Octrooiraad

(12)A **Terinzagelegging** (11) **8703075**

Nederland (19) NL

(54) **Acridiniumverbindingen als chemiluminescentie-merkstof.**

(51) Int.Cl⁴.: C07D 219/00, C09K 11/06, G01N 33/532.

(71) Aanvrager: De Staat der Nederlanden, vertegenwoordigd door de Minister van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur te Leidschendam.

(74) Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.
Nederlandsch Octrooibureau
Scheveningseweg 82
2517 KZ 's-Gravenhage..

(21) Aanvrage Nr. 8703075.

(22) Ingediend 18 december 1987.

(32) - -

(33) - -

(31) - -

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 17 juli 1989.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Acridiniumverbindingen als chemiluminescentie-merkstof

De uitvinding heeft betrekking op acridiniumverbindingen die geschikt zijn als chemiluminescentie-merkstof.

Uit de Europese aanvrage 82.636 zijn chemiluminescerende acridiniumverbindingen met formule 2 bekend die een in de substituent R^4 aanwezige functionele groep bezitten, welke een koppeling met biologisch interessante stoffen kan aangaan.

Chemiluminescentie is het verschijnsel waarbij elektromagnetische straling (licht) wordt uitgezonden als gevolg van een chemische reactie. Gewoonlijk is daarbij sprake van een reactieprodukt dat, in verband met de aard van de reactie, ontstaat in een elektronisch aangeslagen toestand. Dit aangeslagen reactieprodukt kan in de "normale" toestand, de grondtoestand, terechtkomen door zijn energieoverschot af te geven in de vorm van elektromagnetische straling. Bij acridiniumverbindingen zoals die volgens de genoemde Europese octrooiaanvrage 82.636 (zie ook Clin. Chem. 29 (8), 1474-1479 (1983)) treedt de chemiluminescentie op door reactie met basisch waterstofperoxide zoals voor de verbinding 2 is weergegeven in het schema van figuur 1.

Chemiluminescerende stoffen kunnen, net als stoffen met een radioactieve isotoop, als merkstof worden gebruikt om stoffen waarmee zij zich op een of andere wijze binden aan te tonen. De voordelen van chemiluminescerende boven radioactieve merkstoffen zijn onder meer het geringere gevaar, de grotere gevoeligheid en de langere levensduur.

Het gebruik van dergelijke merkstoffen is vooral van belang in biologische systemen. Aldus kunnen bijvoorbeeld eiwitten, koolhydraten en andere biologisch relevante stoffen worden bepaald, maar ook kunnen de biologische reacties van dergelijke stoffen met daarvoor in aanmerking komende reactiepartners worden gevolgd. Voorbeelden zijn de wisselwerking tussen een geneesmiddel en een receptor, tussen een gifstof en een receptor of tegengif en, in het bijzonder, de immuun-reactie tussen een antigeen en een antilichaam.

Een bijzondere bepalingsvorm waarin van de chemiluminescentiereactie gebruik wordt gemaakt is die waarbij de energie van het aangeslagen reactieprodukt (de donor) niet direct als licht wordt uitgestraald, maar stralingsloos wordt overgedragen op een daartoe geschikte acceptor, veelal een fluorescerende stof. Deze acceptor kan de opgenomen energie vervolgens weer afstaan in de vorm van elektromagnetische straling waarvan de golflengte verschilt van de golflengte van de chemiluminescentie van de donor. Dit verschijnsel is o.a. beschreven door

T. Förster (Ann. Phys. (Leipzig) 2, 55-75 (1948) en Z. Naturforsch. 4a, 321-334 (1949)). Doordat de golflengte van het uitgezonden licht specifiek is voor de acceptor of voor het donor-acceptorcomplex, kan de acceptor, die bijvoorbeeld een met een fluorescerende stof gemerkt antilichaam kan zijn, dan wel het met de donor gekoppelde substraat (b.v. een antigen) worden bepaald zonder dat afscheiding van de complexen noodzakelijk is. Deze z.g. homogene bepaling door middel van chemiluminescentie-energieoverdracht is beschreven met isoluminol-derivaten als merkstof, zie A. Patel en A.K. Campbell, Clin. Chem. 29(9), 1604-1608 (1983). Luminol en isoluminol en derivaten daarvan hebben echter als nadeel een betrekkelijke lage kwantumopbrengst; bovendien is voor het starten van de chemiluminescentie van deze stoffen een katalysator nodig.

Een nadeel van de uit de Europese octrooiaanvrage 82.836 bekende acridiniumverbindingen is dat deze niet bruikbaar blijken voor homogene immuunbepalingen gebaseerd op chemiluminescentie en energieoverdracht. Gevonden is nu een groep verbindingen die chemiluminescerend zijn en geschikt zijn als merkstof zowel voor heterogene als voor homogene biologische bepalingen zoals immuunbepalingen.

De acridiniumverbindingen volgens de uitvinding worden gekenmerkt doordat de verbindingen voldoen aan formule 1,
waarin A een tweewaardige organische rest is,
X een groep is die met waterstofperoxide samen met C-9 van het acridine in een dioxetaan kan worden omgezet,
Y een tegenion is, en
Z een functionele groep is,
en waarvan de benzeenringen een of meer substituenten kunnen dragen.

De verbindingen volgens de uitvinding hebben enerzijds een chemiluminescentie-functie, d.w.z. dat zij door een chemische reactie worden omgezet in een elektronisch aangeslagen produkt, dat vervolgens zijn energieoverschot in de vorm van licht uitzendt. Deze functie is aanwezig op C-9 van het acridine. Anderzijds bezitten zij een koppelingsfunctie, d.w.z. dat zij via een organische rest een functionele groep bezitten die bijvoorbeeld met biologisch actieve stoffen zoals eiwitten e.d., maar ook met bijvoorbeeld toxicologisch relevante stoffen een koppeling tot stand kan brengen. De koppelingsfunctie heeft als aanhechtingsplaats het stikstofatoom van de acridiniumeenheid. Door deze tweeledige functie zijn de verbindingen geschikt als merkstof, bijvoorbeeld voor immuunbepalingen, waarbij zij door specifieke koppeling met de te bepalen stof of met een reagens voor de te bepalen stof de aanwe-

zigheid van het koppelingsprodukt of van de wisselwerking met het reagens door de chemiluminescentie aantonen.

Het voordeel van de acridiniumverbindingen volgens de uitvinding is dat bij chemische reactie die tot luminescentie leidt, d.w.z. de reactie met waterstofperoxide via een dioxetaan tot een aangeslagen 9-acridon, de koppeling met te bepalen stof in stand blijft. Hierdoor kan de energie van het aangeslagen produkt desgewenst worden overgedragen op een elders in het koppelingsprodukt of in het complex daarvan aanwezige acceptor zoals fluoresceïne of lucifer-yellow. De energie-overdracht is hierbij efficiënter dan bij chemiluminescentie-donoren van het isoluminol-type, en verder is daarbij geen katalysator nodig.

Een verder voordeel van de verbindingen volgens de uitvinding is dat het verloop van de chemiluminescentie van het koppelingsprodukt (een met de acridiniumverbinding gemerkte, bijvoorbeeld biologisch werkzame, stof, zoals een steroïde) afhankelijk is van de aanwezigheid van een met de gemerkte stof reagerende stof zoals een antistof of een antiserum. Bij dergelijke immuunreacties is het verloop van de luminescentie van het immuuncomplex in de tijd verschillend van het verloop van de luminescentie van de niet gecomplexeerde gemerkte stof, hetgeen tot uiting kan komen in een verschuiving van het tijdstip van maximale emissie. Hierdoor behoeven de immuuncomplexen niet te worden gescheiden om te kunnen worden gemeten en is er dus ook sprake van een homogene immuunbepaling.

De tweewaardige organische rest A dient als zogenaamde "spacer", die de afstand tussen de acridiniumrest en de functionele groep van het substraat waarmee de groep Z moet reageren overbrugt. De lengte van groep A is zodanig dat reactie van de functionele groep Z met een functionele groep van het substraat mogelijk is. Deze minimale lengte is dus afhankelijk van het substraat waarmee de verbinding met formule 1 moet worden gekoppeld. De aard van groep A is niet belangrijk, zolang deze groep de reactiviteit van functionele groep Z of de gewenste reactie van groep X met waterstofperoxide niet stoort. De rest A kan alkyleengroepen, aryleengroepen, carbonylgroepen, heteroatomen, zoals stikstof, zuurstof en zwavel, e.d. bevatten, bijvoorbeeld gecombineerd tot estergroepen, thioestergroepen, amidegroepen e.d.. De rest A kan ook zijn opgebouwd uit bifunctionele eenheden zoals dicarbonzuren, thiolen, hydroxyzuren, aminozuren, thiolzuur enz..

Hoewel groep A dus elke niet-storende tweewaardige organische rest kan zijn, kiest men om complicaties bij de synthese van de verbindingen met de formule 1 te vermijden, bij voorkeur een eenvoudige rest zoals

een, eventueel door een of meer heteroatomen en/of carbonylgroepen onderbroken, tweewaardige koolwaterstofrest. In het bijzonder is A een alkyleengroep met 1-4 koolstofatomen.

De X kan elke groep zijn die met waterstofperoxide een 1,2-dioxetaan vormt. Dit dioxetaan omvat naast de twee van waterstofperoxide afkomstige zuurstofatomen nog het C-9 atoom van het acridine. De groep X moet daarom een koolstofatoom zijn dat is gesubstitueerd met een groep die bij een reactie van waterstofperoxide bijvoorbeeld als negatief ion kan vertrekken, zoals een halogeenatoom, een alkoxy-, aryloxy- of alkylthiogroep, of een ammonium- of sulfoniumgroep. Als groep X kunnen worden genoemd 1-halogeenalkyl, 1-alkoxyalkyl e.d. en halogeenformyl, alkoxycarbonyl, alkylthiocarbonyl, aryloxycarbonyl e.d.; bij voorkeur is groep X een alkoxycarbonylgroep of in het bijzonder een aryloxycarbonylgroep.

Het anion Y kan elk anion zijn zoals halogenide, sulfaat, areensulfonaat e.d.; bijvoorbeeld kan Y het ion zijn dat bij de quaternisering van het acridine-stikstofatoom als vertrekkende groep optreedt.

De groep Z is een functionele groep die met een organisch substraat een koppeling kan aangaan. Z kan worden gekozen afhankelijk van de in het substraat aanwezige functionele groepen. Zijn in het substraat bijvoorbeeld aminogroepen, hydroxygroepen of mercaptogroepen aanwezig, dan kan Z een carboxylgroep of reactief derivaat daarvan, zoals een ester, zuurchloride e.d. zijn. De koppeling wordt dan tot stand gebracht in de vorm van een (thio)ester- of (thio)amide-binding. Een geschikte groep, die ook volgens de Europese octrooiaanvrage 82.636 wordt gebruikt, is de N-succinimidyloxycarbonylgroep. Z kan ook een isocyanaat of isothiocyanaat zijn; de koppeling heeft dan de vorm van een ureumbinding of urethaan, danwel van een mono- of dithioanaloog daarvan. Andere mogelijke groepen Z die met amino-, hydroxy- en/of mercaptogroepen kunnen reageren zijn halogeenatomen, eventueel op de β-plaats geactiveerd door een carbonyl- of alkeenfunctie, sulfonzuurderivaten en fosforzuurderivaten, aziden en eventueel geprotoneerde carboximidaten.

Wanneer het substraat beschikt over carboxylgroepen of derivaten daarvan zoals esters, kan de groep Z bijvoorbeeld een aminofunctie zijn.

De voorkeur hebben acridiniumverbindingen met formule 1 waarin Z een carboxylgroep of een daarvan afgeleide reactieve groep is.

De verbindingen volgens de uitvinding kunnen op op zichzelf bekende wijze worden bereid. Uitgegaan kan worden van acridine of van een

reeds op de 9-plaats op geschikte wijze gesubstitueerd acridine, zoals 9-acridinecarbonzuur of een derivaat daarvan, 9-halogeenmethyl, 9-alkoxymethyl- of 9-aryloxymethyl-acridine. Het 9-acridinecarbonzuur kan dan worden omgezet in een geschikte ester of in een ander derivaat dat met waterstofperoxide een dioxetaan kan opleveren. Een dergelijk 9-gesubstitueerd acridine kan vervolgens worden omgezet door quaternisering van de stikstof op positie 10, waarna de keten A kan worden opgebouwd en tenslotte een eenheid die groep Z draagt kan worden ingevoerd. In het bijzonder kan het acridine-stikstofatoom direkt worden gequarterniseerd met de groep A-Z waarbij acridine wordt omgezet met een verbinding Y'-A-Z, waarin Y' een reactieve groep is zoals een halogeenatoom of een andere vertrekkende groep. Het kan gewenst zijn de functionele groep Z tijdens de synthese te beschermen om ongewenste reacties te vermijden. Bescherming van groep Z kan op bekende wijze geschieden; indien Z een carboxylgroep is kan deze bijvoorbeeld worden beschermd in de vorm van een ester zoals een t-butyl-, benzyl-, succinimidylester enz..

De acridiniumverbindingen volgens de uitvinding geven bij reactie met waterstofperoxide aanleiding tot chemilumilescentie volgens het schema van figuur 2.

De groep X is in figuur 2 weergegeven als de groep CR_2L waarin de groepen R bijvoorbeeld ieder een waterstofatoom of een alkylgroep zijn of samen een oxogroep vormen en L een groep is die bijvoorbeeld als negatief ion kan vertrekken zoals een halogeenatoom, een aryloxygroep of een ammoniumgroep e.d.. Bij reactie met waterstofperoxide en base wordt acridiniumverbinding 1' onder uitstoting van de groep L omgezet in het spirodioxetaan met formule 4. Dit dioxetaan of dioxetanon splitst een molecuul $CR_2=O$ af waarbij het acridon met formule 5 in aangeslagen toestand ontstaat dat door uitzending van licht de grondtoestand bereikt. De chemiluminescentie kan met bekende instrumenten worden gemeten, bijvoorbeeld met een LUMAC Biocounter 2010.

De verbindingen met de formule 1 chemiluminesceren na reactie met waterstofperoxide in het algemeen met een golflengte van 420 nm. De verbinding waarin de groep X (= CR_2L) de betekenis van een fenoxycarbonylgroep en de groep A-Z die van een carboxymethylgroep heeft, zendt na reactie met waterstofperoxide licht uit met een golflengte van 420 nm. De detectiegrens van deze laatste verbinding is lager dan 8 fg ($=8.10^{-15}$ g) wat overeenkomt met ca. 16 amol ($= 1{,}6 \times 10^{-17}$ mol). De chemiluminescentie kan zoals bekend analytisch worden toegepast. Wanneer de verbinding 1 als merkstof wordt

gekoppeld aan een substraat en dit koppelingsprodukt wordt gescheiden van niet-gekoppelde acridiniumverbinding, is de intensiteit van de bij waterstofperoxide-reactie uitgezonden straling een maat voor de concentratie van het koppelingsprodukt, welke concentratie kan worden gerelateerd aan de hoeveelheid substraat.

De uitvinding heeft ook betrekking op de toepassing van acridiniumverbindingen met formule 1 voor immuunbepalingen door middel van chemiluminescentie.

Hierbij wordt de chemiluminescerende verbinding 1 gebonden aan een bij een immuunreactie betrokken stof, bijvoorbeeld een antigeen. Het aldus gemerkte antigeen levert dan bij complexering of andere wisselwerking met een eveneens bij de immuunreactie betrokken stof, bijvoorbeeld een antilichaam, een gemerkt complex op dat (na scheiding van niet-gecomplexeerd antigeen) door middel van de chemiluminescentie-reactie kwalitatief, en desgewenst kwantitatief, kan worden bepaald.

De uitvinding heeft tevens betrekking op de toepassing van acridiniumverbindingen met formule 1 voor immuunbepalingen door middel van chemiluminescentie en energieoverdracht.

Hierbij wordt bijvoorbeeld het antilichaam gekoppeld met een energieacceptor, zoals een fluorescerende stof, waarna het antigeen-antilichaamcomplex door chemiluminescentie en energieoverdracht kan worden bepaald, zonder dat scheiding van het niet-gecomplexeerde antigeen nodig is. De verbindingen volgens de uitvinding zijn voor deze bepalingsmethode zeer geschikt doordat energieoverdracht van het acridiniumgedeelte naar een acceptor zeer efficiënt is en tijdens de chemiluminescentie-reactie geen dissociatie optreedt tussen de donor (de acridineverbinding) en de acceptor.

De uitvinding heeft verder betrekking op verbindingen met formule 1, gekoppeld aan een bij immuunreacties betrokken stof.

Ook omvat de uitvinding de toepassing van de hierboven bedoelde koppelingsprodukten van de acridineverbindingen met formule 1 met een bij immuunreacties betrokken stof, voor bepalingen van immuunreacties en immuunstoffen door middel van chemiluminescentie al of niet in combinatie met energieoverdracht.

Voorbeelden

Voorbeeld I

Bereiding van fenyl-9-acridinecarboxylaat

Acridine-9-carbonzuur (5 g) wordt gesuspendeerd in thionylchloride (75 ml). Onder terugvloeikoeling wordt het mengsel verwarmd en geroerd gedurende vier uur. De overmaat thionylchloride wordt afgedestilleerd.

Het residu wordt gesuspendeerd in pyridine (75 ml) en het mengsel geroerd bij kamertemperatuur gedurende tien minuten. Fenol (4,5 g) wordt aan de suspensie toegevoegd. Het resulterende reactiemengsel wordt geroerd bij kamertemperatuur gedurende zestien uur. De ontstane oplossing wordt uitgegoten in 1 normaal zoutzout 1 normaal zoutzuur (200 ml). Het gevormde neerslag (6,5 g) wordt afgefiltreerd en herkristalliseerd uit benzeen/cyclohexaan.

Voorbeeld II

Bereiding van 4-methoxyfenyl-9-acridinecarboxylaat

Deze verbinding wordt overeenkomstig voorbeeld I bereid door toepassing van 4-methoxyfenol in plaats van fenol.

Voorbeeld III

Bereiding van 4-chloorfenyl-9-acridinecarboxylaat

Deze verbinding wordt overeenkomstig voorbeeld I bereid door toepassing van 4-chloorfenol in plaats van fenol.

Voorbeeld IV

Bereiding van 4-acetylfenyl-9-acridinecarboxylaat

Deze verbinding wordt overeenkomstig voorbeeld I bereid door toepassing van 4-hydroxyacetofenon in plaats van fenol.

Voorbeeld V

Bereiding van t-butyljoodacetaat

Een mengsel van t-butylchlooracetaat (20 g) en natriumjodide (25 g) wordt geroerd in aceton (200 ml) gedurende 20 uur. De aceton wordt verwijderd door destillatie onder verlaagde druk. Het residu wordt opgenomen in diethylether (100 ml) en water (50 ml). De etherlaag wordt afgescheiden, gewassen met water, 5% natriumthiosulfaat en water. De organische laag wordt gedroogd op natriumsulfaat en ingedampt onder verlaagde druk. Er wordt 25 gram t-butyljoodacetaat verkregen.

Voorbeeld VI

Bereiding van benzyljoodacetaat

Deze verbinding wordt overeenkomstig voorbeeld V bereid uit benzylchlooracetaat.

Voorbeeld VII

Bereiding van t-butyl-3-joodpropionaat

Een mengsel van 3-chloorpropionylchloride (20 g), pyridine (20 g) en t-butanol (20 g) in dichloormethaan (200 ml) wordt geroerd bij kamertemperatuur gedurende 20 uur. Het reactiemengsel wordt uitgegoten in water (200 ml). De organische laag wordt gewassen met water, 0,1 normaal zoutzuur, water en 5% natriumbicarbonaat. Na drogen op natriumsulfaat wordt het organische oplosmiddel verwijderd door destillatie onder

verlaagde druk. Een gedeelte van het residu (5 g) wordt opgelost in aceton (10 ml) en behandeld met een oplossing van natriumjodide (8 g) in aceton. Het reactie wordt onder terugvloeikoeling verwarmd en geroerd gedurende 20 uur. Opwerken zoals beschreven onder voorbeeld V geeft 6,5 gram t-butyl-3-joodpropionaat.

Voorbeeld VIII

Bereiding van 9-fenoxycarbonyl-10-carboxymethylacridiniumbromide

Een mengsel van fenyl-9-acridinecarboxylaat (100 mg) en t-butyljoodacetaat wordt onder roeren verwarmd op 110°C gedurende vijf uur. De resulterende oplossing wordt uitgegoten in diethylether (25 ml) en het gevormde neerslag afgefiltreerd. Een gedeelte van dit neerslag (10 mg) wordt geroerd in 33% waterstofbromide in azijnzuur (1 ml) en verwarmd op 50°C gedurende twee uur. Het reactiemengsel wordt uitgegoten in water en het gevormde neerslag (ca. 6 mg) geïsoleerd.

Voorbeeld IX

Bereiding van 9-fenoxycarbonyl-10-carboxyethylacridiniumbromide

Een mengsel van fenyl-9-acridinecarboxylaat (100 mg) en t-butyl-3-joodpropionaat (5 g) wordt onder roeren verwarmd op 130°C gedurende 16 uur. De resulterende oplossing wordt uitgegoten in benzeen (25 ml) en het gevormde neerslag afgefiltreerd. Een gedeelte van dit neerslag (10 mg) wordt geroerd in een mengsel van 33% waterstofbromide in azijnzuur (1 ml) en verwarmd op 50°C gedurende twee uur. Het reactiemengsel wordt uitgegoten in water en het gevormde neerslag (ca. 6 mg) geïsoleerd.

Voorbeeld X

Chemiluminescentie van 9-fenoxycarbonyl-10-carboxymethylacridiniumbromide (acridinium-ester A)

Er wordt een voorraadoplossing gemaakt van 0,1 milligram acridiniumester A in 1 ml methanol. Deze voorraadoplossing wordt verder verdund in 0,001 normaal zoutzuur. De chemiluminescentie die optreedt wanneer deze verdunde oplossingen worden behandeld met basisch waterstofperoxide (dit reagens wordt vers bereid door 100 microliter 5 normaal natronloog en 20 microliter waterstofperoxide te verdunnen met 20 milliliter water) wordt gemeten in een LUMAC Biocounter 2010. Er wordt een dosisrespons-curve verkregen zoals aangegeven in de figuur.

Conclusies

1. Acridiniumverbinding die geschikt is als chemiluminescentiemerkstof, met het kenmerk, dat de verbinding voldoet aan formule 1,
waarin A een tweewaardige organische rest is,
X een groep is die met waterstofperoxide samen met C-9 van het acridine in een dioxetaan kan worden omgezet,
Y een tegenion is, en
Z een functionele groep is,
en waarvan de benzeenringen een of meer substituenten kunnen dragen.

2. Acridiniumverbinding volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat A een eventueel door een of meer heteroatomen en/of carbonylgroepen onderbroken tweewaardige koolwaterstofrest is.

3. Acridiniumverbinding volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat A een alkyleengroep met 1-4 koolstofatomen is.

4. Acridiniumvebrinding volgens een der conclusies 1-3, met het kenmerk, dat X een alkoxycarbonylgroep of aryloxycarbonylgroep is.

5. Acridiniumverbinding volgens een der conclusies 1-4, met het kenmerk, dat Z een carboxylgroep of een van een carboxylgroep afgeleide reactieve groep is.

6. Toepassing van een verbinding volgens een der conclusies 1-5 voor immuunbepalingen door middel van chemiluminescentie.

7. Toepassing van een verbinding volgens een der conclusies 1-5 voor immuunbepalingen door middel van chemiluminescentie en energieoverdracht.

8. Koppelingsprodukt van een verbinding volgens een der conclusies 1-5 met een bij immuunreacties betrokken stof.

9. Toepassing van een koppelingsprodukt volgens conclusie 8 voor bepalingen door middel van chemiluminescentie.

10. Toepassing van een koppelingsprodukt volgens conclusie 8, voor bepalingen door middel van chemiluminescentie- en energieoverdracht.

++++++++++

1.

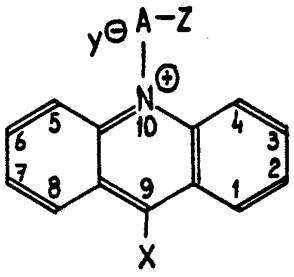


fig. 1.

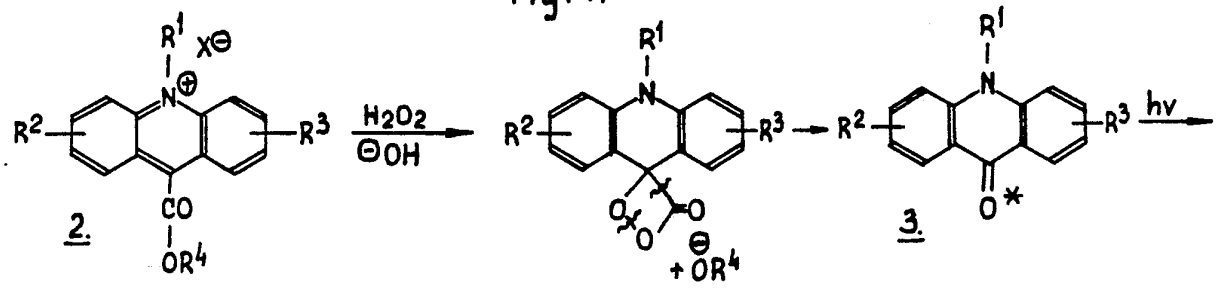
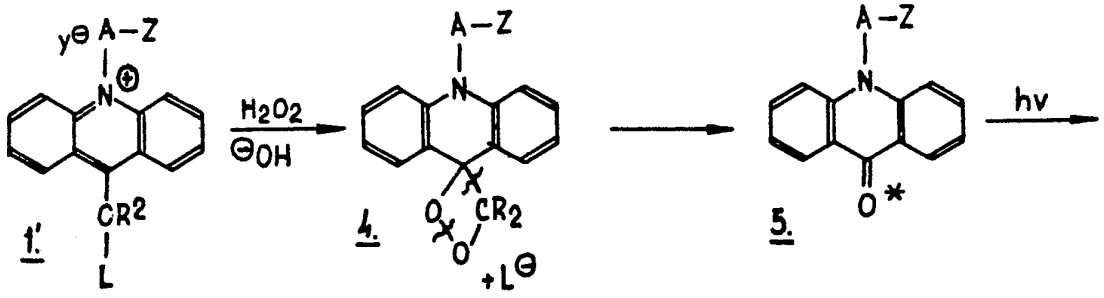
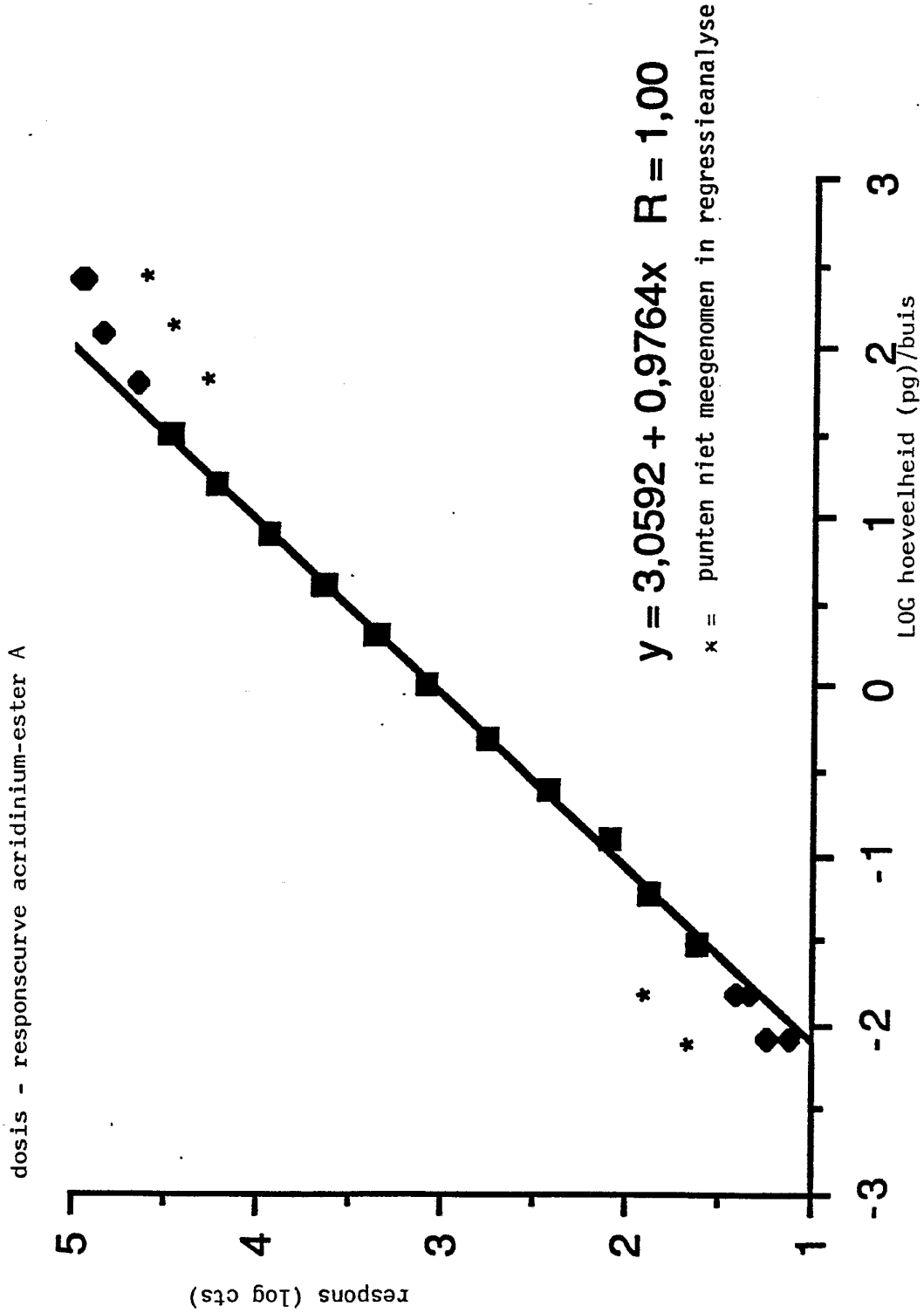


fig. 2.



19561

Fig. 3



8703075