



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 055**

51 Int. Cl.:
C07D 219/04 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99941005 .3**
96 Fecha de presentación : **10.08.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1104405**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2001**

54 Título: **Compuestos de uso acridinio quimiolumiscentes en el infrarrojo cercano y sus usos.**

30 Prioridad: **11.08.1998 US 96073 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2009

73 Titular/es: **Siemens Healthcare Diagnostics Inc.**
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Natrajan, Anand;**
Jiang, Qingping;
Sharpe, David y
Law, Say-Jong

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 320 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de uso acridinio quimiolumiscentes en el infrarrojo cercano y sus usos.

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad bajo el código 35 U.S.C. §119(e) para la solicitud provisional de patente con serial número 06/096.073 presentada el 11 de agosto de 1998, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con nuevos compuestos quimiolumiscentes de acridinio que tienen una emisión máxima cercana a, o en la región del infrarrojo cercano (NIR) (> 590 nm). Se describen aquí los requerimientos estructurales para tales compuestos de acridinio que emiten en una longitud de onda larga. Estos nuevos compuestos de acridinio, cuando se los utiliza junto con ésteres de acridinio que emiten en una longitud de onda corta (con emisión máxima por debajo de 450 nm) deben ser etiquetas de gran utilidad para la detección simultánea de múltiples analitos objetivo en inmunoensayos o en ensayos de ácido nucleico debido a la extremadamente pequeña o despreciable superposición espectral entre las diferentes etiquetas. Se puede lograr una separación óptica efectiva y verdadera de las dos o más señales específicas asociadas con analitos diferentes por medio del uso de filtros ópticos junto con una operación algorítmica única para corrección menor de cualquier nivel bajo de interferencia. Desde un punto de vista práctico, una superposición espectral mínima es por lo tanto el factor clave necesario para la medición simultánea y precisa de diferentes analitos. Una aplicación adicional de los compuestos descritos aquí es en situaciones en las cuales existe interferencia óptica de muestras biológicas a una longitud de onda corta (por debajo de 500 nm). Bajo estas condiciones, estos nuevos compuestos de acridinio deben ser etiquetas alternativas útiles, que permiten la separación óptica de lumiscencia no relacionada con etiquetas de una señal específica de quimiolumiscencia generada a partir del complejo de enlazamiento. Finalmente, los compuestos de acridinio de longitud de onda larga utilizados junto con detectores tales como las cámaras CCD ofrecen el potencial para una mayor sensibilidad del ensayo ya que estos detectores son notoriamente eficientes en la lectura de señales de longitud de onda larga.

30 **Antecedentes de la invención**

Los ésteres de acridinio (AE) proporcionan un método extremadamente sensible de detección y son moléculas útiles como señales quimiolumiscentes que han sido muy utilizadas como etiquetas en inmunoensayos y en ensayos de ácido nucleico. Las patentes estadounidenses Nos. 4.745.181; 4.918.192; 5.110.932 describieron primero a los Ésteres de Acridinio Aril Polisustituídos hidrolíticamente estables (PAAE) que son útiles para mediciones analíticas y se convirtieron en los primeros compuestos de acridinio quimiolumiscentes que permitieron que los ensayos de enlazamiento de ligandos reunieran las estrictas condiciones requeridas para comercialización debido a su notable estabilidad. Posteriormente, las patentes estadounidenses Nos. 5.241.070; 5.538.901 y 5.663.074 describieron PAAE nucleofílico útil para el etiquetado directo de diversas moléculas orgánicas que carecen de grupos funcionales nucleofílicos. La utilidad de PAAE fue mejorada adicionalmente con el advenimiento de PAAE Hidrofílico Funcionalizado (patente estadounidense No. 5.656.426) que incrementa el rendimiento de cuantos de PAAE y mejora el desempeño de los compañeros de enlazamiento marcados con PAAE en términos de las relaciones de señal a ruido observadas y de las sensibilidades de diferentes ensayos de enlazamiento. Esto se debió principalmente a la introducción de un grupo hidrofílico en los núcleos de acridinio que incrementó la solubilidad acuosa del compuesto y también incrementó inesperadamente el rendimiento de cuantos en la producción de luz. Adicionalmente, la introducción de grupos ionizables en la fracción fenoxi produjo otra subclase de PAAE hidrofílico (patentes estadounidenses Nos. 5.227.489; 5.449.556 y 5.595.875) que podía ser encapsulada en grandes cantidades en liposomas funcionalizados de biomoléculas con una pérdida extremadamente baja durante un almacenamiento prolongado. La última aplicación mejoró adicionalmente la utilidad de PAAE.

M. Kawaguichi, y colaboradores (Bioluminescence and Chemiluminescence, Proceedings of 9th International Symposium 1996, Ed. Hastings, Kricka and Stanley, John Wiley & Sons, 1997, páginas 480-484) han descrito ésteres de fenil acridinio estabilizados para inmunoensayos de quimiolumiscencia. Se mostró que los derivados de AE con sustituciones adicionales de metilo en C-1, que son opcionales en C-3 del núcleo de acridinio con mono o dimetil sustituciones que hacen juego en las posiciones orto de la fracción fenoxi, tienen excelente estabilidad en solución acuosa.

EP 0324.202 A1 y posteriormente EP 0609.885 A1 describen ambos ésteres de acridinio con grupos funcionales sustituidos en el átomo de nitrógeno del núcleo de acridinio. Esta última solicitud describe además sustituyentes alternativos tal como las fracciones de bifenilo o de naftilo como posibles reemplazos para el grupo fenilo. Se reporta que estos tipos de compuestos de acridinio tienen una emisión máxima a 420 nm.

Mattingly, y colaboradores (patentes estadounidenses Nos. 5.468.646 y 5.543.524) describen sales de acridinio quimiolumiscentes, sus métodos de preparación, sus anticuerpos conjugados, y sus aplicaciones en inmunoensayos. Estas sales de acridinio pertenecen a otra clase de compuestos llamados acridinio sulfonamidas (o N-sulfonilacridinio carboxamidas). Las acridinio sulfonamidas (AS) tienen estabilidades acuosas que son comparables con PAAE. No se reportó emisión máxima para las AS descritas allí. Sin embargo, ya que la misma especie de acridona debe ser generada a partir de ambas clases de estos compuestos durante su reacción con peróxido alcalino, se espera que la máxima emisión para las acridinio sulfonamidas esté en la región azul.

Mattingly, y colaboradores describen y reivindican además las sales análogas quimiolumiscentes de fanantridinio, sus métodos de preparación, sus anticuerpos conjugados, y sus aplicaciones en inmunoensayos, en las patentes estadounidenses Nos. 5.545.739; 5.565.570 y 5.669.819. Adicionalmente, en estas patentes se describe una estructura general de acridinio sulfonamidas que muestra posibles sustituyentes de un grupo Markush en el núcleo de acridinio.

- 5 No se establecieron beneficios particulares acerca de los sustituyentes. Ninguno de los derivados de AS descritos por la estructura general se adecúa a las enseñanzas descritas por la presente invención. Finalmente, las patentes anteriores no describen ningún intento por extender la longitud de onda de emisión de la luz de las acridinio sulfonamidas ni describen ninguna actividad racional de la estructura acerca de cómo se puede lograr esto.
- 10 Los compuestos convencionales de acridinio, tal como aquellos descritos en las patentes y en la literatura anteriormente mencionada, emiten luz máxima aproximadamente en 428 nm por reacción con peróxido de hidrógeno en solución alcalina fuerte. También han sido descritos los compuestos de acridinio que emiten luz de longitud de onda máxima > 500 nm en el estado del arte. Las patentes estadounidenses Nos. 5.395.752; 5.702.887 y 5.879.894 de Law y colaboradores describen ésteres de acridinio de emisión larga (LEAE), donde se emplea un sistema fusionado de
- 15 benzacridinio para extender la longitud de onda de emisión del éster de acridinio. En la solicitud PCT que se encuentra también bajo examen, PCT/IB98/00831, Jiang y colaboradores han extendido más la emisión máxima de PAEE también dentro de la región de 600-700 nm por medio de la utilización del principio de transferencia de energía. Esto implica el acoplamiento covalente de luminóforos con éster de acridinio. Cuando se iniciaron las reacciones quimiolumiscentes de estos conjugados por medio del tratamiento con peróxido alcalino, se observó emisión de luz a longitudes
- 20 de onda largas donde la longitud de onda máxima depende de la estructura del luminóforo.

- EP 0 478 626 B1 y la patente estadounidense No. 5.656.207 de Batmanghelich y colaboradores describe una estructura para un supuesto éster de acridinio que emite luz de longitud de onda larga, en el cual se bosqueja un sistema de conjugación extendida añadiendo un grupo carboxibutadienilo sustituido a un éster de acridinio. Sin embargo, en
- 25 las patentes de Batmanghelich, ni la síntesis de este éster de acridinio ni sus propiedades de emisión fueron descritas para permitir ni para respaldar la reivindicación de máxima emisión de luz de 500-700 nm, como ya se señaló en la solicitud de patente estadounidense con serial No. 08/308.772.

- Otros compuestos quimiolumiscentes que emiten en longitud de onda larga no basados en éster de acridinio, relacionados con 1,2-dioxetanos estables han sido descritos por Bronstein y colaboradores en las patentes estadounidense No. 4.931.223. Dicha patentes describe 1,2-dioxetanos quimiolumiscentes compuestos de grupos funcionales escindibles por enzimas y fluoróforos que emiten luz con diferentes longitudes de onda de emisión. Modalidades específicas preferidas incluyen un dioxetano estable (A) sustituido con acetoxibenzopirano, un dioxano estable (B) sustituido con fosforilo-benzopirano, y un dioxetano estable (C) sustituido por β -galactosiloxi-benzotiazolil-benzopirano. El dioxetano A emite luz una longitud de onda máxima de 450 nm cuando se escinde su grupo acetoxi por medio de una
- 30 esterasa. El dioxetano B emite luz una longitud de onda máxima de 480 nm cuando se escinde su grupo fosforilo por medio de una fosfatasa, mientras que el dioxetano C emite luz una longitud de onda máxima de 515 nm por tratamiento con la enzima β -galactosidasa. La patente proporciona un ejemplo de un análisis por tres canales para la detección simultánea de HSV, CMV, y HPV en un ensayo simultáneo con una sonda de ácido nucleico, utilizando tres filtros
- 35 ópticos de paso de banda angosto para clasificar las diferentes emisiones de color de los dioxetanos anteriormente mencionados. Los niveles de HSV, CMV, y HPV presentes en la muestra fueron correlacionados por el correspondiente brillo de la imagen. Debido a que las tres máximas de emisión de luz son muy cercanas entre sí, la mayor parte de la dispersión de cada espectro de emisión tuvo que ser cortado por los filtros de paso de banda estrecho para remover la señal de las regiones que se superponen. Esto dio como resultado una cantidad utilizable muy pequeña de señal para
- 40 cada componente del ensayo y limitó grandemente la sensibilidad del ensayo y quizás la precisión.

- Edwardsy colaboradores [J. Biolumin. & Chemilumin., 5, 1 (1990)] han reportado otro dioxetano quimiolumiscente, el 3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(7"-acetoxi)naft-2'-il-1,2-dioxetano, que emite luz verde (máximo de 550 nm) con un desplazamiento batocrómico de 90 nm en comparación con su isómero sustituido por 6"-acetoxi. Esto
- 50 se atribuye a la diferente posición del sustituyente acetoxi enzimáticamente escindible que da origen a un sustituyente oxianión responsable de activar la descomposición del dioxetano. Una aplicación similar de los dos compuestos isoméricos de dioxetano para la detección simultánea de diferentes analitos fue sugerida en el artículo.

- En esta invención, describimos el diseño y la síntesis de nuevos compuestos de acridinio que emiten luz con longitud de onda máxima > 590 nm por reacción con peróxido de hidrógeno. Estos compuestos de acridinio contienen algunas características estructurales claves que son críticas para observar emisión de longitud de onda larga. Estos resultados junto con nuestras primeras observaciones descritas en la patente estadounidense No. 5.395.752 proporcionan normas sólidas y experimentalmente verificadas para el diseño y la síntesis de compuestos de acridinio que emiten
- 55 longitud de onda larga.

- Para la medición mejorada de la señal quimiolumiscente de NIR en la presente invención describimos también un analizador semiautomático modificado de lumiscencia en el cual se ha reemplazado el tubo fotomultiplicador insensible al rojo por un detector CCD refrigerado de bajo nivel de ruido del estado del arte utilizado en el modo de recuento de fotones. Comparando las señales cuantificadas obtenidas a partir de los analizadores originales y los modificados
- 60 demostramos una mejora en la actividad específica de un compuesto de acridinio de NIR aproximadamente de 40 veces. El uso de un sistema refrigerado de cámara CCD para la formación de imágenes de la señal quimiolumiscente en la región de longitud de onda corta generada a partir de un compuesto de 1,2-dioxetano, fue descrito por Martin, y colaboradores en J. Biolumin. Chemilumin. 9 (3), 145, 1994. Las aplicaciones que se dice que han sido adaptadas

a este método de formación de imágenes, incluyen diferentes inmunotransferencias y ácidos nucleicos, métodos de ELISA y sistemas de secuenciación de ADN.

5 Resumen de la invención

Esta invención identifica dos grupos de criterios necesarios y suficientes para la observación de una emisión de longitud de onda larga de compuestos de acridinio:

10 Grupo A:

- (a) La creación de un sistema de conjugación extendido por medio de la unión de grupos funcionales apropiados sobre el núcleo de acridinio (requerimiento electrónico).
- 15 (b) Que el grupo funcional unido y la fracción de acridona estén en el mismo plano durante la emisión de la luz (requerimiento geométrico)
- (c) Dicho grupo funcional debe consistir de al menos un anillo aromático y un átomo o grupo donantes de electrones con un par extra de electrones que puedan deslocalizarse fácilmente dentro del sistema n extendido al cual está directamente unido o incorporado el heteroátomo, y establecer una resonancia extendida estable con la fracción carbonilo que quita electrones de la acridona que emite luz. Tal átomo o grupo donante de electrones que existe en la forma de un anión tiene un efecto particularmente fuerte para promover el desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de emisión.

25 Grupo B:

- (a) Una unión directa a una o más de las posiciones C-2, C-4, C-5 o C-7 del núcleo de acridinio, de átomos o grupos donantes de electrones que tienen un par(es) extra de electrones. Las entidades donantes de electrones pueden ser la misma o diferente si se utiliza más de una entidad donante de electrones. Tale átomo o grupo donante de electrones que existe en la forma de un anión tiene un efecto particularmente fuerte para promover el desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de emisión.

35 Para moléculas para las cuales se reúnen los anteriores criterios tales como LEAE, 3-HS-DMAE, y 2-hidroxi-DMAE, se espera y se observa una emisión de longitud de onda larga que excede los 500 nm y alcanza la región del NIR.

Preferiblemente, la utilidad de un AC en el NIR en el rendimiento comparable de cuantos con respecto a los compuestos de acridinio convencionales, va a la par con el empleo de un detector de lumiscencia de buena hasta excelente eficiencia de detección. Para lograr una detección eficiente de la señal en el NIR y facilitar la realización de ensayos de diagnóstico, un objetivo adicional de la presente invención es el avance de un concepto y la realización de la sustitución de un detector de dispositivo acoplado por carga (CCD) del estado del arte por un tubo fotomultiplicador (PMT) insensible al rojo en un analizador completamente automático o semiautomático convencional tal como MLA-II de Chiron Diagnostics, Walpole, MA.

45

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 describe las intensidades normalizadas de emisión de luz (donde la respuesta máxima para cada espectro es mostrada como 100%) en función de la longitud de onda (en nm) para algunos de los diferentes compuestos que fueron evaluados. (Obsérvese que la cantidad del compuesto evaluado en cada análisis está en el rango aproximadamente de 10 hasta 100 ug. La intensidad de la emisión, siendo una función de la cantidad de compuesto presente, fue normalizada para que la cantidad máxima en el pico en el rango de longitud de onda investigado se fijara en 100). La escala para la Figura 1F está marcada en forma ligeramente diferente, pero aún así se la debe interpretar de la misma manera.

55

La Figura 2 muestra la estructura de compuestos selectivos mencionados en esta patente.

La Figura 3 muestra los resultados del Ensayo TSH discutidos en el Ejemplo 14.

60

La Figura 4 es un diagrama esquemático del Ensayo de Sonda para Doble Analito descrito en el Ejemplo 16.

La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de hibridación para el gen de resistencia a la Vancomicina A discutido en el Ejemplo 16.

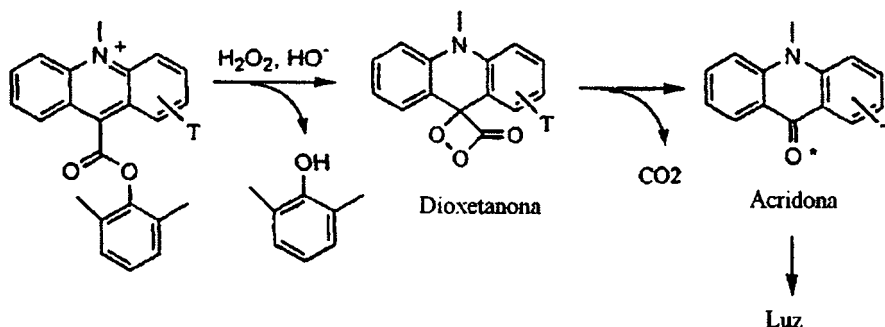
65

La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de hibridación para el gen de resistencia a la Vancomicina B discutido en el Ejemplo 16.

Descripción detallada de la invención

La reacción de quimioluminiscencia de un PAEE se activa por medio de peróxido de hidrógeno en solución alcalina fuerte (ver la figura más abajo). La especie que emite luz es la acridona que se forma en un estado electrónico excitado durante la descomposición química (mediada por peróxido) del éster de acridinio a través de un intermediario putativo y altamente tensado e inestable de dioxetanona. (Debe observarse que se puede utilizar cualquier compuesto químico que libere peróxido divalente, por ejemplo, peróxido de sodio o cualquier sal bivalente de peróxido).

La emisión de luz se presenta cuando esta acridona excitada se devuelve a su estado basal. La energía (longitud de onda) de la luz emitida depende de la diferencia de energía entre el primer estado excitado y el estado basal, que a su vez está determinado por la estructura específica de las acridonas con diferentes grupos funcionales T.



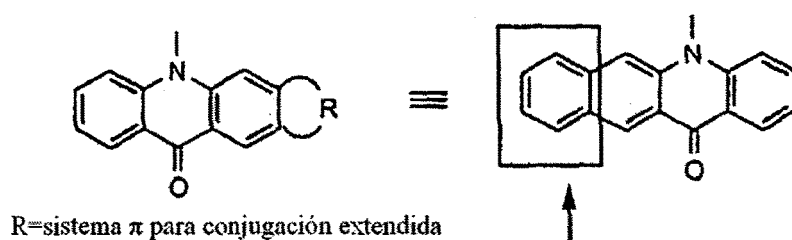
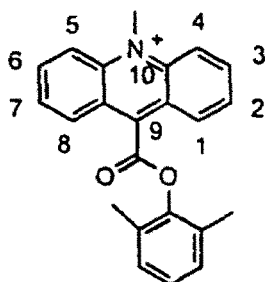
Es evidente que con el propósito de observar emisiones de longitud de onda larga de ésteres de acridinio y derivados (por ejemplo, acridinio sulfonamidas), se debe reducir la brecha de energía entre los estados excitado y basal de la correspondiente acridona. Normalmente, un sistema conjugado extendido disminuye la brecha de energía para la molécula en cuestión. Para los compuestos de acridinio, por lo tanto, se requiere la unión de una función adecuada al núcleo de acridinio en una posición crítica del anillo de tal manera que se cree un sistema conjugado extendido. Se predice que esto da como resultado un desplazamiento en las propiedades de emisión de la acridona correspondiente hasta longitudes de onda más largas.

Un segundo requerimiento igualmente crítico, que se relaciona con la conformación (geometría), es que el sistema conjugado extendido debe permanecer, todo el tiempo, en el mismo plano con el sistema π de la acridona de tal manera que sobre todo la estructura plana de la especie que emite luz sea en realidad la única conformación más energéticamente favorecida de la molécula. Si tal geometría es energéticamente desfavorable, o si la molécula puede asumir también otras conformaciones no planas, entonces o bien no es posible la emisión de longitud de onda larga, o el espectro de emisión resultante cubrirá un rango tan amplio que la utilidad del compuesto será cuestionable como una etiqueta en el ensayo simultaneo de múltiples analitos.

Los sitios más convenientes así como los más críticos para la modificación de los compuestos de acridinio son C-2 (C-7) y C-3 (C-6). En LEAE, el grupo funcional unido responsable por la emisión de longitud de onda larga es un anillo aromático fusionado en una forma lineal tanto a C-2 como a C-3. Asiendo lo así, se asegura un sistema π extendido completamente plano y la molécula queda permanentemente bloqueada en la conformación plana de menor energía. Por lo tanto, LEAE, en su reacción quimioluminiscente con peróxido de hidrógeno, emite luz a 520 nm, una extensión de 92 nm a partir del máximo de emisión de los compuestos convencionales de acridinio. En contraste, los AE carboxibutadienil sustituidos fallan en lograr un máximo de emisión de 510 nm como lo reivindican Batmanghelich y colaboradores. Esto es aparentemente debido a la inhabilidad de la molécula para cumplir con la regla de estar en un solo plano para una deslocalización efectiva del electrón a lo largo del sistema π completo. Como resultado, los AE de 3-carboxibutadienilo únicamente muestran un máximo de emisión de 464 nm, una extensión de únicamente 36 nm a partir del máximo de emisión del éster de acridinio original como se demuestra en la patente estadounidense No. 5.879.894. Permanece una extensa superposición espectral de emisión entre el AE de 3-carboxibutadienilo y el AE original.

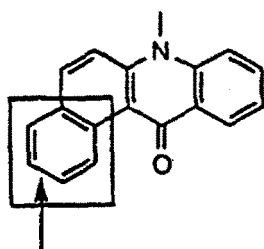
En el caso de sistemas aromáticos de éster de acridinio fusionados al anillo, queremos hacer hincapié también en la importancia de la linealidad a lo largo de un eje horizontal del sistema π completo para una extensión efectiva del máximo de emisión. Los anillos aromáticos fusionados en una forma angular al núcleo de acridinio en las posiciones C-1 (C-8) y C-2 (C-7), por ejemplo, extienden el máximo de emisión únicamente mínimamente desde 428 hasta 440 nm (ver, la patente estadounidense No. 5.395.752), haciendo muy difícil discernir la diferencia en el espectro de emisión entre el PAEE angular fusionado a un anillo aromático y el PAEE progenitor, cuando sus quimioluminiscencias se presentan ambas en el mismo tubo.

Sistema de Numeración para Núcleos de Acridinio



Un anillo aromático linealmente fusionado no puede desviarse del plano y efectivamente incrementa la longitud de onda de emisión

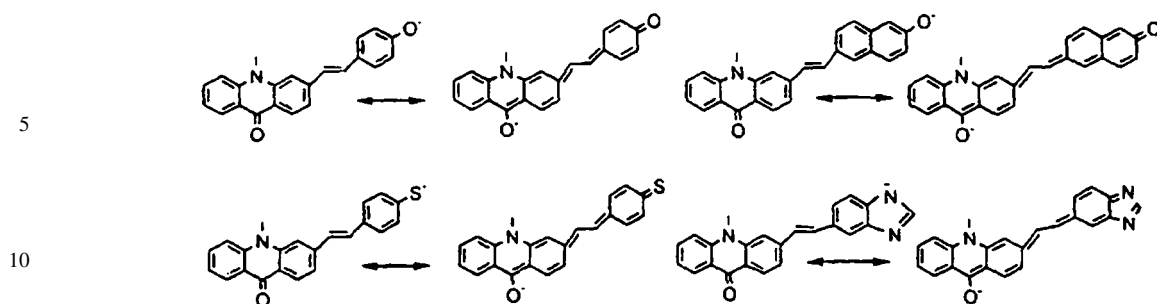
→ Máximo de emisión 524 nm



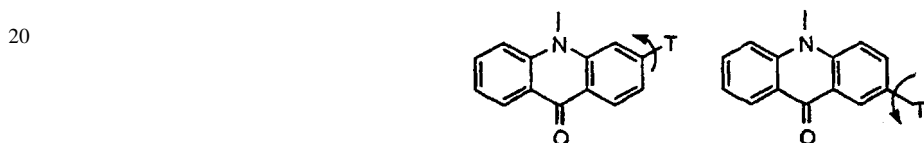
Anillo aromático fusionado en forma angular → El sistema de conjugación extendida contribuye poco al incremento de la longitud de onda de emisión:

Máximo de emisión: 440 nm.

Un modo alternativo de crear un sistema conjugado extendido de acuerdo con la presente invención involucra la unión en un solo punto del grupo funcional requisito (T) a una de las posiciones en el perímetro (C1-C4) del núcleo de acridinio. Dicho grupo funcional debe portar al menos un átomo o un grupo donante de electrones con un par extra de electrones que pueden deslocalizarse fácilmente dentro del sistema de conjugación extendido del núcleo de AE al cual se une directamente o se incorpora el átomo o el grupo donante de electrones. El átomo donante de electrones involucrado en tales arreglos estructurales incluye a los comúnmente encontrados, oxígeno, azufre, y nitrógeno que aparece, por ejemplo, en el estirenilóxido, tiofenóxido, naftóxido, indol, benzimidazol, benzotriazol, benzotiazol, y otros numerosos sistemas aromáticos heterocíclicos. A continuación se muestran algunas estructuras de resonancia para ilustración de la intervención del par de electrones en los sistemas de conjugación extendidos.

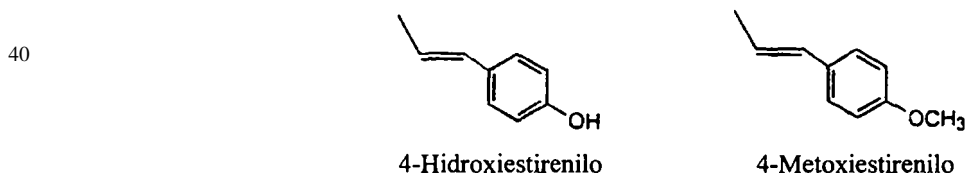


15 En el modo en donde se utiliza un punto único de unión ya sea a C-2 o a C-3, a diferencia de LEAE, puede ocurrir ahora rotación molecular alrededor del enlace que conecta la acridona. Por lo tanto, la longitud de onda de la luz emitida a partir de la acridona correspondiente dependerá de si la acridona y R están en el mismo plano o no.



25 La rotación alrededor del enlace indicado puede romper la planaridad de los dos sistemas π

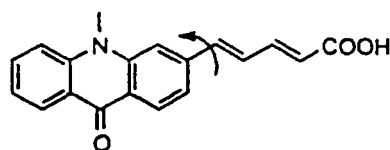
30 Para determinar si la unión de tal grupo funcional con las posiciones en el perímetro (C1-C4) del núcleo de acridinio es una aproximación viable para crear ésteres de acridinio que emiten a una longitud de onda larga, sintetizamos y evaluamos las propiedades de emisión de los ésteres de acridinio que contienen un grupo 4-hidroxiestirenilo (4-HS-) y un grupo 4-metoxiestirenilo (4-MS-) tanto en C-2 como en C-3 (Esquemas 1 y 2). Se escogió la posición C-3 como representativa de las posiciones de C-1 y de C-3, las cuales permitirían que el átomo o el grupo donante de electrones de T participe en resonancia de rango largo con la fracción de carbonilo de la acridona. En forma similar, la posición C-2 es representativa de las posiciones C-2 y C-4, las cuales no permitirían lo mismo.



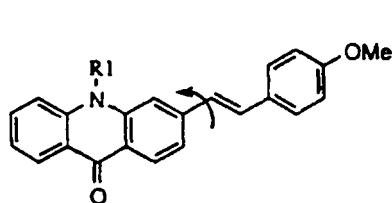
50 Ambos grupos funcionales contienen al sistema de conjugación extendida de la fracción estirenilo con un átomo de oxígeno unido a la posición para del anillo aromático. Los dos grupos funcionales, sin embargo, difieren en la facilidad con la cual son capaces de deslocalizar un par de electrones desde el oxígeno hasta el sistema π del estirenilo. En medio alcalino, el grupo 4-HS-, después de la desprotonación forma el anión fenóxido que es fuertemente donante de electrones y puede deslocalizar fácilmente su par extra de electrones dentro del sistema π al cual está unido. Para el grupo 4-MS-, ya que el oxígeno del éter no puede ser desprotonado, tal mecanismo para donación de electrones no es posible. Mientras que es posible escribir una estructura de resonancia por medio de la cual incluso el oxígeno del éter en el grupo 4-MS- dona un par de electrones n al sistema π unido, esto implica crear una carga positiva sobre el oxígeno del éter. Se espera por lo tanto que esta contribución a la resonancia sea de alta energía y probablemente por lo tanto haga únicamente una contribución mínima a las propiedades electrónicas de todo el sistema π . Los resultados de los estudios que vienen a continuación se anticipan a dar relevancia directa a las propiedades de emisión del éster de acridinio reportado, 3-carboxibutadienilo, y en proporcionar un protocolo no ambiguo en términos de cuál de las características estructurales necesarias es la que realmente es responsable de extender el máximo de emisión del éster de acridinio en la región de 500-700 nm.

65 Las síntesis de los análogos sustituidos de C-2 se muestran en el Esquema 2. La isatina fue N-alkilada con 2-(4-bromofenil)-1,3-dioxolano como se describe en la solicitud de patente estadounidense serial No. 08/308.772. la isatina N-alkilada fue reordenada hasta el correspondiente derivado de acridina por medio de reflujo en KOH al 10% [Zomer y colaboradores, en "Synthesis, Chemiluminescence, and Stability of Acridinium Ester Labeled Compounds", Pract. Spectrosc. 1991, 12 (Lumin. Tech. Chem. Biochem. Anal.), 505-21]. La hidrólisis del dioxolano produjo el 2-carboxaldehído que fue condensado con la molécula neutra con cargas positivas y negativas sobre átomos adyacentes

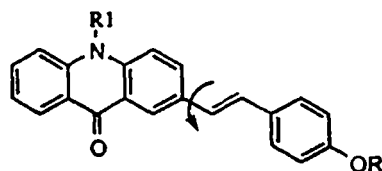
- ya sea del cloruro de 4-benziloxibencilfosfonio o el cloruro de 4-metoxi-benciltrifenilfosfonio. En ambos casos, la reacción de Wittig produjo una mezcla de olefinas E y Z. se observó que la olefina E era más estable en cada caso y podía aislarse pura después de cromatografía. Sin embargo, no se podía aislar el isómero Z puro debido a que en cada caso, el compuesto sufrió isomerización completa o parcial durante la purificación. En consecuencia, únicamente se
- 5 elaboró adicionalmente en cada caso el isómero E. Se alquiló el nitrógeno de acridina ya sea con metil trifluorometano sulfonato (análogo de 4-hidroxifenilo) ó 1,4-butano sulfona (análogo de 4-metoxifenilo). Se removió el éster bencílico para liberar el ácido libre que fue luego convertido en el éster de N-hidroxisuccinimida utilizando dicitclohexil carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.
- 10 La síntesis de los análogos sustituidos en posición 3 se logró en forma similar (Esquema 1) excepto porque se utilizó el 2-(3-bromofenil)-1,3-dioxolano para alquilar isatina. Esto garantiza que el carboxaldehído se introduzca en C-3 en el núcleo de acridina.
- Se prepararon también conjugados de proteína de los ésteres de acridinio como se describe en los ejemplos 8-13.
- 15 Se registró el espectro de emisión de quimiolumiscencia de los ésteres de acridinio sintetizados y de los conjugados de proteína utilizando una cámara Spectrascan. Los resultados se muestran en la Figura 1 que describe las intensidades normalizadas de emisión de luz en función de la longitud de onda para los diferentes compuestos que fueron evaluados.
- 20 Los resultados en la Figura 1 muestran diferencias dramáticas en la longitud de onda de la luz emitida por los diferentes compuestos. 3-HS-DMAE, que contiene una fracción 3-(4-hidroxiestirenilo) muestra una emisión de longitud de onda larga con un máximo centrado ~ en 690 nm. La conjugación de esta molécula con BSA desplaza su máximo de emisión hasta ~ 610 nm. Este desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión se puede atribuir al efecto del solvente, ya que el espectro de emisión del compuesto libre fue medido en un medio que contiene aproximadamente
- 25 42% de solvente orgánico para garantizar solubilidad completa, mientras que el conjugado de proteína fue medido en un medio completamente acuoso debido a la incompatibilidad de la proteína con el solvente orgánico. En forma similar, NSB-3-MS-DMAE mostró un desplazamiento hipsocrómico ~ de 66 nm cuando se registró su espectro en agua en contraposición ya sea a DMF o a acetronitrilo. También se han registrado los cambios en el máximo de emisión de los compuestos de acridinio que dan lugar a los mismos, emiten luz azul, N-metilacridona, en función de la mezcla de solventes utilizada. McCapra y colaboradores. [Tetrahedron Letters No. 43, 3167, (1964) y Photochem. & Photobiology, 4, 1111, (1965)] reportaron un máximo de emisión de 442 nm para una cantidad de sales de acridinio en alcohol acuoso al 80%, mientras que nosotros observamos previamente un máximo de emisión de 426-430 nm para DMAE en DMF al 42%. Otro ejemplo de un desplazamiento hipsocrómico influenciado por el solvente fue observado
- 30 entre N-sulfopropil-DMAE libre, que emite a 424 nm en DMF al 42% versus el conjugado N-sulfopropil-DMAE-BSA que muestra una emisión máxima a 420 nm en un medio completamente acuoso. En general, las etiquetas de éster de acridinio, cuando destellaban en un medio rico en solvente orgánico, producirán un máximo de emisión más largo que en ambiente ricos en agua o completamente acuosos. La diferencia en el máximo observado varía aproximadamente desde 4-12 nm en el caso de los AE de emisión más corta hasta aproximadamente 80 nm como se observa en el caso presente de AE en NIR, que parece ser más susceptible a los efectos del solvente. Un conjugado similar de BSA, con la versión hidrofílica del AE en NIR llamada NSB-3-HS-DMAE, tiene un sustituyente de N-sulfobutilo en vez de un grupo metilo en el nitrógeno del anillo del núcleo de acridinio. Este conjugado también muestra una emisión de longitud de onda más larga a 620 nm. Obsérvese que para uso práctico en ensayos de enlazamiento, los únicos máximos de emisión relevantes son aquellos obtenidos en un ambiente completamente acuoso.
- 35 En un contraste agudo con los compuestos y conjugados anteriores, el éster de acridinio llamado NSB-3-MS-DMAE, que contiene una fracción de 3-(4-metoxiestirenilo), muestra emisión de luz con una longitud de onda más corta (455-460 nm) ya sea como la etiqueta libre o cuando está conjugada con una proteína.
- El éster de acridinio, NSB-2-MS-DMAE, como el análogo 3, también muestra una emisión relativamente corta de longitud de onda a 454 nm. El éster de acridinio 2-HS-DMAE, a diferencia del isómero 3, se encontró que emite luz en un amplio rango de 450 a 700 nm. Cuando se conjugó este compuesto con BSA, su emisión de luz fue a una longitud de onda relativamente corta (482 nm).
- 40 Además de los compuestos de acridinio estirenil sustituidos, preparamos un éster de acridinio en donde una fracción de 4-hidroxifenilo está directamente unida a C-3 del núcleo de acridinio (Esquema 3). Se encontró que este compuesto llamado 3-hidroxifenil-DMAE (3-HP-DMAE) tiene un máximo de emisión en 594 nm. Sin embargo, se observó que el espectro de emisión de 3-HP-DMAE cubre un rango amplio de aproximadamente 420 nm hasta 780 nm con un máximo múltiple.
- 45 El espectro de emisión en la Figura 1 demuestra claramente que la creación de un sistema de conjugación extendido por enlazamiento de la función apropiada en C-2 o en C-3 del éster de acridinio, por si mismo, es una condición necesaria pero no suficiente para tener emisión de longitud de onda larga. La longitud de onda relativamente corta observada en los espectros de emisión del 3-carboxibutadienil-AE, y en derivados de MS-DMAE sugiere fuertemente que los dos sistemas π (acridona y el 4-metiloxiestirenilo) no están en el mismo plano. En forma similar, para el 2-HS-DMAE, mientras que la etiqueta libre parece mostrar emisión de luz desde un rango de conformaciones de baja energía, su espectro de emisión cuando está unida a proteína sugiere que existe una considerable desviación de la planaridad conjunta de los dos sistemas π .
- 50
- 55
- 60
- 65



Máximo de emisión: 464 nm en solventes mezclados



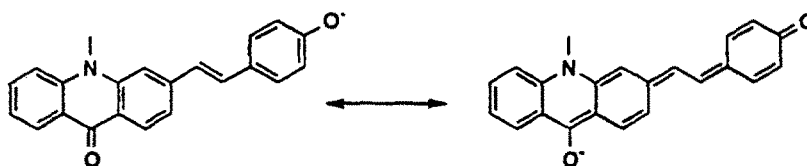
Máximo de emisión:
520 - 522 nm en solventes mezclados
456 nm en medio acuoso



R = H, OMe

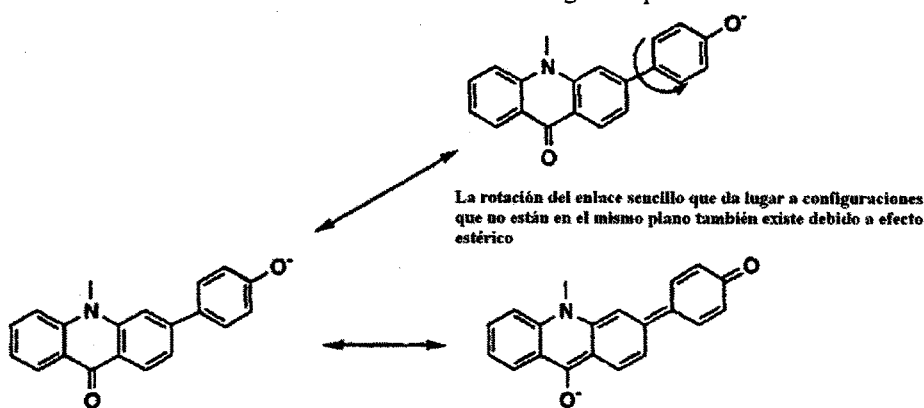
Máximo de emisión:
Muy amplio en solventes mezclados
454 - 482 nm en medio acuoso

Únicamente los derivados de 3-HS-DMAE muestran emisión a una longitud de onda larga. Aunque la rotación alrededor del enlace que conecta a los dos sistemas π es también posible para este compuesto, en pH fuertemente alcalino, la deslocalización de la resonancia de la carga negativa del fenóxido sobre la fracción de carbonilo que quita electrones de la acridona proporciona un fuerte incentivo para que este compuesto permanezca en el mismo plano durante la emisión de luz. Por lo tanto, el sistema conjugado extendido se mantiene y se observa emisión de longitud de onda larga. Un mecanismo similar también opera para 3-HP-DMAE pero aquí los requerimientos estéricos para mantenerse en el mismo plano del sustituyente hidroxifenilo con relación al núcleo de acridinio no son completamente reunidos y por lo tanto la emisión de este compuesto ocurre en un amplio rango de longitudes de onda.



3-HS-Acridona

La deslocalización de la resonancia asegura la planaridad



3-HP-Acridona

La deslocalización de la resonancia asegura la planaridad

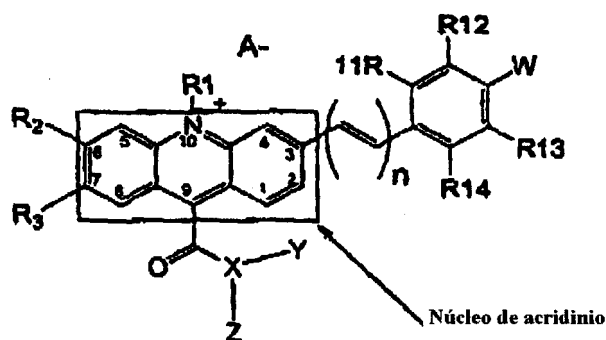
Habiendo observado el efecto dramático de un par extra de electrones en disminuir la energía de sistemas π extendidos para los compuestos de acridinio funcionalizados C-3, examinamos entonces el efecto de la unión directa de un grupo hidroxilo como un representante de átomos o grupos donantes de electrones, al núcleo de acridinio sobre sus propiedades de emisión. Entre los dos grupos de posiciones alternas en el perímetro del núcleo de acridinio, escogimos estudiar la unión a C-2 y a C-3 nuevamente como el representante de las posiciones del grupo A (C-2, C-4, C-5 y C-7) y del grupo B (C-1, C-3, C-6 y C-8), respectivamente. Se espera que los miembros dentro de cada grupo tengan

características de emisión similares debido a que son isómeros con el grupo hidroxilo unido a la posición alterna sobre el núcleo de acridinio. Inesperadamente, encontramos que 2-hidroxi-DMAE, pero no 3-hidroxi-DMAE, es capaz también de emisión de longitud de onda larga (máximo de emisión de 604 nm), a pesar de la ausencia de un sistema de conjugación extendido entre el sustituyente hidroxilo y el núcleo de acridinio.

En soluciones alcalinas fuertes, se espera que este grupo hidroxilo se desprotone. La carga negativa asociada con este oxígeno disminuye así la brecha de energía entre el estado electrónico excitado y el basal de la acridona correspondiente y conduce a una emisión de luz de longitud de onda larga. Describimos por lo tanto otro método nuevo para la creación de ésteres de acridinio que emiten luz en la región del NIR. La estructura del 2-hidroxi-DMAE ha sido incluida en la reivindicación de la sustancia de las patentes estadounidenses Nos. 4.918.192 y 5.110.932 como un PAAE quimiolumiscente hidrolíticamente estable. Se presenta la síntesis de 2-hidroxi-DMAE en la sección de ejemplos de esta solicitud.

A. La invención se relaciona con las siguientes estructuras de Compuestos de Acridinio Quimiolumiscentes en el Cercano Infrarrojo (NIR-AC)

La estructura general de los compuestos de acridinio quimiolumiscentes en el NIR del grupo A de la presente invención se pueden representar esquemáticamente de la siguiente manera:

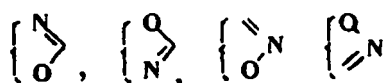
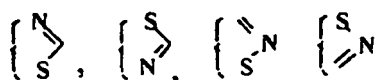
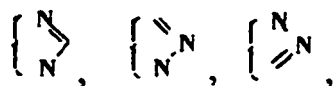
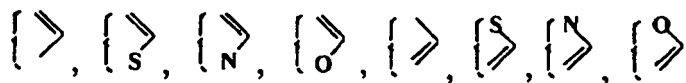
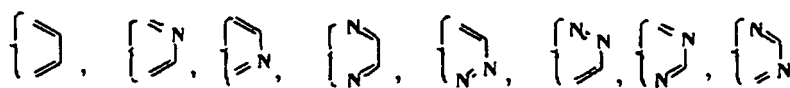


en donde

R₁ es un alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos; preferiblemente R₁ es un grupo metilo o sulfoalquilo.

R₂ y R₃ son idénticos o diferentes, seleccionados entre hidrógeno, R, arilo sustituido o no sustituido (ArR o Ar), haluro, amino, hidroxilo, nitro, sulfonato, -CN, -COOH, -SCN, -OR, -SR, -SSR, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NHR, o -NHC(O)R; A todo lo largo de esta solicitud, se selecciona R del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, y aralquilo que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

Alternativamente, R₂ y R₃ se pueden enlazar, o se pueden unir a través de puentes, como se ejemplifica por medio de las siguientes estructuras, para formar un anillo aromático o no aromático adicional fusionado al núcleo de acridinio unido. (Ver, por ejemplo, la primera estructura en la segunda línea. Si este carbono sp₂ (=C-) está enlazado a R₂ y R₃, resulta un anillo no aromático de 5 miembros). Se debe observar que el anillo puede ser o bien heterocíclico o no heterocíclico, y, por lo tanto, que algunas de estas estructuras resultantes incluyen heteroátomos endocíclicos (esto es, heteroátomos que son parte de la estructura misma del anillo).



Las posiciones periféricas C₂, C₄, C₅ del núcleo de acridinio están opcionalmente sustituidas. n = 1-4, preferiblemente n = 1;

W = un grupo donante de electrones, Preferiblemente un grupo ionizable que puede donar un par de electrones tal como OH, SH, NR'R'', -CH(EWG)_m donde m = 1 ó 2 y EWG es un grupo que quita electrones que incluye pero sin limitarse a -NO₂, -NO, -CN, -CHO, -C(O)R, +NR'R''R''', -COOR, -COOH, -S(O)R, -SO₂R, -SO₂OR, -SO₂NHR, SO₂NR'R'', -SO₂OH o F; R', R'' y R''' son hidrógeno o alquilo inferior y pueden ser todos iguales o diferentes;

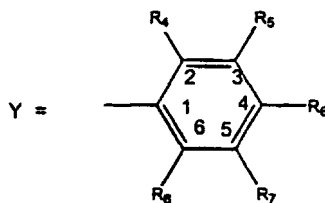
Preferiblemente, W = OH, SH, -NR'R'';

R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ pueden ser iguales a R₂ o R₃; alternativamente, ya sea R₁₁ y R₁₂, o R₁₃ y R₁₄ pueden estar enlazados como en R₂ y R₃ con los ejemplos ya mostrados anteriormente para formar un anillo aromático y/o heterocíclico adicional fusionado al anillo de fenilo unido.

A es un contraión que es introducido para aparearse con el nitrógeno cuaternario del núcleo de acridinio ya sea como resultado de volver cuaternario al nitrógeno del anillo de acridina por medio del uso de agentes de alquilación durante la síntesis, modificación del R₁, o un mecanismo posterior de intercambio que se presenta durante la manipulación de las mezclas de reacción y purificación de los compuestos deseados en una solución o fluido que contiene una cantidad en exceso de otros aniones. Los ejemplos de contraiones incluyen CH₃SO₄⁻, FSO₃⁻, CF₃SO₄⁻, C₄F₉SO₄⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, haluro, CF₃COO⁻, CH₃COO⁻, y NO₃⁻,

X es nitrógeno, oxígeno o azufre;

Cuando X es oxígeno o azufre, se omite Z y Y es una fracción arilo polisustituida de fórmula:



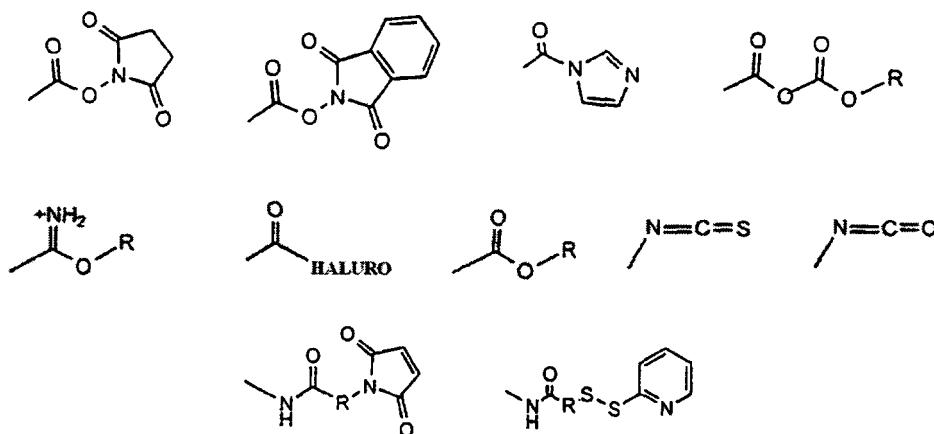
donde

R₄ y R₈ son grupos alquilo, alquenoilo, alquinoilo, alcoxilo (-OR), alquiltiol (-SR), o amino sustituido que sirven para estabilizar el enlace -COX- entre el núcleo de acridinio y la fracción Y, a través de un efecto estérico y/o electrónico; preferiblemente R₄ y R₈ son alquilo inferior, más preferiblemente un grupo metilo, o al menos uno de ellos es como se definió mientras que el otro es un hidrógeno, si la posición C₁ o C₈ del núcleo de acridinio está sustituida con un grupo alquilo inferior, preferiblemente también metilo;

ES 2 320 055 T3

R₅ y R₇ son cualquiera entre R₂ y R₃ definidos anteriormente;

R₆ = -R₉-R₁₀, el sustituyente clave que contiene un grupo funcional necesario para conjugarse con una molécula biológica de interés, donde no se requiere R₉ pero opcionalmente puede ser alquilo de cadena ramificada o lineal, arilo o aralquilo sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos, y R₁₀ es un grupo saliente o un grupo funcional electrofílico unido con un grupo saliente que incluye pero no se limita a:



-SO₂Cl, -N₃, -N₂⁺Cl⁻, un haluro, -COOH

R₁₀ puede ser también -Q-R-Nu, -Q-R-(I)nNu-, -Q-Nu, -R-Nu, o -Nu, donde n es un número de al menos 1, Nu es un grupo nucleofílico, Q es un enlace funcional, I es un grupo iónico o ionizable; se pueden encontrar las definiciones detalladas de Nu, Q, e I en la patente estadounidense # 5.241.070, columna 3, línea 45 hasta la columna 3, línea 16. Las reacciones contempladas para Nu estaban también descritas en la misma patente, columna 3, línea 48 hasta la columna 4, línea 18.

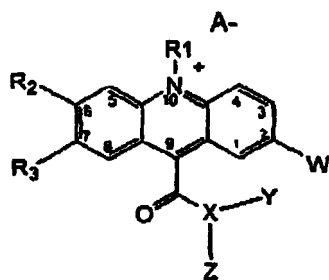
R₅ y R₆, y R₆ y R₇ son intercambiables; y

Quando X es nitrógeno, entonces Z es -SO₂-Y', Y' tiene la misma definición de Y como se describió anteriormente, y ambos pueden ser el mismo o diferente. Adicionalmente, Y por si mismo puede ser un alquilo de cadena ramificada o lineal que contiene opcionalmente hasta átomos de carbono 20, halogenados o no halogenados, o un arilo sustituido, o un sistema de anillo heterocíclico.

Los compuestos del grupo B no forman parte de la presente invención.

Las definiciones de R₁, R₂, R₃, A-, W, X, Y, y Z son las mismas que en la estructura general de los AC en el NIR del grupo A. El resto de las posiciones periféricas de C₃, C₄, C₅ del núcleo de acridinio están opcionalmente sustituidas. R₃ puede ser también lo mismo que W en cuyo caso el éster de acridinio tiene dos grupos donantes de electrones en vez de uno solo. Se espera que los compuestos disustituídos muestren desplazamientos batocrómicos adicionales en sus máximos de emisión sobre sus contrapartes monosustituídas.

La estructura general de los compuestos de acridinio quimiolumiscentes en el NIR del grupo B se pueden representar esquemáticamente de la siguiente manera:



B. Moléculas Biológicas etiquetadas con AC en el NIR

Los AC en el NIR funcionalizados con los grupos funcionales químicamente reactivos mencionados anteriormente y sus derivados obvios se pueden acoplar covalentemente, ya sea directa o indirectamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de un entrelazador o de un espaciador (como ya se describió en la patente estadounidense No. 5.656.426, y se incorporó aquí como referencia) a:

- (a) biomoléculas orgánicas pequeñas, haptenos o ligandos tales como las hormonas tiroideas, esteroides, vitaminas, antibióticos, cofactores enzimáticos, drogas terapéuticas, metabolitos, lípidos, neurotransmisores, o sustancias químicas controladas,
- (b) macromoléculas tales como proteínas bioactivas (incluyendo avidina, anticuerpos, proteínas que enlazan ADN, enzimas, histonas, y otras), polisacáridos, oligosacáridos, glicoproteínas, glicosamino glicanos, lecitinas, lipoproteínas, lipopolisacáridos, ARN aislado o intacto, ADN, oligonucleótidos, proteínas, péptidos, proteínas inactivadas, hormonas, antígenos virales, antígenos bacteriales, antígenos eucariotas, proteínas que enlazan inmunoglobulina, toxinas, citoquinas, fragmentos de anticuerpo, o proteínas receptoras,
- (c) entidades biológicas de orden superior tales como virus, bacterias, células eucariotas, y componentes subcelulares tales como ribosomas.

Los enlaces covalentes resultantes tales como amida, urea, y tioéter son solamente unos pocos ejemplos más comúnmente anticipados por las personas capacitadas en el arte. Otros tipos de enlaces posibles que se pueden formar en medio orgánico (por ejemplo, éter, cetona, éster, azo, etc.) o en medio acuoso (por ejemplo, disulfuro) y que están convenientemente registrados en la literatura deben ser considerados obvios en ausencia de una demostración de beneficios inesperados.

Para ilustrar cómo moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, ligandos o haptenos se pueden conjugar con un AC en el NIR para formar trazadores útiles en el enlazamiento de receptores, así como para análisis de inmunodiagnóstico y diagnóstico de ácido nucleico, fue necesario proporcionar evidencia de que las características de emisión en el NIR de AC en el NIR se pueden retener en el trazador. Con este propósito, se describe en la sección de ejemplos la síntesis de un conjugado anti-TSH-3-HS-DMAE, así como una sonda complementaria de oligonucleótido para vancomicina A, conjugada con 2-OH-DMAE. El término ácido nucleico representa oligonucleótidos típicamente sintetizados *in vitro* utilizando química estándar, y pueden ser de ocurrencia natural, por ejemplo ADN o ARN, o pueden ser análogos sintéticos, como se conoce en el arte. Tales análogos pueden ser los preferidos para uso como sondas debido a una mayor estabilidad bajo las condiciones del ensayo. Se ha mostrado que las modificaciones en la estructura nativa, incluidas las alteraciones en la columna vertebral, los azúcares o las bases heterocíclicas, incrementan la estabilidad intracelular y la afinidad de enlazamiento. Entre los cambios útiles en la química de la columna vertebral están los fosforoditioatos; los fosforoditioatos, donde ambos oxígenos que no son de enlazamiento están sustituidos con azufre; las fosforoamiditas, alquil fosforotriésteres y boranofosfatos. Los derivados de fosfato aquiral incluyen, 3'-O'-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforoamidato. Los ácidos nucleicos para el péptido reemplazan a la columna vertebral entera de la ribosa fosfodiéster con un enlazamiento de péptido. Se utilizan también modificaciones del azúcar para mejorar la estabilidad y la afinidad. Se puede utilizar el anómero a de desoxirribosa, donde se invierte la base con respecto al anómero b natural. Se puede alterar el 2'-OH del azúcar de ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo, que proporcionan resistencia a la degradación sin comprometer la afinidad. La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener el apareamiento apropiado de la base. Algunas sustituciones útiles incluyen desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Se ha mostrado que la 5-propinil-2'-desoxiuridina y la 5-propinil-2'-desoxicitidina incrementan la afinidad y la actividad biológica cuando se sustituyen por desoxitimidina y desoxicitidina, respectivamente.

C. Aplicaciones de AC en el NIR

Las aplicaciones y beneficios de AC en el NIR son numerosas. En el sentido más amplio, cualquiera de los ensayos de diagnóstico aplicados que pueden incluir pero no se limitan al uso simultáneo contemplado de más de un compuesto quimioluminiscente como moléculas libres (tal como en la tecnología de liposoma encapsulado con AE, ver las patentes estadounidenses Nos. 5.227.489; 5.449.556; 5.595.875) o como etiquetas conjugadas para propósitos de señalización (como ya se describió en las patentes estadounidenses Nos. 5.395.752; 5.702.887, en la patente estadounidense No. 5.879.894 y en la solicitud de patente PCT No. PCT/IB98/00831 en trámite junto con la presente, y que se incorporan aquí como referencia), pueden beneficiarse de la presente invención. Los compuestos descritos ahora son mejoras adicionales sobre los ETC y LEAE previamente descritos con respecto a los AE convencionales, debido a una mejor discriminación de sus máximos de emisión y simplicidad de diseño comparados con los ETC. Los ETC, como se describe en la solicitud de patente PCT número PCT/IB98/00831 en trámite junto con la presente, constan de un éster de acridinio unido covalentemente a un fluoróforo. Estos conjugados son estructuralmente complejos y sintéticamente desafiantes. Además, un método para conjugación de biomoléculas no es siempre evidente. Los AC en el NIR de la presente invención son estructuralmente más simples en diseño que los ETC y por lo tanto, ofrecen una alternativa efectiva para utilizar los ETC con compuestos de acridinio convencionales (que emiten en el azul) y LEAE (que emiten en el verde) para ensayos simultáneos de analitos múltiples. Por lo tanto, la invención de los AC en el NIR ha añadido a la familia de los compuestos de acridinio, otra serie de miembros distintivos caracterizados por su máximo de emisión

más largo. Además, tomada junto con nuestros trabajos previos, la invención ha suministrado un panorama general para permitir primero, y luego mejorar la cantidad de análisis simultáneos de diagnóstico de analitos múltiples.

Con los avances recientes en fotofísica, se pueden emplear los AC en el NIR junto con detectores de luz mejorados tales como los dispositivos acoplados de carga (CCD), para tomar ventaja del rendimiento intrínsecamente alto de cuantos de estos compuestos. Por ejemplo, un CCD adelgazado iluminado desde atrás con 1340 x 700 píxeles que puede ser enfriado por medio de diferentes métodos, se encuentra ahora comercialmente disponible (Princeton Instruments, Trenton, NJ). Este CCD tiene un escrutinio extremadamente bajo en la oscuridad y de lectura de ruido mientras mantiene una alta eficiencia de detección del 80-90% o mejor a través del rango de emisión de luz de 400-800 nm. Con el propósito de mantener la lectura de ruido en un nivel bajo y de evitar los problemas debidos a los rayos cósmicos al mismo tiempo, es muy importante seleccionar apropiadamente la así llamada "binning" del CCD. El binning se define como la subdivisión del número total de píxeles sobre el chip del CCD y la agrupación de una cantidad de píxeles dentro de una unidad de exportación de la señal y percepción/detección de un fotón único (también denominado como superpixel) a través de una conexión electrónica y de un software de programación. El resultado del binning es por lo tanto, la reducción significativa de la lectura de ruido debido a la gran reducción en el número de unidades de exportación de la señal (esto es, píxeles versus superpíxeles). Por otro lado, se deberían mantener los superpíxeles en una cantidad suficiente para hacer frente a la gran interferencia de los rayos cósmicos que son ubicuos y se presentan con una frecuencia de unos pocos segundos. La señal de un superpixel afectado tendrá que ser sacrificada a través de un software de programación apropiado con el propósito de no distorsionar mucho la precisión de la salida total de la señal. Es por lo tanto obvio que exista un contrabalanceo necesario para tolerar niveles bajos de lectura de ruido manteniendo una cantidad suficiente de superpíxeles. Para mejorar adicionalmente la precisión y reponer la pérdida de la señal actual esperada del(los) superpixel(es) afectado(s) por los rayos cósmicos, el número de fotones que se origina a partir de la muestra luminescente bajo medición, que ha golpeado a dicho(s) superpixel(es) afectado(s), y por lo tanto, la lectura actual de luminescencia de dicho superpixel afectado puede ser reconstruida por derivación o extrapolación de las lecturas de los superpíxeles circundantes que no están afectados por los rayos cósmicos. Nuestros cálculos teóricos así como los resultados experimentales mostraron que el binning de los 1340 x 700 = 938.000 píxeles dentro de 16 superpíxeles es óptimo. Obsérvese que los detectores actualmente disponibles basados en un tubo fotomultiplicador (PMT) muestran ya sea una caída precipitada en la eficiencia de la detección (desde 15% hasta < 1%) en el rango de 500-650 nm o son muy ruidosos cuando se los diseña para ser más sensibles (las eficiencias de detección son del 5-10%) en esta región. El desempeño mejorado de los CCD se espera que mejore la sensibilidad del ensayo principalmente a través de la gran reducción de la señal de fondo ayudado por la matriz de la muestra/búfer en la misma región de longitud de onda larga donde existe un aumento concurrente de la capacidad de detección de AC en el NIR; por lo tanto, proveyendo al campo de los diagnósticos con un desempeño del ensayo sin precedentes. Una modalidad para la aplicación del CCD es la modificación de los luminómetros semiautomáticos existentes (por ejemplo, MLA-II de Chiron Diagnostics) reemplazando el montaje PMT con una cámara CCD. Conceptualmente, se puede orientar el CCD hacia la cámara de la muestra abriendo y trayendo lo más próximo posible para detectar la luz emitida cuando se activa la quimioluminescencia con peróxido de hidrógeno alcalino. Se puede instalar un tubo de luz de alta eficiencia de transmisión (más del 95%) entre la abertura de la cámara y la ventana de detección del CCD para mejorar la eficiencia de la captación de luz. La utilización o la modificación de las conexiones mecánicas y eléctricas generales para la interfaz del sistema MLA-II y CCD con el propósito de mejorar al luminómetro prototipo deberían ser obvias para aquellos capacitados en el arte de la fotofísica y de la ingeniería eléctrica. Un objetivo separado de esta invención, por lo tanto, es apuntar a una forma por medio de la cual el remplazo del detector basado en un tubo fotomultiplicador de corriente (PMT) con un CCD mejoraría la capacidad de detección del AE en el NIR, mejorando así la sensibilidad del ensayo de diagnóstico.

D. Espectro de Emisión de Luz

Se determinó el espectro de emisión de luz del AC en el NIR y de los ésteres de acridinio con longitudes de onda de emisión más cortas por medio de un Fast Spectral Scanning System (FSSS) de Photo Research (una división de Kollmorgen Corp.) de Burbank, California, EUA. El experimento se realizó en una habitación oscura. Se disolvió cada compuesto en acetonitrilo o en N,N-dimetilformamida, excepto para los conjugados etiquetados de proteína y los derivados hidrofílicos de AE donde tuvieron que utilizarse soluciones acuosas debido a la solubilidad. Se diluyeron los concentrados resultantes con el mismo solvente para formar la solución de trabajo que por reacción con peróxido de hidrógeno alcalino emitió luz de una intensidad adecuada. Un experimento típico utiliza 10-100 ug de la muestra en 500 ul del solvente contenidos en un tubo de ensayo de borosilicato de 13 x 100 mm. Se colocó el tubo en una gradilla para tubos de ensayo elevada hasta una altura apropiada. Se colocó una pieza de una lámina de aluminio en la parte de atrás del tubo para mejorar la capacidad de detección de la luz emitida. Se colocó la cabeza óptica del FSSS en frente del tubo a una distancia apropiada de 130 mm con sus lentes enfocados sobre el líquido en el tubo. Se trató primero la solución de la muestra con 0,35 ml del Reactivo de Destello # 1 (Chiron Diagnostics) que contenía HNO₃ 0,1 N y H₂O₂ al 0,1%. Se oscureció luego la habitación, y se añadieron inmediatamente 0,35 ml del Reactivo de Destello #2 (Chiron Diagnostics), que contenía NaOH 0,25 N y ARQUAD al 0,2% a la mezcla de reacción. (Ver la patente estadounidense No. 4.927.769 que es comúnmente asignada e incorporada aquí como referencia). La luz, que se generó instantáneamente después de la adición del Reactivo #2, fue registrada por el FSSS durante 5 segundos comenzando aproximadamente un segundo después de que se hubiera añadido el Reactivo #2. Los diferentes espectros de emisión que se determinaron sobre el FSSS se presentan en la Figura 1, y están también resumidos en la Tabla 1.

TABLA 1

No.	Compuesto	Rango* [^] (nm)	Máx. de Emisión (nm)	Solvente Orgánico (%) [~]
<u>AC en el NIR</u>				
1.	3-HS-DMAE	510 - 860	690	MeCN/DMF (42)
2.	3-HS-DMAE-BSA	500 - 800	610	0
3.	NSB-3-HS-DMAE-BSA	500 - 800	620	0
4.	2-OH-DMAE-Bz	500 - 800	604	MeCN/DMF (42)
5.	2-OH-DMAE-BSA	500 - 780	594	0
<u>Los AE con longitud de onda de emisión muy amplia o más corta - Compuestos de referencia</u>				
6.	3-HP-DMAE	420 - 780	Amplio	MeCN/DMF (42)
7.	NSB-3-MS-DMAE-Bz	420 - 700	520	MeCN/DMF (42)
8.	3-BS-DMAE-Bz	430 - 700	520	MeCN/DMF (42)
9.	NSB-3-MS-DMAE	420 - 720	522	DMF (42)
10.	NSB-3-MS-DMAE	420 - 700	522	MeCN (42)
11.	NSB-3-MS-DMAE	400 - 660	456	0
12.	NSB-2-BS-DMAE-Bz	450 - 680	520	MeCN/DMF (42)
13.	NSB-3-MS-DMAE-NHS	410 - 640	460	0
14.	NSB-3-MS-DMAE-BSA	410 - 610	456	0
15.	NSB-3-MS-DMAE-anti-TSH	410 - 600	456	0
16.	2-HS-DMAE	420 - 850	Amplio	MeCN/DMF (42)
17.	2-HS-DMAE-BSA	420 - 620	482	0
18.	NSB-2-MS-DMAE-NHS	400 - 680	454	0
19.	DMAE	400 - 530	430	DMF (42)
20.	NSP-DMAE	390 - 530	424	DMF (42)
21.	NSP-DMAE-BSA	390 - 520	420	0
22.	LEAE-BZ	490 - 670	522	MeCN (42)

* El rango está establecido para la región espectral con intensidad de señal aproximadamente del 5% de la altura del pico.

[^] El rango de emisión espectral que va más allá del límite de escaneo (380 - 780 nm) del FSSS, se extrapola en el extremo largo siguiendo la tendencia aproximada de la curva.

[~] El porcentaje de solvente orgánico en la mezcla final después de que fueron añadidos los reactivos de destello # 1 y # 2.

+ Los acrónimos dentro de la tabla representan compuestos, cuya nomenclatura completa se da en la sección de los ejemplos. NSP, MeCN y DMF representan N-sulfopropilo, acetonitrilo, y dimetilformamida, respectivamente.

E. Actividad Específica

La actividad específica quimioluminiscente de diferentes compuestos y sus conjugados se enlista en la Tabla 2. Estos valores se determinaron ya sea (a) sobre un luminómetro de Berthold (MLA-I, Chiron Diagnostics) acondicionado con un filtro BG-38 (de Corion, Franklin, MA) con el rango de transmisión de longitud de onda de aproximadamente 320 a 650 nm con una eficiencia de transmisión del 20-97%; o (b) sobre un prototipo de un nuevo instrumento que incluye un luminómetro semiautomático alojado (MLA-II) integrado a un detector CCD refrigerado con nitrógeno líquido, adelgazado iluminado desde atrás de Princeton Instruments. La actividad específica está limitada por lo tanto por los detectores utilizados y los accesorios seleccionados.

Típicamente, se preparó cada muestra en acetonitrilo o en metanol (libre de etiquetas) o en agua (conjugados). Se diluyeron estas soluciones patrón adicionalmente en fosfato 10 mM pH 8 que contenía también NaCl 150 mM, BSA

al 0,1%, azida sódica al 0,05%. Se inició la quimioluminiscencia de una solución de una muestra de 25 uL por medio de la adición de los Reactivos 1 & 2 (Chiron Diagnostics). Las diluciones típicas de las soluciones patrón dieron como resultado las RLU observadas en su totalidad en el rango de $0,5-5 \times 10^6$ de las RLU para un período de medición de dos segundos. A partir de estas mediciones, se podría calcular la actividad de la etiqueta. Para los conjugados de proteína, ya que es posible la incorporación de más de una etiqueta por proteína, se caracterizó adicionalmente a cada conjugado por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la incorporación de la etiqueta. Esto se logró fácilmente registrando las masas de las proteínas no derivatizadas y etiquetadas. A partir de las diferencias de masa observadas, se podría calcular la incorporación de la etiqueta. Esto está descrito en los ejemplos 9-14. Para el conjugado de oligonucleótidos, ya que se sintetizó el oligonucleótido de partida únicamente con un grupo alquilamino reactivo en el extremo 5' (que puede ser etiquetado con química NHS), el espectro de masas MALDI-TOF de este conjugado mostró la incorporación esperada de una etiqueta.

Se determinaron las concentraciones de proteína por medio de un microensayo de Bradford (BioRad). A partir del conocimiento de la concentración de la proteína y del número de etiquetas por proteína se podría determinar la concentración de la etiqueta que estaba siendo medida en el luminómetro. En forma similar la concentración de oligonucleótido-AE, y por lo tanto la concentración del éster de acridinio, se determinó registrando la absorbancia del conjugado a 260 nm sobre un espectrofotómetro UV. La contribución del éster de acridinio con relación al oligonucleótido para la banda de absorción a 260 nm es despreciable. Todas las actividades específicas enlistadas en la Tabla 2 son para etiquetas individuales únicamente.

La actividad quimioluminiscente específica de dos compuestos, 3-HS-DMAE y 2-OH-DMAE-NHS se midió en los dos luminómetros que fueron descritos anteriormente. Las actividades específicas observadas reflejan claramente la mayor eficiencia del CCD en el rojo contrario a los detectores con base en un tubo fotomultiplicador convencional que estaba acoplado con el MLA-I. Por lo tanto el 3-HS-DMAE se detecta 8 veces mejor con el CCD mientras que el 2-OH-DMAE-NHS se detecta con un enorme incremento en la eficiencia de detección de 40 veces con el luminómetro equipado con la cámara CCD. Otros incrementos en las actividades específicas se pueden anticipar en la medida en que se refine adicionalmente el prototipo del luminómetro modificado. Por lo tanto en NIR-AC acoplado con detectores con base en CCD ofrecen el potencial para máxima sensibilidad en los ensayos debido a las señales de fondo despreciables normalmente observadas en muestras biológicas a partir de una notable eficiencia del detector del CCD en el rojo, así como un rendimiento mejorado de cuantos al menos para algunos compuestos tales como 2-OH-DMAE. Incluso en el caso de 3-HS-DMAE, se debe observar que una vez que este compuesto se conjuga con una proteína, su eficiencia de cuantos se incrementa en más de 20 veces haciendo de este un NIR-AC extremadamente útil.

TABLA 2

Actividad Específica (RLU/mol) de la Determinación NIR-AC sobre un MLA-I con un Hamamatsu R268 PMT, y con un filtro óptico Corion BG38 sobre MLA-II con un detector CCD enfriado con N₂ líquido, adelgazado, iluminado desde atrás

Compuesto/Conjugado+	MW*	RLU/mol x 10 ⁻¹⁹	
		MLA-I	MLA-II
3-HS-DMAE	540,6	0,075	0,62
3-BS-DMAE-Bz	685,8	3,8	
3-HS-DMAE-BSA		1,8	
NSB-3-HS-DMAE-BSA		1,3	
NSB-3-HS-DMAE-anti-TSH		3,6	
NSB-3-MS-DMAE-NHS	736,8	10	
2-HS-DMAE	504,6	0,012	
NSB-2-MS-DMAE-NHS	736,8	3,9	
2-OH-DMAE	402,4	0,49	20,2
2-OH-DMAE-Oligonucleótido		0,45	
3-HP-DMAE	479,5	0,054	
DMAE-Bz	476,6	10	

+ Los acrónimos dentro de la tabla representan compuestos, cuya nomenclatura completa se da en la sección de los ejemplos.

* Los Pesos Moleculares (MW) de las etiquetas se calcularon sin la inclusión de un contraión.

Ejemplo 1

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (3-HS-DMAE) y su N-succinimidil éster (3-HS-DMAE-NHS)

Síntesis de N-[3-(1,3-dioxolil)fenil]isatina

Se disolvió isatina (3,2 g, 0,0218 mol) en DMF anhidro (75 mL) y se enfrió en baño de hielo bajo una atmósfera de nitrógeno. A esta solución fría, se le añadió hidruro de sodio (0,575 g, 0,0239 mol) y se agitó la reacción a 0°C durante 1,5 horas. Se trató luego esta solución con 2-(3-bromofenil)-1,3-dioxolano (5 g, 1 equivalente) seguido por CuI (8,3 g, 2 equivalentes). Se calentó la suspensión resultante en un baño de aceite bajo atmósfera de nitrógeno a 130-140°C durante 16 horas. Se enfrió luego hasta temperatura ambiente y se diluyó con un volumen igual de cloroformo. Se filtró esta suspensión y se concentró el filtrado a presión reducida. Se recuperó un aceite viscoso de color marrón que fue suspendido en xilenos (150 mL) que fue evaporado hasta sequedad. Se utilizó el residuo tal cual para la siguiente reacción. La TLC (5% de metanol en cloroformo) mostró una conversión limpia; Rf (producto) = 0.86.

Síntesis de 2-(acridin-9-carboxil)-1,3-dioxolano

Se suspendió la N-[3-(1,3-dioxolil)fenil]isatina cruda anterior en KOH al 10% (150 mL) y se sometió a reflujo la suspensión resultante bajo atmósfera de nitrógeno durante 4,5 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se filtró. Se diluyó el filtrado con hielo y se acidificó con HCl al 20-30% HCl hasta acidificar débilmente. Se separó un precipitado de color amarillo que se recogió por filtración y se lo secó. Se tuvo un rendimiento ~ 5 g, de un sólido pegajoso de color amarillo que se utilizó tal cual para la siguiente reacción.

Síntesis de ácido acridin-9-carboxílico 3-carboxaldehído

Se suspendió 2-(acridin-9-carboxil)-1,3-dioxolano (~ 5 g) en ácido acético acuoso al 80% (100 mL). Se calentó esta suspensión a 80°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Apareció un precipitado de color amarillo en la reacción. Se enfrió luego la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con éter anhidro (~ 500 mL). Se recogió el sólido precipitado por medio de filtración, se enjuagó con éter y se secó al aire. Se transfirió luego a un balón de fondo redondo, se suspendió en tolueno (50 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se repitió este proceso una vez más. Se recuperó un sólido de color amarillo brillante. Rendimiento = 1,72 g (31% en total). MALDI-TOF MS 252,3 observado. (251,24 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxiacarbonilfenil acridin-9-carboxilato-3-carboxaldehído

Se enfrió ácido acridin-9-carboxílico 3-carboxaldehído (0,3 g, 0,0012 mol) en piridina (50 mL) en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se lo trató con cloruro de p-toluensulfonilo (0,456 g, 0,00239 mol). Se agitó la reacción a 0°C durante 15 minutos y luego se añadió 2,6-dimetil-4-benciloxicarbonil-fenol (0,306 g, 1 equivalente). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas bajo atmósfera de nitrógeno y luego se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en cloroformo que luego fue lavado con bicarbonato acuoso y cloruro de amonio acuoso. Se separó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo crudo (0,6 g) por medio de TLC preparativa sobre sílice utilizando acetato de etilo al 10% en cloroformo; Rf (producto) = 0,6. Rendimiento = 0,24 g (41%); sólido de color Amarillo brillante. MALDI-TOF MS 490,78 observado (489,53 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.46 (s, 6H), 5.40 (s, 2H), 7.37-7.50 (m, 5H), 7.78 (m, 1H), 7.94 (m, 3H), 8.12 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 8.39 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.45 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.51 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.79 (s, 1H), 10.31 (s, 1H).

Síntesis de cloruro de 4-benciloxibenciltrifenil fosfonio

Se sometieron a reflujo el cloruro de 4-benciloxibencilo (1 g, 0,0043 mol) y trifenil fosfina (1,127 g, 1 equivalente) en tolueno anhidro (20 mL) bajo atmósfera de nitrógeno durante ~ 8-10 horas. Apareció un precipitado de color blanco en la mezcla de reacción. Se enfrió luego la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió éter (100 mL). Se recolectó la sal de fosfonio precipitada por medio de filtración, se enjuagó con éter y se secó al aire. Rendimiento = 0,55 g (25%). MALDI-TOF MS 459,51 observado (459,54 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-acridin-9-carboxilato

Se suspendió cloruro de 4-benciloxibenciltrifenil fosfonio (0,475 g, 0,00096 mol) en THF anhidro (10 mL) y se enfrió hasta -78°C en un baño de hielo seco con acetona bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota n-butil litio (0,6 mL de una solución 1,6 M, 1 equivalente). Apareció instantáneamente un color naranja rojizo. Se agitó la reacción a -78°C durante una hora y luego se añadió gota a gota una solución de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil acridin-9-carboxilato-3-carboxaldehído (0,469 g, 0,00096 mol) en THF seco (15 mL). Se agitó la reacción durante 3 horas a -78°C y luego se diluyó con acetato de etilo y cloruro de amonio acuoso. Se separó la capa orgánica y se lavó una vez con salmuera. Se secó luego sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. La TLC (45% de cloroformo, 50% de Hexanos, 5% de acetato de etilo) del residuo mostró una mezcla de los isómeros E y Z en una proporción ~ 1:1; Rf = 0,43 y 0,31. La purificación por medio de cromatografía flash sobre gel de sílice utilizando 7% de acetato de etilo, 23% de cloroformo, 70% de hexanos, resultó en la isomerización completa hasta únicamente un

isómero (E). La evaporación de las fracciones flash produjo un sólido de color amarillo naranja. Rendimiento = 0,25 g (39%). MALDI-TOF-MS 671,2 observado (670,78 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.48 (s, 6H), 5.12 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 7.03 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.23 (d, 1H, J = 18 Hz, E-olefina), 7.35-7.49 (m, 11H), 7.56 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.65 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.93 (m, 3H), 8.25 (s, 1H), 8.30 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.37 (d, 1H), 8.40 (d, 1H).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-10-metil acridinio-9-carboxilato trifluorometanosulfonato (3-BS-DMAE-Bz)

Se trató una solución de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-acridina-9-carboxilato (50 mg, 75 umoles) en diclorometano (5 mL) con triflatato de metilo (125 uL, 15 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 24 horas, un análisis por HPLC utilizando una columna C18 (3,9 x 300 mm) y un gradiente de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA con un flujo de 1 ml/min y detección por UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 29 min., Rt (material de partida) = 32 min. (~ 74% de conversión). Se concentró la reacción a presión reducida y se suspendió el residuo en acetato de etilo y se evaporó hasta sequedad para producir un sólido pegajoso de color púrpura. Se utilizó este material tal cual para la siguiente reacción. MALDI-TOF MS 685,1 observado (685,81 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (3-HS-DMAE)

Se agitó el 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (11 mg) en una mezcla de dimetil sulfuro (2 mL) y HBr al 30% en ácido acético (1 mL). Después de 4 horas a temperatura ambiente, se añadió éter + hexanos (20 mL, 1: 1) y se recogió el sólido precipitado por medio de filtración y se enjuagó con éter. Se disolvió el residuo en metanol y se concentró a presión reducida. El análisis por HPLC como se describió anteriormente mostró un Rt (producto) = 17 minutos. Se aisló el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 20 x 300 mm. Se evaporó la fracción de HPLC que contiene al producto hasta sequedad para producir un sólido de color púrpura. Rendimiento = 5 mg (63%). MALDI-TOF MS 504,98 observado (504,56 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (3-HS-DMAE-NHS)

Se trató una solución de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (5 mg) en DMF (10 mL) con N-hidroxisuccinimida (8,8 mg, 10 equivalentes) y dicitlohexil carbodiimida (15,7 mg, 10 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC como se describió anteriormente mostró un Rt (producto) = 21 min. Se purificó el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 20 x 300 mm y se liofilizó hasta sequedad la fracción de HPLC que contenía el producto. Rendimiento = 9,4 mg (cuantitativo). MALDI-TOF MS 601,63 observado (601,64 calculado).

Ejemplo 2

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-HS-DMAE-NHS)

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-BS-DMAE-Bz)

Se calentaron 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxiestirenil)-acridina-9-carboxilato (24 mg) y 1,4-butano sultona (2 mL) en un baño de aceite ~ a 150°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se enfrió luego hasta temperatura ambiente y se añadió éter (25 mL) para precipitar el producto que fue recogido por filtración para producir un sólido de color púrpura. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 (3,9 x 300 mm) y un gradiente de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA a una velocidad de flujo de 1 mL/min. y detección por UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 29 min.; Rt (material de partida) = 32 min (40% de conversión). Se utilizó el material crudo (30-40 mg) tal cual para la siguiente reacción.

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-sulfobutilacridinio-9-carboxilato (NSB-3HS-DMAE)

Se agitó 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil-3-(4-benciloxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (30 - 40 mg) en una mezcla de dimetil sulfuro (2 mL) y 30% de HBr en ácido acético (5 mL) durante 4 horas. Se añadió éter (75 mL) y se separó un sólido de color púrpura oscuro. Se decantó el éter y se enjuagó el residuo con éter y se secó al aire. Rendimiento crudo = 30 mg. El análisis por HPLC como se describió anteriormente mostró un Rt (producto) = 16 minutos. Se utilizó este material tal cual para la siguiente reacción. MALDI-TOF MS 627,39 observado (625,7 calculado).

ES 2 320 055 T3

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-HS-DMAE-NHS)

Se disolvió 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-sulfobutil-9-acridinio carboxilato crudo (~ 15 mg) en una mezcla de MeCN (2 mL) y DMF (1 mL). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (8,5 mg, 73,9 umoles) y dicitclohexil carbodiimida (11 mg, 53,4 umoles) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC como se describió anteriormente mostró un Rt (producto) = 19 minutos. Se purificó el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 10 x 250 mm con una velocidad de flujo del solvente de 4 mL/min. Se liofilizó hasta sequedad la fracción de HPLC que contenía al producto para producir un polvo de color púrpura. Rendimiento = 5.6 mg (42% total, tres etapas). MALDI-TOF MS 724,66 observado (722,77 calculado).

Ejemplo 3

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-MS-DMAE-NHS)

Síntesis de cloruro de 4-metoxibenciltrifenil fosfonio

Se trató una solución de cloruro de 4-metoxibencilo (1,153 g, 0,0074 mol) en tolueno anhidro (10 mL) con trifenilfosfina (1,93 g, 1 equivalente). Se sometió a reflujo la solución resultante bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 8-10 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con éter. Se recogió la sal de fosfonio por medio de filtración. Rendimiento = 1,5 g (53%); MALDI-TOF MS 383,9 observado (383,45 calculado).

Síntesis de 2'-6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-acridin-9-carboxilato

Se enfrió una suspensión de cloruro de 4-metoxibenciltrifenilfosfonio (0,11 g, 0,25 mmol) en THF anhidro (5 mL) hasta -78°C en un baño de hielo seco con acetona bajo atmósfera de nitrógeno y se la trató con n-butil litio (0,25 mL de 1,6 M, 1,3 equivalentes). Apareció un color rojo naranja. Se agitó la reacción a -78°C durante 0,5 horas y luego se añadió gota a gota una solución de 2',6'-dimetil-4'-carboxibencilfenil acridina-9-carboxilato-3-carboxaldehído (0,1 g, 0,2 mmol) en THF anhidro (5 mL). Se agitó la solución resultante en el baño de hielo seco con acetona durante 0,5 horas y luego se calentó hasta temperatura ambiente durante 0,5 horas. Se diluyó luego con acetato de etilo (40 mL) y se lavó la solución resultante dos veces con cloruro de amonio acuoso. Se secó la capa orgánica sobre sulfato e magnesio y se concentró a presión reducida. La TLC (5:3:2, hexanos, cloroformo, acetato de etilo) mostró una mezcla de olefinas E y Z; Rf (isómero E) = 0,54, Rf (isómero Z) = 0,69. Se aislaron los productos por medio de TLC preparativa sobre gel de sílice. Se observó isomerización parcial del isómero Z hasta el isómero E durante la purificación. Rendimiento = 31 mg (E), 43 mg (E + Z), rendimiento total = 74 mg (61%), MALDI-TOF MS (isómero E) 594,7 observado (594,7 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.48 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.40 (s, 2H), 6.95 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.24 (d, 1H, J = 17 Hz, olefina E), 7.34-7.50 (m, 6H), 7.56 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.65 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.95 (m, 3H), 8.26 (s, 1H), 8.31 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.37 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.39 (d, 1H, J = 8.7 Hz).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-MS-DMAE-Bz)

Se mezcló 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-acridin-9-carboxilato (10 mg, isómero E) con 1,4-butano sultona (~ 1 mL) y se calentó la mezcla en un baño de aceite a 140°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se añadió acetato de etilo. Se recogió el precipitado sólido por medio de filtración y se disolvió en DMF + MeCN. Se lo concentró a presión reducida para producir un sólido pegajoso que fue utilizado tal cual sin purificación durante la siguiente reacción. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 (3,9 x 30 mm) y un gradiente de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA a una velocidad de flujo de 1 mL/min, y detección UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 24,8 min. MALDI-TOF MS 731,7 observado (729,9 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutilacridinio carboxilato (NSB-3-MS-DMAE)

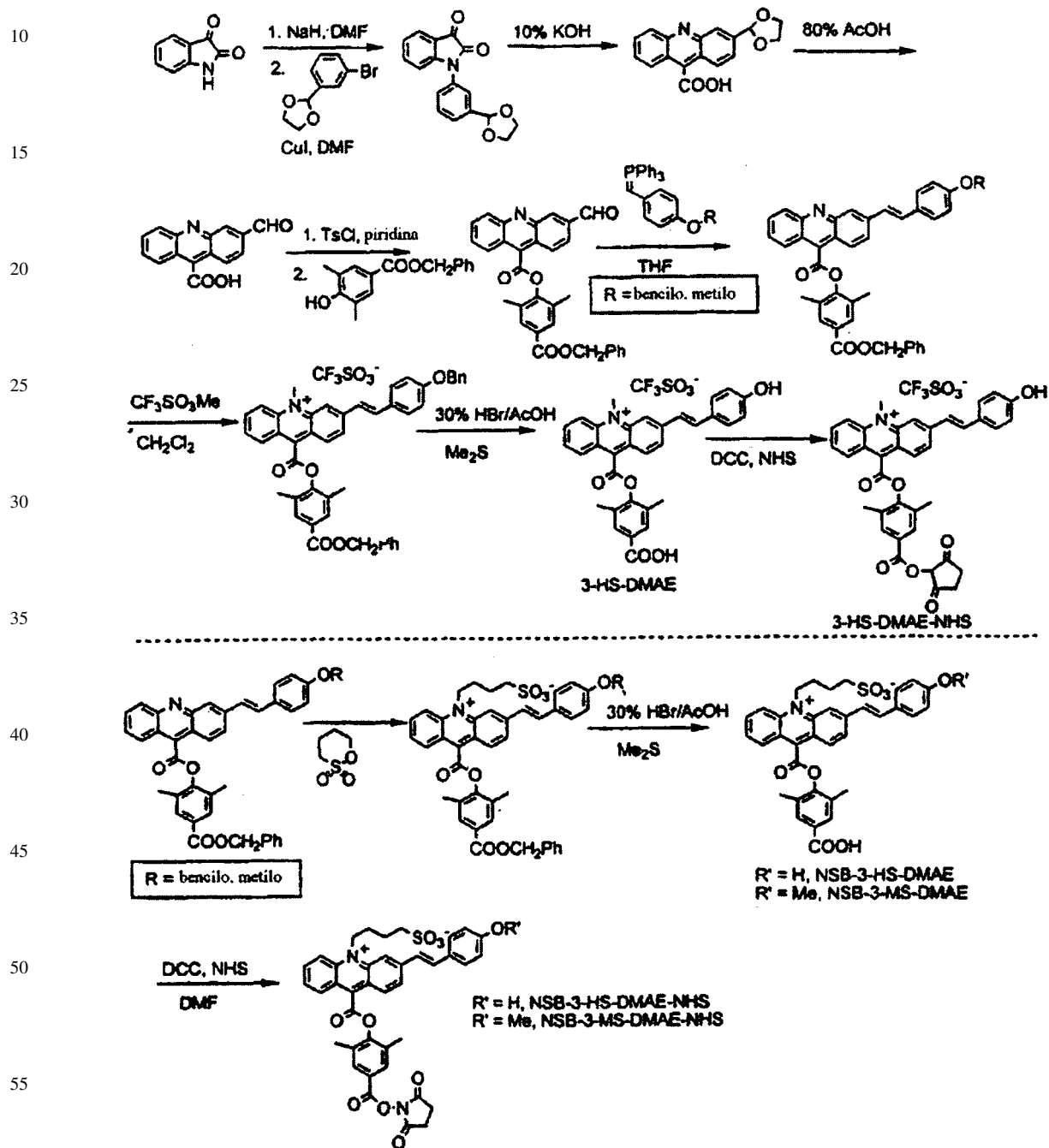
Se agitó el 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutilacridinio-9-carboxilato anterior (crudo) en una mezcla 2:1 de dimetil sulfuro y 30% de HBr en ácido acético (1,5 mL). Después de ~ 3 horas, se añadió éter y se recolectó el precipitado sólido por medio de filtración y se enjuagó con éter. Se disolvió el residuo en metanol y se concentró a presión reducida. El análisis por HPLC utilizando el protocolo descrito anteriormente mostró un Rt (producto) = 17 minutos. Rendimiento = 5,6 mg (64%, 2 etapas); MALDI-TOF MS 641,25 observado (639,7 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-3-MS-DMAE-NHS)

Se disolvió una solución de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil-3-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (5,6 mg del compuesto crudo, 8,75 umoles) en DMF (1mL) y se lo trató con N-hidroxisuccinimida (5 mg, 43,5 umoles) y dicitclohexil carbodiimida (53,4 umoles). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El

Esquema 1

Síntesis de Derivados de AE Sustituídos en Posición 3



60 Ejemplo 4

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-(4-hidroxiestirenil)-10-metilacridinio-9-carboxilato (2-HS-DMAE)

Síntesis de 2-(4-bromofenil)-1,3-dioxolano

65

Se trató 4-bromobenzaldehído (3 g, 0,0162 mol) en benceno (60 mL) con ácido p-toluensulfónico monohidratado (0,15 g, 0,79 mmol) y etilén glicol (5 mL, 0,0896 mol). Se sometió la reacción a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno con remoción azeotrópica de agua. Después de 3 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó

con un volumen igual de acetato de etilo. Se lavó esta solución dos veces con bicarbonato acuoso, se la secó sobre sulfato de magnesio y se la concentró a presión reducida. Se recuperó un aceite incoloro. Rendimiento = 2,83 g (92%). La TLC (5% de acetato de etilo en hexanos) mostró un producto limpio, Rf = 0,17.

5 Síntesis de N-[4-(1,3-dioxolil)fenil]isatina

Se enfrió isatina (1,88 g, 0,0128 mol) en DMF anhidro (100 mL) en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se la trató con hidruro de sodio (0,3 g, 1 equivalente). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y agitó durante 1 hora. Se la trató luego con 2-(4bromofenil)-1,3-dioxalano (2,83 g, 0,0124 mol) seguido por CuI (4,71 g, 2 equivalentes). Se calentó esta suspensión en un baño de aceite a 135°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se la enfrió luego hasta temperatura ambiente y se diluyó con un volumen igual de cloroformo. Se filtró la suspensión resultante y se concentró el filtrado a presión reducida. Se suspendió el residuo en xilenos (100 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se recuperó un aceite viscoso espeso que fue utilizado como tal durante la siguiente reacción. La TLC (5% de metanol en cloroformo) mostró una conversión limpia, Rf (producto) = 0,91.

15 Síntesis de 2-(acridin-9-carboxil)-1,3-dioxolano

Se suspendió el producto crudo anterior, N-[4-(1,3-dioxolil)fenil]isatina, en KOH al 10% (100 mL) y se sometió la suspensión a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 4-5 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se filtró. Se enfrió el filtrado en hielo y se acidificó con HCl concentrado enfriado sobre hielo. Apareció un precipitado denso de color amarillo que fue recogido por filtración y se lo secó al aire. Rendimiento = 2 g. Se utilizó este producto crudo tal cual durante la siguiente reacción. MALDI-TOF MS 295,31 observado (295,29 calculado).

25 Síntesis del ácido acridin-9-carboxílico-2-carboxaldehído

Se suspendió 2-(acridin-9-carboxil)-1,3-dioxolano crudo (2 g) en ácido acético acuoso al 80% (100 mL) y se calentó a 75-80°C en un baño de aceite bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se la vertió en éter (300 mL). Se separó un sólido de color amarillo brillante que fue recolectado por medio de filtración y enjuagado con éter. Se transfirió el producto hasta un balón de fondo redondo y se lo suspendió en tolueno (50 mL) y se evaporó hasta sequedad para producir un polvo de color amarillo. Rendimiento = 1,5 g (47%). MALDI-TOF MS 251,1 observado (251,24 calculado).

35 Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxycarbonilfenil acridin-9-carboxilato-2-carboxaldehído

Se enfrió una solución de ácido acridin-9-carboxílico-2-carboxaldehído (0,3 g, 0,0012 mol) en piridina (50 mL) en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se la trató con cloruro de p-toluensulfonilo (0,455 g, 2 equivalentes). Se agitó la reacción a 0°C durante 10 minutos y luego se añadió 2,6-dimetil-4-benciloxycarbonilfenol (0,306 g, 1 equivalente). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. Se concentró luego la mezcla de reacción a presión reducida y se disolvió el residuo en cloroformo. Se lavó la solución de cloroformo con bicarbonato acuoso y cloruro de amonio acuoso. Se secó luego la capa orgánica sobre sulfato de magnesio y se la concentró a presión reducida. Se purificó el residuo crudo (0,6 g) por medio de TLC preparativa sobre gel de sílice utilizando 10% de acetato de etilo en cloroformo; Rf (producto) = 0,57. Rendimiento = 0,24 g (41%). MALDI-TOF MS 489,1 observado (489,53 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.50 (s, 6H), 5.40 (s, 6H), 7.42 (m, 5H), 7.77 (dd, 1H), 7.97 (m, 3H), 8.32 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 8.42 - 8.49 (m, 3H), 8.99 (s, 1H), 10.23 (s, 1H).

45 Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxycarbonilfenil 2-(4-benciloxiestirenil)-acridin-9-carboxilato

Se enfrió cloruro de 4-benciloxifosfonio (0,1 g, 0,2 mmol) en THF anhidro (5 mL) hasta -78°C en un baño de hielo seco con acetona bajo atmósfera de nitrógeno y se lo trató con n-butil litio (0,15 mL de 1,6 M, 1,3 equivalentes). Apareció un color naranja pálido. Se agitó la reacción a -78°C durante 1 hora y luego se añadió gota a gota una solución de 2',6'-dimetil-4'-benciloxycarbonilfenil acridin-9-carboxilato-2-carboxaldehído (90 mg, 0,9 equivalentes) como una solución en THF anhidro (5 mL). Se agitó la reacción a -78°C durante 0,5 horas y luego se calentó hasta temperatura ambiente durante 0,5 horas. Se diluyó luego la reacción con acetato de etilo (50 mL) y cloruro de amonio acuoso (200 mL). Se separó la capa orgánica y se secó sobre sulfato de magnesio. La concentración produjo un producto crudo (0,17 g) que por TLC (6:3:1 hexanos, cloroformo, acetato de etilo) mostró una mezcla de olefinas Z (Rf = 0,63) y E (Rf = 0,75). Se separaron los dos isómeros por medio de TLC preparativa sobre gel de sílice. Como se anotó anteriormente, se observó una isomerización parcial del isómero Z hasta una mezcla de los isómeros E y Z. Rendimiento = 100 mg (rendimiento combinado, 81%); E = 44 mg, E + Z = 56 mg. MALDI-TOF MS (olefina E) 671,37 observado (670,78 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.51 (s, 6H), 5.12 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 7.01 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.16 (d, 1H, J = 16.3 Hz), 7.32 - 7.52 (m, 11H), 7.67 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.96 (s, 2H), 8.14 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.32 (m, 3H), 8.41 (d, 1H, J = 8.7 Hz).

65 Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxycarbonilfenil 2-(4-benciloxiestirenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (2-BS-DMAE-Bz)

Se trató una solución de 2',6'-dimetil-4'-carboxibencilfenil-2-(4-benciloxifenil) acridin-9-carboxilato (13,5 mg, 20 umoles) en diclorometano (1,5 mL) con metil trifluorometanosulfonato (116 uL, 50 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC sobre una columna C18 (3,9 x 30 mm) y un gradiente

de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA con un flujo de 1 mL/min y un detector UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 24,5 min. Se concentró la mezcla de reacción y se utilizó la mezcla cruda directamente durante la reacción siguiente. MALDI-TOF MS 685,67 observado (685,81 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-(4-hidroxiestirenil)-10-metilacridinio-9-carboxilato (2-HS-DMAE)

Se agitó la mezcla cruda de producto anterior en una mezcla de dimetil sulfuro (1 mL) y HBr al 30% en ácido acético (0,5 mL) a temperatura ambiente. Después de 4 horas, se añadió éter (50 mL) y se recogió el precipitado sólido por medio de filtración. Se disolvió el sólido en MeOH + MeCN y se lo concentró. El análisis por HPLC utilizando el protocolo descrito anteriormente mostró un Rt (producto) = 17 min. Se purificó el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 20 x 300 mm. Se liofilizó hasta sequedad una fracción de HPLC que contenía al producto para producir un sólido de color púrpura oscuro. Rendimiento = 7,6 mg (76%, dos etapas); MALDI-TOF MS 504,9 observado (504,6 calculado).

Ejemplo 5

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 2-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-2-MS-DMAE-NHS)

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-(4-metoxiestirenil)-acridin-9-carboxilato

Se suspendió cloruro de 4-metoxibenciltrifenilamonio (85 mg, 0,0002 mol) en THF (5 mL) y se enfrió hasta -78°C en un baño de hielo seco con acetona bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió N-butil litio (0,15 mL de 1,6 M, 1,2 equivalentes) y se agitó la reacción a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos adicionales. Se le añadió una solución de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil acridin-9-carboxilato-2-carboxaldehído (75 mg, 0,15 mmol) en THF anhidro (5 mL). Se agitó la reacción a -78°C durante 30 minutos y luego se calentó hasta temperatura ambiente durante 30 minutos. Se diluyó luego la reacción con acetato de etilo (40 mL) y se lavó la solución resultante dos veces con cloruro de amonio acuoso. Se separó la capa orgánica y se la secó sobre sulfato de magnesio. Se concentró luego a presión reducida. La TLC (5:3:2, hexanos, cloroformo, acetato de etilo) mostró una mezcla de olefinas E (Rf = 0,59) y Z (Rf = 0,65). Se purificaron los dos productos por medio de TLC preparativa. Rendimiento combinado = 61 mg (67%); E = 24 mg; E + Z = 37 mg (se observó isomerización de Z a E durante la purificación). MALDI-TOF MS (isómero E) 595,6 observado (594,7 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 2.51 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.40 (s, 2H), 6.94 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.15 (d, 1H, J = 16.2 Hz), 7.32-7.53 (m, 6H), 7.67 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.96 (s, 2H), 8.14 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 8.31 (m, 3H), 8.41 (d, 1H, J = 8.6 Hz).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-2-MS-DMAE-Bz)

Se mezcló 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-(4-metoxiestirenil)-acridin-9-carboxilato (19 mg, 32 umoles) con 1,4-butano sultona (3-4 mL) y se calentó la mezcla en un baño de aceite bajo atmósfera de nitrógeno a 140°C durante 16 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (40 mL). Se recolectó el sólido precipitado por medio de filtración. Este fue disuelto en DMF y concentrado a presión reducida. Se recuperó un sólido de color púrpura oscuro que fue utilizado directamente durante la siguiente reacción. El análisis por HPLC utilizando una columna C18 y un gradiente de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA a razón de 1 ml/min y detección UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 25 minutos. MALDI-TOF MS

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutilacridinio-9-carboxilato (NSB-2-MS-DMAE)

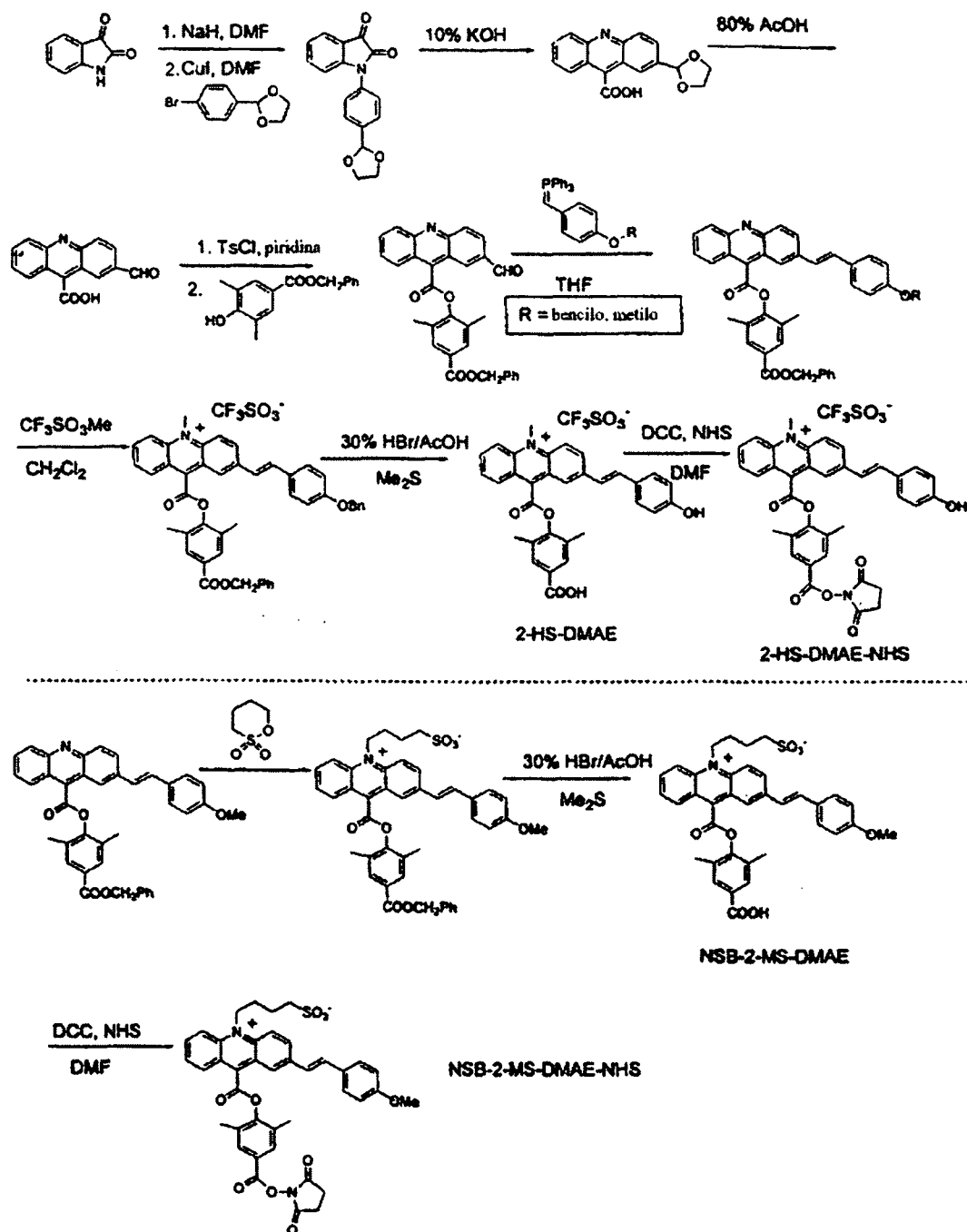
Se agitó el material crudo anterior en una mezcla de dimetil sulfuro (1 mL) y HBr al 30% en ácido acético (0,5 mL) durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió éter (50 mL) y se recolectó el sólido precipitado por medio de filtración. Se disolvió el residuo en DMF y se lo concentró a presión reducida. Se suspendió el residuo recuperado en tolueno y se evaporó hasta sequedad. Rendimiento del crudo = 4,5 mg (~ 22%). El análisis por HPLC utilizando el protocolo anterior mostró un Rt (producto) = 15 minutos. MALDI-TOF MS

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxicarbonilfenil 2-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-acridinio-9-carboxilato (NSB-2-MS-DMAE-NHS)

Se disolvió 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-(4-metoxiestirenil)-10-sulfobutil-9-acridinio carboxilato (5,6 mg) en DMF (1 mL) y se lo trató con N-hidroxisuccinimida (5 mg, 43,5 umoles) y dicitclohexil carbodiimida (10 mg, 48,5 umoles). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por HPLC como se describió anteriormente mostró un Rt (producto) = 19 minutos. Se aisló el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 10 x 250 mm y se liofilizó hasta sequedad a la fracción de HPLC que contenía al producto. Se recuperó un sólido en polvo de color púrpura. Rendimiento = 0,6 mg (12%); MALDI-TOF MS 738,9 observado (736,8 calculado).

Esquema 2

Síntesis de Derivados de AE Sustituídos en Posición 2



Ejemplo 6

*Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-(4-hidroxifenil)-10-metilacridinio-9-carboxilato (2-HP-DMAE)**Síntesis de N-[3-(4-benciloxifenil)fenil]isatina*

Se enfrió isatina (0,12 g, 0,81 mmol) en DMF anhidro (30 mL) en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno y se la trató con hidruro de sodio (21 mg, 1,1 equivalentes). Se agitó la reacción en hielo durante 0,5 horas y luego se la calentó hasta temperatura ambiente. Se trató luego esta solución con 4-(3-bromofenil)fenol bencil éter (Hajduk y colaboradores J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 5818 - 5827), (0,16 g, 0,47 mmol) seguido por yoduro de cobre (0,32 g, 1,68 mmol). Se calentó la reacción en un baño de aceite a 140°C. Después de ~ 16 horas, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se la concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en acetato de etilo (~ 75 mL) y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida para producir un sólido pegajoso de color marrón que fue purificado por medio de TLC preparativa sobre gel de sílice utilizando 25% de acetato de etilo en hexanos como el solvente de desarrollo. Rf (producto) = 0,38. Rendimiento = 47 mg (25%); MALDI-TOF MS 407,02 observado (405,5 calculado); RMN-¹H (CDCl₃) 5.12 (s, 2H), 6.95 (d, 1H, J = 8 Hz), 7.06 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.18 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 7.33-7.47 (m, 7H), 7.53 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.57-7.60 (m, 2H), 7.71 (d, 1H, J = 7.5 Hz).

Síntesis de 3-(4-benciloxifenil)-9-carboxiacridina

Se suspendió la isatina alquilada anterior (47 mg) en 25 mL de KOH al 10% y se la sometió a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se diluyó con un volumen igual de agua con hielo. Esta fue acidificada con HCl ~ al 10% hasta un pH de 2. Se recogió el sólido de color amarillo que se separó por medio de filtración y se enjuagó con agua con hielo (3 x 5 mL). Después de secar completamente al aire, se disolvió el sólido de color amarillo en metanol y se evaporó la solución hasta sequedad. Se suspendió el residuo en tolueno y se evaporó la solución resultante hasta sequedad. Rendimiento = 44 mg (94%). Se utilizó este material tal cual durante la reacción siguiente.

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxifenil)-acridin-9-carboxilato (3-BzP-DMAE-Bz)

Se enfrió en un baño de hielo a la 3-(4-benciloxifenil)-9-carboxiacridina (44 mg, 0,108 mmol) en piridina anhidra (20 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se la trató con 4-carboxibencil-2,6-dimetilfenol (33,3 mg, 1,2 equivalentes) y cloruro de p-toluensulfonilo (41 mg, 2 equivalentes). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Se concentró luego a presión reducida y se suspendió el residuo en tolueno (~ 25 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el material recuperado en cloroformo (~ 2 mL) y se aisló el producto por medio de TLC preparativa sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 25% en hexanos como el solvente de desarrollo. Rendimiento: 22 mg (31%), MALDI-TOF MS 645,52 observado (645,75 calculado).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 3-(4-benciloxifenil)-10-metil-acridinio-9-carboxilato (3-BzP-DMAE-Bz)

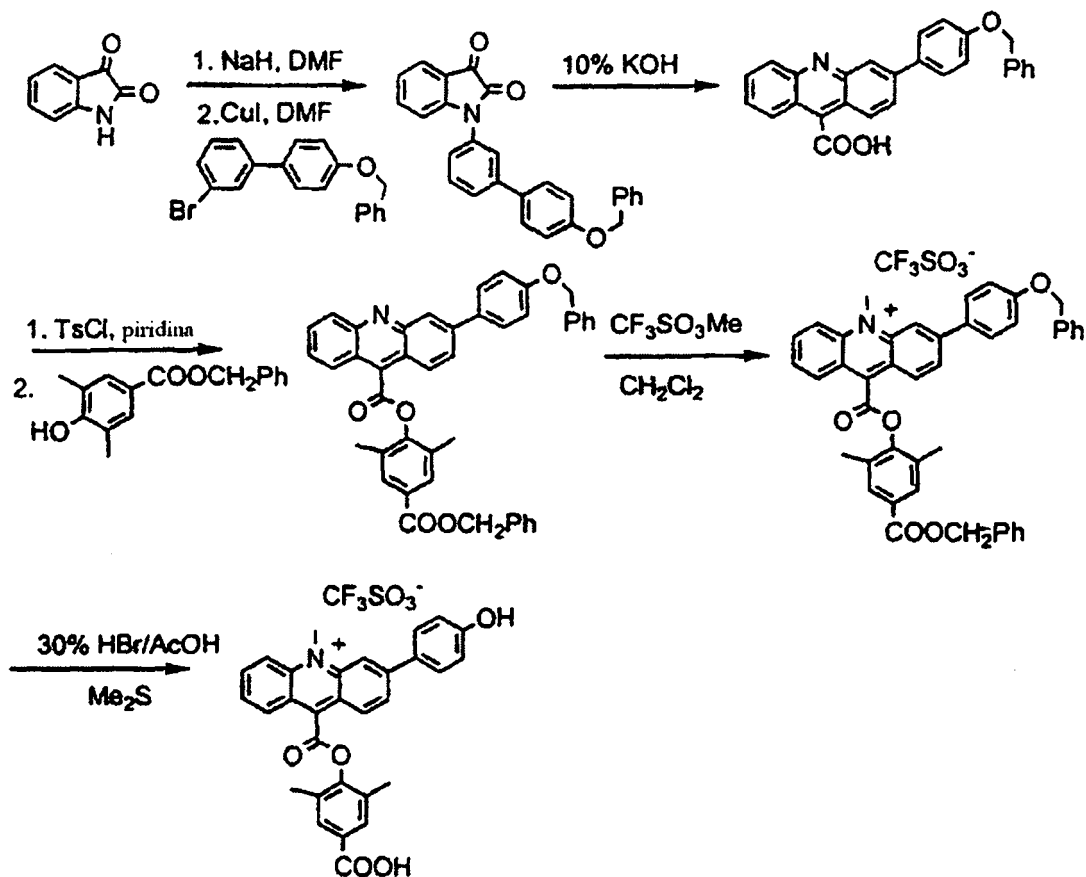
Se disolvió el éster (21 mg, 0,033 mmol) en diclorometano (1,5 mL) y se lo trató con metil trifluorometanosulfonato (100 uL, 0,88 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se removió luego el solvente a presión reducida y se disolvió el residuo en MeCN (2 mL). El análisis por HPLC utilizando una columna C18 (3,9 x 300 mm) y un gradiente de 30 minutos de 10→ 100% MeCN conteniendo cada vez 0,05% de TFA, con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min y detección UV a 260 nm mostró productos que eluyen a 20, 24, 25 y 29,5 minutos. Estos fueron aislados por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 20 x 300 mm y se analizaron las fracciones por medio de MALDI-TOF MS. El producto principal que eluye a los 24 minutos produjo el ion molecular correcto a 659,57 observado (660,78 calculado). Se evaporó hasta sequedad la fracción de HPLC que contiene este producto, que era de color rojo profundo. Rendimiento = 14 mg (65%).

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxifenil)-10-metilacridinio-9-carboxilato (3-HP-DMAE)

Se agitó el anterior éster de acridinio protegido con bencilo (14 mg, 0,017 mmol) en una mezcla 1:1 de sulfuro de metilo y HBr al 30% en ácido acético a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Se añadió luego éter para precipitar el producto que fue recolectado por medio de filtración y enjuagado con éter. Se disolvió el producto rojo en metanol. El análisis por HPLC como se describió anteriormente indicó un producto limpio que eluye a los 16 minutos. Este fue aislado por medio de HPLC preparativa y se evaporó la fracción de HPLC hasta sequedad. Rendimiento = 2,6 mg (26%); MALDI-TOF MS 479,13 observado (479,52 calculado).

Esquema 3

Síntesis de 3-HP-DMAE



Ejemplo 7

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato (2-OH-DMAE)

Síntesis de 4-Metoxietoximetoxi-iodobenceno

Se trató una solución de 4-yodofenol (10 g, 45,45 mmol) en 200 ml de tetrahidrofurano anhidro a 0°C con hidruro de sodio (2,36 g, dispersión al 60%, 59,09 mmol) durante 5 minutos. A la mezcla resultante se le añadió lentamente durante un período de 5, cloruro de metoxi etoximetilo (8,3 ml, 72,73 mmol). Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 minutos, se calentó hasta temperatura ambiente, y se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Se removió el solvente a presión reducida. Se colocó el residuo en 500 ml de éter, se lavó con 200 ml de hidróxido de sodio al 5% (4 x 200 ml), agua (4 x 200 ml), se saturó con cloruro de sodio (1x 200 ml), y se secó sobre sulfato de sodio. La evaporación del solvente a presión reducida produjo un producto aceitoso en 14,1 g. TLC (gel de sílice, éter): R_f = 0,5.

N-(4-Metoxietoximetoxi)fenil isatina

Se trató una solución de isatina (4,0 g, 27,2 mmol) en 200 ml de N,N -dimetilformaldehído a temperatura ambiente con hidruro de sodio (1,036 g, dispersión al 60%, 32,64 mmol) durante 0,5 horas, seguido por la adición de 4-metoxietoximetoxi-yodobenceno (12,57 g, 40,8 mmol) y yoduro de cobre (I) (10,34 g, 54,4 mmol). Se agitó la mezcla resultante a -160°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 17 horas. Se enfrió hasta temperatura ambiente, y se diluyó con 400 ml de cloroformo. Se filtró la mezcla resultante para remover los materiales inorgánicos. Se evaporó el filtrado a presión reducida para producir una mezcla cruda que contiene N-(4-metoxietoximetoxi)fenil isatina como el producto principal. TLC (gel de sílice, éter): R_f = 0,8.

Ácido 2-metoxietoximetoxi-acridin-9-carboxílico

Se suspendió la anterior 4-metoxietoximetoxifenil isatina cruda, sin purificación, en 120 ml de hidróxido de potasio al 10%. Se sometió a reflujo a la suspensión a 150°C durante 5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtró la mezcla para remover las impurezas de color naranja. Se aciduló el filtrado en un baño de agua con hielo con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 2. Se recolectó el precipitado resultante de color amarillo y se lo lavó con agua (4 x 50 ml) y secó al aire. Se lavó adicionalmente el material seco con éter (6 x 50 ml) para rendir el producto deseado en 6,7 g. TLC (gel de sílice, metanol/cloroformo al 30%): Rf = 0,5.

2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-metoxietoximetoxi-acridin-9-carboxilato (2-MEM-DMAeE-Bz)

Se trató una suspensión del ácido 2-metoxietoximetoxi-acridin-9-carboxílico (3,6 g, 11 mmol) en 150 ml de piridina anhidra con cloruro de p-toluensulfonilo (4,183 g, 22 mmol) a 0°C durante 5 minutos para formar una solución homogénea de color marrón. Luego, se añadió bencil 3,5-dimetil-4-hidroxi-benzoato (2,818 g, 11 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 20 horas. Se removió el solvente a presión reducida. Se separó el residuo sobre una columna empacada con sílice para cromatografía flash, con hexano. Se eluyó con éter/hexano al 50% (1 litro) seguido por éter/hexano al 70% (3 litros). Se obtuvo la fracción del producto a partir del eluyente éter/hexano al 70%. La evaporación de los solventes a presión reducida produjo 3,74 g del producto deseado. TLC (gel de sílice, éter): Rf = 0,8.

2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato trifluorometano-sulfonato (2-OH-DMAE-Bz)

Se trató una solución de color amarillo claro de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-metoxietoximetoxi-acridin-9-carboxilato (400 mg, 0,708 mmol) en 20 ml de cloruro de metileno anhidro con metil trifluorometanosulfonato (0,4 ml, 3,54 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno con agitación durante 14 horas. Se trató la mezcla resultante con éter anhidro (20 ml). Se recolectó el precipitado y se lo lavó con éter (4 x 20 ml) para producir 325 mg del producto. MS: (ESI): m/z 492,6 (M⁺). RMN ¹H (300 MHz, MeOD-d₄/CDCl₃): δ 2.52 (6H, s), 5.01 (3H, s), 5.42 (2H, s), 7.37-7.51 (5H, m), 7.81 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7.97 (2H, s), 8.10 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.16 (1H, dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 2.6 Hz), 8.42 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.60 (1H, d, J = 8.8 Hz), y 8.73 (2H, dos dobletes superpuestos, J ~ 8.0 Hz).

Bromuro de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato (2-OH-DMAE)

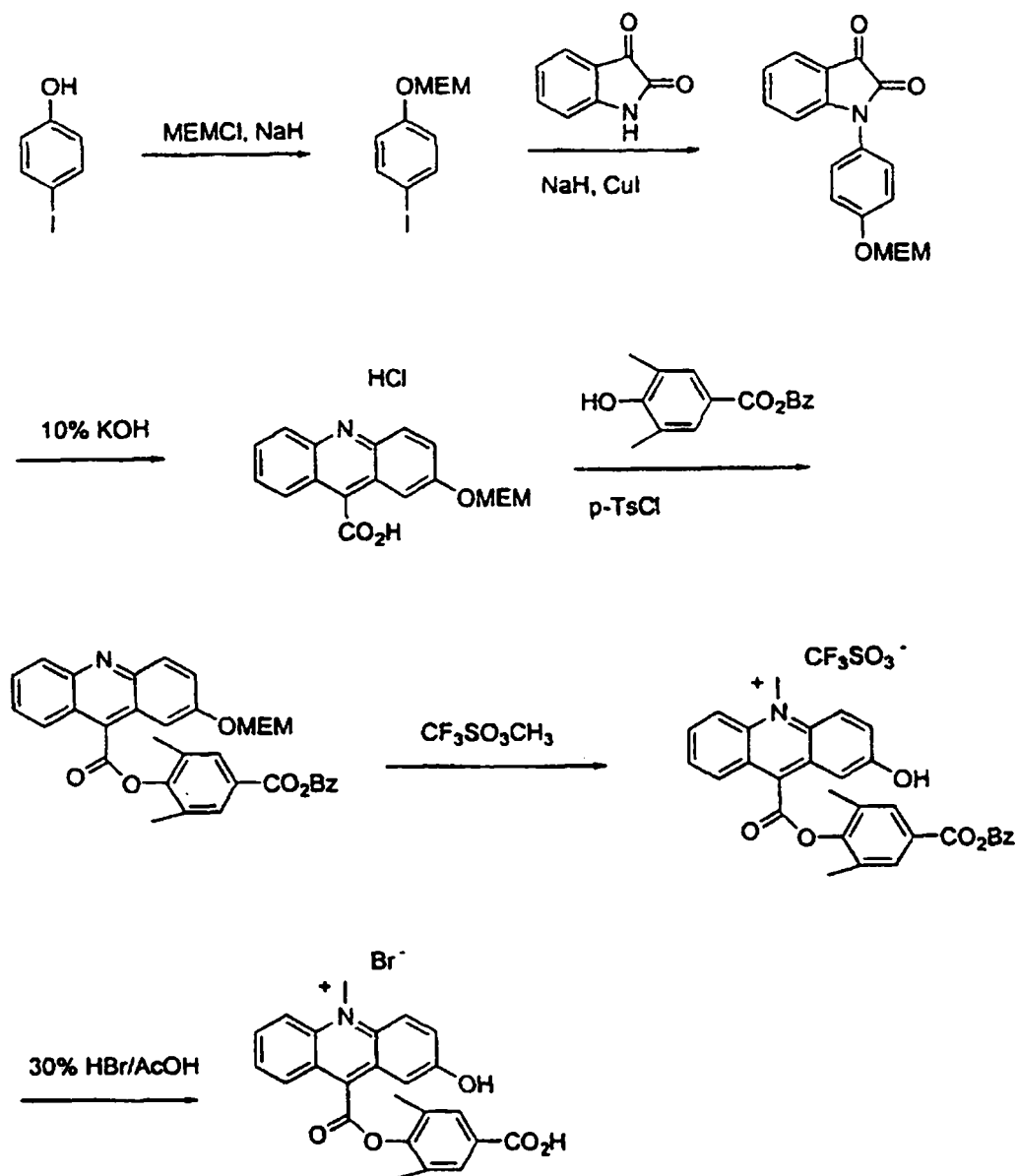
Se agitó una solución de 2',6'-dimetil-4'-benciloxicarbonilfenil 2-hidroxi-10-metilacridinio-9-carboxilato trifluorometanosulfonato (100 mg) en 4 ml de bromuro de hidrógeno al 30% en ácido acético a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, y luego se la trató con 10 ml de éter anhidro. Se recolectó el precipitado resultante y se lo lavó con éter (4 x 10 ml) para producir 80 mg de bromuro de (4-carboxil-2,6-dimetil)fenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato. MS (ESI): m/z 402,7 (M⁺). RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN/MeOD-d₄): δ 2.52 (6H, s), 4.95 (3H, s), 7.78 (1H, d, J = 2.7 Hz), 7.76 (2H, s), 8.10 (1H, t, J = 7.0 Hz), 8.13 (1H, dd, J₁ = 9.9 Hz, J₃₋₂ = 2.7 Hz), 8.40 (1H, d t, J₁ = 2.7 Hz, J₂ = 8.0 Hz), 8.62 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.77 (1H, d, J = 9.2 Hz), y 8.78 (1H, d, J = 9.9 Hz).

(Esquema pasa a página siguiente)

ES 2 320 055 T3

Esquema 4

Síntesis de 2-OH-DMAE



Ejemplo 8

Síntesis del conjugado NSB-3-HS-DMAE-BSA

Se trató BSA (0,5 mg, 0,0075 umoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (0,9 mL) con una solución de NSB-3-HSDMAE-NHS (0,25 mg, 0,35 umoles) en DMF (0,1 mL) gota a gota. Resultó una solución clara que fue agitada a temperatura ambiente durante ~ 16 horas. Se aisló la proteína marcada por medio de cromatografía en columna sobre Sefadex G25 utilizando agua como eluyente. Se recolectó la fracción de proteína que eluye en el volumen vacío y se la concentró utilizando un filtro amicon (corte de PM 30.000). El análisis por MALDI-TOF del conjugado indicó un incremento de masa de 1180 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 2 etiquetas de NSB-3-HS-DMAE por BSA.

Ejemplo 9

Síntesis del conjugado NSB-3-HS-DMAE-anti-TSH

Se trató anticuerpo TSH (0,5 mg, 3,33 nmoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (0,45 mL) con una solución de NSB-3-HS-DMAE-NHS (120 ug, 50 equivalentes) en DMF (60 uL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se aisló la proteína marcada como se describió anteriormente. El análisis por MALDI-TOF MS del conjugado indicó un incremento de masa de 1796 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 3 etiquetas por molécula de anti-TSH.

Ejemplo 10

Síntesis del conjugado 3-HS-DMAE-BSA

Se trató BSA (2 mg, 0,03 umoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (400 uL) con una solución de 3-HS-DMAE-NHS (0,45 mg, 25 equivalentes) en DMF (100 uL). La reacción, que era ligeramente turbia, se agitó a 4°C durante 16 horas. Se aisló el conjugado como se describió anteriormente. El análisis por MALDI-TOF MS del conjugado indicó un incremento de masa de 415 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 1 etiqueta por BSA.

Ejemplo 11

Síntesis del conjugado NSB-3-MS-DMAE-BSA

Se trató BSA (0,5 mg, 0,0075 umoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (400 uL) con una solución de NSB-3-MS-DMAE-NHS (140 ug, ~ 25 equivalentes) en DMF (140 uL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas y luego se aisló el conjugado como se describió anteriormente. El análisis por MALDI-TOF MS del conjugado mostró un incremento de masa de 3250 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 5 etiquetas por BSA.

Ejemplo 12

Síntesis del conjugado NSB-3-MS-DMAE-anti-TSH

Se trató el anticuerpo TSH (0,5 mg, 3,33 nmoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (400 uL) con una solución de NSB-3-MS-DMAE-NHS (120 ug, ~ 50 equivalentes) en DMF (120 uL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas y luego se aisló el conjugado como se describió anteriormente. El análisis por MALDI-TOF MS del conjugado mostró un incremento de masa de 6074 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 10 etiquetas por anticuerpo TSH.

Ejemplo 13

Síntesis del conjugado 2-HS-DMAE-BSA

Se trató 2-HS-DMAE (1,3 mg, 2 umoles) en MeCN (0,65 mL) + DMF (0,1 mL) con N-hidroxisuccinimida (1,4 mg, 12 umoles) y dicitclohexil carbodiimida (3 mg, 14,6 umoles). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 2-3 horas el análisis por HPLC sobre una columna C18 (3,9 x 300 mm) utilizando un gradiente de 30 minutos de 10→100% MeCN/agua conteniendo cada vez 0,05% de TFA con un flujo de 1 ml/min y detección por UV a 260 nm mostró un Rt (producto) = 18,2 min (> 80%), Rt (sm) = 17 min. Se agitó la reacción durante 1 hora adicional y luego se removió MeCN a presión reducida. Se añadió el resto gota a gota a una solución de BSA (5 mg, 0,075 umoles) en carbonato 0,1 M pH 9 (0,5 mL) seguido por DMF adicional (0,2 mL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se centrifugó para remover el material insoluble. Se purificó el filtrado por medio de cromatografía en columna sobre Sefadex G25 con agua como eluyente. Se recolectó la proteína marcada eluyendo en el volumen vacío y se concentró por medio de filtración amicon (corte del filtro PM 30.000). El análisis por MALDI-TOF MS del conjugado mostró un incremento de masa de 2822 unidades correspondiente a la incorporación de aproximadamente 6 etiquetas por BSA.

Ejemplo 14

Comparación del Ensayo con TSH de DMAE y NSB-3-HS-DMAE como Etiquetas Trazadoras

Se evaluó la aplicabilidad del ensayo de diagnóstico por la funcionalidad de enlazamiento del conjugado utilizando un inmunoensayo divalente tipo sándwich formulado durante la cuantificación clínica de TSH en suero. En este ensayo el conjugado NSB-3-HS-DMAE-antiTSH (de aquí en adelante denominado como un trazador) se debe enlazar espe-

cíficamente al analito seleccionado, TSH, presente en una muestra de un paciente o en estándares que contienen TSH (Chiron Diagnostics Corp., Walpole, MA), para formar un complejo antígeno-anticuerpo no covalentemente asociado. El complejo resultante trazador-analito es capturado a su vez por un segundo anticuerpo anti-TSH policlonal de oveja, covalentemente acoplado a una fase sólida de partículas paramagnéticas. Se determina la señal quimioluminiscente después de la separación magnética del conjugado enlazado a la fase sólida del conjugado no enlazado. La calificación del trazador se evalúa a través de dos métodos relacionados; principalmente, un análisis comparativo de los datos de la curva estándar normalizada, generados para ambos conjugados en cuestión y también un trazador DMAE-anti-TSH de utilidad previamente establecida. Se utilizaron los datos de la curva estándar para calcular la concentración de TSH de diferentes muestras de control. Se diluyó el concentrado NSB-3-HS-DMAE-anti-TSH $8,96 \times 10^{-4}$ veces a partir de $2,4 \mu\text{M}$ en Búfer para Reactivos ACSTM TSH3 Lite (Chiron Diagnostics Corp., Walpole, MA) hasta $2,15 \text{ nM}$, que fue la concentración del trazador DMAE-anti-TSH de referencia suministrado con el kit de análisis de TSH3 de Chiron Diagnostics. El análisis de TSH se inició cuando se mezclaron separadamente 100 uL del nuevo trazador NSB-3-HS-DMAE-anti-TSH y 100 uL del trazador del kit de DMAE-anti-TSH con $200 \mu\text{L}$ ya sea de un estándar de TSH o de un control. Se utilizaron diez estándares de TSH, que contenían TSH en concentraciones de $0,000$; $0,120$; $0,740$; $1,92$; $3,86$; $8,99$; $19,9$; $49,6$; $97,1$ y $183 \mu\text{I.U./mL}$ (Chiron Diagnostics Corp., Walpole, MA). Se analizaron también seis controles. Estos fueron los Ligandos 1, 2 y 3 de Chiron Diagnostics, que contenían TSH en concentraciones promedio de $0,600$; $4,90$ y $17,0 \mu\text{I.U./mL}$, respectivamente, y los Sueros de Control 1, 2 y 3 del Inmunoensayo Lifocheck[®] de Bio-Rad Laboratories, que contenían TSH en concentraciones promedio de $2,94$; $11,5$ y $40,6 \mu\text{I.U./mL}$, respectivamente. Se agitaron colectivamente con un agitador tipo vórtice las mezclas tres veces durante 5 segundos en la posición No. 5 en un agitador tipo vórtice para múltiples tubos marca Corning, Inc. modelo 4010. Se recolectaron los datos por triplicado. Se incubaron luego las mezclas del ensayo durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se añadieron 200 uL de Fase Sólida TSH3 ACSTM ($\sim 67 \mu\text{g}$) a cada ensayo. Se agitaron las mezclas del ensayo en el agitador tipo vórtice tres veces como se describió anteriormente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separó magnéticamente la fase sólida del sobrenadante por medio de la aplicación durante 3 minutos de un arreglo de imanes permanentes en un Gradilla para Análisis Ciba-Corning Magic Lite. Se decantó el sobrenadante de la fase sólida. Se removió el sobrenadante residual por medio de transferencias durante 3 minutos y luego nuevamente durante 1 minuto.

Se lavó la fase sólida con dos volúmenes separados de $1,0 \text{ mL}$ de Búfer de Lavado ACSTM:NG de Chiron Diagnostics y se la suspendió en $100 \mu\text{L}$ de agua grado reactivo. Se inició la reacción de quimioluminiscencia por medio de la adición secuencial de $300 \mu\text{L}$ cada vez del Reactivo 1 de MLA de Chiron Diagnostics (HNO_3 $0,1 \text{ N}$, H_2O_2 al $0,5\%$) y del reactivo 2 (NaOH $0,25 \text{ N}$, CTAC al $0,05\%$) en un Analizador Ciba-Corning Diagnostics Magic Lite equipado con un filtro óptico Corion BG38. Se recolectaron los datos de quimioluminiscencia como fotones detectados por el Analizador Magic Lite y se expresaron en unidades relativas de luz (RLU).

Método de Calculo para los Parámetros del Ensayo tipo Sándwich

Los promedios aritméticos para las RLU resultantes de una concentración específica de analito, representada aquí como μ , fueron calculados a partir de tres replicas. Los reactivos no trazadores del ensayo también contribuyen a veces a pesar de un pequeño número significativo de RLU. Por lo tanto, se corrió paralelamente una reacción de control, que contiene todos los reactivos del ensayo excepto trazador, para determinar un valor de fondo del reactivo no trazador, representado aquí como n . Las RLU aritméticas promedio, μ , fueron corregidas para representar las RLU obtenidas únicamente a partir del trazador, representado aquí como B , donde $B = \mu - n$. Cuando la concentración de analito fue la más alta, el valor promedio aritmético corregido de la RLU para ese punto fue denominado como B_{max} . Existe una relación directa pero no lineal entre la concentración del analito presente en el estándar y las RLU detectadas. Consecuentemente, la misma correlación sigmoidal directa también relaciona la concentración del analito con el $\%B/B_{\text{max}}$ resultante y puede ser expresada en forma precisa en forma empírica lineal como

$$y = y_0 + \frac{(y_{\infty} - y_0)}{(1 + 10^{-m \log x - b})}$$

donde x es la concentración de analito, y y es la señal generada observada ya sea como $\%B/B_{\text{max}}$ o como las RLU (Ref. A, B C).

A. **Rodbard**, David; *Ligand Analysis*; (1981); Langon, J.; Clapp, J. (Eds.); *Masson Publishing, Inc.*, New Iork; páginas 45-101.

B. **Nix**, Barri; *The Immunoassai Handbook*; (1994); Wild, David (Ed.); *Stockton Press, Inc.*, New Iork; páginas 117-123.

C. **Peterman**, Jeffrei H.; *Immunochemistri of Solid-Fase Immunoassai*; (1991); Butler, J. (Ed.); *CRC Press, Inc.*, Boca Raton; páginas 47-65.

Adicionalmente, existen cuatro parámetros más, a saber, la constante de regresión, b , el coeficiente de regresión, m , el enlazamiento asintótico no específico (NSB) con una dosis 0 (concentración de analito), y_0 , y la respuesta en el límite infinito asintótico para una dosis infinitamente alta, y_∞ . Los últimos tres de estos parámetros fueron calculados directamente utilizando la función de análisis logístico de cuatro parámetros, iterativa, y ponderada (4PL-WTD) del programa DOSECALC.EXE Rev.1.73 (Chiron Diagnostics Corp., Walpole, MA). Se determinó el promedio aritmético de la constante de regresión b sobre el rango total de concentraciones de analito como se calculó a partir de la expresión de respuesta a la dosis reescrita como

$$b = -\log \frac{y_\infty - y}{y - y_0} - mg \log x$$

Las concentraciones de analito de desconocidos fueron calculadas posteriormente utilizando la ecuación de respuesta a la dosis reordenada como

$$x = 10^{\frac{\log[(y_\infty - y)(y - y_0)] + b}{-m}}$$

Curvas Estándar del Ensayo de TSH Utilizando NSB-3-HS-DMAE y DMAE como Etiquetas Trazadoras

Las gráficas logarítmicas dobles de $\%B/B_{\max}$ versus la concentración de TSH (ver Figura 3) ilustran la cercana similitud en la forma de la curva estándar normalizada generada por los conjugados NSB-3-HS-DMAE-anti-TSH y DMAE-anti-TSH. Indicando, por lo tanto, que la etiqueta NSB-3-HS-DMAE y otras etiquetas de éster de acridinio de longitud de onda de emisión larga tienen utilidad como trazadores para inmunoensayos sobre cuatro o cinco órdenes de magnitud en la concentración de analito: satisfactorio en este caso para la determinación de la concentración de TSH sobre su rango completo clínicamente relevante.

Precisión del Ensayo en la Determinación de la Concentración de TSH

Se calcularon las concentraciones de TSH para los Ligandos 1, 2 y 3 de Ciba-Corning, así como, para los Sueros de Control 1, 2 y 3 de Bio-Rad utilizando la función ponderada 4PL. Se compararon los valores calculados con los rangos de los valores establecidos estipulados en la literatura asociada del producto. En todos los casos NSB-3-HS-DMAE mostró una utilidad demostrable como etiqueta trazadora para la determinación precisa de la concentración de TSH en los controles indicados. Los resultados fueron comparables con aquellos asociados con la etiqueta DMAE. Los ésteres de acridinio en el NIR tienen utilidad práctica como etiquetas trazadoras en inmunoensayos.

Concentración de TSH Esperada versus Determinada para los Controles de TSH						
Concentración de TSH (ul.U./ml)	Ligandos de Ciba-Corning Diagnostics			Sueros de Control de Bio - Rad Laboratories		
Niveles	1	2	3	1	2	3
Rango Esperado	0,50 - 0,70	4,20 - 5,60	14,0 - 20,0	2,34 - 3,54	9,10 - 13,9	35,6 - 45,6
Determinado						
Utilizando etiqueta DMAE	0,607	4,48	17,5	2,84	10,8	35,9
Utilizando etiqueta NSB-3-HS-DMAE	0,688	4,95	19,3	3,32	12,0	41,1

Ejemplo 15

Síntesis de 2',6'-dimetil-4'-(N-succinimidiloxycarbonil)fenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato (2-OH-DMAE-NHS)

Se trató una solución de 2',6'-dimetil-4'carboxifenil 2-hidroxi-10-metil-acridinio-9-carboxilato (3,5 mg, 6,35 μ moles) en DMF anhidro (0,5 mL) con N-hidroxisuccinimida (3,7 mg, 5 equivalentes) y diciclohexil carbodiimida (6,5 mg, 5 equivalentes). Se agitó la reacción a temperatura ambiente. Después de 5-6 horas, el análisis por HPLC utilizando una columna C18 (3,9 x 300 mm) y un gradiente de 30 minutos de 10 $\rightarrow$ 100% MeCN/agua, conteniendo cada vez 0,05% de TFA, con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min y detección UV a 260 nm, indicó conversión

ES 2 320 055 T3

completa; Rt (producto) = 15 min, Rt (ácido de partida) = 14 min. Se aisló el producto por medio de HPLC preparativa utilizando una columna de 20 x 300 mm y se liofilizó hasta sequedad la fracción de HPLC que contiene al producto. Rendimiento = 3 mg (75%). Se utilizó este material tal cual para la siguiente reacción de marcación.

5 Ejemplo 16

Ensayo de Hibridación con Etiqueta de Éster de Acridinio Dual

A. Etiquetas de oligonucleótido

10

Sonda 526.20 (SEQ ID NO: 1) de 2-OH-DMAE-Vanco A

Se sintetizó un oligonucleótido sintético de 20-mer que contiene la siguiente secuencia de la sonda de Vancomicina A 5'-XCG CAA GGT TTT TCG CAC ATT (SEQ ID NO: 7) utilizando química estándar de fosforamidita. Se introdujo un grupo amino en el extremo 5' utilizando el modificador de amino "Unilink" de Clontech (X en la secuencia anterior). Se enfriaron en hielo diez nmoles de este oligonucleótido en 0,3 mL de bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,5 y se lo trató con una solución de DMF del anterior éster de NHS (3 x 500 nmoles, 1 mg total) en tres porciones iguales de 70 uL cada una. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas y luego se separó el ADN etiquetado de la etiqueta libre por medio de filtración en gel sobre una columna de Sefadex G25. Se recolectó el AND etiquetado que eluye en el volumen vacío de la columna y se lo purificó adicionalmente por medio de HPLC preparativa sobre una columna C18 (3,9 x 300 mm) y un gradiente de 8→20% en 20 minutos seguido por un gradiente de 20→60% en 20 minutos de MeCN en acetato de trimetilamonio 0,1 M pH 7,3. El conjugado eluyó a los 16 minutos y fue recolectado y liofilizado hasta sequedad. Rendimiento = 1.73 nmoles (17%), MALDI-TOF MS 6678,5 observado (oligonucleótido 6292,7 no modificado) indicó la incorporación esperada de una etiqueta. Se encontró que la actividad específica de la etiqueta permaneció inalterada comparada con aquella de la etiqueta libre a 0,45 x 10¹⁹ RLU/mole.

Sonda 495.23 (SEQ ID NO: 2) de DMAE-Vanco B

La síntesis de la secuencia de la sonda de Van B enlazada a amino y la marcación de DMAE se llevaron a cabo en la misma forma que en el procedimiento del párrafo anterior.

B. Inmovilización de oligo-desoxirribonucleótidos sobre amino-PMP

Se llevaron a cabo todas las reacciones a temperatura ambiente a menos que se diga otra cosa. Se separó magnéticamente el PMP recubierto con el polímero aminoetil aminopropil siloxano (Amino-PMP, 0,59 mL de 50,8 mg/mL, 30 mg) de su búfer de almacenamiento con la aplicación de un imán permanente fuerte (diez minutos, Industrial Magnetics, Inc. modelo 5C3894). Se removió el buffer de almacenamiento por medio de aspiración. Se lavó secuencialmente el amino-PMP con cuatro volúmenes separados (10 mL) de piridina 10 mM por medio de mezcla (diez minutos, posición 5 en un agitador tipo vórtice para múltiple tubos de Corning, Inc., modelo 4010) y separación magnética (diez minutos) durante cada ciclo de lavado. Se mezcló glutaraldehído (5% (p/v) en piridina 10 mM, 10 mL) (posición 3, tres horas) con la suspensión de amino-PMP. Se removió el glutaraldehído no reaccionado con cuatro ciclos de lavado de piridina 10 mM (40 mL en total). Se acoplaron treinta O.D. de oligómero enlazado a amino 5' en 415 uL de piridina 10 mM. Se reunieron las mezclas de reacción en un agitador orbital (Lab Industries, Inc. modelo 400-100) durante 16 horas. Se removió el sobrenadante y se trataron los oligo-PMP con 10 mL de cianoborhidruro de sodio 100 mM durante cuatro horas. Se lavaron los oligo-PMP cinco veces con 1,0 mL de agua y luego se los desprotegió con 2,0 mL de hidróxido de amonio concentrado durante 16 horas a 55°C. Se removió el sobrenadante y se lavaron los oligo-PMP con 1,0 mL de agua y se los resuspendió en 1,0 mL de agua. (Vanco-A PMP-Sonda 557,22 es denominada como SEQ ID NO: 3. Vanco B PMP-Sonda 496,20 es designada como SEQ ID NO: 4.)

C. Ensayo de la Sonda de Analito Doble

Preparación del ensayo

En la preparación del ensayo se elaboraron varios búferes: Búfer de Hibridación (cloruro de sodio 0,60 M, ácido cítrico 60 mM, Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, albúmina de suero bovino 0,10% (p/v), Tween - 20 0,020% (v/v), azida de sodio 0,020% (p/v), sulfato de dextrano 1,0% (p/v), pH 8,0), Diluyente de Sonda (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0), Solución de Lavado (cloruro de sodio 0,30 M, ácido cítrico 30 mM, dodecil sulfato de sodio 0,10% (p/v), pH 7,7) y Solución de ADNasa I (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, cloruro de magnesio 10 mM, 3,3 µg/mL de ADNasa I, pH 8,0). Se diluyeron las fases sólidas y los objetivos de síntesis hasta las concentraciones indicadas de trabajo en Búfer de Hibridación, mientras que las sondas se diluyeron en Diluyente para Sondas. Se preparó una mezcla de reacción de hibridación (Ver Figura 4) para que contuviera 12,5 µL de la Sonda 526.20 de 2-OH-DMAE-Vanco A 80 nM (1,0 pmol) (SEQ ID NO: 1), 12,5 µL de la Sonda 459.23 de DMAE-Vanco B 1,6 nM (0,10 pmol) (SEQ ID NO: 2), 100 µL de la fase sólida de la Sonda-PMP 557.22 de Vanco-A con una concentración de 2,0 mg/mL (0,20 mg) (SEQ ID NO: 3), 100 µL de la Sonda-PMP 496.20 de Vanco B con una concentración de 0,20 mg/mL (20 µg) (SEQ ID NO: 4), 75 µL tanto del objetivo de síntesis de 526.53 de Vanco A (SEQ ID NO: 5) como de 459.57 de Vanco B (SEQ ID NO: 6) en concentraciones de 10⁻⁸, 5 x 10⁻⁹, 10⁻⁹, 5 x 10⁻¹⁰, 10⁻¹⁰ y 0 M. (Nótese que Vanco es también denominado aquí como Van). Entonces la masa del objetivo en cada análisis fue o bien 750, 375, 75, 37,5, 7,5 ó 0,000 fmoles, representado de otro modo como 4,5 x 10¹¹, 2,3 x 10¹¹, 4,5 x 10¹⁰, 2,3 x 10¹⁰, 4,5 x 10⁹, y 0 moléculas. Mientras que las reacciones

de los ensayos simultáneos se constituyeron como se indicó anteriormente, los ensayos individuales para cada analito contenían únicamente la sonda complementaria, siendo la otra sustituida con Diluyente para Sonda. Se agitaron tres veces las mezclas de los ensayos en un agitador tipo vórtice durante cinco segundos en la posición número cinco en un agitador tipo vórtice para múltiples tubos de Corning, Inc. modelo 4010. Se incubaron las mezclas de reacción a 45°C durante treinta minutos. Se separó magnéticamente la fase sólida del sobrenadante por medio de la aplicación durante tres minutos de un arreglo de imanes permanentes en una en un Gradilla para Análisis Ciba-Corning Magic Lite. Se decantó el sobrenadante de la fase sólida. Se removió el sobrenadante residual por medio de transferencias durante tres minutos y luego nuevamente durante un minuto. Se lavó la fase sólida con dos volúmenes separados de 1,0 mL de Solución de Lavado para remover la sonda no enlazada y luego se la suspendió en 300 μ L de Solución de ADNasa I para liberar la sonda de la superficie de la fase sólida. Se inició la reacción de quimioluminiscencia bajo el control del luminómetro Dual de PMT con la adición secuencial de 300 μ L del Reactivo 1 de ACS de Chiron Diagnostics (ácido nítrico 0,1 N, peróxido de hidrógeno al 0,5% (p/v)) seguido 0,1 segundos después por la adición de 300 μ L del Reactivo 2 de ACS (hidróxido de sodio 0,25 N, tensoactivo cloruro de N,N,N,N-hexadeciltrimetilamonio al 0,5% (p/v)). Se recolectaron los datos de quimioluminiscencia como cuantos detectados por el Aditamento Dual de PMT durante 2,0 segundos seguido inmediatamente por la adición del Reactivo 2 y se expresaron en unidades relativas de luz (RLU). (Las secuencias objetivo y de la sonda mostradas en la Figura 4 no muestran la estructura completa para los compuestos. Específicamente, se omiten los entrelazadores entre la secuencia de ácido nucleico y la etiqueta (o PMP). La descripción anterior proporciona información detallada acerca de los entrelazadores).

Instrumentación

El luminómetro Dual de PMT ha sido descrito en las patentes estadounidenses Nos. 5.395.752 y 5.447.687. Para la presente solicitud, se equiparon cada uno de los dos tubos fotomultiplicadores (PMT) sobre el luminómetro Dual de PMT con un filtro óptico diferente y separado. Se determinaron los valores de interferencia de 25 μ L de cada solución de la sonda. Se totalizaron los promedios aritméticos de cinco réplicas de ambos PMT, donde $T = (RLU \text{ promedio de PMT1}) + (RLU \text{ promedio de PMT2})$. La interferencia para la quimioluminiscencia de 2-HO-DMAE sobre PMT1 se calculó como $(\text{las RLU de PMT1 de 2-HO-DMAE-Van A}) \times 100/T$. La interferencia para la quimioluminiscencia de DMAE sobre PMT2 se calculó como $(RLU \text{ de PMT2 de DMAE-Van B}) \times 100/T$. El canal de longitud de onda corta, denominado aquí como PMT1, fue fijado con un filtro óptico BG-12-S-O939-4M229 de Corion, Inc. a través del cual se transmiten las longitudes de onda de 350 nm hasta 475 nm un 20% mejor que la luz incidente. Por lo tanto, el filtro BG-12-S-O939-4M229 transmitirá únicamente 3,5% (interferencia) de la luz total emitida por la sonda 2-HO-DMAE-Van A. De este modo, se detecta preferiblemente la señal quimioluminiscente de DMAE por medio de PMT1. El canal de longitud de onda larga, denominado aquí como PMT2, fue fijado con un filtro óptico LL-550-F-950B de Corion, Inc., que transmite longitudes de onda de luz de 560 nm y más largas aproximadamente en un 90% de la luz incidente. Como resultado, el filtro LL-550-F-950B transmitirá únicamente 1,1% (interferencia) de la luz total emitida por la sonda DMAE-Van B. De este modo, se detecta preferencialmente la señal quimioluminiscente de 2-HO-DMAE por medio de PMT2. Como se evidencia con los bajos porcentajes de interferencia, el luminómetro Dual de PMT equipado con esos filtros ópticos proporciona una excelente discriminación de las señales separadas de quimioluminiscencia de una muestra combinada de sondas etiquetadas DMAE- y 2-HO-DMAE.

Resultados

Además de la sonda etiquetada con AE, otros reactivos de análisis también contribuyen un poco aunque algunas veces una cantidad significativa de RLU. Por lo tanto, se corrió paralelamente una reacción de control, que contiene todos los reactivos del ensayo excepto la sonda, para determinar la señal de fondo de los reactivos diferentes a la sonda, representada aquí como n . La RLU promedio de tres replicas, μ , fueron corregidas para representar las RLU obtenidas únicamente a partir de la sonda, representada aquí como B , donde $B = \mu - n$. se han tabulado los resultados y se los presenta más abajo. Se generaron gráficas de doble logaritmo para las RLU corregidas por la señal de fondo versus el número objetivo. Como se ilustra en las dos gráficas más abajo (ver Figuras 5 y 6), las curvas estándar son idénticas tanto para el ensayo individual de Van A como para el ensayo simultaneo de Van A y B utilizando la quimioluminiscencia generada por la sonda Van A etiquetada con 2-HO-DMAE. En forma similar, las curvas estándar son idénticas también tanto para el ensayo individual de Van B como para el ensayo simultaneo de Van A y B utilizando la quimioluminiscencia generada por la sonda Van B etiquetada con DMAE. Las formas idénticas de las curvas estándar tanto en el ensayo individual como en el ensayo dual del analito indican que las sondas mezcladas etiquetadas con DMAE- y 2-HO-DMAE hibridan independientemente a sus respectivas secuencias objetivo y no son perturbadas por la presencia de los componentes no relacionados del ensayo dual. Estos resultados junto con la excelente discriminación de las señales de quimioluminiscencia de longitud de onda corta y larga sobre el luminómetro Dual de PMT demuestran lo práctico que es utilizar dos sondas etiquetadas con AE con un máximo de emisión de quimioluminiscencia ópticamente discernible para cuantificar simultáneamente dos analitos distintos dentro de la misma muestra.

ES 2 320 055 T3

Ensayos de Hibridación Individual y Simultanea para el Gen de Resistencia a la Vancomicina A Utilizando una Sonda Etiquetada con 2-OH-DMAE		
Número Objetivo	Cuantos (RLU)	
	Individual	Simultaneo
0	93	89
4.500.000.000	453	563
23.000.000.000	1.981	2.491
45.000.000.000	4.502	4.820
230.000.000.000	22.208	25.209
450.000.000.000	37.171	40.239

Ensayos de Hibridación Individual y Simultanea para el Gen de Resistencia a la Vancomicina B Utilizando una Sonda Etiquetada con DMAE		
Número Objetivo	Cuantos (RLU)	
	Individual	Simultaneo
0	359	468
4.500.000.000	5.663	4.449
23.000.000.000	13.743	13.970
45.000.000.000	18.815	19.875
230.000.000.000	32.065	30.396
450.000.000.000	38.591	38.771

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 06096073 A [0001]
- US 4745181 A [0003]
- US 4918192 A [0003] [0039]
- US 5110932 A [0003] [0039]
- US 5241070 A [0003]
- US 5538901 A [0003]
- US 5663074 A [0003]
- US 5656426 A [0003] [0047]
- US 5227489 A [0003] [0050]
- US 5449556 A [0003] [0050]
- US 5595875 A [0003] [0050]
- US 5543524 A [0006]
- US 5545739 A [0007]
- US 5565570 A [0007]
- US 5669819 A [0007]
- US 5395752 A [0008] [0012] [0023] [0050] [0113]
- US 5702887 A [0008] [0050]
- US 5879894 A, Law [0008] [0022] [0050]
- EP 0478626 B1 [0009]
- US 5656207 A, Batmanghelich [0009]
- US 308772 A [0009] [0028]
- US 4931223 A [0010]

ES 2 320 055 T3

- EP 0324202 A1 [0005]
- EP 0609885 A1 [0005]
- US 4927769 A [0052]
- US 5447687 A [0113]
- US 5468646 A, Mattingly [0006]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

• M. **KAWAGUICHI** y colaboradores. Bioluminescence and Chemiluminescence, Proceedings of 9th International Symposium 1996. *John Wiley & Sons*, 1997, 480-484 [0004]

• **EDWARDS** y colaboradores. *J. Biolumin. & Chemilumin.*, 1990, vol. 5, 1 [0011]

• **MARTIN**. *J. Biolumin. Chemilumin*, 1994, vol. 9 (3), 145 [0013]

• **ZOMER**. Synthesis, Chemiluminescence, and Stability of Acridinium Ester Labeled Compounds. *Lumin. Tech. Chem. Biochem. Anal.*, 1991, vol. 12, 505-21 [0028]

• **MCCAPRA** y colaboradores. *Tetrahedron Letters*, 1964, 3167 [0032]

• *Photochem. & Photobiology*, 1965, vol. 4, 1111 [0032]

• **HAJDUK** y colaboradores. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, 5818-5827 [0086]

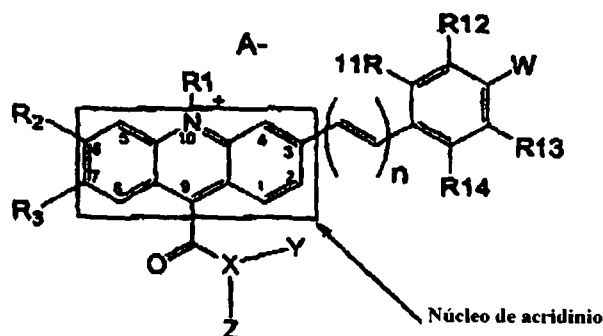
• A. **RODBARD**, DAVID. Ligand Analysis. *Masson Publishing, Inc*, 1981, 45-101 [0105]

• B. **NIX**, BARRY. The Immunoassay Handbook; *Stockton Press, Inc*, 1994, 117-123 [0105]

• C. **PETERMAN**; JEFFREY H. Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay. *CRC Press, Inc*, 1991, 47-65 [0105]

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acridinio que emite luz que tiene una longitud de onda máxima mayor a 590 nm, comprendiendo dicho compuesto, un sistema conjugado extendido, en el mismo plano, formado por la unión de un grupo funcional sobre el núcleo de acridinio, manteniéndose dicho sistema en un solo plano durante la emisión de luz, comprendiendo dicho grupo funcional al menos un anillo aromático y un átomo o grupo donante de electrones, en donde dicho grupo funcional está unido a la posición C-3 o C-1 del núcleo de acridinio, dicho compuesto con el grupo funcional unido a la posición C-3, teniendo la siguiente estructura:



en donde

R_1 es un alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

R_2 y R_3 son idénticos o diferentes, seleccionados entre hidrógeno, R, arilo sustituido o no sustituido (ArR o Ar), haluro, amino, hidroxilo, nitro, sulfonato, $-CN$, $-COOH$, $-SCN$, $-OR$, $-SR$, $-SSR$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NHR$, o $-NHC(O)R$;

R se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, y aralquilo que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos;

Alternativamente, R_2 y R_3 se pueden unir a través de un puente, para formar un anillo adicional, fusionado al núcleo de acridinio unido.

Las posiciones periféricas C_2 , C_4 , C_5 del núcleo de acridinio están opcionalmente sustituidas.

$n = 1-4$;

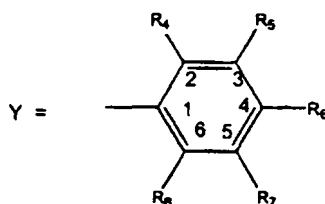
W = un grupo donante de electrones, seleccionado del grupo que consiste de OH , SH , $NR'R''$, $-CH(EWG)_m$ donde $m = 1$ ó 2 y EWG es un grupo que quita electrones que incluye pero sin limitarse a $-NO_2$, $-NO$, $-CN$, $-CHO$, $-C(O)R$, $+NR'R''R'''$, $-COOR$, $-COOH$, $-S(O)R$, $-SO_2R$, $-SO_2OR$, $-SO_2NHR$, $SO_2NR'R''$, $-SO_2OH$ o F ; R' , R'' y R''' son hidrógeno o alquilo inferior y pueden ser todos iguales o diferentes;

R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} pueden ser iguales a R_2 o R_3 ; alternatively, ya sea R_{11} y R_{12} , o R_{13} y R_{14} pueden estar enlazados para formar un anillo aromático y/o heterocíclico adicional fusionado al anillo de fenilo unido.

A^- es un contraión seleccionado del grupo que consiste de $CH_3SO_4^-$, FSO_3^- , $CF_3SO_4^-$, $C_4F_9SO_4^-$, $CH_3C_6H_4SO_3^-$, haluro, CF_3COO^- , CH_3COO^- , y NO_3^- ,

X es nitrógeno, oxígeno o azufre;

Cuando X es oxígeno o azufre, se omite Z y Y es una fracción arilo polisustituida de fórmula:

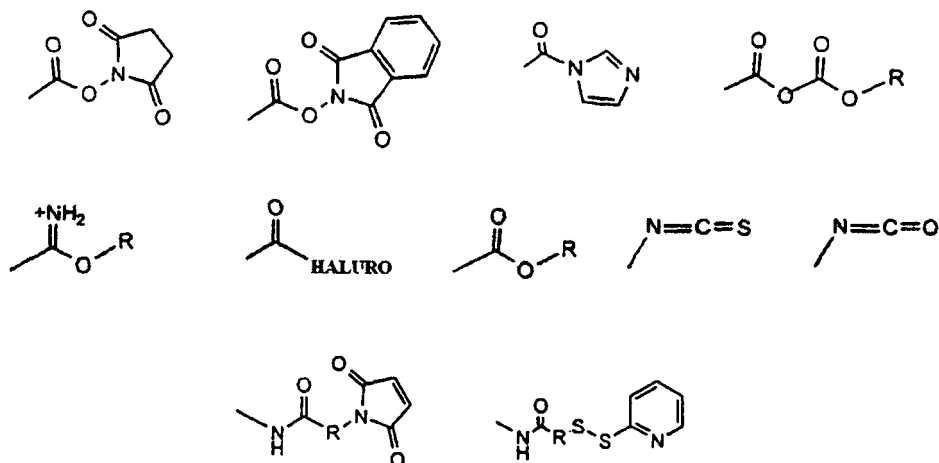


donde

R₄ y R₈ son grupos alquilo, alquenoilo, alquinilo, alcoxilo (-OR), alquiltiol (-SR), o grupos amino sustituidos o al menos uno de ellos es como se definió mientras que el otro es un hidrógeno, si la posición C₁ o C₈ del núcleo de acridinio está sustituida con un grupo metilo;

R₅ y R₇ son cualquiera entre R₂ y R₃ definidos anteriormente;

R₆ = -R₉-R₁₀, donde no se requiere R₉ pero opcionalmente puede ser alquilo de cadena ramificada o lineal, arilo o aralquilo sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente hasta 20 heteroátomos, y R₁₀ es un grupo saliente o un grupo funcional electrofílico unido con un grupo saliente que incluye:



-SO₂Cl, -N₃, -N₂⁺Cl⁻,

un haluro, -COOH

R₁₀ puede ser también -Q-R-Nu, -Q-R-(I)_nNu-, -Q-Nu, -R-Nu, o -Nu, donde n es un número de al menos 1, Nu es un grupo nucleofílico, Q es un enlace funcional, I es un grupo iónico o ionizable;

R₅ y R₆, y R₆ y R₇ son intercambiables; y

Cuando X es nitrógeno, entonces Z es -SO₂-Y', Y' tiene la misma definición de Y como se describió anteriormente, y ambos pueden ser el mismo o diferente. Adicionalmente, Y por si mismo puede ser un alquilo de cadena ramificada o lineal que contiene opcionalmente hasta átomos de carbono 20, halogenados o no halogenados, o un arilo sustituido, o un sistema de anillo heterocíclico.

2. Una composición que contiene un compuesto de la reivindicación 1, en donde se emite luz por reacción con peróxido de hidrógeno, peróxido de sodio o sales de peróxido bivalentes.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es seleccionado del grupo que consiste de 2',6'-dimetil-4'-carboxifenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-metil- acridinio-9-carboxilato (3-HS-DMAE) y 2',6'-dimetil-4'-N-succinimidiloxycarbonilfenil 3-(4-hidroxiestirenil)-10-sulfobutil- acridinio-9-carboxilato (NSB-3-HS-DMAE-NHS).

4. Un compuesto de acridinio de las reivindicaciones 1, 3 y 15 conjugado con una biomolécula orgánica pequeña, macromolécula, partícula viral, componente subcelular, o célula entera, siendo dicha conjugación ya sea por enlace covalente directo entre el compuesto de acridinio y la biomolécula orgánica pequeña, macromolécula, partícula viral, célula entera, o componente subcelular, o por medio de un enlace covalente indirecto a través de un espaciador.

5. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 4 donde la conjugación es a través de un espaciador y el espaciador es suministrado por un entrelazador bifuncional.

6. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 4 donde la macromolécula es seleccionada del grupo que consiste de proteína, péptido, proteína inactivada, ADN, ARN, oligonucleótido, polisacárido, oligosacárido, glicoproteína, glicosamino glicano, lectina, lipoproteína, lipopolisacárido, hormona, toxina, y citoquina.

7. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 6 donde la proteína es seleccionada del grupo que consiste de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, avidina, estreptavidina, alérgeno, proteína receptora, proteína que enlaza ADN, antígeno viral, antígeno bacteriano, antígeno eucariota, proteína que enlaza inmunoglobulina, y enzima.

ES 2 320 055 T3

8. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 4 donde el componente subcelular es ribosoma y la célula entera es seleccionada del grupo que consiste de células bacterianas y eucariotas.

9. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 4 donde la biomolécula orgánica pequeña es un hapteno, ligando, o molécula biológicamente activa.

10. Un compuesto de acridinio de la reivindicación 9 donde el hapteno es una hormona tiroidea, esteroide, vitamina, antibiótico, cofactor enzimático, droga terapéutica, metabolito, lípido, neurotransmisor, o sustancia química controlada.

11. Un ensayo para la detección o cuantificación de un analito, dicho ensayo comprendiendo el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de los compuestos de las reivindicaciones 1, 3 y 15 y las moléculas biológicas conjugadas de las reivindicaciones 4 hasta 10.

12. Un ensayo para la detección simultánea de analitos múltiples, que comprende el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de los compuestos de acridinio de las reivindicaciones 1, 3 y 15 y las moléculas biológicas conjugadas de las reivindicaciones 4 hasta 10.

13. El ensayo de la reivindicación 12 en donde se utilizan dos o más de dichos compuestos, y en donde dichos compuestos permiten la discriminación de sus longitudes de onda o magnitud, y en donde las diferencias en dicha magnitud se pueden correlacionar con las cantidades de dichos diferentes analitos presentes.

14. El ensayo de la reivindicación 12 para la determinación de 2 analitos, en donde se utilizan dos de dichos compuestos, y en donde dichos compuestos desprenden luz a dos diferentes máximos de longitudes de onda, que permiten la discriminación de sus señales y magnitud, que a su vez pueden ser correlacionados con las cantidades de dichos dos analitos presentes.

15. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R_1 es un grupo metilo o sulfoalquilo, R_4 y R_8 son un grupo metilo, y n es igual a 1.

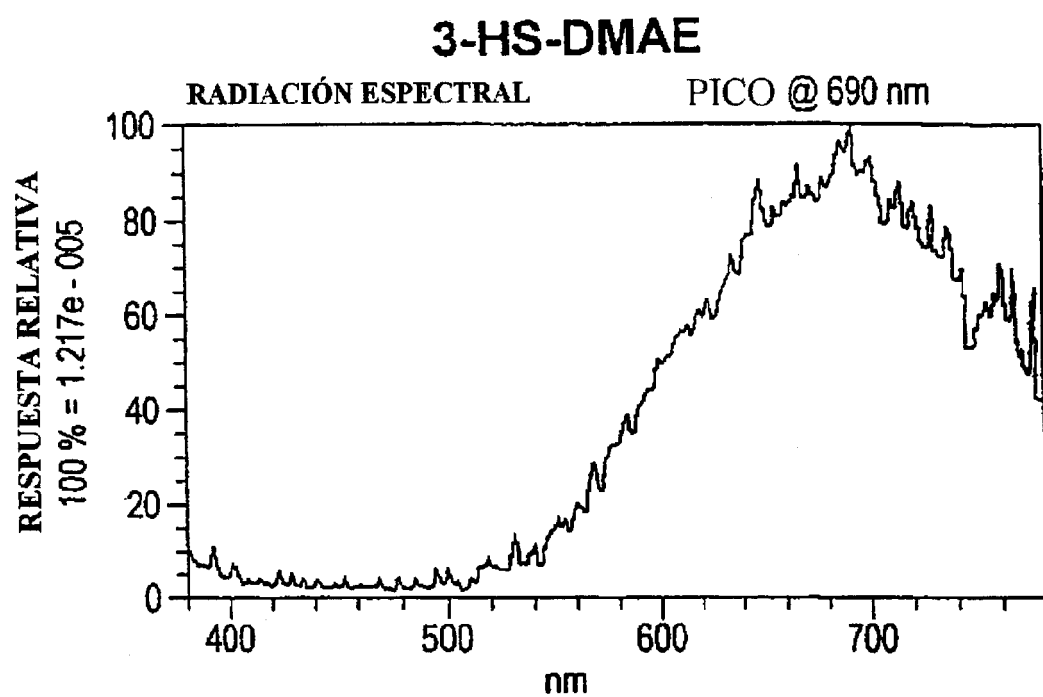


FIG. 1A

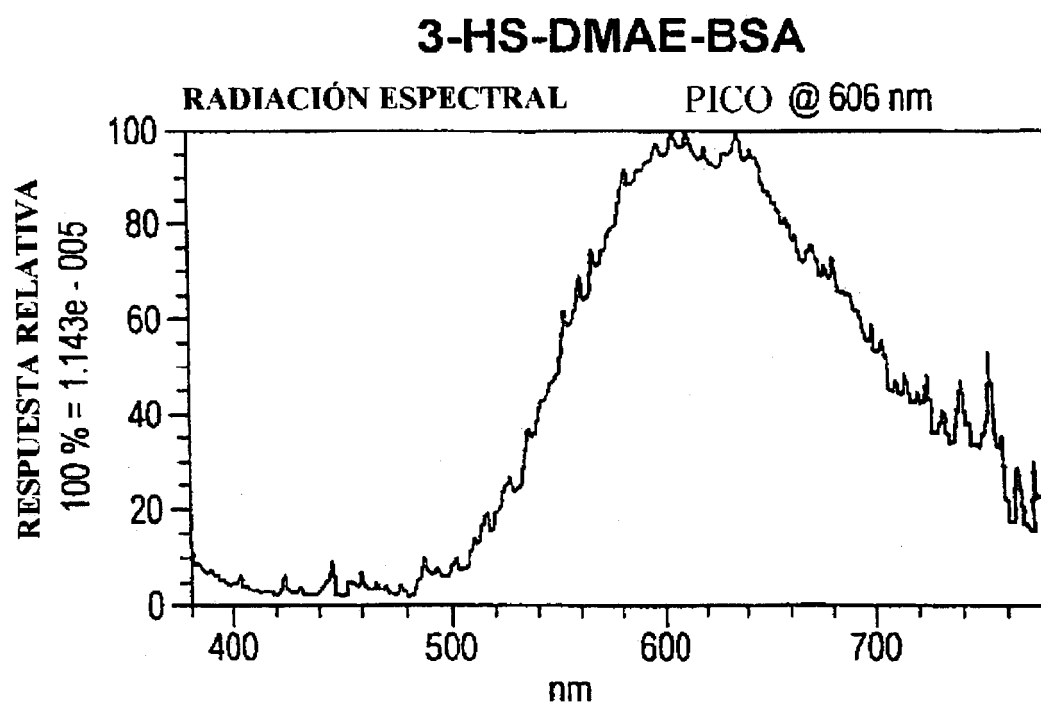


FIG. 1B

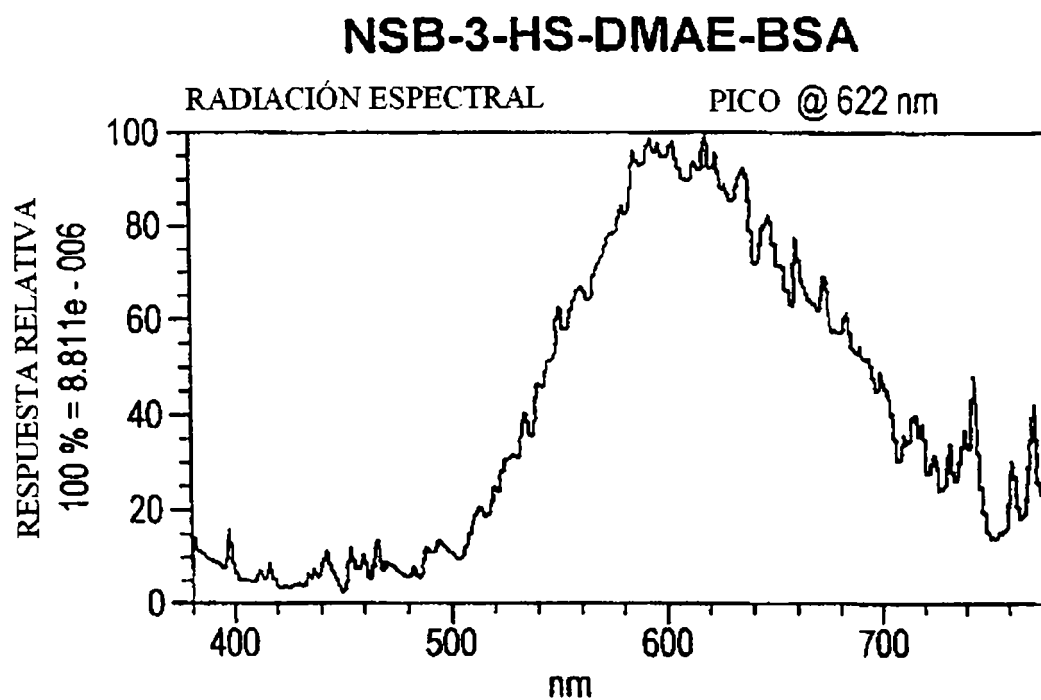


FIG. 1C

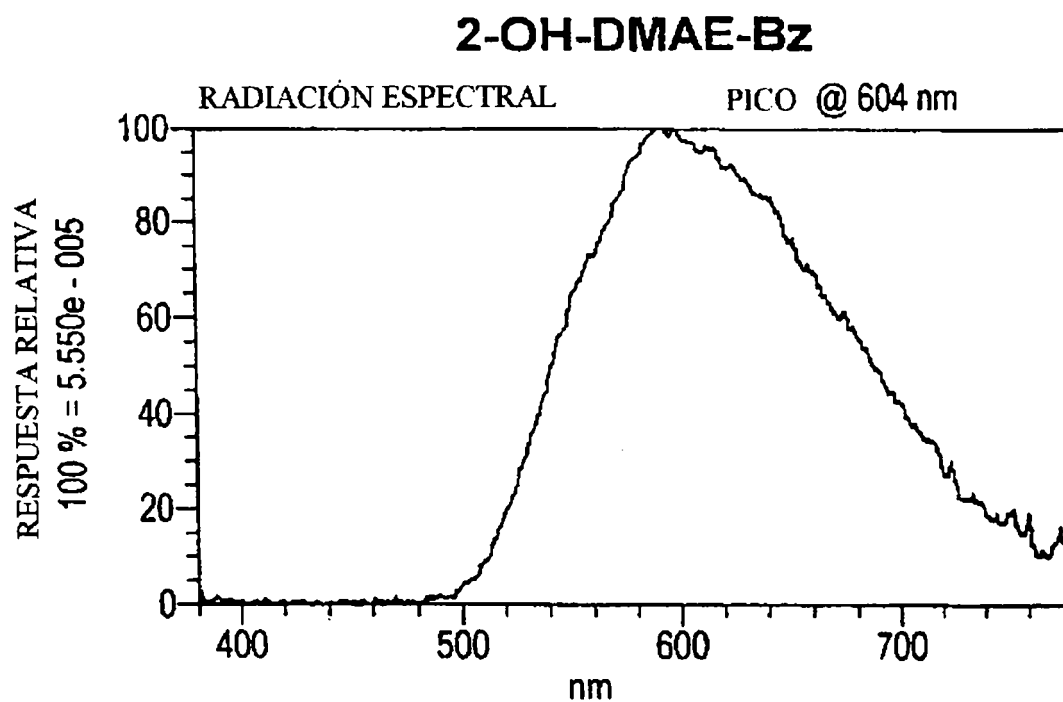


FIG. 1D

2-OH-DMAE-BSA

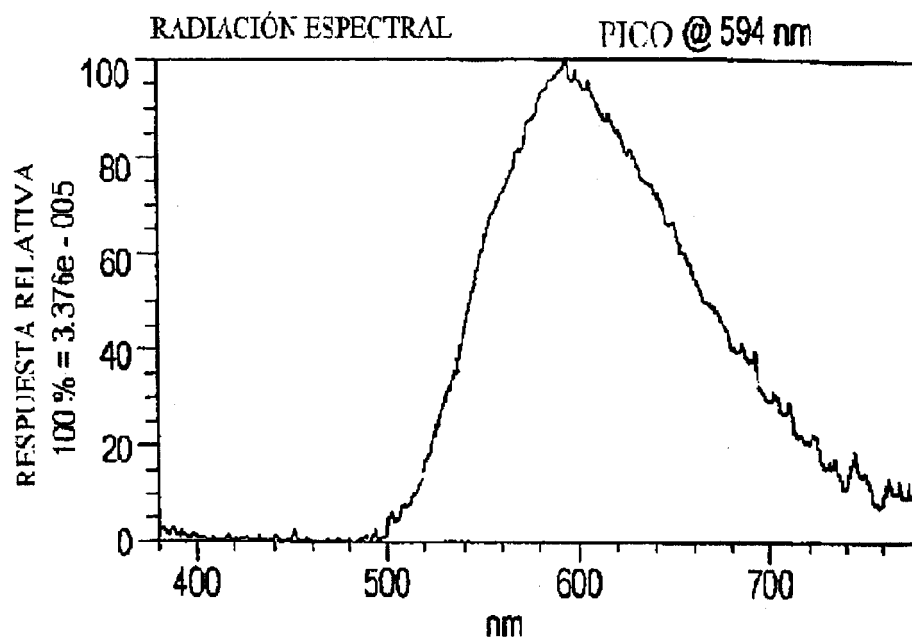


FIG. 1E

3-HP-DMAE

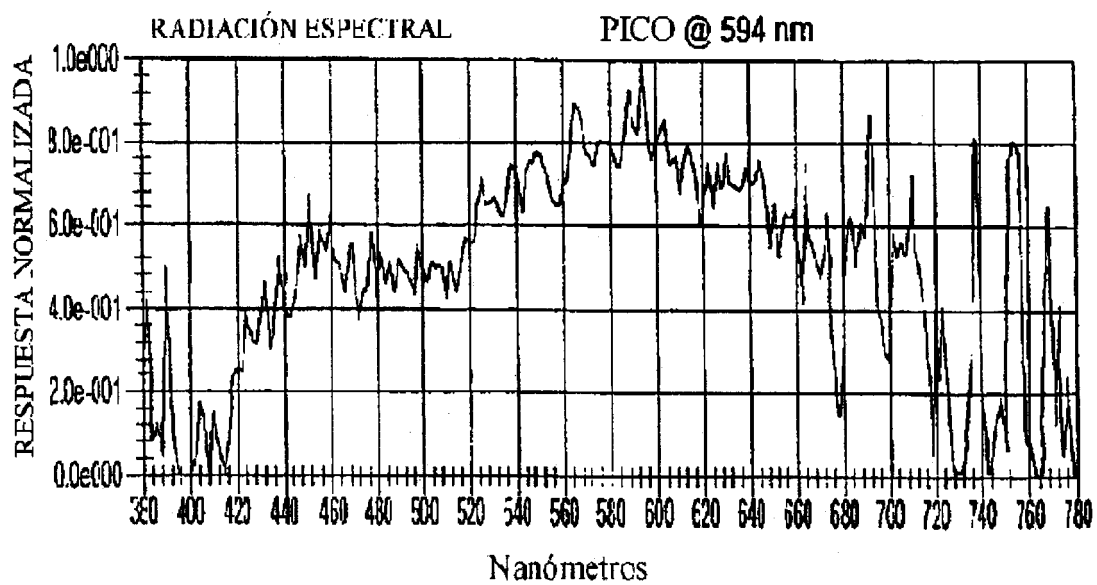


FIG. 1F

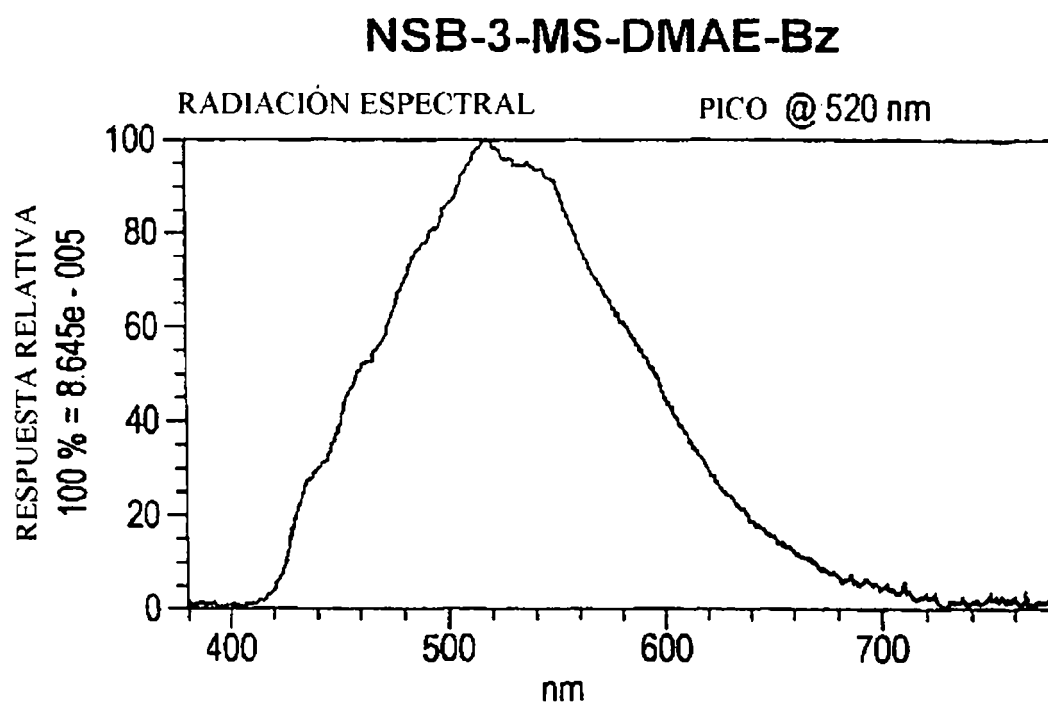


FIG. 1G

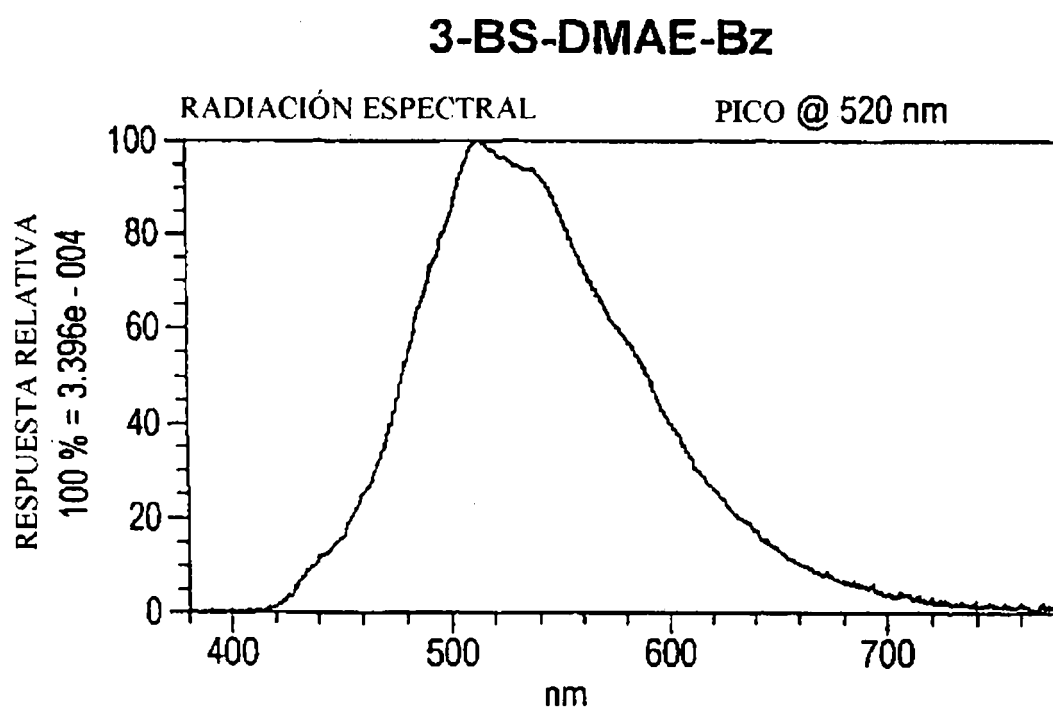


FIG. 1H

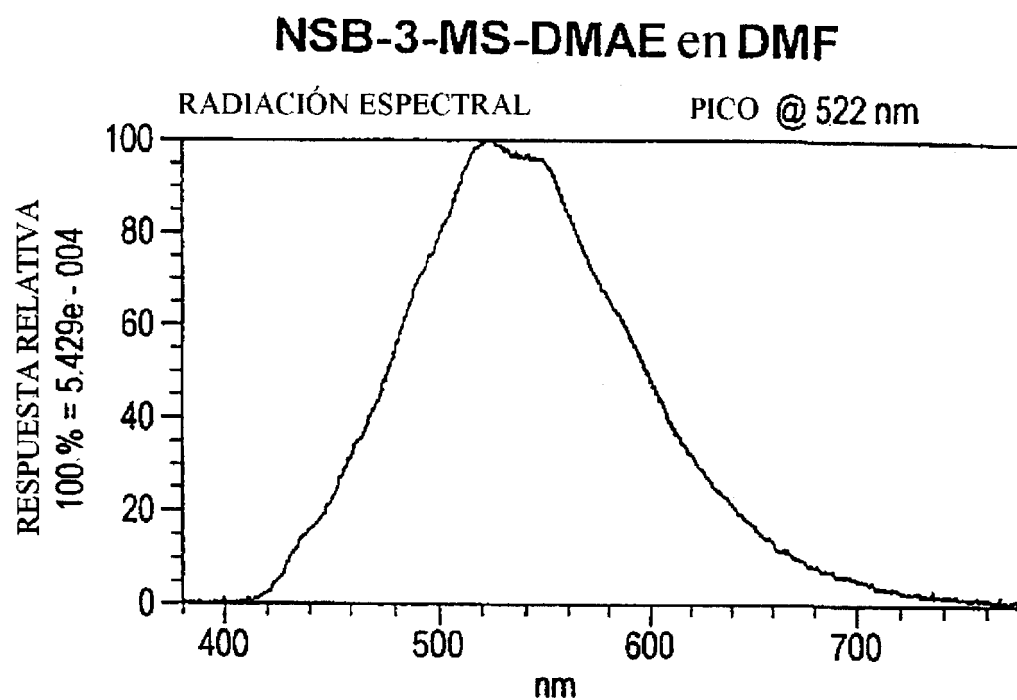


FIG. 1I

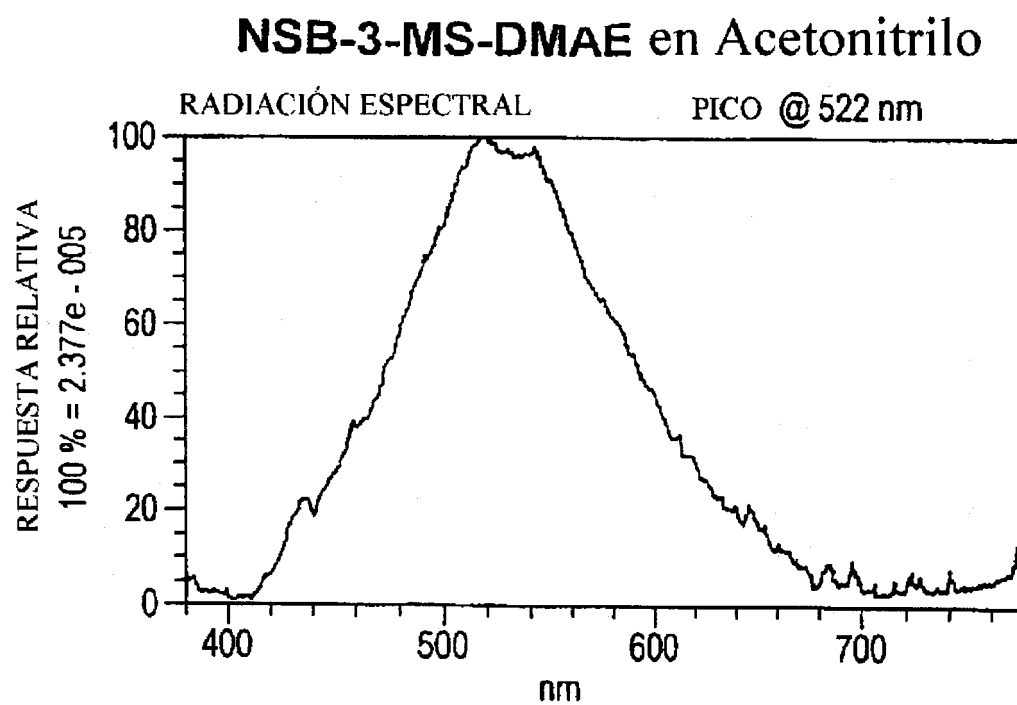


FIG. 1J

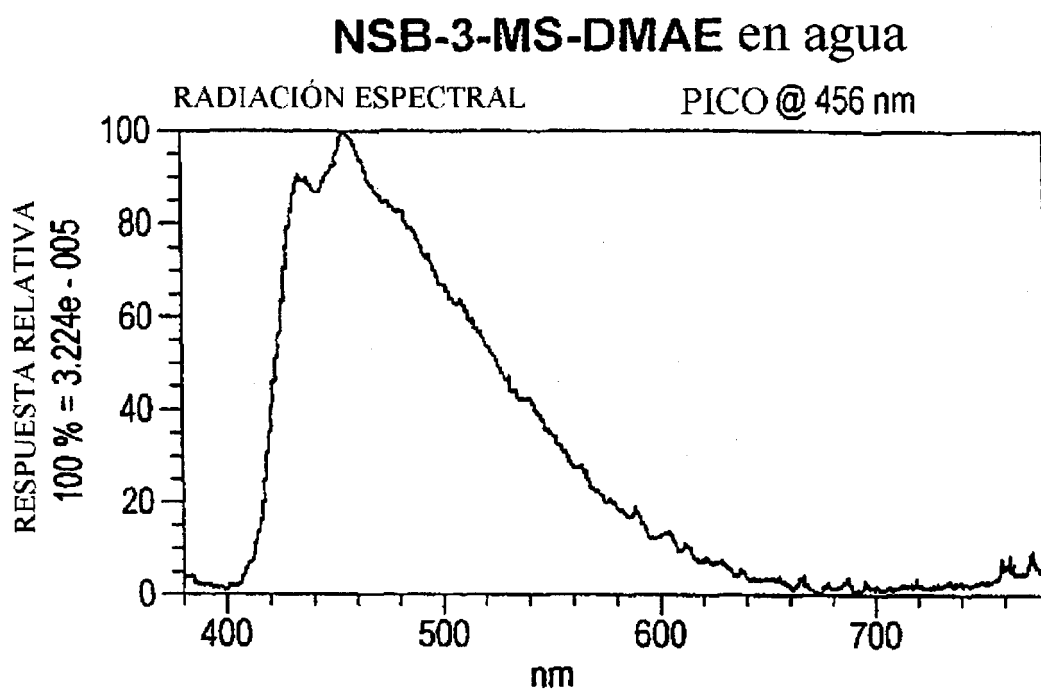


FIG. 1K

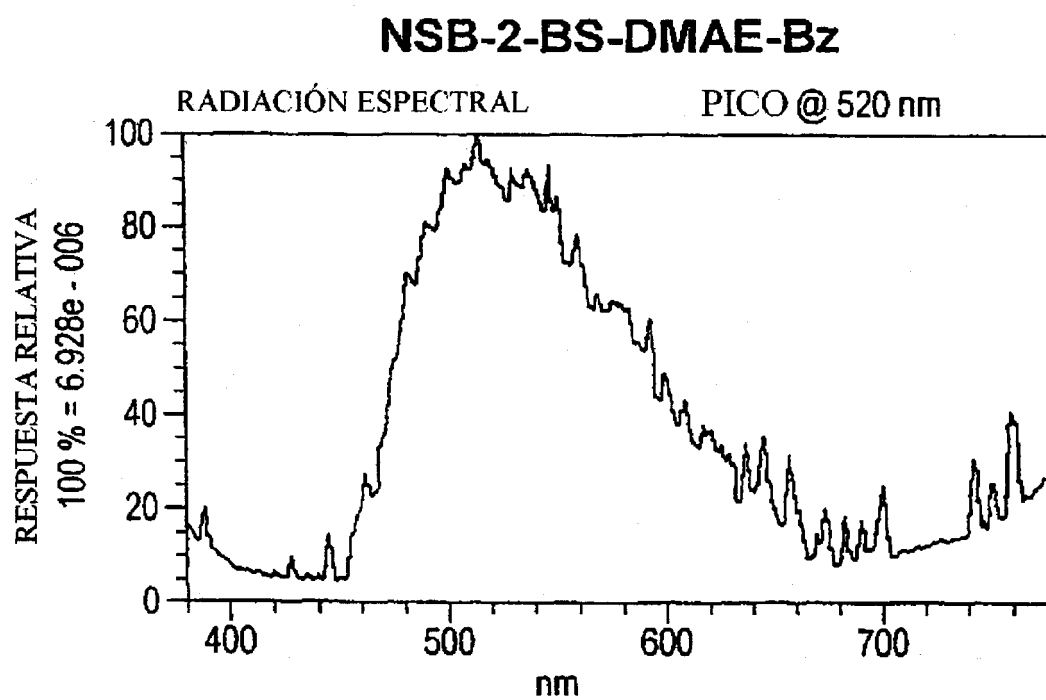


FIG. 1L

NSB-3-MS-DMAE-NHS

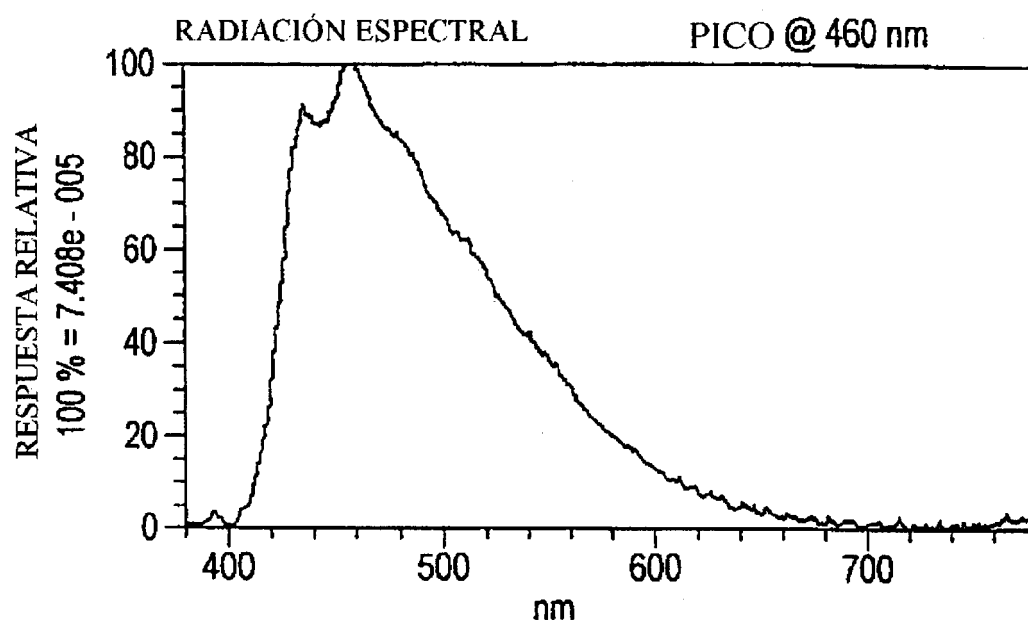


FIG. 1M

NSB-3-MS-DMAE-BSA

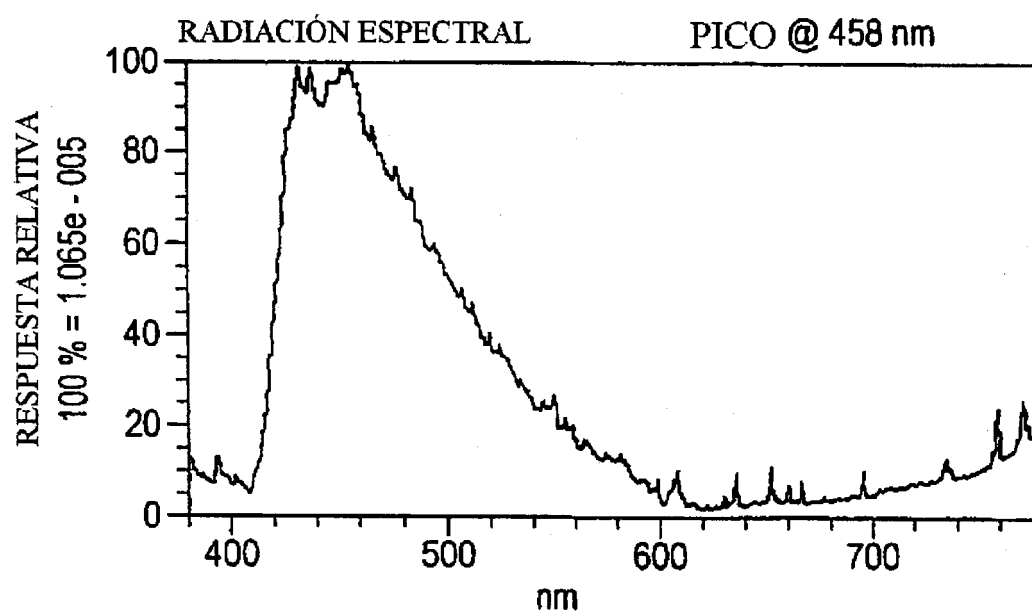


FIG. 1N

NSB-3-MS-DMAE- α -TSH

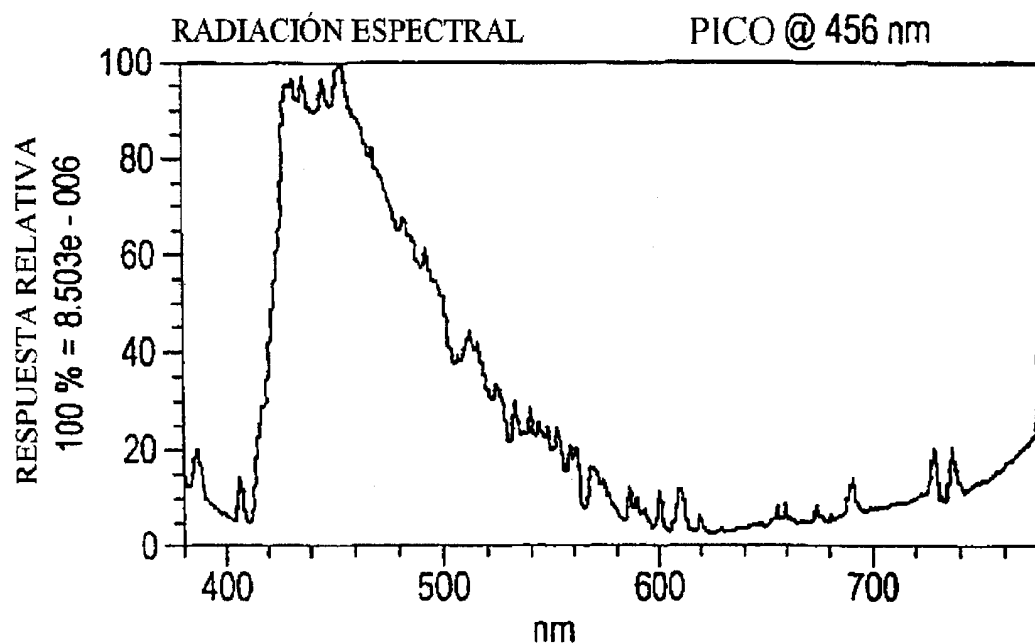


FIG. 10

2-HS-DMAE

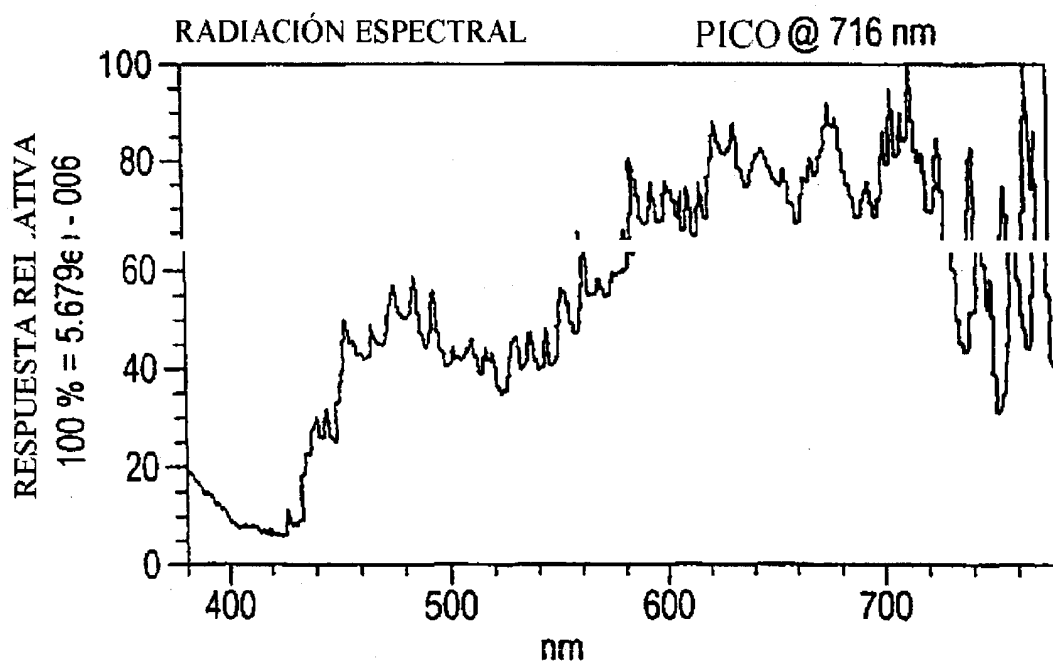


FIG. 1P

2-HS-DMAE-BSA

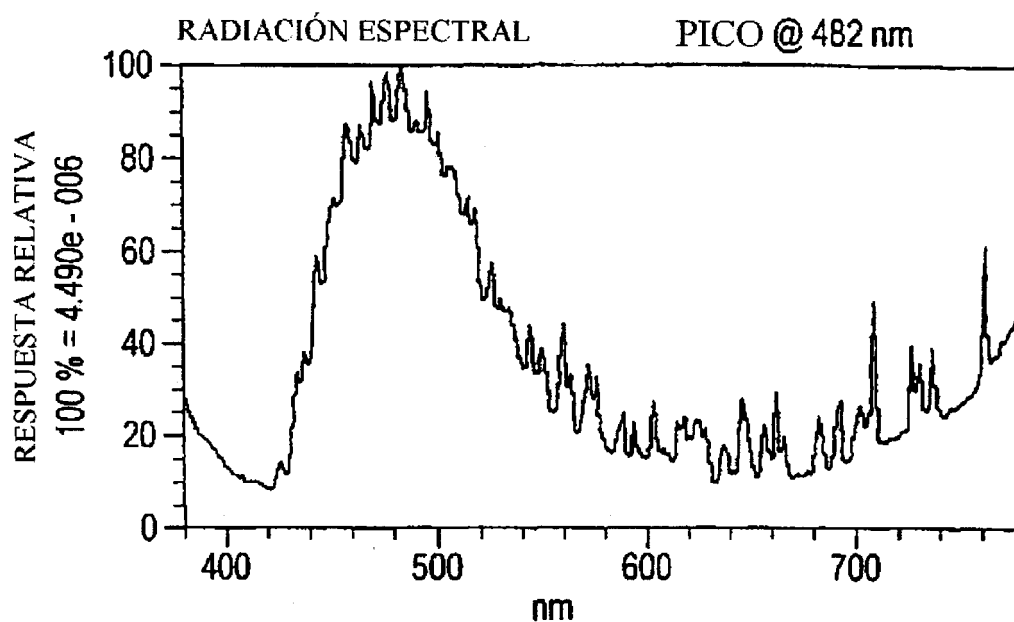


FIG. 1Q

NSB-2-MS-DMAE-NHS

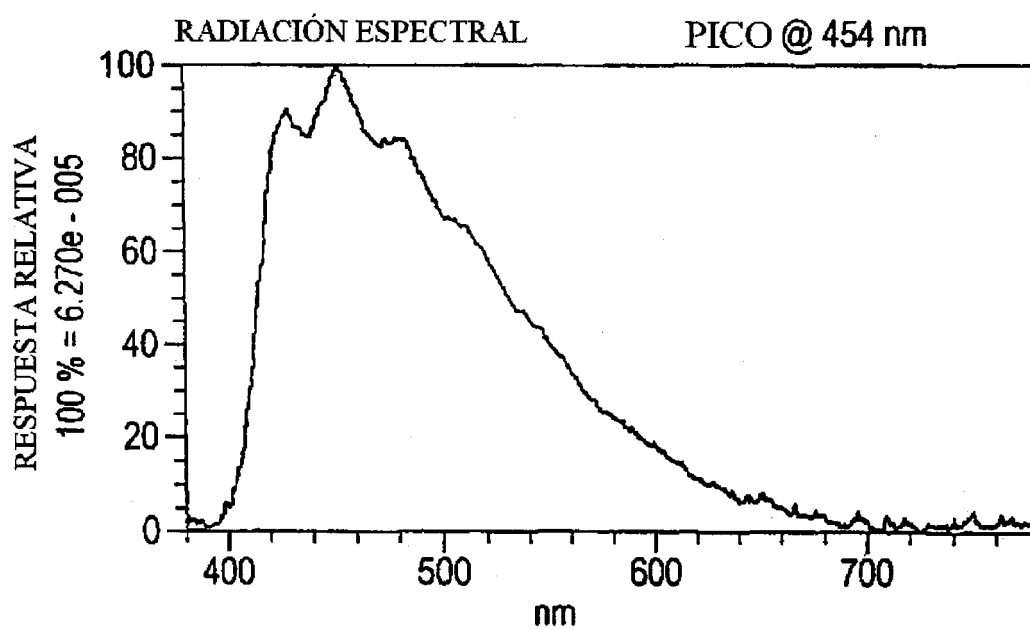


FIG. 1R

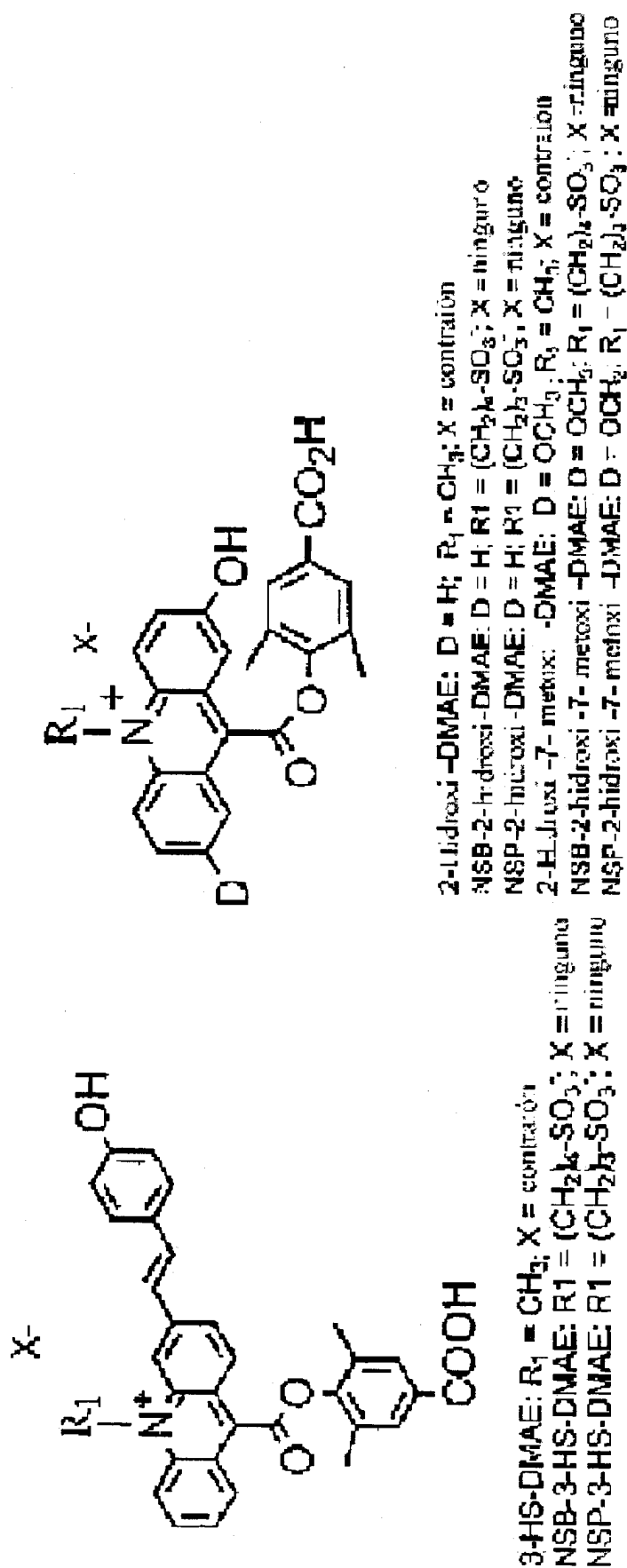
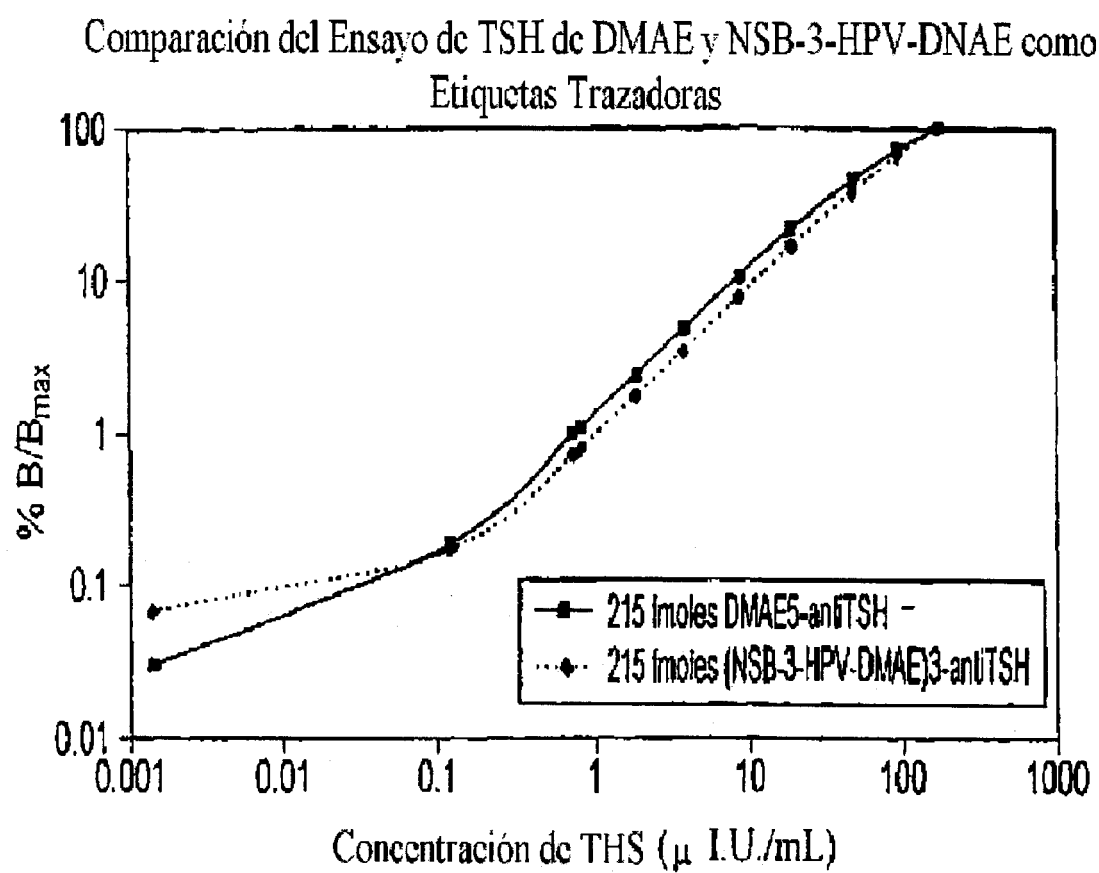


FIG. 2

**FIG. 3**

Ensayos de Hibridación Individual y Simultánea para el Gen de Resistencia a la Vancomicina B Utilizando una Sonda Etiquetada con DMAE

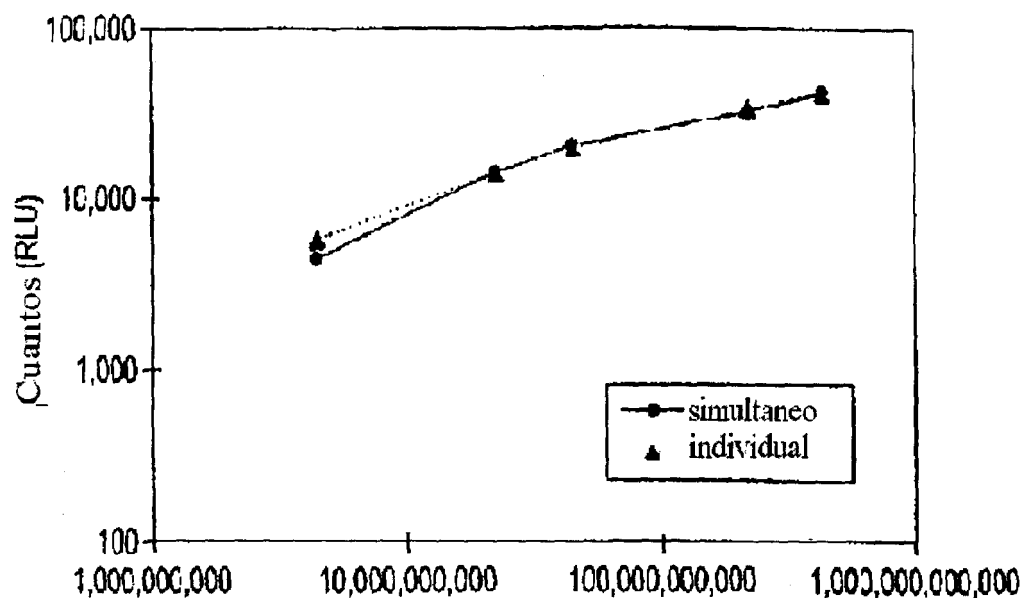


FIG. 5

Ensayos de Hibridación Individual y Simultánea para el Gen de Resistencia a la Vancomicina A Utilizando una Sonda Etiquetada con 2-HO-DMAE

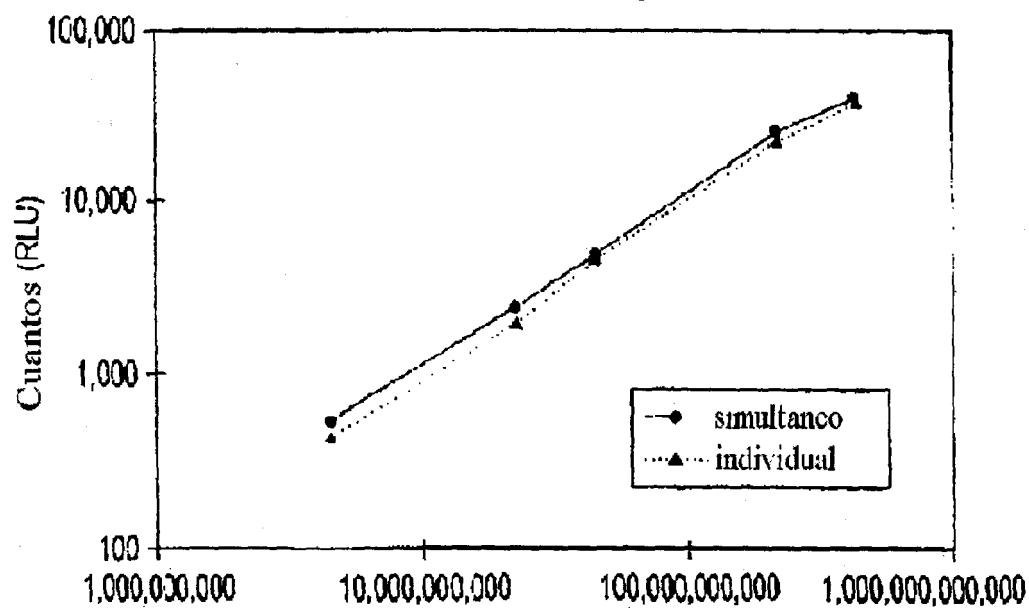


FIG. 6