

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 887**

51 Int. Cl.:

G01N 21/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014 PCT/US2014/037914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014 E 14798016 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2997355**

54 Título: **Tensioactivos catiónicos degradables y su uso para la mejora de la quimioluminiscencia**

30 Prioridad:

14.05.2013 US 201361823162 P

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

29.06.2020

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**NATRAJAN, ANAND y
WEN, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 769 887 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

Tensioactivos catiónicos degradables y su uso para la mejora de la quimioluminiscencia

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/823,162 presentada el martes, 14 de mayo de 2013.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a tensioactivos catiónicos ecológicos degradables para mejorar la quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio. También se proporcionan métodos y kits relacionados.

Antecedentes de la invención

10 Los ésteres dimetilfenílicos de acridinio quimioluminiscentes son marcadores altamente sensibles (Figura 1B) que se utilizan para la medición de una amplia gama de analitos clínicamente importantes en inmunoensayos automatizados, tales como ADVIA de Siemens Healthcare Diagnostics: sistemas Centaur®. Al final de cada ensayo, la emisión de luz del marcador del éster de acridinio se desencadena por la adición secuencial de dos reactivos. Un tratamiento inicial con 0,3 ml de ácido nítrico 0,1 M (que también contiene 0,5 % de peróxido de hidrógeno) convierte la pseudobase no
15 quimioluminiscente del éster de acridinio (Figura 1A) en la forma de acridinio quimioluminiscente del marcador. La posterior adición de 0,3 ml de hidróxido de sodio 0,25 M que también contiene 7 mM del tensioactivo catiónico cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), ioniza el peróxido de hidrógeno e inicia la emisión de luz. El tensioactivo CTAC desempeña un papel muy importante en el proceso de quimioluminiscencia de los ésteres de acridinio (Natrajan et al, Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 5092-5103). CTAC comprime los tiempos de emisión de los marcadores de
20 aproximadamente 60 segundos a <5 segundos. CTAC también aumenta la salida de luz general 3-4 veces de los marcadores de éster de acridinio y sus conjugados. La emisión de luz más rápida y la salida de luz aumentada permiten ensayos rápidos y sensibles en instrumentos automatizados, tales como en ADVIA de Siemens Healthcare Diagnostics: sistemas Centaur®.

25 Cada prueba de inmunoensayo realizada en el ADVIA: el sistema Centaur® consume aproximadamente 0,7 mg de CTAC. El gran volumen de pruebas de inmunoensayo que se realizan en todo el mundo en el ADVIA: los sistemas Centaur® (> 500 millones de pruebas solo en 2012 según una estimación) dan como resultado el uso anual de cantidades sustanciales (> 350 kg) de este tensioactivo catiónico. Los tensioactivos catiónicos, tales como CTAC, se consideran bastante tóxicos para la vida acuática cuando se descargan al medio ambiente (Nalęcz-Jawecki et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 54, 87-91; Pantani et al., *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 1995, 55, 179-186; Kümmerer et al., *J. Chromatogr. A*, 1997, 774, 281-286; Sütterlin et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71, 498-505; Roberts y Costello, *QSAR*, 2003, 22, 220-225; Leeuwen et al., *Chemosphere*, 1992, 24, 629-639). Aunque los tensioactivos catiónicos son degradados por microbios en condiciones aeróbicas, en condiciones anaeróbicas son persistentes y muestran poca biodegradación, lo que representa un grave riesgo ambiental para la vida acuática (Ying, *Environment International*, 2006, 32, 417-431; Maden in *Biodegradability and Toxicity of Surfactants*, Handbook of Detergents Part B: Environmental Impact, U. Zoller, Editor, Marcel Dekker, 2004, p211-248; Ying in *Distribution, Behavior, Fate and Effects of Surfactants and their Degradation Products in the Environment*, Handbook of Detergents Part B: Environmental Impact, U. Zoller, Editor, Marcel Dekker, 2004, p77-109).

35 Por tanto, persiste la necesidad de reemplazar el CTAC con tensioactivos degradables y ecológicos ("verdes"), al tiempo que se preserva la eficiencia de la mejora de la quimioluminiscencia. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar tensioactivos verdes que sean al menos tan eficientes como CTAC para mejorar la quimioluminiscencia.

Sumario de la invención

45 De acuerdo con los objetivos anteriores y otros, sorprendentemente, se ha descubierto que la quimioluminiscencia de los compuestos quimioluminiscentes de acridinio se mejora mediante la incorporación de tensioactivos degradables en reactivos desencadenantes de luz, en un grado que es al menos comparable al de los tensioactivos convencionales como CTAC. El uso de estos tensioactivos ecológicos en reactivos desencadenantes de luz para marcadores de acridinio ampliamente utilizados es verde y, en algunas realizaciones, una alternativa inesperadamente más efectiva al tensioactivo catiónico convencional CTAC.

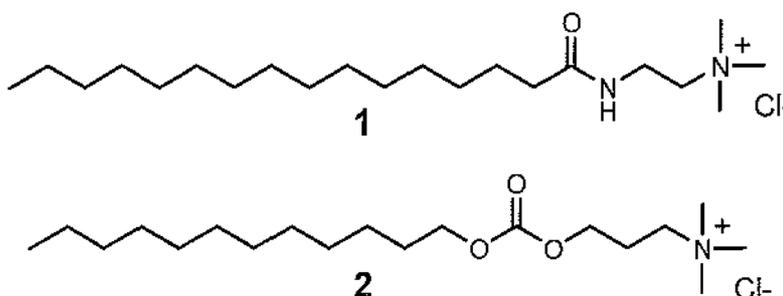
50 En un aspecto, se proporciona un método para mejorar la quimioluminiscencia a partir de un marcador quimioluminiscente según la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, el marcador quimioluminiscente puede ser un éster dimetilfenílico de acridinio o una sulfonamida de acridinio. El ácido puede ser ácido nítrico.

En ciertas realizaciones, el método puede incluir además comprimir el tiempo de emisión de luz de dicho marcador quimioluminiscente, proporcionando así un tiempo de emisión comprimido que un tiempo de emisión estándar sin tensioactivos, en el que dicho tiempo de emisión comprimido es comparable al del cloruro de cetiltrimetilamonio. Por ejemplo, el tiempo de emisión comprimido puede ser más corto (por ejemplo, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 % o aproximadamente un 50 % más corto) que el del cloruro de cetiltrimetilamonio. En una realización, el tensioactivo de la presente invención es tan eficaz como el cloruro de cetiltrimetilamonio para mejorar el rendimiento total de luz del marcador quimioluminiscente.

En algunas realizaciones, el método puede incluir además aumentar la quimioluminiscencia de dicho marcador quimioluminiscente, proporcionando así una mayor emisión de luz que una emisión de luz estándar sin tensioactivos, en el que dicha mayor emisión de luz es comparable a la del cloruro de cetiltrimetilamonio. Por ejemplo, dicha emisión de luz aumentada puede ser al menos aproximadamente 2,5 veces mayor en comparación con la emisión de luz estándar sin tensioactivos. En ciertas realizaciones, dicha mejora puede ser al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 % de la del cloruro de cetiltrimetilamonio. En una realización, el tensioactivo de la presente invención es al menos tan efectivo como el cloruro de cetiltrimetilamonio en la compresión del tiempo de emisión del marcador quimioluminiscente.

El tensioactivo de la presente invención son el compuesto 1 o 2 o una mezcla de los mismos:



En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit de inmunoensayo, que comprende:

- 20 a) un marcador quimioluminiscente que tiene un éster dimetilfenílico de acridinio o una sulfonamida de acridinio;
- un reactivo acidificante que comprende un ácido, peróxido de hidrógeno y un tensioactivo catiónico degradable.

En algunas realizaciones, el marcador quimioluminiscente puede ser un éster dimetilfenílico de acridinio o una sulfonamida de acridinio.

25 En diversas realizaciones, cuando está en uso, el tensioactivo de la presente invención puede proporcionar un tiempo de emisión comprimido del marcador quimioluminiscente que un tiempo de emisión estándar sin tensioactivos, en el que dicho tiempo de emisión comprimido es comparable a (por ejemplo, aproximadamente igual o aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 % o aproximadamente un 50 % más corto) que el del cloruro de cetiltrimetilamonio.

30 En ciertas realizaciones, cuando está en uso, el tensioactivo de la presente invención puede exhibir una mayor emisión de luz del marcador quimioluminiscente en comparación con una emisión de luz estándar sin tensioactivos, en el que dicha emisión de luz aumentada es comparable a (por ejemplo, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %) la del cloruro de cetiltrimetilamonio.

En algunos ejemplos, el ácido puede ser ácido nítrico. El hidróxido alcalino puede ser hidróxido de sodio.

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

35 Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: Equilibrio de pseudobase de acridinio de un éster dimetilfenílico de N-sulfopropil acridinio.

Figura 1B: Estructuras de los marcadores quimioluminiscentes de éster dimetilfenílico de acridinio que contienen grupos N-sulfopropilo en el anillo de acridinio que se usan en inmunoensayos automatizados en Siemens Healthcare Diagnostics' ADVIA: sistemas Cenr®.

40 Figura 2A: Estructuras de tensioactivos catiónicos de ejemplo (1 y 2) que contienen enlaces escindibles (CMC = concentración micelar crítica).

Figura 2B: Estructuras de ésteres de acridinio de ejemplo (3a, 3b y 3c) utilizados para hacer conjugados de

anticuerpos anti-TSH en el presente estudio (TSH = hormona estimulante del tiroides).

Figura 3: Esquema sintético de ejemplo para el tensioactivo catiónico **1** con enlace amida escindible.

Figura 4: Esquema sintético de ejemplo para tensioactivo catiónico **2** con enlace de carbonato escindible.

Figura 5: Perfiles de emisión de quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3a** en ausencia y presencia de tensioactivos catiónicos. (ULR = Unidad relativa de luz).

Figura 6: Perfiles de emisión de quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3b** en ausencia y presencia de tensioactivos catiónicos.

Figura 7: Perfiles de emisión de quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3c** en ausencia y presencia de tensioactivos catiónicos.

10 Descripción detallada

La presente invención se refiere a métodos para mejorar la quimioluminiscencia a partir de un marcador quimioluminiscente que comprende poner en contacto un marcador quimioluminiscente con un ácido y peróxido de hidrógeno en presencia de un tensioactivo catiónico degradable. También se proporcionan kits relacionados que contienen dicho tensioactivo catiónico degradable. El tensioactivo catiónico degradable puede comprimir el tiempo de emisión de luz del marcador quimioluminiscente en un grado comparable o más corto que los tensioactivos convencionales. El tensioactivo catiónico degradable también puede aumentar la quimioluminiscencia del marcador quimioluminiscente, proporcionando una mayor emisión de luz que es comparable a los tensioactivos convencionales.

Para abordar la pobre biodegradabilidad de los tensioactivos catiónicos convencionales, especialmente en condiciones anaeróbicas, la presente invención introduce enlaces escindibles entre el grupo de cabeza cuaternario y la cadena alquílica de tensioactivos catiónicos. En la presente invención, sorprendentemente, se encuentra que los tensioactivos catiónicos que contienen enlaces escindibles (por ejemplo, carbonato o amida) son al menos tan efectivos como CTAC para mejorar la quimioluminiscencia de los ésteres de acridinio. El uso de estos tensioactivos ecológicos en reactivos desencadenantes de luz para marcadores de acridinio ampliamente utilizados (por ejemplo, ésteres o sulfonamidas) es una alternativa ecológica al tensioactivo catiónico convencional CTAC.

25 Definiciones

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recopilan aquí. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

30 Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos y frases tienen el siguiente significado: Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

35 Tal como se usan en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro del 20 %, dentro del 10 % o dentro del 5 %.

40 El término "comparable" como se usa en el presente documento, significa que una propiedad de un primer compuesto (por ejemplo, un primer tensioactivo) es aproximadamente la misma, o similar o equivalente a la de un segundo compuesto (por ejemplo, un segundo tensioactivo). Por ejemplo, cuando una propiedad (por ejemplo, tiempo de emisión comprimido o emisión de luz aumentada) de un tensioactivo verde de la presente invención se denomina "comparable a la del cloruro de cetiltrimetilamonio", se entiende que dicha propiedad es aproximadamente la misma que la del cloruro de cetiltrimetilamonio, estando la diferencia dentro del 20 %, dentro del 10 % o dentro del 5 %. En algunos ejemplos, el tensioactivo verde de la presente invención puede exhibir mejores propiedades en la emisión de luz que el cloruro de cetiltrimetilamonio.

45 En general, el término "tensioactivo" se refiere a compuestos que disminuyen la tensión superficial de un líquido, la tensión interfacial entre dos líquidos o la que existe entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos son típicamente químicos que son anfipáticos, lo que significa que contienen grupos hidrofóbicos de "cabeza" y grupos hidrofílicos de "cola". Muy frecuentemente, los tensioactivos se clasifican según el grupo de cabeza polar. Un tensioactivo no iónico no tiene grupos de carga en su cabeza. La cabeza de un tensioactivo iónico lleva una carga neta. Si la carga es negativa, el tensioactivo se denomina, más específicamente, aniónico; si la carga es positiva, se denomina catiónico. Si un tensioactivo contiene una cabeza con dos grupos con carga opuesta, se denomina zwitteriónico.

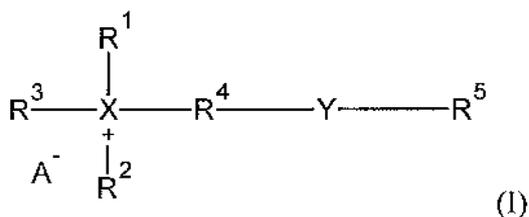
Una "micela" es un agregado de moléculas tensioactivas dispersas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones de la cabeza hidrofílica en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones hidrofóbicas de la cola en el centro de las micelas. Este tipo de micela se conoce como micela de fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro con

las colas extendidas (micela de agua en aceite). Las micelas pueden formarse cuando la concentración de tensioactivo es mayor que la concentración micelar crítica (CMC). Las micelas pueden existir en diferentes formas, que incluyen esféricas, cilíndricas y discoidales.

Tensioactivos verdes

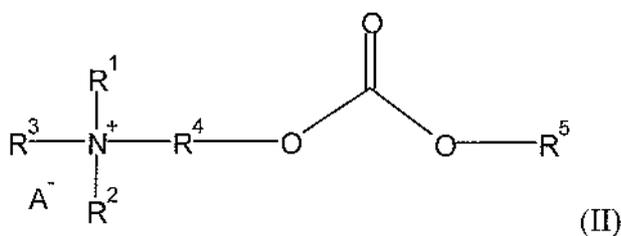
5 El objetivo principal de la presente invención es la eliminación del tensioactivo catiónico CTAC y su sustitución por tensioactivos catiónicos más ecológicos en reactivos desencadenantes de luz para marcadores de acridinio quimioluminiscentes.

10 En el presente documento se describe la estructura de un tensioactivo catiónico degradable para mejorar la quimioluminiscencia de los marcadores de éster de acridinio que se pueden representar mediante la siguiente fórmula (I):



15 en la que X es nitrógeno o fósforo; R¹, cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente entre hidrógeno y un grupo alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo o aralquilo que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos; cada uno de R⁴ y R⁵ se selecciona independientemente entre un alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo o aralquilo que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos; Y es un enlace escindible; y A⁻ es un contraión aniónico.

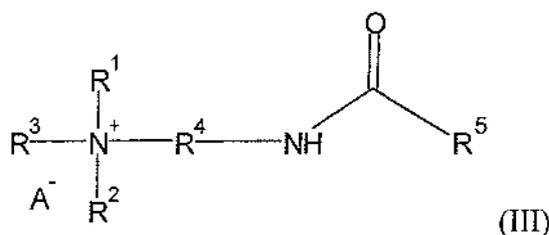
Adicionalmente, en el presente documento se describe la estructura de un tensioactivo catiónico degradable para mejorar la quimioluminiscencia de los marcadores de éster de acridinio que se pueden representar mediante la siguiente fórmula (II):



20 En donde:

- R¹, R² y R³ pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, R¹, R² y R³ pueden ser cada uno independientemente un grupo alquilo C₁₋₁₀, alqueniilo C₂₋₁₀, alquinilo C₂₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₀ o aralquilo C₄₋₁₀ que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos (por ejemplo, metilo, etilo, propilo o butilo);
- 25 - R⁴ puede ser un grupo alquilo C₁₋₂₀, alqueniilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀, cicloalquilo C₃₋₂₀ o aralquilo C₄₋₂₀ que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos. Por ejemplo, R⁴ puede ser una cadena de alquilo que comprende 2-4 carbonos;
- R⁵ puede ser un grupo alquilo C₁₋₃₀, alqueniilo C₂₋₃₀, alquinilo C₂₋₃₀, cicloalquilo C₃₋₃₀ o aralquilo C₄₋₃₀ que tiene opcionalmente uno o más heteroátomos. Por ejemplo, R₅ puede ser una cadena alquílica lineal o ramificada (por ejemplo, 10-16 carbonos); y
- 30 - A⁻ puede ser un anión seleccionado entre iones cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, sulfonato o hidróxido.

Adicionalmente, en el presente documento se describe la estructura de un tensioactivo catiónico degradable para mejorar la quimioluminiscencia de los marcadores de éster de acridinio que se pueden representar mediante la siguiente fórmula (III):

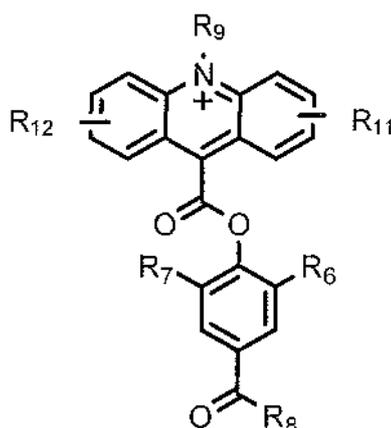


en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y A⁻ pueden tener las mismas definiciones que anteriormente.

Otros tensioactivos adecuados con enlaces escindibles como alternativas más verdes a los tensioactivos convencionales se han descrito en otras partes (por ejemplo, Tatsumi et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2000, 3, 167-172; Tatsumi et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2001, 4, 279-285; Banno et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2009, 12, 249-259; Banno et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2010, 13, 387-398; Banno et al., *Journal of Oleo Science*, 2011, 60, 117-126; Banno et al., *Journal of Oleo Science*, 2007, 56, 493-499; Stjern Dahl y Holmberg, *J. Colloid and Interface Sci.*, 2005, 291, 570-576). Los métodos para fabricar los tensioactivos anteriores son conocidos en la técnica.

10 Compuestos de acridinio

Los ésteres de acridinio cuya quimioluminiscencia puede ser mejorada por los tensioactivos catiónicos degradables pueden representarse mediante la siguiente fórmula:



en la que R₆, R₇, R₈ y R₉ pueden ser grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contienen 0-20 heteroátomos; R₁₀ y R₁₁ pueden ser grupos hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo o aralquilo que contienen 0-20 heteroátomos.

Otros compuestos de acridinio adecuados (por ejemplo, sulfonamidas de acridinio) incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 8.293.908; 8.119.422; 7.875.467; 7.785.904; 7.611.909; y 7.459.284; y la Publicación de los EE.UU. n.º 2012/0225497; 2010/0256380 y 2010/0099077.

Uso de tensioactivos verdes

En comparación con los tensioactivos catiónicos convencionales, tales como cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), el uso de tensioactivos catiónicos degradables es ventajoso porque se degradan rápidamente tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y, por lo tanto, presentan un riesgo significativamente menor cuando se descargan en el medio ambiente. Estos tensioactivos catiónicos también son útiles para mejorar la quimioluminiscencia de otros marcadores, tales como las sulfonamidas de acridinio, cuya ruta de emisión de luz es idéntica a la de los ésteres de acridinio.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para mejorar la quimioluminiscencia a partir de un marcador quimioluminiscente que comprende poner en contacto un marcador quimioluminiscente con un ácido y peróxido de hidrógeno en presencia de un tensioactivo catiónico degradable descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, el método puede incluir además comprimir el tiempo de emisión de luz del marcador quimioluminiscente, proporcionando de este modo un tiempo de emisión comprimido que un tiempo de emisión estándar sin tensioactivos. Tal tiempo de emisión comprimido puede ser comparable al del cloruro de cetiltrimetilamonio. Por ejemplo, el tiempo de emisión comprimido puede ser más corto (por ejemplo, aproximadamente

un 20 %, aproximadamente un 30 % o aproximadamente un 50 % más corto) que el del cloruro de cetiltrimetilamonio. En una realización, el tensioactivo de la presente invención puede ser tan eficaz como el cloruro de cetiltrimetilamonio para mejorar el rendimiento total de luz del marcador quimioluminiscente.

5 En algunas realizaciones, el método puede incluir además mejorar la quimioluminiscencia de dicho marcador quimioluminiscente, proporcionando de este modo una mayor emisión de luz que una emisión de luz estándar sin tensioactivos. Tal aumento de la emisión de luz puede ser comparable a la del cloruro de cetiltrimetilamonio. Por ejemplo, dicha emisión de luz aumentada puede ser al menos aproximadamente 2,5 veces mayor en comparación con la emisión de luz estándar sin tensioactivos. En ciertas realizaciones, dicha mejora puede ser de al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 % de la del cloruro de cetiltrimetilamonio. En una realización, el tensioactivo de la presente invención puede ser al menos tan eficaz como el cloruro de cetiltrimetilamonio en la compresión del tiempo de emisión del marcador quimioluminiscente. En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit de inmunoensayo según la reivindicación 2.

15 En diversas realizaciones, cuando está en uso, el tensioactivo de la presente invención puede proporcionar un tiempo de emisión comprimido del marcador quimioluminiscente que un tiempo de emisión estándar sin tensioactivos. Dicho tiempo de emisión comprimido puede ser comparable a (por ejemplo, aproximadamente el mismo o aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 % o aproximadamente un 50 % más corto) que el del cloruro de cetiltrimetilamonio. En ciertas realizaciones, cuando está en uso, el tensioactivo de la presente invención puede exhibir, de forma alternativa o adicional, una mayor emisión de luz del marcador quimioluminiscente en comparación con una emisión de luz estándar sin tensioactivos, tal que el aumento de la emisión de luz puede ser comparable a (por ejemplo, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %) la del cloruro de cetiltrimetilamonio.

25 En resumen, se ha descubierto ventajosamente que los tensioactivos catiónicos degradables, como los que contienen enlaces amida y carbonato escindibles, son al menos tan efectivos como los tensioactivos catiónicos convencionales, tales como CTAC, para mejorar la quimioluminiscencia de los marcadores éster de acridinio ampliamente utilizados. También se descubrió sorprendentemente que los tensioactivos catiónicos degradables pueden ser más efectivos para acelerar la emisión de luz que el CTAC. Los tensioactivos degradables muestran una excelente estabilidad en solución ácida y son alternativas ecológicas al CTAC. Estos tensioactivos también son útiles para mejorar la luminiscencia de otros marcadores, como las sulfonamidas de acridinio. Debido a que las perturbaciones de las reacciones químicas dependen de la capacidad de los tensioactivos para aumentar las concentraciones locales de reactivos y/o alterar la polaridad del medio de reacción, los tensioactivos degradables pueden servir como alternativas benignas a los tensioactivos convencionales para tales aplicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del tensioactivo amida catiónico 1 (Figura 3)

Compuesto ii

35 Ácido palmítico (i, 2,564 g, 10,00 mmoles), tolueno (100 ml) y N,N-dimetiletilendiamina (1,147 ml, 10,50 mmoles) se combinaron y se calentaron a reflujo durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, lo que dio 3,21 g de un sólido ligeramente amarillo. El sólido bruto se recristalizó en acetona seca (75 ml). El producto deseado ii (1,83 g) se obtuvo como cristales con forma de aguja de color blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), 0,87 (t, 3H, J = 6,5), 1,20-1,35 (m, 24H), 1,55-1,70 (m, 2H), 2,17 (t, 2H, J = 7,5), 2,30 (s, 6H), 2,49 (t, 2H, J = 5,5), 3,36 (dt, 2H, J = 5,5, 5,5), 6,25 (s a, 1H). MALDI-TOF MS m/z 327,4 (M + H⁺); HRMS m/z 327,3376 (M + H⁺) (327,3375 calculado).

Compuesto iii

45 El compuesto ii (1,41 g, 4,32 mmoles), acetona (50 ml) y yodometano (0,309 ml, 4,97 mmoles) se calentaron a reflujo a 80 °C bajo una atmósfera de argón durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el sólido blanco precipitado se recogió por filtración. La torta del filtro se lavó con acetona seca (10 ml x 4) y se secó sobre P₂O₅ a alto vacío. El producto deseado iii (1,904 g) se obtuvo como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 0,88 (t, 3H, J = 6,5), 1,21-1,38 (m, 22H), 1,57-1,70 (m, 4H), 2,29 (t, 2H, J = 7,3), 3,42 (s, 9H), 3,78-3,89 (m, 4H), 7,96 (s a, 1H). MALDI-TOF MS m/z 282,36 (M-NMe₃⁺); HRMS m/z 341,3528 (M⁺) (341,3532 calculado).

Compuesto 1

50 El compuesto iii (1,50 g, 3,20 mmoles) se disolvió en etanol absoluto (400 ml) a temperatura ambiente y se añadió resina de cloruro IR-900 (76,2 g, 3,20 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la mezcla se pasó a través de una columna de resina de cloruro IR-900 (80 g prelavado con etanol absoluto). La columna se eluyó con etanol absoluto (600 ml). El eluyente se concentró a presión reducida, lo que dio 1,51 g de un sólido ligeramente marrón. Este material se recristalizó en acetona/etanol anhidro. El producto deseado, el tensioactivo 1

(0,895 g) se obtuvo como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 0,86 (t, 3H, *J* = 6,3), 1,17-1,38 (m, 22H), 1,55-1,68 (m, 4H), 2,27 (t, 2H, *J* = 7,3), 3,43 (s, 9H), 3,70-3,85 (m, 4H), 8,72 (s a, 1H). MALDI-TOF MS *m/z* 282,36 (M-NMe₃⁺); HRMS *m/z* 341,3529 (M⁺) (341,3532 calculado).

Ejemplo 2: Síntesis del tensioactivo de carbonato catiónico 2 (Figura 4)

5 Compuesto v

Una mezcla de dodecanol (**iv**, 2,236 ml, 10,00 mmoles), trietilamina (1,394 ml, 10,00 mmoles) y carbonato de difenilo (2,142 g, 10,00 mmoles) se calentó a 80 °C durante 16 horas. A continuación, se añadió 3-dimetilamino-1-propanol (2,366 ml, 20,00 mmoles) y se calentó a 80 °C durante 16 horas adicionales. La mezcla de reacción se concentró luego a presión reducida para dar 3,92 g de un aceite amarillo oscuro. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando metanol/acetato de etilo (1: 9) como eluyente. El producto deseado **v** (2,63 g) se obtuvo como un aceite amarillo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 0,88 (t, 3H, *J* = 6,5), 1,20-1,42 (m, 18H), 1,61-1,71 (m, 2H), 1,87-1,98 (m, 2H), 2,33 (s, 6H), 2,49 (t a, 2H, *J* = 7,0), 4,12 (t, 2H, *J* = 6,5), 4,19 (t, 2H, *J* = 6,3). MALDI-TOF MS *m/z* 316,3 (M + H⁺); HMRS *m/z* 316,2855 (M + H⁺) (316,2852 calculado).

15 Compuesto vi

El compuesto **v** (1,500 g, 4,75 mmoles), acetona (50 ml) y yodometano (0,340 ml, 5,47 mmoles) se combinaron y se calentaron a reflujo durante 6 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el producto deseado precipitó en forma de un sólido de color blanco. Se recogió por filtración y se lavó con acetato de etilo (10 ml x 4). El sólido se secó sobre P₂O₅ a alto vacío. El producto deseado **vi** (1,988 g) se obtuvo como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 0,87 (t, 3H, *J* = 7,0), 1,60-1,72 (m, 18H), 2,05-2,34 (m, 2H), 3,49 (s, 9H), 3,76 (t, 2H, *J* = 7,3), 4,12 (t, 2H, *J* = 6,5), 4,29 (m, 2H). MALDITOF MS *m/z* 316,3 (M + H⁺); HMRS *m/z* 316,2855 (M + H⁺) (316,2852 calculado).

20 Compuesto 2

El compuesto **vi** (1,50 g, 3,28 mmoles) se disolvió en etanol absoluto (200 ml) a temperatura ambiente y se añadió resina de cloruro IR-900 (78 g, 328 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la mezcla se pasó a través de una columna de resina de cloruro IR-900 (80 g prelavado con etanol absoluto). La columna se eluyó con etanol absoluto (400 ml). El eluyente se concentró a presión reducida, lo que dio 1,5 g de un sólido blanco. El producto bruto se recristalizó en acetona anhidra. El producto deseado **2** (0,637 g) se obtuvo como un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) 0,86 (t, 3H, *J* = 6,5), 1,60-1,70 (m, 18H), 2,18-2,30 (m, 2H), 3,49 (s, 9H), 3,72 (t, 2H, *J* = 7,8), 4,11 (t, 2H, *J* = 6,8), 4,25 (m, 2H). HRMS *m/z* 330,3013 (M⁺) (330,3008 calculado).

Ejemplo 3: Mediciones de quimioluminiscencia

30 Para estudiar el impacto de los tensioactivos catiónicos degradables en la quimioluminiscencia del éster de acridinio, Se seleccionaron dos tensioactivos catiónicos de ejemplo que contienen enlaces escindibles (Figura 2A). Las concentraciones micelares críticas (CMC) de los dos tensioactivos se muestran en la Figura 2A. Los esquemas sintéticos para los dos tensioactivos se ilustran en las Figuras 3-4 y se describen en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. 35 Ambos tensioactivos se disolvieron en el Reactivo 1 (ácido nítrico 0,1 M que contiene peróxido de hidrógeno al 0,5 %) a cinco veces sus CMC indicadas en agua. Se usó CTAC disuelto en el Reactivo 2 (NaOH 0,25 M) como el tensioactivo de control. Los dos tensioactivos catiónicos de carbonato y amida (Figura 2A) se disolvieron en el Reactivo 1 para preservar la estabilidad, especialmente durante el almacenamiento a largo plazo (Stjernerahl y Holmberg, J. Colloid e Interface Sci., 2005, 291, 570-576). Tres ésteres de acridinio (Figura 2B, compuestos 3a, 3b y 3c) se usaron para hacer conjugados de proteínas de un anticuerpo anti-TSH (TSH = hormona estimulante del tiroides) como se describe 40 en la literatura (Natrajan et al., Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 5092-5103; Natrajan et al., Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 3432-3447). Los conjugados contenían aproximadamente 5 marcadores. Los conjugados se almacenaron a 4 °C en tampón y se midió la quimioluminiscencia de cada conjugado en ausencia de tensioactivo y en presencia de CTAC, así como tensioactivos catiónicos 1 y 2 (Tablas 1-3, Figuras 5-7). La capacidad de cada tensioactivo para (a) aumentar la salida de luz total y (b) acelerar la cinética de emisión se evaluó durante un período de 80 días.

45 La quimioluminiscencia de conjugados de anticuerpos anti-TSH de ésteres de acridinio **3a**, **3b** y **3c** (Figura 2B) se midieron en un luminómetro Autolumat LB953 Plus de Berthold Technologies. Los conjugados, ~ 2 mg/ml que contiene aproximadamente cinco marcadores, se diluyeron en serie 10⁵ veces para mediciones de quimioluminiscencia en un tampón acuoso de 10 mM de hidrógeno fosfato disódico, NaCl 0,15 M y azida de sodio 8 mM y seroalbúmina bovina (BSA) 0,015 mM, pH 8,0. Se dispensó un volumen de 0,010 ml de cada muestra de éster de acridinio diluido en el fondo de una cubeta. Se colocaron las cubetas en el LB953 cebado y se inició la reacción de quimioluminiscencia con la adición secuencial de 0,3 ml de Reactivo 1, una solución de peróxido de hidrógeno al 0,5 % en ácido nítrico 0,1 M seguido de la adición de 0,3 ml de Reactivo 2, una solución de hidróxido de sodio 0,25 M. Para mediciones en presencia de CTAC, el tensioactivo (7 mM) se incluyó en el reactivo 2. Para mediciones en presencia del tensioactivo de amida catiónica **1** o el tensioactivo de carbonato catiónico **2**, cada tensioactivo se disolvió en el Reactivo 1 a 3,2

mM (tensoactivo **1**) y **2** 15 mM (tensoactivo **2**). Cada curva flash de quimioluminiscencia se midió en 240 intervalos de 0,5 segundos (120 segundos de tiempo total). Cada reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo un mínimo de tres veces, se promedió y se convirtió en un porcentaje de la quimioluminiscencia acumulada hasta cada intervalo de tiempo. La salida del instrumento luminómetro se expresó como U.L.R (Unidades Relativas de Luz).

5 Los resultados en las Tablas 1-3 ilustran que los tensoactivos catiónicos **1** y **2** que contienen enlaces amida y carbonato escindibles respectivamente, son al menos tan efectivos como CTAC no solo para aumentar el rendimiento total de luz de los conjugados de éster de acridinio sino también para comprimir los tiempos de emisión. Por ejemplo, para los tres conjugados de éster de acridinio, en comparación con el control sin tensoactivo al que se le asignó un rendimiento de luz relativa de uno, el rendimiento total de luz se incrementó aproximadamente 2,5-4 veces para **3a**, 3-5 veces para **3b** y 3-4,5 veces para **3c** (Tablas 1a, 2a y 3a) para CTAC, así como los tensoactivos **1** y **2**. Específicamente, La Tabla 1a muestra que el tensoactivo **2** es tan efectivo como el CTAC dentro de al menos los primeros 10 días para mejorar la quimioluminiscencia (es decir, la cantidad de aumento de la emisión de luz por el tensoactivo **2** es la misma que el CTAC). Incluso el día 80, la cantidad de aumento de la emisión de luz usando el tensoactivo **2** sigue siendo aproximadamente el 80 % (2,8/3,5) de CTAC. De manera similar, la cantidad de aumento de la emisión de luz usando el tensoactivo **1** es de aproximadamente el 89 % (3,1/3,5) el día 1 y el 74 % (2,6/3,5) el día 80 en comparación con CTAC. Por tanto, ambos tensoactivos **1** y **2** son comparables a CTAC para mejorar la quimioluminiscencia. Además, los dos tensoactivos catiónicos **1** y **2** demostraron ser bastante estables en el reactivo **1** (peróxido al 0,5 % en ácido nítrico 0,1 M) como se evidencia por la poca pérdida en su capacidad para mejorar la quimioluminiscencia de los conjugados de anticuerpos del éster de acridinio incluso después de 80 días a temperatura ambiente.

Adicionalmente, ambos tensoactivos **1** y **2** fueron muy efectivos para acelerar la emisión de luz de los conjugados de anticuerpos de éster de acridinio (Tablas 1b, 2b y 3b, Figuras 5-7). En ausencia de tensoactivo, se observaron que los tiempos de emisión de > 90 % de luz de los conjugados de **3a**, **3b** y **3c** duraban 57,5 segundos, 49,5 segundos y 62,5 segundos respectivamente. En presencia de CTAC o los dos tensoactivos catiónicos **1** y **2**, los tiempos de emisión se comprimieron a <3 segundos para los conjugados de los tres marcadores de éster de acridinio. De manera sorprendente, los tensoactivos **1** y **2** son más efectivos que CTAC para acelerar la emisión de luz. Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1b, ambos tensoactivos **1** y **2** aceleraron la cinética de emisión del éster de acridinio **3a** de 57,5 segundos a 1,0 segundo, mientras que de CTAC fue 1,5 segundos. La capacidad de los dos tensoactivos catiónicos **1** y **2** para acelerar la emisión de luz no disminuyó incluso después de 80 días de almacenamiento a temperatura ambiente como también se ilustra en los perfiles de emisión de quimioluminiscencia de los conjugados (Figuras 5-7).

EQUIVALENTES

La presente invención proporciona, entre otras cosas, tensoactivos verdes y su uso para mejorar la quimioluminiscencia. Aunque se han tratado realizaciones específicas de la invención en cuestión, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva. El ámbito completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones, junto con su ámbito completo de equivalentes y la especificación, junto con dichas variaciones.

40 Tabla 1a. Mejora observada (cantidad) de la quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3a** (no se asignó a un control de tensoactivo un valor de 1).

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	3,5	3,1	3,5
10	3,6	3,1	3,6
20	4,0	3,4	3,7
40	3,4	2,6	3,2
80	3,5	2,6	2,8

Tabla 1b. Aceleración observada de la cinética de emisión (tiempo de emisión > 90 % en segundos) del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3a** (en ausencia de tiempo de tensoactivo a > 90 % de emisión fue de 57,5 segundos).

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	1,5	1,0	1,0
10	1,5	1,0	1,0

(continuación)

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
20	1,5	1,0	1,0
40	1,5	1,0	1,0
80	1,5	1,0	1,0

Tabla 2a. Mejora observada (cantidad) de quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3b** (no se asignó a un control de tensioactivo un valor de 1).

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	5,3	4,5	5,0
10	5,2	4,4	5,2
20	5,5	4,7	5,2
40	4,2	3,4	3,9
80	4,6	3,4	4,1

5

Tabla 2b. Aceleración observada de la cinética de emisión (tiempo de emisión > 90 % en segundos) del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3b** (en ausencia de tiempo de tensioactivo a > 90 % de emisión fue de 49,5 segundos).

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	1,0	1,0	0,5
10	1,0	0,5	0,5
20	1,0	0,5	0,5
40	1,0	0,5	0,5
80	1,0	0,5	0,5

10

Tabla 3a. Mejora observada (cantidad) de quimioluminiscencia del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3c** (no se asignó a un control de tensioactivo un valor de 1).

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	4,1	3,8	4,2
10	4,3	3,8	4,2
20	4,6	4,1	4,4
40	3,9	3,2	3,7
80	4,0	3,0	3,5

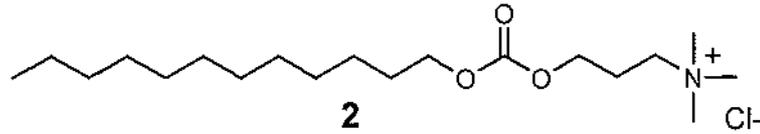
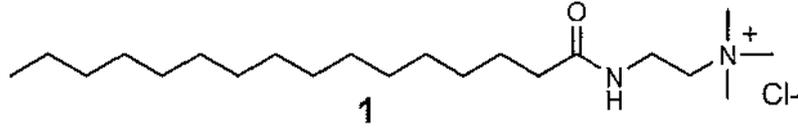
Tabla 3b. Aceleración observada de la cinética de emisión (tiempo de emisión > 90 % en segundos) del conjugado de anticuerpo anti-TSH del éster de acridinio **3c** (en ausencia de tiempo de tensioactivo a > 90 % de emisión fue de 62,5 segundos).

15

Día	CTAC	Amida catiónica 1	Carbonato catiónico 2
1	2,0	2,0	1,0
10	2,0	2,0	1,0
20	2,5	2,0	1,5
40	2,5	2,0	1,5
80	2,5	2,0	1,5

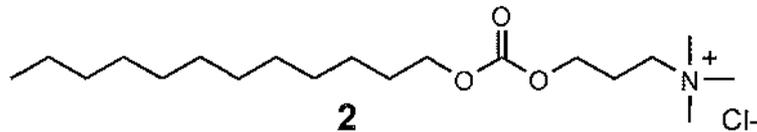
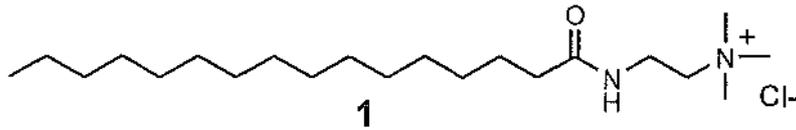
REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la quimioluminiscencia de un marcador quimioluminiscente, que comprende poner en contacto un marcador quimioluminiscente que tiene un éster dimetilfenílico de acridinio o una sulfonamida de acridinio con un ácido y peróxido de hidrógeno en presencia de un tensioactivo catiónico degradable, en el que dicho tensioactivo es el compuesto 1 o 2 o una mezcla de los mismos:



2. Un kit de inmunoensayo que comprende:

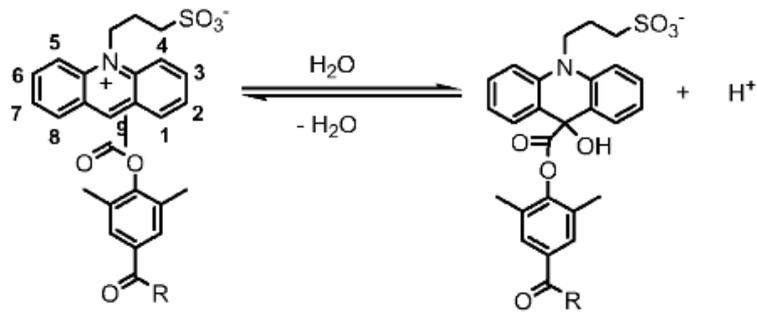
- a) un marcador quimioluminiscente que tiene un éster dimetilfenílico de acridinio o una sulfonamida de acridinio;
 b) un reactivo acidificante que comprende un ácido, peróxido de hidrógeno y un tensioactivo catiónico degradable, en el que dicho tensioactivo es el compuesto 1 o 2 o una mezcla de los mismos:



- y
 c) un reactivo básico que comprende hidróxido alcalino.

3. El kit de la reivindicación 2, en el que el ácido es ácido nítrico y el hidróxido alcalino es hidróxido de sodio.

A



B

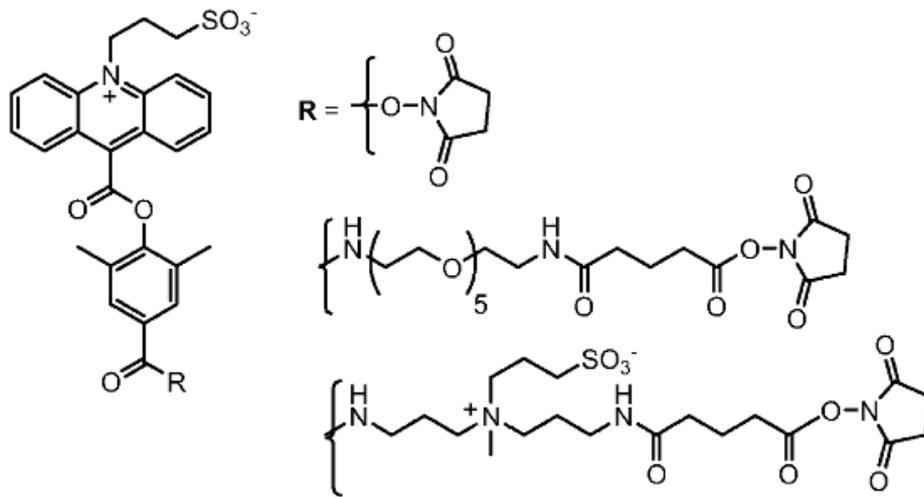
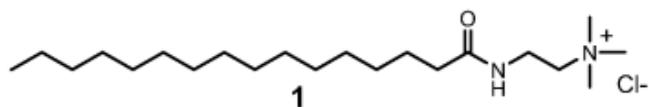
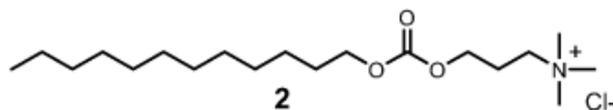


Figura 1

A



tensioactivo catiónico con enlace amida escindible, CMC= 0,64 mM



tensioactivo catiónico con enlace carbonato escindible, CMC= 0,43mM para la sal de yoduro

B

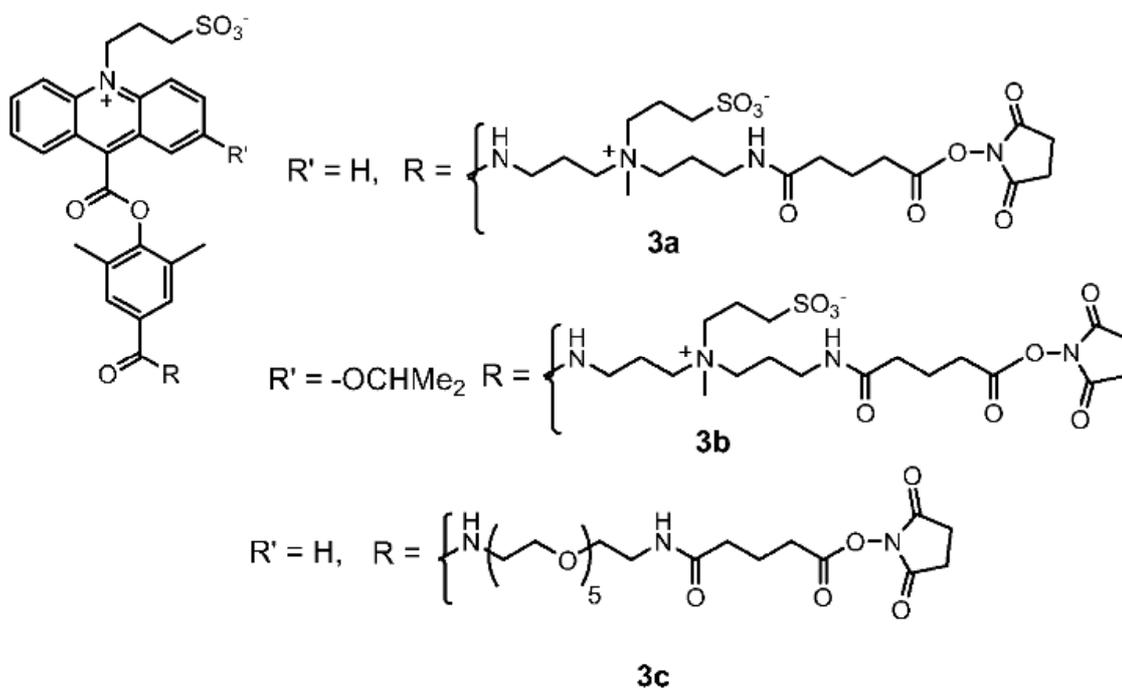


Figura 2

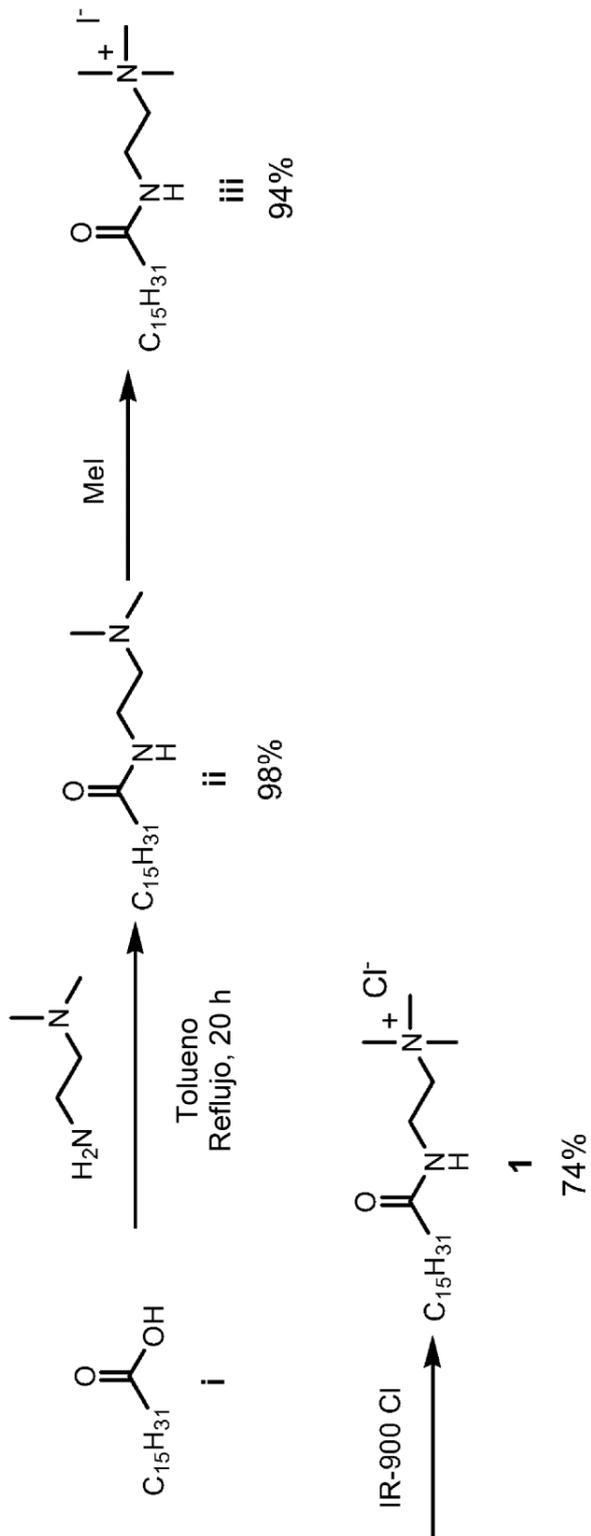


Figura 3

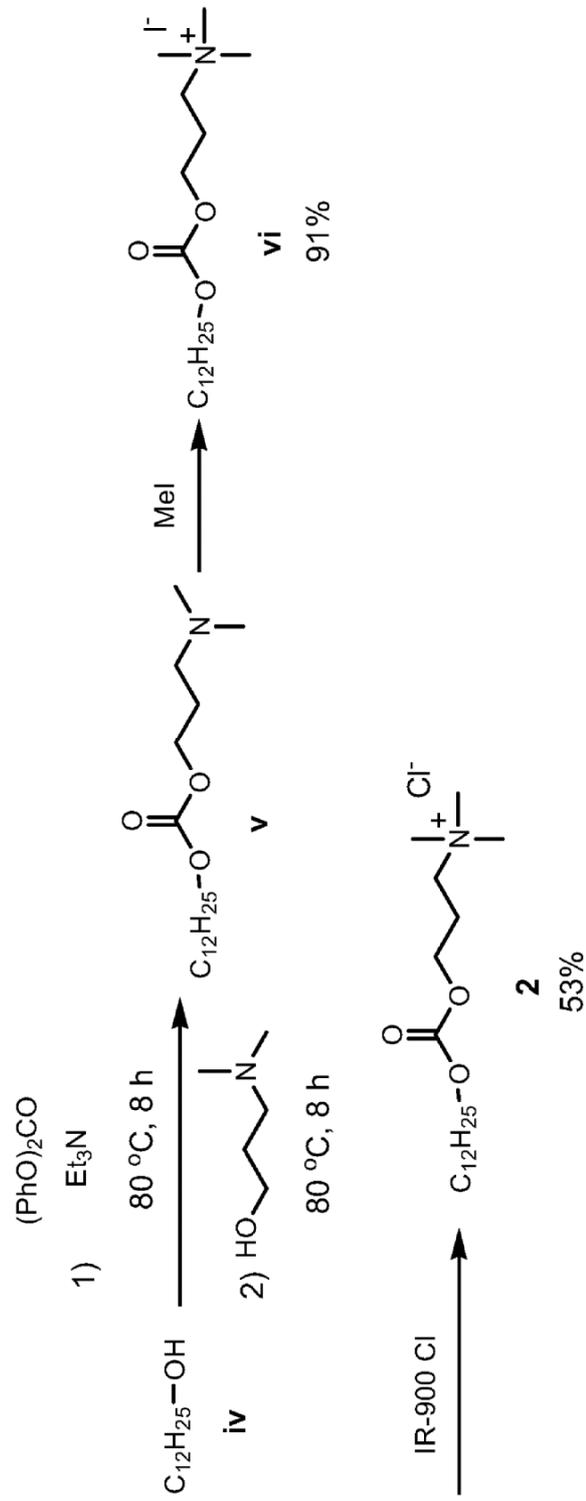


Figura 4

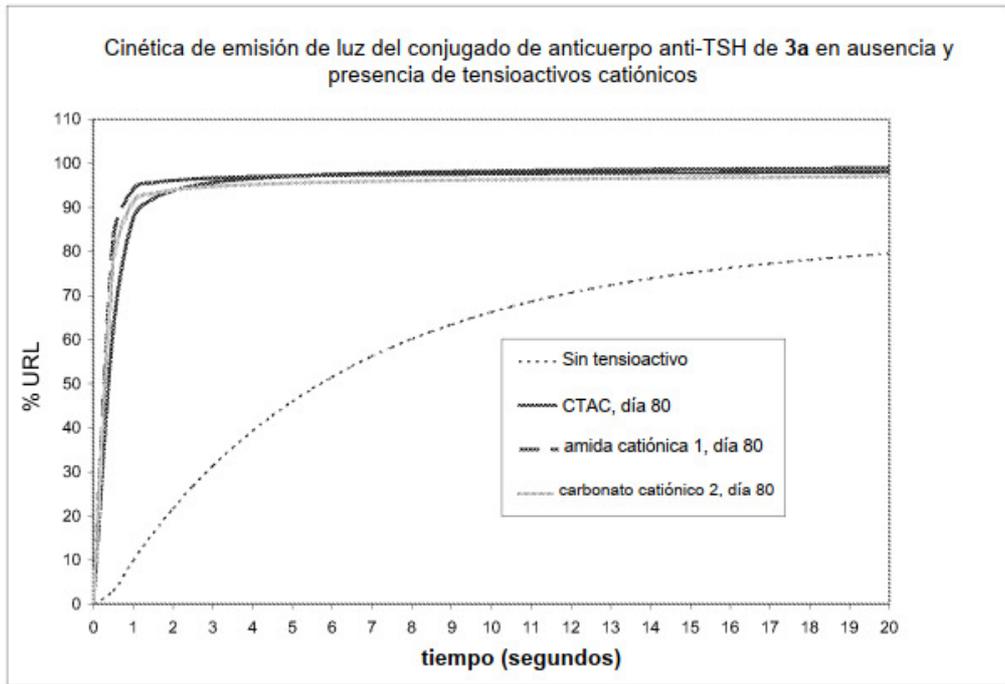


Figura 5

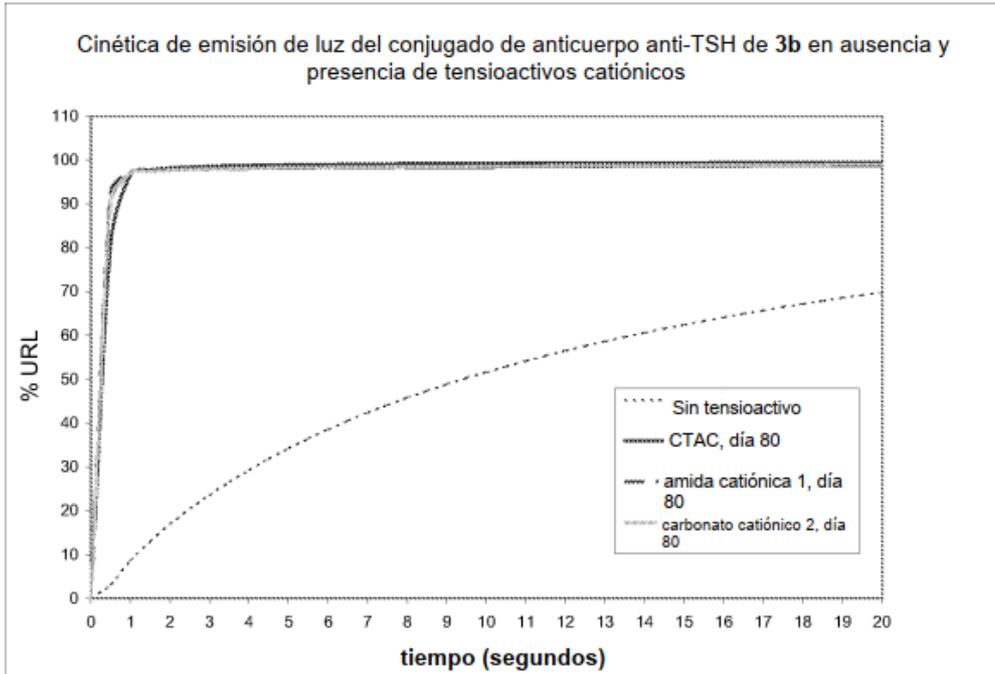


Figura 6

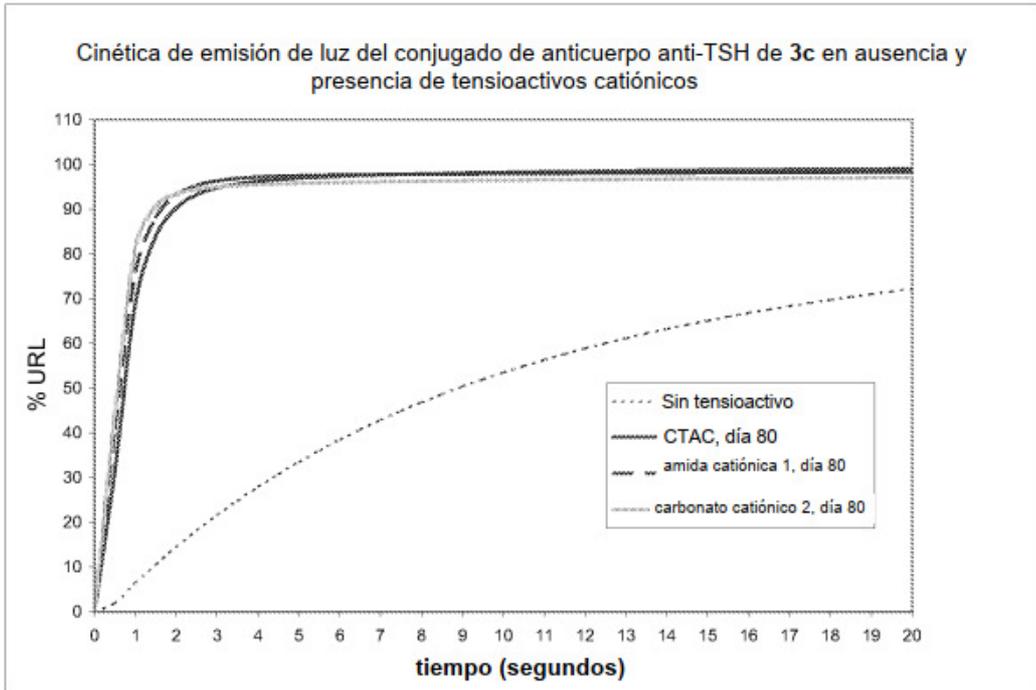


Figura 7