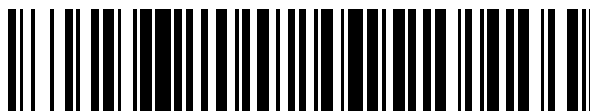


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 190**

51 Int. Cl.:

C07D 219/04 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2003** **E 03021613 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 1403254**

54 Título: **Novedosas aplicaciones de compuestos de acridinio y derivados en ensayos homogéneos**

30 Prioridad:

27.09.2002 US 260504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NATRAJAN, ANAND;
SELLS, TODD;
SCHROEDER, HARTMUT;
YANG, GUOHAN;
SHARPE, DAVID;
JIANG, QINGPING;
LUKINSKY, HANA y
LAW, SAY-JONG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 526 190 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

Novedosas aplicaciones de compuestos de acridinio y derivados en ensayos homogéneos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con la aplicación de compuestos de acridinio con ciertas características estructurales específicas en ensayos homogéneos. Se divulgan aquí características estructurales importantes que son necesarias para asegurar una emisión de luz a pH moderado.

2. Antecedentes de la invención

- 10 Los ésteres de acridinio quimioluminiscentes (AE) son marcadores extremadamente útiles que han sido utilizados extensamente en inmunoensayos y en ensayos de ácidos nucleicos. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,745,181; 4,918,192, 5,110,932; 5,241,070; 5,538,901; 5,663,074 y 5,656,426 divulgan una variedad de ésteres de acridinio estables con diferentes grupos funcionales para conjugación a una variedad de moléculas biológicamente activas denominadas analitos.

- 15 La Patente de los Estados Unidos No. 5, 656,426 divulga un éster de acridinio hidrofílico con rendimiento de cuantos incrementado. Se han dirigido esfuerzos considerables también hacia el diseño de ésteres de acridinio cuya longitud de onda de emisión pueda ser alterada bien sea incorporando características estructurales únicas en el éster de acridinio o empleando el principio de transferencia de energía. Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 395,752; 5, 702,887; 5, 879,894 y 6, 355,803.

- 20 Las sulfonamidas de acridinio son otra clase de compuestos quimioluminiscentes en donde el grupo fenólico saliente sustituido es reemplazado con una sulfonamida sustituida. La síntesis y aplicaciones de estos compuestos de acridinio en ensayos heterogéneos han sido descritos en la técnica anterior: Adamczyk et al, Tetrahedron, vol. S5, páginas 10899-10914 (1999); Mattingly, J. Biolumin. Chemilumin., vol. 6, páginas 107-114 (1991); y Adamczyk et al, Bioconjugate Chem, vol. 11, páginas 714-724 (2000).

- 25 Wilson et al (Anal. Chem 2001, 73, 763-767) divulga el efectos del pH y la concentración de peróxido en el ECL del DMC.

Mecanísticamente, el tratamiento con ácido convierte la forma pseudobase del compuesto de acridinio al éster de acridinio el cual puede participar entonces en la reacción quimioluminiscente con peróxido de hidrógeno. La adición de álcalis sirve no solamente neutralizar el ácido sino también para elevar el pH del medio de reacción para la ionización del peróxido de hidrógeno.

- 30 Los reactivos relativamente agresivos con pH fuertemente ácido del orden de menos de 2 y pH fuertemente básico del orden de más de 12 que son requeridos para disparar la quimioluminiscencia como se describe anteriormente son nocivos para la preservación de complejos enlazantes tales como los complejos anticuerpo-hapteno o híbridos de ácidos nucleicos. Este no es un problema en un formato de ensayo heterogéneo en donde la generación de señal se lleva a cabo típicamente al final del ensayo y donde se han retirado sustancias trazadoras no enlazadas y/o
35 interferentes.

- Un ensayo homogéneo es un método analítico en donde la medición de una sustancia de interés se lleva a cabo sin ningún procedimiento de separación. En un formato de ensayo homogéneo, con el fin de detectar la ocurrencia de eventos de enlazamiento utilizando compuestos de acridinio quimioluminiscentes como marcadores, la generación de luz debe ocurrir bajo condiciones de pH moderadas porque las condiciones de pH agresivas son nocivas para la preservación de los complejos enlazantes. Adicionalmente, se requiere de un mecanismo para distinguir entre trazador o analito enlazado y no enlazado porque no se lleva a cabo ninguna separación en un ensayo homogéneo. Estas restricciones han perturbado la utilidad de los compuestos de acridinio de ensayos homogéneos.

- 40 Los únicos ensayos homogéneos que utilizan compuestos de acridinio que se cree que han sido descritos en la literatura son "ensayos de protección de hibridación". Véase Nelson et al, Biochemistry vol. 35, páginas 8429-8438 (1996). En estos ensayos, la porción de éster de acridinio de una sonda de ácido nucleico marcada con éster de acridinio es descompuesta selectivamente por hidrólisis cuando no está hibridada a un objetivo. La hibridación de la sonda subjetiva da como resultado la protección del éster de acridinio frente a la hidrólisis permitiendo por lo tanto la distinción entre ADN hibridado versus no hibridado. Empleando ésteres de acridinio con ratas de hidrólisis similares pero diferentes perfiles de emisión de luz dependientes del tiempo, se diseñaron ensayos multianalito
50 homogéneos para detectar ácidos nucleicos.

En Nelson et al, la estructura del éster de acridinio no está siendo alterada para permitir la emisión de luz bajo condiciones moderadas. En vez de esto, el ensayo de Nelson et al, tiene la ventaja de las diferentes ratas de

hidrólisis (degradación) del éster de acridinio cuando un ácido nucleico marcado con el éster de acridinio es libre o está hibridado a la secuencia complementaria del ácido nucleico marcado con éster de acridinio. Así, la propiedad del ácido nucleico, bien sea o no hibridado a su secuencia complementaria, está siendo usada para alterar la rata de degradación del éster de acridinio.

- 5 La transferencia de energía por resonancia en fluorescencia (FRET) es un fenómeno bien conocido que ha sido usado ampliamente para estudiar los efectos de proximidad en las biomoléculas. En la FRET, una molécula donante fluorescente excitada electrónicamente transfiere su energía electrónica a una segunda molécula receptora a través de acoplamiento dipolo-dipolo. Esta transferencia de energía produce detención de la fluorescencia del donante. Si el receptor es fluorescente, se observa entonces su fluorescencia.
- 10 La eficiencia de la transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia que separa los fluorescentes donante y receptor y también depende directamente del rendimiento en cuanto fluorescentes del donante y el coeficiente de extinción del receptor en la longitud de onda de emisión máxima del donante. Debido a la dependencia de la distancia, la FRET normalmente no se observa a distancias > 10 nm.
- 15 Los inmunoensayos homogéneos basados en transferencia de energía de quimioluminiscencia también han sido descritos utilizando isoluminol como donante quimioluminiscente y fluoresceína como receptor. Véase Patel et al, Clin, Chem. Vol. 29/9, páginas 1604-1608 (1983). Los ensayos para analitos pequeños tales como la progesterona así como antígenos de proteína fueron construidos utilizando el par donante-receptor isoluminol-fluoresceína presumiblemente porque la quimioluminiscencia del isoluminol puede ser disparada bajo condiciones moderadas.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Las figuras 1 a 10 son todas representaciones gráficas.
- La figura 1 representa titulaciones de pH de éster de dimetil acridinio (DMAE);
- La figura 2 representa titulaciones de pH de 2,7-dimetoxi-DMAE;
- La figura 3 representa un ensayo homogéneo de carbamazepina usando un trazador de éster de acridinio;
- La figura 4 representa un ensayo homogéneo de carbamazepina utilizando un trazador de acridinio sulfonamida;
- 25 La figura 5 representa un ensayo homogéneo de teofilina utilizando un trazador de éster de acridinio;
- La figura 6 representa un ensayo homogéneo de teofilina utilizando un trazador de acridinio sulfonamida;
- La figura 7 representa un ensayo homogéneo de valproato utilizando un trazador de éster de acridinio;
- La figura 8 representa un ensayo homogéneo de valproato utilizando un trazador de acridinio sulfonamida;
- La figura 9 representa un ensayo homogéneo de valproato utilizando un detenedor;
- 30 La figura 10 representa una CL RET de Biotin-AE a Biotin-jfNpFL en un complejo de estreptavidina.

Descripción de las realizaciones preferidas

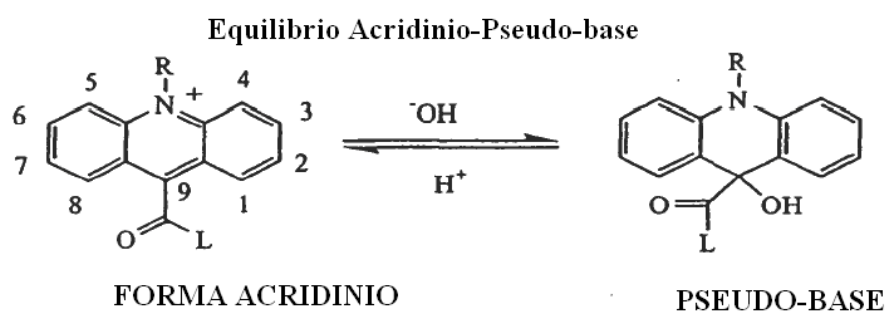
- 35 Esta invención comprende ciertos compuestos de acridinio que incluyen ésteres de acridinio y sulfonamidas de acridinio cuya quimioluminiscencia puede ser disparada bajo condiciones de pH relativamente moderadas. La disponibilidad de tales compuestos de acridinio cuya quimioluminiscencia puede ser disparada bajo condiciones relativamente moderadas hace posible utilizar tales compuestos en ensayos de transferencia de energía en resonancia homogénea. Se ha descubierto inesperadamente, que trazadores de hapteno derivados de estos compuestos de acridinio muestran diferencias significativas en su eficiencia de producción de luz dependiendo de si están libres en solución o enlazados a sus anticuerpos respectivos. El descubrimiento de este fenómeno ha permitido la producción de ensayos homogéneos para analitos clínicamente importantes.
- 40 Los trazadores de hapteno derivados de los compuestos de acridinio de la invención por enlazamientos a sus correspondientes anticuerpos exhiben una alteración en la eficiencia de la emisión de luz. La eficiencia de la emisión de luz significa que los compuestos de acridinio emiten más luz o menos luz dependiendo de si están libres o están enlazados a anticuerpos. Para ésteres de acridinio, la emisión de luz se incrementa mientras que para las sulfonamidas de acridinio, la emisión de luz se disminuye cuando estos compuestos son enlazados a anticuerpos.
- 45 Por lo tanto, dependiendo del compuesto de acridinio, la emisión de luz es bien potenciada o bien atenuada.

Esto efectos han sido utilizados para diseñar ensayos homogéneos para determinar la concentración o para cuantificación o detección de tales analitos clínicamente importantes, incluyendo teofilina, valproato o

- 5 carbamazepina. Además, los compuestos de acridinio divulgados aquí también pueden ser usados en ensayos de transferencia de energía por resonancia (RET) en donde la energía en estado excitado de una acridona formada a partir del compuesto de acridinio durante la reacción quimioluminiscente es transferida en una forma intermolecular a una molécula receptora tal como naftofluoresceína y dabsilo cuya propiedades espectrales (emisión a diferente longitud de onda o de tensión) son distinguibles de la del compuesto de acridinio.

Estructura del acridinio y formación de pseudobases

- 10 Es bien conocido que los compuestos de acridinio existen en un estado de equilibrio entre la forma acridinio y la forma pseudobase en medio acuoso en donde virtualmente se llevan a cabo todos los inmunoensayos. La forma pseudobase de los compuestos de acridinio no puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y así no puede producir quimioluminiscencia. El equilibrio entre la forma de acridinio quimioluminiscente y la forma pseudobase no quimioluminiscente es influido fuertemente por el pH del medio. Un pH ácido por medio de la formación de la forma acridinio y el pH básico por medio de la formación de la forma pseudobase. La siguiente reacción de equilibrio muestra la conversión del compuesto de acridinio a la pseudobase:

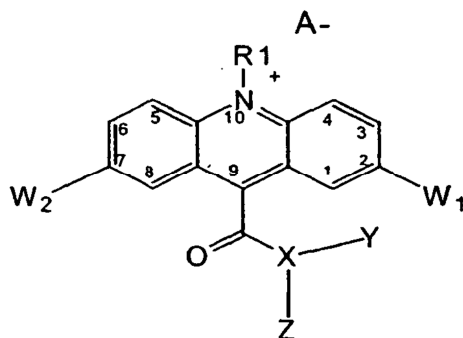


- 15 R es típicamente un alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo; L es típicamente un grupo saliente tal como un alcohol aromático o una sulfonamida.

- 20 En formatos de ensayos heterogéneos, la quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio o las moléculas activas biológicamente marcadas con los compuestos de acridinio, denominados como trazadores o conjugados, es disparada normalmente por la adición secuencial de los reactivos. Un tratamiento inicial del compuesto de acridinio con un peróxido que contiene un ácido fuerte es necesario para convertir la forma pseudobase de compuestos de acridinio a la forma acridinio. El tratamiento subsecuente con solución alcalina neutraliza entonces el ácido y eleva el pH del medio de reacción para la ionización del peróxido de hidrógeno para permitir que tenga lugar la emisión de luz.

- 25 En un ensayo homogéneo, la emisión de luz se presenta a partir de los compuestos de acridinio bajo condiciones moderadas, esto es, un pH moderado de 6 a 10, preferiblemente de forma aproximada de 7 a 9. El mantenimiento de la forma de acridinio sin adición de un ácido fuerte al medio de ensayo es un prerrequisito para generar quimioluminiscencia. Además, omitiendo la etapa de tratamiento con ácido, se obvia también la necesidad de agregar una base fuerte para neutralizar el ácido y para disparar la reacción de quimioluminiscencia.

- 30 Se ha descubierto inesperadamente que los estrés de acridinio que portan grupos funcionales donantes de electrones en la posiciones C-2 y/o C-7 sobre el núcleo acridinio son menos propensos a la formación de pseudobases que los ésteres de acridinio no sustituidos en pH moderado. Los compuestos de acridinio quimioluminiscentes adecuados para uso en la presente invención tienen la siguiente estructura:



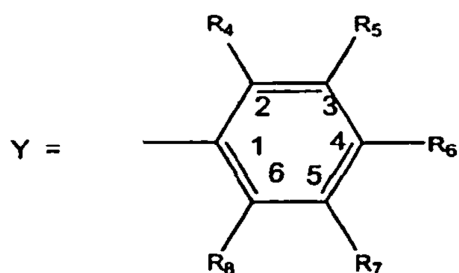
en donde,

R₁ es un alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo;

5 X es oxígeno o nitrógeno;

Y es un alquilo ramificado o de cadena recta que contiene hasta 20 átomos de carbono, halogenado o no halogenado, o un arilo sustituido, o un sistema de anillo heterocíclico;

donde X es oxígeno, Z se omite e Y es una unidad estructural arilo polisustituido de la fórmula:



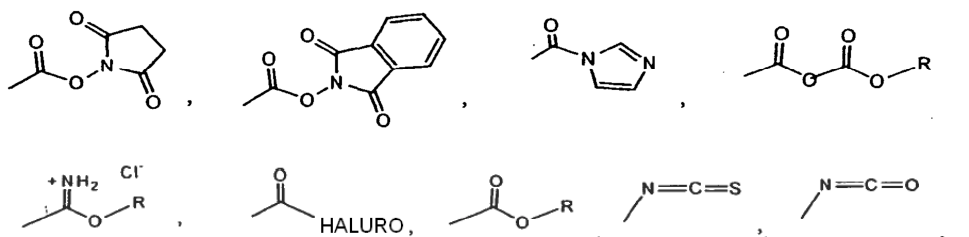
10 en donde R₄ y R₈ son los mismos o diferentes, y son hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, alcoxi (-OR), alquiltiol (-SR) o grupos amino sustituidos que sirven para estabilizar el enlace -COX- entre el núcleo de acridinio y la unidad estructural Y, a través de efectos estéricos y/o electrónicos;

R₅ y R₇ son hidrógeno o el mismo como R;

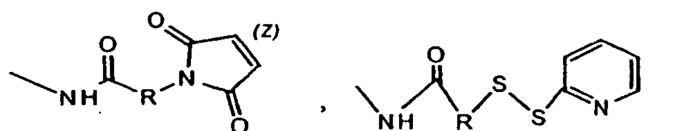
R₆ = -R₉-R₁₀,

15 donde R₉ no es requerido y es un alquilo ramificado o de cadena recta, arilo a aralquilo sustituido o no sustituido que contiene hasta 20 heteroátomos, y

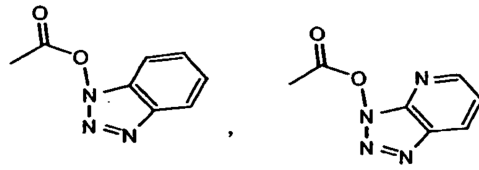
R₁₀ es un grupo saliente o un grupo electrofílico funcional unido con un grupo saliente seleccionado del grupo consistente de:



20



-SO₂Cl, -N₃, -N₂⁺ Cl⁻:



un haluro o -COOH;

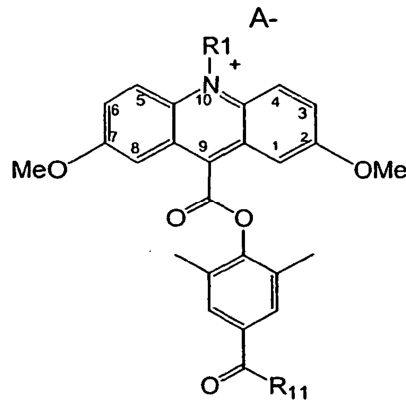
R₅ y R₆, y R₆ y R₇ son intercambiables;

donde X es nitrógeno, Z es -SO₂-Y', e Y' tiene la misma definición de Y y ambos pueden ser el mismo o diferentes;

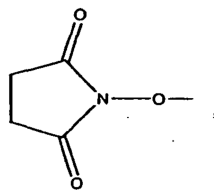
- 5 W1 y W2 son el mismo o diferentes y son grupos donantes de electrones que comprenden OR, OH, SR, SH, NH₂, NR'R''; en donde R, R' y R'' pueden ser el mismo o diferentes, y son seleccionados del grupo consistente de alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo y aralquilo que contienen hasta 20 heteroátomos;

- 10 A⁻ es un contraión el cual es introducido para aliarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y es seleccionado del grupo consistente de CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻, y NO₃⁻.

Más específicamente, el compuesto de acridinio puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:



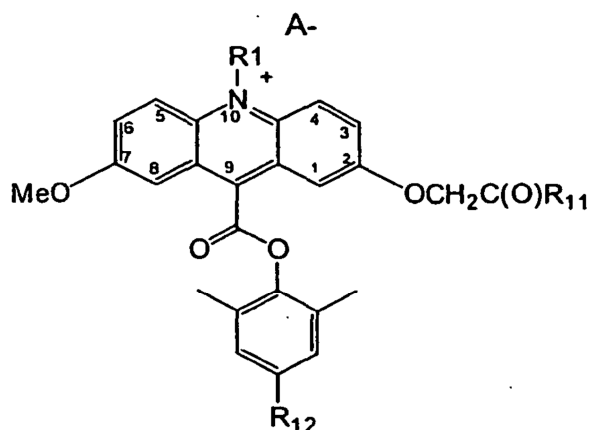
en donde R₁₁ se selecciona del siguiente



15

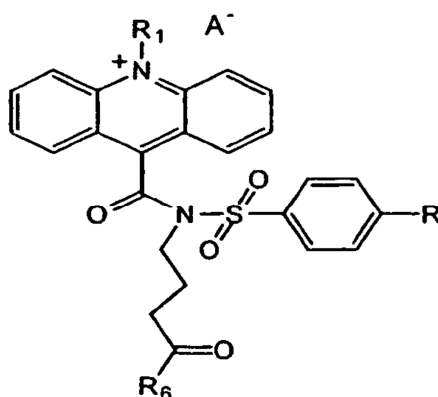
-NH-R-NH₂; y R₁, R y A⁻ son como ya se definió.

Alternativamente, el compuesto de acridinio puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:



en donde R_{12} es seleccionado de hidrógeno, amino, hidroxilo, haluro, nitro, $-CN$, $-SO_3H$, $-SCN$, $-OR$, $NHCOR$, $-COR$, $-COOH$, $-COOR$, o $-CONHR$; y R_1 , A^- y R_{11} son como ya se describió.

- 5 El compuesto de acridinio de la presente invención también puede ser una sulfonamida de acridinio de la siguiente estructura:



en donde R_1 , A^- , R y R_6 son como ya se describió.

- 10 En la figura 1, se muestran las titulaciones de pH del éster de dimetilo de acridinio (DMAE) y en la figura 2 las titulaciones de pH del 2,7-dimetoxi-DMAE en donde la banda de absorción de UV del cromóforo de acridinio se representa gráficamente como una función del pH. El descenso en intensidad de esta banda de absorción es indicativo de la perturbación del cromóforo de acridinio y la formación de una pseudobase. Es evidente de la figura 1 para el DMAE que la formación de la pseudobase está esencialmente completa a pH mayor que 4. Es evidente de la figura 2 que para el análogo 2,7-dimetoxi rico en electrones, la formación de pseudobases está completa solamente a pH mayor que 11.

- 20 Con el fin de determinar si la quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio ricos en electrones puede ser disparada sin pretratamiento con ácido y a un pH más moderado, se midió la emisión de luz de varios compuestos de acridinio incluyendo 2,7-dimetoxi-DMAE y 2-CME-7-metoxi-DMAE y conjugados de proteína anti-TSH empleando un reactivo químico sencillo que comprende 1% de peróxido de hidrógeno y 0.5% de surfactante cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) en regulador de carbonato de sodio a pH 8.3 o a pH 9.

- 25 Los resultados se resumen en la Tabla 1. Para todos los compuestos listados, la cantidad de luz emitida utilizando los disparadores modificados se expresa como un porcentaje de la luz que se mide normalmente siguiendo la adhesión secuencial de 0.5% de peróxido de hidrógeno en ácido nítrico 0.1 N seguido por NaOH 0.25 N que contiene el surfactante CTAC. También se incluyen en la Tabla resultados para una sulfonamida de acridinio. Las sulfonamidas de acridinio son comparables a los ésteres de acridinio en su eficiencia cuántica de producción de luz y estabilidad hidrolítica.

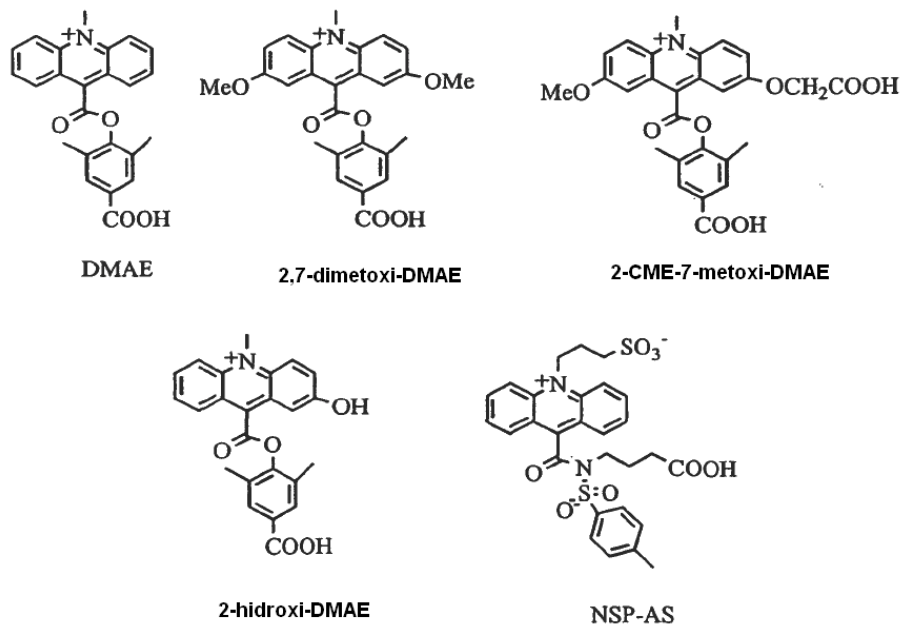
Tabla 1: Quimioluminiscencia para compuestos de acridinio

Compuesto	% de señal retenida	Reactivo disparador de quimioluminiscencia
DMAE	0.14	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9
2,7-dimetoxi-DMAE	9.5	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9
2-CME-7-metoxi-DMAE	43	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 8,3
NSP-AS	6.3	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 8,3
NSP-AS	13.4	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9
2-hidroxi-DMAE	5.8	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9
DMAE-anti-TSH	0.18	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9
2,7-dimetoxi-DMAE-anti-TSH	60	1% H ₂ O ₂ + 0.5% CTAC en carbonato de sodio 0.2 M, pH 9

5 La quimioluminiscencia fue medida durante 5 segundos en un Magic Lite Analyzer Luminometer (MLA1, Bayer Diagnostics). Las muestras de diversos compuestos se prepararon en fosfato 10 mM de pH 8 que contenía NaCl 150 mM, BSA al 0.05% y azida de sodio 0.01%.

10 Los datos de la Tabla 1 indican que la colocación de grupos funcionales donantes de electrones en las posiciones C2 y/o C7 permite que la reacción de quimioluminiscencia del éster de acridinio correspondiente suceda en un rango de pH moderado de aproximadamente 8 a 9. Las posiciones C2 y C7 de la molécula de acridinio son equivalentes. Así, cuando hay solamente un grupo funcional, por ejemplo, metoxi o hidroxi, en cualquiera de estas posiciones, se referirá como estando en la posición C2. Si hay dos grupos funcionales, entonces la segunda posición correspondiente es C7. Debido a que la molécula de acridinio es simétrica, la posición C2 es la misma que C7. De la misma forma la posición C3 es la misma que C6. Sin embargo, C2 y C3 no son equivalentes. Así un grupo metoxi sencillo en C2 no es equivalente a un grupo metoxi en C3.

La estructura química de los compuestos de acridinio listados en la Tabla 1 son como sigue:



Así, el 2-hidroxi-DMAE y el 2,7-dimetoxi-DMAE son ésteres de acridinio cada uno con grupos donantes de electrones. El grupo hidroxilo en el 2-hidroxi-DMAE es el grupo donante de electrones mientras que los dos grupos metoxi en 2,7-dimetoxi-DMAE son grupos donantes de electrones. Además, incluso en la ausencia de un núcleo de acridinio rico en electrones, la quimioluminiscencia de la sulfonamida de acridinio puede ser disparada a pH moderado. No se sabe porque esto es posible para la sulfonamida de acridinio (NSP-AS) incluso en la ausencia de grupos donantes de electrones.

Ensayos homogéneos utilizando la modulación de señal de un trazador enlazado a anticuerpo

(a) Ésteres de acridinio

El éster de acridinio, 2,7-dimetoxi-DMAE fue conjugado con tres analitos: valproato, teofilina y carbamazepina para formar trazadores que son medidos comúnmente por técnicas inmunoquímicas. Las etapas del proceso para hacer conjugados de compuestos de acridinio a diversas otras moléculas de interés son bien conocidas por los experimentados en el arte de la síntesis orgánica. Un conjugado de un compuesto de acridinio está compuesto de el compuesto de acridinio y la molécula de interés con un enlace covalente enlazando las dos unidades estructurales. La molécula de interés puede ser una molécula pequeña tal como un esteroide, un fármaco terapéutico, una vitamina, una hormona y péptidos pequeños, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, oligosacárido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, célula, virus y polímero sintético. Ejemplos de proteínas incluyen avidina, estreptavidina, neutravidina, receptores y alérgenos.

El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace éster, un enlace éter, un enlace que una dos átomos de carbono, y similares. La formación del enlace covalente entre el compuesto de acridinio y la molécula de interés se logra generalmente mediante una reacción química entre grupos funcionales reactivos complementarios en las dos unidades estructurales. Por ejemplo, un enlace amida se hace de un grupo funcional ácido carboxílico sobre una molécula y un grupo amino en la segunda molécula. Típicamente, el proceso involucra convertir el ácido carboxílico en una forma reactiva tal como un éster activo o un anhídrido seguido por reacción con el grupo amino.

Se previó inicialmente marcar los anticuerpos correspondientes a estos analitos con flúor y llevar a cabo ensayos homogéneos utilizando transferencia de energía por resonancia desde el trazador de acridinio al flúor en el anticuerpo. Sin embargo, la experimentación reveló que el anticuerpo que enlaza al trazador correspondiente para todos los tres analitos dio como resultado un potenciamiento inesperado en la producción de luz del éster de acridinio cuando se midió durante un periodo de unos pocos segundos. Por lo tanto, no fue necesario marcar los anticuerpos correspondientes a estos analitos con flúor.

La magnitud del potenciamiento de luz para el éster de acridinio fue diferente para los tres analitos. Esto puede reflejar diferencias en las afinidades y/o microambiente de estos tres diferentes anticuerpos para sus respectivos haptenos.

La cinética más rápida de emisión de luz del trazador enlazado al anticuerpo de éster de acridinio en comparación con el trazador libre es un mecanismo posible para el incremento observado en la señal quimioluminiscente. El potenciamiento de la quimioluminiscencia de un conjugado isoluminol-biotina por enlazamiento con avidina ha sido reportado por Schroeder et al, *Anl. Chem.* Vol. 48, páginas 1933-1937 (1976).

Para todos los tres analitos, valproato, teofilina y carbamazepina, la señal quimioluminiscente de las reacciones de enlazamiento pudo ser medido directamente sin dilución. Estos ensayos de molécula pequeña son así extremadamente simples de llevar a cabo. Las etapas involucradas en el diseño y ejecución de un ensayo homogéneo para la medición de un analito de molécula pequeña incluyen la formación de un conjugado del analito de molécula pequeña y del compuesto de acridinio como ya se describió y hacer una solución del conjugado en un solvente apropiado, tal como una mezcla de un solvente orgánico, por ejemplo, dimetil formamida y agua o un regulador. El compuesto de acridinio es bien un éster de acridinio con grupos funcionales donantes de electrones en la posición C2 y/o C7 o una sulfonamida de acridinio con o sin grupos funcionales donantes de electrones en la posición C2 y/o C7.

El conjugado se utiliza para seleccionar diversos anticuerpos del analito para seleccionar un anticuerpo el cual por enlazamiento con el conjugado de acridinio cause una alteración en la intensidad de la emisión de luz desde el conjugado de acridinio cuando su quimioluminiscencia se dispara a un pH de aproximadamente 6 – 10.

El conjugado se utiliza para generar una curva de respuesta a la dosis utilizando una serie de "estándares" los cuales comprenden diferentes concentraciones conocidas del analito en un fluido, típicamente suero. Generalmente estos se logran mezclando una concentración fija del conjugado de acridinio con cada estándar en un volumen fijo de regulador y agregan una cantidad limitada del anticuerpo deseado la cual es capaz de formar un complejo bien sea con el analito o con su conjugado de acridinio en solución.

La solución que contiene el analito, el conjugado del anticuerpo se incubaba entonces durante una longitud fija de tiempo, típicamente de forma aproximada 10 a 60 minutos a temperatura ambiente, para formar una mezcla de reacción.

5 La quimioluminiscencia de la mezcla de reacción se dispara entonces a un pH de aproximadamente 6 a 10 agregando reactivos disparadores de la quimioluminiscencia tales como una solución de peróxido de hidrógeno en un regulador tal como carbonato, borato, fosfato y tris. La quimioluminiscencia se mide entonces con un luminómetro. Una curva de respuesta a la dosis se prepara entonces representando gráficamente la quimioluminiscencia observada contra la concentración del analito en el estándar.

10 La concentración de una muestra desconocida del analito se determina entonces incubando la muestra en las mismas condiciones que la solución estándar. La quimioluminiscencia de la muestra desconocida de analito se dispara entonces con el mismo agente disparador utilizado para disparar la quimioluminiscencia del analito estándar y su concentración se determina a partir de la curva de respuesta a la dosis.

15 Se llevaron a cabo ensayos homogéneos para carbamazepina, teofilina y valproato, utilizando los trasladores 2,7-dimetoxi-DMAE en un volumen pequeño (0.2 mL) de regulador. El trazador en concentraciones nanomolares fue mezclado con los estándares de hapteno en suero humano. Las reacciones de enlazamiento fueron iniciadas con la adición de una cantidad limitada del correspondiente anticuerpo. Estos son ensayos competitivos verdaderos puesto que el analito y el trazador compiten por una cantidad limitada de anticuerpo.

A medida que la concentración del hapteno se incrementaba, la concentración del trazador enlazado al anticuerpo disminuía y consecuentemente, la señal quimioluminiscente para el éster de acridinio decayó proporcionalmente.

20 (b) Sulfonamidas de acridinio

25 El disparo de la quimioluminiscencia bajo condiciones moderadas de conjugados de hapteno de sulfonamidas de acridinio mostró características que contrastan agudamente con lo que fue observado con los ésteres de acridinio. Para los ésteres de acridinio, el enlazamiento del trazador al anticuerpo lleva a un incremento en la quimioluminiscencia mientras que para las sulfonamidas de acridinio, el enlazamiento del trazador por el anticuerpo lleva a un descenso en la quimioluminiscencia. Una cinética más lenta de una emisión de luz a partir del trazador enlazado al anticuerpo de sulfonamida de acridinio es un mecanismo posible para el descenso observado en la señal quimioluminiscente. El rendimiento luminiscente relativo del trazador derivado de sulfonamida de acridinio dependió del hapteno conjugado. Además, los grupos funcionales donantes de electrones no son necesarios en las posiciones C2 y/o C7 para disparar la quimioluminiscencia.

30 En comparación con los trazadores libres, los trazadores enlazados a los anticuerpos exhiben un descenso en luminiscencia cuando su quimioluminiscencia fue medida durante unos pocos segundos. Los trazadores de valproato, teofilina y carbamazepina enlazados al anticuerpo exhibieron 28%, 12% y 5% de la luminiscencia relativa de los trazadores libres. Un perfil cinético de la producción de luz reveló un descenso en la rata de reacción de quimioluminiscencia por enlazamiento al anticuerpo. Este fenómeno fue utilizado para diseñar los ensayos
35 homogéneos para los analitos: valproato, teofilina y carbamazepina.

Ensayo homogéneos utilizando detenedores

Además de la modulación de señal de vida al enlazamiento del trazador por un anticuerpo, un constructo alternativo para un ensayo homogéneo utilizando los compuestos de acridinio de esta invención conlleva a utilizar el fenómeno de la detención de señal como un mecanismo para generar una curva de respuesta a la dosis.

40 La detención de la señal reduce la quimioluminiscencia del compuesto de acridinio utilizando una molécula receptora que absorbe energía del compuesto de acridinio pero no tiene la emisión por sí misma. La acridona es la especie química que se forma en un estado electrónicamente excitado a partir de la reacción química del compuesto de acridinio con peróxido de hidrógeno. Cualquier molécula que pueda absorber la energía de excitación electrónica de la acridona, la cual nuevamente se emite como luz, y disiparla a través de rutas no radiantes puede llevar a cabo
45 esta función de detención. El dabsilo se utiliza comúnmente para este propósito.

En el complejo anticuerpo-trazador, la proximidad espacial del anticuerpo y el trazador derivado del compuesto de acridinio sugiere que la energía del estado excitado del compuesto de acridinio puede ser transferida a moléculas receptoras adecuadas sobre el anticuerpo. Para investigar esta materia adicionalmente, se preparó un trazador de valproato de 2-CME-7-metoxi-DMAE. Véase ejemplo 2.

50 Este trazador cuando se incubó con un anticuerpo de valproato no marcado no mostró ninguna modulación de su señal quimioluminiscente. Cuando el anticuerpo fue marcado con el detenedor dabsilo, el trazador enlazado al anticuerpo mostró una caída en luminiscencia. Así, el enlazamiento del trazador al anticuerpo marcado con dabsilo pudo ser medido registrando un descenso concomitante en la señal quimioluminiscente.

En un ensayo que utiliza el principio de la detención de señal, todas las etapas son las mismas que en el ensayo homogéneo usando la modulación de señal excepto que se usa el conjugado de un anticuerpo y un detenedor.

5 Se diseñó un ensayo con valproato utilizando el fenómeno de detención. El anticuerpo de valproato utilizado previamente con el conjugado de 2,7-dimetoxi-DMAE-valproato fue marcado con el derivado dabsilo sintético denominado dabsil-ED-glutarato-NHS éster. El derivado dabsilo fue sintetizado condensando primero cloruro de dabsilo con etilen diamina seguido por reacción con anhídrido glutárico y conversión subsecuente del ácido carboxílico resultante al N-hidroxi éster de succinimida (NHS).

10 Un ensayo homogéneo utilizando el anticuerpo marcado fue llevado a cabo permitiendo que el trazador y el estándar de valproato en suero de oveja compitieran por una cantidad limitada del anticuerpo marcado con dabsilo. Un incremento en la concentración de valproato llevo a un incremento en la señal quimioluminiscente.

Ensayos homogéneos utilizando transferencia de energía por resonancia en quimioluminiscencia

15 El inmunoensayo de transferencia de energía por resonancia en quimioluminiscente (RET) está basado en la formación de un complejo que consiste del analito con dos asociados de enlazamiento, por ejemplo, anticuerpos. Ligandos tipo Fab, lectinas, enzimas y ácidos nucleicos pueden también emplearse en una forma análoga, en donde uno es marcado con el compuesto donante quimioluminiscente y el segundo, dirigido contra otro epítipo del analito, es marcado con un receptor fluoróforo. Por enlazamiento, el analito se convierte en el puente entre el donante y el receptor permitiendo suficiente RET si los dos están a menos de 10 mM de distancia. El disparo de la quimioluminiscencia con los reactivos liberadores de luz produce luz que es transferida al receptor y medida en su longitud de onda óptima.

20 En principio, los analitos medidos en el inmunoensayo de transferencia de energía por resonancia quimioluminiscente son macromoléculas que tienen al menos dos sitios de enlazamiento en la misma molécula. Tales macromoléculas incluyen el grupo consistentes de proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, células, virus y polímeros sintéticos.

25 Las etapas de proceso para un ensayo de transferencia de energía por resonancia homogénea quimioluminiscente para la medición de un analito macromolecular tal como una proteína incluye hacer un primer conjugado de un anticuerpo al analito usando los compuestos de acridinio de la presente invención en donde la formación de enlace covalente se lleva a cabo entre el anticuerpo y los grupos funcionales localizados en el núcleo acridinio del compuesto de acridinio. El compuesto de acridinio es bien sea un éster de acridinio con grupos donantes de electrones en la posición C2 y/o C7, o una sulfonamida de acridinio con o sin grupos donantes de electrones en la posición C2 y/o C7.

30 Un segundo conjugado de un segundo anticuerpo al analito se hace utilizando una molécula "receptora" la cual puede absorber energía de excitación electrónica del conjugado acridinio-anticuerpo. Este segundo anticuerpo debe enlazarse a una región diferente del analito pero también debe enlazarse lo suficientemente cerca al primer anticuerpo de tal forma que la transferencia de energía desde el compuesto de acridinio y el receptor pueda ocurrir. La distancia entre regiones es en general ≤ 10 nm. La molécula receptora puede bien sea reemitir la energía absorbida del compuesto de acridinio de una longitud de onda diferente de luz o disiparla como calor.

35 El primero y segundo conjugado se utilizan para generar una curva de respuesta a la dosis utilizando una serie de "estándares" la cual comprende diferentes concentraciones conocidas del analito en un fluido, típicamente suero. Esto se logra generalmente mezclando concentraciones fijas de los conjugados de acridinio a cada estándar en un volumen fijado de regulador. La solución que contiene el analito, y los dos conjugados se denomina como la "mezcla de reacción" y es incubado durante aproximadamente 10 a 60 minutos a temperatura ambiente o del habitáculo.

40 La quimioluminiscencia de la mezcla de reacción se dispara en el rango de pH de aproximadamente 6 a 10 agregando agentes disparadores de la quimioluminiscencia tal como una solución de peróxido de hidrógeno en un regulador inhibiendo la quimioluminiscencia usando un luminómetro. El luminómetro puede ser capaz de distinguir señales quimioluminiscentes distinguibles emitidas a longitudes de onda diferentes. Se prepara entonces una curva de respuesta a la dosis representando gráficamente la quimioluminiscencia observada versus la concentración del analito en el estándar.

45 La concentración de una muestra desconocida del analito se determina incubando la mezcla de reacción del analito desconocido en las mismas condiciones que la mezcla de reacción del analito estándar. La quimioluminiscencia de la mezcla de reacción desconocida es disparada entonces utilizando el mismo agente disparador y las mismas condiciones usadas para preparar la curva de respuesta a la dosis estándar. La concentración de la muestra desconocida es determinada entonces a partir de esta curva de respuestas.

50 En el ensayo de transferencia de energía a resonancia el HCG descrita en el ejemplo 13, un anticuerpo se conjuga con un éster de acridinio mientras que el segundo anticuerpo es un conjugado con el compuesto de naftofluoresceína fluorescente.

55

Biotinas marcadas: Complejo con avidina

5 Un ensayo de transferencia de energía por resonancia homogénea para la medición de la vitamina biotina puede llevarse a cabo haciendo un conjugado de biotina con el compuesto de acridinio de la presente invención en donde se lleva a cabo la formación de enlace covalente entre la biotina y los grupos funcionales localizados en el núcleo de acridinio del compuesto de acridinio. El compuesto de acridinio se une a un éster de acridinio con grupos donantes de electrones en las posiciones C2 y/o C7 o una sulfonamida de acridinio con o sin grupos donantes de electrones en las posiciones C2 y/o C7.

10 Un segundo conjugado de biotinas se hace utilizando una molécula llamada un "receptor" la cual puede absorber energía de excitación electrónica del conjugado compuesto de acridinio-biotina. La molécula receptora puede reemitir la energía absorbida a una longitud de onda de luz diferente o disiparla como calor.

15 Los conjugados anteriores son utilizados para generar curvas de respuesta a la dosis para biotina utilizando una serie de estándares de biotina los cuales comprenden diferentes concentraciones conocidas de biotina en un fluido, típicamente suero. En general esto se logra mezclando concentraciones fijas de los dos conjugados de biotina y neutravidina y estreptavidina en cada estándar de biotina en un volumen fijado de regulador. La solución que contiene biotina, los dos conjugados y la neutravidina o estreptavidina, denominada la "mezcla de reacción" se incubaba durante aproximadamente 10 a 60 minutos a temperatura ambiente.

20 La quimioluminiscencia de la mezcla de reacción se dispara en el rango de pH de aproximadamente 6 a 10 agregando reactivos disparadores de la quimioluminiscencia tales como una solución de peróxido de hidrógeno en regulador y midiendo la quimioluminiscencia utilizando un luminómetro. El luminómetro puede ser capaz de distinguir las señales de quimioluminiscencia emitidas a dos longitudes de onda diferentes. Una curva de respuesta a la dosis para biotina se prepara representando gráficamente la quimioluminiscencia observada versus la concentración de biotina en el estándar.

25 La concentración de una muestra desconocida de biotina se mide incubando primero la mezcla de reacción de la muestra desconocida en las mismas condiciones utilizadas para la mezcla de reacción estándar. La quimioluminiscencia de la muestra desconocida de biotina se dispara entonces con los mismos agentes disparadores y en las mismas condiciones que la mezcla de reacción conocida. La concentración de la muestra desconocida de biotina es determinada a partir de la concentración de la curva de respuesta a la dosis correspondiente a la quimioluminiscencia medida.

30 Un modelo conveniente para probar los límites de RET con los compuestos de acridinio de la presente invención que sirven como donantes, y un receptor fluorescente fue unirlos a una biotina, una molécula de bajo peso molecular, para formar un conjugado. Esto permite entonces que los conjugados resultantes se enlacen a la avidina, una proteína con sitios de enlazamiento múltiples para la biotina. Puesto que las dimensiones de la avidina son aproximadamente 30 x 40 x 50 Å, la especie de biotina marcada enlazadas estaría en proximidad cercana permitiendo por lo tanto la RET. De esta manera, fueron sintetizadas la biotina-hexaetilenglicol-2-CME-7-metoxi-
35 DMAE (biotina-AE) y la biotina-jefamina-naftofluoresceína (biotina-NPFL). CME es carboximetiléter. Véase el ejemplo 10. El ejemplo 11 detalla el ensayo de transferencia de energía por resonancia para la medición de biotina. En el ensayo de transferencia de energía por resonancia para la biotina descrito en el ejemplo 12, los conjugados de biotina del éster de acridinio, 2-CME-7-metoxi-DMAE y el compuesto fluorescente naftofluoresceína se utilizan en conjunción con la neutravidina.

40 Ensayo sándwich para HCG

45 Este es un ensayo homogéneo para HCG utilizando el principio de la transferencia de energía por resonancia. En este ensayo, un anticuerpo anti-HCG marcado con los compuestos de acridinio novedosos de la presente invención, y un segundo anticuerpo anti-HCG, dirigido contra otro sitio, marcados con fluoróforo forman un complejo con HCG, un analito de peso molecular grande. Se marcaron varios anticuerpos anti-HCG hasta grados variables con 2-CME-7-metoxi-DMAE o naftofluoresceína. Un par anti-HCG completo y anti-HCG-beta se enlazaron suficientemente cercano uno a otro para producir RET. Puesto que se disparó la quimioluminiscencia (480 nm), la emisión se desplazó hacia el máximo de fluoróforo medido a > 650 nm. Se observó un máximo de 3 veces el incremento en señal sobre el fondo a 5000 mIU/mL de HCG. Los datos aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2 – CL RET homogéneo para HCG

HCG mIU/mL	NET RLU
0	89,445
100	92,920

HCG mIU/mL	NET RLU
500	114,530
1,000	130,325
2,500	183,180
5,000	242,860
7,500	243,025
10,000	232,905
20,000	199,640

En resumen, la quimioluminiscencia de ciertos compuestos de acridinio puede ser disparada a pH moderado. Los trazadores de hapteno derivados de estos compuestos de acridinio cuando fueron complejados a sus respectivos anticuerpos mostraron bien sea un potenciamiento (ésteres de acridinio) o atenuación (sulfonamidas de acridinio) de la emisión de luz. Este descubrimiento novedoso permite el desarrollo de ensayos homogéneos simples para analitos importante clínicamente tales como teofilina, valproato y carbamazepina. Además, los compuestos de acridinio descritos aquí pueden ser utilizados en ensayos de transferencia de energía por resonancia.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la síntesis del éster de acridinio 2,7-dimetoxi-DMAE rico en electrones y sus conjugados hapteno. Aquí, el ácido 2,7-dimetoxi-acridin-9-carboxílico fue sintetizado utilizando el procedimiento descrito en Zomer et al., "Synthesis, Chemiluminescence, and Stability of Acridinio Ester Labeled Compounds", Pract. Spectroc. (Lumin. Tech. Biochem. Anl.), vol. 12, páginas 505-511 (1991), y condensado con 4-carboxibencil-2,6-dimetilfenol. El éster de acridina resultante fue metilado en N con triflato de metilo. La remoción del grupo protector éster de bencilo expuso el ácido carboxílico. La formación subsecuente de los conjugados con valproato, carbamazepina y teofilina fue lograda a través del éster NHS activo.

(a) Síntesis de 2,7-dimetoxi-2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil acridina-9-carboxilato

Se enfrió ácido 2,7-dimetoxiacridin-9-carboxílico (0.5 g, 0.177 mmol) en piridina anhidra (25 mL) en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con cloruro de p-toluenosulfonilo (0.674 g, 2 equivalentes) y después de 10 minutos, se agregó 4-carboxifenil-2,6-dimetilfenol (0.453 g, 1 equivalente). La reacción fue calentada hasta temperatura ambiente. Después de 2 horas, se agregaron 2 equivalentes adicionales de cloruro de p-toluenosulfonilo junto con 0.5 equivalentes de fenol y piridina (10 - 15 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 48 horas. El solvente fue retirado entonces bajo presión reducida y el residuo fue disuelto en cloroformo (50 mL). Esta solución fue lavada con bicarbonato de sodio acuoso al 2% seguido por cloruro de amonio acuoso al 2%. El extracto en cloroformo fue secado entonces sobre sulfato de magnesio y evaporado hasta sequedad. El producto fue purificado por TLC sobre sílica utilizando 5% de acetato de etilo, 95% de cloroformo. Rf = 0.5. Rendimiento = 0.663 g (72%)

(b) Síntesis de 2,7-dimetoxi-2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil-10-metilacridinio-9-carboxilato

El éster de acridinio de (a) anterior (0.15 g, 0.29 mmol) en diclorometano (5 ml) fue tratado con bicarbonato de sodio sólido (60 mg, 0.71 mmol) y sulfonato de metil trifluorometano (0.2 mL, 0.82 mmol). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas y luego se agregó metanol (5 mL) y la reacción se filtró a través de lana de vidrio. El análisis por HPLC del filtrado sobre una columna C18 4.6 mm x 30 cm utilizando un gradiente por 30 minutos de 10%->100% de MeCN/agua conteniendo cada uno 0.05% de ácido trifluoroacético a una rata de flujo de 1 mL/minuto y detección por UV a 260 nm, indico >90% de conversión al producto que eluyó a 21 minutos. El filtrado fue evaporado hasta sequedad y el producto crudo fue utilizado como tal para la siguiente reacción.

(c) Síntesis de 2,7-dimetoxi-2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-10-metilacridinio-9-carboxilato (2,7-dimetoxi-DMAE)

El éster de acridinio de (b) anterior (25 mg) fue tratado con HBr/AcOH al 30% (3 mL) y la reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 4 horas. El producto fue precipitado mediante la adición de éter (~50 mL). El éter fue decantado y el residuo fue enjuagado varias veces con éter y secado por evaporación rotatoria. Rendimiento = 16 mg. El análisis por HPLC utilizando el gradiente descrito anteriormente mostró que el producto eluyó a 15 minutos.

(d) Síntesis de 2,7-dimetoxi-2',6'-dimetil-4'-[N-succinimidil]oxycarbonil-fenil 10-metilacridinio-9-carboxilato (2,7-dimetoxi-DMAE-NHS)

5 El ácido carboxílico de acridinio de (c) anterior (16 mg, 0.03 mmol, contraión bromuro) fue disuelto en 25% de MeCN anhidro, 75% de dimetil formamida anhidra (DMF) (4 mL) y tratado con N-hidroxisuccinimida (17 mg, 5 equivalentes) y dicitclohexil carbodiimida (DCC) (31 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El análisis de HPLC utilizando el gradiente descrito anteriormente indicó conversión completa con el producto eluyendo a ~ 16 minutos. El producto fue purificado por HPLC preparativa utilizando una columna de 20 mm x 30 cm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto fueron liofilizadas hasta sequedad para producir un polvo amarillo brillante. Rendimiento = 12.6 mg.

10 (e) Síntesis de 2,7-dimetoxi-DMAE-valproato

15 El 2,7-dimetoxi DMAE-NHS (1mg, 1.84 μ moles) en DMF (0.1 mL) fue enfriado en un baño de hielo y tratado con ácido 6-amino-2-propil-hexanoico [0.64 mg, 2 equivalentes, Sidki et al, J. Clin. Chem. Biochem. vol. 26 (2), página 69, (1988)] disuelto en carbonato de sodio 100 mM pH 9 (0.1 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis por HPLC utilizando el gradiente descrito anteriormente, indicó una desaparición completa del material de partida y la formación de un producto que eluyó unos pocos minutos después. El producto fue purificado por HPLC preparativa utilizando una columna de 7.8 mm x 30 cm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto fueron liofilizadas hasta sequedad para producir un polvo amarillo. Rendimiento = ~ 1 mg; MALDITOF MS 603.1 obs. (601.7 calc.).

(f) Síntesis de 2,7-dimetoxi-DMAE-HD

20 El 2,7-dimetoxi-DMAE (7 mg, 13.3 μ moles) fue disuelto en una mezcla de MeCN anhidro/DMF (2 mL, 1:3) y tratado con N-hidroxisuccinimida (9 mg, 5 equivalentes) y DCC (16 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente después de 3 horas, se agregaron 5 equivalentes de cada uno de N-hidroxisuccinimida y DCC. La reacción resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción fue filtrada entonces a través de lana de vidrio y tratada con 1,6-hexanodiamina (HD, 18.3 mg, 10 equivalentes) disueltos en carbonato de sodio 100 mM pH 9 (2 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente. Después de 25 2 horas, el análisis por HPLC utilizando una columna C18 de 4.6 x 30 cm y un gradiente por 40 minutos de 10%->60% de MeCN/agua (cada uno con TFA al 0.05%) a una rata de flujo de 1 mL/min y una detección por UV a 260 nm indicó que el producto eluyó a ~23 minutos. Este fue purificado por HPLC preparativa utilizando una columna de 20 mm x 30 cm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 30 = 9.6 mg (94%); MALDI-TOF MS 545.8 obs. (544.7 calc.).

(g) Síntesis de 2,7-dimetoxi-DMAE-HD-teofilina

35 Se disolvió 8-carboxipropilteofilina (5 mg, 18.8 μ moles, Sigma) en DMF anhidro (1 mL) y se trató con N-hidroxisuccinimida (11 mg, 5 equivalentes) y DCC (20 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. Se agregó entonces 2,7-dimetoxi-DMAE-HD (3.3 mg, 4.3 μ moles) como una solución en metanol (0.2 mL) seguida por N,N-diisopropiletilamina (3.2 μ L, 18.4 μ moles). Después de tres horas el análisis por HPLC utilizando el gradiente 10%->60% descrito anteriormente indicó que el producto eluía a ~28 minutos. Este producto fue aislado por HPLC preparativo utilizando una columna de 20 mm x 30 cm. Las fracciones por HPLC que contenían el producto fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 2.7 mg (76%); MALDI-TOF MS 794.2 obs. (792.9 calc.).

40 (h) Síntesis de 2,7-dimetoxi-DMAE-HD-SA-ED-Carbamazepina

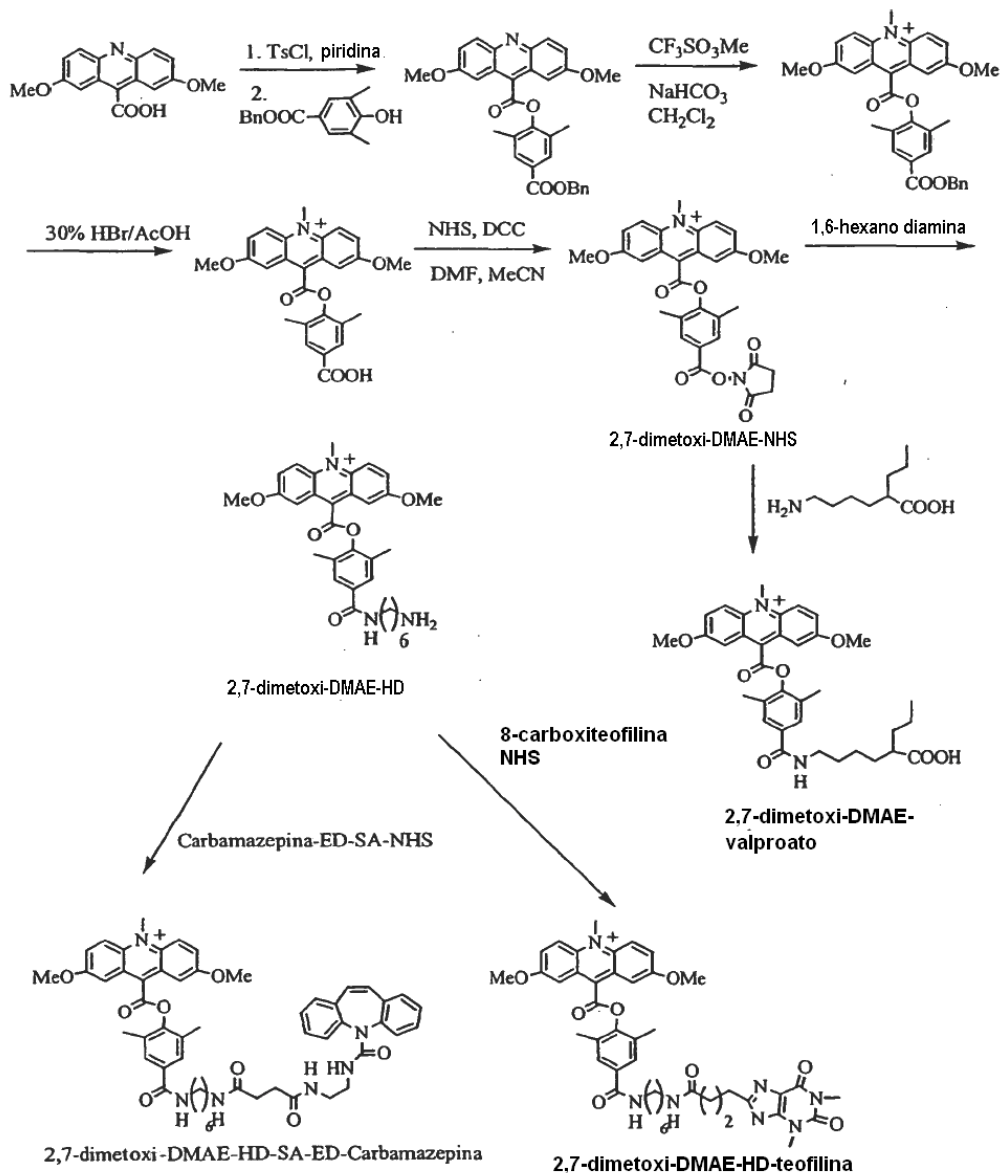
45 Se preparó carbamazepina-ED-SA en dos etapas a partir de cloruro de carbamazepina-N-ácido que fue provisto por Central Research Labs of Ciba-Geigy Limited, ahora Novartis Inc. Una solución de cloruro de carbamazepina-N-ácido (2 g, 7.828 mmol) en 10 ml de tetrahydrofurano fue agregada gota a gota a una solución de etilen diamina (5.24 ml, 10 equivalentes) en 100 ml de éter a 0 °C. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 horas y luego fue evaporada bajo presión reducida con la ayuda de xileno. El sólido obtenido fue transferido a un embudo con fritas y lavado con cloroformo tres veces para dar carbamazepina-ED en forma de un material blancuzco en 955 mg. La carbamazepina-ED (950 mg, 3.42 mmol) fue suspendida en un solvente mixto de 70 ml de DMF/cloroformo (1:1) seguido por la adición de anhídrido succínico (513 mg, 1.5 equivalentes) y trietilamina (1.9 ml, 4 equivalentes). La mezcla fue calentada con agitación a 100 °C durante una hora para dar una solución homogénea. Se evaporó bajo presión reducida hasta sequedad. El residuo fue tratado con 60 ml de agua. La suspensión fue agitada a temperatura ambiente durante 50 minutos para formar un precipitado blanco. Fue recolectado y lavado con agua y luego cloroformo.

55 Después de ser secado bajo vacío, se obtuvieron 552 mg de carbamazepina-ED-SA. La carbamazepina-ED-SA (5 mg, 13.2 μ moles) en DMF anhidro (0.5 mL) fue tratada con N-hidroxisuccinimida (7.6 mg, 5 equivalentes) y DCC (13.6 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 – 4 horas y luego se extrajeron 1.7 mg del éster activo y se diluyó a 900 μ L con DMF. Esta solución fue tratada con una solución de 2,7-dimetoxi-

5 DMAE-HD (2.5 mg, 3.24 μ moles) en metanol (0.2 mL) junto con N,N-diisopropiletilamina (2.4 μ L, 13.8 μ moles). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC utilizando el gradiente de 10%>60% descrito anteriormente indicó que el producto eluía a ~34 minutos. El producto fue purificado por HPLC preparativa utilizando una columna de 20 mm x 30 cm y las fracciones de HPLC que contenían el producto fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 1.6 mg (54%); MALDI-TOF MS 907.8 obs. (906.1 calc.).

(i) Síntesis del conjugado 2,7-dimetoxi-DMAE-anti-TSH

10 El anticuerpo monoclonal anti-TSH (0.5 mg, 3.33 nmoles) en una mezcla de fosfato de sodio 100 mM pH 8 (0.1 mL) y PBS pH 8 (80 μ L) fue tratado con una solución de 2,7-dimetoxi-DMAE-NHS (36.2 μ g, 20 equivalentes) en DMF (20 μ L). La reacción fue agitada a 2 - 4 °C en una caja fría durante 16 horas y luego la proteína marcada fue aislada por cromatografía de filtración por gel Sephadex G25 usando agua como eluyente. El conjugado que eluyó en el volumen vacío de la columna fue recolectado y concentrado a ~ 1 mL. Esta solución fue diluida con 4 mL de PBS pH 7.4 que también contenía 1% de BSA y 0.05% de azida de sodio y se almacenó a 4°C. Las siguientes ecuaciones de reacción representan las síntesis de 2,7-dimetoxi-DMAE y conjugados.



Ejemplo 2

(a) Síntesis de 2-CME-7-metoxi-DMAE

- 5 La síntesis de 2-CME-7-metoxi-DMAE fue lograda a partir de 5-metoxiisatina y 4-bromofenol. La alquilación en N de la sal de sodio de la 5-metoxiisatina con 4-benciloxibromobenceno seguida por reordenamiento en álcali caliente produjo el ácido carboxílico funcionalizado con acridina el cual fue condensado con 4-nitro-2,6-dimetil fenol. El éter de bencilo en el éster de acridina resultante fue escindido primero y el grupo hidroxilo libre fue alquilado con bromoacetato de bencilo. La metilación del nitrógeno de la acridina con triflato de metilo seguida por conversión del éster de bencilo al ácido libre completo la síntesis. El compuesto de acridinio fue convertido en el conjugado con valproato a través del éster NHS.
- 10

(b) Síntesis de 4-benciloxibromobenceno

- 15 Se trató 4-bromofenol (2 g, 0.0116 mol) en acetona (40 mL) con carbonato de potasio anhidro (1.91g, 1.2 equivalentes) y bromuro de bencilo (1.44 mL, 1.05 equivalentes). La reacción fue sometida a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 5 - 6 horas de reflujo, la reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente diluida con un volumen igual de acetato de etilo. Esta solución fue lavada con agua, secada sobre sulfato de magnesio anhidro y evaporada hasta sequedad. Se obtuvo un sólido blanco esponjoso. Rendimiento = 2.36 g (73%).

(c) Síntesis de N-[4'-benciloxifenil]-5-metoxiisatina

Se enfrió 5-metoxiisatina (1.5 g, 0.85 mmol) en DMF anhidro (50 mL) en un baño de agua bajo atmósfera de nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (0.25 g, 1.2 equivalentes). La reacción fue agitada en un baño de hielo y después de 15 – 20 minutos se agregó 4-benciloxibromobenceno (2.36 g, 0.85 mmol) como una solución en DMF anhidro (3 mL) junto con yoduro de cobre (3.23 g, 2 equivalentes). La reacción fue calentada en un baño de aceite bajo una atmósfera de nitrógeno a 130°C durante 24 horas. La reacción fue enfriada entonces a temperatura ambiente filtrada y el filtrado fue evaporado hasta sequedad. El material crudo fue purificado por cromatografía instantánea sobre sílica gel utilizando acetato de etilo al 35% en hexanos como eluyente. El derivado de isatina N-alquilado fue aislado en forma de un sólido naranja-marrón. Rendimiento = 1 g (32%).

10 (d) Síntesis de ácido 2-benciloxi-7-metoxi acridina-9-carboxílico

La isatina alquilada en N de (b) más arriba (1 g) fue suspendida en hidróxido de potasio al 10% (100 mL) y sometida a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 4 horas, la reacción se enfrió durante 5 – 10 minutos y luego se filtró mientras aún estaba caliente. En el filtrado se separó un precipitado amarillo. El filtrado fue diluido con hielo y agua y luego fue acidificado con una mezcla de HCl concentrado y hielo hasta que se separó un precipitado amarillo espeso. Este se dejó en reposo durante ~15 minutos y luego se filtró utilizando un embudo de vidrio con frita de porosidad media. El producto fue enjuagado subsecuentemente con éter seco y luego secado al aire. El polvo amarillo resultante fue transferido entonces a un matraz de fondo redondo, suspendido en tolueno anhidro y evaporado hasta sequedad. Rendimiento = 0.75 g (75%).

(e) Síntesis de 2-benciloxi-7-metoxi-2',6'-dimetil-4'-nitrofenil acridina-9-carboxilato

20 ácido 2-benciloxi-7-metoxi acridina-9-carboxílico (0.38 g, 0.106 mol) de (c) más arriba en piridina anhidra (30 - 40 mL) fue tratado con cloruro de p-toluenosulfonilo (0.404 g, 2 equivalentes) a 0°C bajo nitrógeno. Después de ~5 minutos, se agregó 2,6-dimetil-4-nitrofenol (0.177 g, 1 equivalente) y la reacción fue calentada hasta temperatura ambiente y agitada durante 24 horas. El solvente fue retirado entonces bajo presión reducida y el residuo fue disuelto en cloroformo (50 mL). Esta solución fue lavada con bicarbonato de sodio acuoso al 3% y luego con cloruro de amonio acuoso al 3%. El extracto en cloroformo fue secado entonces sobre sulfato de magnesio anhidro y evaporado hasta sequedad. El producto crudo fue purificado por TLC preparativa sobre sílica utilizando 70% de hexanos, 25% de cloroformo, 5% de acetato de etilo. Rendimiento = 0.26 g (48%)

(f) Síntesis de 2-hidroxi-7-metoxi-2',6'-dimetil-4'-nitrofenil acridina-9-carboxilato

30 El éster de acridina 2-benciloxi-7-metoxi de (d) más arriba (0.2 g) fue agitado en una mezcla de HBr/AcOH al 30% (10 mL) y sulfuro de metilo (5 mL) a temperatura ambiente durante 4 horas. El producto fue precipitado entonces mediante la adición de éter anhidro seguido por filtración. Se obtuvo un sólido amarillo brillante. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 de 4.6 mm x 30 cm y un gradiente durante 30 minutos de 10%->70% MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1 mL/min y detección UV a 260 nm, indicó que el producto eluía a ~25 minutos (el material de partida eluye a 34 minutos). Rendimiento = 0.24 g.

35 (g) Síntesis de 2-[benciloxicarbonil]metiloxi-7-metoxi-2',6'-dimetil-4'-nitrofenil acridina-9-carboxilato

40 El compuesto de (e) más arriba (0.163 g, 0.38 mmol) en DMF anhidro (10 mL) fue tratado con carbonato de potasio anhidro (65 mg, 1.2 equivalentes) seguido por bromoacetato de bencilo (66.2 µL, 1.1 equivalentes). La reacción fue calentada en un baño de aceite a 65°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de una hora, el análisis por HPLC utilizando el gradiente descrito más arriba indicó >85% de conversión con el producto eluyendo a 32 minutos. La reacción fue enfriada entonces a temperatura ambiente y el solvente fue retirado bajo presión reducida. El residuo fue disuelto en cloroformo (50 mL) y esta solución fue lavada una vez con cloruro de amonio acuoso al 3% y bicarbonato de sodio acuoso al 3%. El extracto en cloroformo fue secado entonces sobre sulfato de magnesio anhidro y evaporado hasta sequedad. El producto crudo (0.3 g) fue utilizado como tal para la siguiente reacción.

(h) Síntesis de 2-[benciloxicarbonil]metiloxi-7-metoxi-2',6'-dimetil-4'-nitrofenil-10-metil acridinio-9-carboxilato

45 El éster de acridina crudo de (f) más arriba (0.3 g, 0.53 mmol) fue disuelto en diclorometano (~5 mL) y tratado con bicarbonato de sodio (0.44 g, 10 equivalentes) y trifluorometano sulfonato de metilo (0.6 mL, 10 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC utilizando el gradiente descrito más arriba mostró una conversión completa con el producto eluyendo a 25 minutos. La reacción fue filtrada a través de lana de vidrio y el filtrado fue evaporado hasta sequedad. Se recuperó un sólido amarillo brillante el cual fue usado directamente para la siguiente reacción. MALDITOF MS 582.4 obs. (581.6 calc.).

50 (i) Síntesis de 2-carboximetilether-7-metoxi-2',6'-dimetil-4'-nitrofenil-metil acridinio-9-carboxilato (2-CME- 7-metoxi-DMAE)

El éster de acridinio crudo de (g) más arriba fue agitado en HBr/AcOH al 30% (10 mL) a temperatura ambiente durante 4 – 5 horas. Se agregó entonces éter anhidro para precipitar el producto el cual fue recolectado por filtración. El precipitado fue enjuagado varias veces con éter y luego secado al aire. Se obtuvo un polvo rojizo-amarillo. El análisis por HPLC usando el gradiente descrito anteriormente indica una conversión limpia al producto que eluyó a los 20 minutos. Rendimiento = 0.128 g; MALDI-TOF MS 492.2 obs. (491.5 calc.).

5

(j) Síntesis de 2-CME-7-metoxi-DMAE NHS éster

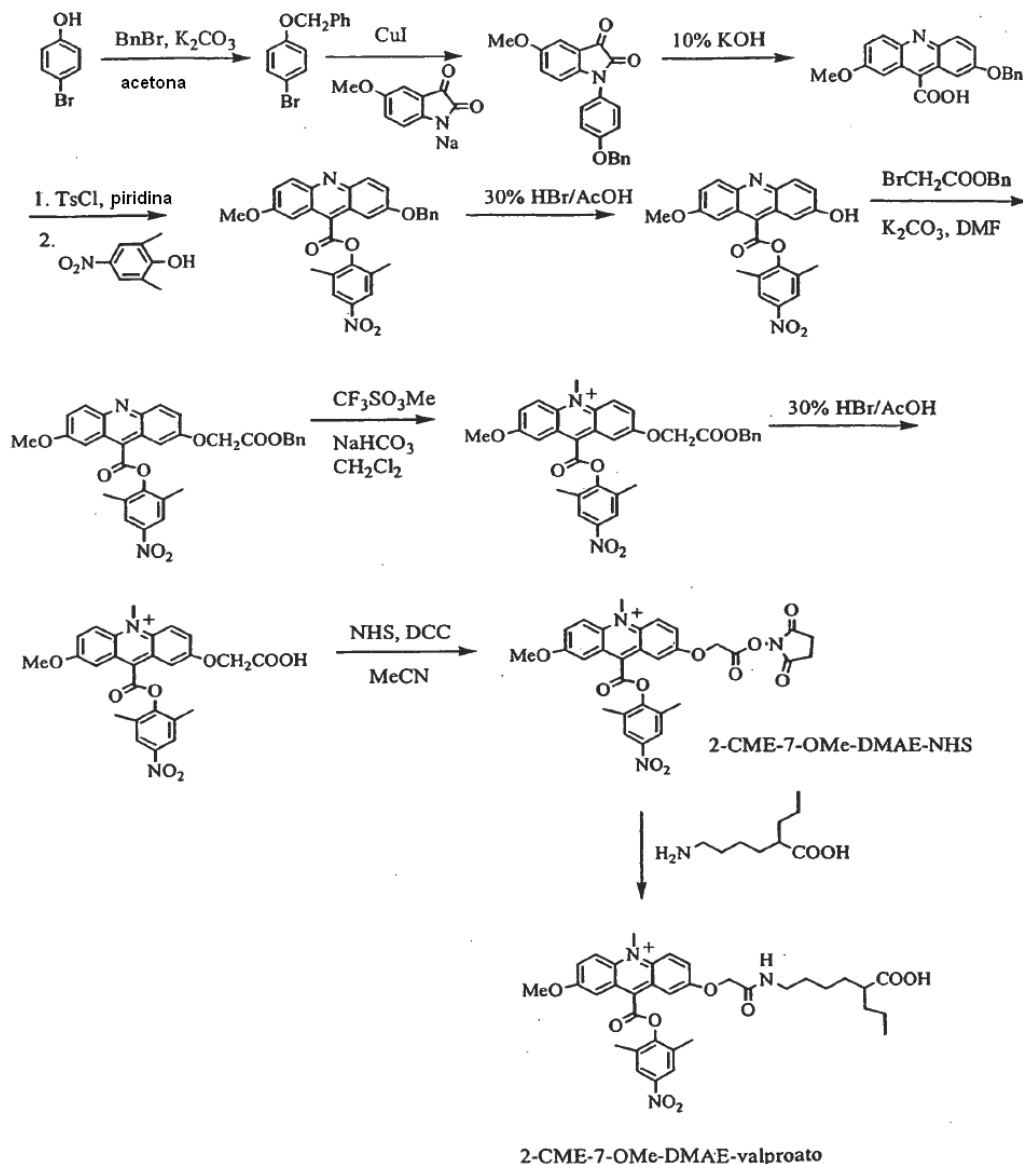
2-CME-7- metoxi -DMAE (10 mg, 16.6 uoles) en MeCN (2 mL) fue tratado con N-hidroxisuccinimida (2.9 mg, 1.5 equivalentes) y DCC (17 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada entonces a temperatura ambiente durante 1 – 2 horas tiempo al cabo del cual se había formado un precipitado fino de DCU en la reacción. La reacción fue filtrada a través de lana de vidrio y la solución fue evaporada hasta sequedad. MALDI-TOF MS 589.1 obs. (588.6 calc.).

10

(k) Síntesis del conjugado de 2-CME-7-metoxi-DMA-E-valproato

Una solución enfriada con hielo de ácido 6-amino-2-propilhexanoico (13 mg, 75 mmol) en regulador de fosfato de sodio (0.10 M, pH 7.4, 0.70 ml) fue mezclada con una solución enfriada con hielo de éster NHS de 2-CME-7-metoxi-DMAE (1.0 mg, 1.7 mmol) en DMF (0.30 ml). Esta mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. El producto deseado fue aislado mediante HPLC C-18 en fase reversa y liofilizado. MALDI-TOF MS 646.1 obsd. (645.7 calcd). Las siguientes ecuaciones de reacción representan la síntesis del conjugado de 2-CME-7-OMe-DMAE y valproato.

15



Ejemplo 3

Titulaciones de pH de los derivados de acridinio

5 Este ejemplo detalla cómo se obtuvieron los datos en las figuras 1 y 2. Las figuras 1 y 2 ilustran como la transición del acridinio a pseudobase se efectúa como función del pH por la colocación de grupos metoxi sobre el éster de acridinio.

10 Un protocolo típico como se ilustra para el 2,7-dimetoxi-DMAE es como sigue. Fue preparada una solución de 2,7-dimetoxi-DMAE (0.5 mg/mL en DMF) y se diluyeron 20 uL de esta solución con 100 uL de regulador de fosfato 25 mM del pH apropiado y 80 uL de DMF. La solución se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1.5 – 2 horas y luego se registró el espectro UV utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo DU 7500. Se utilizó una minicelda de cuarzo de 0.1 mL para las mediciones. Para cada pH, se registró el espectro de UV completo de 220 - 500 nm. La intensidad de la banda de absorción del cromóforo de acridinio varío con diversos derivados de acridinio. Para el 2,7-dimetoxi-DMAE esta banda fue observada a 410 nm mientras que para los derivados de acridinio, no sustituidos en el núcleo de acridinio, esta banda de absorción fue observada típicamente a 363 nm.

Ejemplo 4

15 Síntesis de conjugado 3-[9-((3-carboxipropil)[(4-metilfenil) sulfonil] amino)carbonil]-10-acridinioil]-1-propanesulfonatevalproato (NSP-AS-valproato)

20 El éster NSP-AS-NHS (5 mg, 7.32 umoles) y el ácido 6-amino-2-propilhexanoico (5 mg, 28.9 umoles) fueron combinados en una mezcla 1:1 en DMF y bicarbonato de sodio 0.2M (0.5 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas y luego durante 16 horas a 4°C. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 de 4.6 mm x 30 cm y un gradiente durante 40 minutos de 10%->60% de MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1 mL/min y detección UV a 260 nm mostro el producto eluyendo a 28 minutos. Este fue purificado por HPLC preparativa de las fracciones de HPLC fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 2.2 mg, MALDI-TOF MS 740 obs (739 calc.).

Ejemplo 5

25 (a) Síntesis del conjugado de 8-carboxipropil teofilina y 1,6-hexanodiamina (teofilina-HD)

30 Se trató 8-carboxipropilteofilina (40 mg, 150 umoles) en DMF (1.5 mL) con N- hidroxisuccinimida (50 mg, 434 umoles) y DCC (50 mg, 242 mmoles). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante una hora. A esta solución, se agregó 1,6-hexanodiamina (175 mg, .15 mmol) junto con bicarbonato de sodio 0.2 M (1.5 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas y fue purificada directamente por HPLC preparativa sobre una columna C18 de 20 mm x 30 cm utilizando un gradiente durante 40 minutos de 0%->40% de MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 16 ml/min y detección UV a260 nm. El producto que eluyó a 21.5 minutos fue recolectado y se concentraron las fracciones de HPLC bajo presión reducida y posteriormente se secaron bajo vacio. Rendimiento = 50 mg (91%); MALDI-TOF MS 365 obs. (365.5 calc.).

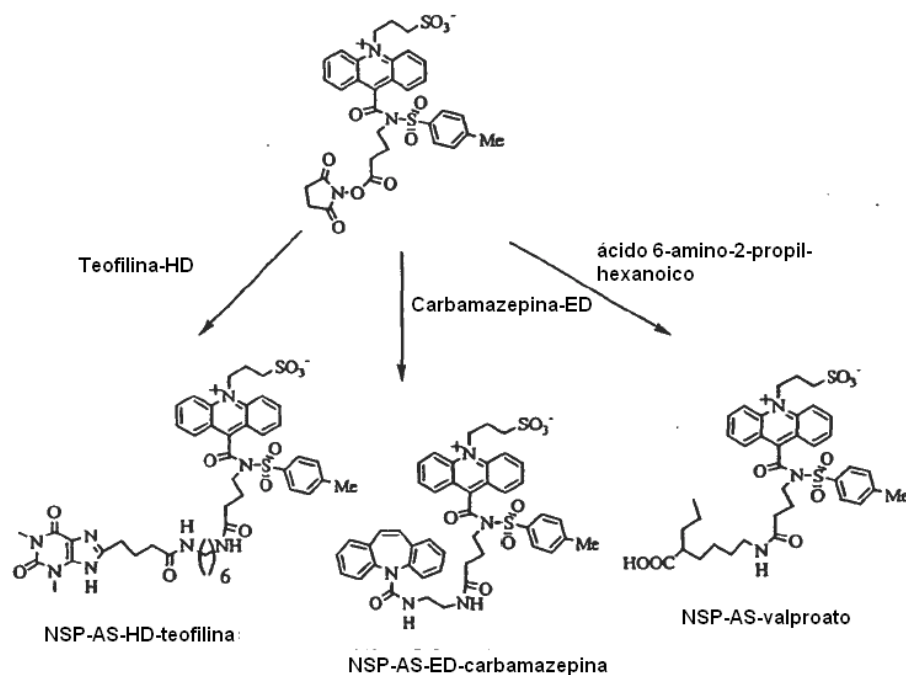
(b) Síntesis de conjugado de NSP-AS-HD-teofilina

35 El éster NSP-AS-NHS (1.8 mg, 2.82 umoles) y teofilina-HD (10 mg, 28.2 umoles) fueron combinados en DMF (0.3 mL). A esta solución, se agregó bicarbonato de sodio 0.2 M (0.3 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto fue purificado sobre una columna C18 de 10 mm x 30 cm utilizando un gradiente durante 40 minutos de 10%->60% de MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 2.3 mL/min y detección UV a 260 nm. La fracción de HPLC que contenía el producto eluyó a 24 minutos el cual fue recolectado y liofilizado hasta sequedad. Rendimiento = 1.3 mg (50%); MALDITOF MS 932 obs. (933 calc.).

(c) Síntesis de conjugado de NSP-AS-ED-carbamazepina

45 El éster NSP-AS-NHS (2 mg, 2.93 umoles) y carbamazepina-ED (10 mg, 35.8 umoles) fueron combinados en DMF (0.3 mL) y se agregó bicarbonato de sodio 0.2 M (0.3 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto fue purificado como se describió anteriormente para el conjugado de teofilina. El producto que eluyó a 33 minutos fue recolectado y las fracciones de HPLC fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 1mg (40%); MALDI-TOF MS 846 obs. (846 calc.).

Las siguientes ecuaciones de reacción representan la síntesis de los conjugados de NSP-AS:



Ejemplo 6

(a) Ensayo homogéneo de carbamazepina usando el conjugado 2,7-dimetoxi-DMAE-HD-SA-ED-carbamazepina

- Los ensayos homogéneos fueron llevados a cabo en un volumen total de 200 μL de fosfato 10 mM que contenían NaCl 150 mM, BSA al 0.05% y azida de sodio al 0.01%. Los estándares de carbamazepina (0, 4.24, 8.47, 16.9, 33.9, 50.8, 93.2 μM) en suero humano fueron diluidos 20 veces en el regulador de ensayo. Las concentraciones finales de carbamazepina en el ensayo fueron 0, 0.212, 0.424, 0.845, 1.695, 2.54, 4.66 μM . Los ensayos fueron ejecutados con 0.02 μM o 0.002 μM de trazador con resultados similares. Las reacciones de enlazamiento fueron iniciadas con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón anticarbamazepina a una concentración final de 0.1 μM . Después de 1 hora a temperatura ambiente, se midió la quimioluminiscencia directamente (25 μL) en un MLA1 (Magic Lite Luminimeter, Bayer Diagnostics, sin filtro) utilizando un reactivo disparador modificado que comprende 3% de peróxido de hidrógeno + 0.5% de cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) en NaHCO_3 100 mM. El estándar cero de carbamazepina y el estándar de carbamazepina alto se diferenciaron aproximadamente 5 veces en señal en la curva de respuesta a la dosis con una precisión de ensayo razonable (<6% CV).
- Se empleó un algoritmo de ajuste de curva logístico de 4 parámetros ("4PL") para simular la curva de respuesta a la dosis observada. La curva teórica de respuesta a la dosis fue virtualmente superponible sobre la curva de respuesta a la dosis observada. Los datos para el ensayo de carbamazepina homogéneo utilizando un trazador de éster de acridinio aparecen en la Tabla 3 y han sido representados gráficamente en la figura 3.

Tabla 3 – Ensayo homogéneo de carbamazepina utilizando trazador de éster de acridinio

Carbamazepina, μM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
0	486107	3.56
4.24	333000	3.27
8.47	181063	4.46
16.9	152220	3.14
33.9	125080	5.12
50.8	109587	3.74
93.2	94320	3.93

(b) Ensayo homogéneo de carbamazepina usando el conjugado NSP-AS-HD-SA-ED-carbamazepina

Los ensayos homogéneos fueron llevados a cabo en un volumen total de 300 uL de fosfato 10 mM que contenía NaCl 150 mM, BSA al 0.05% y azida de sodio al 0.01%. Los estándares de carbamazepina (0, 4.24, 8.47, 16.9, 33.9, 50.8, 93.2 uM) en suero humano fueron diluidos 10 veces en el regulador de ensayo. Las concentraciones finales de carbamazepina en el ensayo fueron 0.424, 0.847, 1.69, 3.39, 5.08, 9.32 uM. Los ensayos fueron ejecutados con trazador 0.2 nM. Las reacciones de enlazamiento fueron iniciadas con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón anticarbamazepina a una concentración final de 70 nM. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la quimioluminiscencia directamente (25 uL) sobre un MLA1 (Magic Lite Luminometer, Bayer Diagnostics, sin filtro) usando un reactivo disparador modificado que comprende 3% de peróxido de hidrógeno + 0.5% de arquad en NaHCO₃ 100 mM. El estándar de carbamazepina cero y el estándar de carbamazepina alto se diferenciaron aproximadamente 13 veces en señal en la curva de respuesta a la dosis con una precisión de ensayo razonable (<8% CV). Los datos para el ensayo de carbamazepina homogéneo utilizando un trazador de sulfonamida de acridinio aparecen en la Tabla 4 y ha sido representado gráficamente en la figura 4.

Tabla 4 – Ensayo de carbamazepina homogéneo usando trazador de sulfonamida de acridinio

Carbamazepina, uM	Unidades de luz relativas promedio	% CV
0	39775	0.59
4.24	201075	3.12
8.47	276635	7.76
16.9	400335	0.04
33.9	477355	6.00
50.8	501350	3.04
93.2	521020	1.53

Ejemplo 7

(a) Ensayo de teofilina homogéneo usando conjugado de 2,7-dimetoxi-DMAE-HD-teofilina

En el ensayo de teofilina homogéneo, se llevaron a cabo las reacciones en un volumen total de 200 uL de regulador como se describe en el ejemplo 6. Los estándares de teofilina en suero humano (0, 6.94, 13.9, 27.7, 55.5, 111, 222 uM) fueron diluidos 10 veces en la reacción para dar las concentraciones finales de teofilina de 0, 0.694, 1.39, 2.77, 5.55, 11.1 y 22.2 uM. Concentraciones diferentes del trazador y del anticuerpo (un monoclonal de ratón antiteofilina) fueron investigadas para determinar una concentración óptima de cada componente que produce la deflexión máxima en señal entre el estándar cero y alto de teofilina. Un potenciamiento máximo de señal de 2 - 3 veces fue observado variando la concentración del trazador de 0.002 a 0.02 uM con una concentración de anticuerpo en 0.1 uM. Empleando una concentración de trazador de 0.002 uM y una concentración de anticuerpo de 0.1 uM, la curva de respuesta a la dosis observada fue capaz de distinguir todos los estándares de teofilina. El ajuste de curva utilizando el método 4PL dio una excelente correlación entre las curvas de respuesta a la dosis teórica y observada a partir de la cual se calculó la concentración de teofilina en tres controles de ACS:180 ligando (Bayer Diagnostics). Las concentraciones calculadas de teofilina para los tres controles fueron un poco menores que las concentraciones indicadas. Los datos para el ensayo de teofilina homogéneo utilizando un trazador de éster de acridinio aparecen en la Tabla 5 y han sido representados gráficamente en la figura 5.

Tabla 5 – Ensayo homogéneo de teofilina utilizando trazador de éster de acridinio

Teofilina, uM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
0	1582490	3.51
6.94	1485077	3.05
13.9	1371950	3.15

(continuación)

Teofilina, uM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
27.7	1268183	3.41
55.5	1084917	4.56
111	973450	1.25
222	891833	1.10

(b) Ensayo homogéneo de teofilina utilizando el conjugado NSP-AS-HD-teofilina

5 En el ensayo homogéneo de teofilina, se llevan a cabo las reacciones en un volumen total de 300 uL de regulador como se describe en el ejemplo 6. Los estándares de teofilina en suero humano (0, 6.94, 13.9, 27.7, 55.5, 111, 222 uM) fueron diluidos 10 veces en la reacción para dar concentraciones finales de teofilina de 0, 0.694, 1.39, 2.77, 5.55, 11.1 y 22.2 uM. Los ensayos fueron ejecutados con un trazador aproximadamente 0.2 nM. Las reacciones de enlazamiento fueron iniciadas con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón antiteofilina a una concentración final de 70 nM. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se midió la quimioluminiscencia directamente (25 uL) en el MLA 1 (sin filtro) utilizando el reactivo disparador modificado. Los estándares cero y alto de teofilina se diferenciaron aproximadamente 5 veces en señal en la curva de respuesta a la dosis con razonable precisión de ensayo (<5% CV). Los datos para el ensayo homogéneo de teofilina utilizando un trazador de sulfonamida de acridinio aparecen en la Tabla 6 y han sido representados gráficamente en la figura 6.

Tabla 6 – Ensayo homogéneo de teofilina utilizando trazador de sulfonamida de acridinio

Teofilina, uM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
0	61270	0.53
6.94	77970	4.88
13.9	112920	2.94
27.7	139890	2.47
55.5	216630	1.78
111	268835	2.45
222	312575	1.74

Ejemplo 8

(a) Ensayo homogéneo de valproato utilizando el conjugado 2,7-dimetoxi-DMAE-valproato

15 El ensayo fue llevado a cabo en 100 uL de regulador como se describe en el ejemplo 6. Los estándares de valproato (0, 87.5, 175, 350, 700 y 1400 uM) en suero humano fueron diluidos 10 veces en el regulador de ensayo. Se empleó una concentración de trazador de 0.2 uM y la concentración del anticuerpo monoclonal de ratón antivalproato fue de 1 uM. Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de anticuerpo y después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las reacciones fueron diluidas 100 veces y medidas como se indicó anteriormente. Los estándares de valproato cero y alto fueron diferenciados en ~10 veces en señal. De nuevo la precisión del ensayo fue buena y todos los estándares de valproato pudieron ser distinguidos claramente uno de otro. Los datos para el ensayo homogéneo de valproato utilizando un trazador de éster de acridinio aparecen en la Tabla 7 y han sido representados gráficamente en la figura 7.

Tabla 7 – Ensayo homogéneo de valproato utilizando trazador de éster de acridinio

Valproato, uM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
0	2226627	2.94
87.5	1179153	4.36
175	853790	3.97
350	645213	3.45
700	451783	1.35
1400	337943	5.24

(b) Ensayo homogéneo de Valproato utilizando conjugado NSP-AS-Valproato

5 El ensayo fue llevado a cabo en 300 uL de regulador como se describe en el ejemplo 6. Los estándares de valproato (0, 87.5, 175, 350, 700 and 1400 uM) en suero humano fueron diluidos 10 veces en el regulador de ensayo para dar concentraciones finales de valproato de 0, 8.75, 17.5, 35, 70 y 140 uM. Una concentración de trazador de aproximadamente 0.2 nM fue empleada y la concentración del anticuerpo monoclonal de ratón antivalproato fue de 70 nM. Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición del anticuerpo y después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se midió la quimioluminiscencia directamente (25 uL) en el MLA1 (sin filtro) utilizando el reactivo disparador modificado. Los estándares de valproato cero y alto se diferenciaron aproximadamente 3.4 veces en señal en la curva de respuesta a la dosis con precisión de ensayo razonable (8% CV). Los datos para el ensayo homogéneo de valproato utilizando un trazador de sulfonamida de acridinio aparecen en la Tabla 8 y ha sido representado gráficamente en la figura 8.

Tabla 8 – Ensayo homogéneo de valproato utilizando trazador de sulfonamida de acridinio

Valproato, uM	Unidades de luz relativa promedio	% CV
0	182265	1.02
87.5	370895	6.61
175	458255	0.55
350	518490	8.10
700	600600	3.41
1400	628925	4.26

Ejemplo 9

(a) Síntesis del conjugado de cloruro de dabsilo y etilen diamina (dabsilo-ED)

20 Se agregó cloruro de dabsilo (25 mg, 0.077 mol, Aldrich) a etilen diamina (36 ul, 7 equivalentes) en diclorometano (2 mL). Después de 10 – 15 minutos, la TCL (acetato de etilo al 25% en hexanos) no indico material de partida. La reacción fue concentrada baja presión reducida y el residuo fue disuelto en MeCN. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 de 4.6 mm x 30 cm y un gradiente durante 30 minutos de 10%→100% de MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) mostró un producto individual que eluye a 13.5 minutos. El producto fue purificado por HPLC preparativa y las fracciones de HPLC fueron concentradas a un volumen pequeño por evaporación rotativa y luego liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 35 mg (80%); MALDI-TOF MS 348.3 obs. (347.4 calc.).

(b) Síntesis del éster de dabsilo -ED-glutarato-NHS

Se trató dabsilo-ED (15 mg, 26.1 μ moles) en MeCN (3 mL) con N,N-diisopropiletilamina (9.2 μ L, 2 equivalentes) seguido por anhídrido glutárico (9 mg, 3 equivalentes). Después de 2 horas a temperatura ambiente, el análisis por HPLC utilizando una columna C18 de 4.6 mm x 30 cm y un gradiente durante 30 minutos de 10% \rightarrow 70% de MeCN/agua (conteniendo cada uno 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1 mL/min y detección UV a 260 nm mostró conversión completa con el producto que eluye a 18 minutos (el material de partida eluye a 16 minutos). A esta solución se agregó N-hidroxisuccinimida ((15 mg, 5 equivalentes) seguida por DCC (27 mg, 5 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis por HPLC indico ~70% de conversión. Se agregó DCC adicional (13.5 mg, 2.5 equivalentes) y la reacción fue continuada durante otra hora. La reacción fue filtrada luego a través de lana de vidrio y el producto fue purificado por HPLC preparativa. Las fracciones de HPLC fueron liofilizadas hasta sequedad. Rendimiento = 14.8 mg (85%).

(c) Síntesis del conjugado anti-valproato-dabsilo

Un anticuerpo monoclonal antivalproato (0.5 mg, 0.45 mL de 1.1 mg/mL reserva en PBS pH 7.4) fue diluido con bicarbonato de sodio 0.1 M (0.45 mL). La solución fue tratada con 50 μ L de una solución de DMF en dabsil-ED-glutarato-NHS éster (2mg/mL en DMF). La reacción de marcación fue llevada a cabo durante 2 – 3 horas a temperatura ambiente y luego el conjugado fue aislado por cromatografía de filtración por gel sobre Sephadex G25 utilizando fosfato 10 mM pH 7 como eluyente. El grado de incorporación de dabsilo fue determinado por MALDI-TOF MS el cual indico ~9 dabsilos por proteína. El conjugado fue almacenado a 4°C.

(d) Ensayo homogéneo de valproato utilizando anticuerpo antivalproato marcado con dabsilo y 2-CME-7-metoxi-DMAE-valproato

Las reacciones fueron ejecutadas en 0.2 mL de regulador como se describe en el ejemplo 6. Los estándares de valproato en suero de oveja fueron empleados a concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100 y 150 μ g /mL las cuales corresponden a 0, 68.5, 171, 342.5, 685, 1027.5 μ M. El trazador fue empleado a una concentración de 1.29 nM. El anticuerpo marcado con dabsilo fue agregado de último hasta una concentración final de 0.4 μ M. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora y luego fueron leídas directamente como se describe en el ejemplo 6. Los datos obtenidos para el ensayo homogéneo de valproato utilizando detenedor fueron representados gráficamente en la figura 9.

Ejemplo 10 - Conjugados para transferencia de energía por resonancia CL

(a) Conjugado de biotina de naftofluoresceína

Una solución de éster NHS de naftofluoresceína (2.3 mg) en DMF (0.25 ml) fue mezclada con una solución de biotina-jefamina (conjugado de biotina trietilenglicol diamina, 15 mg) en DMF (0.25 ml) y regulador de carbonato (0.10 M, pH 8.5, 0.30 ml). Después esta mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche, fueron retirados los solventes bajo vacío, y el residuo fue tomado en CH₃CN/agua para purificación por HPLC (cromatografía en fase reversa en C-18). El producto aislado fue identificado por espectrometría de masas MALDI-TOF (833.2 calc., 833.5 obs.)

(b) Conjugado de biotina de análogo de acridinio

Se disolvieron biotina-jefamina (2.0 mg) y 2-CME-7-metoxi-DMAE éster NHS (0.5 mg) en 0.50 ml de DMF, y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante un periodo de tres horas. Después de que los solventes fueron retirados bajo vacío, el producto deseado fue aislado mediante una cromatografía en fase reversa en C-18 y confirmado por espectrometría de masas MALDI-TOF (847.3 calc., 848.2 obs.)

(c) Preparación de anti-HCG(beta)-naftofluoresceína

0.30 ml de anti-HCG-beta monoclonal de ratón (Bayer, #10244590, 10.2 mg/ml) en regulador acetato (10 mM, pH 5.5) fueron pasados a través de una columna G-25 (1 cm x 15 cm) para intercambio de regulador, eluido con regulador fosfato (0.10 M, pH 8.0), y se recogieron 2.0 ml de proteína con un total de 2.8 mg de anticuerpo. Una tercera parte de la muestra recolectada fue mezclada con naftofluoresceína-NHS en DMF (0.10 ml, 1.0 mg/1.5 ml, 20 eq. total). Después de dos horas, la mezcla de reacción fue lavada con PBS (20 mM, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% NaN₃) a través de CentriCon 10 (0.66 ml, 0.60 mg/ml). El MALDI-TOF del producto indicó que 4.5 colorantes fueron incorporados en un anticuerpo.

(d) Preparación de anti-HCG(entero)-2-CME-7-metoxi-DMAE

Se pasaron 0.90 ml de anti-HCG (entero) a 3.5 mg/ml en fosfato 0.15 M - NaN₃ 0.1 %, pH 7.4 a través de una columna G-25 (1 cm x 15 cm) eluida con regulador de fosfato (0.10 M, pH 8.0), y las fracciones recolectadas fueron reunidas y concentradas a través de CentriCon 10 hasta un volumen de 0.90 ml a 2.3 mg/ml. Una tercera parte de esta muestra fue incubada con una muestra de 2-CME-7-metoxi-DMAE NHS éster en DMF (0.075 ml, 0.50 mg/0.70 ml, 20 eq.) durante dos horas. La purificación a través de columna G-25 y concentración a través de CentriCon 10

dio un producto de 0.21 mg (0.52 mg/ml) en regulador PBS (20 mM, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% NaN₃). El análisis por MALDI-TOF mostró que 1.3 marcadores fueron unidos al anticuerpo.

Ejemplo 11

5 Titulación de Avidina y Biotina-AE con Biotina-JfNpFL en reacciones homogéneas de transferencia de energía por resonancia CL

10 Las reacciones de enlazamiento (300 uL) fueron ensambladas en BSA-PBS (0.1 % de BSA-fosfato de potasio 10 mM,- NaCl 0.15 M - 0.05 % de azida de sodio, pH 8) como se muestra en la Tabla 9. La biotina-jefamina-naftofluoresceína, abreviada como "biotina-Jf-Np-FL, 100 uL" a niveles variables y la biotina-hexaetilen glicol-2-CME-7-metoxi-DMAE, abreviada como "biotina-AE, 100 uL" fueron premezcladas y las reacciones de enlazamiento competitivas (6 - 14) fueron iniciadas mediante la adición de neutravidina 1 uM (Pierce) o estreptavidina (100 uL, Sigma) y mezclando, seguido por 30 minutos de incubación a 37°C. Las reacciones de control (1 – 5) recibieron los reactivos mostrados y fueron llevadas a 300 uL con BSA-PBS. Los datos aparecen en la tabla 9. Los datos para cada reacción aparecen como una fila numerada en la Tabla 9, representando la primera columna de datos la reacción 1, representando la segunda fila la reacción 2 y así sucesivamente.

15 Tabla 9: Transferencia de energía por resonancia CL en el complejo biotina-AE:Avidina:Biotina-JfNpFL

	0.025 μM Biotina-AE (μL)	100 μL Biotina- JfNpFL (μM)	1 μM Avidina	BSA-PBS pH 8 (μL)	Neutravidina		Estreptavidina	
					RLU/5s		RLU/5s	
1.	0	0	0	300	2,230		2,230	
2.	0	0	100	200	2,075		2,340	
3.	100	0	0	200	22,585		22,585	
4.	0	1.000	0	200	2,185		2,265	
5.	0	1.000	100	100	2,080		2,370	
					RLU/5s Neto	Señal/BG	RLU/5s Neto	Señal/BG
6.	100	0.000	100		81,710	1.00	8,110	1.00
7.	100	0.005	100		97,085	1.18	11,275	1.39
8.	100	0.010	100		103,550	1.27	14,430	1.78
9.	100	0.050	100		193,420	2.36	34,910	4.30
10.	100	0.250	100		409,350	5.10	117,130	14.44
11.	100	1.000	100		456,335	5.59	367,075	45.26
12.	100	1.500	100		848,860	10.39	357,275	44.05
13.	100	2.000	100		851,365	10.42	436,045	53.77
14.	100	4.000	100		283,835	3.47	893,085	110.12

20 Se midió la CL a 4°C en un MLA1 con tubo PMT sensible al rojo (Hamamatsu R2228) y 2 filtros (filtros de corte Corion, para leer >650 nm) utilizando una inyección sencilla de 300 uL de peróxido al 1%-CTAC al 0.5%-bicarbonato de sodio 0.1 M, azida de sodio al 0.05 %, pH 8.3. Los RLU netos para 5 segundos mostrados son los recuentos con 2100 o 2300 RLU para señal de fondo para avidina sola restada. La BiotinaNpFL sola también dio esta señal de fondo y por si misma no fue potenciada por la avidina. Véanse los datos para la reacciones 4 y 5 en la Tabla 9. La neutravidina sola potenció la biotina-AE CL ~4 veces, mientras que la estreptavidina sola la disminuyó en ~3 veces. Véanse los datos para la reacciones 6 y 3 en la Tabla 9. La inclusión de biotina-JfNpFL dio un incremento

adicional dependiente de la dosis en CL. Véanse los datos de la reacciones 7 – 14 versus la reacción 6 en la Tabla 9. El rango de biotina-JfNpFL discernible con biotina AE y estreptavidina fue ~ 2 a 3 órdenes de magnitud, con un límite de detención inferior de <0.005 µM en la muestra de 100 µL. Véase la figura 10 la cual representa una gráfica de “CL RET de Biotina-AE a Biotina-jfNpFL en un complejo con estreptavidina”.

5 Como se muestra en la figura 10, a concentraciones óptimas la señal de RET con estreptavidina se incrementó a un máximo de 110 veces y con neutravidina hasta 10 veces. Estos resultados sugieren que un ensayo sándwich de hasta 3 log de rango dinámico puede ser posible si el complejo de enlazamiento RET puede ser reducido en tamaño al del complejo de biotina:avidina.

10 El enlazamiento de la biotina-AE sola con la avidina, produjo una modulación en la señal de quimioluminiscencia producida. Compárense los datos para la reacción 3 con los de la reacción 6 en la Tabla 9. La señal de 22,585 se incrementó a 81,710 con neutravidina y disminuyó a 8,110 con estreptavidina. De manera interesante, la neutravidina potencia la quimioluminiscencia (480 nm), mientras que la estreptavidina la disminuye. Así, la modificación química específica del sitio de los anticuerpos puede ser útil para modular la señal producida por el marcador CL enlazado. Consecuentemente, en este ejemplo la cantidad de quimioluminiscencia RET (>650 nm), cuando la biotina-NpFL a niveles variables en reacciones de enlazamiento compite con la biotina-AE por las avidinas, también depende de la especie de avidina.

Ejemplo 12

Ensayo de saturación secuencial homogéneo para biotina a través de transferencia de energía CL con Biotin-AE, Biotin-Jf-Np-FL y Neutravidina

20 La biotina (100 uL) a la concentración indicada y 100 uL de neutravidina 1 uM fueron mezcladas e incubadas durante 1 hora a 20°C (Tabla 10). Luego se agregaron una solución de biotina-AE 25 nM y biotina-Jf-Np-FL 250 nM, se mezclaron y fueron seguidas por una incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se llevaron a cabo las lecturas en el MLA 1 como se indicó anteriormente. Todos los controles de fondo fueron bajos (reacciones 1 – 4). Los RLU netos son los recuentos menos la señal de fondo de RLU 3285 para neutravidina sola. El enlazamiento inicial de biotina redujo la cantidad de biotina marcadas enlazadas en la siguiente etapa, reduciendo por lo tanto la perceptibilidad de RET por encima de 2.5 uM de biotina en una forma dependiente de la dosis.

25 La biotina libre se dejó competir con los niveles fijos de biotina-AE, biotina-NpFL y neutravidina. Como se muestra en la Tabla 10, la biotina enlazada a neutravidina en lugar de alguna parte de los conjugados marcados redujo la transferencia de energía de otra manera potenciada.

30 Tabla 10: Ensayo homogéneo para biotina a través de CL RET con biotina-HEG-AE, biotina-JfNpFL y neutravidina

	Incubación: durante 60 minutos a 20°C			30 minutos a 37°C	
Rxn	Biotina 100 uL (uM)	Neutravidina 1 uM (uL)	BSA/PBS pH 8 (uL)	Biotina-AE 25 nM Biotina-JfNpFL 250 nM (uL)	Señal CL RLU/5s
1	0	0	300	0	3,180
2	0	100	200	0	3,285
3	10 uM	0	200	0	3,480
4	10 uM	100	100	0	3,675
5	0	0	200	100	22,265

(continuación)

	Incubación: durante 60 minutos a 20°C			30 minutos a 37°C		
Rxn	Biotina 100 uL (uM)	Neutravidina 1 uM (uL)	BSA/PB S pH 8 (uL)	Biotina-AE 25 nM Biotina-JfNpFL 250 nM (uL)	Señal CL RLU/5s	
					RLU neto/5s	%
6	0.0	100		100	411,995	100.0
7	0.1	100		100	389,205	94.5
8	0.5	100		100	423,255	100.5
9	1.0	100		100	465,025	112.9
10	2.5	100		100	384,720	93.4
11	5.0	100		100	30,040	7.3
12	7.5	100		100	23,710	5.8
13	10.0	100		100	21,200	5.1
14	20.0	100		100	19,145	4.6

Ejemplo 13

(a) Inmunoensayo homogéneo para HCG a través de transferencia de energía por resonancia CL

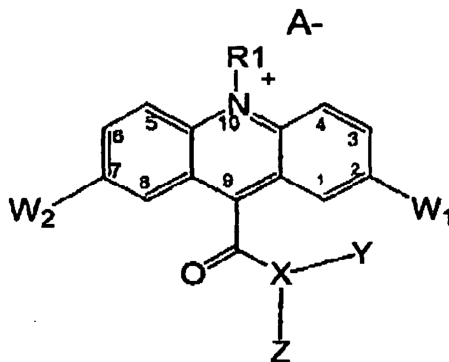
- 5 Este ejemplo detalla un ensayo homogéneo para HCG en donde un anticuerpo es marcado con un éster de acridinio (2-CME-7-metoxi-DMAE) mientras que el segundo anticuerpo es marcado con un colorante fluorescente (naftofluoresceína).

10 Las reacciones de enlazamiento competitivo (300 uL) fueron ensambladas en BSA-PBS. Se premezclaron BSA-PBS, antiHCG (completo) (7504MR)-(2-CME-7-metoxi-DMAE)_{1.3} a 10.4 ug/mL con antiHCG beta (102445901)-(naftofluoresceína)_{4.5} hasta 12.0 ug/mL final. Los estándares de HCG (200 uL) a la concentración variable indicada en la Tabla 10 fueron agregados a 100 uL de la premezcla por tubo (cuadruplicados, cada estándar), se sellaron y fueron seguidos por mezcla y 1 hora de incubación a 37°C en baño de agua. Finalmente se midieron 2 tubos por cada estándar en el MLA1 a 4°C leyendo con el reactivo sencillo (pH 8.3) de iniciación CL como se indicó anteriormente. Cinco minutos después los otros dos tubos fueron leídos con el mismo instrumento, utilizando la lectura con el reactivo CL sencillo en donde la señal alcanza un máximo a 5000 mIU/mL de HCG con un incremento de 2.7 veces sobre el de 0 HCG y luego declino gradualmente.

15

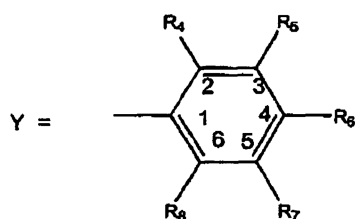
REIVINDICACIONES

1. Un ensayo homogéneo para detección o cuantificación de un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) conjugación del analito a un compuesto de acridinio quimioluminiscente seleccionado del grupo consistente de un éster de acridinio con grupos funcionales donantes de electrones en la posición C2 y/o C7 sobre el núcleo de acridinio o una sulfonamida de acridinio con o sin grupos funcionales donantes de electrones en la posición C2 y/o C7 sobre el núcleo de acridinio;
- (b) adición de una cantidad predeterminada del conjugado a la muestra que contiene la concentración desconocida del analito;
- 10 (c) agregar un anticuerpo específico para el analito para formar un complejo de enlazamiento bien sea con el analito o con su conjugado de acridinio;
- (d) incubar la solución del complejo de enlazamiento;
- (e) disparar la quimioluminiscencia de la mezcla de reacción del complejo de enlazamiento agregando reactivos disparadores de la quimioluminiscencia en un rango de pH de 6 a 10 para producir emisión de luz;
- 15 (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro: y
- (g) calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva de respuesta a la dosis estándar la cual relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 20 2. El ensayo de la reivindicación 1, en donde el compuesto de acridinio es un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio.
3. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho compuesto de acridinio quimioluminiscente tiene la siguiente estructura:



en donde,

- 25 R1 es un alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo;
- X es oxígeno o nitrógeno;
- Y es un alquilo de cadena ramificada o recta que contiene hasta 20 átomos de carbono, halogenado o no halogenado, o un arilo sustituido, o un sistema de anillo heterocíclico;
- 30 donde X es oxígeno, Z se omite e Y es una unidad estructural arilo polisustituido de la fórmula:



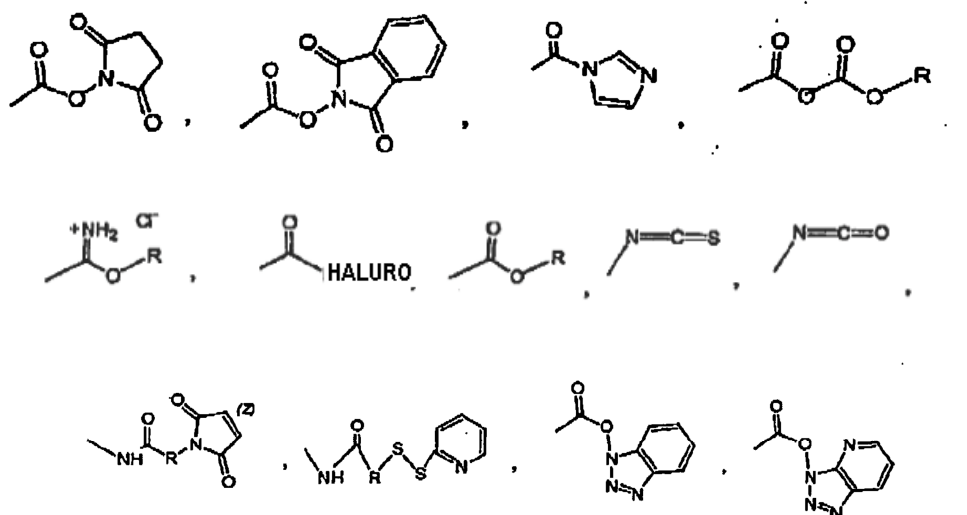
en donde R4 y R8 son el mismo o diferentes, y son hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi (-OR), alquiltiol (-SR) o grupos amino sustituidos que sirven para estabilizar el enlace -COX- entre el núcleo acridinio y la unidad estructural Y, a través de un efecto estérico y/o electrónico;

5 R5 y R7 son hidrógeno o lo mismo que R;

R6 = -R9-R10,

en donde R9 no es requerido y es un alquilo de cadena ramificada o recta, arilo o aralquilo sustituido o no sustituido que contiene hasta 20 heteroátomos, y

10 R10 es un grupo saliente o un grupo funcional electrofílico unido con un grupo saliente seleccionado del grupo consistente de:



15 -SO₂Cl, -N₃, -N₂<-> Cl<->, un haluro o un ácido carboxílico, R5 y R6, y R6 y R7 son intercambiables; cuando x es nitrógeno, Z es -SO₂-Y', e Y' tiene la misma definición de Y y ambos pueden ser el mismo o diferentes; W1 y W2 son el mismo o diferentes y son grupos donantes de electrones que comprenden OR, OH, SR, SH, NH₂, NR'R''; en donde R, R' y R'' pueden ser el mismo o diferentes, y son seleccionados del grupo consistente de alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo que contienen hasta 20 heteroátomos;

20 A<-> es un contraión el cual es introducido para aparearse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y es seleccionado del grupo consistente de CH₃SO₄<->, FSO₃<->, CF₃SO₄<->, C₄F₉SO₄<->, CH₃C₆H₄SO₃<->, haluro, CF₃COO<->, CH₃COO<->, y NO₃<->.

4. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el analito de interés es una molécula pequeña seleccionada del grupo consistente de esteroides, fármacos terapéuticos, vitaminas, hormonas y péptidos.

25 5. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente disparador de la quimioluminiscencia es peróxido de hidrógeno, peróxido de sodio o sales de peróxido bivalentes.

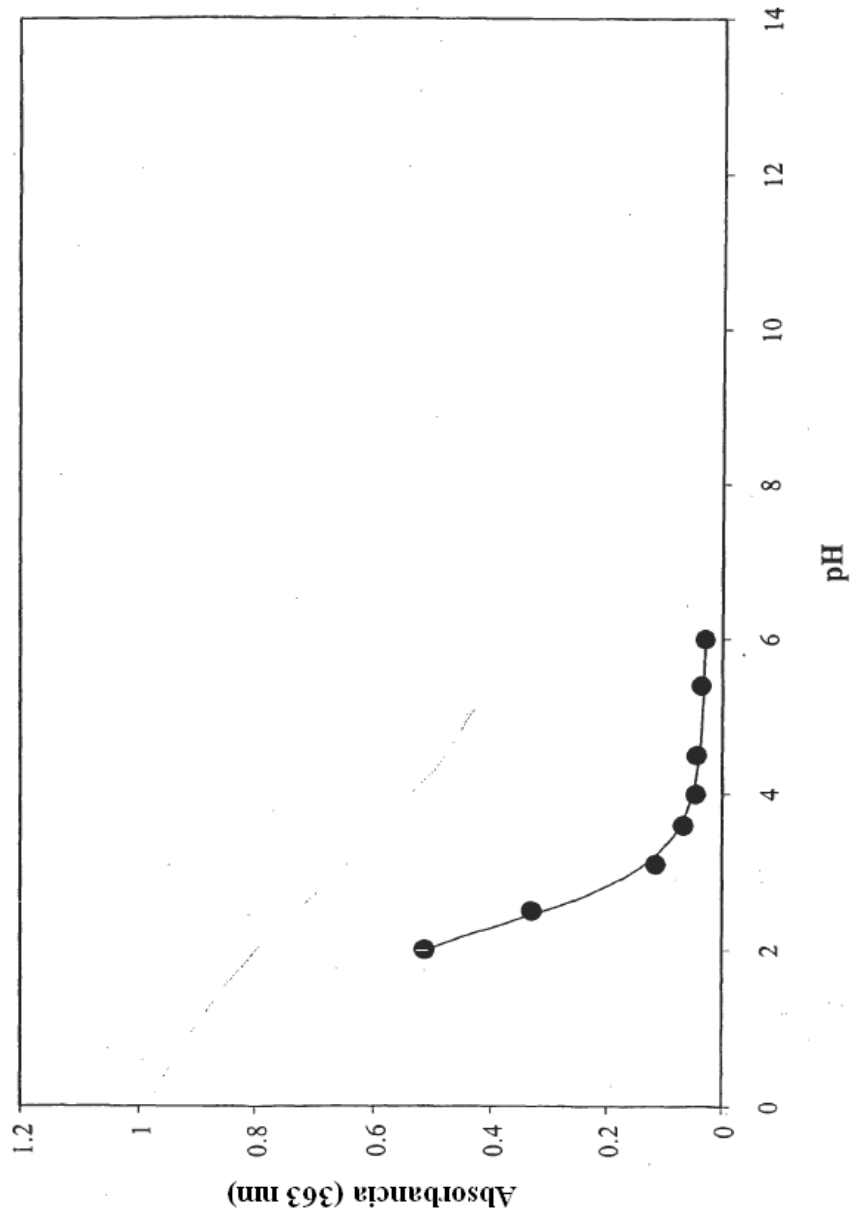


FIG.1

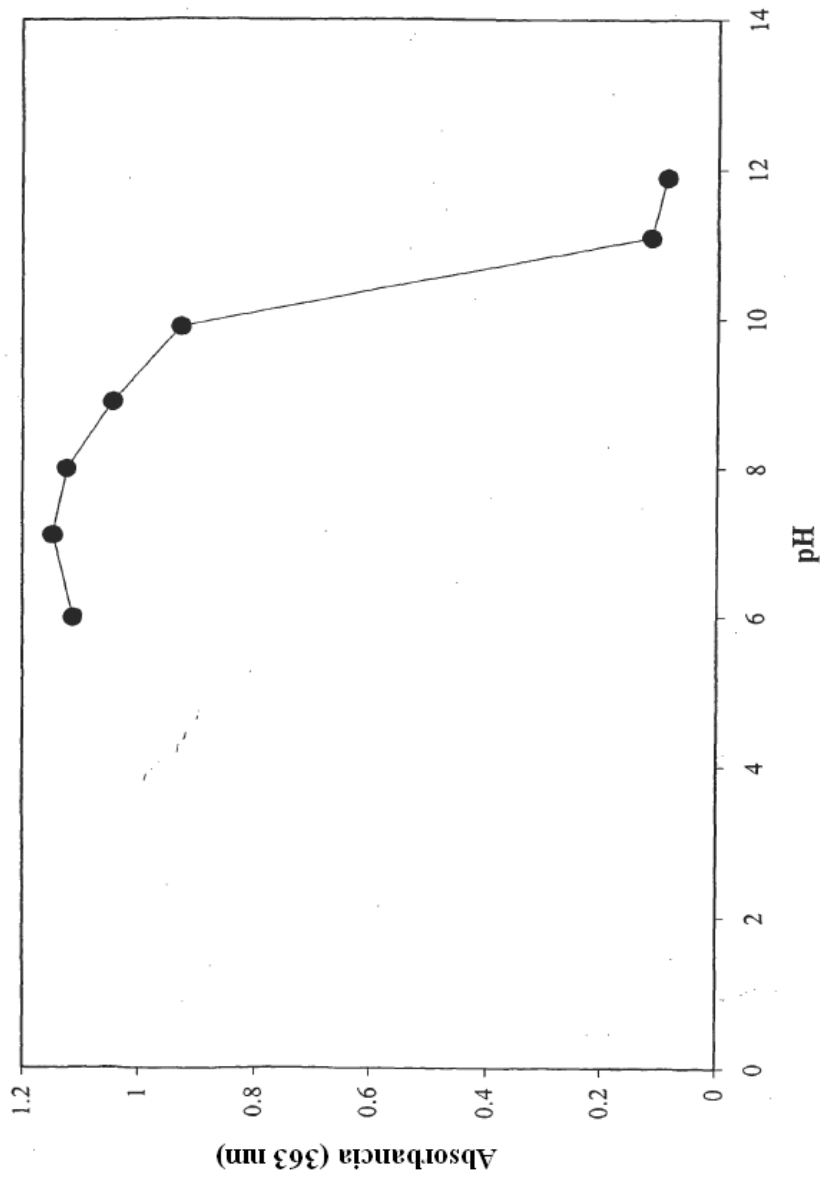


FIG.2

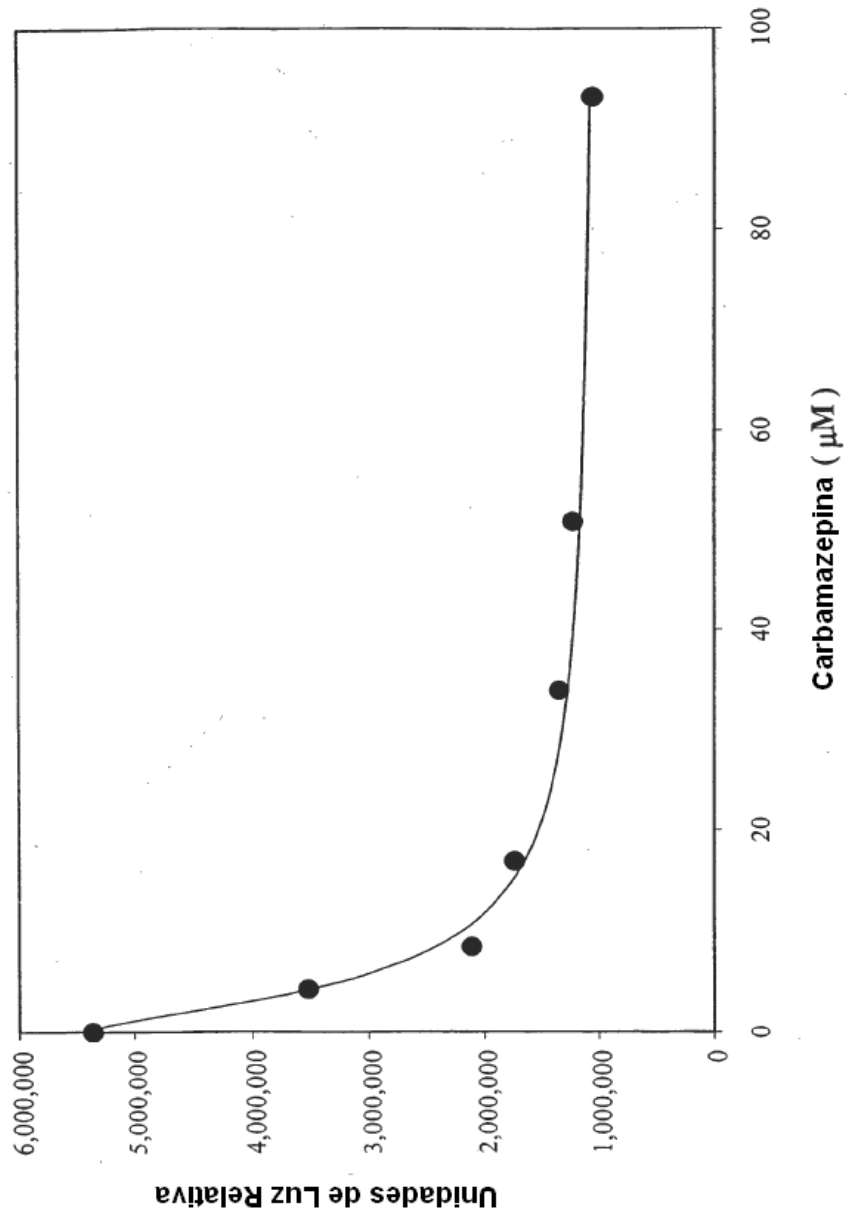


FIG.3

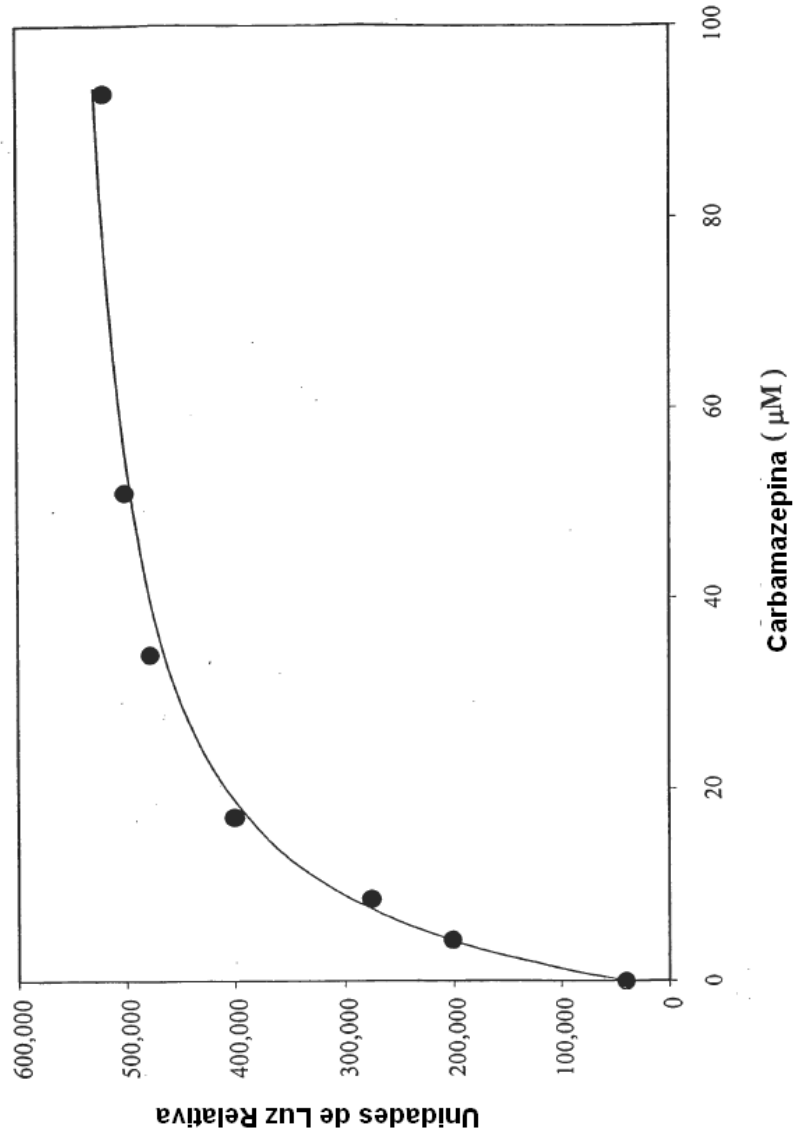


FIG.4

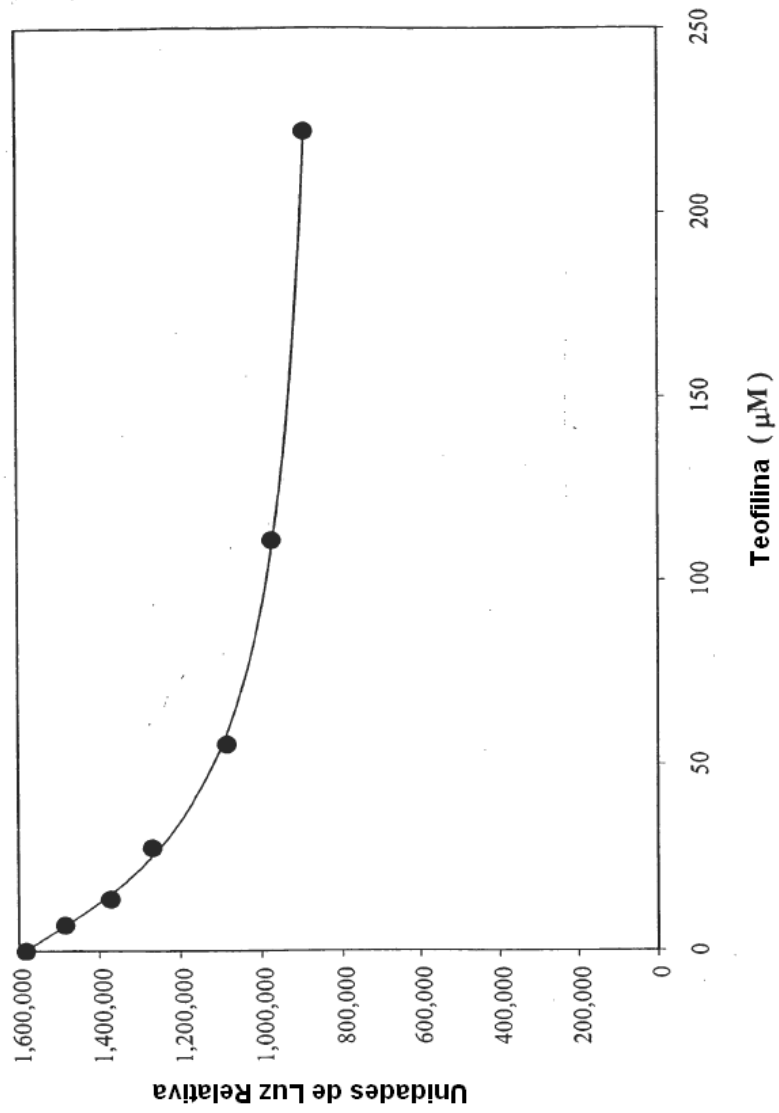


FIG.5

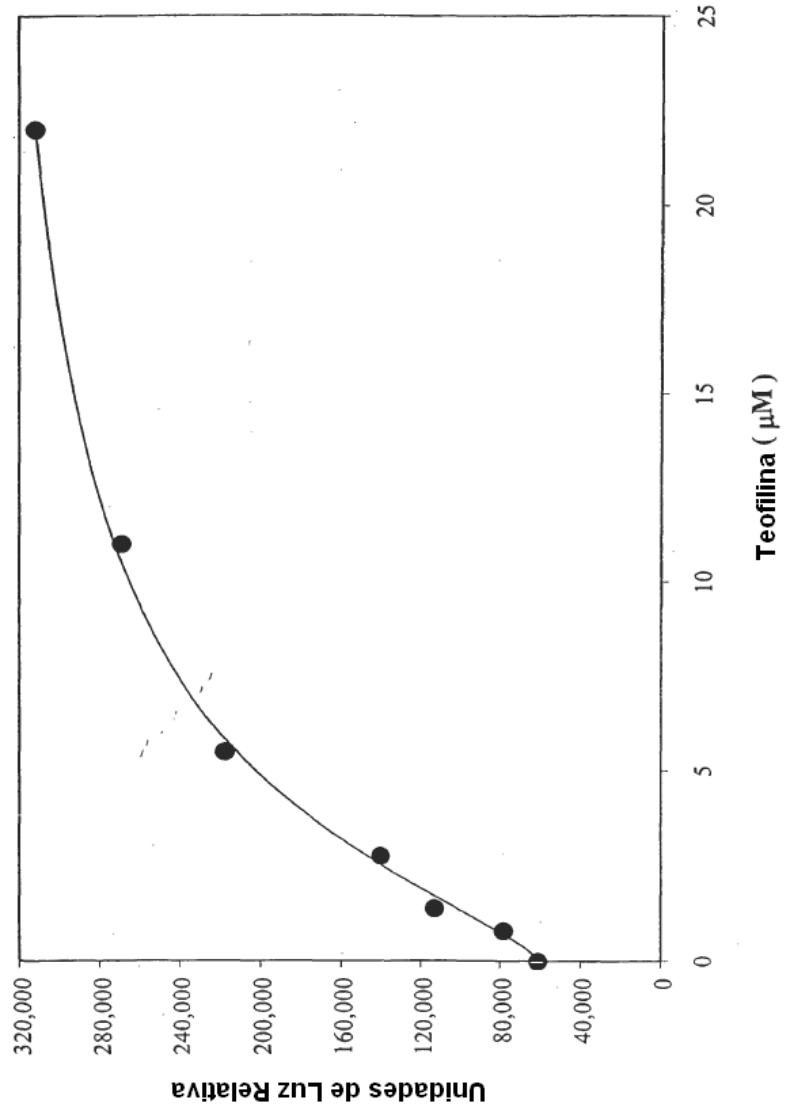


FIG.6

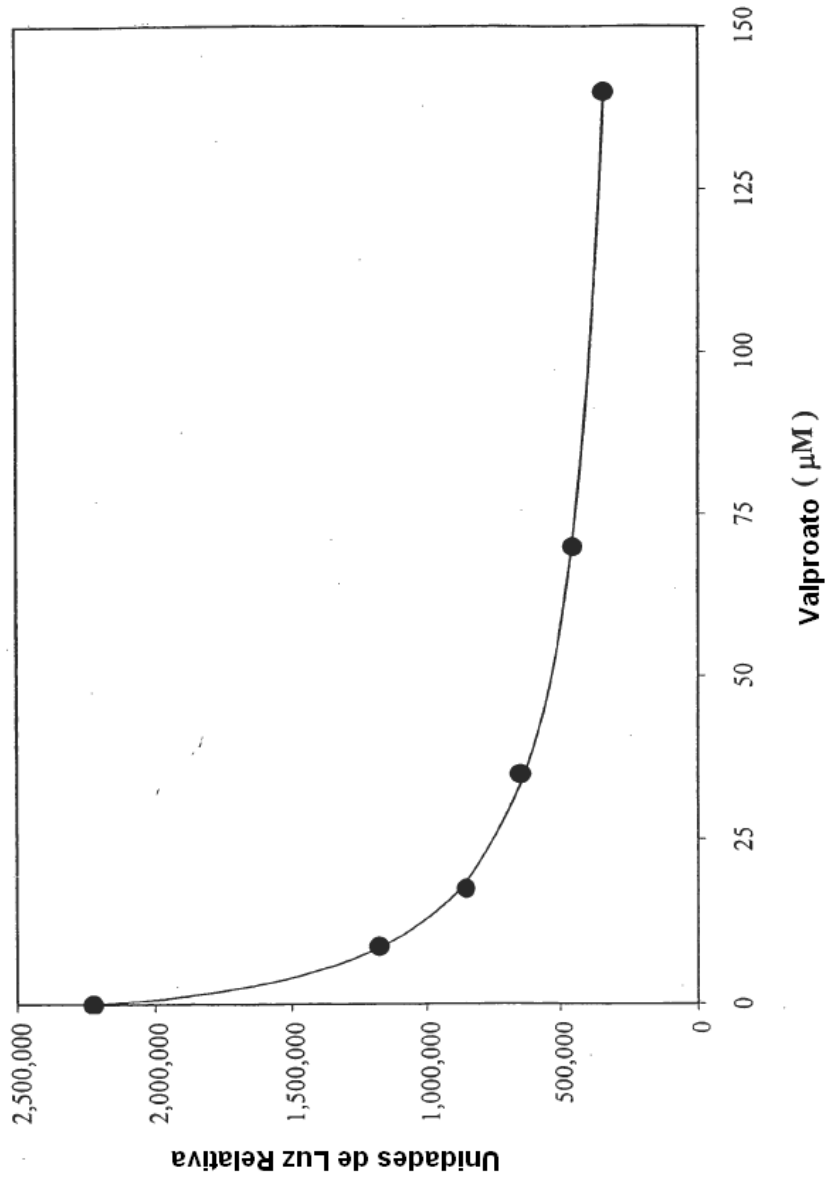


FIG.7

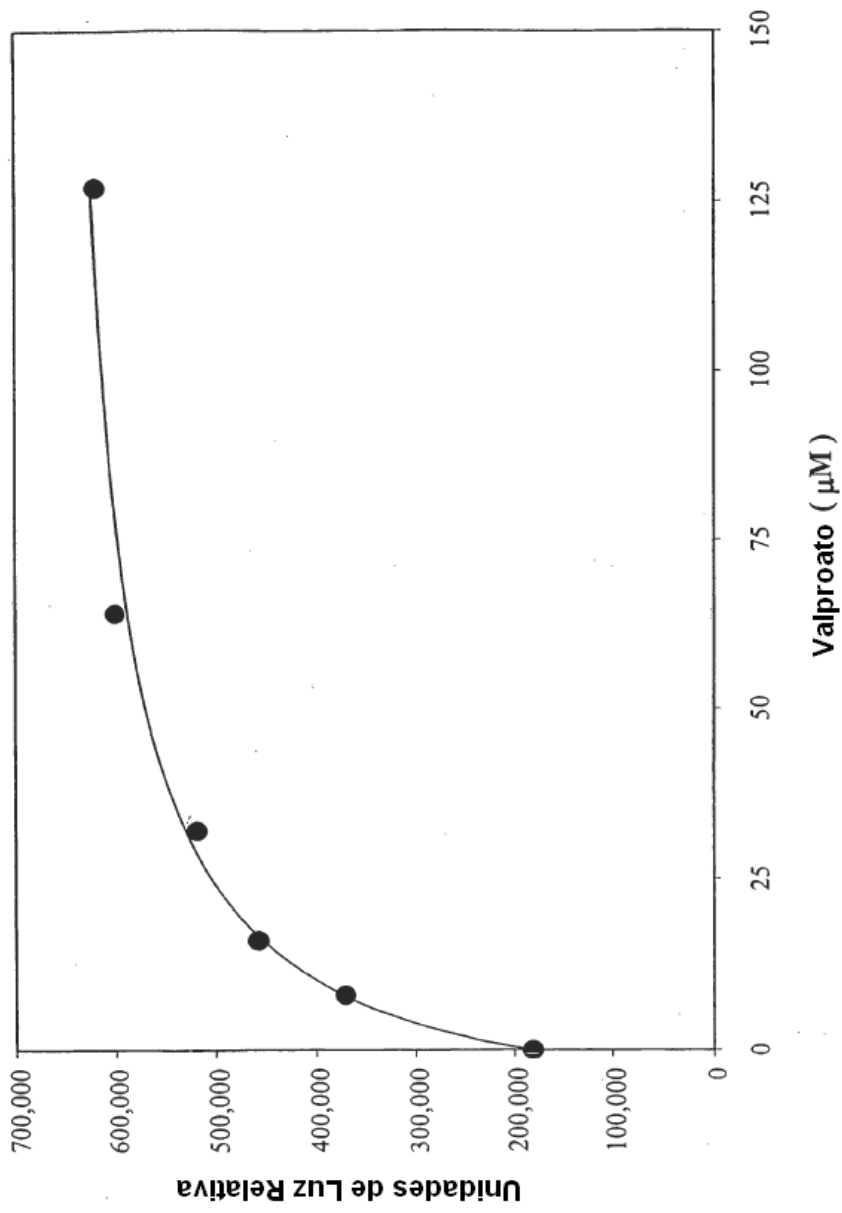


FIG.8

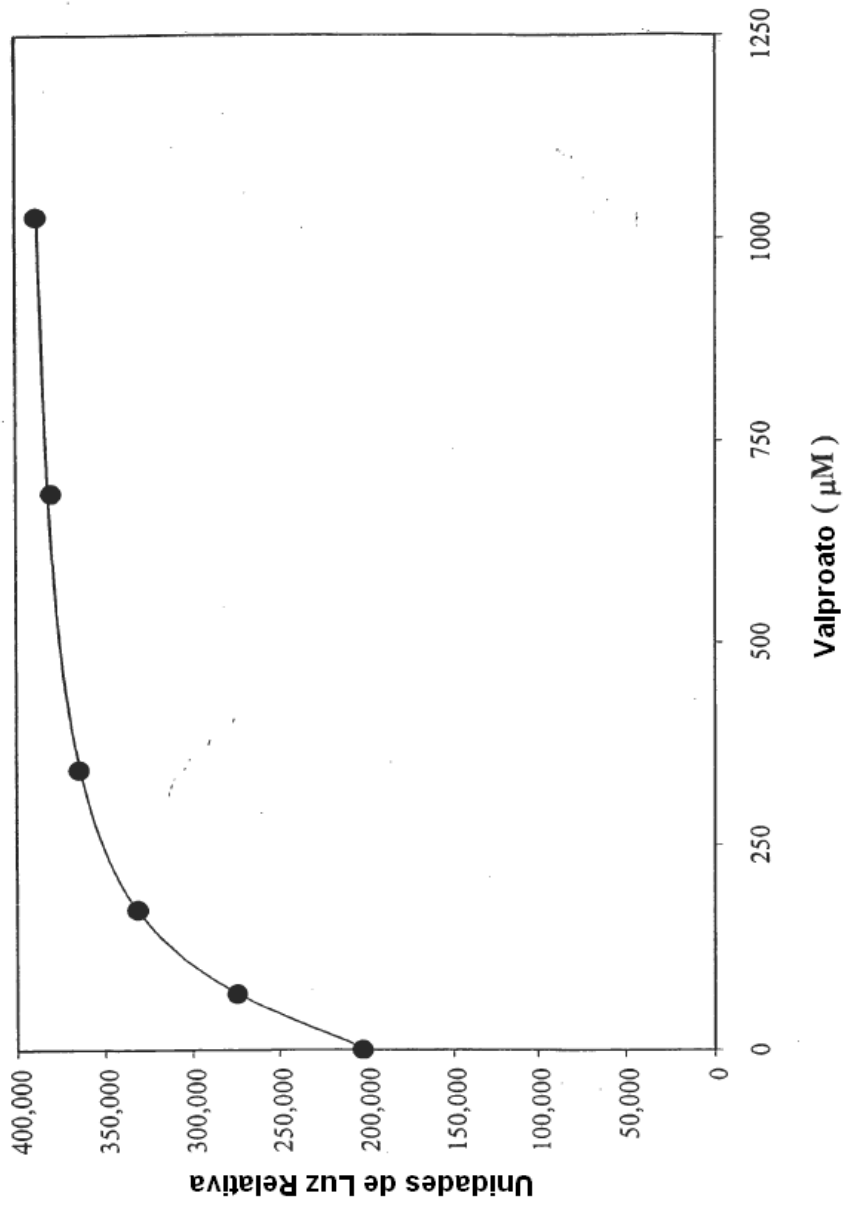


FIG.9

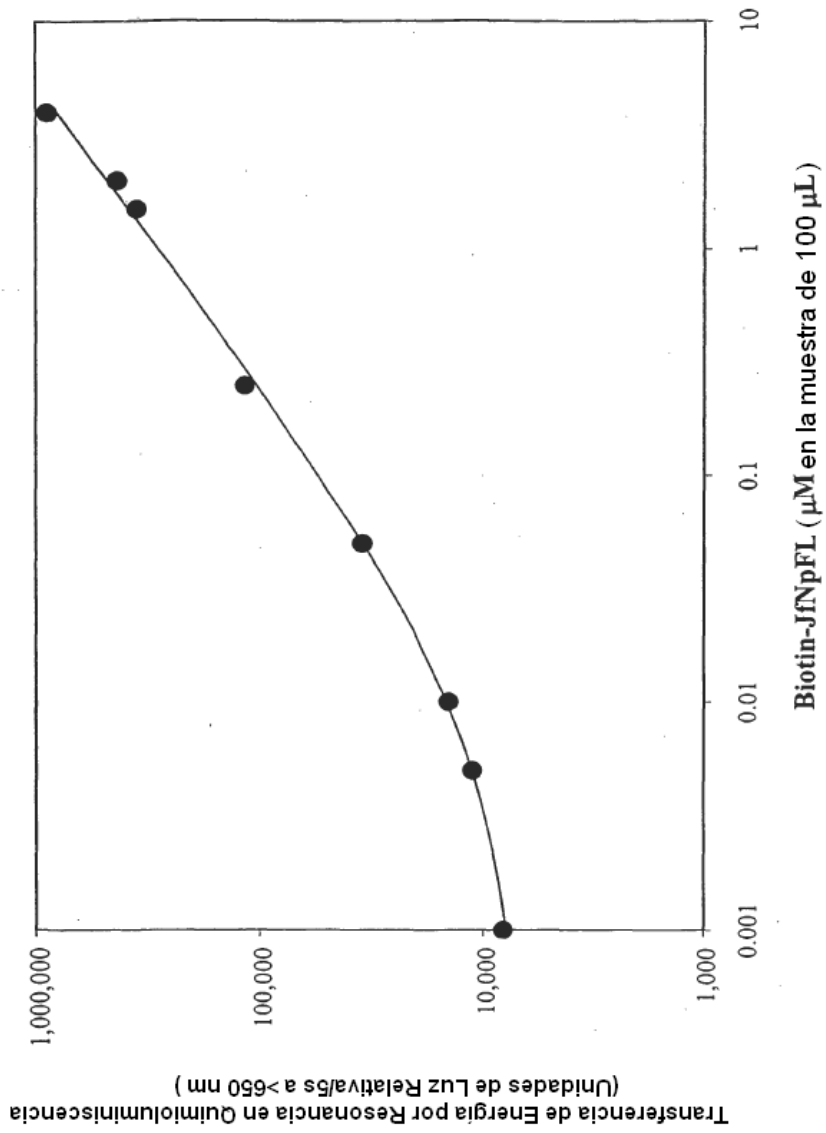


FIG.10