



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 111**

51 Int. Cl.:

**C09K 3/00** (2006.01)

**C07D 219/00** (2006.01)

**C07D 219/04** (2006.01)

**C07D 219/08** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99919759 .3**

86 Fecha de presentación : **03.05.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1029016**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2000**

54 Título: **Nuevos compuestos de marcado quimioluminiscentes.**

30 Prioridad: **17.06.1998 US 99657**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **LUMIGEN, Inc.**  
**22900 W. Eight Mile Road**  
**Southfield, Michigan 48034, US**

72 Inventor/es: **Tafti-Akhavan, Hashem**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 283 111 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

Nuevos compuestos de marcado quimioluminiscentes.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo método para producir rápidamente quimioluminiscencia a partir de alquenos ricos en electrones mediante un procedimiento químico sencillo utilizando reactivos económicos, fácilmente disponibles. La presente invención se refiere además a compuestos de marcado quimioluminiscente, a su utilización en la preparación de compuestos quimioluminiscentes marcados y a la utilización de los compuestos marcados en métodos analíticos. La invención se refiere además a métodos analíticos para detectar un analito y para detectar un analito quimioluminiscente marcado, especialmente en un gel de electroforesis. Los métodos son útiles, por ejemplo, en inmunoanálisis y análisis con sonda de ácido nucleico.

15 **Antecedentes de la invención**

La detección quimioluminiscente de analitos ha supuesto una importancia creciente en numerosos campos, incluyendo el del análisis biomédico, ensayos en alimentos, identificación de patógenos, investigaciones forenses e identificación de contaminantes ambientales. Los métodos de incorporación de un punto final quimioluminiscente en una prueba o ensayo pueden tomar diferente formas, tales como un sustrato quimioluminiscente para un marcador enzimático, un compuesto quimioluminiscente protegido con una estructura tal como una micela, liposoma o partícula de látex o utilizando un compuesto quimioluminiscente tal como un marcador. Se han ideado numerosos compuestos con estos fines (R. Handley, H. Akhavan-Tafti, A. P. Schaap, *J. Clin. Ligand Assay*, 20(4) 302-312 (1997)). La utilización de compuestos quimioluminiscentes para especies de marcadores que han de detectarse con pequeñas moléculas ha atraído interés debido a la capacidad para atacar múltiples marcadores para generar la quimioluminiscencia rápidamente. No obstante ningún marcador único ni esquema de detección ha demostrado ser superior en todas las aplicaciones.

*Marcadores quimioluminiscentes.* Luminol, isoluminol y las diacil hidrazidas cíclicas relacionadas fueron los primeros compuestos quimioluminiscentes en ser adaptados como marcadores directos modificando su estructura para incluir un sustituyente de enlace. Su utilización no es satisfactoria para muchas aplicaciones debido a la generación de luz insuficiente que limita la sensibilidad de detección. La baja eficacia del cuanto de luminiscencia, 0,1 a 1%, y tiempos tan prolongados como varios minutos para que se emitan todos los fotones disminuyen la intensidad de la luz instantánea.

Los ésteres de acridinio y las sulfonamidas de acridinio se han utilizado extensamente en inmunoanálisis quimioluminiscente. (Véase, p. ej., los documentos US nº 5.656.500, US nº 5.521.103 y las referencias citadas en la presente memoria). Las principales ventajas de estos marcadores son el alto rendimiento de quimioluminiscencia (aproximadamente 10%) acoplado con la breve duración de la emisión, típicamente de 1 a 2 s. La liberación de energía luminosa en dicho destello breve crea altas intensidades luminosas. La utilización de estos marcadores, sin embargo, adolece de determinados inconvenientes graves. Los ésteres de acridinio y en menor medida las sulfonamidas, son propensos a la hidrólisis al ácido carboxílico no luminiscente, estando acelerada la hidrólisis a pH alcalino. El problema bien conocido de formación de seudobase procedente del ataque de agua en la posición 9 en el anillo requiere una etapa de reacción por separado para regenerar el anillo de acridinio.

Los complejos que contienen rutenio u osmio producen quimioluminiscencia cuando se oxidan electroquímicamente en presencia de un donante de electrones de la amina de sacrificio. La reacción requiere un instrumento más costoso y complejo para realizar las etapas electroquímica y de detección de la luz simultáneamente.

Aunque se utilizan muchas moléculas grandes como marcadores, incluyendo enzimas y la fotoproteína aecuorina, su utilización adolece del inconveniente de limitar el número de marcadores que pueden estar unidos a las especies diana y que tienen tendencia de depositarse no específicamente sobre soportes y superficies.

Continúa siendo un objetivo del campo analítico desarrollar compuestos quimioluminiscentes de marcado que sean moléculas pequeñas, solubles en agua, que presenten una eficacia alta de quimioluminiscencia, que emitan la luz rápidamente en el momento de la reacción con agentes activadores químicos sencillos, sean estables al almacenamiento prolongado y no se sometan a reacciones secundarias. La presente invención proporciona dichos compuestos.

*Procedimientos de marcado.* Una amplia variedad de procedimientos para marcadores que se unen químicamente a moléculas orgánicas y biológicas se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo: L. J. Kricka, *Ligand-Binder Assays*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1985, págs. 15-51 y M. Z. Atassi, "Chemical Modification and Cleavage of Proteins", capítulo 1 en *Immunochemistry of Proteins*, Vol. 1, Plenum Press, Nueva York, 1977, págs. 1-161, y referencias en la presente memoria). Los anticuerpos y proteínas están convenientemente marcados por reacción de determinados grupos nucleófilos presentes en proteínas (-SH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) con grupos químicamente reactivos. Los ácidos nucleicos funcionalizados de manera apropiada y las sondas de ADN pueden marcarse por reacción con el grupo reactivo correspondiente en un marcador. Otros muchos tipos de moléculas que pueden marcarse incluyendo anticuerpos, enzimas, antígenos proteicos, péptidos, haptenos, esteroides, carbohidratos, ácidos grasos, hormonas, nucleósidos y nucleótidos.

*Detección quimioluminiscente en geles.* Se ha descrito un método para la detección de la enzima fosfatasa alcalina en un gel que utiliza un sustrato quimioluminiscente (N. Theodosiou, C. Chalot, C. Ziomek, BioTechniques, 13(6), 898-901 (1992)). El solicitante no es consciente de ningún informe con respecto a la separación electroforética y la detección quimioluminiscente de un compuesto quimioluminiscente marcado en un gel.

El documento WO-A-9914358 no publicado en la fecha de prioridad del mismo describe compuestos heterocíclicos que incluyen compuestos de acridano para su utilización en reacciones quimioluminiscentes. Los compuestos se oxidan en presencia de peróxido y peroxidasa. El acridano puede presentar la fórmula general tal como en I a continuación. No se ha dado a conocer ningún sustituyente -L-RG como se define en la reivindicación 1.

En el documento WO-A-9940161 no publicado en la fecha de prioridad del mismo, se dan a conocer acridanos quimioluminiscentes. Ninguno de los compuestos ejemplificados que tiene una estructura relacionada con los compuestos de fórmula I en la presente memoria tiene un sustituyente -L-RG como se define en la reivindicación 1.

## Sumario de la invención

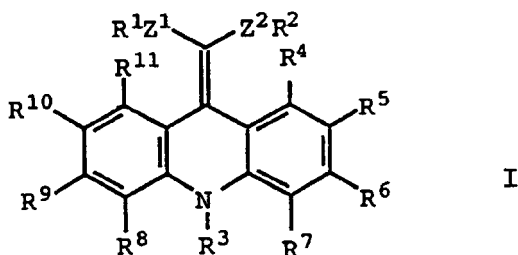
Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos para generar quimioluminiscencia a partir de un compuesto quimioluminiscente por un procedimiento químico sencillo utilizando reactivos económicos, fácilmente disponibles.

Todavía objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos de análisis por medio de una reacción quimioluminiscente sencilla.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar compuestos de marcado para preparar compuestos quimioluminiscentes marcados.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar compuestos quimioluminiscentes marcados.

Un objetivo asimismo de la presente invención consiste en proporcionar compuestos de marcado de fórmula I en la que  $Z^1$  y  $Z^2$  se seleccionan independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre.



Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos para generar quimioluminiscencia a partir del propio marcador quimioluminiscente o del compuesto quimioluminiscente marcado.

Todavía otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para detectar un analito en un gel proporcionando un compuesto quimioluminiscente marcado para la detección, sometiendo a una separación electroforética en un gel y detectándolo por reacción quimioluminiscente directamente en el gel.

Otro objetivo todavía de la presente invención consiste en proporcionar métodos quimioluminiscentes para realizar un análisis utilizando compuestos quimioluminiscentes marcados. Los análisis representativos incluyen inmunoanálisis, análisis de hibridación de ácido nucleico, otros análisis de ligando-aglutinante, detección de analitos en muestras de alimentos, medio ambiente e industriales.

## Descripción general

Los análisis biomédicos modernos requieren la capacidad para detectar cantidades muy pequeñas de compuestos, debido ya sea a la poca abundancia del analito en la muestra o a la cantidad limitada de muestra. Además debe ser posible detectar la cantidad del compuesto con precisión sobre un intervalo muy amplio de concentraciones. Los compuestos y métodos de marcado quimioluminiscentes se dan a conocer en la presente memoria los cuales son adecuados para estos tipos de análisis.

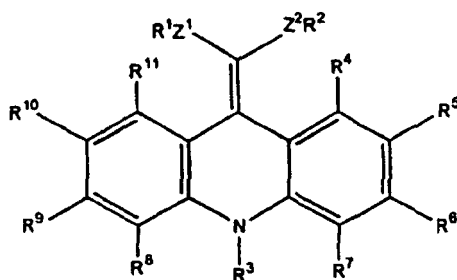
La presente invención se refiere generalmente a métodos de generación de quimioluminiscencia y a los compuestos para su utilización en estos métodos. Los métodos utilizan compuestos de acridano y reactivos sencillos, económicos y fácilmente disponibles para generar quimioluminiscencia a partir de los mismos. La reacción que produce luz puede utilizarse con numerosos fines reconocidos en la técnica, incluyendo métodos analíticos de ensayo, señalización, iluminación de emergencia y artículos de innovación.

## ES 2 283 111 T3

La presente invención también implica asimismo compuestos de marcado quimioluminiscentes que pueden unirse a moléculas orgánicas y biológicas mediante enlaces químicos o por interacciones físicas con el fin de realizar un análisis. La reacción de los compuestos quimioluminiscentes de la presente invención según los métodos actualmente descritos produce quimioluminiscencia como luz visible. La intensidad de la quimioluminiscencia resultante proporciona una medida directa de la cantidad de marcador quimioluminiscente y, por consiguiente, del compuesto marcado.

La presente invención implica además un método para detectar un compuesto quimioluminiscente marcado en un gel de electroforesis del tipo utilizado en la separación de moléculas biológicas. Los compuestos quimioluminiscentes marcados de la presente invención pueden aplicarse a un gel, separado por electroforesis y ulteriormente detectarse posteriormente en el gel sin necesidad de transferir a una membrana de transferencia.

Los compuestos quimioluminiscentes de acridano de la invención presentan la fórmula I



en la que

Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de entre O, S y NR<sup>12</sup>, R<sup>12</sup> se selecciona de entre los grupos alquilo, arilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo;

R<sup>1</sup> es un grupo que contiene de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno que pueden eliminarse mediante un ácido y se selecciona de entre los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, de los grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sililo, un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula PO(OR') (OR'') en la que R' y R'' se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, de los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos trialquilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalinotérreos, cationes amonio y fosfonio;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son grupos orgánicos que contienen de 1 a 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno en los que R<sup>2</sup> se selecciona de entre grupos alquilo sustituidos o insustituidos, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos que presentan de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alquilo)silil, un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula PO(OR') (OR'') en la que R' y R'' se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, grupos de 1 a 20 átomos de carbono de alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido y aralquilo sustituido o insustituido, grupos trialquilsililo, cationes de metal alcalino, cationes de amonio y fosfonio, y R<sup>3</sup> se selecciona de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, los grupos alcoxialquilo, carboxialquilo y ácido alquilsulfónico; y

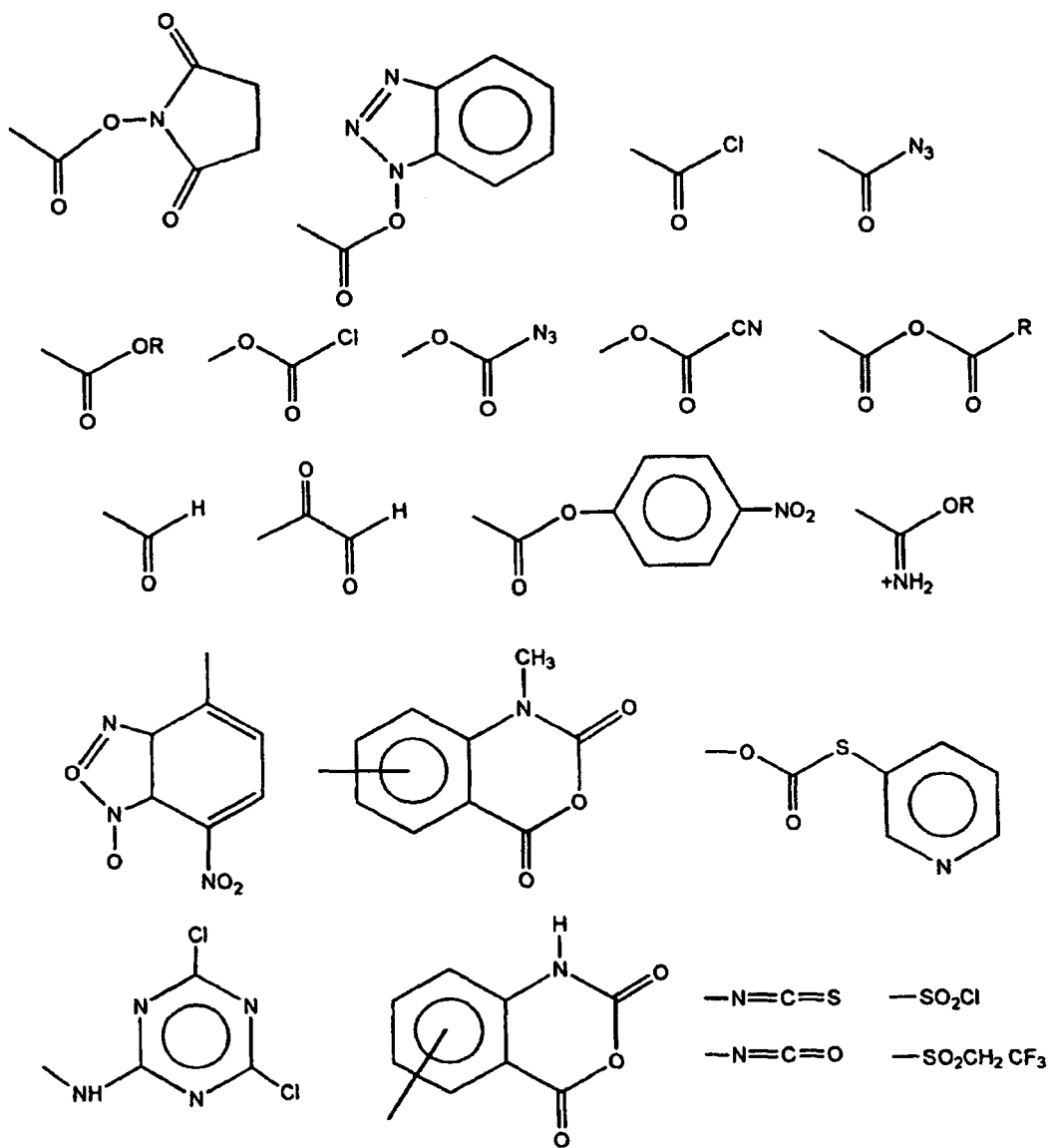
R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y sustituyentes que no interfieren con la generación de quimioluminiscencia y contienen entre 1 a 50 átomos seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno y comprenden grupos sustituyentes seleccionados de entre grupos alquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano y sulfonato;

en la que uno de entre R<sup>1</sup> a R<sup>11</sup> está sustituido con el sustituyente de marcado de fórmula -L-RG en la que L es un grupo de enlace seleccionado de entre un enlace, un átomo, o una cadena lineal o ramificada de átomos algunos de los cuales pueden formar parte de una estructura en anillo en la que los átomos que comprenden la cadena se seleccionan de entre C, O, N, S, P, Si, B y Se y grupos funcionales que comprenden el sustituyente de enlace incluyen alquileo, arileno, alquenileno, éter, peróxido, carbonilo como un grupo cetona, éster, éster carbonato, tioéster o amida, grupos amina, amidina, carbamato, urea, imina, imida, imidato, carbodiimida, hidrazina, diazo, fostodiéster, fosfotriéster, éster de fosfonato, tioéster, disulfuro, sulfóxido, sulfona, éster de sulfonato, éster de sulfato y tiourea y RG es un grupo reactivo seleccionado de entre

ES 2 283 111 T3

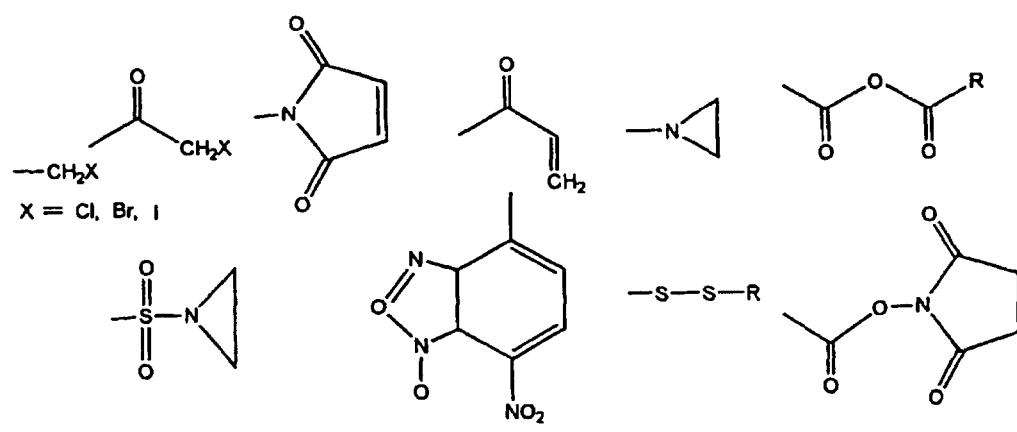
a) grupos reactivos de amina:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



b) grupos reactivos de tiol:

50  
55  
60  
65



## ES 2 283 111 T3

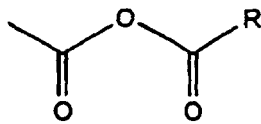
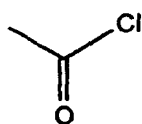
c) grupos reactivos de ácido carboxílico:



5

y d) grupos reactivos de hidroxilo:

10



### 15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que presenta el perfil de tiempo de la quimioluminiscencia resultante de la reacción de fosfato de acridano 5. La producción de luz surgida en el mezclado y la intensidad máxima alcanzada es inferior a 1 s.

20 La Figura 2 es un gráfico que relaciona la cantidad de compuesto con la máxima intensidad de quimioluminiscencia emitida por fosfato de acridano 5 activado a temperatura ambiente. La emisión de quimioluminiscencia se inició añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de una solución de NaOH 0,25 M.

25 La Figura 3 es una imagen de una película de rayos X de la detección de la proteína quimioluminiscente marcada en gel de electroforesis de poliacrilamida exponiendo el gel a una película de rayos X durante 20 min tan pronto como comienza la reacción de quimioluminiscencia.

La Figura 3A presenta la detección de BSA-APNa<sub>2</sub>; la Figura 3B presenta la detección de BSA-APCN<sub>2</sub>.

### 30 Descripción de las formas de realización preferidas

#### Definiciones

35 **Ácido** - Compuesto que, cuando se añade al agua, produce una disminución en el pH de la solución resultante. Acido tal como se utiliza en la presente memoria incluye los ácidos minerales, tales como clorhídrico, nítrico, sulfúrico y perclórico, ácidos orgánicos, incluyendo los ácidos carboxílicos tales como oxálico, acético y propiónico, y otros tipos de compuestos orgánicos, tales como el ácido pícrico y los ácidos de Lewis, tales como el cloruro de aluminio y el cloruro férrico.

40 **Alquilo** - Grupo hidrocarbonado ramificado, de cadena lineal o cíclico que contiene de 1 a 20 átomos de carbono. Alquilo inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alquilo que contienen hasta 8 átomos de carbono.

45 **Alqueno** - Grupo hidrocarbonado ramificado, de cadena lineal o cíclica que contiene por lo menos un doble enlace C-C y que contiene entre 2 y 20 átomos de carbono. Alqueno inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alqueno que contienen hasta 8 átomos de carbono.

50 **Alquino** - Grupo hidrocarbonado ramificado, de cadena lineal o cíclica que contiene por lo menos un doble enlace C-C y que contiene entre 2 y 20 átomos de carbono. Alquino inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alquino que contienen hasta 8 átomos de carbono.

55 **Analito** - Sustancia cuya presencia o cantidad debe medirse en una muestra por análisis. Los analitos incluyen moléculas orgánicas y biológicas para las que existe un compañero de unión específico que presenta una afinidad de unión específica. Ejemplos de analitos incluyen, sin limitación, ADN monocatenario o bicatenario, ARN, complejos ADN-ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, híbridos de anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Otros analitos ejemplificativos incluyen asimismo fármacos, hormonas y plaguicidas.

60 **Arilo** - Grupo que contiene un anillo aromático que contiene 1 a 5 anillos aromáticos carbocíclicos, que pueden sustituirse con 1 o más sustituyentes aparte de H.

65 **Análisis biomédico** - Análisis de muestras de origen biológico para analitos de interés. Los análisis pueden utilizarse en inmunoanálisis, transferencias Western, transferencias Northern, transferencias Southern, análisis de hibridación de ADN, análisis de secuencia de ADN, hibridaciones de colonias, análisis de expresión génica, identificación de fármaco de alto rendimiento, detección de agentes infecciosos o patógenos.

**Glucosilo** - Restos de grupos carbohidrato que incluyen hexosas y pentosas y contienen una o más unidades de azúcar. Los ejemplos incluyen fructosa, galactosa, glucosa, glucuronato, manosa, ribosa y N-acetilglucosamina.

## ES 2 283 111 T3

Halógeno - Átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.

Heteroarilo - Un grupo aromático que contiene un anillo que contiene de 1 a 5 anillos aromáticos carbocíclicos en los que por lo menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye con un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre y que pueden sustituirse con 1 o más sustituyentes distintos del H.

Luminiscente - Capaz de emitir luz cuando se excita a un estado electrónico excitado. La luz puede emitirse bien como fluorescencia cuando se desintegra desde un estado de singlete excitado o como fosforescencia cuando se desintegra desde un estado de triplete excitado.

Peróxido - Compuesto que contiene un enlace O-O, preferentemente peróxido de hidrógeno o un complejo de peróxido de hidrógeno tal como peróxido de urea, perborato o percarbonato.

Muestra - Fluido que contiene o se supone que contiene uno o más analitos que deben analizarse. Las muestras típicas que se analizan por el método de reacción quimioluminiscente son muestras biológicas incluyendo fluidos corporales tales como extractos de sangre, plasma, suero, orina, semen, saliva, lisados celulares y extractos de tejido. Otros tipos de muestras incluyen muestras de alimentos y muestras ambientales tales como suelo o agua.

Par de unión específico - Dos sustancias que presentan una afinidad de unión mutua. Los ejemplos incluyen los pares antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o anticuerpo-anticuerpo, oligonucleótidos complementarios o polinucleótidos, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormona-receptor, lectina-carbohidrato, IgG-proteína A, ácido nucleico-proteína que se une al ácido nucleico y ácido nucleico-anticuerpo anti-ácido nucleico.

Sustituido - Se refiere a la sustitución de por lo menos un átomo de hidrógeno en un grupo por otro átomo de hidrógeno o grupo que tiene de 1 a 50 átomos seleccionados de entre C, O, N, S, P, Si, B, Se, F, Cl, Br e I. Obsérvese que en las referencias a los grupos sustituidos se pretende que los múltiples puntos de sustitución puedan estar presentes a menos que se indique de otra manera.

Se ha descubierto inesperadamente que los compuestos quimioluminiscentes de fórmula I a continuación experimentan una reacción con determinados reactivos para generar quimioluminiscencia como un destello de luz breve e intenso. La utilización de los presentes compuestos para detección, p. ej. como marcadores, en ensayos quimioluminiscentes conduce a una detección de analitos muy sensible. En los compuestos quimioluminiscentes de la presente invención por lo menos uno de los grupos  $R^1$  a  $R^{11}$  puede estar sustituido por un sustituyente de marcado. Cuando un sustituyente de marcado está presente se acopla preferentemente a uno de  $R^1$  o  $R^2$ . *Methods of Generating Chemiluminescence*. En los presentes métodos para producir quimioluminiscencia, un compuesto de fórmula I experimenta una reacción que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto el compuesto de fórmula I con un ácido para formar un primer producto de reacción; y
- b) poner en contacto el primer producto de reacción con una cantidad suficiente de una base para proporcionar un medio básico, incluyendo por lo menos una de las etapas proporcionar un oxidante para la reacción, en la que un segundo producto de reacción se forma y se produce luz en el medio básico. La intensidad luminosa alcanza un nivel máximo rápidamente, con frecuencia en un segundo o menos, a temperatura ambiente cuando la reacción se realiza a pH alcalino.

El ácido utilizado en la primera etapa debe ser capaz de proporcionar un medio de pH bajo, por lo menos inferior a aproximadamente 3 y preferentemente no superior a 1. Se prefieren ácidos minerales debido a su bajo costo y gran acidez. En algunos casos, pueden preferirse ácidos minerales oxidantes, p. ej., ácido nítrico. Los ácidos típicamente se utilizarán a una concentración comprendida en el intervalo entre 0,001 M y 1 M.

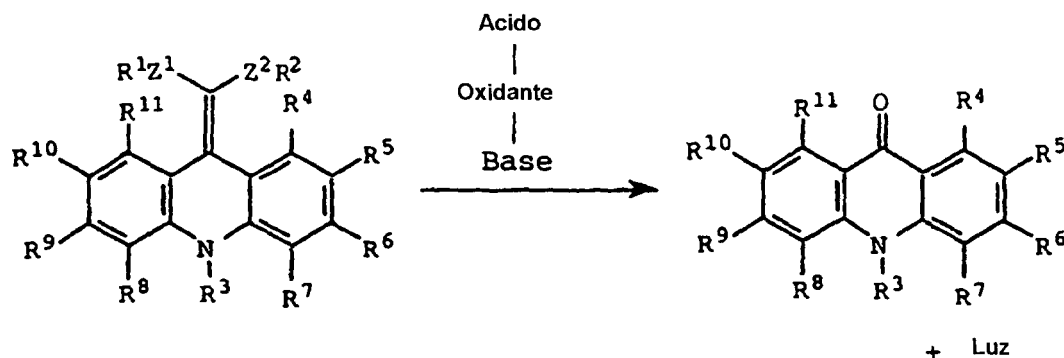
El oxidante puede ser un peróxido o hidroperóxido alcalino. Los peróxidos preferidos incluyen peróxido de hidrógeno, peróxido de urea, sales de persulfato y perborato. El oxidante puede ser también un óxido metálico tal como  $CrO_3$ ,  $MnO_2$  o un complejo aniónico tal como peryodato  $IO_4^-$  o permanganato  $MnO_4^-$  o un peróxido metálico tal como  $Na_2O_2$ . Otros oxidantes incluyen hemo o hemoglobina. El ácido puede también funcionar, en parte, como oxidante, como por ejemplo, cuando el ácido es el ácido nítrico. La selección de si se prefiere combinar el oxidante con el ácido en la primera etapa o la base en la segunda etapa está influida por la selección del ácido y la estabilidad y reactividad del oxidante en la base. En general puede presentar ventajas combinar el oxidante con la base cuando el ácido es un ácido oxidante. En otros casos, puede presentar ventajas combinar el oxidante con el ácido.

Los compuestos básico útiles en la puesta en práctica de la presente invención comprenden compuestos que, cuando se añaden al agua producen un aumento en el pH de la solución resultante. Estos incluyen sales de hidróxido, tales como hidróxido de sodio, potasio o litio, hidróxido amónico e hidróxido de tetraalquilamonio, carbonatos y óxidos básicos metálicos. La utilización de bases se contempla también. Las bases preferidas son los hidróxidos de metales alcalinos.

La reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura comprendida entre 5°C y 50°C, preferentemente entre 20°C y 40°C, y normalmente a temperatura ambiente. La reacción de la presente invención se realiza en solución acuosa que puede estar en contacto con la superficie de un soporte sólido tal como una bola, tubo, membrana o placa

de micropocillos recubierta con peroxidasa. En algunos formatos de análisis, puede ser deseable llevar a cabo las etapas de análisis que implican reacciones de enlace en solución de tampón. El ácido debe utilizarse en una cantidad y concentración suficientes para superar la capacidad de tamponación y reducir el pH de la solución a no más de 3 y preferentemente aproximadamente 1 o inferior.

*Métodos de análisis quimioluminiscentes.* La reacción quimioluminiscente puede utilizarse en un método para detectar un analito, que comprende generar la luz por la reacción quimioluminiscente, detectar la luz producida y, si se desea cuantificación, relacionar la cantidad de luz producida con la cantidad de analito. La relación entre la intensidad de la luz y la cantidad de analito puede discernirse fácilmente construyendo una curva de calibración con cantidades conocidas del compuesto quimioluminiscente. La reacción quimioluminiscente general puede ilustrarse por la reacción siguiente.



El compuesto de fórmula I lleva un sustituyente de marcado, por ejemplo para permitir el acoplamiento a un analito, o un miembro del par de unión específico.

En otros formatos de análisis preferidos, el compuesto de fórmula I se utiliza como compuesto de marcado quimioluminiscente con el objetivo de proporcionar un marcado quimioluminiscente en un compuesto que debe detectarse. En estos análisis, el compuesto de fórmula I comprende un sustituyente de marcado de fórmula -L-RG, en la que L es un grupo de enlace que es opcional y, cuando está presente, se proporciona para conectar el grupo quimioluminiscente a un grupo reactivo, RG.

*Compuestos quimioluminiscentes.* En los compuestos de fórmula I, el grupo R<sup>1</sup> es un grupo que, cuando está acoplado a un doble enlace sustituido en Z<sup>1</sup>, puede ser eliminado por un ácido, y puede ser cualquier grupo que contenga de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre los átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno. Los grupos se seleccionan de entre los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, de los grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sililo, un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula PO(OR') (OR'') en la que R' y R'' se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, de los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos trialkilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalinotérreos, cationes amonio y fosfonio. Un grupo R<sup>1</sup> preferido es un grupo de la sal fosfato PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub> siendo M un ión de metal alcalino.

El grupo R<sup>2</sup> puede ser cualquier grupo que contenga de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno que permita la producción de luz. Esto último significa que cuando un compuesto de fórmula I experimenta una reacción de la presente invención, se produce luz y puede implicar la producción de uno o más intermedios quimioluminiscentes. R<sup>2</sup> se selecciona de entre grupos alquilo sustituidos o insustituidos, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos que presentan de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alquil) sililo, un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula PO(OR') (OR'') en la que R' y R'' se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, grupos de 1 a 20 átomos de carbono de alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido y aralquilo sustituido o insustituido, grupos trialkilsililo, cationes de metal alcalino, cationes de amonio y fosfonio. Los grupos alquilo sustituidos a título de ejemplo incluyen un grupo cianoetilo o un grupo trimetilsililetilo. En una forma de realización preferida, R<sup>2</sup> es un grupo arilo, preferentemente fenilo, sustituido con el sustituyente de marcado de fórmula -L-RG.

El grupo R<sup>3</sup> es un grupo orgánico que contiene de 1 a 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno además del número necesario de átomos de hidrógeno requeridos que satisfacen las valencias de los átomos en el grupo. Más preferentemente R<sup>3</sup> contiene de 1 a 20 átomos distintos de hidrógeno. El grupo orgánico se selecciona de entre el grupo constituido por los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y aralquilo, los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> sustituido o insustituido, los grupos bencilo sustituidos o insustituidos, los grupos alcóxialquilo, carboxialquilo y ácido alquilsulfónico. El grupo R<sup>3</sup> puede unirse a R<sup>7</sup> o R<sup>8</sup> para completar un anillo de 5 ó 6 elementos.

## ES 2 283 111 T3

En los compuestos de fórmula I, los grupos  $R^4$  a  $R^{11}$  cada uno son independientemente H o un grupo sustituyente que permite que se produzca luz y contienen generalmente de 1 a 50 átomos seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno. Los grupos sustituyentes representativos que pueden estar presentes incluyen, sin limitación, grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alqueno, alquino, alcoxi, ariloxi, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano y sulfonato. Los pares de grupos adyacentes, p. ej.  $R^4 - R^5$  o  $R^5 - R^6$  pueden unirse para formar un sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico que comprende por lo menos un anillo de 5 ó 6 elementos que se fusiona al anillo al que se acoplan los dos grupos. Dichos anillos heterocíclicos fusionados pueden contener átomos de N, O o S y pueden contener sustituyentes del anillo distintos de H tales como los mencionados anteriormente. Uno o más de los grupos  $R^4$ - $R^{11}$  puede sustituirse con un sustituyente de marcado de fórmula -L-RG. Es preferible que  $R^4$  a  $R^{11}$  se seleccionen de entre hidrógeno, halógeno y grupos alcoxi tales como metoxi, etoxi, t-butoxi y similares. Un grupo preferido de compuestos tiene uno de entre  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  como halógeno y el otro de  $R^4$  a  $R^{11}$  son átomos de hidrógeno.

Los grupos sustituyentes pueden incorporarse en varias cantidades y en el anillo seleccionado o en las posiciones de la cadena en el anillo de acridano con el fin de modificar las propiedades del compuesto o para proporcionar por conveniencia de síntesis. Dichas propiedades incluyen, p. ej. rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, velocidad de reacción con la enzima, intensidad máxima de luz, duración de la emisión de luz, longitud de onda de la emisión de luz y solubilidad en el medio de reacción. Los sustituyentes específicos y sus efectos se ilustran en los ejemplos específicos a continuación, que, sin embargo, no debe considerarse limitativos del alcance de la invención en modo alguno.

*Grupo de enlace (L).* El grupo de enlace puede ser un enlace, un átomo o una cadena de átomos lineal o ramificada, algunos de los cuales pueden formar parte de una estructura de anillo. El sustituyente contiene de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno, más frecuentemente de 1 a aproximadamente 30 átomos distintos de hidrógeno. Los átomos que comprenden la cadena se seleccionan de entre átomos de C, O, N, S, P, Si, B y Se, preferentemente de entre átomos de C, O, N, P y S. Los átomos de halógeno pueden estar presentes como sustituyentes en la cadena o anillo. Los grupos funcionales típicos que comprenden el sustituyente de enlace incluyen grupos de alqueno, arileno, alqueno, éter, peróxido, carbonilo como un grupo cetona, éster, éster de carbonato, tioéster o amida, grupos amina, amidina, carbamato, urea, imina, imida, imidato, carbodiimida, hidrazina, diazo, fosfodiéster, fosfotriéster, éster de fosfonato, tioéter, disulfuro, sulfóxido, sulfona, éster sulfonato, éster de sulfato y tiourea.

*Grupo reactivo.* El grupo RG reactivo es un átomo o grupo cuya presencia facilita el enlace a otra molécula mediante enlace covalente o fuerzas físicas. En algunas formas de realización, el acoplamiento de un compuesto de marcado quimioluminiscente de la presente invención a otro compuesto conllevará la pérdida de uno o más átomos del grupo reactivo por ejemplo cuando el grupo reactivo es un grupo saliente tal como un átomo de halógeno o un grupo tosilato y un compuesto de marcado quimioluminiscente se une por enlace covalente a otro compuesto mediante una reacción de desplazamiento nucleófilo. En otras formas de realización, el acoplamiento de un compuesto de marcado quimioluminiscente a otro compuesto mediante la formación de un enlace covalente conllevará la reorganización de los enlaces en el grupo reactivo como ocurre en una reacción de adición tal como una adición de Michael o cuando el grupo reactivo es un grupo isocianato o isotiocianato. En otras formas de realización incluso, el acoplamiento no implicará la formación de enlace covalente, sino más bien fuerzas físicas en cuyo caso el grupo reactivo permanece inalterado. Fuerzas físicas significa fuerzas de atracción tales como el enlace de hidrógeno, electrostáticas o de atracción iónica, de atracción hidrofóbica tal como el agrupamiento de bases y las interacciones de afinidad específicas tales como las interacciones biotina-estreptavidina, antígeno-anticuerpo y nucleótido-nucleótido.

(Tabla pasa a página siguiente)

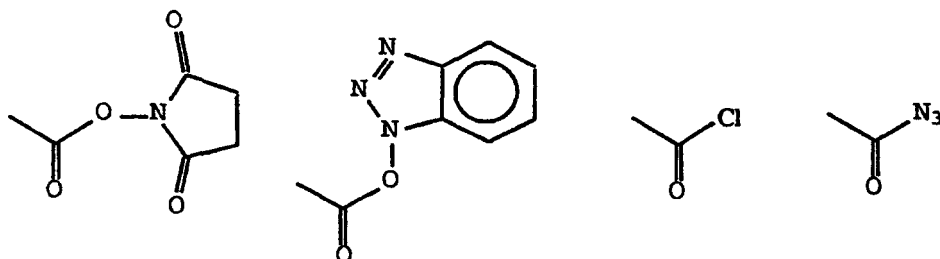
TABLA 1

*Grupos reactivos para el enlace químico de marcadores con moléculas orgánicas y biológicas*

5

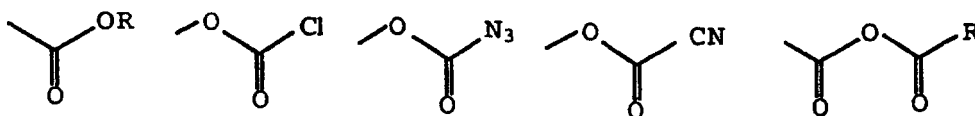
a) Grupos amínicos reactivos:

10



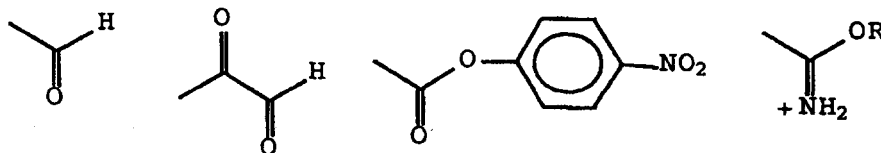
15

20

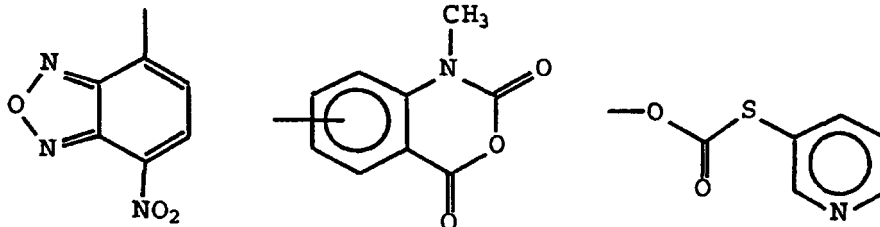


25

30

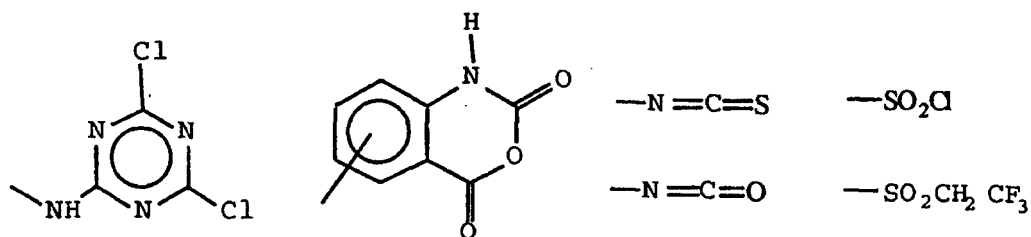


35



40

45



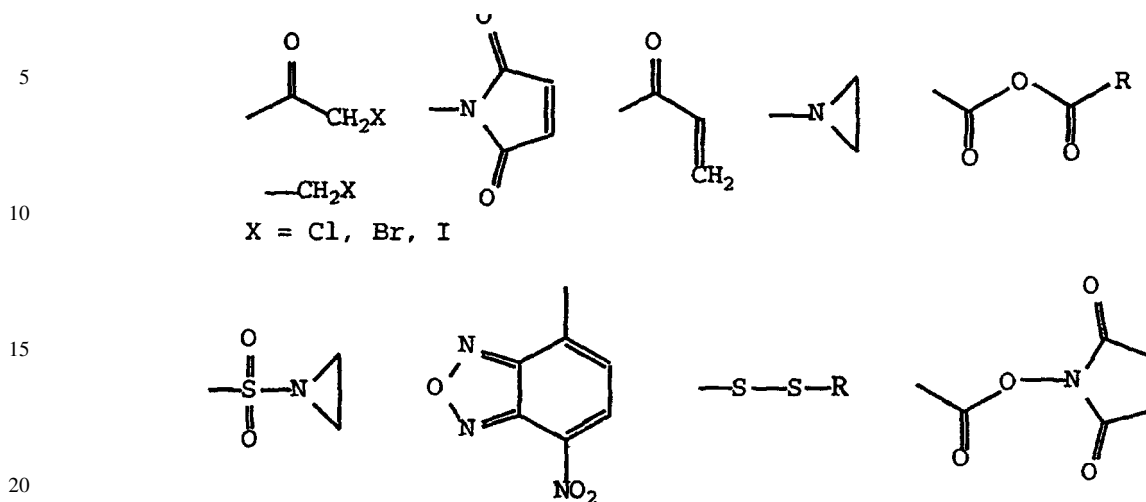
50

55

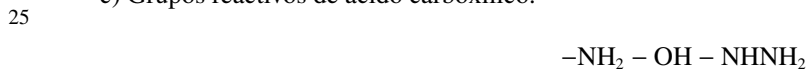
60

65

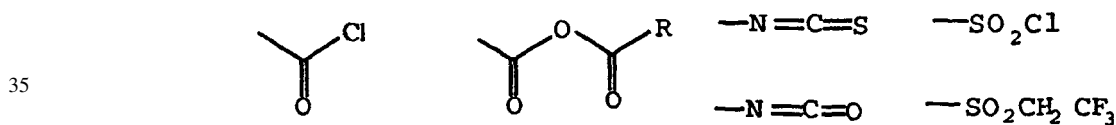
b) Grupos reactivos de tiol:



c) Grupos reactivos de ácido carboxílico:



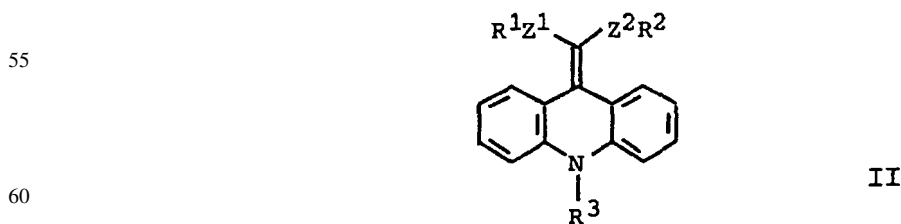
d) Grupos reactivos hidroxílicos:



40 Los grupos reactivos preferidos incluyen los grupos OH,  $\text{NH}_2$ , COOH, éster de  $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ , N-hidroxisuccinimida y maleimida.

45 Los reactivos bifuncionales de acoplamiento pueden también utilizarse para acoplar marcadores a moléculas orgánicas y biológicas con grupos moderadamente reactivos (véase L. J. Kricka, *Ligand-Binder Assays*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1985, págs. 18-20, Tabla 2.2 y T. H. Ji, "Bifunctional Reagents", *Methods in Enzymology*, 91, 580-609 (1983)). Existen dos tipos de reactivos bifuncionales, los que llegan a estar incorporados a la estructura final y los que no se incorporan y sirven solamente para acoplar los dos reactivos.

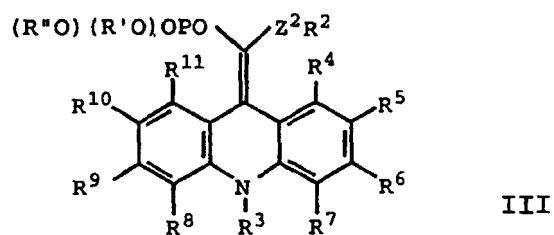
50 Un grupo preferido de compuestos presenta la fórmula II en la que cada uno de  $\text{R}^4$  a  $\text{R}^{11}$  son hidrógeno. Los grupos  $\text{Z}^1$ ,  $\text{Z}^2$ ,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son como se definieron anteriormente.



ES 2 283 111 T3

Otra clase preferida de compuestos presenta la fórmula III a continuación en la que Z<sup>1</sup> junto con R<sup>1</sup> es un grupo fosfato, Z<sup>2</sup> se selecciona de entre O, S y NR<sup>12</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> son tal como se definieron anteriormente y R' y R'' se seleccionan independientemente de entre los grupos alquilo, grupos alquilo sustituidos e iones metálicos alcalinos.

5

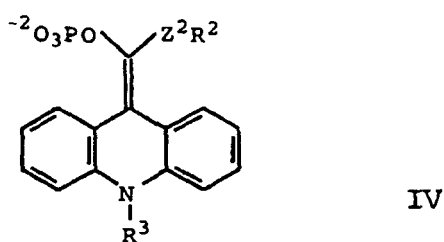


10

15

Los compuestos preferidos de fórmula III tienen átomos de hidrógeno para cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> es hidrógeno y R<sup>3</sup> es un grupo alquilo, más preferentemente un alquilo inferior. Resulta más preferido un compuesto de fórmula IV.

20

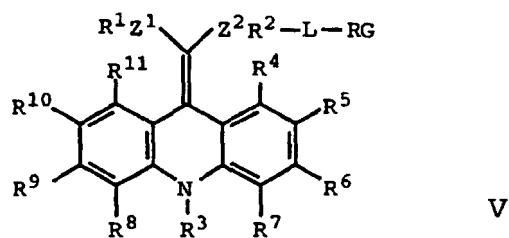


25

30

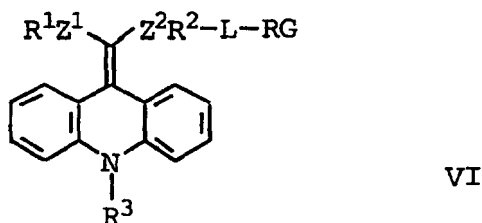
Los compuestos de marcado preferidos tienen las fórmulas V a X.

35



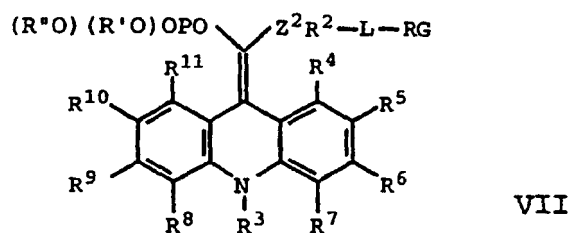
40

45



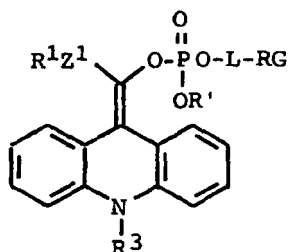
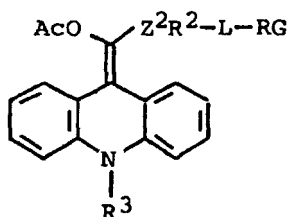
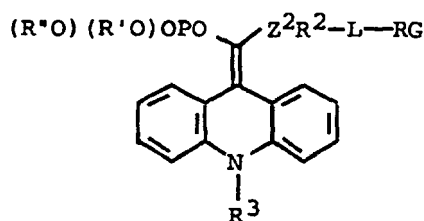
50

55



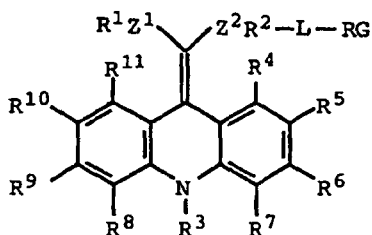
60

65



35 en las que R'' y R' se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo, cianoetilo e iones metálicos alcalinos, los grupos RG reactivos preferidos incluyen grupos hidroxilo, carboxi, amino (NH<sub>2</sub>), maleimida, NHS ésteres y trifluoroetansulfonato (CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) y en los que AcO representa un grupo acetoxi.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a compuestos quimioluminiscentes marcados. Esto significa conjugados de un compuesto que deben detectarse y un compuesto de marcado quimioluminiscente de fórmula I que lleva un sustituyente de marcado. Cuando se prepara un conjugado utilizando un compuesto de marcado de fórmula V:

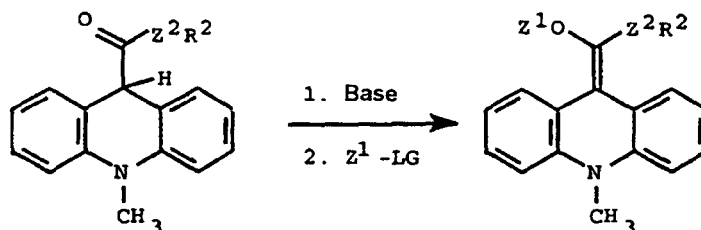


55 el compuesto que debe marcarse con el marcador quimioluminiscente estará unido por medio del grupo reactivo RG de V. El enlace puede dar como resultado el desplazamiento de una parte del grupo reactivo RG. Por ejemplo cuando un éster de N-hidroxisuccinimida es RG, la fracción N-hidroxisuccinimida se pierde al formar el enlace. En otros casos, RG está intacto como por ejemplo cuando es un grupo maleimida que reacciona con un grupo -SH o un compuesto que se está marcando o un reactivo isocianato con un grupo amina u -OH. Incluso en otros casos, el RG completo se pierde al formar el enlace; un ejemplo sería cuando RG es un grupo saliente tal como un haluro, azida, N<sub>3</sub> o p-toluensulfonato.

60 Al preparar el compuesto quimioluminiscente marcado, se utiliza típicamente un exceso molar del compuesto quimioluminiscente marcado aunque no es necesario. El compuesto de marcado quimioluminiscente se utiliza preferentemente en un exceso molar de por lo menos 5 veces el compuesto que debe marcarse y frecuentemente en por lo menos una relación molar de 1 vez. El compuesto quimioluminiscente marcado puede marcarse con un grupo de marcado o copias múltiples del grupo. En general es deseable incorporar múltiples marcadores para aumentar la cantidad de señal que puede generarse.

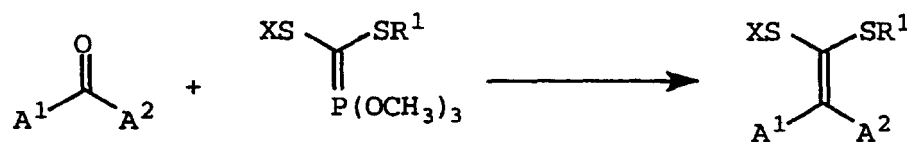
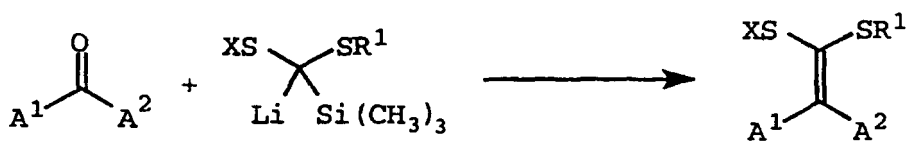
## ES 2 283 111 T3

*Métodos de síntesis.* Los compuestos de fórmula I pueden prepararse por varios métodos. En un método preferido, cuando el grupo  $Z^1$  es O y  $Z^2$  es O, S o  $NR^{12}$ , el compuesto I puede prepararse haciendo reaccionar el enolato de un éster, tioéster o amida con un reactivo de fórmula  $Z^1-LG$ , en la que LG representa un grupo saliente como se ejemplifica mediante el esquema siguiente.

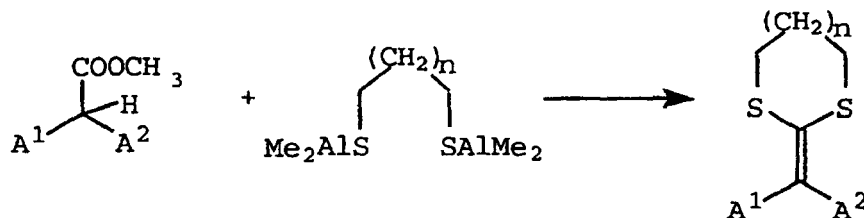


Los grupos salientes típicos incluyen halógenos, tales como cloruro, bromuro y yoduro, sulfonatos tales como metansulfonato y p-toluensulfonato y trifluorometansulfonato, carboxilatos tales como acetato y benzoato específicamente cuando  $Z^1$  es un grupo acilo en cuyo caso  $Z^1-LG$  sería un anhídrido ácido, sulfatos tal como metosulfato, y otros grupos tales como los grupos imidazol, triazol y tetrazol, maleimida y succinimidoxi.

Los métodos de preparación de compuestos de fórmula I en los que ambos grupos Z son átomos de S incluyen la adición nucleófila de un compuesto de litosilano o una fósforo-ilida a un compuesto de carbonilo adecuado según los dos esquemas siguientes (F. A. Carey, A. S. Court, *J. Org. Chem.*, 37, 1926-29 (1972)).



En otro método, un éster se convierte en un ceteno-ditioacetal por reacción con un reactivo bis(dialquilaluminio)-ditiol tal como se da a conocer en E. J. Corey y A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Lett.*, 925-8 (1975).



Incluso en otro método, un anión de un grupo metileno activo se hace reaccionar con  $CS_2$  y el ditiocarboxilato se hace reaccionar con un reactivo  $R_1-LG$  que contiene el grupo  $R_1$  para formar un ditioéster. Un ejemplo de esta última metodología se da a conocer en I. Shahak y Y. Sasson, *Tetrahedron Lett.*, 4207-10 (1973). El ditioéster se convierte en el enolato y reacciona con un reactivo de fórmula X-LG.

Los métodos de preparación de los compuestos quimioluminiscentes de marcado implican generalmente la preparación de un compuesto precursor de fórmula I y someterle a una o más reacciones adicionales, generalmente conocidas por los expertos en la materia, para proporcionar un sustituyente de marcado adjunto a uno de los grupos  $R^1$  a  $R^{12}$ , preferentemente  $R^1$  o  $R^2$ . Se proporcionan numerosos ejemplos a continuación para ilustrar el principio general.

*Analitos.* Las sustancias que pueden analizarse empleando los presentes métodos quimioluminiscentes en un procedimiento analítico incluyen varias clases de moléculas orgánicas y biológicas. Dichos análisis implicarán generalmente la utilización de una reacción de enlace específica entre por lo menos un par de compañeros de unión específicos. Por lo menos uno de los compañeros de unión específicos está asociado con un compuesto de fórmula I de la manera descrita anteriormente. Ejemplos de analitos incluyen fármacos, hormonas, plaguicidas, metabolitos de plaguicidas, ADN, ARN, oligonucleótidos, antibióticos, fragmentos de anticuerpo, híbridos anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, carbohidratos, lectinas, receptores, avidina, estreptavidina y biotina. Compañeros de unión a título de ejemplo incluyen los pares antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o anticuerpo-anticuerpo, oligonucleótidos o polinucleótidos complementarios, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormona-receptor, lectina-carbohidrato, IgG-proteína A, proteína de unión de ácido nucleico-ácido nucleico y anticuerpo ácido nucleico-ácido anti-nucleico.

Los reactivos quimioluminiscentes que utilizan los compuestos de la presente invención pueden utilizarse también en un método para detectar peróxido de hidrógeno, ya que el peróxido puede funcionar como oxidante. Resulta evidente para los expertos en la materia que los presentes métodos pueden utilizarse además para detectar enzimas oxidadas y enzimas deshidrogenasa que generan  $H_2O_2$  por reducción de oxígeno y oxidación de sus sustratos naturales. Además la enzima oxidasa o deshidrogenasa puede estar presente como conjugado a una molécula biológica o a un miembro del par de unión específica en un análisis de un analito.

*Análisis.* En los análisis realizados por los métodos que utilizan los compuestos de la presente invención, un compuesto quimioluminiscente se asocia con el analito o un elemento de un par de unión específica. La asociación puede tomar la forma de enlace covalente si el compuesto posee un sustituyente de marcado. Un ejemplo es un inmunoanálisis quimioluminiscente. Dichos análisis se utilizan frecuentemente en formato manual así como en sistemas de inmunoanálisis multiprueba automáticos. La velocidad de generación de quimioluminiscencia conseguida por las reacciones de la presente invención es particularmente beneficiosa para adaptarla para su utilización con instrumentación de análisis rápido de gran volumen.

En un inmunoanálisis típico, el analito hapteno, antígeno o anticuerpo se analiza detectando la presencia o cantidad de un compañero de unión específico quimioluminiscente marcado para el analito o un análogo marcado del analito. Son muy conocidos en la técnica varios formatos de análisis y los protocolos para realizar las etapas inmunoquímicas. Estos análisis están comprendidos ampliamente en dos categorías. Los análisis competitivos presentan un enlace inmunológico de un anticuerpo específico con el analito y un análogo del analito, p. ej. una molécula de analito marcada de forma detectable. Los análisis en sándwich resultan por la unión sucesiva o simultánea de dos anticuerpos, uno de los cuales está marcado de forma detectable, con el analito. El Par de unión marcado de forma detectable formado de este modo puede analizarse con los compuestos y métodos de la presente invención. La medición puede realizarse con especies marcadas acopladas a una superficie o soporte sólido incluyendo bolas, tubos, micropocillos, partículas magnéticas, partículas de látex, partículas de sílice, tiras de prueba, membranas y filtros tales como son de uso común en la técnica.

La luz emitida por el presente método puede detectarse por cualquier medio adecuado, incluyendo luminómetros, película de rayos X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD o a simple vista. La selección del dispositivo de detección estará gobernada por la aplicación y consideraciones de coste, conveniencia, sensibilidad del espectro y necesidad de un registro permanente.

Una aplicación particularmente útil de los presentes métodos de detección es la detección de ácidos nucleicos mediante la utilización de sondas de ácido nucleico marcadas. Los métodos de análisis y de detección quimioluminiscente de ácidos nucleicos que utilizan sondas marcadas, por ejemplo, análisis de hibridación en solución, detección de ADN en transferencia Southern, ARN por transferencia Northern, secuenciado de ADN, registro de impresiones de ADN, hibridaciones de colonias y levantamientos de placas son técnicas demostradas satisfactoriamente en su totalidad. El marcador puede estar presente como conjugado directo con un oligonucleótido sonda u oligonucleótido de captura o puede incorporarse por medios de enlace indirecto utilizando los métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de medios de enlace indirecto incluyen los que utilizan oligonucleótidos marcados con hapteno y los conjugados anti-hapteno-HRP o los oligonucleótidos biotinilados y los conjugados avidina-HRP. Dichos análisis de ácido nucleico pueden realizarse en una membrana de transferencia o en solución utilizando oligonucleótidos acoplados a superficies sólidas que incluyen bolas, tubos, micropocillos, partículas magnéticas o tiras de prueba como se conocen en la técnica.

La utilización de la presente reacción quimioluminiscente para la detección de analitos marcados, tales como ácidos nucleicos, proteínas o anticuerpos, proporciona una ventaja inesperada sobre los métodos de marcado quimioluminiscente. Se ha descubierto inesperadamente que el analito quimioluminiscente marcado puede experimentar electroforesis y detectarse directamente en geles tales como acrilamida y agarosa. Sorprendentemente, el analito marcado no se destruye ni activa el potencial eléctrico y las corrientes empleadas en el procedimiento tal como sería de esperar basándose en la técnica anterior. La detección quimioluminiscente de analitos marcados, separados por electroforesis en gel no ha tenido éxito anteriormente con el mejor conocimiento de los solicitantes; la detección de los analitos separados por quimioluminiscencia ha requerido transferencia de analitos no marcados a membranas de transferencia y la detección en la membrana por medios indirectos. Los presentes métodos de detección quimioluminiscente proporcionan intensidad adecuada cuando se activan en el gel y de este modo eliminan la necesidad de una etapa de transferencia y de reacciones de enlace. Esta nueva técnica, que representa un avance significativo en la me-

5 metodología de detección eliminando la necesidad de una etapa de transferencia de la membrana, sería particularmente  
 10 muy aconsejable para la detección de escalones de secuenciado de ADN.

Otra utilización a título de ejemplo consiste en la detección inmunológica de proteínas en geles o mediante la  
 5 técnica de transferencia Western. Una muestra que contiene una proteína de interés como el analito se somete a  
 separación electroforética. Las proteínas separadas se detectan directamente en el gel o se transfieren a una membrana  
 de transferencia tal como una membrana de nitrocelulosa o de PVDF mediante acción capilar o con la ayuda de un  
 campo eléctrico. La proteína transferida se detecta con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario  
 10 marcado que reconoce y se une al anticuerpo primario. La determinación cuantitativa del marcador refleja la presencia  
 de la proteína del analito. Para adaptar los métodos de la presente invención para transferencia Western, el anticuerpo  
 secundario se marca con un compuesto de marcado quimioluminiscente de la presente invención. Las variaciones de  
 esta técnica tales como las que utilizan anticuerpos biotinilados y avidina quimioluminiscente marcada se consideran  
 dentro del alcance de la invención.

15 Pueden realizarse análisis de multianalito utilizando dos o más marcadores quimioluminiscentes distinguibles si-  
 multáneamente con analitos de diferente marcador. Los marcadores quimioluminiscentes seleccionados de manera  
 apropiada pueden detectarse independientemente basándose en las diferentes longitudes de onda de emisión. Como  
 alternativa pueden distinguirse dos o más marcadores diferentes por el tiempo requerido para emitir la luz. Los méto-  
 20 dos analíticos de multi-analito quimioluminiscente se dan a conocer en el documento US n° 5.656.207. Los análisis de  
 multi-analito pueden también incluir zonas múltiples del mismo analito, tales como dos zonas diferentes de un ácido  
 nucleico o dos epítomos de un antígeno. Este tipo de análisis es útil, por ejemplo, para detectar yuxtaposiciones génicas  
 o para proporcionar un aumento de especificidad de detección.

25 La utilización de tensioactivos como aditivos en las presentes reacciones quimioluminiscentes presenta ventajas  
 y puede conducir a una mejora de la sensibilidad analítica. Los tensioactivos no iónicos útiles en la práctica de la  
 presente invención incluyen a título de ejemplo los alquifenoles polioxietilenados, alcoholes polioxietilenados, éteres  
 polioxietilenados y ésteres de sorbitol polioxietilenados. Los tensioactivos catiónicos, incluyendo los compuestos  
 de sales de amonio cuaternarias tales como CTAB presentan ventajas para su utilización al aumentar el nivel de  
 quimioluminiscencia emitida.

30 En otra forma de realización, pueden utilizarse aceptores de energía fluorescente para desplazar la emisión máxima  
 a longitudes de onda mayores (desplazamiento del rojo) y/o para aumentar la cantidad de luminiscencia emitida. Los  
 fluorescentes pueden estar unidos por enlace covalente a un compuesto de fórmula I o, alternativamente, pueden  
 añadirse a la solución de reacción como especies por separado, o unirse a un polímero o asociarse electrostáticamente  
 35 con una micela o polímero.

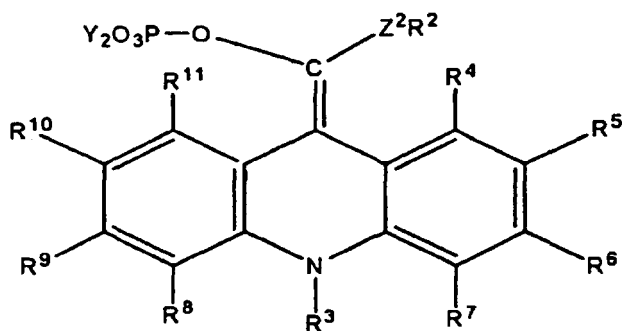
### Ejemplos

40 Los Ejemplos 1 a 9, 21 a 25 y 26 (parte) se proporcionan únicamente como referencia ya que comprenden los  
 compuestos (numerados del 1 al 21) que están fuera del alcance de las reivindicaciones de la presente invención.  
 El contenido de estos ejemplos se pretende que proporcione información de los antecedentes para comprender los  
 métodos de síntesis de los compuestos reivindicados.

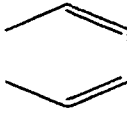
45 Los Ejemplos 10 a 20 describen la síntesis de los compuestos 22 a 32 que están comprendidos dentro del alcance  
 de la presente invención. Asimismo los ejemplo 27 a 30 hacen uso de los compuestos 25 y 26, que están comprendidos  
 en las reivindicaciones.

#### 1. Síntesis de compuestos de fosfato de acridano

50 La preparación de los compuestos 1 a 13 (Y=Na) y 1a-13a (Y=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN) siguientes se describió en la solicitud  
 PCT WO 97/26245 del solicitante.

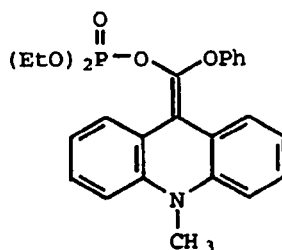


ES 2 283 111 T3

Compuesto	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup> - R <sup>11</sup>	Z	R <sup>2</sup>
1	CH <sub>3</sub>	todos H	O	fenil
2	CH <sub>3</sub>	todos H	O	3,5-difluorofenil
3	CH <sub>3</sub>	R <sup>6</sup> = OCH <sub>3</sub>	O	fenil
4	CH <sub>3</sub>	R <sup>6</sup> = Cl	O	2,6-dimetilfenil
5	CH <sub>3</sub>	todos H	S	fenil
6	CH <sub>3</sub>	R <sup>8</sup> - R <sup>9</sup> =	O	fenil
				
7	CH <sub>3</sub>	todos H	S	4-fluorofenil
8	CH <sub>3</sub>	todos H	S	4-metoxifenil
9	CH <sub>3</sub>	todos H	S	2,6-dimetilfenil
10	CH <sub>3</sub>	R <sup>5</sup> , R <sup>10</sup> = F	S	fenil
11	CH <sub>3</sub>	todos H	S	trifluoroetil
12	CH <sub>3</sub>	todos H	S	4-clorofenil
13	CH <sub>3</sub>	todos H	S	2-naftil

R<sup>4</sup>-R<sup>11</sup> son H a menos que se indique de otro modo.

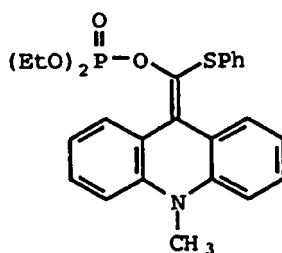
2. Síntesis del derivado 14 de acridano



14

Una solución de 10-metilacridan-9-carboxilato de fenilo (250 mg, 0,79 mmoles) en THF se desprotonó con LDA a -78°C. Simultáneamente, se añadió (EtO)<sub>2</sub>POCl (205 mg, 1,2 mmoles) y piridina (94 mg, 1,2 mmoles) con jeringuillas y agitación continua durante 15 min. Se retiró el baño de nieve carbónica y se continuó agitando durante 2 h. Se eliminaron los volátiles y se aisló el producto del residuo por cromatografía en dos etapas. Una purificación cromatográfica en columna utilizando acetato de etilo al 30%/hexano permitió la separación del producto que contenía una impureza fluorescente. Se efectuó la purificación final por TLC de prep. utilizando 10% de acetato de etilo/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; RMN de <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>) δ 1,08 (t, 6H), 3,46 (s, 3H), 3,76-3,97 (m, 4H), 6,79-7,91 (m, 13H).

3. Síntesis del derivado 15 de acridano



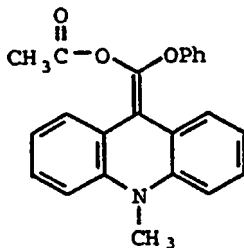
15

Una solución de 10-metilacridan-9-tiocarboxilato de fenilo (1,0 g, 3 mmoles) en THF se desprotonó con LDA a -78°C. Simultáneamente, se añadió (EtO)<sub>2</sub>POCl (958 mg, 5 mmoles) y piridina (2,5 ml, 3 mmoles) con jeringuillas y agitación continua durante 15 min. Se retiró el baño de nieve carbónica y se continuó agitando durante 2 h. Se eliminaron los volátiles y se aisló el producto del residuo por cromatografía en dos etapas. Una purificación cromatográfica en columna utilizando 30 a 100% de acetato de etilo/hexano permitió la separación del producto que contenía

## ES 2 283 111 T3

impurezas fluorescentes azules y verdes. Se efectuó la purificación final por TLC de prep. utilizando 12% de acetato de etilo/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ )  $\delta$  1,01 (t, 6H), 3,49 (s, 3H), 3,74-3,96 (m, 4H), 6,91-7,45 (m, 11H), 7,78 (d, 1H), 7,99 (d, 1H).

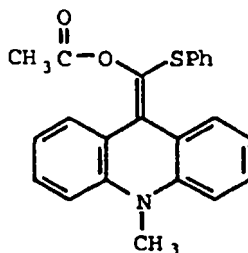
### 4. Síntesis del derivado 16 de acridano



16

Una solución de 10-metilacridan-9-carboxilato de fenilo (311 mg, 1 mmol) en THF se añadió gota a gota a una solución de LDA a  $-78^\circ\text{C}$ . Después de 30 minutos a  $-78^\circ\text{C}$ , se añadió anhídrido acético (161,3 mg, 1,6 mmoles) con jeringuilla y se retiró el baño de nieve carbónica. Después de una hora, se eliminaron los volátiles y se aisló el producto del residuo por cromatografía. Una purificación cromatográfica en columna utilizando 5% de acetato de etilo/hexano proporcionó 90 mg de fracción pura como sólido blanco y una segunda fracción (250 mg) que contenía algún material de partida; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,04 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 6,82-7,65 (m, 13H).

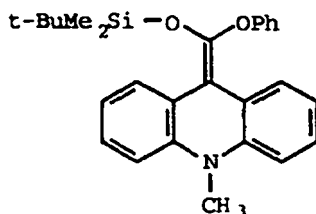
### 5. Síntesis del derivado 17 de acridano



17

Una solución de 10-metilacridan-9-tiocarboxilato de fenilo (1,05 g) en THF se desprotonó con LDA a  $-78^\circ\text{C}$ . Se añadió gota a gota ácido acético (0,45 ml) en 10 ml de THF, se retiró el baño de nieve carbónica y se continuó agitando durante la noche. Se eliminaron los volátiles y se aisló el producto del residuo por cromatografía. Una purificación cromatográfica en columna utilizando 5 a 20% de acetato de etilo/hexano proporcionó 1,15 g del compuesto 40 como sólido blanco desvaído; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,89 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 6,95-7,06 (m, 4H), 7,20-7,34 (m, 5H), 7,40-7,44 (m, 2H), 7,62 (d, 1H), 7,79 (d, 1H).

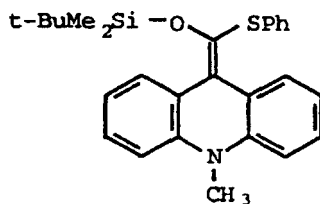
### 6. Síntesis del derivado 18 de acridano



18

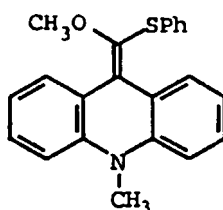
Una solución de 10-metilacridan-9-carboxilato de fenilo (333,4 mg, 1,06 mmoles) en THF se desprotonó con LDA a  $-78^\circ\text{C}$  durante 30 min. La solución anaranjada oscura se trató con cloruro de t-butildimetilsililo (253,4, 1,68 mmoles) en 10 ml de THF anhidro. Se retiró el baño de nieve carbónica y se continuó la agitación durante 2 h. Se eliminaron los volátiles y se aisló el producto como aceite (212 mg) del residuo por cromatografía utilizando 5% de acetato de etilo/hexano; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0,12 (s, 6H), 0,77 (s, 9H), 3,37 (s, 3H), 6,75-7,38 (m, 12H), 7,79 (dd, 1H).

## 7. Síntesis del derivado 19 de acridano

**19**

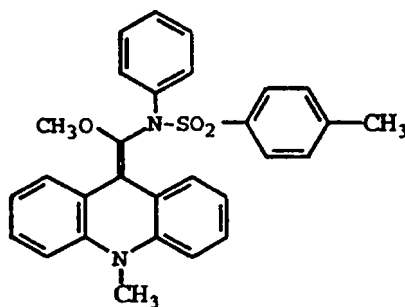
Una solución de 10-metilacridan-9-tiocarboxilato de fenilo (322,3 mg, 0,97 mmoles) en THF se desprotonó con LDA a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Se añadió rápidamente cloruro de t-butildimetilsililo (270, 1,8 mmoles) en 5 ml de THF anhidro, se retiró el baño de nieve carbónica y continuó agitándose durante 90 min. Se eliminaron los volátiles y se aislaron 330 mg del producto del residuo por cromatografía utilizando 5% de acetato de etilo/hexano como un aceite que solidificó en reposo; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0,09 (s, 6H), 0,73 (s, 9H), 3,43 (s, 3H), 6,84-7,01 (m, 4H), 7,16-7,47 (m, 7H), 7,73-7,76 (m, 1H), 7,90-7,93 (m, 1H).

## 8. Síntesis del derivado 20 de acridano

**20**

Se transformó 1,0 g de 10-metilacridan-9-tiocarboxilato de fenilo en el enolato con LDA en 60 ml de THF anhidro a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Después de mantener la temperatura a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, se añadieron 0,76 g de triflato de metilo y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Se dejó la mezcla reposar durante 4 días. Se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml), se extrajo la solución con agua y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se purificó el producto en bruto por TLC de prep. con un eluyente de hexano: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  70/30. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,53 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 6,93-7,45 (m, 11H), 7,71 (d, 1H), 7,93 (d, 1H).

## 9. Síntesis del derivado 21 de acridano

**21**

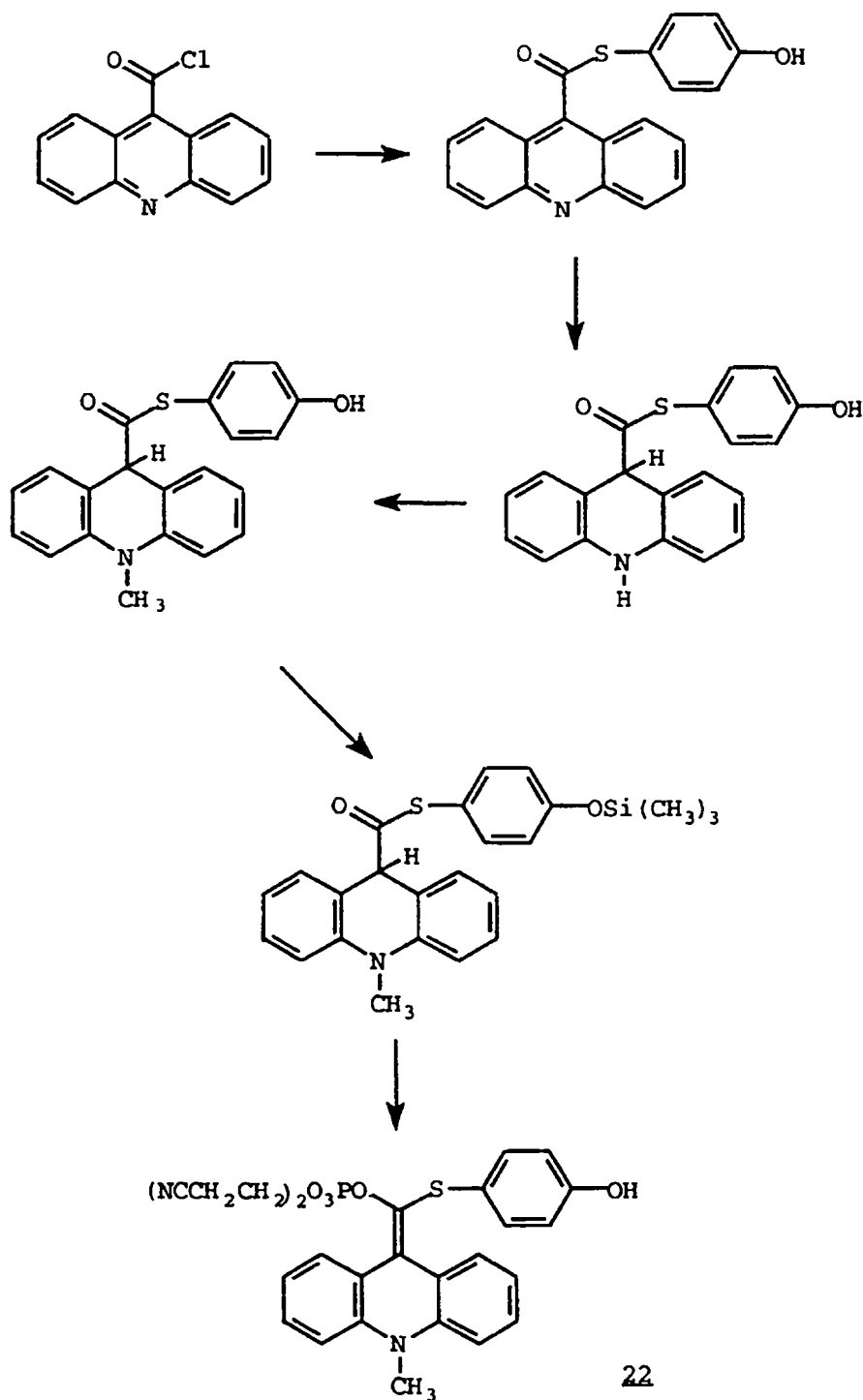
Se preparó 10-metil-N-(fenil)-N-(p-toluensulfonamido)-acridan-9-carboxamida tal como se describe en el documento US n° 5.491.072. La sulfonamida se convirtió en el enolato con LDA en THF anhidro y se metiló utilizando triflato de metilo para producir el compuesto 21.

## 10. Síntesis del derivado 22 de acridano

- Se esterificó el cloruro del ácido acridina-9-carboxílico (4,0 g) con 4-hidroxifenol (2,8 g) en una solución de piridina (2,94 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 ml) durante la noche a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla y se evaporó a sequedad el filtrado. Se combinó el residuo con el precipitado de la reacción y se lavó con agua y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para eliminar las impurezas, proporcionando 3,8 g (70%) del tioéster.
- Se redujo el tioéster (2,0 g) con cinc (3,9 g) y ácido acético en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bajo una atmósfera de argón durante 3 h a temperatura ambiente. Se filtró el producto insoluble, se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se disolvió en acetona para separarlo de los inorgánicos y se evaporó, proporcionando 1,7 g (85%) del tioéster de acridano.
- Se metiló el tioéster de acridano en nitrógeno con triflato de metilo (3,3 g) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante la noche a temperatura ambiente. La evaporación a sequedad, el reparto entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua, y el secado dejó un producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna con 30% de acetato de etilo/hexano, proporcionando 1,55 g (88%) del tioéster N-metilado.

d) Se protegió el grupo fenólico como éter de TMS haciendo reaccionar 2 g del tioéster con 1,25 g de cloruro de trimetilsililo en 20 ml de THF que contenían 0,91 g de piridina durante la noche a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se evaporó a sequedad el filtrado. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna con 25% de acetato de etilo/hexano.

e) Se convirtió el tioéster en el bis(cianoetil)fosfato de enol con eliminación simultánea del grupo protector sililo. El enolato del tioéster, generado por reacción de 2 g del tioéster con LDA en THF a  $-78^{\circ}\text{C}$  se hizo reaccionar más con  $\text{POCl}_3$  (0,87 g) y piridina (0,45 g) en THF. Después de 1 hora a temperatura ambiente se añadió 3-hidroxipropionitrilo (1,56 g) como solución de piridina y se agitó la mezcla durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, se evaporó y se aplicó a una columna para purificación con acetato de etilo, proporcionando un producto ligeramente impuro. Se lavó más el producto con agua para eliminar el 3-hidroxipropionitrilo residual, se secó y se evaporó proporcionando 0,92 g d producto. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,55 (m, 4H), 3,50 (s, 3H), 3,94 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 5,94 (s, 1H), 6,85 (d, 2H), 7,06 (m, 4H), 7,33 (m, 4H), 7,87 (dd, 2H).

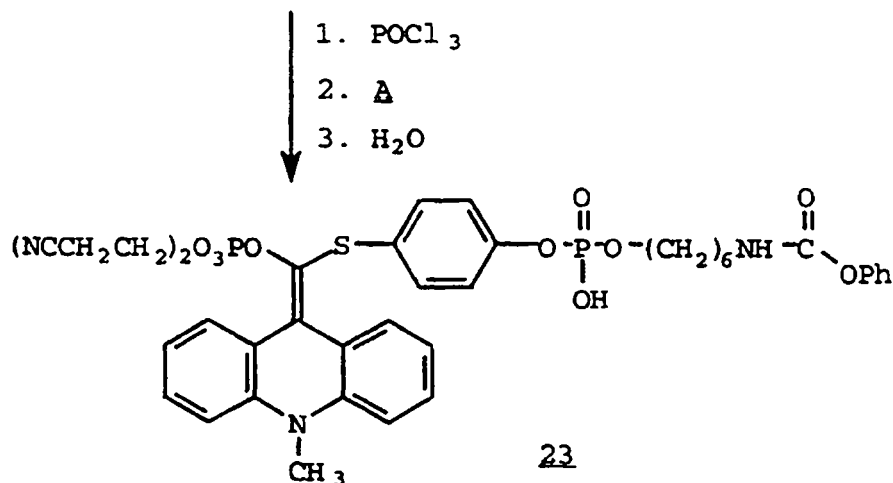
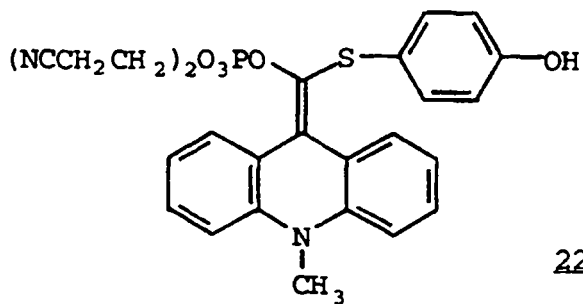
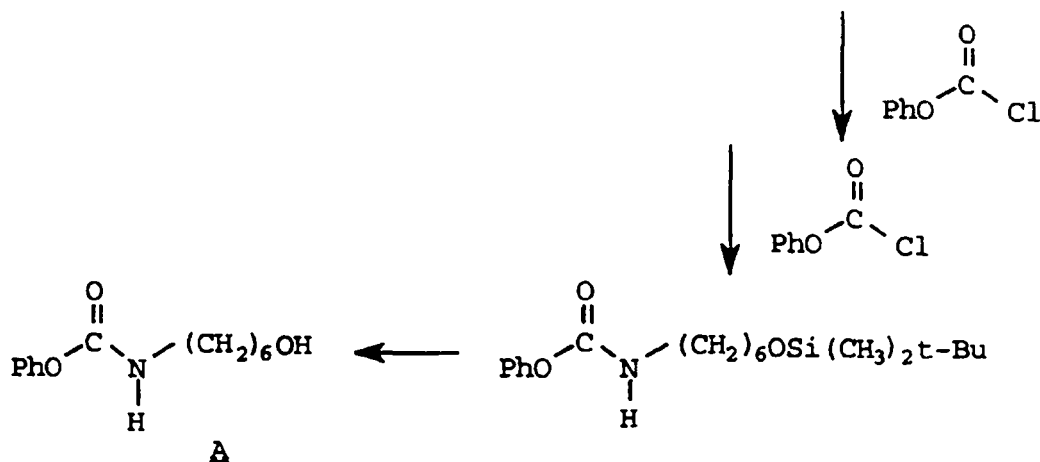


ES 2 283 111 T3

11. Síntesis del derivado 23 de acridano

a) Se sililó el 6-aminohexanol (0,5 g) con 0,556 g de cloruro de trimetilsililo y 0,72 ml de trietilamina en 20 ml de THF durante la noche. Se filtró la mezcla y se evaporó a sequedad el residuo. El éter silílico se convirtió en el carbamato de fenilo reaccionando con clorofornato de fenilo (0,735 g) y 1 ml de piridina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se diluyó la solución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con agua y se secó. El grupo éter silílico escindió con HCl en THF. Se aisló el producto A por cromatografía en columna.

b) Se trató el compuesto 22 con POCl<sub>3</sub> y piridina para fosforilar el fenol. La reacción con el compuesto A (a continuación) durante 3,5 h a temperatura ambiente en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dividiendo la mezcla de reacción entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua, secando y cromatografiando con 25 a 50% de metanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó el compuesto 23. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,17-1,48 (m, 8H), 2,40-2,44 (m, 4H), 3,01-3,04 (m, 2H), 3,45 (s, 3H), 3,82-3,96 (m, 6H), 5,60 (bt, 1H), 6,89-7,29 (m, 15H), 7,76-7,84 (m, 2H).



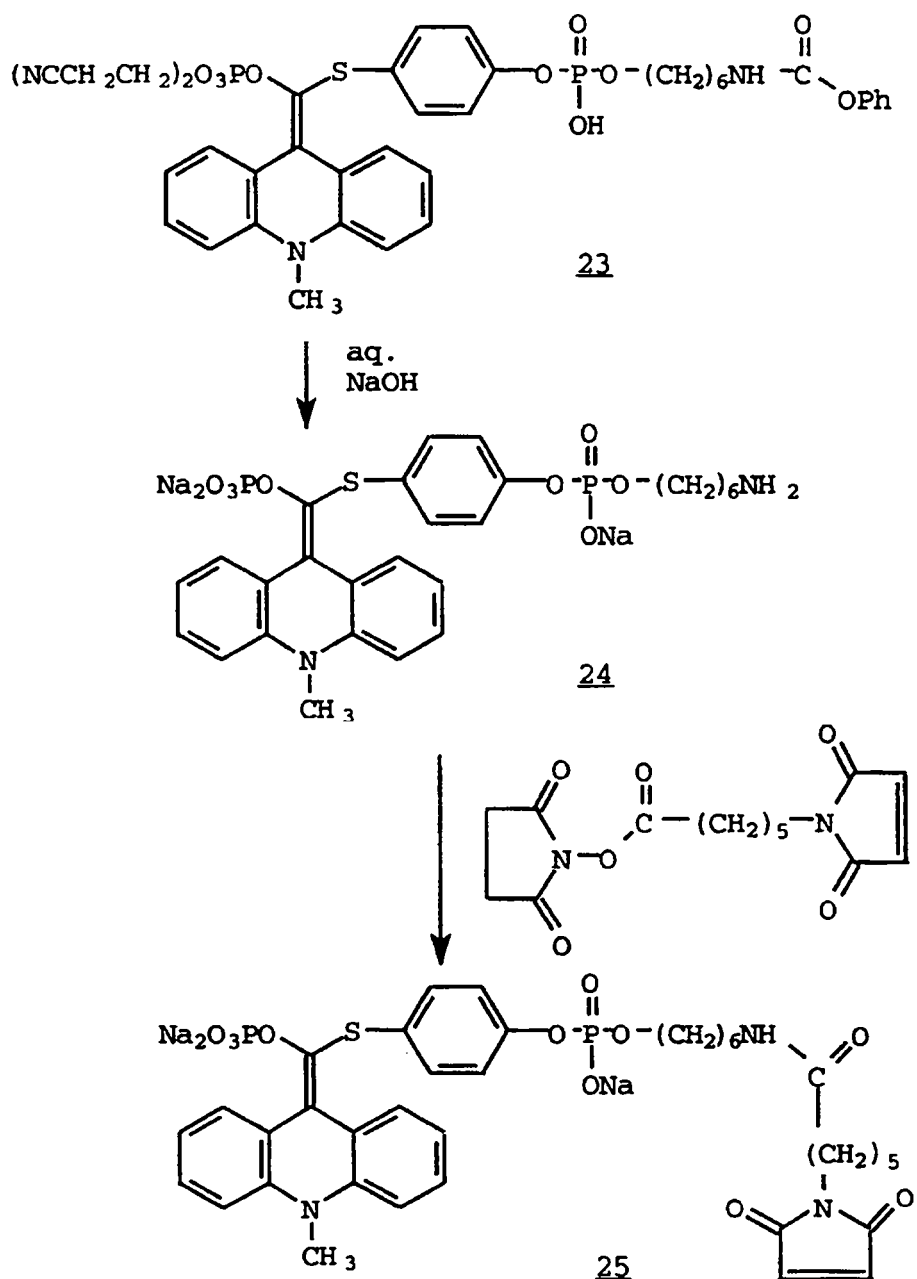
## ES 2 283 111 T3

### 12. Síntesis del derivado 24 de acridano

- a) Se hidrolizó el compuesto 23 (90 mg) en NaOH acuoso/acetona agitando una solución durante 1 día a temperatura ambiente para eliminar los grupos carbamato y cianoetilo. Se evaporó la solución y se trituro el sólido mucilaginoso con metanol para cristalizar el producto, proporcionando 64 mg. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1,0,1-1,46 (m, 8H), 2,46-2,90 (2t, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,77-3,83 (m, 2H), 6,89-7,3 (m, 10H), 7,80-7,83 (d, 1H), 8,14-8,17 (d, 1H).

### 13. Síntesis del derivado 25 de acridano

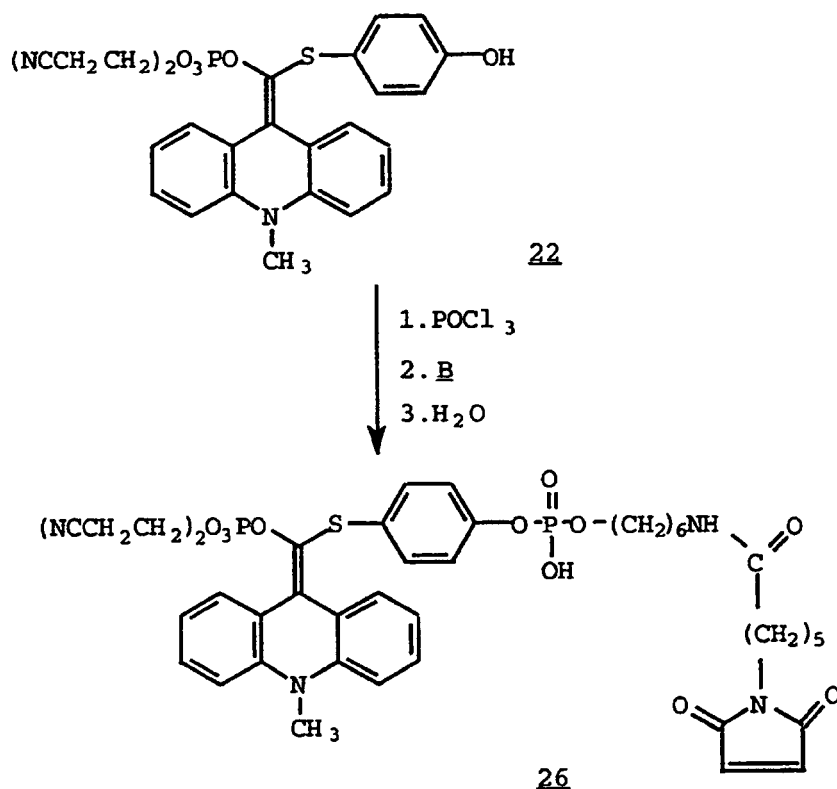
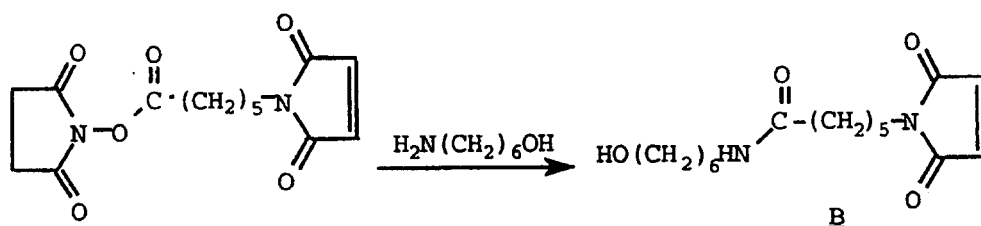
- a) Se disolvió el compuesto 24 (15 mg) en 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  y se añadió a una solución de éster NHS del ácido 6-maleimidoheptanoico (8,4 mg) en 75  $\mu\text{l}$  de p-dioxano- $\text{d}_8$  en un tubo de microcentrifugadora. El tubo se agitó brevemente para mezclar. Se diluyó la solución con metanol y se evaporó a sequedad. Se cristalizó el sólido anaranjado en metanol/acetona, se lavó con acetona y se secó, proporcionando 17 mg de sólido anaranjado claro. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,25-1,58 (m, 14H), 2,11 (t, 2H), 3,09 (t, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,45 (t, 2H), 3,83-3,85 (m, 2H), 6,76-7,16 (m, 12H), 7,87-7,89 (d, 1H), 8,44-8,46 (d, 1H).



## ES 2 283 111 T3

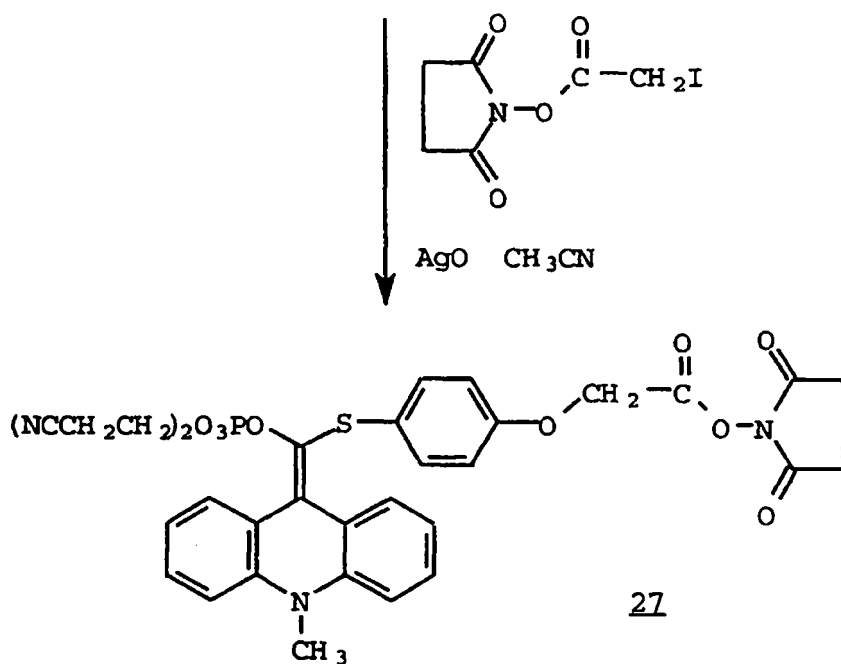
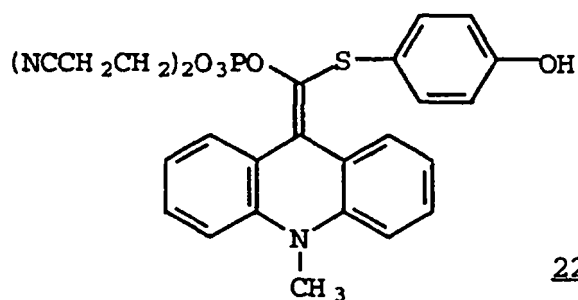
### 14. Síntesis del derivado 26 de acridano

- a) Se hizo reaccionar una solución de éster NHS del ácido 6-maleimido hexanoico (22,7 mg) en THF con 6-aminohexanol. Después de 30 min, se centrifugó la solución y se decantó el líquido. Se lavó el sólido con THF, combinándose los sobrenadantes. El THF se evaporó y se repartió el residuo entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua. El secado y la evaporación de la capa orgánica proporcionaron el compuesto B.
- b) Se fosforiló el compuesto 22 (57 mg) en una solución de  $\text{POCl}_3$  (18 mg), piridina (168 mg) y 1,5 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $0^\circ\text{C}$ . Después de aproximadamente 90 min., se añadió una solución de B (40 mg) en 2,5 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $0^\circ\text{C}$  y se agitó la mezcla durante 4,5 h. Se diluyó la mezcla con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con agua, se secó y se concentró. Se aisló el compuesto 26 del producto en bruto por TLC de prep. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,18-1,53 (m, 14H), 2,03 (t, 2H), 2,28 (bs, 1H), 2,51 (m, 4H), 3,04-3,05 (m, 2H), 3,42 (t, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,89-3,97 (m, 6H), 6,28 (bs, 1H), 6,62 (s, 2H), 6,89-7,34 (m, 10H), 7,75-7,78 (d, 1H), 7,81-7,84 (d, 1H).



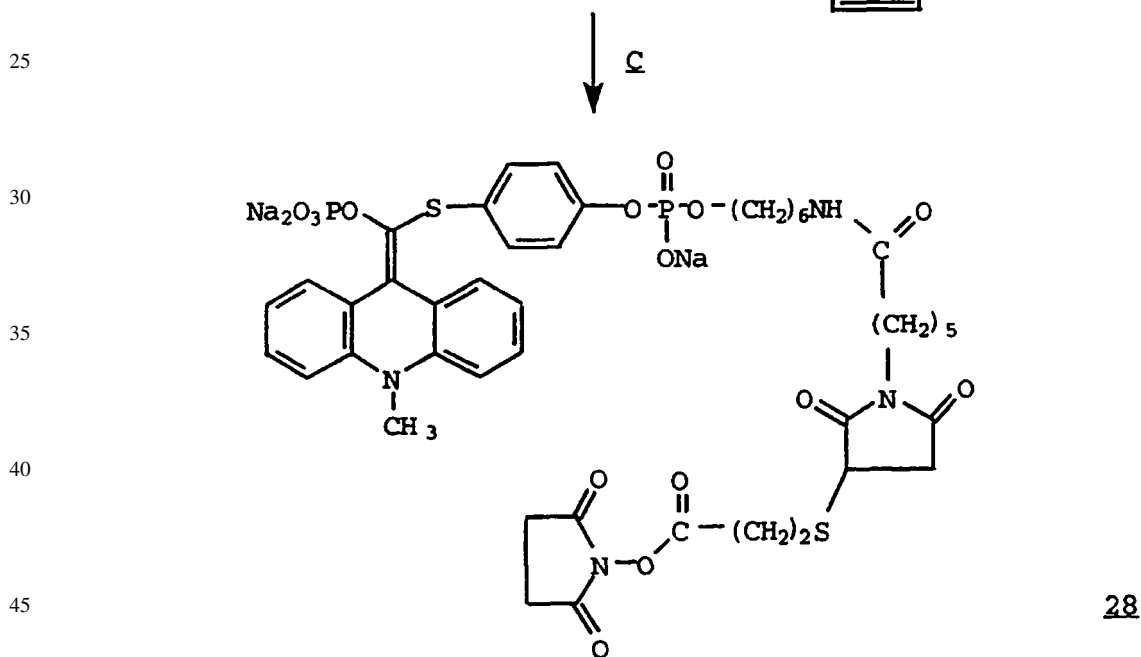
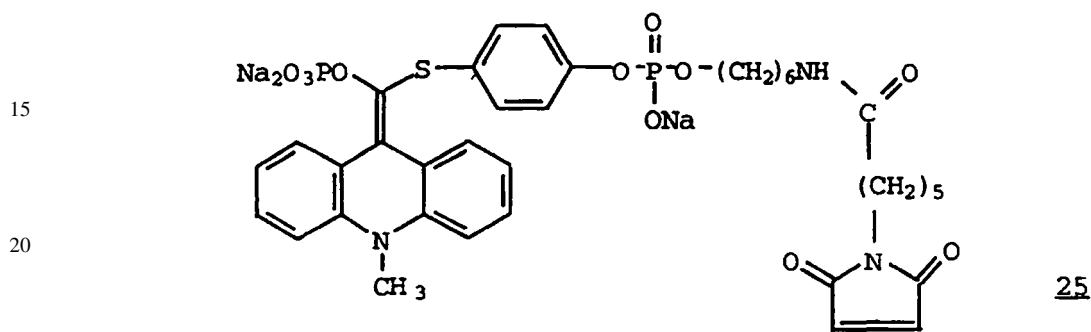
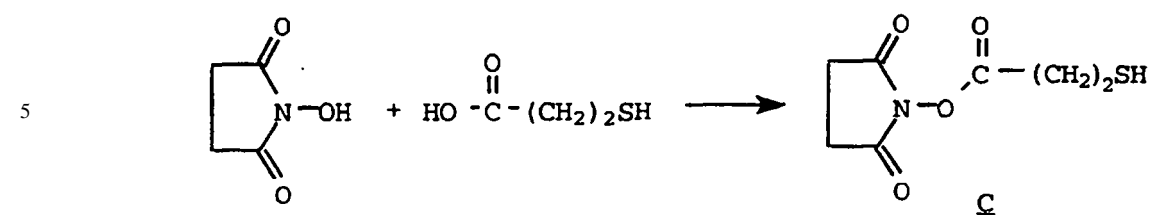
### 15. Síntesis del derivado 27 de acridano

- a) Se hizo reaccionar el compuesto 22 (0,2 g) con 93 mg de  $\text{AgO}$  y 0,2 g de yodoacetato de NHS en acetonitrilo durante 1 h a temperatura ambiente bajo inertización de argón. Se filtró la mezcla, se lavó el sólido con acetona y se evaporaron las soluciones orgánicas combinadas. Se purificó el producto acoplado del crudo por cromatografía utilizando 50 a 75% de acetato de etilo/hexano, proporcionando 64 mg del compuesto 27. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,48-2,55 (m, 4H), 2,77 (s, 4H), 3,53 (s, 3H), 3,88-4,00 (m, 4H), 4,97 (s, 2H), 6,99-7,94 (m, 12H).



40 16. Síntesis del derivado 28 de acridano

- 45 a) Se agitó bajo argón una solución de ácido 3-mercaptopropanoico (118 mg), N-hidroxisuccinimida (192 mg) y DCC (252 mg) en DMF. Después de 45 min., se filtró el precipitado y se lavó con THF. Se puso en suspensión el sólido en acetona y se aplicó la solución de acetona a una placa de TLC de prep. para purificación cromatográfica utilizando 40% de acetato de etilo/hexilo. El producto C acoplado se aisló como aceite (90 mg).
- 50 b) Se disolvió el compuesto 25 (2,5 mg) en 1 ml de metanol/tampón fosfato 1:1, pH 6,0 y a continuación se evaporó a sequedad para convertir el grupo del fosfato disódico en la forma monoácida. El compuesto y el compuesto C se disolvieron juntos en DMF-d<sub>6</sub> y se mantuvieron durante 10 min. Se eliminó la DMF al vacío.
- 55
- 60
- 65

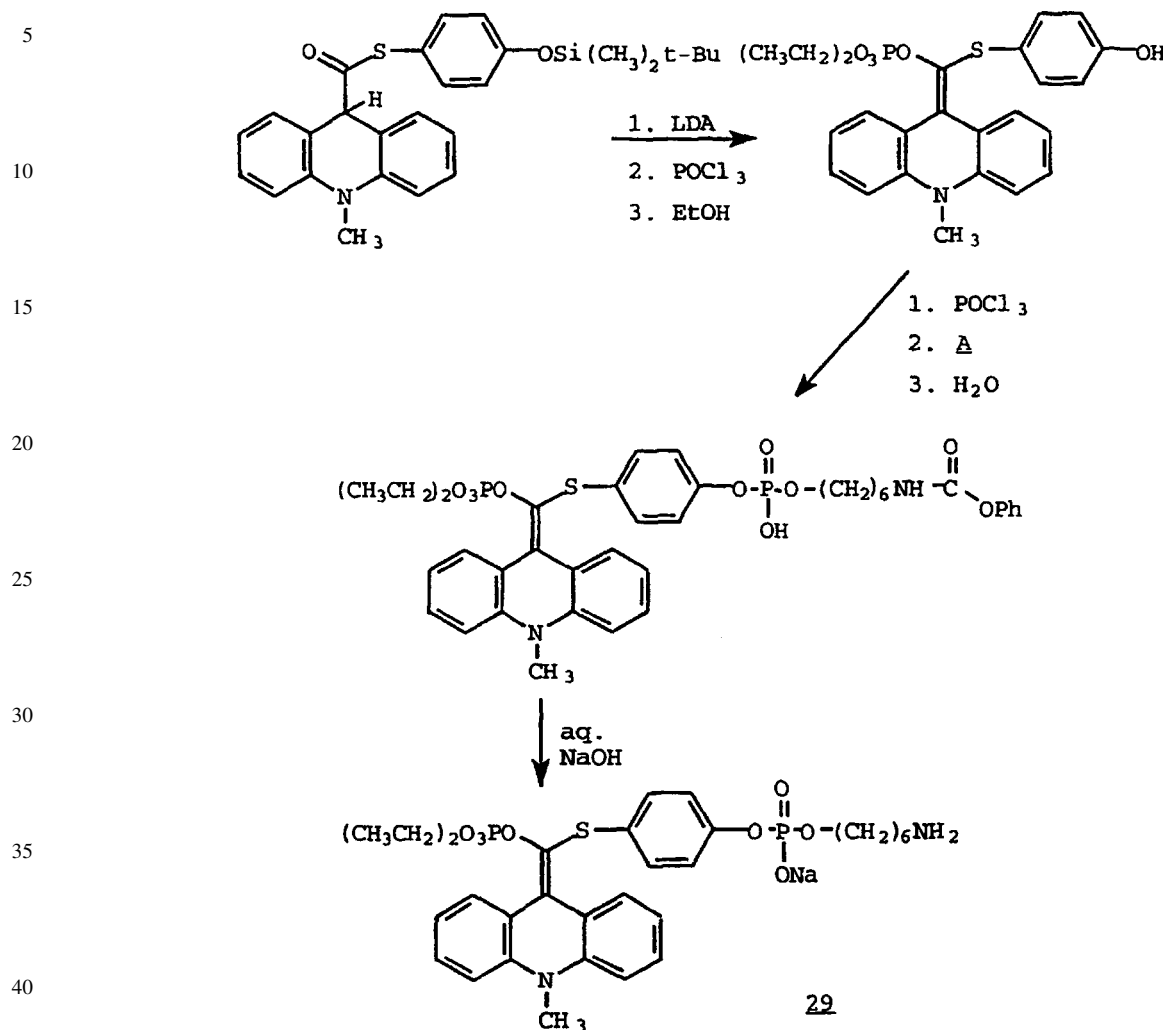


50 17. Síntesis del derivado 29 de acridano

- 55 a) El producto intermedio del tioéster protegido con sililo (a continuación) del Ejemplo 13 (preparado a partir de 5 g del precursor no sililado) se desprotonó con LDA y se fosforiló con  $\text{POCl}_3$  utilizando los procedimientos esencialmente como se describió anteriormente. Se añadió etanol (4,75 ml) al producto intermedio de diclorofosfato y se continuó agitando durante la noche. Se filtró el sólido y se evaporó a sequedad el filtrado, dejando un aceite. Se cromatógrafió el aceite utilizando 30 a 50% de acetato de etilo/hexano proporcionando 2,37 g del producto intermedio de fosfato de enol y etilo como un sólido ligeramente amarillo.
- 60 b) Se fosforiló el producto intermedio fosfato de enol dietilo (288 mg) en el grupo fenol con  $\text{POCl}_3$ /piridina en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  agitando durante aproximadamente 3 h. Se añadió el compuesto A (141 mg) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agitó la solución durante la noche a temperatura ambiente. Se lavó la solución con agua, se secó y se concentró. Se evaporó el residuo por TLC de prep., proporcionando el producto intermedio protegido por carbamato (82 mg).
- 65 c) El producto intermedio protegido por carbamato (82 mg) se hidrolizó en NaOH acuoso/acetona agitando una solución durante 6 h a temperatura ambiente bajo argón para eliminar el grupo carbamato. Se diluyó la solución en metanol/acetona para cristalizar el producto, proporcionando una primera recogida de 21 mg de compuesto 23. Se evaporó el filtrado y se cromatógrafió el residuo (25 a 50% de metanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para

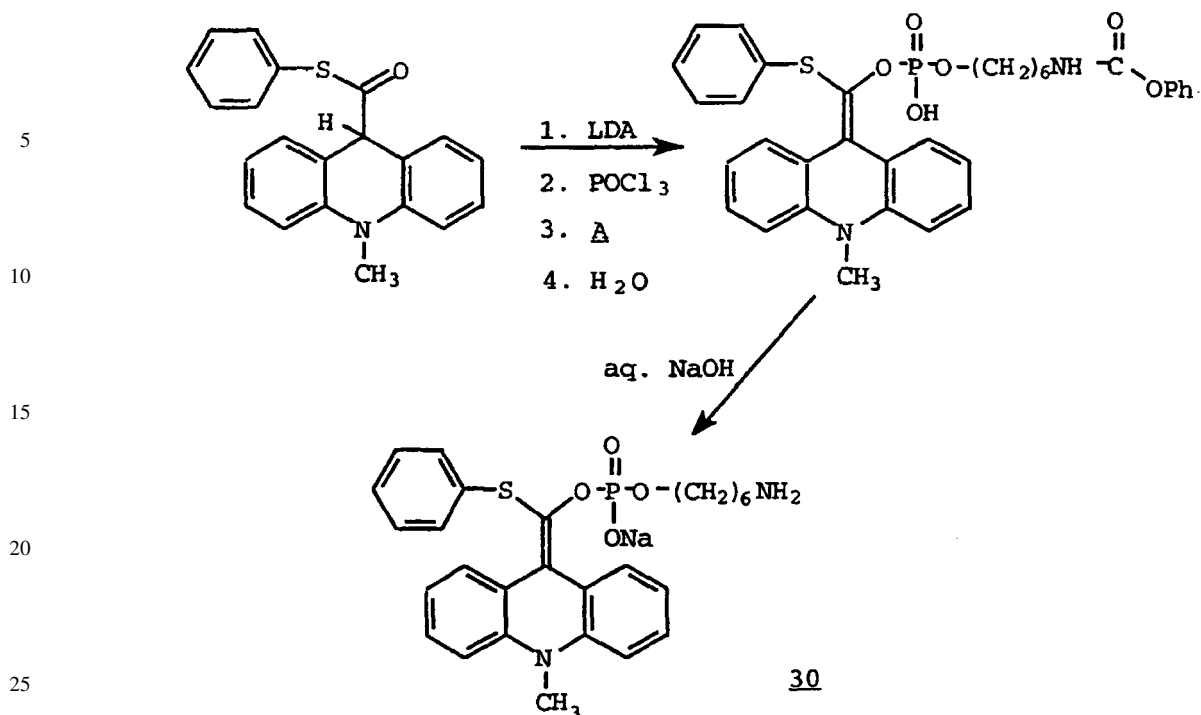
## ES 2 283 111 T3

obtener 40 mg más de producto. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,2 (s, 6H), 1,34-1,72 (m, 8H), 2,82 (bt, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,74-3,97 (m, 6H), 6,89-7,34 (m, 10H), 7,76-7,78 (d, 2H), 8,25 (5s, 1H).



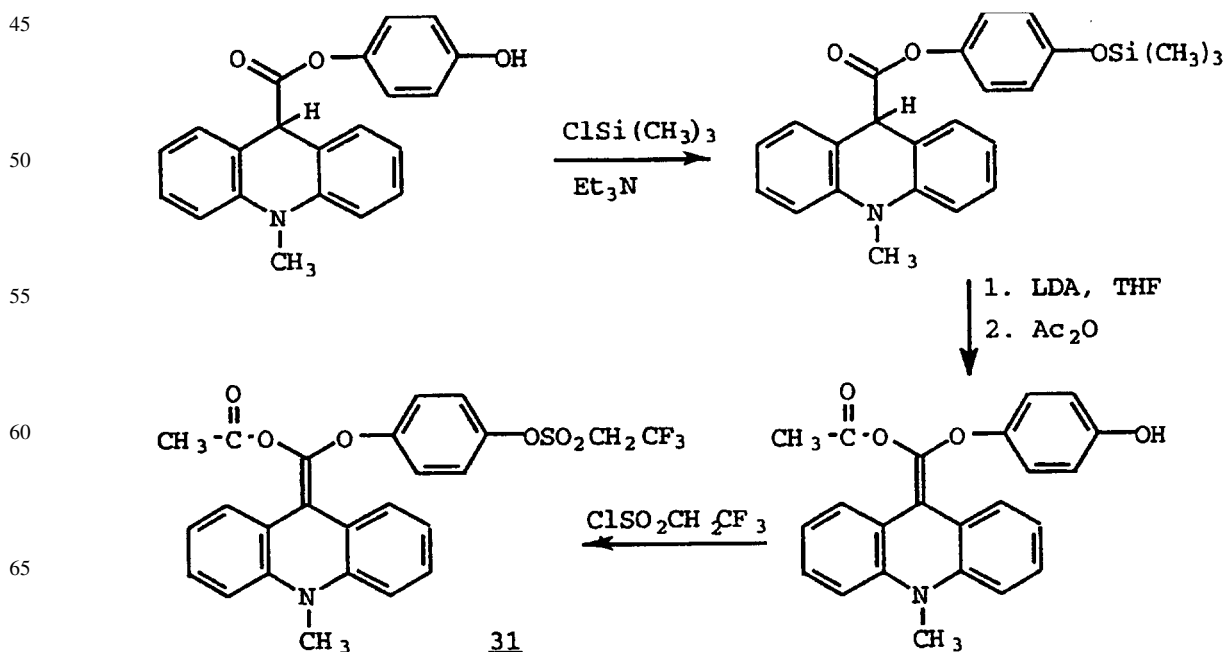
### 18. Síntesis del derivado 30 de acridano

- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Se desprotonó el 10-metilacridan-9-tiocarboxilato de fenilo (0,5 g) con LDA en THF a  $-78^\circ\text{C}$  y se trató con  $\text{POCl}_3$ /piridina a  $-78^\circ\text{C}$  a temperatura ambiente para formar el diclorofosfato de enol. Se añadió una solución de A en THF y se continuó agitando durante la noche. Se evaporó la solución y se repartió el residuo entre acetato de etilo y agua. El secado y la evaporación del acetato de etilo produjeron un sólido anaranjado que se lavó con hexano para eliminar la piridina residual. Se disolvió el sólido y se sometió a cromatografía en columna utilizando 5 a 50% de metanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , varias fracciones que contenían el producto deseado junto con las impurezas se combinaron y se evaporaron. Se purificaron más los materiales por TLC de prep. con 15% de metanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para proporcionar el producto puro protegido con carbamato.
  - Se hidrolizó el producto protegido con carbamato (17 mg) en NaOH/acetona agitando una solución durante la noche a temperatura ambiente bajo argón para eliminar el grupo carbamato. Se evaporó la solución y se cromatografió el residuo (25 a 50% de metanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) produciendo 8 mg del compuesto 30. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,07-1,33 (m, 8H), 2,39 (t, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,40-3,42 (m, 2H), 6,85-7,37 (m, 11H), 7,68-7,70 (d, 1H), 8,12-8,14 (d, 1H).



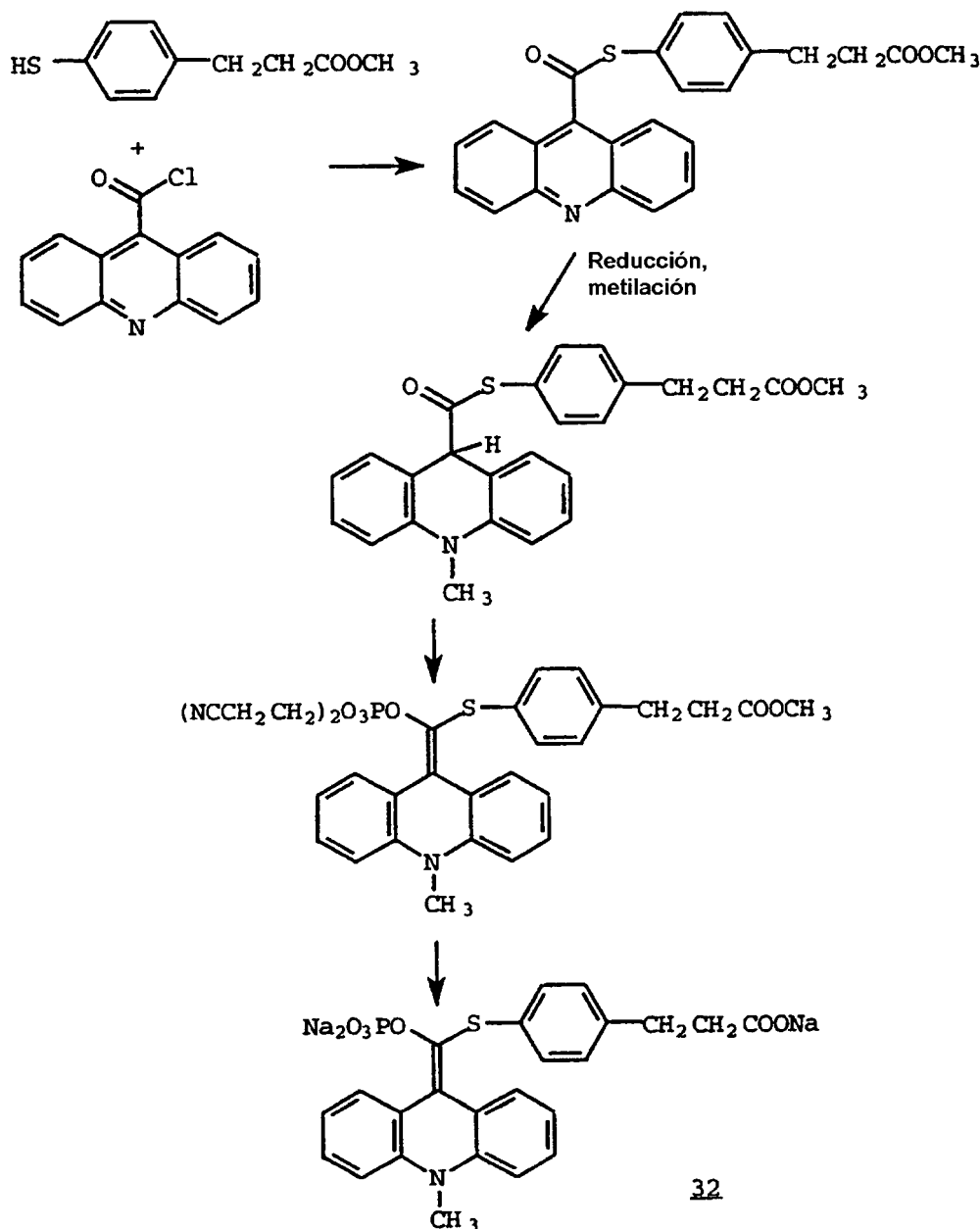
## 19. Síntesis del derivado 31 de acridano

- 30
- 35
- 40
- 45
- a) Se sililó el 10-metilacridan-9-carboxilato de p-hidroxifenilo (preparación descrita en el documento US nº 5.491.072) (1,1 g) con 0,46 ml de clorotrimetilsilano y 1,02 ml de trietilamino en THF en agitación durante la noche. Se filtró la mezcla y se evaporó a sequedad la solución.
- b) El compuesto éter silílico de la etapa a se convirtió en el enolato con LDA en THF a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Después de 30 min., se añadió gota a gota una solución de anhídrido acético (0,5 ml) en THF. Se mantuvo la reacción a  $-78^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. y se calentó a temperatura ambiente. Se eliminaron los volátiles y se cromatografió el residuo utilizando 5 a 10% de acetato de etilo/hexano. Se obtuvo una fracción que contenía el acetato de enol deseado junto con el éster de p-hidroxifenilo de partida.
- c) La mezcla de los productos de la etapa b (100 mg) se hizo reaccionar con cloruro de trifluoroetanosulfonilo (72 mg) y piridina (62 mg) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente durante 1 h. Se evaporó a sequedad la mezcla y se cromatografió utilizando 10 a 50% de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexano. Se separó el compuesto 31 (70 mg). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,09 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,95-4,03 (q, 2H), 6,85-7,58 (m, 12H).



## 20. Síntesis del derivado 32 de acridano

- a) Se convirtió el ácido 3-(p-hidroxifenil)propanoico en el ácido 3-(p-mercaptofenil)-propanoico adaptando el método de Tagawa (H. Tagawa, K. Ueno, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(5) 1384-93, 1978)). En resumen, se esterificó el ácido de partida con etanol, el grupo fenol se convirtió en xantato de dietilo, se reorganizó el xantato isomérico y se saponificó para generar el ácido mercapto-sustituido.
- b) El éster metílico de este ácido se condensó por su grupo -SH con cloruro del ácido acridin-9-carboxílico. El anillo de acridina se redujo con cinc/ $\text{CH}_3\text{COOH}$  al compuesto de acridano correspondiente que se metiló en nitrógeno con triflato de metilo.
- c) Se convirtió el tioéster en el bis(cianoetil)fosfato de eno. El enolato del tioéster, generado por reacción de 1 g del tioéster con LDA en THF a  $-78^\circ\text{C}$  se hizo reaccionar más con  $\text{POCl}_3$  (0,64 g) y piridina (1,9 g) en THF. Después de 1 hora a temperatura ambiente se añadió 3-hidroxipropionitrilo (1,14 ml) en 1 ml de piridina y se agitó la mezcla durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, se evaporó y se aplicó a una columna para purificación con acetato de etilo, proporcionando el bis(cianoetil)fosfato.
- d) La saponificación de los ésteres fosfato y carboxilato tuvo lugar en reacción en acetona/ $\text{NaOH}$  acuoso a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto 32 (100 mg). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2,33 (t, 2H), 2,70 (t, 2H), 3,34 (s, 3H), 6,89-7,34 (m, 10H), 7,70-7,80 (d, 1H), 8,18-8,19 (d, 1H).



## ES 2 283 111 T3

Otros numerosos compuestos del marcado con fosfato de acridano pueden prepararse derivados de los descritos en la solicitud PCT WO 97/26245 del solicitante y la solicitud US nº de serie 08/928.793 proporcionando un sustituyente de marcado.

### 5 21. Perfil cinético de la intensidad de quimioluminiscencia del fosfato de acridano 5

Un reactivo que contiene fosfato de acridano  $5,3,3 \times 10^{-4}$  M en tampón Tris 0,1 M, pH 8,8 (10  $\mu$ l) se mezcló con 50  $\mu$ l de peróxido de urea al 3,6% en HNO<sub>3</sub> 0,4 M y se incubó durante 2 min. Se activó la quimioluminiscencia inyectando 100  $\mu$ l de solución de NaOH 0,25 M. La producción de luz tuvo lugar instantáneamente en el momento del mezclado y se integró durante 5 s. En la Figura 1 se representa el transcurso del tiempo de la emisión de quimioluminiscencia.

### 22. Utilización de diferentes ácidos

En las Tablas 1 y 2 se ilustra la capacidad para utilizar varios compuestos ácidos en el método de generación de quimioluminiscencia a partir de acridano. Fosfato de acridano 5 (8 nM o 2  $\mu$ M) en tampón Tris 0,1 M, pH 8,8 (10  $\mu$ l) se mezcló con 50  $\mu$ l de peróxido de urea al 3,6% en soluciones 0,4 M de varios ácidos y se incubó durante 2 min. Se activó la quimioluminiscencia inyectando 10  $\mu$ l de solución de NaOH 0,25 M. Como se resume a continuación, cada ácido fue eficaz en el presente método para generar luz rápidamente. Los valores de intensidad de la luz están en unidades arbitrarias. La intensidad total se determinó durante un periodo de 10 s.

TABLA 1

*Activación de una solución 8 nM de fosfato de acridano 5*

Ácido	Intensidad pico	Intensidad total
HNO <sub>3</sub>	79	40
HCl	74	37
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	13

TABLA 2

*Activación de una solución 2  $\mu$ M de fosfato de acridano 5*

Ácido	Intensidad pico	Intensidad total
HNO <sub>3</sub>	2000	1090
HCl	8700 (aprox.)	4630
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	616	345

### 23. Activación con solución de peróxido/base

Se generó también quimioluminiscencia a partir de un compuesto de la presente invención utilizando una reacción de activación en la que el peróxido está en la solución básica. Se mezcló una solución 2  $\mu$ M de fosfato de acridano 5 en tampón Tris 0,1 M, pH 8,8 (10  $\mu$ l) con 50  $\mu$ l de ácido 0,4 M y se incubó durante 2 min. Se inició la quimioluminiscencia por adición de 100  $\mu$ l de peróxido de urea al 3,6% en solución 0,25 M de NaOH. Como se resume a continuación, cada uno de los ácidos fue eficaz en el presente método. Se midió la intensidad total durante 10 s.

TABLA 3

Ácido	Intensidad pico	Intensidad total
HNO <sub>3</sub>	8500	5000
HCl	2640	1700
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	100

## ES 2 283 111 T3

### 24. Efecto del tiempo de incubación del ácido

Las soluciones de fosfato de acridano 5 ( $1 \mu\text{M}$  en  $\text{HCl}$   $0,4 \text{ M}$ ) se trataron tal como se describe en el Ejemplo 22, variando la longitud de la etapa de incubación con ácido/peróxido.

TABLA 4

Tiempo de incubación	Intensidad pico	Intensidad total
1 min	5777	3070
2	5501	3290
5	4788	3900
10	5379	4110

### 25. Sensibilidad de la detección del derivado 5 de acridano

Cada una de las soluciones de fosfato de acridano 5 ( $10 \mu\text{l}$ ) que contenían entre  $10^{-11}$  y  $10^{-17}$  moles se añadieron a  $50 \mu\text{l}$  de peróxido de urea al 3,6% en  $\text{HCl}$   $0,4 \text{ M}$  y se incubaron durante 2 min a  $25^\circ\text{C}$ . Se inició la quimioluminiscencia añadiendo  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$   $0,25 \text{ M}$  a cada una de estas soluciones. Se midieron la intensidad en el pico y de luz total mediante determinaciones individuales. Los niveles de luz de fondo fueron  $0,038$  (pico) y  $0,019$  (total) en estas condiciones. Los datos se presentan en las Tablas 5 y en la Figura 2.

TABLA 5

Moles de 5	Intensidad pico	Intensidad total
$10^{-11}$	7010	3990
$10^{-12}$	555	380
$10^{-13}$	60	31,5
$10^{-14}$	6,6	3,10
$10^{-15}$	1,96	1,28
$10^{-16}$	0,90	0,72
$10^{-17}$	0,56	0,50

### 26. Detección de varios compuestos a título de ejemplo

Se preparó cada uno de los compuestos de la Tabla 6 como solución madre  $0,5 \mu\text{M}$ . Diez  $\mu\text{l}$  de alícuotas se añadieron por separado a  $50 \mu\text{l}$  de peróxido de urea al 3,6% en  $\text{HCl}$   $0,4 \text{ M}$  y se incubaron durante 2 min. a  $25^\circ\text{C}$ . Se activó la quimioluminiscencia mediante adición de  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$   $0,25 \text{ M}$ . Se midió la quimioluminiscencia durante 10 s. Se produjeron niveles significativos con cada uno de estos compuestos. Los compuestos 2-4, 6-13, 18-19 y 21-32 también produjeron quimioluminiscencia cuando se activaron en las condiciones de este ejemplo así como de los Ejemplos 22 y 23.

TABLA 6

Compuesto	Intensidad pico	Intensidad total
1	687	1640
5	2346	2000
5a	3586	2710
14	229	707
15	2475	1700
16	769	1560
17	8331	5520
20	632	447

### 27. Conjugación del compuesto marcador con la proteína

Se redujo la albúmina de suero bovino (BSA) (Fluka) utilizando el kit Reduce-Imm™ (Pierce, Rockford, IL) para liberar los grupos sulfhidrilo libres según las instrucciones del fabricante. Una fracción que contenía  $270 \mu\text{g}$  de BSA en  $200 \mu\text{l}$  de tampón de equilibrado n° 2 del kit Reduce-Imm se incubó con  $50 \mu\text{l}$  de una solución del compuesto

## ES 2 283 111 T3

25 en metanol durante la noche a temperatura ambiente. La solución se pasó a través de una columna Sephadex G-25 con fosfato 0,01 M, pH 7,5. Se analizaron las fracciones espectrométricamente a 280 nm y por un análisis de quimioluminiscencia utilizando peróxido de urea y HNO<sub>3</sub> seguido de NaOH como se describió anteriormente. Las fracciones que contienen marcador y proteína se mezclaron. El producto se denominó BSA-APNa<sub>2</sub>.

5

### 28. Conjugación de BSA con el derivado 26 de acridano

Se realizó el marcado de BSA reducida con el compuesto 26 por el método del ejemplo anterior utilizando DMF en lugar de metanol. La BSA se marcó de este modo con un compuesto bis(cianoetil)fosfato acridano. El producto se denomina BSA-APCN<sub>2</sub>.

10

### 29. Detección de la BSA quimioluminiscente marcada

Se analizó el contenido de proteína en las muestras de BSA-APNa<sub>2</sub> y BSA-APCN<sub>2</sub> según el método descrito en (Warburg y Christian, B. Z., 310, 384 (1941)). Se diluyeron soluciones madre en tampón Laemmli (U. K. Laemmli, *Nature* (Londres), 227, 680 (1970)) y se cargaron geles de acrilamida al 7%-bisacrilamida. Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE a 120-130 V durante 1 a 1,5 h a temperatura ambiente. Se eliminaron los geles y se colocaron en un marco de plástico construido con el borde lateral de una placa de Petri y una película transparente. Las proteínas marcadas en el gel fueron detectadas por un análisis de quimioluminiscencia sencillo. El soporte del gel se colocó en la parte superior de una hoja de película de rayos X bajo luces de seguridad. Una solución de peróxido de urea (3,6%) en HNO<sub>3</sub> 0,4 M se colocó en capas sobre el gel en el soporte y se dejó reposar durante 20 min. La solución se aspiró del soporte y se añadieron 15 ml de NaOH 0,25 M para iniciar la emisión de luz, se expuso a la película de rayos X durante 15 min. Las Figuras 3A y 3B muestran la detección de las proteínas marcadas BSA-APNa<sub>2</sub> y BSA-APCN<sub>2</sub>, respectivamente directamente en el gel. La emisión de luz aumentó durante un periodo de varios segundos, alcanzó un máximo y disminuyó durante varios minutos.

25

### 30. Sensibilidad de la detección de proteínas marcadas

Las soluciones de las proteínas marcadas BSA-APNa<sub>2</sub> y BSA-APCN<sub>2</sub> que contienen entre 10<sup>-11</sup> y 10<sup>-17</sup> moles de proteína marcada se prepararon en tampón tris 0,1 M, pH 8,8. Se añadieron alícuotas de diez μl cada una a 50 μl de peróxido de urea al 3,6% en HCl 0,4 M y se incubaron durante 2 min. a 25°C.

30

Se inició la quimioluminiscencia añadiendo 100 μl de NaOH 0,25 M a cada una de estas soluciones. Se midieron los valores de intensidad de luz total por determinaciones individuales. Los niveles de luz de fondo fueron de 0,017 tanto para BSA-APCN<sub>2</sub> como para BSA-APNa<sub>2</sub> en estas condiciones.

35

TABLA 7

	BSA-APCN <sub>2</sub>		BSA-APNa <sub>2</sub>	
	Moles de proteína	I total	Moles de proteína	I total
	6,5 × 10 <sup>-11</sup>	9720	2,4 × 10 <sup>-11</sup>	9230
	6,5 × 10 <sup>-12</sup>	1930	4,8 × 10 <sup>-12</sup>	1730
45	6,5 × 10 <sup>-13</sup>	93,1	4,8 × 10 <sup>-13</sup>	101
	6,5 × 10 <sup>-14</sup>	9,68	4,8 × 10 <sup>-14</sup>	7,62
	6,5 × 10 <sup>-15</sup>	1,86	4,8 × 10 <sup>-15</sup>	0,81
	6,5 × 10 <sup>-16</sup>	1,55	4,8 × 10 <sup>-16</sup>	0,18
50	6,5 × 10 <sup>-17</sup>	0,14	4,8 × 10 <sup>-17</sup>	0,11

La siguiente descripción y ejemplos únicamente a título ilustrativo y no limitativo. El alcance de la invención únicamente está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

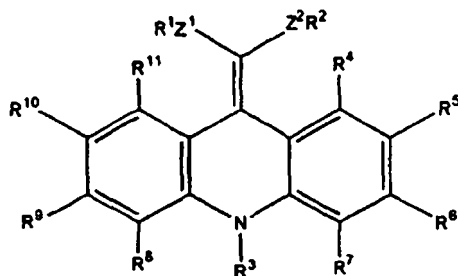
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto quimioluminiscente de fórmula I:



5

10

15

20 en la que

$Z^1$  y  $Z^2$  se seleccionan independientemente de entre O, S y  $NR^{12}$ ,  $R^{12}$  se selecciona de entre los grupos alquilo, arilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo;

25

30

$R^1$  es un grupo que contiene de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno que es eliminable mediante un ácido y se selecciona de entre los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, los grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri(alquilo  $C_1-C_8$ ) sililo, un grupo  $SO_3^-$ , grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula  $PO(OR')$  ( $OR'$ ) en la que  $R'$  y  $R''$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, los grupos alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos trialquilsililo, cationes de metales alcalino, cationes alcalinotérreos, cationes amonio y fosfonio;

35

40

$R^2$  y  $R^3$  son grupos orgánicos que contienen de 1 a 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno en los que  $R^2$  se selecciona de entre grupos alquilo sustituidos o insustituidos, arilo sustituido o insustituido, aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20 átomos de carbono, grupos alquilo o aril carbonilo sustituidos o insustituidos que presentan de 1 a 20 átomos de carbono, grupos tri( $C_1-C_8$  alquil)silil, un grupo  $SO_3^-$ , grupos glucosilo y grupos fosforilo de fórmula  $PO(OR')$  ( $OR''$ ) en la que  $R'$  y  $R''$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, grupos átomos de carbono de alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido y aralquilo sustituido o insustituido de 1 a 20, grupos trialquilsililo, cationes de metal alcalino, cationes alcalinotérreos, cationes de amonio y fosfonio, y  $R^3$  se selecciona de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, los grupos alcoxialquilo, carboxialquilo y ácido alquilsulfónico; y

45

$R^4$  a  $R^{11}$  se seleccionan independientemente de entre hidrógeno y sustituyentes que no interfieren con la generación de quimioluminiscencia y contienen de 1 a 50 átomos seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno y comprenden grupos sustituyentes seleccionados de entre grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alqueno, alquino, alcoxilo, ariloxilo, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboxilo, carboxamida, ciano y sulfonato;

50

55

en la que uno de entre  $R^1$  a  $R^{11}$  está sustituido con el sustituyente de marcado de fórmula  $-L-RG$  en la que L es un grupo de enlace seleccionado de entre un enlace, un átomo, o una cadena lineal o ramificada de átomos algunos de los cuales pueden formar parte de una estructura en anillo en la que los átomos que comprenden la cadena se seleccionan de entre átomos de C, O, N, S, P, Si, B y Se y los grupos funcionales que comprenden el sustituyente de enlace comprenden alqueno, arileno, alqueno, éter, peróxido, carbonilo como un grupo cetona, éster, éster carbonato, tioéster o amida, grupos amina, amidina, carbamato, urea, imina, imida, imidato, carbodiimida, hidrazina, diazo, fostodiéster, fosfotriéster, éster de fosfonato, tioéter, disulfuro, sulfóxido, sulfona, éster de sulfonato, éster de sulfato y tiourea y RG es un grupo reactivo seleccionado de entre

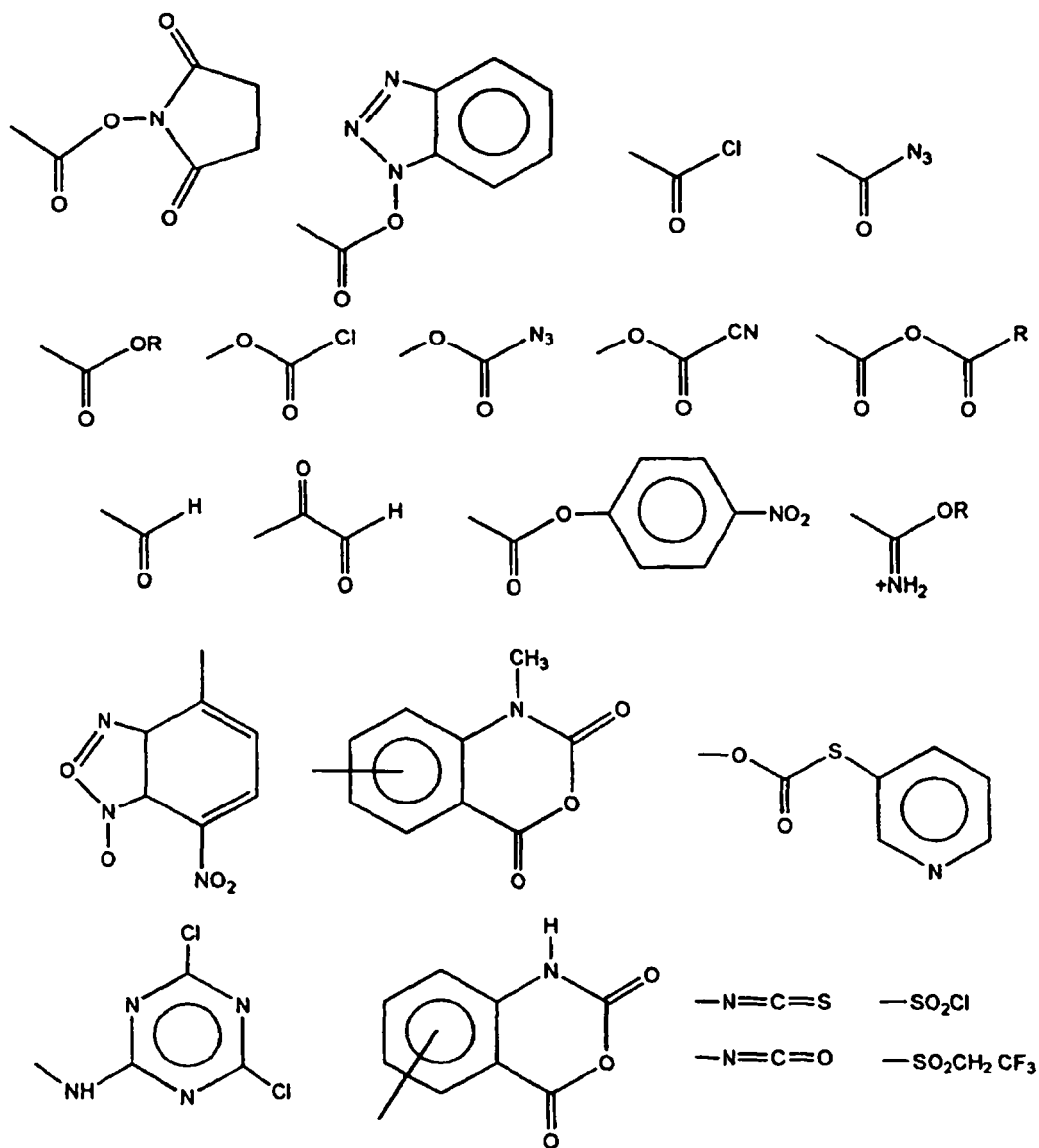
60

65

ES 2 283 111 T3

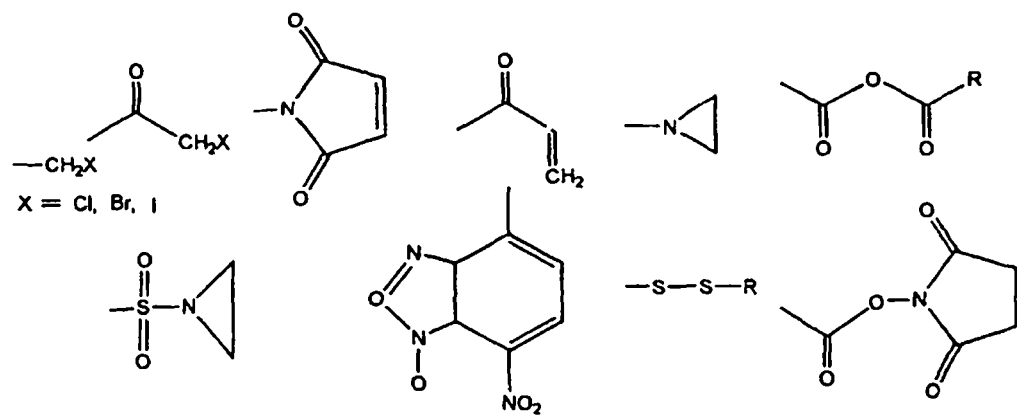
a) grupos amínicos reactivos:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45



b) grupos reactivos de tiol:

50  
55  
60  
65



# ES 2 283 111 T3

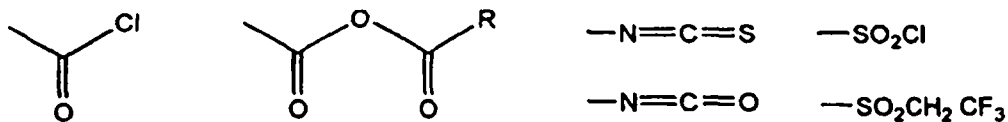
c) grupos reactivos de ácido carboxílico:



5

y d) grupos reactivos de hidroxilo:

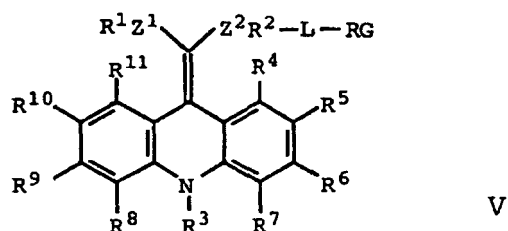
10



15

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto presenta la fórmula V:

20



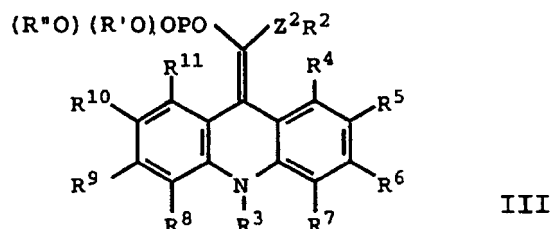
25

en la que R<sup>2</sup> es un grupo orgánico que contiene de 1 a 50 átomos distintos de hidrógeno.

30

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que los grupos Z<sup>1</sup> y R<sup>1</sup> se combinan para formar un grupo fosfato OPO(OR') (OR''), R' y R'' se seleccionan independientemente de entre grupos alquilo, grupos alquilo sustituidos e iones de metales alcalinos y el compuesto presenta la fórmula III:

35



40

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R' y R'' son cada uno un grupo 2-cianoetilo.

45

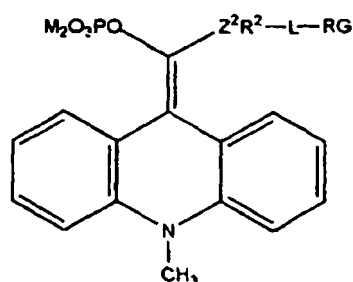
5. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R' y R'' son cada uno iones de metales alcalinos.

6. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Z<sup>2</sup> es O o S y R<sup>2</sup> se selecciona de entre los grupos fenilo y fenilo sustituido.

50

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que los grupos R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> son hidrógeno, R<sup>3</sup> es metilo, Z<sup>1</sup> y R<sup>1</sup> se combinan para formar un grupo fosfato -OPO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, y cada M es un ión de metal alcalino y el compuesto presenta la fórmula

55

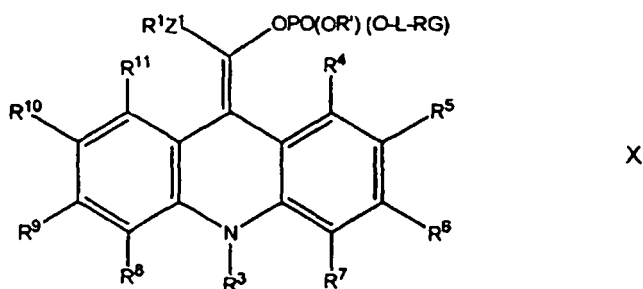


60

65

## ES 2 283 111 T3

8. Compuesto según la reivindicación 2, en el que los grupos  $Z^2$  y  $R^2$ -L-RG se combinan para formar un grupo fosfato  $OPO(OR')(O-L-RG)$ ,  $R'$  se selecciona independientemente de entre los grupos alquilo, grupos alquilo sustituidos, hidrógeno e iones de metales alcalinos y el compuesto presenta la fórmula X:



9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que  $Z^1$  es S y  $R^1$  es fenilo.

20 10. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el grupo reactivo RG se selecciona de entre OH,  $NH_2$ , COOH,  $SO_2CH_2CF_3$ , éster de N-hidroxisuccinimida y grupos maleimida.

25 11. Compuesto quimioluminiscente marcado que comprende un conjugado de un compuesto que ha de ser detectado y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el compuesto detectado es un analito o un miembro del Par de unión específico en el que el analito o el miembro del Par de unión específico está conjugado mediante el grupo RG del compuesto quimioluminiscente.

30 12. Compuesto quimioluminiscente marcado según la reivindicación 11, en el que el compuesto que ha de ser detectado es un analito y se selecciona de entre fármacos, hormonas, plaguicidas, metabolitos de plaguicidas, ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos y antígenos.

35 13. Compuesto quimioluminiscente marcado según la reivindicación 11, en el que el compuesto que ha de ser detectado es un compañero de unión específico y se selecciona de entre antígenos, anticuerpos, haptenos, oligonucleótidos, polinucleótidos, avidina, estreptavidina, hormonas, receptores, lectinas, carbohidratos, IgG, proteína A y proteína que se unen a ácidos nucleicos.

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

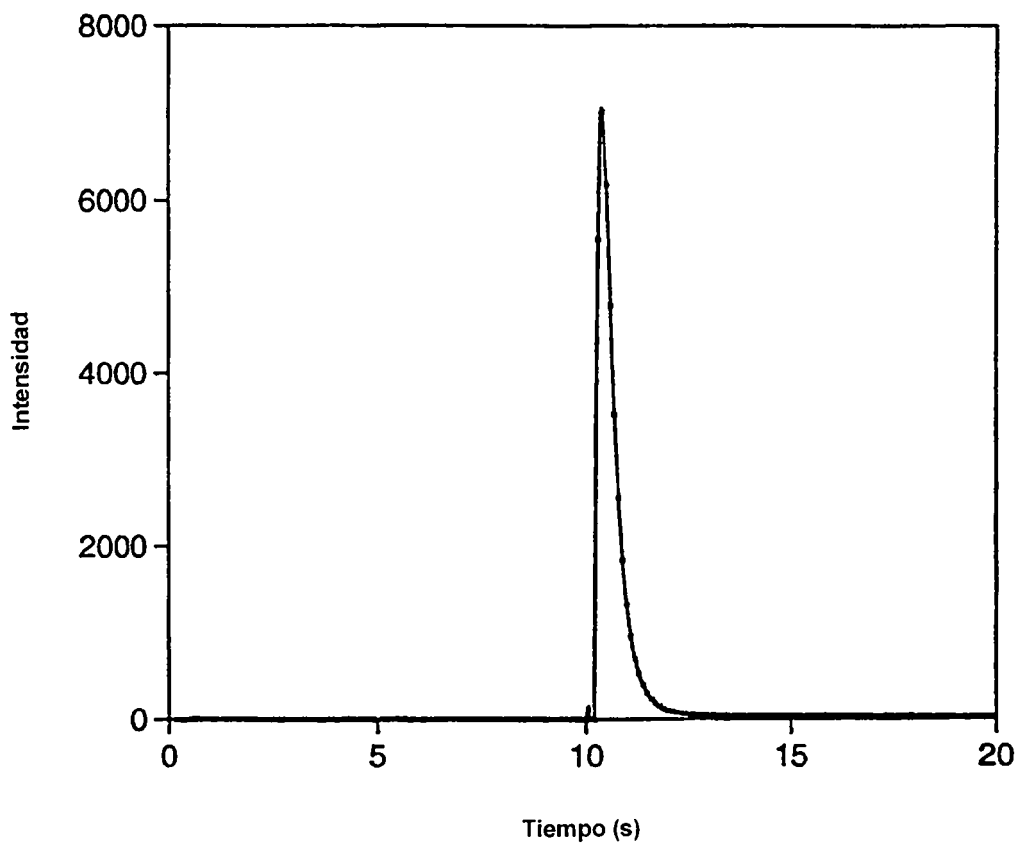


Fig. 2

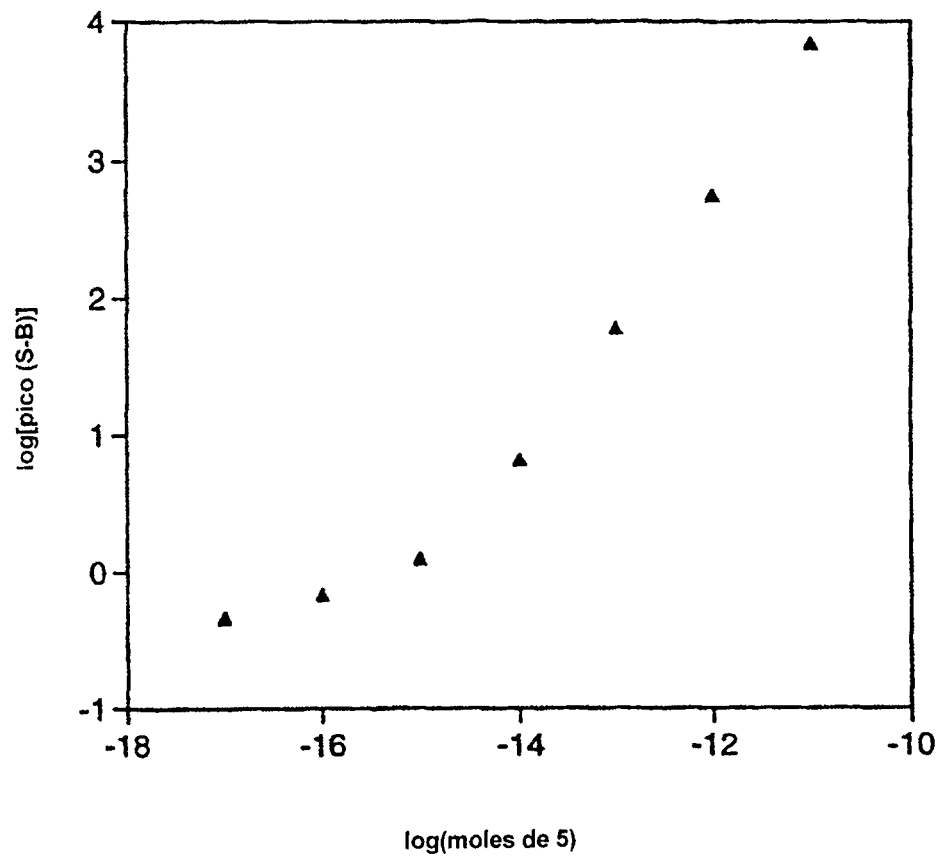
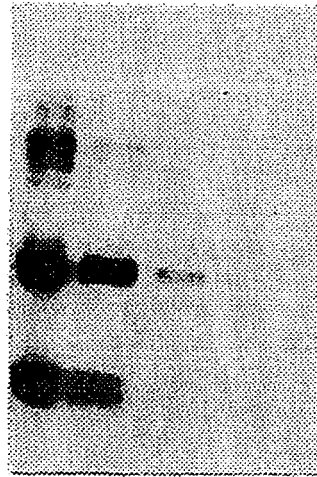
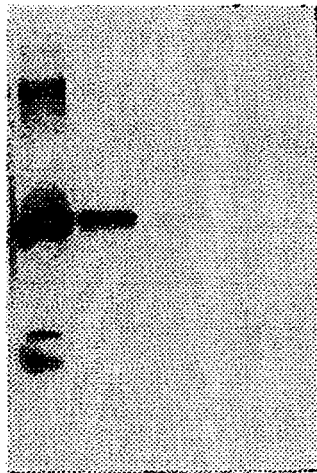


FIG. 3A



650 130 26 5,2 1,0 ng de PROTEÍNA

FIG. 3B



880 176 35 7,0 1,4 ng de PROTEÍNA