

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 364**

51 Int. Cl.:

C07D 219/04 (2006.01)

C07D 219/14 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010** **E 10830765 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2501681**

54 Título: **Compuestos de acridinio que contienen zwitteriones**

30 Prioridad:

16.11.2009 US 261465 P

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

05.10.2016

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**NATRAJAN, ANAND;
SHARPE, DAVID y
JIANG, QINGPING**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 585 364 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).

COMPUESTOS DE ACRIDINIO QUE CONTIENEN ZWITTERIONES**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de acridinio hidrófilos, quimioluminiscentes que contienen zwitteriones. Estos compuestos de acridinio, debido a su naturaleza hidrófila, presentan baja unión no específica a fases sólidas y son potencialmente útiles para mejorar la sensibilidad de ensayo.

10

Antecedentes

Han aparecido ésteres de acridinio quimioluminiscentes que son marcadores extremadamente útiles tanto para inmunoensayos así como para ensayos de ácidos nucleicos. La emisión de luz desde los ésteres de acridinio se desencadena mediante la reacción con peróxido de hidrógeno alcalino que provoca la escisión del enlace éster fenólico y la formación de acridona en estado excitado, que es la especie que emite luz. Se ha propuesto la formación de un producto intermedio de dioxetanona tras la salida del grupo saliente de fenol en el mecanismo de reacción y se supone que es el precursor para la acridona en estado excitado. La duración de la emisión de luz desde los ésteres de acridinio que, depende de las condiciones de reacción, se completa normalmente en el plazo de unos cuantos segundos y puede medirse cuantitativamente usando un luminómetro. Se dio a conocer la aplicación del éster de acridinio bromuro de 9-carboxifenil-N-metilacridinio en un inmunoensayo por Simpson, J.S.A. *et al.* (Nature vol. 279, págs. 646-647 (1979). Sin embargo, este éster de acridinio es bastante inestable, limitando de ese modo su utilidad comercial. Esta inestabilidad surge de la hidrólisis de la unión éster de 9-carboxifenilo lábil entre el fenol y el anillo de acridinio.

25

En un intento por estabilizar el éster fenólico en ésteres de acridinio, Law *et al.* (Journal of Bioluminescence and Chemoluminescence, vol. 4, págs. 88-89 (1989) introdujeron dos grupos metilo flanqueantes para estabilizar este enlace éster. Se encontró que el éster de acridinio estabilizado estéricamente resultante, abreviado como DMAE-NHS [10-metilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxicarbonil)fenilo] tenía la misma producción de luz que un éster de acridinio que carecía de los dos grupos metilo. Por otra parte, la estabilidad del compuesto anterior cuando se conjugó con una inmunoglobulina era enormemente superior y no mostraba pérdida de actividad de quimioluminiscencia ni siquiera después de una semana a 37°C a pH 7. En cambio, el éster de acridinio no sustituido sólo conservaba el 10% de su actividad cuando se sometía al mismo tratamiento.

30

Para paliar la naturaleza hidrófoba de DMAE y sus derivados, la patente estadounidense n.º 5.656.426 de Law *et al.* dio a conocer una versión hidrófila de DMAE denominada éster de NSP-DMAE-NHS en el que el grupo N-metilo se había reemplazado por un grupo N-sulfopropilo (NSP). Tanto DMAE como NSP-DMAE se usan ahora ampliamente en los analizadores de inmunoensayo comerciales, automatizados ACS:180™ y Centaur™ de Siemens Healthcare Diagnostics.

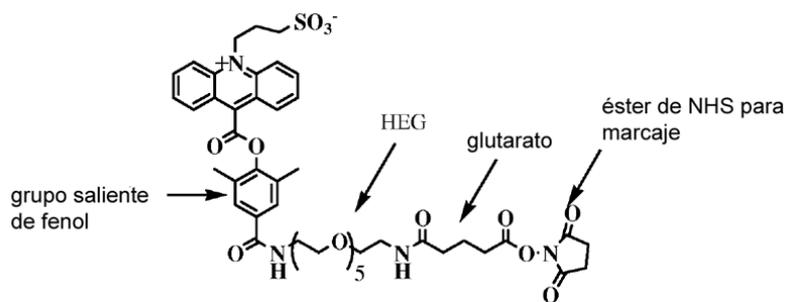
40

Para aumentar adicionalmente la hidrofiliidad de NSP-DMAE, Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2 dieron a conocer derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrófilos tales como poli(etilenglicol) y derivados aniónicos de espermina unidos al fenol. La estructura de un éster de acridinio de este tipo denominado NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS, (abreviado como NSPDMAE-HEG) y que contiene un derivado de hexa(etilenglicol) (HEG) se ilustra en el siguiente dibujo. En este compuesto, se une un resto de α,ω -diamino hexa(etilenglicol) (diamino-HEG) al fenol para aumentar la solubilidad en agua del éster de acridinio. Se añadió un resto glutarato al extremo de diamino-HEG y se convirtió en el éster de NHS para permitir el marcaje de diversas moléculas. Además de HEG, también se dieron a conocer modificadores aniónicos derivados de espermina con grupos sulfonato y carboxilato por Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2.

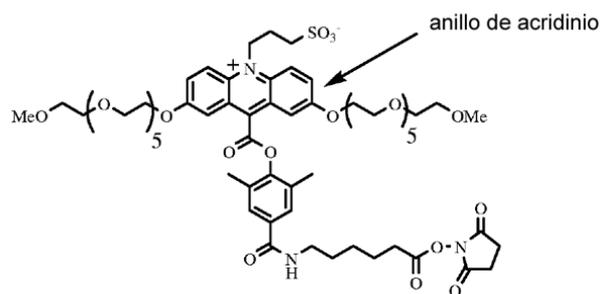
50

Recientemente, Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 7.309.615 B2 describieron compuestos de acridinio hidrófilos, de alto rendimiento cuántico que contienen grupos alcoxilo (OR*) en C₂ y/o C₇ del anillo de acridinio, en los que R* es un grupo que comprende un resto sulfopropilo o restos etilenglicol o una combinación de los mismos. La producción de luz potenciada a partir de tales compuestos y su naturaleza hidrófila hace que sean útiles para mejorar la sensibilidad de inmunoensayos. La estructura de un compuesto de este tipo denominado NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS (abreviado como HQYAE) se ilustra a continuación. Este compuesto y otros compuestos descritos en la patente estadounidense n.º 7.309.615 B2 contenía grupos sulfonato aniónicos o poli(etilenglicol) unidos al anillo de acridinio en vez del fenol.

55



Estructura de NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS



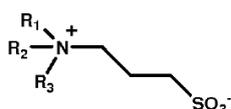
Estructura de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMA-AC-NHS

Se pretendía la incorporación de restos poli(etilen)glicol (PEG) y aniones en las estructuras de ésteres de acridinio dadas a conocer en las patentes mencionadas anteriormente para aumentar la naturaleza hidrófila de estos ésteres de acridinio así como para disminuir la unión no específica de conjugados derivados de estos compuestos. La unión no específica, en ensayos que usan fases sólidas tales como partículas o placas de microtitulación, son interacciones de unión no deseadas de estos conjugados de éster de acridinio con estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas aumentan normalmente el fondo del ensayo conduciendo a una disminución neta de la relación de la señal con respecto al fondo en el ensayo y disminuyendo de ese modo la sensibilidad del ensayo.

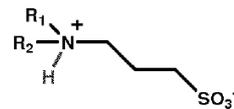
Se ha descrito el uso de poli(etilen)glicol para diseñar superficies inertes que resisten la adsorción de proteínas en la técnica anterior. Por ejemplo, Ostuni *et al.* en J. Am. Chem. Soc. 2000, 17, 5605-5620, evaluaron numerosos grupos funcionales unidos a monocapas autoensambladas para determinar la resistencia a la adsorción de proteínas y observaron que los grupos funcionales poli(etilen)glicol conferían la mejor resistencia. Más recientemente, Ladd *et al.* en Biomacromoleculas 2008, 9, 1357-1361; y otros grupos han notificado que superficies hidrófilas modificadas con zwitteriones son tan inertes frente a la adsorción de proteínas como PEG y además, se ha postulado que los zwitteriones serían químicamente más estables que PEG debido a la propensión de este último a la escisión oxidativa. Se ilustran las estructuras de algunos zwitteriones comunes tales como sulfobetainas, carboxibetainas, fosfobetainas y óxidos de amina en el siguiente dibujo. Como PEG, estos zwitteriones normalmente son eléctricamente neutros, debido al equilibrio de cargas positivas y negativas dentro de una estructura dada (R₁-R₄ son normalmente grupos alquilo).

Ejemplos de zwitteriones

Sulfobetainas



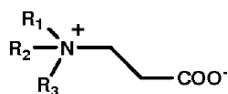
zwitteriónicas a pH tanto alto como bajo



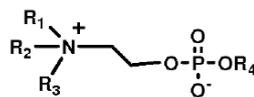
aniónicas a pH > 7

30

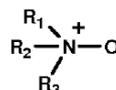
Carboxibetaína



Fosfobetaína



Óxido de amina terciaria



5 Catiónica a pH bajo

10 Las sulfobetaínas en las que el átomo de nitrógeno es cuaternario mantienen su neutralidad eléctrica a lo largo de un amplio intervalo de pH. Por otro lado, las sulfobetaínas con un nitrógeno trisustituido pueden adquirir una carga negativa a mayor pH (pH >7) debido a que pueden desprotonarse en el nitrógeno neutralizando de ese modo su carga positiva. De manera similar, las carboxibetaínas son eléctricamente neutras a mayor pH pero pueden protonarse en el grupo carboxilato y adquirir una carga positiva neta a pH bajo (pH <5).

15 Recientemente se han notificado colorantes fluorescentes modificados con zwitteriones para aplicaciones en proteómica por Dratz y Grieco en la solicitud de la patente estadounidense n.º 0259333 A1 (noviembre de 2007). Se observó que proteínas marcadas con colorantes zwitteriónicos eran solubles en agua y más apropiadas para el análisis electroforético y los autores anteriores han reivindicado métodos para el análisis de proteínas usando colorantes zwitteriónicos.

20 La incorporación de grupos funcionales zwitteriónicos, eléctricamente neutros en ésteres de acridinio quimioluminiscentes para mejorar sus propiedades tales como unión no específica no se ha descrito en la técnica anterior. Tales compuestos complementan los ésteres de acridinio que contienen PEG descritos por Natrajan *et al.* en la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2 y la patente estadounidense n.º 7.309.615 B2 y, tienen el potencial de mejorar la sensibilidad del ensayo.

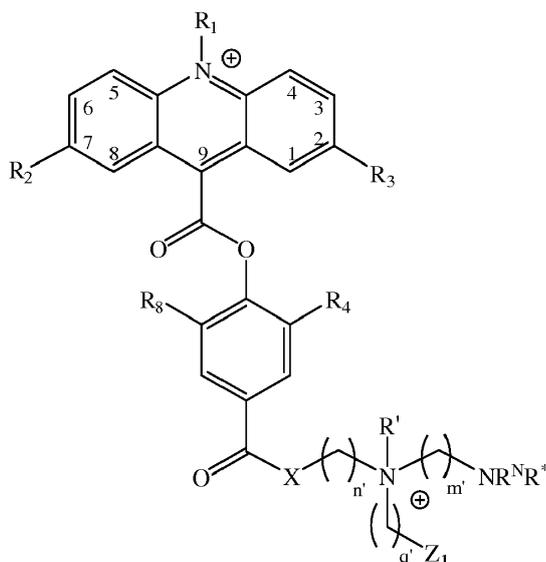
25 Existe la necesidad continuada en la técnica de etiquetas quimioluminiscentes mejoradas para inmunoensayos y similares. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar compuestos de acridinio quimioluminiscentes que presenten unión no específica reducida a una fase sólida.

30 Sumario de la invención

Según los objetivos anteriores y otros, se ha encontrado sorprendentemente que se mejoran las propiedades de compuestos de acridinio quimioluminiscentes incorporando grupos zwitteriónicos en la molécula para aumentar su hidrofiliidad y reducir por consiguiente la unión no específica con fases sólidas.

35 En un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de acridinio quimioluminiscente que comprende (i) un grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando dicho grupo hidrocarbonado opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo carboxilo o sulfonamida en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarbonado sustituido, en el que el compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, el resto hidrocarbonado unido al grupo carboxilo o sulfonamida, o el grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio presenta unión no específica reducida a una fase sólida en comparación con un compuesto de acridinio por lo demás idéntico que no comprende dicho grupo funcional zwitteriónico.

45 El compuesto de acridinio quimioluminiscente de la invención es un éster de acridinio que tiene la siguiente estructura mostrada en la fórmula I:

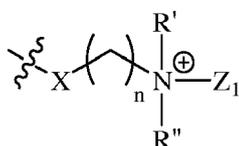


en la que, n' , m' , y q' son independientemente un número entero de 1-4,

5 R_1 es un grupo alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo C_{1-35} , cada uno de los cuales puede contener hasta 20 heteroátomos, o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo, o R_1 es un grupo $-R_a-Z$; en el que R_a es un radical divalente seleccionado del alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

10 R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de (i) hidrógeno, (ii) un grupo electrodonador o (iii) un grupo $-Z$;

Z es un grupo zwitteriónico de la forma:



15 X se selecciona independientemente en cada aparición de un enlace, $-CH_2-$, oxígeno, azufre, $-NR^N-$, amida $-(NR^N(CO)-)$, carbamato $-(NR^N C(O)O-)$ o urea $-(NR^N C(O)NR^N-)$;

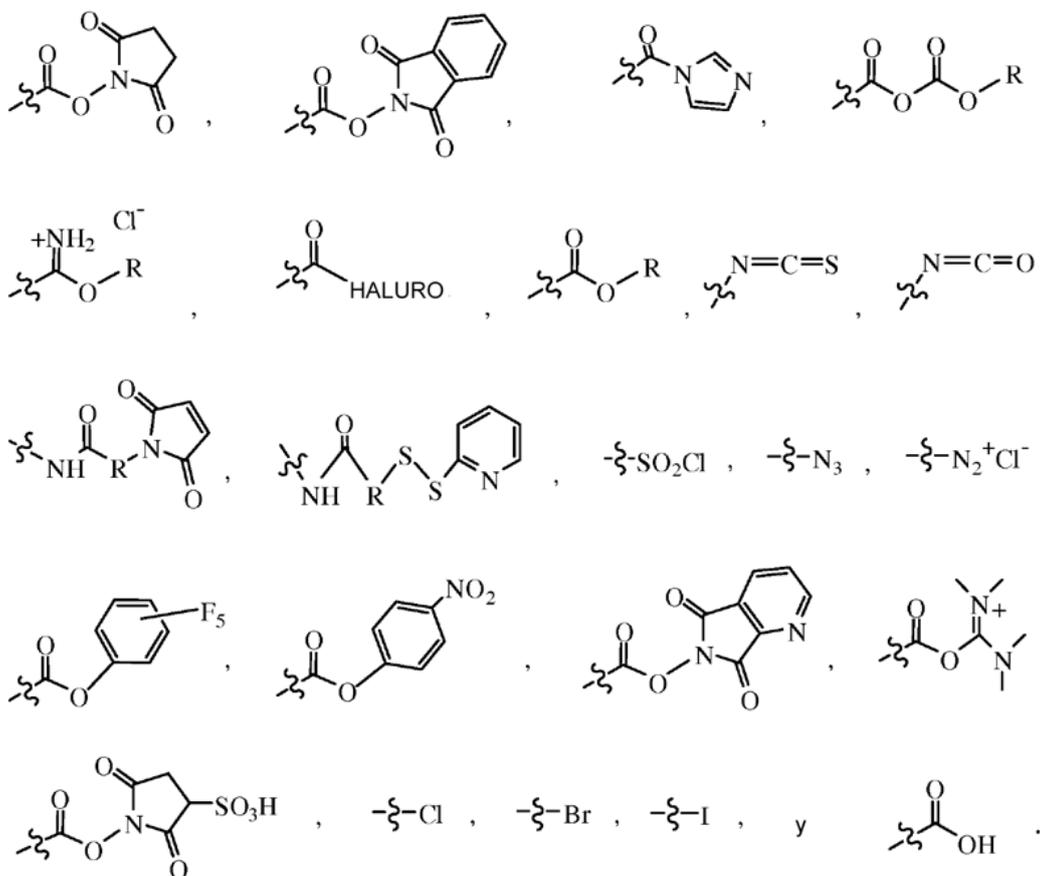
20 R' y R'' se seleccionan independientemente en cada aparición de alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

Z_1 es un grupo $-R_a-Z_2$ en el que Z_2 se selecciona de carboxilato $(-COO-)$, sulfonato $(-SO_3^-)$, sulfato $(-OSO_3^-)$, fosfato $(-OP(O)(OR)(O-))$ u óxido $(-O-)$; o, en el caso en el que Z_2 es un óxido $(-O-)$, R_a puede estar ausente;

25 n es, seleccionado independientemente en cada aparición, un número entero de entre uno y 12; y

R_4 y R_8 son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, alcoxilo $(-OR)$, alquiltiol $(-SR)$ o amino sustituido $(-NR_2)$ C_{1-35} ;

30 R^* se selecciona de hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o R^* es un grupo $-R_a-L$, en el que L se selecciona del grupo que consiste en:



R se selecciona independientemente en cada aparición de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos; y

5 R^N se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un reactivo para la detección de un analito que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente de fórmula I unido un analito, análogo de analito o pareja de unión para un analito, comprendiendo el compuesto de acridinio (i) un grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando dicho grupo hidrocarbonado opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo carboxilo en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarbonado sustituido que está opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, en el que dicho compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido al resto hidrocarbonado unido al grupo carboxilo y, opcionalmente, también a la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, o el grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio presenta unión no específica reducida a una fase sólida en comparación con un compuesto de acridinio por lo demás idéntico que no comprende dicho grupo funcional zwitteriónico.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito macromolecular que comprende: (a) proporcionar un conjugado que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente según la invención unido a una molécula de unión específica para un analito; (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizada sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito; (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia; (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 patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

30 En aún otro aspecto, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito de molécula pequeña que comprende las etapas de: (a) proporcionar un conjugado de un analito con un compuesto de acridinio

quimioluminiscente según la invención; (b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito; (c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia; (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

En otro aspecto todavía, se proporciona un ensayo para la detección de un analito de molécula pequeña que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con un analito o un análogo de analito; (b) proporcionar un conjugado de una molécula de unión específica para el analito con un compuesto de acridinio quimioluminiscente según la invención; (c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia; (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Estos y otros aspectos de la invención se entenderán mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada, incluyendo las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona las estructuras químicas de una pluralidad de compuestos de acridinio que contienen zwitteriones (que no son según la presente invención).

La figura 2 proporciona las estructuras químicas de otros compuestos de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo de la presente invención.

La figura 3 proporciona las estructuras químicas de otro compuesto de acridinio que contiene zwitteriones a modo de ejemplo de la presente invención.

La figura 4 es una representación gráfica de la luz emitida desde conjugados de acridinio de control (NSP-DMAE-HEG) y que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (NSP-DMAE-Z-NHS) en tanto por ciento de unidades relativas de luz (URL), representado gráficamente en función del tiempo.

La figura 5 es una representación gráfica de la luz emitida desde conjugados de acridinio de control (HQYAE) y que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (NSP-2,7-DMG-DMAE) con dos anticuerpos en tanto por ciento de unidades relativas de luz (URL), representado gráficamente en función del tiempo.

La figura 6 es una representación gráfica de la luz emitida desde conjugados de acridinio de control (NSP-DMAE-Z) y que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (ZC6M-AE y ZC8M-AE) con AcM anti-TSH en tanto por ciento de unidades relativas de luz (URL), representado gráficamente en función del tiempo.

Descripción detallada

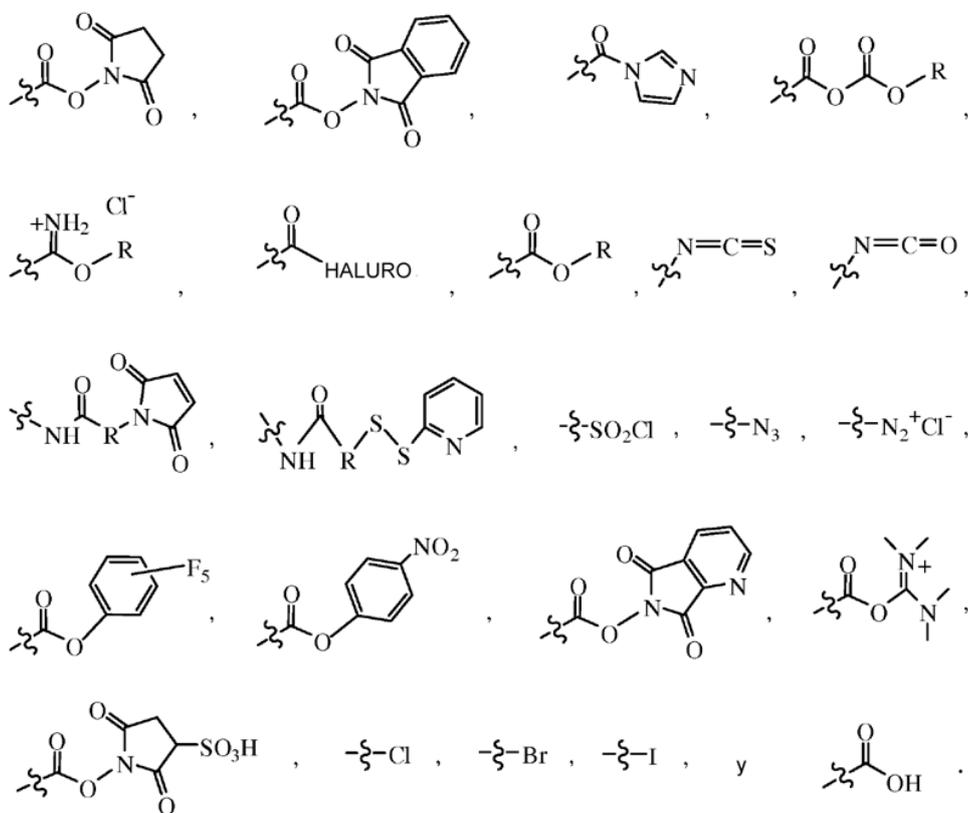
El objetivo principal de esta invención es dar a conocer estructuras de compuestos de acridinio que contienen zwitteriones que presentan baja unión no específica a fases sólidas en comparación con compuestos de acridinio que carecen de esas características estructurales. Otro objetivo de esta invención es dar a conocer dos tipos de modificación zwitteriónica de compuestos de acridinio: (a) compuestos de acridinio que contienen zwitteriones en el anillo de acridinio y, (b) compuestos de acridinio que contienen zwitteriones unidos al grupo saliente de fenol. Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer la emisión de luz inesperadamente más rápida desde compuestos de acridinio con zwitteriones unidos al fenol en comparación con compuestos de acridinio sin esta modificación estructural. Aún otro objetivo de la presente invención es demostrar que los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones son tan estables como los compuestos de acridinio sin zwitteriones y tienen rendimientos cuánticos comparables.

Los compuestos de acridinio quimioluminiscentes según la invención son ésteres de acridinio. Los compuestos de acridinio quimioluminiscentes comprenden (i) un grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando el grupo hidrocarbonado opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo carboxilo en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarbonado sustituido, en el que el compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido al resto hidrocarbonado unido al grupo carboxilo y, opcionalmente, a la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, o el grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio presenta unión no específica reducida a una fase sólida en comparación con un compuesto de acridinio por lo demás idéntico que no comprende dicho grupo funcional zwitteriónico.

5 El grupo hidrocarbonado unido al átomo de nitrógeno está opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos y, por tanto, puede constituir en sí mismo un grupo zwitteriónico, por ejemplo, en el caso de un grupo sulfopropilo o sulfobutilo unido al nitrógeno de anillo en el que hay una carga positiva en el nitrógeno de anillo cuaternario y una carga positiva en el grupo $-SO_3$. Se entenderá que aunque esté presente un grupo zwitteriónico de este tipo, los compuestos según la invención comprenderán además al menos un grupo zwitteriónico. Dicho de otra manera, los compuestos según la invención comprenderán una carga positiva en un átomo distinto de, o además de, el nitrógeno del núcleo de acridinio.

10 El compuesto de acridinio quimioluminiscente es un éster de acridinio que tiene la estructura mostrada en la fórmula I anterior.

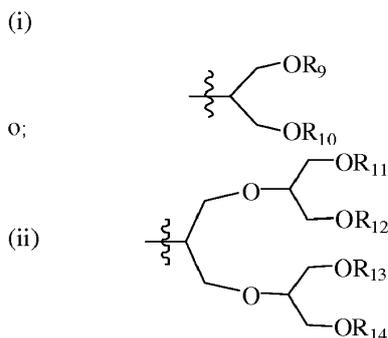
15 En una realización, al menos uno, o exactamente uno de, R_1 , R_2 y R_3 , comprende un grupo $-L$ o $-R_a-L$, en el que L es un grupo funcional derivatizable que comprende un grupo saliente, grupo electrófilo o grupo nucleófilo para formar un conjugado con un analito, análogo de analito o pareja de unión para un analito. L se seleccionará del grupo que consiste en:



20 En una realización, R' o R'' comprende un grupo $-R_a-L$, en el que L se selecciona del grupo proporcionado anteriormente. En una realización, R' o R'' es, en una aparición, un grupo $-R_a-C(O)-CH_2CH_2CH_2-C(O)-N$ -succinimidilo, $-R_a-N$ -maleimido, $-R_a-C(O)-CH_2-Br$ o $-R_a-C(O)-CH_2-I$.

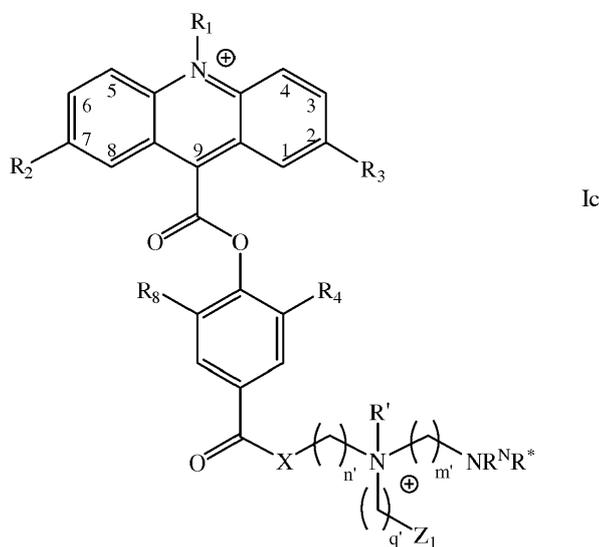
25 En algunas realizaciones, R_2 y R_3 son ambos hidrógeno. En otra realización, R_2 y/o R_3 pueden seleccionarse, por ejemplo, de grupos electrodonadores. Los grupos electrodonadores típicos incluyen, sin limitación, OR , OH , SR , SH , NH_2 , $NR^N R^N$; en el que R y R^N se seleccionan independientemente en cada aparición y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo, que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos. Un grupo electrodonador preferido es alcoxilo ($-OR$).

30 En algunas realizaciones, R_2 y/o R_3 pueden seleccionarse del grupo que consiste en (i) alcoxilo ($-OR$), (ii) un grupo $-O-(CH_2CH_2-O)_l-CH_3$ en el que l es un número entero desde 1 hasta 12, y (iii) un grupo $-O-G$, y (vi) un grupo $-Z$; en el que G es un grupo ramificado seleccionado independientemente en cada aparición de:

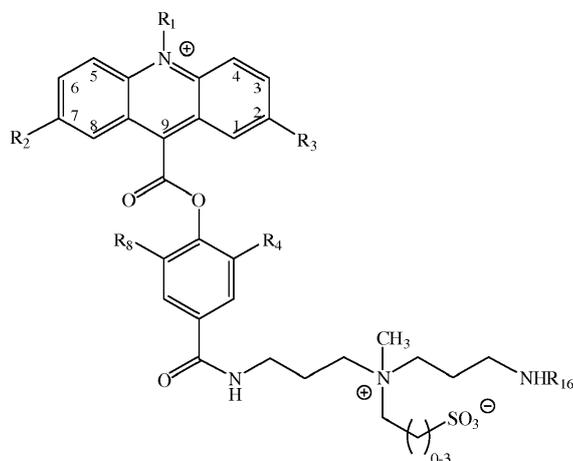


en las que R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} son independientemente en cada aparición un grupo metilo o un grupo $-(CH_2CH_2O)_mCH_3$, en el que m es un número entero desde 1 hasta 5.

5 Otro ejemplo de un compuesto de éster de acridinio quimioluminiscente según la fórmula I, tiene la estructura mostrada en la fórmula Ic:



10 en la que n' , m' , y q' son independientemente un número entero de 1-4, y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_6 , R^N , R^* , R' , X y Z_1 son tal como se definieron anteriormente. En una realización, R^* comprende un grupo $-R_G-L$, en el que L es tal como se definió anteriormente. Un compuesto representativo según esta realización tiene la siguiente estructura:

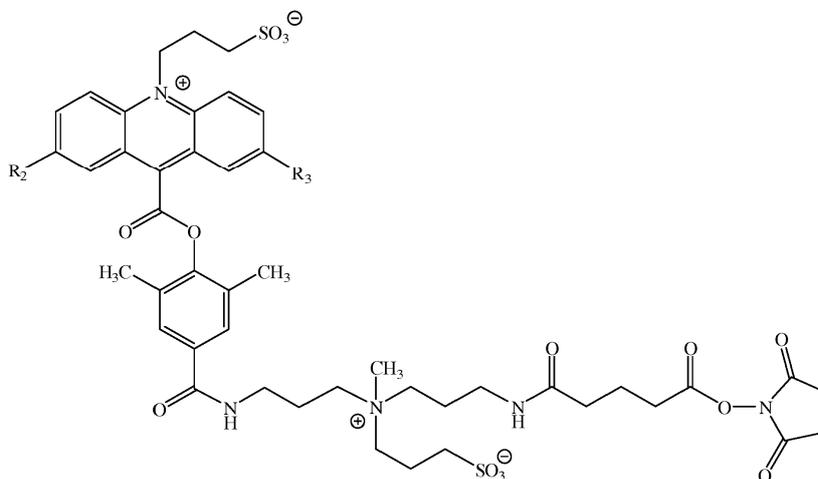


15 en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_6 son tal como se definieron anteriormente. En algunas realizaciones R_4 y R_6 son independientemente grupos alquilo inferior, y en particular metilo; R_1 es alquilo (por ejemplo, metilo), sulfopropilo $(-CH_2CH_2CH_2-SO_3^-)$ o sulfobutilo $(-CH_2CH_2CH_2CH_2-SO_3^-)$; R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno o un grupo $-O-G$, en el que G se define como anteriormente; y R_{16} se selecciona de (i) hidrógeno, (ii) $-C(O)-$

20

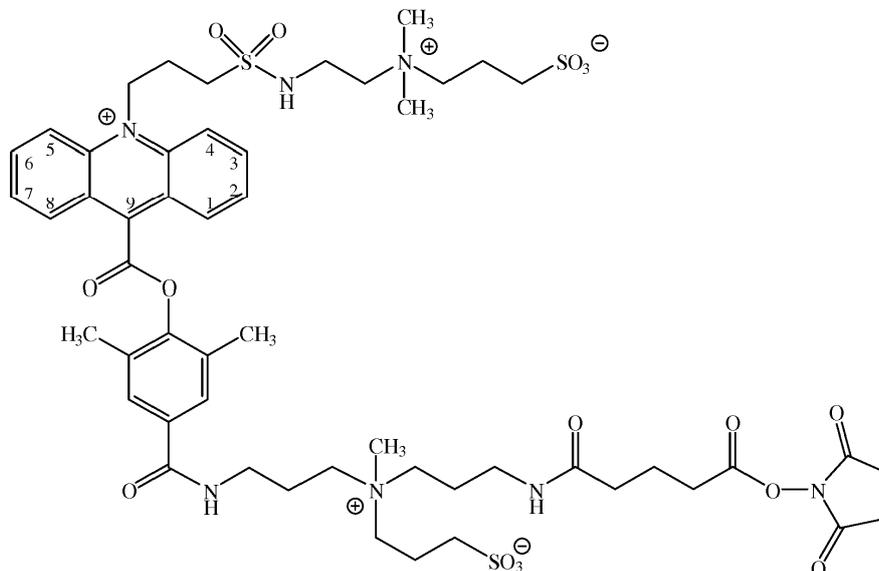
CH₂CH₂CH₂-C(O)-N-succinimidilo, (iii) -R-N-maleimido en el que R es independientemente alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo, cada uno de los cuales puede comprender opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o (iv) -C(O)-CH₂-X en el que X es bromo (Br) o yodo (I).

5 En una realización, un compuesto de acridinio quimioluminiscente según la fórmula Ic, tiene la siguiente estructura:



en la que R₂ y R₃ son tal como se definen como anteriormente.

10 Un compuesto de acridinio quimioluminiscente a modo de ejemplo según la fórmula le (también mostrado en la figura 3) tiene dos grupos zwitteriónicos, según la siguiente estructura:



15 en el que el compuesto incluye un opcionalmente contraión A⁻ para equilibrar el nitrógeno cargado positivamente del núcleo de acridinio.

20 Los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención presentan baja unión no específica cuando se conjugan con proteínas tales como anticuerpos. La unión no específica, tal como se describió previamente, en ensayos que usan fases sólidas tales como partículas o placas de microtitulación son interacciones de unión no deseadas de conjugados con estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas aumentan normalmente el fondo del ensayo conduciendo a una disminución neta de la relación de la señal con respecto al fondo en el ensayo y disminuyendo de ese modo la sensibilidad del ensayo. Para evaluar la unión no específica de los diversos compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención, se prepararon conjugados de anticuerpo de estos compuestos usando un anticuerpo monoclonal murino (AcM anti-TSH) producido contra el analito TSH (hormona estimulante de la tiroides). La unión no específica de estos conjugados se comparó entonces con la unión no específica de conjugados análogos preparados usando NSP-DMAE-HEG y HQYAE. Estos dos últimos ésteres de acridinio hidrófilos, tal como se mencionó previamente y se describe en la patente estadounidense n.º 6.664.043 B2 y patente estadounidense n.º 7.309.615 B2 respectivamente, contienen

hexa(etilen)glicol unido al fenol y el anillo de acridinio respectivamente. Este último compuesto, HQYAE, también tiene una producción de luz aumentada (mayor rendimiento cuántico) debido a los dos grupos alcoxi, electrodonadores en el anillo de acridinio tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.309.615 B2. Se midió la unión no específica en dos clases diferentes de partículas; partículas paramagnéticas (PMP) y partículas de látex magnéticas (MLP) de un proveedor comercial (Dynal™). Las dos partículas difieren en su composición intrínseca. Las PMP se componen principalmente de partículas de óxido de hierro con un recubrimiento de silano que contiene aminas. Las aminas se usan para reticular proteínas en la superficie de las partículas usando reactivos tales como glutaraldehído. Por otra parte, las MLP se componen de poliestireno poroso con dopado de magnetita para permitir la separación magnética. La PMP usada en la presente evaluación se recubrió con un anticuerpo anti-TSH en la superficie de las partículas usando química de acoplamiento de glutaraldehído (fase sólida "PMP"). Las MLP usadas para la presente evaluación (anticuerpo policlonal anti-PTH de cabra biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M280 (fase sólida "M280") y anticuerpo monoclonal anti-cTnI de ratón biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M270 (fase sólida "M270")) tenían estreptavidina inmovilizada sobre las superficies que se usaron entonces para inmovilizar adicionalmente anticuerpos marcados con biotina que pueden unirse a los analitos PTH (hormona paratiroidea) o cTNI (troponina cardiaca I). La interacción de unión estreptavidina-biotina se conoce bien y se usa comúnmente en ensayos. Los dos tipos de partículas (PMP y MLP) se mezclaron con disoluciones de los conjugados durante un periodo de tiempo específico y luego se separaron magnéticamente las partículas, se lavaron una vez y luego se midió la quimioluminiscencia asociada con las partículas. (Pueden encontrarse los detalles experimentales en el ejemplo 18.) La razón de este valor de quimioluminiscencia en comparación con la entrada de quimioluminiscencia total se denomina unión no específica fraccionaria (fNSB). Los conjugados con baja unión no específica tendrán por tanto bajos valores de fNSB y estos valores de realizaciones a modo de ejemplo de los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención (descritos adicionalmente a continuación), junto con los compuestos de control, se tabulan a continuación en la tabla 1.

Tabla 1.

Compuestos de acridinio		N.º de marcadores en el conjugado	Fase sólida		
			PMP	M280	M270
Controles	NSP-DMAE-HEG	5	4,0 x 10 ⁻⁵	5,2 x 10 ⁻⁴	4,6 x 10 ⁻⁴
	HQYAE	6	1,6 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁴
1d	ZC3-AE	7	2,0 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻⁵
5d	ZC3M-AE	7	3,4 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁻⁵
2d	ZC6-AE	5	2,8 x 10 ⁻⁵	1,9 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻⁵
6d	ZC6M-AE	5	3,3 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁻⁴	1,8 x 10 ⁻⁴
3d	ZC8-AE	6	3,7 x 10 ⁻⁵	3,4 x 10 ⁻⁵	3,3 x 10 ⁻⁵
7d	ZC8M-AE		2,4 x 10 ⁻⁵	3,2 x 10 ⁻⁵	2,7 x 10 ⁻⁵
4e	ZC12-AE	7	3,9 x 10 ⁻⁵	5,7 x 10 ⁻⁵	3,9 x 10 ⁻⁵
11f	NSP-DMAE-Z	5	1,3 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻⁵	1,3 x 10 ⁻⁵
10f	NSP-2Z-DMAE	6	1,3 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁵
8d	AZC3-AE	6	6,2 x 10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁻⁵	1,6 x 10 ⁻⁵
9d	AZC6-AE	5	1,0 x 10 ⁻⁵	1,4 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻⁵
PMP = anticuerpo anti-TSH-PMP M280 = anticuerpo policlonal anti-PTH de cabra biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M280 M270 = anticuerpo monoclonal anti-cTnI de ratón biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M270					

Los conjugados de NSP-DMAE-HEG y HQYAE en PMP tienen valores de fNSB de 4 x 10⁻⁵ y 1,6 x 10⁻⁵ respectivamente. Todos los demás conjugados preparados usando los ésteres de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención tienen valores de fNSB que son comparables a o menores que estos valores. Por ejemplo, los conjugados derivados de NSP-DMAE-Z y ZC6MAE tienen valores de fNSB de 1,3 x 10⁻⁵ y 3,7 x 10⁻⁵ respectivamente. El primer éster de acridinio contiene el zwitterión unido al fenol, mientras que el último compuesto contiene un zwitterión en el anillo de acridinio. Ambos tipos de modificación zwitteriónica son por tanto eficaces en la reducción de fNSB a partículas de PMP. En las MLP Dynal con el anticuerpo anti-PTH en la superficie de las partículas, los conjugados de NSP-DMAE-HEG y HQYAE tienen valores de fNSB de 5,2 x 10⁻⁴ y 1,5 x 10⁻⁴ respectivamente. Todos los demás conjugados derivados de los ésteres de acridinio que contienen zwitteriones tienen valores de fNSB que son sustancialmente menores con la excepción de ZC12-AE cuya fNSB (1,7 x 10⁻⁴) es comparable a la del conjugado de HQYAE. Se observa un resultado similar en las MLP Dynal con el anticuerpo anti-cTNI inmovilizado en su superficie. Por tanto, los conjugados de éster de acridinio que contienen zwitteriones tienen valores significativamente menores de fNSB en las MLP que se sometieron a prueba en ese momento y, ofrecen el potencial de mejorar la sensibilidad del ensayo reduciendo la señal del fondo tal como se comentó previamente.

Los conjugados de éster de acridinio de NSP-DMAE-Z y NSP-2,7-DMG-DMAE-Z (DMG = dimetoxigliceriloxilo) con zwitteriones unidos al fenol también presentan inesperadamente una emisión de luz más rápida en comparación con los conjugados análogos derivados de NSP-DMAE-HEG y HQYAE respectivamente tal como se ilustra en los gráficos en las figuras 3 y 4. El éster de acridinio, NSP-DMAE-Z-NHS es análogo a NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS en que ambos ésteres de acridinio contienen el mismo anillo de acridinio pero diferentes grupos funcionales unidos

al fenol. El primer compuesto contiene un zwitterión unido al fenol mientras que el último compuesto contiene un derivado de hexa(etilen)glicol. El compuesto que contiene zwitteriones NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, además de contener el zwitterión unido al fenol también tiene grupos funcionales dimetoxigliceriloxilo (DMG) electrodonadores en el anillo de acridinio. La producción de luz desde este compuesto es similar a la de HQYAE debido a los dos grupos electrodonadores y, es mayor que la de NSPDMAE-HEG.

Se realizaron mediciones de luz en un luminómetro y se midió la luz emitida desde cada conjugado (expresada como URL; unidades relativas de luz) en diversos intervalos de tiempo. Se usó entonces la luz emitida total desde cada conjugado para calcular el porcentaje de luz emitida (% de URL) en cada intervalo de tiempo. Tal como resulta evidente a partir de la figura 4, el conjugado de AcM anti-TSH (AcM = anticuerpo monoclonal) de NSP-DMAE-HEG requiere >4 segundos para la emisión de luz completa mientras que para el conjugado de NSP-DMAE-Z, la emisión de luz es completa en el plazo de dos segundos. Una comparación similar de los conjugados de BSA (BSA = albúmina sérica bovina), de los dos ésteres de acridinio indica una emisión de luz significativamente más rápida para el éster de acridinio que contiene zwitteriones.

La emisión de luz desde conjugados de anticuerpo de los ésteres de acridinio de alta producción de luz HQYAE y NSP-2,7-DMGDMAE con dos anticuerpos diferentes, AcM anti-TSH y AcM anti-HBsAg (HBsAg = antígeno de superficie de la hepatitis), se comparan en la figura 5. En este caso también, el compuesto que contiene zwitteriones presenta una emisión de luz significativamente más rápida con emisión de luz total completa en <2 segundos mientras que los conjugados derivados de HQYAE tardan ~4 segundos para la emisión de luz completa. Además, se observó que la quimioluminiscencia relativa (QL rel.) de los dos ésteres de acridinio era igual en los dos anticuerpos diferentes. Por tanto, la introducción de zwitteriones en el fenol acelera la emisión de luz pero no compromete la producción de luz global del éster de acridinio.

Los compuestos de acridinio son marcadores quimioluminiscentes extremadamente útiles especialmente en instrumentos de inmunoquímica automatizados tales como Centaur™ y ACS: 180™ (Siemens Healthcare Diagnostics) que usan los ésteres de acridinio NSP-DMAE-HEG y HQYAE. Estos dos instrumentos tienen alto rendimiento, lo que significa que pueden ejecutar la realización de un gran número de pruebas de inmunoensayo, 240 y 180 pruebas respectivamente, cada hora respectivamente. Los reactivos derivados de NSP-DMAE normalmente emiten luz a lo largo de un periodo de cinco segundos cuando se desencadena su quimioluminiscencia con la adición de ácido nítrico 100 mM que contiene hidrógeno peróxido al 0,5% seguido por una segunda disolución de hidróxido de sodio 0,25 N más tensioactivo. Los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención, en los que el zwitterión está ubicado en el fenol, en virtud de su rápida emisión de luz (≤ 2 segundos para $\geq 90\%$ de luz emitida total) pueden usarse en instrumentos de inmunoquímica automatizados tales como ADVIA:Centaur™ para aumentar su rendimiento, en comparación con las pruebas por lo demás idénticas que emplean los ésteres de acridinio NSP-DMAE-HEG y HQYAE.

Finalmente en la figura 6, la cinética de emisión de luz desde los conjugados de AcM anti-TSH de los ésteres de acridinio que contienen zwitteriones ZC6M-AE, ZC8M-AE (cuyas estructuras se muestran en la figura 1) y NSP-DMAE-Z-NHS se comparan con la de NSP-DMAE-HEG. Mientras que el conjugado de NSP-DMAE-Z, con la modificación zwitteriónica en el fenol, presenta emisión de luz más rápida que NSP-DMAE-HEG tal como se indicó anteriormente, los dos conjugados de éster de acridinio de ZC6M-AE y ZC8M-AE en los que el zwitterión está ubicado en el anillo de acridinio, muestran una cinética de emisión comparable a NSP-DMAE-HEG. Por tanto, la introducción de zwitteriones en el anillo de acridinio tampoco es perjudicial para la cinética de emisión tal como se observa en estos dos casos. También se observó que la producción de luz total desde los conjugados de AcM anti-TSH y de AcM anti-HBsAg de los tres compuestos que contienen zwitteriones ZC6M-AE, ZC8M-AE y NSP-DMAE-Z era similar y comparable a la de NSP-DMAE-HEG.

La estabilidad potenciada de los ésteres de acridinio tal como se describió originariamente por Law *et al.* para DMAE, es otra característica importante de estos compuestos que facilita su utilidad en inmunoanalizadores comerciales, automatizados. Por "estabilidad," quiere decirse una actividad de quimioluminiscencia con pérdida mínima tal como se mide mediante la pérdida de URL cuando los compuestos o conjugados se almacenan en una disolución acuosa normalmente, en el intervalo de pH de 6-9, que está dentro del pH fisiológico. Desde un punto de vista mecanístico, la hidrólisis del éster fenólico es la ruta principal mediante la cual los ésteres de acridinio quimioluminiscentes se vuelven no quimioluminiscentes. Los conjugados estables garantizan una larga vida útil para los reactivos de éster de acridinio y también garantizan que el rendimiento del ensayo no varía mucho a lo largo de un periodo de tiempo dado. La estabilidad de diversos conjugados de éster de acridinio (descritos adicionalmente a continuación) del anticuerpo anti-TSH de la presente invención se enumera en la tabla 2. Se almacenaron disoluciones acuosas de los conjugados o bien a 4°C, que son típicas para instrumentos automatizados comerciales tales como Centaur™, o bien a 37°C en un tampón acuoso a pH 7,7. Las condiciones de almacenamiento más duras a 37°C en las que se espera que se acelere la hidrólisis del éster de acridinio, permitieron una comparación equitativa de las estabildades relativas de los diversos ésteres de acridinio. Se registró periódicamente la luz como URL usando un luminómetro para todos los conjugados. A las URL que se midieron en el punto de tiempo inicial, también denominado día 1, se les asignó un valor del 100%. Las URL residuales de cada conjugado después de cuatro semanas se enumeran en la tabla 2. Pueden encontrarse otros detalles pertenecientes a estas mediciones en el ejemplo 19.

Tabla 2.

Compuestos de acridinio		Estabilidad de quimioluminiscencia (% de URL) a las cuatro (4) semanas	
		4°C	37°C
Controles	NSP-DMAE-HEG	98	75
	HQYAE	92	58
1d	ZC3-AE	106	64
5d	ZC3M-AE	99	67
2d	ZC6-AE	93	52
6d	ZC6M-AE	99	68
7d	ZC8M-AE	98	66
11f	NSP-DMAE-Z	88	73
10f	NSP-2Z-DMAE	118	94
8d	AZC3-AE	100	60
9d	AZC6-AE	100	56

5 A partir de la tabla 2, las estabildades de quimioluminiscencia de diversos conjugados de éster de acridinio que
 10 contienen zwitteriones de la presente invención son comparables a las de NSP-DMAE-HEG y HQYAE. A 37°C,
 después de 4 semanas, los conjugados de estos dos ésteres de acridinio conservan el 75% y el 58% de su actividad
 de quimioluminiscencia respectivamente. Todos conjugados de otros ésteres de acridinio que contienen zwitteriones
 muestran una estabilidad comparable que oscila entre el 52% para el conjugado de ZC6-AE y el 94% para el
 conjugado de NSP-2Z-DMAE. A 4°C, después de 4 semanas, todos los conjugados de éster de acridinio mostraron
 una pérdida mínima de actividad de quimioluminiscencia.

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

40 Cuando la fase sólida con el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo marcado se mezcla con una muestra que
 contiene el analito, se forma un complejo de unión entre el analito y los dos anticuerpos. Este tipo de ensayo se
 denomina a menudo ensayo heterogéneo debido a la participación de una fase sólida. Puede medirse entonces la
 señal quimioluminiscente o fluorescente asociada con el complejo de unión y deducirse la presencia o ausencia del
 analito. Habitualmente, el complejo de unión se separa del resto de los componentes de la reacción de unión tales
 como anticuerpo marcado en exceso, antes de la generación de señales. Por ejemplo, si el complejo de unión está
 45 asociado con una perla magnética, puede usarse un imán para separar el complejo de unión asociado con la perla
 de la disolución en masa. Usando una serie de "patrones", es decir, concentraciones conocidas del analito, puede
 generarse una curva de "dosis-respuesta" usando los dos anticuerpos. Por tanto, la curva de dosis-respuesta
 correlaciona con una determinada cantidad de señal medida con una concentración específica de analito. En un
 ensayo de tipo sándwich, a medida que aumenta la concentración del analito, también aumenta la cantidad de señal.
 Entonces puede calcularse la concentración del analito en una muestra desconocida comparando la señal generada
 50 por una muestra desconocida que contiene el analito macromolecular, con la curva dosis-respuesta.

Del mismo modo, los dos componentes de unión también pueden ser ácidos nucleicos que se unen o hibridan con
 diferentes regiones de un analito de ácido nucleico. Entonces puede deducirse la concentración del ácido nucleico

analito de manera similar.

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

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

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

Los reactivos para su uso en relación con estos métodos también se proporcionan por la invención y comprenden normalmente un compuesto de acridinio quimioluminiscente que tiene una fórmula tal como se muestra en la fórmula I anterior unido a un analito, análogo de analito o pareja de unión para un analito.

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

(a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) cualquiera de los compuestos de éster de acridinio que contienen zwitteriones de la invención;

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

(c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;

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

(e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;

(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 patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

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

(a) proporcionar un conjugado de un analito con cualquiera de los compuestos de éster de acridinio que contienen zwitteriones de la invención;

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

(c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;

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

(e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;

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

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

En un formato de ensayo alterno, los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención también son útiles para la detección de analitos de molécula pequeña en ensayos que comprenden las siguientes etapas;

a) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con un analito o un análogo de analito;

b) proporcionar un conjugado de una molécula de unión específica para el analito con un compuesto de éster de acridinio que contiene zwitteriones de la presente invención;

c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;

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

e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;

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

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

Los reactivos que desencadenan luminiscencia pueden ser o bien peróxido de hidrógeno o bien sales de peróxido.

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

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

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

Ejemplo 1

Síntesis de ZC3-AE-NHS, compuesto 1d

a) Compuesto 1a

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxi-acridina, (0,1 g, 0,24 mmol), (patente estadounidense n.º 7.309.615), 3-dimetilaminopropanol (0,112 ml, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (0,252 g, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (0,188 ml, 4 equivalentes) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis mediante CCF sobre sílice usando acetato de etilo como eluyente no mostró material de partida y usando el 75% de acetato de etilo, el 24% de metanol y el 1% de trietilamina, se observó un producto polar ($R_f \sim 0,15$). Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se repartió el residuo entre HCl 1 N (25 ml) y acetato de etilo (25 ml). Se extrajo la fase acuosa que contenía producto dos veces más con acetato de etilo (2 x 25 ml). Después se trató la fase acuosa ácida con hidróxido de sodio acuoso al 2,5% gota a gota hasta que se formó una suspensión de color amarillo brillante. Se extrajo esta suspensión con acetato de etilo (3 x 25 ml). Entonces se analizó una pequeña porción de esta disolución mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de

1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 25$ minutos y que era el componente mayoritario. Se secó la disolución en acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para producir un sólido pegajoso de color amarillo. Rendimiento = 126 mg (89%); EM MALDI-TOF 588,3 observado.

5

b) Compuesto 1c

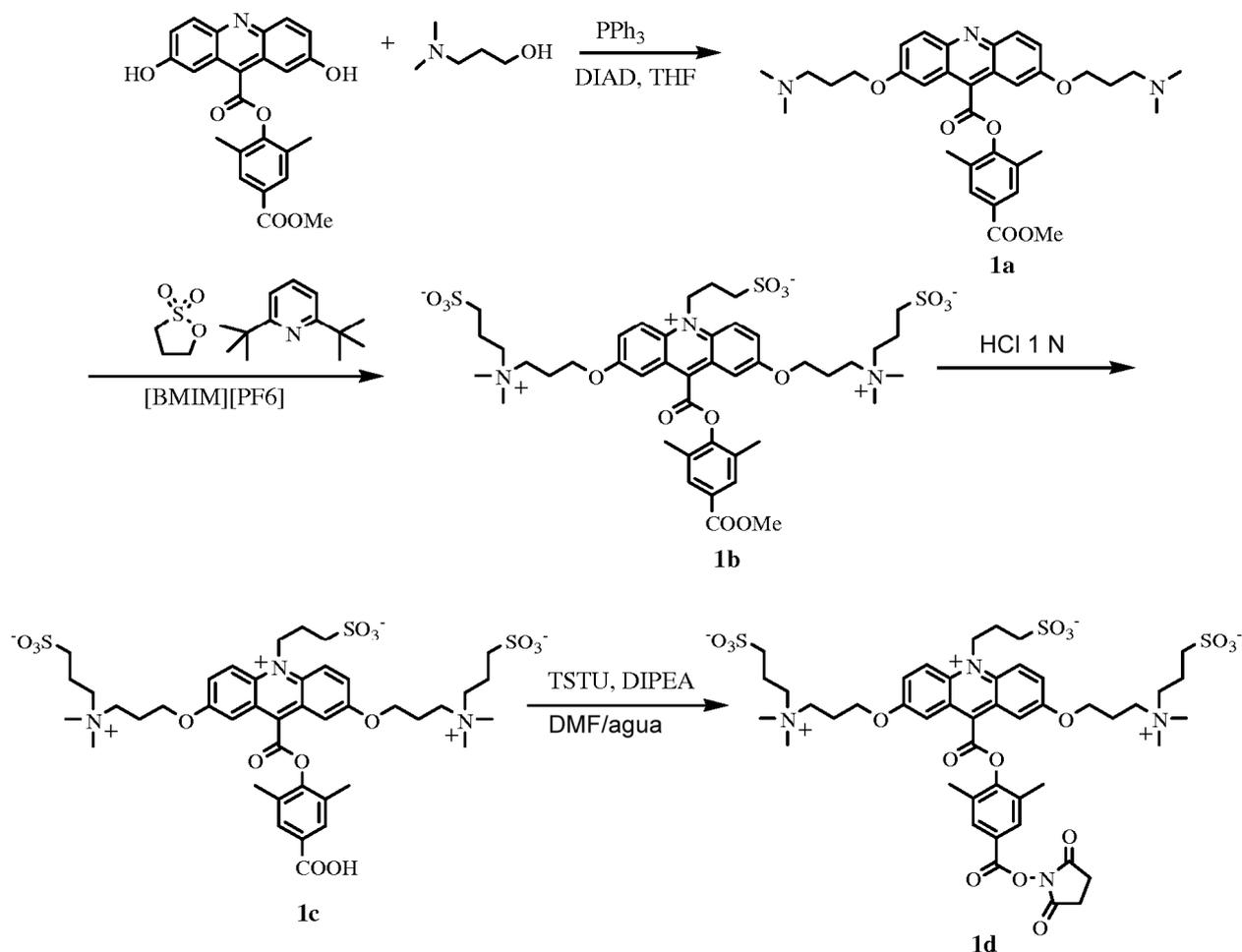
Se calentó una mezcla del compuesto 1a (0,126 g, 0,215 mmol), 1,3-propano-sultona destilada (0,785 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,470 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (1-2 ml) a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente. Se retiró una pequeña porción (1-2 μ l) de la mezcla de reacción, se diluyó con metanol (0,1 ml) y se analizó mediante HPLC analítica usando el gradiente descrito anteriormente en la sección (a). Se observó un producto mayoritario que eluía a $R_t = 18$ minutos que mediante análisis de EM MALDI-TOF (953,5 observado) correspondía al producto de éster de acridinio trialquilado 1b. Se repartió la mezcla de reacción en bruto entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). Se extrajo la fase acuosa que contenía producto tres veces más con acetato de etilo (3 x 30 ml). Se concentró la fase acuosa a presión reducida para producir éster de acridinio 1b en bruto. Se disolvió este material en HCl 1 N (15 ml) y se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante 1,5 horas y después se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó hidrólisis limpia del éster metílico con el producto 1c que eluía a $R_t = 16$ minutos. Se concentró la mezcla de reacción hasta ~10 ml y se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito en la sección (a) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron y se concentraron las fracciones de HPLC que contenían producto a presión reducida. Rendimiento = 116 mg (57% global); EM MALDI-TOF 941,2 observado.

25 c) Compuesto 1d (que no es según la invención)

Se trató una disolución parcial de ácido acridinio-carboxílico 1c (30 mg, 32 μ mol) en DMF (3 ml) y agua (0,3 ml) con diisopropiletilamina (7 ml, 1,5 equivalentes) y TSTU (19 mg, 2 equivalentes). Se agitó vigorosamente la reacción a temperatura ambiente. Después de 24 horas, el análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción usando el gradiente descrito en la sección (a) mostró producto (~20% de conversión) que eluía a $R_t = 17,5$ minutos. Después se diluyó la reacción con agua (2,7 ml) lo que dio una disolución transparente y entonces se trató con diisopropiletilamina (10 μ l, 2 equivalentes) y TSTU (50 mg, 5 equivalentes) adicionales. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 0,5 horas y entonces se analizó mediante HPLC que indicó ~40% de conversión. Después se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando el gradiente y la columna descritos en la sección (b). Se congelaron las fracciones de HPLC que contenían producto a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad para producir un polvo de color amarillo brillante. Rendimiento = 11 mg (33%); EM MALDI-TOF 1037,4 observado.

35

Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC3-AE-NHS, compuesto 1d.



Ejemplo 2

5 Síntesis de ZC6-AE-NHS, compuesto 2d

a) Compuesto 2a

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxi-acridina, (30 mg, 72 μmol), 6-dimetilamino-1-hexanol (42 mg, 4 equivalentes) y trifenilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El análisis mediante CCF sobre sílice usando el 70% de acetato de etilo, el 28% de metanol, el 2% de trietilamina mostró la conversión limpia en un producto polar. Se realizó el análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 25$ minutos y que era el componente mayoritario. Se aisló el producto tal como se describe en el ejemplo 1, sección (a). Rendimiento = 36 mg (75%).

20 b) Compuesto 2c

Se calentó una mezcla del compuesto 2a (36 mg, 54 μmol), 1,3-propano-sultona destilada (0,2 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,120 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (1 g) a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (50 ml). Se separó la fase acuosa que contenía producto y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 30 ml). El análisis mediante HPLC de la disolución acuosa usando el gradiente descrito en la sección (a) indicó >80% de conversión en el producto trialquilado que eluía a $R_t = 19$ minutos con ~20% de producto dialquilado que eluía a $R_t = 24$ minutos. Se concentró la fase acuosa que contenía el producto de éster de acridinio 2b en bruto a presión reducida. Se disolvió el residuo en HCl 1 N (10 ml) y se sometió a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC que indicó la conversión limpia en el ácido acridinio-carboxílico que eluía a $R_t = 17$ minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y el mismo

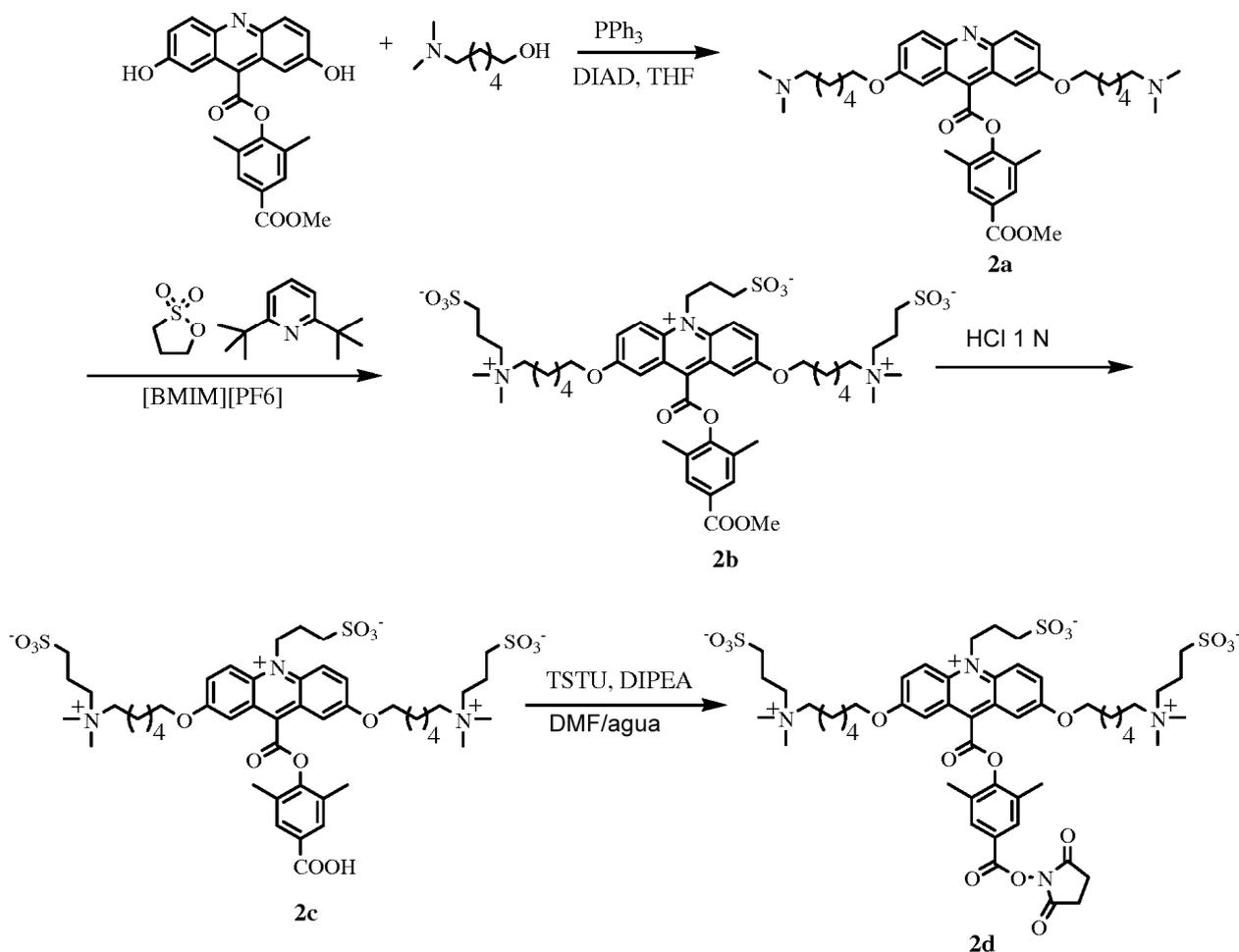
gradiente descrito en la sección (a) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 2c. Rendimiento = 39,4 mg (71% global); EM MALDI-TOF 1025,1 observado.

5 c) Compuesto 2d (que no es según la invención)

Se trató una disolución del compuesto 2c (39 mg, 38 μ mol) en agua al 15%/DMF (4 ml) con diisopropiletilamina (0,033 ml, 5 equivalentes) y TSTU (57 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó la conversión completa en el producto de éster de NHS 2d que eluía a R_t = 18,4 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito en la sección (a) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el compuesto 2d. Rendimiento = 28 mg (66%); EM MALDI-TOF 1120,8 observado.

15

Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC6-AE-NHS, compuesto 2d.



20 Ejemplo 3

Síntesis de ZC8-AE-NHS, compuesto 3d

a) Compuesto 3a

25

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxi-acridina, (30 mg, 72 μ mol), 8-dimetilamino-1-octanol (50 mg, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). Se agitó la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a R_t = 22,5 minutos y que era el componente mayoritario. Se aisló el

30

producto 3a tal como se describe en el ejemplo 1, sección (a). Rendimiento = 58 mg (cuantitativo), EM MALDI-TOF 728,6 observado.

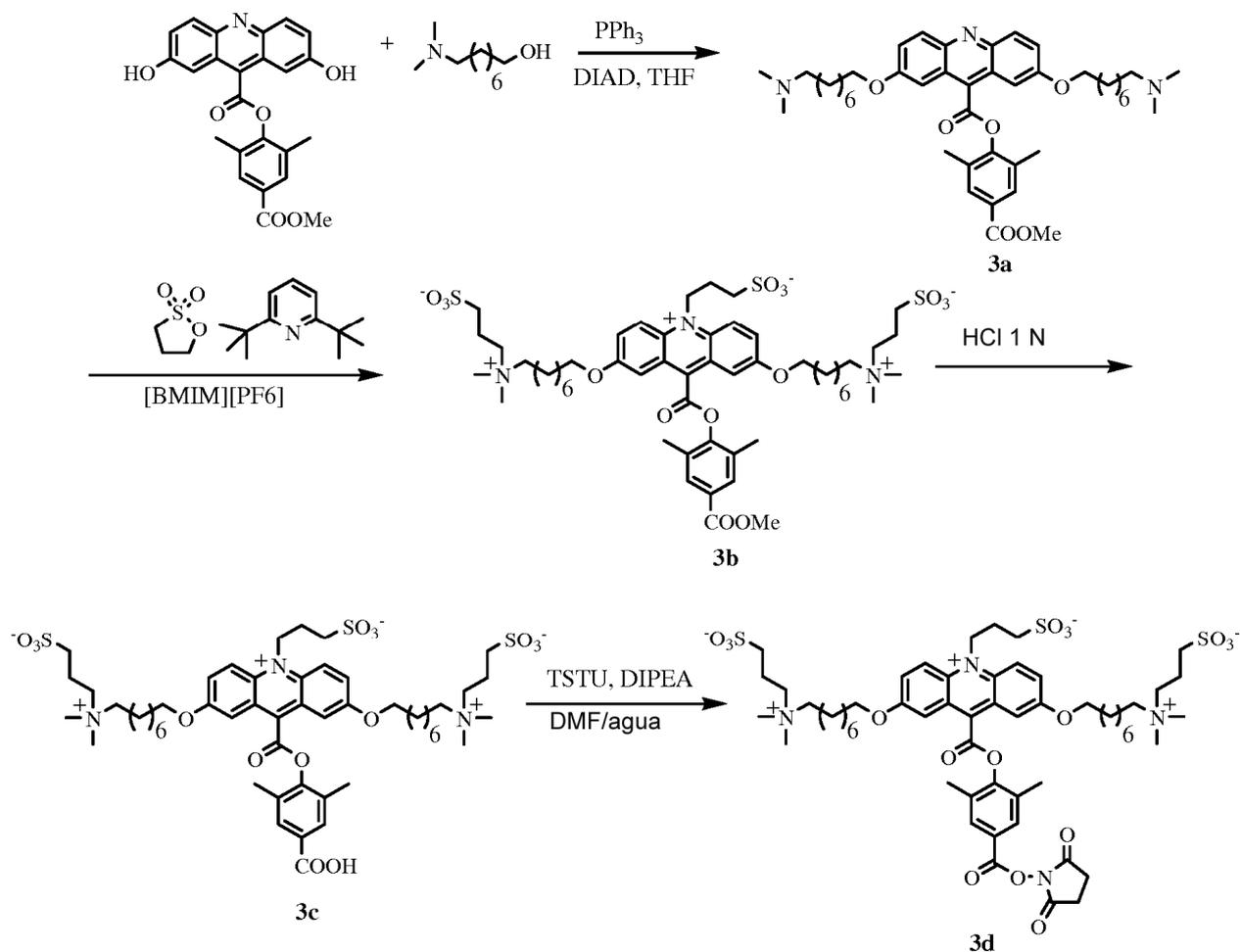
b) Compuesto 3c

5 Se calentó una mezcla del compuesto 3a (58 mg, 80 μ mol), 1,3-propano-sultona destilada (0,291 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,175 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (1 g) a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). Se separó la fase acuosa que contenía producto y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 30 ml). El análisis mediante HPLC de la disolución acuosa usando el gradiente descrito en la sección (a) indicó el producto de éster de acridinio 3b que eluía a R_t = 1,5 min (EM MALDI-TOF 1094 observado). Se concentró la fase acuosa a presión reducida y se sometió a reflujo el aceite marrón recuperado en HCl 1 N (10 ml) bajo nitrógeno. Después de 2 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC que indicó un producto que eluía a R_t = 16 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 3c. Rendimiento = 30 mg (39% global); EM MALDI-TOF 1082,4 observado.

20 c) Compuesto 3d (que no es según la invención)

Se trató una disolución del compuesto 3c (23 mg, 21,3 μ mol) en agua al 15%/DMF (2 ml) con diisopropiletilamina (18,6 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (32 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a R_t = 29 minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el producto 3d. Rendimiento = 15 mg (60%); EM MALDI-TOF 1178,8 observado.

35 Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC8-AE-NHS, compuesto 3d.



Ejemplo 4

5 Síntesis de ZC12-AE-NHS, compuesto 4e

a) 12-dimetilamino-1-dodecanol, 4a

Se trató una disolución de 12-bromo-1-dodecanol (1 g, 3,8 mol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) con una disolución de dimetilamina en tetrahidrofurano 2,0 M (10 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días. El análisis mediante CCF sobre sílice usando el 25% de acetato de etilo, el 75% de hexanos como eluyente mostró la formación de un producto polar con poca cantidad de material de partida. Se diluyó la reacción con acetato de etilo (75 ml) y se lavó dos veces con bicarbonato de sodio acuoso y agua. Entonces se secó la disolución en acetato de etilo sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 1,2 g (cera). El análisis mediante CCF sobre sílice (el 25% de metanol, el 75% de acetato de etilo) mostró un producto en franjas con $R_f \sim 0,1$. Este producto 4a, se usó sin purificación.

b) Compuesto 4b

Se trató una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxi-acridina, (30 mg, 72 μmol), 12-dimetilamino-1-dodecanol (66 mg, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). Después de 2 horas, se trató la reacción con 4 equivalentes de trifetilfosfina y 5 equivalentes de azodicarboxilato de diisopropilo adicionales. Después de 30 minutos, se analizó una pequeña porción mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 30$ minutos y que era el componente mayoritario. Se aisló el producto 4b tal como se describe en el ejemplo 1, sección (a). Rendimiento = 57 mg (95%), EM MALDI-TOF 840,3 observado.

c) Compuesto 4d

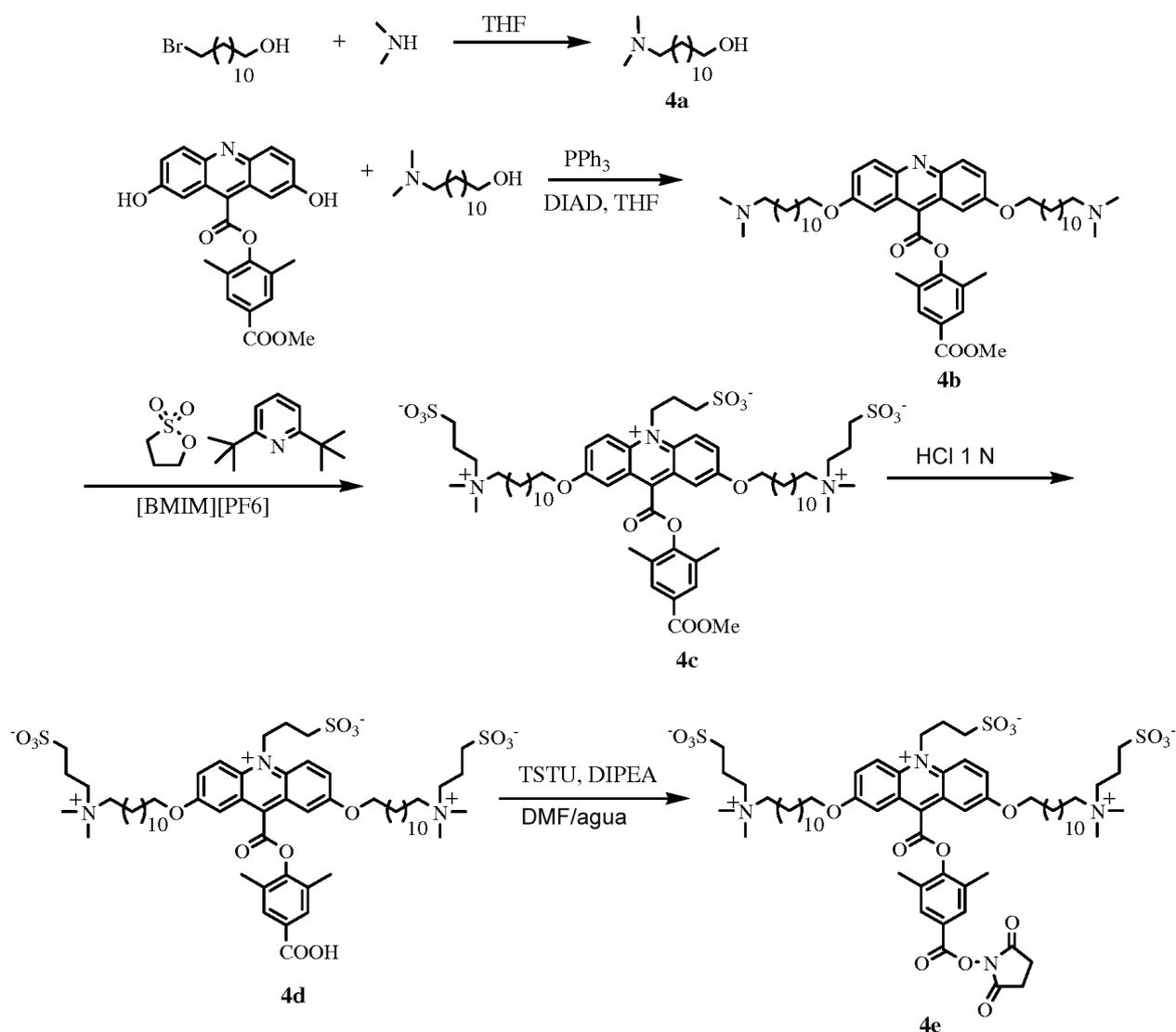
Se calentó una mezcla del compuesto 4b (57 mg, 68 μmol), 1,3-propano-sultona (0,250 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-

5 terc-butilpiridina (0,15 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (1 ml) a 150°C bajo nitrógeno durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se procesó tal como se describe en el ejemplo 2, sección (b). El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción en bruto usando el gradiente descrito en la sección (a) indicó el producto de éster de acridinio 4c que eluía a $R_t = 24$ minutos (EM MALDI-TOF 1206,2 observado). Se sometió a reflujo el producto 4c en bruto en HCl 1 N (10 ml) durante 4 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC que indicó ~70% de conversión en el producto 4d que eluía a $R_t = 21$ minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 4d. Rendimiento = 22 mg (27% global); EM MALDI-TOF 1193,4 observado.

d) Compuesto 4e (que no es según la invención)

15 Se trató una disolución del compuesto 4d (22 mg, 18,4 μ mol) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) con diisopropiletamina (16 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (28 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 22$ minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el producto 4e. Rendimiento = 15,4 mg (64%); EM MALDI-TOF 1290,6 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC12-AE-NHS, compuesto 4e.



Ejemplo 5

5 Síntesis de ZC3M-AE-NHS, compuesto 5d

a) Compuesto 5a

Se trató una disolución de éster 2,6-dimetil-4-metiloxicarbonilfenílico del ácido 2-hidroxi-acridin-9-carboxílico (25 mg, 62,3 μmol) (sintetizado de manera similar al derivado de dihidroxilo en la patente estadounidense n.º 7.309.615), 3-dimetilamino-1-propanol (15 μl , 2 equivalentes) y trifetilfosfina (33 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (25 μl , 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 1 hora, el análisis mediante CCF sobre sílice usando acetato de etilo/metanol 1:1 como eluyente mostró la formación limpia de un producto polar de $R_f \sim 0,2$. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 25,2$ minutos y que era el componente mayoritario. Se diluyó la reacción con acetato de etilo (25 ml) y HCl 1 N (25 ml). Se separó la fase de HCl con producto y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 25 ml). Entonces se enfrió la fase de HCl en hielo y se trató con KOH acuoso al 5% hasta que se formó una suspensión. Se extrajo esta suspensión con acetato de etilo (2 x 25 ml). Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados con agua (25 ml). Entonces se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 5a. Rendimiento 24,5 mg (82%); EM MALDI-TOF 487,5 observado.

25 b) Compuesto 5c

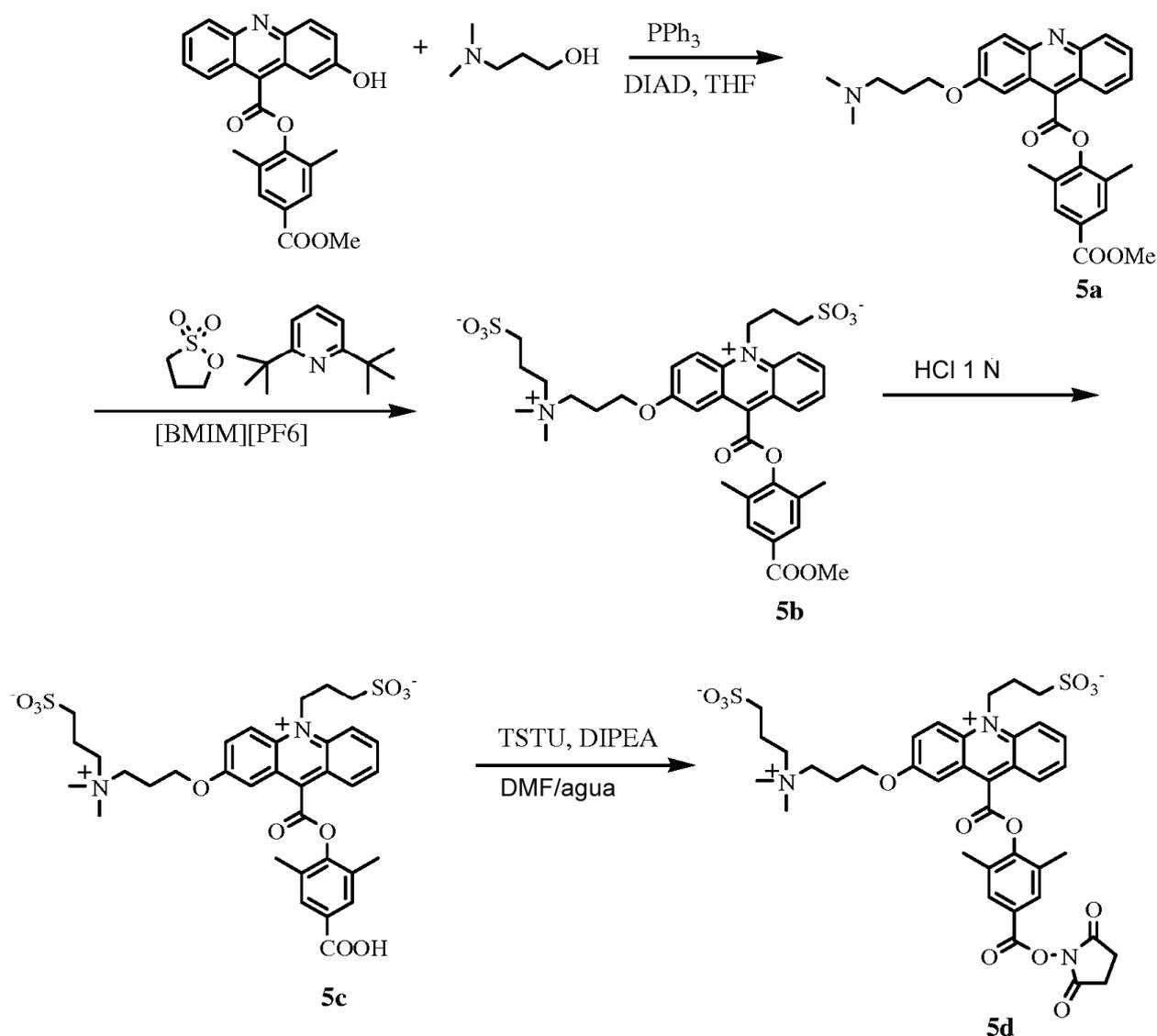
Se calentó una mezcla del compuesto 5a (24,5 mg, 51,3 μmol), 1,3-propano-sultona (125 mg, 20 equivalentes) y 2,6-

5 di-terc-butilpiridina (79 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (0,5 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio 5b que eluía a R_t = 18 minutos (>80% de conversión; EM MALDI-TOF 731,04 observado). Se repartió la
10 reacción entre acetato de etilo (25 ml) y agua (25 ml). Se separó la fase acuosa que contenía producto y se lavó una vez con acetato de etilo (50 ml). Entonces se concentró a presión reducida. Se sometió a reflujo el residuo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 5c que eluía a R_t = 15 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 5c. Rendimiento = 32 mg (89% global); EM MALDI-TOF 717,1 observado.

15 c) Compuesto 5d (que no es según la invención)

Se trató una disolución del compuesto 5c (32 mg, 44,6 μ mol) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) con diisopropiletilamina (39 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (67 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de
20 reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a R_t = 17 minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad
25 de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 5d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 25 mg (69%); EM MALDI-TOF 814,1 observado.

30 Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC3M-AE-NHS, compuesto 5d.



Ejemplo 6

5 Síntesis de ZC6M-AE-NHS, compuesto 6d

a) Compuesto 6a

Se trató una disolución de éster metílico de 2-hidroxi-acridina (25 mg, 62,3 μmol), 6-dimetilamino-1-hexanol (18 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (33 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (25 μl , 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 1 hora y entonces se sometió a tratamiento final tal como se describe en la sección (a), ejemplo 5. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 22$ minutos y que era el componente mayoritario. Rendimiento 33,5 mg (cuantitativo); EM MALDI-TOF 529,5 observado.

b) Compuesto 6c

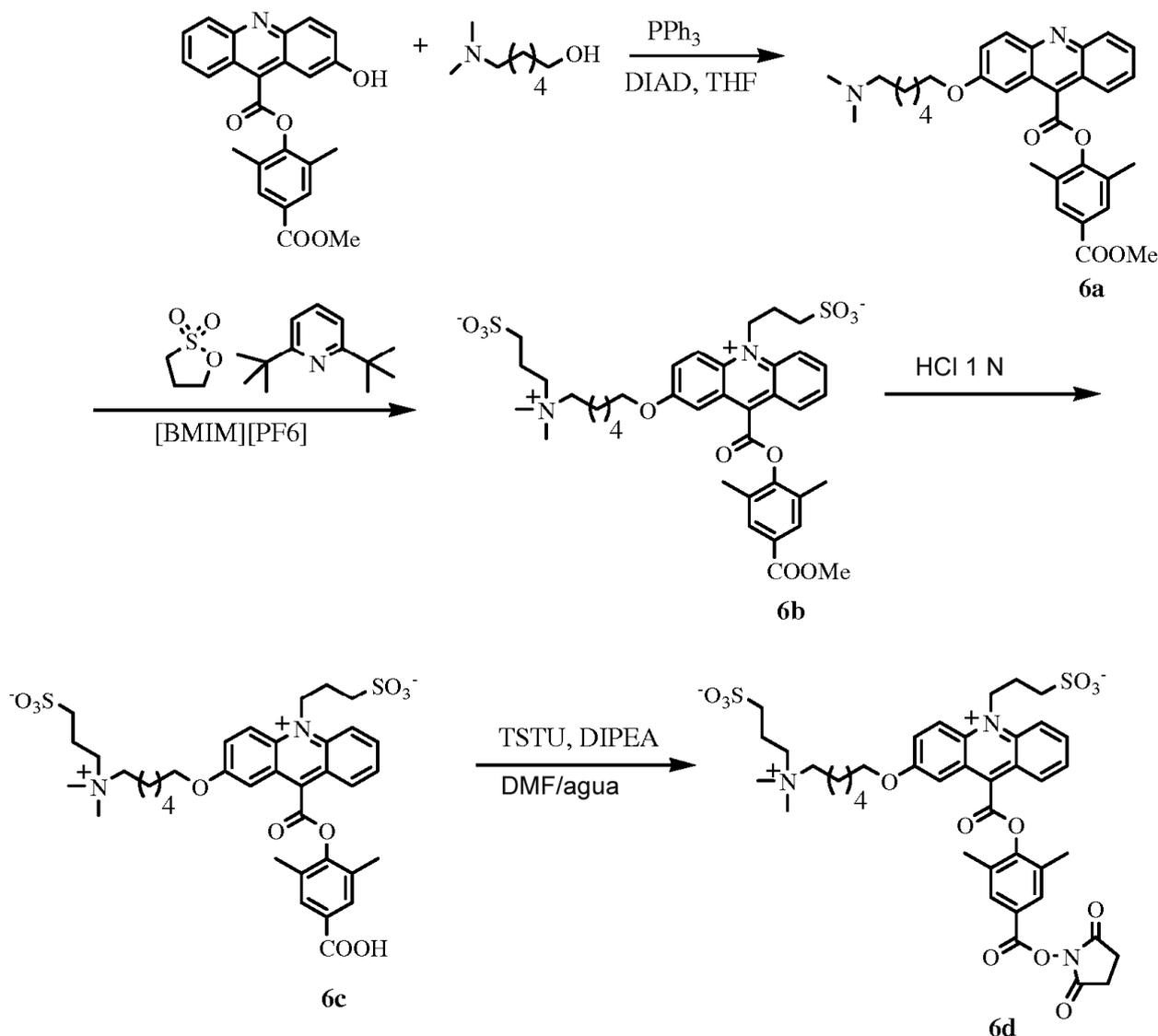
Se calentó una mezcla del compuesto 6a (33,5 mg, 63,3 μmol), 1,3-propano-sultona (155 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (97 μl , 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (0,5 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μl), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio 6b que eluía a $R_t = 16$ minutos (>80% de conversión; EM MALDI-TOF 773,5 observado). Se sometió la mezcla de reacción a tratamiento final tal como se describe en la sección (b), ejemplo 5. Se sometió a reflujo el éster

de acridinio 6b en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 6c que eluía a $R_t = 14$ minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 6c. Rendimiento = 26,8 mg (56% global).

c) Compuesto 6d (que no es según la invención)

Se trató una disolución del compuesto 6c (26,9 mg, 35,3 μ mol) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) con diisopropiletilamina (31 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (53 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 15,4$ minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 6d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 19,3 mg (63%); EM MALDI-TOF 856,2 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC6M-AE-NHS, compuesto 6d.



Ejemplo 7Síntesis de ZC8M-AE-NHS, compuesto 7d5 a) Compuesto 7a

Se trató una disolución de éster metílico de 2-hidroxi-acridina (30 mg, 75 μ mol), 8-dimetilamino-1-octanol (26 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (40 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (30 μ l, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 1 hora y entonces se sometió a tratamiento final tal como se describe en la sección (a), ejemplo 5. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 24 minutos y que era el componente mayoritario. Rendimiento 13 mg (31%); EM MALDI-TOF 557,1 observado.

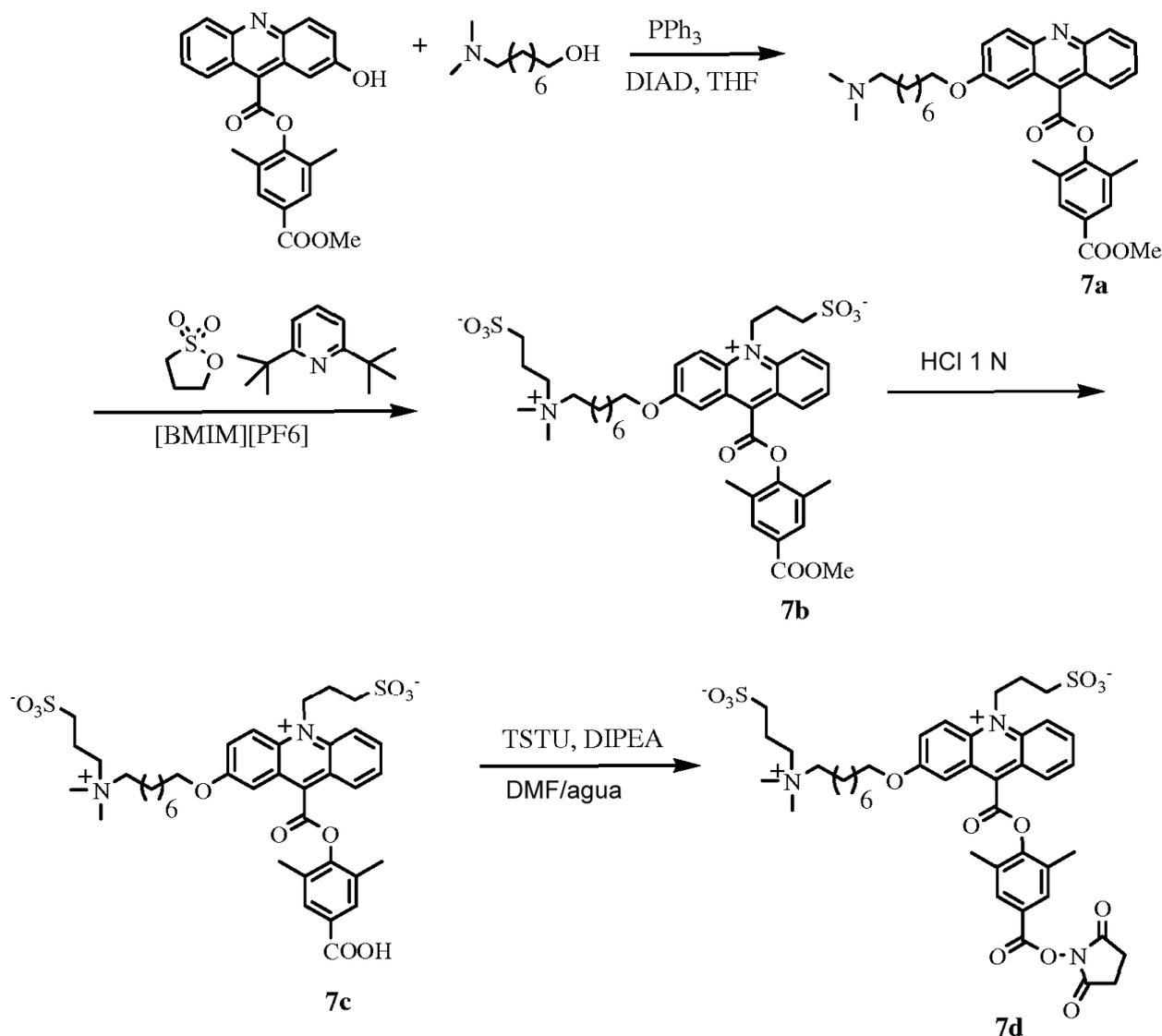
15 b) Compuesto 7c

Se calentó una mezcla del compuesto 7a (13 mg, 23,3 μ mol), 1,3-propano-sultona (57 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (36 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,2 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio 7b que eluía a Rt = 17,4 minutos (>80% de conversión; EM MALDI-TOF 800,8 observado). Se sometió la mezcla de reacción a tratamiento final tal como se describe en la sección (b), ejemplo 5. Se sometió a reflujo el éster de acridinio 7b en 5 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 7c que eluía a Rt = 15,3 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 7c. Rendimiento = 6,8 mg (37% global); EM MALDI-TOF 787,8 observado.

25 c) Compuesto 7d (que no es según la invención)

35 Se trató una disolución del compuesto 7c (6,8 mg, 8,6 μ mol) en DMF (1,7 ml) y agua (0,3 ml) con diisopropiletilamina (7,5 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (13 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 16,5 minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 7d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 5 mg (66%); EM MALDI-TOF 885,0 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de ZC8M-AE-NHS, compuesto 7d.



Ejemplo 8

5 Síntesis de AZC3-AE-NHS, compuesto 8d

a) Compuesto 8a

Se sintetizó el compuesto de éster metílico de 2-hidroxi-7-metoxi-acridina a partir de ácido 2-benciloxi-7-metoxi-acridin-9-carboxílico y 2,6-dimetil-4-hidroxibenzoato de metilo usando las reacciones descritas en la patente estadounidense n.º 7.319.041 B2. Se trató una disolución de éster metílico de 2-hidroxi-7-metoxi-acridina (25 mg, 0,058 mmol), 3-dimetilamino-1-propanol (13,6 μl , 2 equivalentes) y trifenilfosfina (30 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (23 μl , 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 1 hora, se sometió a tratamiento final tal como se describe en la sección (a), ejemplo 5. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 20$ minutos y que era el componente mayoritario. Rendimiento 27 mg (90%); EM MALDI-TOF 517,9 observado.

b) Compuesto 8c

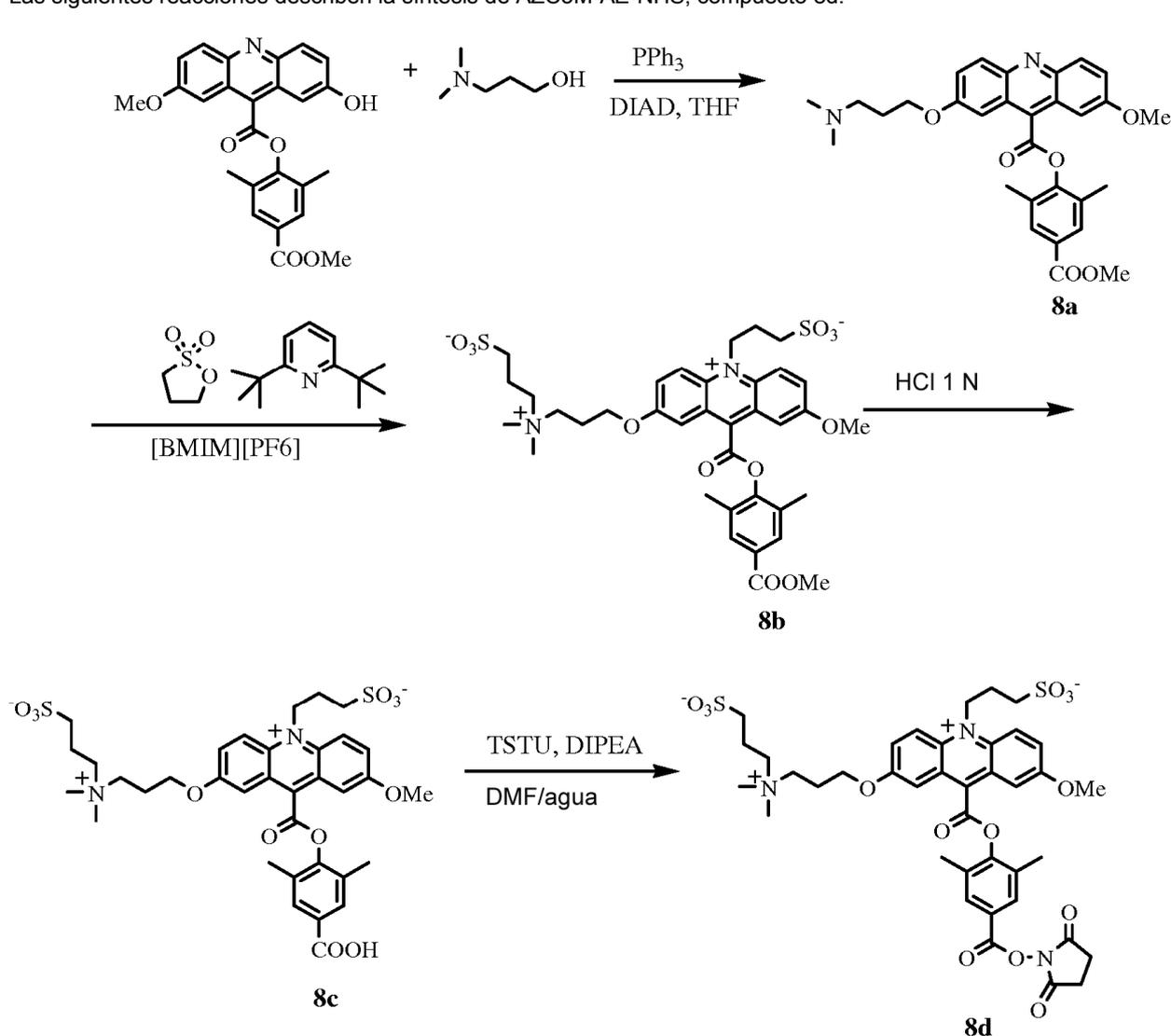
Se calentó una mezcla del compuesto 8a (27 mg, 52,2 μmol), 1,3-propano-sulfona (128 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (80 μl , 7 equivalentes) en el líquido iónico $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ (0,5 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μl), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó el producto de éster de

acridinio 8b que eluía a $R_t = 15,2$ minutos. Se sometió la mezcla de reacción a tratamiento final tal como se describe en la sección (b), ejemplo 5. Se sometió a reflujo el éster de acridinio 8b en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 8c que eluía a $R_t = 13,5$ minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 8c. Rendimiento = 22 mg (56% global); EM MALDI-TOF 747,4 observado.

10 c) Compuesto 8d (que no es según la invención)

Se trató una disolución del compuesto 8c (22 mg, 29,5 μ mol) en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml) con diisopropiletilamina (26 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (44 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 14,6$ minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 8d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 17,6 mg (70%); EM MALDI-TOF 843,9.0 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de AZC3M-AE-NHS, compuesto 8d.



Síntesis de AZC6-AE-NHS, compuesto 9da) Compuesto 9a

5 Se trató una disolución de éster metílico de 2-hidroxi-7-metoxi-acridina (25 mg, 0,058 mmol), 6-dimetilamino-1-hexanol (17 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (30 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) con azodicarboxilato de diisopropilo (23 μ l, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 2 horas, se sometió a tratamiento final tal como se describe en la sección (a), ejemplo 5. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 22,5 minutos y que era el componente mayoritario. Rendimiento 20 mg (63%); EM MALDI-TOF 559,8 observado.

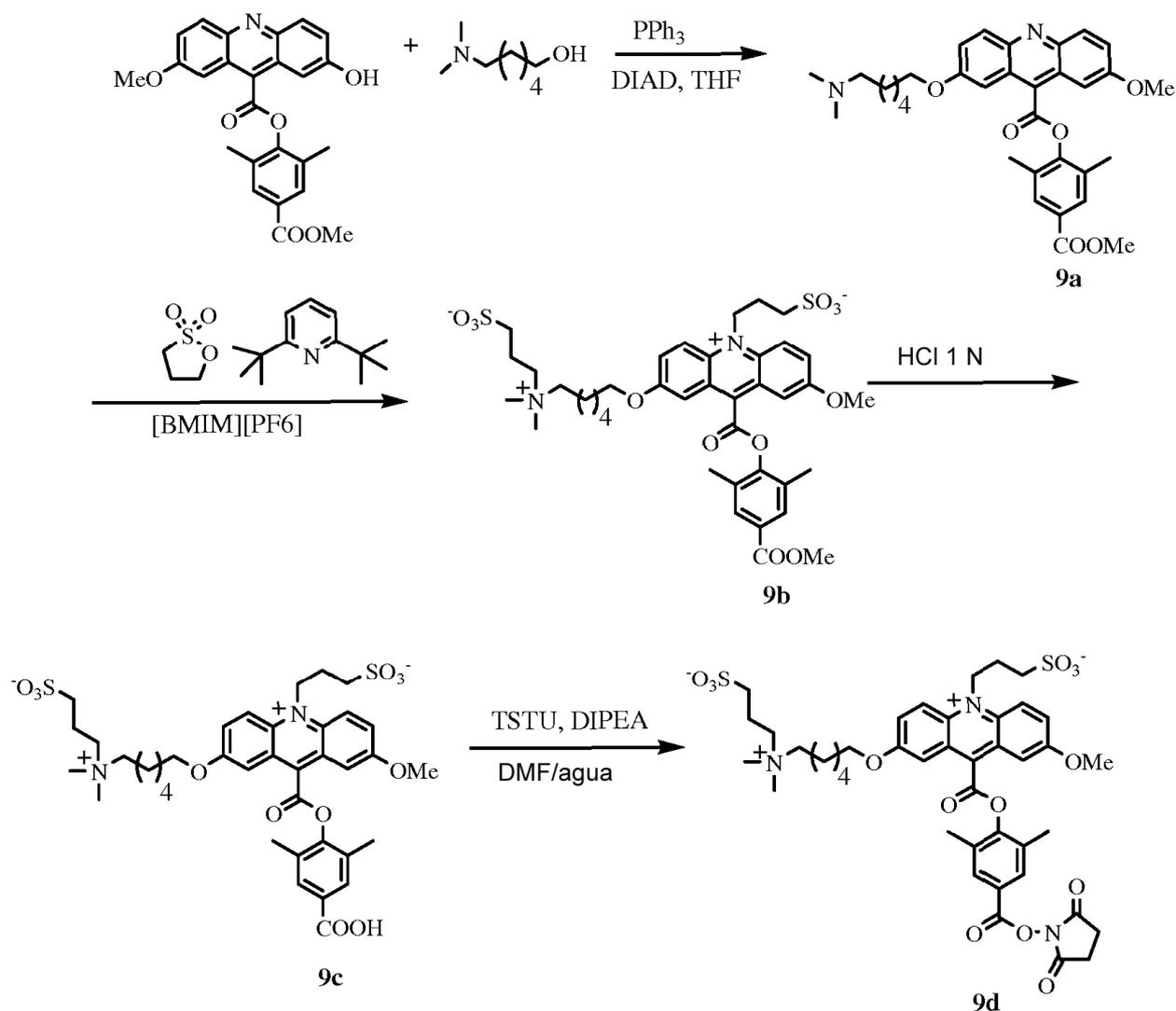
b) Compuesto 9c

15 Se calentó una mezcla del compuesto 9a (20 mg, 35,9 μ mol), 1,3-propano-sultona (87 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (59 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC tal como se describe en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio 9b que eluía a Rt = 15,7 minutos (EM MALDI-TOF 803,9 observado). Se sometió la mezcla de reacción a tratamiento final tal como se describe en la sección (b), ejemplo 5. Se sometió a reflujo el éster de acridinio 9b en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 9c que eluía a Rt = 14,9 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 9c. Rendimiento = 18,3 mg (65% global); EM MALDI-TOF 790,4 observado.

c) Compuesto 9d (que no es según la invención)

35 Se trató una disolución del compuesto 9c (18,3 mg, 23,2 μ mol) en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml) con diisopropiletilamina (20 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (35 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 16 minutos y que era el componente mayoritario. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 9d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 14 mg (68%); EM MALDI-TOF 887,6 observado.

45 Las siguientes reacciones describen la síntesis de AZC6M-AE-NHS, compuesto 9d.



Ejemplo 10

5 Síntesis de NSP-2Z-DMAE-NHS, compuesto 10f

a) Compuesto 10a

Se trató una disolución de bromuro de 4-bromobencilo (2 g, 8 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) con una disolución 2,0 M de dimetilamina (20 ml) en tetrahidrofurano. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 días. Entonces se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (75 ml) y se lavó con 100 ml de disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se separó la fase de acetato de etilo y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El análisis mediante CCF sobre sílice usando acetato de etilo al 15% en hexanos, no mostró material de partida y sí la formación de un producto polar de $R_f = 0,1$. Se secó la disolución en acetato de etilo a presión reducida para producir un aceite de color amarillo claro. Rendimiento = 1,63 g.

b) Compuesto 10b

Se enfrió una disolución de isatina (1,12 g, 7,6 mmol) en DMF anhidra (20 ml) en un baño de hielo bajo nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (0,366 g, 1,2 equivalentes, dispersión al 60% en aceite mineral). Se agitó la reacción en el baño de hielo durante 30 minutos y entonces se añadió el compuesto 10a (1,63 g, 7,6 mmol) como una disolución en DMF (5 ml) junto con yoduro de cobre (2,9 g, 2 equivalentes). Se calentó la reacción a 140°C bajo nitrógeno durante 24 horas. Entonces se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y se filtró. La CCF sobre sílice del filtrado usando metanol al 10% en acetato de etilo como eluyente mostró un producto polar de $R_f \sim 0,1$. Se concentró el filtrado a presión reducida. Se suspendió el residuo en 100 ml de KOH acuoso al 10% y se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante 4 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se acidificó con HCl 2 N hasta pH 5. Apareció un precipitado amarillo que se recogió mediante filtración y se secó a vacío. Rendimiento = 0,6 g. Se usó este compuesto tal cual para la siguiente reacción.

c) Compuesto 10c

5 Se trató una suspensión del compuesto 10b (0,2 g, 0,714 mmol) en piridina anhidra (15 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (272 mg, 2 equivalentes) bajo nitrógeno. Después de agitar brevemente durante 5 minutos, se añadió 2,6-dimetil-4-hidroxibenzoato de metilo (128 mg, 0,714 mmol). Se agitó la reacción resultante a temperatura ambiente durante 3 días. Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se repartió el residuo entre acetato de etilo (40 ml) y HCl 1 N (50 ml). Se separó la fase de HCl que contenía producto y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 40 ml). Luego se enfrió la disolución en HCl en un baño de hielo y se trató gota a gota con KOH acuoso al 5% hasta que se separó un precipitado amarillo (pH ~8). Se extrajo esta suspensión con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se lavaron los extractos de acetato de etilo combinados una vez con agua y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 95 mg (30%); EM MALDI-TOF 443,7 observado.

d) Compuesto 10e

15 Se calentó una mezcla del compuesto 10c (22 mg, 49,5 μ mol), 1,3-propanosultona (120 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (81,5 μ l, 7,5 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) a 150°C durante 24 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 10d que eluía a Rt = 17,2 minutos (~40% de conversión). Se sometió la mezcla de reacción a tratamiento final tal como se describe en la sección (b), ejemplo 5.

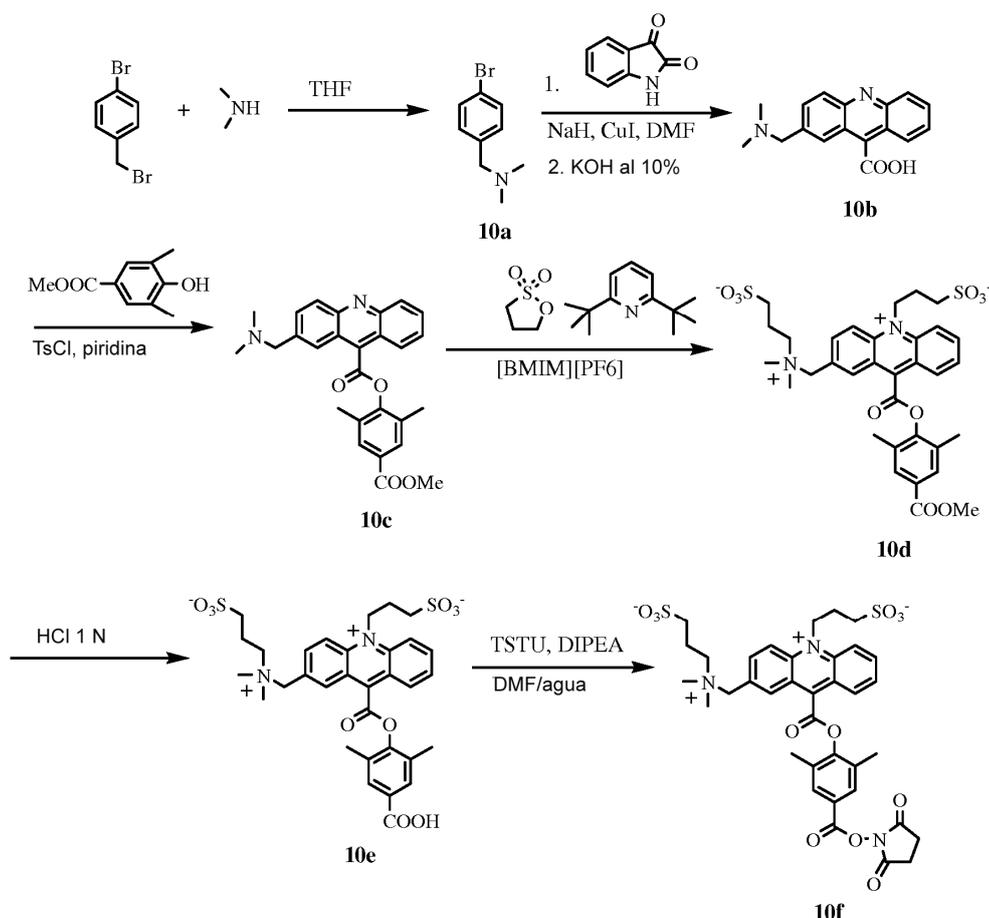
25 Se sometió a reflujo el éster de acridinio 10d en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió hasta temperatura ambiente. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto 10e que eluía a Rt = 14,0 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 10e. Rendimiento = 14,5 mg (44 % global); EM MALDI-TOF 673,3 observado.

e) Compuesto 10f (que no es según la invención)

35 Se trató una disolución del compuesto 10e (14,5 mg, 21,5 μ mol) en DMF (1,8 ml) y agua (0,2 ml) con diisopropiletilamina (18,8 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (32 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 16,5 minutos y que era el componente mayoritario.

40 Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 10f, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 14 mg (85 %); EM MALDI-TOF 769,5 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2Z-DMAE-NHS, compuesto 10f.



Ejemplo 11

5 Síntesis de NSP-DMAE-Z-NHS, compuesto 11f

a) Compuesto 11a

Se trató una disolución de N,N-bis(3-aminopropil)metilamina (1 g, 6,9 mmol) en cloroformo (40 ml) con benciloxicarbonilsuccinimida (3,78 g, 2,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis mediante CCF sobre sílice de la mezcla de reacción usando metanol al 15% en acetato de etilo mostró la formación de un producto polar en una reacción limpia. Se diluyó la mezcla de reacción con cloroformo (40 ml) y se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se secó entonces sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para producir un aceite viscoso que solidificó tras su almacenamiento para dar un sólido ceroso. Rendimiento = 3,2 g; EM MALDI-TOF 414,4 observado.

b) Compuesto 11b

Se trató una disolución del compuesto 11a (1,2 g, 2,9 mmol) en DMF anhidra (15 ml) con 1,3-propanosulfona (0,71 g, 2 equivalentes). Se calentó la reacción a 145°C bajo nitrógeno durante 1 hora. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 19,6 minutos (~80% de conversión), eluyendo el material de partida a Rt = 21,6 minutos. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se disolvió el aceite recuperado en metanol (20 ml). El análisis mediante CCF sobre sílice usando el 40% de metanol, el 60% de acetato de etilo indicó la separación limpia del producto (Rf ~0,2) del material de partida (Rf ~0,3). Se repitió la reacción anterior en la misma escala y se purificó la mezcla de reacción combinada mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando el 40% de metanol, el 60% de acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 1,55 g (60%); espuma blanca; EM MALDI-TOF 536,4 observado.

c) Compuesto 11c

Se agitó el compuesto 11b (0,8 g, 1,49 mmol) en 15 ml de HBr al 33%/AcOH a temperatura ambiente durante 24 horas. Entonces se añadió éter (100 ml) y se separó un sólido granular blanco. Se permitió que sedimentase el

producto y se decantó el éter. Se repitió este procedimiento dos veces con éter (2 x 50 ml). Finalmente, se secó el producto a vacío. Se disolvió el aceite viscoso recuperado en 5-6 ml de agua, se congeló a -80°C y se liofilizó hasta sequedad para producir un sólido vítreo. Rendimiento = 0,766 g (cuantitativo); EM MALDI-TOF 268,2 observado. El análisis mediante CCF sobre sílice usando el 25% de amoníaco, el 75% de metanol y ninhidrina para visualización mostró una única mancha de $R_f \sim 0,2$.

d) Compuesto 11d

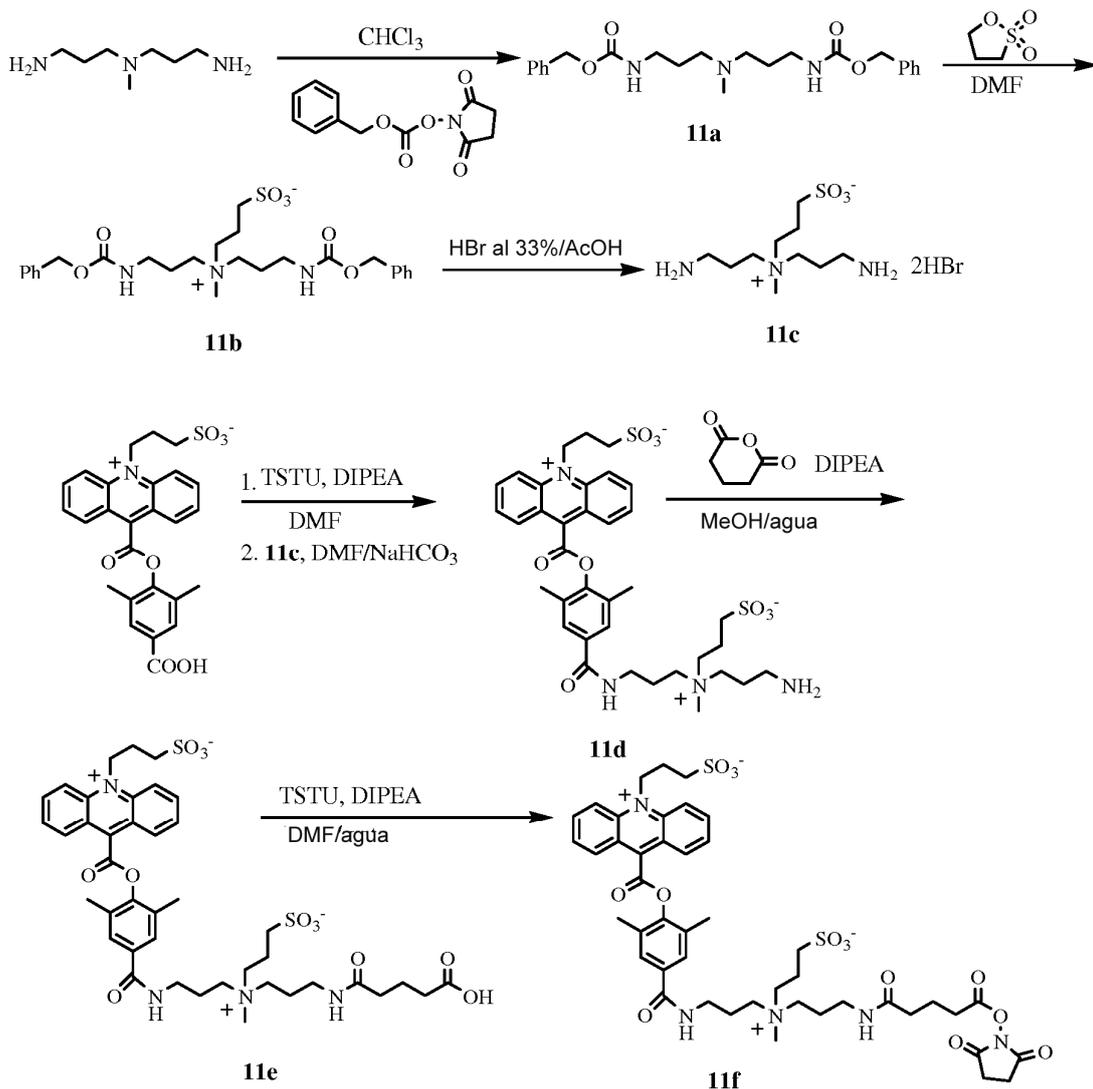
Se trató una disolución de NSP-DMAE (30 mg, 61 μmol , patente estadounidense n.º 6.664.043 B2) en DMF (3 ml) con diisopropiletilamina (16 μl , 1,5 equivalentes) y TSTU (22 mg, 1,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a $R_t = 20$ minutos y que era el componente mayoritario. Se añadió gota a gota la mitad de esta disolución en DMF (1,5 ml) del éster de NHS a una disolución del compuesto 11c (50 mg, 0,187 mmol, forma de amina libre) disuelto en DMF (1 ml) y bicarbonato de sodio 0,15 M (1 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 3 horas, el análisis mediante HPLC mostró la conversión limpia en el producto 11d, que eluyó a 12,4 minutos. Usando un gradiente del 10 \rightarrow 40% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%), el producto eluyó a $R_t = 19,2$ minutos.

Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y gradiente del 10 \rightarrow 40% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 11d y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 19 mg (83 %); EM MALDI-TOF 743,2 observado.

e) Compuesto 11f

Se trató una disolución del compuesto 11d (45 mg, 60,6 μmol) en metanol (3,6 ml) y agua (0,4 ml) con diisopropiletilamina (53 μl , 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (35 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 11e que eluía a $R_t = 14$ minutos y que era el componente mayoritario. Después se eliminó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml). Se trató esta disolución con diisopropiletilamina (106 μl , 10 equivalentes) y TSTU (182 mg, 10 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión completa en el producto 11f que eluía a $R_t = 15,3$ minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y gradiente del 10 \rightarrow 40% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 11f, se congelaron a -80°C y liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 28,7 mg (50 %); EM MALDI-TOF 955,2 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-DMAE-Z-NHS, compuesto 11f.



Ejemplo 12

5 Síntesis de NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, compuesto 12h

a) 1,3-Dimetoxiglicerol, compuesto 12a

Se trató metanol anhidro (100 ml) con gránulos de hidróxido de potasio (25 g, 0,446 mol) y se la suspensión agitó a temperatura ambiente hasta que se hubo disuelto toda la base. Entonces se enfrió esta disolución en un baño de hielo y se añadió gota a gota epiclorhidrina (0,223 mol, 20,6 g). Después de completarse la adición, se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se calentó en un baño de aceite a 75-80°C bajo nitrógeno durante 16 horas. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida. Se disolvió el aceite recuperado en acetato de etilo (150 ml) y se filtró de nuevo y se concentró entonces a presión reducida. Se recuperó un aceite incoloro (21,5 g) que se purificó mediante destilación al vacío para producir 12,9 g (50%) de 1,3-dimetoxiglicerol, compuesto 12a.

b) Compuesto 12b

Se trató una disolución de 1,3-dimetoxiglicerol, compuesto 12a (1 g, 8,3 mmol) en piridina anhidra (20 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (2,38 g, 1,5 equivalentes) y 4-dimetilaminopiridina (0,253 g, 0,25 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 3 días. Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se repartió el residuo entre acetato de etilo (100 ml) y HCl 1 N (50 ml). Se separó la fase de acetato de etilo y se lavó una vez con HCl 1 N (50 ml), seguido por bicarbonato de sodio acuoso (3 x 50 ml). Se secó entonces sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el producto en bruto (2,5 g) mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando acetato de etilo al 20% en hexanos como eluyente. Rendimiento = 1,79 g (65%).

c) Compuesto 12c

Se calentó una disolución de éster metílico de 2,7-dihidroxiacridina (0,1 g, 0,24 mmol), compuesto 12b (0,4 g, 1,45 mmol) y carbonato de cesio (0,2 g, 2,5 equivalentes) en DMF anhidra (6 ml) en un baño de aceite a 90-100°C bajo nitrógeno. Después de 5 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 26,5 minutos y que era el componente mayoritario. Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se repartió el residuo entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se separó la fase de acetato de etilo y se lavó dos veces con agua (2 x 50 ml). Se secó entonces sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el producto en bruto (0,37 g) mediante CCF preparativa sobre sílice usando acetato de etilo/hexanos 1:1. Rendimiento purificado = 58 mg (40%); EM MALDI-TOF 623,1 observado.

d) Compuesto 12e

Se calentó una mezcla del compuesto 12c (58 mg, 93,25 μmol), 1,3-propanosultona destilada (1,14 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (78 mg, 10 equivalentes) a 140-150°C. Después de 2 h, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 12d que eluía a Rt = 20 minutos y que era el componente mayoritario. Se trató la mezcla de reacción con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1 y se sonicó la mezcla brevemente para dispersar la goma. Se permitió que sedimentase el producto, y se eliminó el disolvente mediante decantación. Se secó el producto en bruto a vacío y se suspendió entonces en 10 ml de HCl 1 N y se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante 3 horas. Entonces se enfrió hasta temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC que indicó hidrólisis completa del éster metílico con el producto 12e, que eluyó a Rt = 17,0 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 100% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 12e y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 56 mg (82 %); EM MALDI-TOF 730,9 observado.

e) Compuesto 12f

Se trató una disolución del compuesto 12e (55 mg, 75,3 μmol) en DMF (3 ml) con diisopropiletilamina (20 μl, 1,5 equivalentes) y TSTU (27 mg, 1,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el éster de NHS que eluía a Rt = 18 minutos y que era el componente mayoritario. Entonces se añadió gota a gota la disolución en DMF del éster de NHS a una disolución del compuesto 11c (168 mg, 0,376 mmol, sal de 2HBr) disuelto en agua (1,68 ml) y bicarbonato de sodio 0,5 M (1,68 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión limpia en el producto 12e, que eluyó a 12,4 minutos.

Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 100% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 12f y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 63,8 mg (86%); MALDI-TOF 979,1MS observado.

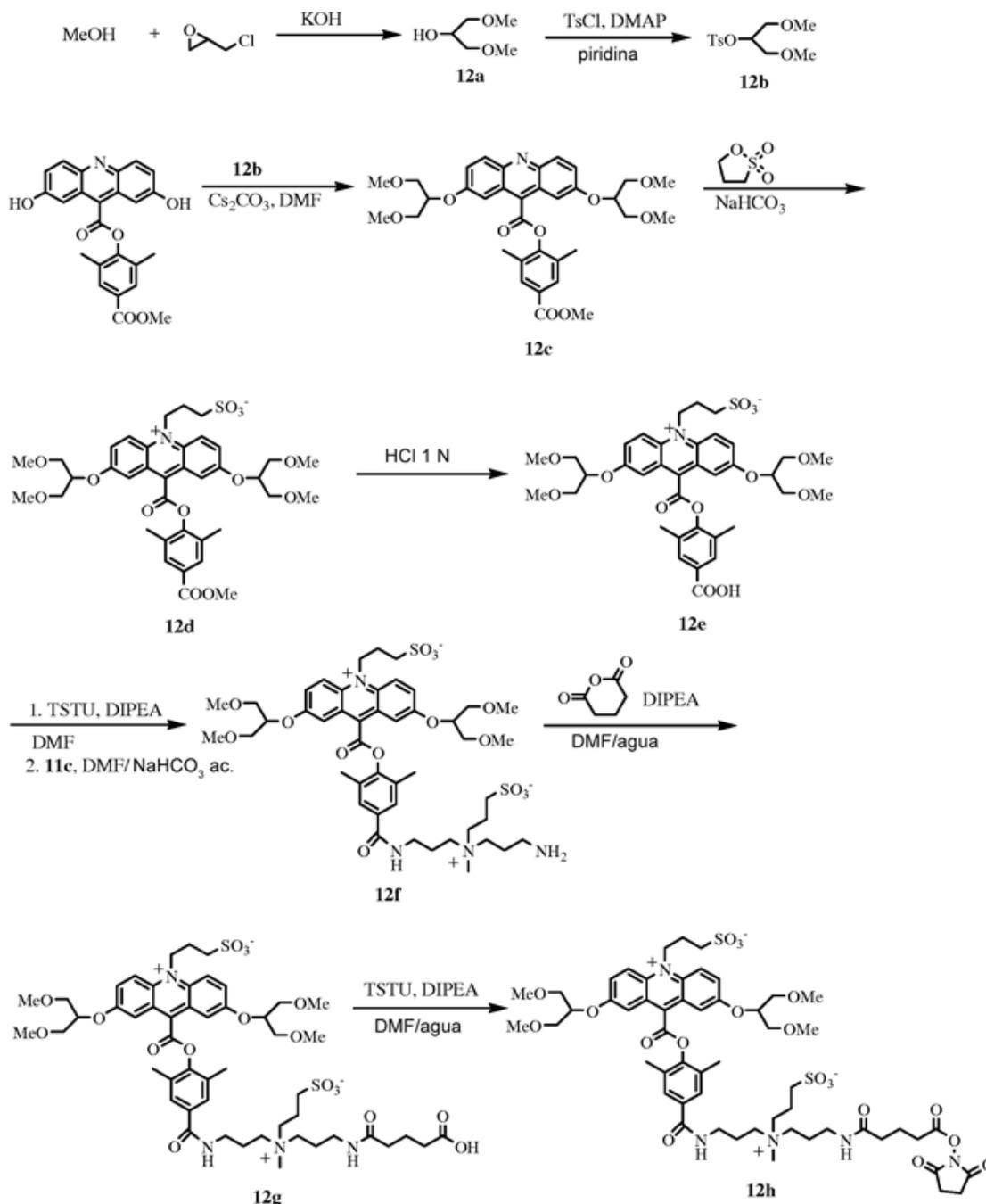
f) Compuesto 12h

Se trató una disolución del compuesto 12f (63,8 mg, 65,2 μmol) en metanol (4,0 ml) con diisopropiletilamina (57 μl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (74 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 100% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 12g que eluía a Rt = 13,5 minutos y que era el componente mayoritario. Después se eliminó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMF (5,4 ml) y agua (0,6 ml). Se trató esta disolución con diisopropiletilamina (114 μl, 10 equivalentes) y TSTU (200 mg, 10 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión completa en el producto 12h que eluía a Rt = 14,3 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 70% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las

fracciones de HPLC que contenían el producto 12h, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 49,3 mg (63 %); EM MALDI-TOF 1188,9 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, compuesto 12h.

5



Ejemplo 13

10 Síntesis de NSP-DMAE-Z2-NHS, compuesto 13e

a) Compuesto 13a

15 Se enfrió una disolución de cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (0,126 ml, 1,2 mmol) en éter anhidro (5 ml) hasta -5°C en un baño de hielo-sal bajo una atmósfera de nitrógeno y se trató con 2,6-lutidina (0,14 ml, 1,2 mmol) en una porción. Se agitó la reacción a -5°C durante 30 minutos, se calentó entonces hasta temperatura ambiente. Entonces se filtró la reacción a través de lana de vidrio en una disolución con agitación de 11a (0,325 g, 0,79 mmol) disuelto en ácido acético (5 ml). Después de 4-5 horas, se eliminó el disolvente a presión reducida. Se suspendió el residuo en

tolueno (5 ml) y se concentró a presión reducida. Se repartió el producto en bruto entre agua (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Se separó la fase acuosa y se lavó una vez con cloroformo (50 ml). Se ajustó el pH de la fase acuosa a 9 con hidróxido de amonio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Entonces se concentró la fase acuosa a presión reducida para producir un sólido blanco. Rendimiento = 0,18 g, (43%); EM MALDI-TOF 522,8 observado).

Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción del producto usando una columna Phenomenex PRODIGY, C₁₈ de 10 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 4,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto limpio que eluía a Rt = 21 min sin material de partida.

b) Compuesto 13b

Se agitó el compuesto 13a (78 mg, 0,15 mmol) en 5 ml de HBr al 33%/AcOH a temperatura ambiente durante 24 horas. Entonces se añadió éter (75 ml) y se separó un sólido granular blanco. Se permitió que sedimentase el producto y se decantó el éter. Se repitió este procedimiento dos veces con éter (2 x 50 ml). Finalmente, se secó el producto a vacío. Rendimiento = 48 mg (77%). Se usó este material tal cual para la siguiente reacción.

c) Compuesto 13c

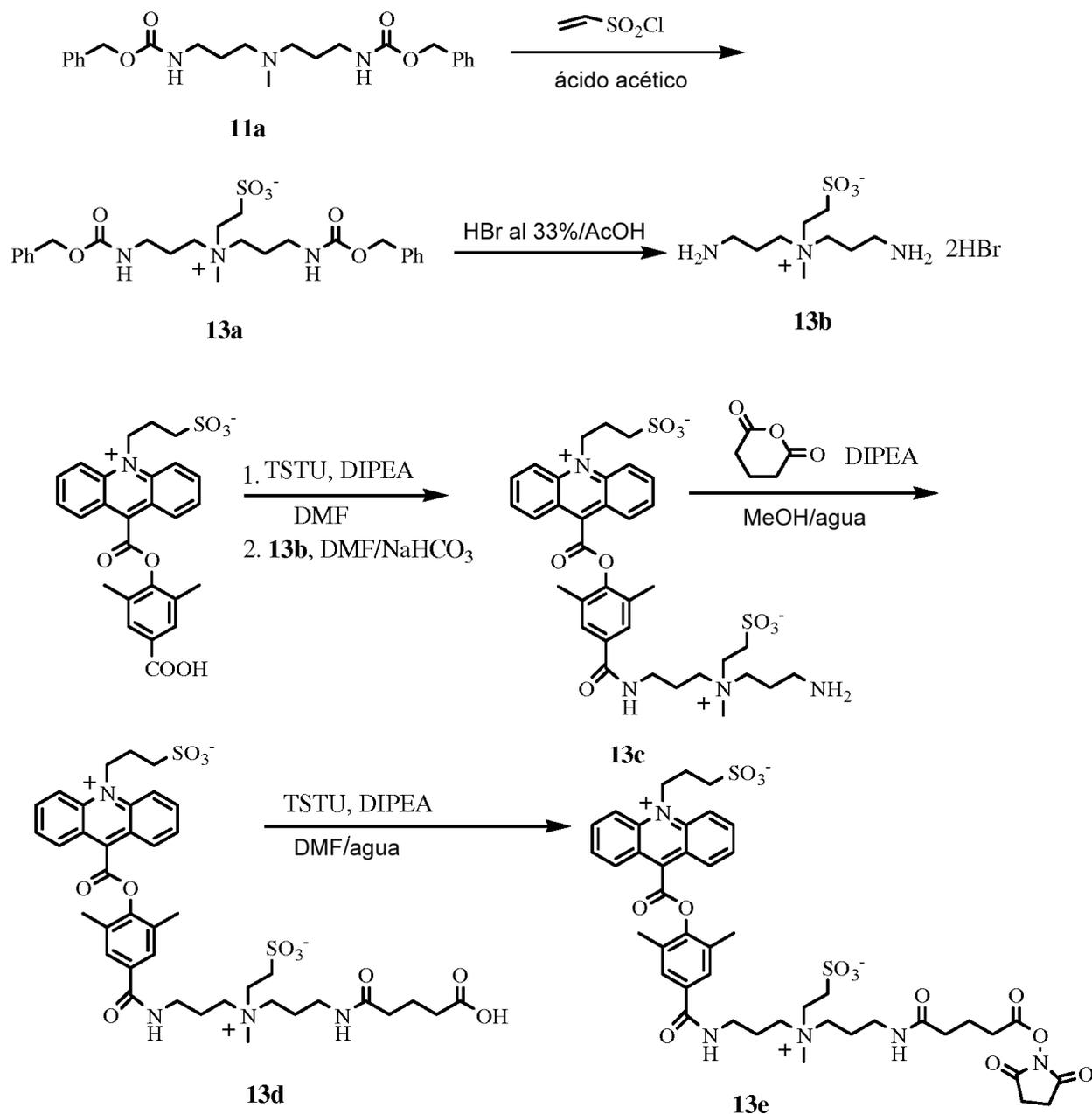
Se trató una disolución de NSP-DMAE (14 mg, 28,4 μmol, patente estadounidense n.º 6.664.043 B2) en DMF (1 ml) con diisopropiletilamina (7,4 μl, 1,5 equivalentes) y TSTU (10,3 mg, 1,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 20 minutos y que era el componente mayoritario. Se añadió gota a gota esta disolución en DMF del éster de NHS a una disolución del compuesto 13b (48 mg, 0,116 mmol, sal de HBr) disuelto en bicarbonato de sodio 0,25 M (3 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión limpia en el producto 13c, que eluyó a 12,4 minutos.

Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 13c y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 19 mg (90 %).

d) Compuesto 13e

Se trató una disolución del compuesto 13c (19 mg, 26,1 μmol) en metanol (3,6 ml) y agua (0,4 ml) con diisopropiletilamina (22,8 μl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (15 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 13d que eluía a Rt = 14,6 minutos y que era el componente mayoritario (>80%). Después se eliminó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml). Se trató esta disolución con diisopropiletilamina (45,6 μl, 10 equivalentes) y TSTU (79 mg, 10 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión completa en el producto 13e que eluía a Rt = 15,7 minutos. Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 13e, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 15 mg (60 %).

Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-DMAE-Z2-NHS, compuesto 13e.

Ejemplo 145 Síntesis de NSP-DMAE-ZCB-NHS, compuesto 14da) Compuesto 14a

10 Se trató una disolución de 11a (0,6 g, 1,45 mmol) disuelto en MeCN (5 ml) con ácido acrílico (1 ml, 1,45 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 36 horas. Después se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando MeOH:EtOAc 3:2 como eluyente. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 0,432 g, (61%); MALDITOF MS 486,1 observado).

15 b) Compuesto 14b

20 Se agitó el compuesto 14a (0,43 g, 0,88 mmol) en 10 ml de HBr al 33%/AcOH a temperatura ambiente durante 24 horas. Entonces se añadió éter (100 ml) y se separó un sólido granular blanco. Se permitió que sedimentase el producto y se decantó el éter. Se repitió este procedimiento cuatro veces con éter (4 x 50 ml). Finalmente, se secó el producto a vacío. Se disolvió entonces en agua (5 ml), se congeló y se liofilizó. Rendimiento = 0,35 g (cuantitativo); EM MALDI-TOF 218,3 observado.

c) Compuesto 14c

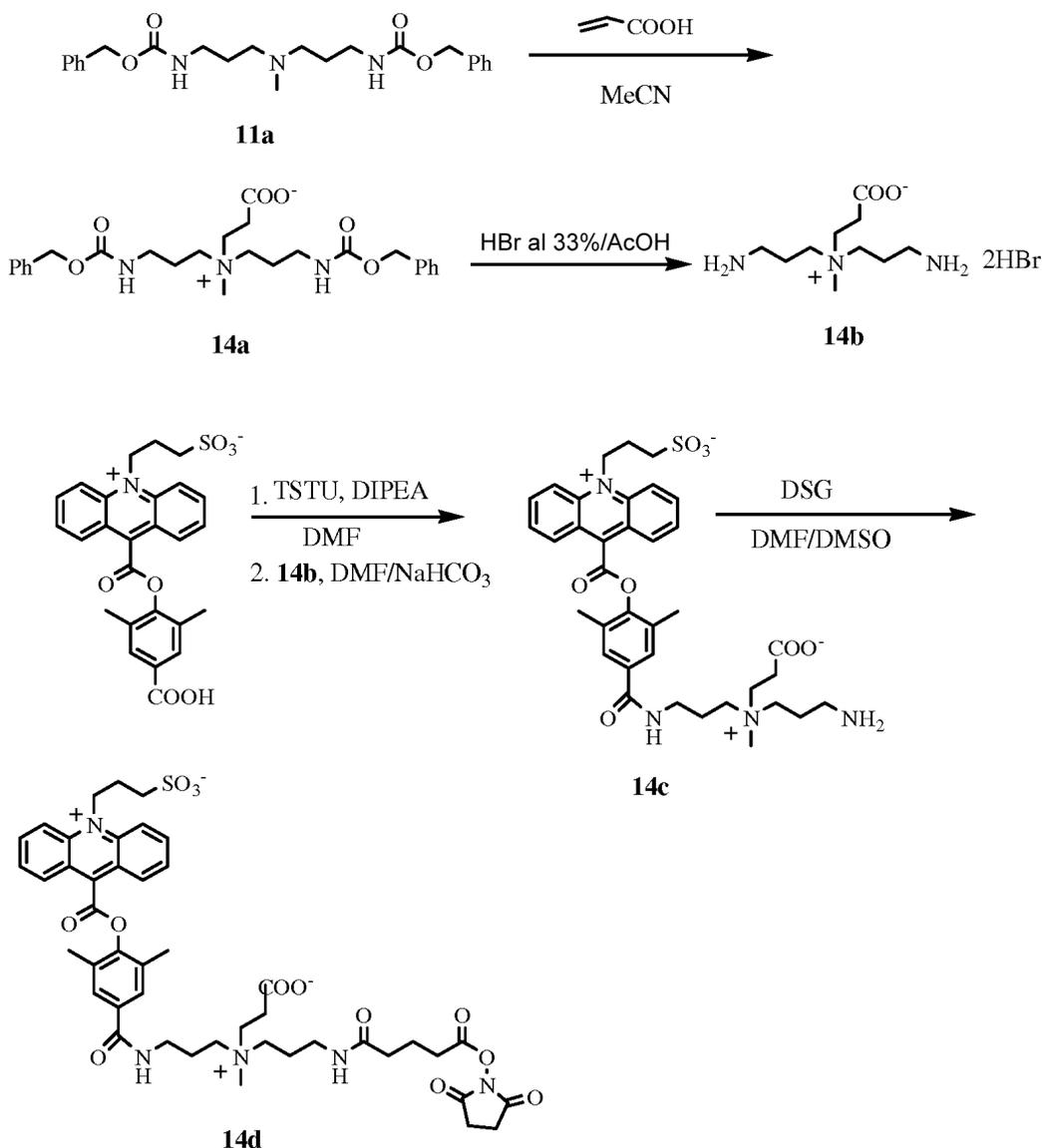
5 Se trató una disolución de NSP-DMAE (25 mg, 51,0 μ mol, patente estadounidense n.º 6.664.043 B2) en DMF (2 ml) con diisopropiletilamina (11,3 μ l, 1,5 equivalentes) y TSTU (18,3 mg, 1,2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió gota a gota esta disolución en DMF del éster de NHS a una disolución del compuesto 14b (80 mg, 0,2 mmol, sal de HBr) disuelto en bicarbonato de sodio 0,25 M (0,8 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm, 10 mostró la conversión limpia en el producto 14c, que eluyó a 12,0 minutos.

Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 \rightarrow 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 14c y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 38 mg (cuantitativo); EM MALDI-TOF 692,9 observado.

e) Compuesto 14d

20 Se trató una disolución del compuesto 14c (20 mg, 29 μ mol) en DMF (1,0 ml) y DMSO (2,0 ml) con diisopropiletilamina (8,6 μ l, 2 equivalentes) se añadió gota a gota a una disolución con agitación de glutarato de disuccinimidilo (38 mg, 0,117 mmol) en DMF (1 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 60 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una 25 columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 \rightarrow 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 14d que eluía a Rt = 15,0 minutos y que era el componente mayoritario (>70%). Se purificó el producto mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 \rightarrow 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 30 disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían el producto 14d, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 4 mg (15 %); EM MALDI-TOF 905,5 observado.

35 Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-DMAE-ZCB-NHS, compuesto 14d.



Ejemplo 15

5 Síntesis de CN-NSP-DMAE-Z3-NHS, compuesto 15fa) Compuesto 15a

Se calentó una suspensión de éster metílico de NSP-DMAE (0,223 g, 0,44 mmol) en cloruro de tionilo (5 ml) a 80°C bajo una atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa. Después de una hora, se formó una disolución oscura que se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió hexano (50 ml) y se separó un sólido pegajoso de color marrón oscuro. Se decantó el hexano y se enjuagó el residuo una vez con hexano (25 ml) y se secó muy brevemente a vacío. A este sólido pegajoso se le añadió una disolución de N,N-dimetiletildiamina (10 ml, en exceso) en MeCN anhidro (10 ml). Se formó una disolución de color marrón oscuro que se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 70% de B durante 30 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 15a que eluía como un pico ancho a Rt = 19 minutos. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se disolvió el residuo en metanol (5 ml), se diluyó con tolueno (15 ml) se concentró a presión reducida para producir una espuma pegajosa de color marrón. Rendimiento en bruto = 0,46 g. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando metanol como eluyente. Rendimiento = 0,22 g, (87%); EM MALDI-TOF 577,9 observado.

b) Compuesto 15b

25

Se calentó una mezcla del compuesto 15a, (0,22 g, 0,38 mmol), 1,3-propanosultona destilada (0,465 g, 10 equivalentes) y 2,6-di-tercbutilpiridina (0,42 ml, 5 equivalentes) en [BMIM][PF6] (3 ml) a 155°C durante 16 horas con agitación vigorosa. Entonces se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió acetato de etilo (100 ml). Precipitó el producto y se recogió mediante filtración y se enjuagó con acetato de etilo (25 ml) y metanol (20 ml).

5 Entonces se transfirió el producto en bruto a un matraz de fondo redondo con 50 ml de agua/metanol 1:1. Se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción en bruto usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 40% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó un producto que eluía a Rt = 33 minutos (~90% de conversión). La evaporación de la disolución acuosa a presión reducida dio 0,35 g de un sólido marrón. EM MALDI-TOF 699,2 observado. Se usó este material tal cual para la siguiente reacción.

c) Compuesto 15c

15 Se suspendió el compuesto 15 b (0,35 g, en bruto) en HCl 1 N (20 ml) y se calentó a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas. El análisis mediante HPLC tal como se indica en la sección (b) mostró un producto que eluía a Rt = 27 minutos. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente. Se purificó el producto 15c mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 14 mg; EM MALDI-TOF 685,7 observado.

d) Compuesto 15d

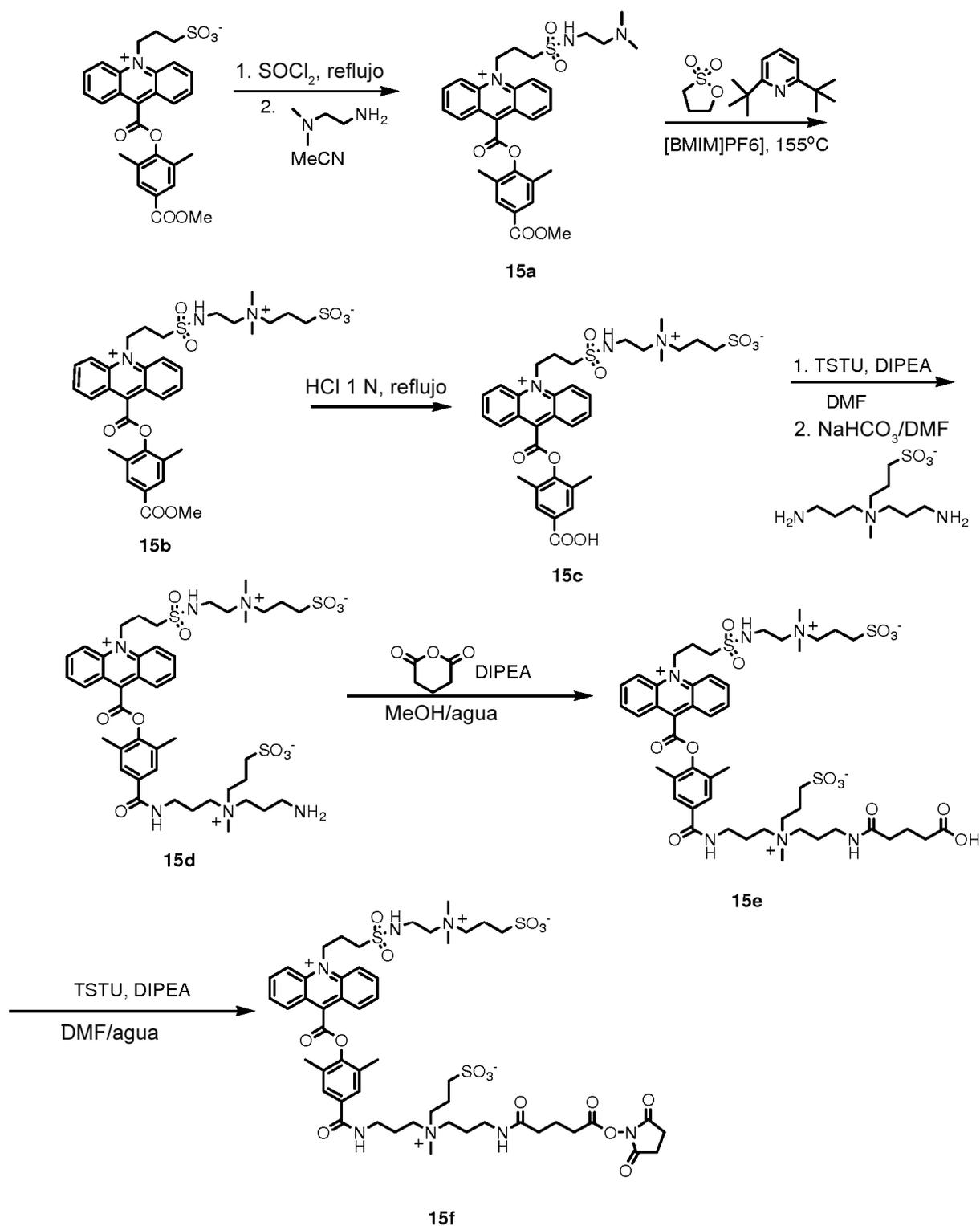
25 Se trató una disolución del compuesto 15c (14 mg, 20 μmol) en DMF (2 ml) con diisopropiletilamina (6 μl, 2 equivalentes) y TSTU (12,3 mg, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se realizó el análisis mediante HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción en bruto usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente del 10 → 40% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó la conversión completa en el éster de NHS que eluía a 22 minutos. Se añadió gota a gota esta disolución en DMF a una disolución con agitación del compuesto 11c (46 mg, 5 equivalentes, sal de HBr) en bicarbonato de sodio 0,25 M (1 ml). Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis mediante HPLC indicó un producto mayoritario que eluía a Rt = 14 minutos.

35 Se purificó el producto 15d mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 18 mg (cuantitativo); EM MALDI-TOF 935,8 observado.

40 e) Compuesto 15f

Se trató una disolución del compuesto 15d (18 mg, 19,2 μmol) en metanol (1,8 ml) y agua (0,2 ml) con diisopropiletilamina (26 μl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (17 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis mediante HPLC tal como se describe en la sección (d) mostró la conversión completa en el derivado de glutarato 15e que eluía a Rt = 16,2 minutos. Se diluyó la reacción con tolueno (5 ml) y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMF (1,8 ml) y agua (0,2 ml) y se trató con diisopropiletilamina (52 μl, 10 equivalentes) y TSTU (90 mg, 10 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis mediante HPLC mostró la conversión completa en el producto que eluía a Rt = 19 minutos. Se purificó el producto 15f mediante HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y gradiente del 10 → 60% de B durante 40 minutos (A = agua con TFA al 0,05%, B = MeCN con TFA al 0,05%) a una velocidad de flujo de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se combinaron las fracciones de HPLC que contenían producto, se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 6,5 mg (30%); EM MALDI-TOF 1146,6 observado.

55 Las siguientes reacciones describen la síntesis de CN-NSP-DMAE-Z3-NHS, compuesto 15f.



Ejemplo 16

5 Procedimiento general para el marcaje de AcM anti-TSH con éster de acridinio

Se diluyó una disolución madre del anticuerpo (5 mg/ml, 200 μl , 1,0 mg, 6,7 nmoles) con carbonato de sodio 0,1 M pH 9 (250 ml) para dar una disolución $\sim 2,0$ mg/ml. A esta disolución se le añadieron 10 equivalentes del éster de NHS de acridinio como una disolución o bien en disolución de DMF/agua 1:1 o bien en DMSO. Por ejemplo, usando NSP-DMAE-Z-NHS, 11f esto conllevó la adición de 64 microgramos añadidos a partir de una disolución 5 mg/ml (12,8 μl) del éster de acridinio. Se agitaron suavemente las reacciones de marcaje a 4°C durante 16 horas y luego se diluyeron con agua desionizada hasta 4 ml. Entonces se transfirieron estas disoluciones diluidas a filtros Centricon™

10

de 4 ml (punto de corte de PM de 30.000) y se centrifugaron a 4000 G para reducir el volumen hasta ~0,2 ml. Se repitió este procedimiento tres veces más. Finalmente se diluyeron los conjugados filtrados en un volumen total de 250 µl de agua para el análisis del espectro de masas y mediciones de URL.

- 5 Se registraron los espectros de masas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Voyager DE y se usó el anticuerpo sin marcar como referencia. Se mezclaron aproximadamente 2 µl de la disolución de conjugado con 2 µl de disolución de matriz de ácido sinapínico (HP) y luego se aplicaron a una placa para MALDI. Después del secado completo, se registraron los espectros de masas. A partir de la diferencia en los valores de masa para el anticuerpo sin marcar y los conjugados, pudo medirse la extensión de incorporación de AE. Normalmente, en estas condiciones de marcaje, se incorporaron ~5 marcadores de AE en el anticuerpo.

Ejemplo 17

Mediciones de quimioluminiscencia

- 15 Se diluyó cada anticuerpo marcado con éster de acridinio hasta una concentración de 0,2 nanomolar en un tampón que consistía en fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 6 mM y albúmina sérica bovina (BSA) 1 g/l. se integró la cinética de quimioluminiscencia para 10 microlitros de cada conjugado de éster de acridinio-anticuerpo sometido a prueba a intervalos de 0,1 segundos durante 10 segundos en condiciones convencionales en un luminómetro Autolumat LB953 de Berthold Technologies con la adición secuencial de 300 microlitros de cada uno de reactivo 1 (ácido nítrico 0,1 M y peróxido de hidrógeno al 0,5%) y reactivo 2 (hidróxido de sodio 0,25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0,05%). Se comparó la cinética de quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio sometidos a prueba para determinar la tasa relativa de emisión de luz así como la producción de luz total.

Ejemplo 18

Medición de unión no específica

- 30 Se sometieron a prueba compuestos de acridinio zwitteriónicos como marcadores en un inmunoensayo para la comparación con compuestos de acridinio de control usados por separado como marcadores en el mismo inmunoensayo. El ensayo TSH3 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics es uno de una serie de inmunoensayos vendidos comercialmente por Siemens Healthcare Diagnostics para la aplicación en ACS:180®. El ensayo TSH3 es un inmunoensayo de tipo sándwich que usa un compuesto de acridinio quimioluminiscente de un anticuerpo anti-TSH para la medición del analito TSH (hormona estimulante del tiroides) en una muestra.

- El ensayo TSH3 tiene dos anticuerpos, uno de los cuales es un anticuerpo de ratón unido al compuesto de acridinio, denominándose la combinación el trazador, mientras que el otro anticuerpo se une a partículas paramagnéticas (PMP), en el que esta combinación se denomina fase sólida. En este ensayo de ejemplo, tanto los compuestos de acridinio zwitteriónicos como también los compuestos de control de acridinio se unieron cada uno al mismo anticuerpo en partes separadas. En este ensayo de ejemplo, sólo se midió la unión no específica cuando se sometieron a prueba conjugados de éster de acridinio o trazadores en ausencia del analito TSH en la muestra. Se diluyeron los trazadores hasta una concentración de 2,2 nM en un tampón que contenía ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,15 M, cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 7,7 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1,0 mM, t-octilfenoxipoliétoxietanol (Triton X-100) 12 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 5 g/l, anfotericina B 0,20 g/l, sulfato de gentamicina 0,48 g/l, IgG de ratón 1 g/l, IgG de oveja 10 mg/l, suero de ratón 5,0 g/l, antiespumante B 0,05 g/l, pH 7,7. En este ensayo de ejemplo, se sometieron a prueba tres fases sólidas con los compuestos de acridinio: fase sólida del ensayo TSH3 de Siemens Healthcare Diagnostics, fase sólida del ensayo de iPTH (hormona paratiroidea intacta) de Siemens Healthcare Diagnostics (anticuerpo policlonal anti-PTH de cabra biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M280) y ultraensayo de TnI (troponina I) de Siemens Healthcare Diagnostics (anticuerpo monoclonal anti-TnI de ratón biotinilado unido a estreptavidina-Dynal M270).

- ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics es un dispositivo robótico automatizado diseñado para realizar una serie de inmunoensayos para diferentes analitos. Se inició el procedimiento automatizado para el ensayo TSH3 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics con la dispensación de 200 µl cada de muestra de suero que no contenía analito TSH en cubetas separadas. Una cubeta es un recipiente ópticamente transparente o translúcido para mezclar el trazador, la muestra y la fase sólida y en la que se mide la quimioluminiscencia. Las muestras no contenían el analito TSH. Se dispensaron entonces al ACS:180® 0,100 ml de trazador 2,2 nM (0,22 pmol) y 0,225 ml de fase sólida 0,3 g/l (67 mg) en cada cubeta que contenía las muestras, de tal manera que se usaron la misma cantidad de trazador y fase sólida para todos los compuestos de acridinio sometidos a prueba. El primero de los dos reactivos de ensayo era una disolución, que contenía el anticuerpo anti-TSH conjugado con el compuesto de acridinio. Tanto los compuestos de acridinio zwitteriónicos como los compuestos de acridinio de control se sometieron a prueba por separado como marcadores para los trazadores. Se prepararon los trazadores y se purificaron usando el procedimiento descrito previamente usando compuestos de acridinio y anticuerpo de ratón de unión a TSH. El número de compuestos de acridinio por anticuerpo en cada trazador era aproximadamente igual para todos los compuestos de acridinio sometidos a prueba. Por tanto, cualquier diferencia en la unión no específica

medida para cada compuesto de acridinio pudo relacionarse con la estructura del compuesto de acridinio. Se calentó la mezcla de trazador, muestra y fase sólida en cada cubeta durante 5,0 minutos a 37°C. Se retiró el trazador no unido de la fase sólida con separación magnética de la fase sólida de la mezcla en la cubeta, seguido por la retirada de fluido de la cubeta y lavado de la fase sólida en la cubeta con agua para retirar todo excepto la fase sólida y cualquier cantidad de trazador unido a la misma.

Se inició la quimioluminiscencia de compuestos de acridinio en la fase sólida con la posterior emisión de luz con adiciones secuenciales de 0,30 ml cada vez de reactivo 1 para ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics y reactivo 2 para ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. El reactivo 1 para ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics era ácido nítrico 0,1 M y peróxido de hidrógeno al 0,5%. El reactivo 2 para ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics era hidróxido de sodio 0,25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0,05%. Entonces se midió la quimioluminiscencia en cada cubeta como unidades relativas de luz (URL), correspondiendo cada cubeta a una única muestra sometida a ensayo. Se midió la unión no específica para compuesto de acridinio sometido a prueba como quimioluminiscencia en unidades de URL, midiéndose el número de URL mediante el ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. La unión no específica fraccionaria se define como la razón de la quimioluminiscencia de unión no específica con respecto a la entrada de quimioluminiscencia total en cada cubeta a partir de trazador 0,22 pmol. La minimización de la unión no específica fraccionaria maximiza la medición de señal específica, mejorando por tanto la medición de menores cantidades de analito y potenciando el rendimiento del inmunoensayo. En este ensayo de ejemplo, los compuestos de acridinio zwitteriónicos tienen menor unión no específica fraccionaria y se esperaría por tanto que potenciasen el rendimiento del inmunoensayo.

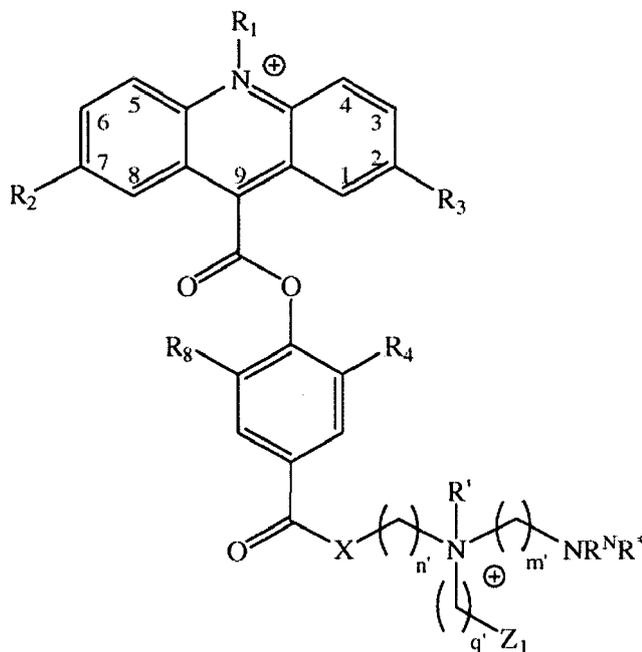
Ejemplo 19

Medición de la estabilidad de quimioluminiscencia del conjugado de acridinio

Se diluyeron los conjugados de compuestos de acridinio zwitteriónicos y compuestos de acridinio de control NSP-DMAE-HEG y HQY-AE hasta una concentración de 0,1 nM en un tampón que contenía ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,15 M, cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 7,7 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1,0 mM, t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) 12 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 5 g/l, anfotericina B 0,20 g/l, sulfato de gentamicina 0,48 g/l, IgG de ratón 1 g/l, IgG de oveja 10 mg/l, suero de ratón 5,0 g/l, antiespumante B 0,05 g/l, pH 7,7. Entonces se almacenaron todos los conjugados o bien a 4 o bien a 37°C durante cuatro semanas en frascos de polietileno sellados. Se retiraron periódicamente 10 µl de cada trazador almacenado o bien a 4 o bien a 37°C para la medición de quimioluminiscencia en el quimioluminómetro Bertholdt ALB953 que usaba el mismo método para la medición de quimioluminiscencia que ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics usando los reactivos 1 y 2 para ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. Entonces se comparó la quimioluminiscencia como porcentaje con la determinada para cada trazador al comienzo del almacenamiento bien a 4 o bien a 37°C. Una estabilidad de quimioluminiscencia potenciada o equivalente con relación a los compuestos de acridinio de control sería una propiedad deseable para nuevos compuestos de acridinio proporcionar que proporcionan una semivida más larga o equivalente del producto y una reproducibilidad de los resultados día a día mejor o equivalente.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de acridinio quimioluminiscente que tiene la siguiente estructura:



5

en la que, n' , m' , y q' son independientemente un número entero de 1-4,

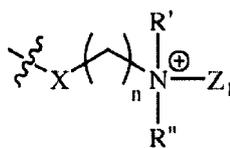
10

R_1 es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo C_{1-35} , cada uno de los cuales puede contener hasta 20 heteroátomos, o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo, o R_1 es un grupo $-R_a-Z$; en el que R_a es un radical divalente seleccionado del alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

15

R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de (i) hidrógeno, (ii) un grupo electrodonador, o (iii) un grupo $-Z$;

Z es un grupo zwitteriónico de la forma:



20

X se selecciona independientemente en cada aparición de un enlace, $-CH_2-$, oxígeno, azufre, $-NR^N-$, amida ($-NR^N(CO)-$), carbamato ($-NR^N C(O)O-$) o urea ($-NR^N C(O)NR^N-$);

25

R' y R'' se seleccionan independientemente en cada aparición de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

30

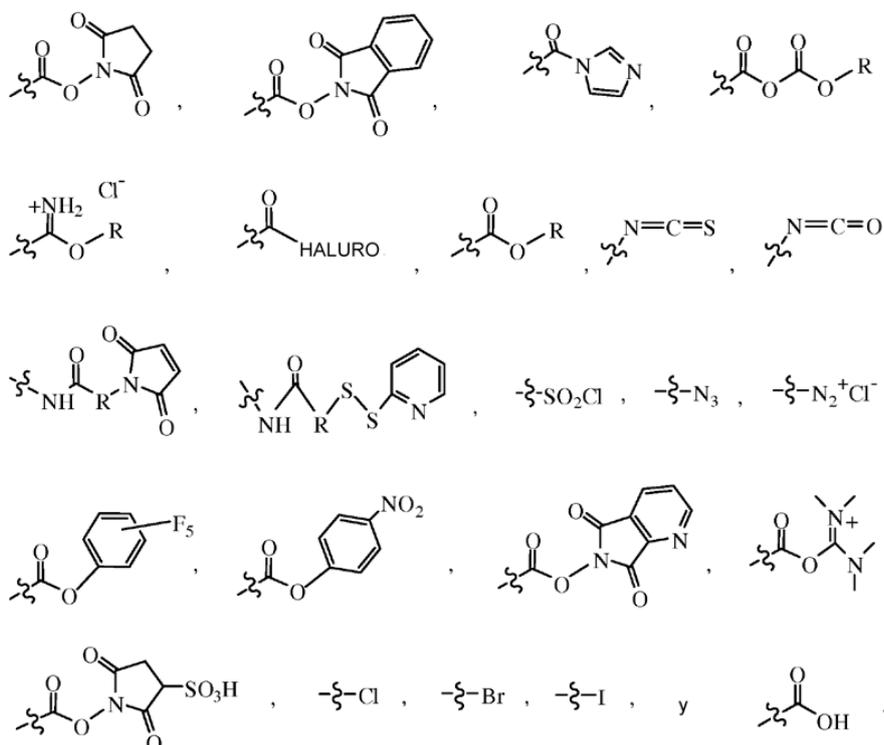
Z_1 es un grupo $-R_a-Z_2$ en el que Z_2 se selecciona de carboxilato ($-COO^-$), sulfonato ($-SO_3^-$), sulfato ($-OSO_3^-$), fosfato ($-OP(O)(OR)(O^-)$), u óxido ($-O-$); o, en el caso en el que Z_2 es un óxido ($-O-$), R_a puede estar ausente;

35

n es, seleccionado independientemente en cada aparición, un número entero de entre uno y 12; y

R_4 y R_8 son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxilo ($-OR$), alquiltiol ($-SR$) o amino sustituido ($-NR_2$) C_{1-35} ;

R^* se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C_{1-35} , conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o R^* es un grupo $-R_a-L$, en el que L se selecciona del grupo que consiste en:



R se selecciona independientemente en cada aparición de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos; y

5

R^N se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos.

10

2. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que uno de R₁, R₂, y R₃ comprende un grupo -L o -R_a-L.

3. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que R' o R'' comprende un grupo -R_a-L.

15

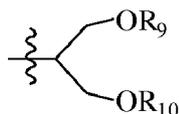
4. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que R' o R'' son, en una aparición, un grupo -R_a-C(O)-CH₂CH₂CH₂-C(O)-N-succinimidilo, -R_a-N-maleimido, -R_a-C(O)-CH₂-Br o -R_a-C(O)-CH₂-I.

20

5. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que dichos grupos electrodonadores se seleccionan del grupo que consiste en (i) alcóxilo (-OR), (ii) un grupo -O-(CH₂CH₂-O)_l-CH₃ en el que l es un número entero desde 1 hasta 12, y (iii) un grupo -O-G, y (vi) un grupo-Z; en los que G es un grupo ramificado seleccionado independientemente en cada aparición de:

25

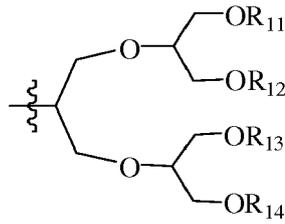
(i)



o;

30

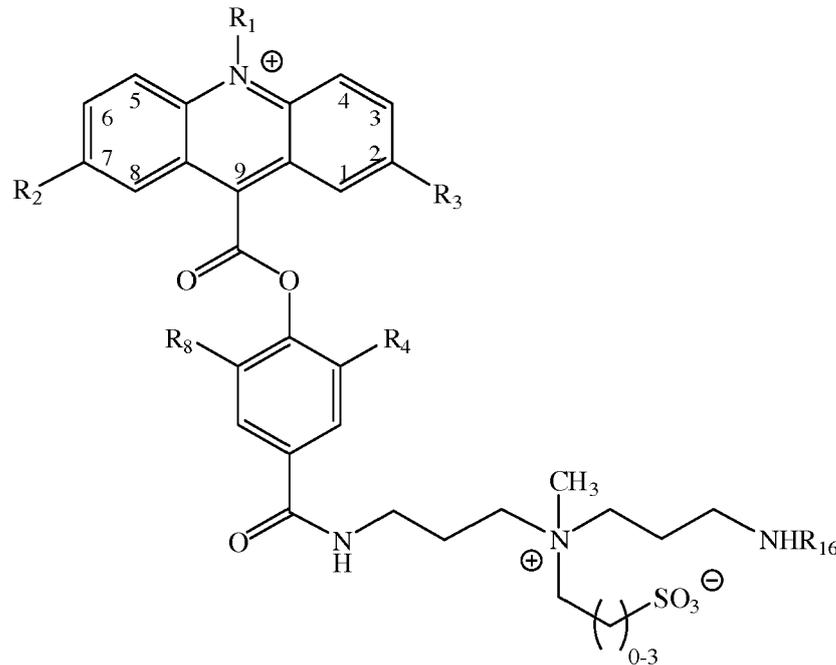
(ii)



y en los que R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ son independientemente en cada aparición un grupo metilo o un grupo -(CH₂CH₂O)_mCH₃, en el que *m* es un número entero desde 1 hasta 5.

5

6. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



10

en la que R₁, R₂, R₃, R₄, y R₈ son tal como se definen en la reivindicación 1; y

R₁₆ se selecciona de (i) hidrógeno, (ii) -C(O)-CH₂CH₂CH₂-C(O)-N-succinimidilo, (iii) -R-N-maleimido en el que R es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo, cada uno de los cuales puede comprender opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o (iv) -C(O)-CH₂-X en el que X es bromo (Br) o yodo (I).

15

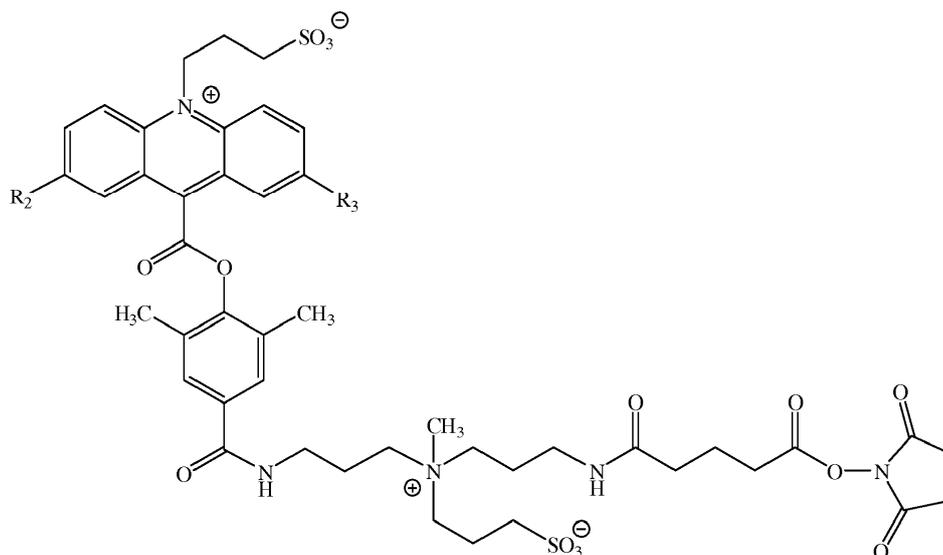
7. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 6, en el que:

R₁ se selecciona de grupos metilo, sulfopropilo (-CH₂CH₂CH₂-SO₃) o sulfobutilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-SO₃); y

20

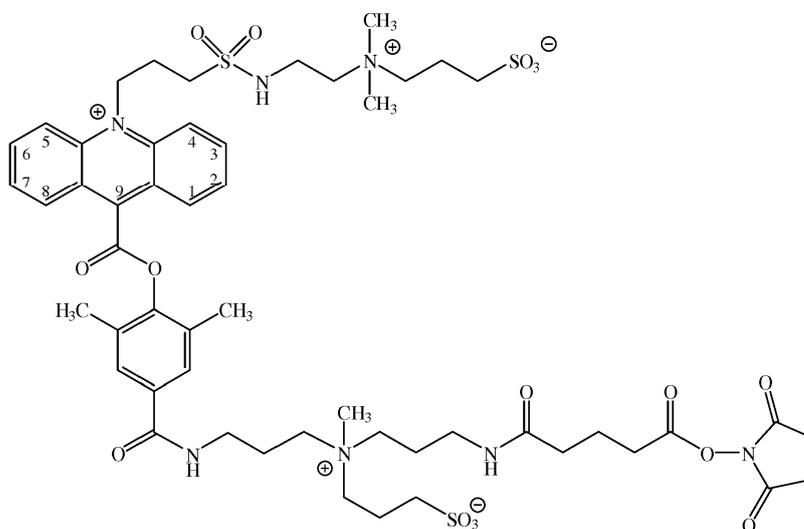
R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno o un grupo -O-G, en el que G se define como en la reivindicación 5.

8. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



en la que R_2 y R_3 son tal como se definen en la reivindicación 1.

- 5 9. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 8, en el que R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno o un grupo -O-G, en el que G es tal como se define en la reivindicación 5.
- 10 10. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 8, en el que R_2 y R_3 son hidrógeno.
- 11 11. Compuesto de acridinio quimioluminiscente según la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



- 15 en el que el compuesto incluye opcionalmente un contraión A para equilibrar el nitrógeno cargado positivamente del núcleo de acridinio.
12. Ensayo para la detección o cuantificación de un analito macromolecular, que comprende:
- 20 (a) proporcionar un conjugado que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 unido a una molécula de unión específica para un analito;
- (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizada sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito;
- 25 (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;
- (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;

- (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;
- 5 (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 patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 10 13. Ensayo para la detección o cuantificación de un analito de molécula pequeña se proporciona que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un conjugado de un analito con un compuesto de acridinio quimioluminiscente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- 15 (b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;
- (c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;
- 20 (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;
- (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;
- 25 (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 30 14. Ensayo para la detección de un analito de molécula pequeña que comprende:
- 35 a) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con un analito o un análogo de analito;
- b) proporcionar un conjugado de una molécula de unión específica para el analito con un compuesto de acridinio quimioluminiscente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- 40 c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra sospechosa de contener el analito para formar un complejo de unión;
- d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;
- 45 e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) añadiendo reactivos que desencadenan luminiscencia;
- f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- 50 g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida desde la mezcla de reacción con una curva patrón de respuesta a la dosis que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

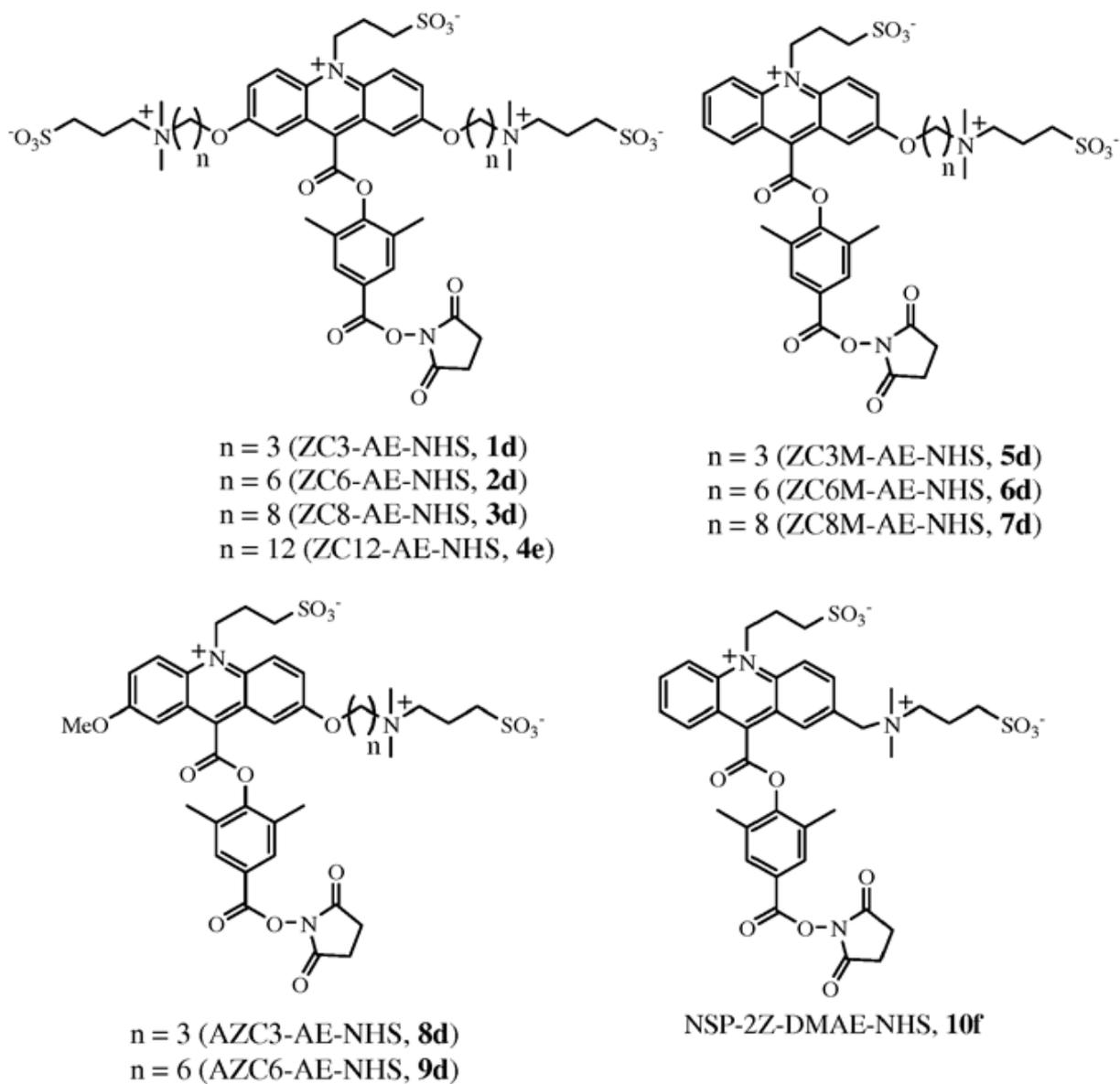
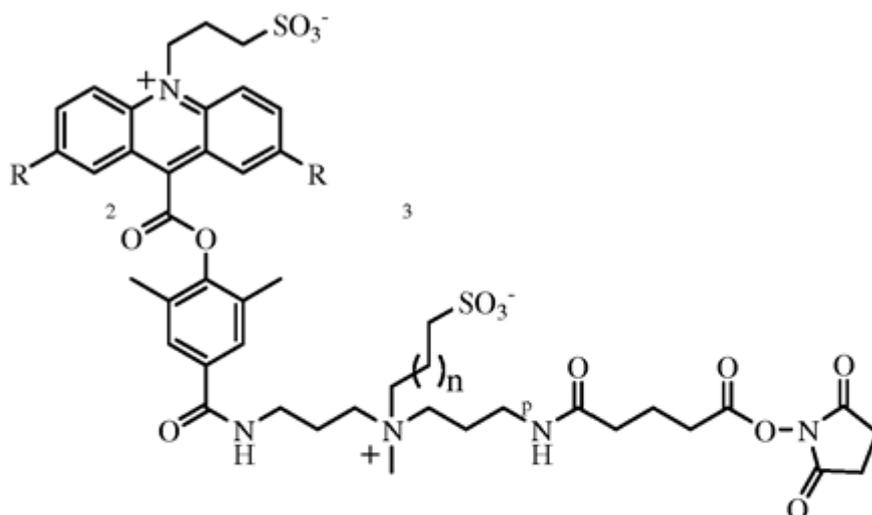


Figura 1.



 $R_2, R_3 = H$ (NSP-DMAE-Z-NHS, **11f**)

$R_2, R_3 = \text{---} \begin{array}{c} \text{---} \text{O} \text{---} \\ | \\ \text{---} \text{C} \text{---} \\ | \\ \text{---} \text{O} \text{---} \end{array} \text{---} \text{OMe}$ $n = p = 1$ (NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, **12h**)

 $R_2, R_3 = H, p = 0$ (NSP-DMAE-Z2-NHS, **13e**)

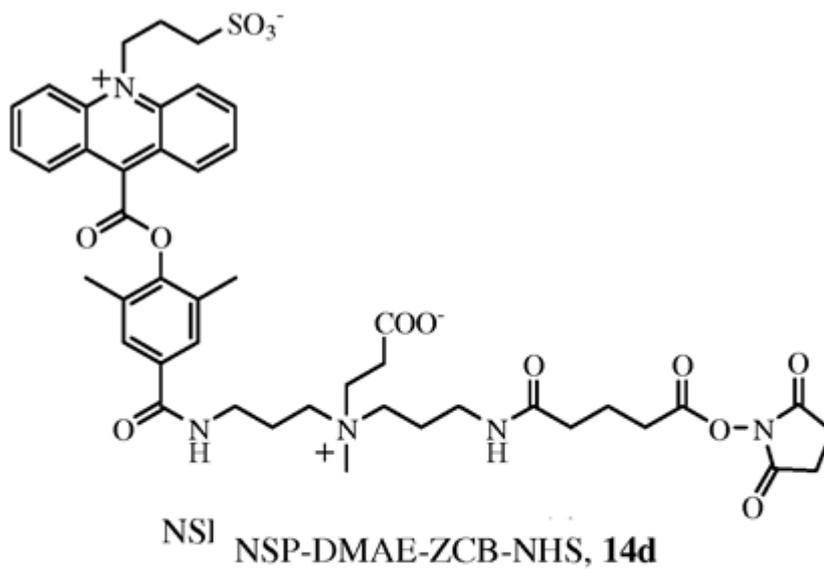


Figura 2.

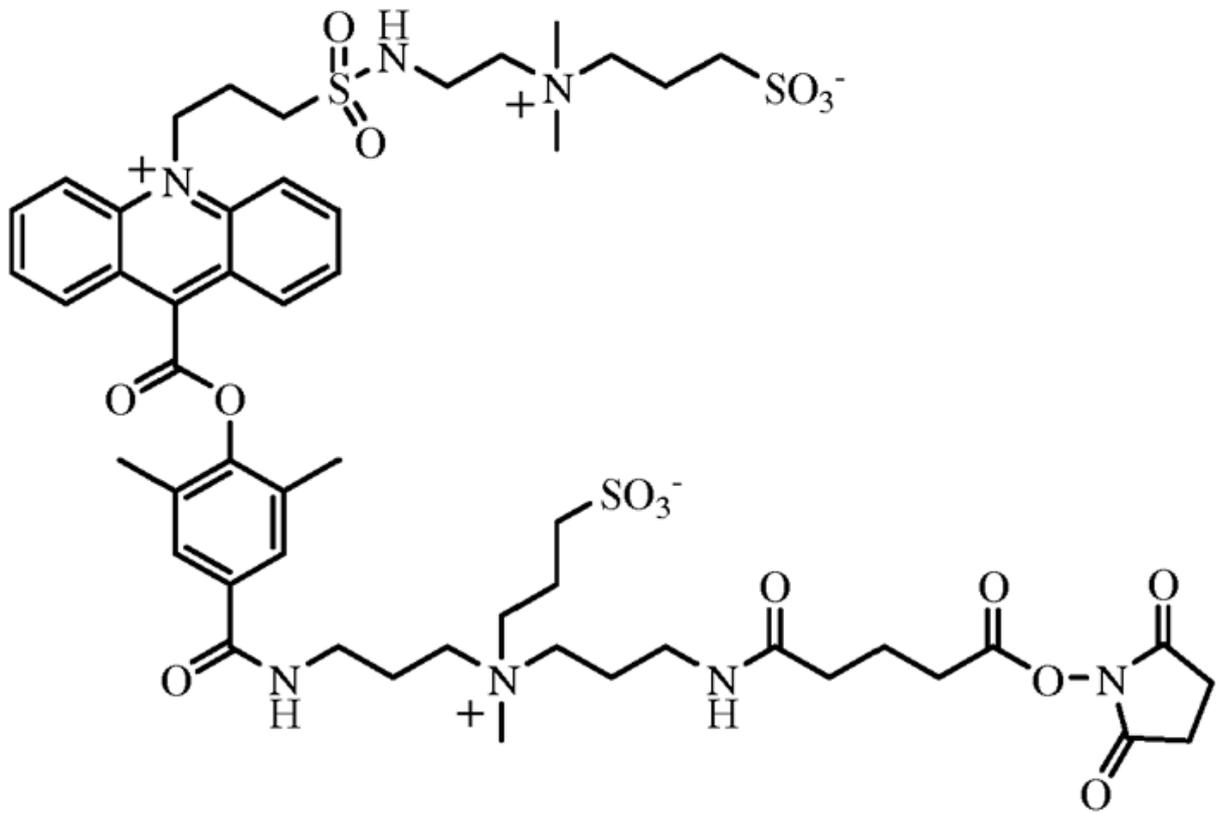


Figura 3.

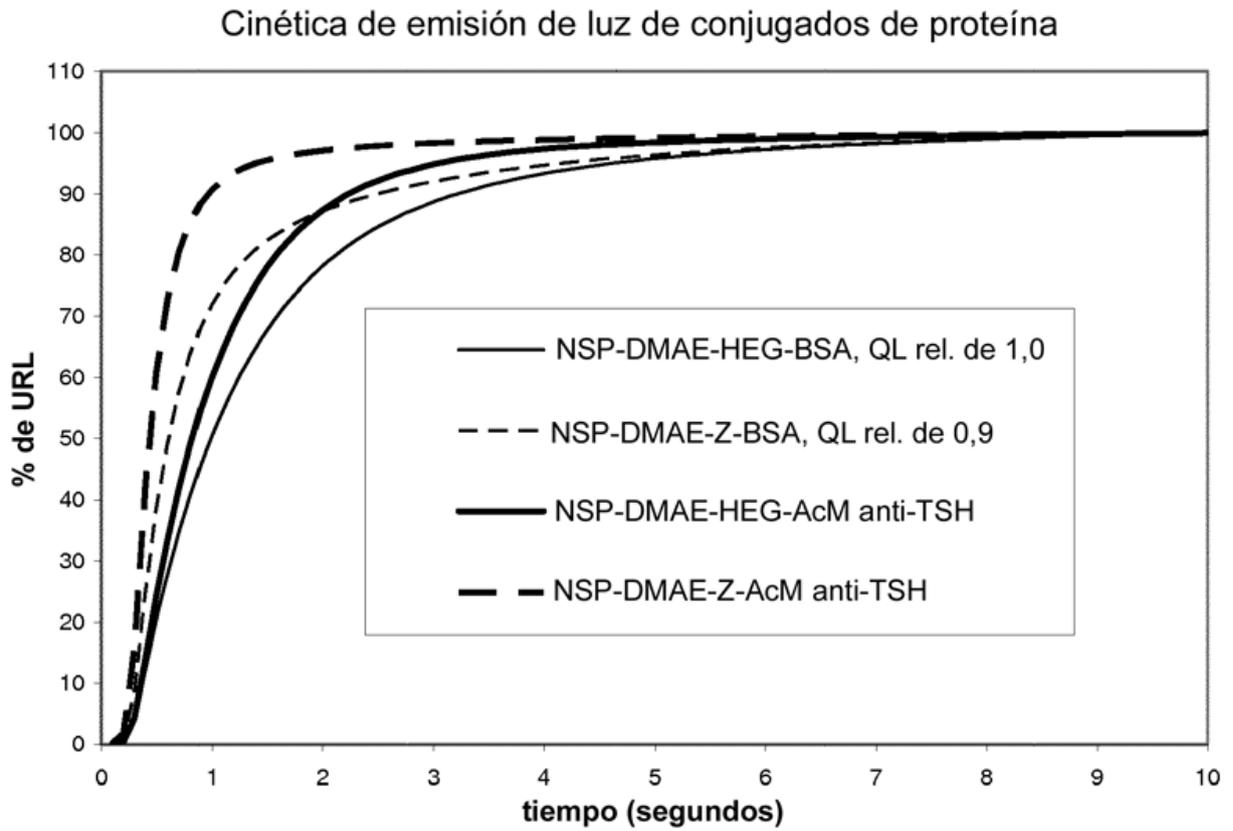


Figura 4.

Emisión de luz desde conjugados de anticuerpo: HQYAE frente a NSP-2,7-DMG-DMAE-Z

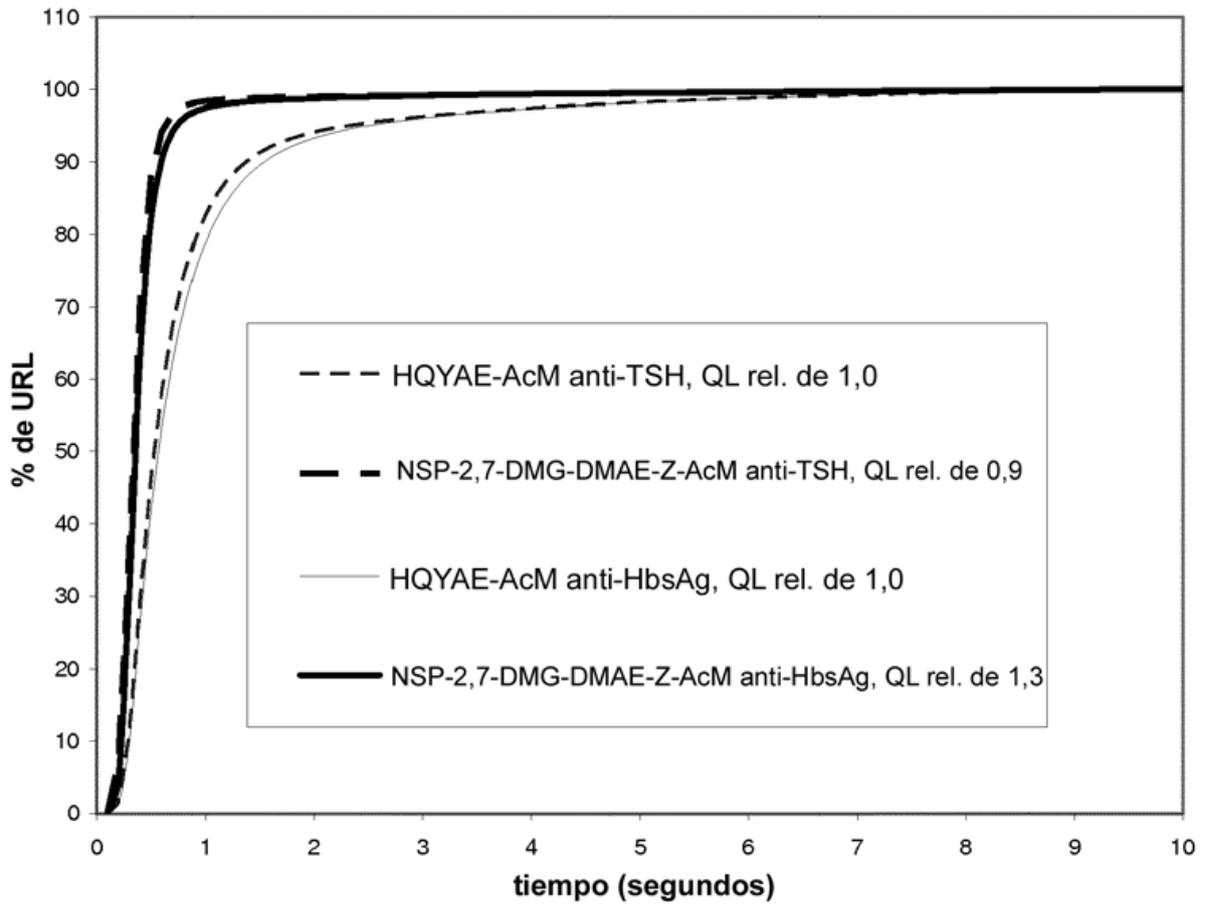


Figura 5

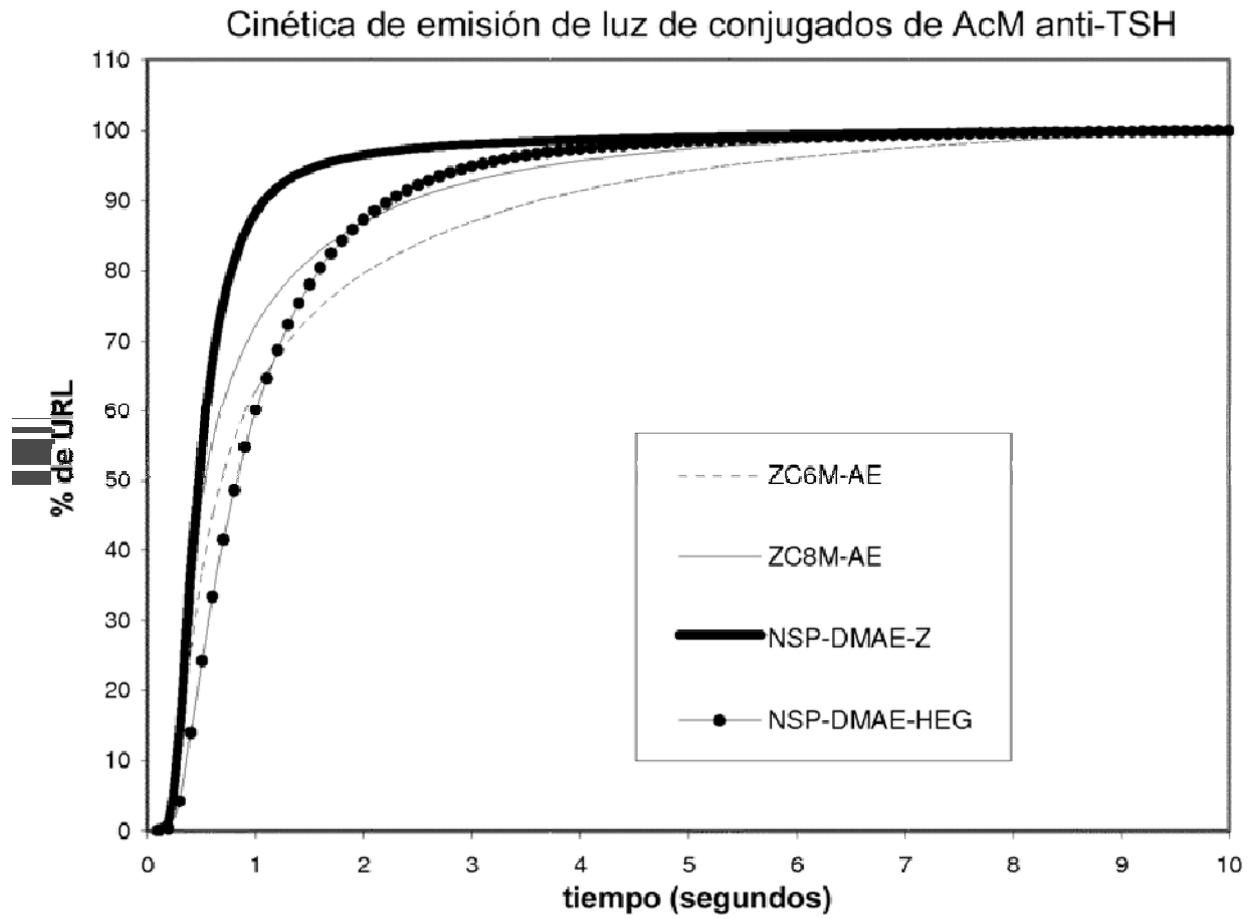


Figura 6.