



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 303**

51 Int. Cl.:

**C07D 219/00** (2006.01) **C07D 219/04** (2006.01)  
**C07D 221/18** (2006.01) **C07D 409/04** (2006.01)  
**C07D 411/04** (2006.01) **C07D 487/06** (2006.01)  
**C07D 495/06** (2006.01) **C07D 495/16** (2006.01)  
**C07D 455/03** (2006.01) **C12Q 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02789841 .0**

96 Fecha de presentación : **18.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1456176**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54

Título: **Compuestos mejorados para generar quimioluminiscencia con una peroxidasa.**

30

Prioridad: **20.12.2001 US 29222**  
**25.07.2002 US 205050**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.07.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.07.2009**

73

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

72

Inventor/es: **Akhavan-Tafti, Hashem;**  
**De Silva, Renuka y**  
**Xie, Wenhua**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 323 303 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos mejorados para generar quimioluminiscencia con una peroxidasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones quimioluminiscentes que reaccionan con una peroxidasa y un peróxido para generar quimioluminiscencia. En particular, la presente invención se refiere a composiciones mejoradas que contienen nuevos compuestos de ceteno-ditioacetal que reaccionan con una peroxidasa y un peróxido para producir quimioluminiscencia visible. La invención se refiere además a procedimientos analíticos para detectar una peroxidasa y para detectar acompañantes de fijación específica marcados con peroxidasa en inmunoanálisis, a los ensayos con sonda de ácido nucleico y a otros ensayos con par de fijación específico.

15 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas peroxidasa tales como la peroxidasa del rábano picante (HRP) se utilizan frecuentemente como marcadores o etiquetas en ensayos con enzima ligada para las moléculas biológicas y otros analitos de interés, tales como fármacos, hormonas, esteroides y marcadores para el cáncer. La detección quimioluminiscente de estas enzimas ofrece un medio seguro, conveniente y sensible para medir la cantidad de enzima en una muestra o la cantidad de analito marcado con una enzima o el acompañante de fijación específico marcado para un analito. Se han desarrollado otros esquemas de reacción quimioluminiscente para cuantificar la concentración de enzimas peroxidasa específicas.

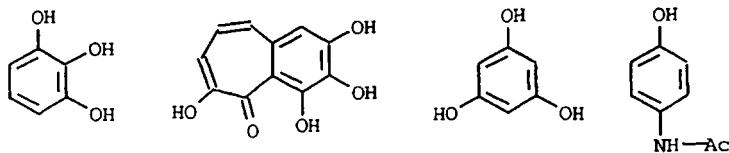
20 *a. Sustratos quimioluminiscentes de peroxidasa*

Las acilhidrazidas cíclicas amino-sustituidas tales como el luminol y el isoluminol bien conocidas reaccionan con  $H_2O_2$  y un catalizador de peroxidasa (tal como la peroxidasa del rábano picante, HRP) en condiciones básicas con emisión de luz. Esta reacción se ha utilizado como base para procedimientos analíticos destinados a la detección de  $H_2O_2$  y para la peroxidasa. Análogos heterocíclicos de luminol tales como 8-amino-5-cloro-7-fenilpirido[3,4-d-piridazina-1,4(2H,3H)diona (M. li. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 193(2), 540-5 (1993)); piridazinoquinoxalinas (patente US n° 5.324.835) y pirazolo[4',3':5',6']pirido-[2,3-d]-pirazindionas 1,3-disustituidas (Y. Tominaga, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 36, 8641-4 (1995)) son conocidos por reaccionar con una peroxidasa y peróxido para producir quimioluminiscencia. Otros compuestos de hidracida que son quimioluminiscentes cuando son oxidados por una peroxidasa y un peróxido son las ftalhidrazidas hidroxil-sustituidas (patente US n° 5.552.298).

Las patentes de los solicitantes US n° 5.491.072, n° 5.523.212 y n° 5.593.845 dan a conocer ésteres, tioésteres y sulfonamidas quimioluminiscentes del ácido N-alquilacridán-carboxílico, que producen luz durante la reacción con un peróxido y una peroxidasa para su utilización en la detección de peroxidasa y en análisis. Una solicitud PCT (documento WO 94/02486) describe la reacción quimioluminiscente de los compuestos de espiroacridán con el peróxido de hidrógeno. La reacción se mejora mediante la adición de peroxidasa de rábano picante.

Varios compuestos de origen biológico, denominados en conjunto luciferinas, son oxidados por una peroxidasa (resumido en L. J. Kricka y G.H.G. Thorpe, en *Luminescence Immunoassay and Molecular Applications*, K. Van Dyke y R. Van Dyke, eds., CRC Press, Boca Raton, 1990, págs. 77-98). Cuando no se utiliza peróxido de hidrógeno, la enzima está funcionando como una oxidasa.

Ciertos compuestos de fenol producen quimioluminiscencia en la oxidación con una peroxidasa. Como ejemplos, el pirogalol B-1 y la purpurogalina B-2 se citan en Kricka y Thorpe, *ibid.* así como los compuestos de tipo cumarina, umbeliferona y esculina (D. Slawinska, J. Slowinski, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4, 226-30 (1989)); floriglucinol B-3 (M. Halmann, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 30, 165-7 (1979)); y acetaminofeno B-4 (K. Schmitt, G. Cilento, *Photochem. Photobiol.*, 51, 719-23 (1990)).



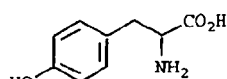
B-1

B-2

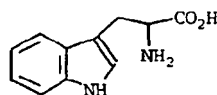
B-3

B-4

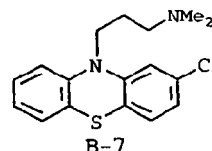
Otros compuestos diversos publicados por producir quimioluminiscencia débil en presencia de oxígeno o un peróxido y una peroxidasa son un polímero sintético que contiene una base de Schiff ((R. Zoulik, *et al.*, *Coll Czech. Chem. Commun.*, 60, 95-103 (1995)); ácido indol-3-acético en presencia de colorantes de xanteno con o sin peróxido de hidrógeno (S. Krylov, A. Chebotareva, *FEBS*, 324(1), 6-8(1993); tirosina, triptófano y clorpromazina (M. Nakano, *J. Biolumin. Chemilumin.* 4, 231-40 (1989)) y MCLA B-8 (Mitani *et al.*, *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 355-61 (1994)) que tienen las estructuras B-5 a B-8 respectivas como se muestra a continuación.



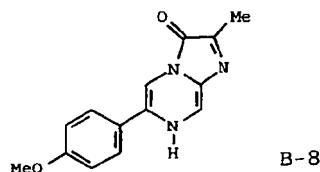
B-5



B-6



B-7



B-8

15 Ninguna de las referencias anteriores da a conocer la oxidación quimioluminiscente de los compuestos descritos actualmente por una peroxidasa.

#### b. Reacción de enoles con HRP

20 Una serie de artículos describen la oxidación de aldehídos enolizables con aire catalizada con peróxido (H. Gallardo, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 789, 57-62 (1984); W.J. Baader, *et al.*, *Biochem. Ed.*, 14(4), 190-2 (1986); I. Nantes, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 63(6), 702-8 (1996)). El sustrato reactivo se cree que es la pequeña cantidad de la forma enólica en equilibrio con el aldehído. La reacción del aldehído esta catalizada por fosfatos de enol, pero el propio fosfato de enol no se consume. La referencia da a conocer que el *fosfato de enol no reacciona con peroxidasa para producir quimioluminiscencia*. La transferencia de energía a receptores de energía fluorescente aumentó la emisión de luz (M. T. Grijalba, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 63 (6), 697-701 (1996)). Los aldehídos enmascarados como éteres de enol sililo (Baader, *ibid.*) o los acetatos de enol se utilizaron en ensayos acoplados en los que el enol no estaba enmascarado en una primera etapa para general un enol *in situ* que reaccionó posteriormente con una peroxidasa para generar quimioluminiscencia (A. Campa, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 63 (6), 742-5 (1996)).

#### c. Potenciadores de peroxidasa

30 Se han utilizado numerosos potenciadores con objeto de aumentar la cantidad y duración de quimioluminiscencia en la reacción de peroxidasa con sustratos quimioluminiscentes conocidos incluyendo el luminol y los derivados del ácido acridancarboxílico mencionados anteriormente. Estos incluyen los derivados de benzotiazol tales como D-luciferina, varios compuestos fenólicos tales como p-yodofenol, p-fenifenol, naftoles y aminas aromáticas como se listan en G. Thorpe, L. Kricka, en *Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives*, J. Scholmerich, *et al.*, Eds., págs. 199-208 (1987). Otros compuestos que funcionan como potenciadores de la oxidación quimioluminiscente de acilidracidas cíclicas sustituidas con amino por un peróxido incluyen el 4-(4-hidroxifenil)-tiazol (M. li. *ibid.*), un grupo de compuestos dados a conocer en la patente US nº 5.171.668, 2-hidroxi-9-fluorenona y un grupo de derivados de benzoxazol sustituidos con hidroxilo como se da a conocer en la patente US nº 5.206.149 y determinados compuestos del ácido fenilbórico como se describe en la patente US nº 5.629.168. Ninguna de las referencias anteriores dan a conocer la oxidación quimioluminiscente de los presentes compuestos por una peroxidasa sola o con utilización de potenciadores.

#### d. Potenciación de las reacciones quimioluminiscentes con peroxidasa por tensioactivos

45 La potenciación de la quimioluminiscencia producida en las reacciones catalizadas por peroxidasa utilizando tensioactivos poliméricos o monoméricos es conocida en la técnica. La potenciación puede ocurrir afectando los resultados de una o más etapas, por ejemplo, aumentando el rendimiento cuantitativo de fluorescencia del emisor, aumentando el porcentaje de moléculas producidas en estado excitado, aumentando la fracción de moléculas que experimentan la reacción quimioluminiscente por inhibición de reacciones secundarias competitivas o favoreciendo la actuación de un catalizador enzimático. No existen modelos claros o coherentes relativos al efecto de los tensioactivos poliméricos o monoméricos en las reacciones quimioluminiscentes. Es imposible predecir qué compuestos tensioactivos, si existen, pueden potenciar la quimioluminiscencia en un proceso específico y solamente pueden determinarse por experimentación sustancial.

50 El tensioactivo polimérico catiónico bromuro de poli-N-etil-4-vinil-pirinio inhibió completamente la reacción quimioluminiscente de luminol mediante un conjugado insulina-peroxidasa con carga negativa y disminuyó la quimioluminiscencia en una medida menor cuando se utilizó enzima natural (S. B. Vlasenko, *et al.*, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4, 164-176 (1989)).

55 Una solicitud de patente japonesa publicada nº JP 06.242.111 y un artículo (R. Iwata, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 231, 170-4 (1995)) dan a conocer la utilización de tensioactivo no iónico y leche descremada en la peroxidación quimioluminiscente de luminol para reducir la emisión de fondo o aumentar la señal/ruido.

Ninguna de las referencias anteriores dan a conocer la oxidación quimioluminiscente de los presentes compuestos por una peroxidasa o la potenciaron de la quimioluminiscencia con tensioactivos.

e. *Ensayos utilizando HRP*

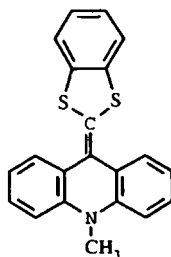
La enzima peroxidasa de rábano picante ha hallado utilización extendida en inmunoanálisis enzimáticos y ensayos de hibridación de ADN con detección quimioluminiscente utilizando luminol o isoluminol como sustrato. Los kits disponibles en el mercado que utilizan conjugados de HRP y detección quimioluminiscente con aumento de luminol están disponibles. Los ensayos quimioluminiscentes con peroxidasa se dan a conocer también en las patentes mencionadas anteriormente US nº 5.491.072, nº 5.523.212 y nº 5.593.845. Ninguna referencia da a conocer los ensayos quimioluminiscentes con peroxidasa utilizando los presentes compuestos como sustratos.

10 f. *Nuevos sustratos quimioluminiscentes de peroxidasa*

Una nueva clase de sustratos quimioluminiscentes de peroxidasa fue dada a conocer por los solicitantes en su anterior patente US nº 5.922.558 y la solicitud PCT publicada WO 99/14220. Mientras que la exposición de estas publicaciones describe una clase de compuestos heterocíclicos genéricos de la presente invención, los presentes compuestos son superiores inesperadamente en la producción de luz a partir de la reacción con una enzima peroxidasa y una fuente de peróxido.

q. *Benzoditiafulvalenos*

La síntesis de un benzoditiafulvaleno que tiene la estructura siguiente se ha descrito (K. Akiba, K. Ishikawa, N. Inamoto, *Synthesis*, 12, 861-2 (1997)) No se conoce ninguna información relativa a su capacidad para funcionar como sustrato quimioluminiscente de peroxidasa.



La patente US nº 6.126.870 describe conjugados quimioluminiscentes marcados que comprenden un anillo de acridano. Los conjugados generan quimioluminiscencia rápidamente después de experimentar una reacción con un ácido, un oxidante y una base. Se dice que los conjugados son útiles en análisis de un analito en una muestra y en análisis que emplean pares de fijación específicos marcados.

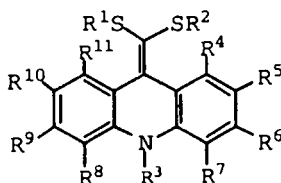
La patente US nº 5.922.558 se refiere a composiciones quimioluminiscentes que reaccionan con una peroxidasa y un peróxido para generar quimioluminiscencia. La composición comprende compuestos con un doble enlace carbono-carbono sustituido en un terminal del doble enlace con dos átomos seleccionados de entre los átomos de oxígeno y azufre.

Akiba *et al.* In *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 51, nº 9, 1978, páginas 2674-2683 dan a conocer la síntesis de 1,4-ditiafulvenos y 1,4-ditiafulvalenos.

**Sumario de la invención**

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones mejoradas que contienen compuestos que reaccionan con una peroxidasa y un peróxido para proporcionar quimioluminiscencia y para la detección de la peroxidasa.

Un objetivo específico de la presente invención consiste en proporcionar compuestos y composiciones mejoradas que los contienen en el que los compuestos mejorados presentan la formula:



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1 a 20 átomos de carbono y pueden unirse para formar un grupo que contiene un anillo, cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> es independientemente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos

## ES 2 323 303 T3

seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y halógeno, y R<sup>3</sup> se selecciona de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. En las composiciones de la invención, los compuestos están comprendidos en una concentración entre 0,01 y 10 mM;

5 un peróxido está presente a una concentración entre 0,01 y 10 mM;

y un potenciador está presente a una concentración entre 0,001 y 10 mg/ml, en el que el potenciador se selecciona de entre compuestos fenólicos, aminas aromáticas, ácidos arilbóricos sustituidos e insustituidos, ésteres arilbóricos, anhídridos del ácido arilbórico, fenoxazinas y fenotiazinas;

10 en una solución acuosa tamponada con un pH comprendido en el intervalo entre 5 y 10,5.

Las composiciones que contienen los compuestos de la invención incorporan compuestos potenciadores para favorecer la quimioluminiscencia producida en la reacción de los compuestos de la presente invención con una peroxidasa y mejorar la utilidad analítica de la invención.

15 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar conocimientos para generar rápidamente quimioluminiscencia durante la reacción con una peroxidasa y un peróxido que emplea los compuestos y composiciones, indicados en la reivindicación 1.

20 Todavía otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones quimioluminiscentes y procedimientos para utilizarlos en la detección de las peroxidases y conjugados en inmunoanálisis, análisis con sonda de ácido nucleico, análisis de inmunotransferencia Western, análisis de inmunotransferencia Southern y otros análisis por procedimientos generalmente conocidos que emplean marcadores enzimáticos para la detección de analitos. Los análisis son útiles por lo tanto para detectar analitos en dichos análisis detectando la peroxidasa o conjugado y relacionando la quimioluminiscencia producida de este modo con la presencia o cantidad del analito.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es un gráfico que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia en 1,5 min. emitida por 100  $\mu$ l de un reactivo descrito en el ejemplo 7 que contiene en compuesto 14 activado a temperatura ambiente. La emisión de quimioluminiscencia se inició mediante la adición de 100  $\mu$ l del reactivo a 10  $\mu$ l de soluciones de HRP que contienen entre  $1,4 \times 10^{-16}$  y  $1,4 \times 10^{-20}$  moles de encima en los pocillos de una microplaca blanca. El término S-B se refiere a la señal (S) de quimioluminiscencia en unidades de luz relativas (RLU) en presencia de HRP corregido para la quimioluminiscencia de fondo (B) en ausencia de HRP. Para la comparación, se muestra también la relación entre S-B y la cantidad de HRP para el compuesto 1 de referencia medido en 15 min.

40 La figura 2 es un gráfico que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia en 1,5 min. emitida por 100  $\mu$ l de un reactivo descrito en el Ejemplo 8 que contiene el compuesto 27 activado a temperatura ambiente. Para la comparación, la relación entre S-B y la cantidad de HRP se presenta también para el compuesto de referencia 1 medido en 15 min.

45 La figura 3 es un gráfico que presenta el perfil temporal de quimioluminiscencia resultante de la reacción de  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP a 25°C con 100  $\mu$ l del reactivo que contiene el Compuesto 26 descrito en el Ejemplo 11. El perfil temporal de quimioluminiscencia relativa demuestra la generación más rápida de quimioluminiscencia que un compuesto estructuralmente similar denominado Ref. 2.

La figura 4 es un gráfico que presenta el perfil temporal de quimioluminiscencia resultante de la reacción de  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP a 25°C con 100  $\mu$ l del reactivo que contiene el Compuesto 27 descrito en el Ejemplo 12.

50 La figura 5 es una imagen de películas de rayos X de un análisis de inmunotransferencia Western de  $\beta$ -galactosidasa mediante un anticuerpo marcado con HRP en una membrana de PVDF con composiciones de reactivo quimioluminiscente. Las diluciones de  $\beta$ -galactosidasa que contienen 5.000, 1.000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, de proteína se detectaron con un reactivo de la invención que contenía el compuesto 1 o, para comparación, con un reactivo que contenía el compuesto Ref. 1 tal como se describe en el documento US nº 5.922.558. Las membranas se expusieron a una película de rayos X durante 5 s. después de 11 min. de incubación en los respectivos reactivos de detección.

60 La figura 6 representa imágenes de películas de rayos X en el análisis de inmunotransferencia Western de  $\beta$ -galactosidasa mediante un anticuerpo marcado con HRP en una membrana de PVDF con composiciones de reactivo quimioluminiscente. Las diluciones de  $\beta$ -galactosidasa que contiene 5.000, 1.000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, de proteína se detectaron con un reactivo de la invención que contiene el compuesto 27 o el compuesto 37.

65 La figura 7 representa imágenes de películas de rayos X de un análisis de inmunotransferencia Western de  $\beta$ -galactosidasa mediante un anticuerpo marcado con HRP en una membrana de nitrocelulosa con una composición de reactivo quimioluminiscente que contiene el compuesto 46. Las diluciones de  $\beta$ -galactosidasa que contenían 5.000, 1.000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, se detectaron fácilmente durante un periodo de 2 horas tal como se muestra.

La figura 8 es un gráfico que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia emitida por 100  $\mu$ l de un reactivo descrito en el Ejemplo 22 que contiene el compuesto 52 ó 53 activado a temperatura ambiente.

## ES 2 323 303 T3

### Descripción de las formas de realización preferidas

#### Definiciones

5 Alquilo - Grupo hidrocarbonado de cadena lineal, ramificada o cíclica que contiene de 1 a 20 carbonos. Alquilo inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alquilo que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

Alquilenilo - Grupo divalente con cadena de alquilo.

10

Alquenilo - Grupo hidrocarbonado de cadena lineal, ramificada o cíclica que contiene por lo menos un doble enlace C-C y que contiene de 2 a 20 átomos de carbono. Alquenilo inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alquenilo que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

15 Alquinilo - Grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que contiene por lo menos un triple enlace C-C y que contiene de 2 a 20 átomos de carbono. Alquinilo inferior tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los grupos alquinilo que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

20 Analito - Sustancia cuya presencia o cantidad ha de medirse en una muestra por análisis. Los analitos incluyen moléculas orgánicas y biológicas para las que existe un acompañante de unión específico con afinidad de unión específica. Ejemplos de analitos incluyen, sin limitación, ADN monocatenario o bicatenario, ARN, complejos ADN-ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, híbridos de anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Otros ejemplos de analitos incluyen también las enzimas oxidasa y las enzimas peroxidasa.

25

Arilo - Grupo que contiene un anillo aromático que contiene 1 a 5 anillos aromáticos carbocíclicos, que puede estar sustituido con uno o más sustituyentes aparte del H.

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

30

Heteroalquilo - Grupo monovalente con cadena de alquilo en el que por lo menos uno de los átomos de carbono no terminales está sustituido por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre.

35 Heteroalquilenilo - Grupo monovalente con cadena de alquilenilo en el que por lo menos uno de los átomos de carbono no terminales está sustituido por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre.

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

45

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

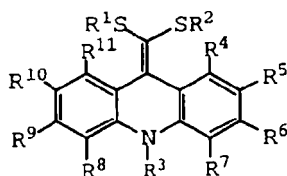
45 Muestra - Fluido que contiene o que se supone que contiene uno o más analitos que han de analizarse. Las muestras típicas que se analizan por el procedimiento de reacción quimioluminiscente son muestras biológicas que incluyen fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, orina, semen, saliva, lisados celulares, extractos tisulares y similares. Otros tipos de muestras incluyen muestras de alimentos y muestras del entorno tales como suelo o agua.

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

55 Sustituido - Se refiere al reemplazado de por lo menos un átomo de hidrógeno en un grupo por un grupo distinto de hidrógeno. Debe indicarse que en las referencias en los grupos sustituidos se pretende que múltiples puntos de sustitución pueden estar presentes a menos que se indique claramente de otra manera.

60 Se ha descubierto que los compuestos de fórmula I reaccionan a continuación con un peróxido y una peroxidasa para generar quimioluminiscencia con propiedades inesperadamente superiores. Los compuestos de ceteno-ditioacetal utilizados en la presente invención presentan la fórmula I:

65

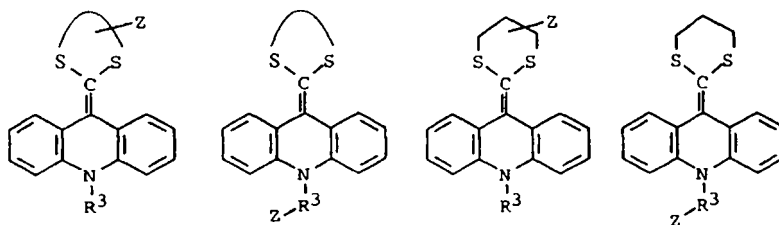


## ES 2 323 303 T3

en la que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno grupos orgánicos que contienen de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno además del número necesario de H requeridos para satisfacer las valencias de los átomos en el grupo y en la que  $R^1$  y  $R^2$  pueden estar unidos para formar un anillo. Los grupos  $R^1$  y  $R^2$  pueden contener de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno pero más preferentemente de 1 a aproximadamente 20 de dichos átomos. Los grupos preferidos para  $R^1$  y  $R^2$  incluyen los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. Son más preferidos los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido. Los grupos sustituyentes a parte de los átomos de H, tales como los grupos fónicos o los grupos polares, pueden incorporarse en varios números y en posiciones seleccionadas en la cadena o anillo de carbono con objeto de modificar las propiedades del compuesto o para proporcionar por conveniencia de síntesis. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, el rendimiento del cuanto de luminiscencia, la velocidad de reacción con la enzima, la intensidad máxima de emisión de luz, la duración de la emisión de luz, la longitud de onda de la emisión de luz, la solubilidad en el medio de reacción. Los grupos preferidos que proporcionan solubilidad en agua son grupos de la sal sulfonato  $-SO_3^-$ , grupos de la sal sulfato  $-OSO_3^-$ , grupos de la sal fosfonato  $-PO_3^-$ , grupos de la sal fosfato  $-OPO_3^{2-}$ , grupos de la sal carboxilato  $-COO^-$  y grupos de la sal amónica  $-NR_3^+$  y grupos de la sal fosfonio  $-PR_3^+$ . Uno o más grupos que permiten el acoplamiento covalente a otra molécula tal como un acompañante de unión específica pueden incluirse también como sustituyentes en  $R^1$  y  $R^2$ . Los ejemplos de sustituyentes específicos incluyen, sin limitación, los grupos alcoxi, aliloxi, hidroxilo, halógeno, amino, amino sustituido, carboalcoxi, carboxamida, ciano y sulfonato.

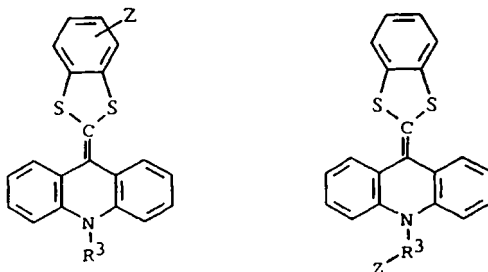
Cuando  $R^1$  y  $R^2$  se unen para formar un anillo, el anillo es preferentemente de 5 a 30 átomos y está comprendido por átomos adicionales de carbono y/u oxígeno seleccionados de entre cadenas de alquileo, heteroalquileo y cadenas insaturadas que contienen dobles enlaces. Los átomos de carbono en la cadena pueden sustituirse por átomos distintos de hidrógeno como se describió anteriormente en relación con los grupos  $R^1$  y  $R^2$ . Los tamaños de anillo preferidos son de cinco a siete átomos.

25



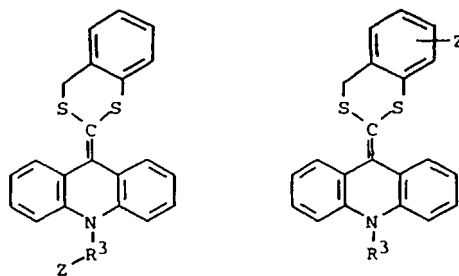
30

35



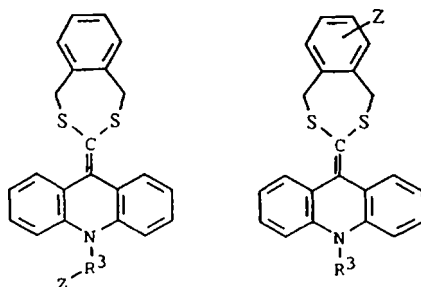
40

45



50

55



60

65

## ES 2 323 303 T3

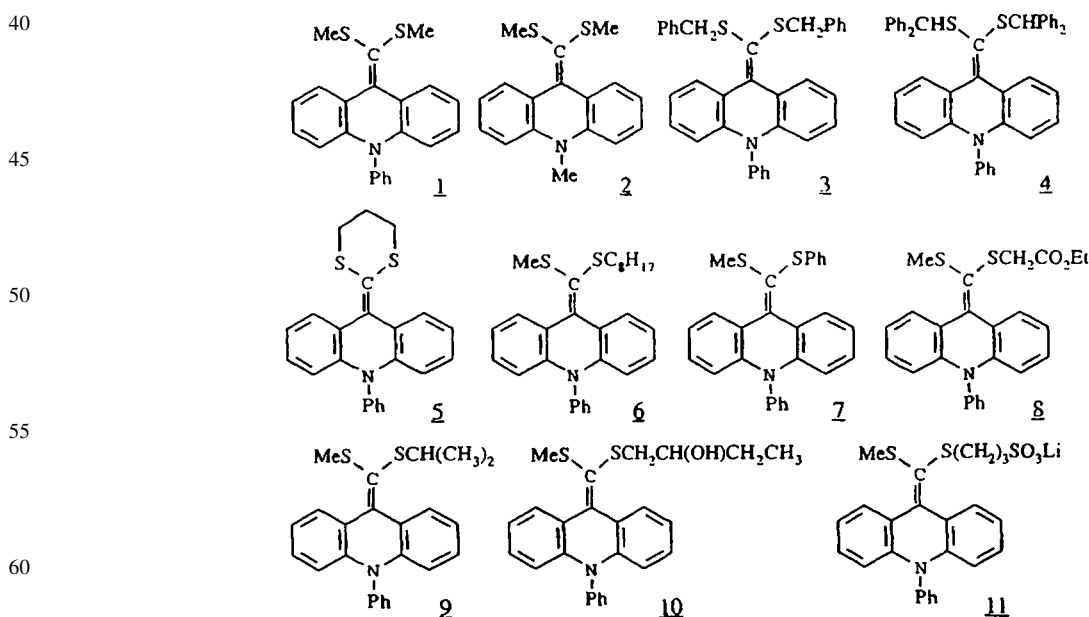
En una forma de realización preferida  $R^1$  y  $R^2$  se unen para completar un anillo de seis miembros que está sustituido en el anillo con un grupo Z por lo menos que proporciona solubilidad en agua, tal como se describió anteriormente. En otra forma de realización el grupo Z está unido en lugar del grupo  $R^3$ . El anillo formado conectando  $R^1$  y  $R^2$  puede ser también un anillo de cinco a siete eslabones condensado con un segundo anillo tal como un anillo condensado con benzo. Asimismo se prefiere que un grupo Z por lo menos que proporciona solubilidad en agua esté sustituido en uno de los anillos condensados o en el grupo  $R^3$ . Estructuras a modo de ejemplo se presentaron anteriormente.

En los presentes compuestos, el grupo  $R^3$  es un grupo orgánico que contiene de 1 a 50 átomos distintos de hidrógeno seleccionados de entre los átomos de C, N, O, S, P, Si y halógeno además del número necesario de átomos de H requeridos para satisfacer las valencias de los átomos en el grupo. Más preferentemente  $R^3$  contiene de 1 a 20 átomos distintos de hidrógeno. El grupo orgánico se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. Los grupos más preferidos para  $R^3$  incluyen grupos alquilo  $C_1$ - $C_4$  sustituidos o insustituidos, grupos fenilo o naftilo sustituidos o insustituidos y grupos benzilo sustituidos o insustituidos. Cuando se sustituyen a modo de ejemplo los sustituyentes incluyen, sin limitación, grupos alcoxi, ariloxi, hidroxilo, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano, sulfonato y fosfato. Un grupo  $R^3$  preferido es un grupo alquilo o heteroalquilo sustituido con por lo menos un grupo que proporciona solubilidad en agua.

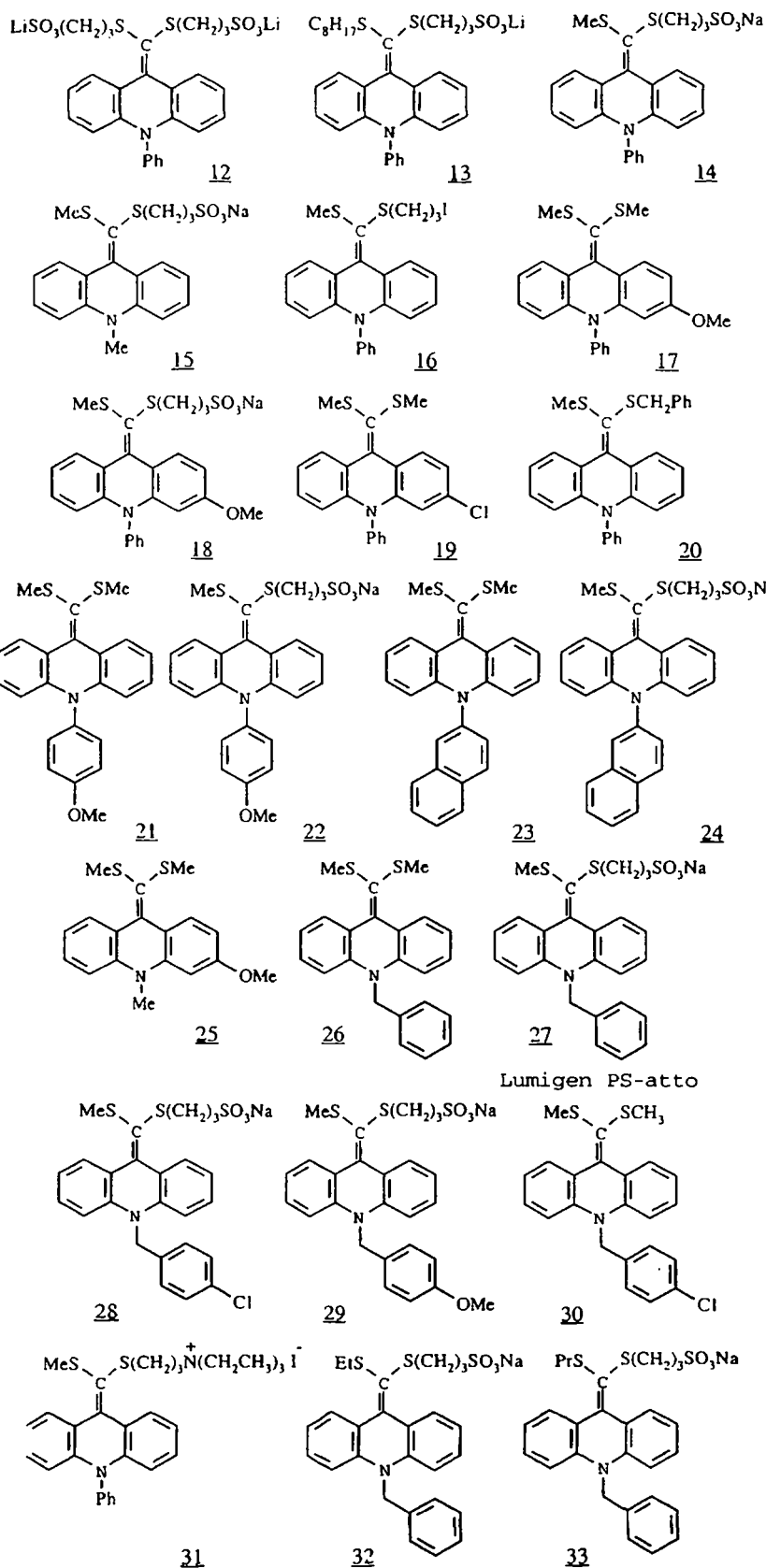
Los grupos sustituyentes pueden incorporarse en varias cantidades y en posiciones seleccionadas del anillo o cadena en el anillo heterocíclico con objeto de modificar las propiedades del compuesto o para proporcionar por conveniencia de la síntesis del compuesto final. Dichas propiedades incluyen, sin limitación, rendimiento del cuanto de quimioluminiscencia, velocidad de reacción con la enzima, intensidad máxima de luz, duración de la emisión de luz, longitud de onda de la emisión de luz y solubilidad en el medio de reacción. Los grupos  $R^4$  a  $R^{11}$ , que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos seleccionados de entre átomos de C, H, N, O, S, P, Si y halógeno y que permiten que se produzca luz y pueden incluir sin limitación, grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alquenoilo, alquinoilo, alcoxi, aliloxi, halógeno, amino, grupos amino sustituidos, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano, sulfonato y fosfato. Resulta preferido que  $R^4$  a  $R^{11}$  se seleccionen de entre hidrógeno, halógeno, grupo alcoxi, amino o amino sustituido con uno o dos grupos alquilo o arilo. Un grupo de compuestos preferido tiene uno de entre  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  como un átomo de cloro y el otro de  $R^4$  a  $R^{11}$  son átomos de hidrógeno.

Pares de grupos adyacentes, es decir,  $R^4$  y  $R^5$ ,  $R^5$  y  $R^6$ ,  $R^6$  y  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  o  $R^{10}$  y  $R^{11}$  pueden unirse como sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico que comprende por lo menos un anillo de 5 ó 6 eslabones que se condensa con el anillo que lleva el doble enlace exocíclico. Cuando un anillo adicional condensado está presente es preferentemente un anillo de benceno condensado adicional que hace que el compuesto resultante sea un derivado de benzacridano.

Los compuestos específicos dentro del alcance de la invención incluyen, sin limitación:

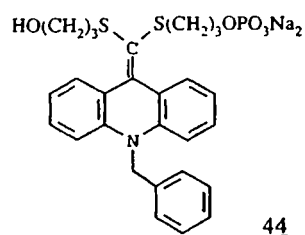
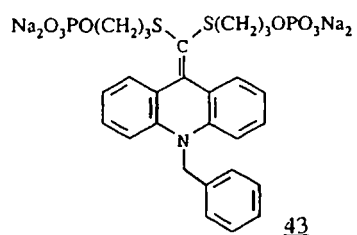
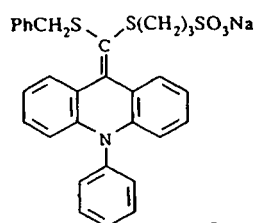
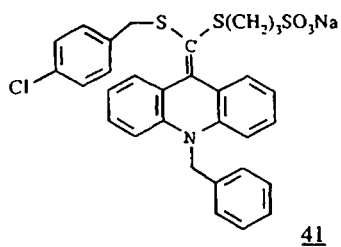
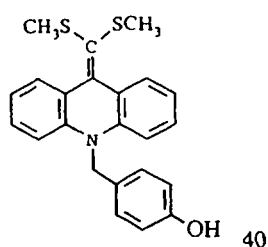
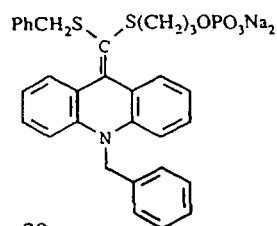
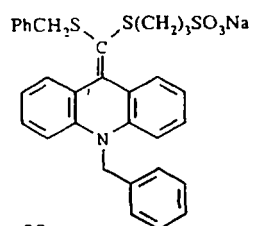
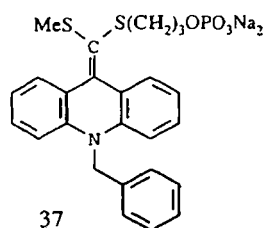
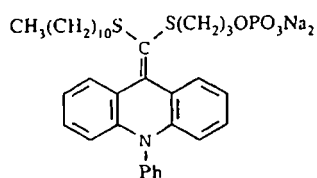
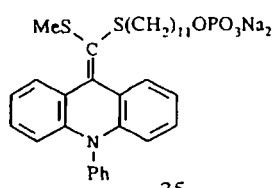
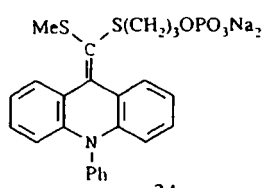


ES 2 323 303 T3



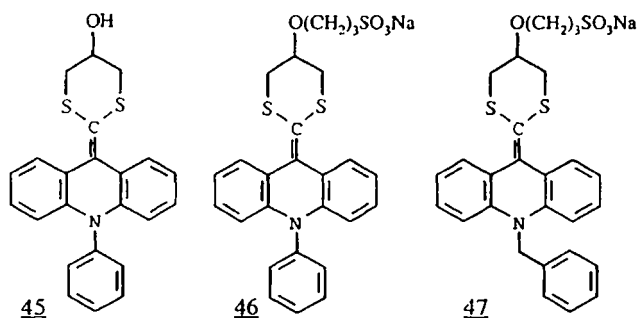
ES 2 323 303 T3

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



ES 2 323 303 T3

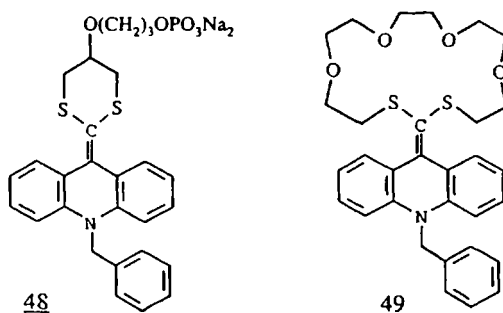
5



10

Lumigen TMA-6

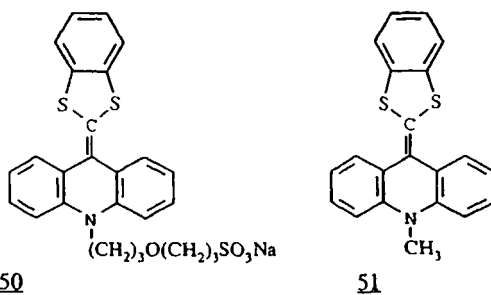
15



20

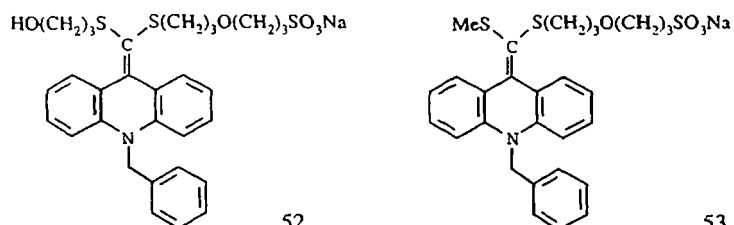
25

30



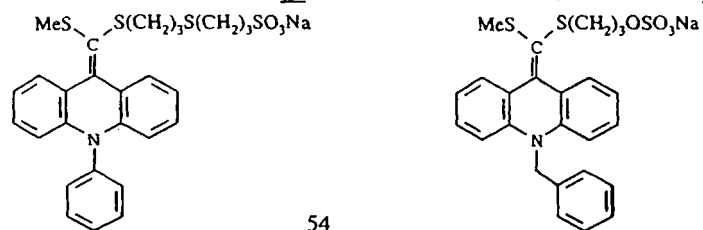
35

40



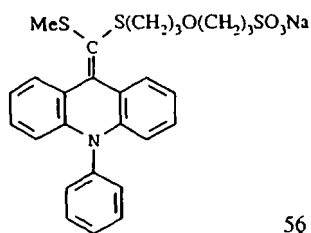
45

50



55

60



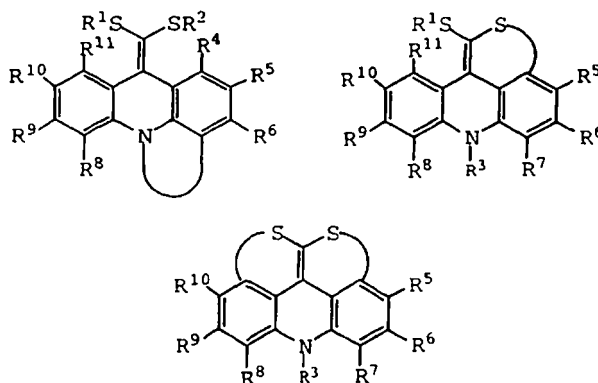
65

## ES 2 323 303 T3

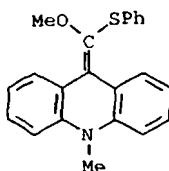
Las combinaciones preferidas de grupos  $R^1$ - $R^3$  incluyen compuestos en los que uno o ambos de  $R^1$  y  $R^2$  comprenden un grupo alquilo sustituido con un grupo de sal sulfonato o un grupo de sal fosfato y  $R^3$  es fenilo, fenilo sustituido, bencilo o bencilo sustituido. Cuando solamente un grupo sulfonato o alquilo sustituido con fosfato está presente, el otro de entre  $R^1$  o  $R^2$  es preferentemente alquilo o bencilo.

También se consideran dentro del alcance de la clase de compuestos de la presente invención las formas de realización en las que  $R^1$  o  $R^2$  o ambos están unidos en la posición más próxima, es decir,  $R^4$  o  $R^{11}$ , del anillo de acridano para cerrar un anillo adicional.

En otras formas de realización incluso el átomo de hidrógeno está unido a una de las posiciones más próximas del anillo de  $R^7$  o  $R^8$  del anillo de acridano para aproximar un anillo de 5 a 7 eslabones y  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1 a 20 átomos de carbono y pueden estar unidos para formar de 5 a 30 átomos o  $R^1$  o  $R^2$  o ambos pueden estar unidos a la posición más próxima del anillo de acridano para cerrar un anillo adicional. Las estructuras ilustrativas incluyen:



La reacción de compuestos de ceteno-ditioacetal de fórmula I incluyendo las mostradas anteriormente, con peróxido y una peroxidasa generan quimioluminiscencia que rápidamente alcanza intensidad muy elevada. La emisión de luz máxima se consigue en un minuto o menos y permanece constante durante varios minutos. Ningún otro sustrato de peroxidasa quimioluminiscente conocido genera quimioluminiscencia de alta intensidad tan rápidamente. El comportamiento cinético es inesperado y contrasta con el perfil temporal de quimioluminiscencia de los compuestos con estructura relacionada dados a conocer en la patente US n° 5.922.558 mencionada anteriormente. Por ejemplo, un compuesto que presenta la fórmula:

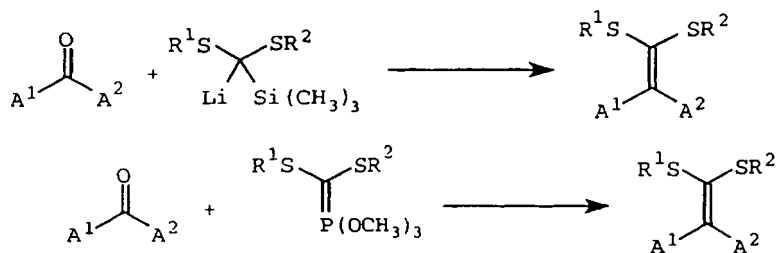


que ha reaccionado con HRP se dio a conocer por alcanzar la intensidad máxima de quimioluminiscencia en 7 min. La capacidad de los compuestos de la presente invención para alcanzar una intensidad máxima de luz estable tan rápidamente les hace más adecuados que otros compuestos para el análisis de resultados muy rápidos demandados actualmente.

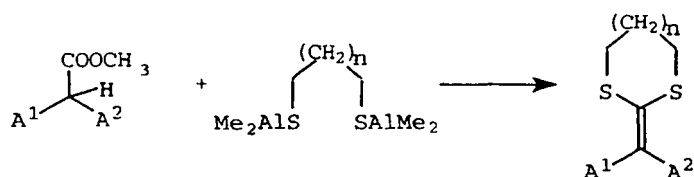
Los presentes compuestos presentan estabilidad inesperadamente elevada en el intervalo de pH de por lo menos 5 a 10,5 permitiendo su formulación y utilización tanto en los valores de pH ácido como alcalino. Las soluciones acuosas taponadas de los compuestos de fórmula I presentan estabilidad al almacenamiento ampliada a temperatura ambiente y son indefinidamente estables a 4°C. Las soluciones de los compuestos de fórmula I que llevan grupos que se disuelven en agua pueden prepararse a sus concentraciones de operación y no requieren cosolventes. Se han preparado soluciones mejoradas de reactivos que permiten la detección sensible a pH 5-6, pH de actividad óptima de la peroxidasa de rábano picante.

Los procedimientos de preparación de los compuestos de fórmula I incluyen la adición nucleófila de un compuesto de litiosilano o una ilida de fósforo a un compuesto de carbonilo adecuado según los dos esquemas siguientes [F.A. Carey, A.S. Court, *J. Org. Chem.*, 37, 1926-29, (1972)].

ES 2 323 303 T3

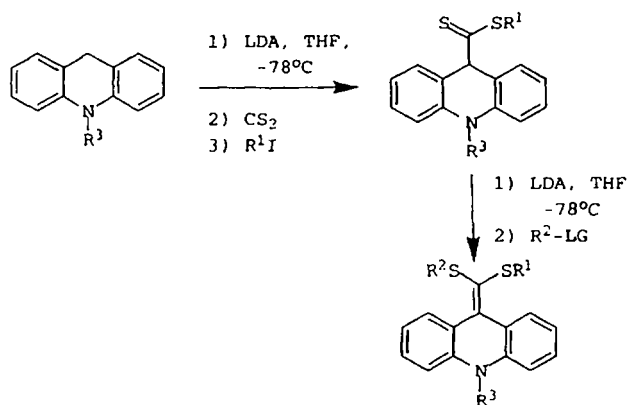


En otro procedimiento, un éster se convierte en un ceteno-ditioacetal por reacción con un reactivo de bis(dialquilaluminio)-ditiol tal como se da a conocer en E. J. Corey y A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Lett.*, 925-8 (1975) y se presenta a continuación.

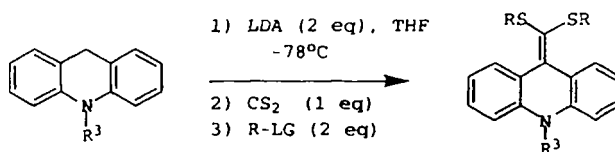


Incluso en otro procedimiento, un anión de un grupo metileno activo se hace reaccionar con  $CS_2$  y el ditiocarbonylato se hace reaccionar con un reactivo  $R^1-LG$  que contiene el grupo  $R^1$  para formar un ditioéster. Un ejemplo de la última metodología se da a conocer en I. Shahak e Y. Sasson, *Tetrahedron Lett.*, 4207-10 (1973). El ditioéster se convierte en un enolato y se hace reaccionar con un reactivo de fórmula  $R^2-LG$ . Los grupos salientes típicos incluyen halógenos, tales como cloruro, bromuro y yoduro, sulfonatos tales como metilsulfonato y p-toluensulfonato y trifluorometansulfonato, carboxilatos tales como acetato y benzoato particularmente cuando X es un grupo acilo en cuyo caso X-LG sería un anhídrido ácido, sulfatos tal como metosulfato, y otros grupos tales como los grupos imidazol, triazol y tetrazol, maleimida, succinimidoxi.

Procedimiento A

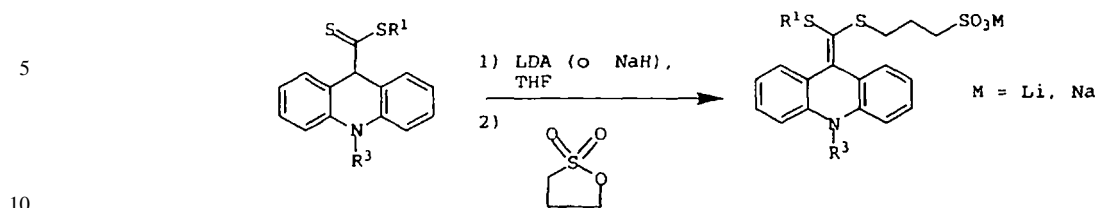


Procedimiento B

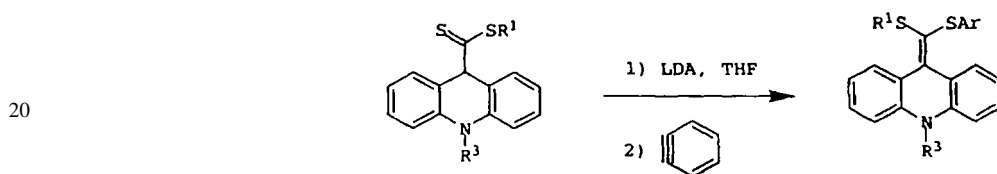


## ES 2 323 303 T3

### Procedimiento C



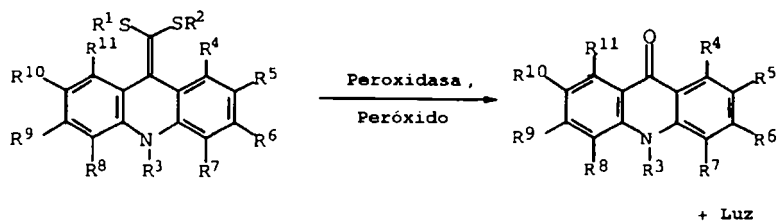
### Procedimiento D



25 El procedimiento D anterior implica la generación de un intermedio bencino como especie de arilación reactiva. El intermedio bencino puede generarse *in situ* mediante, por ejemplo, tratamiento de un compuesto de benceno bromado con una base fuerte tal como sec-butil litio o LDA (M. Watanabe, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37(1), 36-41 (1989)).

30 Otro procedimiento de síntesis comprende la reacción de una ilida de fósforo procedente de benzoditiol con un compuesto de acridona. Los procedimientos y condiciones se describen generalmente en la referencia de Akiba *et al.* mencionada anteriormente así como en K. Ishikawa, K. Akiba y N. Inamoto, *Tetrahedron Lett.*, 41, 3695-3698 (1976).

35 Los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles en un procedimiento para producir quimioluminiscencia por reacción con una peroxidasa. La reacción de un compuesto de la invención con una peroxidasa y un peróxido en una solución de tampón acuosa produce quimioluminiscencia visible fácilmente detectable. La intensidad de la luz alcanza un nivel máximo rápidamente a temperatura ambiente, por lo general en aproximadamente 1 minuto. La reacción se realiza opcionalmente en presencia de un potenciador.



50 En un procedimiento preferido de producción de quimioluminiscencia, el compuesto I se hace reaccionar con una peroxidasa, un peróxido y un potenciador en un tampón alcalino con un pH entre aproximadamente 8 y 10 para producir una señal de quimioluminiscencia continua que comienza en la reacción de la enzima y el compuesto I. La sensibilidad analítica puede aumentarse por incorporación de un tensioactivo no iónico como se describirá con más detalle a continuación.

55 En un procedimiento preferido de producción de luz a partir de la reacción del compuesto I con una peroxidasa, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida 5°C y 50°C, preferentemente entre 20°C y 40°C en una solución de tampón acuosa a un pH comprendido entre aproximadamente 5 y 10,5, preferentemente entre 7 y 10. El compuesto I se utiliza a una concentración comprendida entre 1 μM y 20 μM, preferentemente entre 10 μM y 5 μM. La enzima puede ser una peroxidasa libre o un conjugado de peroxidasa.

60 Los compuestos de la presente invención por lo general producen luz en una banda de emisión amplia de 100 a 200 nm, que presenta una intensidad máxima a longitudes de onda en el ultravioleta próximo hasta la zona visible del espectro electromagnético. Las longitudes de ondas λ<sub>max</sub> típicas de intensidad máxima en el intervalo de 350 a 500 nm. Se contempla que los compuestos de formula I que llevan un fluoróforo unido por enlace covalente podrían experimentar transferencia de energía intramolecular dando como resultado la emisión a longitudes de onda mayores desde el estado excitado del fluoróforo.

Puede utilizarse simultáneamente más de un compuesto de fórmula I en un procedimiento para producir luz mediante la acción de una peroxidasa. Puede resultar ventajoso en algunos casos que reaccionen simultáneamente dos o más compuestos de fórmula I con la peroxidasa. Cuando dos o más compuestos tienen diferentes propiedades luminiscentes o físicas, la combinación de los dos puede ser deseable para producir una reacción que emite luz con características no fácilmente conseguibles mediante la utilización de cualquier compuesto. Los ejemplos de propiedades luminiscentes y físicas que pueden diferenciarse entre los compuestos I incluyen el espectro de emisión, la duración de la emisión de la luz, la renovación de la enzima, la velocidad de aumento de emisión al máximo, la hidrofobia/hidrofilia y la solubilidad.

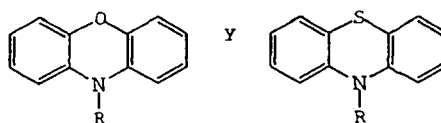
El componente peróxido es cualquier peróxido o hidroperóxido de alquilo capaz de reaccionar con la peroxidasa. Los peróxidos preferidos incluyen el peróxido de hidrógeno, el peróxido de urea y las sales perborato.

La peroxidasa que puede experimentar la reacción quimioluminiscente incluye lactoperoxidasa, microperoxidasa, mieloperoxidasa, haloperoxidasa, por ejemplo, bromoperoxidasa de vanadio, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa micóticas tales como la peroxidasa de lignina y la peroxidasa de *Arthromyces ramosus* y la peroxidasa dependiente de Mn producida en los hongos de la podredumbre blanca y la peroxidasa de la soja. Otros compuestos miméticos de peroxidasa que no son enzimas pero poseen actividad similar a la peroxidasa incluyen los complejos con hierro y Mn-TPPS<sub>4</sub> (Y.-X. Ci, *et al.*, *Mikrochem. J.*, 52, 257-62 (1995)) es conocido que catalizan la oxidación quimioluminiscente de luminol y se considera explícitamente que están comprendidos en el alcance del significado de la peroxidasa tal como se utiliza en la presente memoria.

Los conjugados o complejos de una peroxidasa y una molécula biológica pueden utilizarse también en el procedimiento para producir quimioluminiscencia, siendo la única condición que el conjugado presente actividad de peroxidasa. Las moléculas biológicas que pueden conjugarse con una o más moléculas de una peroxidasa incluyen ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, híbridos de anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Los complejos que incluyen o incorporan una peroxidasa tales como liposomas, micelas, vesículas y polímeros que están funcionalizados para el acoplamiento a moléculas biológicas pueden utilizarse también en los procedimientos de la presente invención.

La incorporación de determinados compuestos potenciadores en la mezcla de reacción favorece la reactividad de la enzima. Están incluidos entre estos potenciadores los compuestos fenólicos y las aminas aromáticas que se sabe que potencian otras reacciones de peroxidasa tal como se describe en las referencias mencionadas anteriormente por Thorpe y Kricka y por Li, *et al.* y en las patentes US nº 5.171.668 y nº 5.206.149. Los compuestos de ácido arilbórico sustituidos e insustituidos y sus derivados de éster y anhídrido tal como se da a conocer en la patente US nº 5.512.451 se considera también que están comprendidos en el alcance de los potenciadores útiles en la presente invención. Los potenciadores preferidos incluyen pero no se limitan a: p-fenilfenol, p-yodofenol, p-bromofenol, ácido p-hidroxicinámico, p-imidazolilfenol, acetaminofeno, 2,4-diclorofenol, 2-naftol y 6-bromo-2-naftol. Pueden emplearse también mezclas de más de un potenciador de las clases mencionadas anteriormente.

Los potenciadores adicionales que se han descubierto eficaces en la potenciación de la producción de quimioluminiscencia en los compuestos de la presente invención son derivados de fenoxazina y de fenotiazina que presentan las fórmulas siguientes.



Los grupos R sustituidos en el átomo de nitrógeno de los potenciadores de fenoxazina y fenotiazina incluyen alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, y alquilo de 1 a 8 átomos de carbono sustituido con un grupo de sal sulfonato o de sal carboxilato. Los potenciadores preferidos incluyen las sales del ácido 3-(N-fenotiazinil)propanosulfónico, las sales del ácido 3-(N-fenoxazinil)propanosulfónico, las sales del ácido 4-(N-fenoxazinil)butanosulfónico, las sales del ácido 5-(N-fenoxazinil)pentanoico y N-metil-fenoxazina y los homólogos relacionados.

Los aditivos del tensioactivo no iónico en los presentes reactivos quimioluminiscentes son útiles con fines de disolución. La incorporación de tensioactivos no iónicos en las reacciones para producir quimioluminiscencia mediante la utilización de una peroxidasa pueden conducir a una mejora en la sensibilidad analítica con respecto a la peroxidasa. Los tensioactivos no iónicos útiles en la práctica de la presente invención incluyen a título de ejemplo los alquilfenoles polioxietilenados, los alcoholes polioxietilenados, los éteres polioxietilenados y los ésteres de sorbitol polioxietilenados.

Los tensioactivos catiónicos, incluyendo los compuestos de la sal de amonio cuaternario tal como CTAB, presentan ventajas para su utilización para aumentar el nivel de quimioluminiscencia emitida cuando se hacen reaccionar determinados compuestos de la presente invención con una peroxidasa y un peróxido. Por ejemplo, la intensidad de luz de la reacción del compuesto 11 presentado a continuación según la presente invención aumentó más de 20 veces cuando se incluyó CTAB en la mezcla de reacción.

## ES 2 323 303 T3

La reacción de la presente invención se lleva a cabo en solución tal como un tampón acuoso que puede estar en contacto con la superficie de un soporte sólido tal como un lecho, tubo, membrana o placa de micropocillos recubierta con peroxidasa. Los tampones adecuados incluyen cualquiera de los tampones utilizados frecuentemente capaces de mantener un pH en el intervalo desde aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5, por ejemplo, fosfato, borato, acetato, carbonato, Tris(hidroximetilamino)metano, glicina, tricina, 2-amino-2-metil-1-propanol, dietanolamina y similares. El procedimiento preferido de puesta en práctica de la invención a este respecto se determina por los requisitos de la utilización específica deseada.

La luz emitida por el presente procedimiento puede detectarse por cualquier medio adecuado conocido tal como un luminómetro, película de rayos X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara de CCD, un contador de centelleo, un actinómetro químico o visualmente. Cada medio de detección tiene una diferente sensibilidad espectral. El ojo humano es óptimamente sensible a la luz verde, están disponibles cámaras CCD que presentan máxima sensibilidad a la luz roja, las películas de rayos X con máxima respuesta a la luz UV a azul o la luz verde. La selección del dispositivo de detección vendrá gobernada por la aplicación y consideraciones de coste, conveniencia y si se requiere creación de un registro permanente.

Una utilización importante de los presentes procedimientos quimioluminiscentes es para detectar la presencia o cantidad de un analito en un procedimiento analítico mediante una reacción quimioluminiscente. El procedimiento comprende las etapas de poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene el analito con un compuesto quimioluminiscente de la presente invención, una fuente de peróxido y una peroxidasa, detectar la luz producida en un procedimiento cualitativo y si se desea cuantificación, relacionar la cantidad de luz producida con la cantidad de analito. La relación entre la intensidad de la luz y la cantidad de analito puede discernirse fácilmente construyendo una curva de calibración con cantidades conocidas de analito. El Compuesto I se utiliza por lo general en una concentración desde aproximadamente  $10^{-5}$  M a aproximadamente  $10^{-2}$  M, preferentemente entre aproximadamente  $10^{-4}$  M y aproximadamente  $10^{-3}$  M. La peroxidasa es preferentemente inferior a aproximadamente  $10^{-9}$  M cuando se detecta en una solución. Muestras típicas que son analizadas por el procedimiento de reacción quimioluminiscente son los fluidos corporales tales como la sangre, el plasma, el suero, la orina, el semen, la saliva, CSF y similares.

Los analitos que pueden analizarse por los presentes procedimientos incluyen las peroxidases, en cuyo caso sería innecesario añadir peroxidasa adicional, inhibidores de peroxidases y varias clases de moléculas orgánicas y biológicas que pueden marcarse con una peroxidasa o pueden detectarse específicamente mediante acompañantes de fijación específica marcados con enzima. La enzima puede incorporarse directamente como marcador en el compuesto de fijación al analito. Alternativamente el compuesto de fijación del analito puede estar unido a por lo menos una sustancia de fijación específica marcada con enzima para el compuesto de fijación del analito. Alternativamente, el compuesto de fijación al analito puede marcarse con por lo menos una segunda sustancia de unión específica que se una a continuación al acompañante de fijación marcado con la enzima para la segunda sustancia de fijación específica.

La presente invención también se refiere a la utilización de este procedimiento para detectar peróxido de hidrógeno en un procedimiento analítico mediante una reacción quimioluminiscente con un compuesto de fórmula I y una enzima peroxidasa, en la que la cantidad de luz producida está relacionada con la presencia o cantidad del presente peróxido. Resultará evidente para los expertos en la materia de análisis quimioluminiscente que los presentes métodos pueden utilizarse para detectar enzimas oxidasa y enzimas deshidrogenada. Estas enzimas generan peróxido de hidrógeno por reacción del oxígeno y oxidación de los sustratos naturales. El peróxido de hidrógeno producido de este modo se puede hacer reaccionar más a continuación ya sea simultáneamente a medida que se genera o en una etapa posterior con el compuesto I de la presente invención y una peroxidasa para producir luz. Una propiedad de la luz producida se relaciona a continuación con la cantidad de enzima oxidasa o deshidrogenasa. Además la enzima oxidasa o deshidrogenasa puede estar presente como conjugado en una molécula biológica o un miembro de un par de fijación específico en un análisis de un analito.

La reacción de un compuesto de fórmula I con una peroxidasa para producir quimioluminiscencia constituye un procedimiento rápido y sensible para detectar la presencia o cantidad de la peroxidasa. La utilización del presente procedimiento puede realizarse por consiguiente con el fin de determinar la presencia o cantidad de una peroxidasa en una muestra midiendo la cantidad o intensidad de luz producida por reacción de la muestra con un compuesto de fórmula I. Dicha determinación puede hallar utilización, por ejemplo, en la detección de la actividad de peroxidasa de la sangre del mamífero como prueba en investigaciones forenses.

Una segunda área de aplicación para la medición quimioluminiscente de la actividad de la peroxidasa es en la detección y medición de inhibidores enzimáticos. Por ejemplo, los inhibidores de peroxidasa incluyen cianuro, sulfuro y altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La medición de la cantidad o características de un inhibidor, tal como la inhibición de la constante  $K_i$  o la vida media para la inhibición,  $t_{1/2}$ , se realiza midiendo la actividad de una muestra que contiene la enzima peroxidasa en presencia de un sustrato de fórmula I que produce un producto detectable y una cantidad de inhibidor. La reacción de la enzima y del compuesto quimioluminiscente se realiza en presencia y ausencia del inhibidor y se comparan los resultados para determinar la presencia o cantidad del inhibidor. El efecto del inhibidor puede tener uno o más de alguno de estos efectos, una disminución de la intensidad de luz, una velocidad más lenta de aumento de la intensidad de la luz o un periodo de disminución antes que comience la emisión de luz.

## ES 2 323 303 T3

Como la reacción esta catalizada por la peroxidasa, pequeñas cantidades en exceso de la enzima son suficientes para producir una cantidad detectable de luz. Se han conseguido sensibilidades inferiores a 1 amol ( $1 \times 10^{-18}$  moles). La capacidad para detectar dichas pequeñas cantidades de peroxidasa hacen a la presente tecnología quimioluminiscente adecuada para análisis de muchos tipos de analitos que utilizan ensayos con enzima ligada que pueden detectar pequeñas cantidades de analito presentes en poca abundancia en una muestra o en una muestra de tamaño limitado. En este tipo de análisis, una peroxidasa se conjuga con un miembro de un par de fijación específica. Un ejemplo es un inmunoanálisis quimioluminiscente con enzima ligada, tal como ELISA. Varios formatos de análisis y los protocolos para llevar a cabo las etapas inmunoquímicas son muy conocidos en la técnica e incluyen tanto los análisis competitivos como los análisis en sándwich. El par de fijación marcado de manera detectable formado de este modo puede analizarse con los compuestos y procedimientos de la presente invención. Cuando el marcador detectable es la enzima peroxidasa, se detecta directamente. Cuando el marcador detectable es un miembro de otro par de fijación específica, por ejemplo, un hapteno un conjugado de su acompañante de fijación con una peroxidasa se hace reaccionar en primer lugar y la peroxidasa se hace reaccionar a continuación según los presentes procedimientos. La medición puede realizarse con especies con enzima marcada acopladas a la técnica de superficies o soportes sólidos conocidos o libre en solución o contenida dentro de un conjunto organizado tal como un liposoma en cuyo caso se emplea un agente lítico para lisar el liposoma y sin la enzima detectable.

Otra utilización a título de ejemplo es la detección de proteínas por la técnica de inmunotransferencia Western. Una muestra que contiene un analito de proteína se detecta con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario marcado con enzima que reconoce y se une al anticuerpo primario. La enzima del marcador se detecta por quimioluminiscencia utilizando un compuesto de la presente invención como análisis quimioluminiscente que utiliza un reactivo de la invención. Las variaciones de esta técnica tal como la utilización de anticuerpos biotinilados y avidina-HRP se consideran dentro del alcance de los análisis capaces de realizarse utilizando los procedimientos de la invención.

Los compuestos utilizados en la presente invención son también útiles para la detección de ácidos nucleicos mediante la utilización de sondas de ácido nucleico marcadas con enzimas. Ejemplos de procedimientos incluyen los análisis de hibridación en solución, la detección de ADN en inmunotransferencia Southern, ARN por inmunotransferencia Northern, secuenciado de ADN, impresión digital de ADN, hibridaciones de colonias y elevadores de placa, cuya realización es bien conocida por los expertos en la materia. Para adaptar estos procedimientos para su utilización en los presentes compuestos se utiliza como marcador una enzima peroxidasa. La peroxidasa puede estar presente como conjugado directo con un oligonucleótido sonda o oligonucleótido de captura o pueden incorporarse con medios de fijación indirectos utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Además de los pares antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o anticuerpo-anticuerpo mencionados anteriormente, los pares de fijación específica pueden incluir también oligonucleótidos complementarios o polinucleótidos, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormona-receptor, lectina-carbohidrato, IgG-proteína A, ácido nucleico-proteína de fijación al ácido nucleico y ácido nucleico-antígeno anti-ácido nucleico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para producir quimioluminiscencia por reacción con una peroxidasa que comprende un tampón acuoso con un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10,5, un compuesto de fórmula I a una concentración entre 0,01 y 10 mM y un peróxido a una concentración de 0,01 a 10 mM. La composición comprende además por lo menos un potenciador en una cantidad eficaz para aumentar la quimioluminiscencia, preferentemente entre 0,001 y 10 mg/ml. La composición puede comprender también opcionalmente un tensioactivo a una concentración entre 0,01 y 10 mg/ml.

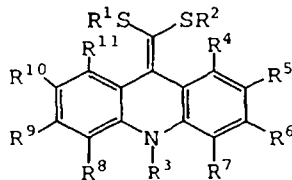
Una composición de reactivo preferida para producir quimioluminiscencia por reacción con una peroxidasa comprende un tampón acuoso con un pH entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9, un compuesto de fórmula I a una concentración entre 0,01 y 10 mM, un peróxido a una concentración entre 0,01 y 10 mM, un potenciador a una concentración entre 0,001 y 10 mg/ml y un tensioactivo en una cantidad eficaz para aumentar la quimioluminiscencia, preferentemente entre 0,001 y 10 mg/ml. La formulación puede comprender además un agente quelante tal como EDTA a una concentración entre 0,01 y 10 mM.

Con objeto de describir con mayor detalle varios aspectos de la presente invención, se proporcionan los ejemplos siguientes no limitativos del alcance de la invención en modo alguno.

## Ejemplos

## 1. Síntesis de ceteno-ditioacetales

5 Se prepararon los compuestos siguientes: 2.



| Comp. | R <sup>4-11</sup> | R <sup>3</sup>                                       | R <sup>1</sup>                                     | R <sup>2</sup>   |
|-------|-------------------|--|--|--|
| 1     | -                 | Ph   | Me   | Me   |
| 2     | -                 | Me   | Me   | Me   |
| 3     | -                 | Ph   | bencil   | bencil   |
| 4     | -                 | Ph   | CHPh <sub>2</sub>                                  | CHPh <sub>2</sub>  |
| 5     | -                 | Ph   | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -                 |  |
| 6     | -                 | Ph   | Me   | N-octil  |
| 7     | -                 | Ph   | Me   | Ph   |
| 8     | -                 | Ph   | Me   | CH <sub>2</sub> COOEt  |
| 9     | -                 | Ph   | Me   | isopropil  |
| 10    | -                 | Ph   | Me   | 2-hidroxibutil   |
| 11    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Li                 |
| 12    | -                 | Ph   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Li | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Li                 |
| 13    | -                 | Ph   | N-octil  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Li                 |
| 14    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 15    | -                 | Me   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 16    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> I                                  |
| 17    | 6-OMe             | Ph   | Me   | Me   |
| 18    | 6-OMe             | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 19    | 6-Cl              | Ph   | Me   | Me   |
| 20    | -                 | Ph   | Me   | CH <sub>2</sub> Ph   |
| 21    | -                 | An   | Me   | Me   |
| 22    | -                 | An   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 23    | -                 | Np   | Me   | Me   |
| 24    | -                 | Np   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 25    | 6-OMe             | Me   | Me   | Me   |
| 26    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | Me   | Me   |
| 27    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 28    | -                 | CH <sub>2</sub> -p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl  | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 29    | -                 | CH <sub>2</sub> -p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OMe | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 30    | -                 | CH <sub>2</sub> -p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl  | Me   | Me   |
| 31    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Et) <sub>3</sub> I |
| 32    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | Et   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 33    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | Pr   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 34    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |
| 35    | -                 | Ph   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>  |
| 36    | -                 | Ph   | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>                    | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |
| 37    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | Me   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |
| 38    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | CH <sub>2</sub> Ph                                 | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                 |
| 39    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph                                   | CH <sub>2</sub> Ph                                 | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |

65 Me=metil, Et=etil, Pr=n-propil, Ph=fenil, Np=2-naftil, An=p-anisil (4-MeOPh), R<sup>4</sup>-R<sup>11</sup> son H a menos que se indique de otro modo. Los compuestos 3, 4 y 6 se obtuvieron como mezclas de isómeros con doble enlace. Cada uno de estos compuestos genera quimioluminiscencia en la presente invención.

## ES 2 323 303 T3

### 2. Preparación de precursores de N-arilacridán

Se prepararon los compuestos de N-fenilacridán, N-(4-metoxi)fenilacridán y N-(2-naftil)acridán por acoplamiento catalizado por paladio de acridán y un compuesto aromático halogenado preferentemente un yoduro de arilo o bromuro de arilo. Por ejemplo, pueden utilizarse bromobenceno, 4-bromoanisol y 2-bromonaftaleno en la reacción de acoplamiento. La etapa catalizada por paladio se realizó utilizando procedimientos generalmente conocidos en la bibliografía utilizando un catalizador de paladio formado a partir de una fosfina terciaria y un compuesto de paladio tal como PdCl<sub>2</sub> o Pd(OAc)<sub>2</sub>.

### 3. Procedimientos de síntesis representativos



**Síntesis del Compuesto 1.** A una solución de LDA (37 mmoles) preparada a partir de diisopropilamina y N-butil-litio en THF (150 ml) a -78°C se añadió el N-fenilacridán (9,00 g, 35 mmoles) en THF (50 ml). Se agitó la mezcla a -78°C durante 1 h. Se añadió a continuación CS<sub>2</sub> (2,35 ml, 39 mmoles). Después de 1 h a -78°C, se dejó calentar la reacción lentamente a temperatura ambiente (1 h). La mezcla de reacción se enfrió a -78°C de nuevo cuando se añadió Mel (2,86 ml, 46 mmoles). Tras la adición, se retiró el baño de nieve carbónica y se continuó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se evaporó a continuación la mezcla de reacción al vacío y se sometió el residuo a cromatografía en columna (hexanos/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 7:1) proporcionando 9,21 g de N-fenilacridán-9-ditiocarboxilato de metilo en forma de un sólido cristalino amarillo. 76% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,54 (s, 3H), 6,02 (s, 1H), 6,37 (d, 2H), 6,92 (t, 2H), 7,07 (t, 2H), 7,35-7,43 (m, 4H), 7,53 (m, 1H), 7,64 (m, 2H).

A una solución de LDA (1,1 mmoles) en THF (30 ml) a -78°C se le añadió el ditioéster (0,347 g, 1 mmol) en THF (5 ml). Se agitó la mezcla a -78°C durante 1 h. Se añadió a continuación Mel (0,10 ml, 1,6 mmoles) mediante una jeringuilla a -78°C. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras la eliminación del disolvente al vacío se cromatografió el residuo en gel de sílice (hexanos/EtOAc 20:1), dando 0,317 g del Compuesto 1 en forma de un sólido ligeramente amarillento (rendimiento del 88%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,37 (s, 6H), 6,52 (d, 2H), 7,07-7,18 (m, 4H), 7,41 (d, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,97 (dd, 2H).

Se prepararon también los compuestos 2, 6, 8, 9, 10, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 26 y 30 mediante un procedimiento análogo a partir de los intermedios de ditioéster que utilizan LDA o NaH como base.

Compuesto 2. 80% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,29 (s, 6H), 3,48 (s, 3H), 7,01-7,09 (m, 4H), 7,30 (m, 2H), 7,82 (dd, 2H).

Compuesto 6. 29% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 0,88 (t, 3H), 1,20 (br, 10H), 1,49 (m, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,71 (t, 2H), 6,47 (t, 2H), 7,04-7,10 (m, 4H), 7,36 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,90 (dd, 1H), 7,96 (dd, 1H).

Compuesto 8. 63% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,19 (t, 3H), 2,25 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 4,08 (q, 2H), 6,49 (d, 2H), 7,03-7,12 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,55 (m, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,93 (dd, 1H), 8,00 (dd, 1H).

Compuesto 9. 83% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,21 (d, 6H), 2,32 (s, 3H), 3,22 (m, 1H), 6,44-6,50 (m, 2H), 7,04-7,12 (m, 4H), 7,35 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,85 (dd, 1H), 8,03 (dd, 1H).

Compuesto 10. 65% de rendimiento, utilizando 1,2-epoxibutano como agente alquilante. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 0,86 (t, 3H), 1,38 (p, 2H), 1,74 (br, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,49 (dd, 1H), 3,02 (dd, 1H), 3,30 (m, 1H), 6,51 (dd, 2H), 7,03-7,16 (m, 4H), 7,35 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,62 (t, 2H), 7,92 (dd, 1H), 8,00 (dd, 1H).

Compuesto 16. 96% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,35 (s, 6H), 6,51 (m, 2H), 7,08 (m, 4H), 7,43 (dd, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,93 (m, 4H), 8,00 (d, 1H), 8,12 (d, 1H).

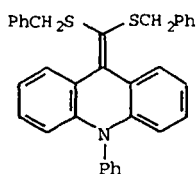
Compuesto 17. 49% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,31 (s, 6H), 3,67 (s, 3H), 5,99 (d, 1H), 6,43 (dd, 1H), 6,63 (dd, 1H), 7,00-7,11 (m, 2H), 7,36 (d, 2H), 7,52 (m, 1H), 7,63 (m, 2H), 7,80 (d, 1H), 7,93 (dd, 1H).

Compuesto 19. 90% de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,29 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 6,37 (d, 1H), 6,48 (m, 1H), 6,97 (t, 1H), 7,01-7,17 (m, 3H), 7,36 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,73 (m, 1H).

## ES 2 323 303 T3

- Compuesto 20. 86% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,20 (s, 3H), 3,94 (m, 2H), 6,52 (m, 2H), 7,00-7,16 (m, 4H), 7,25 (m, 5H), 7,37 (d, 2H), 7,58 (t, 1H), 7,68 (t, 2H), 7,80 (dd, 1H), 7,93 (dd, 1H).
- Compuesto 21. 96% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,30 (s, 6H), 3,92 (s, 3H), 6,50 (d, 2H), 7,00-7,15 (m, 6H), 7,28 (d, 2H), 7,87 (dd, 2H).
- Compuesto 23. 84% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,89 (p, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,77 (t, 2H), 2,90 (t, 2H), 6,48 (t, 2H), 7,01-7,13 (m, 4H), 7,37 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,86 (d, 1H), 7,95 (d, 1H).
- Compuesto 26. 94% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,30 (s, 6H), 5,29 (s, 2H), 6,87 (d, 2H), 7,06 (t, 2H), 7,13-7,20 (m, 4H), 7,27-7,35 (m, 3H), 7,88 (d, 2H).
- Compuesto 30. 90% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,32 (s, 6H), 5,25 (s, 2H), 6,83 (d, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,19 (d, 2H), 7,12 (d, 2H), 7,91 (d, 2H).

*Procedimiento alternativo para ditiocarboxilación.* A una solución de N-bencilacridán (43,8 g) en THF (800 ml) en argón se le añadieron 67 ml de solución n-BuLi 2,5 M a  $-78^\circ\text{C}$ . Se agitó la mezcla a  $-78^\circ\text{C}$  durante 3 horas, se retiró el baño de enfriamiento y se continuó la agitación durante otros 30 min. La solución se enfrió de nuevo a  $-78^\circ\text{C}$  y se añadieron 10,65 ml de  $\text{CS}_2$ . Después de 1 h a  $-78^\circ\text{C}$  la reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente (1 h). Se añadió yoduro de metilo (29,71 g) y se continuó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se evaporó a continuación al vacío y se disolvió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El paso de la solución a través de un tapón corto de sílice y la evaporación del disolvente dejó un sólido anaranjado que se cristalizó en acetato de etilo caliente (10 ml/g de sólidos).



3

*Síntesis del compuesto 3.* A una solución de LDA (11,0 mmoles) en THF (60 ml) a  $-78^\circ\text{C}$  se le añadió N-fenilacridán (1,285 g, 5,0 mmoles) en THF (20 ml). La mezcla resultante se agitó a  $-78^\circ\text{C}$  durante 1 h. Se añadió  $\text{CS}_2$  (0,33 ml, 5,5 mmoles). Después de 30 min. a  $-78^\circ\text{C}$ , se calentó la reacción lentamente a temperatura ambiente (1 h) y se agitó durante 30 min. Se enfrió la reacción a  $-78^\circ\text{C}$  cuando se añadió bromuro de bencilo (1,67 ml, 14 mmoles). Después de 20 min, a  $-78^\circ\text{C}$ , se dejó calentar la reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Después de la preparación, la cromatografía sobre sílice (hexanos/EtOAc 20:1) dio 1,565 g de 3 (rendimiento del 61%).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,90 (s, 4H), 6,42 (d, 2H), 6,97 (t, 2H), 7,09 (t, 2H), 7,18-7,30 (m, 12H), 7,55 (m, 1H), 7,62-7,71 (dd, 4H) ppm.

Los compuestos 4 y 25 se prepararon de manera similar.

- Compuesto 4. 26% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,95 (s, 4H), 6,38 (d, 2H), 6,88 (t, 2H), 7,07 (t, 2H), 7,12 (d, 2H), 7,21-7,30 (m, 20H), 7,40 (d, 2H), 7,53 (m, 1H), 7,61 (m, 2H).
- Compuesto 25. 16% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,28 (d, 6H), 3,44 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 6,54 (d, 1H), 6,63 (dd, 1H), 7,00-7,08 (m, 2H), 7,29 (m, 1H), 7,72 (d, 1H), 7,87 (d, 1H).

Asimismo se preparó el compuesto 5 por alquilación del ditiocarboxilato correspondiente con 1,3-diyodopropano en THF con un rendimiento del 44%.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,16 (p, 2H), 2,90 (t, 4H), 6,44 (d, 2H), 6,99-7,10 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,71 (dd, 2H).

Los compuestos 11, 12, 14, 15, 18, 22, 24, 27, 28, 29, 32, 33 y 38 que cada uno contiene uno o dos grupos de la sal del ácido propansulfónico se prepararon alquilando el éster ditiocarboxilato o ditiocarboxilato de alquilo con propano sulfona.

- Compuesto 11. (98% de rendimiento).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,92 (p, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,67 (t, 2H), 2,81 (t, 2H), 6,41 (t, 2H), 6,90-7,10 (m, 4H), 7,37 (d, 2H), 7,57 (t, 1H), 7,67 (t, 2H), 7,87 (d, 2H).
- Compuesto 12. (68% de rendimiento).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,99 (p, 4H), 2,73 (t, 4H), 2,91 (t, 4H), 6,42 (d, 2H), 6,97-7,06 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,67 (t, 2H), 7,89 (dd, 2H).
- Compuesto 14. (53% de rendimiento).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,88 (p, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,63 (t, 2H), 2,78 (t, 2H), 6,37 (t, 2H), 6,90-7,05 (m, 4H), 7,32 (d, 2H), 7,52 (t, 1H), 7,63 (t, 2H), 7,83 (d, 2H).

## ES 2 323 303 T3

- Compuesto 15. 94% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,87 (p, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,64 (t, 2H), 2,81 (t, 2H), 3,45 (s, 3H), 6,90-7,09 (m, 4H), 7,24 (m, 2H), 7,79 (m, 2H).
- 5 Compuesto 18. 84% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,93 (m, 2H), 2,26 (m, 3H), 2,69 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 3,61 (s, 3H), 5,91 (dd, 1H), 6,39 (t, 1H), 6,62 (m, 1H), 6,90-7,08 (m, 2H), 7,37 (d, 2H), 7,57 (t, 1H), 7,68 (t, 2H), 7,79 (dd, 1H), 7,90 (dd, 1H).
- 10 Compuesto 22. 90% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,91 (p, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,67 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 3,90 (s, 3H), 6,46 (t, 2H), 6,99 (m, 2H), 6,07 (m, 2H), 7,18- 7,29 (m, 4H), 7,86 (d, 2H).
- 15 Compuesto 24. 78% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,95 (p, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,70 (t, 2H), 2,83 (t, 2H), 6,44 (dd, 2H), 7,03 (m, 4H), 7,40 (dd, 1H), 7,59 (m, 2H), 7,90 (d, 2H), 8,01 (m, 3H), 8,16 (d, 1H).
- 20 Compuesto 27. 83% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,85 (p, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,59 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 5,32 (s, 2H), 6,88 (d, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,20- 7,27 (m, 3H), 7,83 (dd, 2H).
- 25 Compuesto 28. 87% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,85 (p, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,60 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 5,30 (s, 2H), 6,86 (d, 2H), 6,96-7,17 (m, 6H), 7,27 (d, 2H), 7,80-7,87 (dd, 2H).
- 30 Compuesto 29. 91% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,85 (p, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,61 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 3,74 (s, 3H), 5,25 (s, 2H), 6,82 (d, 2H), 6,89-7,02 (m, 6H), 7,13 (t, 2H), 7,80-7,87 (dd, 2H).
- 35 Compuesto 32.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,14 (t, 3H), 1,89 (p, 2H), 2,63 (t, 2H), 2,72 (q, 2H), 2,83 (t, 2H), 5,32 (s, 2H), 6,90 (m, 2H), 6,99 (m, 2H), 7,09-7,26 (m, 7H), 7,83 (d, 1H), 7,89 (d, 1H).
- 40 Compuesto 33.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,82 (t, 3H), 1,46 (m, 2H), 1,92 (p, 2H), 2,68 (m, 4H), 2,83 (t, 2H), 5,32 (s, 2H), 6,91 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 7,1-7,25 (m, 7H), 7,86 (t, 2H).
- 45 Compuesto 38.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,9 (p, 2H), 2,6 (t, 2H), 2,8 (t, 2H), 3,93 (s, 2H), 5,31 (s, 2H), 6,9 (m, 3H), 7,2 (m, 13H), 7,6 (d, 1H), 7,8 (d, 1H).

35 *Síntesis del Compuesto 7.* A una solución de LDA (2,5 mmoles) en THF (30 ml) se le añadió N-fenilacridán-9-ditiocarboxilato de metilo (0,347 g, 1,0 mmoles) en THE (10 ml). Después de 1 h a  $-78^\circ\text{C}$ , se dejó calentar la reacción hasta  $-20^\circ\text{C}$  y se añadió a continuación bromobenceno. Se dejó calentar lentamente la reacción después de la adición y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La eliminación del disolvente al vacío seguida de cromatografía (hexanos/EtOAc 20:1) proporcionó 0,255 g de compuesto 7 (rendimiento del 60%).  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,20 (s, 3H), 6,45 (d, 1H), 6,53 (d, 1H), 6,92 (t, 1H), 7,03-7,24 (m, 4H), 7,33-7,47 (m, 6H), 7,56 (m, 1H), 7,66 (m, 2H), 7,87-7,94 (m, 2H).

45 *Síntesis del Compuesto 13.* El N-fenilacridán-9-ditio-carboxilato se convirtió en el bioéster de n-octilo por reacción con 1-yodooctano. A una solución de LDA (4,48 mmoles) en THE (70 ml) a  $-78^\circ\text{C}$  se añadió N-fenilacridán-9-ditiocarboxilato de n-octilo (1,90 g, 4,26 mmoles) en THF (20 ml). La mezcla resultante se agitó a  $-78^\circ\text{C}$  durante 1 h. Se añadió a continuación 1,3-propanosulfona (0,78 g, 6,39 mmoles) en THE (10 ml). Después de 45 min. a  $-78^\circ\text{C}$ , se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h más. La eliminación del disolvente proporcionó un residuo sólido que se disolvió en un volumen mínimo de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se precipitó con hexanos. Se repitió el procedimiento hasta que la solución no presentaba ningún componente fluorescente en una placa de TLC. Después del secado al vacío, se obtuvieron 2.270 g de 13 en forma de un polvo amarillento. 93% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,84 (t, 3H), 1,13-1,40 (m, 12H), 2,02 (q, 2H), 2,68 (t, 2H), 2,77 (t, 2H), 2,90 (t, 2H), 6,42 (dd, 2H), 6,94-7,08 (m, 4H), 7,34 (d, 2H), 7,56 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,86 (d, 1H), 7,92 (d, 1H).

55 *Síntesis del Compuesto 31.* El compuesto 16 (0,250 g, 0,49 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) se agitó con trietilamina (9 ml) a temperatura ambiente durante 2,5 días. Se eliminaron los volátiles al vacío. Se disolvió el residuo en una cantidad mínima de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se precipitó con éter. Este procedimiento se repitió hasta que los lavados no presentaban ningún componente fluorescente. Tras secar al vacío, se obtuvieron 0,140 g del Compuesto 31 en forma de un sólido amarillento. 47% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,06 (m, 9H), 1,71 (m, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,91-3,08 (m, 10H), 6,37 (d, 1H), 6,51 (d, 1H), 6,98-7,18 (m, 4H), 7,25 (d, 2H), 7,59 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,82 (d, 1H), 8,02 (d, 1H).

60 *Síntesis del Compuesto 35.* A una solución de N-fenilacridán-9-ditiocarboxilato de metilo (1,735 g, 5,00 mmoles) en THF (80 ml) se le añadió NaH (0,460 g, suspensión al 60% en aceite mineral, 11,5 mmoles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió a continuación 11 bromoundecán-1-ol (1,633 g, 6,50 mmoles) en THF (20 ml). Tras agitación toda la noche, 4 ml de MeOH se añadieron a la mezcla de reacción para descomponer el NaH en exceso. La eliminación del disolvente al vacío dio un residuo que se cromatografió sobre gel de sílice (hexano/EtOAc 4:1) proporcionando el derivado de 11-hidroxibundecil ceteno-ditioacetil derivado como un jarabe, 2,550 g, 98% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,19-1,60 (m, 19H), 2,32 (s, 3H), 2,70 (t, 2H), 3,64 (m, 2H), 6,46 (t, 2H), 7,05 (m, 4H), 7,35 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,88 (dd, 1H), 7,95 (dd, 1H) ppm.

## ES 2 323 303 T3

A una solución del compuesto preparado anteriormente (2,55 g, 4,92 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 ml) a  $0^\circ\text{C}$  se le añadió piridina (0,52 ml, 6,40 mmoles) seguida de  $\text{POCl}_3$  (0,60 ml, 6,40 mmoles). La reacción se continuó a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 h, antes de retirar el baño de hielo para permitir calentar la reacción a temperatura ambiente (30 min). Se añadió a continuación 3-hidroxipropionitrilo (1,35 ml, 19,7 mmoles) en piridina (3,18 ml, 39,4 mmoles). Tras agitación durante la noche, se calentó la mezcla de reacción con agua en un embudo separador. Se secó la fase orgánica sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporó y se cromatografió el residuo en gel de sílice  $\text{CEtOAc}$  para dar el derivado de bis(cianoetil)fosfato, 2,70 g, 79% de rendimiento.  $^1\text{H RMN}(\text{CDCl}_3)$ :  $\delta$  1,19-1,50 (m, 16H) 1,71 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,70 (t, 2H), 2,79 (t, 4H) 4,13 (q, 2H) 4,38 (q, 4H) 6,45 (t, 2H) 7,05 (m, 4H) 7,35 (d, 2H) 7,54 (m, 1 H), 7,64 (m, 2H) 7,88 (dd, 1 H) 7,94 (dd, 1 H) ppm.

La hidrólisis de los grupos protectores cianoetil se efectuó por tratamiento de 2,70 g (3,84 mmoles) del fosfato protegido con  $\text{NaOH}$  1 M (7,68 ml, 7,68 mmoles) en acetona (40 ml) durante la noche, proporcionando 2,36 g del compuesto 35 (rendimiento del 96%).  $^1\text{H RMN}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  1,08-1,34 (m, 16H), 1,56 (m, 2H) 2,25 (s, 3H) 2,64 (t, 2H) 3,79 (q, 2H), 6,42 (d, 2H), 6,95-7,09 (m, 4H), 7,31 (d, 2H), 7,58 (m, 1H) 7,69 (m, 2H), 7,84 (d, 1 H), 7,89 (dd, 1H).

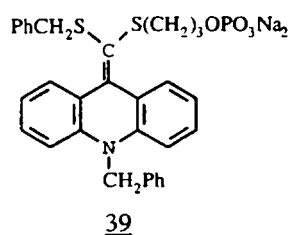
Se prepararon los compuestos 34, 36 y 37 de manera similar, partiendo el 36 del ditioéster de undecilo.

Compuesto 34  $^1\text{H RMN}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  1,77 (p, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,85 (t, 2H), 3,79 (q, 2H), 6,39 (t, 2H), 6,94-7,07 (m, 4H), 7,32 (d, 2H), 7,56 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,83 (dd, 1H), 7,89 (dd, 1H).

Compuesto 36  $^1\text{H RMN}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  0,88 (t, 3H), 1,09-1,35 (m, 18H) 1,87 (p, 2H) 2,66 (t, 2H), 2,90 (t, 2H), 3,84 (q, 2H), 6,40 (m, 2H), 6,94-7,08 (m, 4H), 7,31 (d, 2H) 7,56 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,82 (d, 1 H), 7,95 (d, 1 H).

Compuesto 37  $^1\text{H RMN}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  1,75 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,89 (t, 2H), 3,83 (q, 2H) 5,35 (s, 2H), 6,92 (d, 2H), 7,01 (t, 2H), 7,15 (m, 4H), 7,29 (m, 3H), 7,88 (m, 2H).

### 4. Síntesis del Compuesto 39



El compuesto 39 se prepara por el procedimiento de síntesis siguiente. La reacción del anión de N-bencilacridán con  $\text{CS}_2$  en THE a  $-78^\circ\text{C}$ , permitiendo calentar la reacción a temperatura ambiente (1 h) seguida de adición de bromuro de bencilo proporciona el ditioéster bencílico de N-bencilacridán. Una solución de este ditioéster en THF se trata con  $\text{NaH}$  y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente. Se añade a continuación 3-bromopropan-1-ol (1,633 g, 6,50 mmoles) y la reacción se lleva a cabo durante la noche. El ceteno dicioacetal formado de este modo se fosforila según el procedimiento descrito en relación con la síntesis del compuesto 35.

### 5. Mejora de la quimioluminiscencia de los compuestos de ceteno-ditioacetal

Se probaron varios mejoradores en un protocolo de la prueba que implica hacer reaccionar la peroxidasa de rábano picante con una solución del potenciador, peróxido, EDTA y el compuesto 1 ó 14 en un tampón que contenía Tween 20. Se determinó la intensidad de luz máxima. Entre los potenciadores preferidos estaban 2-naftol, 6-bromo-2-naftol, ácido p-hidroxicinnámico, 1,6-dibromo-2-naftol, 7-metoxi-2-naftol, 4-fenifenol, sales de ácido 3-(N-fenotiainil)propansulfónico, sales del ácido 3-(N-fenoxacinil)propansulfónico, sales del ácido 4-(N-fenoxazenil)butansulfónico, sales del ácido 5-(N-fenoxazinil)pentanoico y N-metil-fenoxazina.

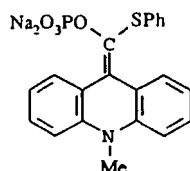
### 6. Detección quimioluminiscente de HRP con el Compuesto 1

Las composiciones reactivas que comprenden el tampón Tris 0,01 M, pH 7,0, peróxido de urea 0,5 mM, p-fenilfenol 0,1 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,025% y el compuesto 1  $5 \times 10^{-5}$  M se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de  $100 \mu\text{l}$  con  $10 \mu\text{l}$  de HRP en el intervalo comprendido entre  $1,4 \times 10^{-15}$  y  $1,4 \times 10^{-20}$  moles. La producción de luz resultó del mezclado, y alcanzó intensidad máxima en aproximadamente 1 min. Una representación log-log de intensidad de quimioluminiscencia frente a la cantidad de enzima fue lineal en todo el intervalo probado.

## ES 2 323 303 T3

### 7. Detección quimioluminiscentes de HRP con el Compuesto 14

Las composiciones de reactivo que comprenden tampón Tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxycinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y compuesto 14  $3 \times 10^{-4}$  M se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de 100  $\mu$ l con 10  $\mu$ l de HRP en el intervalo entre  $1,4 \times 10^{-16}$  y  $1,4 \times 10^{-20}$  moles. La producción de luz resultó en el mezclado y alcanzó intensidad máxima en aproximadamente 1 min. La relación entre la intensidad de quimioluminiscencia y la cantidad de enzima se representa en la Figura 1. Para comparación, se presenta también la relación entre S-B y la cantidad de HRP para el compuesto 1 de referencia que presenta la formula:



Ref. 1

Los resultados para el compuesto de referencia se midieron 15 minutos después de la adición de 10  $\mu$ l de solución de HRP que contenía entre  $1,4 \times 10^{-15}$  y  $1,4 \times 10^{-19}$  moles de enzima para 100  $\mu$ l del reactivo que comprende tampón Tris 0,055 M, pH 8,6, peróxido de urea 0,25 mM, p-fenilfenol 0,05 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,0125% y  $3,3 \times 10^{-4}$  M de Ref. 1.

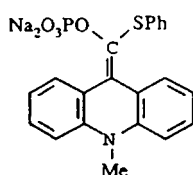
### 8. Detección quimioluminiscente de HRP con el Compuesto 27

Las composiciones del reactivo que comprenden tampón Tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxycinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y compuesto 27  $3 \times 10^{-4}$  M se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de 100  $\mu$ l con 10  $\mu$ l de HRP en el intervalo entre  $1,4 \times 10^{-16}$  a  $1,4 \times 10^{-20}$  moles. La producción de luz se produjo durante el mezclado y la intensidad máxima se alcanzó en aproximadamente 1 min. La relación entre la intensidad de quimioluminiscencia en 1,5 min. y la cantidad enzima se presenta en la Figura 2 junto con los resultados para el compuesto de Ref. 1 en 15 min como se describió anteriormente.

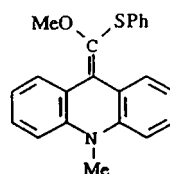
### 9. Comparación de la intensidad de señal

Las composiciones el reactivo que comprenden tampón Tris 0,01 M, pH 8, peróxido de urea 0,5 mM, p-fenilfenol 0,1 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,025% y  $5 \times 10^{-5}$  M de cada compuesto en la tabla siguiente excepto el compuesto denominado Ref. 1 se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100  $\mu$ l con  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP. La formulación del reactivo para Ref. 1 comprendía tampón Tris 0,05 M, pH 8,6, peróxido de urea 0,25 mM, p-fenilfenol 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,0125% y Ref. 1  $3,3 \times 10^{-4}$  M. Para comparación, se proporcionan datos para los compuestos 1 y 2 de referencia.

| Compuesto | Señal/Fondo |
|-----------|-------------|
| Ref. 1    | 53          |
| Ref. 2    | 325         |
| 1         | 8060        |
| 2         | 953         |
| 11        | 849         |
| 13        | 7626        |
| 14        | 688         |
| 26        | 5200        |
| 27        | 533         |



Ref. 1



Ref. 2

## ES 2 323 303 T3

### 10. Comparación de la intensidad de la señal

La señal máxima producida por cada uno de los compuestos 14 y 27 a 29 se comparó haciendo reaccionar una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de las composiciones de reactivo que comprenden tampón Tris 0,025 M, pH 8, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxycinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y  $3 \times 10^{-4}$  M del compuesto de prueba con  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP. Cada reactivo alcanzó la intensidad de luz máxima en aproximadamente 1 minuto.

|    | <u>Compuesto</u> | <u>Señal/Fondo</u> |
|----|------------------|--------------------|
| 10 | 14               | 2491               |
|    | 27               | 6933               |
|    | 28               | 6717               |
|    | 29               | 6621               |
| 15 | 38               | 26000              |

### 11. Perfil temporal de quimioluminiscencia utilizando ceteno-ditioacetato 26

Las composiciones de reactivo que comprenden tampón Tris 0,01 M, pH 8,0, peróxido de urea 0,5 mM, p-nitrofenol 0,01 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,025% y compuesto 26  $5 \times 10^{-5}$  se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  con  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP. El perfil temporal de la quimioluminiscencia relativa se representa en la Figura 3 y demuestra una generación más rápida de quimioluminiscencia que el compuesto de estructura similar denominado Ref. 2. El perfil temporal de quimioluminiscencia utilizando los demás ceteno-ditioacetatos listados en el Ejemplo 1 presentaba un aumento rápido similar.

### 12. Perfil temporal de quimioluminiscencia utilizando ceteno-ditioacetato 27

Las composiciones de reactivo que comprenden tampón Tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxycinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y compuesto 27  $3 \times 10^{-4}$  M se probaron para la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  con  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP. El perfil temporal de quimioluminiscencia relativa se representa en la Figura 4 y representa la rápida generación de quimioluminiscencia y un nivel de señal mayor generando que los reactivos del ejemplo anterior.

### 13. Transferencia Western utilizando un sustrato de ceteno-ditioacetato

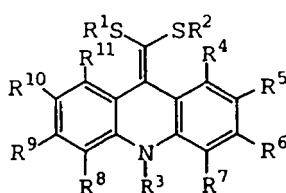
Un ensayo de inmunotransferencia Western de  $\beta$ -galactosidasa como antígeno de ensayo se realizó según el procedimiento descrito en U.K. Laemmli, *Nature* (Londres), 227-680 (1970) utilizando una membrana de PVDF y patrones de  $\beta$ -galactosidasa en el intervalo de 5.000-5 pg. El reactivo para la detección que contiene el Compuesto 1 permitió realizar la detección en menos de 1 minuto. La Figura 5 demuestra la detección de  $\beta$ -gal después de 11 min. con una exposición de 5 segundos. Para comparación, los resultados de una inmunotransferencia Western utilizando un reactivo que contiene el compuesto Ref. 1 como se describe en la patente US n° 5. 922.558 produjo quimioluminiscencia de intensidad inferior y requirió exposiciones más prolongadas para conseguir la misma imagen de las bandas más abundantes. Además, el reactivo de la invención pudo representar bandas en menor abundancia de 1 pg o inferior que no fueron posibles para la imagen con el reactivo que contiene el compuesto de referencia.

### 14. Inmunotransferencia Western utilizando sustrato adicional de ceteno-ditioacetato

Los ensayos de inmunotransferencia Western de  $\beta$ -galactosidasa se realizaron según el Ejemplo 13 utilizando reactivos de detección que contienen el compuesto 27, el compuesto 37, un potenciador y peróxido. La Figura 6 demuestra la detección de  $\beta$ -gal después de 60 min. con una exposición de 1 min. utilizando el compuesto 27 y una exposición de 1 min. después de 8 min., utilizando el compuesto 37.

### 15. Ceteno-ditioacetatos adicionales

Se prepararon los compuestos siguientes.



ES 2 323 303 T3

| Comp. | R <sup>4-11</sup> | R <sup>3</sup>  | R <sup>1</sup>   | R <sup>2</sup>   |
|-------|-------------------|---|--|--|
| 40    | -                 | CH <sub>2</sub> -p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH                                 | CH <sub>3</sub>  | CH <sub>3</sub>  |
| 41    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | CH <sub>2</sub> -p-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl              | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na   |
| 42    | -                 | Ph  | CH <sub>2</sub> Ph   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na   |
| 43    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |
| 44    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH                               | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>   |
| 45    | -                 | Ph  |  | -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> -   |
| 46    | -                 | Ph  |  | -CH <sub>2</sub> CH(O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na)CH <sub>2</sub> -                |
| 47    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  |  | -CH <sub>2</sub> CH(O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na)CH <sub>2</sub> -                |
| 48    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  |  | -CH <sub>2</sub> CH(O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> - |
| 49    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  |  | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -                      |
| 50    | -                 | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na |  | O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>  |
| 51    | -                 | CH <sub>3</sub>   |  | O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>  |
| 52    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH                               | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                      |
| 53    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | CH <sub>3</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                      |
| 54    | -                 | Ph  | CH <sub>3</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                      |
| 55    | -                 | CH <sub>2</sub> Ph  | CH <sub>3</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OSO <sub>3</sub> Na  |
| 56    | -                 | Ph  | CH <sub>3</sub>  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Na                      |

El Compuesto 51 se preparó tal como se describe en el artículo de Akiba mencionado anteriormente.

16. Síntesis y caracterización adicionales

Compuesto 40: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,28 (s, 6H), 4,74 (s, 1H), 5,21 (s, 2H), 6,76 (d, 2H), 6,76 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 7,00 (m, 4H), 7,12 (t, 2H), 7,85 (d, 2H).

Compuesto 41: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,03 (p, 2H), 2,78 (t, 2H), 2,94 (t, 2H), 3,86 (s, 2H), 5,29 (s, 2H), 6,80-7,15 (m, 12H), 7,28 (m, 3H), 7,59 (d, 1H), 7,93 (d, 1H).

Compuesto 42: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,82 (p, 2H), 2,60 (t, 2H), 2,75 (t, 2H), 3,83 (s, 2H), 6,29-6,36 (m, 2H), 6,80-6,85 (t, 1H), 6,90-7,03 (m, 3H), 7,12 (s, 5H), 7,22-7,25 (d, 2H), 7,48-7,63 (m, 4H), 7,78-7,80 (d, 1H).

Compuesto 43: <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): δ 1,77 (p, 4H), 2,88 (t, 4H), 3,69 (q, 4H), 5,30 (s, 2H), 6,98 (d, 2H), 7,06 (m, 4H), 7,18-7,29 (m, 5H), 7,88 (d, 2H).

Compuesto 44: <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD): δ 1,70 (p, 2H), 1,88 (p, 2H), 2,78 (t, 2H), 2,92 (t, 2H), 3,15 (t, 2H), 3,85 (q, 2H), 5,29 (s, 2H), 6,90 (t, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,08-7,26 (m, 7H), 7,74 (d, 1H), 7,95 (d, 1H).

*Síntesis del Compuesto 45.* A una solución de LDA (30,8 mmoles) en THF (250 ml) a -78°C se le añadió N-fenil acridán (3,86 g, 15,0 mmoles) en THF (20 ml). La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1,5 h. Se añadió a continuación SC<sub>2</sub> (0,99 ml, 16,5 mmoles). Después de 45 min. a -78°C, se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente y se agitó mas durante 30 min. Antes se añadió [2-(1,3-dibromo)propoxi]-terc-butildimetilsilano (5,23 g, 15,8 mmoles) en THE (130 ml). Después de agitación durante la noche, se eliminó el disolvente y el residuo se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 1/2,5). Se obtuvo el Compuesto 45 (6,15 g) (rendimiento del 81%). La desprotección del grupo siloxi con TBAF proporcionó el compuesto 45 con un rendimiento del 85%. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,76 (dd, 2H), 2,82 (br, 1 H), 3,19 (dd, 2H), 4,22 (m, 1 H), 6,76 (d, 2H), 7,01-7,13 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,55 (t, 1 H), 7,62-7,72 (m, 4H).

*Síntesis del Compuesto 46.* A una solución del Compuesto 45 (1,00 g, 2,57 mmoles) en DMF (10 ml) en argón se le añadió hidruro sódico (0,108 g, 60% en aceite mineral, 2,70 mmoles). Después de aproximadamente 1 h a 20 min. se produjo una solución transparente. Se añadió a continuación 3-propanosulfona y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 h. La mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de aproximadamente 3 ml eliminando DMF al vacío. Se añadió acetona (7 ml) para precipitar el producto. Se agitó la mezcla durante 20 min. y se recogió el sólido por filtración. Se lavo el sólido con acetona (3 x 5 ml) y se secó para proporcionar 1,12 g del producto en bruto. La recristalización con agua e isopropanol proporcionó 0,80 g del compuesto 46 puro en forma de un sólido amarillento (rendimiento del 58%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,16 (p, 2H), 2,90 (t, 4H), 6,44 (d, 2H), 6,99-7,10 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,71 (dd, 2H).

## ES 2 323 303 T3

Compuesto 47:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,03 (2H, m), 2,87 (4H, m), 3,08 (2H, m), 3,62 (2H, t,  $J = 6,5$  Hz), 4,00 (1H, m), 5,26 (2H, s), 6,81 (2H, d,  $J = 8,2$  Hz), 6,94 (2H, m), 7,07 (4H, m) 7,21-7,29 (3H, m), 7,65 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz).

5 Compuesto 48:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,85 (2H, m), 2,84 (2H, m), 3,06 (2H, m), 3,63 (2H, t,  $J = 6,7$  Hz), 3,87 (2H, m), 3,99 (1H, m) 5,21 (2H, s), 6,78 (2H, d,  $J=8,1$  Hz), 6,93 (2H, m), 7,05 (4H, m), 7,19-7,27 (3H, m), 7,64 (2H, d,  $J = 7,2$  Hz). P31 RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): d 10,27 (s).

10 Compuesto 49:  $^1\text{H}$  RMN( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,92 (4H, t,  $J = 7,1$  Hz), 3,51-3,63 (16H, m), 5,27 (2H, s), 6,85 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz), 7,02 (2H, m), 7,11-7,16 (4H, m), 7,25-7,30 (3H, m), 7,93 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz).

Compuesto 50:  $^1\text{H}$  RMN( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2,03 (m, 4H), 2,85 (t, 2H), 3,48 (m, 4H), 4,14 (t, 2H), 7,02-7,10 (m, 4H), 7,18-7,33 (m, 6H), 7,45 (d, 2H).

15

### 17. Comparación de la intensidad de señal

20 La señal máxima producida por cada uno de los compuestos 40 a 51 se comparó haciendo reaccionar una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de las composiciones de reactivo que comprende tampón Tris 0,025 M, pH 8, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y 1 mM, 0,3 mM, 0,15 mM o 0,05 mM del compuesto de ensayo con  $3,5 \times 10^{-16}$  moles de HRP. Cada reactivo alcanzó la intensidad de luz máxima en 1 a 3 minutos.

|    | <u>Compuesto</u> | <u>Formulación</u> | <u>Señal/Fondo</u> |
|----|------------------|--------------------|--------------------|
| 25 | 40               | 1,0                | 4011               |
|    | 41               | 1,0                | 14000              |
|    | 42               | 1,0                | 9100               |
|    | 43               | 1,0                | 1121               |
| 30 | 44               | 1,0                | 5810               |
|    | 45               | 0,3                | 2102               |
|    | 46               | 1,0                | 13000              |
|    | 47               | 1,0                | 7228               |
| 35 | 48               | 1,0                | 4219               |
|    | 49               | 0,05               | 4853               |
|    | 50               | 0,3                | 1651               |
|    | 51               | 0,05               | 4264               |
| 40 | 52               | 0,15               | 5840               |
|    | 53               | 0,15               | 5742               |
|    | 54               | 0,15               | 2502               |
|    | 55               | 0,3                | 5408               |

45

Los Compuestos 49 y 51 eran muy poco solubles en la formulación acuosa.

### 50 18. Inmunotransferencia Western utilizando el sustrato 46 de ceteno-ditioacetal

55 Se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia Western de (3-galactosidasa según el Ejemplo 13 pero utilizando membranas de nitrocelulosa y un reactivo de detección que comprende el tampón Tris 0,025 m, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y compuesto 46 1 mM. La Figura 7 demuestra la detección rápida y conveniente  $\beta$ -gal con excelente sensibilidad en varios puntos de tiempo hasta 120 min.

### 19. Compuestos adicionales

60 Compuesto 52:  $^1\text{H}$  RMN( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,59-1,70 (m, 4H), 1,95 (m, 2H), 2,72-2,83 (m, 6H), 3,18 (t, 2H), 3,34 (t, 2H), 3,45 (t, 2H), 5,29 (s, 2H), 6,91-7,02 (m, 4H), 7,09-7,25 (m, 7H), 7,82 (d, 1 H), 7,88 (d, 1 H) ppm.

65 Compuesto 53:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,54 (p, 2H), 1,92 (m, 2H) 2,21 (s, 3H), 2,70-2,82 (m, 4H), 3,10 (t, 2H), 3,29 (t, 2H), 5,30 (s, 2H), 6,90-7,02 (m, 4H), 7,08-7,26 (m, 7H), 7,78 (d, 1 H), 7,89 (d, 1 H) ppm.

## ES 2 323 303 T3

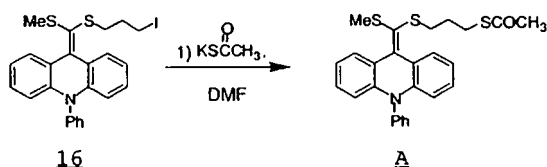
Compuesto 56:  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,60 (p, 2H), 1,93 (m, 2H), 2,27 (s, 3H), 2,71-2,82 (m, 4H), 3,14 (t, 2H), 3,32 (t, 2H), 6,43 (t, 2H), 6,98-7,10 (m, 4H), 7,32 (d, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,69 (m, 2H), 7,82 (d, 1H), 7,92 (d, 1H) ppm.

5

### 20. Síntesis del Compuesto 54

Una mezcla del compuesto 16 (0,500 g, 0,97 mmoles) y ditioacetato potásico (0,166 g, 1,45 mmoles) en DMF (10 ml) se agitó en argón a T.A. durante la noche. Tras la eliminación de DMF al vacío, se absorbió el residuo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se paso a través de una almohadilla de gel de sílice. La eliminación del disolvente proporcionó 0,46 g de A en forma de un sólido espumoso.

10

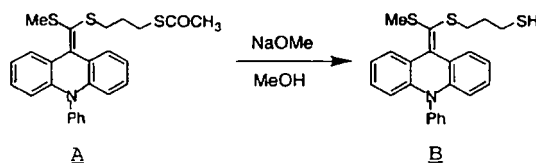


15

20

Se disolvió el compuesto A en una mezcla de MeOH (10 ml) y THF (10 ml) en argón. A esta solución se le añadió NaOMe (0,054 g, 0,97 mmoles). La mezcla resultante se añadió a T.A. durante 3 horas. Se utilizó a continuación resina de intercambio iónico Dowex 50WX8-100 para ajustar el pH entre 5 y 6. Se filtró la resina y se evaporó a sequedad el filtrado. Se absorbió el residuo con acetona y se paso a través de una almohadilla de gel de sílice. Tras la eliminación del disolvente, se proporcionaron 0,41 g de B en forma de un sólido espumoso.

25



30

B.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,21 (t, 1H), 1,72 (p, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,80 (t, 2H), 6,49 (t, 2H), 7,02-7,14 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,88 (d, 1H), 7,95 (d, 1H) ppm.

35

El compuesto B se convirtió en el compuesto 54 por reacción con propanosulfona y NaH en DMF como se describió anteriormente.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,59 (p, 2H), 1,92 (p, 2H), 2,22 (t, 2H), 2,27 (s, 3H), 2,45 (t, 2H), 2,73-2,85 (m, 4H), 6,43 (dd, 2H), 6,98-7,10 (m, 4H), 7,35 (d, 2H), 7,58 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,80 (d, 1H), 7,92 (d, 1H) ppm.

40

### 21. Síntesis del Compuesto 55

Una mezcla del ditioéster (1,00 g, 2,77 mmoles) y NaH (2,77 mmoles) en DMF se agitó bajo argón durante 1 h. Se añadió a continuación sulfato de 1,3-propanodiol cíclico y se agitó la mezcla resultante a T.A. durante la noche. Tras la eliminación de DMF, se lavó el residuo con acetona/éter (1:3) y se recristalizó en MeOH/2-propanol para dar 1,40 g del compuesto 55 (96% de rendimiento).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,69 (p, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,76 (t, 2H), 3,83 (t, 2H), 5,31 (s, 2H), 6,90 (m, 2H), 6,99 (m, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,24 (m, 3H), 7,83-7,88 (dd, 2H) ppm.

50

### 22. Detección quimioluminiscente de HRP con los Compuestos 52 y 53

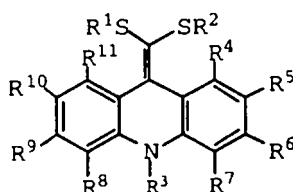
En las composiciones del reactivo que comprenden tampón Tris 0,025 m, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxycinnámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 al 0,1% y compuesto 52 ó 53  $3 \times 10^{-4}$  M se ensayó la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar alícuotas de  $100 \mu\text{l}$  por triplicado con  $10 \mu\text{l}$  de HRP en el intervalo entre  $1,4 \times 10^{-16}$  a  $1,4 \times 10^{-21}$  moles. Se produjo luz durante el mezclado y la intensidad máxima se alcanzó rápidamente. La relación entre la intensidad máxima de quimioluminiscencia y la cantidad de enzima se representa en la Figura 8.

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir quimioluminiscencia que comprende hacer reaccionar en una solución de tampón acuosa que presenta un pH comprendido en el intervalo de 5 a 10,5, una enzima peroxidasa con un peróxido y por lo menos un compuesto de fórmula I:



para producir quimioluminiscencia en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1 a 20 átomos de carbono y pueden unirse para formar un grupo que contiene un anillo, cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> es independientemente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y de halógeno, y R<sup>3</sup> se selecciona de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen mediante una cadena de heteroalquileno o alquileno sustituido para formar un anillo que comprende de cinco a treinta átomos.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I está sustituido con por lo menos un grupo Z que proporciona solubilidad en agua seleccionado de entre grupos de la sal sulfonato -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal sulfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfonato -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfato -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, grupos de la sal carboxilato -COO<sup>-</sup>, grupos de la sal de amonio -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> y grupos de la sal de fosfonio -PR<sub>3</sub><sup>+</sup>.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el anillo que contiene la cadena de alquileno está sustituido con por lo menos un grupo Z que proporciona solubilidad en agua seleccionado de entre grupos de la sal sulfonato -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal sulfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfonato -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfato -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, grupos de la sal carboxilato -COO<sup>-</sup>, grupos de la sal de amonio -NR<sub>3</sub><sup>+</sup>, y grupos de la sal de fosfonio -PR<sub>3</sub><sup>+</sup>.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el R<sup>3</sup> está sustituido con por lo menos un grupo Z que proporciona solubilidad en agua seleccionado de entre grupos de la sal sulfonato -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal sulfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfonato -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfato -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, grupos de la sal carboxilato -COO<sup>-</sup> y grupos de la sal de amonio -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> y grupos de la sal de fosfonio -PR<sub>3</sub><sup>+</sup>.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además proporcionar un potenciador seleccionado de entre compuestos fenólicos, aminas aromáticas, ácidos arilbóricos sustituidos e insustituidos, ésteres arilbóricos, anhídridos del ácido arilbórico, fenoxazinas y fenotiazinas.

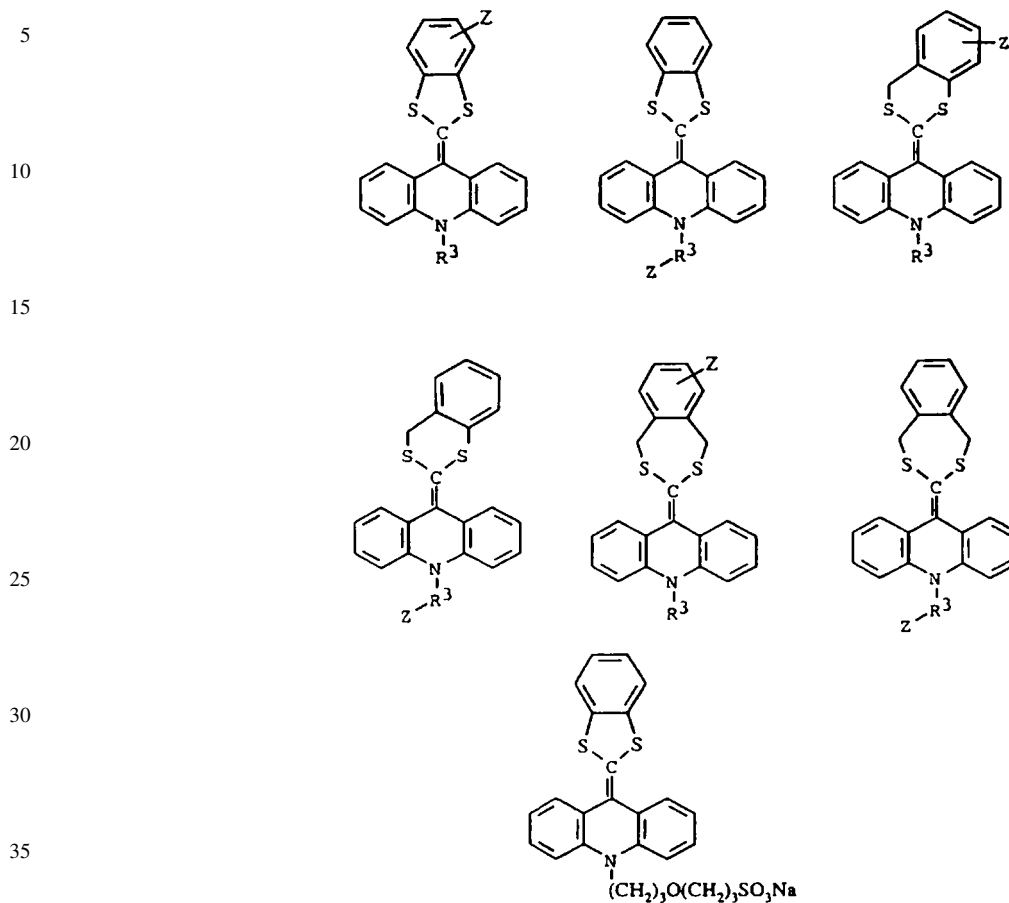
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos por un anillo que comprende de cinco a treinta átomos fusionados a un segundo anillo, cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> es independientemente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y de halógeno, R<sup>3</sup> se selecciona de entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, y que comprende además un grupo Z que proporciona solubilidad en agua seleccionado de entre grupos de la sal sulfonato -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal sulfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfonato -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfato -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, grupos de la sal carboxilato -COO<sup>-</sup>, grupos de la sal de amonio -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> y grupos de la sal de fosfonio -PR<sub>3</sub><sup>+</sup>.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el segundo anillo fusionado en el compuesto de fórmula I es un anillo bencénico o un anillo bencénico sustituido.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el segundo anillo fusionado en el compuesto de fórmula I está sustituido con por lo menos un grupo Z que proporciona solubilidad en agua seleccionado de entre grupos de la sal sulfonato -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal sulfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfonato -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, grupos de la sal fosfato -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, grupos de la sal carboxilato -COO<sup>-</sup>, grupos de la sal de amonio -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> y grupos de la sal de fosfonio -PR<sub>3</sub><sup>+</sup>.

ES 2 323 303 T3

10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el compuesto de fórmula I se selecciona de entre:



40 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I presenta la fórmula:



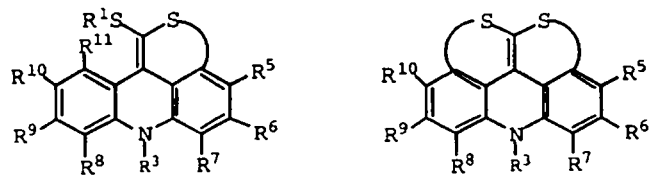
55 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de entre grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1 a 20 átomos de carbono y pueden unirse cada uno independientemente a la posición R<sup>4</sup> o R<sup>11</sup> del anillo respectivo más próximo para cerrar un anillo adicional y pueden unirse para formar un anillo de 5 a 30 átomos cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>6</sup> y R<sup>8</sup> a R<sup>11</sup> es independientemente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y de halógeno, y el átomo de nitrógeno se une a R<sup>7</sup> junto a un anillo adicional de 5 a 7 miembros.

60

65

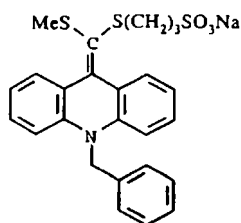
ES 2 323 303 T3

12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I presenta la fórmula:

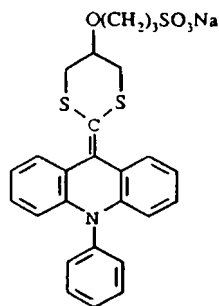


15 en la que por lo menos uno de los átomos de azufre está unido a la posición R<sup>4</sup> o R<sup>11</sup> del anillo respectivo más próximo para formar un anillo de 5 a 7 átomos, y cada uno de R<sup>4</sup> a R<sup>11</sup> es independientemente un sustituyente que puede contener desde 1 a 50 átomos seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y halógeno.

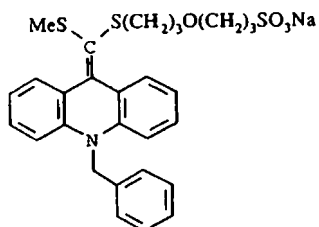
13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I presenta la fórmula:



14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I presenta la fórmula:



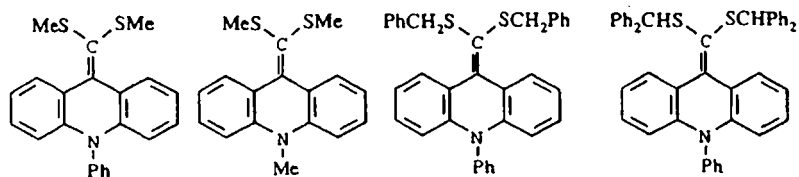
15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I presenta la fórmula:



ES 2 323 303 T3

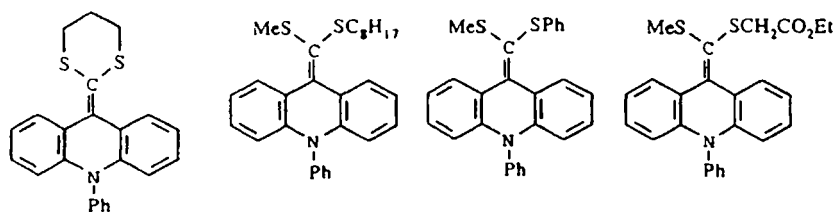
16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I se selecciona de entre el grupo constituido por:

5



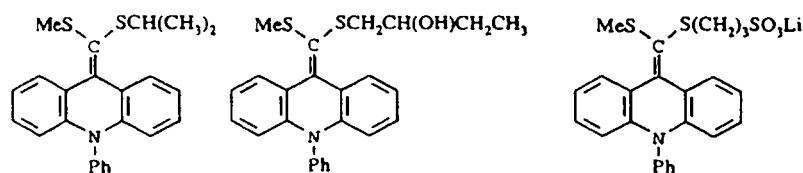
10

15

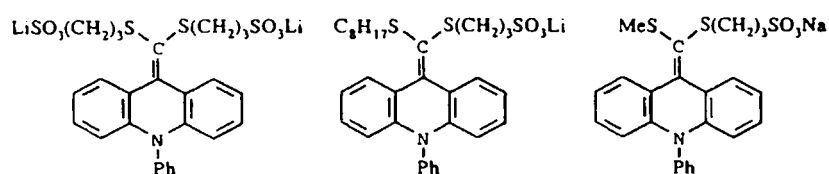


20

25

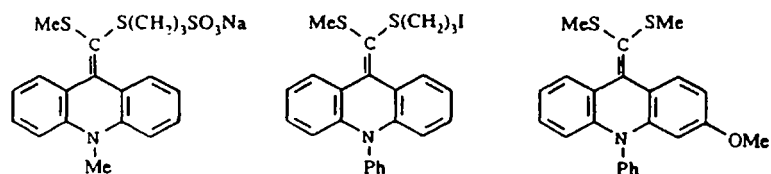


30

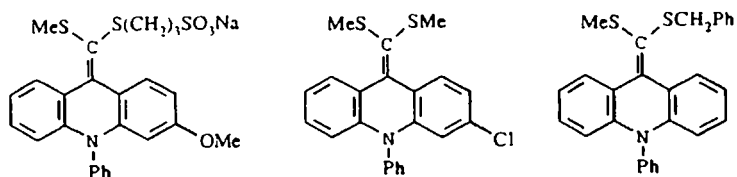


35

40

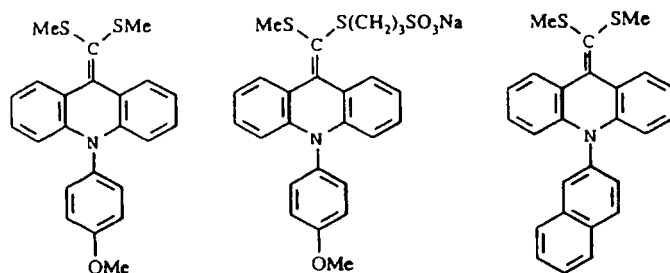


45



50

55

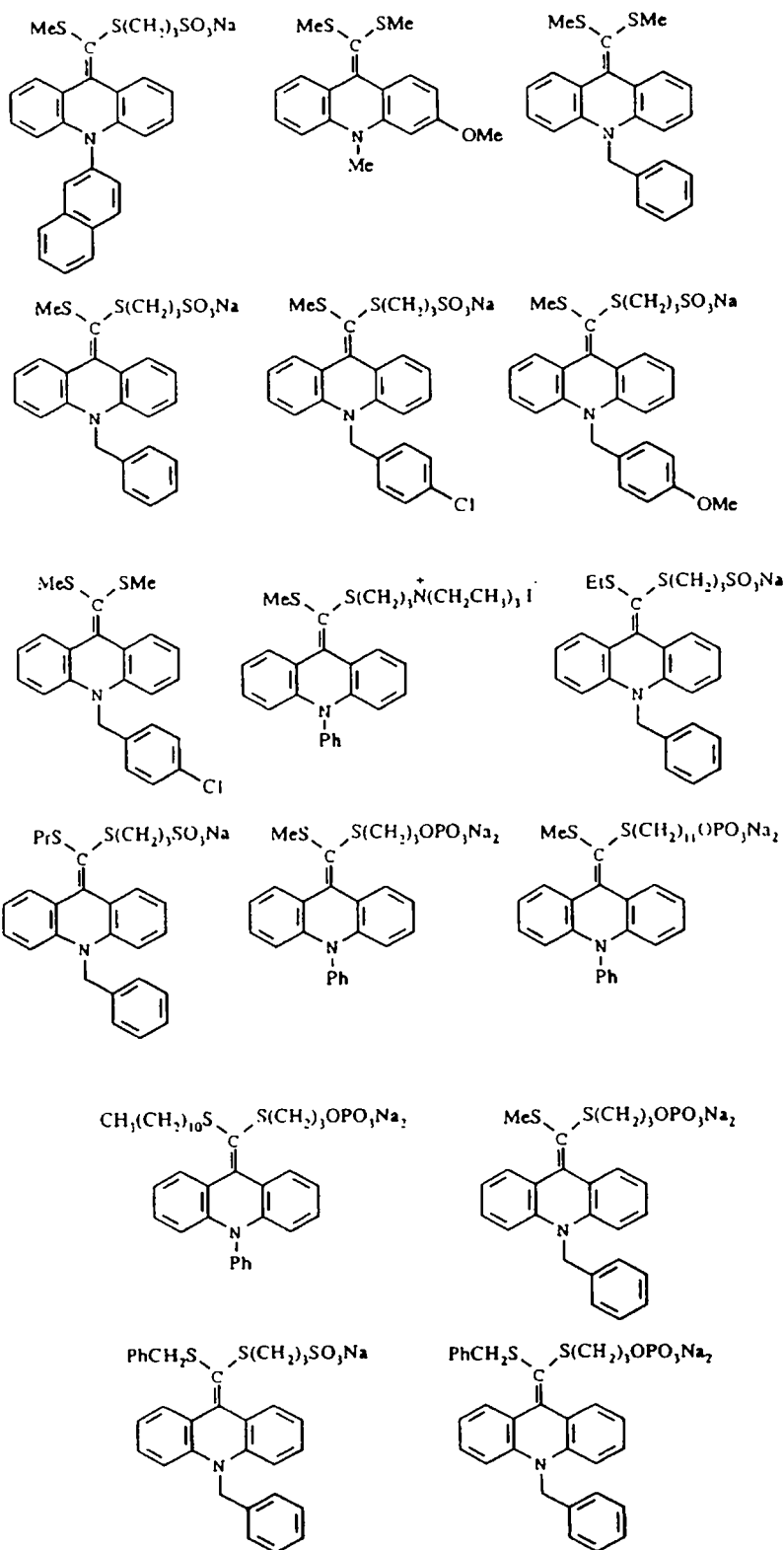


60

65

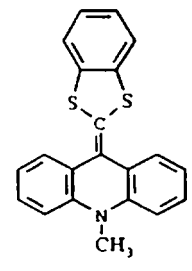
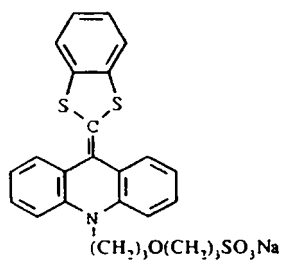
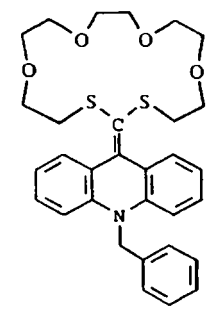
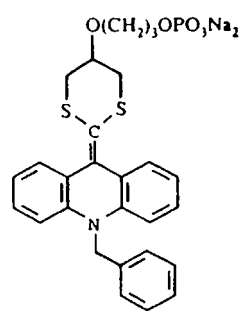
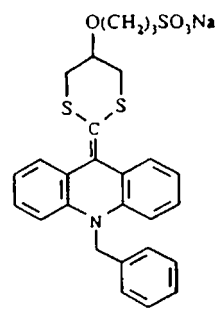
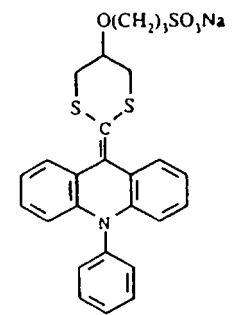
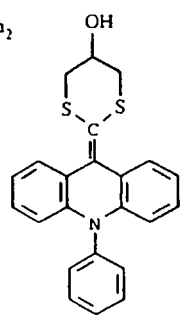
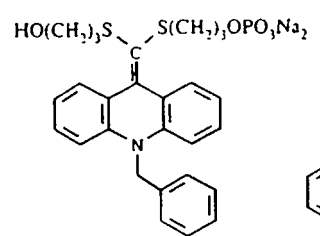
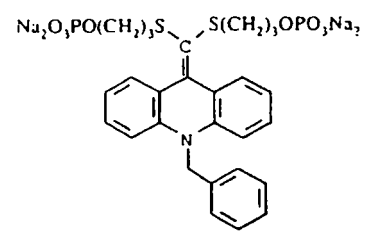
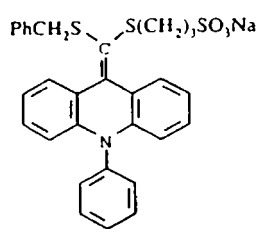
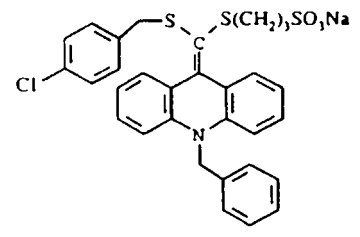
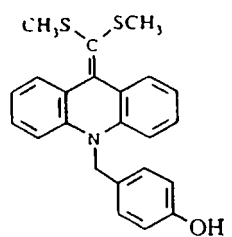
ES 2 323 303 T3

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

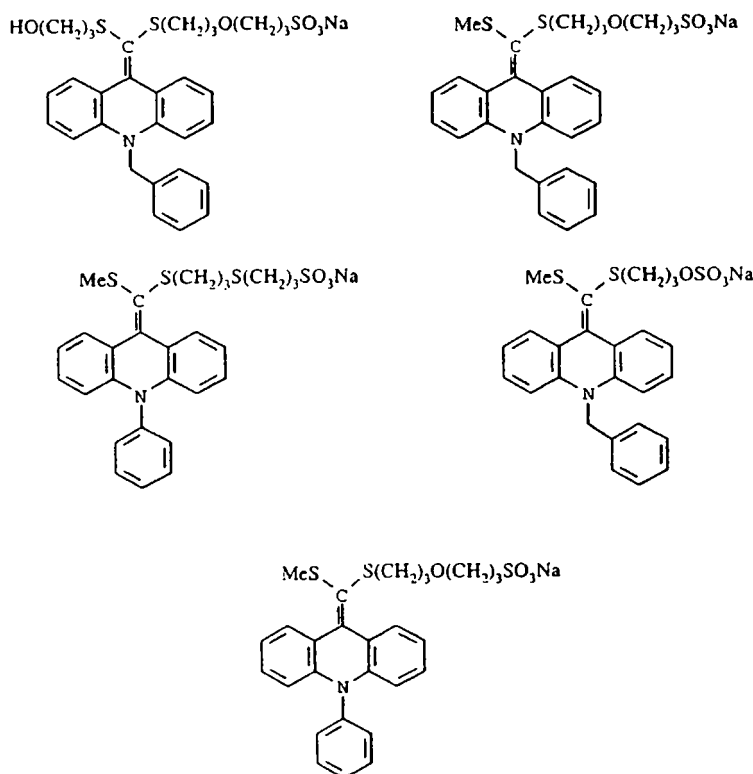


ES 2 323 303 T3

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

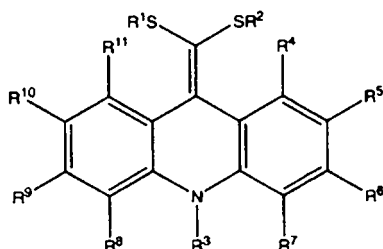


# ES 2 323 303 T3



17. Composición que comprende:

un compuesto de fórmula I:



en la que en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente de entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1 a 20 átomos de carbono y pueden unirse para formar un grupo que contiene un anillo, cada uno de  $R^4$  a  $R^{11}$  es independientemente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos seleccionados de entre los átomos de C, H, N, O, S, P, Si y de halógeno, y  $R^3$  se selecciona de entre los grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido a una concentración entre 0,01 y 10 mM;

un peróxido a una concentración entre 0,01 y 10 mM;

un potenciador a una concentración entre 0,001 y 10 mg/ml, en el que el potenciador se selecciona de entre compuestos fenólicos, aminas aromáticas, ácidos arilbóricos sustituidos e insustituidos, ésteres arilbóricos, anhídridos del ácido arilbórico, fenoxazinas y fenotiazinas;

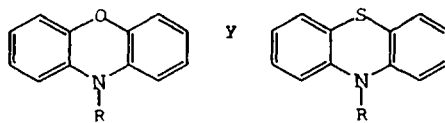
en una solución acuosa tamponada que presenta un pH comprendido en el intervalo de 5 a 10,5.

18. Composición según la reivindicación 17, en la que el potenciador se selecciona de entre p-fenilfenol, p-yodofenol, p-bromofenol, ácido p-hidroxicinnámico, p-imidazolilfenol, acetaminofeno, 2,4-diclorofenol, 2-naftol y 6-bromo-2-naftol.

## ES 2 323 303 T3

19. Composición según la reivindicación 18, en la que el potenciador se selecciona de entre fenoxazina y fenotiazina que presentan las fórmulas:

5



10

en las que los grupos R sustituidos en el átomo de nitrógeno de los potenciadores de fenoxazina y fenotiazina son alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, y alquilo de 1 a 8 átomos de carbono sustituido con un grupo de sal sulfonato o de sal carboxilato.

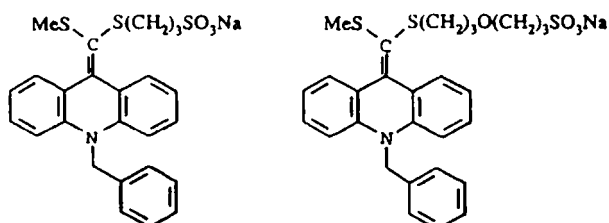
15

20. Composición según la reivindicación 17, que comprende además un tensioactivo a una concentración comprendida entre 0,01 y 10 mg/ml.

20

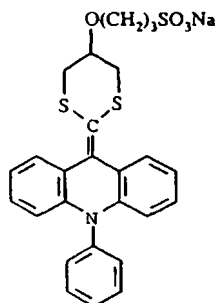
21. Composición según la reivindicación 18, en la que el compuesto de fórmula I se selecciona de entre el grupo constituido por:

25



30

35



40

45

50

55

60

65

FIG. 1

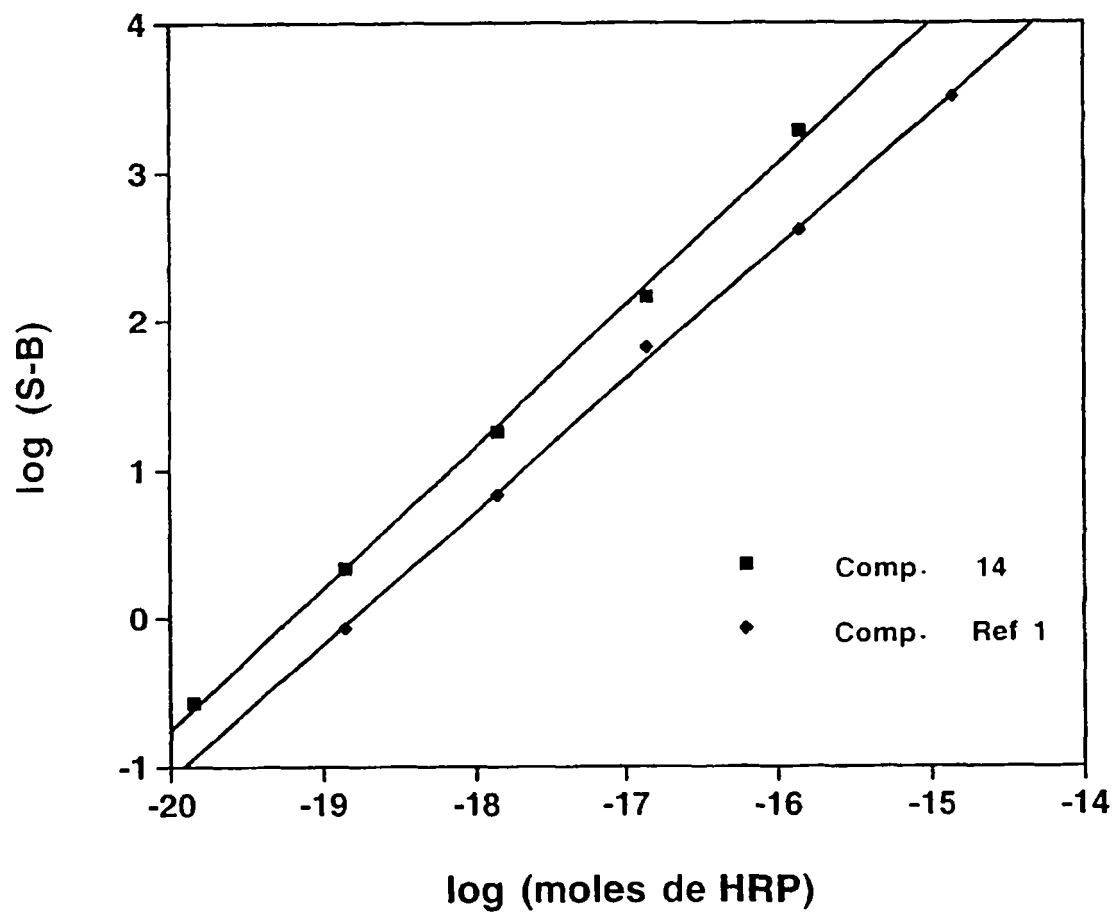


FIG. 2

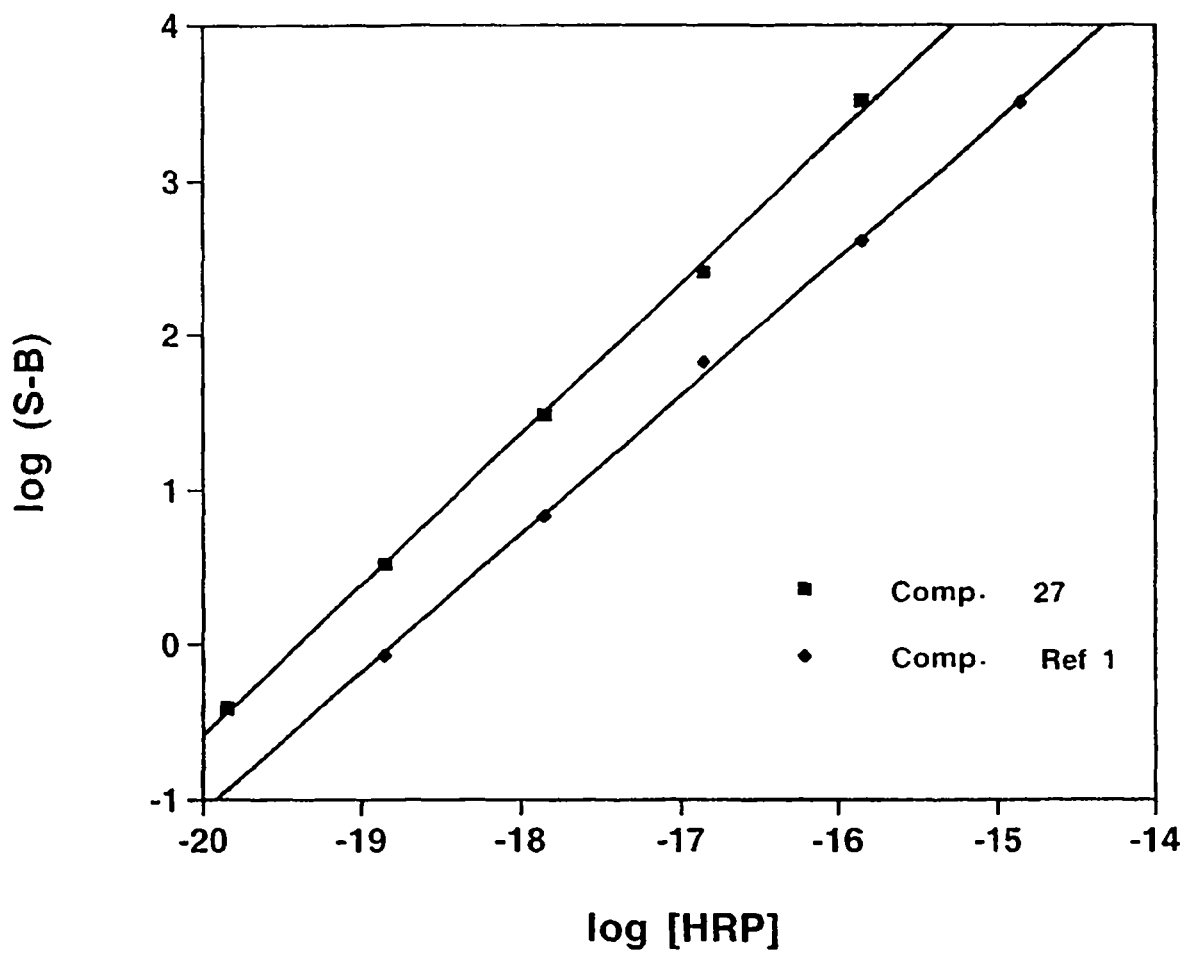


FIG. 3

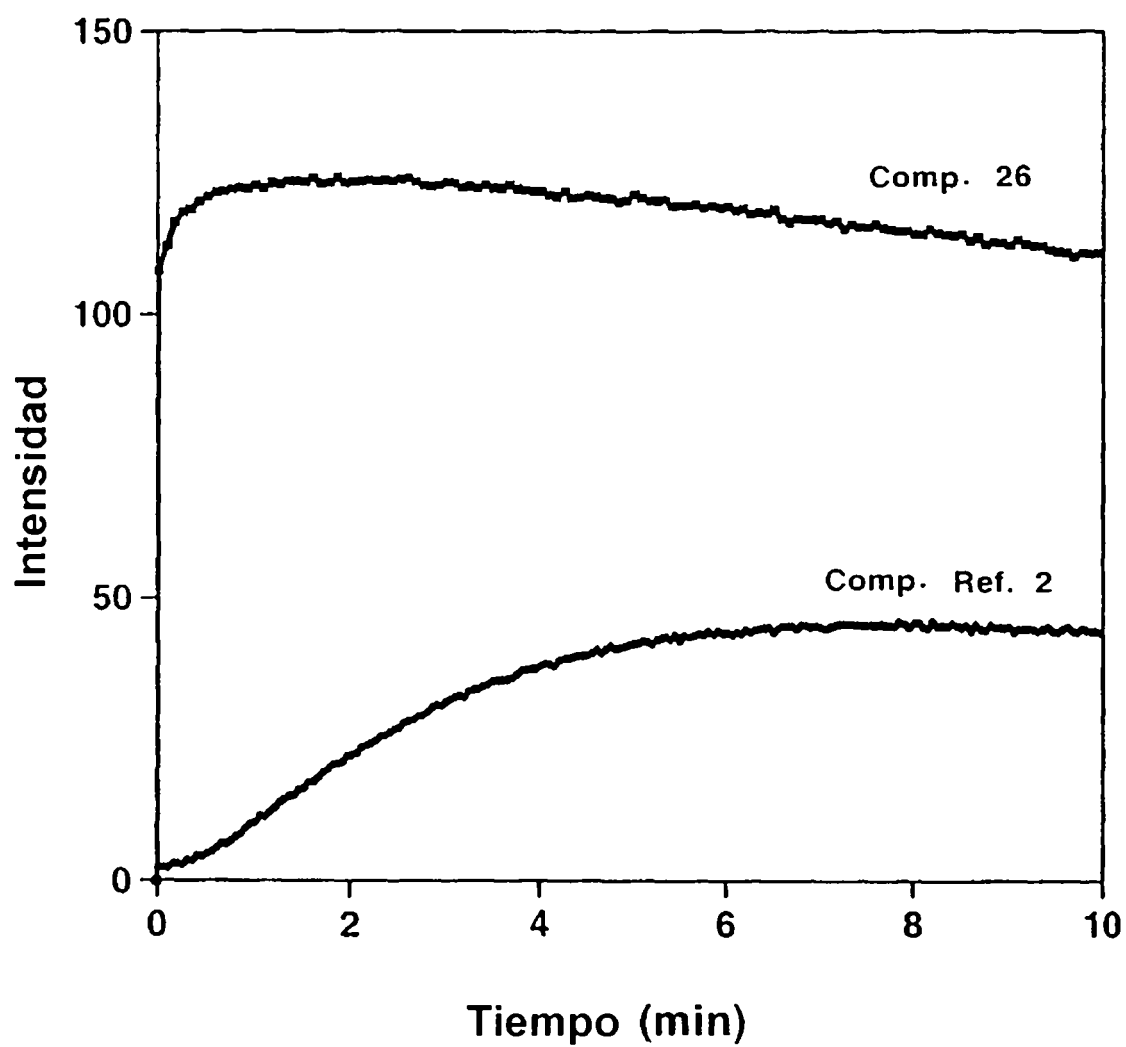


FIG. 4

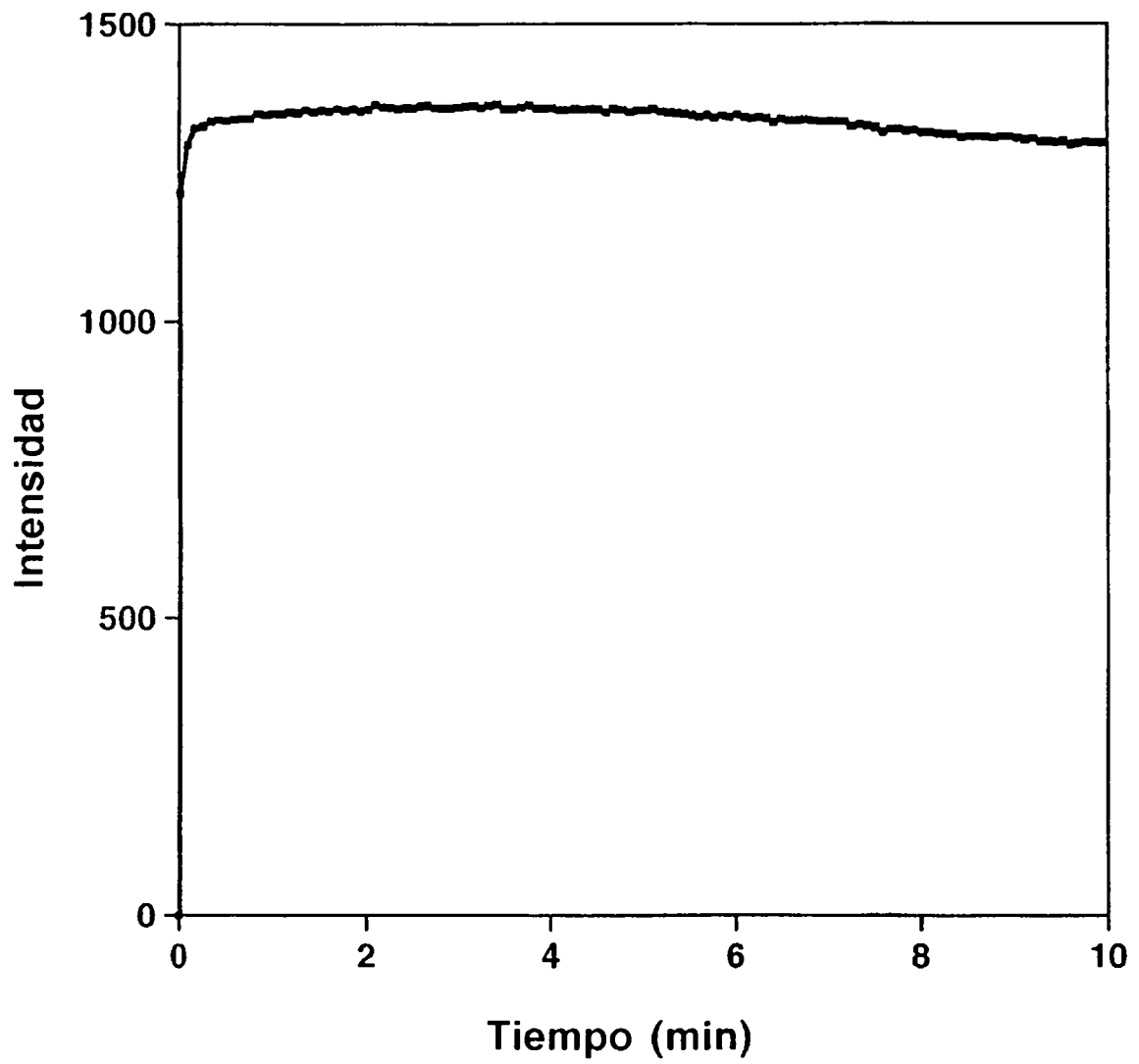
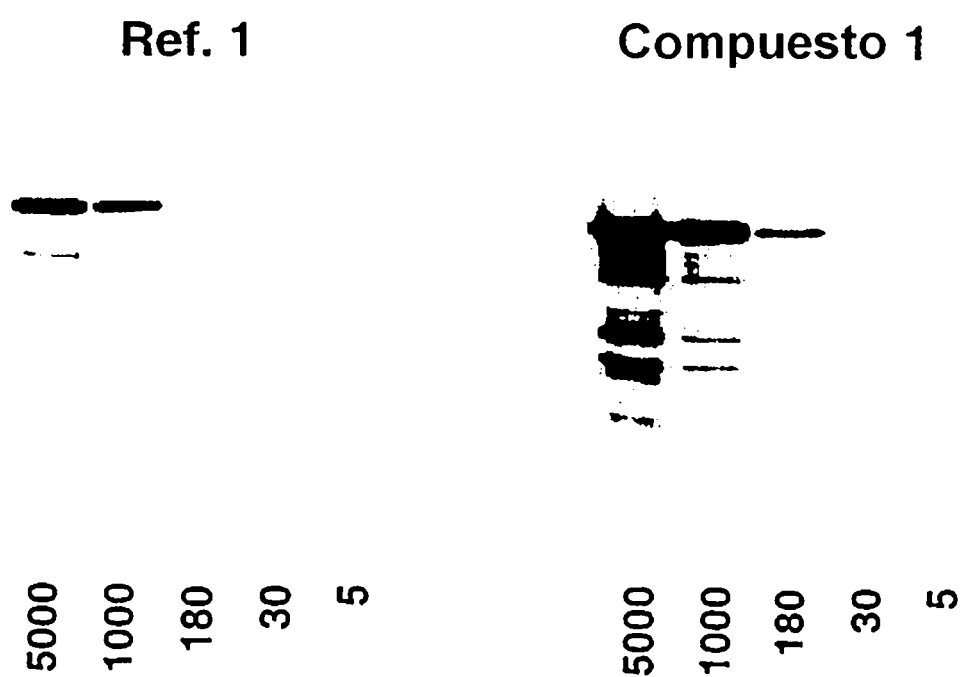
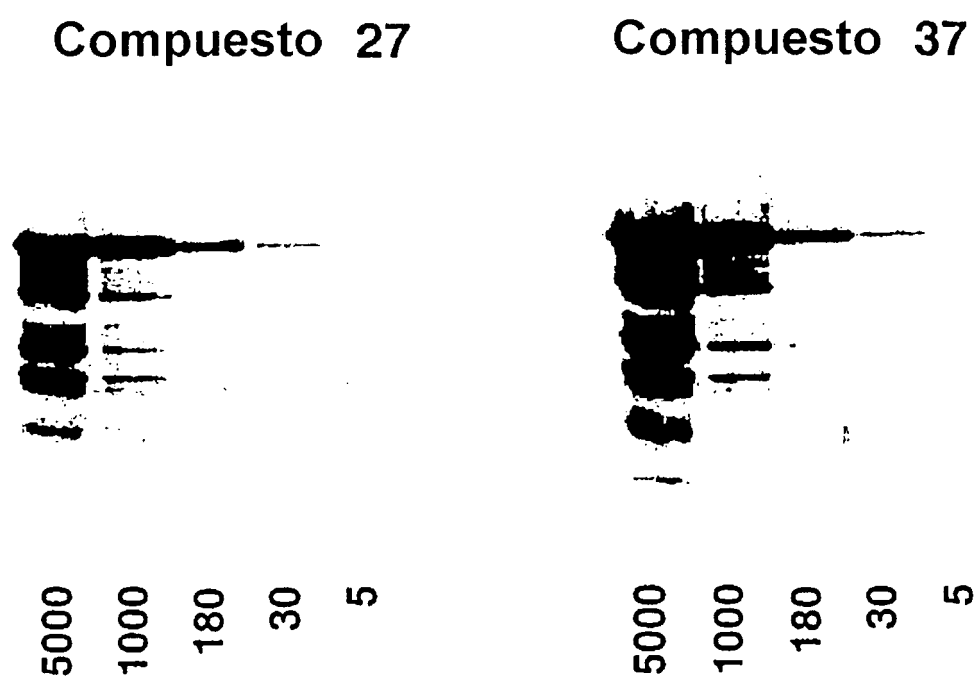


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

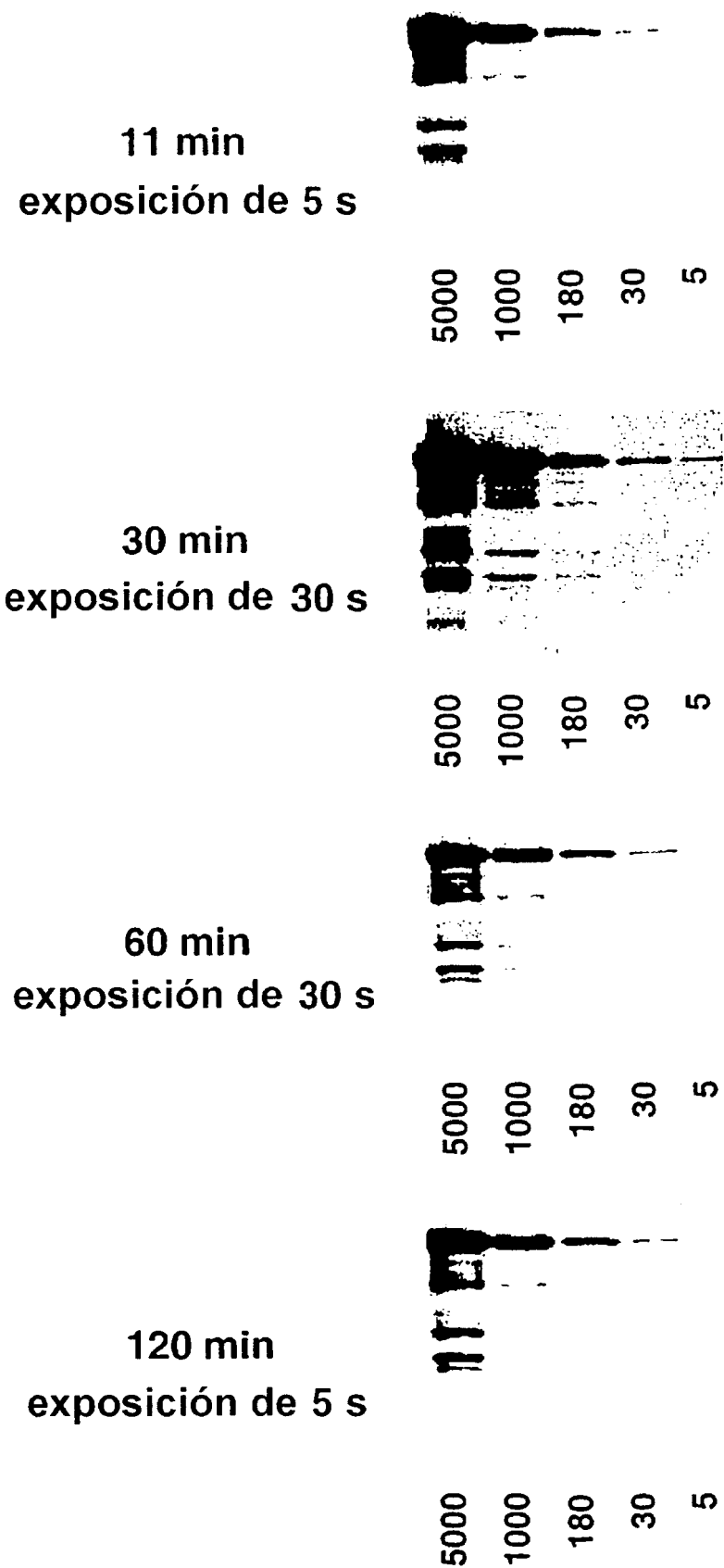


FIG. 8

