

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 395**

51 Int. Cl.:

C09K 11/07 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

C07D 219/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/US2014/045505**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15006174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14823526 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3019575**

54 Título: **Ésteres de acridinio hidrófilos de alto rendimiento cuántico con estabilidad mejorada y emisión rápida de luz**

30 Prioridad:

08.07.2013 US 201361843528 P

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

12.06.2019

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 716 395 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

Ésteres de acridinio hidrófilos de alto rendimiento cuántico con estabilidad mejorada y emisión rápida de luz

1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie No. 61/843,528 presentada el 8 de julio de 2013.

2. Campo de la Invención.

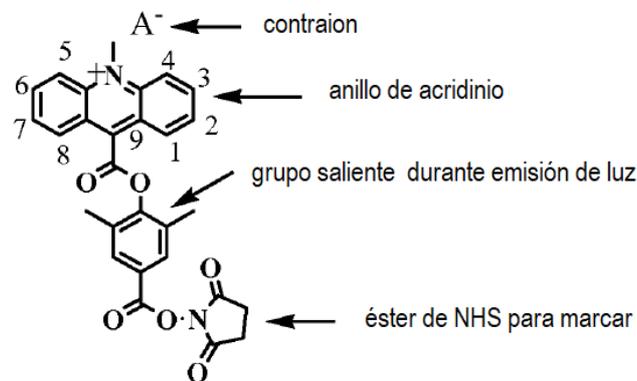
La presente invención se refiere a compuestos de acridinio quimioluminiscentes, hidrófilos, de alto rendimiento cuántico, con salida de luz incrementada, estabilidad mejorada, emisión de luz rápida y baja unión no específica. Estos compuestos, debido a su mayor rendimiento cuántico y su naturaleza hidrófila, son útiles para mejorar la sensibilidad del ensayo. La estabilidad mejorada de estos compuestos es útil para extender la vida útil de los reactivos que utilizan estos compuestos, así como para minimizar la variación en el rendimiento del ensayo con el tiempo. Su mayor cinética de emisión también permite mediciones de luz más rápidas en ensayos especialmente en analizadores automáticos.

3. Antecedentes de la invención.

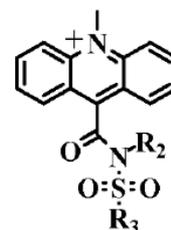
Los ésteres de acridinio (AEs) quimioluminiscentes son marcadores extremadamente útiles que se han usado ampliamente en inmunoensayos y ensayos de ácido nucleico. Una revisión de Pringle, M. J. *Journal of Clinical Ligand Assay* vol. 22, pp. 105-122 (1999) resume los desarrollos anteriores y actuales en esta clase de compuestos quimioluminiscentes. McCapra, F. et al. en *Tetrahedron Lett.* vol. 43, pp. 3167-3172 (1964) y Rahut et al. en *J. Org. Chem* vol. 301, pp. 3587-3592. (1965) describieron que la quimioluminiscencia de los ésteres de las sales de acridinio puede ser activada por el peróxido alcalino. Desde estos estudios trascendentales, el interés en los compuestos de acridinio ha aumentado debido a su utilidad como marcadores. La aplicación del éster bromuro de acridinio 9-carboxifenil-N-metilacridinio en un inmunoensayo fue descrita por Simpson, J.S.A. et al., *Nature*, vol. 279, pp. 646-647 (1979). Sin embargo, este éster de acridinio es bastante inestable, lo que limita su utilidad comercial. Esta inestabilidad surge de la hidrólisis del enlace del éster 9-carboxifenilo entre el fenol y el anillo de acridinio.

Se han descrito diferentes estrategias para aumentar la estabilidad de los compuestos de acridinio. Law et al., *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, vol. 4, pp. 88-89 (1989), introdujeron dos grupos metilo para flanquear la unidad estructural de éster de acridinio para estabilizar este enlace. Se encontró que el éster de acridinio estéricamente estabilizado resultante, el DMAE-NHS [2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxycarbonil)fenil 10-metilacridinio-9-carboxilato] tenía la misma salida de luz que un éster de acridinio que no contenía los grupos metilo. La estabilidad del compuesto anterior cuando se conjugó con una inmunoglobulina fue muy superior y no mostró pérdida de actividad quimioluminiscente incluso después de una semana a 37°C a pH 7. En contraste, el éster de acridinio no sustituido solo retuvo el 10% de su actividad cuando se sometió al mismo tratamiento. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,918,192 y 5,110,932 describen el DMAE y sus aplicaciones.

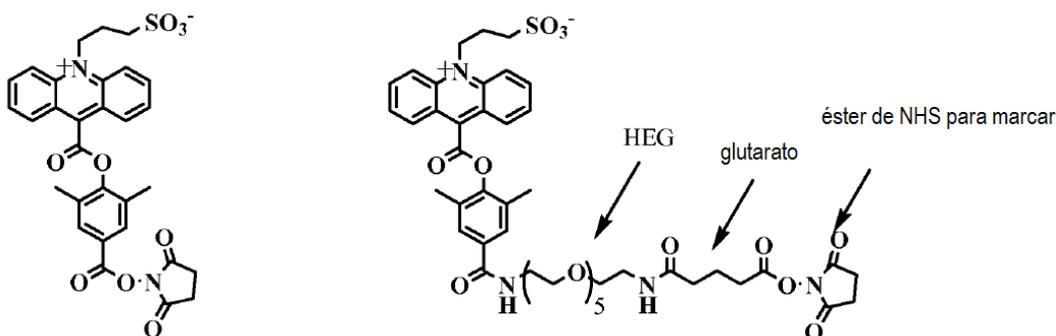
La Patente de los Estados Unidos No. 5,656,426 de Law et al. describe una versión hidrófila de DMAE denominada NSP-DMAE-NHS éster donde el grupo N-metilo se ha reemplazado con un grupo N-sulfopropilo (NSP). Las estructuras de estos dos compuestos y el sistema de numeración del anillo de acridinio se ilustran a continuación.



Estructura de DMAE-NHS



Estructura general de una sulfonamida de acridinio (R2 y R3 son grupos alquilo o arilo)



Estructura de NSP-DMAE-NHS

Estructura de NSP-DMAE-HEG-Glutarato-NHS

Natrajan et al. en la Patente de los Estados Unidos No. 6,664,043 B2 describen derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrófilos unidos al fenol. La estructura de uno de dichos compuestos, NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS, (abreviado como HEG-AE) se ilustra a continuación. En este compuesto, se une una unidad estructural diamino hexa(etilenglicol) (diamino-HEG) al fenol para aumentar la solubilidad acuosa del éster de acridinio. Se anexó una unidad estructural glutarato hasta el final de HEG y se convirtió en el éster de NHS para permitir la marcación de diversas moléculas.

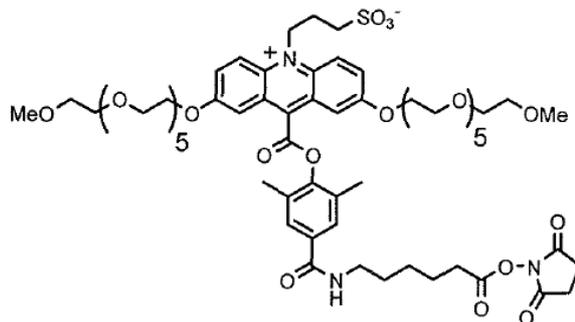
Natrajan et al. en la Patente de los Estados Unidos No. 6,664,043 B2 describen derivados de NSP-DMAE con modificadores hidrófilos unidos al fenol. La estructura de uno de dichos compuestos, NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS, (abreviado como HEG-AE) se ilustra a continuación. En este compuesto, se une una unidad estructural diamino hexa(etilenglicol) (diamino-HEG) al fenol para aumentar la solubilidad acuosa del éster de acridinio. Se anexó una unidad estructural glutarato hasta el final de HEG y se convirtió en el éster de NHS para permitir la marcación de diversas moléculas.

Además, Natrajan et al. en el documento WO 2011/060228 A1 describe quimioluminiscencia a partir de marcadores de éster dimetilfenílico de acridinio sustituido con alcoxi. Se describe que al final del ensayo, la emisión de luz de la marcación del éster de acridinio se desencadena por la adición secuencial de volúmenes iguales de dos reactivos. Un tratamiento inicial con ácido nítrico que contiene peróxido de hidrógeno es seguido por la adición de hidróxido de sodio que contiene el agente tensioactivo catiónico CTAC. Los surfactantes CTAC, cloruro de cetiltripropilamonio (CTPAC) y N,N-dimetildodecilamonio-1,3-propano sulfonato (DDAPS) se probaron en el método descrito, en donde CTAC fue el surfactante más efectivo.

Una clase diferente de compuestos de acridinio quimioluminiscentes estables ha sido descrita por Kinkel et al., *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* vol. 4, pp. 136-139 (1989) and Mattingly, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* vol. 6, pp. 107-114 (1991) y la Patente de los Estados Unidos No. 5,468,646. En esta clase de compuestos, el enlace éster fenólico se reemplaza por la unidad estructural de sulfonamida, de la cual se reporta que imparte estabilidad hidrolítica sin comprometer la salida de luz. En los ésteres de acridinio, el fenol es el "grupo saliente", mientras que en las sulfonamidas de acridinio, la sulfonamida es el "grupo saliente" durante la reacción quimioluminiscente con peróxido alcalino.

La emisión de luz de los compuestos de acridinio normalmente es provocada por el peróxido alcalino. La salida de luz total, que también se puede denominar rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, es una combinación de las eficiencias de la reacción química que conduce a la formación de la acridona en estado excitado y el rendimiento cuántico de fluorescencia de este último.

Recientemente, Natrajan et al., en la Patente de los Estados Unidos No. 7,309,615 B2 se describen compuestos de acridinio hidrófilos de alto rendimiento cuántico que contienen grupos alcoxi hidrófilos (OR*) en C2 y/o C7 del anillo de acridinio, en donde R* es un grupo que comprende una unidad estructural sulfopropilo o las unidades estructurales de etilenglicol o combinación de los mismos. La salida de luz mejorada de tales compuestos y su naturaleza hidrófoba los hizo útiles para mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos. La estructura de uno de dichos compuestos, NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS (abreviado como HQYAE), se ilustra a continuación.

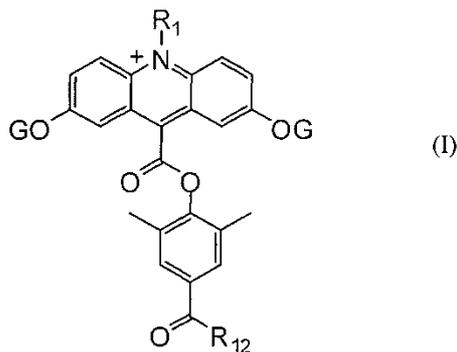


Estructura de NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS

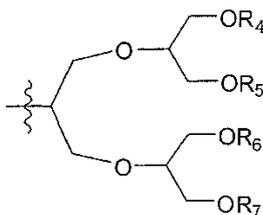
4. Resumen de la invención

5 Se ha encontrado sorprendentemente que los ésteres de acridinio quimioluminiscentes, hidrófilos, de alto rendimiento cuántico poseen grupos funcionales donadores de electrones de la forma -OG en C2 y/o C7 del anillo de acridinio, donde G representa un sustituyente hidrófilo ramificado de acuerdo con la reivindicación 1, proporciona una salida de luz incrementada, estabilidad mejorada, emisión de luz rápida y/o baja unión no específica en los ensayos.

En un aspecto de la invención, se proporcionan ésteres de acridinio, hidrófilos y de alto rendimiento cuántico que tienen la estructura de fórmula (I):

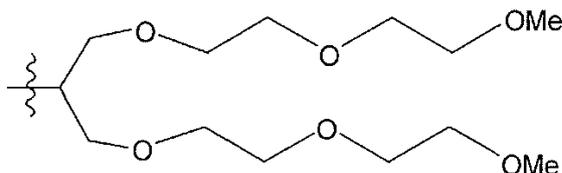


10 en donde, R1 es un grupo metilo o sulfopropilo; G es un grupo ramificado de acuerdo con la reivindicación 1:

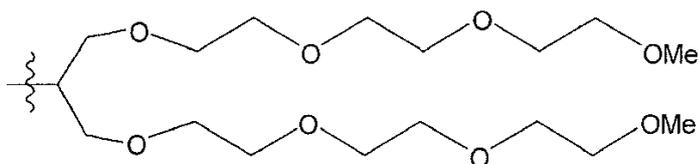


donde R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente en cada aparición un grupo metilo o un grupo -(CH₂CH₂O)_nCH₃, donde n es un número entero de 1 a 5; y R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo para conjugar el compuesto de acridinio con un analito, un análogo de analito o una molécula de unión para un analito de acuerdo con la reivindicación 1.

15 En algunas realizaciones de acuerdo con la fórmula (I), G puede ser un grupo:

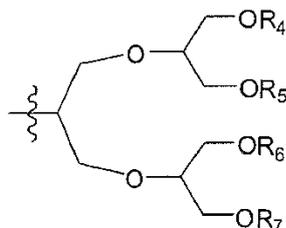


en una o ambas apariciones. En una realización relacionada, G es un grupo:

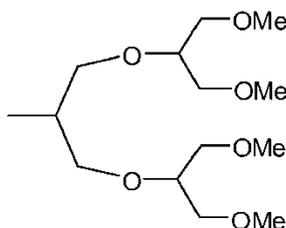


en una o ambas apariciones.

En otras realizaciones de acuerdo con la fórmula (I), G representa, en una o ambas apariciones, un grupo:

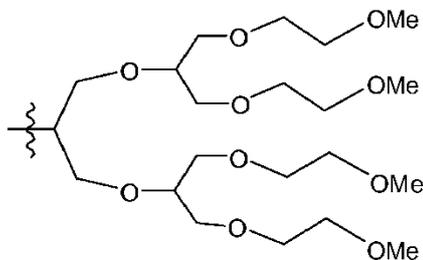


- 5 donde R_4 , R_5 , R_6 y R_7 son independientemente en cada aparición un grupo metilo o un grupo $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$, donde n es un número entero de 1 a 5. En una variante de acuerdo con esta realización, R_4 - R_7 puede representar grupos metilo, tal que G es un grupo:



en una o ambas apariciones.

- 10 En una realización de acuerdo con la fórmula (I), G es un grupo:



en una o ambas apariciones.

En los ésteres de acridinio de acuerdo con la fórmula (I), R_{12} puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en:

- 15 (1) -OH;
 (2) -O-N-succinimidilo;
 (3) -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo;
 (4) -NH-(CH₂)₅-COOH;
 (5) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo en donde $n=1$ a 5;
- 20 (6) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-COOH, en donde $n=1$ a 5;
 (7) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂, en donde $n=1$ a 5; y
 (8) -NH-R-NHR, en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

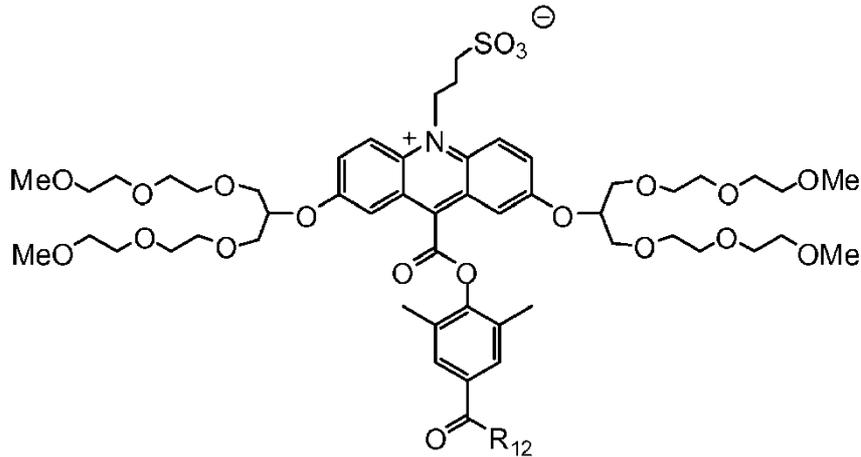
En varias realizaciones ilustrativas, R₁₂ será -OH, o R₁₂ será un grupo:

-NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂, en donde n=1 a 5,

o R₁₂ será un grupo:

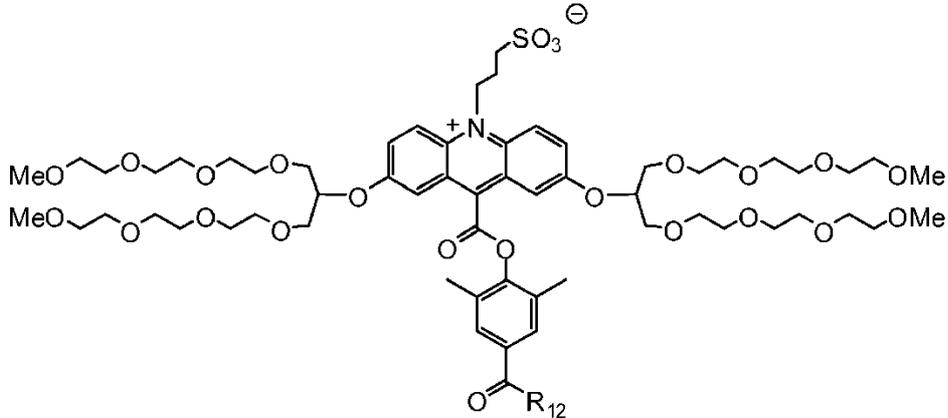
-NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-R", donde n=1 a 5; y donde R" es hidrógeno o -N-succinimidilo.

5 Un éster de acridinio de acuerdo con la fórmula (I) tiene la siguiente estructura:



donde R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo para conjugar el compuesto de acridinio con un analito, un análogo de analito o una molécula de unión para un analito.

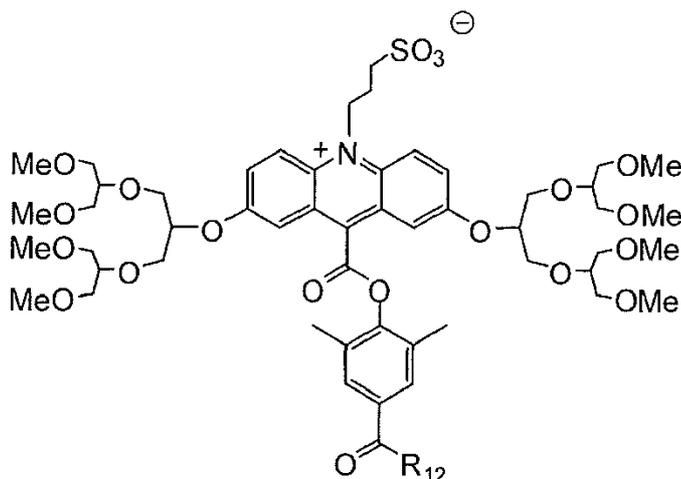
Aun otro éster de acridinio de acuerdo con la fórmula (I) tiene la siguiente estructura:



10

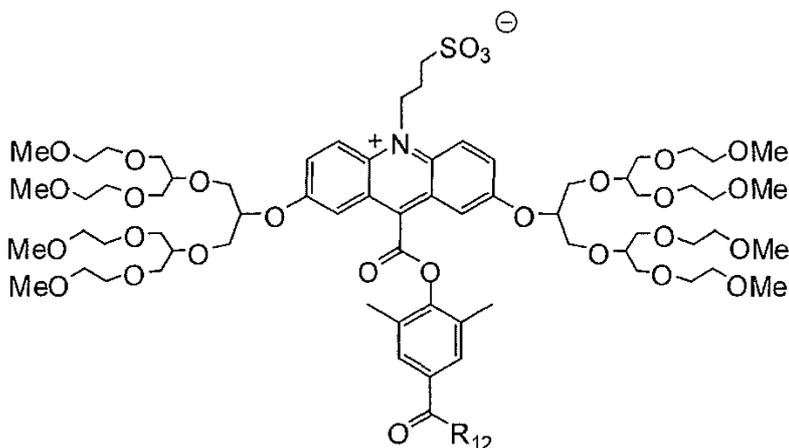
donde R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo para conjugar el compuesto de acridinio con un analito, un análogo de analito o una molécula de unión para un analito.

Otro éster de acridinio de acuerdo con la fórmula (I) tiene la siguiente estructura:



donde R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo para conjugar el compuesto de acridinio con un analito, un análogo de analito o una molécula de unión para un analito.

Todavía otro éster de acridinio de acuerdo con la fórmula (I) tiene la siguiente estructura:



5

donde R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo para conjugar el compuesto de acridinio con un analito, un análogo de analito o una molécula de unión para un analito.

En una realización ejemplar de los ésteres de acridinio de acuerdo con la fórmula (I), R₁₂ representa -OH.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende los pasos de acuerdo con la reivindicación 11. El ensayo comprende: (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito y (ii) un éster de acridinio hidrófilo, de alto rendimiento cuántico y rápido de emisión de luz de acuerdo con la reivindicación 1; (b) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para el analito; (c) mezclar el conjugado, la fase sólida y una muestra de la que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado en el soporte sólido; (e) activar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) agregando reactivos que activen la quimioluminiscencia; (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

20 En un aspecto relacionado, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de: (a) proporcionar un conjugado de un analito con un éster de acridinio hidrófilo, de alto rendimiento cuántico y rápido de emisión de luz según la fórmula (I); (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 de la que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión; (d) separar el complejo de unión capturado en el soporte sólido; (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) agregar reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia; (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

25

Estos y otros aspectos de la invención pueden entenderse más claramente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y las reivindicaciones adjuntas.

5. Breve descripción de los dibujos.

5 La Figura 1 ilustra estructuras de B-AEs con grupos funcionales electrófilos de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) adecuados para preparar conjugados de proteínas u otras moléculas que contienen grupos funcionales nucleófilos.

La Figura 2 ilustra estructuras B-AE con grupos funcionales nucleofílicos, hexaetilenglicol amina (HEG-NH₂) útiles para conjugar el compuesto de acridinio con moléculas que contienen grupos funcionales electrofílicos.

La Figura 3 muestra las estructuras de los conjugados de estradiol (abreviados como B-AE-E2) preparados utilizando los B-AE de la Figura 2.

10 6. Descripción de las realizaciones preferidas

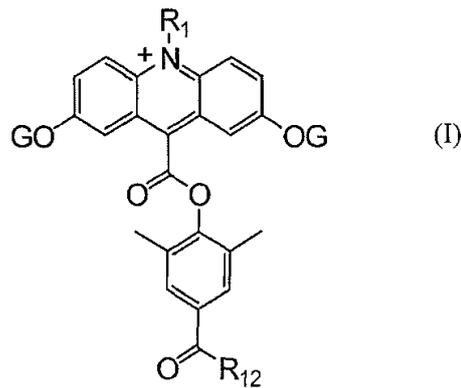
15 La introducción de grupos funcionales donadores de electrones tales como OR* en C2 y/o C7 del anillo de acridinio aumenta el rendimiento cuántico del correspondiente compuesto de acridinio quimioluminiscente. Cuando el grupo R* es hidrófilo, tal como un grupo sulfopropilo o metoxi poli(etilen)glicol, el compuesto de acridinio correspondiente no solo presenta un incremento de salida de luz, sino que también muestra una unión no específica reducida en inmunoensayos. Estas dos propiedades en conjunto conducen a un aumento en la sensibilidad de los inmunoensayos.

Los objetivos principales de la presente invención fueron identificar las características estructurales de los compuestos de acridinio que dan como resultado (a) una emisión de luz más rápida en comparación con NSP-DMAE y derivados, así como HQYAE; (b) estabilidad mejorada especialmente en comparación con HQYAE; (c) alta salida de luz que es comparable a HQYAE y (d) baja unión no específica que es comparable a HQYAE.

20 Los compuestos de acridinio hidrófilos de acuerdo con la presente invención, abreviados como B-AEs (ésteres de acridinio ramificado), no solo muestran un aumento de la salida de luz, sino que también muestran una estabilidad mejorada y una emisión de luz más rápida. Por estabilidad se hace referencia a la actividad quimioluminiscente de los compuestos de acridinio. Un aumento en la estabilidad se manifiesta, así como un aumento de la retención de la actividad quimioluminiscente en función del tiempo. El aumento de la estabilidad de los compuestos de acridinio es
25 útil porque los reactivos derivados de dichos compuestos tienen menos probabilidades de mostrar un deterioro del rendimiento del ensayo en función del tiempo y, además, es probable que la vida útil de los reagentes derivados de dichos compuestos se prolongue, lo que lleva a menos residuos. Típicamente, los reactivos de ensayo derivados de compuestos de acridinio incluyen conjugados de proteínas o moléculas pequeñas. La segunda propiedad de los compuestos de acridinio es una emisión de luz más rápida, lo que significa que estos compuestos emiten su luz total
30 en un período de tiempo significativamente más corto en comparación con los compuestos de acridinio que carecen de las características estructurales únicas de los compuestos de acridinio de la presente invención. La emisión de luz más rápida permite mediciones más rápidas en ensayos y tiene el potencial de aumentar el rendimiento de los analizadores automáticos. El rendimiento de los analizadores automáticos se define normalmente como el número de pruebas que puede realizar el analizador en un período de tiempo determinado. La tercera y cuarta propiedades de
35 los compuestos de acridinio de la presente invención son su salida de luz incrementada y su baja unión no específica, ambas extremadamente útiles para mejorar la sensibilidad del ensayo.

Se ha descubierto inesperadamente que la colocación de grupos funcionales ramificados derivados de glicerol, del tipo -OG, donde G es un grupo funcional ramificado, en C2 y/o C7 del anillo de acridinio aumenta significativamente
40 la estabilidad del correspondiente compuesto de acridinio y conduce a una emisión de luz más rápida. Al mismo tiempo, la presencia de estos grupos funcionales ramificados aumenta el rendimiento cuántico y disminuye la unión no específica de los correspondientes compuestos de acridinio y sus conjugados. La unión no específica en ensayos que utilizan fases sólidas tales como partículas o placas de microtitulación son interacciones de unión no deseadas de conjugados a estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas típicamente aumentan el fondo del ensayo, lo que lleva a una reducción neta de la relación señal a fondo en el ensayo y, por lo tanto, disminuye la
45 sensibilidad del ensayo.

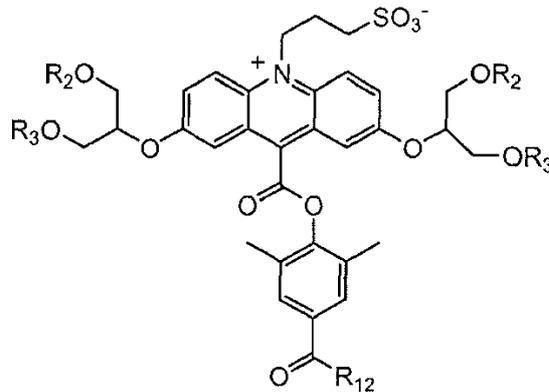
Los compuestos de acridinio de la presente invención pueden representarse por la fórmula general (I):



donde R₁ es como se reivindica en la reivindicación 1, un grupo metilo o sulfopropilo (-CH₂CH₂CH₂SO₃⁻); G se define en la reivindicación 1;

y donde R₁₂ es un grupo electrófilo o nucleófilo como se reivindica en la reivindicación 1.

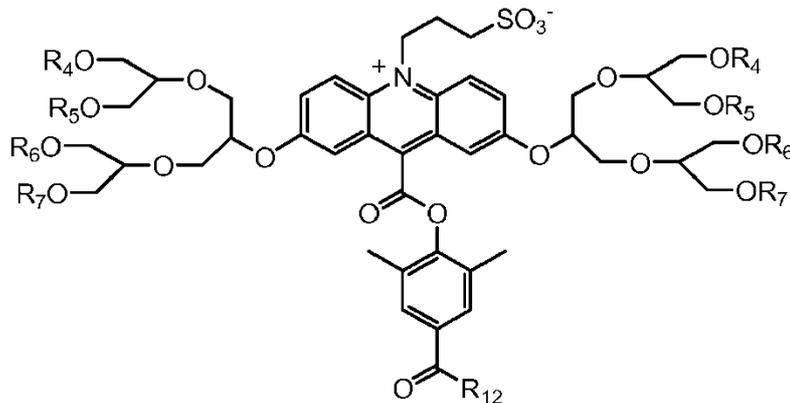
- 5 Más específicamente, los compuestos de acridinio de la presente invención se pueden representar mediante la siguiente fórmula:



donde R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son grupos -(CH₂CH₂O)_nMe, donde n = 2-3; y donde R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 (1) -O-N-succinimidilo;
 (2) -NH-(CH₂)₅-C(=O)-O-N-succinimidilo; y
 (3) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(=O)-(CH₂)₃-C(=O)-O-N-succinimidilo, en donde n = 1 a 5; y
 (4) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂ donde n = 1-5.

Los compuestos de acridinio de la presente invención también pueden representarse por la siguiente fórmula:



donde R₄, R₅, R₆ y R₇ son iguales o diferentes y son metilo o -(CH₂CH₂O)_nMe, donde n = 1-3; y donde R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en:

(1) -O-N-succinimidilo (NHS);

(2) -NH-(CH₂)₅-C(=O)-O-N-succinimidilo; y

5 (3) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(=O)-(CH₂)₃-C(=O)-O-N-succinimidilo, en donde n = 1 a 5; y

(4) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂ donde n = 1-5.

Los ejemplos representativos de las estructuras generales anteriores se sintetizaron como estructuras discretas utilizando técnicas tradicionales de química orgánica. Las estructuras de estos compuestos junto con su nomenclatura abreviada se ilustran en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 ilustra estructuras de B-AE con grupos funcionales de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) electrófilos, mientras que la Figura 2 ilustra estructuras B-AE con nucleofílico, hexaetilenglicol amina (HEG-NH₂) grupos funcionales. Los primeros compuestos son adecuados para preparar conjugados de proteínas u otras moléculas que contienen grupos funcionales nucleófilos. Los últimos compuestos también son útiles para conjugar el compuesto de acridinio con moléculas que contienen grupos funcionales electrofílicos. La Figura 3 muestra las estructuras de los conjugados de estradiol (abreviados como B-AE-E2) preparados utilizando los AE-B de la Figura 2. El estradiol es una hormona esteroidea que se mide comúnmente por inmunoensayo.

Los B-AE de la Figura 1, así como NSP-DMAE, NSP-DMAE-HEG-glutarato-NHS (abreviado como HEG-AE) y el alto rendimiento cuántico del éster de acridinio NSP-2,7-(OMHEG)2-DMAE-AC-NHS (abreviado como HQYAE) se usó para preparar conjugados de un anticuerpo monoclonal anti-TSH murino (TSH = hormona estimulante de la tiroides) como se describe en el Ejemplo 9. La emisión de luz de cada conjugado se activó mediante la adición de dos reactivos. El primer reactivo comprendía peróxido de hidrógeno al 0.5% en ácido nítrico 100 mM, mientras que el segundo reactivo contenía un surfactante en hidróxido de sodio 0.25 N. La luz se midió utilizando un luminómetro equipado con un tubo fotomultiplicador como detector. La cantidad de luz emitida por cada conjugado de compuesto de acridinio fue reportada como Unidades Relativas de Luz (RLUs) por el luminómetro. La cantidad total de luz emitida (100% RLU) se midió para los diversos conjugados y la emisión de luz en tiempos de medición más cortos, se representan como fracciones de este número y también se expresan como porcentajes en la Tabla 1. Otros detalles relacionados con estas mediciones se pueden encontrar en la sección de ejemplos.

Tabla 1. % de RLU en función del tiempo de medición de conjugados de anticuerpo de acridinio-anti-TSH.

Entrada	Conjugado	0.5s	1.0s	2.0s	5.0s
1	HEG-AE	32	65	87	97
2	HQYAE	31	61	82	95
3	B1-AE	59	91	96	97
4	B2-AE	62	91	96	98
5	B3-AE	57	89	96	97
6	B04-AE	90	99	99	99
7	B4-AE	68	95	98	99

30 De la Tabla 1, mientras que HEG-AE y HQYAE emiten solo el 65% y el 61% de su luz total en un segundo, todos los conjugados B-AE muestran una emisión de luz mucho más rápida con $\geq 89\%$ de la luz emitida en un segundo. Las características estructurales únicas en los B-AE aceleran la emisión de luz de estos compuestos cuando se conjugan con una proteína.

35 De manera similar, la cinética de la emisión de luz de los conjugados B-AE-E2 ilustrados en la Figura 3 se comparó con la emisión de luz de los conjugados E2 de NSP-DMAE-E2 y HQYAE-E2. Los dos últimos compuestos incorporaron los mismos enlazadores HEG. Los resultados de estas mediciones se tabulan en la Tabla 2.

Tabla 2. % RLU en función del tiempo de medición de los conjugados E2

Entrada	Conjugado	0.5s	1.0s	2.0s	5.0s
1	NSP-DMAE	8	23	45	80
2	HQYAE	35	72	91	98
3	B1-AE	33	71	93	98
4	B2-AE	33	70	92	97
5	B4-AE	39	77	95	99

Para los conjugados de estradiol, todos los B-AE nuevamente muestran una emisión de luz más rápida en comparación con el conjugado NSP-DMAE-HEG-E2.

- 5 Además de mostrar la emisión de luz rápida, los ésteres de acridinio de la presente invención también muestran una buena estabilidad. Por "estabilidad" se entiende una pérdida mínima de actividad quimioluminiscente, medida por la pérdida de RLU cuando los compuestos o conjugados se almacenan en una solución acuosa, típicamente, en el rango de pH de 7-8, que está dentro del pH fisiológico. Desde un punto de vista mecánico, la hidrólisis del éster fenólico es la vía principal por la cual los ésteres de acridinio quimioluminiscentes se convierten en no quimioluminiscentes. Los
- 10 conjugados estables aseguran una larga vida útil para los reactivos de éster de acridinio y también aseguran que el rendimiento del ensayo no varíe mucho en un período de tiempo determinado. La estabilidad de varios conjugados de éster de acridinio de la presente invención se enumeran en las Tablas 3 y 4. Las soluciones acuosas de los conjugados se almacenaron a 37°C en un regulador acuoso a pH 7.7 y las RLU se registraron periódicamente usando un luminómetro. A las RLU que se midieron en el punto de tiempo inicial, también conocido como día 0, se les asignó un valor del 100%. Las RLU que se midieron en otros puntos de tiempo, se expresan como porcentajes de este número. Otros detalles relacionados con estas mediciones se pueden encontrar en la sección de ejemplos.
- 15

Tabla 3. Estabilidad de los conjugados de anticuerpos anti-TSH expresados como % de RLU

Tiempo (días)	HEG-AE	HQYAE	B1-AE	B2-AE	B3-AE	B4-AE
0	100	100	100	100	100	100
7	94	86	97	91	92	96
16	89	77	91	85	87	93
23	82	68	84	78	81	85
33	82	68	87	79	83	86

Tabla 4. Estabilidad de los conjugados E2 expresados como % de RLU

Tiempo (días)	HEG-AE	HQYAE	B1-AE	B2-AE	B4-AE
0	100	100	100	100	100
1	99	98	97	98	98
5	95	89	94	94	96

Tiempo (días)	HEG-AE	HQYAE	B1-AE	B2-AE	B4-AE
8	97	87	92	93	96
12	94	76	89	88	92
20	92	73	84	85	88
27	89	66	77	81	84
33	84	60	75	77	82

5 Como es evidente en las Tablas 3 y 4, los conjugados B-AE retienen una mayor proporción de su actividad quimioluminiscente y son más estables en comparación con el conjugado HQYAE. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpos anti-TSH de HQYAE retiene el 68% de su actividad quimioluminiscente después de 33 días a 37°C, los conjugados de B-AE retienen $\geq 79\%$ de su actividad quimioluminiscente en el mismo período de tiempo. Se observa una tendencia similar para los conjugados de estradiol (E2) donde los conjugados B-AE retienen $\geq 75\%$ de su actividad quimioluminiscente después de 33 días a 37°C, mientras que la actividad quimioluminiscente del conjugado HQYAE ha disminuido a 60% en el mismo período.

10 Además de mostrar la emisión de luz rápida, los B-AE de la presente invención también muestran una salida de luz incrementada que es comparable a o mejor que HQYAE. La Tabla 5 resume los rendimientos cuánticos relativos de los diversos B-AE cuando se conjugan con el anticuerpo monoclonal anti-TSH. En esta tabla, al rendimiento cuántico de HEG-AE se le asignó un valor de unidad (1) y los rendimientos cuánticos de todos los demás conjugados son relativos a este conjugado de este compuesto.

Tabla 5. Rendimientos cuánticos relativos de conjugados AE de anticuerpo anti-TSH

Entrada	Conjugado	Rendimiento cuántico relativo
1	HEG-AE	1.0
2	HQYAE	2.2
3	B1-AE	4.7
4	B2-AE	2.7
5	B3-AE	1.9
6	B04-AE	1.5
7	B4-AE	2.0

15 Como se puede observar en la Tabla 5, todos los conjugados B-AE muestran una salida de luz mayor (más alto rendimiento cuántico) que el conjugado HEG-AE y son ya sea comparables o mayores que la salida de luz del conjugado HQYAE.

20 Finalmente, las B-AE de la presente invención también muestran una baja unión no específica a fases sólidas (Tabla 6). La unión no específica, como se describió anteriormente, en ensayos que utilizan fases sólidas tales como partículas o placas de microtitulación son interacciones de unión no deseadas de conjugados a estas fases sólidas. Estas interacciones de unión no deseadas aumentan típicamente la señal de fondo del ensayo, lo que lleva a una reducción neta de la relación de señal a señal de fondo en el ensayo y, por lo tanto, disminuye la sensibilidad del ensayo. Para los diversos conjugados de acridinio del anticuerpo anti-TSH enumerados en la Tabla 6, se midió la
25 unión no específica en dos tipos diferentes de partículas; partículas paramagnéticas (PMP) y partículas de látex

5 magnético (MLP). Estas dos partículas difieren en su composición intrínseca. Las PMP están hechas principalmente de partículas de óxido de hierro con un recubrimiento de silano que contiene aminas. Las aminas se utilizan para entrecruzar proteínas con la superficie de la partícula utilizando reactivos como el glutaraldehído. Por otro lado, los MLP están hechos de poliestireno. Las MLP utilizadas en la Tabla 6 contenían una capa delgada de magnetita para permitir la separación magnética y un recubrimiento de ácido poliacrílico para conjugar proteínas. Los dos tipos de partículas se mezclaron con soluciones de los conjugados durante un período específico de tiempo y luego las partículas se separaron magnéticamente, se lavaron una vez y luego se midió la quimioluminiscencia asociada con las partículas. (Los detalles experimentales se pueden encontrar en el Ejemplo 11). La relación de este valor de quimioluminiscencia en comparación con la entrada de quimioluminiscencia total se refiere a la fracción no específica de unión (fNSB). Los conjugados con baja unión no específica tendrán valores fNSB bajos. Al examinar la Tabla 6, es evidente que todos los conjugados B-AE tienen una unión no específica más baja que HEG-AE en ambos tipos de partículas. También se encontró que los valores de fNSB de los conjugados B-AE son comparables a los HQYAE hidrófilos descritos previamente.

Tabla 6. Unión fraccionaria no específica (fNSB) de conjugados de anticuerpo anti-TSH-acridinio a partículas.

	Partícula	
	PMP	MLP
Conjugado de éster de acridinio	Enlace no específico fraccionaria (fNSB)	
HEG-AE	4.1E-05	1.2E-05
HQYAE	6.0E-06	7.5E-07
B1-AE	4.5E-06	1.8E-06
B2-AE	5.9E-06	2.8E-06
B3-AE	3.9E-06	1.2E-06
B4-AE	5.8E-06	1.9E-06
B04-AE	5.9E-06	7.1E-06

15 Los compuestos de acridinio de la invención, hidrolíticamente estables, de emisión rápida de luz, de alto rendimiento cuántico, son útiles como marcadores en ensayos para la determinación o cuantificación de analitos. Los analitos que normalmente se miden en dichos ensayos son a menudo sustancias de cierta relevancia clínica y pueden abarcar una amplia gama de moléculas desde macromoléculas grandes como proteínas, ácidos nucleicos, virus, bacterias, etc. hasta moléculas pequeñas como etanol, vitaminas, esteroides y hormonas, fármacos terapéuticos, etc. Un inmunoensayo "en sándwich" generalmente implica la detección de una molécula grande, también conocida como analito macromolecular, que utiliza dos moléculas de unión como los anticuerpos. Un anticuerpo está inmovilizado o unido a una fase sólida tal como una partícula, perla, membrana, placa de microtitulación o cualquier otra superficie sólida. Los métodos para la unión de moléculas de unión tales como anticuerpos a fases sólidas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse covalentemente a una partícula que contiene aminas en su superficie mediante el uso de una molécula de reticulación como el glutaraldehído. La unión también puede ser no covalente y puede implicar una simple adsorción de la molécula de unión a la superficie de la fase sólida, como las perlas de poliestireno y la placa de microtitulación. El segundo anticuerpo a menudo se une covalentemente con una molécula quimioluminiscente o fluorescente, a menudo denominada marcación. La marcación de moléculas de unión tales como anticuerpos y otras proteínas de unión también son bien conocidos en la técnica y comúnmente se denominan reacciones de conjugación y el anticuerpo marcado a menudo se denomina conjugado. Típicamente, una unidad estructural amino reactiva con marcación reacciona con una amina en el anticuerpo para formar un enlace amida. También se conocen otros enlaces, tales como tioéter, éster, carbamato y similares, entre el anticuerpo y la marcación. En el ensayo, los dos anticuerpos se unen a diferentes regiones del analito macromolecular. El analito macromolecular puede ser, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, células, virus, receptores o polímeros sintéticos. Las moléculas de unión pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas de unión o polímeros de unión sintéticos. Por

ejemplo, la proteína de unión a folato ("FBP") se une al folato analito. También han descrito moléculas de unión sintética que pueden unirse a una variedad de analitos Mossbach et al. *Biotechnology* vol. 14, pp. 163-170 (1995).

5 Cuando la fase sólida con el anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo marcado se mezcla con una muestra que contiene el analito, se forma un complejo de unión entre el analito y los dos anticuerpos. Este tipo de ensayo a menudo se denomina ensayo heterogéneo debido a la participación de una fase sólida. La señal quimioluminiscente o fluorescente asociada con el complejo de unión puede ser medida entonces y se puede inferir la presencia o ausencia del analito. Normalmente, el complejo de unión se separa del resto de los componentes de la reacción de unión tales como un, anticuerpo en exceso marcado antes de la generación de la señal. Por ejemplo, si el complejo de unión está asociado con una perla magnética, se puede usar un imán para separar el complejo de unión asociado con la perla de la solución a granel. Al usar una serie de "estándares", es decir, concentraciones conocidas del analito, se puede generar una curva de "dosis-respuesta" utilizando los dos anticuerpos. Por lo tanto, la curva de dosis-respuesta correlaciona una cierta cantidad de señal medida con una concentración específica de analito. En un ensayo en 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 comparando la señal generada por una muestra desconocida que contiene el analito macromolecular, con la curva de dosis-respuesta.

En una vena similar, los dos componentes de unión también pueden ser ácidos nucleicos que se unen o hibridan con diferentes regiones de un analito de ácido nucleico. La concentración del analito de ácido nucleico puede entonces deducirse de una manera similar.

20 Otra clase de inmunoensayos para analitos de moléculas pequeñas, como los esteroides, las vitaminas, las hormonas, los fármacos terapéuticos o los péptidos pequeños, emplea un formato de ensayo que se conoce comúnmente como un ensayo competitivo. Típicamente, en un ensayo competitivo, se hace un conjugado del analito de interés y un marcador quimioluminiscente o fluorescente mediante la 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 con el marcador. El analito con la estructura alterada se llama un análogo. A menudo es necesario usar un análogo estructural del analito para permitir la química para unir la marcación con el analito. A veces, se usa un análogo estructural de un analito para atenuar o mejorar su unión a una molécula de unión, como un anticuerpo. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica. El anticuerpo o una proteína de unión al analito de interés a menudo se inmoviliza en una fase sólida ya sea directamente o a través de una interacción de unión secundaria tal como el sistema biotina-avidina.

30 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 marcado con el analito compitan por una cantidad limitada de molécula de unión inmovilizada en fase sólida. A medida que aumenta la concentración de analito en una muestra, la cantidad de conjugado de marcación de analito capturada por la molécula de unión en la fase sólida disminuye. Al emplear una serie de "estándares", es decir, concentraciones conocidas del analito, se puede construir una curva de dosis-respuesta donde la señal del conjugado marcado con el analito capturada por la molécula de unión en la fase sólida se correlaciona inversamente con la concentración de analito. Una vez que se ha diseñado una curva de dosis-respuesta de esta manera, la concentración del mismo analito en una muestra desconocida se puede deducir comparando la señal obtenida de la muestra desconocida con la señal en la curva de dosis-respuesta.

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

De acuerdo con lo anterior, un ensayo para la detección o cuantificación de un analito comprende, de acuerdo con una realización de la invención, los siguientes pasos:

50 (a) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) cualquiera de los ésteres de acridinio hidrófilos, de alto rendimiento cuántico y de rápida emisión de luz de acuerdo con 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 de la que se sospecha que contener el analito para formar un complejo de unión;

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

(e) activando la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) agregando reactivos que activan la quimioluminiscencia;

- (f) medir la cantidad de emisión de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 5 En otra realización, se proporciona un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un conjugado de un analito con cualquiera de los ésteres de acridinio hidrófilos, de alto rendimiento cuántico y de emisión de luz rápida 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 de la que se sospecha que contiene el analito para formar un complejo de unión;
- (d) separar el complejo de unión capturado en el soporte sólido;
- (e) desencadenar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) agregando reactivos desencadenantes de quimioluminiscencia;
- 15 (f) medir la cantidad de luz con un luminómetro; y
- (g) detectar la presencia o calcular la concentración del analito comparando la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.

Los analitos macromoleculares pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, células, virus, polímeros sintéticos y similares. Los analitos de moléculas pequeñas pueden ser esteroides, vitaminas, hormonas, fármacos terapéuticos, péptidos pequeños y similares. Las moléculas de unión en los ensayos pueden ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de unión, un ácido nucleico, un péptido, un receptor o una molécula de unión sintética.

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la presente invención)

25 Síntesis del éster B1-AE-NHS, 1i

a) 1,3-bis(metoxietoxi)-2-propil toluenosulfonato, 1b. El compuesto 1a, 1,3-bis (metoxietoxi)-2-propanol se sintetizó como se describe por Cormier and Gregg en Chem. Mater. 1998, 10, 1309-1319. Una solución de 1a (2 g, 9.6 mmol) en piridina anhidra (10 mL) se trató con 4-dimetilaminopiridina (0.234 g, 1.92 mmol) seguida de cloruro de p-toluenosulfonilo (3.67 g, 19.25 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 días. El disolvente se eliminó luego a presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y HCl al 10% (100 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto crudo (4.05 g) se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando 1:1 de acetato de etilo/hexanos como eluyente. El producto se recuperó como un aceite amarillo claro. Rendimiento = 2.42 g (70%).

35 b) Compuesto 1d. Una mezcla de 2,7-dihidroxi acridina metil éster, 1c (0.2 g, 0.48 mmol), (Patente de los Estados Unidos No. 7,309,615), compuesto 1b (0.868g, 2.39 mmol) y carbonato de cesio (0.39g, 1.2 mmol) en DMF anhidro (10 mL) se calentó a 100°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4-5 horas. Luego se analizó una pequeña porción de la mezcla de reacción mediante HPLC 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 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 25 minutos y fue el componente principal. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (50 mL) y agua (50 mL). La capa de acetato de etilo se separó, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto crudo (0.48 g) se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 0.134 g (34%); MALDI-TOF MS 40 797.8 observado.

c) Compuesto 1f. Una mezcla de compuesto 1d (60 mg, 75.3 umoles), 1,3-propanosultona destilada (1 g, 8.2 mmol) y bicarbonato de sodio (65 mg, 0.77 mmol) se calentó a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. Se retiró una parte de la mezcla de reacción, se diluyó con metanol y se analizó por HPLC como se describe en la sección (b). Se observó el éster de acridinio 1e que eluye a Rt = 19 minutos. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se 50 añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexanos 1:1. La mezcla se sometió a sonicación brevemente para dispersar el sólido gomoso y luego se decantó el disolvente. El producto crudo se secó a presión reducida. Este producto crudo se suspendió en HCl 1 N (10 mL) y se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción bruta mostró una hidrólisis completa de la mezcla de reacción con el producto que eluye a Rt = 16 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ 30 x 300 mm y el

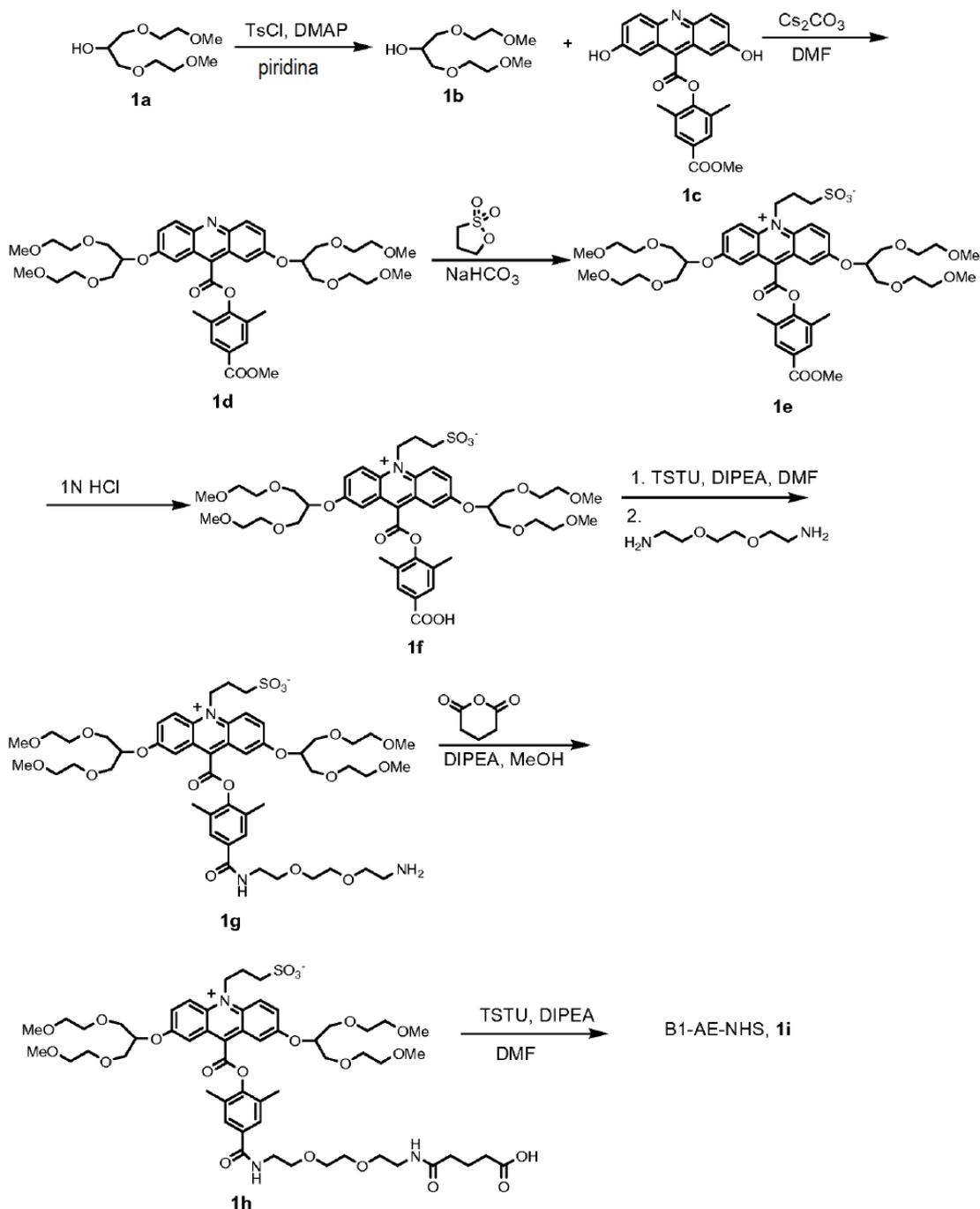
mismo gradiente descrito en la sección (b) a una velocidad de flujo de solvente de 20 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron y se concentraron a presión reducida. Rendimiento = 55 mg (81%); MALDI-TOF MS 904.7 observado.

5 d) Compuesto 1g. Una solución del compuesto 1f (53 mg, 58.2 umoles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (15.2 uL, 87.3 umoles) y TSTU (20 mg, 64 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción como se describe en la sección (b) indicó una conversión completa al éster NHS que eluye a R_t = 18 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (86 uL, 0.582 mmol) en DMF anhidro (1.0 mL). Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción, como se describe en la sección (b), mostró una conversión completa al producto 1g que eluye a R_t = 13.6 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Rendimiento = 50 mg (83%); MALDI-TOF MS 1035.6 observado.

15 e) B1-AE-NHS, compuesto 1i. Una solución de compuesto 1g (47.5 mg, 46 umoles) en metanol anhidro (3 mL) se trató con diisopropiletilamina (40 uL, 0.23 mmol) y anhídrido glutárico (26 mg, 0.23 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (b), mostró una conversión completa al derivado de glutarato 1 h que eluye a R_t = 14.8 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con tolueno anhidro (3 mL) y se concentró a presión reducida. El producto crudo se disolvió en DMF anhidro (3 mL) y se trató con diisopropiletilamina (80 uL, 0.46 mmol) y TSTU (138 mg, 0.46 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (b), mostró >80% de conversión al producto 1i que eluye a R_t = 16 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. El producto liofilizado se disolvió en MeCN anhidro y se transfirió a un matraz de fondo redondo tarado y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 32 mg (56%); MALDI-TOF MS 1247.1 observado.

20

Las siguientes reacciones describen la síntesis de B1-AE-NHS, compuesto 1i.



Ejemplo 2

Síntesis del éster B2-AE-NHS, 2h

- 5 a). 1,3-bis(3,6-dioxahexanil)glicerol-2-toluenosulfonato, 2b. El compuesto 1,3-bis(3,6-dioxahexanil)glicerol, 2a, se sintetizó como describe Vacus y Simon en *Adv. Mater.* 1995, 7, 797-800. El crudo 2a (16 g, 0.054 mol) se disolvió en piridina anhidra (50 mL) y se trató con 4-dimetilaminopiridina (1.32 g, 0.011 mol) seguido de cloruro de p-toluenosulfonilo (12.4 g, 0.065 mol). La reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El disolvente se eliminó luego a presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (100 mL) y HCl 2N (100 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio seguida de salmuera. Luego se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. El producto crudo (14 g) se
- 10

purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando 1:4, hexanos/acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 6.3 g, aceite amarillo claro. MALDI-TOF MS 473.4 observado, (M+Na⁺).

5 b) Compuesto 2c. Una mezcla de 1c (0.2 g, 0.48 mmol), 2b (1.08 g, 2.4 mmol) y carbonato de cesio (0.39 g, 0.12 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se calentó en un baño de aceite a 100°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 5 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y agua (75 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar 0.974 g de producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea en gel de sílica usando metanol al 3% en acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 99.4 mg (21%); MALDI-TOF MS 974.4 observado.

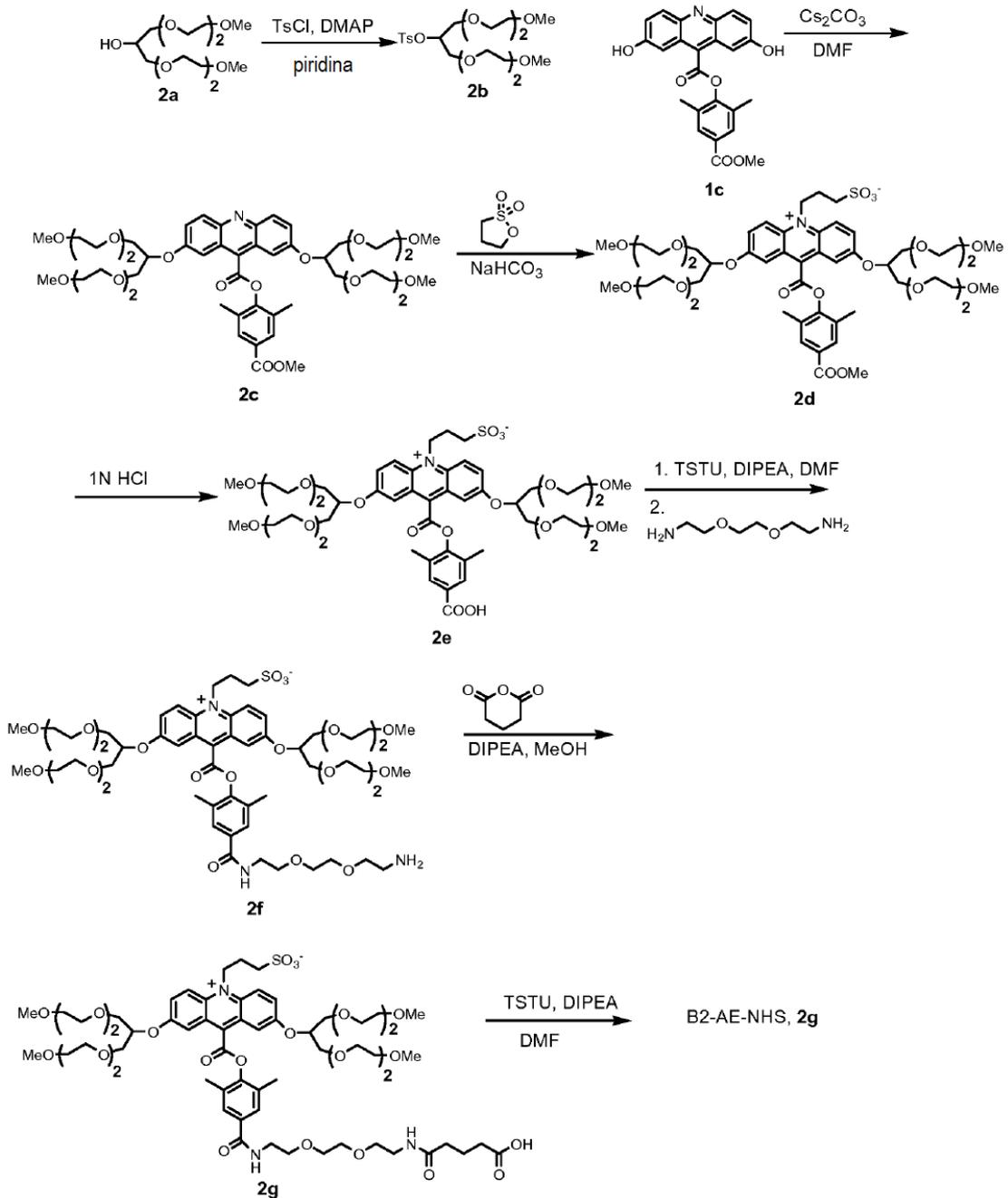
10 c) Compuesto 2e. Una mezcla de compuesto 2c (58 mg, 60 μ moles), 1,3-propanosulfona destilada (0.75 g, 6.15 mmol) y bicarbonato de sodio (50 mg, 0.59 mmol) se calentó a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 1 hora, se retiró una pequeña porción, se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B \rightarrow 100% (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 18.5 minutos (>80% de conversión, comenzando a imitar el material Rt = 23.5 minutos). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexanos 1:1. Después de una breve sonicación para dispersar el producto gomoso, el disolvente se decantó y el producto 2d se secó al vacío.

15 El éster de acridinio crudo 2d se suspendió en HCl 1 N (10 mL) y se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis por HPLC, como se describe anteriormente, indicó la conversión completa al producto 2e que eluye a los 16 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito anteriormente con una tasa de flujo 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 = 42 mg (65%); MALDI-TOF MS 1083.3 observado.

20 d) Compuesto 2f. Una solución del compuesto 2e (42 mg, 39 μ moles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (10 μ L, 59 μ moles) y TSTU (14 mg, 46.5 μ moles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 17.7 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (58 μ L, 0.39 mmol) en DMF anhidro (1.0 mL). Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción, como se describe en la sección (b), mostró una conversión completa al producto 2f que eluye a Rt = 13.6 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Rendimiento = 37 mg (79%); MALDI-TOF MS 1217.9 observado.

25 e) B2-AE-NHS, compuesto 2h. Una solución del compuesto 2f (37 mg, 30 μ moles) en metanol anhidro (3 mL) se trató con diisopropiletilamina (26 μ L, 0.15 mmol) y anhídrido glutárico (17 mg, 0.15 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al derivado de glutarato 2g que eluye a Rt = 15 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con tolueno anhidro (3 mL) y se concentró a presión reducida. El producto crudo se disolvió en DMF anhidro (2 mL) y se trató con diisopropiletilamina (52 μ L, 0.3 mmol) y TSTU (89 mg, 0.3 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró >80% de conversión al producto durante 2 h que eluye a Rt = 16 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. El producto liofilizado se disolvió en MeCN anhidro y se transfirió a un matraz de fondo redondo tarado y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 39 mg (91%); MALDI-TOF MS 1425.4 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de B2-AE-NHS, 2h.



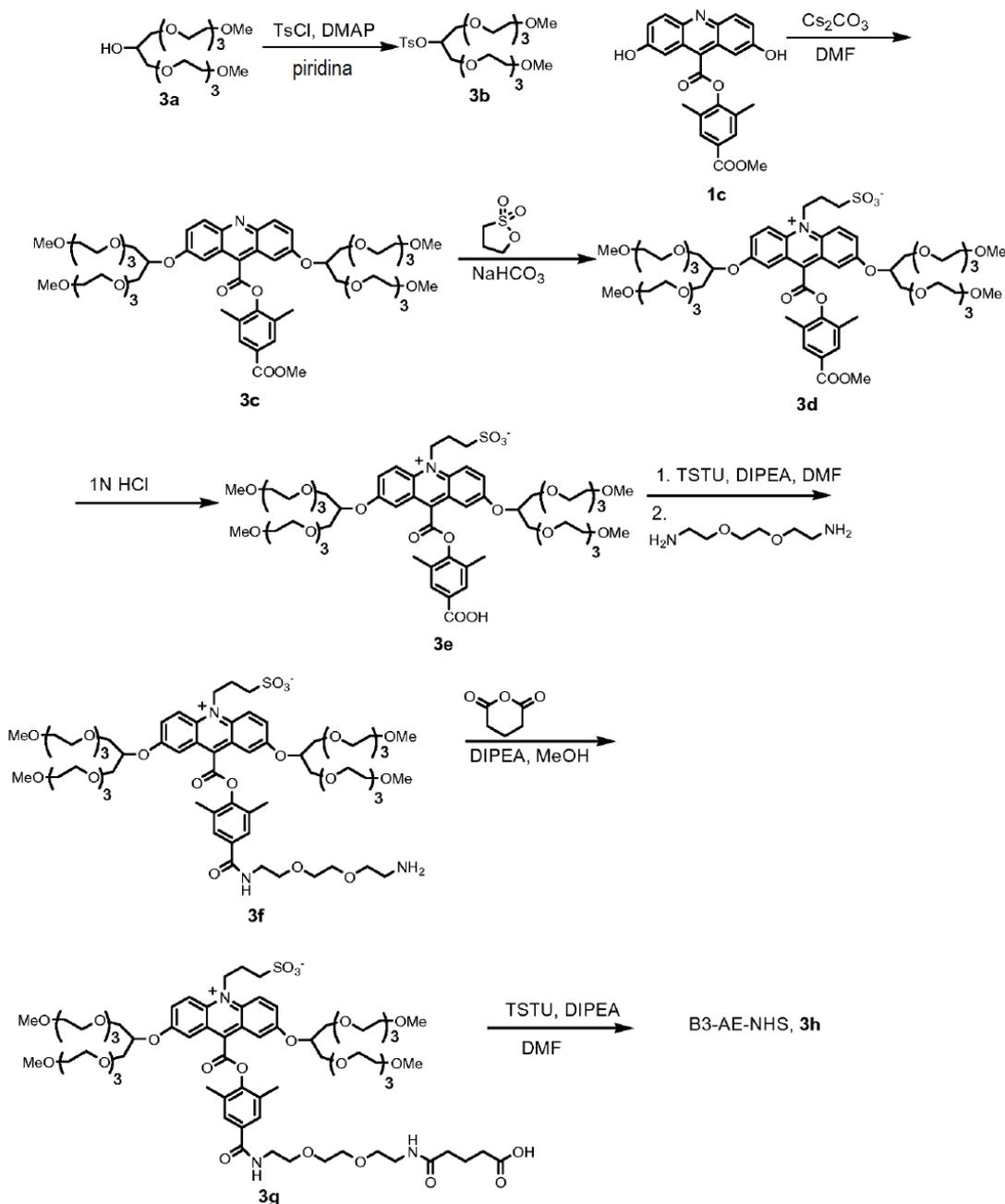
Ejemplo 3

B3-AE-NHS éster 3h

- 5 a) 1,3-bis(3,6,9-dioxadecanil)glicerol-2-toluenosulfonato, 3b. El compuesto 1,3-bis(3,6,9-dioxadecanil)glicerol, 3a, se sintetizó como describe Lauter et al. en *Macromol. Chem. Phys.* 1998, 199, 2129-2140. El alcohol (7 g, 0.0182 mol) se disolvió en piridina anhidra (30 mL) y se trató con 4-dimetilaminopiridina (0.444 g, 3.6 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (3.85 g, 0.02 mol). La reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 días. El disolvente se eliminó luego a presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (100 mL) y HCl al 10% (100 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y salmuera. Luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por
- 10 cromatografía instantánea en gel de sílice usando 5:4.5:0.5, hexanos:acetato de etilo:metanol. Rendimiento = 4.47 g (45%); aceite de color amarillo claro.

- 5 b) Compuesto 3c. Una mezcla de 1c (0.2 g, 0.48 mmol), 3b (1.3 g, 2.4 mmol) y carbonato de cesio (0.35 g, 0.11 mmol) en DMF anhidro (10 mL) se calentó en un baño de aceite a 100°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 6 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y agua (75 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se eliminó luego a presión reducida para proporcionar 1.3 g de producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando metanol al 5% en acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 134 mg (22%); MALDI-TOF MS 1148.9 observado.
- 10 c) Compuesto 3e. Una mezcla de compuesto 3c (45 mg, 39 umoles), 1,3-propanosultona destilada (0.5 g, 4.1 mmol) y bicarbonato de sodio (33 mg, 0.39 mmol) se calentó a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas, se extrajo una pequeña porción, se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B → 100% (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 18.3 minutos (>80% de conversión, comenzando con el material Rt = 22.5 minutos). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexanos 1:1. Después de una breve sonicación para dispersar el producto gomoso, el disolvente se decantó y el producto 3d se secó al vacío.
- 15 El éster 3d de acridinio crudo se suspendió en HCl 1 N (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis por HPLC, como se describe anteriormente, indicó la conversión completa al producto 3e que eluye a los 16.3 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito anteriormente con una tasa de flujo 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 = 28 mg (57%); MALDI-TOF MS 1255.9 observado.
- 20 d) Compuesto 3f. Una solución del compuesto 3e (28 mg, 22.3 umoles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (6.4 uL, 33.5 umoles) y TSTU (8 mg, 26.6 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 17.7 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (32 uL, 0.22 mmol) en DMF anhidro (1.0 mL). Después de una hora, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al producto 3f que eluye a Rt = 14 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Rendimiento = 28 mg (90%); MALDI-TOF MS 1388.6 observado.
- 25 e) B3-AE-NHS, compuesto 3h. Una solución del compuesto 3f (28 mg, 20 umoles) en metanol anhidro (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (17.6 uL, 0.1 mmol) y anhídrido glutárico (11.5 mg, 0.1 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al derivado de glutarato 3g que eluye a Rt = 15.2 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con tolueno anhidro (3 mL) y se concentró a presión reducida. El producto crudo se disolvió en DMF anhidro (2 mL) y se trató con diisopropiletilamina (35 uL, 0.2 mmol) y TSTU (60 mg, 0.2 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró >70% de conversión al producto durante 3h, que eluye a Rt = 16.2 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (c). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. El producto liofilizado se disolvió en MeCN anhidro y se transfirió a un matraz de fondo redondo tarado y se concentró a presión reducida.
- 30 Rendimiento = 17.6 mg (55%); MALDI-TOF MS 1598 observado.
- 35
- 40

Las siguientes reacciones describen la síntesis de B3-AE-NHS, 3h.



Ejemplo 4

B4-AE-NHS éster, 4h

- 5 a) Compuesto 4a. 1,3-bis(metoxietoxi)-2-propanol, 1a, (12 g, 0.058 mol) e hidróxido de potasio (2.43 g, 0.043 mol) se agitaron vigorosamente y se añadió gota a gota epíclorhidrina (1.334 g, 0.0144 mol). La reacción se calentó a 80°C durante 24 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua (50 mL). La solución se extrajo con diclorometano (3×50 mL). Los extractos de diclorometano combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida. El producto crudo (10.85 g) se demandó como tal para la siguiente reacción.
- 10 b) Compuesto 4b. Una solución de 4a (10.5 g en crudo, 0.023 mol) en piridina anhidra (25 mL) se trató con 4-dimetilaminopiridina (0.56 g, 4.6 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (0.046 mol, 8.8 g). La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El disolvente se eliminó luego a presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (100 mL) y HCl 2 N (100 mL). La capa de acetato de etilo se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se

concentró a presión reducida. El producto crudo (16.4 g) se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando acetato de etilo:hexanos 1:1 para eluir el 1,3-bis(metoxietoxi)-2-propil toluenosulfonato, seguido de acetato de etilo para eluir el producto. Rendimiento = 2.82 g (32%); MALDI-TOF MS 648.6 (M+Na⁺).

5 c) Compuesto 4c. Una mezcla de 2,7-dihidroxi acridina metil éster, 1c (0.2 g, 0.48 mmol) compuesto 4b (1.5 g, 2.4 mmol) y carbonato de cesio (0.39 g, 1.2 mmol) en DMF anhidro (10 mL) se calentó a 100°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 4-5 horas. Luego se analizó una pequeña porción de la mezcla de reacción mediante HPLC 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 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 23.5 minutos y fue el componente principal. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (50 mL) y agua (50 mL). La capa de acetato de etilo se separó, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto crudo (1.36 g) se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando metanol al 5% en acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 0.156 g (25%); MALDI-TOF MS 1325 observado.

15 d) Compuesto 4e. Una mezcla de compuesto 4c (60 mg, 45.3 umoles), 1,3-propanosultona destilada (1.0 g, 8.2 mmol) y bicarbonato de sodio (76 mg, 0.9 mmol) se calentó a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas, se extrajo una pequeña porción, se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC usando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B 10 → 100% (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 17.8 minutos (>80% de conversión, comenzando con el material Rt = 23.5 minutos). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexanos 1:1. Después de una breve sonicación para dispersar el producto gomoso, el disolvente se decantó y el producto 4d se secó al vacío.

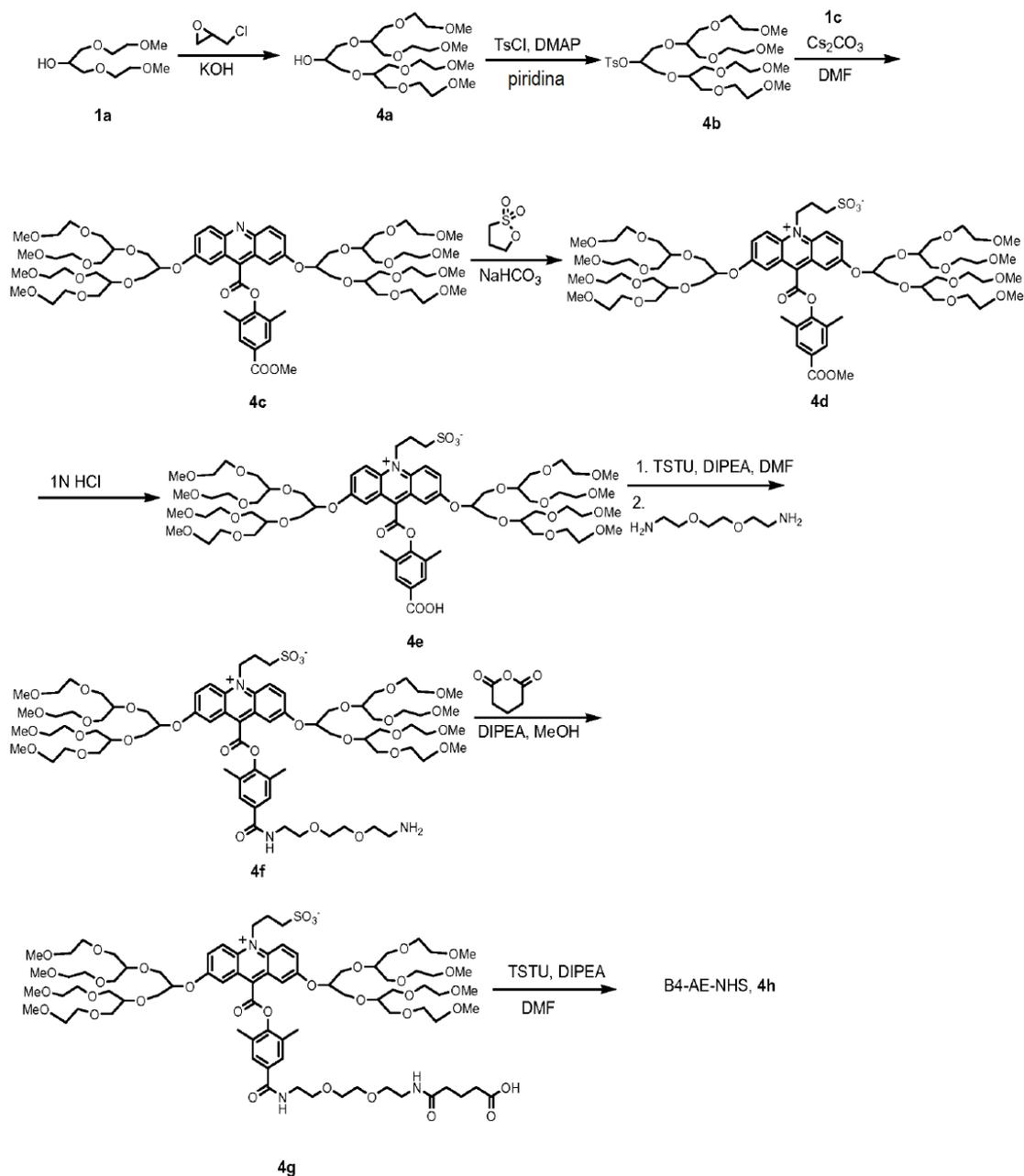
20 El éster de acridinio crudo 4d se suspendió en HCl 1 N (10 mL) y se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis por HPLC, como se describe anteriormente, indicó la conversión completa al producto 4e que eluye a los 17 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito anteriormente con una rata de flujo 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 = 33.5 mg (52%); MALDI-TOF MS 1433.1 observado.

25 e) Compuesto 4f. Una solución del compuesto 4e (33.5 mg, 23.4 umoles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (6.1 uL, 35 umoles) y TSTU (8.5 mg, 28.2 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 18.7 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (35 uL, 0.24 mmol) en DMF anhidra (1.0 mL). Después de una hora, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al producto 4f que eluye a Rt = 14.5 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (d). Rendimiento = 22 mg (59%); MALDI-TOF MS 1565.8 observado.

30 f) B4-AE-NHS, compuesto 4h. Una solución del compuesto 4f (22 mg, 14 umoles) en metanol anhidro (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (12.3 uL, 70 umoles) y anhídrido glutárico (8 mg, 70 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (d), mostró una conversión completa al derivado de glutarato 4g que eluye a Rt = 15.9 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con tolueno anhidro (3 mL) y se concentró a presión reducida.

35 El producto crudo se disolvió en DMF anhidro (2 mL) y se trató con diisopropiletilamina (24.6 uL, 0.14 mmol) y TSTU (42 mg, 0.14 mmol). Después de agitar durante 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró >70% de conversión al producto durante 4h que eluye a Rt = 16.9 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (d). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. El producto liofilizado se disolvió en MeCN anhidro y se transfirió a un matraz de fondo redondo tarado y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 18.8 mg (75%); MALDI-TOF MS 1776.5 observado.

Las siguientes reacciones describen la síntesis de B4-AE-NHS, 4h.



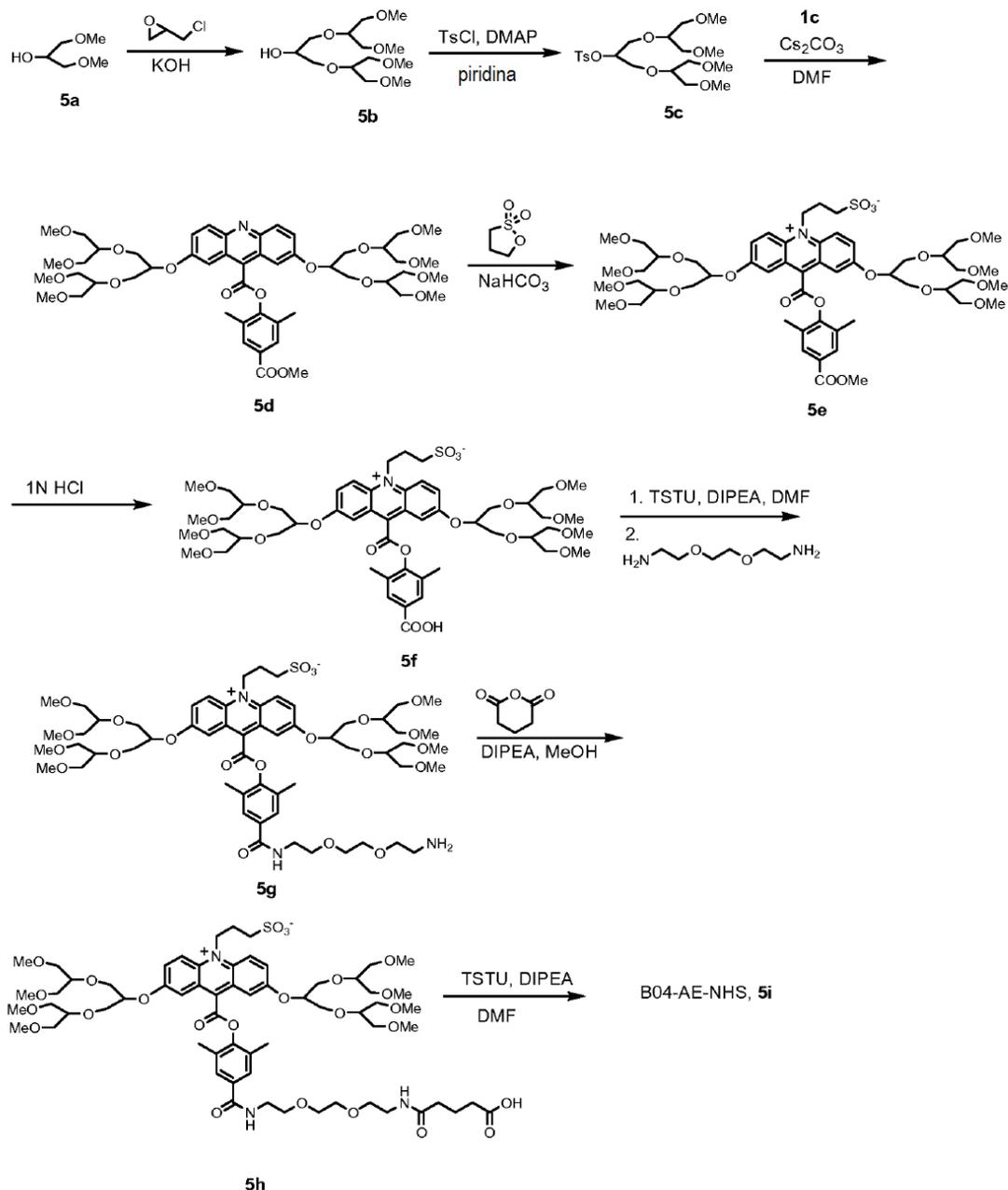
Ejemplo 5

B04-AE-NHS, 5i

- 5 a) Compuesto 5b. El 1,3-dimetoxi-2-propanol, 5a, se sintetizó como describe Kang et al. en Bull. Korean chim. Chem. 2006, 27, 1364-1370. El 1,3-dimetoxi-2-propanol crudo (10.66 g, 0.089 mol) e hidróxido de potasio (3 g, 0.00534 mol) se agitaron a 80°C bajo una atmósfera de nitrógeno hasta que se disolvió todo el hidróxido de potasio. Luego se añadió gota a gota epiclorhidrina (1.65 g, 0.00178 mol) y la reacción se calentó a 100°C en una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y una solución saturada de cloruro de amonio (75 mL). La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa se extrajo una vez más con acetato de etilo (50 mL). Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida. El aceite marrón claro recuperado (3.7 g) se usó como tal en la siguiente reacción.
- 10

- b) Compuesto 5c. El Compuesto 5b (3.7 g, 0.0125 mol) se disolvió en piridina anhidra (15 mL) y se trató con 4-dimetilpiridina (0.381 g, 3.1 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (4.8 g, 0.0025 mol). La reacción se agitó a

- temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 días. El disolvente se eliminó luego a presión reducida y el residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y HCl 1N (50 mL). La capa de acetato de etilo se separó y se lavó con una solución de hidróxido de sodio al 2% (50 mL) y una solución saturada de cloruro de amonio (50 mL). Luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto
- 5 crudo (6.6 g) se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando 75:24:1; hexanos:acetato de etilo:metanol como eluyente. Rendimiento = 1.73 g, aceite amarillo claro.
- c) Compuesto 5d. Una mezcla de 2,7-dihidroxi acridina metil éster, 1c (0.1 g, 0.24 mmol) compuesto 5c (0.54 g, 1.2 mmol) y carbonato de cesio (0.2 g, 0.06 mmol) en DMF anhidro (5 mL) se calentó a 100°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 4-5 horas. Luego se analizó una pequeña porción de la mezcla de reacción mediante HPLC usando una
- 10 columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de 10 → 100% de B (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 26.2 minutos y fue el componente principal. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (75 mL) y agua (50 mL). La capa de acetato de etilo se separó, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión
- 15 reducida. El producto crudo (0.45 g) se purificó por TLC preparativa en gel de sílice usando metanol al 1% en acetato de etilo como eluyente. Rendimiento = 64 g (28%); MALDI-TOF MS 973.8 observado.
- d) Compuesto 5f. Una mezcla de compuesto 5d (64 mg, 65.7 umoles), 1,3-propanosultona destilada (1.6 g, 13.1 mmol) y bicarbonato de sodio (110 mg, 1.3 mmol) se calentó a 150°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas,
- 20 se extrajo una pequeña porción, se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC 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 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y detección UV a 260 nm. Se observó que el producto eluye a Rt = 20.5 minutos (>60% de conversión). La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexanos 1:1. Después de una breve sonicación para dispersar el producto gomoso, el disolvente se decantó y el producto 5e se secó al vacío.
- 25 El éster de acridinio crudo 5e se suspendió en HCl 1 N (10 mL) y se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El análisis por HPLC, como se describe anteriormente, indicó la conversión completa al producto 5f que eluye a los 17.5 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente descrito anteriormente con una rata de flujo 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.
- 30 Rendimiento = 12 mg (17%); MALDI-TOF MS 1082.4 observado.
- e) Compuesto 5g. Una solución del compuesto 5f (12 mg, 11.1 umoles) en DMF anhidra (1 mL) se trató con diisopropiletilamina (4.0 uL, 22 umoles) y TSTU (5 mg, 16.7 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 19.5 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (16 uL, 0.11 mmol) en DMF anhidro (1.0 mL). Después de una hora, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al producto 5g que eluye a Rt = 14.7 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (d). Rendimiento = 15.4 mg (cuantitativo); MALDI-TOF MS 1212.9 observado.
- 35
- f) B04-AE-NHS, compuesto 5i. Una solución de compuesto 5g (15.4 mg, 12.7 umoles) en metanol anhidro (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (11 uL, 63.5 umoles) y anhídrido glutárico (7.2 mg, 63.5 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró una conversión completa al derivado de glutarato 5h que eluye a Rt = 16.2 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con tolueno anhidro (3 mL) y se concentró a presión reducida. El producto crudo se disolvió en DMF anhidro (2 mL) y se trató con diisopropiletilamina (22 uL, 0.126 mmol) y TSTU (38 mg, 0.126 mmol). Después de agitar durante 15 minutos,
- 40 el análisis por HPLC, como se describe en la sección (c), mostró >80% de conversión al producto 5i que eluye a Rt = 17.2 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa como se describe en la sección (d). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. El producto liofilizado se disolvió en MeCN anhidro y se transfirió a un matraz de fondo redondo tarado y se concentró a presión reducida. Rendimiento = 12.3 mg (68%); MALDI-TOF MS 1423.8 observado.
- 45
- 50 Las siguientes reacciones describen la síntesis de B04-AE-NHS, compuesto 5i.

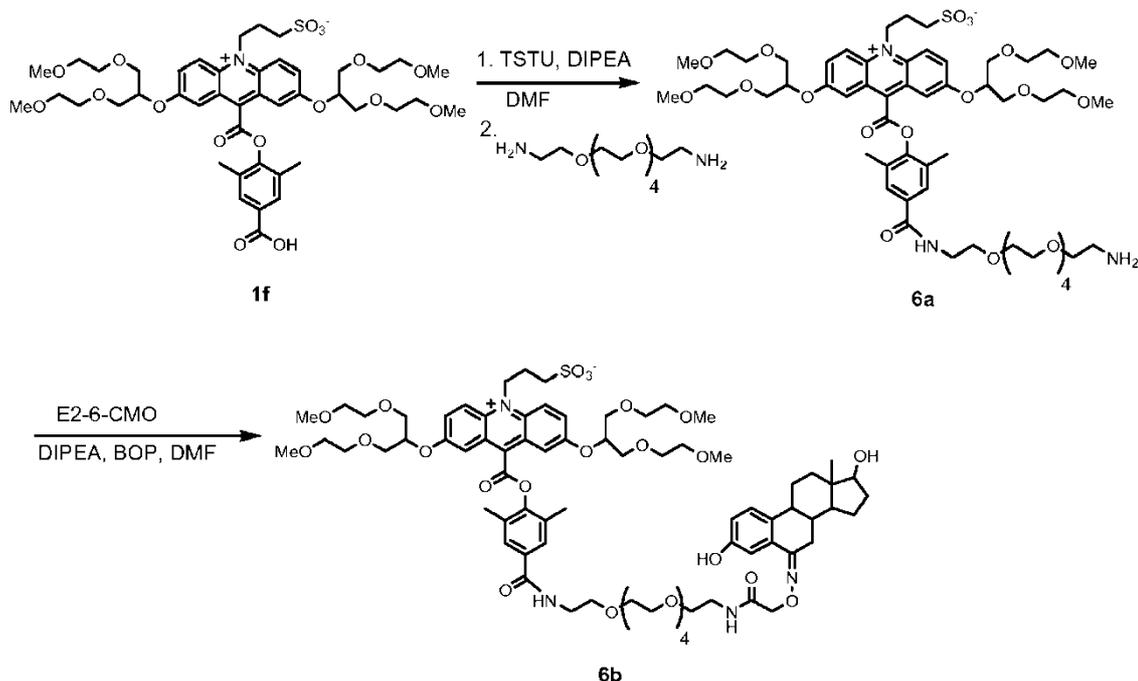
**Ejemplo 6 (no de acuerdo con la presente invención)**

B1-AE-E2, 6b

- 5 a) Compuesto 6a. Una solución del compuesto 1f (26 mg, 28.7 u moles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (7.5 uL, 43 u moles) y TSTU (10.4 mg, 35 u moles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción utilizando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B 10 → 100% (A = agua con TFA al 0.05%, B = MeCN con TFA al 0.05%) a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto y la detección de UV a 260 nm, indicaron la conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 18.2 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de diamino hexa(etilén)glicol (Patente de los Estados Unidos No. 6,664,043), (40 mg, 0.142 mmol) en DMF anhidro (2.0 mL).
- 10 Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción mostró una conversión completa al producto 6a que eluye a Rt = 14.1 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que el descrito anteriormente a una tasa de flujo 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 = 26 mg (78%); MALDI-TOF MS 1168.6 observado.
- 15

5 b) B1-AE-E2, 6b. Estradiol-6-carboximetiloxima (1 mg, 2.78 umoles) en DMF (0.1 mL) se combinó con el compuesto 6a (3.25 mg, 2.78 umoles) y se trató con diisopropiletilamina (1 uL, 5.56 umoles) seguido de reactivo de BOP (1.84 mg, 4.17 umoles) añadidos como una solución en DMF (0.184 mL de una solución de 10 mg/mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente 2h. El análisis por HPLC, como se describe en la sección (a), indicó >80% de conversión al producto que eluye a $R_t = 18.2$ minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna YMC, C_{18} de 20 x 250 mm y un tiempo de 30 minutos de 10 → 70% de B (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) con un flujo de solvente de 16 mL/minuto y detección de UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. Rendimiento = 2.8 mg (67%); MALDI-TOF MS 1511.2 observado.

10 Las siguientes reacciones describen la síntesis de B1-AE-E2, 6b.



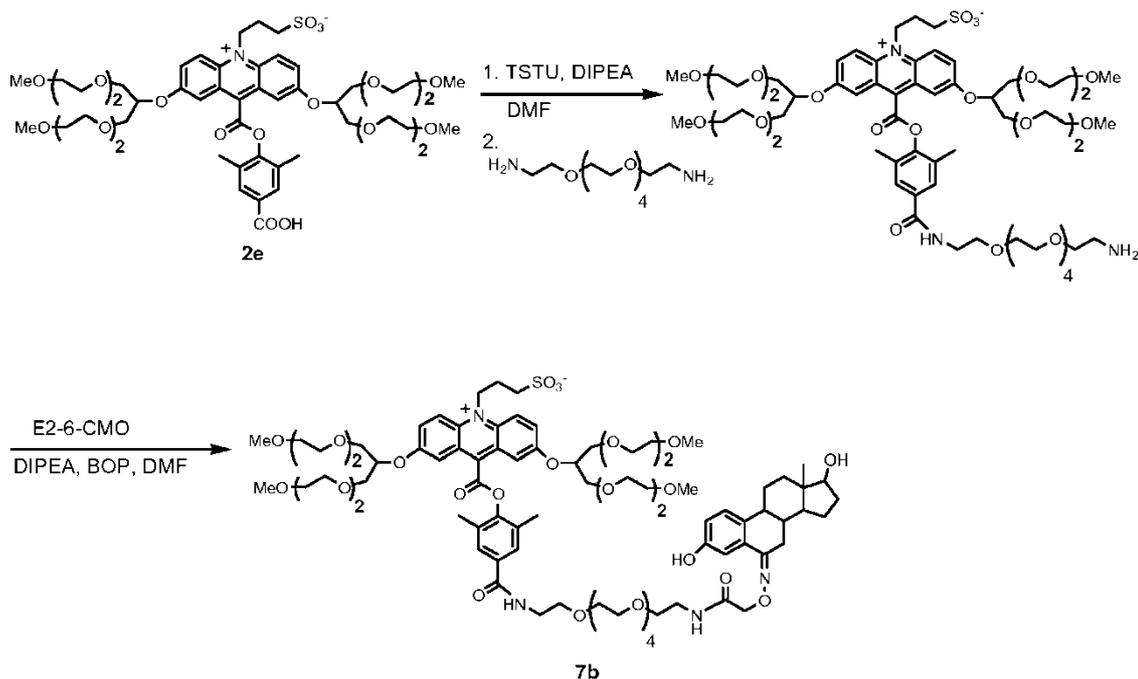
Ejemplo 7

B2-AE-E2, 7b

15 a) Compuesto 7a. Una solución del compuesto 2e (30 mg, 28 umoles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (7.2 uL, 42 umoles) y TSTU (10 mg, 34 umoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción utilizando una columna Phenomenex, C_{18} de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B 10 → 100% (A = agua con TFA al 0.05%, B = MeCN con TFA al 0.05%) a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto y la detección de UV a 260 nm, indicaron la conversión completa al éster de NHS que eluye a $R_t = 17.7$ minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de diamino hexa(etilenglicol) (Patente de los Estados Unidos No. 6,664,043), (40 mg, 0.142 mmol) en DMF anhidra (1.0 mL). Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción mostró una conversión completa al producto 7a que eluye a $R_t = 14$ minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C_{18} de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que el descrito anteriormente a una rata de flujo 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 = 28.3 mg (76%); MALDI-TOF MS 1345.4 observado.

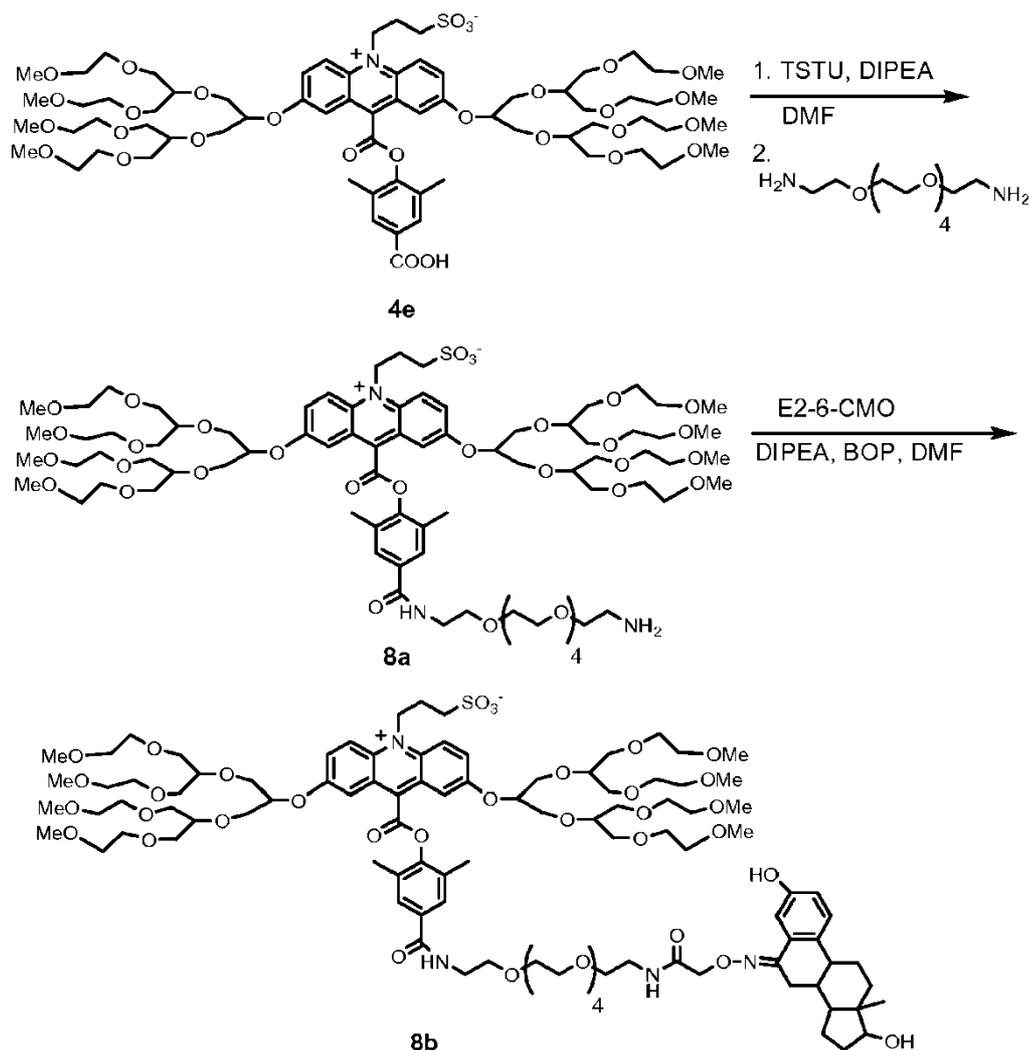
30 b) B2-AE-E2, 7b. La estradiol-6-carboximetiloxima (1 mg, 2.78 umoles) en DMF (0.1 mL) se combinó con el compuesto 7a (3.74 mg, 2.78 umoles) y se trató con diisopropiletilamina (1 uL, 5.56 umoles) seguido de reactivo de BOP (1.84 mg, 4.17 umoles) añadidos como una solución en DMF (0.184 mL de una solución de 10 mg/mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente 2h. El análisis por HPLC, como se describe en la sección (a), indicó >80% de conversión al producto que eluye a $R_t = 18.1$ minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C_{18} de 20 x 250 mm y un tiempo de 30 minutos 10 → 70% de B (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) con un flujo de solvente de 16 mL/minuto y detección de UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. Rendimiento = 4.6 mg (98%); MALDI-TOF MS 1688.4 observado.

35 Las siguientes reacciones describen la síntesis de B2-AE-E2, 7b.

**Ejemplo 8**

B4-AE-E2, 8b

- 5 a) Compuesto 8a. Una solución del compuesto 4e (26 mg, 18 μ moles) en DMF anhidra (2 mL) se trató con diisopropiletilamina (4.0 μ L, 27 μ moles) y TSTU (6.6 mg, 22 μ moles). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción utilizando una columna Phenomenex, C₁₈ de 4.6 mm x 25 cm y un gradiente de 30 minutos de B 10 \rightarrow 100% (A = agua con TFA al 0.05%, B = MeCN con TFA al 0.05%) a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto y la detección de UV a 260 nm, indicaron una conversión completa al éster NHS que eluye a Rt = 18.7 minutos. Esta reacción se añadió gota a gota a una solución agitada de diamino hexa(etilen)glicol (Patente de los Estados Unidos No. 6,664,043), (25 mg, 0.089 mmol) en DMF anhidro (2.0 mL).
- 10 Después de 30 minutos, el análisis por HPLC de la mezcla de reacción mostró una conversión completa al producto 8a que eluye a Rt = 15.1 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 30 x 300 mm y el mismo gradiente que el descrito anteriormente a una tasa de flujo 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 = 22.5 mg (73%); MALDI-TOF MS 1698.6 observado.
- 15 b) B4-AE-E2, 8b. El estradiol-6-carboximetiloxima (1 mg, 2.78 μ moles) en DMF (0.1 mL) se combinó con el compuesto 8a (4.72 mg, 2.78 μ moles) y se trató con diisopropiletilamina (1 μ L, 5.56 μ moles) seguido de reactivo de BOP (1.84 mg, 4.17 μ moles) añadidos como una solución en DMF (0.184 mL de una solución de 10 mg/mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente 2h. El análisis por HPLC, como se describe en la sección (a), indicó una conversión >80% en el producto que eluye a Rt = 18.9 minutos. El producto se purificó por HPLC preparativa utilizando una columna YMC, C₁₈ de 20 x 250 mm y un tiempo de 30 minutos 10 \rightarrow 70% de B (A = agua con 0.05% de TFA, B = MeCN con 0.05% de TFA) con un flujo de solvente de 16 mL/minuto y detección de UV a 260 nm. Las fracciones de HPLC que contenían el producto se combinaron, se congelaron a -80°C y se liofilizaron a sequedad. Rendimiento = 4.0 mg (70%); MALDI-TOF MS 2040.9 observado.
- 25 Las siguientes reacciones describen la síntesis de B4-AE-E2, 8b.



Ejemplo 9

Procedimiento general para marcar Mab anti-TSH con éster de acridinio. Se diluyó una solución madre del anticuerpo (5 mg/mL, 50 μ L, 0.5 mg, 3.4 nmoles) con ya sea regulador de fosfato 0.1 M, pH 8 (150 μ L) o carbonato de sodio 0.1 M, pH 9 (150 μ L) para dar una solución de 2.5 mg/mL. A esta solución se agregaron 20 equivalentes del éster NHS de acridinio como una solución de DMF. Por ejemplo, al usar B1-AE-NHS, esto implicó la adición de 83 μ g agregados como 8.3 μ L de una solución de DMF de 10 mg/mL del éster de acridinio.

Las reacciones de marcación se agitaron suavemente a temperatura ambiente durante 3-4 horas y luego se diluyeron con agua desionizada (1.8 mL). Estas soluciones diluidas luego se transfirieron a filtros Centricon™ de 2 mL (MW 30.000 de corte) y se centrifugaron a 4500G para reducir el volumen a \sim 0.2 mL. Este proceso se repitió tres veces más. Los conjugados filtrados finalmente se diluyeron en un volumen total de 200 μ L de agua desionizada para el análisis espectral de masas y las mediciones de RLU.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Voyager DE MALDI-TOF y se usó como referencia el anticuerpo no marcado. Aproximadamente 2 μ L de la solución de conjugado se mezclaron con 2 μ L de solución de matriz de ácido sinapínico (HP) y se colocaron en una placa MALDI. Después del secado completo, se registraron los espectros de masas. A partir de la diferencia en los valores de masa para el anticuerpo no marcado y los conjugados, se pudo medir el grado de incorporación de AE. Normalmente, bajo estas condiciones de marcación, se incorporaron 3 a 6 marcaciones AE en el anticuerpo.

Ejemplo 10

Medición de la estabilidad. La maximización de la estabilidad de los ésteres de acridinio es un parámetro por el cual se mejora la precisión del ensayo. La estabilidad de la quimioluminiscencia de varios ésteres de acridinio unidos covalentemente al anticuerpo anti-TSH se analizó para determinar la correlación de la estructura molecular del éster de acridinio con la estabilidad del quimioluminiscente tanto a una temperatura de almacenamiento nominal de 4°C como a una temperatura de almacenamiento elevada de 37°C. Cantidades equivalentes de anticuerpos anti-TSH

(hormona estimulante de la tiroides) marcados con éster de acridinio cada uno conjugado con un éster de acridinio diferente se diluyeron a una concentración de 0.2 nanomolar en reactivo Lite Reagent Siemens Healthcare Diagnostics TSH3 (hormona estimulante de la tiroides), consistente en 0.1 M de sodio N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etanosulfonato (HEPES), cloruro de sodio 0.15 M, azida de sodio 7.7 mM, etilendiaminotetraacetato de tetrasodio 1.0 mM, (EDTA), t-octilfenoxipolietoxietanol tetrasódico 12 mM (Triton X-100), albúmina sérica bovina (BSA) 76 uM, inmunoglobulina de ratón (IgG) 7 uM, pH 7.7. Cada solución de éster de acridinio se dividió en dos conjuntos de recipientes de almacenamiento. Un conjunto de recipientes de almacenamiento se mantuvo a 4°C y el otro a 37°C. A partir del día de la dilución inicial, la quimioluminiscencia a partir de 10 microlitros de cada solución de éster de anticuerpo de acridinio se determinó en condiciones estándar en un luminómetro Berthold Technologies Autolumat LB953 con adición secuencial de 300 microlitros cada uno de Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 1 (ácido nítrico 0.1 M y 0.5% de peróxido de hidrógeno) y Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 2 (0.25 M de hidróxido de sodio y cloruro de cetiltrimetilamonio 0.05%).

Ejemplo 11

Medición de la unión fraccionaria no específica. La minimización de la unión fraccionaria no específica (fNSB) de los ésteres de acridinio a una fase sólida es un parámetro por el cual se aumenta la sensibilidad del ensayo. Las uniones fraccionarias no específicas de varios ésteres de acridinio unidos covalentemente al anticuerpo anti-TSH se analizaron para determinar la correlación con la estructura molecular del éster de acridinio. Cantidades equivalentes de anticuerpos anti-TSH (hormona estimulante de la tiroides) marcados con éster de acridinio, cada uno conjugado con un éster de acridinio diferente, se diluyeron a una concentración de 2 nanomolar en regulador Lite Reagent Siemens Healthcare Diagnostics TSH3 (hormona estimulante de la tiroides) consistente en N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etanosulfonato de sodio 0.1 M (HEPES), cloruro de sodio 0.15 M, azida de sodio 7.7 mM, etilendiaminotetraacetato de tetrasodio 1.0 mM, (EDTA), 12 mM t-octilfenoxipolietoxietanol tetrasódico (Triton X-100), albúmina sérica bovina (BSA) 76 uM, inmunoglobulina (IgG) 7 uM de ratón, pH 7.7. Después de la dilución, 100 microlitros de las soluciones que contenían éster de acridinio fueron tratadas con 200 microlitros de suero de caballo (Multidiluyente 1 de Siemens Healthcare Diagnostics) y 200 microlitros de cualquiera de las dos fases sólidas. La primera fase sólida fue de 200 microlitros de Siemens Healthcare Diagnostics ACS PTH (hormona paratiroidea) en fase sólida que contenía 50 microgramos de micropartículas de látex magnético (MLP) derivadas con anticuerpo antiPTH. La segunda fase sólida fue de 200 microlitros de la fase sólida de Siemens Healthcare Diagnostics ACS TSH3 (hormona estimulante de la tiroides) que contenía 60 microgramos de micropartículas paramagnéticas (PMP) derivadas con anticuerpo anti-TSH. Las partículas se recogieron magnéticamente y se lavaron dos veces con agua después de una incubación de 10 minutos para permitir la interacción entre los anticuerpos marcados con éster de acridinio y las fases sólidas. La quimioluminiscencia del éster de acridinio asociado con las partículas se midió en condiciones estándar en un luminómetro Berthold Technologies Autolumat LB953 con adición secuencial de 300 microlitros cada uno de Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 1 (ácido nítrico 0.1 M y hidroperóxido de hidrógeno 0.5%) y Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 2 (hidróxido de sodio 0.25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio 0.05%). La quimioluminiscencia se midió durante 5.0 segundos. La unión fraccionaria no específica (fNSB) se calcula como la relación de la quimioluminiscencia unida a la partícula a la entrada de quimioluminiscencia total. En general, la hidrofobicidad de un éster de acridinio eleva el fNSB y es indeseable cuando se distinguen pequeñas cantidades de señal específica, y a la inversa, la hidrofiliidad de un éster de acridinio disminuye el fNSB y es deseable al distinguir pequeñas cantidades de señal específica.

Ejemplo 12

Medición de la cinética de quimioluminiscencia. La aceleración de las tasas de quimioluminiscencia del éster de acridinio es un parámetro por el cual se pueden aumentar las tasas de rendimiento del ensayo. La cinética de quimioluminiscencia de varios ésteres de acridinio unidos covalentemente al anticuerpo anti-TSH se analizó para determinar la correlación de la estructura molecular del éster de acridinio con su tasa de emisión de luz de quimioluminiscencia. Cada anticuerpo marcado con éster de acridinio se diluyó a una concentración de 0.2 nanomolar en un regulador que consiste 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 de éster de acridinio-anticuerpo probado se integró en intervalos de 0.1 segundos durante 20 segundos en condiciones estándar en un luminómetro Berthold Technologies Autolumat LB953 con adición secuencial de 300 microlitros cada uno de Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 1 (ácido nítrico 0.1 M y peróxido de hidrógeno 0.5%) y Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 2 (hidróxido de sodio 0.25 M y cloruro de cetiltrimetilamonio 0.05%). La cinética de quimioluminiscencia de los ésteres de acridinio probados se comparó para la tasa relativa de emisión de luz.

Ejemplo 13

Medición del rendimiento cuántico. El aumento de la cantidad de quimioluminiscencia del éster de acridinio es un parámetro por el cual se puede aumentar la sensibilidad del ensayo. Los rendimientos cuánticos de quimioluminiscencia de varios ésteres de acridinio unidos covalentemente al anticuerpo anti-TSH se analizaron para determinar la correlación de la estructura molecular de los ésteres de acridinio con la magnitud de su salida de luz de quimioluminiscencia. Cada anticuerpo marcado con éster de acridinio se diluyó a una concentración de 0.2 nanomolar en un regulador que consiste 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 de éster

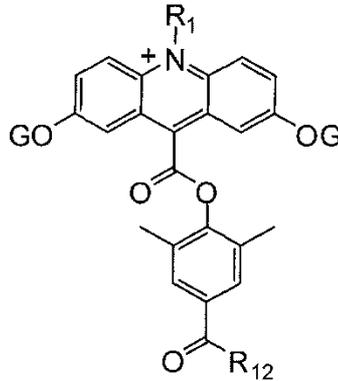
5 de acridinio-anticuerpo analizado se midió durante 10 segundos en condiciones estándar en un luminómetro Berthold Technologies Autolumat LB953 con adición secuencial de 300 microlitros cada uno de Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 1 (ácido nítrico 0.1 M y de peróxido de hidrógeno al 0.5 %) y Siemens Healthcare Diagnostics Flash Reagent 2 (hidróxido de sodio 0.25 M y de cloruro de cetiltrimetilamonio 0.05%). El rendimiento cuántico de quimioluminiscencia se calculó como la relación de la quimioluminiscencia a la cantidad de éster de acridinio analizado.

Toda la literatura de patentes y no patentes a la que se hace referencia en esta especificación se incorpora aquí como referencia.

10 Habiéndose descrito la invención mediante la descripción anterior de las realizaciones preferidas, se entenderá que el experto en la materia puede realizar modificaciones y variaciones de estas realizaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la invención como se expone en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

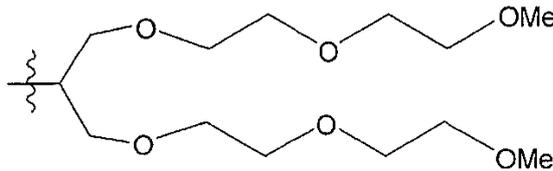
1. Un éster de acridinio hidrófilo de alto rendimiento cuántico que tiene la siguiente estructura:



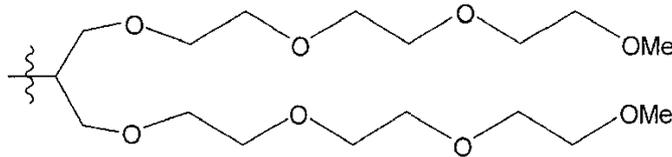
en donde,

5 R₁ es un grupo metilo o sulfopropilo;

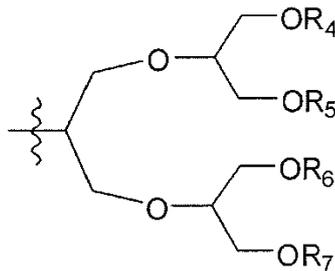
G es en una o ambas apariciones, un grupo:



en una o ambas apariciones, o G es un grupo:



10 en una o ambas apariciones; o G es, en una o ambas apariciones, un grupo:



donde R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente en cada aparición un grupo metilo o un grupo $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$, donde n es un número entero de 1 a 5 y R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en:

(1) -OH;

15 (2) -O-N-succinimidilo;

(3) -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo;

(4) -NH-(CH₂)₅-COOH;

(5) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo

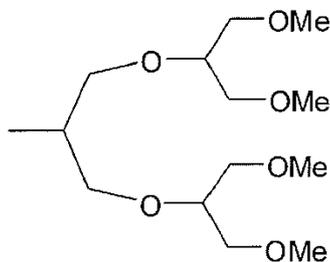
donde n = 1 a 5;

20 (6) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-COOH, donde n = 1 a 5;

(7) $-\text{NH}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$, donde $n = 1$ a 5 ; y

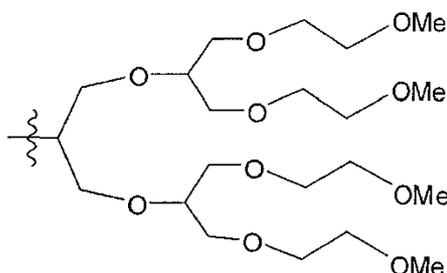
(8) $-\text{NH}-\text{R}-\text{NHR}$, en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

2. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde G es, en una o ambas apariciones, un grupo:



5

en una o ambas apariciones, o donde G es un grupo:



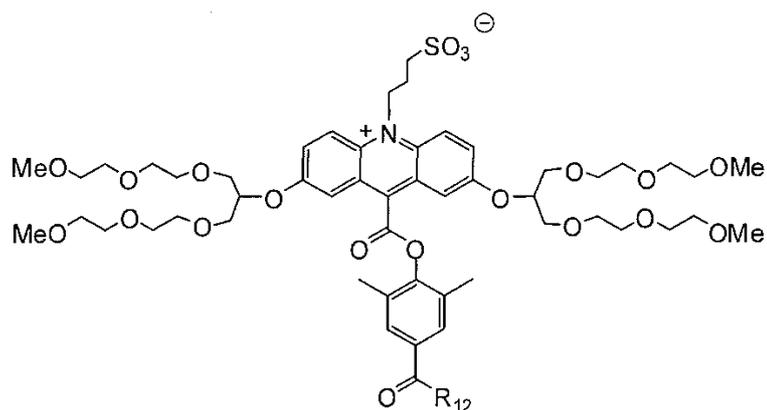
en una o ambas apariciones.

3. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_{12} es $-\text{OH}$.

10 4. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_{12} es $-\text{NH}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$, en donde $n = 1$ a 5 .

5. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_{12} es: $-\text{NH}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}''$ en donde $n = 1$ a 5 ; y donde R'' es hidrógeno o $-\text{N}$ -succinimidilo.

6. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura:



15

donde R_{12} se selecciona del grupo que consiste en:

(1) $-\text{OH}$;

(2) $-\text{O}-\text{N}$ -succinimidilo;

(3) $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{N}$ -succinimidilo;

20 (4) $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$;

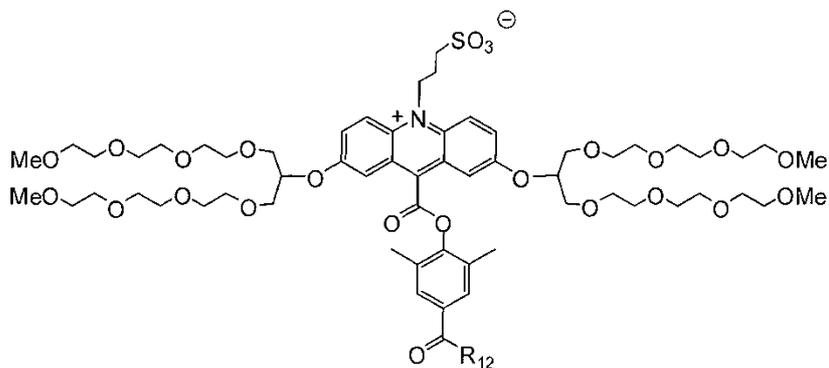
(5) $-\text{NH}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{N}$ -succinimidilo donde $n = 1$ a 5 ;

(6) $\text{-NH-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-C}_2\text{H}_4\text{NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$, donde $n = 1$ a 5 ;

(7) $\text{-NH-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$, en donde $n = 1$ a 5 ; y

(8) -NH-R-NHR , en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

5 7. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura:



donde R_{12} se selecciona del grupo que consiste en:

(1) -OH ;

(2) $\text{-O-N-succinimidilo}$;

10 (3) $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_5\text{-C(O)-O-N-succinimidilo}$;

(4) $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH}$;

(5) $\text{-NH-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-C}_2\text{H}_4\text{NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(O)-O-N-succinimidilo}$

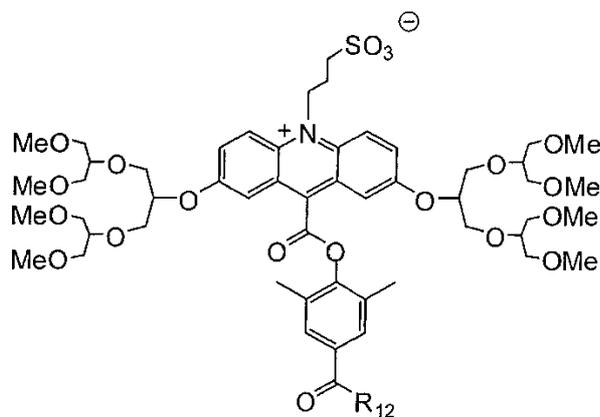
donde $n = 1$ a 5 ;

(6) $\text{-NH-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-C}_2\text{H}_4\text{NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$, en donde $n = 1$ a 5 ;

15 (7) $\text{-NH-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_n\text{-C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$, en donde $n = 1$ a 5 ; y

(8) -NH-R-NHR , en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

8. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura:



20 donde R_{12} se selecciona del grupo que consiste en:

(1) -OH ;

(2) $\text{-O-N-succinimidilo}$;

(3) $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_5\text{-C(O)-O-N-succinimidilo}$;

(4) -NH-(CH₂)₅-COOH;

(5) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo

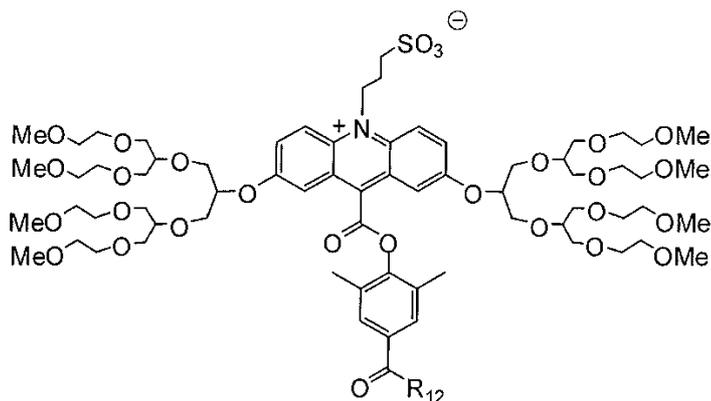
donde $n = 1$ to 5;

(6) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-COOH, en donde $n = 1$ a 5;

5 (7) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂, en donde $n = 1$ a 5; y

(8) -NH-R-NHR, en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

9. Un éster de acridinio de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura:



10 donde R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en:

(1) -OH;

(2) -O-N-succinimidilo;

(3) -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-succinimidilo;

(4) -NH-(CH₂)₅-COOH;

15 (5) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-succinimidilo

donde $n = 1$ a 5;

(6) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-COOH, en donde $n = 1$ a 5;

(7) -NH-(C₂H₄O)_n-C₂H₄NH₂, en donde $n = 1$ a 5; y

20 (8) -NH-R-NHR, en donde R es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino o aralquilo; en donde R comprende opcionalmente hasta 20 heteroátomos.

10. El éster de acridinio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde R₁₂ es -OH.

11. Un ensayo para la detección o cuantificación de un analito que comprende los pasos de:

(a1) proporcionar un conjugado que comprende: (i) una molécula de unión específica para un analito; y (ii) un éster de acridinio hidrófilo, de alto rendimiento cuántico y rápido de emisión de luz de acuerdo con la reivindicación 1;

25 (b1) proporcionar un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo una segunda molécula de unión específica para dicho analito;

o

(a2) proporcionar un conjugado de un analito con un éster de acridinio hidrófilo de alto rendimiento cuántico y rápido de emisión de luz de acuerdo con la reivindicación 1;

30 (b2) proporcionar un soporte sólido inmovilizado con una molécula de unión específica para el analito;

- (c) mezclar el conjugado provisto en (a1) y la fase sólida provista en (b1) o el conjugado provisto en (a2) y la fase sólida provista en (b2) junto con una muestra de la que se sospecha que contiene el analito para formar una unión compleja;
- (d) separar el complejo de unión capturado en el soporte sólido;
- 5 (e) activar la quimioluminiscencia del complejo de unión de la etapa (d) agregando reactivos activadores 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 comparando la cantidad de luz emitida por la mezcla de reacción con una curva de respuesta de dosis estándar que relaciona la cantidad de luz emitida con una concentración conocida del analito.
- 10

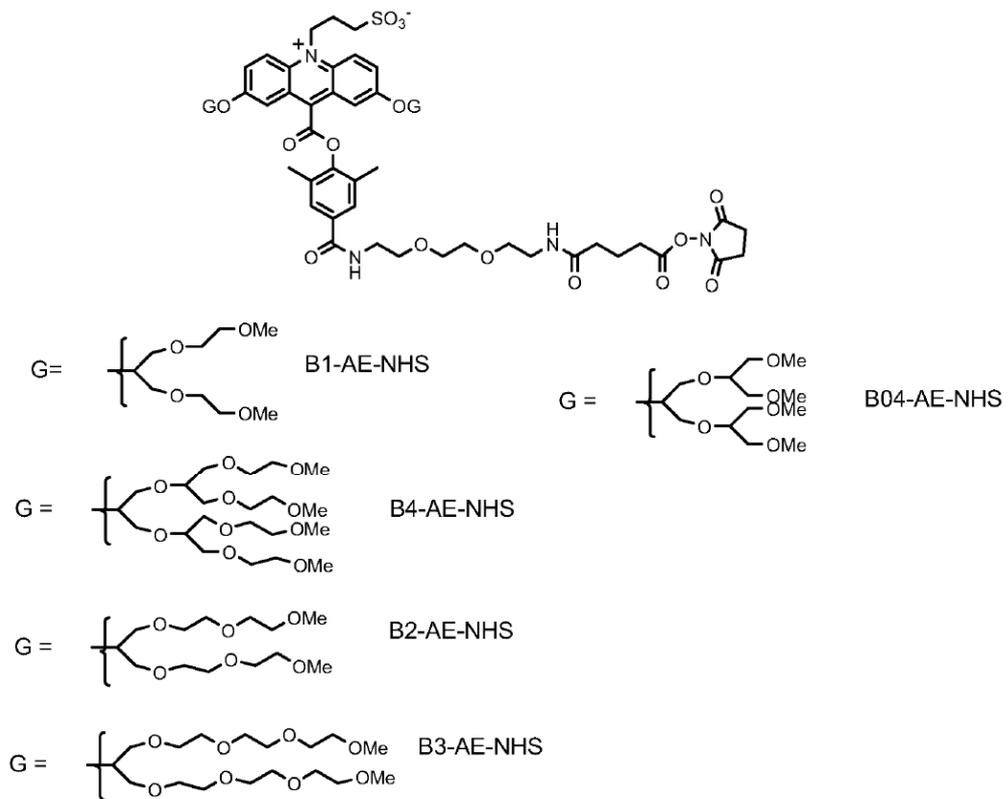


Figura 1. Estructuras de B-AEs con grupos funcionales electrófilos.

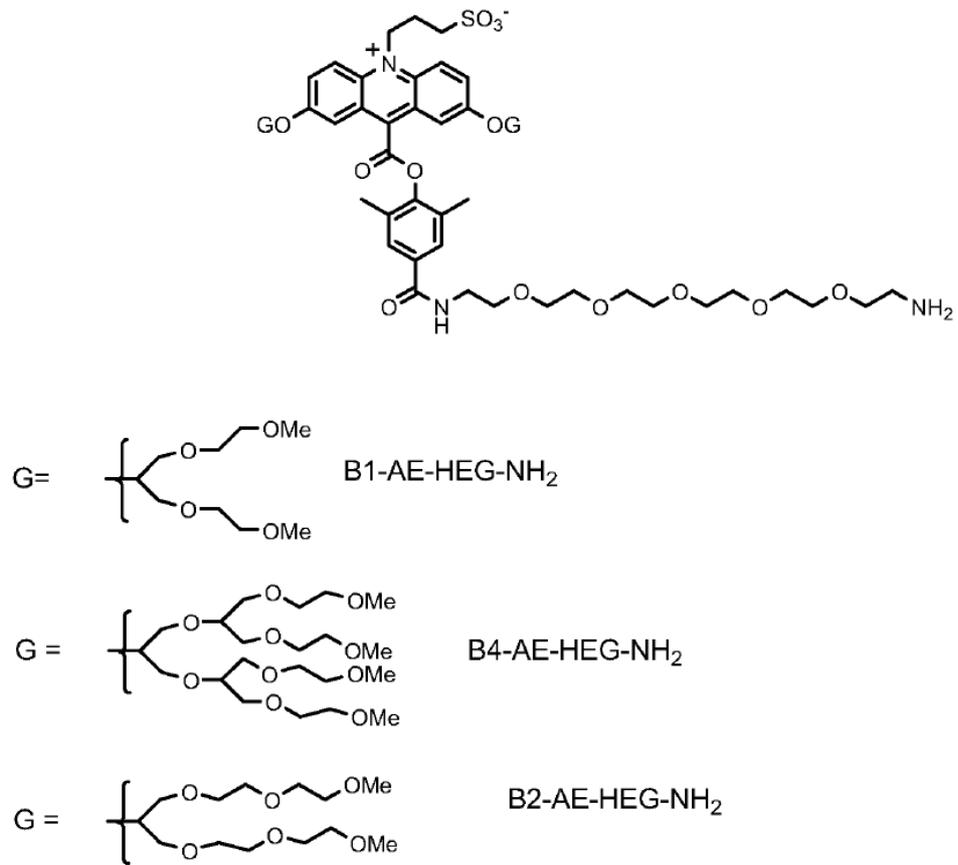


Figura 2. Estructuras de B-AEs con grupos funcionales nucleófilos.

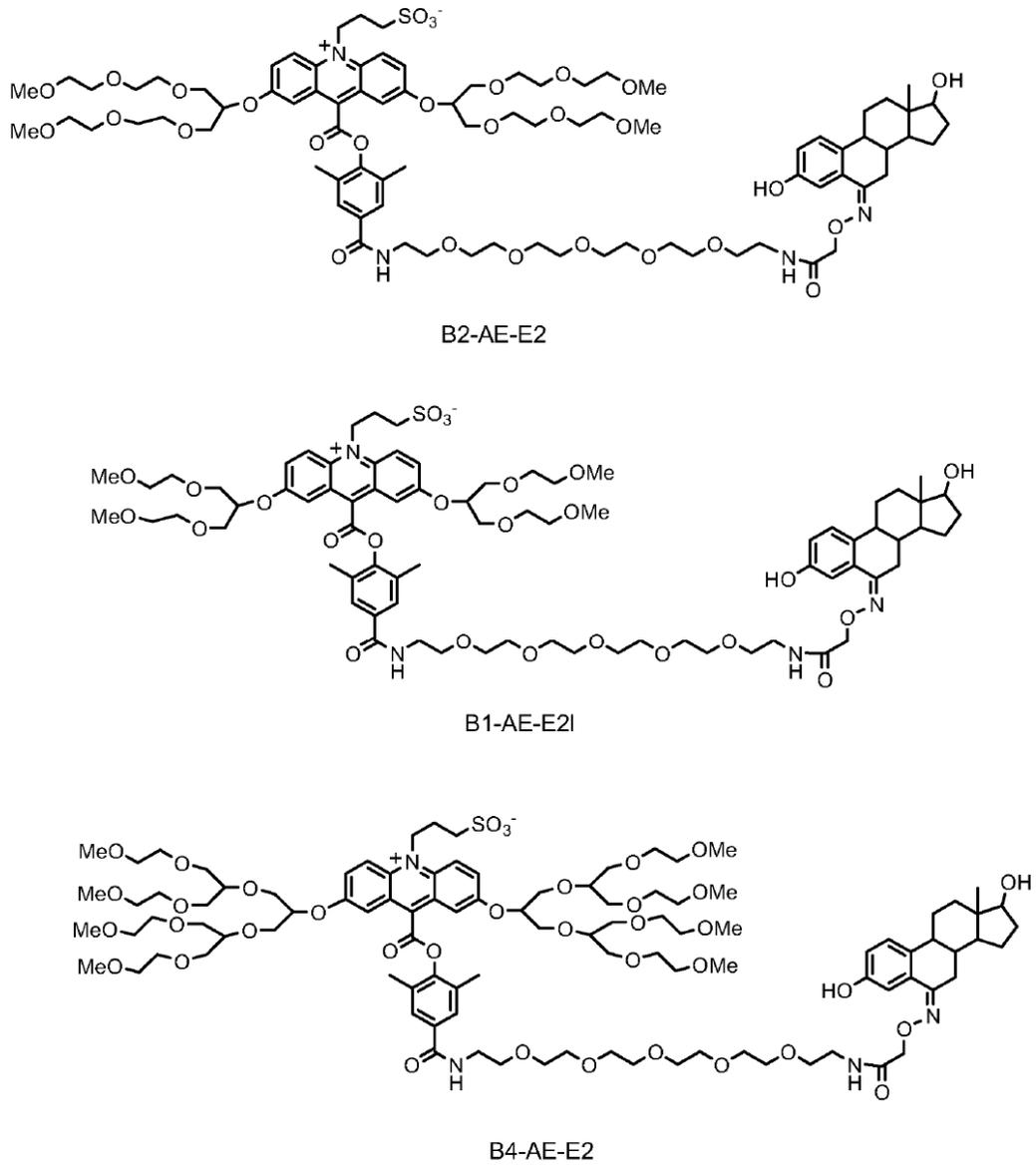


Figura 3. Estructuras de conjugados de B-AE-E2.