

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 059**

51 Int. Cl.:

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2006 E 06771782 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1946108**

54 Título: **Compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico y sus usos en mejoramiento de la sensibilidad de ensayo**

30 Prioridad:

02.06.2005 US 142938

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

20.01.2015

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

511 BENEDICT AVENUE

TARRYTOWN, NY 10591-5098, US

72 Inventor/es:

NATRAJAN, ANAND;

JIANG, QUINGPING;

SHARPE, DAVID y

COSTELLO, JAMES

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 527 059 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

Compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico y sus usos en mejoramiento de la sensibilidad de ensayo

Antecedentes de la invención

5 Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud con número de serie 10/260,504 presentada el 27 de septiembre de 2002.

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a compuestos de acridinio quimioluminiscentes con alto rendimiento cuántico, con una producción de luz incrementada. Las características estructurales necesarias para obtener emisión de luz incrementada a partir de compuestos de acridinio se divulgan en la presente. Adicionalmente, también divulgamos versiones hidrofílicas de estas estructuras, las cuales no sólo tienen producción de luz incrementada sino también tienen solubilidad de agua incrementada y bajo enlazamiento no específico. Éstos compuestos son útiles para mejorar la sensibilidad de ensayo debido a su elevado rendimiento cuántico y a su naturaleza hidrofílica.

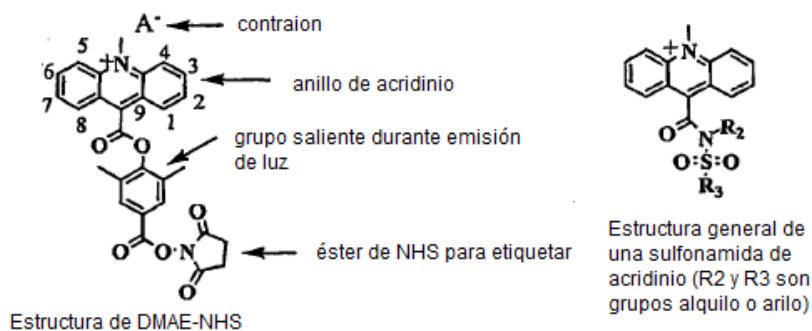
2. Antecedentes de la invención

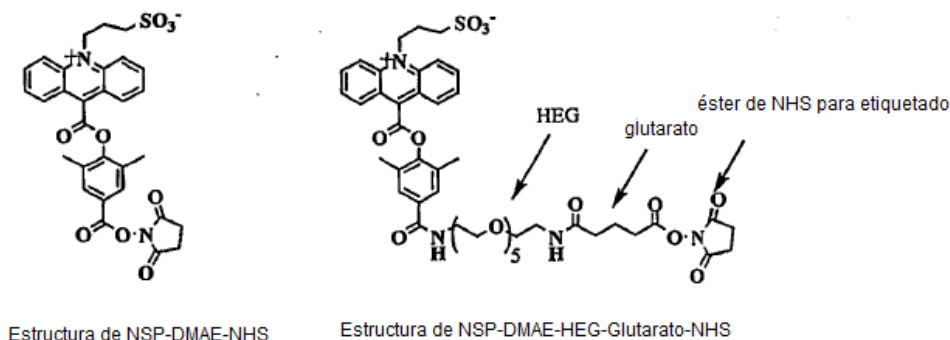
15 Los ésteres de acridinio (AEs por sus siglas en inglés) luminiscentes son etiquetas extremadamente útiles que se han usado extensamente en inmunoensayos y ensayos de ácidos nucleicos. Una reseña reciente, M.J., Journal of Clinical Ligand Assay vol. 22, pp. 105-122 (1999) resume los desarrollos pasados y actuales en esta clase de compuestos quimioluminiscentes.

20 McCapra, F. et al., Tetrahedron Lett. vol. 5, pp.3167-3172 (1964) y Rahut et al. J. Org. Chem vol. 301, pp. 3587-3592. (1965) divulgaron que la luminiscencia de los ésteres de sales de acridinio puede provocarse por peróxido alcalino. Desde estos estudios fundamentales se ha incrementado el interés en compuestos de acridinio debido a su utilidad como etiquetas. La aplicación del éster de acridinio bromuro de 9-carboxifenil-N-metilacridinio en un inmunoensayo fue divulgada por Simpson, J.S.A. et al., Nature vol. 279, pp. 646-647 (1979). Sin embargo, este éster de acridinio es muy inestable y por lo mismo limita su utilidad comercial. La inestabilidad surge de la hidrólisis de la unión del éster 9-carboxifenilo entre el fenol y el anillo de acridinio.

25 En la técnica anterior, se han descrito diferentes estrategias para incrementar la estabilidad de compuestos de acridinio. Law et al., Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 4, pp. 88-89 (1989) introdujeron dos grupos metilo al flanco del residuo de éster de acridinio para estabilizar esta unión. Se encontró que el resultante éster de acridinio estabilizado de modo estérico, DMAENHS [2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxicarbonil)fenil 10-metilacridinio-9-carboxilato] tenía la misma producción de luz que un éster de acridinio que carecía de los dos grupos metilo. La estabilidad del anterior compuesto al conjugarse con una inmunoglobulina era vastamente superior y no mostraban pérdida de actividad quimioluminiscente incluso después de una semana a 37 °C, a pH 7. En contraste, el éster de acridinio monosustituido solamente retuvo 10% de su actividad cuando se sometió al mismo tratamiento. Las patentes estadounidenses Nos. 4,918,192 y 5,110,932 describen DMAE y sus aplicaciones.

35 El éster de acridinio estabilizado de modo estérico, DMAE-NHS ha sido utilizado comercialmente en el inmunoanizador ACS:180™ (Bayer Diagnostics). La patente estadounidense No. 5,656,426 de Law et al. divulga una versión hidrofílica de DMAE denominada éster NSP-DMAE-NHS. Tanto DMAE como NSP-DMAE se usan actualmente en los inmuno analizadores ACS:180™ y Advia Centaur™ de Bayer. Las estructuras químicas de estos compuestos y el sistema de numeración del anillo de acridinio se ilustran en las siguientes ilustraciones:





Debido a que el anillo de acridinio es simétrico, C-1 es equivalente a C-8, C-2 es equivalente a C-7, C-3 es equivalente a C-6, y C-4 es equivalente a C-5.

Además, los compuestos de éster de acridinio se divulgan en los documentos EP 1 403254 A1, US 5 521 103, WO 98/02421 A1, US 5 593 845 A, US 5 523 212 A, y US 6 783 948 B1. En la patente estadounidense No. 6,664,043 B2, Natrajan et al. divulgan derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrofílicos adheridos al fenol. La estructura de un compuesto de ese tipo se ilustra en la figura de arriba. En este compuesto, se adhiere un residuo de diamino hexa(etileno) glicol (diamino-HEG) al fenol para incrementar la solubilidad acuosa del éster de acridinio. Un residuo de glutarato se adjunta al extremo de HEG y se convierte en el éster de NHS para habilitar el etiquetado de diversas moléculas.

Una clase diferente de compuestos de acridinio quimioluminiscentes estables ha sido descrita por Kinkel et al., Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence vol. 4, pp. 136-139 (1989) y Mattingli, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence vol. 6, pp. 107-114 (1991) y la patente estadounidense No. 5,468,646. En esta clase de compuestos, la unión de éster fenólico se reemplaza por un residuo sulfonamida, la cual imparte estabilidad hidrolítica sin comprometer la producción de luz, según se ha reportado. En ésteres de acridinio, el fenol es el 'grupo saliente' mientras que en las sulfonamidas de acridinio la sulfonamida es el 'grupo saliente' durante la reacción quimioluminiscente con peróxido alcalino.

La emisión de luz a partir de compuestos de acridinio es provocada normalmente por peróxido alcalino. La producción de luz total, la cual también puede denominarse rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, es una combinación de las eficiencias de la reacción química que conduce a la formación de la acridona en estado excitado y al rendimiento cuántico de fluorescencia de esta última.

Un número de factores puede incluir la producción total de luz de los compuestos de acridinio. Los rendimientos cuánticos de luminiscencia intrínseca de los compuestos de acridinio se ven afectados marcadamente por sus estructuras. Mientras que la mayoría de los estudios se han enfocado en el efecto del grupo saliente sobre la emisión de luz, ninguno ha tratado el efecto de los grupos funcionales sobre el anillo de acridinio o los rendimientos cuánticos de quimioluminiscencia aunque sus efectos sobre las longitudes de onda de la emisión de luz hayan sido bien documentados. Véase la patente estadounidense No. 6,355,803. Aunque la síntesis de un éster de acridinio con grupos metoxi en C-2 y C-7 del sistema de anillo de acridinio también haya sido divulgado en la patente estadounidense No. 5,521,103, el efecto de los dos grupos metoxi en el rendimiento cuántico o en la longitud de onda de la emisión de luz del éster de acridinio no se había divulgado.

Descripción de los dibujos

En los dibujos acompañantes:

Fig. 1(a) es una representación gráfica del ensayo de teofilina a altas concentraciones de teofilina;

Fig. 1(b) es una representación gráfica del ensayo de teofilina a bajas concentraciones de teofilina;

La figura 2(a) es una representación gráfica del ensayo de la hormona estimulante de tiroides (TSH) a bajas concentraciones de TSH;

La figura 2(b) es una representación gráfica del ensayo de TSH a altas concentraciones de TSH.

Descripción de las modalidades preferidas

- La presente invención se refiere al inmunoensayo de la reivindicación 1 que usa compuestos de acridinio con rendimientos cuánticos incrementados. Se ha descubierto que colocar grupos donadores de electrones en el anillo de acridinio incrementa la cantidad de luz que se emite por el compuesto de acridinio correspondiente cuando se provoca quimioluminiscencia por peróxido alcalino. El concepto de grupos donantes de electrones es bien conocido por los profesionales en el campo. De manera típica, un grupo donador de electrones es un grupo funcional que es un átomo o una colección de átomos que, comparados con hidrógeno, donan electrones. Una discusión detallada sobre grupos donadores de electrones y que retiran electrones puede encontrarse en Smith et al., *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms y Structure* (Química orgánica avanzada: reacciones, mecanismos estructura), pp. 16-17 (quinta edición Wiley-Interscience).
- Más específicamente, se ha encontrado que colocar uno o dos grupos funcionales donadores de electrones, tales como grupos metoxi o alcoxi, en C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio de los compuestos de acridinio incrementa su rendimiento cuántico. La tabla 1 resume los incrementos cuánticos relativos de diversos compuestos de acridinio sustituidos con metoxi y alcoxi en relación con NSP-DMAE así como también sus máximos de longitud de onda de emisión. Las estructuras químicas de los compuestos representativos de acridinio con grupos funcionales donadores de electrones en las posiciones C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio y los compuestos de acridinio correspondientes sin grupos funcionales donadores de electrones en las posiciones C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio están listadas en la tabla 1 y se representan estructuralmente a partir de la misma.

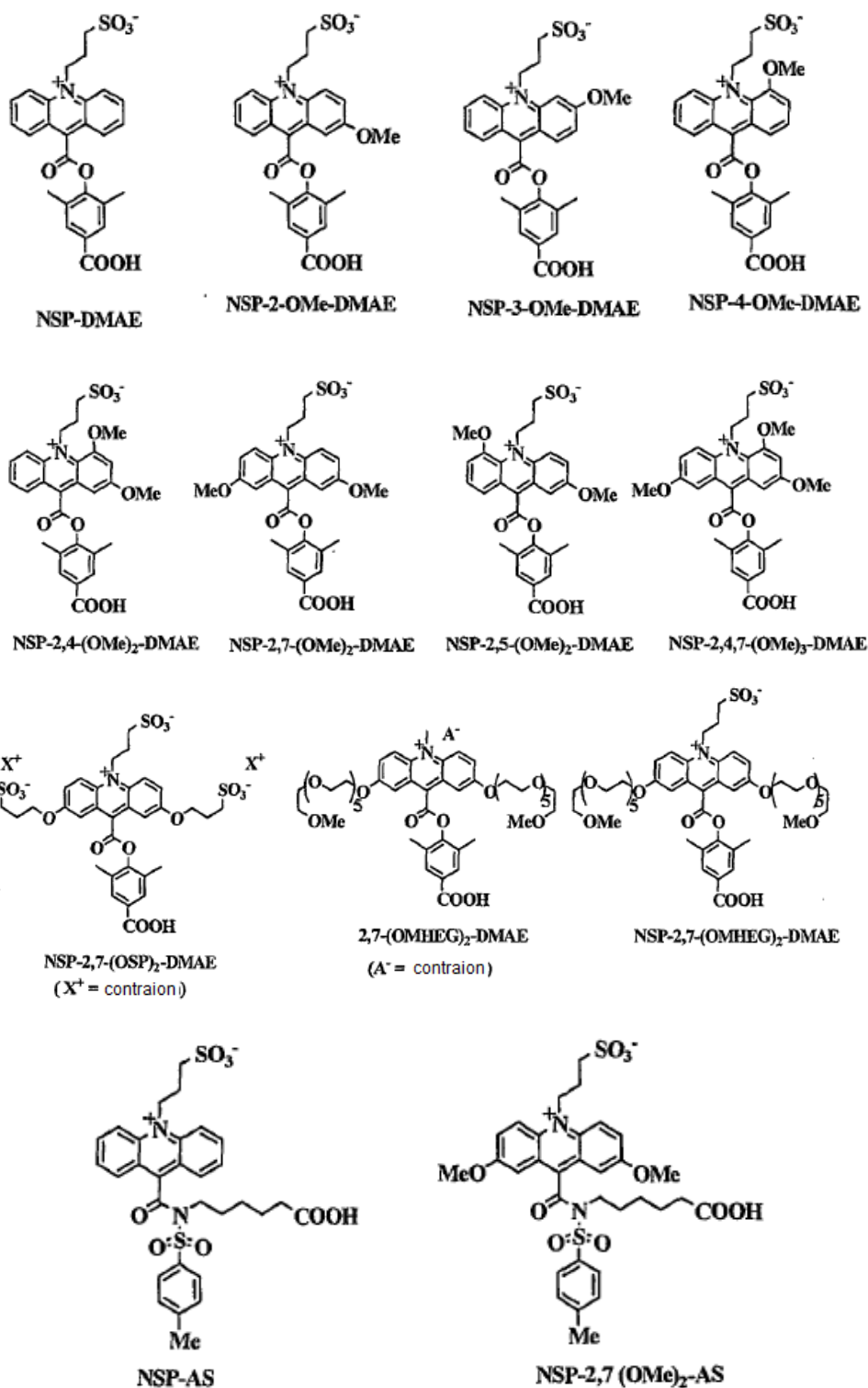
Los compuestos de acridinio listados en la tabla 1 se sintetizaron usando técnicas de química orgánica bien conocidas por los profesionales en el campo. El éster de acridinio NSP-DMAE, el cual no tiene grupos donantes de electrones en el núcleo del acridinio, fue usado como compuesto de referencia. En los ejemplos puede encontrarse información acerca de la síntesis de los compuestos de la tabla 1. La emisión de luz de cada compuesto se midió usando un luminómetro equipado con un tubo fotomultiplicador en calidad de detector y la longitud de onda de la emisión se midió usando una cámara FSSS (por Fast Spectral Scanning System o sistema de barrido espectral rápido) de Photoresearch Inc.

Tabla 1. Rendimientos cuánticos relativos de compuestos de acridinio

	Compuesto	Rendimiento cuántico relativo	Máximo de longitud de onda de emisión, nm
1	NSP-DMAE	1	426
2	NSP-2-OMe-DMAE	2.2	458
3	NSP-3-OMe-DMAE	0.35	418
4	NSP-4-OMe-DMAE	0.33	478
5	NSP-2,4-(OMe) ₂ -DMAE	0.35	514
6	NSP-2,7-(OMe) ₂ -DMAE	2.7	484
7	NSP-2,7-(OSP) ₂ -DMAE	3.1	480
8	NSP-2,5-(OMe) ₂ -DMAE	0.5	486
9	NSP-2,4,7-(OMe) ₃ -DMAE	1	518
10	2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE	1.5	480
11	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ DMAE	3.3	480
12	NSP-AS	1	426
13	NSP-2,7-(OMe) ₂ -AS	1.7	484

Se midió la quimioluminiscencia durante 5 segundos en un luminómetro Magic Lite Analyzer Luminometer (MLA1, Bayer Diagnostics). Para medición de rendimiento cuántico se prepararon muestras de los diversos compuestos en fosfato de 10 mM, pH 8, que contenía NaCl de 150, albúmina de suero bovino (BSA) al 0.05% y azida de sodio al 0.01%. Para determinaciones espectrales de emisión se prepararon muestras en dimetilformamida (DMF).

Las estructuras químicas de los compuestos listados en la tabla 1 son como siguen:



5 Partiendo de una inspección de la tabla 1, es evidente que un grupo metoxi individual en C-2 o dos grupos metoxi en C-2 y C-7 del anillo de acridinio incrementan la producción de luz del compuesto de acridinio correspondiente. Por ejemplo, NSP-2-OMe-DMAE tiene 2.2 veces la producción de luz de NSP-DMAE mientras que NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE tiene 2.7 veces (270%) la producción de luz de NSP-DMAE. Los grupos metoxi en otras posiciones sobre el sistema de anillo de acridinio no conducen a emisión de luz incrementada. De esta manera, el hallazgo de la

10 colocación específica de grupos metoxi en el anillo de acridinio que se requiere para obtener rendimiento de luz incrementado es inesperado.

En adición a los grupos metoxi, otros grupos alcoxi ("OR"), donde R puede ser alquilo, alqueno, alquino, arilo, y aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos, en C-2 y C-7 del anillo de acridinio conducen a emisión de luz incrementada. Este hallazgo es importante debido a que los componentes estructurales que conducen a una emisión de luz incrementada pueden combinarse con grupos hidrofílicos para producir un compuesto de acridinio hidrofílico con alto rendimiento cuántico. Por ejemplo, el reemplazo de los dos grupos metoxi en NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE con grupos O-sulfopropilo ("OSP") en el compuesto NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE también conduce a emisión de luz incrementada la cual es 3.1 veces la producción de luz de NSP-DMAE. Además del grupo O-sulfopropilo, otros grupos hidrofílicos tales como los grupos de O-metoxi hexa(etilén)glicol ("OMHEG") también conducen a emisión de luz incrementada.

De esta manera, los dos compuestos 2,7-(OMHEG)₂-DMAE y NSP-(OMHEG)₂-DMAE emiten 1.5 veces y 3.3 veces más luz, respectivamente, que NSP-DMAE como se muestra en la tabla 1. En 2,7-(OMHEG)₂-DMAE, el nitrógeno de acridinio contiene un grupo metilo mientras que NSP-(OMHEG)₂-DMAE contiene un residuo de sulfopropilo. Estas observaciones demuestran claramente que los grupos -OR en general pueden usarse como grupos donadores de electrones en estas posiciones para obtener emisión de luz incrementada. La sustitución del grupo funcional clave es de esta manera la colocación directa de átomos donadores de electrones en la posición C-2 y/o C-7 sobre el núcleo de acridinio.

Otra ventaja de los grupos O-sulfopropilo así como también de los grupos OMHEG es que los ésteres de acridinio resultantes son extremadamente hidrosolubles debido a los tres residuos de sulfonato o a los residuos de metoxi hexa(etilén)glicol en estos compuestos. También pueden usarse otros residuos de poli(etilén) glicol además de hexa(etilén)glicol (HEG). Un éster de acridinio de alto rendimiento cuántico que contiene grupos de -OMTEG [O-metoxitri(etilén)glicol] en C-2 y C-7 del anillo de acridinio también ha sido sintetizado tal como se describe en el ejemplo 10.

La sulfonamida de acridinio con dos grupos metoxi en C-2 y C-7 también muestra emisión de luz incrementada en comparación con la sulfonamida de acridinio no sustituida. Por ejemplo, NSP-2,7-(OMe)₂-AS emite 1.7 veces más luz que NSP-AS en condiciones idénticas. Puesto que los compuestos de sulfonamida de acridinio contienen un grupo saliente diferente que los ésteres de acridinio, la emisión de luz incrementada obtenida de NSP-2,7-(OMe)₂-AS indica claramente que el grupo saliente no desempeña un papel crítico. El incremento del rendimiento cuántico debido a la presencia de grupos donadores de electrones en las posiciones C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio aplica tanto a ésteres de acridinio como sulfonamidas de acridinio.

Los máximos de longitud de onda de emisión de los diversos compuestos listados en la tabla 1 muestran que la colocación de grupos metoxi o alcoxi en cada posición del anillo de acridinio, excepto en C-3, conduce a un desplazamiento hacia una longitud de onda más larga si se compara con NSP-DMAE monosustituido. Sin embargo, parece no haber correlación simple entre el máximo de longitud de onda de emisión y el rendimiento cuántico. Por ejemplo, NSP-4-OMe-DMAE tiene un máximo de emisión de 478 nm y aún así su rendimiento cuántico es solamente un tercio del NSP-DMAE. Otro punto a notar es que la naturaleza del grupo alquilo adherido a los átomos de oxígeno en C-2 y C-7 no parece afectar el máximo de longitud de onda de la emisión. De esta manera, NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE; NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE tienen todos los mismos máximos de longitud de onda de emisión.

En resumen, la tabla 1 divulga compuestos de acridinio con componentes estructurales específicos tales como la presencia de un grupo -OR en el cual R puede ser alquilo, alqueno, alquino, arilo, y aralquilo que contienen hasta 20 heteroátomos en C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio, que contribuyen a emisión de luz incrementada. Un compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico tiene un rendimiento de luz relativo mayor que el de NSP-DMAE que se usa como compuesto de referencia en este estudio y al cual se asigna un valor de 1.

Los compuestos de acridinio se usan extensamente en inmunoensayos y ensayos de ácido nucleico. Los análisis que se miden normalmente en tales ensayos con frecuencia son sustancias de alguna relevancia clínica y pueden cubrir un rango amplio de moléculas desde grandes macromoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, virus y bacterias, y similares, hasta pequeñas moléculas tales como etanol, vitaminas, esteroides, hormonas, medicamentos terapéuticos y similares.

Un inmunoensayo de 'sándwich' incluye de modo típico la detección de una molécula grande, denominada también analito macromolecular, usando dos moléculas enlazantes, tales como anticuerpos. Se inmoviliza o se adhiere un anticuerpo a una fase sólida, tal como una partícula, pastilla, membrana, placa de microtitulación o cualquier otra superficie sólida.

La metodología para acoplar moléculas enlazantes, tales como anticuerpos, a fases sólidas es bien conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo puede acoplarse de manera covalente a una partícula que contiene aminas en su superficie usando una molécula de reticulación, tal como un glutaraldehído. El acoplamiento también puede ser no covalente y puede incluir adsorción simple de la molécula de enlace a la superficie de la fase sólida, tal como pastillas de poliestireno y placa de microtitulación. El segundo anticuerpo con frecuencia se acopla

covalentemente con una molécula quimioluminiscente o fluorescente, con frecuencia denominada etiqueta. El etiquetado de moléculas de enlace, tales como anticuerpos y otras proteínas de enlace, también se conocen bien en el estado de la técnica y comúnmente se llaman reacciones de conjugación y el anticuerpo etiquetado se llama con frecuencia un conjugado. Normalmente, un residuo reactivo de amina en la etiqueta reacciona con una amina sobre el anticuerpo para formar una unión amida. Otras uniones, tales como tioéter, éster, carbamato y similares entre el anticuerpo y la etiqueta también se conocen bien en el estado de la técnica.

En el ensayo de sándwich, los dos anticuerpos se enlazan a diferentes regiones del analito macromolecular. El analito macromolecular pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus, receptores o polímeros sintéticos. Las moléculas de enlazamiento pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas de enlazamiento o polímeros sintéticos de enlazamiento. Por ejemplo, la proteína de enlazamiento de folato ("FBP") se enlaza al analito folato. Las moléculas de enlazamiento sintéticas que puede enlazarse a una variedad de analitos también han sido divulgadas por Mossbach et al. *Biotechnology* vol. 14, pp. 163-170 (1996).

Cuando la fase sólida con el anticuerpo inmovilizado se mezcla con una muestra que contiene el analito, se forma un complejo de enlazamiento entre el analito y los dos anticuerpos. Este tipo de ensayo se llama con frecuencia un ensayo heterogéneo debido a que se involucra una fase sólida. La señal quimioluminiscente o fluorescente asociada con el complejo de enlazamiento puede medirse luego y puede inferirse la presencia o ausencia del analito. Usualmente, el complejo de enlazamiento se separa del resto de los componentes de reacción de enlazamiento, tal como el exceso, el anticuerpo etiquetado antes de generación de señal. Por ejemplo, si el complejo de enlazamiento está asociado con una pastilla magnética, puede usarse un imán para separar el complejo de enlazamiento asociado con la pastilla del grueso de la solución.

Usando una serie de 'estándares', es decir concentraciones conocidas del analito, puede generarse una curva de 'dosis-respuesta' usando los dos anticuerpos. De esta manera, la curva de dosis-respuesta se correlaciona con una cantidad determinada de señal medida con una concentración específica de analito. En un ensayo de sándwich, a medida que se incrementa la concentración del analito, también se incrementa la cantidad de señal. La concentración del analito en una muestra desconocida puede luego calcularse comparando la señal generada por una muestra desconocida que contiene el analito macromolecular con la curva de dosis-respuesta.

Del mismo modo, los dos componentes de enlazamiento también pueden ser ácidos nucleicos que se enlazan o hibridan a diferentes regiones de un analito de ácido nucleico. La concentración del analito de ácido nucleico puede deducirse luego de una manera similar.

En los ensayos descritos arriba, a medida que la concentración del analito disminuye, la cantidad de señal también disminuye. A concentraciones de analito extremadamente bajas, se vuelve cada vez más difícil la capacidad de distinguir la señal específica de la molécula de etiqueta asociada con el complejo de enlazamiento del 'ruido' que se genera del enlazamiento no específico del anticuerpo etiquetado con la fase sólida.

El enlazamiento no específico es un fenómeno común y se mide en los ensayos como la señal en ausencia de cualquier analito y con frecuencia surge cuando el anticuerpo etiquetado se enlaza a la fase sólida de una manera aleatoria. Para poder medir la señal específica que surge de una concentración pequeña del analito, esta señal específica debe ser mayor en magnitud que la señal asociada con el enlazamiento no específico. De esta manera, incrementar la sensibilidad de un ensayo para un analito por la cual se entiende la habilidad para detectar y cuantificar cantidades muy bajas de un analito, tiene que incrementarse la señal específica y tiene que reducirse el enlazamiento no específico.

Una estrategia común para mejorar la sensibilidad de ensayos que emplean etiquetas quimioluminiscentes o fluorescentes es etiquetar una de las moléculas de enlazamiento con etiquetas múltiples en un intento por incrementar la fuerza de la señal específica. Sin embargo, esta estrategia tiene sus propias desventajas tales como un incremento en el enlazamiento no específico el cual invalida la ganancia de señal específica y además el etiquetado múltiple de los anticuerpos y ácidos nucleicos con frecuencia puede tener efectos perjudiciales sobre sus propiedades tales como su habilidad para enlazar el analito, así como su solubilidad. Por ejemplo, el etiquetado múltiple de anticuerpos con etiquetas hidrófugas quimioluminiscentes o fluorescentes puede causar la conglomeración o precipitación del anticuerpo.

Un enfoque más atractivo para mejorar la sensibilidad de ensayo es incrementar la propiedad quimioluminiscente o fluorescente de la etiqueta de interés. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es el mejoramiento de la sensibilidad de ensayo mediante el uso de compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico. Otro objetivo de esta invención es la divulgación de compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico que no solamente tengan producción de luz incrementada sino que sean también extremadamente hidrosolubles y, por consiguiente, tengan propiedades de enlazamiento no específicas. Tales etiquetas quimioluminiscentes tienen poca probabilidad de causar aglomeración o precipitación de proteínas y ácidos nucleicos al compararse con etiquetas hidrófugas y ofrecen una ventaja distintiva sobre las etiquetas convencionales.

Finalmente, a pesar que las estrategias de etiquetado múltiple para amplificación de señal usando etiquetas hidrófugas son de utilidad limitada, las presentes etiquetas pueden ser más apropiadas para una estrategia de este tipo. Por ejemplo, una molécula de enlazamiento, tal como un anticuerpo, puede unirse a otra molécula que puede servir como el 'soporte' de la etiqueta. En tal caso, la molécula enlazante puede considerarse 'etiquetada indirectamente' a través del soporte.

La segunda molécula o portador pueden ser una proteína o moléculas sintéticas tales como polímeros como poliaminoácidos, o dendrímeros que pueden etiquetarse con el compuesto quimioluminiscente. Empleando una estrategia así, las propiedades de la molécula enlazante se segregan y preservan para las reacciones de enlazamiento, mientras que la molécula portadora se vuelve una portadora de señal para incrementos grandes en la señal.

En el arte previo se conoce bien la conjugación de proteínas a otras proteínas y polímeros. Un ejemplo simple de tal estrategia sería etiquetar una proteína tal como albúmina de suero bovino (BSA por bovine serum albumin) con múltiples etiquetas quimioluminiscentes y después acoplar o conjugar de manera covalente el BSA etiquetado a un anticuerpo para un analito. El conjugado de BSA- anticuerpo etiquetado resultante, cuando se usa en el ensayo, puede generar probablemente cantidades mayores de señal en virtud de las múltiples etiquetas quimioluminiscentes en el BSA.

Otro tipo de moléculas que pueden ser particularmente adecuadas como soportes son dendrímeros disponibles comercialmente en Dendritech Inc. Estos dendrímeros, en virtud de su tamaño pequeño en relación con el número de grupos funcionales que tienen para el acoplamiento de etiquetas, pueden ser soportes ideales de etiquetas quimioluminiscentes y fluorescentes.

El acoplamiento de los soportes etiquetados a la molécula de enlazamiento o al anticuerpo puede realizarse de modo no covalente. Por ejemplo, si la molécula del anticuerpo se etiqueta con biotina, entonces la estreptavidina con una etiqueta quimioluminiscente puede enlazarse al anticuerpo biotinilado de afinidad fuerte de estreptavidina por biotina. El conjugado resultante de anticuerpo-estreptavidina puede usarse luego en un ensayo para un analito.

Otra clase de inmunoensayos para analito de molécula pequeña, tales como esteroides, vitaminas, hormonas, medicamentos terapéuticos o pequeños péptidos, emplea un formato de ensayo que se denomina comúnmente como ensayo competitivo. Normalmente, en un ensayo competitivo se hace un conjugado del analito de interés y una etiqueta quimioluminiscente o fluorescente mediante enlazamiento covalente de las dos moléculas. El analito de molécula pequeña puede usarse como tal no puede alterarse su estructura antes de conjugarse a la etiqueta.

El analito con la estructura modificada se llama un análogo. Con frecuencia es necesario usar un análogo estructural del analito para permitir la química para enlazamiento de la etiqueta con el analito. Un análogo estructural de un analito se usa a veces para atenuar o promover su enlazamiento a una molécula enlazante tal como un anticuerpo. Tales técnicas son bien conocidas en el arte previo. El anticuerpo o una proteína de enlazamiento con el analito de interés frecuentemente se inmovilizan sobre una fase sólida, ya sea directamente o a través de una interacción de enlazamiento secundario tal como un sistema de biotina-avidina descrito antes.

La concentración del analito en una muestra puede determinarse en un ensayo competitivo permitiendo que la muestra que contiene el analito y el conjugado de analito-etiqueta compitan por una cantidad limitada de molécula de enlazamiento inmovilizada en la fase sólida. A medida que la concentración del analito en una muestra se incrementa, disminuye la cantidad de conjugado de analito-etiqueta capturada por la molécula de enlazamiento sobre la fase sólida. Empleando una serie de 'estándares', es decir concentraciones conocidas del analito, puede construirse una curva de dosis-respuesta donde la señal del conjugado analito-etiqueta capturado por la molécula de enlazamiento sobre la fase sólida se correlacione de manera inversa con la concentración del analito. Una vez se haya concebido de esta manera una curva de dosis-respuesta, la concentración del mismo analito en una muestra desconocida puede determinarse comparando la señal obtenida de la muestra desconocida con la señal en la curva de dosis-respuesta.

Otro formato del ensayo competitivo para analito de molécula pequeña incluye el uso de una fase sólida que se inmoviliza con el analito de interés o un análogo de analito y anticuerpo o una proteína de enlazamiento específica para el analito que se conjuga con una etiqueta quimioluminiscente o fluorescente. En este formato, el conjugado de anticuerpo-etiqueta es capturado sobre la fase sólida mediante interacción de enlazamiento con el analito o el análogo de analito sobre la fase sólida.

El analito de interés presente en una muestra enlaza "de manera competitiva" con el conjugado anticuerpo-etiqueta y de esta manera inhibe o reemplaza la interacción del conjugado anticuerpo-etiqueta con la fase sólida. De este modo, la cantidad de señal generada a partir del conjugado anticuerpo-etiqueta capturado sobre la fase sólida se correlaciona con la cantidad del analito en la muestra.

5 Los compuestos de acridinio de alto rendimiento cuántico de la presente invención, al usarse en ensayos competitivos para analito de molécula pequeña, ofrecen la ventaja de producir señales superiores en todas las concentraciones de analito, facilitando de esta manera la medición de un rango más amplio de concentración de analito. De esta manera, a una concentración de analito alta, cuando la cantidad del conjugado etiqueta-analito capturado por la molécula de enlazamiento sobre la fase sólida se vuelve muy pequeña, todavía es posible medir una señal discernible a partir de un conjugado de un compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico y el analito.

10 Los compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención son útiles para la detección de analitos macromoleculares en ensayos heterogéneos con sensibilidad mejorada que comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar un conjugado de una molécula de enlazamiento específica para un analito macromolecular con un compuesto de acridinio hidrofílico, de alto rendimiento cuántico, que contiene grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;

15 b) proporcionar una fase sólida inmovilizada con una segunda molécula de enlazamiento, específica para dicho analito macromolecular;

c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que supuestamente contiene el analito para formar un complejo de enlazamiento;

d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;

20 e) provocar la quimioluminiscencia del complejo de enlazamiento separado adicionando reactivos que provocan quimioluminiscencia;

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

g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva estándar de dosis-respuesta que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

25 Los compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención también son útiles para la detección de analitos de molécula pequeña en ensayos heterogéneos con sensibilidad mejorada, que comprende los siguientes pasos:

30 (a) proporcionar un conjugado de un analito con un compuesto quimioluminiscente hidrofílico de acridinio con alto rendimiento cuántico que contienen grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;

(b) proporcionar una fase sólida inmovilizada con una molécula de enlazamiento específica para el analito;

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

(d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;

35 (e) provocar la luminiscencia del complejo de enlazamiento separado adicionando reactivos que disparan la quimioluminiscencia;

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

40 (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva estándar de dosis-respuesta que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Los compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención también son útiles para la detección de analitos de molécula pequeña en ensayos heterogéneos con sensibilidad mejorada, que comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar una fase sólida inmovilizada con un analito o un análogo de analito;

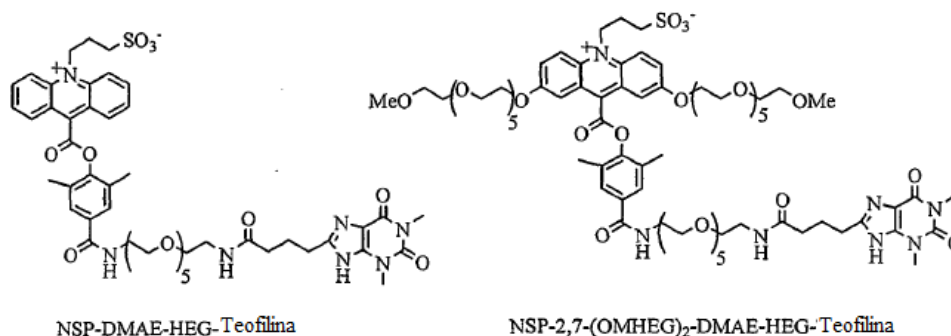
- b) proporcionar un conjugado de una molécula de enlazamiento específica para el analito con un compuesto quimioluminiscente, hidrofílico con alto rendimiento cuántico, que contienen grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;
- 5 c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra que supuestamente contiene el analito para formar un complejo de enlazamiento;
- (d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;
- (e) provocar la quimioluminiscencia del complejo de enlazamiento separado adicionando reactivos que disparan la quimioluminiscencia;
- (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- 10 (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva estándar de dosis-respuesta que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Los reactivos que provocan la quimioluminiscencia pueden ser peróxido de hidrógeno o sales de peróxido.

- 15 La utilidad de los compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención es evidente en inmunoensayos heterogéneos para dos analitos. Por ejemplo, teofilina es un analito de molécula pequeña y el ensayo de teofilina sirve como un ejemplo de los ensayos competitivos de la presente invención. La hormona estimulante de la tiroides (TSH por thyroid stimulating hormone) es un analito macromolecular que comúnmente se mide mediante inmunoensayos. El ensayo de TSH se usa como un ejemplo de los ensayos sándwich.

- 20 Para el ensayo de teofilina, se comparó el desempeño del ensayo de dos conjugados de teofilina-acridinio, el conjugado NSP-DMAE-HEG-teofilina descrito en la patente estadounidense 6,664,043 y el conjugado hidrofílico con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-teofilina descrito en el ejemplo 15.

El ensayo se describe en el ejemplo 18 y las estructuras de los dos conjugados son como sigue:



- 25 El ensayo de Bayer Diagnostics ACS:180® Teofilina es uno de una serie de inmunoensayos comercializados en el mercado, fabricados por Bayer Diagnostics para aplicación sobre la ACS:180® (sistema de inmunoensayo quimioluminiscente automatizado).

- 30 El ensayo es un inmunoensayo competitivo que usa un conjugado de compuesto de acridinio quimioluminiscente de teofilina, NSP-DMAE-HEG-teofilina, para medición de teofilina en una muestra. En el ensayo de teofilina se mezclaron dos reactivos con la muestra que contiene el analito teofilina para iniciar el ensayo. El primer reactivo de ensayo es un anticuerpo anti-teofilina inmovilizado sobre partículas para magnéticas (PMP) el cual enlaza tanto al analito, que es teofilina, y los conjugados de teofilina-éster de acridinio. El segundo reactivo de ensayo es el conjugado de teofilina-éster de acridinio.

- 35 Puesto que la fase sólida tiene una cantidad limitada del anticuerpo anti-teofilina, el analito teofilina en la muestra y el conjugado de teofilina-éster de acridinio compiten por enlazarse al anticuerpo sobre la fase sólida. Por lo tanto, la cantidad de analito en la muestra está inversamente correlacionada con la cantidad del conjugado de teofilina-éster de acridinio que se enlazarán a la fase sólida en el ensayo.

El diagnóstico de Bayer ACS:180® realizó automáticamente los siguientes pasos para el ensayo de teofilina. Primero, se dosificaron 0.020 mL de cada una de las 14 muestras a una cubeta separada. Una cubeta es un contenedor ópticamente transparente o traslúcido que sostiene los reactivos de ensayo y en el cual tiene lugar el ensayo.

- 5 Las 14 muestras contenían cada una cantidades conocidas separadas de teofilina. Las cantidades de teofilina dadas como concentraciones en cada una de estas 14 muestras fueron 0, 1.40, 2.10, 2.80, 4.20, 5.60, 9.21, 15.6, 32.7, 68.3, 129, 288, 500, y 1000 micromolar (uM). Las cantidades de teofilina dadas como números de moléculas en cada una de las mismas 14 muestras fueron 0, 0.028, 0.042, 0.056, 0.084, 0.112, 0.184, 0.313, 0.655, 1.37, 2.59, 5.76, 10.0, y 2.00 picomoles (10^{-12} moles), respectivamente.
- 10 A continuación, el ACS:180® dosificó los dos reactivos de ensayo juntos a cada cubeta y los reactivos de ensayo se mezclaron con la muestra dentro de cada cubeta. El primero de los dos reactivos de ensayo fue 0.450 mL de fase sólida la cual contenía 8.7 picomoles de anticuerpo anti-teofilina sobre partículas para magnéticas separables magnéticamente. El segundo de los dos reactivos de ensayo fue 0.100 mL de conjugado de teofilina-éster de acridinio, el cual era 0.026 picomoles de compuesto de acridinio conjugado con teofilina.
- 15 El ensayo se realizó durante 7.5 minutos a 37 °C. El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® finalizó el ensayo separando magnéticamente la fase sólida de otro reactivo de ensayo, luego retirando el fluido de la cubeta y después lavando la fase sólida en la cubeta con agua. Se inició la quimioluminiscencia desde el compuesto de acridinio sobre la fase sólida con la subsiguiente emisión de luz, con las adiciones secuenciales de 0.30 mL de cada uno de los reactivos 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® y reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180®. El reactivo 1 era ácido nítrico de 0.1 M n y peróxido de hidrógeno al 0.5 %. El reactivo 2 era hidróxido de sodio de 0.25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0.05 %.
- 20

El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® midió la quimioluminiscencia en cada cubeta y cada cubeta correspondía a una muestra individual ensayada como unidades de luz relativas (RLUs). Se calculó normalización a porcentaje de quimioluminiscencia medida en ausencia de analito para comparación de la quimioluminiscencia relativa dada para cada cantidad de analito para los dos conjugados de teofilina-éster de acridinio. Los resultados de ensayo fueron tabulados en la tabla 2 abajo y en forma gráfica en la figura 1.

25

El espaciado entre valores de quimioluminiscencia para cantidades sucesivas de analito es un indicador de la sensibilidad del ensayo, donde un espaciado mayor equivale a una sensibilidad mayor. Esto es bien conocido por los profesionales en el campo. En el actual ensayo, relativo a la etiqueta de rendimiento cuántico más bajo NSP-DMAE-HEG, el compuesto de acridinio con rendimiento cuántico alto NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG generó mayor diferenciación entre muestras que contenían cantidades pequeñas de teofilina y no teofilina.

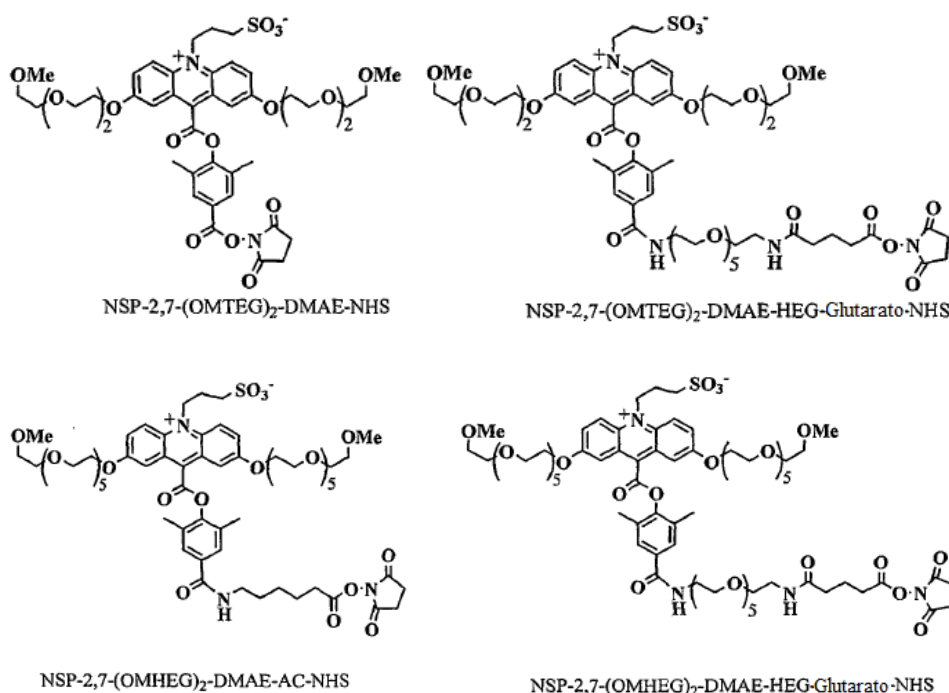
30

Tabla 2. Ensayo de teofilina

Teofilina [mM]	Etiqueta compuesto de acridinio			
	NSP-DMAE-HEG		NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE-HEG	
	Quimioluminiscencia			
	(RLU)	(%)	(RLU)	(%)
0	1846515	100	2493756	100
1.40	1774943	96.1	2237897	89.7
2.10	1806959	97.9	2115736	84.8
2.80	1790450	97.0	1959285	78.6
4.20	1698641	92.0	1770358	71.0
5.60	1609515	87.2	1647086	66.0
9.21	1391668	75.4	1523003	61.1
15.6	1119475	60.6	1056765	42.4
32.7	808738	43.8	682131	27.4
68.3	525335	28.5	395396	15.9
129	314966	17.1	217917	8.74
288	158037	8.56	107430	4.31
500	100707	5.45	61806	2.48
1000	51284	2.78	32293	1.29

35 La pendiente de la línea generada para cada indicador usando el ensayo de teofilina Bayer Diagnostics ACS:180® es un indicador de sensibilidad. En el presente ensayo, la etiqueta de compuesto de acridinio con rendimiento cuántico alto NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG dio una pendiente incrementada relativa a la etiqueta de compuesto de acridinio NSP-DMAE-HEG en todas las concentraciones del analito teofilina.

- La sensibilidad de ensayo con frecuencia se define como la cantidad mínima mensurable de analito. La cantidad mínima mensurable de analito en el actual inmunoensayo competitivo es la cantidad de analito correspondiente a la mayor quimioluminiscencia medida que es menos que la diferencia de la quimioluminiscencia medida en ausencia de analito menos dos desviaciones estándar de quimioluminiscencia medida en ausencia de analito. Por ejemplo, en
- 5 inmunoensayos competitivos donde se dan las siguientes representaciones:
- n = número entero positivo mayor a 0.
- x = la cantidad medida de analito correspondiente a y , donde $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$ son sucesivamente cantidades mayores medidas de analito.
- 10 y = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito, representado por x , donde $y_0 > y_1 > y_2 > y_3 > \dots > y_n$ son sucesivamente valores menores de quimioluminiscencia medida para $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$, respectivamente.
- x_0 = una cantidad cero de analito por la cantidad de analito igual a cero.
- y_0 = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito igual a cero, las cual es x_0 .
- s = una desviación estándar de y_0 .
- 15 Luego la sensibilidad = x_n para $y_n < y_0 - 2s$, cuando n = el número entero positivo, menor, no cero.
- Usando esta definición, la sensibilidad del ensayo de teofilina usando el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG era de 1.4 μ M. La sensibilidad del ensayo usando el compuesto de acridinio NSP-DMAEHEG era de 4.2 μ M. El cociente de 4.2 μ M y 1.4 μ M es 3.
- 20 El compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG incrementó de esta manera la sensibilidad del ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® en tres veces al compararse con el compuesto de acridinio NSPDMAE-HEG.
- El ejemplo establece claramente que cuando se usan como etiquetas de inmunoensayo quimioluminiscente, la emisión incrementada de luz quimioluminiscente a partir de compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico mejora la sensibilidad de los inmunoensayos competitivos.
- 25 Para el ensayo de TSH, la realización del ensayo del éster de acridinio NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS descrito en la patente estadounidense No. 6,664,043 fue comparada con los compuestos hidrofílicos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención, la cual se describe en el ejemplo 19.
- 30 Se hizo una comparación de los compuestos NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-NHS, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAEHEG-glutarato-NHS, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS y NSP-2,7-(OMHEG)₂-HEG-glutarato-NHS cuyas estructuras se muestran abajo y cuya síntesis se describen en el ejemplo 9 (compuestos que contienen HEG)



y en el ejemplo 10 (compuestos que contienen TEG), respectivamente.

- 5 El ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® es uno de una serie de inmunoensayos comercializados en el mercado, fabricados por Bayer Diagnostics para aplicación en ACS:180®. El ensayo de TSH3 es un inmunoensayo de sándwich que usa un conjugado de compuesto de acridinio quimioluminiscente de un anticuerpo anti-TSH, para medición del analito TSH (hormona estimulante de tiroides) en una muestra. En este ensayo hay dos anticuerpos, uno de los cuales está etiquetado con éster de acridinio mientras que el otro está inmovilizado sobre partículas paramagnéticas (PMP).
- 10 En el ensayo, los dos anticuerpos se mezclan con la muestra que contiene el analito TSH para iniciar el ensayo. Esto da lugar al enlazamiento de ambos anticuerpos al analito TSH. A medida que se incrementa la concentración del analito TSH, una mayor cantidad del anticuerpo etiquetado con éster de acridinio se enlaza a la fase sólida. De esta manera, la concentración de analito está directamente correlacionada con la cantidad de señal quimioluminiscente observada en el ensayo.
- 15 El ACS:180® realizó automáticamente los siguientes pasos para el actual ensayo de TSH3. Primero se dosificaron 200 µL de cada una de las 12 muestras a cubetas separadas. Las 12 muestras contenían cada una cantidad desconocida separadas de TSH. Las cantidades de TSH dadas como concentraciones en cada una de estas 12 muestras eran de 0, 0.002, 0.004, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.10, 1.0, 10 y 100 mIU/L. A continuación, el ACS:180® dosificó to reactivo de ensayo juntos a cada cubeta y se mezclaron los reactivo de ensayo con la muestra dentro de cada cubeta. El primero de los dos reactivo de ensayo era 0.100 mL de una solución que contenía 0.22 picomoles de anticuerpo anti-TSH conjugado con compuestos de acridinio.
- 20

25 Tanto los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como NSP-DMAE-HEG-glutarato se ensayaron por separado como etiquetas conjugadas con el anticuerpo anti-TSH. Los conjugados se prepararon y purificaron usando el procedimiento descrito en el ejemplo 16. El número de etiquetas por molécula de anticuerpo para NSP-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato fueron de 8, 8, 7, 10 y 8 respectivamente.

De esta manera, todos los conjugados contenían un número aproximadamente equivalente de etiquetas. Por lo tanto, cualquier diferencia en la realización del ensayo puede correlacionarse directamente con las propiedades de etiqueta compuesto de acridinio.

- 30 La reacción de enlazamiento se realizó durante 2.5 minutos a 37 °C el segundo de los dos reactivo de ensayo fue 0.225 mL de fase sólida que era el otro anticuerpo anti-TSH conjugado con partículas paramagnéticas. El ensayo se realizó luego durante 5.0 minutos a 37 °C. El ensayo se finalizó separando magnéticamente la fase sólida de otros reactivo de ensayo, retirando fluido de la cubeta y lavando la fase sólida en la cubeta con agua.

La quimioluminiscencia del compuesto de acridinio sobre la fase sólida se inició con la subsiguiente emisión de luz con adiciones secuenciales de 0.30 mL de cada uno de los reactivos 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® y del reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180®. La quimioluminiscencia en cada cubeta se midió luego como unidades de luz relativass (RLUs) y cada cubeta correspondía a una muestra individual ensayada. La cantidad de analito se correlaciona con el número de RLUs medida por el Bayer Diagnostics ACS:180®. Cuanto mayor sea la cantidad del analito TSH en una muestra, mayor es la cantidad de RLUs que se miden.

En el ensayo actual, las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron quimioluminiscencia incrementada para todas las cantidades de analito relativa a la etiqueta compuesto de acridinio NSP-DMAEHEG-glutarato. Los resultados del ensayo fueron tabulados en la tabla 3-5 y fueron dibujados gráficamente en la figura 2.

Tabla 3. Ensayo de TSH usando compuestos de acridinio como etiquetas

TSH [mI.U./L]	NSP-DMAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE-AC	NSP-2,7-(OMHEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato
Quimioluminiscencia (RLU)					
0	12504	13492	20114	11871	12343
0.002	12831	14514	20185	12567	13973
0.004	13127	15567	22650	13084	14152
0.01	13680	17442	24519	13418	15493
0.015	14161	21150	25387	15268	17577
0.02	15106	21628	27810	16831	19542
0.025	15558	22920	29258	18547	21139
0.03	15750	23840	30872	20170	22404
0.1	20998	50110	66057	46578	58692
1	62108	306958	352706	286667	283798
10	553358	1916772	3147811	1867356	1999399
100	4350612	16861210	21937230	15763393	17584945

Ruido es la porción de quimioluminiscencia en un inmunoensayo sándwich de una muestra que se debe al enlazamiento no específico del anticuerpo etiquetado con la fase sólida y que se mide en muestras que no contienen analito. Señal es la porción de la quimioluminiscencia debido al enlazamiento específico del anticuerpo etiquetado a la fase sólida cuando el analito está presente en la muestra. La quimioluminiscencia total medida en el actual ensayo de TSH para muestras que sí contienen analito es la suma de señal más ruido, donde la señal se calcula como la diferencia de la quimioluminiscencia total menos el ruido.

Para el ensayo actual, sensibilidad se define como la cantidad mínima mensurable de analito que corresponde a la luminiscencia mínima medida que es mayor que la suma del ruido más dos desviaciones estándar del ruido. En el actual ensayo se determinaron señal y ruido para cada uno de los conjugados ensayados de anticuerpo-éster de acridinio. La proporción de la señal medida por el ruido en un inmunoensayo de sándwich para una cantidad particular de analito es un indicador de sensibilidad de inmunoensayo de sándwich. Cuanto mayor sea la proporción de señal a ruido para una cantidad particular de analito en un ensayo de sándwich, tanto más distante es la señal correspondiente al ruido y mejor capacidad tiene el ensayo para medir la diferencia entre la señal y el ruido.

En el ensayo actual, las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron proporciones incrementadas de señal a ruido para el analito en relación con la etiqueta NSP-DMAE-HEG-glutarato para todas las concentraciones de analito. Las mayores proporciones de señal a ruido generadas por las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico tanto para las cantidades altas como particularmente las cantidades bajas de TSH, con relación a NSP-DMAE-HEG-glutarato, indican un incremento de sensibilidad para el ensayo de TSH.

Cuando los resultados de la tabla 3 se dibujan en forma gráfica en la figura 2, entonces la pendiente de la línea generada para cada conjugado de anticuerpo-éster de acridinio también es un indicador de sensibilidad. Cuanto mayor sea la pendiente de la línea, más distante es la señal para una cantidad particular de analito del ruido y el ensayo tiene mejor capacidad de medir la diferencia entre la señal y el ruido. En el ensayo actual, las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron pendientes incrementadas relativas a NSP-DMAE-HEG-glutarato, como es evidente a partir de la figura 2. Las pendientes de las líneas en la figura 2 fueron tabuladas en la tabla 4.

Tabla 4. Pendientes del ensayo de TSH usando compuestos de acridinio como etiquetas

		NSP-MAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OM-HEG) ₂ -DMAE-AC	NSP-2,7-(OM-HEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato
Baja pendiente de TSH (RLU/(ml.U./L))	desde 0 a 0.03 ml.U./L TSH	1.1E+05	3.4E+05	3.6E+05	2.8E+05	3.4E+05
Alta pendiente de TSH (RLU./(ml.U./L))	desde 1 a 100 ml.U./L TSH	4.3E+04	1.7E+05	2.2E+05	1.6E+05	1.7E+05

5 Sensibilidad de ensayo se define con frecuencia como la cantidad mínima mensurable de analito. En el actual inmunoensayo de sándwich, la cantidad mínima mensurable distinta de cero de analito es la cantidad de analito correspondiente a la quimioluminiscencia mínima medida que es mayor que la suma del ruido más dos desviaciones estándar del ruido. Por ejemplo, en inmunoensayos de sándwich donde se dan las siguientes representaciones:

n = número entero positivo mayor a 0.

x = cantidad medida de analito correspondiente a y, donde $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$ son sucesivamente cantidades medidas más grandes de analito.

10 y = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito, representada por x, donde $y_0 < y_1 < y_2 < y_3 < \dots < y_n$ son valores sucesivamente mayores de luminiscencia, medidos para $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$, respectivamente.

x_0 = una cantidad cero de analito o la cantidad de analito igual a cero.

y_0 = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito igual a cero, la cual es x_0 .

15 s = una desviación estándar de y_0 .

Entonces, la sensibilidad = x_n para $y_n > y_0 + 2s$, cuando n = el número entero menor positivo, no cero.

20 La sensibilidad de ensayo en el actual ensayo usando etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico se incrementó tal como se muestra en la tabla 5 con los números más bajos que indican un ensayo más sensible. Por ejemplo, usando la etiqueta hidrofílica, con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato en el ensayo se proporciona una sensibilidad de ensayo que es >7-veces más sensible (0.015/0.002) si se compara con la etiqueta NSP-DMAE-HEG-glutarato. El ejemplo demuestra claramente que al usarse como etiquetas, los compuestos de acridinio hidrofílicos con alto rendimiento cuántico incrementan la sensibilidad de inmunoensayos de sándwich.

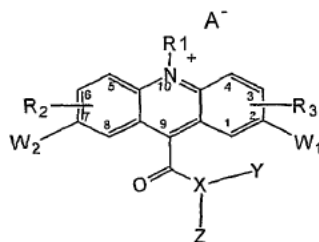
Tabla 5. Sensibilidad de ensayo de TSH usando compuestos de acridinio como etiquetas

	NSP-DMAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE	NSP-2,7-(OMTEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato	NSP-2,7-(OM-HEG) ₂ -DMAE-AC	NSP-2,7-(OM-HEG) ₂ -DMAE-HEG-glutarato
TSH [ml.U./L]	0.015	0.004	0.004	0.010	0.002

25 La sensibilidad incrementada en el ensayo de teofilina y el ensayo de TSH usando los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico de la presente invención ilustra, en general, la utilidad de estos compuestos para incrementar sensibilidad de ensayo de una variedad de ensayos. Existen numerosos métodos para diseñar inmunoensayos y ensayos de ácidos nucleicos que son bien conocidos en la técnica. Independientemente del diseño del ensayo, si un ensayo para un analito depende de la generación de una señal quimioluminiscente para medición de la concentración de aquel analito, entonces los compuestos de acridinio de la presente invención permitirán una medición más sensible de concentración de aquel analito, gracias a su alto rendimiento cuántico y su naturaleza hidrofílica.

30

Los compuestos quimioluminiscentes de acridinio, adecuados para usarse en la presente invención, tienen la siguiente estructura:



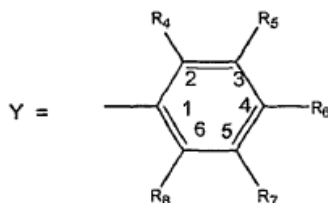
donde,

- 5 R₁ se selecciona de una alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; preferiblemente un metilo, un sulfopropilo o un grupo sulfobutilo;

R₂ y R₃ pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de grupos que comprenden hidrógeno, haluros o R, donde R se selecciona de una alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos en posiciones distintas de C-2 y C-7;

- 10 X es oxígeno o nitrógeno;

cuando X es oxígeno, Z se omite e Y es un residuo arilo sustituido de la fórmula:



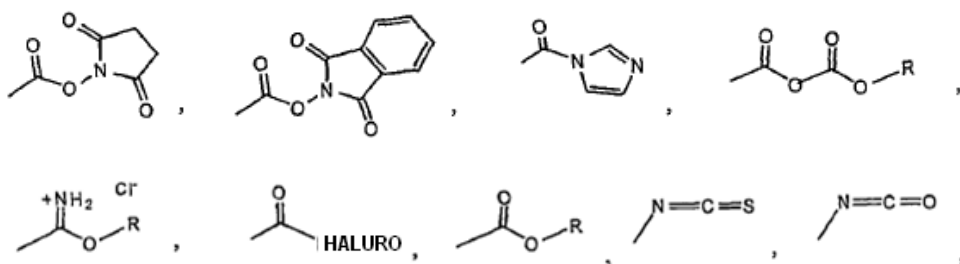
- 15 donde R₄ y R₈ pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo (-OR), alquiltiol (-SR), o grupos -NR_aR_b, donde R_a y R_b pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos, R₄ y R₈ son preferiblemente metilo;

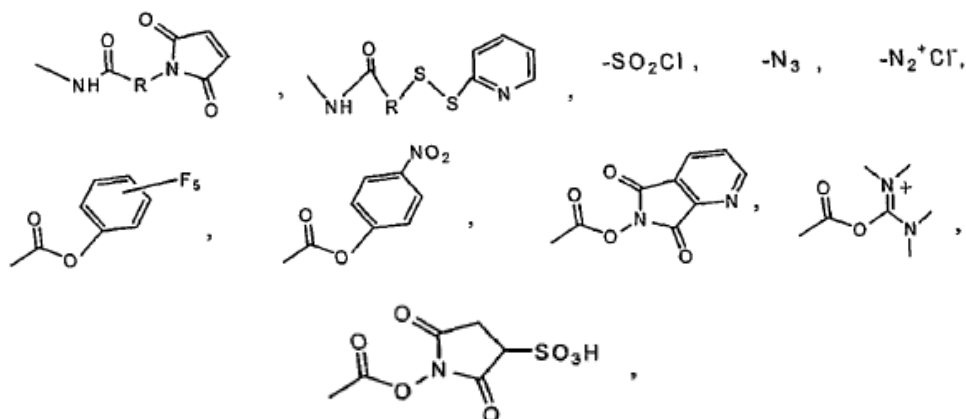
R₅ y R₇ son iguales o diferentes y son hidrógeno o igual que R tal como se definió antes;

R₆ = -R₉-R₁₀,

donde R₉ no se requiere y se selecciona de alquilo ramificado o de cadena recta, arilo sustituido o no sustituido o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos, y

- 20 R₁₀ es un grupo saliente o un grupo funcional electrofílico, acoplado con un grupo saliente seleccionado del grupo que consiste de:





un haluro o -COOH;

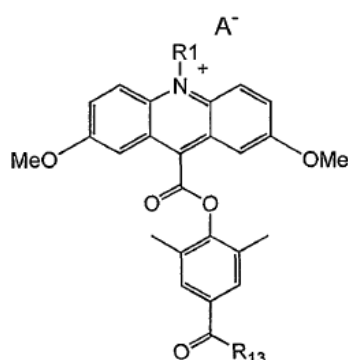
- 5 R₅ y R₆, y R₆ y R₇ son intercambiables.

De modo alternativo, cuando X es oxígeno, se omite Z e Y es -N=C(R₁₁R₁₂) donde R₁₁ y R₁₂ son iguales que R₆ tal como se definió antes y pueden ser iguales o diferentes;

cuando X es nitrógeno, Y es igual que R₆ tal como se definió antes, Z es -SO₂-Y', e Y' es un grupo alquilo sustituido por monosustituido o una cadena ramificada o recta;

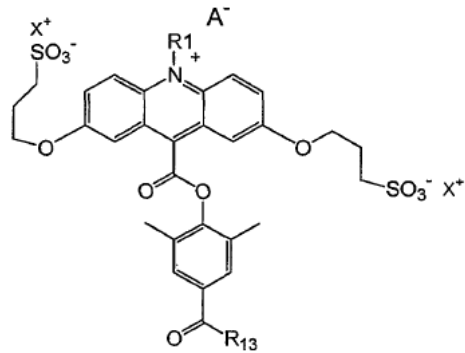
- 10 W₁ y W₂ son iguales o diferentes y son grupos donadores de electrones que comprenden -OR, -OH, -SR, -SH, -NH₂, -NR'R"; donde R, R' y R" pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan del grupo consistente de alquilo, alqueno, alquino, arilo, y aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; preferiblemente, W₁ y W₂ pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de -OMe, -OCH₂CH₂CH₂SO₃⁻ y -O(CH₂CH₂O)_n-CH₂-CH₂-OMe, en el cual Me representa un grupo metilo y n = 0-5.
- 15 A⁻ es un contraion que se introduce para emparejarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona 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:



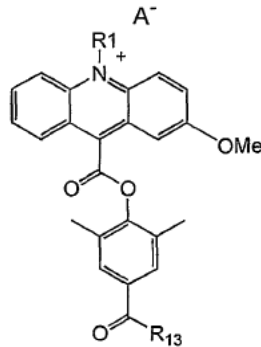
- 20 donde R₁₃ se selecciona de -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo, donde n = 0 a 5, o NH-R-NHR, y donde R₁, A⁻, y R son tal como se describieron previamente.

El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:



donde R_{13} , R_1 y A^- están definidos arriba, y X^+ es un contraion cargado positivamente para emparejarse con el residuo sulfonato y puede incluir H^+ , Na^+ , K^+ , o NH_4^+ .

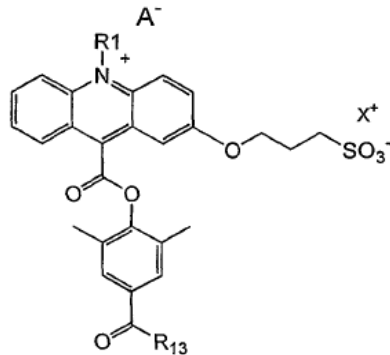
El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:



5

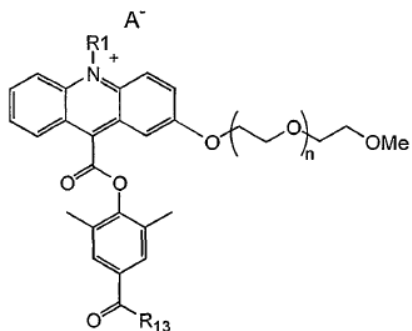
donde R_{13} , R_1 y A^- se han definido previamente.

El compuesto de acridinio puede ser también un éster de acridinio de la siguiente estructura:



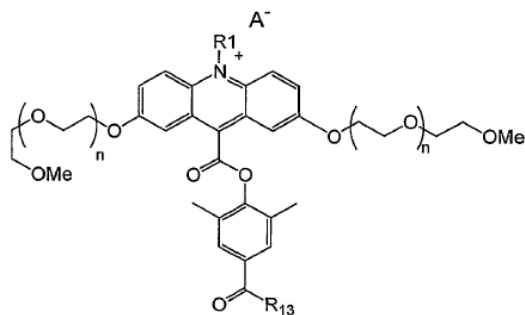
donde R_{13} , R_1 , A^- y X^+ se han definido previamente.

10 El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:



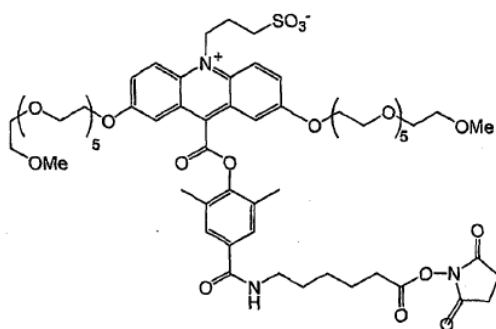
donde R_{13} , R_1 y A^- se han definido previamente, y $n = 0$ a 5 .

El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:

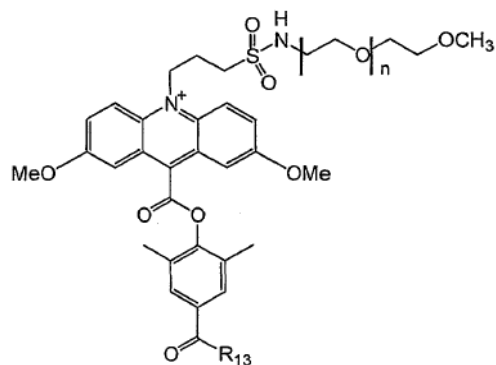


5 donde R_{13} , R_1 y A^- y n se han descrito previamente.

El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:

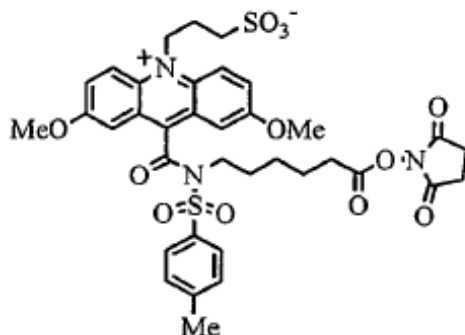


El compuesto de acridinio también puede ser un éster de acridinio de la siguiente estructura:

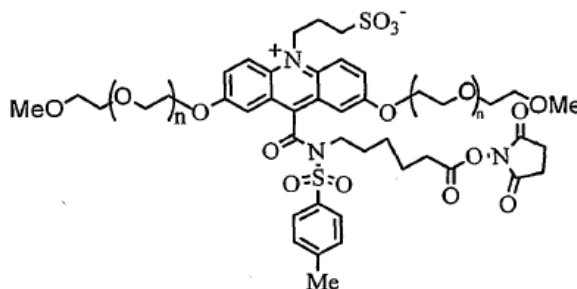


donde n y R₁₃ son tal como se describieron previamente.

El compuesto de acridinio también puede ser una sulfonamida de acridinio de la siguiente estructura:



El compuesto de acridinio también puede ser una sulfonamida de acridinio de la siguiente estructura:



5

donde n = 0 a 5.

Ejemplo 1

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-dimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE] y su éster de N-succinimidilo [NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE-NHS]

10 (a) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-benziloxycarbonilfenil 2,7-dimetoxi-acridinio

El ácido 2,7-dimetoxi acridin-9-carboxílico (Patente estadounidense No. 5,521,103) (0.5 g, 0.00177 mol) en piridina (~25 mL) fue tratado con cloruro de tosilo (0.674 g, 2 equivalentes). Después de agitar durante 10 minutos, se adicionó 4-benziloxycarbonil -2,6-dimetilfenol (0.453 g, 1 equivalente) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 1-2 horas, se adicionaron 2 equivalentes más de cloruro de toluenesulfonilo junto con 0.5 equivalentes del fenol y 10-15 mL de piridina. La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 48 horas. Luego se retiró el solvente a presión reducida y se disolvió el residuo en 50 mL de cloroformo. Esta solución se lavó con cloruro de amonio acuoso al 2% y bicarbonato de sodio acuoso al 2%. El extracto de cloroformo se secó luego sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó hasta quedar seco. El producto crudo se purificó mediante TLC preparativa usando acetato de etilo al 5% en cloroformo. Rendimiento = 0.663 g (72%). MALDI-TOF MS 524.3 obs. (521.6 calc.).

20

(b) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-dimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio

El éster de acridinio de arriba (20 mg, 38.4 umoles), 1,3-propano-sultona (0.28 g, 2.29 mmoles) y bicarbonato de sodio (32 mg, 384 umoles) se mezclaron en un matraz de fondo redondo de 10 mL y se calentó en un baño de aceite a 120 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 4 horas, se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (10 mL). La suspensión se sometió a ultrasonido hasta que el sólido gomoso se dispersó en el solvente para dar un precipitado de color rojizo-amarillo. Este precipitado se recogió mediante filtración y se enjuagó con acetato de etilo. Luego se disolvió en metanol y se filtró. El análisis por HPLC del filtrado usando una columna de C₁₈ (Phenomenex 4.6 mm x 30 cm) y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10 → 70% en agua (cada solvente con ácido trifluoroacético al 0.05%) mostró que el producto se eluyó a los 23 minutos con ~10% de material de partida eluyendo a los 31 minutos. La solución de metanol se evaporó hasta secarse para dar 42 mg de producto

25

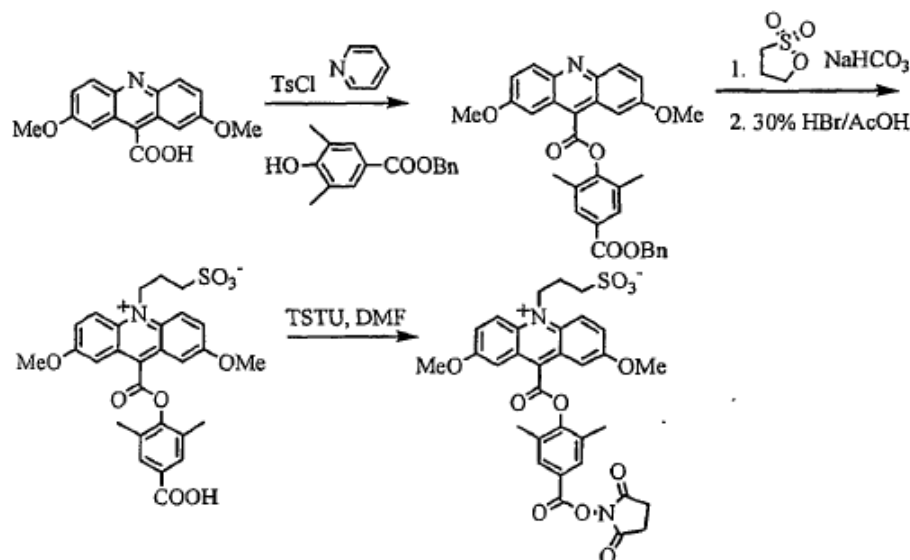
30

5 crudo que se agitó en 2 mL de HBr/AcOH al 30% a temperatura ambiente. Se adicionó éter (30 mL) después de 6 horas para precipitar el producto, el cual se recogió por filtración y se enjuagó con éter. El producto se disolvió en metanol (40 mL) y se analizó por HPLC tal como se describió antes. Se encontró que el producto eluía a los 15.9 minutos sin material de partida. La evaporación del filtrado de metanol proporcionó un sólido oleoso el cual se redisolvió en metanol (2-3 mL) y se diluyó con acetato de etilo (20 mL). La evaporación del solvente produjo un sólido amarillo. Rendimiento = 34 mg. Una porción de este material se disolvió en DMF (2-3 mL) y se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈ de 30 mm x 30 cm. La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse para dar un polvo amarillo claro. MALDI-TOF MS 555.7 obs. (553.6 calc.).

10 (c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarbonyfenil 2,7-dimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio

15 NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE crudo (34 mg, 61.5 umoles,) en DMF (3 mL) fue tratado con diisopropiletamina (13 uL, 1.2 equivalentes) y TSTU (18.5 mg, 1 equivalente). Después de agitar durante 15 minutos, El análisis de HPLC, tal como se describió en el paso (b) r, versión completa a un producto que eluía a los 17.8 minutos. Una porción de la mezcla de reacción de arriba fue purificada mediante HPLC preparativa tal como se describió en el paso (b). La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse para dar un polvo de color amarillo claro. MALDI-TOF MS 653.2 obs. (650.7 calc.).

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE y su éster NHS.



Ejemplo 2

20 Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxinhenil 2-metoxi-10-N sulfopropil-acridinio (NSP-2-OMe-DMAE)

(a) Síntesis de N-(4-metoxifenil)isatina

25 Una solución de isatina (2.5 g, 0.017 mol) en DMF anhidra (50 mL) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se trató con hidruro de sodio (0.5 g, 1.2 equivalentes). Se formó una solución púrpura que se agitó 0°C durante 30 minutos y luego se calentó a temperatura ambiente. A esta solución se adicionó 4-bromoanisol (2.13 mL, 1 equivalente) seguido de yoduro de cobre (6.46 g, 2 equivalentes). La reacción se calentó en un baño de aceite a 145°C durante 6-7 horas. Luego se enfrió la reacción a temperatura ambiente, se diluyó con un volumen igual de acetato de etilo y se filtró. El filtrado se evaporó hasta secarse. El producto crudo, que fue obtenido como un sólido marrón oscuro, se usó como tal para la siguiente reacción.

(b) Síntesis de ácido 2-metoxi-acridin-9-carboxílico

30 La isatina del paso (a) se sometió a reflujo con 150 mL de hidróxido de potasio al 10% bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 4 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se diluyó con agua (150 mL) y hielo. Esta solución se acidificó luego con HCl concentrado. Se separó un precipitado amarillo que se recogió por filtración y se enjuagó con agua fría y éter. Después de secar al aire, el precipitado se transfirió a un

matraz de fondo redondo con metanol y se evaporó hasta secarse. El residuo resultante se evaporó hasta secarse dos veces desde tolueno y se obtuvo un polvo amarillento marrón. Rendimiento = 1.15 g (26%).

(c) Síntesis de 9-carboxilato 2',6'-dimetil-4'-benziloxycarbonilfenil 2-metoxi-acridinio

5 El ácido 2-metoxi acridin-9-carboxílico (0.8 g, 0.0032 mol) en piridina (30 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se trató con cloruro de tosilato (1.32 g, 2 equivalentes) seguido por 4-benziloxycarbonil-2,6-dimetilfenol (0.81 g). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. Luego se retiró el solvente a presión reducida y el residuo fue suspendido en 100 mL de tolueno y se evaporó hasta secarse. El residuo resultante se disolvió en cloroformo (10 mL) y se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice usando acetato de etilo 5%, cloroformo 25% y hexanos 70%. Rendimiento = 0.84 g (54%), polvo amarillo claro.
10 MALDI-TOF MS 492.8 obs. (491.5 calc.).

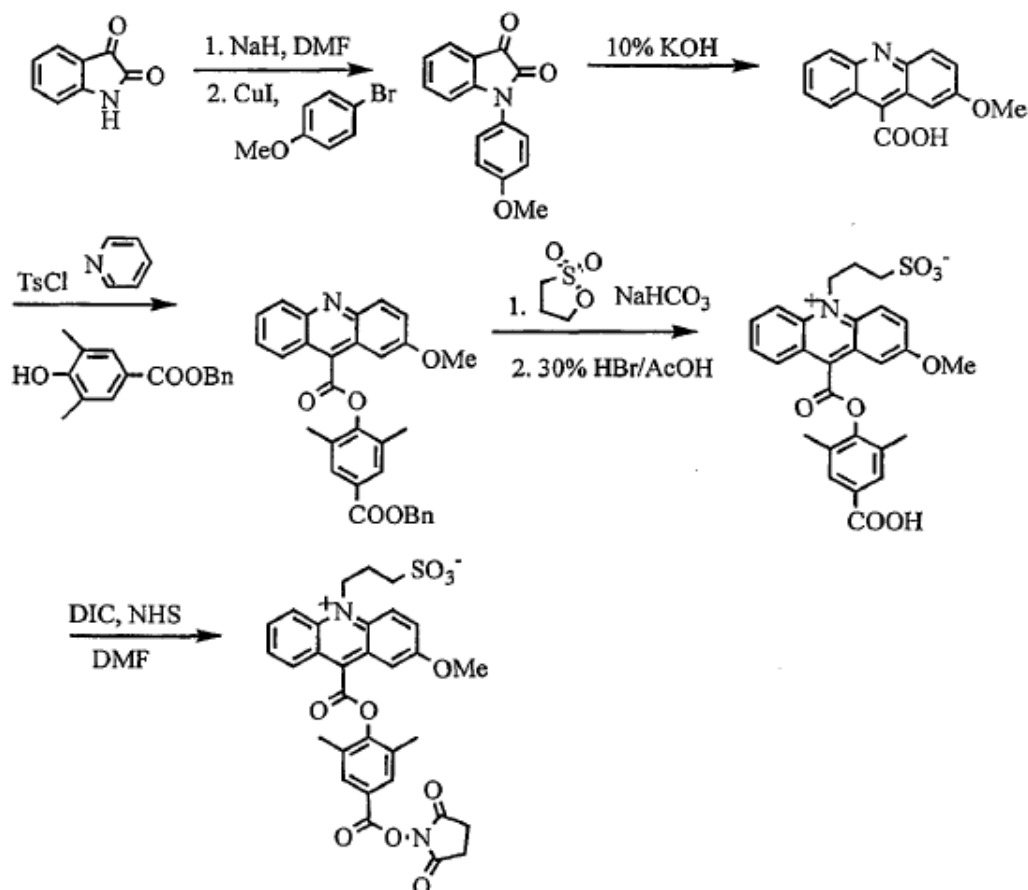
(d) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil- 2-metoxi-10-N-sulfopropil-acridinio

Este compuesto fue sintetizado a partir del éster de acridinio mediante el método descrito en el ejemplo 1, sección (b) para NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE.

(e) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarboxifenil 2-metoxi-10-N-sulfopropil-acridinio

15 NSP-2-OMe-DMAE (23 mg, 0.044 mmol) en DMF (1.5 mL) fue tratado con N-hidroxisuccinimida (25 mg, 5 equivalentes) y diisopropil-carbodiimida (68 μ L, 10 equivalentes). La reacción fue agitada vigorosamente a temperatura ambiente. Después de 36 horas, el análisis de HPLC, tal como se describió antes en el ejemplo 1, sección (b), mostró conversión completa a un producto que eluía a los 16.7 minutos sin material de partida a los 14.7 minutos. El producto se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 20 mm x 30 cm. La fracción de HPLC, que contenía producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse para dar un polvo amarillo claro. Rendimiento = 23 mg (84%).
20

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2-OMe-DMAE y su éster NHS.

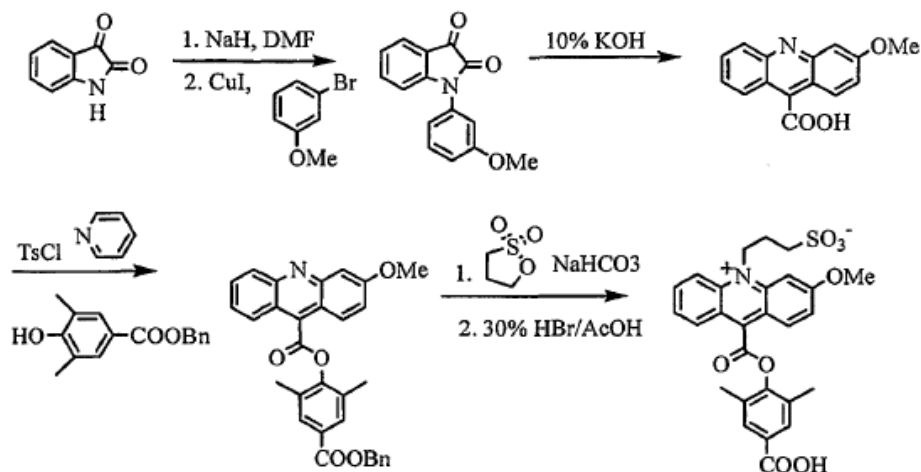


Ejemplo 3

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-metoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-3-OMe-DMAE]

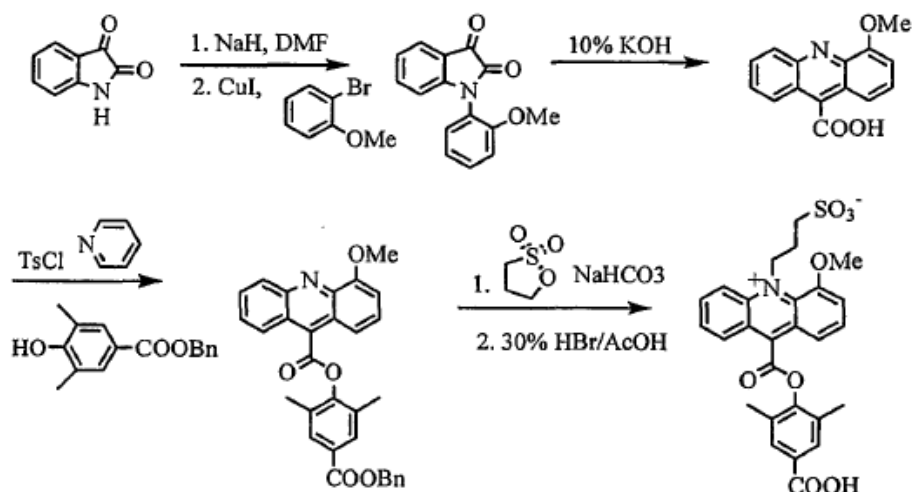
Este compuesto fue hecho a partir de 3-bromoanisol, isatina y 4-benziloxicarbonil-2,6-dimetilfenol usando los mismos procedimientos descritos arriba para el análogo 2-metoxi en el ejemplo 2.

5 Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-3-OMe-DMAE.

**Ejemplo 4**

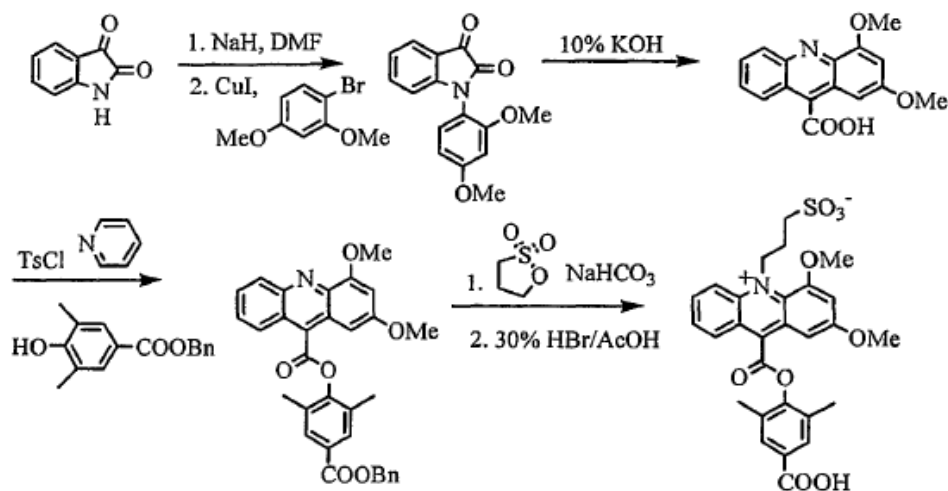
Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 4-metoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-4-OMe-DMAE]

10 Este compuesto fue hecho a partir de 2-bromoanisol, isatina y 4-benziloxicarbonil-2,6-dimetilfenol usando los mismos procedimientos descritos arriba para el análogo 2-metoxi en el ejemplo 2. Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-4-OMe-DMAE.

**Ejemplo 5**

15 Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,4-dimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,4-(OMe)₂-DMAE]

Este compuesto fue hecho a partir de 2,4-dibromoanisol, isatina y 4-benziloxicarbonil-2,6-dimetilfenol usando los mismos procedimientos descritos arriba para el análogo 2-metoxi en el ejemplo 2. Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,4-(OMe)₂-DMAE.



Ejemplo 6

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,5-dimetoxi-10-sulfopropil-acridinio [NSP-2,5-(OMe)₂-DMAE]

(a) Síntesis de N-(2-metoxifenil)-5-metoxiisatina

- 5 5-Metoxiisatina (2 g, 0.0113 mol) en DMF anhidra (15 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (0.54 g, 1.2 equivalentes, dispersión de 60% en aceite mineral). La reacción fue agitada a 0 °C durante 0.5 horas y luego se adicionó 2-bromoanisol (1.4 mL, 1 equivalente) junto con yoduro de cobre (4.3 g, 2 equivalentes). La reacción se calentó en un baño de aceite a 140 °C durante 16 horas luego la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado fue evaporado hasta secarse. El sólido marrón oscuro se usó directamente para la siguiente reacción.

(b) Síntesis de ácido 2,5-dimetoxi acridin-9-carboxílico

- 15 El derivado de isatina cruda del paso (a) se sometió a reflujo en 60 mL de hidróxido de potasio al 10% en agua durante 4 horas. Luego la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se acidificó con una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y hielo hasta que se separó un precipitado oscuro. El producto se recogió mediante filtración y se secó al vacío. Rendimiento = 0.32 g (10%).

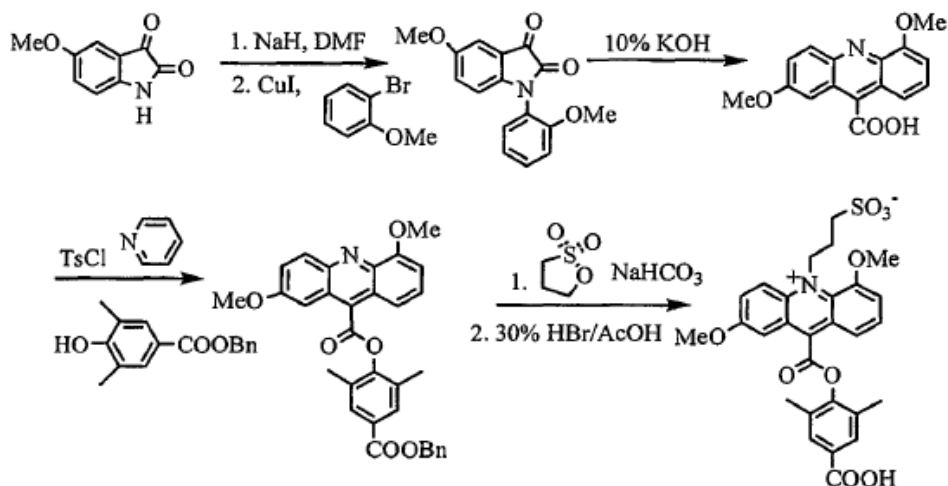
(c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-benziloxycarbonilphenyl-2,5-dimetoxi-acridinio

Este compuesto se sintetizó a partir del ácido 2,5-dimetoxi acridin-9-carboxílico y 4-benziloxycarbonil-2,6-dimetilfenol usando el procedimiento descrito para la síntesis del análogo 2,7-dimetoxi en el ejemplo 1.

- 20 (d) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,5-dimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,5-(OMe)₂-DMAE]

Este compuesto fue sintetizado mediante reacción del éster de acridinio con 1,3-propano-sultona usando el procedimiento descrito para la síntesis del NSP-2,7-(OMe)₂-DMAE en el ejemplo 1, sección (b).

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,5-(OMe)₂-DMAE.

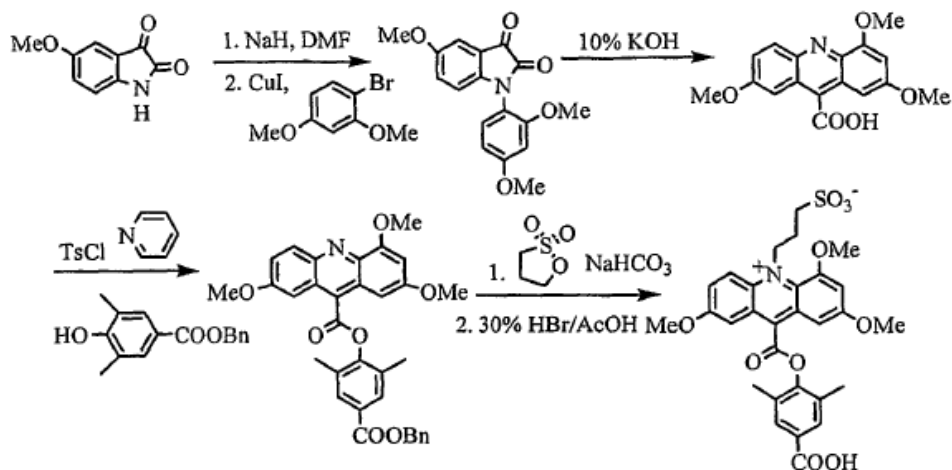


Ejemplo 7

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,4,7-trimetoxi-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,4,7-(OMe)₃-DMAE]

- 5 Este compuesto fue sintetizado a partir de 5-metoxiisatina, 2,4-dibromoanisol y 2,6-dimetil-4-carboxibenzilfenol usando procedimientos descritos en el ejemplo 6.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,4,7-(OMe)₃-DMAE.



Ejemplo 8

- 10 Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxycarbonilfenil 2,7-bis(O-sulfopropil)-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE] y su éster de N-succinimidilo [NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE-NHS]

(a) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxycarbonilfenil 2,7-dihidroxi-acridinio

- 15 Una solución de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-benziloxycarbonilfenil- 2,7-dimetoxi-acridinio (52 mg, 100 umoles) en diclorometano (5 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con una solución de 1 M de tribromuro de boro en diclorometano (4 mL). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3-4 horas. Luego la reacción se enfrió de nuevo en un baño de hielo y se adicionó cuidadosamente metanol (10 mL). Luego se calentó la reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Después del tiempo de reacción indicado, se adicionó bicarbonato de sodio sólido a la reacción hasta un papel de pH neutro. La mezcla de reacción completa se evaporó luego hasta secarse. El residuo se dividió entre acetato de etilo (30 mL) y agua (50 mL). La

capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta secarse para dar un polvo amarillo. Rendimiento = 30 mg (75%). MALDI-TOF MS 419.4 obs. (420.5 calc.)

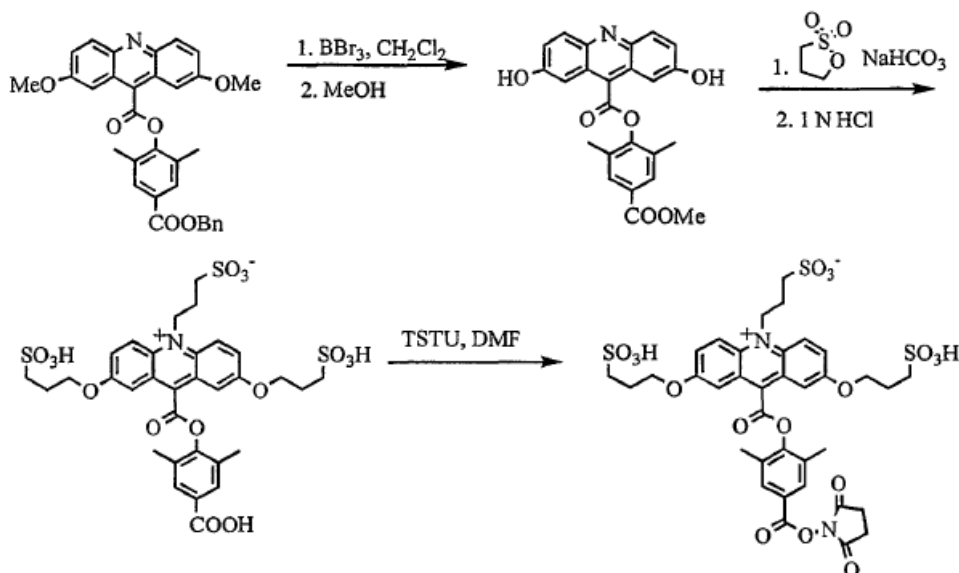
(b) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-bis(O-sulfopropil)-10-N-sulfopropil acridinio

5 El derivado de 2,7-dihidroxi acridina de la sección (a) (30 mg, 71.6 umoles) se mezcló con 1,3-propano sultona (0.875 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (120 mg, 20 equivalentes). La mezcla se calentó en un baño de aceite a 140°C con agitación vigorosa. Después de una hora, se adicionaron además 100 equivalentes de 1,3-propano sultona y 20 equivalentes de bicarbonato de sodio y se continuó la reacción. Después de una hora adicional se trató la mezcla de reacción con más 1,3-propano sultona (100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (20 equivalentes). Se continuó la reacción por una hora y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó acetato de etilo (20 mL) y la mezcla de reacción se sometió ultrasonido brevemente (15 minutos) para dispersar la goma en un precipitado amarillo. Este precipitado se recogió mediante filtración y se enjuagó con acetato de etilo. Este sólido luego se transfirió con la ayuda de metanol aún matraz con fondo redondo y luego se evaporó hasta secarse. El residuo resultante se suspendió en 20 ml de ácido clorhídrico de 1 N y se sometió a reflujo por 3 horas. El análisis de HPLC tal como se describe en el Ejemplo 1, sección (b), indicó un producto que eluía a los 11 minutos junto con algunos subproductos. La mezcla de reacción se concentró hasta un volumen pequeño y se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 20 mm x 30 cm. La fracción de HPLC que contiene el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse para producir un polvo amarillo claro. Rendimiento = 12.5 mg (23%). 772.7 obs. (769.8 calc.).

20 (c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 2,7-bis(O-sulfopropil)-10-N-sulfopropil acridinio

NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE (3 mg, 3.9 umoles) se disolvió en DMF anhidra (1 mL) y se trató con diisopropiletilamina (1.4 uL) y TSTU (1.8 mg, 1.2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 40 minutos, se adicionó más diisopropiletilamina y TSTU y la reacción continuó durante 30 minutos. El análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 40 minutos de MeCN 10% → 40% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético de 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min mostró conversión completa en un producto que eluía a los 19 minutos sin material de partida los 17 minutos. El producto se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 20 mm x 30 cm. La fracción de producto que contiene el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 2 mg (59%). MALDI-TOF MS 868.2 obs. (866.9 calc.).

30 Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE y su éster NHS.



Ejemplo 9

35 Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-bis[O-metoxihexa(etilen)glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE]; 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-bis[O-metoxihexa(etilen) glicol]-10-N-metil-acridinio [2,7-(OMHEG)₂-DMAE]; ésteres de N-succinimidilo [2,7-(OMHEG)₂-DMAE-NHS] y [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-NHS]; 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxi-

glutarilamidohexa(etilen)glicolamidocarbonilfenil-2,7-bis(O-metoxihexa(etilen)glicol)-10-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato-NHS] y 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicaproilamidocarbonilfenil-2,7-bis[Ometoxi(hexa)etilen glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS]

(a) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxi hexa(etilen) glicol]-acridinio.

- 5 Una solución de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-metoxicarbonilfenil-2,7-dihidroxi acridina (100 mg, 0.24 mmol) en THF anhidra (25 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (dispersión de 60%, 25 mg, 2.5 equivalentes). Después de agitar durante 30 minutos en el baño de hielo, se adicionó tosilato de metoxi hexa(etilen) glicol (Yamashita et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 6249-6253, 195 mg, 3 equivalentes). La reacción resultante se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante 4 horas. Luego se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se neutralizó con acetato de etilo y metanol y luego se evaporó hasta secarse. El residuo se dividió entre cloroformo (30 mL) y solución saturada de cloruro de sodio (30 mL). La capa de cloroformo se separó de la capa acuosa se extrajo dos veces más con cloroformo (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó hasta secarse para dar un sólido aceitoso. Rendimiento = 0.242 g (quant.). El análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN 10% → 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min mostró conversión completa en producto que eluía a los 24 minutos. Este material fue usado como tal para las siguientes transformaciones.

(b) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-2,7-bis[O-metoxi hexa(etilen) glicol]-10-N-metil-acridinio

- 20 El éster de acridinio del paso (a) (45 mg, 46 umoles) se disolvió en diclorometano anhidro (5 mL) y fue tratado con bicarbonato de sodio (20 mg, 5 equivalentes) y metil trifluorometano sulfonato (50 uL, 10 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis de HPLC tal como se describió en la sección (a) indicó un producto que eluía a los 21 minutos. La reacción se filtró a través de algodón de vidrio para retirar bicarbonato de sodio y el filtrado se evaporó hasta secarse. El residuo se suspendió en 10 mL de HCl de 1N y la reacción resultante se sometió a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis de HPLC indicó hidrólisis limpia del éster de metilo con el producto que eluía a los 19 minutos. La mezcla de reacción se concentró luego a un volumen pequeño (3-4 mL) mediante evaporación por rotación y el producto se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 30 x 300 mm, YMC y el gradiente descrito antes. La fracción de HPLC que contiene el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 18.2 mg (aceite), 40%.

30 (c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-2,7-bis[O-metoxi hexa(etilen) glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio

- 35 El éster de acridinio del paso (a) (0.1 g, 0.102 mmol) se mezcló con 1,3-propano sulfona (1.25 g, ~100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (170 mg, 20 equivalentes). La mezcla se calentó en un baño de aceite a 130°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 2-3 horas, se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (~10 mL). La mezcla se sometió brevemente a ultrasonido para dispersar la goma a un polvo que se recogió mediante filtración. El producto se suspendió en 10 mL de HCl de 1 N y se sometió a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a) la cual indicó un producto que eluía a los 17 minutos. El producto se purificó mediante HPLC preparativa tal como se describió arriba y la fracción de HPLC se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento ~10 mg (10%).

40 (d) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen)glicol]-10-N-metil-acridinio

- 45 El ácido carboxílico del 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen) glicol]-10-N-metilacridinio (18 mg, 18.7 umoles) en DMF anhidra (2 mL) fue tratado con diisopropiletilamina (5 uL, 1.5 equivalentes) y TSTU (7 mg, 1.2 equivalentes). La reacción fue agitada a temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10% → 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min mostró conversión completa a un producto que eluía a Rt = 20 minutos. El producto se purificó usando una columna de YMC, C₁₈ 20 x 300 mm. La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 14.4 mg (72%). MALDI-TOF MS 1073.1 obs. (1071.2 calc.).

50 (e) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen) glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio

Una solución de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen) glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio (9.3 mg, 8.6 umoles) en DMF anhidra (2 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (2.3 uL, 1.5 equivalentes) y TSTU (3 mg, 1.2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis de

HPLC, tal como se describió en la sección (d), pero conversión a un producto que eluía a los 18.3 minutos. El producto se purificó mediante HPLC preparativa tal como se describió arriba y la fracción de HPLC se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 6.7 mg (66%). MALDI-TOF MS 1181.1 obs. (1179.3 calc.).

5 (f) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-aminohexa(etilen)glicolamidocarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen)glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio

Una solución de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen)glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio (20 mg, 18.6 umoles) en DMF (2 mL) fue tratado con diisopropiletilamina (8 uL, 5 equivalentes) y TSTU (14 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC realizado tal como se describió en la sección (d) indicó completa conversión al éster NHS que eluía a los 18.5 minutos. Esta solución de DMF se adicionó en porciones de 0.1 mL a una solución de diamino hexa(etilen) glicol (patente estadounidense No. 6,664,043, 56 mg, 5 equivalentes) en DMF (1 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC desarrollado tal como se describió en la sección (d) indicó conversión completa a un producto que eluía a los 16.2 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de YMC, C₁₈, 20 x 300 mm. La fracción de HPLC que contenía el producto se evaporó hasta secarse. Rendimiento 16 mg (62%).

(g) 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxiglutarilamidohepta-(etilen)glicol-amidocarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxihexa(etilen)glicol]-10-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato-NHS]

El producto de la sección (f) (16 mg, 11 umoles) se disolvió en metanol (1 mL) y se trató con diisopropiletilamina (9.6 uL, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (6 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC realizado tal como se describió en la sección (d) indicó conversión completa a un producto que eluía a los 17 minutos. El solvente se retiró luego a presión reducida el residuo se suspendió en tolueno (2 mL) y se evaporó hasta secarse. El producto crudo se disolvió en DMF (1 mL) y se trató con diisopropiletilamina (19.2 uL, 10 equivalentes) y TSTU (33 mg, 10 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC indicó >80% de conversión a un producto que eluía a los 18 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa tal como se describió arriba. La fracción de HPLC que contenía productos se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 10.7 mg (63%); MALDI-TOF MS 1557.8 obs. (1556.8 calc.).

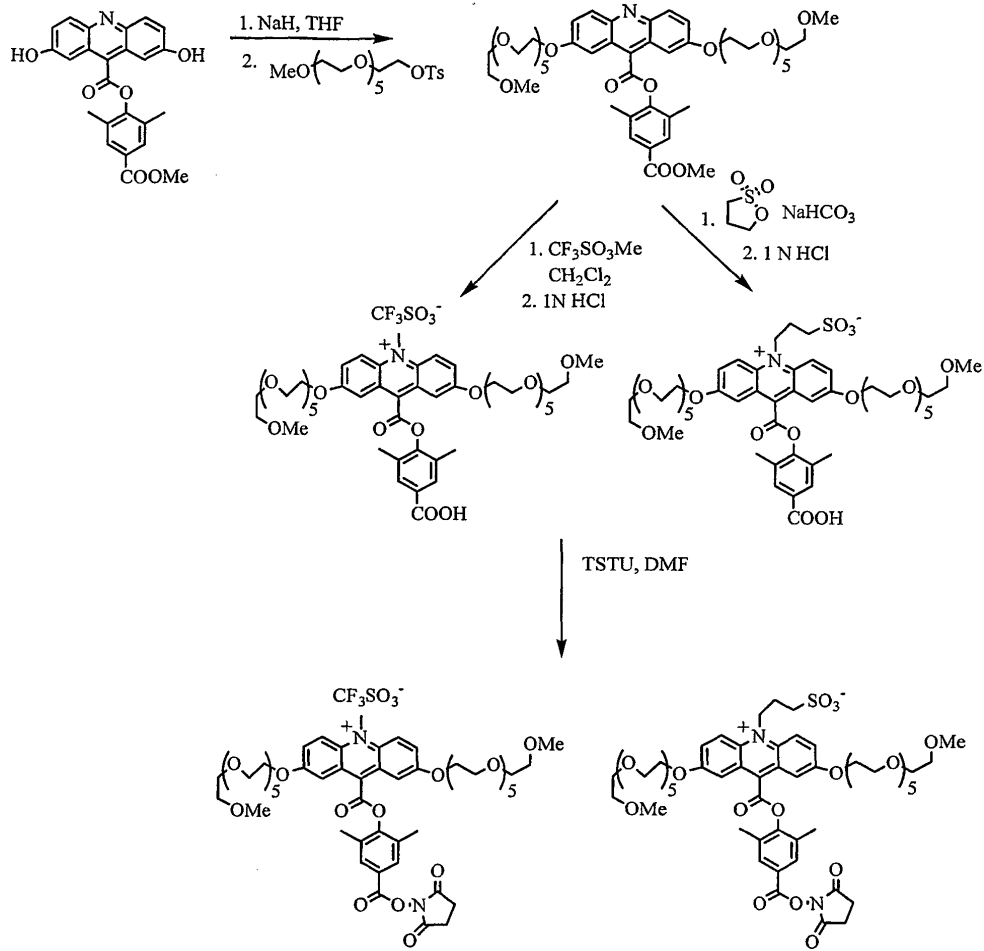
(h) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxicaproilamidocarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxi(hexa)etilen glicol]-10-Nsulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC]

30 NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE (16 mg, 14.8 umoles) en DMF (1.5 mL) fue tratado con diisopropiletilamina (5.2 uL, 2 equivalentes) y TSTU (9 mg, 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se enfrió a 0°C. Esta solución se adicionó luego gota a gota a una solución de ácido 6-aminocaproico (20 mg, 55.5 10 equivalentes) disuelto en NaHCO₃ de 0.1 M (2 mL). La reacción resultante se agitó a 0°C en un baño de hielo y después de 15 minutos se calentó a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la reacción se analizó por HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN 10% → 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró conversión completa a un producto que eluía a los 17.2 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 20 mm x 30 cm. La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 15.2 mg (84%).

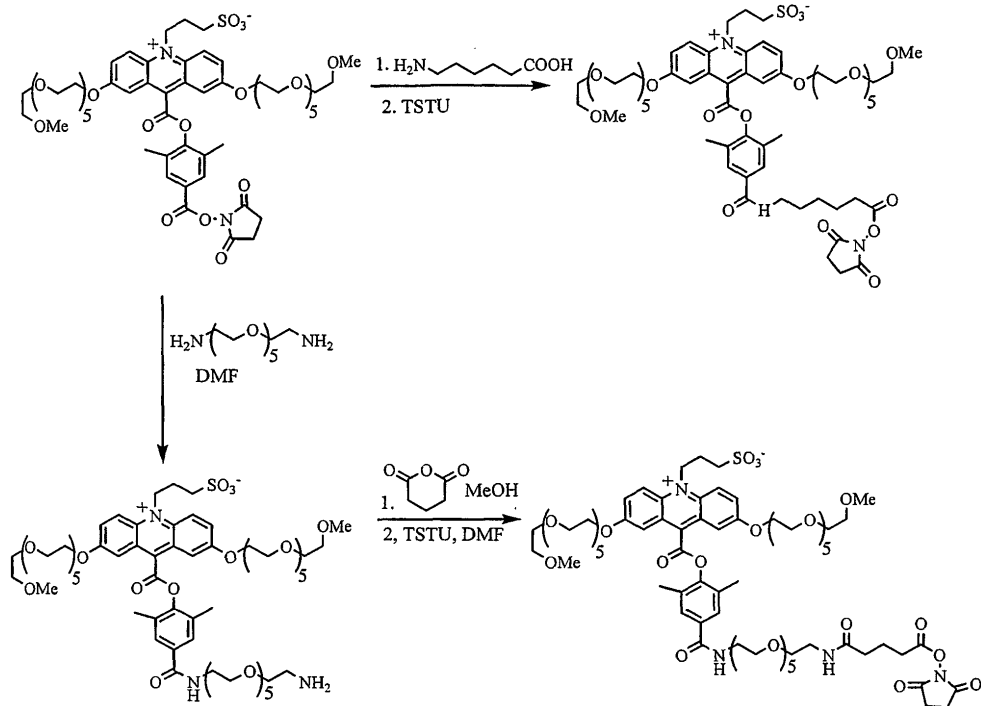
40 (i) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicaproilamidocarbonilfenil-2,7-bis[O-metoxi(hexa)etilen glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS]

45 NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC (15 mg, 12.7 umoles) del paso (h) se disolvió en DMF (1.5 mL) y se trató con diisopropiletilamina (3.3 uL, 1.5 equivalentes) y TSTU (4.6 mg, 1.2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se analizó mediante HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 40 minutos de MeCN de 10% → 60% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, la cual mostró conversión completa a un producto que eluía a los 24.5 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈, 20 mm x 30 cm. La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 8 mg (50%). MALDI-TOF MS 1294.5 obs. (1293.5 calc.).

50 Las siguientes reacciones describen la síntesis de 2,7-(OMHEG)₂-DMAE y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE, sus ésteres NHS



Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato-éster NHS.



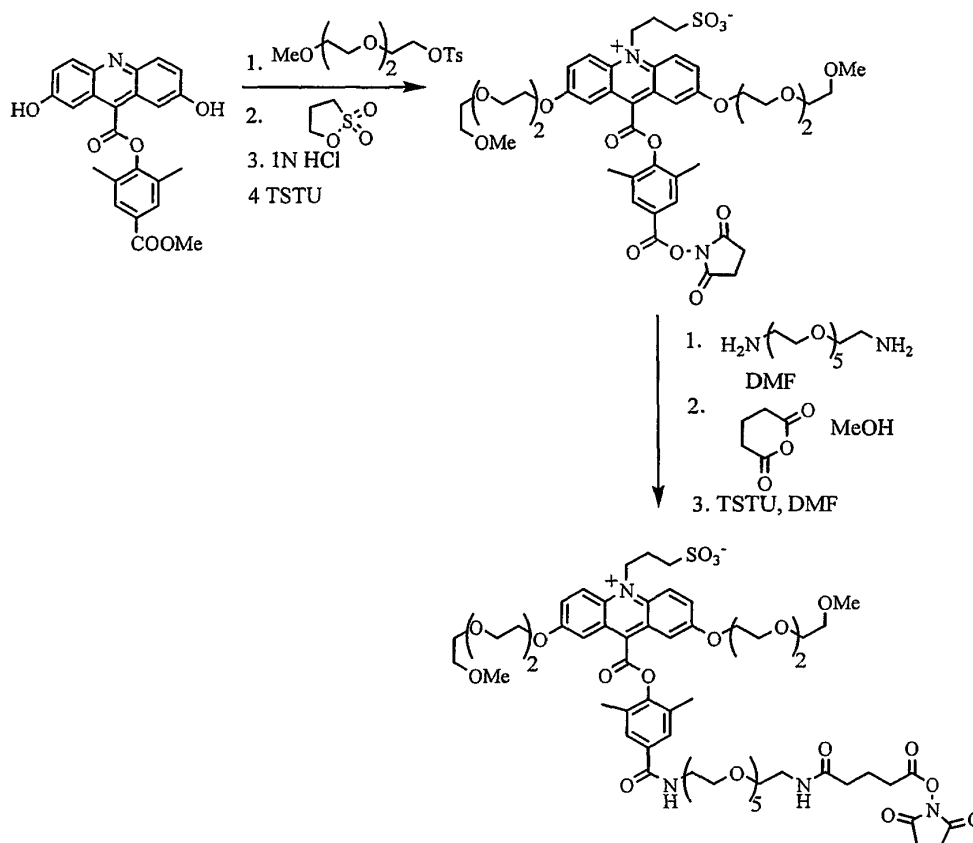
Ejemplo 10

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2,7-bis[O-metoxitri(etilen) glicol]-10-N-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE], su éster NHS y 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxiglutarilamidohexa(etilen)-glicolamido-carbonilfenil-2,7-bis[O-metoxitri(etilen)glicol]-10-sulfopropil-acridinio [NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato-NHS]

5

Estos compuestos se sintetizaron usando los procedimientos descritos en el ejemplo 9 para la síntesis de NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-éster NHS usando metoxi tri(etilen) glicol en lugar de metoxi hexa(etilen) glicol.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-éster NHS y NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato-éster NHS.



10

Ejemplo 11

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicaproil-amidocarbonilfenil-N¹⁰-2,7-tris[O-metoxihexa(etilen)glicol-sulfonamidilpropil]-acridinio [N¹⁰-2,7-(OMHEG-SP)₃-DMAE-AC-NHS]

15

(a) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-N¹⁰-2,7-tris[O-metoxihexa(etilen)glicol-sulfonamidilpropil]-acridinio

20

NSP-2,7-(OSP)₂-DMAE (10 mg, 0.0129 mmol) se disolvió en metanol (5 mL), y se enfrió en un baño de hielo. Se adicionó gota a gota duro de tionilo (0.5 mL) y la reacción se agitó brevemente en el baño de hielo y luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. El análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10% → 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró conversión completa a un producto que eluía a los 12 minutos. El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se suspendió en acetato de etilo (~5 mL) y se evaporó hasta secarse.

25

El éster de metilo se suspendió luego en cloruro de tionilo (1.5 mL) y se calentó a reflujo durante 1 hora bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se retiró el cloruro de tionilo al vacío. El residuo se enjuaga con éter anhidro (~5 mL) varias veces y luego se secó al vacío. Luego se trató con una solución de

metoxi hexa(etilen)glicol amina (sintetizada usando procedimientos descritos en la patente estadounidense No. 6,664,043 y Yamashita et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 6249-6253) (0.1 mL) disuelta en diclorometano (2 mL).

5 La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de una hora, el análisis de HPLC indicó conversión completa a un producto que eluía a los 21 minutos. Luego se retiró el solvente a presión reducida y el producto crudo se suspendió en HCl de 1 N (~5 mL) y se sometió a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas para hidrolizar el éster de metilo. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC la cual indicó hidrólisis completa del éster de metilo. Se observó que el producto eluía a los 19.5 minutos.

10 El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈ YMC, 20 x 300 mm usando el gradiente de arriba y una velocidad de flujo de solvente de 16 mL/min. La fracción de HPLC que contenía el producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 3.8 mg (~20%), MALDI-TOF MS 1602.92 (calc.).

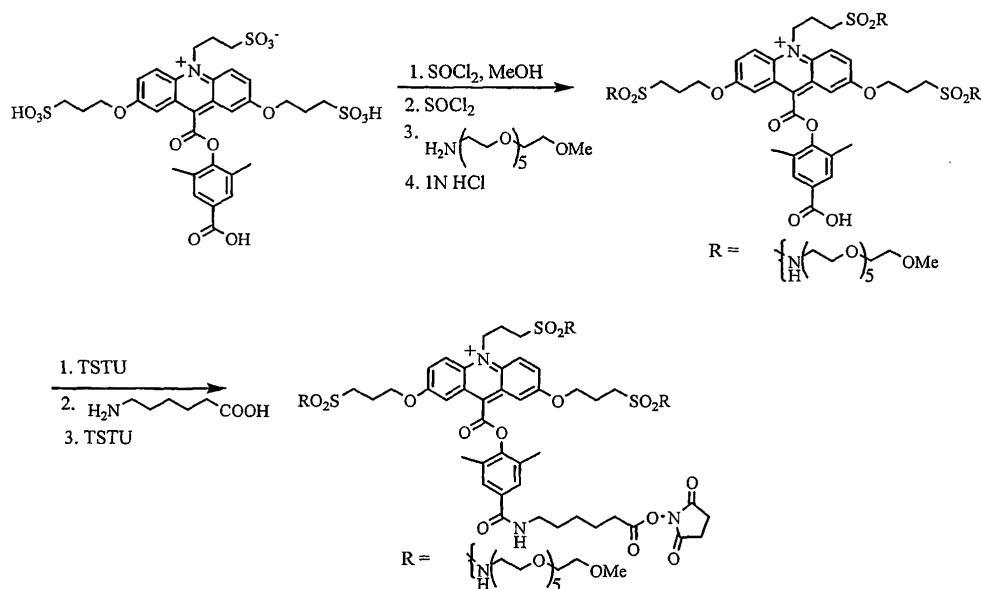
b) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxicaproilamidocarbonilfenil-N¹⁰-2,7-tris[O-metoxihexa(etilen)glicol-sulfonamidilpropil]-acridinio

15 Una solución de N¹⁰-2,7-(OMHEG-SP)₃-DMAE (3.8 mg, 2.4 umoles) en DMF anhidra (1 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (2.0 uL, 2.4 x 5 umoles) y TSTU (4 mg, 2.4 x 5 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego el análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN 10% → 100% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró conversión completa a un producto que eluía a los 16.2 minutos (el material de partida eluye a los 15.3 minutos). La solución de DMF se enfrió en un baño de hielo y luego se adicionó en porciones de 0.1 mL a una solución helada con hielo de ácido 6-aminocaproico (6 mg, 47.4 umoles) disuelto en bicarbonato de sodio de 0.1 M (1 mL). La reacción se calentó luego a temperatura ambiente y se agitó durante una hora. El análisis de HPLC indicó conversión completa a un producto que eluía a los 15.4 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈ YMC 20 x 300 mm. La fracción de HPLC se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 3.3 mg (81%); MALDI-TOF MS 1719 obs. (1717.1 calc.).

25 c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicaproil-amidocarbonilfenil-N¹⁰-2,7-tris[O-metoxihexa(etilen)glicolsulfon-amidilpropil]-acridinio

30 Una solución de N¹⁰-2,7-(OMHEG-SP)₃-DMAE-AC (3.3 mg, 2 umoles) del paso (a) en DMF anhidra (1 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (1.8 uL, 10 umoles) y TSTU (3 mg, 10 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente después de 15 minutos, el análisis de HPLC tal como se describe arriba en la sección (a) mostró conversión completa a un producto que eluía a los 16.2 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa y la fracción de HPLC se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 2.2 mg (63%); MALDI-TOF MS (1814.1 calc.)

Las siguientes reacciones describen la síntesis de N¹⁰-2,7-(OMHEG-SP)₃-DMAE-AC-NHS.



Ejemplo 12

Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxiglutaril-amidohexa(etilen)glicol-amidocarbonilfenil-N¹⁰-metoxihexa(etilen) glicol-sulfonamidilpropil- 2,7-dimetoxi-acridinio [N¹⁰-(OMHEG-SP)-2,7-(OMe)₂-DMAE-HEG-Glutarato-NHS]

5 (a) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-N¹⁰-metoxihexa(etilen) glicol-sulfonamidilpropil]-2,7-dimetoxiacridinio

10 Éster bencílico de NSP-2,7-dimetoxi-DMAE (22 mg) del ejemplo 1 se disolvió en cloruro de tionilo y la solución se calentó en un baño de aceite a 55°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. Se retiró el cloruro de tionilo a presión reducida y el residuo se enjuagó con éter anhidro y se secó al vacío. Éste residuo se trató con una solución de metoxi hexa(etilen)glicol amina (0.1 mL) en diclorometano (2 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10% → 100% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró conversión completa a un producto que eluía a los 19 minutos. Luego se retiró el solvente a presión reducida y el aceite resultante se revolvió en 30% de HBr/AcOH (2 mL) a temperatura ambiente durante 6 horas para efectuar la desbencilación del ácido carboxílico. Luego se adicionó éter (10 mL) y se separó un aceite rojo oscuro. El éter se decantó y el aceite se enjuagó varias veces con éter. Éste se disolvió luego en DMF (2-3 mL) y se analizó mediante HPLC la cual indicó un producto que eluía a los 15 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de YMC C₁₈, 20 x 300 mm. Las fracciones de HPLC que contenían producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta secarse. Rendimiento = 5.3 mg (19%); MALDI-TOF MS 831.9 calc.

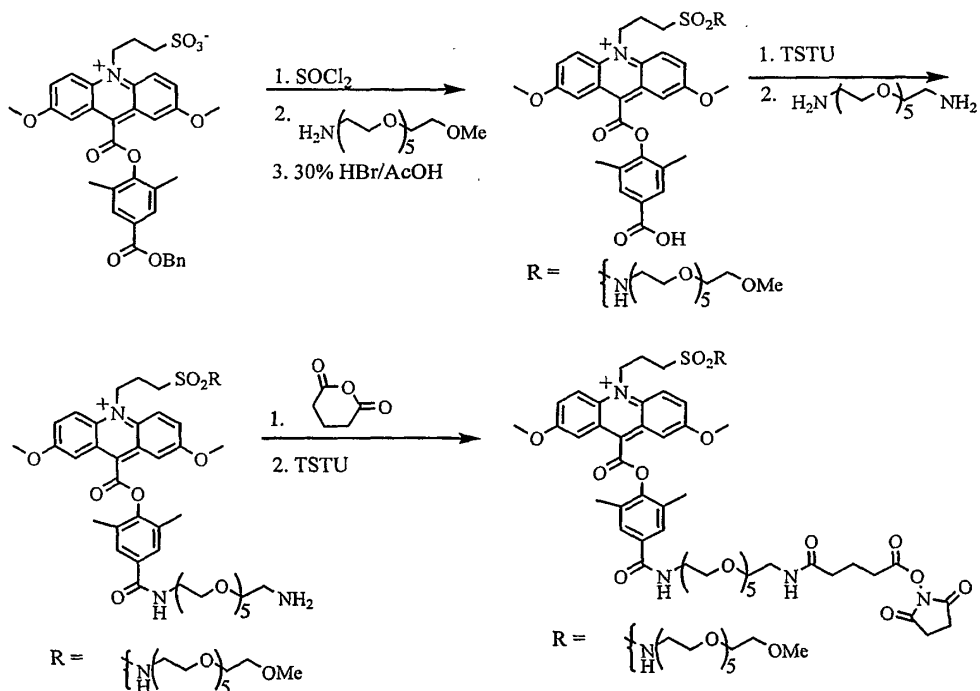
20 (b) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-aminohexa(etilen)glicolamido-carbonilfenil-N¹⁰-metoxihexa(etilen) glicolsulfonamidilpropil 2,7-dimetoxi-acridinio

25 Una solución de N¹⁰-(OMHEG-SP)-2,7-(OMe)₂-DMAE (5.3 mg, 6.4 umoles) del paso (a) en DMF anhidra (1 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (5.6 uL, 17 umoles) y TSTU (6 mg, 10.2 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describió arriba en la sección (a) indicó conversión completa a un producto que eluía a los 16.3 minutos. La mezcla de reacción se adicionó gota a gota a una solución de diamino hexa(etilen)glicol (10 mg, 0.0354 mmol) en DMF (0.5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se analizó mediante HPLC la cual indicó conversión completa a un producto que eluía a los 14 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de YMC C₁₈, 20 x 300 mm. La fracción de HPLC se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 3.7 mg (53%).

30 (c) Síntesis de 9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxislutaril-amidohexa(etilen)-glicolamidocarbonilfenil-N¹⁰-metoxihexa(etilen) glicol-sulfonamidilpropil 2,7-dimetoxi-acridinio

35 Una solución de N¹⁰-(OMHEG-SP)-2,7-(OMe)₂-DMAE-HEG-NH₂ (3.7 mg, 3.4 umoles) del paso (b) en metanol anhidro (1 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (3 uL, 17 umoles) y anhídrido glutárico (2 mg, 17 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente y después de 30 minutos, el análisis de HPLC tal como se describió en la sección (a) indicó conversión completa a un producto que eluía a los 14.6 minutos. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse. El residuo se disolvió en DMF (1 mL) y se trató con diisopropiletilamina (3 uL) y TSTU (6 mg, 17 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente y después de 30 minutos, El análisis de HPLC indicó un producto que eluía a los 15.3 minutos. El producto se purificó mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈ YMC, 20 x 300 mm. La fracción de HPLC que contenía producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 1.7 mg (39%). MALDI-TOF-MS 1303.5 calc.

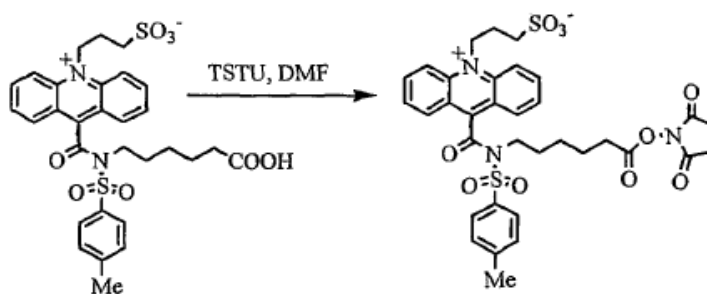
Las siguientes reacciones describen la síntesis de N¹⁰-(OMHEG-SP)-2,7-(OMe)₂-DMAE-HEG-glutarato-NHS.

**Ejemplo 13**

Síntesis de 3-[9-((5-carboxipentil)[4-metilfenil]sulfonil)amino] carbonil-10-acridinioil]-1-propanesulfonato (NSP-AS) y su éster de N-succinimidilo (NSP-AS-NHS)

- 5 NSP-AS se sintetizó usando los procedimientos reportados por Adamczyk et al., Tetrahedron, vol. 55, pp. 10899-10914 (1999) como sigue. NSP-AS (8.8 mg, 14.4 μmoles) se disolvió en DMF anhidra (1 mL) y se trató con diisopropiletilamina (5 μL , 2 equivalentes) y TSTU (8.2 mg, 1.5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos el análisis de HPLC usando una columna de C_{18} de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10% \rightarrow 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró conversión completa a un producto que eluía a los 17.7 minutos sin material de partida a los 15.5 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C_{18} , 20 mm x 30 cm. La fracción de producto que contenía producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 5.8 mg (57%)

Las siguientes reacciones describen la síntesis de éster de NSP-AS-NHS.



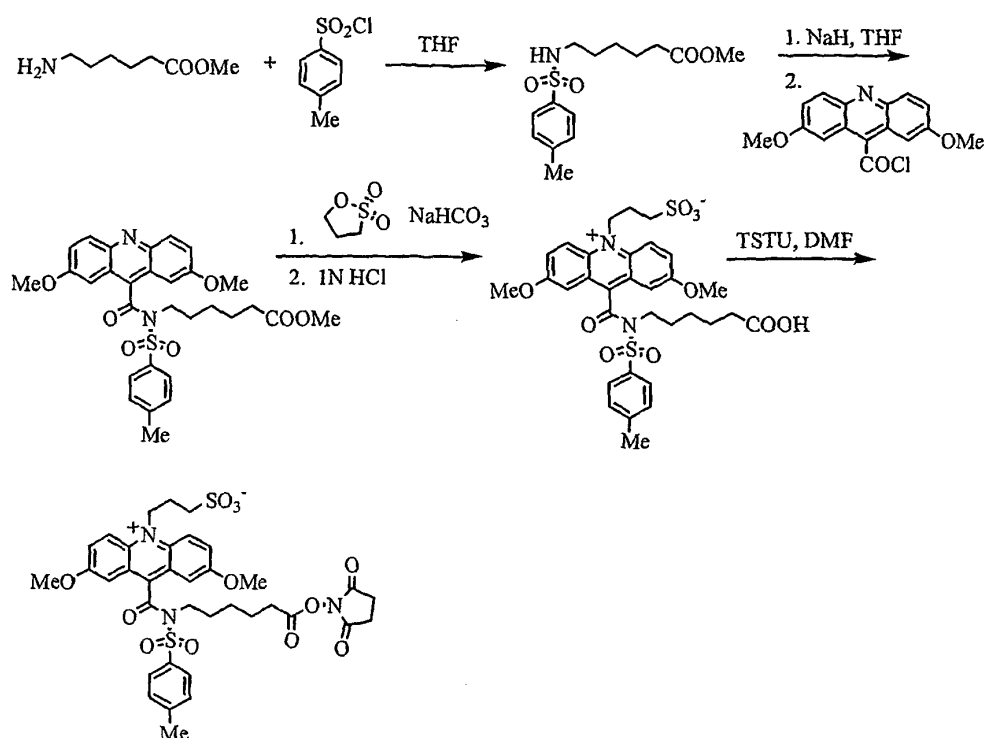
15

Ejemplo 14

Síntesis de 3-[9-((5-carboxipentil)[4-metilfenil]sulfonil)amino] carbonil-2,7-dimeti-10-acridinioil]-1-propanesulfonato (NSP-2,7-dimetoxi-AS) y su éster de N-succinimidilo SP-AS-NHS)

Estos compuestos se sintetizaron usando los procedimientos y la referencia citada en los ejemplos 7-13.

- 20 Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMe)₂-AS y su éster NHS.

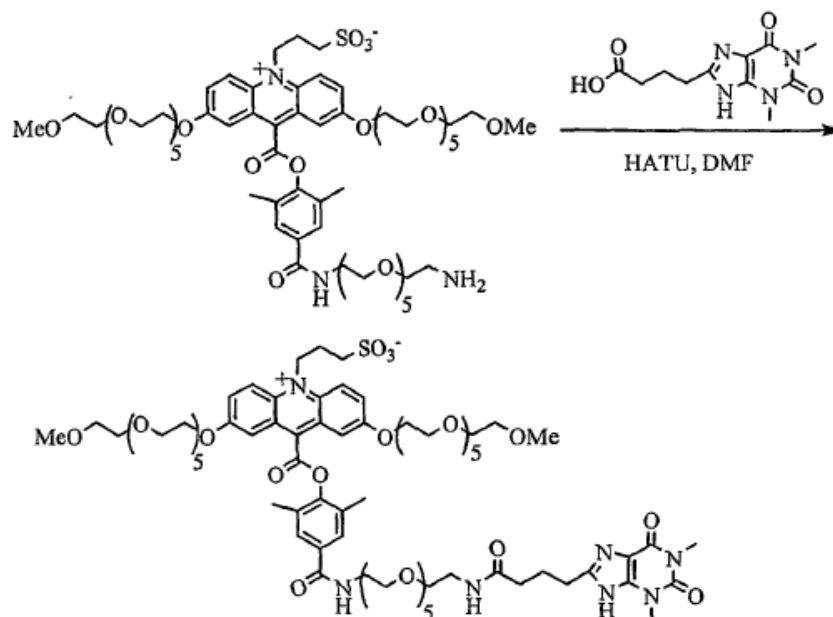


Ejemplo 15

Síntesis de conjugado de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-teofilina

- 5 Una solución de 8-carboxipropilteofilina (Sigma, 5 mg, 18.7 umoles) en DMF anhidra (1 mL) fue tratada con diisopropiletilamina (3.2 uL, 1 equivalente) y HATU (7 mg, 1 equivalente). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se adicionó una solución de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-NH₂ (5 mg, 3.7 umoles) del ejemplo 9, paso (f) en DMF anhidra (1 mL) junto con diisopropiletilamina (2 uL). Esta reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 16 horas el análisis de HPLC usando una columna de C₁₈ de Phenomenex, 4.6 mm x 30 cm, y un gradiente de 30 minutos de MeCN de 10% → 70% en agua, cada uno con ácido trifluoroacético al 0.05%, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, mostró una conversión completa a un producto que eluía a los 18 minutos. El producto fue purificado mediante HPLC preparativa usando una columna de C₁₈ YMC, 20 x 300 mm. La fracción de HPLC que contenía producto se congeló a -80°C y se liofilizó hasta secarse. Rendimiento = 4.0 mg (67%). MALDI-TOF-MS 1593.8 calc. 1596.7 obs.
- 10

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-teofilina.



Ejemplo 16

Procedimiento general para etiquetar proteína con compuestos de acridinio

5 El anticuerpo monoclonal de murino anti-TSH (1 mg, 6.67 nmoles, solución madre 5mg/mL, 0.2 mL) se diluyó con 300 uL de fosfato de sodio de 0.1 M, pH 8. Las soluciones de proteína se trataron con soluciones de DMF de diversos ésteres de acridinio, tal como sigue:

- a) Para etiquetar con 20 equivalentes de NSP-DMAE-HEG-Glutarato-éster de NHS, se adicionaron 63 uL de una solución de DMF de 2 mg/mL DMF del compuesto;
- 10 b) para etiquetar con 20 equivalentes de NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-éster NHS, se adicionaron 46 uL de una solución de 2.67 mg/mL de DMF del compuesto;
- c) para etiquetar con 20 equivalentes de NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-Glutarato-éster NHS, se adicionaron 52 uL de una solución 3.33 mg/mL de DMF;
- d) para etiquetar con 20 equivalentes de NSP-2,7-(OMBEG)₂-DMAE-AC-éster NHS, se adicionaron 43 uL de una solución de 4 mg/mL DMF y;
- 15 e) para etiquetar con 20 equivalentes de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-Glutarato-éster NHS, se adicionaron 52 uL de una solución de 3.33 mg/mL de DMF.

20 Todas las reacciones se agitaron a 4°C durante 16 horas y luego se transfirieron a filtros Amicon de 2 mL (MW 30,000 máximo) y se diluyeron con 1.5 mL de agua desionizada. El volumen se redujo a ~0.1 mL centrifugando a 4500 G. Las soluciones de conjugado concentradas se diluyeron con 2 mL de agua desionizada y se centrifugaron de nuevo para reducir el volumen. Este proceso se repitió en total por cuatro veces. Finalmente, los conjugados concentrados se diluyeron con 0.1 mL de agua desionizada.

25 Estas soluciones se usaron para análisis espectral de masas MALDI-TOF (por Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight o desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo), usando el instrumento Voyager-DE de Perkin-Elmer, para medir la incorporación del compuesto de acridinio. Normalmente, esto implicaba medir el peso molecular del anticuerpo no etiquetado y el anticuerpo etiquetado. La etiqueta de compuesto de acridinio contribuyó con la diferencia en masa de estas dos mediciones. Conociendo el peso molecular de la etiqueta de compuesto de acridinio específica, pudo calcularse así el alcance de la incorporación de etiqueta de aquel compuesto específico de acridinio.

30 El número de etiquetas por molécula de anticuerpo para NSP-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato fueron 8, 8, 7, 10 y 8 respectivamente.

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante un ensayo colorimétrico comercial.

5 La quimioluminiscencia de los conjugados se midió diluyendo primero los conjugados en fosfato de 10 mM pH 8 que contenía NaCl de 150 mM, 0.05% de BSA y 0.01% de azida de sodio y luego efectuar mediciones en un instrumento ACS:180® (por Automated Chemiluminescent Immunoassay System o sistema de inmunoensayo quimioluminiscente automatizado) de Bayer Diagnostics. Una medición típica incluye provocar quimioluminiscencia de 25 uL de la solución de conjugado diluida con la adición de dos reactivos. El reactivo 1 es una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% en ácido nítrico de 0.1 N. El reactivo 2 es hidróxido de sodio de 0.25 N. Se midió la luz por un total de 5 segundos. En estas condiciones, se recogió >90% de la luz de cada muestra. El rendimiento del instrumento luminómetro se expresa como RLUs (por Relative Light Units o unidades de luz relativas). Estos valores se normalizaron a aquel de NSPDMAE al cual se le asignó un rendimiento cuántico de quimioluminiscencia relativa de 1.0.

Se llevaron a cabo reacciones de etiquetado con otros compuestos de acridinio de manera similar.

Ejemplo 17

Mediciones de quimioluminiscencia y longitud de onda de emisión de compuestos de acridinio

15 Se midió la quimioluminiscencia de los diversos compuestos de acridinio tal como se describió para los conjugados de proteína en el ejemplo 16. Se diluyó en series una solución, normalmente 1 mg/mL en DMF, de los diversos compuestos purificados por HPLC en fosfato de 10 mM, pH 8, que contenía NaCl de 150 mM, BSA al 0.05% y azida de sodio al 0.01% y luego se realizaron mediciones de quimioluminiscencia en un luminómetro (MLA1™, Bayer Diagnostics). Se asignó un valor de 1.0 al rendimiento cuántico relativo de NSP-DMAE.

20 La longitud de onda de emisión de los compuestos de acridinio se midió usando una cámara de FSSS (Fast Spectral Scanning System o sistema de barrido espectral rápido) de Photoresearch Inc. En una medición típica, se diluyeron 25-50 uL de una solución de 1 mg/mL en DMF del compuesto de acridinio con DMF (~0.3 mL). Se provocó la quimioluminiscencia por adición de los dos reactivos descritos en el ejemplo 10. Precisamente antes de adicionar el segundo reactivo, se abrió el obturador de la cámara y se recolectó luz durante 5 segundos. El dato de salida del instrumento es un gráfico de intensidad de luz vs. longitud de onda. Los máximos de emisión para cada compuesto están listados en la tabla 1.

Ejemplo 18

Inmunoensayo de teofilina usando compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico como etiqueta quimioluminiscente

30 Se ensayó un compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico como una etiqueta en un inmunoensayo competitivo para comparación con un compuesto de acridinio de control usado por separado como una etiqueta en el mismo inmunoensayo competitivo. Una etiqueta es un átomo, molécula, compuesto, ion, radical o macromolécula, que al conjugarse o acomplejarse en un ligando, o al conjugarse o acomplejarse en un receptor, permite la identificación, evaluación, caracterización, detección o medición, cualitativas o cuantitativas, de un analito o analitos en un ensayo.

40 En este ejemplo, el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG era la etiqueta a ensayarse y a compararse con el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG, la cual es la etiqueta existente en el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS: 180® comercializada en el mercado. El compuesto de acridinio de control NSPDMAE-HEG se denomina de control porque es la etiqueta existente en el producto disponible comercialmente, el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®.

45 El compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG tiene un rendimiento cuántico superior que el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG, el cual tiene un rendimiento cuántico más bajo. Al usarse como etiqueta en el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, se esperaba que el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG mejorará el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® al compararse con el compuesto de acridinio de control con rendimiento cuántico más bajo NSP-DMAE-HEG, cuando sea usado también por separado en el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®.

50 Un ensayo, que es sinónimo de prueba, es un método, una reacción o el acto de identificación, evaluación, caracterización, detección o medición, cualitativas o cuantitativas, de las propiedades o de la cantidad de una sustancia, sustancias, analito o analitos o sus partes.

El ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® es uno de una serie de inmunoensayos comercializados en el mercado, manufacturado por Bayer Diagnostics para aplicación en el Bayer Diagnostics ACS:180® (Automated Chemiluminescent Immunoassay System o sistema de inmunoensayo quimioluminiscente automatizado).

5 Un inmunoensayo, que es sinónimo de un ensayo inmunológico o un ensayo inmunoquímico, es un método, una reacción o el acto de identificación cualitativa o cuantitativa, evaluación, caracterización, detección o medición de las propiedades o de la cantidad de una sustancia, sustancias, analito o analitos o sus partes por acción de un antígeno, epítipo, hapteno, ligando, soporte o macromolécula con un receptor que usualmente es un anticuerpo u otro receptor biológico.

10 El ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® es un inmunoensayo competitivo que usa un conjugado de compuesto de acridinio quimioluminiscente de teofilina, el cual es NSP-DMAE-HEG-teofilina, para medición de teofilina en una muestra.

Una muestra es un material que puede contener un analito o analitos. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la muestra fue en suero que puede contener analito.

15 Un analito es una sustancia o sustancias que pueden estar presentes en una muestra y que pueden ser, cualitativa o cuantitativamente, identificadas, evaluadas, caracterizadas, detectadas o medidas en un ensayo. En referencia el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el analito es teofilina.

20 Tanto el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG como el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG fueron etiquetas conjugadas con un ligando. Un ligando es un átomo, molécula, compuesto, ion o radical que se enlazan específicamente a una macromolécula, y la macromolécula es un receptor. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el ligando es teofilina.

Un compuesto de acridinio conjugado con un ligando es un marcador. Un marcador es un conjugado o complejo de una etiqueta con un ligando, pues un conjugado o complejo de una etiqueta con un receptor, el cual por acción de la etiqueta permite, cuantitativa o cualitativamente, la identificación, evaluación, caracterización, detección o medición de un analito o analitos en un ensayo.

25 En el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS: 180® los reactivos se mezclaron con la muestra para iniciar la reacción de ensayo. Un reactivo es una sustancia o sustancias que tienen acción química con otras sustancias u otras sustancias, pero más específicamente con respecto a un ensayo, un reactivo de ensayo es una sustancia o sustancias distintas de, que no incluyen, la muestra, las cuales reaccionarán con un analito si el analito está presente en una muestra.

30 Con referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, hubo dos reactivos de ensayo. El primer reactivo de ensayo fue la fase sólida. La fase sólida es un reactivo de ensayo que consiste en un ligando o un receptor conjugado a, o acomplexado con, directa o indirectamente, un material separable. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la fase sólida es un receptor sobre partículas paramagnéticas, separables magnéticamente.

35 Un receptor es una macromolécula que enlaza específicamente uno o más analitos, antígenos, átomos, compuestos, epítipos, haptenos, iones, ligandos, moléculas, radicales, marcadores u otros receptores. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el receptor es un anticuerpo anti-teofilina que enlaza tanto el analito, que es teofilina, como el marcador.

40 El segundo reactivo de ensayo es el marcador. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el marcador, que es sinónimo de reactivo luminiscente, es un conjugado de una etiqueta, que es un compuesto de acridinio, y ligando, que de modo similar al analito es teofilina. Puesto que, en referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el ligandos teofilina y es igual al analito, que también es teofilina, tanto el analito como el marcador se enlazarán al receptor en la mezcla de reacción.

45 La mezcla de reacción es una combinación de reactivos, pero más específicamente con respecto a un ensayo, la mezcla de reacción del ensayo es una combinación de la muestra y de reactivos de ensayo en un ensayo o reacción de ensayo. Una reacción es la acción de una sustancia o sustancias sobre otra sustancia u otras sustancias, pero más específicamente con respecto a un ensayo, la reacción de ensayo es la acción de reactivos de ensayo sobre una muestra en un ensayo.

50 En referencia el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la mezcla de reacción de ensayo contiene la muestra, la fase sólida y el marcador, y la reacción de ensayo es la acción de la fase sólida y el marcador sobre la muestra, que puede contener analito.

En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la reacción de ensayo es el enlazamiento tanto del analito, que es teofilina si está presente en la muestra, como del marcador, que es el conjugado de compuesto de acridinio del ligando teofilina, a la misma fase sólida, que enlaza tanto un analito como un marcador en cualquier receptor, pero no enlaza un analito y un marcador al mismo tiempo en el mismo receptor.

5 Puesto que la fase sólida tiene una cantidad más pequeña de receptor con respecto a la cantidad total del analito, cuando está presente en la muestra, entonces el total de la cantidad de analito más el marcador en la mezcla de reacción de ensayo es mayor que la cantidad del receptor en la fase sólida. De esta manera, el total de la cantidad del analito más el marcador no pueden enlazarse a la fase sólida en su totalidad.

10 Por consiguiente, la presencia de analito en una muestra bloqueará o competirá con el enlazamiento del marcador a la fase sólida en la mezcla de reacción de ensayo, donde la cantidad de bloqueo o competencia depende de la cantidad de analito presente en la muestra.

15 Por lo tanto, la cantidad de analito en una muestra es inversamente correlacionada a la cantidad de marcador que se enlazarán a la fase sólida en una mezcla de reacción de ensayo. En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el analito, que es teofilina si está presente en la muestra, bloquea o compete con el marcador, el cual es un conjugado de compuesto de acridinio de teofilina, para una cantidad limitada de anticuerpo anti-teofilina, que es el receptor sobre partículas para magnéticas separables magnéticamente.

20 El sistema Bayer Diagnostics ACS: 180® efectuó automáticamente los siguientes pasos para el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®. Primero, se dosificaron 0.020 mL de cada una de las 14 muestras en una cubeta separada. Una cubeta es un contenedor ópticamente transparente o traslúcido que contiene la mezcla de reacción del ensayo y en el cual tiene lugar la reacción del ensayo.

25 Las 14 muestras contenían cada una cantidades conocidas, separadas de teofilina. Las cantidades de teofilina dadas a concentraciones en cada una de estas 14 muestras fueron 0, 1.40, 2.10, 2.80, 4.20, 5.60, 9.21, 15.6, 32.7, 68.3, 129, 288, 500, y 1000 micromolar. Las cantidades de teofilina dadas como números de moléculas en cada una de estas mismas 14 muestras fueron 0, 0.028, 0.042, 0.056, 0.084, 0.112, 0.184, 0.313, 0.655, 1.37, 2.59, 5.76, 10.0, y 2.00 picomoles, respectivamente.

A continuación, el sistema Bayer Diagnostics ACS:180® dosificó dos reactivos de ensayo juntos en cada cubeta y mezcló los reactivos de ensayo con la muestra dentro de cada cubeta. El primero de los dos reactivos de ensayo fue 0.450 mL de fase sólida, que contenía 8.7 picomoles de anticuerpo anti-teofilina sobre partículas paramagnéticas separables magnéticamente.

30 El segundo de los dos reactivos de ensayo fue 0.100 mL de marcador, el cual era 0.026 picomoles de compuesto de acridinio conjugado con teofilina. Tanto el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG como el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG fueron ensayados por separado como etiquetas conjugadas con teofilina en forma de dos marcadores: NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-teofilina y NSP-DMAE-HEG-teofilina, respectivamente.

35 La reacción de ensayo procedió durante 7.5 minutos a 37°C. El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® término del ensayo de teofilina de ACS:180® separando magnéticamente la fase sólida de otros reactivos de ensayo, retirando luego el fluido de la cubeta y lavando después la fase sólida en la cubeta con agua.

40 La quimioluminiscencia del compuesto de acridinio sobre la fase sólida fue iniciada con subsiguiente emisión de luz, con adiciones secuenciales de 0.30 mL de cada reactivo 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® y reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180®. El reactivo 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® era ácido nítrico de 0.1 M y peróxido de hidrógeno 0.5 %. El reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180® era hidróxido de sodio de 0.25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0.05 %.

45 El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® midió la quimioluminiscencia en cada cubeta y cada cubeta correspondía a una muestra individual ensayada. El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® midió la quimioluminiscencia como unidades de luz relativas (RLUs). En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la cantidad de analito se correlaciona de modo inverso con la cantidad de marcador que se enlazarán a la fase sólida.

50 Por consiguiente, la cantidad de analito se correlaciona de manera inversa con el número de RLUs medido por el sistema Bayer Diagnostics ACS:180®. Esto significa que cuanto mayor sea la cantidad del analito en una muestra entonces se miden menos RLUs con respecto a cantidades más bajas del analito teofilina en una muestra donde se miden más RLUs.

Se calculó una normalización a porcentaje medido en ausencia del analito para comparación de la quimioluminiscencia relativa para cada cantidad de analito para el compuesto de acridinio con alto rendimiento

cuántico, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG, en comparación con el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG.

5 El mayor espaciamento entre los valores de quimioluminiscencia para cantidades sucesivas de analito es un indicador de sensibilidad mejorada. La mayor diferencia de quimioluminiscencia entre cantidades pequeñas de analito a partir de la quimioluminiscencia obtenida en ausencia de analito permite diferenciar mejor cantidades pequeñas de analito y la ausencia de analito en ensayo competitivo, mejorando de esta manera la sensibilidad.

10 En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® relativo a la etiqueta con rendimiento cuántico más bajo NSP-DMAE-HEG, el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG generó mayor diferenciación entre cantidades pequeñas de teofilina y la ausencia de teofilina cuando se usó como etiqueta de inmunoensayo competitivo.

15 La pendiente de la línea generada para cada marcador usando el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® es un indicador de sensibilidad. Cuanto mayor sea la magnitud absoluta de la pendiente de la línea para un marcador o etiqueta particular en un inmunoensayo competitivo, más distante está la quimioluminiscencia para una cantidad particular de analito de la quimioluminiscencia de una muestra sin analito y el ensayo es más capaz de medir la diferencia entre la presencia de analito y la ausencia de analito.

En referencia al ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, la etiqueta compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG dio una pendiente mejorada relativa a la etiqueta compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG.

20 La mayor magnitud absoluta de la pendiente generada por la etiqueta compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico tanto para las cantidades altas como particularmente para las cantidades bajas de teofilina, en relación con el compuesto de acridinio de control y NSP-DMAE-HEG, indica un mejoramiento de sensibilidad para el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® usando compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como etiquetas de inmunoensayo.

25 Para el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180®, el cual es un inmunoensayo competitivo, la sensibilidad es la cantidad mensurable menor, no cero, de analito. La cantidad mensurable menor, no cero, del analito en el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® es la cantidad de analito correspondiente a la quimioluminiscencia medida mayor que es menos que la diferencia de la quimioluminiscencia medida en ausencia de analito menos dos desviaciones estándar de la quimioluminiscencia medida en ausencia de analito.

Por ejemplo, en inmunoensayos competitivos donde se dan las representaciones siguientes:

30 $n =$ número entero positivo mayor a 0.

$x =$ la cantidad medida de analito correspondiente a y , donde $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$ son cantidades medidas sucesivamente más grandes del analito.

$y =$ la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito, representada por x , donde $y_0 > y_1 > y_2 > y_3 > \dots >$

35 y_n son valores sucesivamente menores de quimioluminiscencia, medida para $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$, respectivamente.

$x_0 =$ una cantidad cero de analito o la cantidad de analito igual a cero.

$y_0 =$ la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito igual a cero, que es x_0 .

$s =$ una desviación estándar de y_0 .

Luego, la sensibilidad = x_n para $y_n < y_0 - 2s$, cuando $n =$ el número entero menor, positivo, no cero.

40 La sensibilidad para el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® usando el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG fue de 1.4 μM . La sensibilidad para el ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® usando el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG fue de 4.2 μM . El cociente de 4.2 μM y 1.4 μM es 3.

45 El ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® usando el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico como una etiqueta midió una cantidad de teofilina que era tres veces más pequeña que el ensayo de

teofilina comercializados en el mercado Bayer Diagnostics ACS:180® que usó los compuestos de acridinio de control con rendimiento cuántico más bajo, o una etiqueta.

5 El compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG mejoró la sensibilidad del ensayo de teofilina de Bayer Diagnostics ACS:180® tres veces al compararse con el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG.

El ejemplo establece que cuando se usa como etiquetas de inmunoensayo quimioluminiscente, la emisión de luz quimioluminiscente mejorada desde los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico mejorar la sensibilidad de inmunoensayos competitivos.

Ejemplo 19

10 Inmunoensayo de TSH usando compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como etiquetas quimioluminiscentes

Se ensayaron compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como etiquetas en un inmunoensayo de sándwich para comparación con los compuestos de acridinio de control usados por separado como etiquetas en el mismo inmunoensayos de sándwich.

15 En este ejemplo, los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC fueron las etiquetas quimioluminiscentes que iban a ensayarse y a compararse con el compuesto de acridinio de control NSP-DMAEHEG-glutarato.

20 Los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico tienen rendimientos cuánticos superiores que el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato, y se espera que mejoren el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®.

El ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® es un inmunoensayo de sándwich que usa un conjugado de compuesto de acridinio quimioluminiscente de anticuerpo anti-TSH, para medición de TSH (Thyroid Stimulating Hormone, u hormona estimulante de tiroides) en una muestra.

25 Una muestra es un material que puede contener un analito o unos analitos. En referencia al ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®, la muestra era suero que podía contener analito un analito es una sustancia o una sustancias que pueden estar presentes en una muestra y que pueden cualitativa o cuantitativamente identificarse, evaluarse, caracterizarse, detectarse o medirse en un ensayo.

30 En referencia al ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®, el analito es TSH. Tanto los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato fueron etiquetas conjugadas con anticuerpos.

En referencia al ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®, había dos anticuerpos, uno de los cuales estaba etiquetado con el compuesto de acridinio y fue llamado el marcador, mientras que el otro estaba unido covalentemente a una fase sólida de partículas paramagnéticas (PMP).

35 En el ensayo de TSH3 de ACS:180®, la mezcla de ensayo contiene muestra, marcador y fase sólida, y la reacción de ensayo es la acción del marcador y la fase sólida sobre la muestra que puede contener analito. Puesto que el marcador se enlaza al analito y el analito se enlaza a la fase sólida, se forma un 'sándwich' de tres partes: de marcador, analito y fase sólida.

40 Por consiguiente, la presencia de analito en una muestra causará el enlazamiento del marcador a través del analito con la fase sólida en la mezcla de reacción de ensayo, donde la cantidad de marcador enlazado con la fase sólida depende de la cantidad de analito presente en la muestra.

45 El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® efectuó automáticamente los siguientes pasos para el ensayo de TSH3. Primero, se dosificaron 200 mL de cada una de las 12 muestras a una cubeta separada. Una cubeta es un contenedor ópticamente transparente o traslúcido que contiene la mezcla de reacción de ensayo y en el cual tiene lugar la reacción de ensayo. Las 12 muestras contienen cada una cantidades conocidas separadas de THS.

Las cantidades de TSH dadas como concentraciones en cada una de estas 12 muestras fueron 0, 0.002, 0.004, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.10, 1.0, 10 y 100 mIU/L. A continuación, el sistema Bayer Diagnostics

ACS:180® dosificó los dos reactivos de ensayo juntos a cada cubeta y mezcló los reactivos de ensayo con la muestra dentro de cada cubeta.

5 El primero de los dos reactivos de ensayo fue 0.100 mL de marcador, el cual contenía 0.22 picomoles de anticuerpo anti-TSH conjugado con compuestos de acridinio. Tanto los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato se ensayaron por separado como etiquetas conjugadas con el anticuerpo anti-TSH. La reacción de ensayo se efectuó durante 2.5 minutos a 37 °C.

El segundo de los dos reactivos de ensayo fue 0.225 mL de fase sólida, que era anticuerpo anti-TSH conjugado con micropartículas paramagnéticas. La reacción de ensayo se efectuó por 5.0 minutos a 37°C. La reacción de ensayo siguió por un total de 7.5 minutos a 37°C.

10 El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® acabó el ensayo de TSH3 de ACS:180® separando magnéticamente la fase sólida de los otros reactivos de ensayo, retirando luego el fluido de la cubeta y lavando luego la fase sólida en la cubeta con agua.

15 Se inició quimioluminiscencia de compuesto de acridinio sobre la fase sólida con la subsiguiente emisión de luz, con adiciones secuenciales de 0.30 mL de cada reactivo 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® y reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180®. El reactivo 1 de Bayer Diagnostics ACS:180® era ácido nítrico de 0.1 M y peróxido de hidrógeno al 0.5 %. El reactivo 2 de Bayer Diagnostics ACS:180® era hidróxido de sodio de 0.25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0.05 %.

20 El sistema Bayer Diagnostics ACS:180® midió la quimioluminiscencia como unidades de luz relativas (RLUs) en cada cubeta y cada cubeta corresponde a una muestra individual ensayada. En el ensayo, la cantidad de analito se correlaciona con la cantidad de marcador que se enlazarán a la fase sólida.

Por consiguiente, la cantidad de analito se correlaciona con el número de RLUs medidos por el sistema Bayer Diagnostics ACS:180®. Esto significa que cuanto mayor sea la cantidad de analito TSH en una muestra, mayor será la cantidad de RLUs que se miden con respecto a cantidades más bajas del analito TSH en una muestra donde se miden menos RLUs.

25 Las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron quimioluminiscencia mejorada para todas las cantidades de analito.

30 Ruido es la porción de quimioluminiscencia en un inmunoensayo de sándwich de una muestra que se debe al marcador que se enlaza de modo específico a la fase sólida y el cual se mide en muestras que no contienen analito. Señal es la porción de la quimioluminiscencia debido al enlazamiento específico del marcador a la fase sólida cuando el analito está presente en la muestra.

La quimioluminiscencia total medida en el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® para muestras que sí contienen analito es la suma de señal más ruido, donde la señal se calcula como la diferencia de la quimioluminiscencia total menos el ruido.

35 La sensibilidad de ensayo se define con frecuencia como la cantidad mensurable mínima del analito. Para el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®, el cual es un inmunoensayo de sándwich, la sensibilidad es la cantidad diferente de cero mínimamente mensurable del analito. La cantidad distinta de cero mínimamente mensurable de analito es la cantidad de analito que corresponde a la luminiscencia mínima medida que es mayor que la suma del ruido más dos desviaciones estándar del ruido.

40 En el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180®, señal y ruido se determinaron para cada marcador ensayado. La proporción de la señal dividida por el ruido en un inmunoensayo de sándwich para una cantidad particular de analito es un indicador de la sensibilidad del inmunoensayo de sándwich. Cuanto mayor sea la proporción de señal a ruido para una cantidad particular de analito en un inmunoensayo de sándwich, más distante es la señal correspondiente desde el ruido y más capaz es el ensayo de medir la diferencia entre la señal y el ruido.

45 En el actual ensayo, las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron proporciones mejoradas de señal a ruido para cantidades de analito relativas a la etiqueta compuesta de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato.

50 La mayor relación de señal a ruido generadas por las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico tanto para las cantidades altas como particularmente para las cantidades bajas de TSH, relativas a los compuestos de acridinio de control DMAE y NSP-DMAE-HEG-glutarato, indican un mejoramiento de sensibilidad

para el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® usando compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico como etiquetas de inmunoensayo.

5 La pendiente de la línea generada para cada marcador usando el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® es un indicador de sensibilidad. Cuanto mayor sea la pendiente de la línea para un marcador o etiqueta particular en un inmunoensayo de sándwich, más distante es la señal para una cantidad particular de analito del ruido y más capaz es el ensayo de medir la diferencia entre la señal y ruido.

10 En el ensayo actual, las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato dieron pendientes mejoradas en relación con la etiqueta compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato.

15 Las pendientes mayores generadas por las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico tanto para las cantidades altas como particularmente para las cantidades bajas de TSH, relativas a los compuestos de acridinio de control DMAE y NSP-DMAE-HEGglutarato, indican una mejora de sensibilidad para el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® usando compuestos de acridinio de alto rendimiento cuántico como etiquetas de inmunoensayo.

La sensibilidad de medidas para el ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics ACS:180® usando las etiquetas compuestas de acridinio con alto rendimiento cuántico NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE, NSP-2,7-(OMTEG)₂-DMAE-HEG-glutarato, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC y NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-HEG-glutarato se mejoraron en comparación con las sensibilidades medidas usando el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato.

20 La sensibilidad de ensayo se define con frecuencia como la cantidad mínima mensurable de analito. En el actual inmunoensayo de sándwich, la cantidad distinta de cero mínima mensurable de analito es la cantidad de analito correspondiente a la quimioluminiscencia mínima medida que es mayor que la suma del ruido más dos desviaciones estándar del ruido.

Por ejemplo, en inmunoensayos de sándwich donde se dan las siguientes representaciones:

25 n = número entero positivo mayor que 0.

x = la cantidad medida de analito correspondiente a y , donde $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$ son cantidades medidas sucesivamente mayores de analito.

y = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito, representada por x , donde $y_0 < y_1 < y_2 < y_3 < \dots <$

30 y_n son valores sucesivamente mayores de quimioluminiscencia, medidos para $x_0 < x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_n$, respectivamente.

x_0 = una cantidad cero de analito o la cantidad de analito igual a cero.

y_0 = la quimioluminiscencia medida para una cantidad de analito igual a cero, la cual es x_0 .

s = una desviación estándar de y_0 .

Luego, la sensibilidad = x_n para $y_n > y_0 + 2s$, cuando n = el número entero mínimo, positivo, distinto de cero.

35 Los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico mejoraron la sensibilidad del ensayo de TSH3 de Bayer Diagnostics Acts:180® 1.5 a 7.5 veces al compararse con el compuesto de acridinio de control NSP-DMAE-HEG-glutarato. El ejemplo establece que cuando se usan como etiquetas de inmunoensayo quimioluminiscente, la emisión de luz quimioluminiscente de los compuestos de acridinio con alto rendimiento cuántico mejora la sensibilidad de inmunoensayos de sándwich.

40 **Definiciones**

Análogo: Un compuesto químico con alguna similitud estructural con otro compuesto diferente.

Analito: Una sustancia o unas sustancias en una muestra que van a identificarse, evaluarse, caracterizarse, detectarse o medirse en un ensayo.

Ensayo: El método, la reacción o el acto de identificación, evaluación, caracterización, detección o medición, cualitativas o cuantitativas, de las propiedades o de la cantidad de una sustancia, sustancias, analito o analitos o sus partes; y es sinónimo de prueba.

5 Antígeno: Una sustancia que tiene la producción de anticuerpos, o una respuesta de sistema inmune, generalmente contra un determinante o unos determinantes específicos.

Anticuerpo (inmunoglobulinas, inmuno gamma globulina, inmuno globulina, inmuno suero globulina, inmunoglobulina): una proteína que normalmente puede enlazar antígeno, produciendo de esta manera una respuesta inmune.

Reacción de ensayo: la acción de reactivos de ensayo sobre una muestra en un ensayo.

10 Mezcla de reacción de ensayo: una mezcla de muestra y reactivos de ensayo en un ensayo o reacción de ensayo.

Soporte: una sustancia, generalmente una macromolécula, conjugada o acomplejada con uno o más antígenos, átomos, compuestos, epítopos, haptenos, iones, etiquetas, ligandos, moléculas, radicales o receptores.

15 Inmunoensayo competitivo (generalmente sinónimo de ensayo de enlazamiento competitivo, ensayo del ligando, ensayo de receptor de ligando, ensayo de hapteno, ensayo de enlazamiento de saturación): Un subconjunto de inmunoensayo donde la cantidad de receptor es menos que la cantidad de ligando y se basa en el enlazamiento competitivo entre un ligando etiquetado (marcador) y ligando no etiquetado (analito) para un receptor, o con base en el enlazamiento competitivo entre un ligando inmovilizado y un ligando no inmovilizado (analito) para un receptor etiquetado.

20 Complejo: una unión no covalente de uno o más átomos, moléculas, compuestos, iones por radicales con uno o más átomos, moléculas, compuestos, iones o radicales.

Complejamiento: formación de un complejo.

Conjugado: el acto de una unión covalente de una molécula o moléculas, compuesto o compuestos con uno o más átomos, moléculas, compuestos, iones o radicales que forman una nueva molécula.

Conjugación: formación de un conjugado.

25 Determinante: una molécula o característica específica sobre la superficie de un microbio o macromolécula que provoca una respuesta inmune.

Epítipo: un sitio específico sobre una macromolécula al cual puede enlazarse un anticuerpo específico.

30 Hapteno: una pequeña molécula que no puede iniciar por si misma una respuesta inmune pero puede actuar como un antígeno al acomplejarse o conjugarse con un soporte más grande y de esta manera puede iniciar producción específica de anticuerpo al cual puede enlazarse a continuación.

Inmunoensayo heterogéneo: método de inmunoensayo que incluye pasos para separación de sustancias enlazadas de sustancias no enlazadas.

Inmunoensayo homogéneo: método de inmunoensayo que no tiene pasos para separación de sustancias enlazadas de sustancias no enlazadas.

35 Inmunoensayo: el método, la reacción o el acto de identificación, evaluación, caracterización, detección o medición, cualitativas o cuantitativas, de las propiedades o de la cantidad de una sustancia o de un analito o de sus partes por acción de un antígeno, epítipo, hapteno, ligando, soporte o macromolécula con un receptor que usualmente es un anticuerpo u otro receptor biológico; y es sinónimo de ensayo inmunológico o ensayo inmuoquímico.

40 Etiqueta: un átomo, molécula, compuesto, ion, radical o macromolécula que al conjugarse o acomplejarse en un ligando o en un receptor permite cualitativa o cuantitativamente identificar, evaluar, detectar o medir un analito en un ensayo.

Ligando: un átomo, moléculas, compuesto, ion o radical que se enlaza específicamente a una macromolécula (por ejemplo, una hormona es un ligando para su receptor).

Macromolécula: una molécula grande con un peso molecular mayor a 1,000 daltons.

Muestra: material biológico que contiene potencialmente un analito o unos analitos.

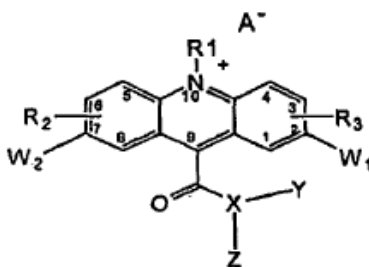
Marcador: un reactivo de inmunoensayo hecho de un conjugado o complejo de una etiqueta con un ligando o un receptor, el cual por acción de la etiqueta permite cualitativa o cuantitativamente identificar, evaluar, detectar o medir un analito en un ensayo.

- 5 Receptor: una macromolécula que puede enlazar específicamente uno o varios antígenos, átomos, compuestos, epítomos, haptenos, iones, etiquetas, ligandos, moléculas, radicales, otros receptores o marcadores.

REIVINDICACIONES

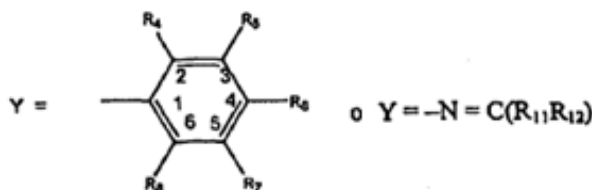
- 5 1. Un inmunoensayo heterogéneo mejorado para la detección o cuantificación de un analito usando un compuesto de acridinio hidrofílico, con alto rendimiento cuántico, que contiene grupos funcionales donadores de electrones en la posición C-2 y/o la posición C-7 del anillo de acridinio, donde el compuesto de acridinio con alto rendimiento cuántico tiene un rendimiento de luz cuántico relativo mayor que 1 al compararse con un compuesto de acridinio correspondiente sin grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio, en cuyo caso el grupo funcional donantes de electrones se selecciona del grupo consistente en $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ y $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OMe}$, donde $n = 0-5$.
- 10 2. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 1, donde el compuesto de acridinio se selecciona del grupo consistente en ésteres de acridinio y sulfonamidas de acridinio.
3. Un inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 1 para la cuantificación de un analito macromolecular que comprende:
- 15 a) proporcionar un conjugado de una molécula de enlazamiento específica para un analito macromolecular con el compuesto de acridinio hidrofílico, quimioluminiscente, con alto rendimiento cuántico, que contiene grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;
- b) proporcionar una fase sólida inmovilizada con una segunda molécula específica para dicho analito macromolecular;
- c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que contiene el analito para formar un complejo de enlazamiento;
- 20 d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;
- e) provocar la quimioluminiscencia del complejo de enlazamiento de d) adicionando reactivos que provocan quimioluminiscencia;
- f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y
- 25 g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito mediante comparación de la cantidad de luz emitida de la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
4. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 1 para la cuantificación de un analito de molécula pequeña que comprende los siguientes pasos:
- 30 (a) proporcionar un conjugado de un analito con el compuesto de acridinio hidrofílico, quimioluminiscente, con alto rendimiento cuántico, que contienen grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;
- (b) proporcionar una fase sólida inmovilizada con una molécula de enlazamiento específica para el analito;
- (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra en la que supuestamente está contenido el analito para formar un complejo de enlazamiento;
- 35 (d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;
- (e) provocar la quimioluminiscencia del complejo de enlazamiento de d) mediante adición de reactivos que provocan quimioluminiscencia;
- (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- 40 (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida de la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
5. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 1 para la cuantificación de un analito de molécula pequeña que comprende los siguientes pasos:

- (a) proporcionar una fase sólida inmovilizada con un analito o un análogo de analito;
- (b) proporcionar un conjugado de una molécula de enlazamiento para el analito con el compuesto de acridinio hidrofílico, quimioluminiscente, con alto rendimiento cuántico, que contienen grupos funcionales donantes de electrones en la posición C-2 y/o C-7 del anillo de acridinio;
- 5 (c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra en la que supuestamente está contenido el analito para formar un complejo de enlazamiento;
- (d) separar el complejo de enlazamiento capturado sobre la fase sólida;
- (e) provocar la quimioluminiscencia del complejo de enlazamiento de d) mediante adición de reactivos que provocan quimioluminiscencia;
- 10 (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito mediante comparación de la cantidad de luz emitida de la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
6. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 1, donde el compuesto de acridinio hidrofílico, con alto rendimiento cuántico, tienen la siguiente estructura:
- 15



donde,

- R₁ es un alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos;
- 20 R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son hidrógeno, haluros o R donde R es un alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos en posiciones distintas de C(2) y C(7);
- W₁ y W₂ son iguales o diferentes grupos funcionales donantes de electrones.
- A⁻ es un contraion que se introduce para emparejarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo consistente en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃HCOO⁻, y NO₃⁻;
- 25 X es oxígeno o nitrógeno;
- de modo que cuando X es oxígeno, se omite Z e Y se selecciona del grupo consistente en un residuo arilo sustituido de la fórmula:



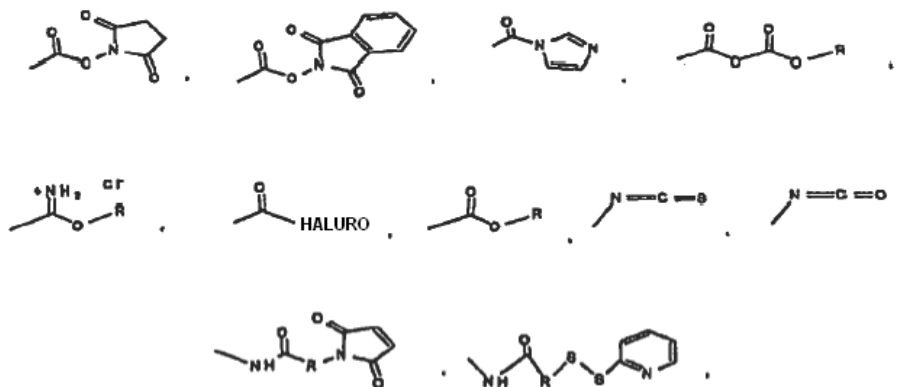
donde R_4 y R_8 son hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alcoilo (-OR), alquiltiol (-SR), o grupos -NR₂ donde R en el nitrógeno pueden ser iguales o diferentes, R es un alquilo, alqueno, alquino, arilo, o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos, preferiblemente R_4 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 pueden ser iguales o diferentes;

R_5 y R_7 son iguales o diferentes y son hidrógeno o igual es que R;

5 $R_6 = -R_9-R_{10}$,

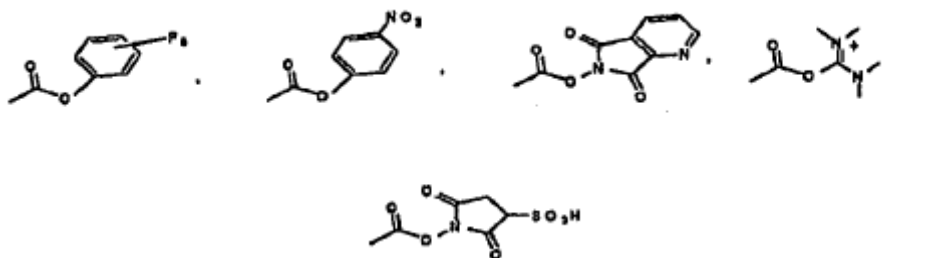
donde no se requiere R_9 y es alquilo ramificado o de cadena recta, arilo sustituido o no sustituido o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos, y

R_{10} es un grupo de salida o un grupo funcional electrofílico unido con un grupo de salida seleccionado del grupo consistente en:



10

-SO₂Cl, -N₃, -N₂⁺Cl⁻,

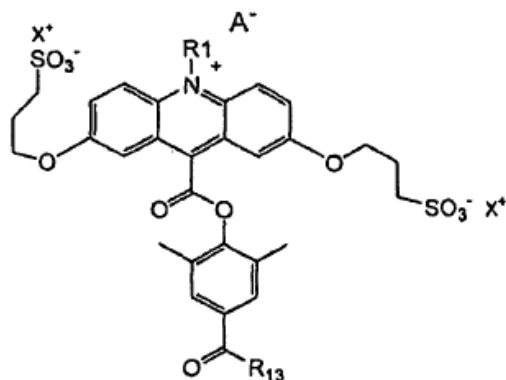


un haluro o -COOH;

R_5 y R_6 , y R_5 y R_7 son intercambiables;

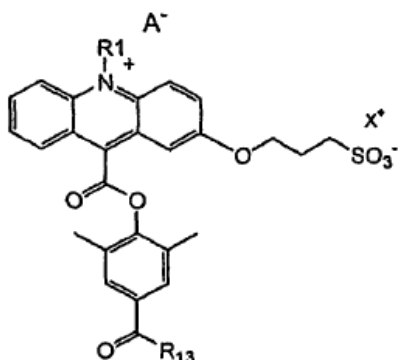
15 R_{11} y R_{12} son iguales que R_6 definido arriba y pueden ser iguales o diferentes; y cuando X es nitrógeno, Y es igual que R_6 definido arriba, Z es -SO₂-Y', e Y' es un grupo arilo sustituido o no sustituido o una cadena ramificada o recta.

7. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 6, donde el compuesto de acridinio tienen la siguiente estructura:



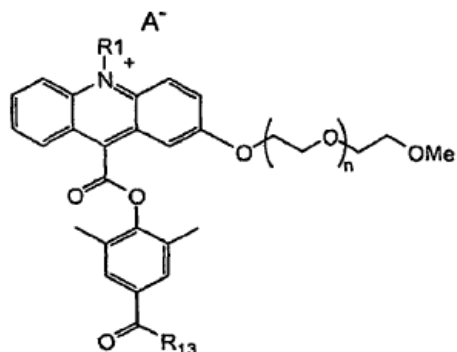
- 5 Donde R_{13} es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo, donde n = 0 a 5, o NH-R-NHR, R_1 es un alquilo, alqueno, alquino o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; A^- es un contraion que se introduce para emparejarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo consistente en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻, y NO₃⁻ y X^+ es un contraion cargado positivamente para emparejarse con el residuo de sulfonato y puede incluir H⁺, Na⁺, K⁺, o NH₄⁺.

8. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 6, donde el compuesto de acridinio tienen la siguiente estructura:



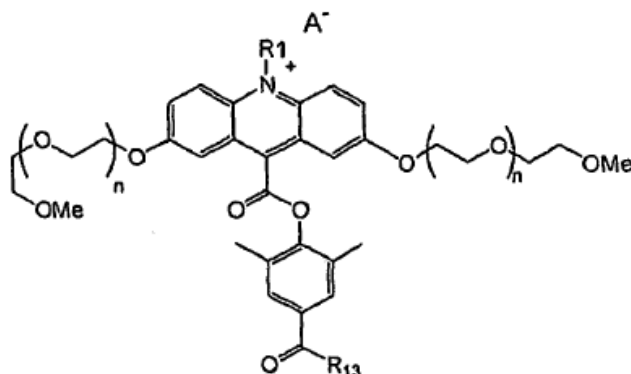
10

9. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 6, donde el compuesto de acridinio tienen la siguiente estructura:



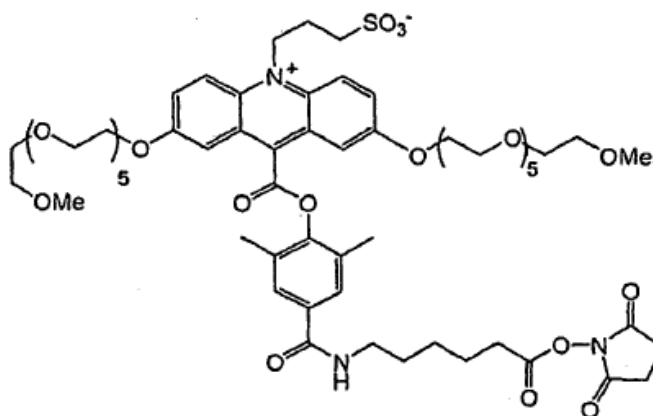
- 15 donde R_{13} es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo, donde n = 0 a 5, o NH-R-NHR, R_1 es un alquilo, alqueno, alquino o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; A^- es un contraion que se introduce para emparejarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo consistente en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻, y NO₃⁻, y n = 0 a 5.

10. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 6, donde el compuesto de acridinio tienen la siguiente estructura:



5 donde R₁₃ es -OH, -O-N-succinimidilo, -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo, -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo donde n = 0 a 5, o -NH-R-NHR, , R₁ es un alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contiene hasta 20 heteroátomos; A⁻ es un contraion que se introduce para emparejarse con el nitrógeno cuaternario de dicho núcleo de acridinio, y se selecciona del grupo consistente en CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻, y NO₃⁻, y n = 0 a 5.

10 11. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 6, donde el compuesto de acridinio tienen la siguiente estructura:



12. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 3, donde el analito macromolecular se selecciona del grupo consistente en proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus y polímeros sintéticos.

15 13. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 4, donde el analito de molécula pequeña se selecciona del grupo consistente en esteroides, vitaminas, hormonas, medicamentos terapéuticos y péptidos pequeños.

14. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 5, donde el analito de molécula pequeña se selecciona del grupo consistente en esteroides, vitaminas, hormonas, medicamentos terapéuticos y péptidos pequeños.

20 15. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 3, donde el analito macromolecular es hormona estimulante de tiroides.

16. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 4, donde el analito de molécula pequeña es teofilina.

17. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 2, donde el compuesto de acridinio es un éster de acridinio.

18. El inmunoensayo heterogéneo de la reivindicación 2, donde el compuesto de acridinio es una sulfonamida de acridinio.

FIG. 1A

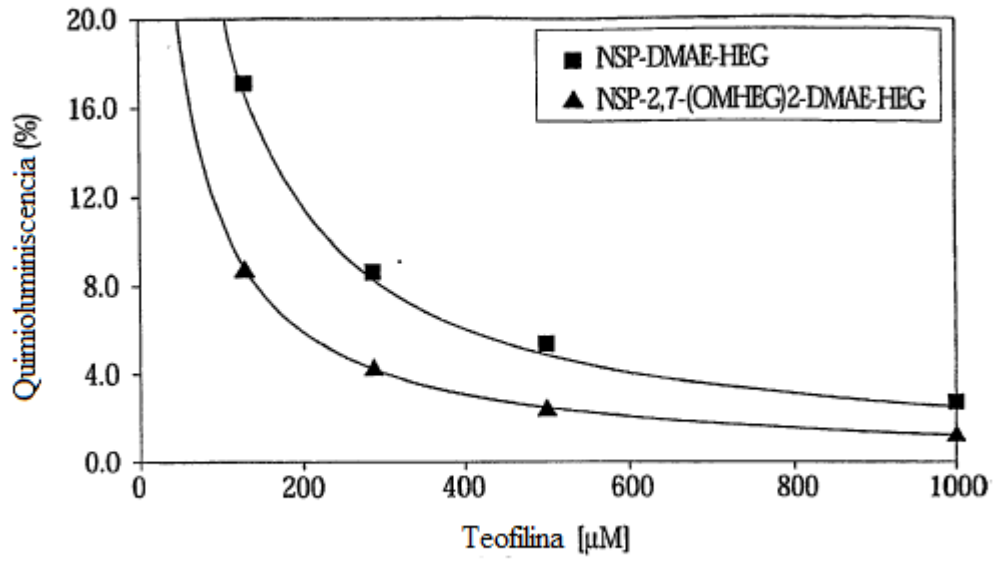


FIG. 1B

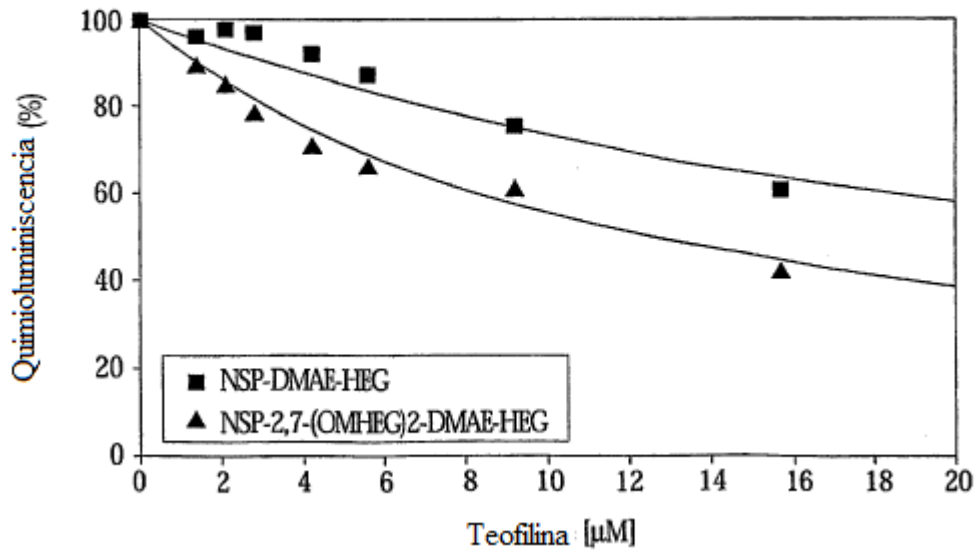


FIG. 2A

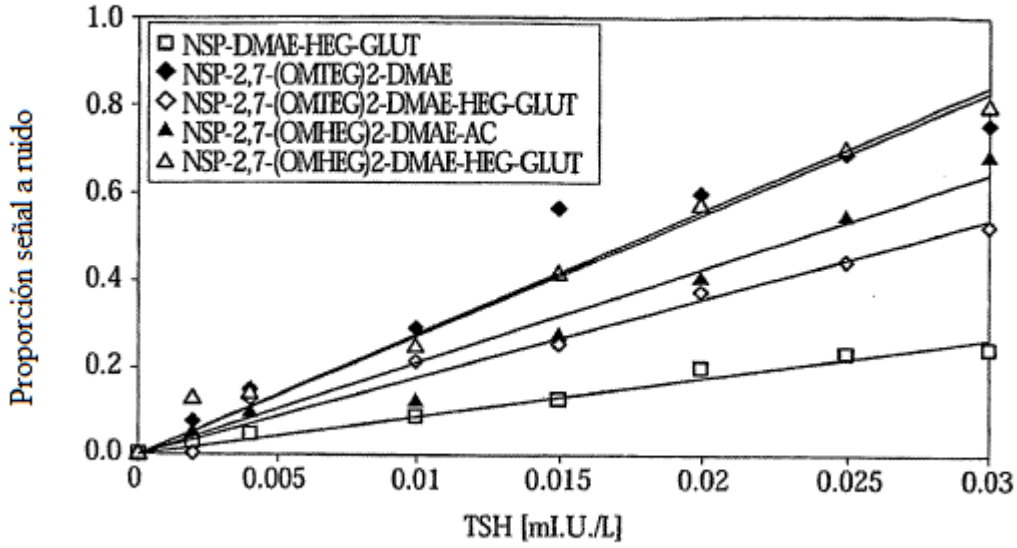


FIG. 2B

