

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240086**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **416813**

(22) Data zgłoszenia: **18.04.2016**

(51) Int.Cl.

**C07D 401/14 (2006.01)**

**C09B 15/00 (2006.01)**

**C09K 11/06 (2006.01)**

**G01N 33/50 (2006.01)**

**G01N 33/533 (2006.01)**

(54) **Sole estrów arylowych N-podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych,  
sposób ich otrzymywania oraz odczynnik immunochemiczny  
do oznaczeń chemiluminescencyjnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**23.10.2017 BUP 22/17**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**14.02.2022 WUP 07/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA GDAŃSKA, Gdańsk, PL**  
**UNIwersytet GDAŃSKI, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KAROL JAN KRZYMIŃSKI, Gdynia, PL**  
**JUSTYNA CHECHOWSKA, Gdańsk, PL**  
**ILLIA SERDIUK, Charków, UA**  
**NATALIA KARSKA, Gdynia, PL**  
**JÓZEF KUR, Wejherowo, PL**  
**LUCYNA HOLEC-GAŚSIOR, Gdańsk, PL**  
**BARTOSZ FERRA, Puck, PL**  
**FRANCISZEK KASPRZYKOWSKI,**  
**Pruszcz Gdański, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Justyna Pawłowska**

**PL 240086 B1**

## Opis wynalazku

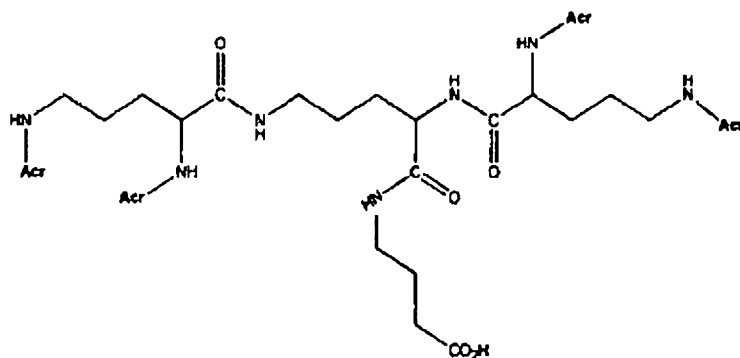
Przedmiotem wynalazku są sole estrów arylowych *N*-podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych, sposób otrzymywania tych związków, odczynnik immunochemiczny do oznaczeń luminescencyjnych zawierający emiter chemiluminogenny. Związki opisane w wynalazku mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej do oznaczeń immunochemicznych, gdzie jako metodę detekcji stosuje się pomiar emisji promieniowania w formie chemiluminescencji (Schulman SG, Schulman J, Rakićioğlu Y (2001), *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Garcia-Campaña AM, Bayenes WRG, Marcel Dekker, New York-Basel).

Immunodiagnostyka medyczna, wykorzystująca zjawisko chemiluminescencji w oznaczeniach typu antygen-przeciwciało (ang. *Chemiluminescent Immunoassays, CLIA; Enzymatic Chemiluminescent Immunoassays, ECLIA*) jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną analityki (Van Dyke Ch, Van Dyke K, Woodfork eds. 2002, *Luminescence Biotechnology Instruments and Applications*, CRC Press, Boca Raton, London-New York-Washington D.C.). Metody luminescencyjne stanowią dziś atrakcyjną alternatywę w stosunku do typowych metodologii, wykorzystujących absorpcję promieniowania (kolorymetrycznych), na przykład testach typu ELISA – z uwagi na bardzo wysoką czułość, niewielką ilość koniecznych odczynników, prostotę wykonania i względnie niski koszt (Roda A, Guardigli M, Michelini E, Mirasoli M, Pasini P (2003) *Anal. Chem.* 462–470). Wykrywalność analitu w femtomolowym zakresie stężeń ( $10^{-15}$  M) jest z łatwością dostępna w większości aplikacji, gdzie stosuje się detekcję chemiluminescencyjną (Roda A, Guardigli M, Michelini E, Mirasoli M, Pasini P (2003): *Anal. Chem.* 462–470). Żadna inna metoda chemiczna nie cechuje się tak wysoką czułością. Metody chemiluminescencyjne pozwalają też wyeliminować problemy związane ze stosowaniem radioaktywnych izotopów (specjalne laboratoria, składowanie odpadów, zanik promieniotwórczy i inne), zachowując podobnie wysoką czułość. W badaniach immunochemicznych z detekcją chemiluminescencyjną najczęściej wykorzystuje się związki organiczne będące pochodnymi luminolu. Znane jest również wykorzystanie w tym celu soli akrydyniowych (Weeks I, Beheshti I, McCapra F, Campbell AK, Woodhead JS (1983) *Clin. Chem.* 29: 1474–1479). Wśród znanych soli akrydyniowych zdolnych do chemiluminescencji (emiterów chemiluminescencji) znajdują się estry aromatyczne i sulfonamidy *N*-podstawionego kwasu akrydynylo-9-karboksyloвого (Krzymiński K, Ożóg A, Malecha, P. Roshal AD, Wróblewska A, Zadykowicz B, Błażejowski J (2011): *J. Org. Chem.* 76: 1072–1085; Adamczyk M, Fino JR, Mattingly PG, Moore JA, Pan Y (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 2313–2317; Natrajan A, Sharpe D, Costello J, Jiang Q (2010) *Anal. Biochem.* 406: 204–213). Pochodne akrydyny, stosowane jako znaczniki lub indykatory chemiluminescencyjne wykazują szereg zalet w porównaniu z pochodnymi luminolu – cechują się zazwyczaj wyższą wydajnością, korzystną dynamiką emisji typu błyskowego, dobrym zachowaniem zdolności emisyjnej w układach biologicznych oraz brakiem wymogu użycia katalizatora do wywołania chemiluminescencji, co obniża stosunek sygnału do szumu (Zomer B, Stavenuiter JFC, Van den Berg RH, Jansen EHJM (1991) *Pract. Spectrosc.* 12: 505–521). Względna łatwość modyfikacji chemicznej powyższych wspomnianych związków oraz prostota metod immunochemicznych zdecydowały o dynamicznym rozwoju metod analitycznych z ich udziałem (Browne K, Deheyn DD, El-Hiti GA, Smith K, Weeks I (2011) *J. Am. Chem. Soc.* 133: 14637–14648; Van Dyke K, Van Dyke Woodfork K, (2002) "Luminescence Biotechnology", CRC Press, Boca Raton).

Zastosowania chemiluminogennych soli akrydyniowych obejmują szeroki obszar analityki medycznej i środowiskowej, gdzie wykorzystuje się je jako znaczniki luminescencyjne, w formie związanej z analitem biologicznym, jak również jako indykatory luminescencyjne, w stanie niezwiązanym, których zmiany spektralne dotyczące intensywności, względnie kinetyki emisji umożliwiają, po odpowiedniej kalibracji układu, określenie stężenia analitu w układzie. Znane są sposoby wykrywania ilości analitów biologicznych z udziałem chemiluminogennych soli akrydyniowych na poziomie attomoli lub niższym. Estry akrydyniowe/akrydanowe były już stosowane wielu tego typu oznaczeniach biomedycznych, między innymi ludzkiej  $\alpha$ -fetoproteiny, gonadotropiny, hormonów TSH, wirusów, DNA, nadtlenu wodoru, dioksygeniny i wielu innych (Garcia-Campana AM, Bayenes WRG Ed. (2001) *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker; Krička LJ (2003) *Anal. Chim. Acta* 500: 279–286). W badaniach immunochemicznych z udziałem chemiluminogennych soli akrydyniowych jako emiterów chemiluminescencji stosuje się dwa typy połączeń. Z jednej strony są to znaczniki, w których elektronowo wzbudzony produkt odrywa się od analitu w procesie utleniania, emitując promieniowanie z zakresu widzialnego, co wykorzystuje się najczęściej w oznaczeniach immunochemicznych typu antygen-przeciwciało. Z drugiej strony stosuje się znaczniki, w których wzbudzony elektronowo produkt pozostaje przyłączony do

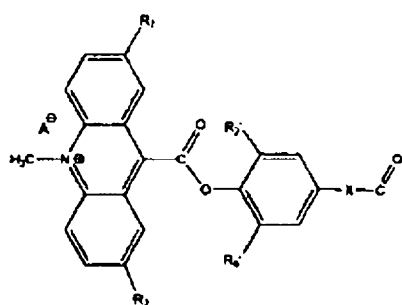
analitu po wywołaniu emisji promieniowania. Związki z ostatniej grupy są stosowane, przykładowo, w testach hybrydacyjnych kwasów nukleinowych typu HPA (ang. *Hybridisation Protection Assays*) (Brown RC, Li Z, Rutter AJ, Mu X, Weeks OH, Smith K, Weeks I (2009) *Org. Biomol. Chem.* 7: 386–394). Oba typy układów molekularnych różnią się budową, przy czym modyfikacja chemiczna połączeń z pierwszej grupy jest utrudniona – ze względu na skumulowanie elementów strukturalnych znacznika decydujących o jego przydatności w jednym fragmencie cząsteczki, choć są one zwykle prostsze do otrzymania z punktu widzenia syntezy chemicznej. Niekorzystną cechą znanych związków chemiluminesyjnych na bazie estrów akrydyniowych jest ich podatność na ciemne reakcje uboczne – to jest hydrolizę oraz tworzenie tak zwanych pseudo-zasad w środowisku alkaicznym (Krzyński K, Roshal AD, Zadykovicz B, Białk-Bielińska A, Sieradzan A. (2010): *J. Phys. Chem. A* 114: 10550–10562; Krzyński K, Ożóg A, Malecha P, Roshal AD, Wróblewska A, Zadykovicz B, Błażejowski J (2011) *J. Org. Chem.* 76: 1072–1085), która stanowi utrudnienie w zastosowaniach praktycznych tego typu połączeń. Wciąż poszukuje się rozwiązań, umożliwiających poprawę własności emisyjnych układów chemiluminesyjnych korzystnych w analityce – to jest możliwie wysokiej intensywności emisji i kinetyki typu błyskowego i jednocześnie dobrej stabilności w roztworach wodnych.

Przedmiotem wynalazku są sole estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboxyloowych o wzorze ogólnym **3** zawierające szkielet oligomeru aminokwasowego:



gdzie:

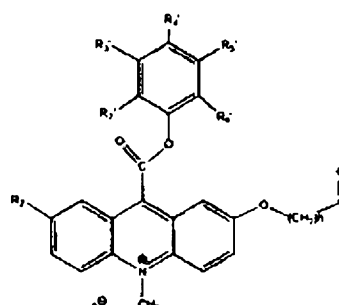
Acr =



X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH=CH, C≡C  
 R<sub>2</sub>, R<sub>7</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I,  
 OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> gdzie n = 1–6  
 dowolnej kombinacji  
 R<sub>2</sub>', R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I, OCH<sub>3</sub>  
 w dowolnej kombinacji  
 A<sup>-</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>.

lub

Acr =



n = 1–8

R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 R<sub>2</sub>' – R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 w dowolnej kombinacji  
 A<sup>-</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>

Sposób otrzymywania soli estrów arylowych kwasów akrydynylo-9-karboxyloowych o wzorze ogólnym **3** pokazanym wyżej, charakteryzuje się według wynalazku tym, że do rozgałęzionego oligomeru aminokwasowego otrzymanego z diaminokwasów, korzystnie z ornityny lub lizyny oraz ω-amino-kwasu, korzystnie kwasu γ-aminomasłowego przyłącza się co najmniej dwie cząsteczki związku o wzorze ogólnym **1**, określonego w zastrz. 1 lub związku o wzorze ogólnym **2**, w ten sposób, że na nośniku

stałym, stosowanym w syntezie zgodnie ze strategią osłon fluorenylo-9-metoksykarbonylowych Fmoc, dającą wolny kwas po odszczepieniu od nośnika, którym korzystnie jest żywica typu polistyren-glikol polietylenowy PS-PEG z kotwiczką alkoholu *p*-alkoksybenzylowego lub żywica tritylowej lub żywica 2-chlorotrytylowej lub żywica Wanga, osadza się, korzystnie w stopniu 0,1 milirównoważnika aminokwasu na gram żywicy, kwas  $\omega$ -aminokwas chroniony na *N*-końcu osłoną Fmoc otrzymany według znanych metod. Następnie nadmiar grup hydroksylowych nośnika blokuje się przez acetylowanie według znanych metod, korzystnie za pomocą *N*-acetyloimidazolu, a następnie usuwa się osłonę grupy aminowej Fmoc z  $\omega$ -aminokwasu przyłączonego do żywicy za pomocą znanych metod. Sprzęga się wolną grupę aminową w  $\omega$ -aminokwasie za pomocą *N,N'*-chronionego diaminokwasu według znanych metod, korzystnie za pomocą di(flourenylo-9-metoksykarbonylo)-ornityny Fmoc-Orn-(Fmoc) lub di(flourenylo-9-metoksykarbonylo)-lizyny Fmoc-Lys-(Fmoc), a następnie usuwa się z przyłączonych aminokwasów osłony typu Fmoc według znanych metod. Otrzymany na nośniku stałym produkt ponownie acyluje się jak wyżej za pomocą kolejnej porcji *N,N'*-chronionego diaminokwasu Fmoc-Orn(Fmoc) lub Fmoc-Lys(Fmoc), a następnie usuwa się osłonę Fmoc z grup aminowych powyższego diaminokwasu według znanych metod. Odszczepia się otrzymany oligomer aminokwasowy z żywicy znaną metodą odpowiednią do zastosowanego nośnika stałego, a następnie wytrąca się wolny oligomer aminokwasowy eterem dietylowym i liofilizuje go, po czym sprzęga się wolne grupy aminowe w oligomerze aminokwasowym z solą estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **1**, określoną w zastrz. 1 lub solą estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **2** określoną w zastrz. 2. Oczyszcza się otrzymany produkt końcowy o wzorze ogólnym **3**, korzystnie za pomocą chromatografii cieczowej typu HPLC w odwróconych fazach, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu w wodzie w obecności 0,05–0,20% kwasu trifluoroctowego.

Odczynnik immunochemiczny do oznaczeń chemiluminescencyjnych zawierający emiter chemiluminogeny, charakteryzuje się według wynalazku tym, że emitery są sole *N*-podstawionych estrów arylowych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **3**, który to emiter jest sprzężony jest z dowolnym białkiem zdolnym do reakcji immunochemicznej z antygenem i korzystnie zawiera 10–12-krotny nadmiar molowy emitery nad białkiem i który korzystnie można wyizolować się za pomocą techniki filtracji molekularnej i liofilizacji, i których emisję wywołuje się za pomocą znanych odczynników, korzystnie w obecności substancji powierzchniowo czynnych takich jak Triton X-100 lub Triton X-705 lub *N*-dodecylo-*N,N*-dimetylo-3-amonio-1-propanosulfonian sodowy lub chlorek heksadecylotrimetyloamoniowy. Wcześniej wymienione Tritony to etery polimeru glikolu polietylenowego (PEG) i *p*-t-oktylofenolu  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$  gdzie ilość podjednostek glikolu polietylenowego  $n = 9-10$  lub 55.

Związki według wynalazku umożliwiają uzyskanie korzystnych wyników analitycznych w stosunku do stanu techniki pod względem wydajności emisji – czułości metody oraz zakresu i prostoty ich stosowania. Indykatory chemiluminescencyjne według wynalazku zawierają nowe rozwiązania strukturalne, poprawiające w odpowiednim środowisku ich parametry fizykochemiczne w immunochemicznych oznaczeniach biomedycznych. Do cech tych należy wiązanie wielokrotne typu węgiel-węgiel w bezpośrednim sąsiedztwie ugrupowania estru aromatycznego, korzystnie ułatwiające transfer energii reakcji na powstający produkt, ulegający wzbudzeniu elektronowemu i będący docelowym emiterym. Z drugiej strony rozdzielone przestrzennie grupy atomów odpowiedzialne za emisję promieniowania od grupy atomów odpowiedzialnych za łączenie znacznika CL z analitem pozwalają na niezależną i bardziej wszechstronną modyfikację chemiczną obu wspomnianych fragmentów. Odpowiednia kombinacja podstawników w cząsteczkach emiterym chemiluminogeny korzystnie zmniejsza szumy pomiarowe (poziom tła) oraz poprawia dynamikę emisji i/lub trwałość odczynników immunochemicznych z ich udziałem. Przyłączenie kilku cząsteczek chemiluminogeny soli akrydynyowych do odpowiednio zaprojektowanych oligomerów aminokwasowych według wynalazku umożliwia uzyskanie złożonego układu molekularnego, zawierającego kilka cząsteczek emitery chemiluminescencji, co winno poprawić jego zdolność emisyjną – a co za tym idzie – wykrywalność analitu (białka reporterowego). Sposób oznaczania ilości analitu według wynalazku umożliwia uzyskanie korzystnych parametrów analitycznych, to jest niższych limitów detekcji/oznaczalności (LOD/LOQ) i lepszej rozpoznawalności analitu białkowego (specyficzność). Dzięki wysokiej reaktywności odczynników immunochemicznych według wynalazku uzyskuje się ogólnie lepszą efektywność emisji, dynamiczną chemiluminescencję typu błyskowego oraz zadowalającą trwałość, co poszerza możliwości analityki biomedycznej. Dotyczy to w szczególności badań, gdzie podstawą oznaczenia są specyficzne reakcje typu antygen-przeciwciało w diagnostyce klinicznej, w tym immunoidentyfikacja specyficznych białek np. fuzyjnych, wykrywanie i monitorowanie

czynników zakaźnych, badania kwasów nukleinowych. Sposoby określania ilości analitu według wynalazku mogą znaleźć zastosowanie w analizie farmaceutycznej i monitoringu środowiska – wszędzie tam, gdzie konwencjonalne metody bioanalizy wykazują niewystarczającą czułość.

Wynalazek przedstawiono we wzorze ogólnym 3, zaś związki pośrednie na wzorze ogólnym 1 i 2. Na schemacie 1 i 2 pokazano drogę syntezy związku o wzorze 1 i 2. Wynalazek pokazano w przykładach wykonania na rysunku, gdzie na fig. 1 przedstawiono przykładowe widmo typu  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 300 K) zarejestrowane dla związku 1b, fig. 2 przykładowe widmo masowe typu MALDI-TOF dla związku 2b, jon macierzysty  $M^+ = 527,3$ , fig. 3 wzór strukturalny przykładowego znacznika akrydyniowego według wzoru ogólnego 3, opartego o rdzeń oligomeru aminokwasowego na bazie ornityny i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (3a), zaś Acr oznacza w tym przypadku akrydyniowy emiter chemiluminescencji dostępny w handlu (CAS 177332-37-5), fig. 4A wysokorozdzielczą analizę masową typu MALDI-QTOF dla oligoestru akrydyniowego 3a, sygnał główny ( $m/z = 479,6$ ) odpowiada masie molekularnej czterokrotnie naładowanego kationu macierzystego pochodzącego od 3a ( $M^+ = 1918,3276$ ), fig. 4B jony fragmentacyjne emitera chemiluminescencji 3a (fig. 3) z uwidocznionym jonem macierzystym ( $m/z \sim 480$ ) oraz jonami fragmentacyjnymi charakterystycznymi dla soli akrydyniowych ( $m/z \sim 193$ ,  $\text{AcrNCH}_3^+$ ), a fig. 5–12 są przykładami dodatkowymi o związkach pośrednich: fig. 5 porównanie intensywności emisji odczynników immunochemicznych w zależności od metody przyłączania emitera chemiluminescencji do białka antyludzkie IgG, 1b – emiter CL o wzorze ogólnym 1 (schemat 1,  $X = \text{CH}=\text{CH}$ ,  $R_2 = R_7 = \text{H}$ ,  $R_2' = R_6' = \text{OCH}_3$ ), C – emiter CL dostępny w handlu (CAS 177332-37-5), Cay oznacza znaną metodologię sprzęgania emitera z białkiem (<http://www.caymanchem.com/pdfs/200201.pdf>), II–VI oznaczają warianty metody opisanej w przykładzie 5, różniące się proporcją molową pomiędzy emiternem CL (E) a znakowanym białkiem (B), zastosowaną podczas sprzęgania; II: E/B = 15; III: E/B = 11,3; IV: E/B = 22,6; V: E/B = 33,9; VI: E/B = 41,5, fig. 6 porównanie intensywności emisji integralnej (wartości znormalizowane) pochodzącej od odczynników immunochemicznych zawierających indykatory chemiluminescencyjne o wzorze ogólnym 4 (luminol – stan techniki; 4d:  $R_2 = \text{Br}$ ,  $R_2' = R_7' = \text{F}$ ; 4e:  $R_2 = \text{Br}$ ,  $R_2' = R_4 = R_7' = \text{F}$ ; 4f:  $R_2 = \text{Br}$ ,  $R_2' = R_7' = \text{Br}$ ), fig. 7 porównanie sumarycznej intensywności emisji przykładowych odczynników immunochemicznych według zastrzeżenia 1, 2 w obecności lub przy braku obecności substancji powierzchniowo czynnych w układzie pomiarowym, fig. 8 porównanie stabilności w roztworze alkalicznym emiternów chemiluminescencji 2a i 2b względem pokrewnego produktu handlowego (CAS 177332-37-5), jednakowe ilości emiternów akrydyniowych inkubowano w temp. 298 K w buforze fosforanowym (pH = 8,0) i po określonym czasie badano pod kątem zachowanej zdolności do emisji promieniowania, fig. 9 wykresy kalibracyjne (emisja integralna w jednostkach względnych (RLU) vs. stężenie analitu białkowego dla immunologicznej metody bezpośredniej z udziałem odczynników immunochemicznych zawierających emitery chemiluminescencji 1a, 1b, 1c otrzymane wg zastrzeżenia 1 i 2a, 2b wg zastrzeżenia 2, uzyskane zgodnie z opisem wg zastrzeżenia 12, C oznacza zawierającego handlowy emiter chemiluminescencji (CAS 177332-37-5) przygotowany i zastosowany wg załączonego opisu (<http://www.caymanchem.com/pdfs/200201.pdf>), fig. 10 reaktywność odczynników immunochemicznych (wykresy kalibracyjne) z udziałem emiternów chemiluminescencji 1a, 1b, 2a w oznaczeniach pośrednich z udziałem antygenów *Toxoplasma gondii*, opisanych w przykładzie 9, C oznacza kontrolny emiter chemiluminescencji (C: CAS 177332-37-5), dostępny w handlowych testach wykorzystujących sole akrydyniowe (<http://www.caymanchem.com/pdfs/200201.pdf>). fig. 11 porównanie integralnej intensywności emisji odczynników immunochemicznych ( $c = 0,05 \mu\text{g/ml}$ ) z udziałem emiternów chemiluminescencji 1a, 1b, 2a otrzymanych według przykładów 1, 2 i 5 oraz emitern handlowego (C: CAS 177332-37-5) w tych samych warunkach, badania serosyficzności prowadzono w obecności (serum pozytywne) lub przy braku obecności (serum negatywne) specyficznych przeciwciał typu anti-*T. gondii* w surowicy pacjentów, fig. 12 porównanie intensywności integralnej emisji pochodzącej od odczynników immunochemicznych zawierających stałą ilość indykatora chemiluminescencyjnego (4f: wzór ogólny 4,  $R_2 = \text{Br}$ ,  $R_2' = R_7' = \text{Br}$ ) w obecności białka znakowanego HRP, w testach bezpośrednich zastosowano substancje pomocnicze: wzmacniacze sygnału (SPITZ, DMAP) i środki powierzchniowo czynne (Triton X-100, Triton X-705, CTAC, DDAPS); luminol/PIP oznacza układ referencyjny (typowy), wszystkie pomiary wykonano w tych samych warunkach eksperymentalnych.

**Przykład 1.** Sposób otrzymywania soli triflatowych *N*-podstawionych estrów arylowych kwasów akrydyniolo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym 1 – związek pośredni.

Poszczególne kroki syntezy (A=E) związków 1a ( $X = \text{CH}=\text{CH}$ ,  $R_2 = R_7 = R_6 = \text{H}$ ,  $R_2' = \text{OCH}_3$ ), 1b, ( $X = \text{CH}=\text{CH}$ ,  $R_2 = R_7 = \text{H}$ ,  $R_2' = R_6' = \text{OCH}_3$ ), 1c ( $X = \text{CH}=\text{CH}$ ,  $R_2 = R_2' = \text{OCH}_3$ ,  $R_7 = R_6' = \text{H}$ ) wraz z zaznaczeniem produktów pośrednich typu 5–9 przedstawiono na schemacie 1 i opisano poniżej.

Ogólna metoda otrzymywania estrów benzytowych kwasów karboksylowych **6** (droga A). Synteza związków **6a** (schemat 1,  $X = CH=CH$ ,  $R_2' = OCH_3$ ,  $R_6' = H$ ), **6b** (schemat 1,  $X = CH=CH$ ,  $R_2' = R_6' = OCH_3$ ).

Do roztworu, zawierającego dostępną w handlu pochodną kwasu karboksylowego typu **5** (1 mmol) w 2 ml dimetyloformamidu (DMF) dodaje się 1 mmol węglanu potasowego ( $K_2CO_3$ ), 1,1 mmol chlorku benzyłu ( $C_6H_5-CH_2-Cl$ ): i 0,1 mmol jodku potasu (K1). Zawartość miesza się w zamkniętym naczyniu przez 5–30 godzin w temperaturze pokojowej, po czym mieszaninę reakcyjną wprowadza się do nadmiaru zimnej wody. Produkt ekstrahuje się za pomocą dichlorometanu ( $CH_2Cl_2$ ), po czym warstwę organiczną należy przemyć wodą, osuszyć przez dodanie bezwodnego  $MgSO_4$  i usunąć rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy ester benzylowy typu **6** oczyszcza się metodą szeroko-porowatej chromatografii kolumnowej (ang. *flash chromatography*; faza stacjonarna:  $SiO_2$ , faza ruchoma; 1–5% izopropanol ( $(CH_3)_2CHOH$ ) w chloroformie ( $CHCl_3$ ). Produkty pośrednie identyfikuje się w oparciu o widma masowe typu MALDI-TOF oraz widma magnetycznego, rezonansu jądrowego typu  $^1H$  NMR. Wydajności: (*E*)-3-(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)akrylan benzyłu (**6a**) – 73%, (*E*)-3-(4-hydroksy-3,5-dimetoksyfenilo)-akrylan benzyłu (**6b**) – 67%.

Ogólna metoda otrzymywania pochodnych estrów arylowych kwasu akrydynylo-9-karboksylowego **7** (droga B). Synteza związków **7a** (schemat 1,  $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = R_6' = H$ ,  $R_2' = OCH_3$ ), **7b** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = H$ ,  $R_2', R_6' = OCH_3$ ), **7c** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_2' = OCH_3$ ,  $R_7 = R_6' = H$ ).

Do roztworu zawierającego 1 mmol estru typu **6** rozpuszczonego w 30 ml  $CH_2Cl_2$  dodaje się 3,3 mmola trietyloaminy ( $Et_3N$ ) i katalityczną ilość *N,N*-dimetylopirydyno-4-aminy (DMAP). Do tak przygotowanej mieszaniny należy wprowadzić 1,1 mola odpowiednio podstawionego chlorowodoru 9-(chlorokarbonylo)akrydyny, otrzymanego według opisanych metod (Krzymiński K, Roshal AD, Zadykiewicz B, Białk-Bielińska A, Sieradzan A. (2010): *J. Phys. Chem. A* 114: 10550–10562; Krzymiński K, Ożóg A, Malecha P, Roshal AD, Wróblewska A, Zadykiewicz B, Błażejowski J (2011) *J. Org. Chem.* 76: 1072–1085). Mieszaninę reakcyjną należy pozostawić na mieszadle magnetycznym przez 4–50 godzin w temperaturze pokojowej, następnie odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i surowy produkt przekrystalizować z metanolu. Produkty zidentyfikować w oparciu o widma masowe typu MALDI-TOF i widma typu  $^1H$  NMR. Wydajności: akrydynylo-9-karboksylan 4-((*E*)-2-((benzyloksy)karbonylo)winylo)-2-metoksyfenilu **7a** – wydajność 74%, akrydynylo-9-karboksylan 4-((*E*)-2-((benzyloksy)karbonylo)winylo)-2,6-dimetoksyfenilu **7b** – wydajność 77%, 2-metoksyakrydynylo-9-karboksylan 4-((*E*)-2-((benzyloksy)karbonylo)winylo)-2-metoksyfenilu **7c** – wydajność 69%. Przykładowa analiza  $^1H$  NMR dla **7c** ( $CDCl_3$ , 300 K,  $\delta$ , ppm (J, Hz): 3,98 (3H, s); 4,08 (3H, s); 5,21 (2H, s); 6,41 (1H, d, J = 16,0); 7,18 (2H, m); 7,27–7,38 (6H, m); 7,43 (1H, d, J = 8,8); 7,62 (1H, t, J = 7,6); 7,68 (1H, d, J = 16,0); 7,71 (1H, d, J = 9,1); 7,77 (1H, t, J = 7,3); 8,21–8,34 (2H, m); 8,50 (1H, d, J = 8,7).

Ogólna metoda otrzymywania kwasów (*E*)-3-{4-[(akrydynylo-9-karbonylo)oksy]fenilo}akrylowych **8** (droga C). Synteza związków **8a** (schemat 5,  $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = R_6' = H$ ,  $R_2' = OCH_3$ ), **8b** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = H$ ,  $R_2' = R_6' = OCH_3$ ), **8c** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_2' = OCH_3$ ,  $R_7 = R_6' = H$ ).

1 mmol diestru typu **7** rozpuszcza się w 5 ml 40% roztworu HBr w kwasie octowym i pozostawia na mieszadle przez 1–15 godzin w temperaturze 20–50°C. Po tym czasie mieszaninę rozcieńcza się namiarem wody z lodem, po czym odfiltrowuje się osad surowego produktu. Czysty związek typu **8** otrzymuje się w drodze krystalizacji z etanolu lub mieszaniny etanol-woda (1/1 obj./obj.). Wydajności: kwas (*E*)-3-{4-[(akrydynylo-9-(karbonylo)oksy]-3-metoksyfenilo}akrylowy (**8a**) – 85%; kwas (*E*)-3-{4-[(akrydynylo-9-(karbonylo)oksy]-3,5-dimetoksyfenilo}akrylowy (**8b**) – 91%; kwas (*E*)-3-{4-[(akrydynylo-9-(karbonylo)oksy]-3-metoksyfenilo}akrylowy (**8c**) – 90%. Przykładowa analiza  $^1H$  NMR dla **8c** ( $DMSO-d_6$ , 300 K,  $\delta$ , ppm (J, Hz): 4,07 (3H, s); 4,15 (3H, s); 6,68 (1H, d, J = 16,0); 7,44 (2H, m); 7,67 (1H, d, J = 16,0); 7,69 (1H, s); 7,89 (1H, t, 7,9); 7,95 (1H, t, 7,9); 8,13 (1H, d, J = 9,4); 8,25 (1H, d, J = 8,4); 8,36 (1H, d, J = 9,3); 8,59 (1H, d, J = 8,6); 12,5 (1H, ss).

Ogólna metoda otrzymywania estrów sukcyimidylowych kwasów (*E*)-3-{4-[(akrydynylo-9-karbonylo)oksy]fenilo}akrylowych **9** (droga D). Synteza związków **9a** (schemat 1,  $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = R_6' = H$ ,  $R_2' = OCH_3$ ); **9b** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_7 = H$ ,  $R_2' = R_6' = OCH_3$ ), **9c** ( $X = CH=CH$ ,  $R_2 = R_2' = OCH_3$ ,  $R_7, R_6' = H$ ).

Do chłodzonego lodem roztworu zawierającego 1 mmol; kwasu typu **8** w suchym DMF dodaje się 1,2 mmola dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), po czym mieszaninę pozostawia się na mieszadle przez okres 0,5–2 godzin. Następnie do naczynia dodaje się 1,2 milimola *N*-hydroksybursztynoimidu (NHS)

i pozostawia na mieszadle przez okres 6–20 godzin. Po zakończeniu reakcji mieszaninę należy rozcieńczyć za pomocą  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (około 20 ml) i przemyć wodą (3x). Warstwę organiczną należy osuszyć za pomocą bezwodnego  $\text{MgSO}_4$ , odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym, ciśnieniem i oczyścić produkt metodą grawitacyjnej chromatografii kolumnowej (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: 20–50% octan etylu w heksanie lub 1–5% izopropanol w  $\text{CHCl}_3$ ). Wydajności: akrydynylo-9-karboksylan 4-(*E*)-2-((sukcynoimidyluksy)karbonylo)-winylo)-2-metoksy-fenyłu (**9a**) – 75%; akrydynylo-9-karboksylan 4-((*E*)-2-((sukcynoimidyluksy)karbonylo)winylo)-2,6-dimetoksy-fenyłu (**9b**) – 73%; 2-metoksyakrydynylo-9-karboksylan 4-((*E*)-2-((sukcynoimidyluksy)karbonylo)winylo)-2-metoksy-fenyłu (**9c**) – 78%.

Przykładowe analizy:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm (J, Hz): **9a**: 2,81 (4H, s); 3,99 (3H, s); 6,55 (1H, d, J = 16,0); 7,22 (2H, m); 7,30 (1H, d, J = 8,6); 7,60 (2H, t, J = 7,9); 7,77 (2H, t, J = 7,2); 7,87 (1H, d, J = 16,0); 8,23 (2H, d, J = 8,8); 8,31 (2H, d, J = 8,8). **9b**:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm (J, Hz): 2,89 (4H, s); 4,03 (6H, s); 6,62 (1H, d, J = 16,0); 6,95 (2H, s); 7,67 (2H, t, J = 8,0); 7,84 (2H, t, J = 7,4); 7,91 (1H, d, J = 16,0); 8,30 (2H, d, J = 8,7); 8,49 (2H, d, J = 8,7).

*Ogólna metoda syntezy N-metylowanych soli triflatowych estrów bursztynimidylowych kwasów (2E)-3-{4-[[akrydynylo-9-karbonylo]oksy]fenylo}akrylowych 1 (droga E). Synteza związków **1a** (schemat 1, X = CH=CH,  $R_2 = R_7 = R_6' = \text{H}$ ,  $R_2' = \text{OCH}_3$ ), **1b** (X = CH=CH,  $R_2 = R_7 = \text{H}$ ,  $R_2' = R_6' = \text{OCH}_3$ ), **1c** (X = CH=CH,  $R_2 = R_2' = \text{OCH}_3$ ,  $R_7 = R_6' = \text{H}$ ).*

Do roztworu zawierającego 1 milimol estru aktywnego typu **9** w suchym  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  dodaje się 4 mmole 2,6-di-*tert*-butylopirydyny (związanej na nośniku polimerycznym) i po około 10 minutach wprowadza 5–10 mmoli trifluorometanosulfonianu (triflatu) metylu ( $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ ). Mieszaninę reakcyjną należy utrzymywać na mieszadle magnetycznym przez 1–15 godzin. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodaje się minimalną ilość suchego acetonitrylu do rozpuszczenia wytrąconego osadu soli akrydyniowej, po czym mieszaninę sączy się przez filtr strzykawkowy (0,45  $\mu\text{m}$ , PTFE) i wprowadza wprost do minimum 100-krotnego nadmiaru objętościowego suchego eteru dietylowego. Po ochłodzeniu mieszaniny (około  $-20^\circ\text{C}$ ) osad soli akrydyniowej typu **1** należy odsączyć, przemyć i wysuszyć w próżni i przechowywać bez dostępu wilgoci, w obniżonej temperaturze (około  $-20^\circ\text{C}$ ). Otrzymane związki stanowią emitery chemiluminescencji według zastrzeżenia 1 i 5. Przykładowe analizy: trifluorometanosulfonian 10-metyloakrydynio-9-karbonyloksy-4-((*E*)-2-((sukcynimidyluksy)karbonylo)winylo)-2-metoksyfenyłu (**1a**) – wydajność: 89%; czystość: 97% (RP-HPLC: faza stacjonarna: C18, faza ruchoma: 60%/40% acetonitryl ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )/0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie ( $\text{TFA}_{\text{aq}}$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , ppm (J, Hz): 2,84 (4H, s); 4,14 (3H, s); 4,87 (3H, s); 6,90 (1H, d, J = 16,0); 7,49 (1H, d, J = 8,2); 7,60 (1H, d, J = 8,2); 7,64 (1H, s); 8,03 (1H, d, J = 16,0); 8,16 (2H, t, J = 7,3); 8,51 (2H, t, J = 7,3); 8,70 (4H, m). Trifluorometanosulfonian 10-metyloakrydynio-9-(karbonyloksy)-4-((*E*)-2-((sukcynimidyluksy)karbonylo)winylo)-2,6-dimetoksyfenyłu (**1b**) – wydajność: 91%; czystość >92% (RP-HPLC: faza stacjonarna: C18, faza ruchoma:  $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\% \text{TFA}_{\text{aq}} = 60\%/40\%$  obj./obj.);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\delta$  (ppm), J (Hz): 2,84 (4H, s); 4,09 (6H, s); 4,85 (3H, s); 6,92 (1H, d, J = 16,0); 7,24 (2H, s); 7,99 (1H, d, J = 16,0); 8,18 (2H, t, J = 7,0); 8,51 (2H, t, J = 7,5); 8,68 (2H, d, J = 9,1); 8,72 (2H, d, J = 8,6). Trifluorometanosulfonian 2-metoksy-10-metyloakrydynio-9-(karbonyloksy)-4-((*E*)-2-((sukcynimidyluksy)karbonylo)winylo)-2-metoksyfenyłu (**1c**) – wydajność: 78%; czystość: >90%. (RP-HPLC: faza stacjonarna: C18, faza ruchoma: 70%  $\text{CH}_3\text{CN}/30\%$  0,1% TFA w  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , ppm (J, Hz): 2,84 (4H, s); 4,09 (6H, s); 4,85 (3H, s); 6,92 (1H, d, J = 16,0); 7,24 (2H, s); 7,99 (1H, d, J = 16,0); 8,18 (2H, t, J = 7,0); 8,51 (2H, t, J = 7,5); 8,68 (2H, d, J = 9,1); 8,72 (2H, d, J = 8,6). Przykładowe widmo typu  $^1\text{H NMR}$  dla związku **1b** przedstawiono na fig. 1.

**Przykład 2.** Sposób otrzymywania wybranych soli triflatowych estrów arylowych *N*-podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **2** – związek pośredni, przedstawionym na schemacie 2.

Poszczególne kroki syntezy (F, G, C, D, E) związków **2a** ( $R_2 = \text{H}$ ,  $R_2' - R_6' = \text{H}$ ,  $n = 3$ ), **2b** ( $R_2 = \text{H}$ ,  $R_2' - R_6' = \text{H}$ ,  $n = 4$ ) wraz z zaznaczeniem produktów pośrednich **10–13** przedstawiono na schemacie 2 i opisano poniżej.

*Ogólna metoda otrzymywania estrów arylowych kwasów akrydynylo-2-hydroksy-9-karboksylowych 11 (droga F). Synteza związków **11a** (schemat 2,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_2' - R_6' = \text{H}$ ,  $n = 3$ ), **11b** ( $R_2 = \text{H}$ ,  $R_2' - R_6' = \text{H}$ ,  $n = 4$ ).*

Estry aromatyczne kwasu akrydynylo-9-karboksylowego typu **10** można otrzymać wg metod opisanych w literaturze (Krzyżniński K, Roshal AD, Zadykowiec B, Białk-Bielińska A, Sieradzan A (2010): *J. Phys. Chem. A* 114: 10550–10562; Smith K, Yang JJ, Li Z, Weeks I, Woodhead JS (2009) *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 203; 72–79). Grupę metoksyową (2- $\text{OCH}_3$ ) w związkach typu **10** usuwa się

selektywnie w środowisku kwaśnym. Naważkę związku typu **10** (**10a**:  $R_2 = H$ ,  $R_2'-R_6' = H$ ; **10b**:  $R_2 = H$ ,  $R_2' = CH_3$ ) należy umieścić w kolbie ciśnieniowej i dodać około 100-krotny nadmiar wagowy roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym (HBr/CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H = 45/55 wagowo). Zawartość kolby miesza się w temperaturze około 100°C przez 3–5 godzin. Po tym czasie roztwór reakcyjny chłodzi się, wprowadza do wody z lodem i zobojętniania nasyconym roztworem węgla sodu (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Produkt reakcji należy odfiltrować, przemyć wodą i wysuszyć w eksykatorze próżniowym. Otrzymaną 2-hydroksy pochodną akrydyny typu **11** przemywa się na lejku mieszaniną toluen/cykloheksan, aby usunąć ślady mało polarnych zanieczyszczeń.

Przykładowe analizy: **11a**: wydajność: 65%; t.t. = 273°C (rozkład); TLC (SiO<sub>2</sub>, toluen/pirydyna = 10/1 obj./obj.):  $R_F = 0,37$ ; analiza elementarna (% znaleziony/obliczony): C = 75,87/76,18, H = 4,43/4,16, N = 4,26/4,44; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, t.p.): 7,42 (1H, s), 7,43 (1H, s), 8,20 (3H, ss), 7,74 (1H, t), 7,84 (1H, t), 7,54–7,64 (5H, m). **11b**: wydajność: 63%; t.t. = 252°C (rozkład); TLC (SiO<sub>2</sub>, toluen/pirydyna = 10/1 obj./obj.):  $R_F = 0,39$ ; analiza elementarna (% znaleziony/obliczony): C = 76,39/76,58, H = 4,72/4,59, N = 4,12/4,25.

*Ogólna metoda otrzymywania estrów arylowych kwasów akrydynylo(benzyloksykarbonylo)-alkilo-9-karboksylowych 12 (droga G). Synteza związków 12a (schemat 2,  $R_2 = H$ ,  $R_2'-R_6' = H$ ,  $n = 3$ ), 12b ( $R_2 = H$ ,  $R_2'-R_6' = H$ ,  $n = 4$ ).*

Aby wprowadzić ugrupowanie separujące (łącznik) z grupą aktywną w położenie 2 rdzenia akrydyny związków typu **11** należy zastosować chronione  $\gamma$ -halogenokwasy alifatyczne, np. ester benzylový lub *tert*-butylový kwasu 4-bromomasłowego lub 5-bromowalerianowego, otrzymane z handlowych odczynników według znanych procedur (Vogel AI, Preparatyka organiczna, wyd. 3 (2006), Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa). Osuszoną 2-hydroksy pochodną akrydyny typu **11** rozpuszcza się w niewielkiej ilości bezwodnego DMF i otrzymany roztwór umieszcza w strzykawce. Mieszaninę wkrapla się przez septum w atmosferze gazu obojętnego (Ar) w ciągu około 30 minut do mieszanej i chłodzonej (-20°C) zawiesiny zawierającej 2–3 krotny nadmiar molowy (w stosunku do **11**) wodoru sodowego (NaH), rozprowadzonego w niewielkiej ilości suchego DMF. Po tym czasie usuwa się łaźnię z lodem i kontynuuje reakcję przez kolejne 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie sporządza się roztwór stechiometrycznej ilości (w odniesieniu do **11**) estru benzylový lub *tert*-butylový kwasu 4-bromomasłowego lub 5-bromowalerianowego w suchym DMF, który stopniowo dodaje się w ciągu około 30 min. ze strzykawki przez septum do wcześniej otrzymanej O-hydroksy soli związku **11**, która nie jest wyodrębniana (t.p., Ar). Po tym czasie mieszaninę reakcyjną należy stopniowo ogrzewać do temp. 65–70°C i temperaturę tę utrzymuje się przez 3–5 godzin. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wprowadza się do rozcieńczonego roztworu HCl<sub>aq</sub> (5–10%) i wytrąconą substancję ekstrahuje toluenem, przemywa wodą, a połączone ekstrakty suszy bezwodnym siarczanem sodu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Po przefiltrowaniu roztworu i usunięciu rozpuszczalnika otrzymuje się związki typu **12**, które oczyszcza się metodą grawitacyjnej chromatografii kolumnowej (faza stacjonarna: SiO<sub>2</sub>, faza ruchoma: toluen/pirydyna = 10/1 obj./obj.). Przykładowe analizy: ester fenylový kwasu akrydynylo-2(3'-benzyloksykarbonylo)-propioksy-9-karboksylowego **12a**: wydajność chemiczna 86%, TLC:  $R_F = 0,45$  (SiO<sub>2</sub>, toluen/pirydyna = 10/1 obj./obj.), temperatura topnienia (t.t.) = 108–110°C; analiza elementarna (% obliczony/znaleziony): C = 75,71/75,78; H = 5,02/5,13; N = 2,92/2,85. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm (integracja, multipletowość (s – singlet, t – triplet, kwi – kwintet, ss – sekstet): 2,21 (2H, kwi.); 2,59 (2H, t); 3,49 (2H, t); 5,16 (2H, s); 7,39 (5H, s). Ester fenylový kwasu akrydynylo-2(3'-benzyloksykarbonylo)-butooksy-9-karboksylowego (**12b**): wydajność 89%, TLC:  $R_F = 0,51$  (SiO<sub>2</sub>, toluen/pirydyna = 10/1 obj./obj.), t.t. = 88–89°C, analiza elementarna (% obliczony/znaleziony): C = 75,89/76,05; H = 5,32/5,38; N = 2,76/2,77. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm (integracja, multipletowość): 1,80 (4H, ss); 2,40 (2H, t); 3,40 (2H, t); 5,10 (2H, s); 7,32 (5H, s).

*Otrzymywanie estrów arylowych kwasów 2-(( $\gamma$ -sukcynimidyluksykarbonylo)alkoksy)akrydynylo-9-karboksylowych 13 (droga C, D). Synteza związków 13a (schemat 2,  $R_2 = H$ ,  $R_2'-R_6' = H$ ,  $n = 3$ ), 13b ( $R_2 = H$ ,  $R_2'-R_6' = H$ ,  $n = 4$ ).*

Aby usunąć osłonę benzylovą z grupy karboksylowej i następnie aktywować ją, adoptuje się metody opisane w literaturze przedmiotu (Zomer G, Stavenuiter JFC, Van den Berg RH, Jansen EHJM (1991) *Pract. Spectrosc.* 12: 505–521). W tym celu substraty typu **12** rozpuszcza się w około 10-krotnym nadmiarze wagowym 33% roztworu HBr/CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H i pozostawia na mieszadle przez około 2 godziny w temp. 40–50°C. Po zakończeniu reakcji mieszaninę wprowadza się do nadmiaru wody, a produkty odsąca, przemywa wodą i suszy w próżni. Otrzymuje się związki, stanowiące estry arylový kwasów 2-(( $\gamma$ -karbonylooksy)alkoksy)akrydynylo-9-karboksylowych. Aktywację wolnych grup karboksylowych w ostatnich związkach można przeprowadzić z użyciem NHS, otrzymując związki typu **13**. Przykładowe



GABA. Mieszaninę umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza się w t.p. w atmosferze gazu obojętnego (Ar) aż do rozpuszczenia odczynników sprzęgających. Następnie rozpuszczony aminokwas z odczynnikami sprzęgającymi dodaje się do wcześniej przygotowanej żywicy i naczynie z mieszaniną reakcyjną wytrząsa się przez 1–1,5 godziny. Otrzymaną żywicę z osadzonym Fmoc-GABA przemywa się kolejno: 4x3 ml DMF (1 min.), 4x3 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 min.) 4x3 ml metanolem (1 min.) i 4x3 ml eterem dietylowym (1 min.).

#### *Ustalanie stopnia obsadzenia żywicy*

Umieszcza się 20 mg żywicy z osadzonym Fmoc-GABA w kolbie miarowej 25 ml, dodaje 2 ml 2% roztworu 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu (DBU) w DMF i wytrząsa się całość przez około 30 minut. Następnie dopełnia się kolbę miarową do kreski acetonitrylem (CH<sub>3</sub>CN). Stopień obsadzenia wyznacza się metodą spektrofotometryczną (UV-Vis) za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali 330 nm, pochodzącej od dibenzofulwenu (DBF). W opisany sposób uzyskuje się stopień obsadzenia żywicy w granicach 0,10–0,15 mmol. W celu zacetylowania pozostałych wolnych grup aminowych na tak przygotowanej żywicy, wytrząsa się ją przez około 12 godzin z 3,2 mmola *N*-acetyloimidazolu, rozpuszczonego w minimalnej ilości DMF.

#### *Usunięcie osłony Fmoc z osadzonego pierwszego aminokwasu na nośniku*

W celu usunięcia osłony Fmoc z osadzonej na żywicy pochodnej kwasowej Fmoc-GABA, stosuje się wytrząsanie z 50% roztworem piperydyny w DMF (1x5 min., następnie 1x20 min.). W celu przemycia żywicy stosuje się kolejno następujące wytrząsania: 3 x DMF (5 min.), 2 x izopropanol (5 min.) i 1 x DMF (20 min.). Potwierdzenie obecności wolnych grup aminowych (NH<sub>2</sub>) wykonuje się pomocą testu chloranilowego (Chan WC, White PD, „Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach” (2000), Oxford University Press, Oxford, England). W powyższy sposób uzyskuje się całkowite usunięcie osłony Fmoc z osadzonego na nośniku GABA.

#### *Sprzęganie chronionego aminokwasu Fmoc-Orn(Fmoc)-OH z nośnikiem*

Proces polega na tworzeniu wiązania peptydowego z udziałem wolnych grup aminowych (NH<sub>2</sub>) obecnych w GABA oraz grupy karboksylowej obecnej w *N,N'*-dichronionej ornitynie, Fmoc-Orn(Fmoc)-OH, otrzymanej jak opisano powyżej. Jako czynniki sprzęgające stosuje się *N,N*-diizopropylkarbodiimid (DIPCI) i *N*-hydroksybenzotriazol (HOBt). Naważkę (4-krotny molowy namiar w stosunku do stopnia obsadzenia żywicy) rozpuszcza się w minimalnej ilości DMF, a następnie dodaje DIPCI (10% nadmiar molowy w stosunku do Fmoc-Orn(Fmoc)-OH) oraz naważkę HOBt (4-krotny namiar molowy w stosunku do Fmoc-Orn(Fmoc)-OH). Całość rozpuszcza się, a następnie dodaje do żywicy przygotowanej jak opisano powyżej, prowadząc reakcję sprzęgania przez około 1,5 godziny. Nadmiar reagentów usuwa się przez wymywanie za pomocą DMF (4x5 min.). Proces sprzęgania monitoruje się na obecność wolnych grup aminowych za pomocą wyżej wspomnianego testu chloranilowego. Wynik negatywny wskazuje na zakończenie przyłączania pierwszej cząsteczki ornityny Fmoc-Orn(Fmoc)-OH do GABA (ornityna 1).

#### *Usuwanie grupy ochronnej z chronionego aminokwasu Fmoc-Orn(Fmoc)-OH osadzonego na nośniku (ornityna 1).*

W celu usunięcia grup osłonowych Fmoc z *N,N'*-dichronionej ornityny Fmoc-Orn(Fmoc) połączonej z GABA, wytrząsa się zmodyfikowaną jak opisano powyżej żywicę z 50% roztworem piperydyny w DMF (1x5 min., 1 x20 min.). W celu przemycia produktu stosuje się wytrząsanie z DMF (3x5 min.), następnie z izopropanolem (2x5 min.) oraz DMF (1x20 min.).

#### *Sprzęganie chronionego aminokwasu typu Fmoc-Orn(Fmoc)-OH z ornityną 1.*

Przyłączenie ornityny 2 do żywicy wykonuje się analogicznie jak opisano powyżej, z tym że do reakcji bierze się 2-krotnie wyższy namiar molowy odczynników jak w pierwszym etapie acylowania, ze względu na obecność 2 grup aminowych w ornitynie. Usuwanie grup ochronnych typu Fmoc z ornityny 2 wykonuje się według znanych metod, analogicznie jak opisano powyżej w przypadku ornityny 1.

#### *Odszczepienie oligomeru aminokwasowego od żywicy*

Do odszczepienia uzyskanego oligomeru aminokwasowego od żywicy stosuje się mieszaninę zawierającą objętościowo 88% kwasu trifluorooctowego (TFA), 5% fenolu, 5% wody i 2% triizopropylsilanu (TIPSIL). Tak przygotowany roztwór miesza się ze zmodyfikowaną żywicą (10 ml roztworu na 1 g żywicy) i całość wytrząsa się przez 2 godziny. Po odsączeniu żywicy od roztworu i zagęszczeniu przesączu oligomer aminokwasowy wytrąca się przez wprowadzenie mieszaniny do nadmiaru eteru dietylowego. Wytrącony oligomer odwirowuje się na wirówce (15 min.), a następnie izoluje przez dekantację fazy eterowej. Czynność tę powtarza się 3-krotnie. Po osuszeniu oligomeru rozpuszcza się go w wodzie destylowanej i liofilizuje.

### Przyłączenie soli akrydyniowej do oligomeru aminokwasowego

Reakcję prowadzi się w warunkach typowych dla sprzęgania pierwszorzędowej grupy aminowej białek z aktywowanymi estrami typu NHS (bufor fosforanowy, pH = 8,5, t.p., 30 min.), mieszając równomolowe ilości emitera chemiluminescencji, otrzymanego według przykładu 1 lub przykładu 2, względnie handlowego produktu (CAS 177332-37-5), z otrzymanym jak opisano powyżej oligomerem aminokwasowym. Produkt oczyszcza się za pomocą półpreparatywnej chromatografii typu RP-HPLC, stosując kolumnę typu C8 (np. 250 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) i gradientową fazą ruchomą (A = H<sub>2</sub>O, B = 80% ACN + 0,1% TFA, B = 0–100%, objętość nastrzyku 200  $\mu$ l), a następnie izoluje go za pomocą liofilizacji. Powstaje znacznik zawierający cztery ugrupowania estru akrydyniowego w cząsteczce i dany Acr pokazany na fig. 3, z wydajnością chemiczną na poziomie 20–30%. Czystość związku określa się za pomocą RP-HPLC, stosując elucję izokratyczną za pomocą mieszaniny 0,1% TFA w wodzie/0,06% TFA w acetonitrylu w stosunku objętościowym 1/1, kolumnę typu C6-Phenyl lub C-18 i detekcję absorpcyjną przy długości fali 254 nm i 365 nm. Przykładowe widmo typu MALDI-TOF MS dla związku **3a** (Fig. 3) przedstawiono na fig. 1A i fig. 1B.

**Przykład 4.** Odczynnik immunochemiczny do oznaczeń chemiluminescencyjnych zawierający emiter chemiluminescencji o wzorze ogólnym **1**, **2**, **3**, otrzymany według przykładów 1–3. Dodatkowo pokazano właściwości luminescencyjne związków o wzorze 1 i 2 – stanowiące część struktury wynalazku – związku o wzorze 3.

Sposób otrzymywania odczynników immunochemicznych zawierających emitery chemiluminescencji **1a** (X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub> = H, R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1b** (X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = H, R<sub>2</sub>' = R<sub>6</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1c** (X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>, R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub>' = H), **2a** (R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 3), **2b** (R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 4) i **3a** (fig. 3) opisano poniżej.

Do małej kolby wprowadza się 0,18 mg (1,2x10<sup>-9</sup> mola) handlowego białka typu IgG (np. *Goat Anti-Human Immunoglobulin G*) w buforze fizjologicznym (pH = 7,5; 0,01 M monofosforan sodowy, 0,25 M NaCl), a następnie odpowiednią ilość zasady (0,01 M NaOH), aby otrzymać roztwór o pH w granicach 8,0–9,0. Do otrzymanej mieszaniny należy wprowadzić roztwór emitera chemiluminescencji, otrzymanego w przykładzie 1 lub 2, rozpuszczonego w bezwodnym DMF lub CH<sub>3</sub>CN, aby otrzymać mieszaninę zawierającą 10–12-krotny nadmiar molowy emitera nad znakowanym białkiem, optymalnie 13,6x10<sup>-9</sup> mola znacznika, to jest 2,72  $\mu$ l roztworu **1a–2b** o stężeniu 5 mM (procedura III, fig. 5). W przypadku zastosowania emitera chemiluminescencji **3a**, do otrzymania odczynnika immunochemicznego stosuje się 3–5-krotny nadmiar molowy **3a** nad znakowanym białkiem, a reakcję prowadzi w obecności następujących odczynników sprzęgających: 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDAC) i *N*-hydroksysukcynimidu (NHS) w ilościach równomolowych w stosunku do użytego emitera.

Pozostałe kroki są identyczne dla wszystkich typów emiterek chemiluminescencji opisanych w dokumencie. Kolbę pozostawia się na mieszadle w temp. pok. przez około 30 minut i po tym czasie do mieszaniny wprowadza się 50  $\mu$ l 1% roztworu lizyny i pozostawia na mieszadle przez kolejne 15 minut. Powstałe koniugaty typu białko-znacznik, stanowiące odczynniki immunochemiczne, należy wyizolować stosując złożę chromatograficzne typu sitowego, na przykład *Sephadex G-50* lub *G-25* jako fazę stacjonarną oraz kwaśny bufor fosforanowy (pH = 3,5–5,0) w charakterze fazy ruchomej, zbierając frakcje po 1 ml. Następnie należy wykonać pomiary chemiluminescencji poszczególnych frakcji za pomocą luminometru płytkowego w standardowy sposób, opisany w piśmiennictwie (<http://www.cayman-chem.com/pdfs/200201.pdf>; Krzywiński K, Ożóg A, Malecha P, Roshal AD, Wróblewska A, Zadykowiec B, Błażejowski J (2011) *J. Org. Chem.* 76: 1072–1085) i wyselekcjonować na tej podstawie 1–2 frakcje o maksymalnej intensywności emisji. Stężenie białka w otrzymanych roztworach odczynników immunochemicznych można wyznaczyć stosując metodę spektrofotometryczną, a korzystnie test Bradforda (<http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/4110065A.pdf>). Przygotowany roztwór odczynnika można bezpośrednio stosować w oznaczeniach immunochemicznych, a pomiędzy badaniami należy go przechowywać w obniżonej temperaturze (-20°C). Odczynnik immunochemiczny korzystnie jest wyizolować w stanie suchym, stosując ultrafiltrację molekularną roztworu o największej emisji i filtry wirówkowe o zdefiniowanym punkcie odcięcia masy (np. *Centrifugal Filter Units, 30000 NMWL*), przemywając produkt zakwaszoną wodą destylowaną (HCl<sub>aq</sub>, pH = 5,0–5,5) i liofilizując pozostałość otrzymaną na filtrze. Przykładowe rezultaty dotyczące wydajności emisji odczynników immunochemicznych otrzymanych w powyższy sposób z udziałem przykładowego emitera chemiluminescencji **1b** przedstawiono na fig. 5. Optymalne odczynniki immunochemiczne, stosowane do dalszych badań, uzyskuje się stosując 11,3-krotny nadmiar molowy emitera chemiluminescencji nad znakowanym białkiem według opisanej w tym przykładzie metodologii.

**Przykład 5.** Porównanie efektywności emisji odczynników immunochemicznych zawierających emitery chemiluminescencji o wzorze ogólnym **1** i **2** otrzymanych według przykładu 1 i 2, w obecności substancji powierzchniowo czynnych. Intensywność emisji odczynników immunodiagnostycznych uzyskanych z udziałem emiterów chemiluminescencji **1a** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub> = H, R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1b** (schemat 1, X = CHCH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = H, R<sub>2</sub>' = R<sub>6</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1c** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>, R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub>' = H), **2a** (schemat 2, R<sub>2</sub> = H, R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 3), **2b** (schemat 2, R<sub>2</sub> = H, R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 4) w układach zawierających *N*-dodecylo-*N,N*-dimetylo-3-amonio-1-propanosulfonian sodowy, chlorek heksadecylotrimetyloamoniowy i Triton X-100.

Efektywność emisji odczynników immunochemicznych, otrzymanych według przykładu 5, zawierających emitery chemiluminescencji **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b** porównano w obecności różnego typu substancji powierzchniowo czynnych, to jest (*N*-dodecylo-*N,N*-dimetylo-3-amonio-1-propanosulfonianu sodowego (DDAPS), chlorku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAC) i Tritonu X-100 (TX-100), uzyskując końcowe stężenia na płytce pomiarowej w zakresie 5–10 mM w przypadku CTAC i DDAPS oraz 10–20 mM w przypadku TX-100. Wywołanie emisji chemiluminescencji przeprowadzono dodając do studzienek pomiarowych, zawierających określoną ilość odczynnika immunochemicznego według przykładu powyżej, rozpuszczonego buforze fosforanowym (0,04 mg/ml, pH = 3,5–5) kolejno 50 μl 0,06% roztworu nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w 0,01 M kwasie azotowym (V) (HNO<sub>3</sub>) z dodatkiem jednego z powyżej wymienionych środków powierzchniowo czynnych, a następnie 50 μl 0,2 M roztworu NaOH i mierząc całkowity sygnał emisji przy ustalonej czułości aparatu. Dodatek surfaktantów do układu pomiarowego zwiększa intensywność emisji promieniowania, w szczególności w przypadku odczynników immunochemicznych zawierających emitery chemiluminescencji wg zastrzeżenia 1. Szczególnie wysoką efektywność emisji uzyskuje się, stosując emiter **1b** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = H, R<sub>7</sub> = R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>) w obecności DDAPS lub TX-100. Porównanie efektywności emisji odczynników immunochemicznych otrzymanych z udziałem emiterów chemiluminescencji **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b** przedstawiono na fig. 7.

Porównanie stabilności chemicznej odczynników immunochemicznych otrzymanych według przykładu 5 z udziałem emiterów chemiluminescencji **2a**, **2c** oraz substratu handlowego C (fig. 3, CAS: 177332-37-5) w roztworze buforowym przedstawiono na fig. 8. Stabilność chemiczna odczynnika immunochemicznego jest rozumiana w niniejszym wynalazku jako stopień zachowanej pierwotnej zdolności do emisji po jego inkubacji w roztworze alkalicznym przez określony czas (pH = 8,0; 298 K). Wysoka stabilność odczynników jest korzystna ze względu na warunki analiz biomedycznych, które najczęściej wykonuje się w zakresie wartości pH = 7–8. Odczynniki zawierające emitery CL **2a** i **2c** są stabilniejsze roztworze, aniżeli odpowiednik handlowy C. Odczynniki, zawierające emitery o wzorze ogólnym **1a–1c** wykazują stabilność porównywalną z produktem handlowym C.

**Przykład 6.** Sposób określania ilości białkowego analitu biologicznego za pomocą pomiaru chemiluminescencji z udziałem odczynników immunochemicznych o wzorze ogólnym **1** i **2**, otrzymanych według przykładów 1 i 2, polegający na immunologicznej metodzie bezpośredniej.

Wykresy kalibracyjne dla odczynników immunochemicznych zawierających **1a** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub> = H, R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1b** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = H, R<sub>2</sub>' = R<sub>6</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1c** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>, R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub>' = H), **2a** (schemat 2, R<sub>2</sub> = H, R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 3), **2b** (schemat 2, R<sub>2</sub> = H, R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, n = 4).

Na białe płytki polistyrenowe przystosowane do badań immunochemicznych (na przykład *Maxi-Sorp White Multiwell Plates*) pokryte antygenami klasy IgG (analit) nakłada się seryjnie rozcieńczone przeciwciała klasy anti-IgG (np. *Goat Anti-Human IgG (H+L)*) z przyłączonym kowalencyjnie emiterem chemiluminescencji o wzorze ogólnym **1** i **2**, to jest odczynniki immunochemiczne zawierające związki **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b**, otrzymane jak w przykładzie 5. Płytki należy inkubować przez około 60 minut w temperaturze 37°C, następnie opłukać i osuszyć. Aby wywołać emisję promieniowania, do kolejnych studzienek dodaje się z pomp 10–50 μl 0,06% roztworu nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w 0,01 M HNO<sub>3</sub>, zawierający 5 mM DDAPS, a następnie taką samą objętość 0,20–0,25 M roztworu wodnego wodorotlenku sodowego (NaOH<sub>aq</sub>) i mierzy całkowitą (integralną) emisję promieniowania przez okres 3–30 sekund, w zależności od użytego znacznika. Czas pomiaru musi umożliwić zebranie przynajmniej 99% sygnału emisji. Pomiar wykonuje się z udziałem luminometru płytkowego z opcją dozowania odczynników z pomp. Wykresy kalibracyjne, uzyskane w immudiagnostycznych testach bezpośrednich z udziałem odczynników immunochemicznych zawierających przykładowe emitery chemiluminescencji **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b** przedstawiono na fig. 9. Wykres kalibracyjny, uzyskany w tym samym układzie pomiarowym z udziałem handlowego odpowiednika i wykonany według załączonych procedur oznaczono jako C (CAS 177332-37-5; <http://www.caymanchem.com/pdfs/200201.pdf>).

**Przykład 7.** Reaktywność odczynników immunochemicznych, zawierających emitery chemiluminescencji o wzorze ogólnym **1** i **2**, otrzymane według przykładów 1 i 2 w immunologicznej metodzie pośredniej.

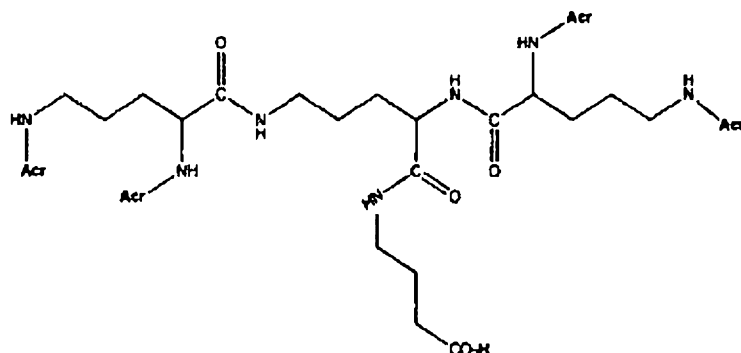
Porównanie czułości i serospecyficzności odczynników immunochemicznych zawierających emitery chemiluminescencji **1a** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub> = H, R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1b** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = H, R<sub>2</sub>' = R<sub>6</sub>' = OCH<sub>3</sub>), **1c** (schemat 1, X = CH=CH, R<sub>2</sub> = R<sub>2</sub>' = OCH<sub>3</sub>, R<sub>7</sub> = R<sub>6</sub>' = H) i **2a** (schemat 2, R<sub>2</sub> = H, R<sub>2</sub>'-R<sub>6</sub>' = H, n = 3) w badaniach toksoplazmozy z udziałem pomiaru chemiluminescencji.

Białe płytki 96-dołkowe przystosowane do badań immunochemicznych (na przykład *MaxiSorp White Multiwell Plates*) pokryć antygenami *Toxoplasma gondii*, inkubować około 60 min. w 37°C i przemyć. Następnie płytki inkubować w tych samych warunkach z surowicą ludzką i po wypłukaniu inkubować je ponownie z odczynnikami immunochemicznymi, to jest przeciwciałami antyludzkimi np. *Goat Anti-Human IgG (H+L)*, znakowanymi emiterami chemiluminescencji **1a** lub **1b**, lub **2a**, otrzymanymi jak opisano w przykładzie powyżej. Dodatkowo, jedną płytkę należy inkubować w tych samych warunkach z udziałem odczynnika immunochemicznego otrzymanego na bazie tego samego białka i porównywalnego handlowego emitery chemiluminescencji (C: CAS 177332-37-5) w sposób opisany w ulotce technicznej produktu (<http://www.caymanchem.com/pdfs/200201.pdf>).

Po wypłukaniu płytek należy odczytać całkowitą (integralną) emisję promieniowania z użyciem luminometru płytkowego, wprowadzając kolejno do studzienek pomiarowych 50 µl mieszaniny składającej się z 0,06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w 0,01M HNO<sub>3</sub> zawierającej środek powierzchniowo czynny typu DDAPS o stężeniu 25 mM, jak opisano w przykładzie powyżej, a następnie taką samą objętość 0,2 M roztworu NaOH<sub>aq</sub> lub TBAOH<sub>aq</sub>. Wykresy kalibracyjne, przedstawiające zależność intensywności emisji (chemiluminescencji) od stężenia badanego odczynnika immunochemicznego przedstawiono na fig. 10. Na podstawie przedziałów ufności danych przedstawionych na powyższych wykresach określono limity detekcji (LOD) i limity oznaczalności (LOQ) odczynników immunochemicznych, które wyniosły: LOD (x10<sup>-5</sup> µg< studzienka) = 7,93; 4,55; 3,68 i 11,6 odpowiednio dla **1a**, **1b**, **2a** i **C** (odczynnik kontrolny) oraz LOQ (x10 µg/studzienka) = 12,5; 7,33; 5,90 i 18,4 odpowiednio dla **1a**, **1b**, **2a** i **C**. Przykładowe rezultaty dotyczące serospecyficzności opisanej w tym przykładzie metody dla ustalonego i stałego stężenia odczynnika immunochemicznego, równego 0,05 µg/ml, przedstawiono na fig. 11.

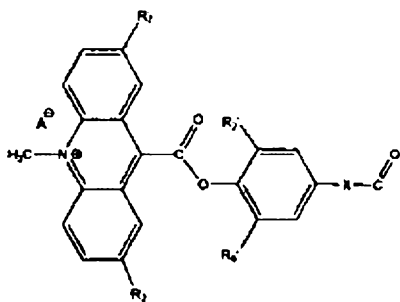
## Zastrzeżenia patentowe

1. Sole estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **3** zawierające szkielet oligomeru aminokwasowego:



gdzie:

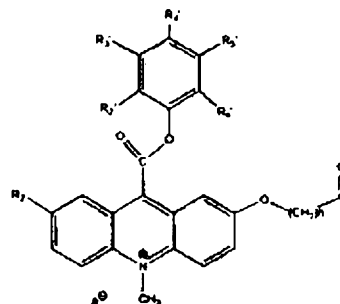
Acr =



X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH=CH, C≡C  
 R<sub>2</sub>, R<sub>7</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I,  
 OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> gdzie n = 1-6  
 w dowolnej kombinacji  
 R<sub>2</sub>', R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I, OCH<sub>3</sub>  
 w dowolnej kombinacji  
 A<sup>+</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>.

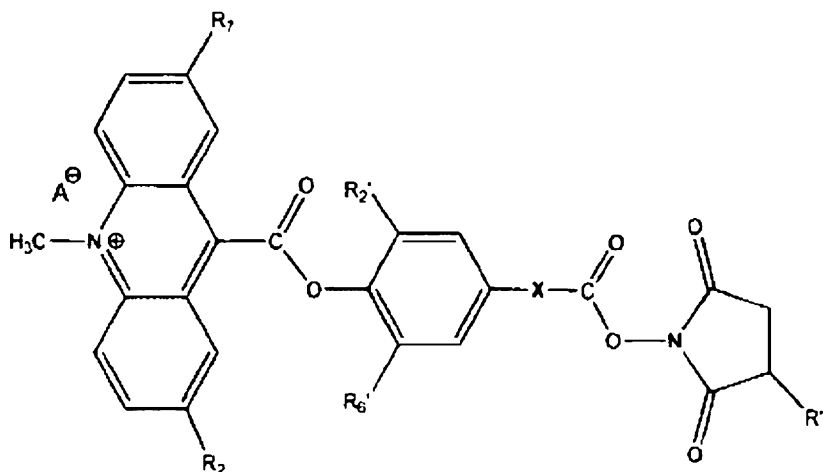
lub

Acr =



n = 1-8  
 R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 R<sub>2</sub>' - R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 w dowolnej kombinacji  
 A<sup>+</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>

2. Sposób otrzymywania soli estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **3**, określonych w zastrz. 1, **znamienny tym**, że do rozgałęzionego oligomeru aminokwasowego otrzymanego z diaminokwasów, korzystnie z ornityny lub lizyny oraz ω-amino-kwasu, korzystnie kwasu γ-aminomasłowego przyłącza się co najmniej dwie cząsteczki związku o wzorze ogólnym **1**



gdzie:

$X = \text{CH}=\text{CH}, \text{C}\equiv\text{C}$

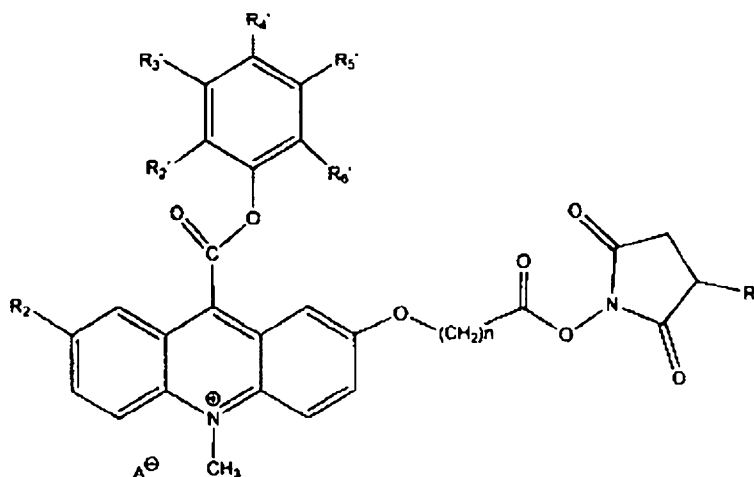
$R_2, R_7 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{OCH}_3, \text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$  gdzie  $n = 1-6$  w dowolnej kombinacji

$R_2', R_6' = \text{H}, \text{CH}_3, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{OCH}_3$  w dowolnej kombinacji

$R'' = \text{H}, \text{SO}_3\text{H}$

$A^- = \text{CF}_3\text{SO}_3^-, \text{FSO}_3^-, \text{I}^-$

lub związku o wzorze ogólnym 2:



gdzie

$n = 1-8$

$R_2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$

$R_2'-R_6' = \text{H}, \text{CH}_3, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$  w dowolnej kombinacji

$R'' = \text{H}, \text{SO}_3\text{H}$

$A^- = \text{CF}_3\text{SO}_3^-, \text{FSO}_3^-, \text{I}^-$

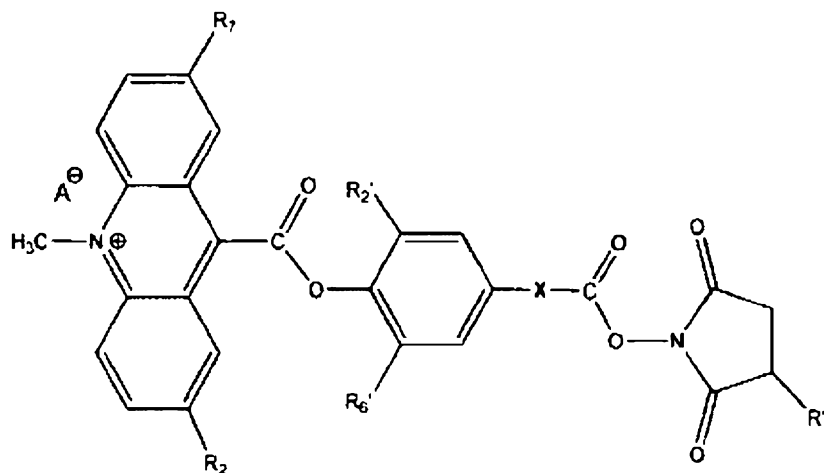
przy czym na nośniku stałym, stosowanym w syntezie zgodnie ze strategią osłon fluorenylo-9-metoksykarbonylowych Fmoc, dającą wolny kwas po odszczepieniu od nośnika, którym korzystnie jest żywica typu polistyren-glikol polietylenowy PS-PEG z kotwiczką alkoholu *p*-alkoksybenzylowego lub żywica tritylowa lub żywica 2-chlorotrytylowa lub żywica Wanga, osadza się korzystnie w stopniu 0,1 milirównoważnika aminokwasu na gram żywicy kwas  $\omega$ -aminokwas chroniony na *N*-końcu osłoną Fmoc otrzymany według znanych metod, a następnie nadmiar grup hydroksylowych nośnika blokuje się przez acetylowanie według znanych metod, korzystnie za pomocą *N*-acetyloimidazolu, a następnie usuwa się osłonę grupy aminowej Fmoc z  $\omega$ -aminokwasu przyłączonego do żywicy za pomocą znanych metod, po czym sprzęga się wolną grupę aminową w  $\omega$ -aminokwasie za pomocą *N,N'*-chronionego diaminokwasu według znanych metod, korzystnie za pomocą di(flourenylo-9-metoksykarbonylo)-ornityny Fmoc-Orn-(Fmoc) lub

di(flourenylo-9-metoksykarbonylo)-lizyny Fmoc-Lys-(Fmoc), a następnie usuwa się z przyłączonych aminokwasów osłony typu Fmoc według znanych metod, po czym otrzymany na nośniku stałym produkt ponownie acyluje się jak wyżej za pomocą kolejnej porcji *N,N'*-chronionego diaminokwasu Fmoc-Orn(Fmoc) lub Fmoc-Lys(Fmoc), a następnie usuwa się osłonę Fmoc z grup aminowych powyższego diaminokwasu według znanych metod, po czym odszczepia się otrzymany oligomer aminokwasowy z żywicy znaną metodą odpowiednią do zastosowanego nośnika stałego, a następnie wytrąca się wolny oligomer aminokwasowy eterem dietylowym i liofilizuje go, po czym sprzęga się wolne grupy aminowe w oligomerze aminokwasowym z solą estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **1**, lub solą estrów arylowych podstawionych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **2** określonym powyżej, po czym oczyszcza się otrzymany produkt końcowy o wzorze ogólnym **3** określonym powyżej, korzystnie za pomocą chromatografii cieczowej typu HPLC w odwróconych fazach, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu w wodzie w obecności 0,05–0,20% kwasu trifluorooctowego.

3. Odczynnik immunochemiczny do oznaczeń chemiluminescencyjnych zawierający emiter chemiluminogeny, **znamienny tym**, że emiterem są sole *N*-podstawionych estrów arylowych kwasów akrydynylo-9-karboksylowych o wzorze ogólnym **3** określonym w zastrz. 1, który to emiter jest sprzężony z dowolnym białkiem zdolnym do reakcji immunochemicznej z antygenem i korzystnie zawiera 1012-krotny nadmiar molowy emitera nad białkiem i który korzystnie można wyizolować się za pomocą techniki filtracji molekularnej i liofilizacji, i których emisję wywołuje się za pomocą znanych odczynników, korzystnie w obecności substancji powierzchniowo czynnych takich jak etery polimeru glikolu polietylenowego (PEG) i *p*-t-oktylofenolu  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$  gdzie ilość podjednostek glikolu polietylenowego  $n = 9-10$  lub 55, lub *N*-dodecylo-*N,N*-dimetylo-3-amonio-1-propanosulfonian sodowy lub chlorek heksadecylotrimetylo-amonioowy.

Wzory:

1. Emitery chemiluminescencyjne.



gdzie:

X = CH=CH, C≡C

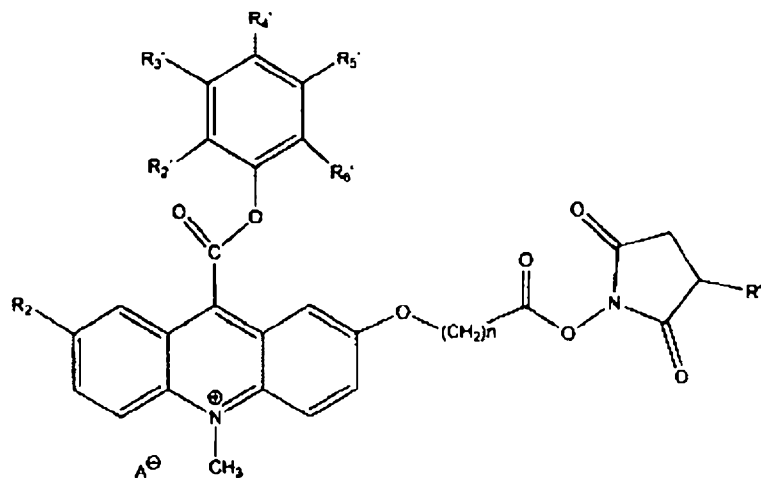
R<sub>2</sub>, R<sub>7</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> gdzie n = 1–6 w dowolnej kombinacji

R<sub>2</sub>', R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I, OCH<sub>3</sub> w dowolnej kombinacji

R'' = H, SO<sub>3</sub>H

A<sup>-</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>

2. Emitery chemiluminescencyjne.



gdzie

n = 1–8

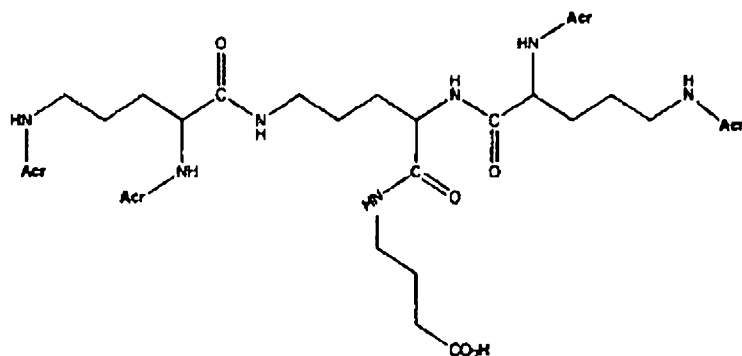
R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I

R<sub>2</sub>'–R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I w dowolnej kombinacji

R'' = H, SO<sub>3</sub>H

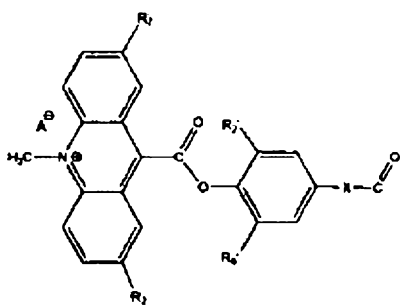
A<sup>-</sup> = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>

## 3. Emitery chemiluminescencyjne – wynalazek



gdzie:

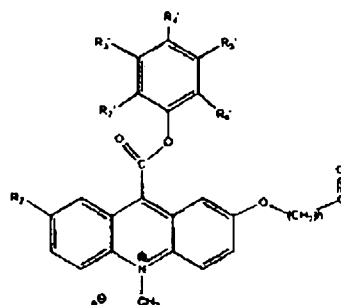
Acr =



X = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH=CH, C≡C  
 R<sub>2</sub>, R<sub>7</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I,  
 OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> gdzie n = 1-6  
 w dowolnej kombinacji  
 R<sub>2</sub>', R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I, OCH<sub>3</sub> w  
 dowolnej kombinacji  
 A' = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>.

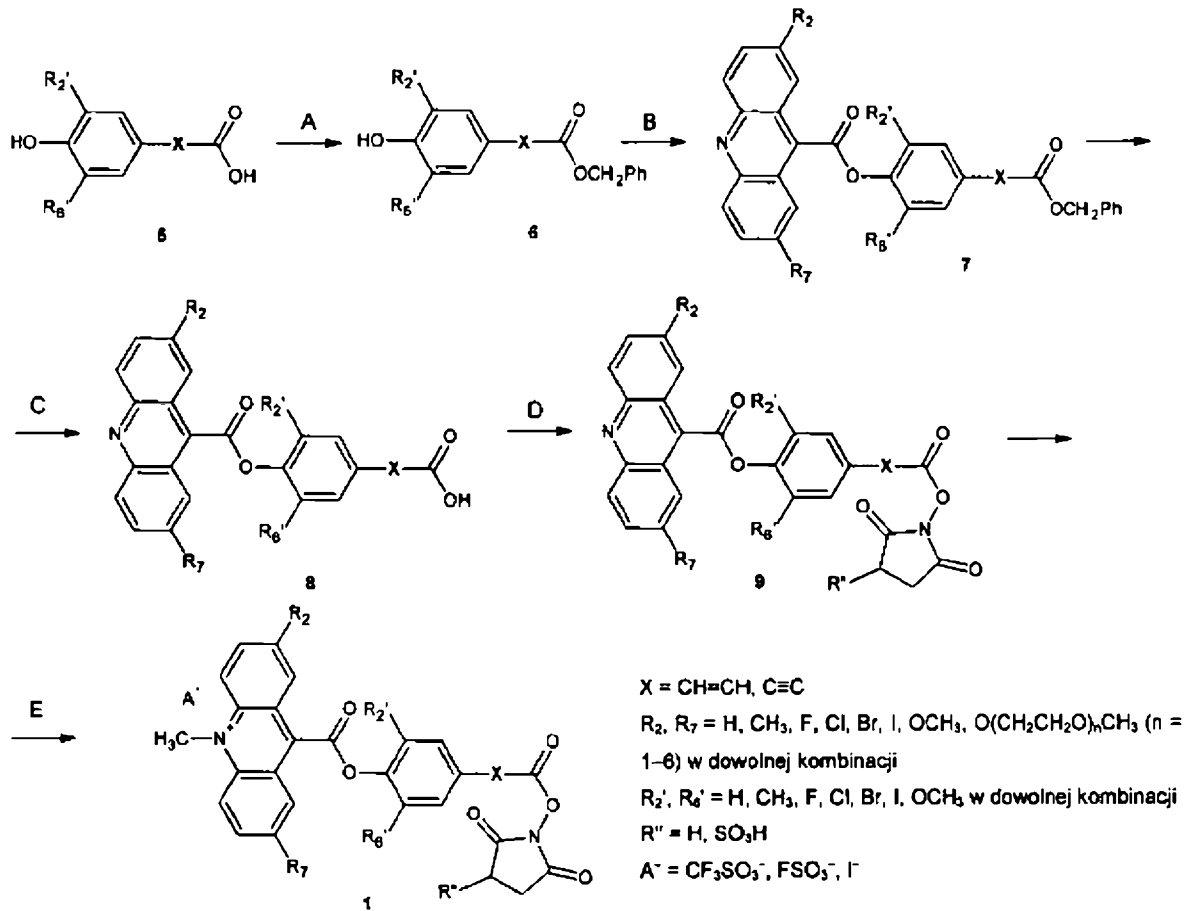
lub

Acr =

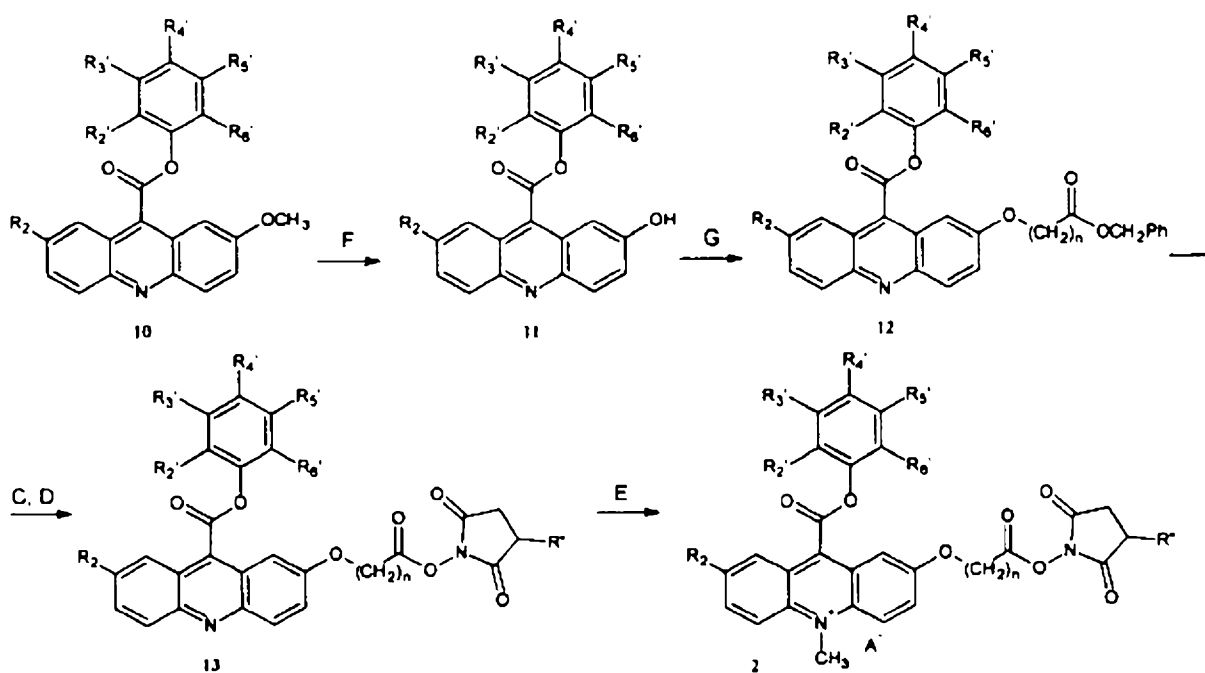


n = 1-8  
 R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 R<sub>2</sub>' - R<sub>6</sub>' = H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, I  
 w dowolnej kombinacji  
 A' = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, FSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>

Schemat 1. Droga syntezy związków objętych zastrzeżeniem 1 o wzorze ogólnym 1 przedstawionych na schemacie 1.



Schemat 2. Droga syntezy związków objętych zastrzeżeniem 2 o wzorze ogólnym 2 przedstawionych na schemacie 2.



$n = 1-8$

$R_2 = H, CH_3, F, Cl, Br, I$

$R_2' - R_6' = H, CH_3, F, Cl, Br, I$  w dowolnej kombinacji

$R'' = H, SO_3H$

$A' = CF_3SO_3^-, FSO_3^-, I^-$

### Rysunki

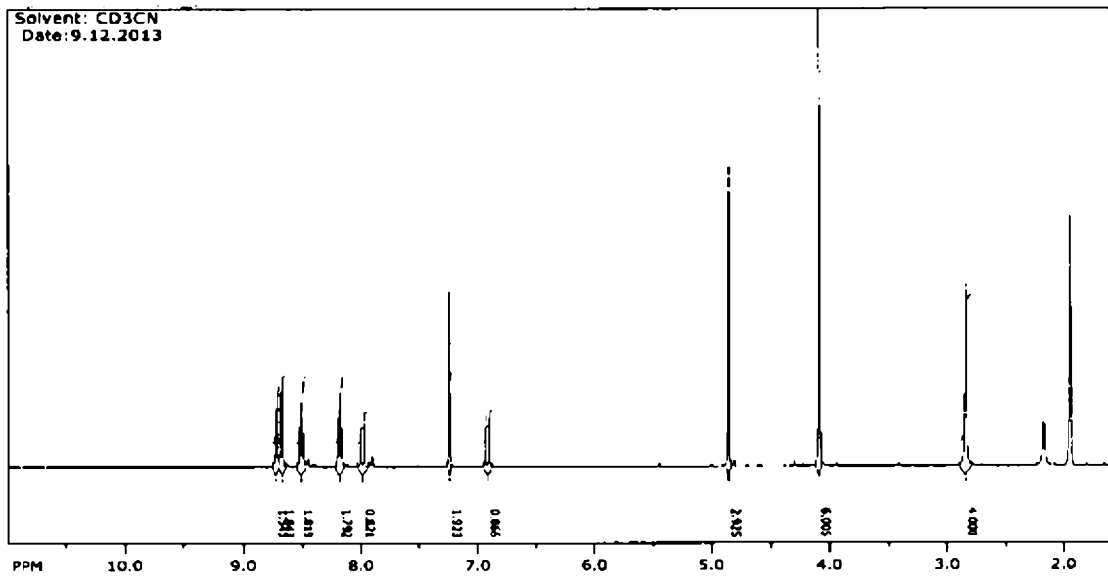


Fig. 1

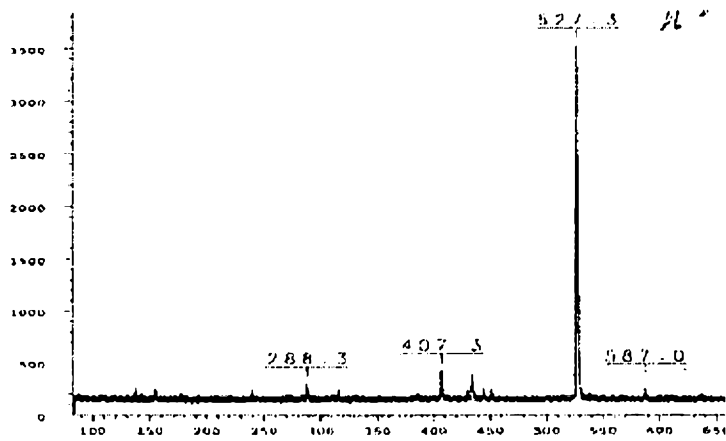


Fig. 2

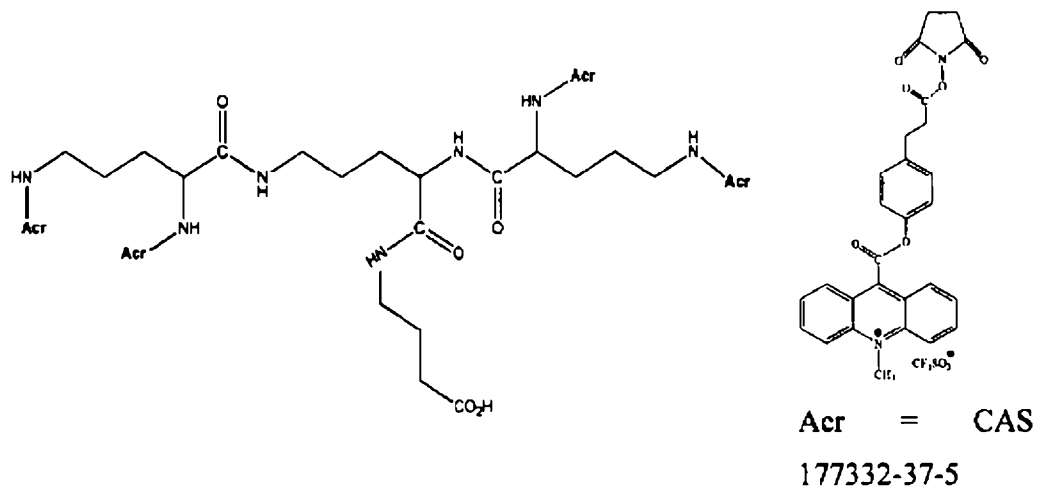


Fig. 3

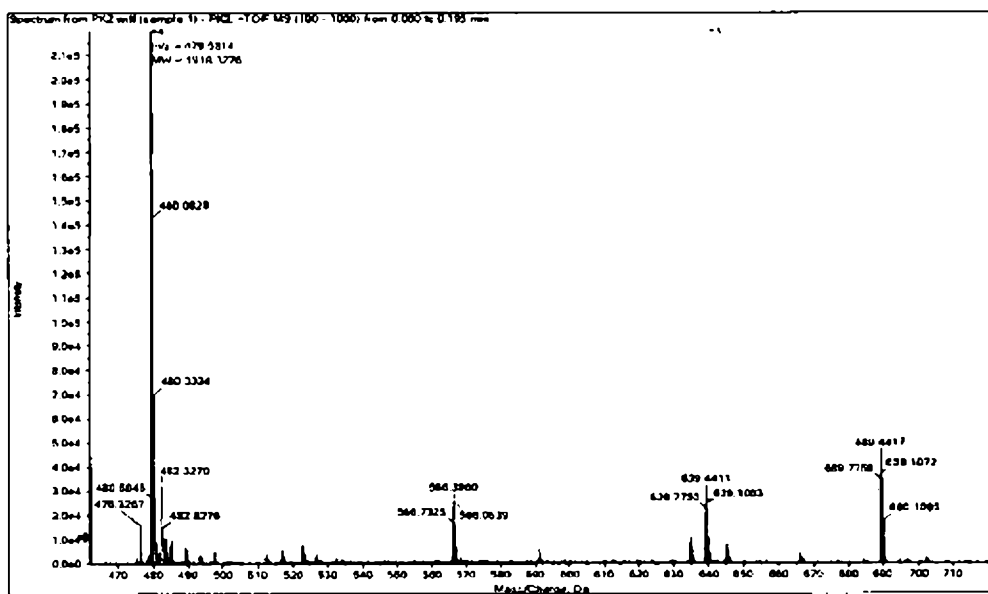


Fig. 4A

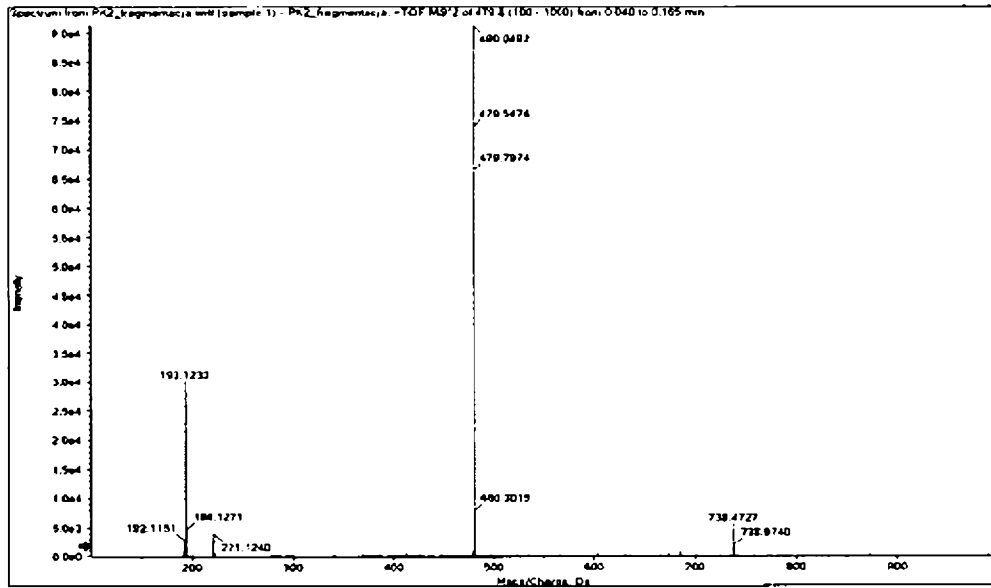


Fig. 4B

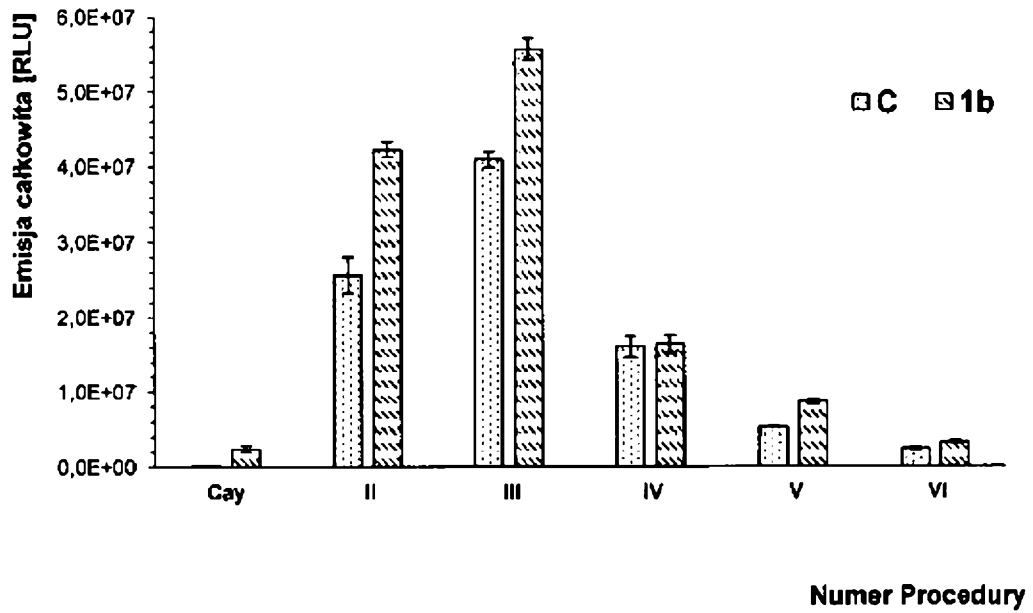


Fig. 5

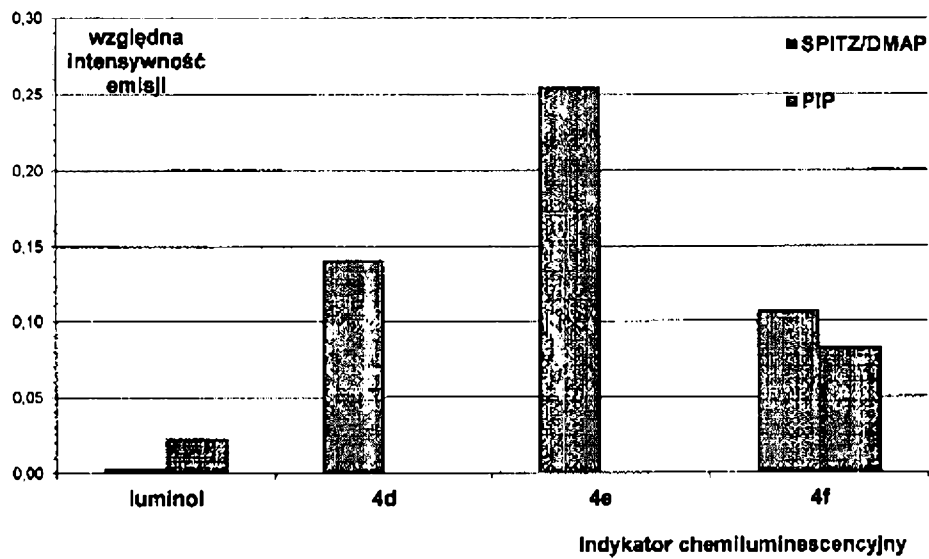


Fig. 6

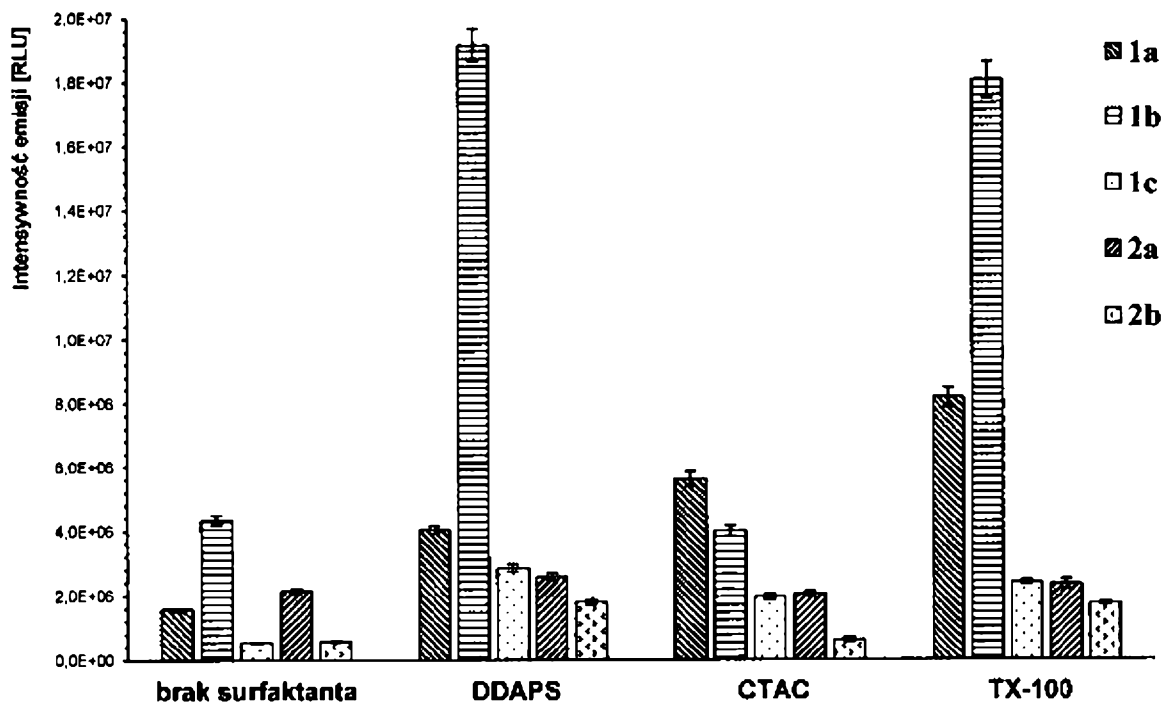


Fig. 7

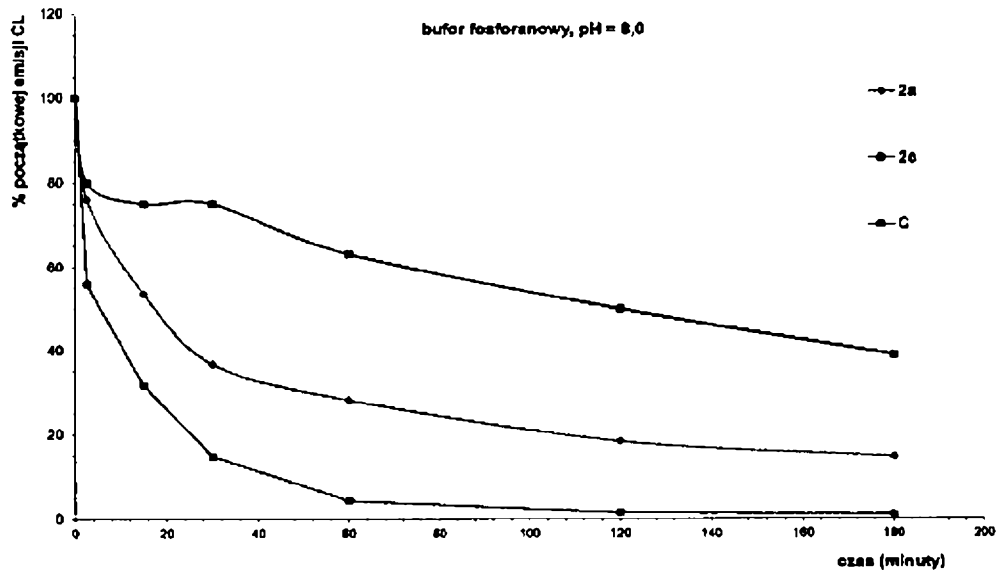


Fig. 8

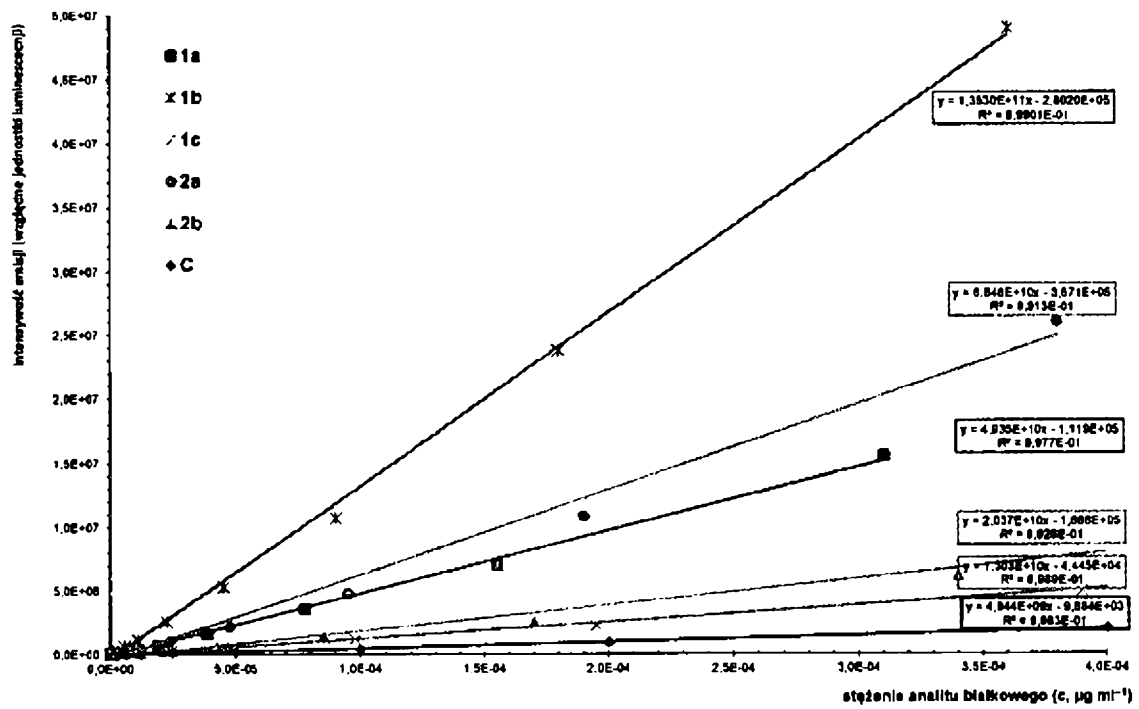


Fig 9

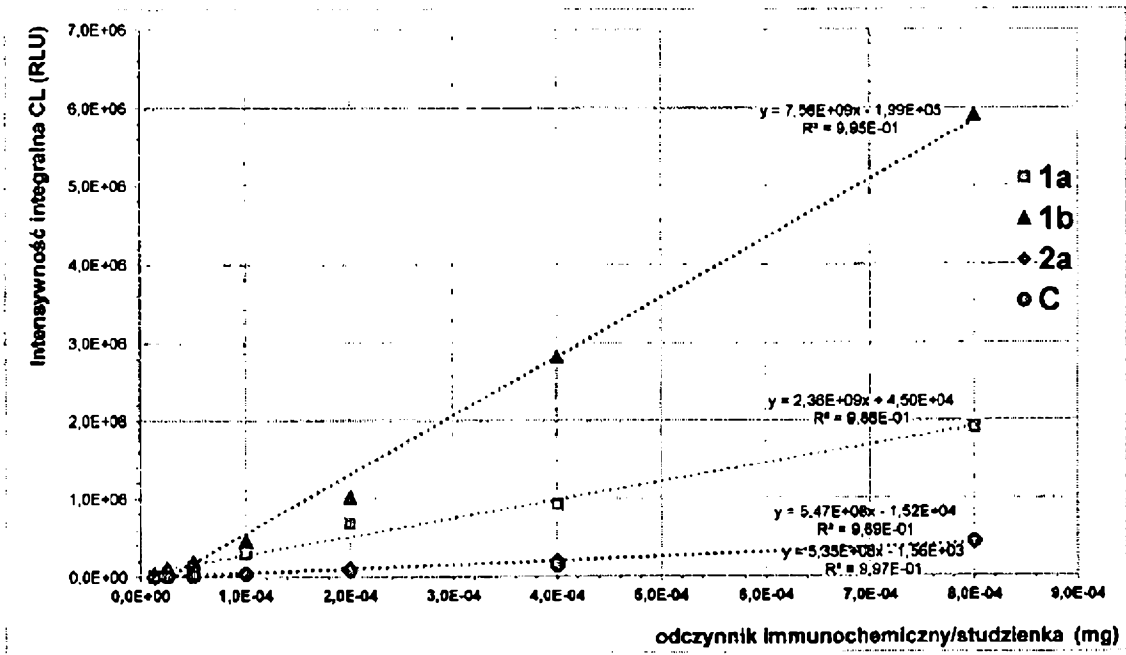


Fig. 10

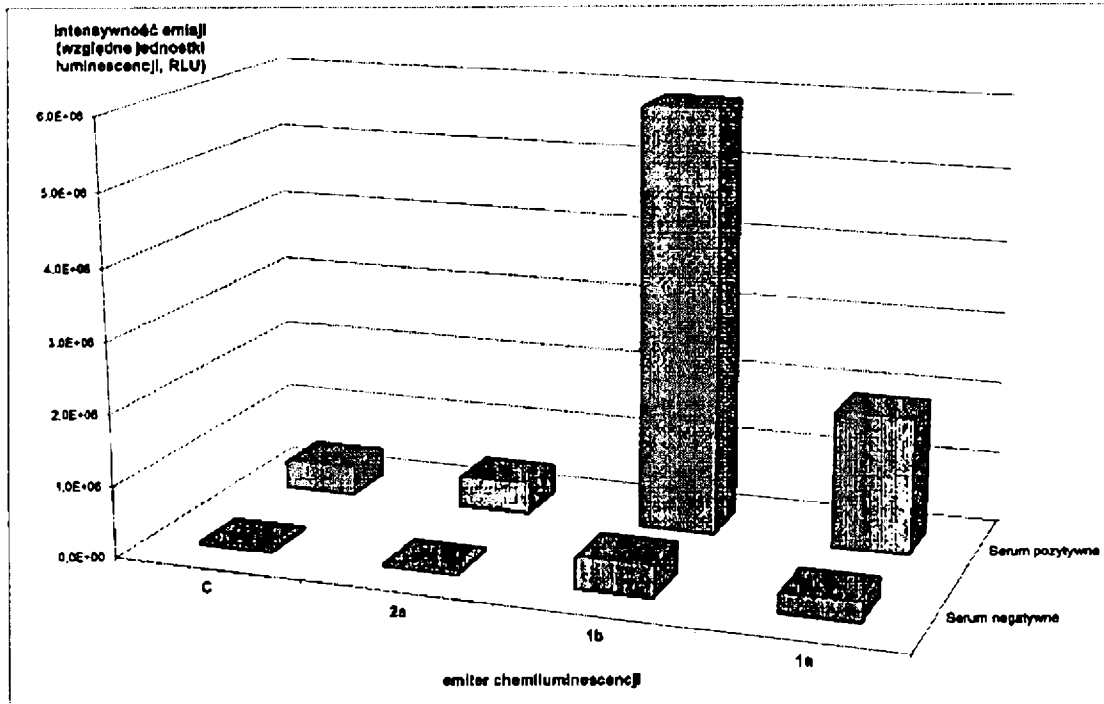


Fig. 11

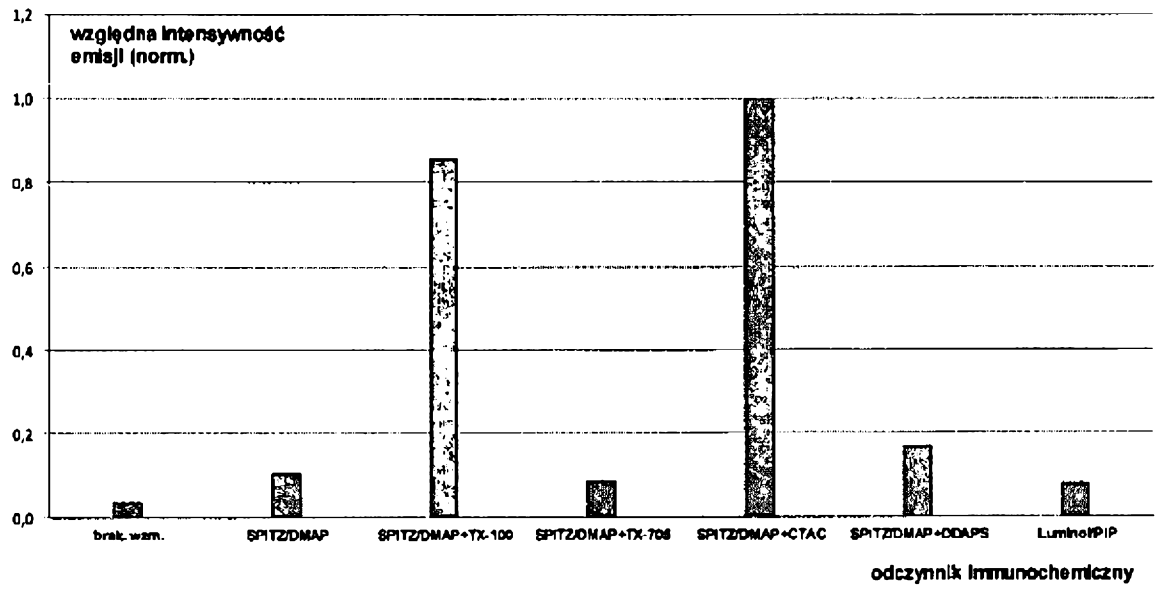


Fig. 12