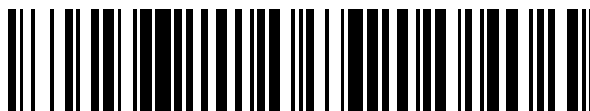


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 362**

51 Int. Cl.:

C09K 11/07 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C09B 67/22 (2006.01)

C09B 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2022** **PCT/EP2022/070522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2023** **WO23006581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2022** **E 22754071 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 4146765**

54 Título: **Un método y reactivos para mejorar la señal quimioluminiscente**

30 Prioridad:

29.07.2021 EP 21188638

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

31.10.2023

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**THEUSER, MATTHIAS;
KOMOROWSKI, LARS;
DAMMERMAN, ANTJE;
BAUMERT, KATHRIN;
HOLSTE, MAREIKE y
HINKELAMMERT, MARCEL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 952 362 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

Un método y reactivos para mejorar la señal quimioluminiscente

La presente invención se refiere a un método para potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico en una mezcla de reacción quimioluminiscente en una reacción quimioluminiscente que comprende oxidar el compuesto quimioluminogénico en presencia de una cantidad eficaz de un potenciador para obtener una señal quimioluminiscente potenciada, uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) para potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en una reacción quimioluminiscente, preferiblemente en un inmunoensayo quimioluminiscente, una composición quimioluminiscente relacionada y un kit relacionado.

Como tecnología de inmunoensayo no radiactiva, los inmunoensayos de quimioluminiscencia se desarrollaron muy rápidamente en el mundo después de las tecnologías de inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo e inmunoensayo de fluorescencia. El inmunoensayo quimioluminiscente es una tecnología que tiene alta sensibilidad, amplio intervalo de detección, operación simple y rápida, etiqueta estable y baja contaminación, por lo que es un método de inmunoensayo cuantitativo deseable (Cinquanta *et al.*, "Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?", Auto Immun Highlights, 8:9, 24 de junio de 2017).

En la actualidad, el inmunoensayo de quimioluminiscencia suele preferirse a los métodos de detección tradicionales, como el radioinmunoensayo, para la cuantificación de diversas sustancias biológicas, como moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, hormonas, anticuerpos, etc. Se caracteriza por la generación de luz por sustratos quimioluminogénicos debido a un estímulo externo por sustancias desencadenantes químicas o enzimáticas. Ejemplos destacados de sustratos quimioluminogénicos son el luminol, los arilfosfatos de 1,2-dioxetano, el complejo Tris-(bipiridil)rutenio(II) o las sondas a base de acridinio. Normalmente, la reacción de quimioluminiscencia puede dividirse en quimioluminiscencia de tipo destello y quimioluminiscencia de tipo resplandor en función de la naturaleza del sustrato quimioluminogénico, las sustancias desencadenantes aplicadas y el tipo de salida luminosa resultante. Como se describe en Tannous *et al.* (Tannous *et al.*, "Combined flash and glow-type chemiluminescent reactions for high-throughput genotyping of biallelic polymorphisms", Analytical Biochemistry, Volume 320, Issue 2, pages 266-272, 15 September 2003) la reacción de tipo destello resulta en una señal de quimioluminiscencia brillante en el intervalo de segundos a minutos mientras que la salida de luz en las reacciones de tipo resplandor no es tan brillante pero puede persistir hasta varias horas. En función del método elegido, pueden diseñarse inmunoensayos de tipo destello y de tipo resplandor.

Las sondas basadas en acridinio de tipo destello se utilizan a menudo en inmunoensayos de quimioluminiscencia para la generación de señales rápidas y ultrasensibles si se requiere un alto rendimiento de muestras. Ejemplos destacados son el éster de 10-metil-2,6-dimetil-acridinio-NHS (Me-DMAE-NHS), el éster de N-sulfopropil-dimetil-acridinio-N-hidroxisuccinimida (NSP-DMAE-NHS), el éster de N-sulfopropil-acridinio-sulfonamida-N-hidroxisuccinimida (NSP-SA-NHS) y el éster de 10-metil-2,6-dimetil-acridinio-(óxido de polietileno)4-N-hidroxisuccinimida (MeAE-PEO4-NHS), 6-dimetil-acridinio-(óxido de polietileno)éster 4-N-hidroxisuccinimida (MeAE-PEO4-NHS) y estas moléculas y sus variantes se describen, por ejemplo, en los documentos EP 1273917 B1, EP 1539702 B1 y otros. Todas estas moléculas generan luz ante el estímulo externo del peróxido de hidrógeno alcalino. Normalmente, estos últimos reactivos se añaden paso a paso en las soluciones desencadenantes A y B. El peróxido de hidrógeno suele formar parte de la solución desencadenante A en combinación con un ácido como el ácido nítrico. A continuación, se inyecta hidróxido de sodio en el gatillo B.

Para una generación óptima de la señal, se supone que el activador B necesita, además, una molécula detergente que pueda formar una estructura micelar en solución acuosa. Chang y Miller describen en el documento US 4.927.769 que los detergentes catiónicos basados en aminas cuaternarias son especialmente favorables. Aunque también son posibles los detergentes no iónicos o aniónicos, se supone que la carga positiva del grupo de cabeza del detergente catiónico acerca espacialmente la sonda a base de acridinio, mayoritariamente hidrófoba, y el anión de peróxido de hidrógeno, cargado negativamente, en la interfaz micelar y, por lo tanto, fomenta la producción de señales de quimioluminiscencia, como también se describe en Natrajan *et al.* (Natrajan *et al.*, "Effect of surfactants on the chemiluminescence of acridinium dimethylphenyl ester labels and their conjugates", Org. Biomol. Chem., 9, pp. 5092-5103, 13 de abril de 2011). Un ejemplo destacado de este tipo de detergente catiónico incluido en el documento US 4.927.769 es el cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC).

En Arakawa Hidetoshi *et al.*, se describe un método de detección de un analito que comprende 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio fluorosulfonato (PMAC) y cloruro de trietilbencilamonio utilizado como potenciador de emisiones más fuertes: "Development of a highly sensitive chemiluminescent assay for hydrogen peroxide under neutral conditions using acridinium ester and its application to an enzyme immunoassay", Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence, vol. 29, n.º 4, 5 de julio de 2013, páginas 374-377.

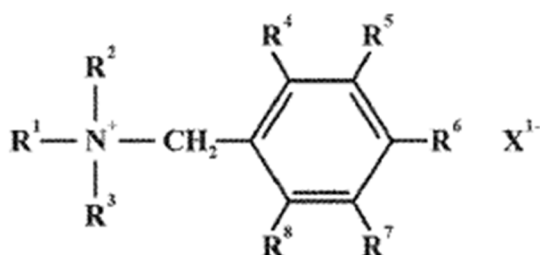
No obstante, son necesarias mejoras adicionales en la tecnología de inmunoensayo de quimioluminiscencia para permitir la cuantificación de analitos con concentraciones ultrabajas y facilitar la discriminación entre señal y ruido en general. Lo más probable es que estas mejoras requieran potenciar la quimioluminiscencia mediante sustancias

potenciadoras optimizadas.

El problema subyacente a la presente invención es proporcionar un método y reactivos relacionados y usos en la tecnología de inmunoensayo por quimioluminiscencia que puedan utilizarse para mejorar la cuantificación de analitos, especialmente con concentraciones ultrabajas, y que puedan utilizarse para facilitar mejor la discriminación entre señal y ruido en general.

Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar sustancias capaces de potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico, preferiblemente un compuesto de acridinio como, por ejemplo, un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en un inmunoensayo de quimioluminiscencia.

En un primer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un método para potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico en una mezcla de reacción quimioluminiscente en una reacción quimioluminiscente que comprende oxidar el compuesto quimioluminogénico en presencia de una cantidad eficaz de un potenciador para obtener una señal quimioluminiscente potenciada, en la que el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en la que dicho potenciador es un compuesto o una mezcla de dos, tres o más compuestos, y en la que dicho compuesto potenciador o cada uno de estos compuestos potenciadores se selecciona del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



fórmula (I)

en donde R¹ es alquilo C₃-C₂₀ o alquenilo; y R² y R³ son independientemente entre sí alquilo C₁-C₄ o alquenilo; y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X¹⁻ es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro.

La cantidad eficaz de potenciador según la presente invención se proporciona mediante uno, dos o más compuestos potenciadores en los que cada uno de ellos se selecciona del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) según se divulga en el presente documento.

Cada compuesto potenciador según la presente invención tiene un grupo de cabeza aromático. Un posible contraión aniónico de la parte catiónica de un compuesto potenciador según la presente invención incluye, pero no se limita a cloruro, bromuro e hidróxido.

En una realización preferida, el método según la presente invención incluye el paso de añadir el potenciador a una mezcla de reacción quimioluminiscente que contiene el compuesto quimioluminogénico, es decir, el compuesto de acridinio, por ejemplo, el éster de acridinio o la sulfonamida de acridinio.

En una realización preferida, el compuesto potenciador o cada uno de los compuestos potenciadores según la presente invención es o se selecciona del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) según se divulga en el presente documento, en el que R¹ es alquilo C₃-C₁₈ o alquenilo, preferiblemente alquilo C₅-C₁₈ o alquenilo; más preferiblemente alquilo C₅-C₁₆ o alquenilo; más preferiblemente alquilo C₁₂-C₁₄ o alquenilo; R² y R³ son independientemente entre sí metilo, etilo, propilo o butilo, preferiblemente metilo; R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo, preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo; y/o X¹⁻ es cloruro o bromuro, preferiblemente cloruro.

En una realización preferida, el compuesto potenciador, al menos un compuesto del potenciador o cada compuesto del potenciador según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en

- Cloruro de bencildimetilsilamonio,
- Cloruro de bencildimetilnonadecilamonio,
- Cloruro de bencildimetiloctadecilamonio,
- Cloruro de bencildimetilheptadecilamonio,
- Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio,

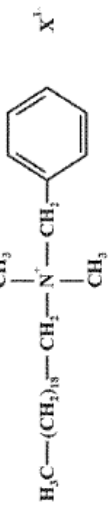
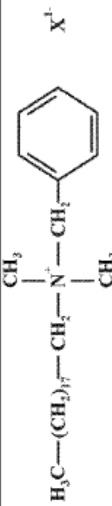
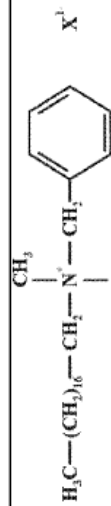
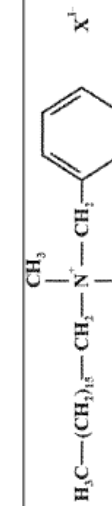
- Cloruro de bencildimetilpentadecilamonio,
- Cloruro de bencildimetiltetradecilamonio,
- Cloruro de bencildimetiltradecilamonio,
- Cloruro de bencildimetildodecilamonio,
- 5 - Cloruro de bencildimetildecilamonio,
- Cloruro de bencildimetiletilamonio,
- Cloruro de bencildimetilnonilamonio,
- Cloruro de bencildimetiloctilamonio,
- Cloruro de benzalconio,
- 10 - Cloruro de bencildimetilheptilamonio,
- Cloruro de bencildimetilhexilamonio,
- Cloruro de bencildimetilpentilamonio,
- Cloruro de bencildimetilbutilamonio,
- Cloruro de bencildimetilpropilamonio,
- 15 - Cloruro de benciltripropilamonio,
- Cloruro de bencildipropiletilamonio,
- Cloruro de bencildietilpropilamonio,
- Cloruro de bencildipropilmetilamonio,
- Cloruro de bencilpropiletilmetilamonio,
- 20 - Cloruro de bencilbutilamonio,
- Cloruro de bencildibutilpropilamonio,
- Cloruro de bencildipropilbutilamonio,
- Cloruro de bencilobutilpropiletilamonio,
- Cloruro de bencilbutilpropilmetilamonio,
- 25 - Cloruro de bencilobutiletilmetilamonio,
- Cloruro de bencildietilbutilamonio,
- Cloruro de alquil C₁₂₋₁₄-dimetil(etilbencil)amonio,
- Cloruro de dodecil(etilbencil)dimetilamonio,
- Cloruro de tetradecildimetil(etilbencil)amonio,
- 30 - Cloruro de octadecildimetil(ar-etilbencil)amonio y los respectivos compuestos antes mencionados que contienen bromuro en lugar de cloruro.

En la **Tabla 1**, se presenta una lista de compuestos potenciadores de ejemplo que incluyen la estructura molecular según la presente invención (sustancias catiónicas con grupos de cabeza aromáticos adecuadas como potenciadores de quimioluminiscencia). Para aclarar la identidad de las sustancias enumeradas a pesar de posibles ambigüedades en la nomenclatura química, en la Tabla 1, se indican los números de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) y/o los registros de compuestos (CID), en caso de que esta información se haya podido encontrar y esté a disposición del público. Los números de registro CAS según la División de la American Chemical Society son accesibles a través de <https://www.cas.org> o <https://commonchemistry.cas.org>. Los registros CID pueden encontrarse en la base de datos PubChem de los Institutos Nacionales de Salud a través de

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Si no se asignaba ningún CAS y/o ningún CID a un compuesto o no había información disponible públicamente, el compuesto respectivo se definía como "n.d.".

Tabla 1. Lista de ejemplo de compuestos potenciadores con grupos de cabeza aromáticos apropiados como potenciador de quimioluminiscencia de acuerdo con la presente invención. Los posibles contraiones de las partes catiónicas de los compuestos incluyen, pero sin limitación, cloruro, bromuro e hidróxido, los últimos mostrados en la tabla.

5

Parte catiónica del compuesto apropiada como potenciador de la quimioluminiscencia	Contratión aniónico X¹⁻						Estructura molecular del potenciador de quimioluminiscencia (parte catiónica más contratión aniónico X¹⁻)
	Cloruro		Bromuro		Hidróxido		
	CAS	CID	CAS	CID	CAS	CID	
Bencildimetilcosilamonio	37557-89-4	37781	25271-92-5	21666128	n.d.	88777875	
Bencildimetilnonadecilamonio	16576-99-1	14367850	2367044-60-6	141364238	n.d.	n.d.	
Bencildimetiloctadecilamonio	122-19-0	31204	22546-65-2	10479761	19493-24-4	13650437	
Bencildimetilheptadecilamonio	16576-98-0	3014947	1098301-66-6	87844792	n.d.	n.d.	

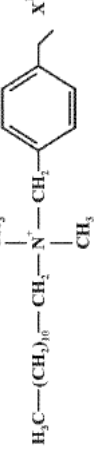
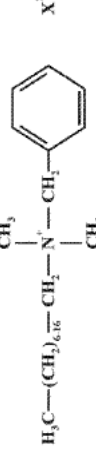
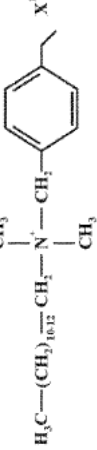
Bencildimetilhexadecilamonio	122-18-9	31202	3529-04-2	165133	54942-73-3	129864 09	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^-
Bencildimetilpentadecilamonio	16576-96-8	301494 5	860534-71-0	87844402	n.d.	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^-
Bencildimetiltradecilamonio	139-08-2	8755	18773-88-1	9866364	75169-64-1	129400 63	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^-
Bencildimetiltridecilamonio	1641-93-6	301402 4	136816-61-0	85616532	23043 52-54-1	882549 63	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^-
Bencildimetildodecilamonio	139-07-1	8753	7281-04-1	23705	500-33-4	123000 39	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^-

Bencilidimetilundecilamonio	16576-95-7	140295 37	776331-80-7	86005046	14294 85-54-0	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^+
Bencilidimetildecilamonio	965-32-2	13762	32014-84-9	11660400	14294 85-00-6	136504 36	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^+
Bencilidimetilnonilamonio	3024-71-3	232755 23	73620-02-7	71402097	14294 85-31-3	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^+
Bencilidimetiloctilamonio	959-55-7	13740	58965-50-7	15636465	19296 13-88-6	136504 35	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^+
Bencilidimetilheptilamonio	33296-72-9	232749 18	77339-31-2	87776931	n.d.	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ X^+

Bencildimetilhexilamonio	22559-57-5	232746-30	58965-49-4	71443268	16275 60-59-1	880065 71	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencildimetilpentilamonio	54335-04-5	130861-97	1098023-81-4	87777946	n.d.	887780 49	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencildimetilbutilamonio	72617-58-4	219880-52	58965-48-3	71443269	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencildimetilpropilamonio	87314-55-4	232739-22	54884-45-6	71364434	n.d.	881590 92	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$
Benciltripropilamonio	5197-87-5	609706-7	5350-75-4	13056170	11949 6-03-6	184134 60	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencilpropiletilamonio	5197-84-2	883181-57	90105-60-5	71430311	n.d.	883181 43	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \quad \text{X}^+$

Bencilidietilpropilamonio	5197-83-1	227682 69	n.d.	n.d.	n.d.	883178 89	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \end{array} $	X ⁺
Bencilidipropilmetilamonio	n.d.	121302 550	90105-59- 2	71430312	16275 60-55- 7	n.d.	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array} $	X ⁺
Bencilpropiletimetilamonio	5197-85- 3.	883171 76	96200-25- 8	n.d.	n.d.	883177 94	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	X ⁺
Benciltributilamonio	23616-79- 7	159952	25316-59- 0	2724282	27574- 41-0	221496 63	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2 \end{array} $	X ⁺
Bencilidibutilpropilamonio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2 \end{array} $	X ⁺
Bencilidipropilbutilamonio	n.d.	n.d.	90105-61- 6	71430309	n.d.	n.d.	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array} $	X ⁺

Bencilbutilpropilmetilamonio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencilbutilpropilmetilamonio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencilbutilmetilmetilamonio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \end{array} \quad \text{X}^+$
Bencildietilbutilamonio	5197-86-4	883175 00	90105-68- 3	71430302	n.d.	883177 93	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2 \end{array} \quad \text{X}^+$
Hexadecilidimetil(etilbencil)amonio	2065159- 60-4	122443	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$
Tetradecilidimetil(etilbencil) amonio	n.d.	101575 58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \text{X}^+$

Dodecil(etilbencil)dimetil- amonio	14351-42- 9	33917	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{X}^+$ 
Benzalconio	63449-41- 2; 8001- 54-5; 64365-16- 8	n.d.	91080-29- 4; 8043- 47-8	n.d.	n.d.	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5-\text{X}^+$ 
Alquil C12-C14-dimetil(etilbencil)- amonio	85409-23- 0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10/12}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{X}^+$ 

5 El potenciador según la presente invención puede constituir de una mezcla de dos, tres o más de los compuestos mencionados en la **Tabla 1**, y esta mezcla también puede estar disponible comercialmente como un artículo individual. Un ejemplo para una mezcla de dos, tres o más de los compuestos mencionados en la **Tabla 1**, que está disponible comercialmente como artículo individual es, por ejemplo, el cloruro de benzalconio o el bromuro de benzalconio. El cloruro de benzalconio es una mezcla de cloruros de alquilbencilmetilamonio (ABDAC), cuya parte alquílica está formada por cadenas C₈ a C₁₈. Dependiendo de la composición de la mezcla, pueden encontrarse

múltiples artículos comerciales y números CAS para el cloruro de benzalconio, respectivamente.

Si un compuesto potenciador según la presente invención incluye un átomo C quiral, el compuesto potenciador divulga e incluye todas las formas isómeras de dicho compuesto.

5 En una realización preferida, la cantidad eficaz de dicho potenciador en la mezcla de reacción quimioluminiscente es del 0,001 % en peso por volumen (p/v) o mayor, preferiblemente del 0,01 % en p/v, más preferiblemente del 0,1 % en p/v o mayor, más preferiblemente del 0,2 % en p/v o mayor, en cada caso en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente. En general, la cantidad eficaz de potenciador necesaria para potenciar la señal quimioluminiscente del compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente en la reacción quimioluminiscente variará en función del potenciador elegido y puede determinarse empíricamente. Como regla
10 general, una cantidad eficaz de potenciador en una mezcla de reacción quimioluminiscente es superior al 0,005 % en peso por volumen, preferiblemente superior al 0,01 % en peso por volumen, en cada caso en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente. En una realización preferida, la cantidad del potenciador para efectuar una señal quimioluminiscente mejorada incluida en una mezcla de reacción quimioluminiscente está en el intervalo del 0,005 % p/v al 3 % p/v, preferiblemente en el intervalo del 0,01 % p/v al 2 % p/v, también preferiblemente en el intervalo del 0,05 % p/v al 1 % p/v, más preferiblemente en el intervalo del 0,08 % p/v al 0,8 %
15 p/v, incluso más preferiblemente en el intervalo del 0,1 % p/v al 0,6 % p/v, más preferiblemente en el intervalo del 0,2 % p/v al 0,5 % p/v, en cada caso en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente. En una realización específicamente preferida, la cantidad del potenciador para efectuar una señal quimioluminiscente mejorada incluida en una mezcla de reacción quimioluminiscente está en el intervalo del 0,08 % en p/v al 0,4 % en p/v, en cada caso en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente.

Preferiblemente, la reacción quimioluminiscente de acuerdo con un método o uso de la presente invención debe llevarse a cabo a una temperatura de 20 °C a 37 °C y a un pH en el intervalo de 10 a 13,5. El potenciador según la presente invención se diluye preferiblemente antes de su uso en el método de esta invención. Los diluyentes adecuados incluyen agua, soluciones acuosas ácidas o soluciones acuosas básicas.

25 En una realización preferida, el potenciador según la presente invención es soluble en la mezcla de reacción quimioluminiscente.

En una realización preferida, el método según la presente invención se lleva a cabo mediante un inmunoensayo o forma parte de un inmunoensayo, en el que el inmunoensayo comprende preferiblemente el paso de detectar la presencia o ausencia de un antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo. El inmunoensayo puede seleccionarse
30 preferiblemente del grupo que comprende un ensayo competitivo, un ensayo de puente de captura, un ensayo inmunométrico, un ensayo de captura de clase directa o indirecta. El principio de cada uno de estos formatos se detalla en The Immunoassay Handbook, 3ª edición, editado por David Wild, Elsevier, 2005.

En una realización preferida, la reacción quimioluminiscente según la presente invención es una reacción quimioluminiscente de tipo destello. La reacción quimioluminiscente de tipo destello produce una señal de quimioluminiscencia brillante en un intervalo de segundos a minutos.

En otra realización preferida, el método para aumentar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico en una mezcla de reacción quimioluminiscente en una reacción quimioluminiscente según la presente invención comprende una reacción quimioluminiscente de tipo destello como reacción quimioluminiscente.

40 En una realización preferida, el potenciador según la presente invención se combina con el compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente antes, simultáneamente o poco después del inicio de la reacción quimioluminiscente, preferiblemente el potenciador se combina con el compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente simultáneamente al inicio de la reacción quimioluminiscente.

En una realización preferida, la señal quimioluminiscente generada por la reacción quimioluminiscente según la presente invención se detecta durante un período de tiempo fijo, preferiblemente, se forma la mezcla de reacción quimioluminiscente, se inicia la reacción quimioluminiscente y se detecta la señal de modo simultáneo, más preferiblemente, la duración de la detección varía de 0,01 a 360 segundos, incluso más preferiblemente, de 0,1 a 30 segundos, incluso más preferiblemente, de 0,3 a 15 segundos, y lo más preferiblemente, de 0,5 a 10 segundos, incluyendo en cada caso la duración de la detección comienza con el inicio de la reacción quimioluminiscente.

50 En una realización preferida, el método según la presente invención comprende los pasos de combinar el potenciador según la presente invención con el compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente simultáneamente al inicio de la reacción quimioluminiscente y/o detectar la señal quimioluminiscente generada por la reacción quimioluminiscente según la presente invención comenzando con el inicio de la reacción quimioluminiscente durante una duración fija de tiempo de 0,1 a 10 segundos.

55 Según la presente invención, la reacción quimioluminiscente se inicia preferiblemente iniciando la oxidación del compuesto quimioluminogénico. Preferiblemente, la etapa de iniciación de la oxidación del compuesto quimioluminogénico se realiza añadiendo un compuesto oxidante, preferiblemente peróxido de hidrógeno.

En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, la mezcla de reacción quimioluminiscente incluye, además, peróxido de hidrógeno, un ácido, preferiblemente ácido nítrico, y/o un hidróxido alcalino, preferiblemente hidróxido de sodio.

5 En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, la mezcla de reacción quimioluminiscente incluye una solución desencadenante A y una solución desencadenante B. Preferiblemente, la solución desencadenante A incluye un ácido, preferiblemente ácido nítrico, y peróxido de hidrógeno y la solución desencadenante B incluye un hidróxido alcalino, preferiblemente hidróxido de sodio, y el potenciador según la invención.

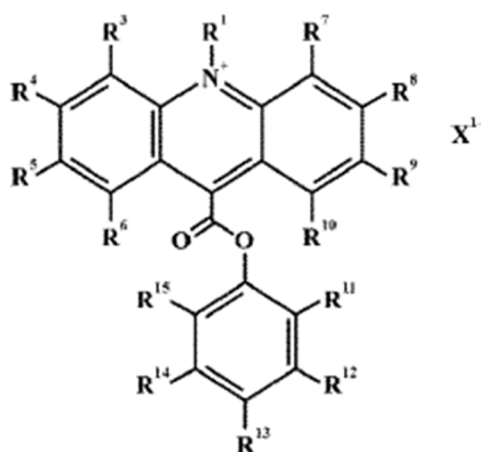
10 En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, la mezcla de reacción quimioluminiscente se proporciona mezclando una solución desencadenante A, que preferiblemente incluye ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, y una solución desencadenante B, que preferiblemente incluye hidróxido de sodio y el potenciador según la invención, con el compuesto quimioluminogénico, que es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio.

15 El compuesto quimioluminogénico según la presente invención es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio.

20 Es bien conocido en la técnica que los compuestos de acridinio existen en un equilibrio entre la forma de acridinio y la forma pseudobase en los medios acuosos en los que se realizan prácticamente todos los inmunoensayos. La forma pseudobase de los compuestos de acridinio no puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y, por lo tanto, no puede producir quimioluminiscencia. El equilibrio entre la forma quimioluminiscente del acridinio y la forma pseudobase no quimioluminiscente está fuertemente influenciado por el pH del medio. El pH ácido favorece la formación de la forma acridínica y el pH básico favorece la formación de la forma pseudobásica.

25 En los formatos de ensayo heterogéneos, la quimioluminiscencia de los compuestos de acridinio o de las moléculas biológicamente activas marcadas con compuestos de acridinio, denominadas trazadores o conjugados, se desencadena normalmente mediante la adición secuencial de dos reactivos. Es necesario un tratamiento inicial del compuesto de acridinio con un ácido fuerte que contenga peróxido para convertir la forma pseudobase de los compuestos de acridinio en la forma de acridinio. El tratamiento posterior con una solución alcalina neutraliza el ácido y eleva el pH del medio de reacción para la ionización del peróxido de hidrógeno y permitir así la emisión de luz.

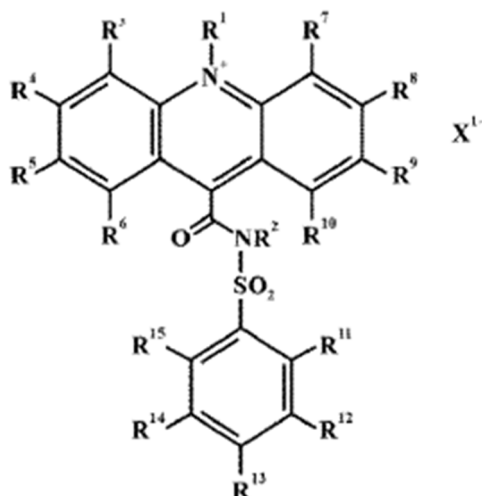
30 Preferiblemente, el compuesto quimioluminogénico utilizado en la presente invención es un éster de acridinio según la fórmula (II):



fórmula (II)

35 en donde R¹ es un alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo, sulfoalquilo, carboxialquilo y oxoalquilo y en donde R² a R¹⁵ se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo o aralquilo, amino, amido, acilo, alcoilo, hidroxilo, carboxilo, halógeno, halogenuro, nitro, ciano, sulfo, sulfoalquilo, sulfamilo, carboxialquilo, éster succinimidílico y oxoalquilo o cualquier otro grupo saliente; y opcionalmente, si está presente, X¹⁻ es un anión;

o una sulfonamida de acridinio según la fórmula (III)



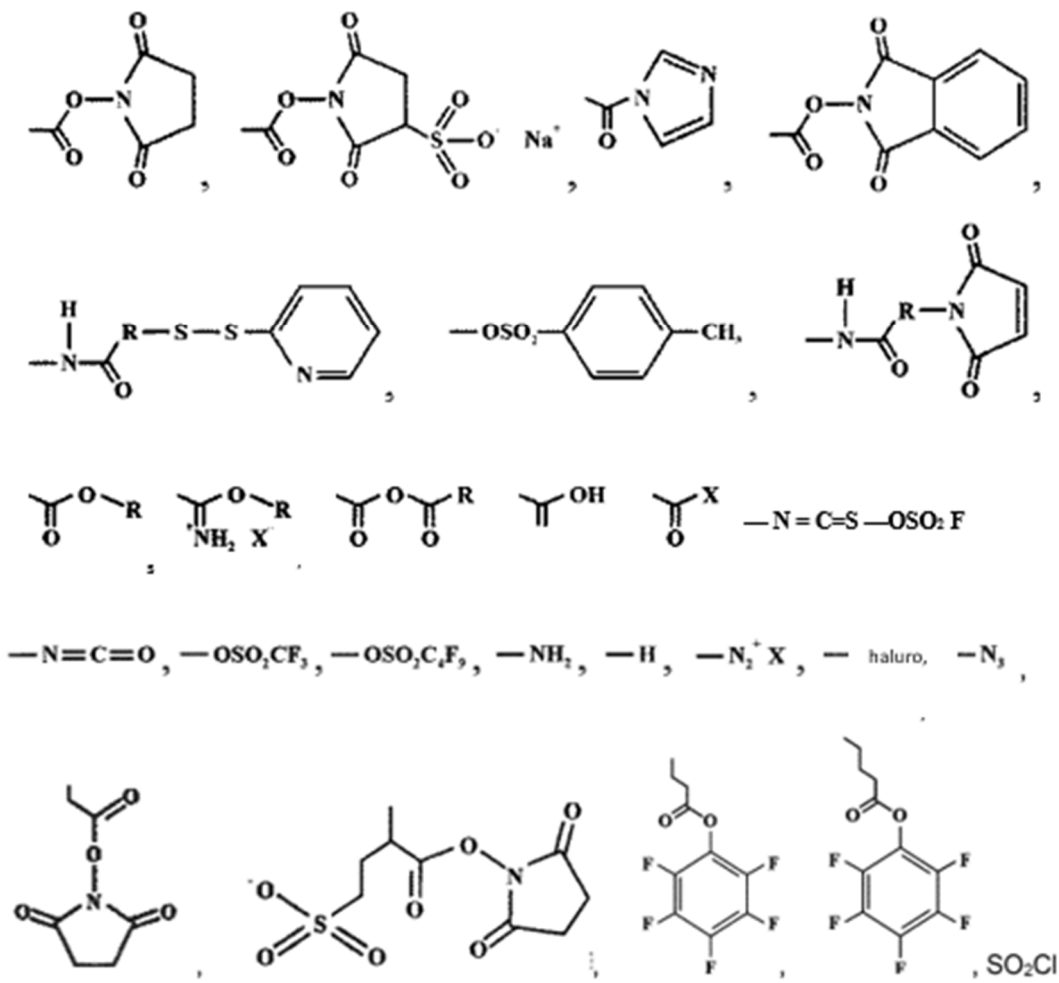
fórmula (III)

en donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo, sulfoalquilo, carboxialquilo y oxoalquilo y en donde R² a R¹⁵ se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo, amino, amido, acilo, alcoxilo, hidroxilo, carboxilo, halógeno, halogenuro, nitro, ciano, sulfo, sulfoalquilo, sulfamoilo, carboxialquilo, éster succinimidílico y oxoalquilo o cualquier otro grupo saliente; y opcionalmente, si está presente, X¹⁻ es un anión.

En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, el compuesto quimioluminogénico es un éster de acridinio según la fórmula (II) descrita en el presente documento, en donde adicionalmente R¹² y R¹⁴ se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo, amino, carboxilo, hidroxilo, alcoxilo, nitro o halogenuro; R¹¹ y R¹⁵ se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquino, arilo, alcoxilo, amino, amido, sulfonamida o sulfuro; y R¹³ representa el siguiente sustituyente

R¹³ = L-R¹⁶-R¹⁷

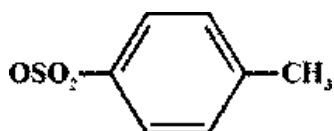
en donde L es sulfamoilo o se omite, R¹⁶ se omite o es alquilo, arilo, aralquilo, (amido)_z con z = 1- 10, preferiblemente z = 1 o 2, u (óxido de polietileno)_x con x = 1-10, preferiblemente x = 4; y R¹⁷ se selecciona del grupo que consiste en:



o cualquier otro grupo saliente,

en donde R es alquilo, arilo o aralquilo; X es CH_3SO_4 , OSO_2F , halogenuro, OSO_2CF_3 , $\text{OSO}_2\text{C}_4\text{F}_9$, o

5



y en donde las posiciones de los sustituyentes R^{12} , R^{13} y R^{14} son intercambiables.

10

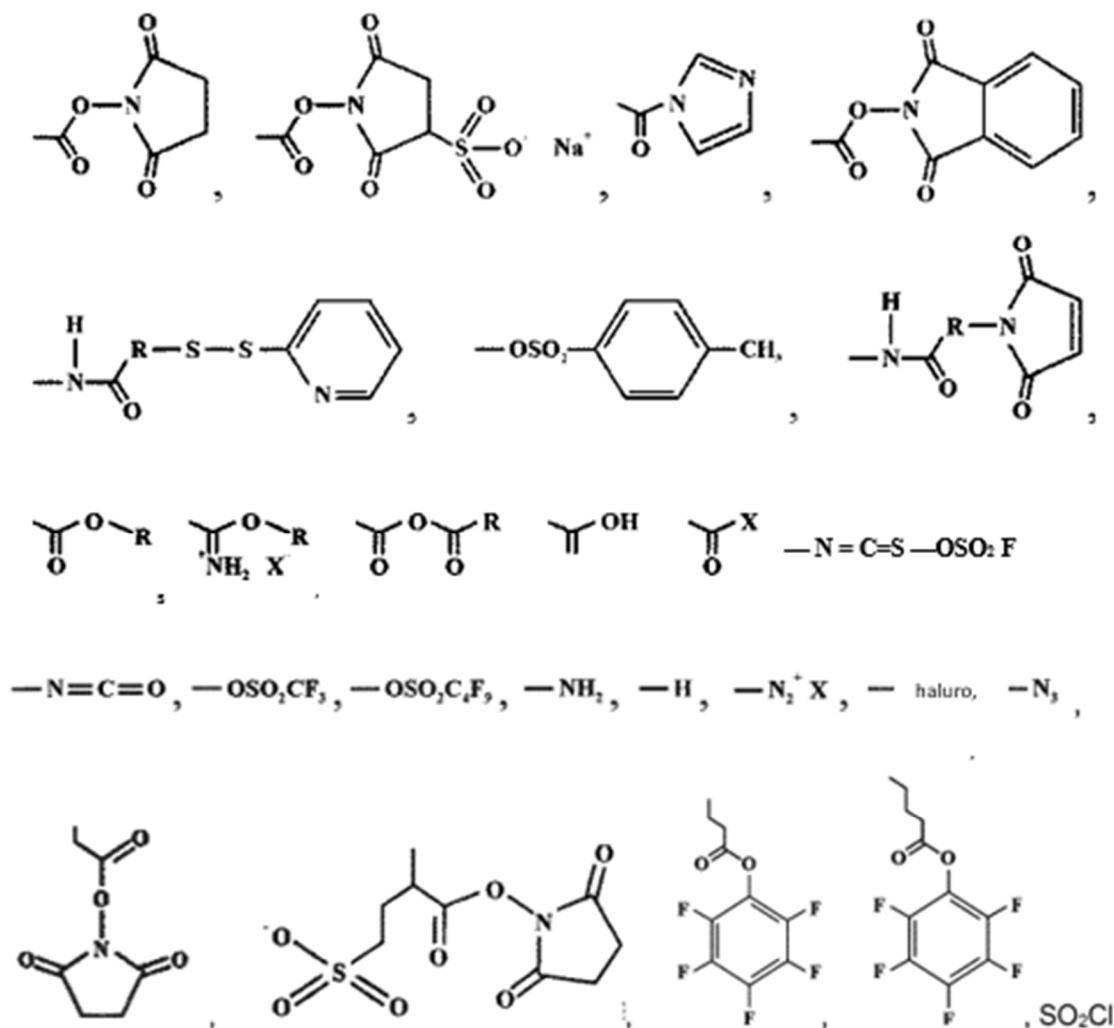
En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, el compuesto quimioluminogénico es una sulfonamida de acridinio según la fórmula (III) descrita en el presente documento, en donde adicionalmente R^{12} , R^{13} y R^{14} se seleccionan cada uno

independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, amino, carboxilo, hidroxilo, alcoxilo, nitro o halogenuro; R¹¹ y R¹⁵ están seleccionados, cada uno independientemente del otro, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquénilo, alquínilo, arilo, alcoxilo, amino, amido, sulfonamida o sulfuro; y R² representa el siguiente sustituyente

$$5 \quad R^2 = L - R^{16} - R^{17}$$

en donde L es sulfamoilo o se omite, R¹⁶ se omite o es alquilo, arilo, aralquilo, (amido)z con z = 1-10, preferiblemente z = 1 o 2, u (óxido de polietileno)_x con x = 1-10, preferiblemente x = 4; y R¹⁷ se

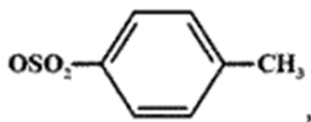
selecciona del grupo que consiste en



10

o cualquier otro grupo saliente,

en donde R es alquilo, arilo o aralquilo; X es CH_3SO_4 , OSO_2F , halogenuro, OSO_2CF_3 , $\text{OSO}_2\text{C}_4\text{F}_9$, o



y en donde las posiciones de los sustituyentes R¹¹ a R¹⁵ son intercambiables.

Los compuestos de acridinio que son útiles en la presente invención se describen con más detalle en la solicitud US con número de serie 915.527, presentada el 6 de octubre de 1986 y en Natrajan *et al.*, "A comparison of chemiluminescent acridinium dimethylphenyl ester labels with different conjugation sites", Org Biomol Chem, 13(9):2622-337, marzo de 2015.

En una realización preferida, preferiblemente según al menos una de las realizaciones precedentes, el compuesto quimioluminogénico se selecciona del grupo que consiste en

éster de N-sulfopropil-dimetilacridinio-(óxido de polietileno)_x-N-hidroxisuccinimida (NSP-DMAE-PEO_x-NHS) con x = 1-10, preferiblemente éster de N-sulfopropil-dimetilacridinio-(óxido de polietileno)4-N-hidroxisuccinimida (NSP-DMAE-PEO4-NHS);

2,6-(dimetil)-3-clorosulfonilfenil-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxilato (SPA); 2,6-(dimetil)-3-sulfamoilfenil-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxilato (polietileno)éster 4-pentafluorofenílico (SPA-PEO₄-PFP);

trifato de 2,6-(dimetil)-3-clorosulfonilfenil-N-metil-acridinio-9-carboxilato (MeAE); trifato de 2,6-(dimetil)-3-sulfamoilfenil-N-metil-acridinio-9-carboxilato (óxido de polietileno)éster 4-N-hidroxisuccinimida (MeAE-PEO4-NHS),

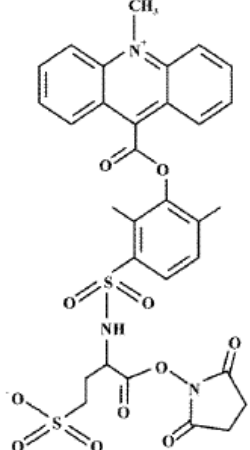
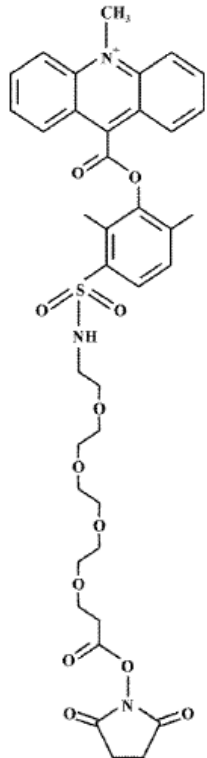
2,3,4,5,6-pentafluorofenilo-1-carbonil-4,7,10,13-tetraoxapentadecil-(15-amino)-3'-sulfonil-2',6'-dimetilfenil-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxilato, éster metilsulfato de 10-metil-2,6-dimetil-acridinio-NHS (Me-DMAE-NHS) N-sulfopropil-dimetilacridinio-N-hidroxisuccinimida (NSP-DMAE-NHS); y N-sulfopropil-acridinio-sulfonamida-N-hidroxisuccinimida (NSP-SA-NHS).

En la **Tabla 2**, se presenta una lista de compuestos de acridinio de ejemplo según las fórmulas (II) o (III) definidas en el presente documento, adecuados como compuestos quimioluminogénicos según la presente invención. Para aclarar la identidad de las sustancias enumeradas a pesar de posibles ambigüedades en la nomenclatura química, en la **Tabla 2**, se indican los números de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) y/o los registros de compuestos (CID), en caso de que esta información se haya podido encontrar y esté a disposición del público. Los números de registro CAS según la División de la American Chemical Society son accesibles a través de <https://www.cas.org> o <https://commonchemistry.cas.org>. Los registros CID pueden encontrarse en la base de datos PubChem de los Institutos Nacionales de Salud a través de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Si no se asignaba ningún CAS y/o ningún CID a un compuesto o no había información disponible públicamente, el compuesto respectivo se definía como "n.d."

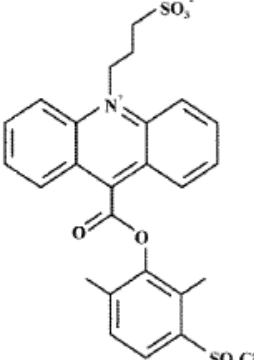
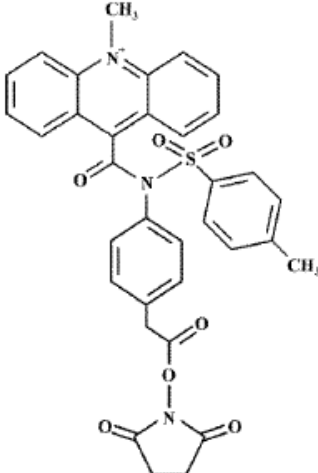
Tabla 2:

Lista de ejemplo de compuestos de acridinio según la fórmula (II) o (III) según la presente invención.

Compuesto de acridinio	CAS	CID	Nombre IUPAC	Estructura molecular del compuesto de acridinio
Me-DMAE-NHS	115853-74-2	14153946	[4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxycarbonil-2,6-dimetilfenil] 10-metilacridin-10-io-9-carboxilato; metilsulfato	
NSP-DMAE-NHS	194357-64-7	20608334	3-[9-[[4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxycarbonil-2,6-dimetilfenil]oxycarbonilacridin-10-io-10-il]propan-1-sulfonato	
NSP-SA-NHS	199293-83-9	59642932	3-[9-[[4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-4-oxobutyl]-(4-metilfenil)sulfonilcarbamoil]acridin-10-io-10-il]propan-1-sulfonato	

MeAE-HCA-NHS	Me-DMAE-PEO4-NHS
664351-78-4	663921-17-3
20818505	20818504
3-[[2,4-dimetil-3-(10-metilacridin-10- io-9-carbonil)oxifenil]sulfonilamino]- 4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-4- oxobutan-1-sulfonato	[3-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-3- oxopropoxil]etoxi]etoxi]etoxi]etilsulfamoil]-2,6-dimetilfenil] 10-metilacridin-10-io-9-carboxilato
	

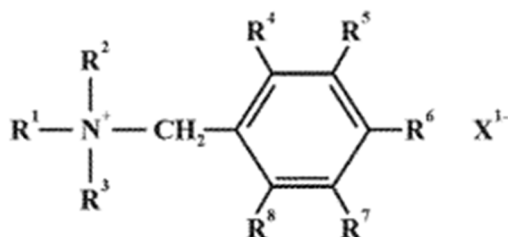
MeAE-Gly3-NHS				
	663921-23-1	20818507	[3-[[2-[[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-yl)oxi-2-oxoetil]amino-2-oxoetil]sulfamoil]-2,6-dimetilfenil] 10-metilacridin-10-ilo-9-carboxilato	
MeAE-Gly2-NHS	663921-21-9	20818508	[3-[[2-[[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-yl)oxi-2-oxoetil]amino-2-oxoetil]sulfamoil]-2,6-dimetilfenil] 10-metilacridin-10-ilo-9-carboxilato	

SPAЕ	Me-SA-PhAc-NHS
663921-11-7	125603-37-4
20818511	19598396
3-[9-(3-clorosulfonil-2,6-dimetilfenoksi)carbonilacridin-10-io-10-il]propan-1-sulfonato	(2,5-dioxopirrolidin-1-il) 2-[4-[(10-metilacridin-10-io-9-carbonil)-(4-metilfenil)sulfonilamino]fenil]acetato
	

SPAE-PEO4-PFP	663921-24-2	20818509	3-[9-[2,6-dimetil-3-[2-[2-[2-[3-oxo-3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenoxi)propoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]sulfamoi]fenoxi] carbonilacridin-10-io-10-il]propan-1-sulfonato	
---------------	-------------	----------	--	--

El compuesto de acridinio según la presente invención puede ser oxidado por cualquier oxidante que reaccione con el compuesto para causar la excitación del compuesto de modo que el compuesto emita luz en una reacción quimioluminiscente. Un oxidante preferido es el peróxido de hidrógeno en álcali diluido.

- 5 En una realización preferida, la mezcla de reacción quimioluminiscente según la presente invención incluye un oxidante en una cantidad del 0,01 % al 1 % en volumen en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente, preferiblemente del 0,05 % al 0,5 % en volumen en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente y más preferiblemente del 0,1 % al 0,3 % en volumen en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente.
- 10 La luz emitida puede cuantificarse utilizando un dispositivo de medición estándar como un Luminómetro de Microplacas LB 960 Centro (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Alemania), un Luminómetro Modelo 810 (Ciba-Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA) o un Analizador RA 10 (Euroimmun, una empresa de PerkinElmer, Alemania).
- 15 En una realización preferida, el compuesto quimioluminogénico capaz de emitir quimioluminiscencia emite luminiscencia con una longitud de onda de 400 nm o más, preferiblemente de 400 nm a 690 nm, más preferiblemente de 400 nm a 550 nm, más preferiblemente de 405 nm a 500 nm y más preferiblemente de 410 a 490 nm.
- 20 En un segundo aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



(fórmula (I))

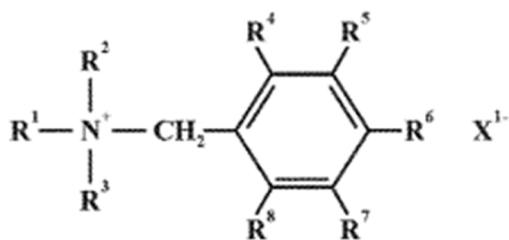
en donde R¹ es alquilo C₃-C₂₀ o alquenilo; y R² y R³ son independientemente entre sí alquilo C₁-C₄ o alquenilo; y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X¹⁻ es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro, para potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente según la presente invención, en una reacción quimioluminiscente, preferiblemente en un inmunoensayo quimioluminiscente.

En una realización preferida, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se define en el presente documento, en donde R¹ es alquilo C₃-C₁₈ o alquenilo, preferiblemente alquilo C₅-C₁₈ o alquenilo; más preferiblemente C₈-C₁₆ alquilo o alquenilo; más preferiblemente C₁₂-C₁₄ alquilo o alquenilo; R² y R³ son independientemente entre sí metilo, etilo, propilo o butilo, preferiblemente metilo, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo, preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo; y/o X¹⁻ es cloruro o bromuro, preferiblemente cloruro.

Preferiblemente, se utilizan uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se ha desvelado con anterioridad para potenciar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, preferiblemente según la presente invención, en una reacción quimioluminiscente, preferiblemente en un inmunoensayo quimioluminiscente.

Según la presente invención, el compuesto es un compuesto potenciador según la presente invención que tiene un grupo de cabeza aromático.

En un tercer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante una composición quimioluminiscente que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



fórmula (I)

en donde R¹ es alquilo C₃-C₂₀ o alquenilo; y R² y R³ son independientemente entre sí alquilo C₁-C₄ o alquenilo; y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X¹⁻ es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro, y al menos un compuesto quimioluminogénico, en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) como se describe en el presente documento.

Según la presente invención, al menos un compuesto en la composición quimioluminiscente según la presente invención es un compuesto potenciador según la presente invención que tiene un grupo de cabeza aromático.

En una realización preferida, la composición quimioluminiscente según la presente invención comprende, además, un agente fluorescente.

La composición quimioluminiscente según la presente invención puede incluir, además, uno o más agentes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína sódica, rodamina B y/o rodamina 6G. El agente o agentes fluorescentes emitirán un tipo de fluorescencia tras recibir energía luminosa de la señal quimioluminiscente del compuesto quimioluminogénico. Puede ocurrir que el rendimiento cuántico de la fluoresceína sea mucho mayor que el del compuesto quimioluminogénico, por lo que el rendimiento cuántico del compuesto quimioluminogénico puede mejorar indirectamente. Por ejemplo, la fluoresceína sódica (9-(o-carboxifenil)-6-hidroxi-3H-xanteno-3-cetona disódica) es un agente fluorescente soluble en agua y tiene una longitud de onda de excitación y emisión de 494 nm y 518 nm, respectivamente. El rendimiento cuántico de la fluoresceína sódica es de hasta 0,97. Del mismo modo, los agentes fluorescentes de la serie de la rodamina también tienen un rendimiento cuántico de fluorescencia muy elevado. El agente fluorescente se utiliza de preferencia a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/L a aproximadamente 1 g/L en una composición quimioluminiscente según la presente invención.

En una realización preferida, la composición quimioluminiscente según la presente invención es la mezcla de reacción quimioluminiscente según un método según la presente invención. Preferiblemente, la composición quimioluminiscente según la presente invención comprende, además, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno y/o hidróxido de sodio.

La composición quimioluminiscente de la presente invención, preferiblemente según las realizaciones divulgadas, puede incluirse en un kit envasando individualmente los componentes de la composición quimioluminiscente en un sistema de envasado múltiple. En otras realizaciones según la presente invención, algunos componentes pueden combinarse en un envase, mientras que los otros se almacenan en envases separados para formar un sistema multienvase. Otra posibilidad es mezclar los componentes y envasarlos como una sola mezcla.

En un cuarto aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un kit, preferiblemente para potenciar la quimioluminiscencia de un compuesto quimioluminogénico, que comprende al menos un compuesto quimioluminogénico, en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) como se ha divulgado con anterioridad y uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se ha divulgado con anterioridad. El problema se resuelve preferiblemente mediante un kit para uso en la potenciación de la quimioluminiscencia de un compuesto quimioluminogénico, en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) como se ha descrito con anterioridad y uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se ha descrito con anterioridad.

Preferiblemente, uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) son potenciadores según la presente invención como se ha descrito con anterioridad.

En una realización preferida, los componentes del kit según la presente invención se almacenan individualmente o en forma de una, dos o más mezclas.

En una realización preferida, el al menos un compuesto quimioluminogénico, preferiblemente un compuesto de la fórmula (II) o de la fórmula (III) según se describe en el presente documento, y uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) según se describe en el presente documento, se almacenan juntos en una mezcla en el kit según la presente invención, opcionalmente, además junto con hidróxido de sodio. Preferiblemente, la solución desencadenante A, que comprende preferiblemente ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, se almacena individualmente en el kit según la presente invención.

En una realización preferida, el kit según la presente invención, preferiblemente según al menos una de las realizaciones preferidas divulgadas, comprende un portador útil para el diagnóstico, preferiblemente un portador sólido, que comprende un medio para capturar un antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo en una solución líquida y un medio para detectar el antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo unido al portador, en donde el medio para detectar el antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo unido al portador está marcado con al menos un compuesto quimioluminogénico, es decir, un compuesto de acridinio de la fórmula (II) o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (III) según la presente invención, es decir, un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio de la fórmula (II) o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (III) según la presente invención. Según la presente invención, se prefiere, además, que el portador de utilidad diagnóstica se seleccione del grupo que comprende una microesfera, preferiblemente una microesfera paramagnética, una tira reactiva, una placa de microtitulación, una membrana, preferiblemente del grupo que comprende western blot, line blot y dot blot, un dispositivo de flujo lateral, una superficie de vidrio, un portaobjetos para microscopia, una micromatriz y un biochip. En otra realización preferida, el portador de

utilidad diagnóstica es una mancha lineal, un biochip o una microesfera, preferiblemente una microesfera. Preferiblemente, el portador de utilidad diagnóstica está provisto de microesferas. Se prefiere, además, según la presente invención que el al menos un compuesto quimioluminogénico, en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) según la presente invención, esté unido a perlas. La unión puede estar presente por interacciones proteína-proteína no covalentes, puenteadas por interacciones proteína-proteína o puede estar presente por unión covalente.

En una realización preferida, el kit según la presente invención comprende, además, un portador de utilidad diagnóstica como se ha descrito con anterioridad, una solución desencadenante A y una solución desencadenante B, en donde la solución desencadenante A incluye ácido nítrico y peróxido de hidrógeno y la solución desencadenante B incluye hidróxido de sodio y uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se ha definido con anterioridad y en las que al menos la solución desencadenante A y una solución desencadenante B se almacenan individualmente.

En una realización preferida, el kit según la presente invención comprende, además, un medio para detectar un antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo unido a un portador, en donde el medio para detectar el antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo unido al portador puede ser un anticuerpo secundario. Preferiblemente, un anticuerpo secundario es un anticuerpo que se une específicamente a todos los anticuerpos de una clase de anticuerpos, preferiblemente una clase de anticuerpos de mamíferos, más preferiblemente una clase de anticuerpos humanos como la IgG. Los anticuerpos secundarios suelen reconocer el dominio constante de dicha clase, pero también pueden reconocer otros epítomos compartidos por anticuerpos de la clase de interés, por ejemplo un epítomo conformacional a través de la estructura 3D. Existe una amplia gama de ellos en el mercado, por ejemplo en Thermo Fisher. Puede tratarse de un anticuerpo monoclonal o policlonal. En una realización preferida, el término "reconocido", tal como se utiliza en el presente documento, significa que el anticuerpo secundario se une específicamente al antígeno o antígenos, anticuerpo/anticuerpos o autoanticuerpo/autoanticuerpos por detectar. Un anticuerpo secundario puede unirse específicamente a todos los isotipos de la clase de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo secundario de clase IgG puede unirse a los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Esto puede lograrse utilizando como anticuerpo secundario de la clase, preferiblemente de la clase IgG, una mezcla que comprenda un anticuerpo que se una específicamente a cada isotipo IgG o un único anticuerpo que reaccione con todos los isotipos de interés. El uso de anticuerpos secundarios se explica en Kruger, N. J., Detection of Polypeptides on Blots Using Secondary Antibodies, en The Protein Protocols Handbook (ed. J. M. Walker), página 967, volumen 1996, Springer. Brevemente, dichos anticuerpos secundarios pueden generarse inmunizando a un animal de laboratorio con el anticuerpo a reconocer o una mezcla de los anticuerpos por reconocer.

La unión específica significa preferiblemente que la reacción de unión es más fuerte que una reacción de unión caracterizada por una constante de disociación de 1×10^{-5} M, más preferiblemente 1×10^{-7} M, más preferiblemente 1×10^{-8} M, más preferiblemente 1×10^{-9} M, más preferiblemente 1×10^{-10} M, más preferiblemente 1×10^{-11} M, más preferiblemente 1×10^{-12} M, determinada por resonancia de plasmón de superficie utilizando un equipo Biacore a 25 °C en tampón PBS a pH 7.

En una realización preferida, la composición quimioluminiscente, la mezcla de reacción quimioluminiscente y/o el kit según la presente invención, incluye, además, uno o más, preferiblemente todos los reactivos del grupo que comprende estabilizadores, preferiblemente un conjunto de estabilizadores, tampón de lavado, antidegradantes.

La composición quimioluminiscente, la mezcla de reacción quimioluminiscente y/o el kit según la presente invención pueden contener, además, un tampón, para mantener el pH del sistema de reacción. Los tampones apropiados incluyen un tampón de carbonato, un tampón de dietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, etc. El tampón puede utilizarse a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mM.

La composición quimioluminiscente, la mezcla de reacción quimioluminiscente y/o el kit según la presente invención pueden incluir, además, un conservante, que facilita la conservación y el almacenamiento a largo plazo de los reactivos. No hay ninguna limitación en cuanto al tipo de conservante, y pueden utilizarse conservantes disponibles en el mercado como Proclin300, azida sódica, Kathon y gentamicina. Los conservantes pueden utilizarse en cualquier concentración que no influya en la reacción quimioluminiscente.

En una realización preferida, el kit según la presente invención comprende además uno o más, preferiblemente todos los reactivos del grupo que comprende calibradores, preferiblemente un conjunto de calibradores, controles positivos y controles negativos.

Según otros usos de detección diferentes, el kit según la presente invención puede incluir, además, reactivos enzimáticos correspondientes, reactivo enzimático marcado, un anticuerpo en fase sólida y/o un manual que instruya al operador.

En un quinto aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un uso de la composición quimioluminiscente o la mezcla de reacción quimioluminiscente según la presente invención para la fabricación de un kit, un dispositivo médico, preferiblemente un dispositivo de diagnóstico, para el diagnóstico de una enfermedad. El soporte de utilidad diagnóstica se selecciona preferiblemente del grupo que comprende un portaobjetos de vidrio, preferiblemente para microscopia, un biochip, una placa de microtitulación, un dispositivo de flujo lateral, una tira reactiva, una membrana, preferiblemente una transferencia en línea, una columna de cromatografía y una perla, preferiblemente una placa de microtitulación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo y/o un método para detectar un analito de interés en una muestra de ensayo, el inmunoensayo y/o el método comprenden los pasos de:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo de la que se sospecha que contiene un analito de interés con un primer anticuerpo que se une al menos a un epítipo del analito de interés para formar un primer complejo anticuerpo-analito, en donde el primer anticuerpo se inmoviliza en una fase sólida, y en donde al menos un autoanticuerpo de la muestra de ensayo se une al menos a un epítipo del analito de interés para formar un complejo autoanticuerpo-analito, en donde dicho autoanticuerpo se une a la fase sólida;

(b) poner en contacto dicha mezcla que comprende un primer complejo anticuerpo-analito y un complejo autoanticuerpo-analito, con un segundo anticuerpo que ha sido conjugado con una etiqueta detectable para formar un primer complejo anticuerpo-analito-segundo anticuerpo y un complejo autoanticuerpo-analito-segundo anticuerpo; en donde el segundo anticuerpo se une al menos a un epítipo en el analito de interés y en donde, además, la etiqueta detectable es al menos un compuesto de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio según la fórmula (II) o una sulfonamida de acridinio según la fórmula (III) como se ha descrito con anterioridad según la presente invención;

(c) generar o proporcionar una fuente de peróxido de hidrógeno y un potenciador según la fórmula (I) como se ha descrito con anterioridad según la presente invención a la mezcla del paso (b);

(d) añadir una solución básica a la mezcla del paso (c) para generar una señal luminosa; y

(e) medir la señal luminosa generada o emitida en el paso d) y detectar el analito de interés en la muestra de ensayo.

En el inmunoensayo o método anterior, la muestra de ensayo puede ser sangre total, suero o plasma.

En otro aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante una composición quimioluminiscente de la presente invención o un kit de la presente invención para su uso en el diagnóstico de una enfermedad.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los inventores de que mediante el uso de un potenciador (compuesto) seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I) como se divulga en el presente documento se puede proporcionar una señal quimioluminiscente mejorada de un compuesto quimioluminogénico, que es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en una mezcla de reacción quimioluminiscente en una reacción quimioluminiscente.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la adición de un resto aromático en un grupo de cabeza cargado positivamente de una sustancia catiónica de amina cuaternaria mejora aún más la salida de la señal de quimioluminiscencia en comparación con las sustancias tradicionales, como el cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC). Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que la longitud de al menos tres átomos de carbono en la cola hidrófoba de dicha sustancia catiónica de amina cuaternaria tiene una importancia adicional para la mejora de la señal de quimioluminiscencia en comparación con las sustancias tradicionales, como el cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), y en comparación con las sustancias catiónicas de amina cuaternaria que tienen un resto aromático en el grupo de cabeza cargado positivamente pero que carecen de una longitud de al menos tres átomos de carbono en la cola hidrófoba.

En consecuencia, el nuevo método descrito según la presente invención (y los usos, composiciones, mezclas y/o sustancias relacionados) permite una cuantificación aún más sensible de analitos con concentración ultrabaja, pero también favorece la diferenciación de señal en inmunoensayos de quimioluminiscencia en general.

Los compuestos quimioluminiscentes potenciadores según la presente invención incluyen componentes simples con efectos potenciadores deseables para la quimioluminiscencia de compuestos quimioluminiscentes, específicamente compuestos quimioluminiscentes como de la fórmula (II) y/o fórmula

(III) según la presente invención. Las composiciones quimioluminiscentes de la presente invención proporcionan señales de quimioluminiscencia estables, duraderas y muy mejoradas, y pueden utilizarse en inmunoensayos de quimioluminiscencia, detección de sondas de ADN y análisis de quimioluminiscencia de manchas de proteínas biológicas de membrana. Las composiciones quimioluminiscentes de la presente invención pueden utilizarse ampliamente en los campos del diagnóstico clínico, la investigación científica, la detección medioambiental e higiénica y la identificación forense. En general, los compuestos quimioluminiscentes potenciadores según la presente invención están disponibles comercialmente y son baratos. Además, son adecuados para la producción de composiciones quimioluminiscentes en gran escala.

A menos que se indique lo contrario, los términos utilizados en el presente documento tienen el siguiente significado:

El término "potenciador", tal como se utiliza en el presente documento, significa que la emisión total de luz de la reacción quimioluminiscente y/o la relación señal/ruido de fondo de la reacción quimioluminiscente es mayor cuando se utiliza el potenciador según la presente invención que en ausencia del potenciador según la presente invención y/o en comparación con los denominados potenciadores que se han utilizado hasta la presente invención (es decir, cloruro de hexadeciltrimetilamonio; CTAC).

El término "alquilo", tal como se utiliza en el presente documento individualmente o en combinación con otros grupos, se refiere a grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que contienen 1-20 átomos de carbono, como 1-12, 1-8 y 1-6 átomos de carbono. La referencia a un único alquilo de cadena lineal, como "n-propilo", significa específicamente un grupo alquilo de cadena lineal, mientras que la referencia a un único alquilo ramificado, como "isopropilo", significa específicamente un grupo alquilo ramificado. Por ejemplo, "alquilo C₁₋₆" incluye alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₃, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y tert-butilo. Las mismas reglas se aplican a otros grupos utilizados a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, secbutilo, iso-butilo, tert-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo.

El término "alcoxi", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo alquilo, tal como se define en el presente documento, unido a la molécula madre a través de un átomo de oxígeno. Ejemplos representativos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, tert-butoxi, pentiloxi y hexiloxi.

El término "arilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo fenilo, o a un sistema de anillos fusionados bicíclicos o tricíclicos, en donde uno o más de los anillos fusionados es un grupo fenilo. Los sistemas de anillos bicíclicos fusionados se ejemplifican mediante un grupo fenilo fusionado a un grupo cicloalqueno, un grupo cicloalquilo u otro grupo fenilo. Los sistemas de anillos tricíclicos fusionados se ejemplifican mediante un sistema de anillos bicíclicos fusionados a un grupo cicloalqueno, un grupo cicloalquilo, tal como se define en el presente documento u otro grupo fenilo. Ejemplos representativos de arilo incluyen, pero no se limitan a antraceno, azuleno, fluoreno, indano, indeno, naftilo, fenilo y tetrahidronaftilo. Los grupos arilo de la presente divulgación pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

El término "acilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo -C(O)R_a, en donde R_a es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo. Ejemplos representativos de acilo incluyen, pero no se limitan a formilo, acetilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilmetilcarbonilo, benzoilo, bencilcarbonilo y similares.

El término "alqueno", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 20 carbonos y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono formado por la eliminación de dos hidrógenos. Ejemplos representativos de alqueno incluyen, pero no se limitan a eteno, 2-propeno, 2-metil-2-propeno, 3-butenilo, 4-pentenilo, 5-hexeno, 2-hepteno, 2-metil-1-hepteno y 3-deceno.

El término "alquino", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 20 átomos de carbono y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Ejemplos representativos de alquino incluyen, pero no se limitan a acetileno, 1-propino, 2-propino, 3-butino, 2-pentino y 1-butino.

El término "amido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido a la molécula madre a través de un grupo carbonilo (donde el término "grupo carbonilo" se refiere a un grupo -C(O)-).

El término "amino", tal como se utiliza en el presente documento, significa -NR_bR_c, en donde R_b y R_c se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y alquilcarbonilo.

El término "aralquilo", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo arilo añadido a la molécula madre a través de un grupo alquilo, tal como se define en el presente documento. Ejemplos representativos de arilalquilo incluyen, pero no se limitan a bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo y 2-naft-2-iletilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carboxi" o "carboxilo" se refiere a $-\text{CO}_2\text{H}$ o $-\text{CO}_2$.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "carboxialquilo" se refiere a un grupo $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2^-$, en donde n es de 1 a 20.

Como se utiliza en el presente documento, el término "ciano" significa un grupo $-\text{CN}$.

- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquenilo" se refiere a un sistema de anillos cíclicos o bicíclicos no aromáticos que tienen de tres a diez átomos de carbono y de uno a tres anillos, en donde cada anillo de cinco miembros tiene un doble enlace, cada anillo de seis miembros tiene uno o dos dobles enlaces, cada anillo de siete y ocho miembros tiene de uno a tres dobles enlaces, y cada anillo de nueve a diez miembros tiene de uno a cuatro dobles enlaces. Ejemplos representativos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclohexenilo, octahidronaftalenilo, norbornilenilo y similares. Los grupos cicloalquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillos hidrocarbonados monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos saturados que tienen de tres a doce átomos de carbono. Ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, biciclo[3.1.1]heptilo, adamantilo y similares. Los grupos cicloalquilo de la presente divulgación pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilalquilo" significa un grupo $-\text{R}_d\text{R}_e$, en donde R_d es un grupo alquilenilo y R_e es un grupo cicloalquilo. Un ejemplo representativo de un grupo cicloalquilalquilo es el ciclohexilmetilo, y similares.

- 25 El término "halogenuro" utilizado en el presente documento incluye el fluoruro, el cloruro, el bromuro y el yoduro.

Como se utiliza en el presente documento, el término "hidroxilo" significa un grupo $-\text{OH}$.

Como se utiliza en el presente documento, el término "nitro" significa un grupo $-\text{NO}_2$.

Como se utiliza en el presente documento, el término "oxoalquilo" se refiere a $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{R}_a$, en donde R_a es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo y donde n es de 1 a 20.

- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "fenilalquilo" significa un grupo alquilo que está sustituido por un grupo fenilo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sulfo" significa un grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ o un grupo $-\text{SO}_3^-$.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sulfoalquilo" se refiere a un grupo $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$, en donde n es de 1 a 20.

- 35 El término "soluble" se refiere a la ausencia de precipitado.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sulfamoilo" se refiere a $-\text{SO}_2\text{-NR}_1$, en donde R_1 selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo y alquilcarbonilo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sulfonamida" se refiere a cualquier amida de un ácido sulfónico.

- 40 El término "quimioluminiscencia", tal como se utiliza en el presente documento, es la luz generada en una reacción específica de una sustancia química. Las moléculas singlete se excitan y se forman al descomponerse los intermediarios de alta energía en una reacción química, luego las moléculas singlete excitadas vuelven al estado básico y parte de la energía se emite en forma de luminiscencia. Por lo tanto, las reacciones quimioluminiscentes incluyen dos procesos: un proceso de excitación y un proceso de luminiscencia. Parte de la energía molecular también se disipará en el estado excitado debido al cruce inter- e intrasistema.

- 45 En una realización preferida, el término "diagnóstico", tal como se utiliza en el presente documento, debe emplearse en su sentido más amplio posible y puede referirse a cualquier tipo de procedimiento destinado a obtener información instrumental para evaluar si un paciente, conocido o un sujeto anónimo de una cohorte, padece o es probable o más probable que la media o un sujeto comparativo, este último preferiblemente con síntomas similares, que padezca una determinada enfermedad o trastorno en el pasado, en el momento del
- 50

diagnóstico o en el futuro, averiguar cómo evoluciona o es probable que evolucione la enfermedad en el futuro o evaluar la capacidad de respuesta de un paciente o pacientes en general con respecto a un determinado tratamiento, por ejemplo, la administración de fármacos inmunosupresores, o averiguar si una muestra procede de un paciente de este tipo. Dicha información puede utilizarse para un diagnóstico clínico, pero también puede ser obtenida por un laboratorio experimental y/o de investigación con fines de investigación general, por ejemplo, para determinar la proporción de sujetos que padecen la enfermedad en una cohorte de pacientes o en una población. En otras palabras, el término "diagnóstico" comprende no solo diagnosticar, sino también pronosticar y/o monitorizar el curso de una enfermedad o trastorno, incluyendo la monitorización de la respuesta de uno o más pacientes a la administración de un fármaco o fármaco candidato, por ejemplo, para determinar su eficacia. Mientras que el resultado puede asignarse a un paciente específico para aplicaciones de diagnóstico clínico y puede comunicarse a un médico o institución que trate a dicho paciente, no es necesariamente el caso para otras aplicaciones, por ejemplo, en diagnósticos con fines de investigación, en donde puede ser suficiente asignar los resultados a una muestra de un paciente anónimo.

En una realización preferida, el término "diagnóstico" también puede referirse a un método o agente utilizado para elegir el régimen de tratamiento más prometedor para un paciente. En otras palabras, el método o agente puede estar relacionado con la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto. Por ejemplo, la detección de autoanticuerpos puede indicar que debe seleccionarse una terapia inmunosupresora, que puede incluir la administración al paciente de uno o más fármacos inmunosupresores.

Un método según la presente invención es preferiblemente un método *in vitro*.

Según la presente invención, el kit puede comprender instrucciones sobre cómo llevar a cabo el método según la presente invención.

En una realización preferida, cualquier método o uso según la presente invención puede estar destinado a un uso no diagnóstico, por ejemplo, determinar la presencia de un autoanticuerpo para un uso distinto del diagnóstico de un paciente. Por ejemplo, el método o uso puede ser para probar *in vitro* la eficacia de un dispositivo médico diseñado para eliminar un autoanticuerpo de la sangre de un paciente, en el que la prueba se realiza en un líquido distinto de la sangre del paciente.

En otra realización preferida, el método puede ser para confirmar la fiabilidad de un ensayo de diagnóstico y puede implicar la detección de un anticuerpo contra un polipéptido.

En una realización preferida, cualquier método o uso según la presente invención puede ser para identificar a un sujeto en riesgo de padecer o desarrollar una enfermedad y/o un tumor.

La Fig. 1 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-DMAE-NHS en presencia del 0,5 % (p/v) de tres compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo de cabeza aromático (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencil-amonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) del compuesto catiónico CTAC que carece de un grupo de cabeza aromático.

La Fig. 2 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-SA-NHS en presencia del 0,5 % (p/v) de tres compuestos catiónicos diferentes, cada uno de ellos con un grupo de cabeza aromático (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencil-amonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) del detergente catiónico CTAC que carece de un grupo de cabeza aromático.

La Fig. 3 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 0,1 µg/mL de IgG antihumana-Fcy-NSP-DMAE en presencia de 0,5 % (p/v) de tres compuestos catiónicos diferentes, cada uno de ellos con un grupo de cabeza aromático (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencil-amonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) del detergente catiónico CTAC que carece de un grupo de cabeza aromático.

La Fig. 4 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 0,1 µg/mL de IgG antihumana-Fcy-NSP-SA en presencia del 0,5 % (p/v) de tres compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo de cabeza aromático (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencil-amonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) del detergente catiónico CTAC que carece de un grupo de cabeza aromático.

La Fig. 5 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-DMAE-NHS en presencia del 0,5 % (p/v) de cuatro compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo aromático en la cabeza y una cola hidrófoba prolongada con al menos tres átomos de carbono (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: Cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencilamonio; compuesto 4: Cloruro de bencildimetildodecilamonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) de cloruro de benciltrietilamonio (BTEAC) que contenga un grupo de cabeza aromático pero carezca de

una cola hidrófoba prolongada o en presencia del 0,5 % (p/v) de CTAC que carezca de un grupo de cabeza aromático pero contenga una cola hidrófoba prolongada.

La Fig. 6 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-SA-NHS en presencia del 0,5 % (p/v) de cuatro compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo aromático en la cabeza y una cola hidrófoba prolongada con al menos tres átomos de carbono (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: Cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencilamonio; compuesto 4: Cloruro de bencildimetildodecilamonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) de BTEAC que contenga un grupo de cabeza aromático pero carezca de una cola hidrófoba prolongada o en presencia del 0,5 % (p/v) de CTAC que carezca de un grupo de cabeza aromático pero contenga una cola hidrófoba prolongada.

La Fig. 7 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 0,1 µg/mL de IgG antihumana-Fcy-NSP-DMAE en presencia del 0,5 % (p/v) de cuatro compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo aromático en la cabeza y una cola hidrófoba prolongada con al menos tres átomos de carbono (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: Cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencilamonio; compuesto 4: Cloruro de bencildimetildodecilamonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) de BTEAC que contenga un grupo de cabeza aromático pero carezca de una cola hidrófoba prolongada o en presencia del 0,5 % (p/v) de CTAC que carezca de un grupo de cabeza aromático pero contenga una cola hidrófoba prolongada.

La Fig. 8 muestra la cinética de quimioluminiscencia de 0,1 µg/mL de IgG antihumana-Fcy-NSP-SA en presencia del 0,5 % (p/v) de cuatro compuestos catiónicos diferentes, cada uno con un grupo aromático en la cabeza y una cola hidrófoba prolongada con al menos tres átomos de carbono (compuesto 1: Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; compuesto 2: Cloruro de benzalconio; compuesto 3: Cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencilamonio; compuesto 4: Cloruro de bencildimetildodecilamonio) o en presencia del 0,5 % (p/v) de BTEAC que contenga un grupo de cabeza aromático pero carezca de una cola hidrófoba prolongada o en presencia del 0,5 % (p/v) de CTAC que carezca de un grupo de cabeza aromático pero contenga una cola hidrófoba prolongada.

La presente invención se ilustra, además, mediante los siguientes ejemplos, secuencias y figuras de los que pueden extraerse otras características, realizaciones, aspectos y ventajas de la presente invención.

Ejemplos

Preparación de la etiqueta de acridinio y de las soluciones conjugadas:

Se prepararon soluciones madre de 1 mg/mL de N-sulfopropil-dimetil-acridinio-N-hidroxisuccinimida (NSP-DMAE-NHS; PerkinElmer Inc., Finlandia) y N-sulfopropil-acridinio-sulfonamida-N-hidroxisuccinimida (NSP-SA-NHS; BOC Sciences, EE. UU.) en N,N-dimetilformamida al 100% (v/v) (Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG, Alemania). AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fey fragment specific (Anti-human IgG-Fcy; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., RU) se diluyó a una concentración final de 0,33 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,6 y se incubó posteriormente con un exceso molar 10 veces superior de NSP-DMAE-NHS o con un exceso molar 2,5 veces superior de NSP-SA-NHS durante 2 h a temperatura ambiente en un Intelli-Mixer, modelo RM-2M (Hassa GmbH, Alemania) a 10 rpm. Las reacciones de etiquetado se detuvieron con la adición de 17,4 mM de L-lisina (VWR International GmbH, Alemania) durante 30 min a temperatura ambiente durante la rotación a 10 rpm. El exceso de etiqueta libre se eliminó de los conjugados de anticuerpos durante la ultrafiltración a 3.800 g en una centrifugadora Heraeus Megafuge 40R (Fisher Scientific GmbH, Alemania) a 4 °C utilizando un concentrador Vivaspin 20, con corte de peso molecular de 10 kDa (VWR International GmbH, Alemania) y el tampón se cambió por solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 que contenía 0,045 % (p/v) de azida sódica (Merck KGaA, Alemania). Los conjugados de anticuerpos purificados se almacenaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,045 % (p/v) de azida sódica, 1 % (p/v) de albúmina sérica bovina (Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG, Alemania), 0,3 % (p/v) Kolliphor® P 188 (Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG, Alemania) y sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético 0,5 mM (Gerbu Biotechnik GmbH, Alemania).

Preparación de soluciones activadoras de la quimioluminiscencia:

Se prepararon la solución desencadenante de quimioluminiscencia A, que contenía ácido nítrico 100 mM (VWR International GmbH, Alemania) y peróxido de hidrógeno al 0,2 % (v/v) (Roth GmbH & Co. KG, Alemania), y la solución desencadenante B, que contenía hidróxido de sodio 0,5 M (Gerbu Biotechnik GmbH, Alemania). La solución desencadenante B se utilizó sin detergente o complementada con 0,05, 0,1, 0,25 o 0,5 % (p/v) de los compuestos catiónicos cloruro de hexadeciltrimetilamonio (Merck KGaA, Alemania), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Merck KGaA, Alemania) o cloruro de tetradeciltrimetilamonio (Merck KGaA, Alemania), todos los cuales carecen de un grupo de cabeza aromático. Alternativamente, la solución desencadenante B se complementó con 0,05, 0,1, 0,25 o 0,5 % (p/v) de los compuestos catiónicos cloruro de hexadecilbencilmetilamonio (Merck KGaA, Alemania; CAS 122-18-9), cloruro de benzalconio (Merck KGaA,

Alemania; CAS 63449-41-2), cloruro de alquil(C₁₂-C₁₄)dimetiletilbencilamonio (Alfa Chemistry, EE.UU.; CAS 85409-23-0) o cloruro de bencildimetildodecilamonio (VWR International GmbH, Alemania; CAS 139-07-1), todos los cuales contienen un grupo de cabeza aromático, o con cloruro de bencitrietilamonio (Merck KGaA, Alemania), que contiene un grupo de cabeza aromático pero carece de una cola hidrófoba prolongada de al menos tres átomos de carbono.

Medición de las intensidades de las señales de quimioluminiscencia:

Las soluciones madre de las etiquetas NSP-DMAE-NHS y NSP-SA-NHS se diluyeron hasta una concentración final de 1 nM y los conjugados de anticuerpos se diluyeron hasta una concentración final de 0,1 µg/mL en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Se transfirieron 10 µL de cada una de estas diluciones a un pocillo de una placa LumiNunc™ de 96 pocillos (VWR International GmbH, Alemania) y se midieron las intensidades de las señales de quimioluminiscencia en un luminómetro de microplacas LB 960 Centro (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Alemania) en presencia de 100 µL cada uno de activador de quimioluminiscencia A y de diferentes soluciones de activador B, variando estas últimas en la identidad y concentración del compuesto catiónico. Tras la inyección del activador A a velocidad media, las mezclas se incubaron durante 1 segundo durante el mezclado en modo de órbita doble a velocidad normal. Las intensidades de quimioluminiscencia en unidades luminosas relativas (RLU) se registraron cada 50 ms durante un tiempo total de 1,5 s tras la adición de las distintas soluciones de activación B con baja velocidad de inyección. Todas las muestras se midieron en cuatro réplicas técnicas. En los experimentos de control, se inyectaron todas las soluciones diferentes del activador B en combinación con el activador A en pocillos vacíos de la placa de 96 pocillos. Estos últimos experimentos reflejan el fondo de señal generado por las distintas soluciones desencadenante.

Análisis de datos:

Para la presentación gráfica de la cinética de quimioluminiscencia observada, se eligió un conjunto de datos representativos de las cuatro réplicas técnicas y se trazaron las intensidades de señal en RLU frente al tiempo. Además, se calcularon las intensidades de señal totales sumando todos los valores de RLU observados en el intervalo de tiempo de 1,5 segundos. Las intensidades de la señal de fondo de las diferentes soluciones de disparo B se restaron de las intensidades de la señal total y todas las intensidades de la señal total con corrección de fondo se establecieron en comparación.

Ejemplo 1

Para el análisis se eligieron tres compuestos potenciadores representativos (compuestos 1-3) según la presente invención. Todas estas moléculas se basan en un compuesto catiónico de amonio cuaternario que contiene un resto aromático adyacente al amonio cuaternario. Los compuestos potenciadores según la presente invención se probaron frente a una sustancia potenciadora común CTAC (como por ejemplo se propone en el documento US 4.927.769). En cambio, el CTAC no contiene un resto aromático adyacente al amonio cuaternario.

Se eligieron cuatro analitos representativos para investigar el efecto de los compuestos potenciadores según la presente invención en comparación con la sustancia potenciadora común ya conocida en la técnica anterior sobre la señal de quimioluminiscencia generada por estos analitos (**Fig. 1-4**). Los analitos elegidos incluyen los compuestos de acridinio NSP-DMAE-NHS y NSP-SA-NHS en forma libre (**Fig. 1-2**) y en forma unida a anticuerpos (**Fig. 3-4**). Se eligió un anticuerpo policlonal anti-humano IgG- Fcy de cabra para conjugarlo con ambos tipos de etiqueta de acridinio.

La etiqueta de acridinio, las soluciones conjugadas y las soluciones activadoras de quimioluminiscencia se obtuvieron según los métodos descritos con anterioridad. Se midieron las intensidades de las señales de quimioluminiscencia y los datos se analizaron como se ha descrito con anterioridad.

Resultados:

Se observó un aumento del 43 % en el rendimiento de la señal utilizando cloruro de bencildimetilhexadecilamonio (compuesto 1) con el analito NSP-DMAE-NHS (**Fig. 1, Tabla 3**) en comparación con la sustancia potenciadora CTAC para el mismo analito.

El cloruro de benzalconio (compuesto 2) y el cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄) dimetiletilbencilamonio (compuesto 3) también dieron lugar a un aumento de la señal del 19 % y el 15 % en comparación con la CTAC con NSP-DMAE-NHS como analito, respectivamente.

Se obtuvo un resultado similar cuando se cambió el analito a NSP-SA-NHS (**Fig. 2, Tabla 3**).

El compuesto 1 (cloruro de bencildimetilhexadecilamonio) produjo un aumento de la señal del 67 % en comparación con la sustancia CTAC. Además, se observó un aumento de la señal del 58 % y el 40 % con los compuestos 2 y 3 para este analito en comparación con el CTAC, respectivamente.

Además, se observó que la mejora de la señal de salida observada para ambos ejemplos de sondas basadas en acridinio en forma libre también podía observarse cuando las sondas se unían covalentemente a un anticuerpo, este último normalmente necesario para los inmunoensayos.

En este escenario, el compuesto 1 (cloruro de bencildimetilhexadecilamonio) condujo a un aumento de señal del 45 % y del 66 % para los analitos anti-humanos IgG-Fcy-NSP-DMAE (**Fig. 3, Tabla 3**) y anti-humano IgG-Fcy-NSP-SA (**Fig. 4, Tabla 3**), respectivamente, en comparación con la generación de señal para dichos analitos en presencia de CTAC. El compuesto 2 (cloruro de benzalconio) también aumentó la señal de estos dos conjugados de anticuerpos en un 40 % y un 52 %, respectivamente. Además, se observó un aumento del 25 % y del 35 % de la señal en presencia del compuesto 3 (cloruro de alquil (C₁₂-C₁₄) dimetiletilbencilamonio) para los dos analitos en comparación con la generación de señal en presencia de CTAC.

Tabla 3:

Comparación de las intensidades de señal totales con corrección de fondo de cuatro analitos diferentes en presencia del 0,5 % (p/v) de tres compuestos potenciadores catiónicos diferentes, cada uno con un grupo de cabeza aromático (compuestos 1-3) o en presencia del 0,5 % (p/v) del detergente catiónico CTAC que carece de un grupo de cabeza aromático.

Compuesto	Analito			
	NSP-DMAE-NHS	NSP-SA-NHS	IgG-Fcy-NSP-DMAE antihumano	IgG-Fcy-NSP-SA antihumano
Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio (compuesto 1)	4712949 RLU (+43 %)	3631369 RLU (+67 %)	2707416 RLU (+45 %)	1449182 RLU (+66 %)
Cloruro de benzalconio (compuesto 2)	3913778 RLU (+19 %)	3432574 RLU (+58 %)	2621080 RLU (+40 %)	1325083 RLU (+52 %)
Cloruro de alquil (C ₁₂ -C ₁₄)dimetiletilbencilamonio (compuesto 3)	3809207 RLU (+15 %)	3042201 RLU (+40 %)	2339403 RLU (+25 %)	1175726 RLU (+35 %)
CTAC	3299926 RLU	2169527 RLU	1871550 RLU	872358 RLU

Ejemplo 2

Descripción

Para comprobar el efecto de la longitud de la cadena dentro de la cola hidrófoba de las sustancias sobre la mejora de la quimioluminiscencia, se realizaron más experimentos con los compuestos 1-3 (como se describe en el Ejemplo 1), con el potenciador común CTAC, con un potenciador catiónico adicional según la presente invención (compuesto 4; cloruro de bencildimetildodecilamonio) y con la sustancia adicional BTEAC (cloruro de bencildimetilamonio), que contiene una longitud de cadena de menos de tres átomos de carbono en la cola hidrófoba (**Fig. 5 - 8**). Estos experimentos adicionales se realizaron como se ha descrito con anterioridad y como se describe en el Ejemplo 1, respectivamente.

Resultados:

De forma similar a los compuestos 1-3, el compuesto 4 potenció la quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-DMAE-NHS (**Fig. 5**), de 1 nM de NSP-SA-NHS (**Fig. 6**), de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-DMAE antihumano (**Fig. 7**) y de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-SA antihumano (**Fig. 8**) en comparación con el potenciador común CTAC. En este experimento, los compuestos 1-3 aumentaron la quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-DMAE-NHS en un 45 - 79 %, de 1 nM de NSP-SA-NHS en un 62 - 102 %, de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-DMAE antihumano en un 46 - 63 % y de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-SA antihumano en un 47 - 50% en comparación con el potenciador común CTAC (**Tab. 4**). Del mismo modo, el compuesto 4 aumentó la quimioluminiscencia de 1 nM de NSP-DMAE-NHS en un 50 %, de 1 nM de NSP-SA-NHS en un 47 %, de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-DMAE antihumano en un 50 % y de 0,1 µg/mL de IgG-Fcy-NSP-SA antihumano en un 40 % en comparación con el potenciador común CTAC (**Tab. 4**).

Para BTEAC, se observó una quimioluminiscencia reducida con los cuatro analitos en comparación con el potenciador común CTAC (**Fig. 5-8 y Tab. 4**). Aunque esta sustancia contiene un grupo de cabeza aromático, esta sustancia no funciona como un potenciador de quimioluminiscencia equivalente, muy probablemente y sin estar ligado a ninguna teoría, porque la longitud de la cadena de la cola hidrófoba es demasiado corta para formar estructuras micelares.

Tabla 4: Comparación de las intensidades de señal totales con corrección de fondo de cuatro analitos diferentes en presencia del 0,5 % (p/v) de cuatro compuestos potenciadores catiónicos diferentes, cada uno con un grupo principal aromático y una cola hidrófoba prolongada con al menos tres átomos de carbono (compuestos 1-4) o en presencia del 0,5 % (p/v) de cloruro de benciltrietilamonio (BTEAC) que contiene un grupo de cabeza aromático pero que carece de una cola hidrófoba prolongada o en presencia del 0,5 % (p/v) del detergente catiónico CTAC que carece de un cabeza aromática pero que contiene una cola hidrófoba prolongada.

Compuesto	Analito			
	NSP-DMAE-NHS	NSP-SA-NHS	IgG-Fcy-NSP-DMAE antihumano	IgG-Fcy-NSP-SA antihumano
Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio (compuesto 1)	9285851 RLU (+74%)	7687351 RLU (+86%)	2545936 RLU (+55%)	13400308 RLU (+48%)
Cloruro de benzalconio (compuesto 2)	9554986 RLU (+79%)	8351873 RLU (+102%)	2667518 RLU (+63%)	13568679 RLU (+50%)
Cloruro de alquil (C ₁₂ -C ₁₄)dimetiletilbencilamonio (compuesto 3)	7746405 RLU (+45%)	6669609 RLU (+62%)	2389234 RLU (+46%)	13333146 RLU (+47%)
Cloruro de bencildimetildodecilamonio (compuesto 4)	8015307 RLU (+50%)	6074325 RLU (+47%)	2450210 RLU (+50%)	12677099 RLU (+40%)
BTEAC	3663184 RLU (-31%)	1939935 RLU (-53%)	676605 RLU (-59%)	5143731 RLU (-43%)
CTAC	5333619 RLU	4125130 RLU	1637564 RLU	9041121 RLU

En conjunto, los datos obtenidos en los ejemplos descritos muestran que los cuatro compuestos ensayados que representan ejemplos de potenciadores presentados por la presente invención fueron capaces de aumentar la señal generada por todos los analitos basados en acridinio ensayados en comparación con la señal generada por los mismos analitos basados en acridinio en presencia de un potenciador común, como CTAC.

Además, todos estos nuevos potenciadores de la quimioluminiscencia comparten una estructura molecular que contiene un compuesto catiónico de amonio cuaternario unido a un resto aromático, es decir, un grupo de cabeza aromático, y una longitud de cadena mínima de al menos tres átomos de carbono en la cola hidrófoba del potenciador. Es probable que todas las sustancias que contienen estas moléculas, es decir, el grupo aromático de la cabeza y la longitud mínima de la cadena de al menos tres átomos de carbono en la cola hidrófoba, aumenten de manera similar la quimioluminiscencia generada por los analitos basados en acridinio en comparación con las sustancias potenciadoras que carecen de estas moléculas, es decir, el grupo aromático de la cabeza y la longitud mínima de la cadena de al menos tres átomos de carbono en la cola hidrófoba. Las sustancias con una longitud de cadena más corta en la cola hidrófoba no potencian en forma similar la quimioluminiscencia, muy probablemente porque no forman estructuras micelulares, que se supone que favorecen la potenciación de la quimioluminiscencia. Sin estar limitado por la teoría, se cree además que los potenciadores de quimioluminiscencia catiónicos recién presentados según la presente invención favorecen el proceso de reacción de quimioluminiscencia por interacción directa con el anillo de acridinio formando las denominadas interacciones hidrófobas de apilamiento π - π . De este modo, la etiqueta de acridinio puede ser reclutada y posicionada eficazmente para reaccionar con el anión peróxido de hidrógeno, atraído este último por la carga positiva del ion amonio catiónico adyacente.

Los datos, figuras, instrumentos, reactivos y pasos expuestos en el presente documento deben entenderse como

ilustrativos, pero no restrictivos. Aunque la presente divulgación se describió con referencia a las realizaciones concretas anteriores, muchas modificaciones y variantes serán evidentes para los expertos en la técnica. Todas las modificaciones y variantes entran también en el ámbito de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

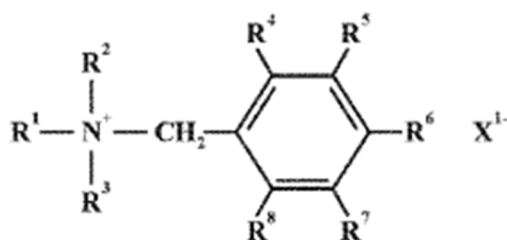
REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la señal quimioluminiscente de un compuesto quimioluminogénico en una mezcla de reacción quimioluminiscente en una reacción quimioluminiscente que comprende oxidar el compuesto quimioluminogénico en presencia de una cantidad eficaz de un potenciador para obtener una señal quimioluminiscente mejorada,

en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio,

en donde dicho potenciador es un compuesto o una mezcla de dos, tres o más compuestos, y

en donde dicho compuesto potenciador o cada uno de los compuestos potenciadores se selecciona del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



fórmula (fórmula (I))

en donde R¹ es alquilo o alquenilo C₃-C₂₀; y R¹ y R² son independientemente entre sí alquilo o alquenilo C₁-C₄; y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X¹⁻ es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

- R¹ es alquilo C₅-C₁₈ o alquenilo;

- R² y R³ son, independientemente entre sí, metilo, etilo, propilo o butilo, preferiblemente metilo;

- R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo, preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo; y/o

X¹⁻ es cloruro o bromuro, preferiblemente cloruro.

3. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho potenciador, al menos un compuesto de dicho potenciador o cada compuesto de dicho potenciador se selecciona del grupo que consiste en

Cloruro de bencildimetilsilamonio,

Cloruro de bencildimetilnonadecilamonio,

Cloruro de bencildimetiloctadecilamonio,

Cloruro de bencildimetilheptadecilamonio,

Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio,

Cloruro de bencildimetilpentadecilamonio,

Cloruro de bencildimetiltetradecilamonio,

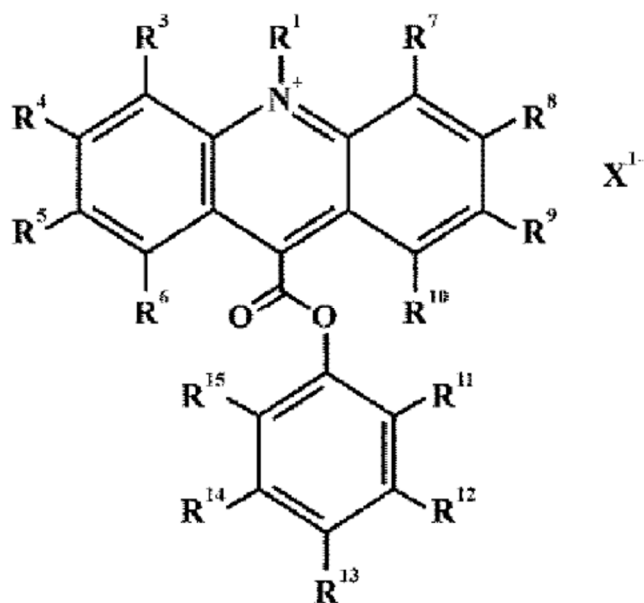
Cloruro de bencildimetiltradecilamonio,

Cloruro de bencildimetildodecilamonio,

- Cloruro de bencildimetildecilamonio,
 Cloruro de bencildimetiletilamonio,
 Cloruro de bencildimetilnonilamonio,
 Cloruro de bencildimetiloctilamonio,
 5 Cloruro de benzalconio,
 Cloruro de bencildimetilheptilamonio,
 Cloruro de bencildimetilhexilamonio,
 Cloruro de bencildimetilpentilamonio,
 Cloruro de bencildimetilbutilamonio,
 10 Cloruro de bencildimetilpropilamonio,
 Cloruro de benciltripropilamonio,
 Cloruro de bencildipropiletilamonio,
 Cloruro de bencildietilpropilamonio,
 Cloruro de bencildipropilmetilamonio,
 15 Cloruro de bencilpropiletilmetilamonio,
 Cloruro de bencilbutilamonio,
 Cloruro de bencildibutilpropilamonio,
 Cloruro de bencildipropilbutilamonio,
 Cloruro de bencilobutilpropiletilamonio,
 20 Cloruro de bencilbutilpropilmetilamonio,
 Cloruro de bencilobutiletilmetilamonio,
 Cloruro de bencildietilbutilamonio,
 Cloruro de alquil C₁₂₋₁₄-dimetil(etilbencil) amonio,
 Cloruro de dodecil(etilbencil)dimetilamonio,
 25 Cloruro de tetradecildimetil(etilbencil)amonio,
 Cloruro de octadecildimetil(ar-etilbencil) amonio, y los respectivos compuestos antes mencionados que contienen bromuro en lugar de cloruro.
- 30 4. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad eficaz de dicho potenciador en la mezcla de reacción quimioluminiscente es del 0,001 % en peso por volumen (p/v) o mayor, preferiblemente del 0,01 % en p/v, más preferiblemente del 0,1 % en p/v o mayor, más preferiblemente del 0,2 % en p/v o mayor, en cada caso en base al volumen total de la mezcla de reacción quimioluminiscente.
- 35 5. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde el potenciador se combina con el compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente antes, simultáneamente o poco después del inicio de la reacción quimioluminiscente, preferiblemente el potenciador se combina con el compuesto quimioluminogénico en la mezcla de reacción quimioluminiscente simultáneamente al inicio de la reacción quimioluminiscente.
- 40 6. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la señal quimioluminiscente generada por la reacción quimioluminiscente se detecta durante una duración fija de tiempo, preferiblemente, se forma la mezcla de reacción quimioluminiscente, se inicia la reacción quimioluminiscente y se detecta la señal de modo simultáneo, más preferiblemente la duración de la detección oscila entre 0,01 y 360 segundos, aún más preferiblemente, de 0,1 a 30 segundos, aún más preferiblemente, de 0,3 a 15 segundos, y lo

más preferiblemente, de 0,5 a 10 segundos, en donde, en cada caso, la duración de la detección comienza con el inicio de la reacción quimioluminiscente.

- 5 7. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la mezcla de reacción quimioluminiscente incluye, además, peróxido de hidrógeno, ácido nítrico y/o hidróxido de sodio.
8. Un método de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto quimioluminógeno es un éster de acridinio según la fórmula (II)



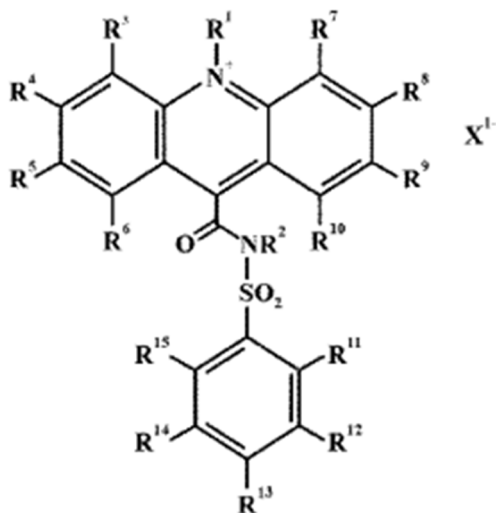
fórmula (II)

en donde R¹ es un alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo o aralquilo, sulfoalquilo, carboxialquilo y oxoalquilo; y

- 10 en donde R³ a R¹⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo o aralquilo, amino, amido, acilo, alcoilo, hidroxilo, carboxilo, halógeno, halogenuro, nitro, ciano, sulfo, sulfoalquilo, sulfamoilo, carboxialquilo, éster succinimídico y oxoalquilo o cualquier otro grupo saliente; y

opcionalmente, si está presente, X¹⁻ es un anión;

- 15 o una sulfonamida de acridinio según la fórmula (III)



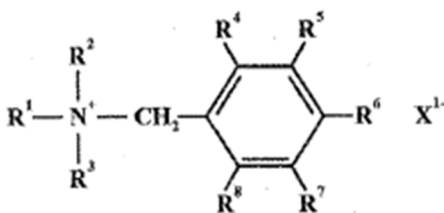
fórmula (III)

en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo, sulfoalquilo, carboxialquilo y oxoalquilo, y

en donde R^2 a R^{15} se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o aralquilo, amino, amido, acilo, alcoxilo, hidroxilo, carboxilo, halógeno, halogenuro, nitro, ciano, sulfo, sulfoalquilo, sulfamoilo, carboxialquilo, succinimidilo y oxoalquilo o cualquier otro grupo saliente; y

opcionalmente, si está presente, X^{1-} es un anión.

9. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



fórmula (I)

en donde R^1 es alquilo C_3 - C_{20} o alquenilo; y R^2 y R^3 son independientemente entre sí alquilo C_1 - C_4 o alquenilo; y R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X^{1-} es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro, para aumentar la señal quimioluminiscente de un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en una reacción quimioluminiscente, preferiblemente en un inmunoensayo quimioluminiscente.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde

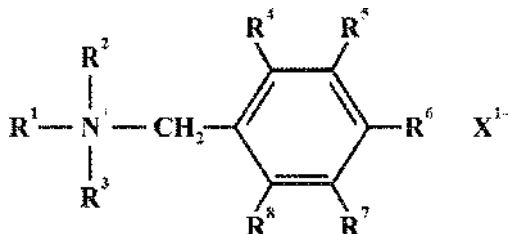
R^1 es alquilo C_5 - C_{18} o alquenilo;

R^2 y R^3 son independientemente entre sí metilo, etilo, propilo o butilo, preferiblemente metilo,

R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo, preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo; y/o

X^{1-} es cloruro o bromuro, preferiblemente cloruro.

11. Una composición quimioluminiscente que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I),



fórmula (I)

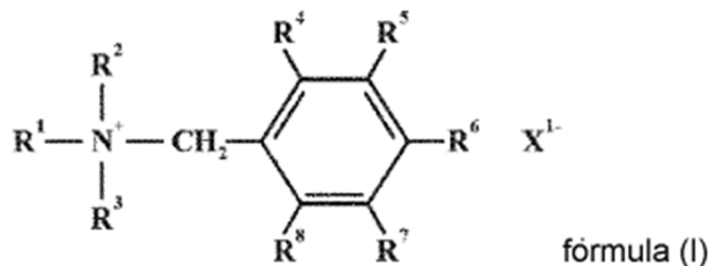
en donde R^1 es alquilo C_3 - C_{20} o alquenilo; y R^2 y R^3 son independientemente entre sí alquilo C_1 - C_4 o alquenilo; y R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X^{1-} es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro, y al menos un compuesto quimioluminógeno, en donde el compuesto quimioluminógeno es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes.

12. Un kit, preferiblemente para aumentar la quimioluminiscencia de un compuesto quimioluminogénico, que comprende al menos un compuesto quimioluminogénico, en donde el compuesto quimioluminogénico es un compuesto de acridinio, preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, más

preferiblemente un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio de la fórmula (II) o de la fórmula (III) de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes

y

- 5 uno, dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en sustancias catiónicas de amina cuaternaria de la fórmula (I)



en donde R¹ es alquilo C₃-C₂₀ o alquenilo; y R² y R³ son independientemente entre sí alquilo C₁-C₄ o alquenilo; y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, alquenilo; y X¹⁻ es halogenuro o ion hidroxilo, preferiblemente cloruro o bromuro.

- 10 13. Un kit de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende un portador de utilidad diagnóstica, preferiblemente un portador sólido, que comprende un medio para capturar un antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo en una solución líquida y un medio para detectar el antígeno, el anticuerpo o el autoanticuerpo unido al portador,

- 15 en donde los medios para detectar el antígeno, anticuerpo o autoanticuerpo unido al portador están marcados con al menos un compuesto quimioluminogénico.

14. Una composición quimioluminiscente de acuerdo con la reivindicación 11 o un kit de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para su uso en el diagnóstico de una enfermedad.

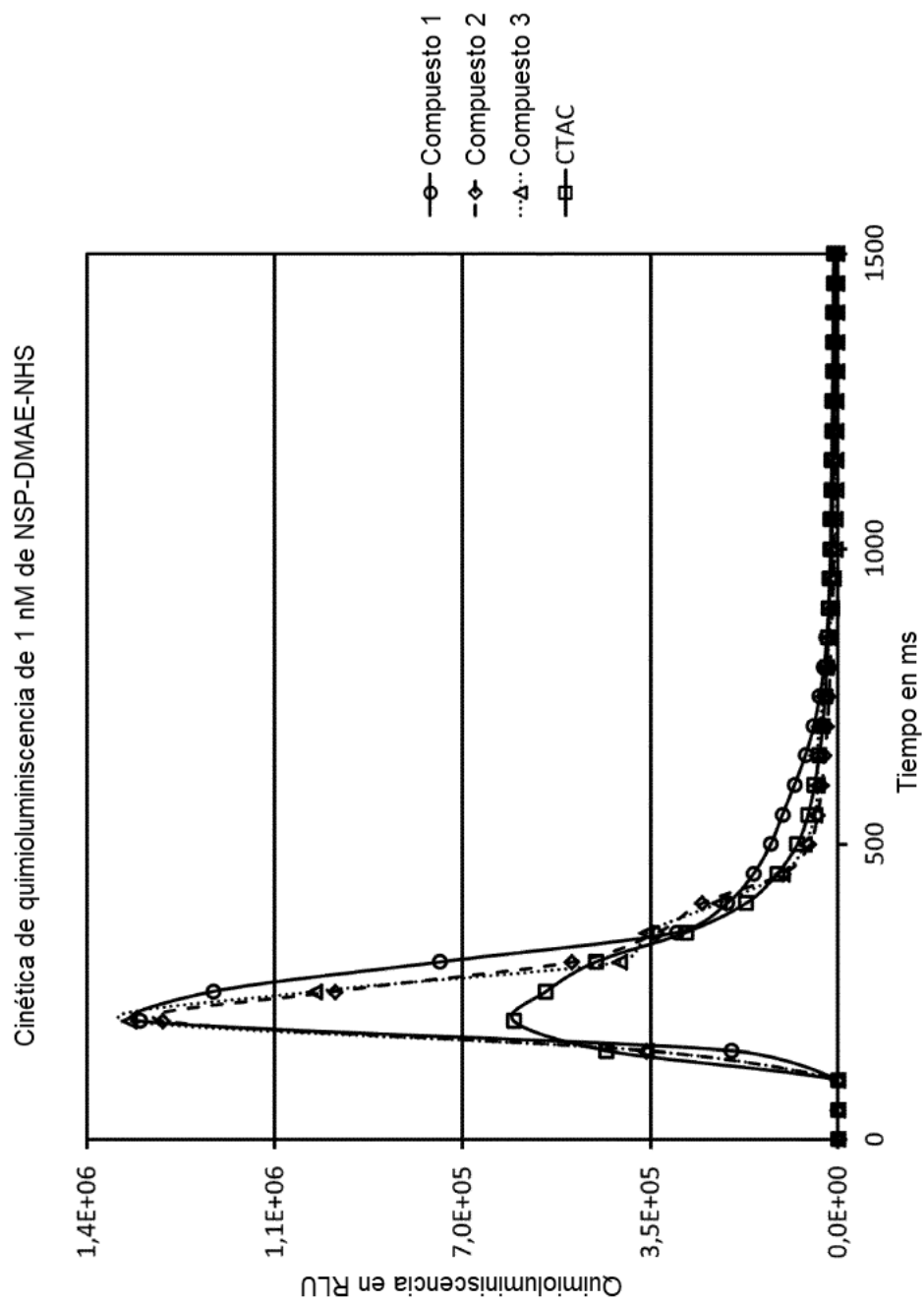


Fig. 1

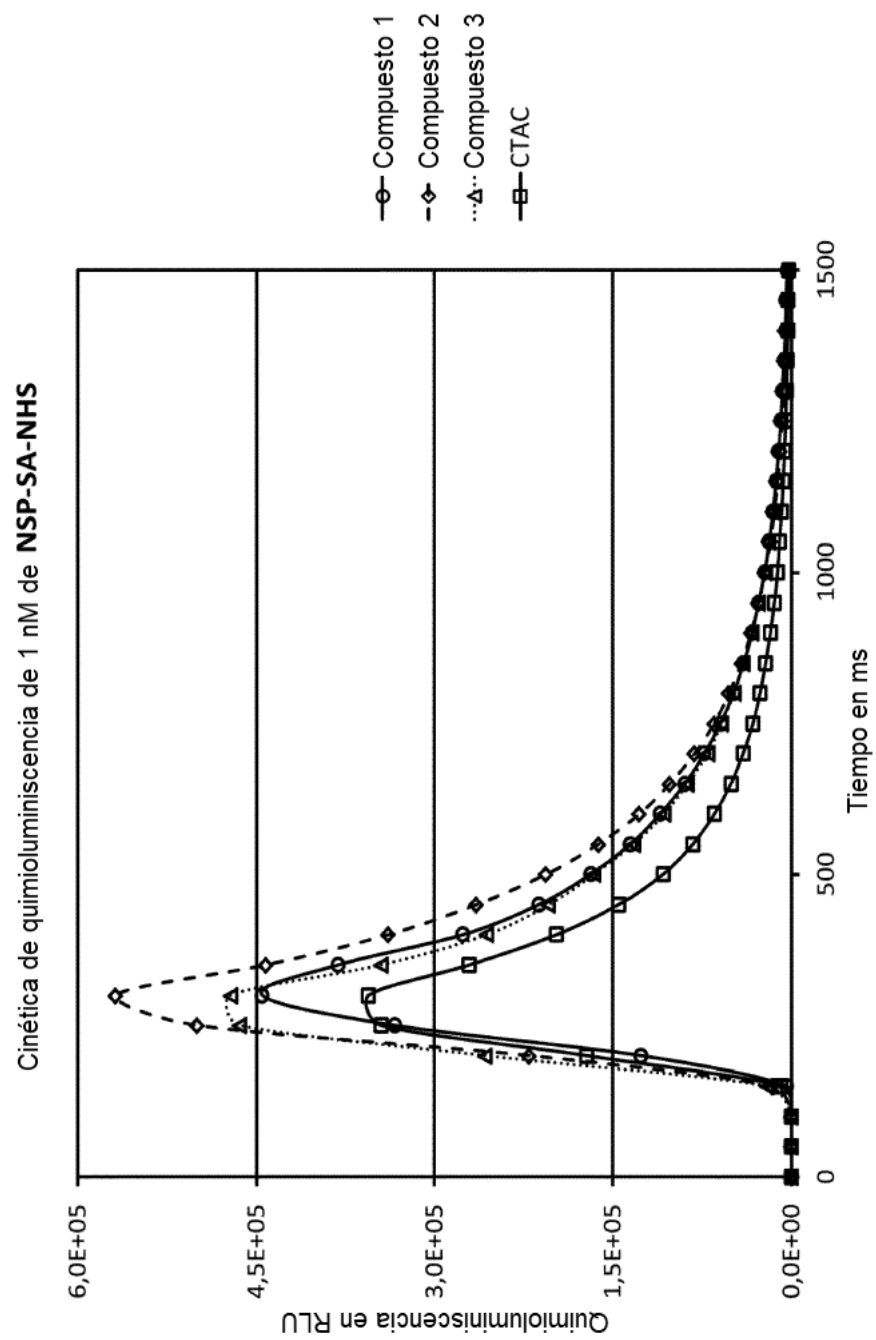


Fig. 2

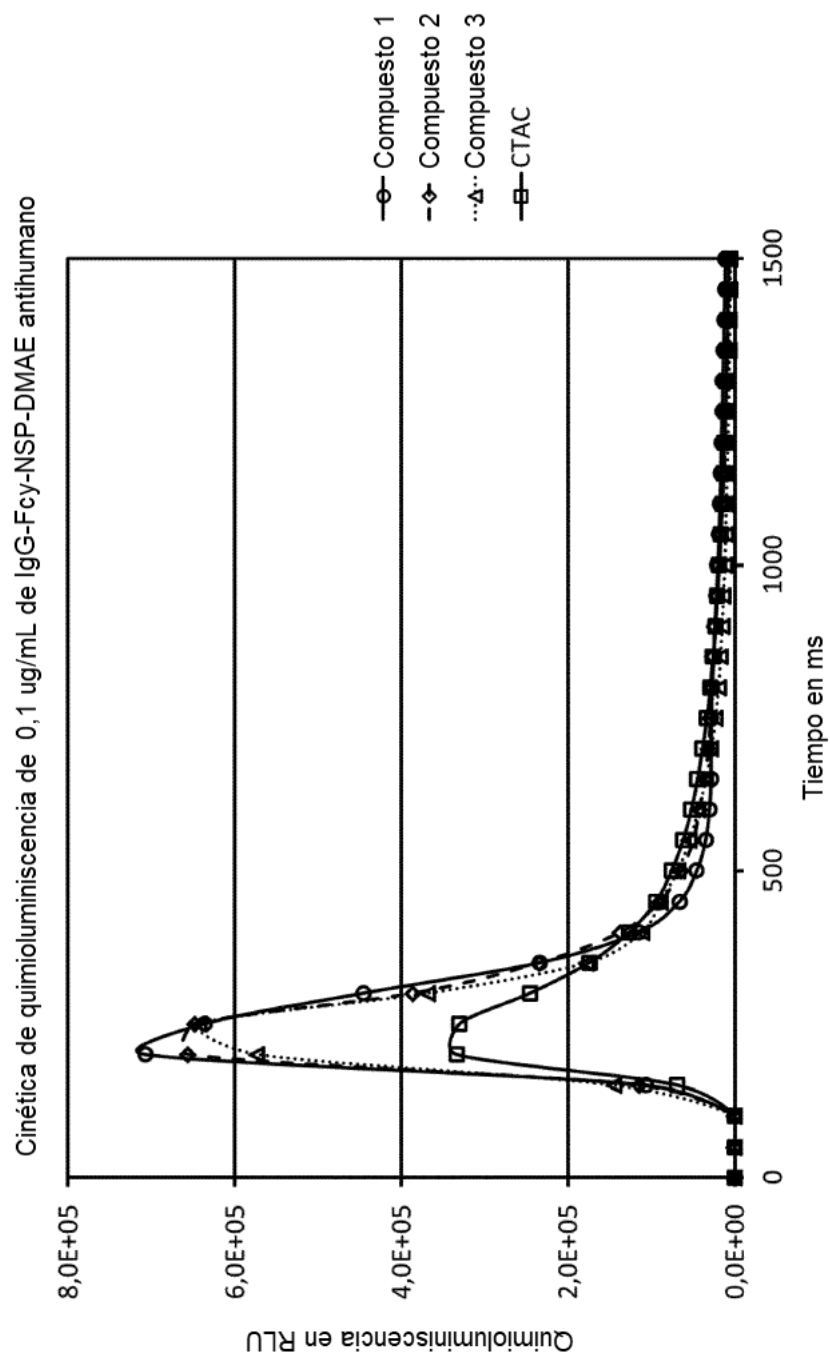


Fig. 3

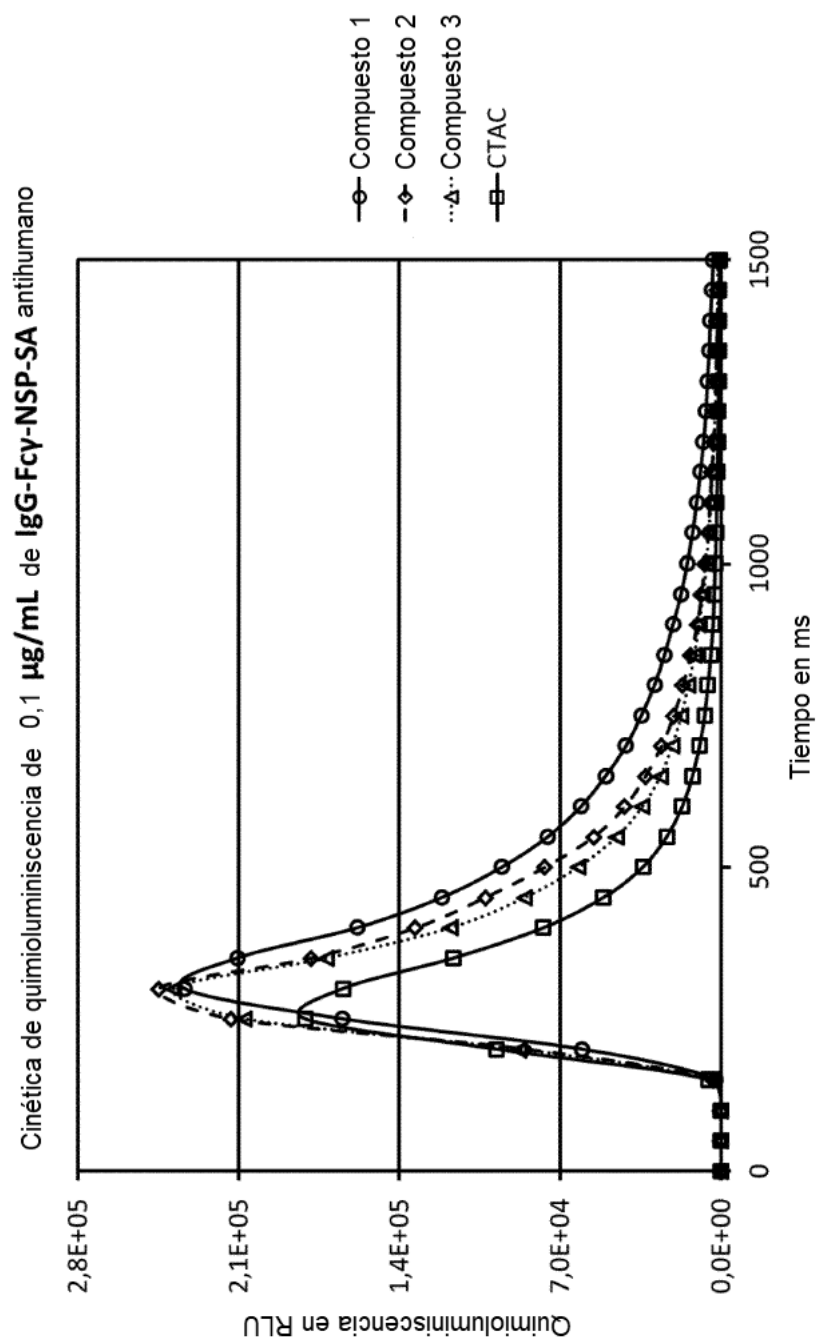


Fig. 4

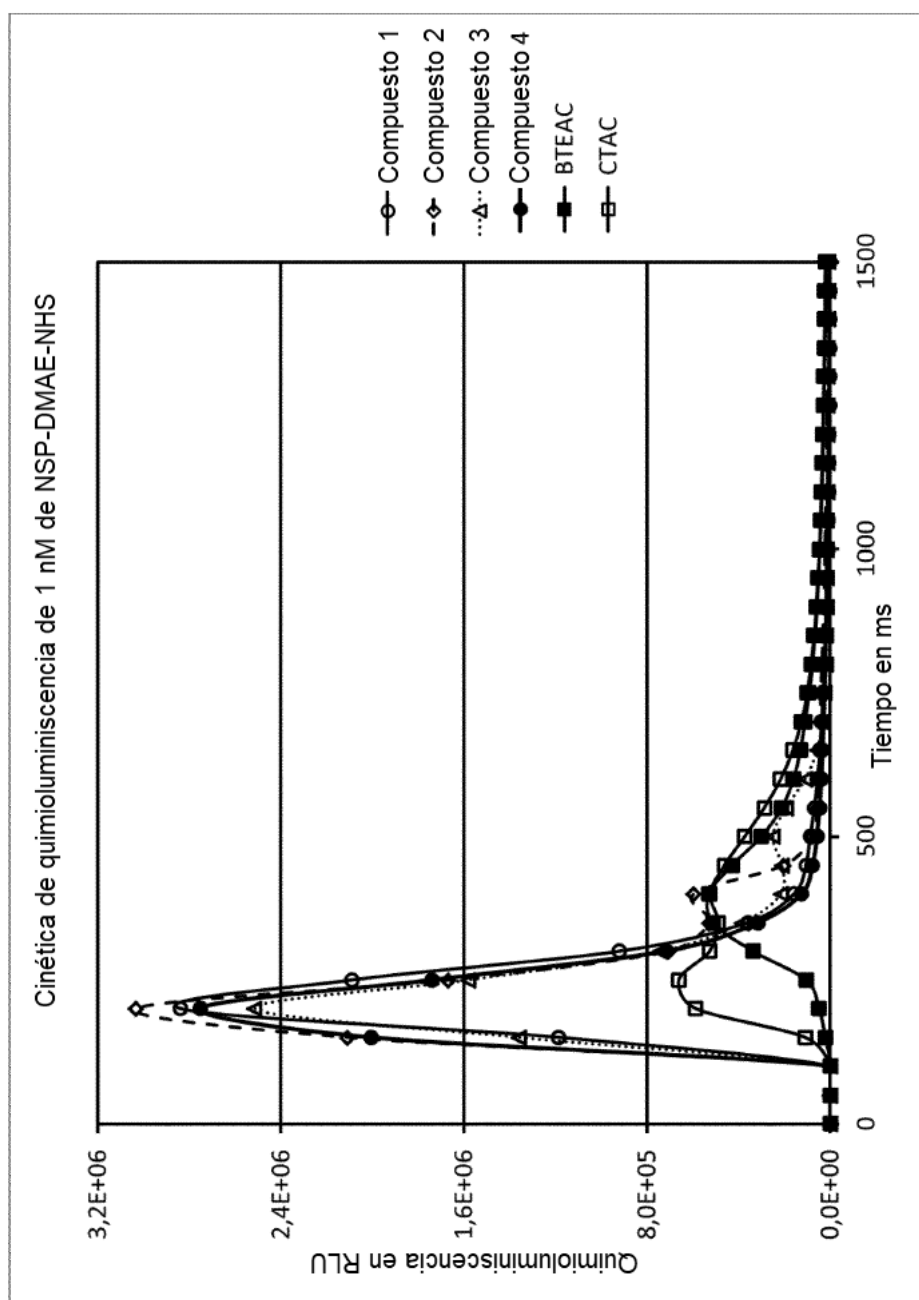


Fig. 5

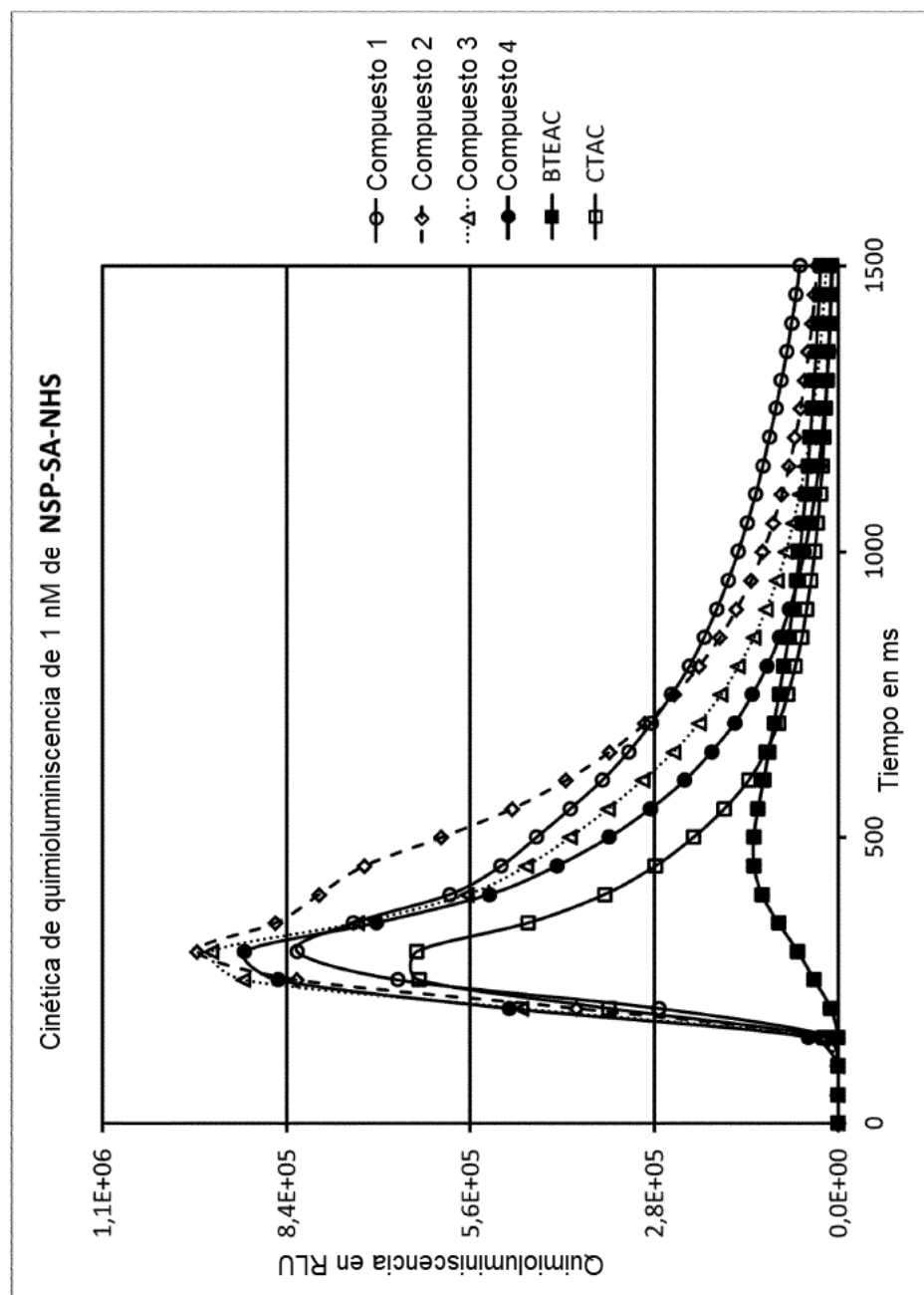


Fig. 6

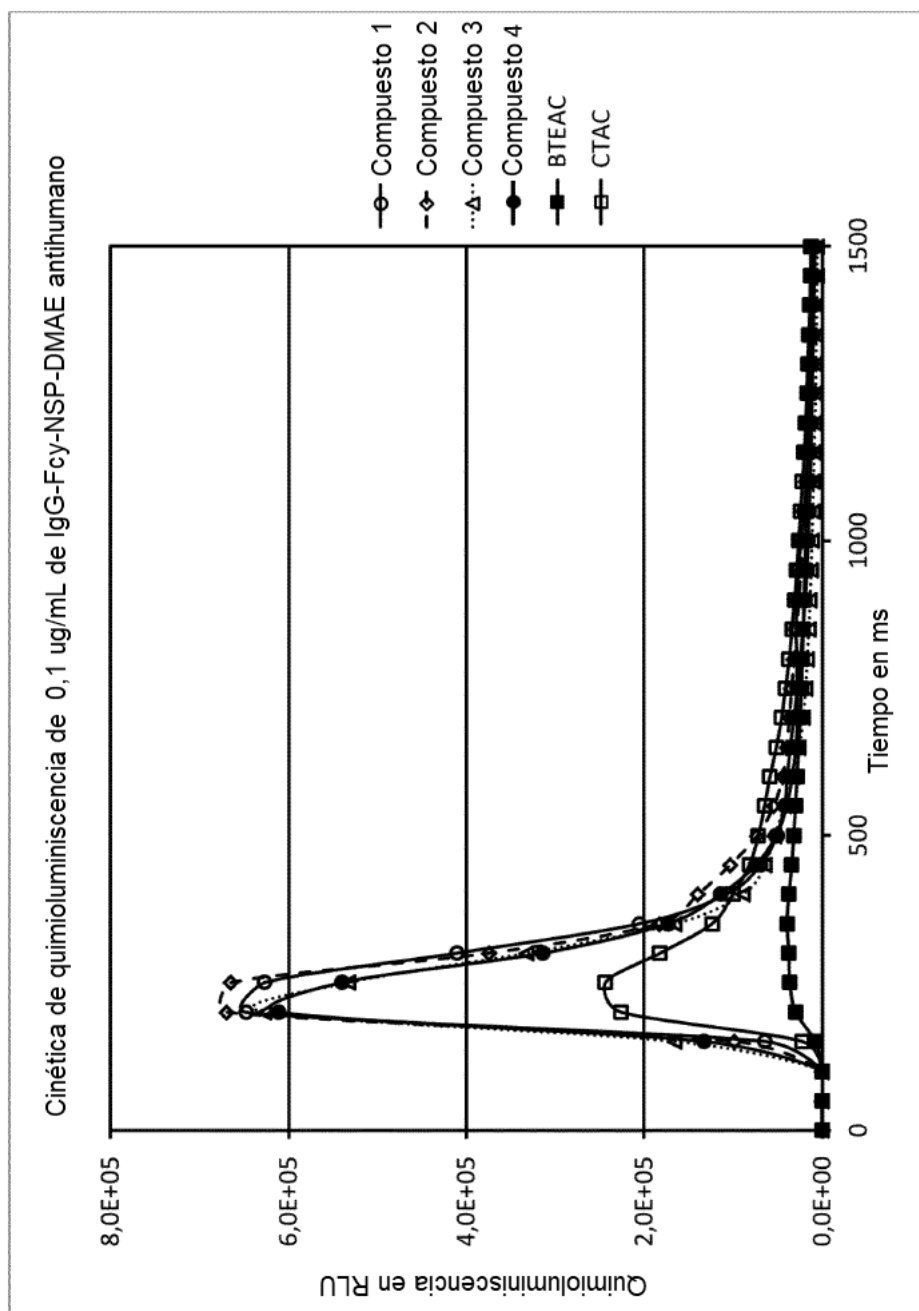


Fig. 7

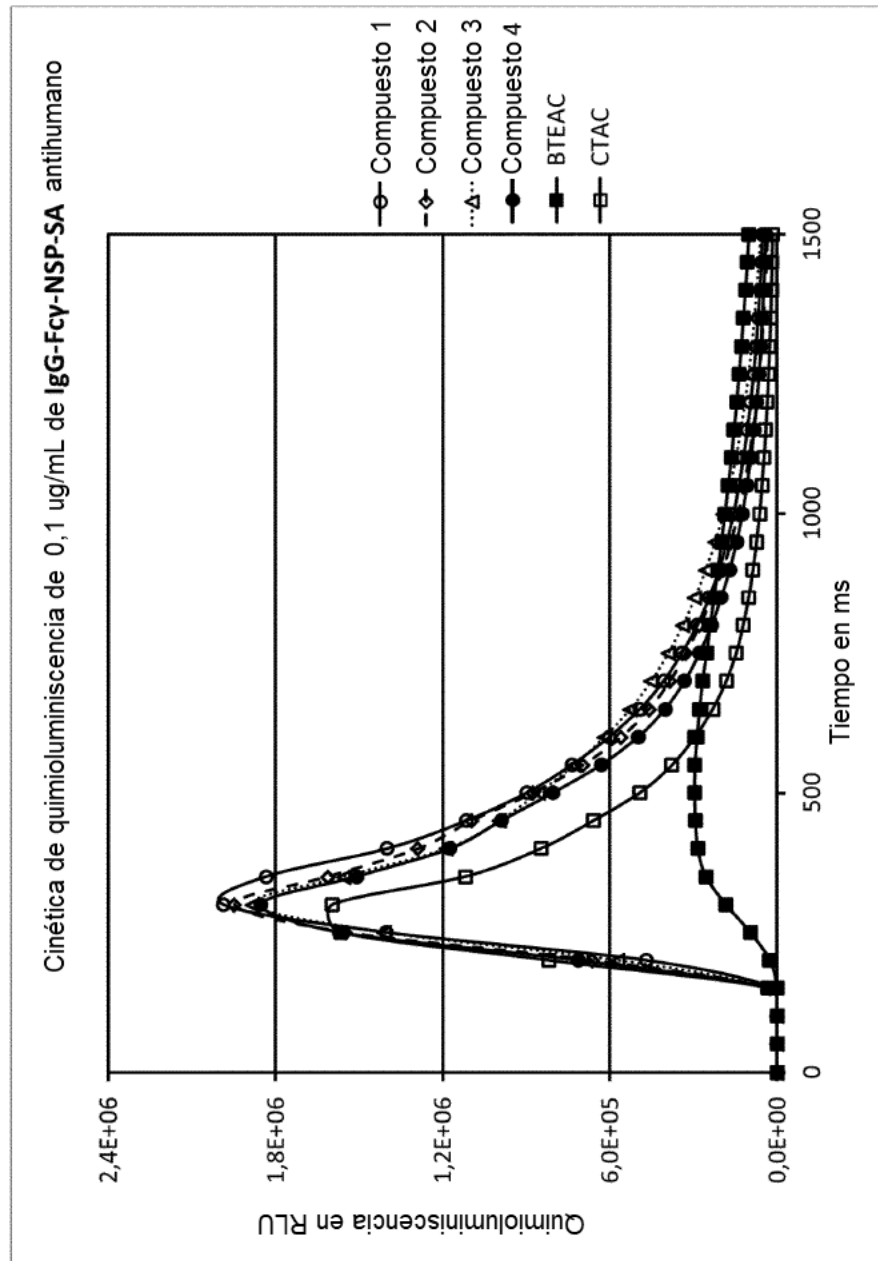


Fig. 8