hasta 1-2 g del éster de acridina condujo a una conversión a producto todavía mejor (>85%). Se realizó la reacción en [BMIM] [PF₆] con 2 gramos del éster metílico de acridina y se sometió convenientemente a tratamiento final diluyendo la mezcla de reacción en acetato de etilo y recogiendo el producto bruto mediante filtración simple. La hidrólisis del éster metílico con ácido clorhídrico seguido por simple precipitación dio 1,68 g (66%) del ácido acridinio-carboxílico y con una pureza excelente (94%) tal como se describe en el ejemplo 2. Una reacción similar, descrita en el ejemplo 3, se llevó a cabo en [BMIM] [BF₄] usando 1 g del éster de acridina que, después de la hidrólisis del éster metílico, llevó a 0,79 g de producto. Ninguno de los procedimientos anteriores en estos dos LI requirió cromatografía, sino que requirieron filtración simple para aislar el producto final. Además, el propósito de la hidrólisis ácida en ambos procedimientos era principalmente para la hidrólisis del éster metílico, en vez de descomponer polisulfonato, ya que la formación de polisulfonato fue mínima en estas reacciones. Esto se ilustra en las figuras 2A y 2B en las que se muestran análisis de HPLC de las reacciones de N-alquilación del éster metílico de acridina con propanosulfona o bien en 1,3-propanosulfona pura o bien en [BMIM] [PF₆]. Tal como resulta evidente a partir de la figura 2B, la reacción en líquido iónico muestra principalmente producto monosulfonado mientras que la reacción llevada a cabo en propanosulfona pura (figura 2A) muestra una cantidad significativa de polisulfonación que se manifiesta como una serie de picos de intensidad decreciente que eluyen después del pico de producto principal.

La ausencia de polisulfonación significativa en líquidos iónicos permitió una mejora en el rendimiento de producto del éster NSP-DMAE-NHS tal como se muestra a modo de ejemplo mediante la N-alquilación del éster acridina-NHS con diez equivalentes de propanosulfona en [BMIM] [PF₆]. Tal como se describe en el ejemplo 4, la N-alquilación de 0,5 g del precursor de acridina condujo, después de la purificación mediante HPLC, a 0,356 g (56%) del producto éster NSP-DMAE-NHS lo que representa un rendimiento de más del doble usando cinco veces menos 1,3-propanosulfona con respecto al procedimiento descrito por Law *et al.* en la patente estadounidense n.º 5.656.426, incorporada como referencia en el presente documento.

En una realización, se producirá al menos aproximadamente un 50% menos de producto de polisulfonación cuando se alquila un compuesto de acridina con 1,3-propanosulfona en líquidos iónicos según la invención en comparación con el uso de 1,3-propanosulfona pura en condiciones por lo demás idénticas. Preferiblemente, se producirá al menos aproximadamente un 60% menos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70% menos y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% menos y de manera ideal al menos aproximadamente un 90% menos de producto de polisulfonación con el método de la invención en comparación con el uso de 1,3-propanosulfona pura.

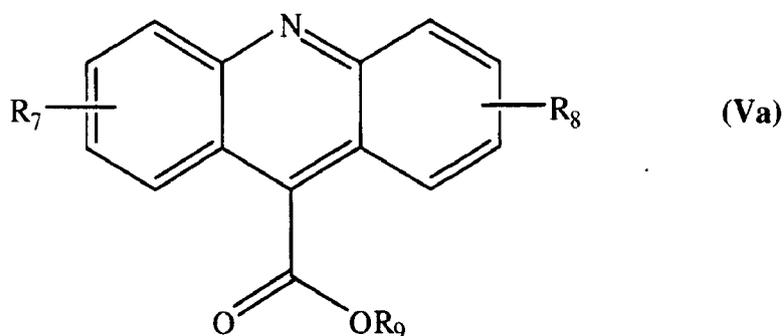
La N-alquilación con 1,3-propanosulfona en líquidos iónicos de ésteres de acridina que contienen grupos funcionales en el anillo de acridina también se llevó a cabo satisfactoriamente tal como se ilustra en la figura 3 y el ejemplo 5. En este ejemplo particular, el éster de acridina tiene grupos alcoxilo (OR) donadores de electrones en C-2 y C-7 del

anillo de acridina. La N-alkilación de este compuesto con 10 equivalentes de propanosultona condujo a un 80% de conversión a producto. En este caso, se mejoró la conversión mediante la inclusión de la base 2,6-di-t-butilpiridina en el medio de reacción. El tratamiento final de la reacción después de la reacción de N-alkilación, seguido por la hidrólisis del éster metílico y posterior purificación mediante HPLC, condujo a un rendimiento aislado del 52% del producto final.

El sorprendente descubrimiento de que la N-alkilación de compuestos de acridina con propanosultona puede llevarse a cabo en líquidos iónicos usando una cantidad limitada de sultona, pero avanzar de manera limpia con una excelente conversión y un aislamiento de producto directo, no sólo ofrece una oportunidad para abreviar el uso del carcinógeno propanosultona, sino que también ofrece un protocolo para el aumento a escala de la síntesis de una variedad de compuestos de acridinio hidrófilos. Además de [BMIM] [PF₆] y [BMIM] [BF₄], se contempla que una amplia variedad de líquidos iónicos, como los descritos en el presente documento o generalmente conocidos de otro modo, serán útiles en la presente invención. Se prefiere un exceso de entre 5-20 veces de líquido iónico con respecto al compuesto de acridina en la reacción de N-alkilación aunque también es probable que otras razones sean útiles porque el líquido iónico es simplemente el disolvente de reacción.

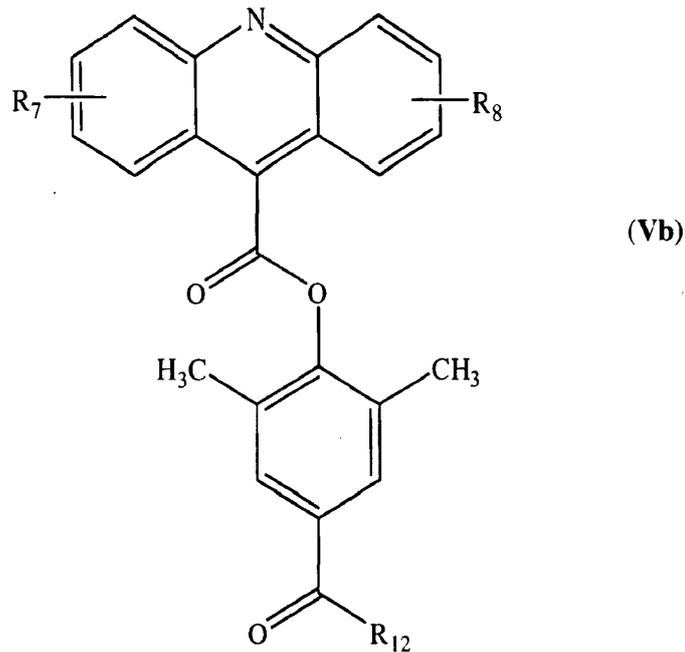
La temperatura de reacción útil para lograr la reacción de N-alkilación de ésteres de acridina será normalmente de entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 120°C a aproximadamente 160°C. El calentamiento puede llevarse a cabo de manera térmica tal como en un baño de aceite o mediante calentamiento por microondas. Los tiempos de reacción más útiles para conseguir una buena conversión química (es decir, >70%) pueden abarcar el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 24 horas, aunque es preferible de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas. Pueden emplearse probablemente tiempos de reacción de más de 24 horas para mejorar adicionalmente la conversión química.

La reacción de alkilación en líquidos iónicos dada a conocer en el presente documento es extremadamente versátil, debido en parte al hecho de que la polisulfonación se evita en gran parte, evitando por tanto la necesidad de hidrólisis ácida que de lo contrario interferiría con los grupos funcionales lábiles a ácidos en la molécula. Por tanto, no hay esencialmente ninguna limitación en la estructura de los compuestos de acridina que pueden N-alkilarse según la invención, con la posible excepción de que antes de llevar a cabo la reacción de N-alkilación deben evitarse o protegerse con un grupo protector adecuado los grupos funcionales fuertemente nucleófilos que pueden reaccionar con el agente alkilante. En una realización, los compuestos de acridina de partida usados en la presente invención son ésteres de acridina que tienen la siguiente estructura:



en la que R₇ y R₈ pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, -OR y R; en los que R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; y R₉ es un resto alquilo o arilo sustituido o no sustituido, normalmente un resto arilo sustituido que tiene grupos funcionales para formar conjugados con analitos, análogos de analitos o anticuerpos para tales analitos. En una realización, R₇ y R₈ representan cada uno hidrógeno. En otra realización, R₇ y R₈ son sustituyentes en los átomos de carbono C2 y C7 del núcleo de acridina, respectivamente. En una variante particularmente interesante del caso en el que R₇ y R₈ son de la forma -OR, R puede comprender una o más unidades de etilenglicol de la forma -(O-CH₂-CH₂)_n- (n=1-5) o pueden comprender grupos sulfonilpropilo (-CH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻), o combinaciones de los mismos, tal como por ejemplo -(O-CH₂-CH₂)_n-CH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻ o -CH₂-CH₂-CH₂-SO₂-NH-(O-CH₂-CH₂)_n, o similares y R puede ser opcionalmente un sustituyente ramificado, tal como se ilustra en la figura 3.

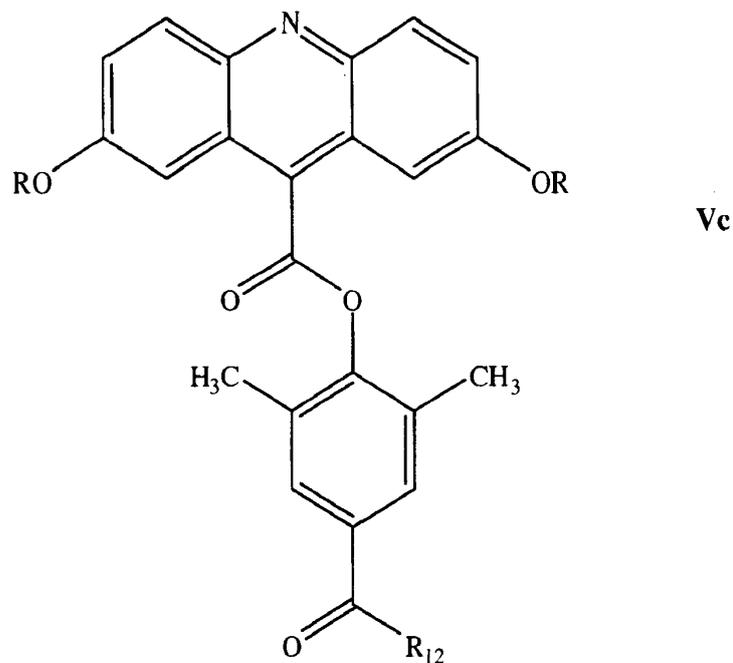
Las estructuras preferidas de los ésteres de acridina según esta realización tendrán la estructura:



en la que R_7 y R_8 son tal como se definieron anteriormente, y R_{12} se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (i) -OR (en el que R es tal como se definió anteriormente);
- (ii) -O-N-succinimidilo;
- 10 (iii) -NH-(CH₂)₅-C(=O)-O-N-succinimidilo; y
- (iv) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(=O)-(CH₂)₃-C(=O)-O-N-succinimidilo, en el que $n = 0$ a 5.

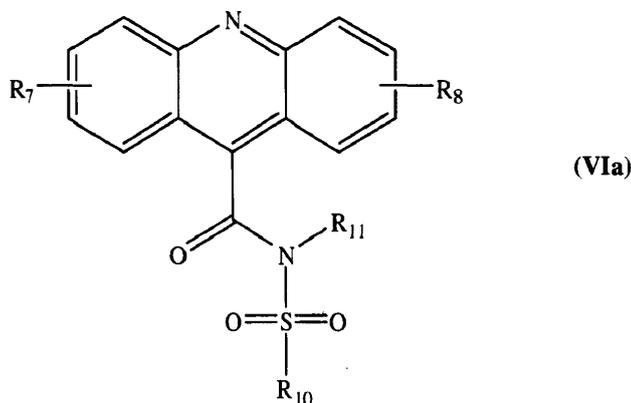
Otras estructuras preferidas de los compuestos éster de acridina tienen la forma:



15 en la que R_{12} es tal como se definió anteriormente; y R se selecciona independientemente en cada caso y también es tal como se definió anteriormente.

20 En otra realización, pueden usarse compuestos de acridina-sulfonamida como compuesto de acridina de partida en

la transformación para dar acridinio-sulfonamidas. Normalmente, las acridina-sulfonamidas tendrán la siguiente estructura:



5 en la que R_7 y R_8 se seleccionan independientemente y son tal como se definieron anteriormente, y R_{10} y R_{11} pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos.

10 Para optimizar el rendimiento en la N-alquilación de compuestos de acridina que contienen grupos donadores de electrones (por ejemplo, -OR) en el núcleo de acridina, se prefiere incluir una base en la mezcla de reacción, preferiblemente un derivado de piridina, y más preferiblemente un derivado de piridina estéricamente impedido que no reaccionará con el reactivo alquilante. Las bases preferidas son 2,6-di-t-butilpiridina o 2,6-di-t-butil-4-metilpiridina en la razón molar preferida de 1:2 (base:reactivo alquilante), aunque también es probable que otras razones sean
15 útiles.

Los ejemplos adicionales de compuestos que pueden prepararse según los métodos de la invención incluyen todos los ésteres de acridinio y acridinio-sulfonamidas dados a conocer en la publicación de patente estadounidense 2005/0221390 y la publicación de patente estadounidense 2004/0063147, cuyas descripciones se incorporan como
20 referencia en el presente documento.

Ejemplo 1

25 Procedimiento general para la N-alquilación a pequeña escala de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenilo con propanosultona en diversos disolventes.

El siguiente procedimiento ilustrado en disolvente DMF fue típico. Se calentó una mezcla de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenilo (50 mg, 0,13 mmol) y 1,3-propanosultona destilada (160 mg, 10 equivalentes) en DMF anhidra (0,5 ml) en un baño de aceite a 155-160°C. Después de 6 horas, se realizó un análisis de HPLC
30 usando una columna de 4,6 x 30 cm, C18 y un gradiente de 30 minutos de MeCN al 10% → 100%/agua (cada uno con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. y detección UV a 260 nm indicó que el producto eluía a ~17,5 minutos. La comparación con la cantidad de material de partida sin reaccionar que eluía a 26 minutos indicó aproximadamente un 40% de conversión.

35 Se realizaron de manera similar reacciones a pequeña escala en otros disolventes.

Ejemplo 2

40 N-Alquilación en una escala de gramos de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenilo con propanosultona en [BMIM][PF₆]: Síntesis de 10-sulfopropilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenilo.

A un vial de 8 dracmas se le añadieron 2,0 g (5,19 mmol) del éster de acridina, 15 g (52,8 mmol) de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (Fluka) y 6,34 g (51,9 mmol) de 1,3-propanosultona destilada bajo nitrógeno. Se calentó este vial sellado hasta 155°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta
45 40°C y se añadió gota a gota a 500 ml de acetato de etilo con agitación lo que dio un precipitado amarillo. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas y se filtró. La lavó la torta de filtro con acetato de etilo (50 ml x 3) y se secó a alto vacío lo que dio 6,19 g de un sólido amarillo que entonces se trató tal como sigue.

Se añadieron los 6,19 g anteriores de éster de acridinio bruto a 80 ml de disolución de HCl (8 ml de HCl concentrado y 72 ml de agua desionizada). Se calentó la mezcla de reacción hasta 110°C durante 4 horas y entonces se enfrió hasta 2-8°C durante la noche. Se formó un precipitado amarillo que se filtró. Se lavó la torta de filtro con agua desionizada (40 ml x 3) y dietil éter (20 ml x 2) y se secó a alto vacío sobre P₂O₅ lo que dio 1,68 g de polvo amarillo
50

(el 66% de rendimiento a partir de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenilo, el 94% de pureza mediante HPLC).

Ejemplo 3

5 N-Alquilación en una escala de gramos de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenilo con propanosultona en [BMIM] [BF₄]: Síntesis de 10-sulfopropilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenilo.

10 A un vial de 8 dracmas se le añadieron 1,0 g (2,6 mmol) del éster de acridina, 10 g (44,2 mmol) de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] [BF₄] (Fluka) y 3,18 g (26,0 mmol) de 1,3-propanosultona destilada bajo nitrógeno. Se calentó este vial sellado hasta 155°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente lo que dio un líquido transparente rojo (el 83% de conversión a producto mediante HPLC). Se añadió el líquido transparente rojo anterior del éster metílico de acridinio a 30 ml de una disolución de HCl 1 M. Se calentó la mezcla de reacción hasta 110°C durante 4 horas y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente lo que dio una disolución roja. Se vertió la mezcla de reacción en 1000 ml de agua desionizada y se formó un precipitado amarillo. Se mantuvo la mezcla en la nevera durante la noche. Entonces se filtró el precipitado amarillo y se lavó con agua desionizada (40 ml x 3) y dietil éter (40 ml x 3). Entonces se secó a alto vacío sobre P₂O₅ lo que dio 0,793 g de producto como un polvo amarillo (el 62% de rendimiento a partir de éster de acridina, el 81% de pureza mediante HPLC).

Ejemplo 4

25 N-Alquilación en una escala de medio gramo de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarbonilfenilo con propanosultona en [BMIM] [PF₆]: Síntesis de 10-sulfopropilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarbonilfenilo (NSP-DMAE-NHS).

30 A un vial de 8 dracmas se le añadieron 0,50 g (1,07 mmol) de acridina-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarbonilfenilo, 5 g (17,6 mmol) de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] [PF₆] (Fluka) y 1,31 g (10,7 mmol) de 1,3-propanosultona destilada bajo nitrógeno. Se calentó este vial sellado hasta 155°C durante 16 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta 40°C y se añadió gota a gota a 100 ml de acetato de etilo con agitación lo que dio un precipitado amarillo. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas y se filtró. Se lavó la torta de filtro con acetato de etilo (30 ml x 2) y se secó a alto vacío lo que dio 0,753 g de un sólido amarillo. Se purificó el producto bruto mediante HPLC preparativa con sistema Waters usando una columna YMC, C18, de 50 x 500 mm, con una velocidad de flujo de disolvente de 60 ml/minuto, detección UV a 260 nm, realizándose la elución con B al 35% a lo largo de 50 minutos (A: agua/TFA al 0,05%; B: acetonitrilo/TFA al 0,05%). Después de la liofilización de las fracciones de HPLC, se obtuvo el producto deseado éster NSP-DMAE-NHS, 0,356 g (el 56% de rendimiento), como un polvo amarillo.

Ejemplo 5

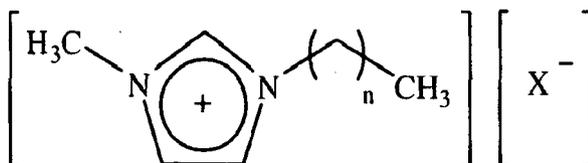
40 N-Alquilación de un éster de acridina que contiene grupos donadores de electrones en el anillo de acridina con propanosultona en [BMIM] [PF₆].

45 Se combinaron el éster de acridina ilustrado en la figura 3 (78 mg, 98 μ moles), 1,3-propanosultona destilada (120 mg, 10 equivalentes) y 2,6-di-t-butilpiridina (0,110 ml, 5 equivalentes) en 1,2 g [BMIM] [PF₆] y se calentaron a 155°C en un baño de aceite durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC tal como se describió en el ejemplo 1. Se observó aproximadamente un 80% de conversión a producto que eluía a 19 minutos eluyendo el material de partida a 25 minutos. Se disolvió la mezcla de reacción en bruto en acetato de etilo (5 ml) y se aplicó a una columna de sílice. En primer lugar se eluyó la columna con acetato de etilo (500 ml) seguido por acetato de etilo/metanol 1:1. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a presión reducida lo que dio 165 mg de un sólido pegajoso. Se suspendió este producto en 10 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno. Después de 1 hora, el análisis de HPLC indicó la hidrólisis completa del éster metílico y mostró producto que eluía a 16,4 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC C18, de 30 x 300 mm. Se concentraron las fracciones de HPLC a presión reducida. Rendimiento = 46 mg (el 52% global).

REIVINDICACIONES

1. Método para la N-alkilación de un compuesto de acridina, comprendiendo el método proporcionar una mezcla de reacción que comprende dicho compuesto de acridina, un agente alquilante y un disolvente líquido iónico, y calentar dicha mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir dicho compuesto de acridina en un compuesto de N-alkilacridinio.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho disolvente líquido iónico es de la forma:



en la que n es un número entero de desde uno hasta nueve; y

X se selecciona del grupo que consiste en tetracloroaluminato; hexafluoroantimoniato; dicianamida; tiocianato; nitrato; cloruro; yoduro; trifluoroacetato; tetrafluoroborato; hexafluorofosfato; metilsulfonato; trifluorometilsulfonato; tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato; bis(trifluorometilsulfonyl)imida; y

combinaciones de los mismos.

3. Método según la reivindicación 2, en el que X es tetrafluoroborato o hexafluorofosfato.

4. Método según la reivindicación 3, en el que n es 3.

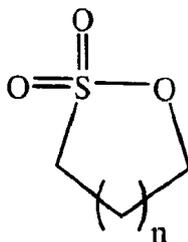
5. Método según la reivindicación 4, en el que el disolvente iónico comprende [BMIM] [PF₆] (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio).

6. Método según la reivindicación 4, en el que el disolvente iónico comprende [BMIM] [BF₄] (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio).

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho agente alquilante se selecciona del grupo que consiste en: sultonas; ésteres de ácido haloacético; haluros de alquilo y triflatos de alquilo; en el que dichos grupos alquilo opcionalmente comprenden uno o más heteroátomos y opcionalmente incluyen uno o más enlaces insaturados.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho agente alquilante es una sultona.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha sultona tiene la estructura:



en la que n = 1 ó 2.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha sultona es 1,3-propanosultona.

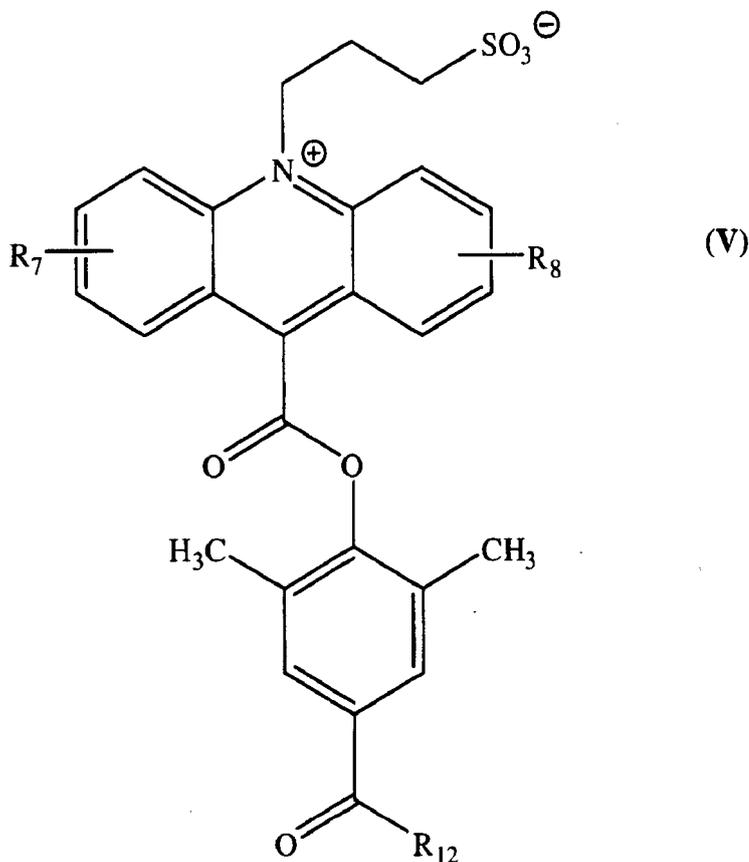
11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de acridina es un éster de acridina.

12. Método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de acridina es una acridina-sulfonamida.

13. Método según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción comprende además una base que no reacciona con dicho agente alquilante en las condiciones de reacción.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha base es un derivado de piridina estéricamente impedido.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha base comprende 2,6-di-t-butilpiridina (DtBP) o 2,6-di-t-butil-4-metilpiridina (DtBMP) o una combinación de las mismas.
- 5 16. Método según la reivindicación 1, la razón molar de dicho agente alquilante con respecto a dicho compuesto de acridina es menor de aproximadamente 20:1, dicho disolvente líquido iónico está presente en una razón molar con respecto a dicho compuesto de acridina de al menos aproximadamente 1:1, y en el que dicha mezcla de reacción se calienta durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 24 horas a una temperatura de entre aproximadamente 120°C y aproximadamente 160°C.
- 10 17. Método según la reivindicación 1, en el que el porcentaje de conversión química para dar dicho derivado de N-alkilacridinio es de al menos aproximadamente el 70%.
- 15 18. Método según la reivindicación 1, en el que el porcentaje de conversión química para dar dicho derivado de N-alkilacridinio es de al menos aproximadamente el 80%.
19. Método según la reivindicación 1 para preparar un compuesto de éster de acridinio que tiene la estructura de la fórmula (V):



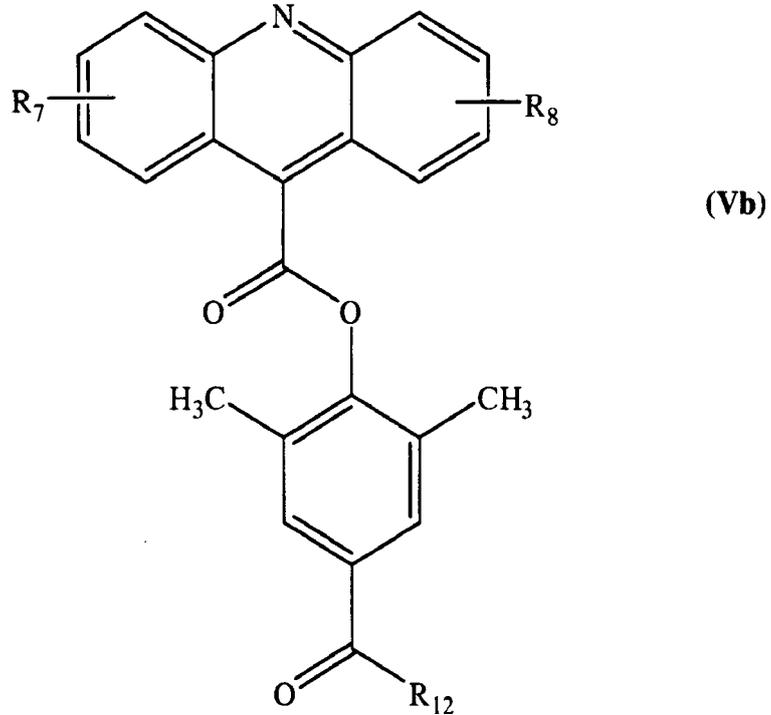
20 en la que R₇ y R₈ pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, -OR y R; en los que R es un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno; y en la que R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) -OR;
- (ii) -O-N-succinimidilo;
- 30 (iii) -NH-(CH₂)₅-C(=O)-O-N-succinimidilo; y
- (iv) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(=O)-(CH₂)₃-C(=O)-O-N-succinimidilo, en el que n = 0 a 5;

35 comprendiendo el método:

(1) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un compuesto de acridina, 1,3-propanosulfona y un disolvente líquido iónico, teniendo el compuesto de acridina la estructura de la fórmula (Vb):

5



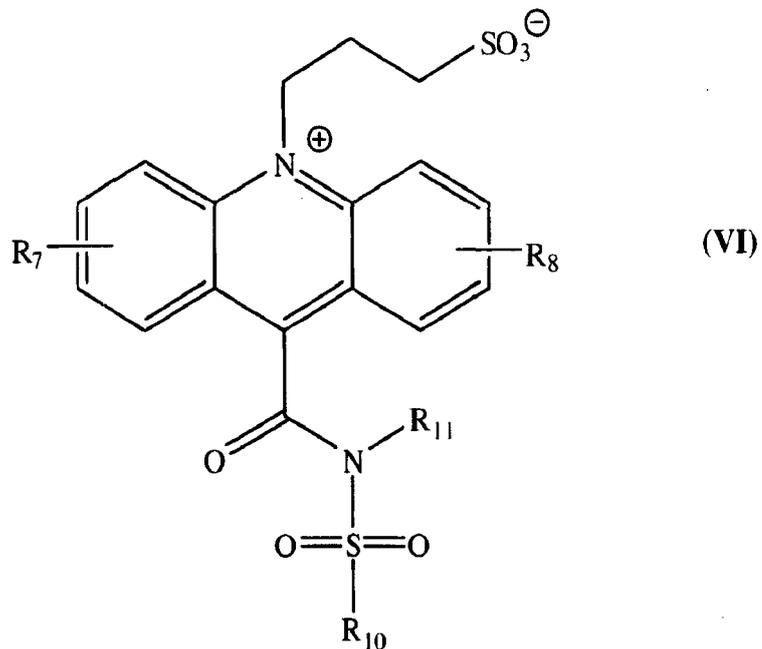
en la que R₇, R₈ y R₁₂ son tal como se definieron anteriormente; y

10

(2) calentar dicha mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir dicho compuesto de acridina de la fórmula (Vb) en dicho compuesto de éster de acridinio de la fórmula (V).

20.
15

Método según la reivindicación 1 para la preparación de un compuesto de acridinio-sulfonamida que tiene la estructura de la fórmula (VI):



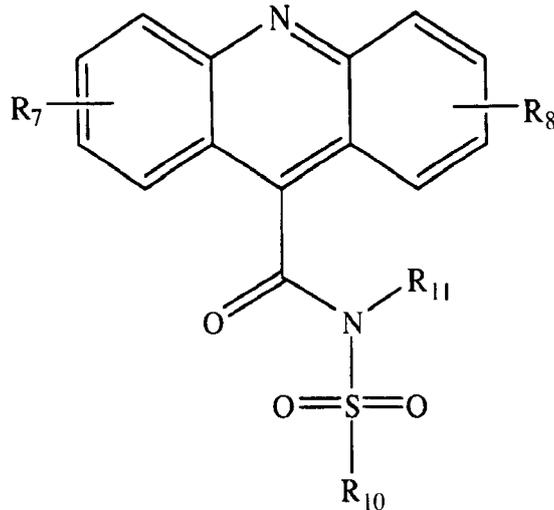
en la que R_7 y R_8 pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, -OR y R; en los que R es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno; y en la que R_{10} y R_{11} pueden ser iguales o diferentes y representan grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo que contienen hasta 20 heteroátomos;

5

comprendiendo el método:

(1) proporcionar una mezcla de reacción que comprende un compuesto de acridina, 1,3-propanosulfona y un disolvente líquido iónico, teniendo el compuesto de acridina la estructura de la fórmula (VIa):

10



15

en la que R_7 , R_8 , R_{10} y R_{11} son tal como se definieron anteriormente; y

(2) calentar dicha mezcla de reacción hasta entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 200°C, para de ese modo convertir dicho compuesto de acridina de la fórmula (VIb) en dicho compuesto de acridinio-sulfonamida de la fórmula (VI).

20

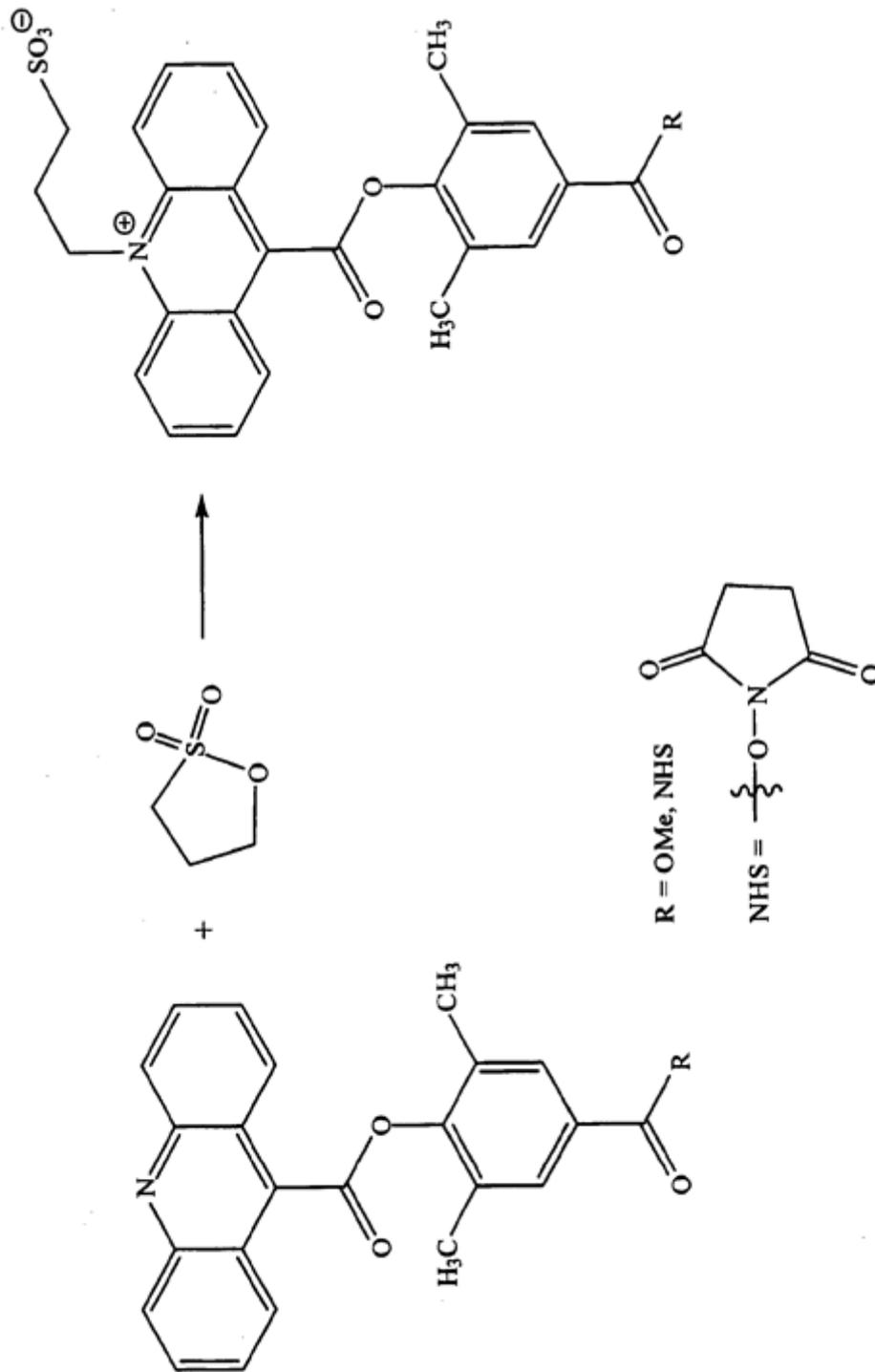


FIGURA 1

N-Alquilación del éster metílico de acridina en 1,3-propanosulfona pura

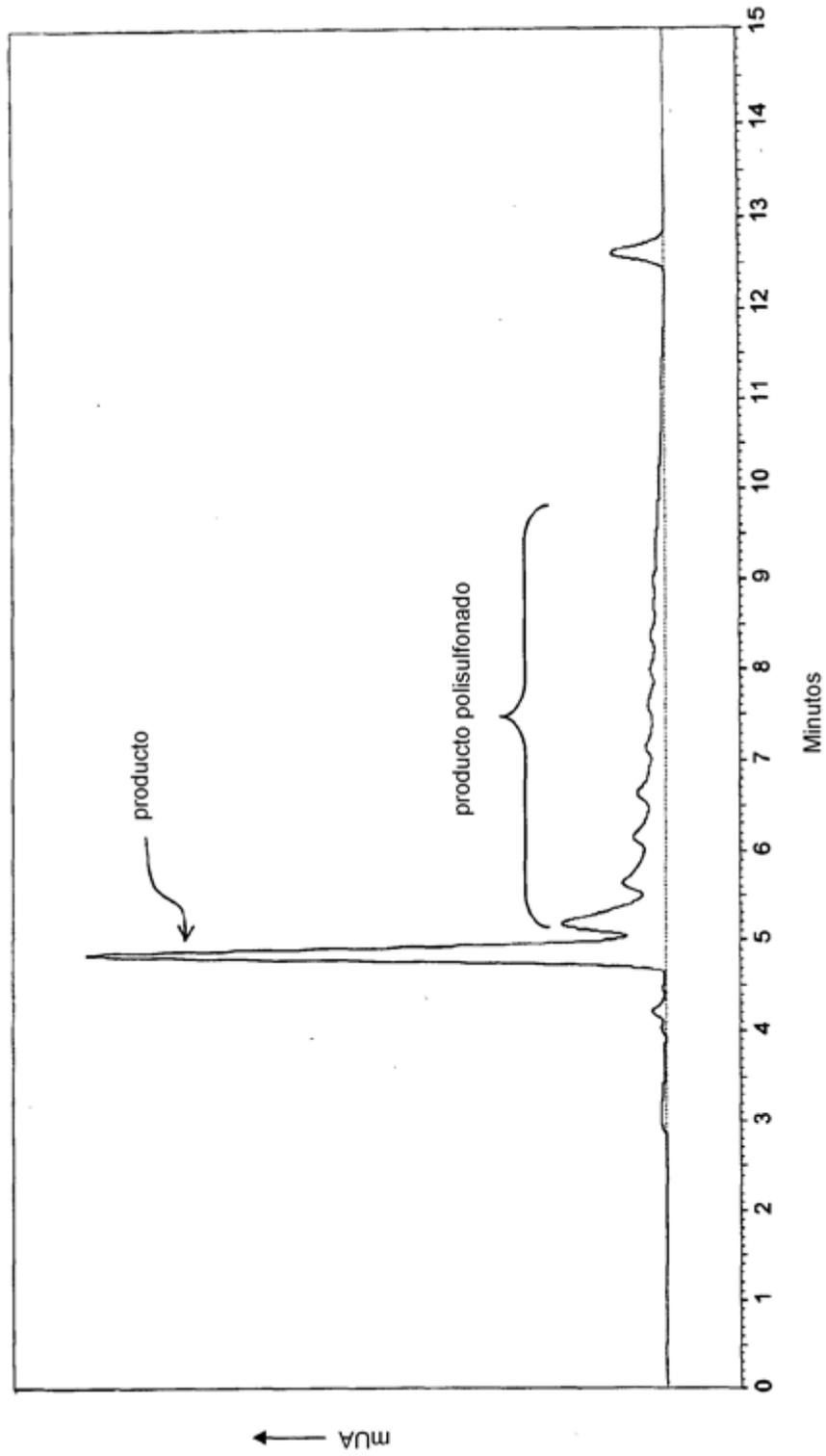


FIGURA 2A

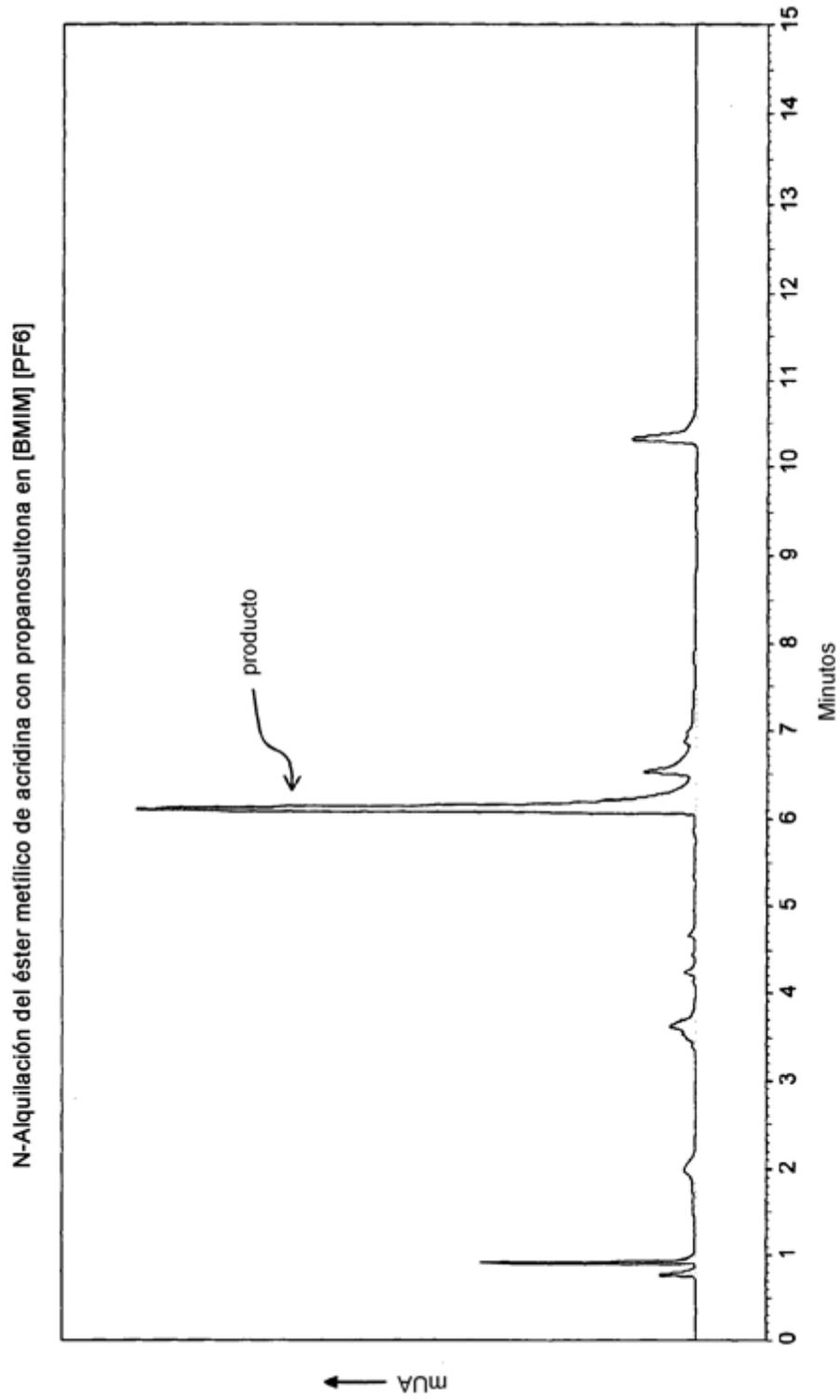


FIGURA 2B

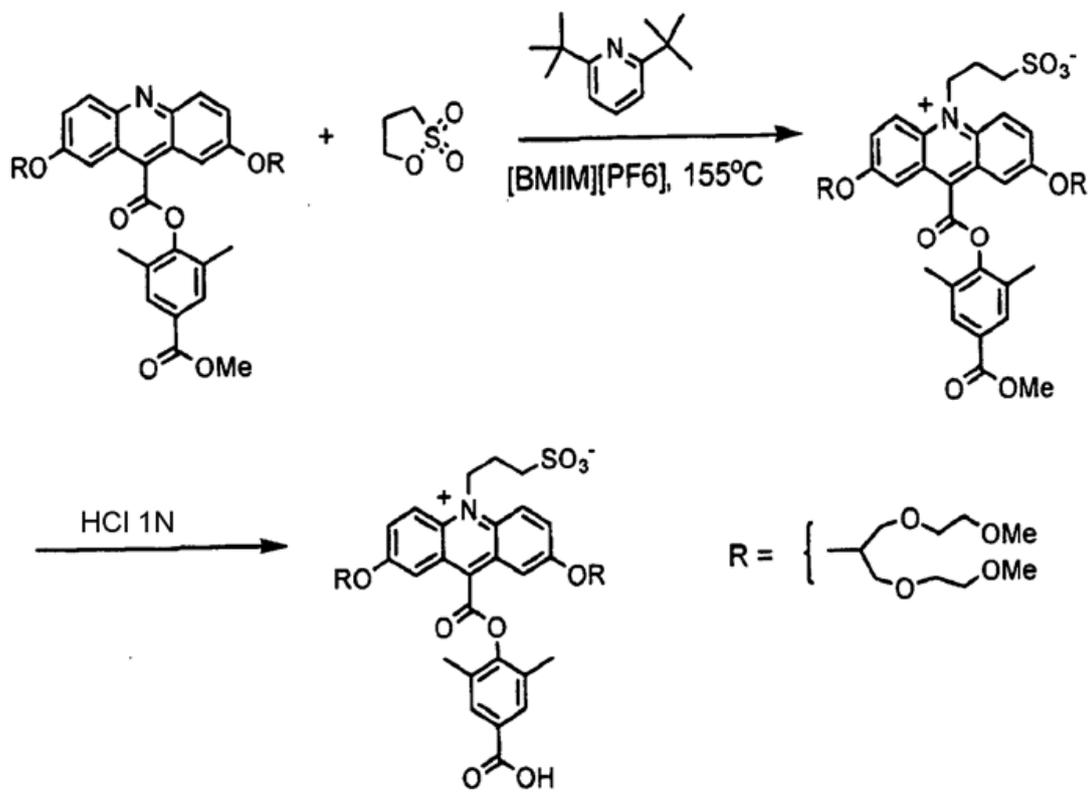


Figura 3.