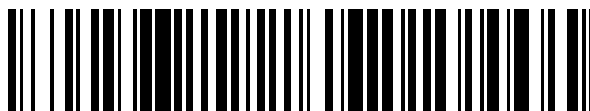


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 649**

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 16163154 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 3067345**

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

30 Prioridad:

16.11.2009 US 261465 P

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

18.02.2019

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:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 700 649 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de acridinio que contienen zwitteriones

Campo de la invención

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

Antecedentes

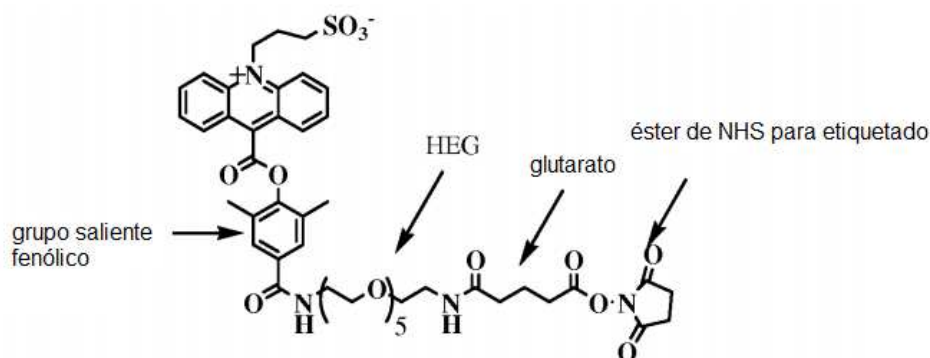
10 Los ésteres de acridinio quimioluminiscentes han surgido como etiquetas extremadamente útiles tanto para inmunoensayos como para ensayos de ácidos nucleicos. La emisión de luz de los ésteres de acridinio se desencadena mediante la reacción con peróxido de hidrógeno alcalino que causa la escisión del enlace éster fenólico y la formación de una acridona en estado excitado, que es la especie emisora de luz. Se ha propuesto la formación de un compuesto intermedio de dioxetanona seguido de la salida del grupo saliente fenol en el mecanismo de reacción y se supone que es el precursor de la acridona en estado excitado. La duración de la emisión de luz de los ésteres de acridinio, que depende de las condiciones de reacción, se completa normalmente en unos pocos segundos y se puede medir cuantitativamente usando un luminómetro. Se ha desvelado la aplicación del éster de acridinio bromuro de 9-carboxi-fenil-N-metilacridinio en un inmunoensayo por parte de Simpson, J.S.A. *et al.* (Nature vol. 279, pág. 646-647 (1979). Sin embargo, este éster de acridinio es bastante inestable, limitando de ese modo su utilidad comercial. La inestabilidad surge de la hidrólisis de la unión éster 9-carboxifenilo lábil entre el fenol y el anillo de acridinio.

20 En un intento por estabilizar el éster fenólico en ésteres de acridinio, Law *et al.* (Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 4, pág. 88-89 (1989) introdujeron dos grupos metilo laterales para estabilizar este enlace éster. El éster de acridinio estabilizado estéricamente resultante, abreviado DMAE-NHS [10-metilacridinio-9-carboxilato de 2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxicarbonil)fenilo] se descubrió que tenía la misma potencia luminosa que un éster de acridinio que carecía de los dos grupos metilo. Por otra parte, la estabilidad del compuesto anterior cuando se conjugaba con una inmunoglobulina era muy superior y no mostraba ninguna pérdida de actividad quimioluminiscente incluso después de una semana a 37 °C a pH 7. Por el contrario, el éster de acridinio sin sustituir solo retenía un 10 % de su actividad cuando se sometía al mismo tratamiento.

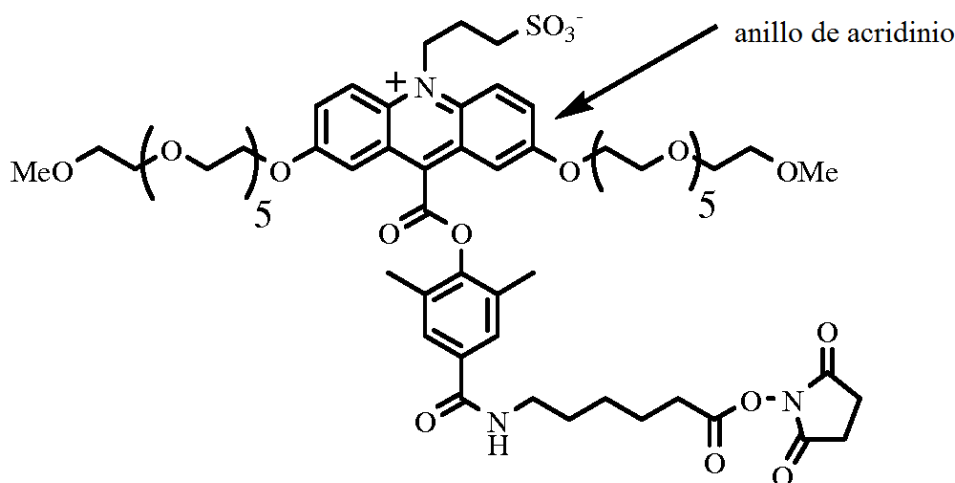
30 Para aliviar la naturaleza hidrófoba de DMAE y sus derivados, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.656.426 de Law *et al.* desveló una versión hidrófila de DMAE denominada éster NSP-DMAE-NHS donde el grupo N-metilo se había reemplazado por un grupo N-sulfopropilo (NSP). Tanto DMAE como NSP-DMAE se usan ampliamente en la actualidad en los analizadores de inmunoensayo comerciales y automatizados ACS:180™ y Centaur™ de Siemens Healthcare Diagnostics.

35 Para aumentar más la hidrofiliidad de NSP-DMAE, Natrajan *et al.* en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2 desvelaron derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrófilos tales como poli(etilen)glicol y derivados aniónicos de espermina unidos al fenol. La estructura de uno de tales ésteres de acridinio denominado NSP-DMAE-HEG-Glutarato-NHS, (abreviado NSP-DMAE-HEG) y que contiene un derivado de hexa(etilen)glicol (HEG) se ilustra en la siguiente figura. En este compuesto, un resto α,ω -diaminohexa(etilen)glicol (diamino-HEG) está unido al fenol para aumentar la solubilidad acuosa del éster de acridinio. Se añadió un resto glutarato al final del diamino-HEG y se convirtió en éster de NHS para permitir el etiquetado de diversas moléculas. Además de HEG, se han desvelado modificadores aniónicos obtenidos a partir de espermina con grupos sulfonato y carboxilato por parte de Natrajan *et al.* en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2.

45 Recientemente, Natrajan *et al.* en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615 B2 han descrito compuestos de acridinio hidrófilos y de alto rendimiento cuántico que contienen grupos alcoxi (OR*) hidrófilos 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. El aumento de potencia luminosa de tales compuestos y su naturaleza hidrófila les hace útiles para mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos. La estructura de uno de tales compuestos denominado NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS (abreviado HQYAE) se ilustra a continuación. Este compuesto y otros compuestos descritos en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615 B2 contenían grupos poli(etilen)glicol sulfonato aniónico unidos al anillo de acridinio en lugar del fenol.



Estructura de NSP-DMAE-HEG-Glutarato-NHS

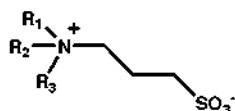
Estructura de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS

- 5 La incorporación de restos poli(etilen)glicol (PEG) y aniones a las estructuras de los ésteres de acridinio como se desvela en los documentos de patente mencionados anteriormente significó aumentar la naturaleza hidrófila de estos ésteres de acridinio así como disminuir la unión no específica de los conjugados obtenidos a partir de estos compuestos. La unión no específica, en los ensayos que usan fases sólidas tales como partículas o placas de microvaloración, son interacciones de unión no deseadas de estos conjugados de éster de acridinio a estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas aumentan por lo general el fondo del ensayo, lo que conduce a una disminución neta de la proporción de la señal con respecto al fondo en el ensayo y disminuye de ese modo la sensibilidad del ensayo.

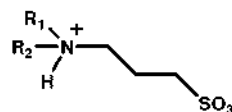
El uso de poli(etilen)glicol para idear superficies inertes que resistan la adsorción de proteínas se ha descrito en la técnica anterior. Por ejemplo, Ostuni *et al.* en J. Am. Chem. Soc. 2000, 17, 5605-5620, evaluaron numerosos grupos funcionales unidos a monocapas autoensambladas para resistencia a la adsorción de proteínas y observaron que los grupos funcionales poli(etilen)glicol conferían la mejor resistencia. Más recientemente, Ladd *et al.* en Biomacromolecules 2008, 9, 1357-1361; y otros han informado que las superficies hidrófilas modificadas con zwitteriones son tan inertes a la adsorción de proteínas como el PEG y además se ha postulado que los zwitteriones serían químicamente más estables que el PEG dada la propensión del último a la escisión oxidativa. Las estructuras de algunos zwitteriones comunes tales como sulfobetáinas, carboxibetáinas, fosfobetáinas y óxidos de aminas se ilustran en las siguientes figuras. Al igual que el PEG, normalmente estos zwitteriones son eléctricamente neutros, debido al equilibrio de cargas positivas y negativas en una estructura dada (R1-R4 son por lo general grupos alquilo).

Ejemplos de zwitteriones

Sulfobetainas

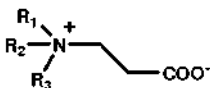


zwiteriónico at pH tanto bajo como alto



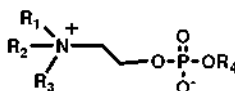
aniónico a pH >7

Carboxibetaina

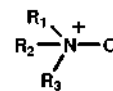


catiónico a pH bajo

Fosfobetaina



Óxido de amina terciaria



Las sulfobetainas en las que el átomo de nitrógeno es cuaternario mantienen su neutralidad eléctrica en un amplio intervalo de pH. Por otra parte, las sulfobetainas con un nitrógeno trisustituido pueden adquirir una carga negativa a pH alto (pH > 7) debido a que se pueden desprotonar en el nitrógeno neutralizando de ese modo su carga positiva. De forma análoga, las carboxibetainas son eléctricamente neutras a pH alto pero se pueden protonar en el grupo carboxilato y adquirir una carga positiva neta a pH bajo (pH < 5).

Recientemente, se han informado colorantes fluorescentes modificados con zwiteriones para aplicaciones de proteómica por parte de Dratz y Grieco en el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 0259333 A1 (noviembre de 2007). Se observó que las proteínas etiquetadas con colorantes zwiteriónicos eran solubles en agua y más susceptibles al análisis electroforético y los autores anteriores han reivindicado métodos para el análisis de proteínas usando colorantes zwiteriónicos.

La incorporación de grupos funcionales eléctricamente neutros y zwiteriónicos a 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 el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2 y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615 B2, y tienen el potencial de mejorar la sensibilidad del ensayo.

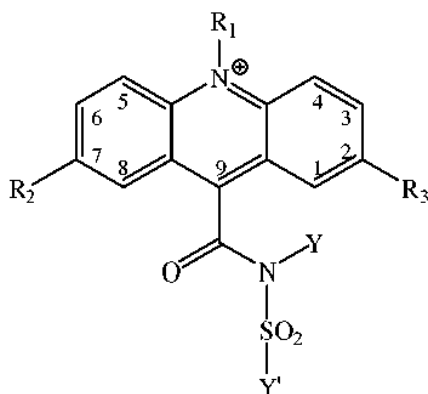
Existe la continua necesidad en la técnica de etiquetas quimioluminiscentes mejoradas para inmunoensayos y similares. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos de acridinio quimioluminiscentes que exhiban unión no específica reducida a una fase sólida.

Sumario de la invención

De acuerdo con los objetivos anteriores y otros objetivos, se ha descubierto sorprendentemente que las propiedades de los compuestos de acridinio quimioluminiscentes mejoran con la incorporación de grupos zwiteriónicos a la molécula para aumentar su hidrofiliidad y reducir en consecuencia la unión no específica a fases sólidas.

En un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de acridinio quimioluminiscente que comprende (i) un grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando dicho grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo sulfonamida en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarburo sustituido, en el que el compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwiteriónico unido a la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, el resto de hidrocarburo unido al grupo sulfonamida, o el grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio exhibe 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 zwiteriónico.

En otra realización, el compuesto de acridinio quimioluminiscente es una acridinio sulfonamida que tiene la siguiente estructura mostrada en la Fórmula:



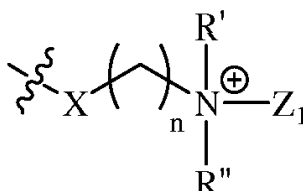
en la que,

R₁ es un grupo alquilo, alquenido, alquinilo o aralquilo C₁₋₃₅, cada uno de los cuales puede contener hasta 20 heteroátomos, o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo, o R₁ es un grupo -R^a-Z;

5 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre (i) hidrógeno, (ii) un grupo donador de electrones seleccionado entre OR[#], OH, SR[#], SH, NH₂ y NR^NNR^N, en los que R[#] y R^N se seleccionan independientemente en cada aparición y se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenido, alquinilo, arilo y aralquilo, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, o (iii) un grupo -Z;

10 Y e Y' se seleccionan independientemente entre R, -R^a-Z, o -R^a-L; donde L es un grupo funcional derivatizable que comprende un grupo saliente para formar un conjugado con un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito;

Z es un grupo zwitteriónico de forma:



15 X se selecciona independientemente en cada aparición entre un enlace, -CH₂-, oxígeno, azufre, -NR^N-, amida (-NH(CO)-), carbamato (-NHC(O)O-), o urea (-NHC(O)NH-);

R' y R'' se seleccionan independientemente en cada aparición entre alquilo, alquenido, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, y un grupo R^a-L;

Z₁ es un grupo -R^a-Z₂ donde Z₂ se selecciona entre carboxilato (-COO⁻), sulfonato (-SO₃⁻), sulfato (-OSO₃⁻), fosfato (-OP(O)(OR)(O⁻)), u óxido (-O⁻); o, en el caso en el que Z₂ sea un óxido (-O⁻), R^a puede estar ausente;

20 n es, seleccionado independientemente en cada caso, un número entero entre uno y 12;

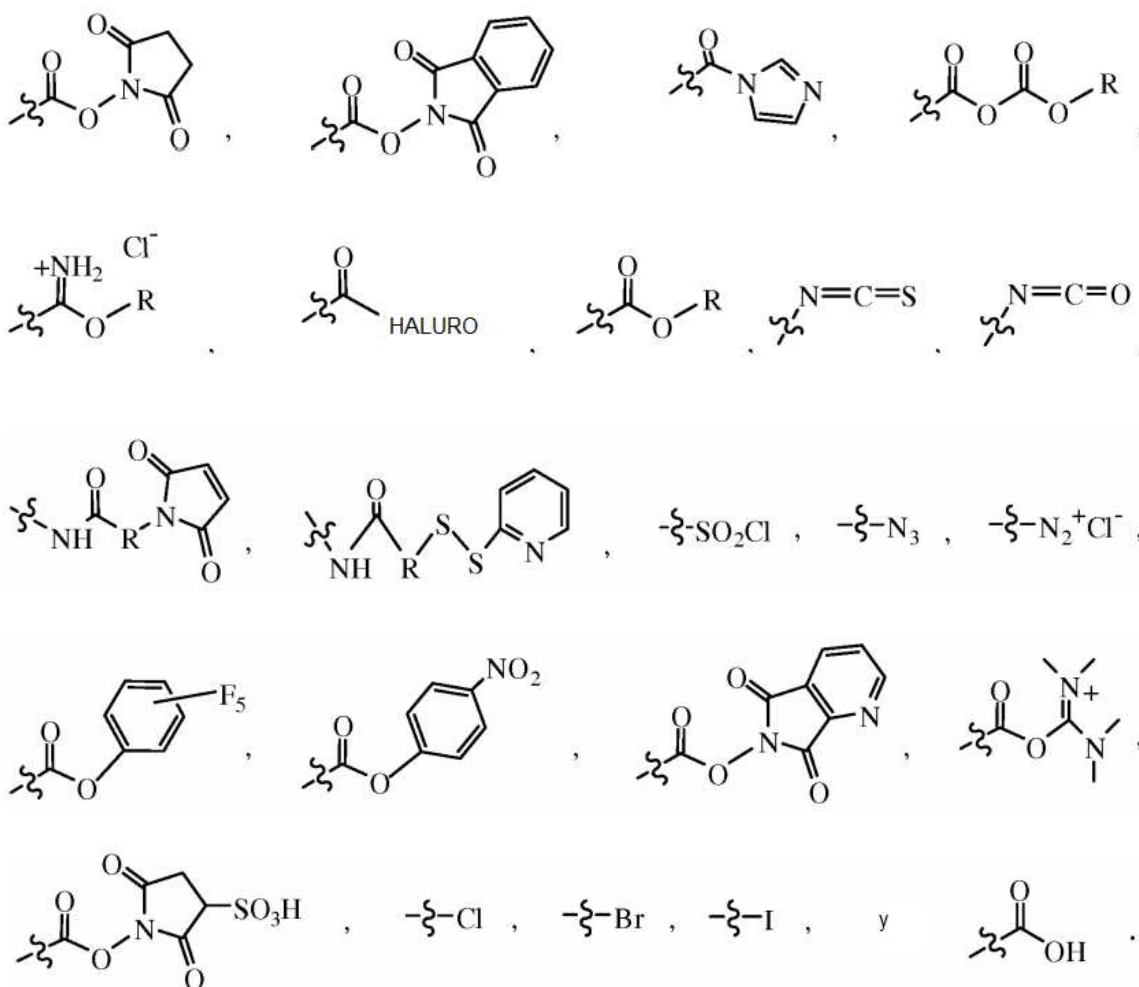
R se selecciona independientemente en cada aparición entre grupos alquilo, alquenido, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos;

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

25 y R^a es un radical divalente seleccionado entre un grupo alquileno, alquencileno, alquinileno, arilo, o aralquileno C₁₋₃₅, conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃, Y e Y' comprenda dicho grupo zwitteriónico Z,

en la que L se selecciona entre el grupo que consiste en:



- En otro aspecto de la invención, se proporciona un reactivo para la detección de un analito que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente unido a un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito, comprendiendo el compuesto de acridinio (i) un grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando dicho grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo sulfonamida en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarburo sustituido que está opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, en el que dicho compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido a la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, el resto hidrocarburo unido al grupo sulfonamida, o el grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio exhibe 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.
- 15 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ensayo para la detección o la cuantificación de un analito macromolecular que comprende: (a) proporcionar un conjugado que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la invención unido a una molécula de unión específica para un analito; (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito; (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) por adición de reactivos desencadenantes de la quimioluminiscencia; (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito por comparación de la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta a dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

En otro aspecto más, se proporciona un ensayo para la detección o la 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 de acuerdo con 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 que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) por adición de reactivos desencadenantes de la quimioluminiscencia; (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito por comparación de la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta a dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

En a otro aspecto, 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 de acuerdo con la invención; (c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) por adición de reactivos desencadenantes de la quimioluminiscencia; (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito por comparación de la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta a dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Estos y otros aspectos de la invención se comprenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, incluyendo las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona las estructuras químicas de una pluralidad de compuestos de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo.

La Figura 2 proporcionar las estructuras químicas de otros compuestos de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo.

La Figura 3 proporcionar las estructuras químicas de otros compuestos de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo.

La Figura 4 es un gráfico de la luz emitida por el control (NSP-DMAE-HEG) y conjugados de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (NSP-DMAE-Z-NHS) en porcentaje de unidades de luz relativas (RLU), representada en función del tiempo.

La Figura 5 es un gráfico de la luz emitida por el control (HQYAE) y conjugados de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (NSP-2,7-DMG-DMAE) a dos anticuerpos en porcentaje de unidades de luz relativas (RLU), representada en función del tiempo.

La Figura 6 es un gráfico de la luz emitida por el control (NSP-DMAE-Z) y conjugados de acridinio que contienen zwitteriones a modo de ejemplo (ZC6M-AE y ZC8M-AE) a un Mab anti-TSH en porcentaje de unidades de luz relativas (RLU), representada en función del tiempo.

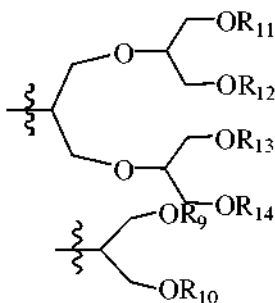
Descripción detallada

El objetivo principal de la presente descripción es desvelar estructuras de compuestos de acridinio que contienen zwitteriones que presentan una baja unión no específica a fases sólidas cuando se comparan con compuestos de acridinio que carecen de estos rasgos estructurales. Otro objetivo de la presente invención es desvelar dos tipos de modificación de zwitterión 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 fenólico. Otro objetivo de la presente descripción es desvelar la emisión de luz inesperadamente más rápida de los compuestos de acridinio con zwitteriones unidos al fenol cuando se compara con los compuestos de acridinio sin esta modificación estructural. Otro objetivo más 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.

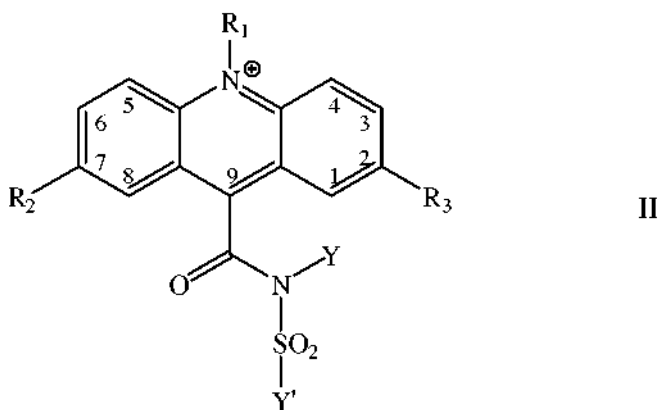
Los compuestos de acridinio quimioluminiscentes de acuerdo con la invención son acridinio sulfonamidas. En una realización, los compuestos de acridinio quimioluminiscentes comprenden (i) un grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio, estando el grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo sulfonamida en la posición C9 del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarburo

5 sustituido, en el que el compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido a la posición C2 del núcleo de acridinio, la posición C7 del núcleo de acridinio, el resto hidrocarburo unido al grupo sulfonamida, o el grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio exhibe una 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.

10 El grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno está opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos y, por lo tanto, puede constituir por sí mismo un grupo zwitteriónico, por ejemplo en el caso de un grupo sulfopropilo o sulfobutilo unido al nitrógeno del anillo donde existe una carga positiva en el nitrógeno cuaternario de anillo y una carga negativa en el grupo $-SO_3$. Se ha de entender que, incluso si está presente tal grupo zwitteriónico, los compuestos de acuerdo con la invención comprenderán al menos un grupo zwitteriónico más. Visto desde otro modo, los compuestos de acuerdo con la invención comprenderán una carga positiva sobre un átomo distinto de, o además de, el nitrógeno del núcleo de acridinio.

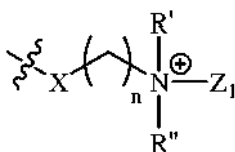


15 La invención incluye compuestos de acridinio capaces de experimentar quimioluminiscencia, en concreto acridinio sulfonamidas. En algunas realizaciones, las acridinio sulfonamidas de acuerdo con la invención tendrán la estructura de Fórmula II:



en la que,

20 R₁ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo C₁₋₃₅, cada uno de los cuales puede contener hasta 20 heteroátomos, o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo, o R₁ es un grupo -R^a-Z;
 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre (i) hidrógeno, (ii) un grupo donador de electrones seleccionado entre OR[#], OH, SR[#], SH, NH₂ y NR^NR^N, en los que R[#] y R^N se seleccionan independientemente en cada aparición y se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, o (iii) un grupo -Z;
 25 Y e Y' se seleccionan independientemente entre R, -R^a-Z, o -R^a-L; donde L es un grupo funcional derivatizable que comprende un grupo saliente para formar un conjugado con un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito;
 Z es un grupo zwitteriónico de forma:



X se selecciona independientemente en cada aparición entre un enlace, -CH₂-, oxígeno, azufre, -NR^N-, amida (-NH(CO)-), carbamato (-NHC(O)O-), o urea (-NHC(O)NH-);

R' y R'' se seleccionan independientemente en cada aparición entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, y un grupo R^a-L;

Z₁ es un grupo -R^a-Z₂ donde Z₂ se selecciona entre carboxilato (-COO⁻), sulfonato (-SO₃⁻), sulfato (-OSO₃⁻), fosfato (-OP(O)(OR)(O⁻)), u óxido (-O⁻); o, en el caso en el que Z₂ sea un óxido (-O⁻), R^a puede estar ausente; n es, seleccionado independientemente en cada caso, un número entero entre uno y 12; y

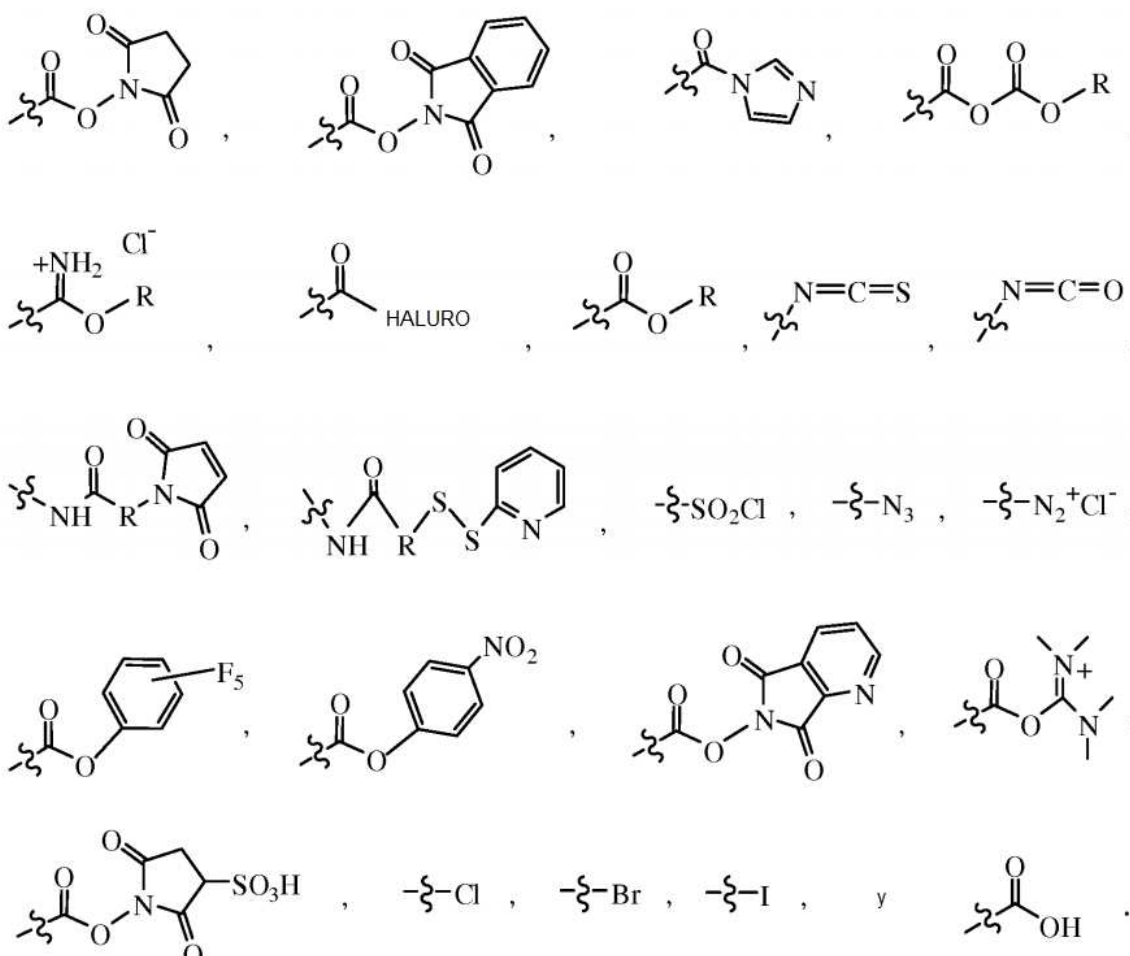
R se selecciona independientemente en cada aparición entre grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos;

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

R^a es un radical divalente seleccionado entre un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

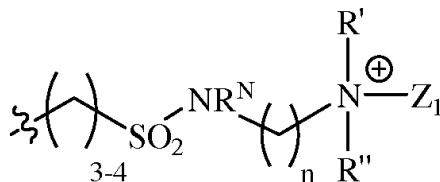
con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃, Y e Y' comprenda dicho grupo zwitteriónico Z.

L es un grupo funcional que permite que un compuesto forme un conjugado con un analito, análogo de analito, par de unión para un analito, etc., y se selecciona entre el grupo que consiste en:



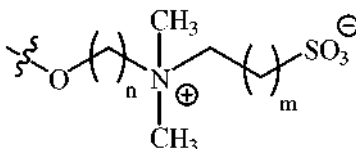
En algunas realizaciones, R' o R'' comprende un grupo -R^a-L. En otras realizaciones, R' o R'' es, en una aparición, un grupo -R^a-C(O)-CH₂CH₂CH₂-C(O)-N-succinimido, -R^a-N-maleimido, -R^a-C(O)-CH₂-Br, o -R^a-C(O)-CH₂-I.

En realizaciones adicionales de los compuestos de acridinio sulfonamida quimioluminiscentes de acuerdo con la Fórmula II, R₁ se seleccionará entre metilo, sulfopropilo (-CH₂CH₂CH₂-SO₃), sulfobutilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-SO₃), o un grupo que tiene la estructura:



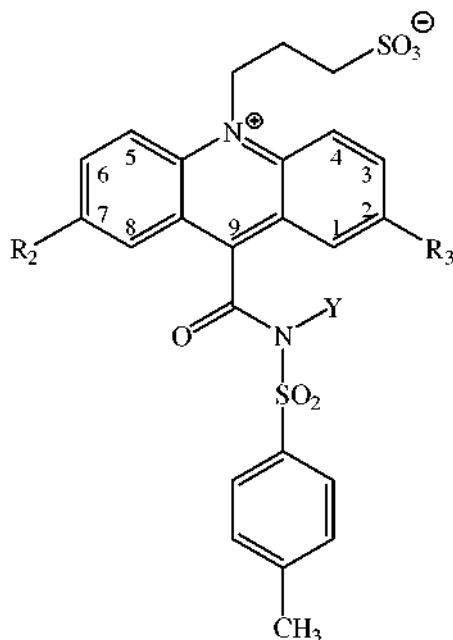
5 donde R^N, R', R'', Z₁, y n son como se han definido para la Fórmula II.

Uno o ambos de R₂ y R₃ pueden ser, por ejemplo, un grupo Z, y más particularmente, uno o ambos de R₂ y R₃ pueden ser un grupo:



donde n es un número entero de 1-12 y m es un número entero de 0-3.

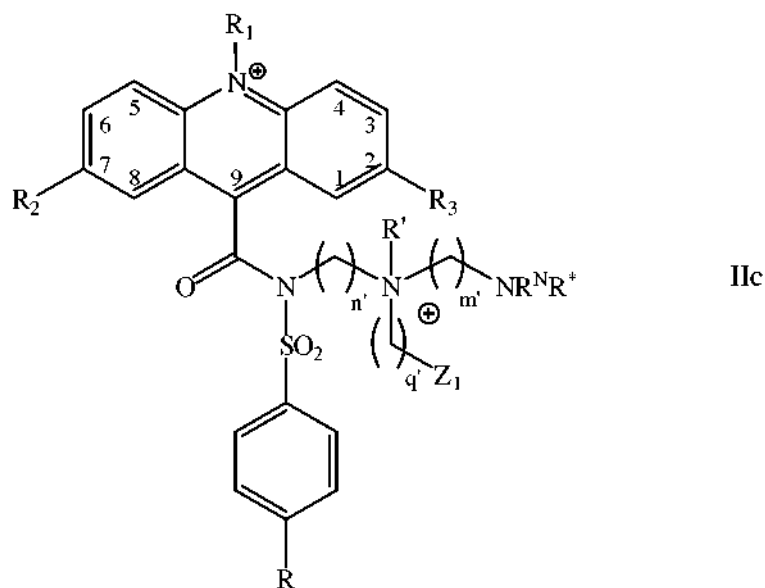
10 En compuestos de acridinio sulfonamida quimioluminiscentes preferentes de acuerdo con la Fórmula II, Y comprenderá un grupo arilo, o un grupo alquil-arilo, o arilo, un grupo alquilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos. Uno de tales compuestos de acridinio sulfonamida tiene la estructura de Fórmula IIb:



IIb

15 en la que Y comprende un grupo -R^a-Z, donde R^a, R₂, R₃, y Z son como se han definido anteriormente.

Otros compuestos de acridinio sulfonamida quimioluminiscentes de acuerdo con la Fórmula II, tienen la estructura de Fórmula IIc:



en la que R* se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o R* es un grupo -R^a-L, donde L es un grupo saliente para formar un conjugado con un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito; n', m', y q' son independientemente números enteros de 1-4, y R, R^N, R₁, R₂, R₃, R' y Z₁ son como se han definido anteriormente.

Los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención presentan una baja unión no específica cuando se conjugan a proteínas tales como anticuerpos. La unión no específica, como se ha descrito anteriormente, en ensayos que usan fases sólidas tales como partículas o placas de microvaloración son interacciones de unión no deseadas de los conjugados con estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas aumentan por lo general el fondo del ensayo conduciendo a una disminución neta de la proporción 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, los presentes inventores prepararon conjugados de anticuerpo de estos compuestos usando un anticuerpo monoclonal murino (Mab anti-TSH) cultivado frente al analito TSH (hormona estimulante del tiroides). La unión no específica de estos conjugados se comparó a continuación con la unión no específica de conjugados análogos preparados usando NSP-DMAE-HEG y HQYAE. Los dos últimos ésteres de acridinio hidrófilos, como se ha mencionado anteriormente y se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2 y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615 B2, respectivamente, contienen hexa(etilen)glicol unido al anillo de fenol y de acridinio, respectivamente. El último compuesto, HQYAE, también tiene una potencia luminosa aumentada (mayor rendimiento cuántico) debido a los dos grupos alcoxi donadores de electrones en el anillo de acridinio como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615 B2. La unión no específica se midió en dos tipos diferentes de partículas; partículas paramagnéticas (PMP) y partículas magnéticas de látex (MLP) de un proveedor comercial (Dynal™). Las dos partículas difieren en su composición intrínseca. Las PMP están compuestas principalmente por partículas de óxido de hierro con un revestimiento de silano que contiene aminas. Las aminas se usan para reticular proteínas a la superficie de la partícula usando reactivos tales como glutaraldehído. Por otra parte, las MLP están compuestas por poliestireno poroso dopado con magnetita para permitir la separación magnética. Las PMP que se usan en la presente evaluación se revistieron con un anticuerpo anti-TSH sobre la superficie de las partículas usando química de acoplamiento de glutaraldehído (Fase Sólida "PMP"). Las MLP que se usan para la presente evaluación (Dynal M280-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-PTH policlonal de cabra biotinado (Fase Sólida "M280") y Dynal M270-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-cTnI monoclonal de ratón biotinado (Fase Sólida "M270")) tenían estreptoavidina inmovilizada sobre las superficies que a continuación se usaron para inmovilizar además anticuerpos etiquetados con biotina capaces de unirse a los analitos PTH (hormona paratiroidea) o cTnI (troponina cardíaca I). La interacción de unión estreptoavidina-biotina se conoce bien y se usa habitualmente en los ensayos. Los dos tipos de partículas (PMP y MLP) se mezclaron con soluciones de los conjugados durante un periodo específico de tiempo y a continuación las partículas se separaron magnéticamente, se lavaron una vez y a continuación se midió la quimioluminiscencia asociada a las partículas (los detalles experimentales se pueden encontrar en el Ejemplo 18). La proporción de este valor de quimioluminiscencia en comparación con la entrada de quimioluminiscencia total se denomina fracción de unión no específica (fNSB). Los conjugados con una baja unión no específica tendrán de ese modo valores bajos de fNSB y estos valores de las realizaciones a modo de ejemplo de los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente descripción (descritos adicionalmente más adelante), junto con los compuestos de control, se tabulan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1.

Compuestos de acridinio		N.º de etiquetas en el conjugado	Fase sólida		
			PMP	M280	M270
Controles	<i>NSP-DMAE-HEG</i>	5	$4,0 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-4}$
	<i>HQYAE</i>	6	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
1d	<i>ZC3-AE</i>	7	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$
5d	<i>ZC3M-AE</i>	7	$3,4 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5}$
2d	<i>ZC6-AE</i>	5	$2,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$
6d	<i>ZC6M-AE</i>	6	$3,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$
3d	<i>ZC8-AE</i>		$2,4 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$
7d	<i>ZC8M-AE</i>	7	$3,9 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5}$
4e	<i>ZC12-AE</i>	5	$3,3 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$
11f	<i>NSP-DMAE-Z</i>	5	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$
10f	<i>NSP-2Z-DMAE</i>	6	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
8d	<i>AZC3-AE</i>	6	$6,2 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$
9d	<i>AZC6-AE</i>	5	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$

PMP = PMP-anticuerpo anti-TSH
M280 = Dynal M280-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-PTH policlonal de cabra biotinado
M270 = Dynal M270-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-cTnI monoclonal de ratón biotinado

Los conjugados NSP-DMAE-HEG y HQYAE en PMP tienen valores de fNSB de 4×10^{-5} y $1,6 \times 10^{-5}$, 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 inferiores a estos valores. Por ejemplo, los conjugados obtenidos a partir de NSP-DMAE-Z y ZC6M-AE tienen valores de fNSB de $1,3 \times 10^{-5}$ y $3,7 \times 10^{-5}$, respectivamente. El primer éster de acridinio contiene el zwitterión unido al fenol, mientras que el segundo compuesto contiene un zwitterión en el anillo de acridinio. De ese modo, los dos tipos de modificación de zwitterión son eficaces en la reducción de fNSB en partículas PMP. En las MLP Dynal con el anticuerpo anti-PTH sobre la superficie de la partícula, los conjugados NSP-DMAE-HEG y HQYAE tienen valores de fNSB de $5,2 \times 10^{-4}$ y $1,5 \times 10^{-4}$, respectivamente. Todos los demás conjugados obtenidos a partir de los ésteres de acridinio que contienen zwitteriones tienen valores de fNSB que son considerablemente inferiores con la excepción de ZC12-AE, cuyo fNSB ($1,7 \times 10^{-4}$) es comparable al del conjugado HQYAE. Se observa un resultado similar en las MLP Dynal con el anticuerpo anti-cTnI inmovilizado sobre su superficie. De ese modo, los conjugados de éster de acridinio que contienen zwitteriones tienen valores de fNSB considerablemente inferiores en las MLP que los sometidos a ensayo en la actualidad, y ofrecen el potencial de mejorar la sensibilidad del ensayo mediante la reducción de la señal de fondo como se ha discutido anteriormente.

Los conjugados de éster de acridinio de NSP-DMAE-Z y NSP-2,7-DMG-DMAE-Z (DMG = dimetoxigliceriloxi) con zwitteriones unidos al fenol también exhiben inesperadamente una emisión de luz más rápida cuando se comparan con los conjugados análogos obtenidos a partir de NSP-DMAE-HEG y HQYAE, respectivamente, como se ilustra en los gráficos de 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 segundo compuesto contiene un derivado de hexa(etilen)glicol. El compuesto que contiene zwitterión NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, además de contener el zwitterión unido al fenol también tiene grupos funcionales dimetoxigliceriloxi (DMG) donadores de electrones en el anillo de acridinio. La potencia luminosa de este compuesto es similar a la de HQYAE debido a los dos grupos donadores de electrones, y es mayor que la de NSP-DMAE-HEG.

Las mediciones de luz se llevaron a cabo en un luminómetro y se midió la luz emitida por cada conjugado (expresada en unidades de RLU; *Relative Light Units*, unidades de luz relativas) para diversos intervalos de tiempo. La luz total emitida por cada conjugado se usó a continuación para calcular el porcentaje de luz emitida (% de RLU) para cada intervalo de tiempo. Como resulta evidente a partir de la Figura 4, el conjugado de Mab (Mab = *Monoclonal antibody*, anticuerpo monoclonal) anti-TSH de NSP-DMAE-HEG requiere > 4 segundos para completar la emisión de luz mientras que para el conjugado de NSP-DMAE-Z, la emisión de luz se completa en dos segundos. Una comparación similar de los conjugados de BSA (BSA = albúmina de suero bovino), de los dos ésteres de

acridinio indica una emisión de luz considerablemente más rápida para el éster de acridinio que contiene zwitteriones.

La emisión de luz de los conjugados de anticuerpo de los ésteres de acridinio de alta potencia luminosa HQYAE y NSP-2,7-DMG-DMAE para dos anticuerpos diferentes, Mab anti-TSH y Mab anti-HBsAg (HBsAg = *Hepatitis B, surface antigen*, antígeno superficial de hepatitis B), se comparan en la Figura 5. También en este caso, el compuesto que contiene zwitteriones presenta una emisión de luz considerablemente más rápida con una emisión de luz total completa en < 2 segundos mientras que los conjugados obtenidos a partir de HQYAE tardan ~4 en completar la misión de luz. Además, se observó que la quimioluminiscencia relativa (CL Rel.) de los dos ésteres de acridinio era la misma en los dos anticuerpos diferentes. De ese modo, la introducción del zwitterión en el fenol acelera la emisión de luz pero no compromete la potencia luminosa global del éster de acridinio.

Los compuestos de acridinio son etiquetas quimioluminiscentes extremadamente útiles en especial 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 un alto rendimiento que significa que son capaces de funcionar llevando a cabo un gran número de ensayos de inmunoensayo, 240 y 180 ensayos respectivamente, cada hora, respectivamente. Los reactivos obtenidos a partir de NSP-DMAE emiten luz por lo general durante un periodo de cinco segundos cuando se desencadena su quimioluminiscencia por adición de ácido nítrico 100 mM que contiene peróxido de hidrógeno a 0,5 % seguido de una segunda solución de hidróxido de sodio 0,25 N más tensioactivo. Los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención, donde el zwitterión está situado en el fenol, en virtud de su rápida emisión de luz (≤ 2 segundos para ≥ 90 % de la luz total emitida) se pueden usar en instrumentos de inmunoquímica automatizados tales como el ADVIA:Centaur™ para aumentar su rendimiento, cuando se comparan con ensayos por lo demás idénticos que emplean los ésteres de acridinio NSP-DMAE-HEG y HQYAE.

Finalmente, en la Figura 6, las cinéticas de emisión de luz de los conjugados de Mab 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 NSP-DMAE-Z, con la modificación de zwitterión en el fenol, exhibe una emisión de luz más rápida que NSP-DMAE-HEG como se ha indicado anteriormente, los dos conjugados de éster de acridinio de ZC6M-AE y ZC8M-AE donde el zwitterión está situado en el anillo de acridinio, muestran cinéticas de emisión comparables a NSP-DMAE-HEG. De ese modo, la introducción del zwitterión en el anillo de acridinio tampoco es perjudicial para la cinética de emisión como se observa en estos dos casos. También se observó que la potencia luminosa de los conjugados de Mab anti-TSH y Mab anti-HBsAg de los tres compuestos que contienen zwitteriones ZC6M-AE, ZC8M-AE y NSP-DMAE-Z es similar y comparable a NSP-DMAE-HEG.

La estabilidad mejorada de los ésteres de acridinio que se describe originalmente en Law *et al.* para DMAE, es otra característica importante de estos compuestos que facilita su utilidad en inmunoanalizadores comerciales y automatizados. Por "estabilidad", se pretende indicar una pérdida mínima de actividad quimioluminiscente según se mide mediante la pérdida de RLU cuando los compuestos o los conjugados se almacenan en una solución acuosa por lo general 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 que los ésteres de acridinio quimioluminiscentes se vuelven no quimioluminiscentes. Los conjugados estables aseguran una vida en anaquel prolongada para los reactivos de éster de acridinio y también aseguran que el rendimiento del ensayo no varíe en gran medida durante un periodo dado de tiempo. La estabilidad de diversos conjugados de éster de acridinio (descritos adicionalmente con posterioridad) del anticuerpo anti-TSH de la presente invención se enumeran en la Tabla 2. Las soluciones acuosas de los conjugados se almacenaron a 4 °C, que es habitual para los instrumentos automatizados comerciales tales como el Centaur™, o a 37 °C en un tampón acuoso a pH 7,7. Las condiciones de almacenamiento más rigurosas a 37 °C donde se espera que se acelere la hidrólisis del éster de acridinio, permitieron una comparación ecuánime de las estabilidades relativas de los diversos ésteres de acridinio. Se registró periódicamente la luz como RLU usando un luminómetro para todos los conjugados. Se asignó a las RLU que se midieron en el punto temporal inicial, también denominado día 1, un valor de un 100 %. Las RLU residuales de cada conjugado después de cuatro semanas se enumeran en la Tabla 2. Se pueden encontrar otros detalles concernientes a estas mediciones en el Ejemplo 19.

50

Tabla 2.

Compuestos de acridinio		Estabilidad de quimioluminiscencia (% RLU) durante cuatro (4) semanas	
		4 °C	37 °C
Controles	NSP-DMAE-HEG	98	75
	HQYAE	92	58
1d	ZC3-AE	106	64

Compuestos de acridinio		Estabilidad de quimioluminiscencia (% RLU) durante cuatro (4) semanas	
		4 °C	37 °C
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

A partir de la Tabla 2, las estabildades quimioluminiscentes de diversos conjugados de éster de acridinio que contienen zwitteriones 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 un 75 % y un 58 % de su actividad quimioluminiscente, respectivamente. Todos los conjugados de otros ésteres de acridinio que contienen zwitteriones muestran estabildades comparables que varían de un 52 % para el conjugado de ZC6-AE a un 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 quimioluminiscente.

Los compuestos de acridinio que contienen zwitteriones de la presente invención son útiles como etiquetas en ensayos para la determinación o la cuantificación de analitos. Los analitos que se miden por lo general en tales ensayos son a menudo sustancias de cierta relevancia clínica y pueden abarcar una amplia diversidad de moléculas desde grandes macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, virus, bacterias, etc. a moléculas pequeñas tales como etanol, vitaminas, esteroides, hormonas, fármacos terapéuticos, etc. Un inmunoensayo de "sándwich" implica por lo general la detección de una molécula grande, también denominada analito macromolecular, usando dos moléculas de unión tales como anticuerpos. Un anticuerpo está inmovilizado en o unido a una fase sólida tal como una partícula, perla, membrana, placa de microvaloración o cualquier otra superficie sólida. Los métodos para la unión de moléculas de unión tales como anticuerpos a fases sólidas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir covalentemente a una partícula que contiene aminos sobre su superficie mediante el uso de una molécula de reticulación tal como glutaraldehído. La unión también puede ser no covalente y puede implicar adsorción sencilla de la molécula de unión a la superficie de la fase sólida, tal como perlas de poliestireno y placa de microvaloración. El segundo anticuerpo a menudo está unido covalentemente a una molécula quimioluminiscente o fluorescente denominada a menudo etiqueta. El etiquetado de las moléculas de unión tales como anticuerpos y otras proteínas de unión también se conoce bien en la técnica y se denomina habitualmente reacción de conjugación y el anticuerpo etiquetado se denomina a menudo conjugado. Por lo general, un resto reactivo con aminos de la etiqueta reacciona con una amina del anticuerpo para formar una unión amida. También se conocen bien otras uniones tales como tioéter, éster, carbamato, y similares, entre el anticuerpo y la etiqueta. En el ensayo, los dos anticuerpos se unen a regiones diferentes del analito macromolecular. El analito macromolecular puede ser, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, células, virus, receptores, o polímeros sintéticos. Las moléculas de unión pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos 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 han desvelado moléculas de unión sintéticas que se pueden unir a una diversidad de analitos en Mossbach *et al.* Biotechnology vol. 14, pág. 163-170 (1995).

Cuando la fase sólida con el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo etiquetado 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. A continuación se puede medir la señal quimioluminiscente o fluorescente asociada al complejo de unión y se puede inferir la presencia o ausencia del analito. Habitualmente, el complejo de unión se separa del resto de los componentes de reacción de unión tal como el anticuerpo etiquetado en exceso antes de la generación de la señal. Por ejemplo, si el complejo de unión está asociado a una perla magnética, se puede usar un imán para separar el complejo de unión asociado a la perla del volumen de la solución. Mediante el uso de una serie de "estándares", es decir, concentraciones conocidas del analito, se puede generar una curva de "respuesta a dosis" usando los dos anticuerpos. De ese modo, la curva de respuesta a dosis correlaciona una cierta cantidad de señal medida con una concentración específica del analito. En un ensayo de sándwich, a medida que aumenta la concentración del analito, también aumenta la cantidad de señal. La concentración del analito en una muestra desconocida se puede calcular a continuación por comparación de la señal generada por una muestra desconocida que contiene el analito macromolecular con la curva de

respuesta a dosis.

Del mismo modo, los dos componentes de unión también pueden ser ácidos nucleicos que se unen o hibridan a diferentes regiones de un analito de ácido nucleico. La concentración del analito de ácido nucleico se puede deducir a continuación de una forma similar.

- 5 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 habitualmente ensayo competitivo. Por lo general, en un ensayo competitivo, se prepara un conjugado del analito de interés y una etiqueta quimioluminiscente o fluorescente por unión covalente de las dos moléculas. El analito de molécula pequeña se puede usar como tal o su estructura se puede alterar antes de la conjugación a la etiqueta. El analito con la
- 10 estructura alterada se denomina análogo. A menudo es necesario usar un análogo estructural del analito que permita la química para la unión de la etiqueta al analito. En ocasiones se usa un análogo estructural de un analito para atenuar o mejorar 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 para el analito de interés se inmoviliza a menudo sobre una fase sólida directamente o a través de una interacción de unión secundaria tal como el sistema biotina-avidina.
- 15 La concentración del analito en una muestra se puede deducir en un ensayo competitivo permitiendo que la muestra que contiene el analito y el conjugado analito-etiqueta compitan por una cantidad limitada de molécula de unión inmovilizada en fase sólida. A medida que aumenta la concentración del analito en una muestra, disminuye la cantidad del conjugado analito-etiqueta capturada por la molécula de unión sobre la fase sólida. Mediante el empleo de una serie de "estándares", es decir, concentraciones conocidas del analito, se puede construir una curva de
- 20 respuesta a dosis donde la señal del conjugado analito-etiqueta capturado por la molécula de unión sobre la fase sólida correlaciona inversamente con la concentración del analito. Una vez se ha creado una curva de respuesta a dosis de este modo, la concentración del mismo analito en una muestra desconocida se puede deducir por comparación de la señal obtenida de la muestra desconocida con la señal en la curva de respuesta a dosis.

- 25 Otro formato del ensayo competitivo para analitos de molécula pequeña implica el uso de una fase sólida que está inmovilizada con el analito de interés o un análogo de analito y un anticuerpo o una proteína de unión específica para el analito que está conjugado con una etiqueta quimioluminiscente o fluorescente. En este formato, el conjugado analito-etiqueta se captura sobre la fase sólida a través de la interacción de unión con el analito o el análogo de analito sobre la fase sólida. El analito de interés presente en una muestra se une a continuación "competitivamente" al conjugado anticuerpo-etiqueta y de ese modo inhibe o reemplaza la interacción del conjugado
- 30 anticuerpo-etiqueta con la fase sólida. De este modo, el aumento de señal generado por el conjugado anticuerpo-etiqueta capturado sobre la fase sólida correlaciona con la cantidad del analito en la muestra.

- La presente invención también proporciona reactivos para su uso junto con estos métodos y por lo general comprenden un compuesto de acridinio quimioluminiscente unido a un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito, comprendiendo el compuesto de acridinio (i) un grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del
- 35 núcleo de acridinio, estando dicho grupo hidrocarburo opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, y (ii) un grupo sulfonamida en la posición C₉ del núcleo de acridinio unido a un resto hidrocarburo sustituido que está opcionalmente sustituido con hasta 20 heteroátomos, en el que dicho compuesto de acridinio comprende al menos un grupo funcional zwitteriónico unido a la posición C₂ del núcleo de acridinio, la posición C₇ del núcleo de acridinio, el resto hidrocarburo unido al grupo sulfonamida, o el grupo hidrocarburo unido al átomo de nitrógeno del núcleo de
- 40 acridinio; en el que dicho compuesto de acridinio exhibe una 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.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, un ensayo para la detección o la cuantificación de un analito macromolecular comprende, de acuerdo con una realización de la invención, las siguientes etapas:

- 45 (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) cualquier compuesto de acridinio sulfonamida que contiene zwitteriones de la invención;
- (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito;
- (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un
- 50 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) por adición de reactivos desencadenantes de la quimioluminiscencia;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 En un formato de ensayo alternativo, los compuestos de acridinio que comprenden 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 acridinio sulfonamida que contiene zwitteriones de la presente invención;

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

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

e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) por adición de reactivos desencadenantes de la quimioluminiscencia;

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

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

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

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

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

40 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.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

Síntesis de ZC3-AE-NHS, compuesto 1d

a) Compuesto 1a

- 5 Una solución de éster de metilo de 2,7-dihidroxiacridina, (0,1 g, 0,24 mmol), (documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615), 3-dimetil-aminopropanol (0,112 ml, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (0,252 g, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (0,188 ml, 4 equivalentes) en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por TLC sobre sílice usando acetato de etilo como eluyente no mostró ningún material de partida y usando un 75 % de acetato de etilo, un 24 % de metanol y un 1 % de trietilamina, se observó un producto polar (fR -0,15). A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se repartió entre HCl 1 N (25 ml) y acetato de etilo (25 ml). La fase acuosa que contenía el producto se extrajo dos veces más con acetato de etilo (2 x 25 ml). La fase acuosa ácida se trató a continuación gota a gota con hidróxido de sodio acuoso al 2,5 % hasta que se formó una suspensión de color amarillo intenso. Esta suspensión se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Una pequeña porción de esta solución se analizó a continuación por HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 60 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 25 minutos y fue el componente mayoritario. La solución de acetato de etilo se secó 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 %); MALDI-TOF MS 588,3 observado.

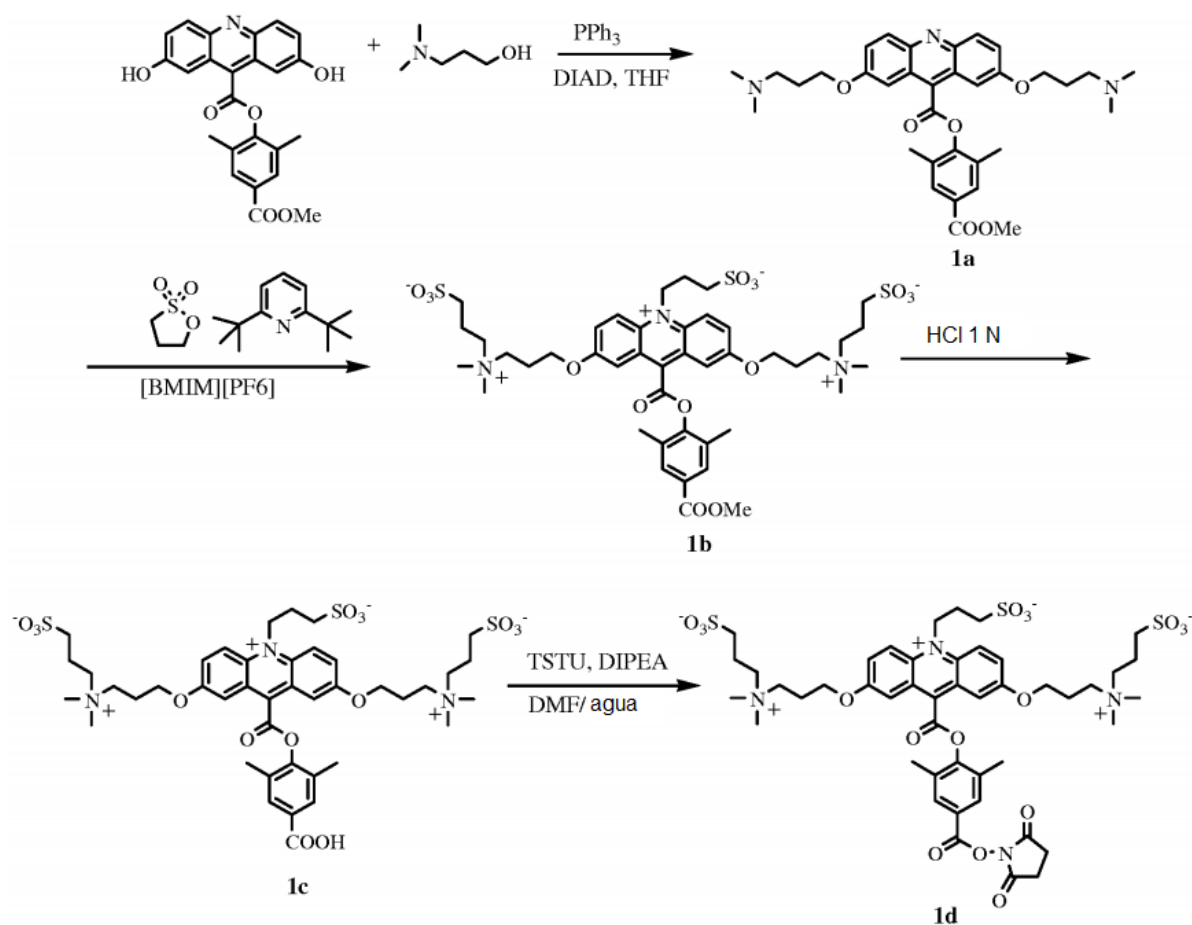
b) Compuesto 1c

- 25 Una mezcla del compuesto **1a** (0,126 g, 0,215 mmol), 1,3-propanosulfona 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) se calentó a 150 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se retiró una pequeña porción (1-2 µl) de la mezcla de reacción, se diluyó con metanol (0,1 ml) y se analizó por HPLC analítica usando el gradiente descrito anteriormente en la sección (a). Se observó un producto mayoritario eluyendo con un tR = 18 minutos que mediante análisis por MALDI-TOF MS (953,5 observado) correspondió al producto de éster de acridinio trialquilado **1b**. La mezcla de reacción en bruto se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). La fase acuosa que contenía el producto se extrajo tres veces más con acetato de etilo (3 x 30 ml). La fase acuosa se concentró a presión reducida para proporcionar el éster de acridinio **1b** en bruto. Este material se disolvió en HCl 1 N (15 ml) y se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó hidrólisis limpia del éster de metilo con el producto **1c** eluyendo con un tR = 16 minutos. La mezcla de reacción se concentró hasta ~10 ml y el producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que se ha descrito en la sección (a) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 116 mg (57 % global); MALDI-TOF MS 941,2 observado.

c) Compuesto 1d

- 40 Una solución parcial del ácido acridiniocarboxílico **1c** (30 mg, 32 µmoles) en DMF (3 ml) y agua (0,3 ml) se trató con diisopropiletilamina (7 ml, 1,5 equivalentes) y TSTU (19 mg, 2 equivalentes). La reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Después de 24 horas, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción usando el gradiente que se ha descrito en la sección (a) mostró el producto (-20 % de conversión) eluyendo con un tR = 17,5 minutos. La reacción se diluyó a continuación con agua (2,7 ml) para dar una solución transparente y a continuación se trató con una cantidad adicional de diisopropiletilamina (10 µl, 2 equivalentes) y TSTU (50 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y a continuación se analizó por HPLC que indicó un -40 % de conversión. El producto se purificó a continuación por HPLC preparativa usando el gradiente y la columna que se han descrito en la sección (b). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad para proporcionar un polvo de color amarillo intenso. Rendimiento = 11 mg (33 %); MALDI-TOF MS 1037,4 observado.

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



Ejemplo 2

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

a) Compuesto **2a**

- 5 Una solución de éster de metilo de 2,7-dihidroxiacridina, (30 mg, 72 μ moles), 6-dimetilamino-1-hexanol (42 mg, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El análisis por TLC sobre sílice usando un 70 % de acetato de etilo, un 28 % de metanol, un 2 % de trietilamina mostró una conversión limpia en un producto polar. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción se llevó a cabo usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 25 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se aisló como se ha descrito en el Ejemplo 1, sección (a). Rendimiento = 36 mg (75 %).

15 b) Compuesto **2c**

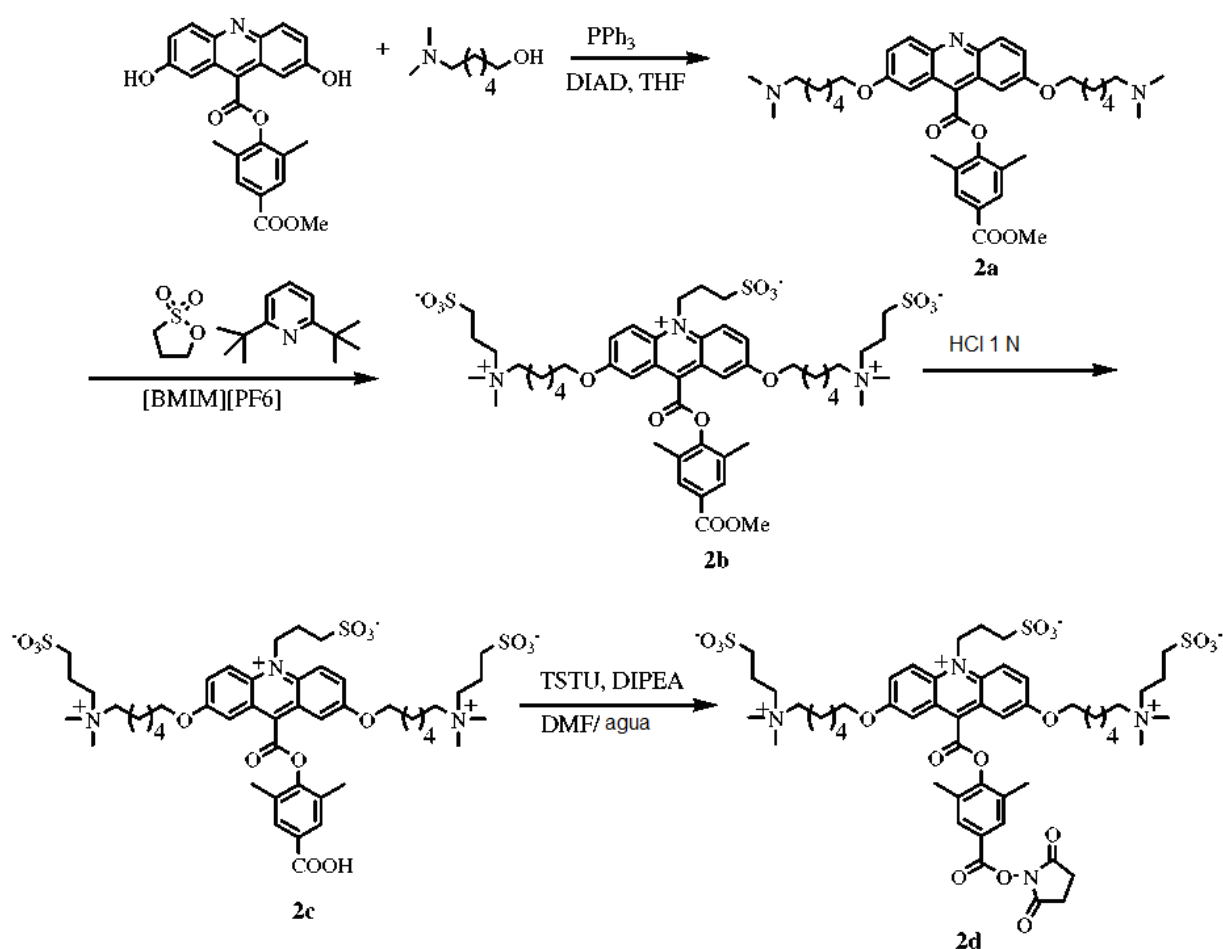
- Una mezcla del compuesto **2a** (36 mg, 54 μ moles), 1,3-propanosultona destilada (0,2 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,120 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (1 g) se calentó a 150 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (50 ml). La fase acuosa que contenía el producto se separó y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 30 ml). El análisis por HPLC de la solución acuosa usando el gradiente que se ha descrito en la sección (a) indicó >80 % de conversión en el producto trialquilado que eluye con un tR = 19 minutos con un -20 % de producto dialquilado que eluye con un tR = 24 minutos. La fase acuosa que contenía el producto de éster de acridinio **2b** en bruto se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en HCl 1 N (10 ml) y se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se analizó por HPLC que indicó la conversión limpia en el ácido acridiniocarboxílico que eluyó con un tR

= 17 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que se ha descrito en la sección (a) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **2c**. Rendimiento = 39,4 mg (71 % global); MALDI-TOF MS 1025,1 observado.

5 c) Compuesto **2d**

Una solución del compuesto **2c** (39 mg, 38 μ moles) en agua/DMF al 15 % (4 ml) se trató con diisopropiletilamina (0,033 ml, 5 equivalentes) y TSTU (57 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó la conversión completa en el producto de éster de NHS **2d** que eluyó con un tR = 18,4 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que se ha descrito en la sección (a) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el compuesto **2d**. Rendimiento = 28 mg (66 %); MALDI-TOF MS 1120,8 observado.

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



15

Ejemplo 3

Síntesis de ZC8-AE-NHS, compuesto **3d**

a) Compuesto **3a**

Una solución de éster de metilo de 2,7-dihidroxiacridina, (30 mg, 72 μ moles), 8-dimetilamino-1-octanol (50 mg, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). La reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se llevó a cabo el análisis por HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción usando

20

una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 22,5 minutos y fue el componente mayoritario. El producto **3a** se aisló como se ha descrito en el Ejemplo 1, sección (a). Rendimiento = 58 mg (cuantitativo), MALDI-TOF MS 728,6 observado.

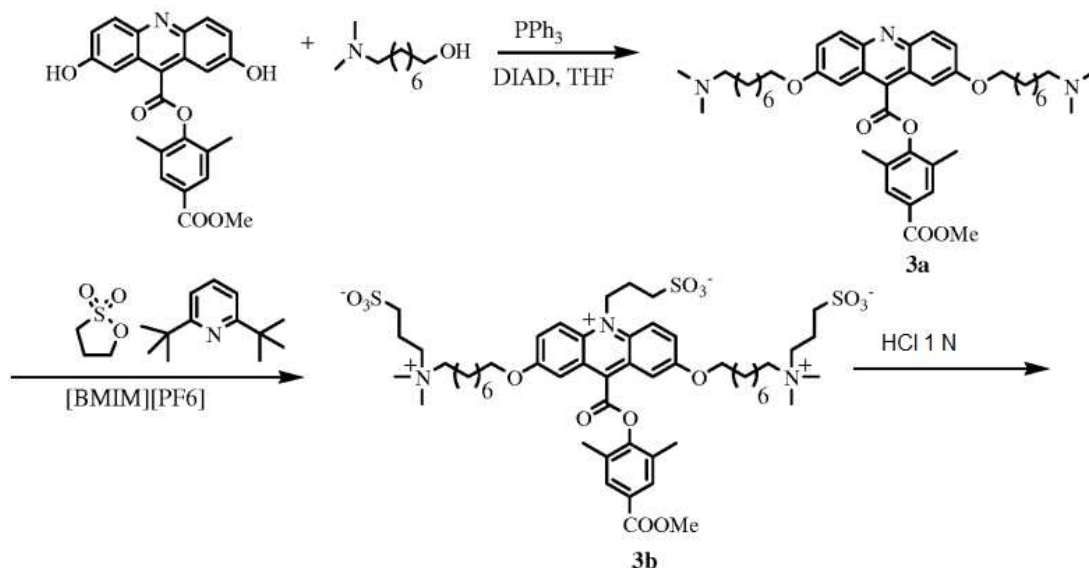
5 b) Compuesto 3c

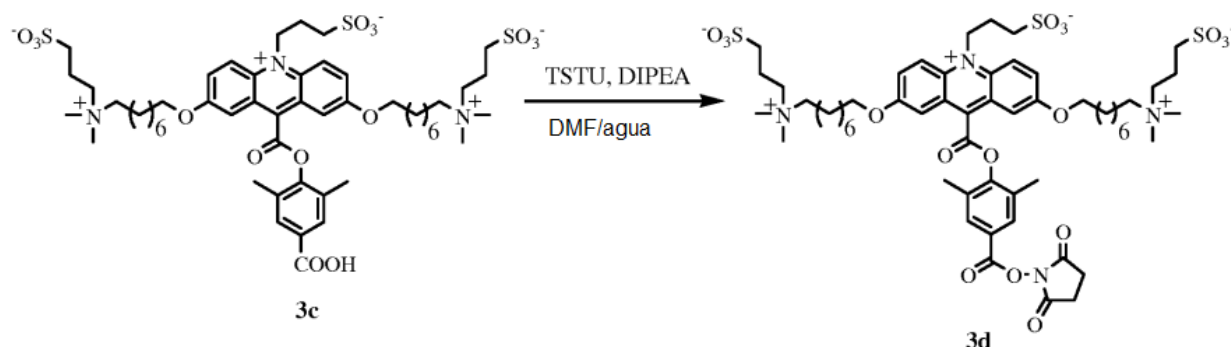
Una mezcla del compuesto **3a** (58 mg, 80 μmoles), 1,3-propanosulfona destilada (0,291 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,175 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (1 g) se calentó a 150 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). La fase acuosa que contenía el producto se separó y se lavó dos veces con acetato de etilo (2 x 30 ml). El análisis por HPLC de la solución acuosa usando el gradiente que se ha descrito en la sección (a) indicó el producto de éster de acridinio **3b** que eluyó con un tR = 1,5 min (MALDI-TOF MS 1094 observado). La fase acuosa se concentró a presión reducida y el aceite de color pardo recuperado se calentó a reflujo en HCl 1 N (10 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se analizó por HPLC que indicó el producto eluyendo con un tR = 16 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **3c**. Rendimiento = 30 mg (39 % global); MALDI-TOF MS 1082,4 observado.

c) Compuesto 3d

Una solución del compuesto **3c** (23 mg, 21,3 μmoles) en agua/DMF al 15 % (2 ml) se trató con diisopropiletilamina (18,6 μl, 5 equivalentes) y TSTU (32 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 40 minutos de 10 → 60 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 29 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el producto **3d**. Rendimiento = 15 mg (60 %); MALDI-TOF MS 1178,8 observado.

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





Ejemplo 4

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

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

- 5 Una solución de 12-bromo-1-dodecanol (1 g, 3,8 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con una solución 2,0 M de dimetilamina en tetrahidrofurano (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El análisis por TLC sobre sílice usando un 25 % de acetato de etilo, y un 75 % de hexanos como eluyente mostró la formación de un producto polar con poco material de partida. La reacción se diluyó con acetato de etilo (75 ml) y se lavó dos veces con bicarbonato de sodio acuoso y agua. La solución de acetato de etilo se secó a continuación sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 1,2 g
- 10 (cera). El análisis por TLC sobre sílice (25 % de metanol, 75 % de acetato de etilo) mostró un producto estriado con un $fR \sim 0,1$. Este producto **4a**, se usó sin purificación.

b) Compuesto **4b**

- 15 Una solución de éster de metilo de 2,7-dihidroxiacridina, (30 mg, 72 μ moles), 12-dimetilamino-1-dodecanol (66 mg, 4 equivalentes) y trifetilfosfina (75 mg, 4 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (0,06 ml, 5 equivalentes). Después de 2 horas, la reacción se trató con una cantidad adicional de 4 equivalentes de trifetilfosfina y 5 equivalentes de azodicarboxilato de diisopropilo. Después de 30 minutos, se analizó una pequeña porción por HPLC usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un $tR = 30$ minutos y fue el componente mayoritario. El producto **4b** se aisló como se ha descrito en el Ejemplo 1, sección (a). Rendimiento =
- 20 57 mg (95 %), MALDI-TOF MS 840,3 observado.

c) Compuesto **4d**

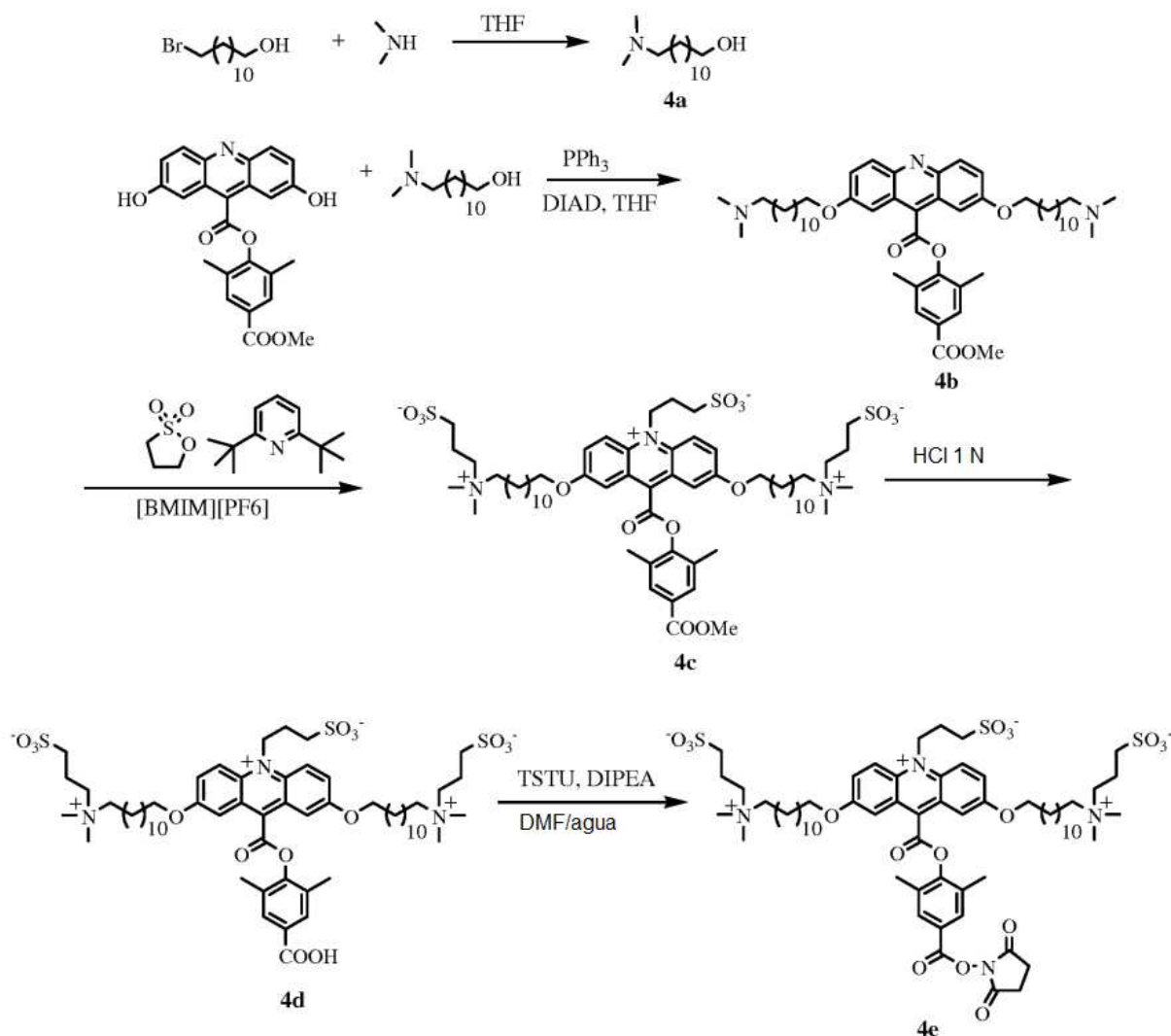
- 25 Una mezcla del compuesto **4b** (57 mg, 68 μ moles), 1,3-propanosultona (0,250 g, 30 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,15 ml, 10 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF6] (1 ml) se calentó a 150 $^{\circ}C$ en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se procesó como se ha descrito en el Ejemplo 2, sección (b). El análisis por HPLC de la mezcla de reacción en bruto usando el gradiente que se ha descrito en la sección (a) indicó el producto de éster de acridinio **4c** que eluyó con un $tR = 24$ minutos (MALDI-TOF MS 1206,2 observado). El producto **4c** en bruto se calentó a reflujo en HCl 1 N (10 ml) durante 4 horas.
- 30 A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se analizó por HPLC que indicó -70 % de conversión en el producto **4d** que eluyó con un $tR = 21$ minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **4d**.
- 35 Rendimiento = 22 mg (27 % global); MALDI-TOF MS 1193,4 observado.

d) Compuesto **4e**

- 40 Una solución del compuesto **4d** (22 mg, 18,4 μ moles) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) se trató con diisopropiletilamina (16 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (28 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a

260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 22 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 1000 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad para dar el producto **4e**. Rendimiento = 15,4 mg (64 %); MALDI-TOF MS 1290,6 observado.

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



Ejemplo 5

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

a) Compuesto **5a**

Una solución de éster de metilo de 2-hidroxiacridina (25 mg, 62,3 μmoles) (sintetizado de una forma similar al dihidroderivado en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.309.615), 3-dimetilamino-1-propanol (15 μl, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (33 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (25 μl, 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Después de 1 hora, el análisis por TLC sobre sílice usando acetato de etilo/metanol 1:1 como eluyente mostró la formación limpia de un producto polar de fR -0,2. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 20 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 25,2 minutos y fue el

componente mayoritario. La reacción se diluyó 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). A continuación, la fase de HCl se enfrió en hielo y se trató con KOH acuoso al 5 % hasta que se formó una suspensión. Esta suspensión se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con agua (25 ml). A continuación se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto **5a**. Rendimiento 24,5 mg (82 %); MALDI-TOF MS 487,5 observado.

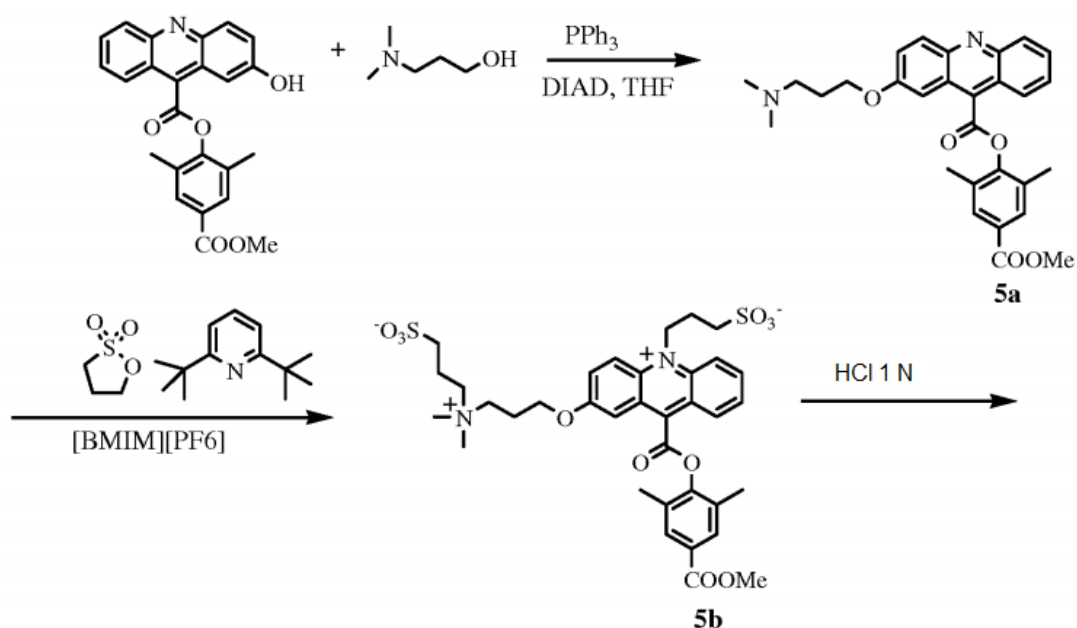
b) Compuesto **5c**

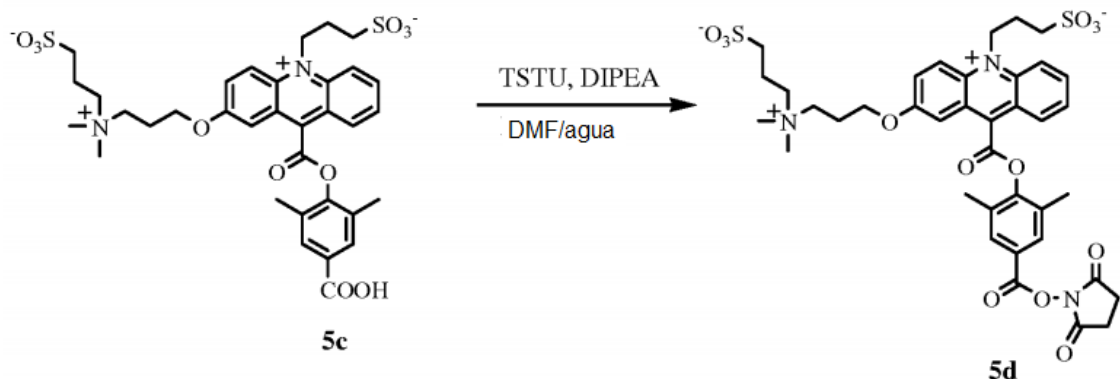
Una mezcla del compuesto **5a** (24,5 mg, 51,3 μ moles), 1,3-propanosulfona (125 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (79 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) se calentó a 150 °C durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio **5b** eluyendo con un tR = 18 minutos (>80 % de conversión; MALDI-TOF MS 731,04 observado). La reacción se repartió entre acetato de etilo (25 ml) y agua (25 ml). La fase acuosa que contenía el producto se separó y se lavó una vez con acetato de etilo (50 ml). A continuación se concentró a presión reducida. El residuo se calentó a reflujo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto **5c** que eluyó con un tR = 15 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **5c**. Rendimiento = 32 mg (89 % global); MALDI-TOF MS 717,1 observado.

c) Compuesto **5d**

Una solución del compuesto **5c** (32 mg, 44,6 μ moles) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) se trató con diisopropiletilamina (39 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (67 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 17 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **5d** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 25 mg (69 %); MALDI-TOF MS 814,1 observado.

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





Ejemplo 6

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

a) Compuesto **6a**

- 5 Una solución de éster de metilo de 2-hidroxiacridina (25 mg, 62,3 μ moles), 6-dimetilamino-1-hexanol (18 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (33 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (25 μ l, 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora y a continuación se procesó como se ha descrito en la sección (a), Ejemplo 5. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 22 minutos y fue el componente mayoritario. Rendimiento 33,5 mg (cuantitativo); MALDI-TOF MS 529,5 observado.

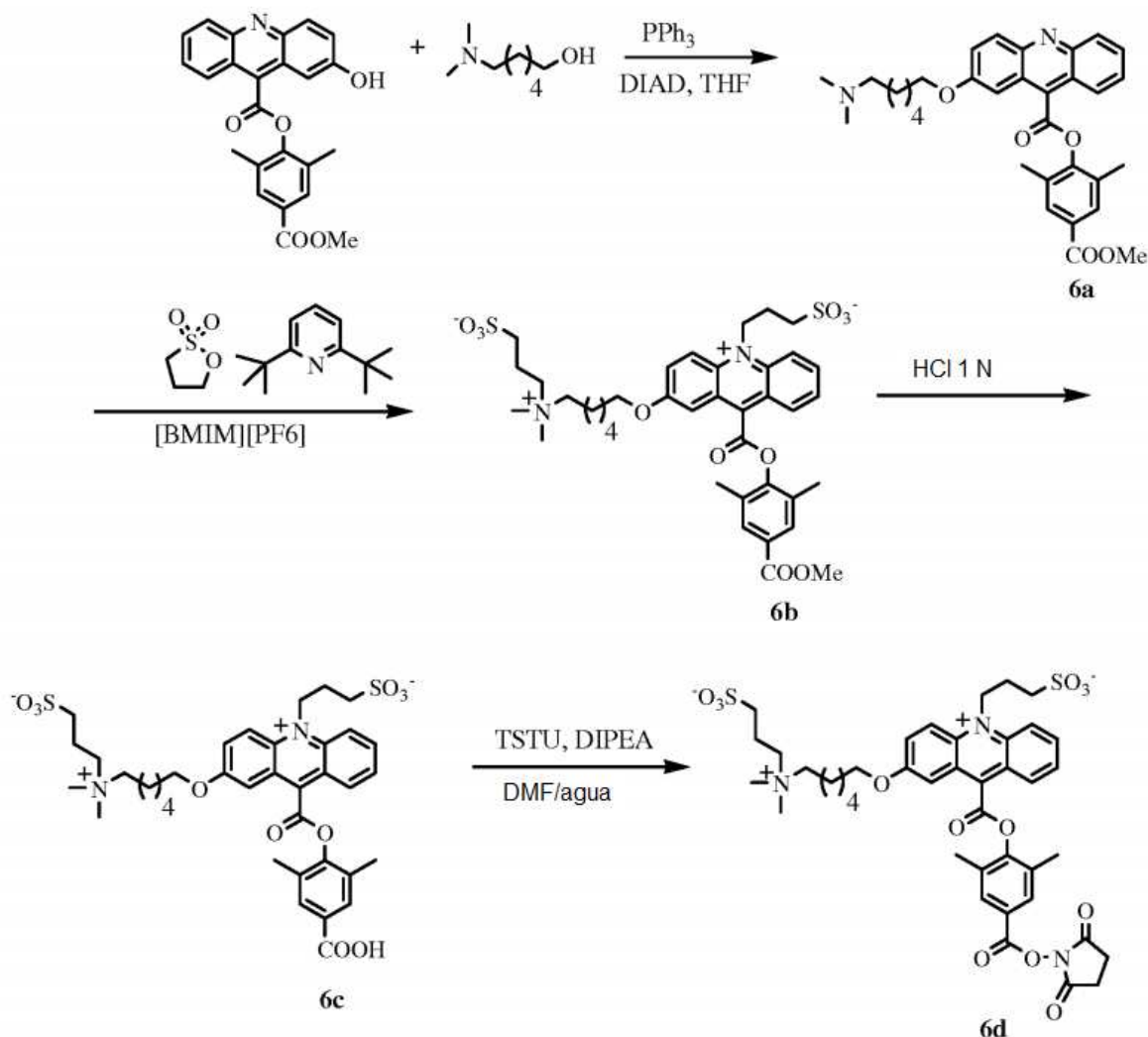
b) Compuesto **6c**

- 15 Una mezcla del compuesto **6a** (33,5 mg, 63,3 μ moles), 1,3-propanosultona (155 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (97 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) se calentó a 150 $^{\circ}$ C durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio **6b** que eluyó con un tR = 16 minutos (>80 % de conversión; MALDI-TOF MS 773,5 observado). La mezcla de reacción se trató como se ha descrito en la sección (b), Ejemplo 5. El éster de acridinio **6b** se calentó a reflujo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto **6c** que eluyó con un tR = 14 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **6c**. Rendimiento = 26,8 mg (56 % global).

c) Compuesto **6d**

- 30 Una solución del compuesto **6c** (26,9 mg, 35,3 μ moles) en DMF (3,4 ml) y agua (0,6 ml) se trató con diisopropiletilamina (31 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (53 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 15,4 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **6d** se combinaron, se congelaron a -80 $^{\circ}$ C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 19,3 mg (63 %); MALDI-TOF MS 856,2 observado.

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



Ejemplo 7

Síntesis de ZC8M-AE-NHS, compuesto 7d

a) Compuesto 7a

- 5 Una solución de éster de metilo de 2-hidroxiacridina (30 mg, 75 μmoles), 8-dimetilamino-1-octanol (26 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (40 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (30 μl , 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora y a continuación se procesó como se ha descrito en la sección (a), Ejemplo 5. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 24 minutos y fue el componente mayoritario. Rendimiento 13 mg (31 %); MALDI-TOF MS 557,1 observado.

b) Compuesto 7c

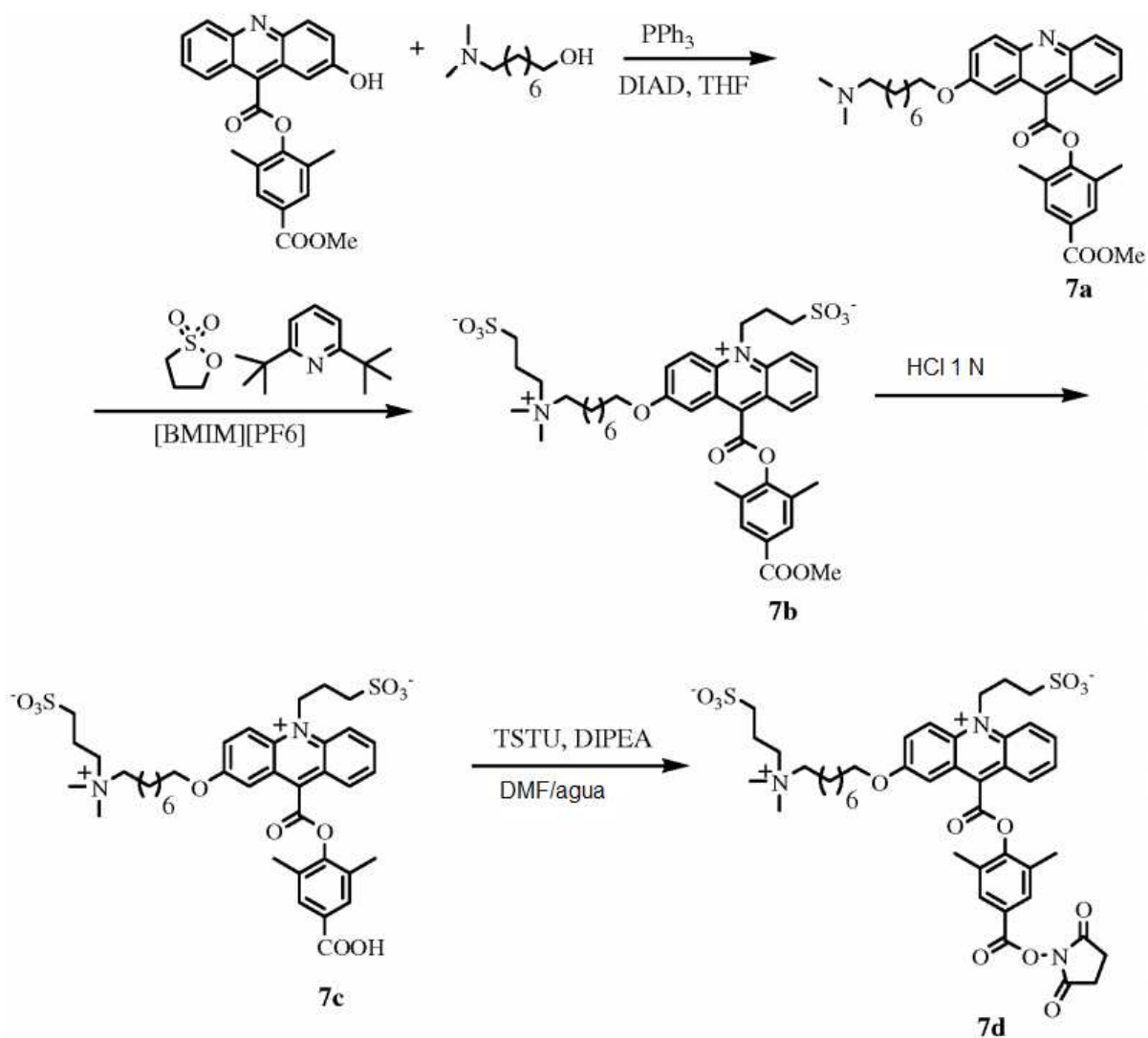
- 15 Una mezcla del compuesto 7a (13 mg, 23,3 μmoles), 1,3-propanosultona (57 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-tert-butilpiridina (36 μl , 7 equivalentes) en el líquido iónico $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ (0,2 ml) se calentó a 150 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μl), se diluyó con metanol y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio 7b eluyendo con un tR = 17,4 minutos (>80 % de conversión; MALDI-TOF MS 800,8 observado). La mezcla de reacción se trató como se ha descrito en la sección (b), Ejemplo 5. El éster de acridinio 7b se calentó a reflujo en 5 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC
- 20

de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto **7c** que eluyó con un $t_R = 15,3$ minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **7c**. Rendimiento = 6,8 mg (37 % global); MALDI-TOF MS 787,8 observado.

c) Compuesto **7d**

Una solución del compuesto **7c** (6,8 mg, 8,6 μ moles) en DMF (1,7 ml) y agua (0,3 ml) se trató con diisopropiletilamina (7,5 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (13 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un $t_R = 16,5$ minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **7d** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 5 mg (66 %); MALDI-TOF MS 885,0 observado.

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



Ejemplo 8Síntesis de AZC3-AE-NHS, compuesto 8da) Compuesto 8a

5 El compuesto éster de metilo de 2-hidroxi-7-metoxiacridina se sintetizó a partir de ácido 2-benciloxi-7-metoxi
 10 acridina-9-carboxílico y 2,6-dimetil-4-hidroxibenzoato de metilo usando las reacciones que se describen en el
 documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.319.041 B2. Una solución de éster de metilo de 2-hidroxi-7-
 metoxiacridina (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) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (23 µl,
 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Después de 1 hora, se
 trató como se ha descrito en la sección (a), Ejemplo 5. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos
 de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y
 detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un t_R = 20 minutos y fue el componente mayoritario.
 Rendimiento 27 mg (90 %); MALDI-TOF MS 517,9 observado.

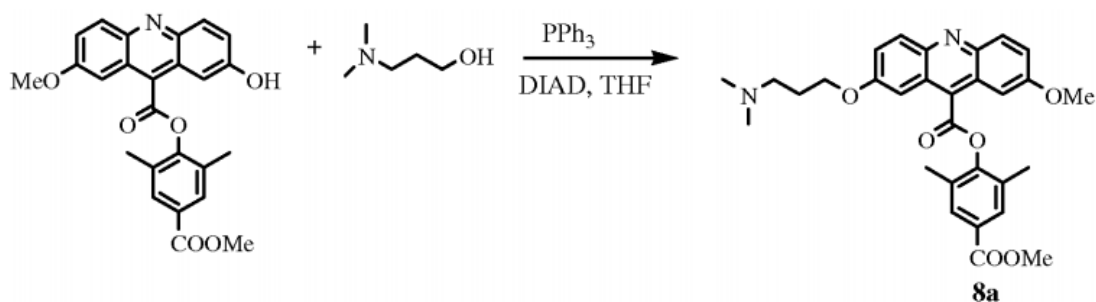
b) Compuesto 8c

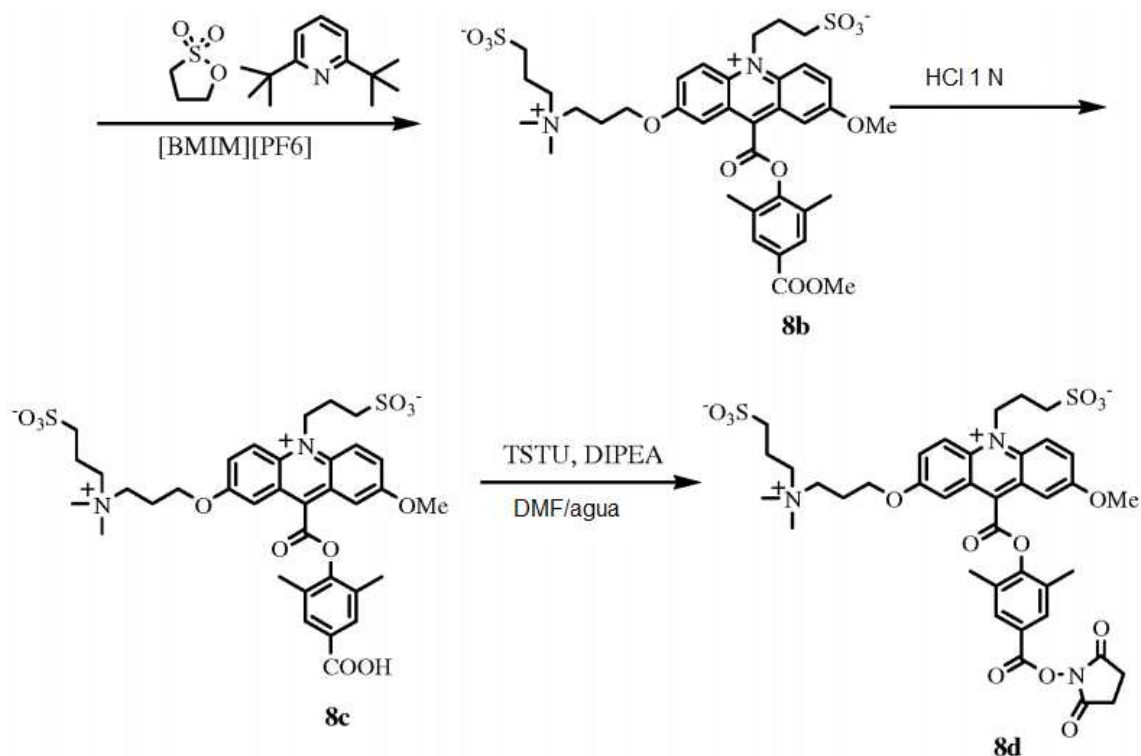
15 Una mezcla del compuesto **8a** (27 mg, 52,2 µmoles), 1,3-propanosulfona (128 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-
 butilpiridina (80 µl, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) se calentó a 150 °C durante 24 horas. A
 continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 µl), se diluyó con
 metanol y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio
 20 **8b** eluyendo con un t_R = 15,2 minutos. La mezcla de reacción se trató como se ha descrito en la sección (b),
 Ejemplo 5. El éster de acridinio **8b** se calentó a reflujo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de
 nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación
 limpia del producto **8c** eluyendo con un t_R = 13,5 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una
 columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B =
 25 MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones
 de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **8c**.
 Rendimiento = 22 mg (56 % global); MALDI-TOF MS 747,4 observado.

c) Compuesto 8d

30 Una solución del compuesto **8c** (22 mg, 29,5 µmoles) en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml) se trató con
 diisopropiletilamina (26 µl, 5 equivalentes) y TSTU (44 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura
 ambiente. Después de 30 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 %
 de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a
 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un t_R = 14,6 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se
 35 purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 →
 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto
 y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **8d** se combinaron, se congelaron a -
 80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 17,6 mg (70 %); MALDI-TOF MS 843,9.0 observado.

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





Ejemplo 9

Síntesis de AZC6-AE-NHS, compuesto **9d**

a) Compuesto **9a**

- 5 Una solución de éster de metilo de 2-hidroxi-7-metoxiacridina (25 mg, 0,058 mmol), 6-dimetilamino-1-hexanol (17 mg, 2 equivalentes) y trifetilfosfina (30 mg, 2 equivalentes) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) se trató con azodicarboxilato de diisopropilo (23 μ l, 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas, se trató como se ha descrito en la sección (a), Ejemplo 5. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 22,5 minutos y fue el componente mayoritario. Rendimiento 20 mg (63 %); MALDI-TOF MS 559,8 observado.
- 10

b) Compuesto **9c**

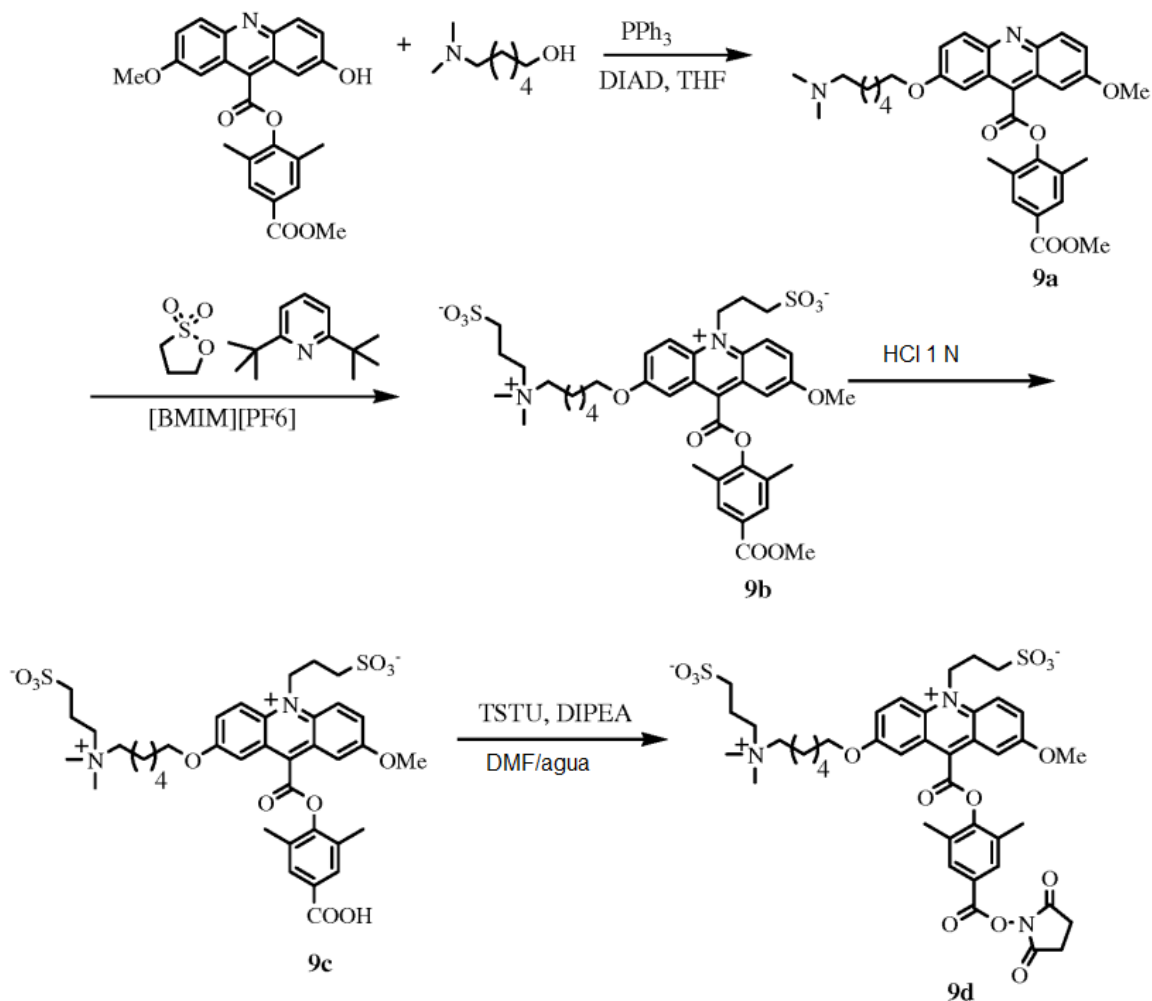
- 15 Una mezcla del compuesto **9a** (20 mg, 35,9 μ moles), 1,3-propanosulfona (87 mg, 20 equivalentes) y 2,6-di-terc-butilpiridina (59 μ l, 7 equivalentes) en el líquido iónico [BMIM][PF₆] (0,5 ml) se calentó a 150 °C durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó por HPLC como se ha descrito en la sección (a). Se observó el producto de éster de acridinio **9b** eluyendo con un tR = 15,7 minutos (MALDI-TOF MS 803,9 observado). La mezcla de reacción se trató como se ha descrito en la sección (b), Ejemplo 5. El éster de acridinio **9b** se calentó a reflujo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto **9c** eluyendo con un tR = 14,9 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **9c**. Rendimiento = 18,3 mg (65 % global); MALDI-TOF MS 790,4 observado.
- 20
- 25

c) Compuesto **9d**

Una solución del compuesto **9c** (18,3 mg, 23,2 μ moles) en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml) se trató con diisopropiletilamina (20 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (35 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 16 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **9d** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 14 mg (68 %); MALDI-TOF MS 887,6 observado.

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



10 Ejemplo 10

Síntesis de NSP-2Z-DMAE-NHS, Compuesto **10f**

a) Compuesto **10a**

Una solución de bromuro de 4-bromobencilo (2 g, 8 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con una solución 2,0 M de dimetilamina (20 ml) en tetrahidrofurano. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (75 ml) y se lavó con 100 ml de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La fase de acetato de etilo se separó y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El análisis por TLC sobre sílice usando acetato de etilo al 15 % en hexanos no mostró ningún material de partida y la formación de un producto polar de $\text{R}_\text{f} = 0,1$. La solución de acetato de etilo se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo claro. Rendimiento = 1,63 g.

20

b) Compuesto 10b

Una solución de isatina (1,12 g, 7,6 mmoles) en DMF anhidra (20 ml) se enfrió en un baño de hielo en atmósfera de nitrógeno y se trató con hidruro de sodio (0,366 g, 1,2 equivalentes, dispersión al 60 % en aceite mineral). La reacción se agitó en el baño de hielo durante 30 minutos y a continuación se añadió compuesto **10a** (1,63 g, 7,6 mmoles) en forma de una solución en DMF (5 ml) junto con yoduro de cobre (2,9 g, 2 equivalentes). La reacción se calentó a 140 °C en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. A continuación se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y se filtró. TLC sobre sílice del filtrado usando metanol al 10 % en acetato de etilo como eluyente mostró un producto polar de R_f -0,1. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se suspendió en 100 ml de KOH acuoso al 10 % y se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se acidificó con HCl 2 N hasta pH 5. Apareció un precipitado de color amarillo que se recogió por filtración y se secó al vacío. Rendimiento = 0,6 g. Este compuesto se usó como tal para la siguiente reacción.

c) Compuesto 10c

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

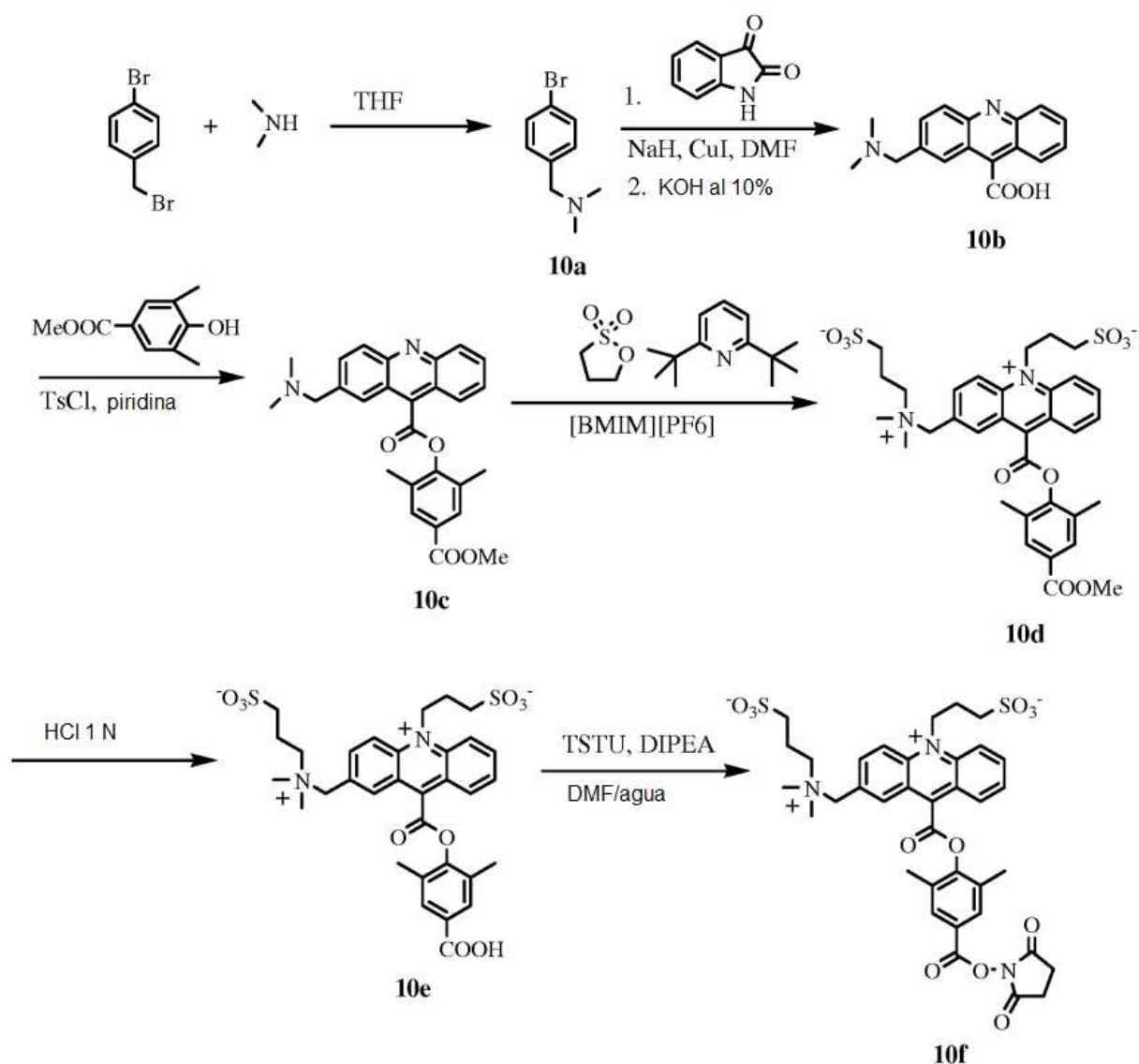
d) Compuesto 10e

Una mezcla del compuesto **10c** (22 mg, 49,5 μ moles), 1,3-propanosulfona (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) se calentó a 150 °C durante 24 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se retiró una pequeña porción (1-2 μ l), se diluyó con metanol y se analizó por HPLC usando una columna Phenomenex, C_{18} de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto **10d** eluyendo con un t_R = 17,2 minutos (-40 % de conversión). La mezcla de reacción se trató como se ha descrito en la sección (b), Ejemplo 5. El éster de acridinio **10d** se calentó a reflujo en 10 ml de HCl 1 N durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó la formación limpia del producto **10e** eluyendo con un t_R = 14,0 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto **10e**. Rendimiento = 14,5 mg (44 % global); MALDI-TOF MS 673,3 observado.

c) Compuesto 10f

Una solución del compuesto **10e** (14,5 mg, 21,5 μ moles) en DMF (1,8 ml) y agua (0,2 ml) se trató con diisopropiletilamina (18,8 μ l, 5 equivalentes) y TSTU (32 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un t_R = 16,5 minutos y fue el componente mayoritario. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **10f** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 14 mg (85 %); MALDI-TOF MS 769,5 observado.

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



Ejemplo 11

Síntesis de NSP-DMAE-Z-NHS, Compuesto **11f**

a) Compuesto **11a**

- 5 Una solución de N,N-bis(3-aminopropil)metilamina (1 g, 6,9 mmoles) en cloroformo (40 ml) se trató con benciloxycarbonilsuccinimida (3,78 g, 2,2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por TLC 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. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo (40 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. A continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite viscoso que solidificó tras almacenamiento en un sólido céreo. Rendimiento = 3,2 g; MALDI-TOF MS 414,4 observado.
- 10

b) Compuesto **11b**

- 15 Una solución del compuesto **11a** (1,2 g, 2,9 mmoles) en DMF anhidra (15 ml) se trató con 1,3-propanosultona (0,71 g, 2 equivalentes). La reacción se calentó a 145 °C en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 19,6 minutos (-80 % de conversión) con material de partida eluyendo con un tR = 21,6 minutos. La mezcla de

reacción se concentró a presión reducida y el aceite recuperado se disolvió en metanol (20 ml). El análisis por TLC sobre sílice usando un 40 % de metanol, un 60 % de acetato de etilo indicó la separación limpia del producto (fR - 0,2) del material de partida (fR -0,3). La reacción anterior se repitió a la misma escala y la mezcla de reacción combinada se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando un 40 % de metanol, y un 60 % de acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 1,55 g (60 %); espuma de color blanco; MALDI-TOF MS 536,4 observado.

c) Compuesto 11c

Se agitó el compuesto 11b (0,8 g, 1,49 mmoles) en 15 ml de HBr/AcOH al 33 % a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se añadió éter (100 ml) y se separó un sólido granular de color blanco. El producto se dejó sedimentar y se decantó el éter. Este proceso se repitió dos veces con éter (2 x 50 ml). Finalmente, el producto se secó al vacío. El aceite viscoso recuperado se disolvió en 5-6 ml de agua, se congeló a -80 °C y se liofilizó hasta sequedad para proporcionar un sólido vítreo. Rendimiento = 0,766 g (cuantitativo); MALDI-TOF MS 268,2 observado. El análisis por TLC sobre sílice usando un 25 % de amoniaco, y un 75 % de metanol y ninhidrina para la visualización mostró una marcha individual de fR -0,2.

d) Compuesto 11d

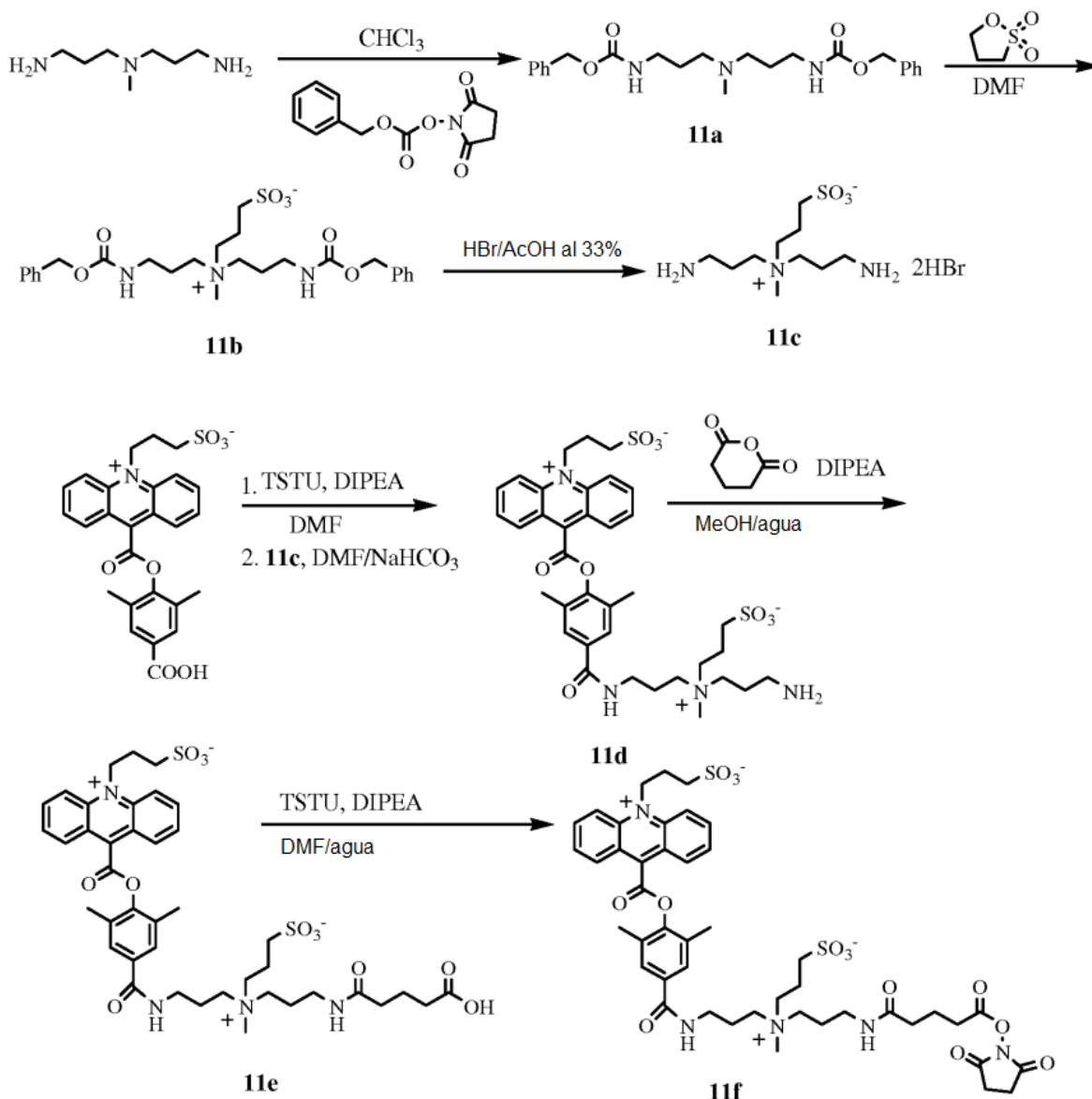
Una solución de NSP-DMAE (30 mg, 61 µmoles, documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2) en DMF (3 ml) se trató con diisopropiletilamina (16 µl, 1,5 equivalentes) y TSTU (22 mg, 1,2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 20 minutos y fue el componente mayoritario. La mitad de esta solución en DMF (1,5 ml) del éster de NHS se añadió gota a gota a una solución del compuesto 11c (50 mg, 0,187 mmol, forma exenta de amina) disuelto en DMF (1 ml) y bicarbonato de sodio 0,15 M (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, el análisis por HPLC mostró la conversión limpia en el producto 11d, que eluyó a 12,4 minutos. Usando un gradiente de 40 minutos de 10 → 40 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %), el producto eluyó a tR = 19,2 minutos.

El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 40 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto 11d se combinaron y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 19 mg (83 %); MALDI-TOF MS 743,2 observado.

e) Compuesto 11f

Una solución del compuesto 11d (45 mg, 60,6 µmoles) en metanol (3,6 ml) y agua (0,4 ml) se trató con diisopropiletilamina (53 µl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (35 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto 11e eluyendo con un tR = 14 minutos y fue el componente mayoritario. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml). Esta solución se trató con diisopropiletilamina (106 µl, 10 equivalentes) y TSTU (182 mg, 10 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, el análisis por HPLC mostró la conversión completa en el producto 11f que eluyó con un tR = 15,3 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 40 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto 11f se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 28,7 mg (50 %); MALDI-TOF MS 955,2 observado.

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



Ejemplo 12

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

a) 1,3-Dimetoxiglicerol, compuesto **12a**

- 5 Se trató metanol anhidro (100 ml) con microgránulos de hidróxido de potasio (25 g, 0,446 mol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvió toda la base. A continuación, esta solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota epiclorohidrina (0,223 mol, 20,6 g). Después de la finalización de la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se calentó en un baño de aceite a 75-80 °C en atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El aceite recuperado se disolvió en acetato de etilo (150 ml) y se filtró de nuevo y a continuación se concentró a presión reducida. Se recuperó un aceite incoloro (21,5 g) que se purificó por destilación al vacío para proporcionar 12,9 g (50 %) de 1,3-dimetoxiglicerol, compuesto **12a**.
- 10

b) Compuesto **12b**

- 15 Una solución de 1,3-dimetoxiglicerol, compuesto **12a** (1 g, 8,3 mmoles) en piridina anhidra (20 ml) se trató con cloruro de p-toluenosulfonilo (2,38 g, 1,5 equivalentes) y 4-dimetilaminopiridina (0,253 g, 0,25 equivalentes). La

reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 3 días. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se repartió entre acetato de etilo (100 ml) y HCl 1 N (50 ml). La fase de acetato de etilo se separó y se lavó una vez con HCl 1 N (50 ml), seguido de bicarbonato de sodio acuoso (3 x 50 ml). A continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto (2,5 g) se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando acetato de etilo al 20 % en hexanos como eluyente. Rendimiento = 1,79 g (65 %).

c) Compuesto **12c**

Una solución de éster de metilo de 2,7-dihidroxiacridina (0,1 g, 0,24 mmol), el compuesto 12b (0,4 g, 1,45 mmoles) y carbonato de cesio (0,2 g, 2,5 equivalentes) en DMF anhidra (6 ml) se calentó en un baño de aceite a 90-100 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de 5 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 26,5 minutos y fue el componente mayoritario. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se repartió entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). La fase de acetato de etilo se separó y se lavó dos veces con agua (2 x 50 ml). A continuación se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto (0,37 g) se purificó por TLC preparativa sobre sílice usando acetato de etilo/hexanos 1:1. Rendimiento purificado = 58 mg (40 %); MALDI-TOF MS 623,1 observado.

d) Compuesto **12e**

Una mezcla del compuesto 12c (58 mg, 93,25 µmoles), 1,3-propanosultona destilada (1,14 g, 100 equivalentes) y bicarbonato de sodio (78 mg, 10 equivalentes) se calentó a 140-150 °C. Después de 2 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto **12d** eluyendo con un tR = 20 minutos y fue el componente mayoritario. La mezcla de reacción se trató con 20 ml de acetato de etilo/hexanos 1:1 y la mezcla se sometió a ultrasonidos brevemente para dispersar la goma. El producto se dejó sedimentar, y el disolvente se retiró por decantación. El producto en bruto se secó al vacío y a continuación se suspendió en 10 ml de HCl 1 N y se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. A continuación se enfrió a temperatura ambiente y se analizó por HPLC que indicó la hidrólisis completa del éster de metilo con el producto **12e**, que eluyó con un tR = 17,0 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **12e** se combinaron y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 56 mg (82 %); MALDI-TOF MS 730,9 observado.

e) Compuesto **12f**

Una solución del compuesto **12e** (55 mg, 75,3 µmoles) en DMF (3 ml) se trató con diisopropiletilamina (20 µl, 1,5 equivalentes) y TSTU (27 mg, 1,2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el éster de NHS eluyendo con un tR = 18 minutos y fue el componente mayoritario. La solución en DMF del éster de NHS se añadió a continuación gota a gota a una solución 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). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC mostró la conversión limpia en el producto **12e**, que eluyó a 12,4 minutos.

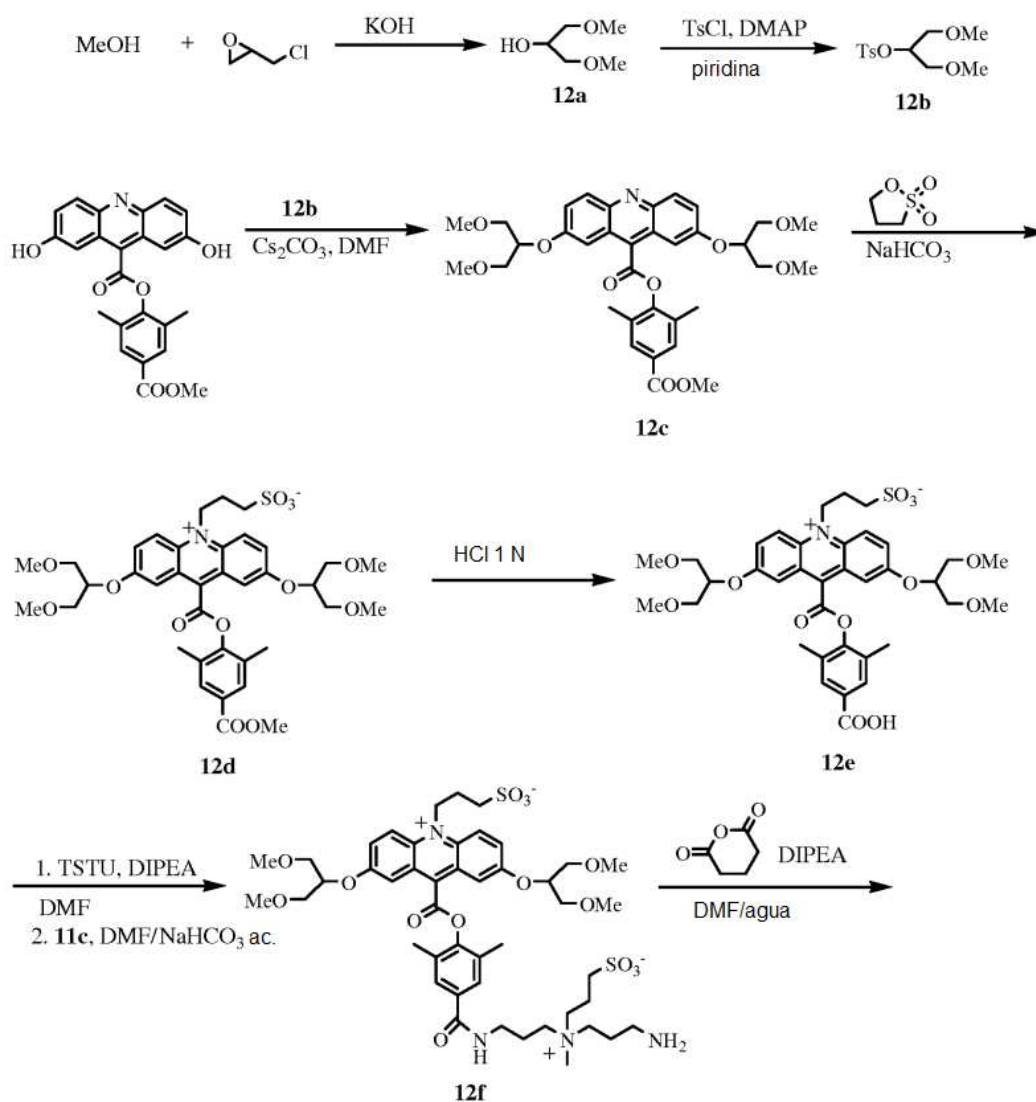
El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto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

f) Compuesto **12h**

Una solución del compuesto **12f** (63,8 mg, 65,2 µmoles) en metanol (4,0 ml) se trató con diisopropiletilamina (57 µl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (74 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 100 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el

producto **12g** eluyendo con un tR = 13,5 minutos y fue el componente mayoritario. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en DMF (5,4 ml) y agua (0,6 ml). Esta solución se trató con diisopropiletilamina (114 ul, 10 equivalentes) y TSTU (200 mg, 10 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis por HPLC mostró la conversión completa en el producto **12h** que eluyó con un tR = 14,3 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **12h** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 49,3 mg (63 %); MALDI-TOF MS 1188,9 observado.

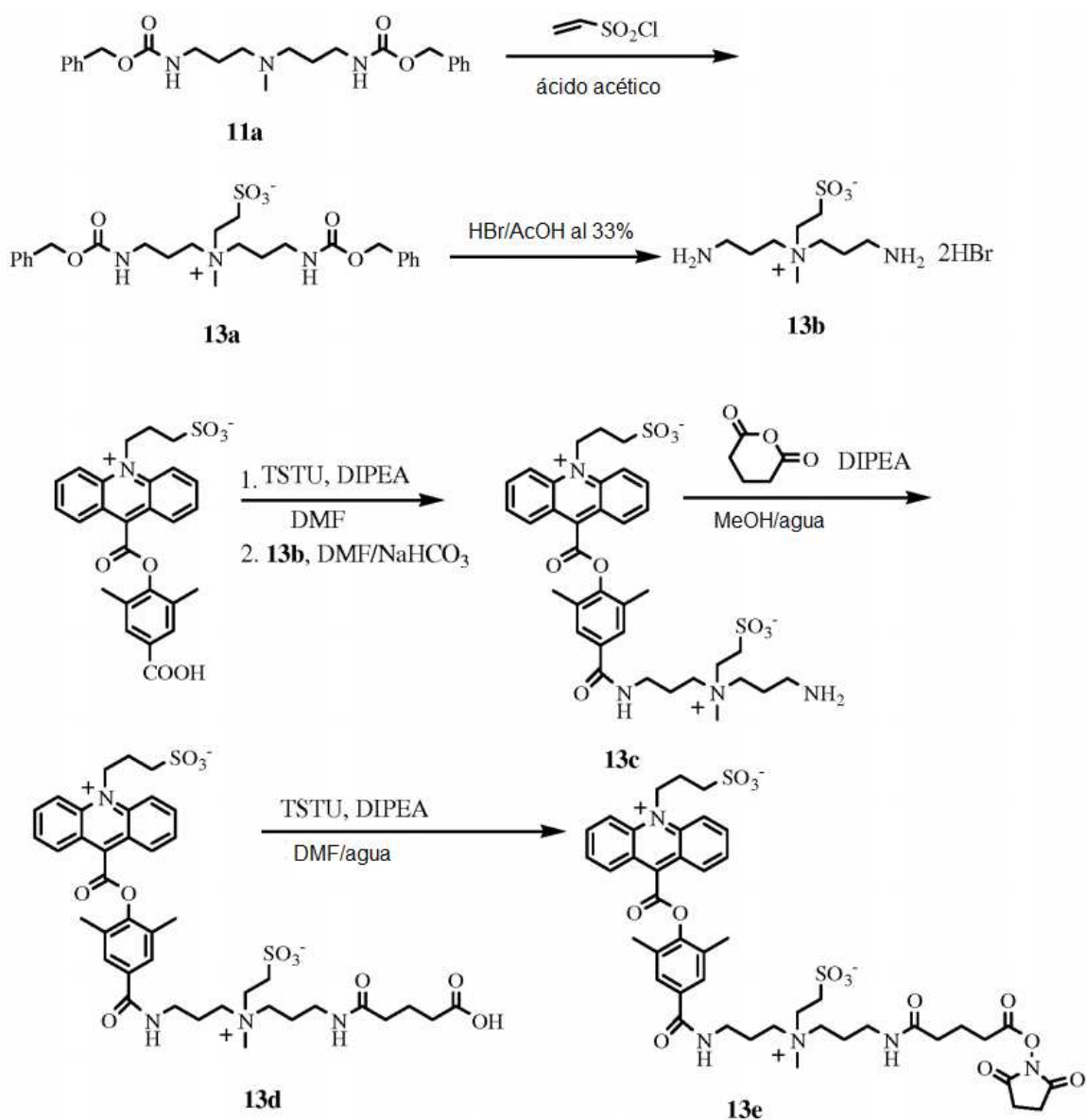
10 Las siguientes reacciones describen la síntesis de NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, compuesto **12h**.



d) Compuesto 13e

Una solución del compuesto **13c** (19 mg, 26,1 μ moles) en metanol (3,6 ml) y agua (0,4 ml) se trató con diisopropiletilamina (22,8 μ l, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (15 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto **13d** eluyendo con un t_R = 14,6 minutos y fue el componente mayoritario (>80 %). A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en DMF (3,6 ml) y agua (0,4 ml). Esta solución se trató con diisopropiletilamina (45,6 μ l, 10 equivalentes) y TSTU (79 mg, 10 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis por HPLC mostró la conversión completa en el producto **13e** eluyendo con un t_R = 15,7 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 \rightarrow 60 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **13e** se combinaron, 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 14Síntesis de NSP-DMAE-ZCB-NHS. Compuesto **14d**a) Compuesto **14a**

- Una solución de **11a** (0,6 g, 1,45 mmoles) disuelto en MeCN (5 ml) se trató con ácido acrílico (1 ml, 1,45 mmoles).
 5 La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando MeOH:EtOAc 3:2 como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 0,432 g, (61 %); MALDI-TOF MS 486,1 observado).

b) Compuesto **14b**

- 10 Se agitó el compuesto **14a** (0,43 g, 0,88 mmoles) en 10 ml de HBr/AcOH al 33 % a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se añadió éter (100 ml) y se separó un sólido granular de color blanco. El producto se dejó sedimentar y se decantó el éter. Este proceso se repitió cuatro veces con éter (4 x 50 ml). Finalmente, el producto se secó al vacío. A continuación se disolvió en agua (5 ml), se congeló y se liofilizó. Rendimiento = 0,35 g (cuantitativo); MALDI-TOF MS 218,3 observado.

c) Compuesto **14c**

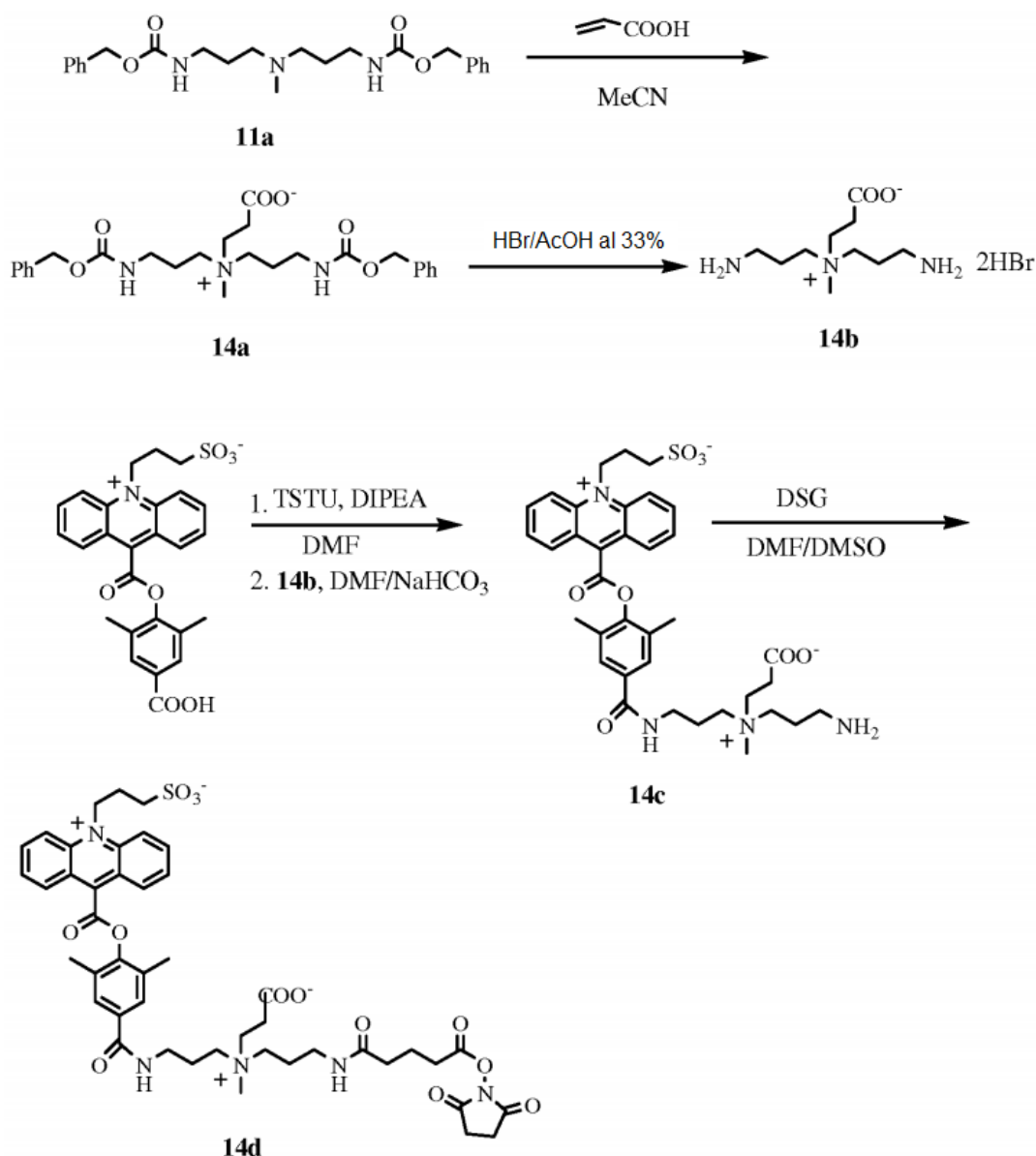
- Una solución de NSP-DMAE (25 mg, 51,0 μ moles, documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.664.043 B2) en DMF (2 ml) se trató con diisopropiletilamina (11,3 μ l, 1,5 equivalentes) y TSTU (18,3 mg, 1,2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, esta solución en DMF del éster de NHS se añadió gota a gota a una solución del compuesto **14b** (80 mg, 0,2 mmoles, sal de HBr) disuelto en bicarbonato de sodio 0,25 M (0,8 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, un análisis por HPLC
 20 llevado a cabo usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm, mostró la conversión limpia en el producto **14c**, que eluyó a 12,0 minutos.

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

e) Compuesto **14d**

- Una solución del compuesto **14c** (20 mg, 29 μ moles) en DMF (1,0 ml) y DMSO (2,0 ml) se trató con diisopropiletilamina (8,6 μ l, 2 equivalentes) y se añadió gota a gota a una solución agitada de glutarato de disuccinimidilo (38 mg, 0,117 mmoles) en DMF (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 60 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 \rightarrow 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto **14d** eluyendo con un tR = 15,0 minutos y fue el componente mayoritario (> 70 %). El producto se purificó
 35 por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 \rightarrow 60 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto **14d** se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 4 mg (15 %); MALDI-TOF MS 905,5 observado.

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



Ejemplo 15

Síntesis de CN-NSP-DMAE-Z3-NHS. Compuesto **15f**

5 a) Compuesto **15a**

Una suspensión de éster de metilo de NSP-DMAE (0,223 g, 0,44 mmoles) en cloruro de tionilo (5 ml) se calentó a 80 °C en una atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa. Después de una hora se formó una solución oscura que se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió hexano (50 ml) se separó un sólido pegajoso de color pardo oscuro. El hexano se decantó y el residuo se aclaró una vez con hexano (25 ml) y se secó muy brevemente al vacío.

- 10 A este sólido pegajoso se añadió una solución de N,N-dimetiletilendiamina (10 ml, exceso) en MeCN anhidro (10 ml). Se formó una solución de color pardo oscuro que se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se llevó a cabo el análisis por 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 de 30 minutos de 10 → 70 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto **15a** eluyendo como un pico engrosado con un tR = 19 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol (5 ml), se diluyó con tolueno (15 ml) y se concentró a presión reducida para proporcionar una espuma pegajosa de color pardo. Rendimiento en bruto = 0,46 g. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice usando metanol como eluyente. Rendimiento = 0,22 g, (87 %); MALDI-TOF

MS 577,9 observado.

b) Compuesto 15b

Una mezcla del compuesto **15a** (0,22 g, 0,38 mmoles), 1,3-propanosulfona destilada (0,465 g, 10 equivalentes y 2,6-di-terc-butilpiridina (0,42 ml, 5 equivalentes) en [BMIM][PF6] (3 ml) se calentó a 155 °C durante 16 horas con agitación vigorosa. A continuación se enfrió a temperatura ambiente y se añadió acetato de etilo (100 ml). El producto precipitó y se recogió por filtración y se aclaró con acetato de etilo (25 ml) y metanol (20 ml). El producto en bruto se transfirió a continuación a un matraz de RB con 50 ml de agua/metanol 1:1. Se llevó a cabo el análisis por 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 de 40 minutos de 10 → 40 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó el producto eluyendo con un tR = 33 minutos (-90 % de conversión). La evaporación de la solución acuosa a presión reducida proporcionó 0,35 g de un sólido de color pardo. MALDI-TOF MS 699,2 observado. Este material se usó como tal para la siguiente reacción.

c) Compuesto 15c

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

d) Compuesto 15d

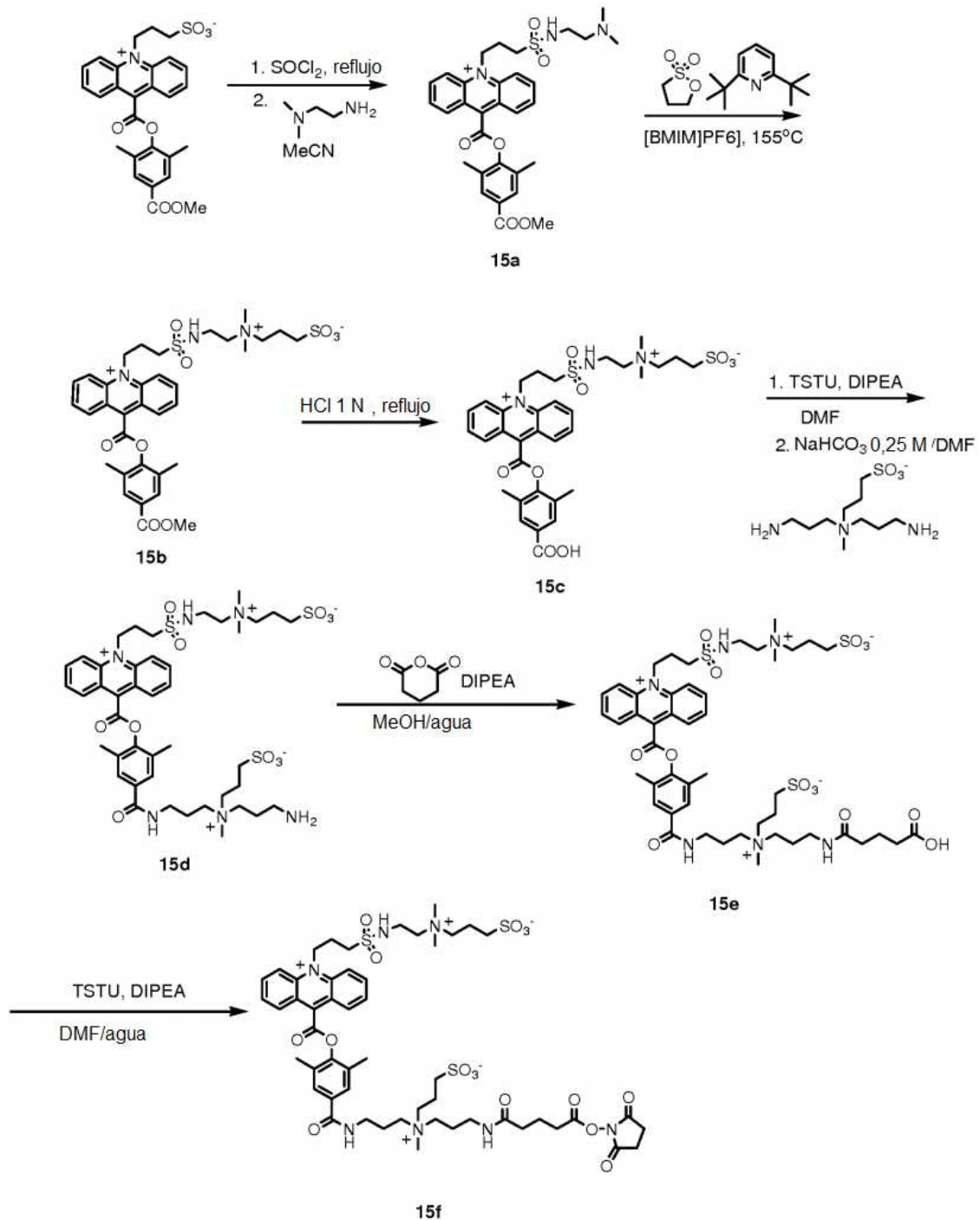
Una solución del compuesto 15c (14 mg, 20 μmoles) en DMF (2 ml) se trató con diisopropiletilamina (6 μl, 2 equivalentes) y TSTU (12,3 mg, 2 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se llevó a cabo el análisis por HPLC de una pequeña porción de la mezcla de reacción en bruto usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 40 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de 1,0 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó la conversión completa en el éster de NHS eluyendo a 22 minutos. Esta solución en DMF se añadió gota a gota a una solución agitada de compuesto **11c** (46 mg, 5 equivalentes, sal de HBr) en bicarbonato de sodio 0,25 M (1 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis por HPLC indicó un producto mayoritario eluyendo con un tR = 14 minutos.

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

e) Compuesto 15f

Una solución del compuesto **15d** (18 mg, 19,2 μmoles) en metanol (1,8 ml) y agua (0,2 ml) se trató con diisopropiletilamina (26 μl, 5 equivalentes) y anhídrido glutárico (17 mg, 5 equivalentes). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis por HPLC como se ha descrito en la sección (d) mostró la conversión completa en el derivado de glutarato **15e** que eluyó con un tR = 16,2 minutos. La reacción se diluyó con tolueno (5 ml) y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió 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). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC mostró la conversión completa en el producto que eluyó con un tR = 19 minutos. El producto **15f** se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y un gradiente de 40 minutos de 10 → 60 % de B (A = agua con TFA al 0,05 %, B = MeCN con TFA al 0,05 %) a un caudal de disolvente de 20 ml/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron hasta sequedad. Rendimiento = 6,5 mg (30 %); MALDI-TOF MS 1146,6 observado.

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



Ejemplo 16

Procedimiento general para el etiquetado de Mab anti-TSH con éster de acridinio

- 5 Una solución de trabajo del anticuerpo (5 mg/ml, 200 μ l, 1,0 mg, 6,7 nmoles) se diluyó con carbonato de sodio 0,1 M a pH 9 (250 ml) para dar una solución de -2,0 mg/ml. A esta solución se añadieron 10 equivalentes del éster de NHS de acridinio en forma de una solución en una solución 1:1 de DMF/agua o DMSO. Por ejemplo, usando NSP-DMAE-Z-NHS, **11f**, esto supuso la adición de 64 microgramos añadidos en forma de una solución de 5 mg/ml (12,8 μ l) del éster de acridinio. Las reacciones de etiquetado se agitaron suavemente a 4 °C durante 16 horas y a continuación se diluyeron con agua desionizada hasta 4 ml. Estas soluciones diluidas se transfirieron a continuación a filtros Centricon™ de 4 ml (corte de MW 30.000) y se centrifugaron a 4000g para reducir el volumen hasta -0,2 ml. Este proceso se repitió tres veces más. Los conjugados filtrados se diluyeron finalmente en un volumen total de 250 μ l de
- 10

agua para análisis espectral de masa y mediciones de RLU.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Voyager DE MALDI-TOF y el anticuerpo sin etiquetar se usó como referencia. Se mezclaron aproximadamente 2 ul de la solución de conjugado con 2 ul de solución matriz de ácido sinapínico (HP) y se aplicaron a una placa MALDI. Después de secado completo, se registraron los espectros de masas. A partir de la diferencia en los valores de masa para el anticuerpo sin etiqueta y los conjugados, se pudo medir la extensión de incorporación de AE. Por lo general, en estas condiciones de etiquetado, se incorporaron -5 etiquetas AE al anticuerpo.

Ejemplo 17

Mediciones de quimioluminiscencia

Cada anticuerpo etiquetado con éster de acridinio se diluyó hasta una concentración de 0,2 nanomolar en un tampón que consistió en fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 6 mM y 1 g/l de albúmina de suero bovino (BSA). La cinética de quimioluminiscencia para 10 microlitros de cada conjugado éster de acridinio-anticuerpo sometido a ensayo se integró a intervalos de 0,1 segundos durante 10 segundos en condiciones convencionales en un luminómetro Berthold Technologies Autolumat LB953 con adición secuencial de 300 microlitros de cada uno del Reactivo 1 (ácido nítrico 0,1 M y peróxido de hidrógeno a 0,5 %) y el Reactivo 2 (hidróxido de sodio 0,25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0,05 %). Las cinéticas de quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio sometidos a ensayo se compararon para la tasa relativa de emisión de luz así como para la potencia luminosa total.

Ejemplo 18

Medición de la unión no específica

Se sometieron a ensayo compuestos de acridinio zwitteriónicos como etiquetas en un inmunoensayo para la comparación con compuestos de acridinio de control usados por separado como etiquetas en el mismo inmunoensayo. El ensayo de TSH3 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics es uno de una serie de inmunoensayos comercializados fabricados por Siemens Healthcare Diagnostics para su aplicación en el ACS:180®. El ensayo de TSH3 es un inmunoensayo de 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 de TSH3 tiene dos anticuerpos, uno de los cuales es un anticuerpo de ratón unido al compuesto de acridinio, denominándose la combinación trazador, mientras que el otro anticuerpo está unido a partículas paramagnéticas (PMP), donde esta combinación se denomina fase sólida. En este ensayo a modo de ejemplo se unieron tanto los compuestos de acridinio zwitteriónicos como también los compuestos de acridinio de control al mismo anticuerpo en porciones separadas. En este ensayo modo de ejemplo, solo se midió la unión no específica donde los conjugados de éster de acridinio o los trazadores se sometieron a ensayo en ausencia de analito TSH en la muestra. Los trazadores se diluyeron hasta una concentración de 2,2 nM en un tampón que contenía ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 0,15 M (HEPES), cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 7,7 mM, ácido etilendiaminetetraacético 1,0 mM (EDTA), t-octilfenoxipolietoxietanol 12 mM (Triton X-100), 5 g/l de albúmina de suero bovino (BSA), 0,20 g/l de anfotericina B, 0,48 g/l de sulfato de gentamicina, 1 g/l de IgG de ratón, 10 mg/l de IgG de oveja, 5,0 g/l de suero de ratón, 0,05 g/l de antiespumante B, a pH 7,7. En este ensayo a modo de ejemplo se sometieron a ensayo tres fases sólidas con los compuestos de acridinio: Fase Sólida de Ensayo de TSH3 de Siemens Healthcare Diagnostics, Fase Sólida de Ensayo de iPTH (hormona paratiroidea intacta) de Siemens Healthcare Diagnostics (DynaM280-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-PTH policlonal de cabra biotinado) y Ensayo de TnI (Troponina I)-ultra de Siemens Healthcare Diagnostics (DynaM270-estreptoavidina unida a anticuerpo anti-TnI monoclonal de ratón biotinado).

El ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics es un dispositivo robótico automatizado diseñado para llevar a cabo una serie de inmunoensayos para diferentes analitos. El procedimiento automatizado para el ensayo de TSH3 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics se inició con la dispensación de 200 µl de cada una de las muestras de suero que no contenían analito TSH en cubetas separadas. Una cubeta es un recipiente ópticamente transparente o translúcido para la mezcla del trazador, la muestra y la fase sólida y en el que se mide la quimioluminiscencia. Las muestras no contuvieron en analito TSH. A continuación, el ACS:180® dispensó 0,100 ml de trazador 2,2 nM (0,22 pmol) y 0,225 ml de 0,3 g/l (67 µg) de fase sólida en cada cubeta que contenía las muestras, de un modo tal que se usaron la misma cantidad de trazador y de fase sólida para todos los compuestos de acridinio sometidos a ensayo. El primero de los dos reactivos de ensayo fue una solución que contenía el anticuerpo anti-TSH conjugado con un compuesto de acridinio. Se sometieron a ensayo tanto los compuestos de acridinio zwitteriónicos como los compuestos de acridinio de control por separado como etiquetas para los trazadores. Los trazadores se prepararon y se purificaron usando el procedimiento que se ha descrito anteriormente usando compuestos de acridinio y anticuerpo de ratón de unión a TSH. El número de compuestos de acridinio por anticuerpo en cada trazador fue aproximadamente el mismo para todos los compuestos de acridinio sometidos a

5 ensayo. Por lo tanto, cualquier diferencia en la unión no específica medida para cada compuesto de acridinio se pudo relacionar con la estructura del compuesto de acridinio. La mezcla de trazador, muestra y fase sólida en cada cubeta se calentó durante 5,0 minutos a 37 °C. El trazador sin unir se retiró de la fase sólida con separación magnética de la fase sólida de la mezcla en la cubeta, seguido de la retirada de fluido de la cubeta y lavado de la fase sólida en la cubeta con agua para retirar todo menos la fase sólida y cualquier cantidad trazador unido a la misma.

10 La quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio sobre la fase sólida se inició con la emisión de luz posterior con adiciones secuenciales de 0,30 ml de cada uno del Reactivo 1 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics y el Reactivo 2 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. El Reactivo 1 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics fue ácido nítrico 0,1 M y peróxido de hidrógeno al 0,5 %. El Reactivo 2 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics fue hidróxido de sodio 0,25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio al 0,05 %. A continuación se midió la quimioluminiscencia de cada cubeta en unidades de luz relativas (RLU) correspondiendo cada cubeta a una muestra individual sometida a ensayo. Se midió la unión no específica para cada compuesto de acridinio sometido a ensayo como la quimioluminiscencia en unidades de RLU con el número de RLU medido por el ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. La unión no específica fraccionaria se define como la proporción de la quimioluminiscencia de unión no específica con respecto a la entrada de quimioluminiscencia total en cada cubeta de 0,22 pmol de trazador. La minimización de la unión no específica fraccionaria maximiza la medición de señal específica mejorando de ese modo la medición de cantidades menores de analito y mejorando el rendimiento del inmunoensayo. En este ensayo a modo de ejemplo, los compuestos de acridinio zwitteriónicos tienen una menor unión no específica fraccionaria y por lo tanto se podría esperar que aumenten el rendimiento del inmunoensayo.

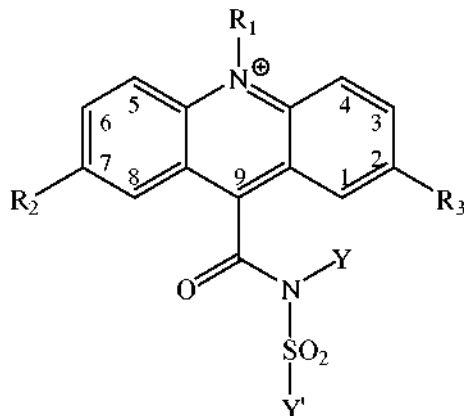
Ejemplo 19

Medición de la estabilidad de quimioluminiscencia del conjugado de acridinio

25 Se diluyeron 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-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 0,15 M (HEPES), cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio 7,7 mM, ácido etilendiaminatetraacético 1,0 mM (EDTA), t-octilfenoxipolietoxietanol 12 mM (Triton X-100), 5 g/l de albúmina de suero bovino (BSA), 0,20 g/l de anfotericina B, 0,48 g/l de sulfato de gentamicina, 1 g/l de IgG de ratón, 10 mg/l de IgG de oveja, 5,0 g/l de suero de ratón, 0,05 g/l de antiespumante B, a pH 7,7. Todos los conjugados se almacenaron a continuación a 4 o 37 °C durante cuatro semanas en botellas de polietileno selladas. Se retiraron periódicamente 10 µl de cada trazador almacenado a 4 o 37 °C para la medición de quimioluminiscencia en el quimioluminómetro Bertholdt ALB953 que usó el mismo método para la medición de quimioluminiscencia que el ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics usando los Reactivos 1 y 2 de ACS:180® de Siemens Healthcare Diagnostics. A continuación, se comparó la quimioluminiscencia como porcentaje con la que se determinó para cada trazador al inicio del almacenamiento a 4 o 35 37 °C. Una estabilidad de quimioluminiscencia mejorada o equivalente con respecto a los compuestos de acridinio de control sería una propiedad deseable para que los nuevos compuestos de acridinio proporcionen una vida en anaquel de producto mayor o equivalente y una reproducibilidad de los resultados día a día mejor o equivalente.

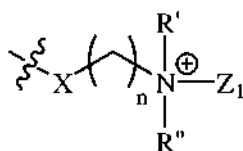
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acridinio quimioluminiscente que tiene la siguiente estructura:

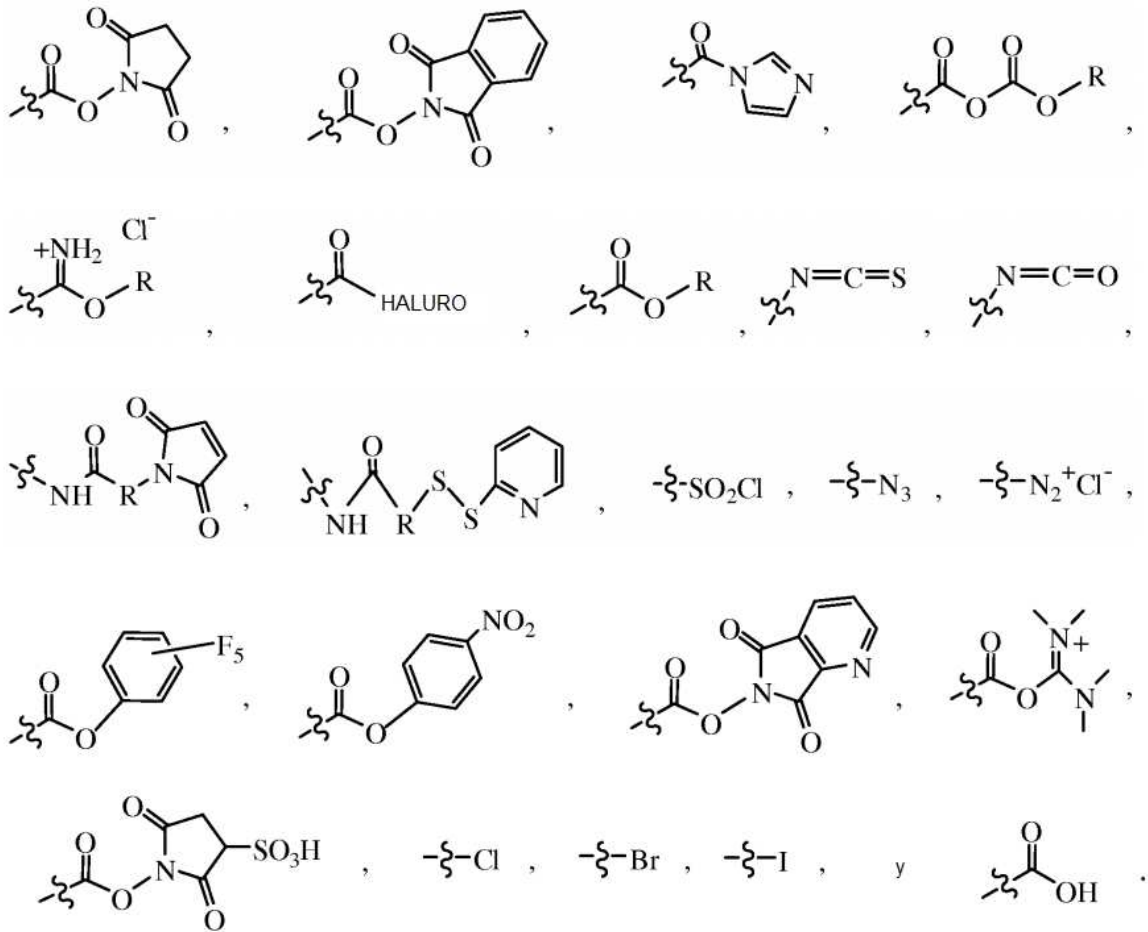


en la que,

- 5 R₁ es un grupo alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo C₁₋₃₅, cada uno de los cuales puede contener hasta 20 heteroátomos, o un grupo sulfopropilo o sulfobutilo, o R₁ es un grupo -R^a-Z;
 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre (i) hidrógeno, (ii) un grupo donador de electrones seleccionado entre OR[#], OH, SR[#], SH, NH₂ y NR^NR^N, en los que R[#] y R^N se seleccionan independientemente en cada aparición y se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, o (iii) un grupo - Z;
 10 Y e Y' se seleccionan independientemente entre R, -R^a-Z, o -R^a-L; donde L es un grupo funcional derivatizable que comprende un grupo saliente para formar un conjugado con un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito;
 Z es un grupo zwitteriónico de forma:

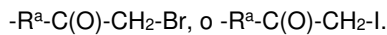


- 15 X se selecciona independientemente en cada aparición entre un enlace, -CH₂-, oxígeno, azufre, -NR^N-, amida (-NR^N(CO)-), carbamato (-NR^NC(O)O-), o urea (-NR^NC(O)NR^N-);
 R' y R'' se seleccionan independientemente en cada aparición entre alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno hasta 20 heteroátomos, y un grupo R^a-L;
 20 Z₁ es un grupo -R^a-Z₂ donde Z₂ se selecciona entre carboxilato (-COO⁻), sulfonato (-SO₃⁻), sulfato (-OSO₃⁻), fosfato (-OP(O)(OR)(O⁻)), u óxido (-O⁻); o, en el caso en el que Z₂ sea un óxido (-O⁻), R^a puede estar ausente;
 n es, seleccionado independientemente en cada caso, un número entero entre uno y 12; y
 R se selecciona independientemente en cada aparición entre grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos;
 25 R^N se selecciona independientemente en cada aparición entre hidrógeno, grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅ que contienen cada uno hasta 20 heteroátomos; y
 R^a es un radical divalente seleccionado entre un grupo alquilenilo, alqueniileno, alquinileno, arileno, o aralquilenilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos;
 30 con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃, Y e Y' comprenda dicho grupo zwitteriónico Z, en la que L se selecciona entre el grupo que consiste en:

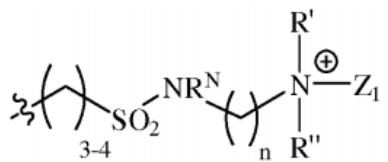


2. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R' o R'' comprende un grupo -R^a-L.

3. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R' o R'' es, en una aparición, un grupo -R^a-C(O)-CH₂CH₂CH₂-C(O)-N-succinimido, -R^a-N-maleimido,

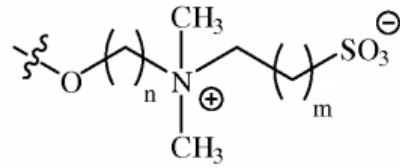


4. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ se selecciona entre metilo, sulfopropilo (-CH₂CH₂CH₂-SO₃), sulfobutilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-SO₃⁻), o un grupo que tiene la estructura:



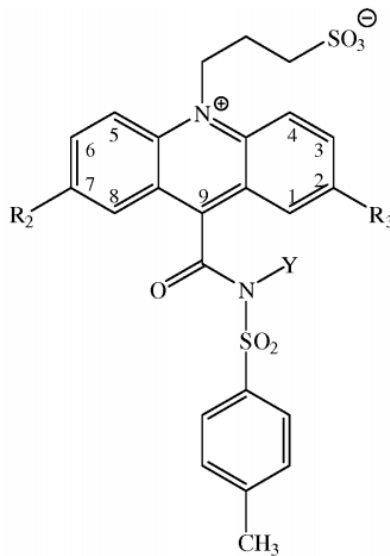
5. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno o ambos de R₂ y R₃ es un grupo Z.

6. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 6, en la que uno o ambos de R₂ y R₃ es un grupo:



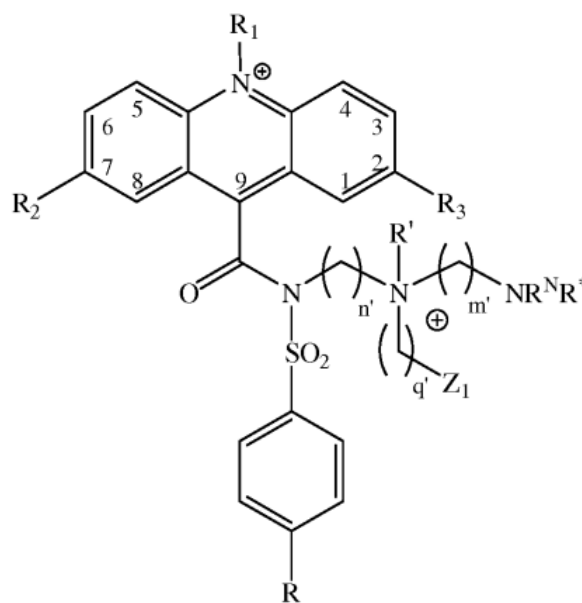
donde n es un número entero de 1-12 y m es un número entero de 0-3.

7. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



5 en la que Y comprende un grupo -R^a-Z, donde R^a, R₂, R₃, y Z son como se han definido anteriormente.

8. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



10 en la que R* se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, o aralquilo C₁₋₃₅, conteniendo cada uno opcionalmente hasta 20 heteroátomos, o R* es un grupo -R^a-L, donde L es un grupo saliente para formar un conjugado con un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito; n', m', y q' son independientemente

números enteros de 1-4, y R, R^N, R₁, R₂, R₃, R' y Z₁ son como se han definido anteriormente.

9. El compuesto de acridinio quimioluminiscente de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de acridinio exhibe 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 10. Un reactivo para la detección de un analito que comprende el compuesto de acridinio quimioluminiscente de la reivindicación 1 unido a un analito, análogo de analito, o par de unión para un analito, en el que dicho compuesto de acridinio exhibe 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.

10 11. Un ensayo para la detección o la cuantificación de un analito macromolecular que comprende:

(a) proporcionar un conjugado que comprende un compuesto de acridinio quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1 unido a una molécula de unión específica para un analito;
 (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito;
 15 (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

o
 para la detección o la 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 de acuerdo con la reivindicación 1;
 20 (b) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;
 (c) mezclar el conjugado, el soporte sólido y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

o
 25 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 de acuerdo con la reivindicación 1;
 30 c) mezclar la fase sólida, el conjugado y una muestra que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;

en el que cada formato de ensayo comprende además:

d) separar el complejo de unión capturado sobre el soporte sólido;
 e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de (d) por adición de reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;
 35 f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
 g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito por comparación de la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta a dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

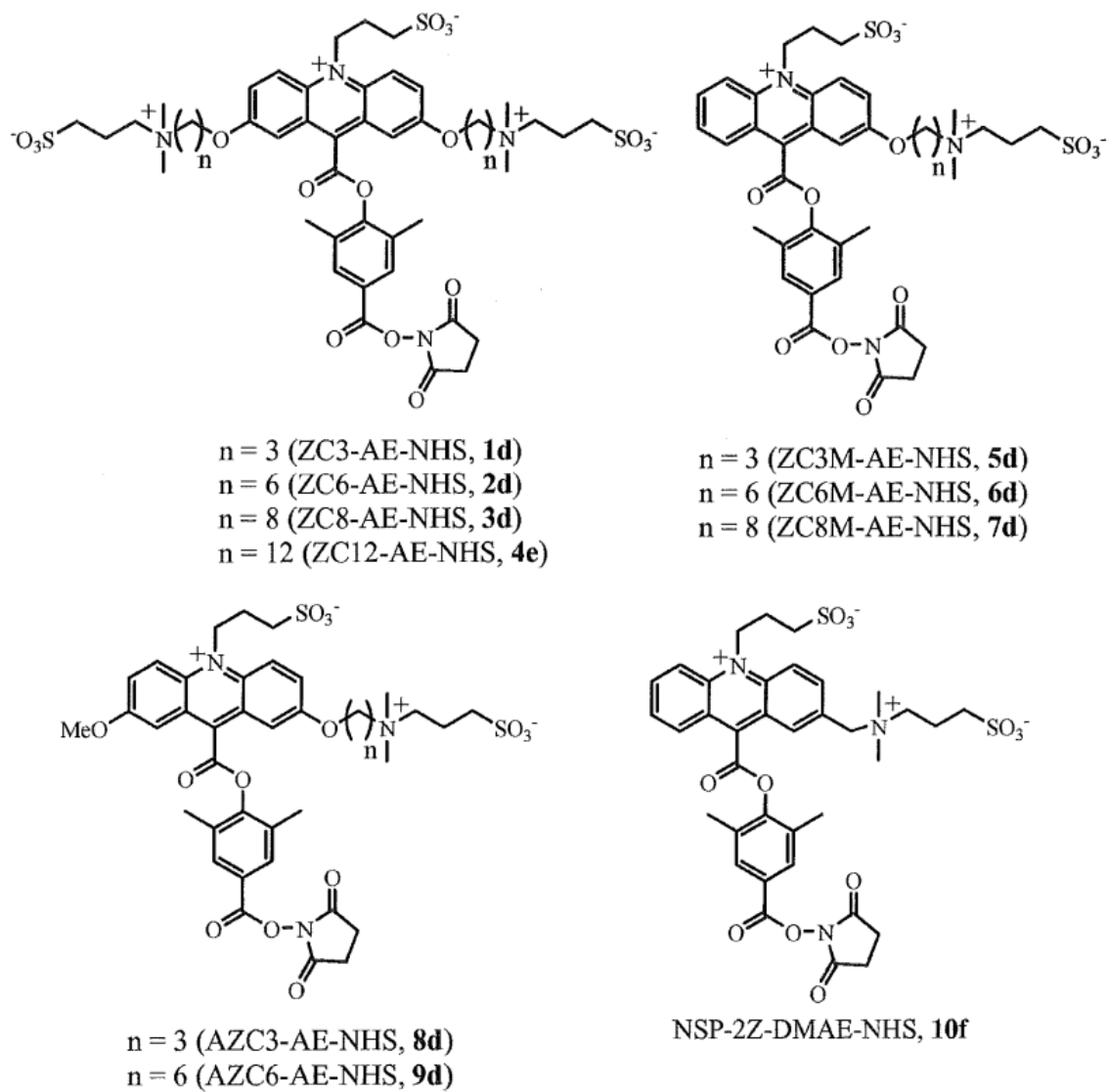
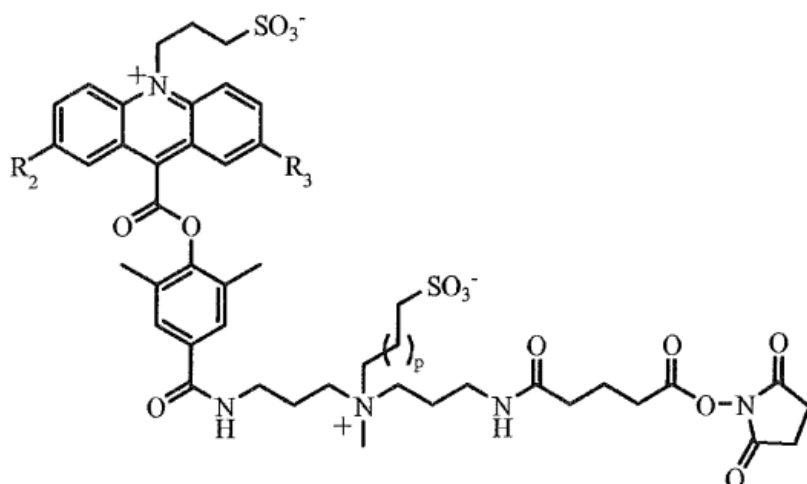


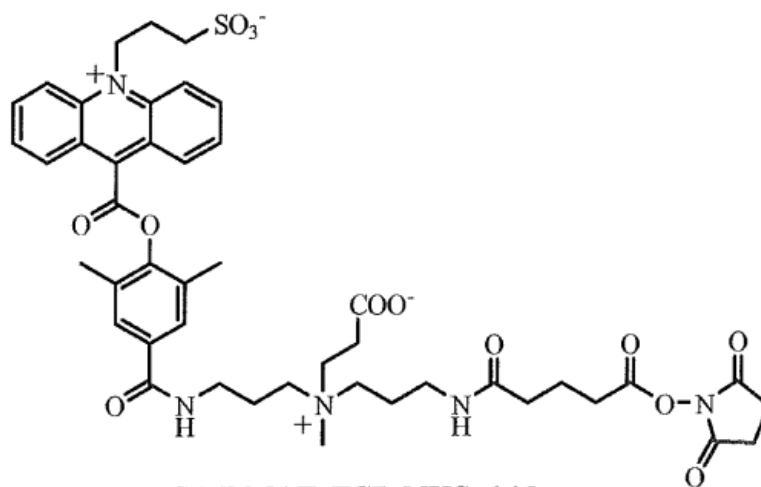
Figura 1.



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

$R_2, R_3 = \left\{ \begin{array}{l} \text{---} \text{O---} \\ \text{---} \text{O---} \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{---} \text{OMe} \\ \text{---} \text{OMe} \end{array} \quad p = 1$ (NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHS, **12h**)

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



NSP-DMAE-ZCB-NHS, **14d**

Figura 2.

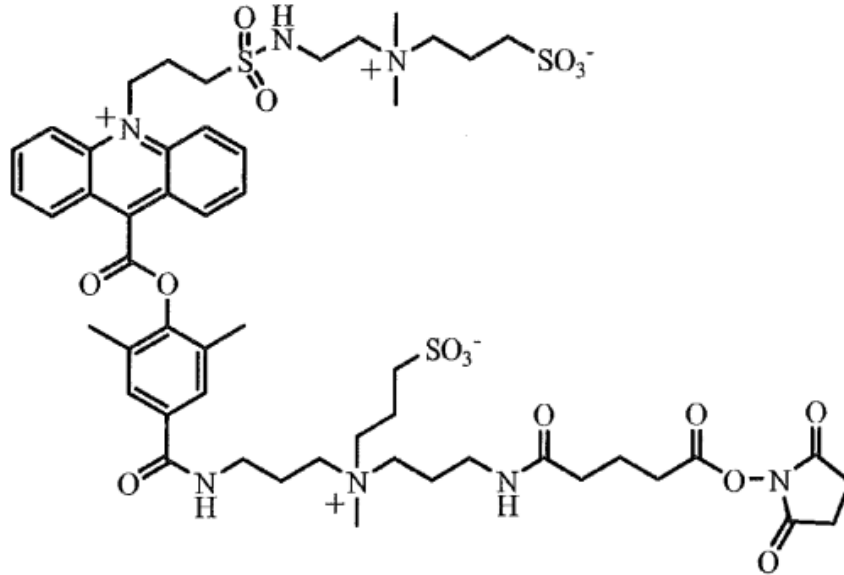


Figura 3.

Cinética de emisión de luz de conjugados de proteína

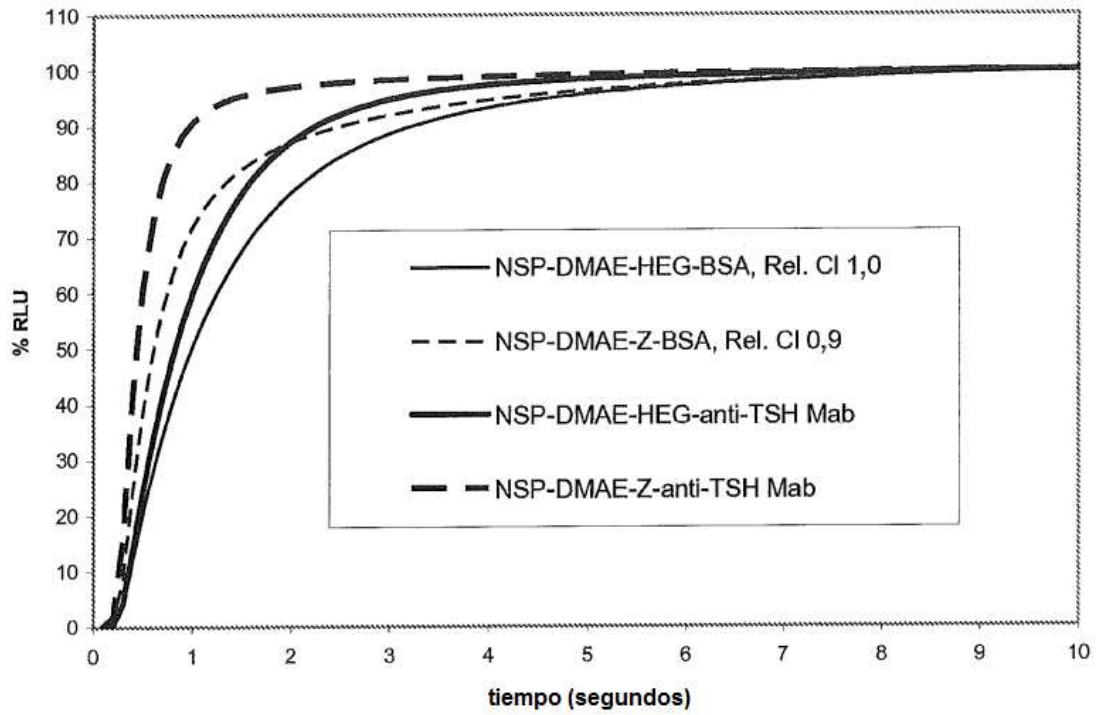


Figura 4.

Emisión de luz de conjugados de anticuerpo: HQYAE vs NSP-2,7-DMG-DMAE-Z

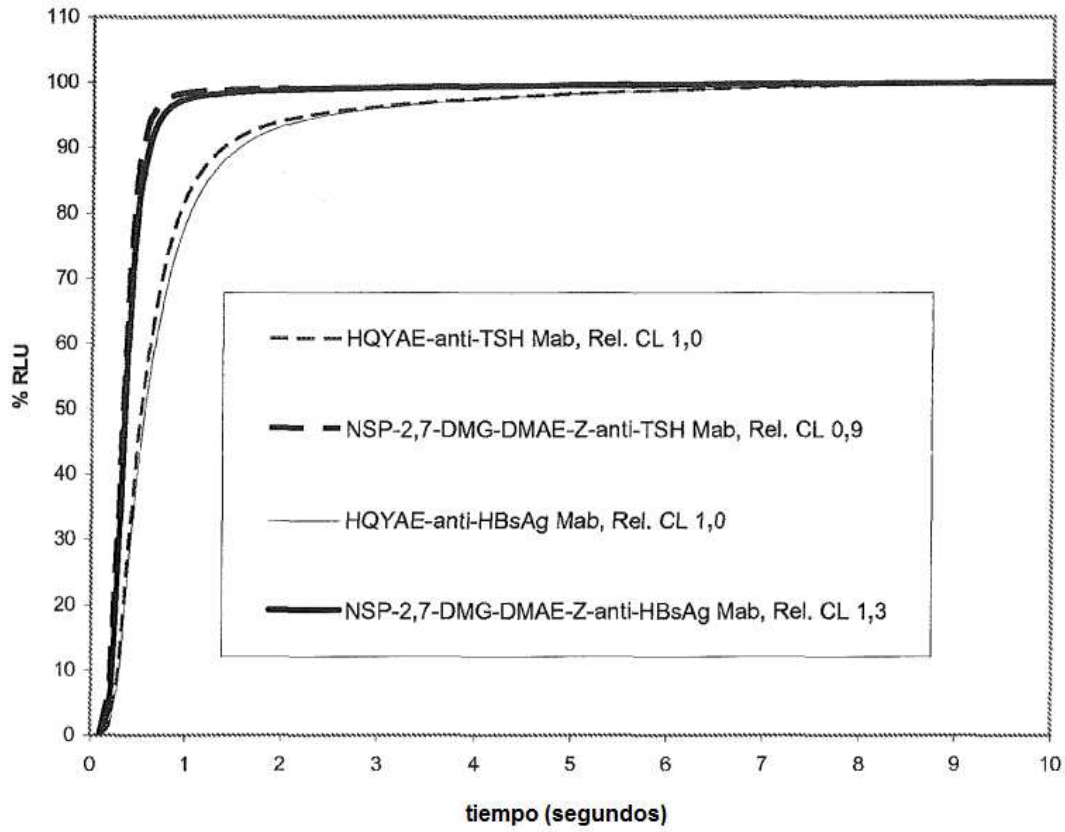


Figura 5.

Cinética de emisión de luz de conjugados de Mab anti-TSH

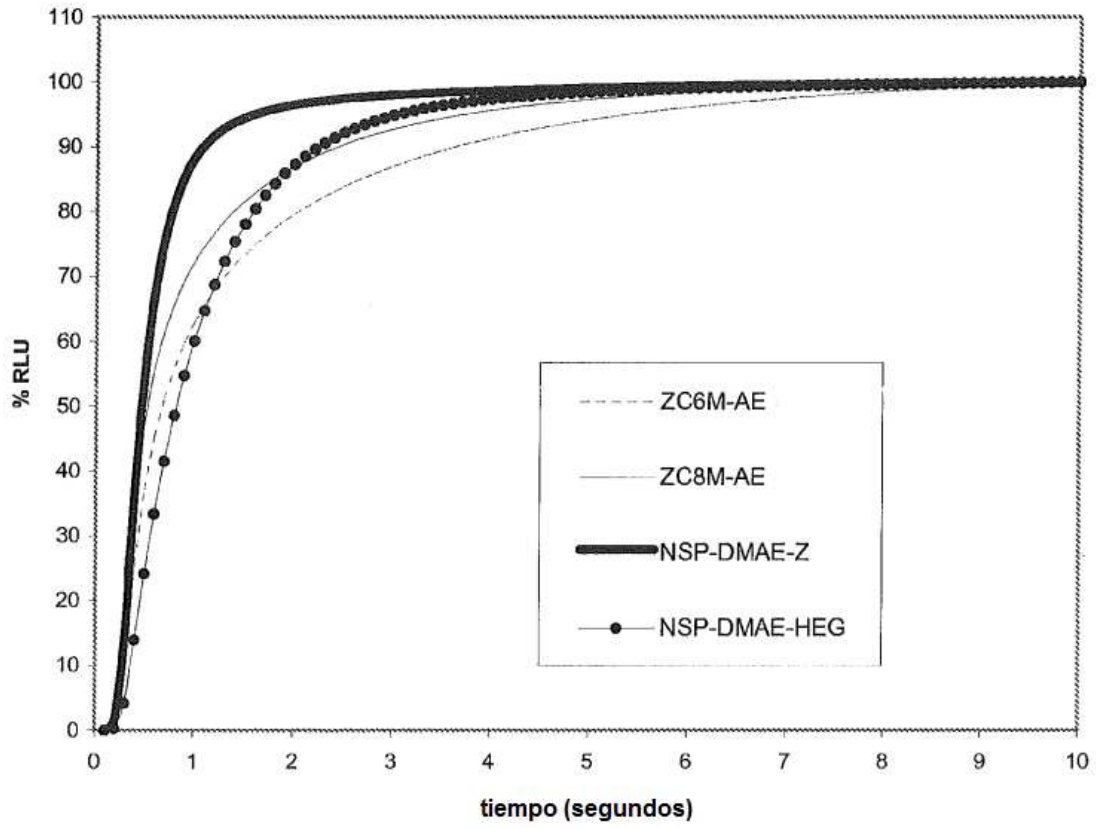


Figura 6.