



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 368 509**

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: **09002933 .1**

96 Fecha de presentación : **18.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **2096110**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54

Título: **Derivados de 9-ditiocarboxilato de acridano 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:
17.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2011

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: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 509 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

Derivados de 9-ditiocarboxilato de acridano para generar quimioluminiscencia con una peroxidasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos quimioluminiscentes y a composiciones que reaccionan con una peroxidasa y a una peroxidasa para generar quimioluminiscencia. En particular, la presente invención se refiere a composiciones mejoradas que contienen nuevos compuestos de ceteno ditioacetato que reaccionan con una peroxidasa y a un peróxido para producir quimioluminiscencia visible. La invención además se refiere a métodos de ensayo para detectar una peroxidasa y para detectar socios de enlace específicos marcados con peroxidasa en inmuno-ensayos, ensayos de sonda de ácido nucleico y otros ensayos de pares de unión específicos.

15 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas de peroxidasa tales como la peroxidasa de rábano (HITS) se usan frecuentemente como marcadores en ensayos ligados a enzimas para moléculas biológicas y otros analitos de interés tales como fármacos, hormonas, esteroides y marcadores de cáncer. La detección quimioluminiscente de estas enzimas ofrece un medio seguro, apropiado y sensible para medir la cantidad de enzima de una muestra o la cantidad de analito marcado con enzima o socio de enlace específico marcado para un analito. Se han desarrollado otros esquemas de reacción quimioluminiscentes para cuantificar el nivel particular de enzimas de peroxidasa.

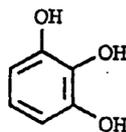
a. Sustratos de peroxidasa quimioluminiscentes. Las acilhidrazidas cíclicas con sustitución amino tales como los conocidos luminol e isoluminol reaccionan con H_2O_2 y un catalizador de peroxidasa (tales como peroxidasa de rábano, HRP) en condiciones básicas con emisión de luz. Se ha usado esta reacción como la base para métodos analíticos para la detección de H_2O_2 y peroxidasa. Se sabe que los análogos heterocíclicos de luminol tal como 8-amino-5-cloro-7-fenilpirido[3,4-d-piridazin-1,4(2H, 3H)diona (M li, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 193(2), 540-5 (1993)); piridazinoquinoxalinas (patente de EE.UU. N° 5.324.835) y pirazolo[4',3':5',6']pirido-[2,3-d]-pirazindionas con disustitución 1,3 (Y. Tominaga, et al., Tetrahedron Lett., 36, 8641-4 (1995)) reaccionan con una peroxidasa y con peróxido para producir quimioluminiscencia. Otros compuestos de hidrazida que son quimioluminiscentes cuando son oxidados por una peroxidasa y un peróxido son las ftalhidrazidas con sustitución hidroxilo (patente de EE.UU. N° 5.552.298).

Las patentes de EE.UU. Nos. 5.491.072, 5.523.212 y 5.593.845 de los solicitantes divulgan ésteres de ácido N-alquilacridancarboxílico quimioluminiscentes, tioésteres y sulfonimidias que producen luz tras reacción con un peróxido o una peroxidasa para su uso en la detección de peroxidasa en ensayos. La solicitud de PCT (WO 94/02486) describe la reacción quimioluminiscente de compuestos de espiroacridano con agua oxigenada. Esta reacción se mejora por medio de la adición de peroxidasa de rábano.

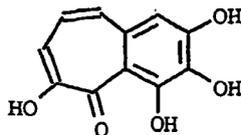
40 Varios compuestos de origen biológico, denominados colectivamente luciferinas, son oxidados por peroxidasa (resumidos en L.J. Kricka y G.H.G. Thorpe, en Luminescencen Immunoassay and Molecular Applications, K. Van Dyke and R. Van Dyke, eds., CRC Press, Boca Raton, 1990, pp. 77-98). Cuando no se usa agua oxigenada, la enzima funciona como una oxidasa.

45 Determinados compuestos de fenol producen quimioluminiscencia tras oxidación con una peroxidasa. Como ejemplos, se citan pirogalol-B-1 y purpogalina-B-2 en Kricka y Thorpe, *ibid*, así como también compuestos de cumarina o de tipo cumarina, umbeliferona y esculina (D. Slawinska, J. Slowinski, J. Biolumin. Chemilumin., 4, 226-30 (1989)); floroglucinol B-3. (M. Halmann, et al., Photochem. Photobiol., 30, 165-7 (1979)); y acetaminofen B-4 (K. Schmitt, G. Clinto, Photochem. Photobiol., 51, 719-23 (1990)).

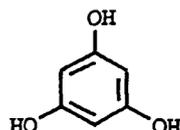
50



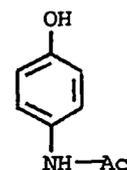
B-1



B-2



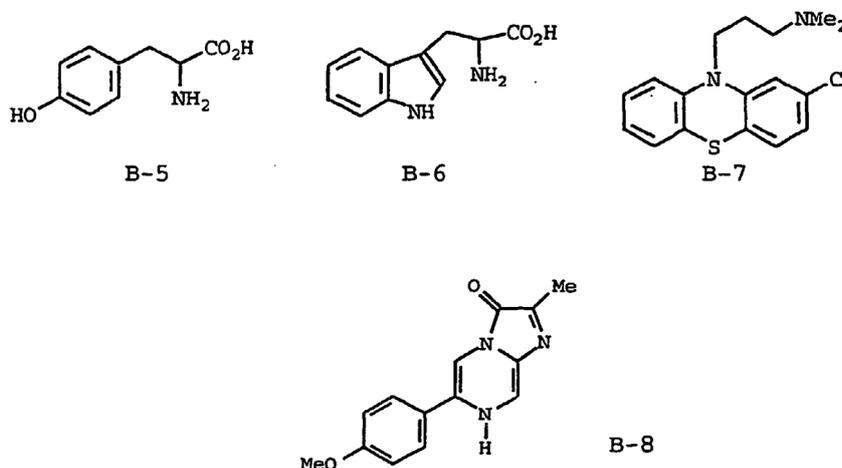
B-3



B-4

Otros compuestos variados publicados para producir quimioluminiscencia leve en presencia de oxígeno o de un

peróxido y una peroxidasa son polímeros sintéticos que contienen 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 agua oxigenada (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 M (Mitani, et al., J. Biolumin. Chemilumin. 9, 355-61 (1994)) que presentan estructuras respectivas B-5-B-8 como se muestra a continuación.



Ninguna de las referencias anteriores divulga la oxidación quimioluminiscente de los compuestos divulgados actualmente por parte de una peroxidasa.

b. Reacción de enoles con HRP. Una serie de publicaciones describe la oxidación al aire catalizada por peroxidasa de aldehídos enolizables (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)). Se piensa que el sustrato reactivo es la pequeña cantidad de la forma de enol en equilibrio con el aldehído. La reacción del aldehído se encuentra catalizada por fosfato de enol, pero el fosfato de enol no se consume en sí mismo. La referencia muestra que el fosfato de enol no reacciona con una peroxidasa para producir quimioluminiscencia. La transferencia de energía a los aceptores de energía fluorescentes aumentó la emisión de luz (M.T. Grijalba, et al., Photochem. Photobiol., 63(6), 697-701 (1996)). Se usaron aldehídos enmascarados como éteres de enol sililo (Beader, *ibid.*) o acetatos de enol en ensayos acoplados en los que se desenmascaró el enol en un primera etapa para generar un enol *in situ* que posteriormente se hizo reaccionar con una peroxidasa para generar quimioluminiscencia (A. Campa, et al., Photochem. Photobiol., 63 (6), 742-5 (1996)).

c. Mejoradores de peroxidasa. Se han empleado numerosos mejoradores de peroxidasa con el fin de aumentar la cantidad y duración de la quimioluminiscencia procedente de la reacción de una peroxidasa con sustratos quimioluminiscentes conocidos que incluyen el luminol anteriormente mencionado y los derivados de ácido acridancarboxílico. Estos incluyen derivados de benzotiazol tal como D-luciferina, varios compuestos fenólicos tales como p-yodofenol, p-fenilfenol, naftoles y aminas aromáticas como las recogidas en G. Thorpe, L. Kricka, en Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives, J. Scholmerich et al., Eds. pp. 199-208 (1987). Otros compuestos que funcionan como mejoradores de la oxidación quimioluminiscente de acilhidrazidas cíclicas con sustitución amino por parte de una peroxidasa incluyen 4-(4-hidroxifenil)-tiazol (M. li, *ibid.*), un grupo de compuestos divulgado en la patente de EE.UU. 555.171.668, 2-hidroxi-9-fluoreno y un grupo de derivados de benzoxazol con sustitución hidroxilo como se divulga en la patente de EE.UU. 5.206.149 y determinados compuestos de ácido fenilborónico como se divulga en la patente de EE.UU. 5.629.168. Ninguna de las referencias anteriores divulga la oxidación quimioluminiscente de los presentes compuestos por parte de una peroxidasa sola o con el uso de mejoradores.

d. Mejora de las reacciones quimioluminiscentes con peroxidasa por parte de tensioactivos. La mejora de la quimioluminiscencia producida en las reacciones catalizadas por peroxidasa usando tensioactivos poliméricos y monoméricos se conoce en la técnica. La mejora puede tener lugar afectando al resultado de una o más etapas, por ejemplo, aumentando el rendimiento cuántico de fluorescencia del emisor, aumentando el porcentaje de moléculas de producto generadas en el estado excitado, aumentando la fracción de moléculas que experimentan la reacción quimioluminiscente a través de la inhibición de las reacciones secundarias que compiten o favoreciendo la acción del catalizador de enzima. No existe un patrón claro o evidente que se refiera al efecto de los tensioactivos poliméricos y monoméricos sobre las reacciones quimioluminiscentes. Es imposible predecir qué compuestos de tensioactivos, si es que existen, pueden mejorar la quimioluminiscencia de un proceso particular y únicamente se puede determinar a partir de experimentación importante.

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

5 La solicitud de patente japonesa publicada N°. JP 06.242.111 y la publicación (R. Iwata, et al., Anal. Biochem., 231, 170-4 (1995)) divulgan el uso de un tensioactivo aniónico y leche desnatada en la peroxidación quimioluminiscente de luminol hasta una emisión de fondo menor o mejora de la señal/ruido.

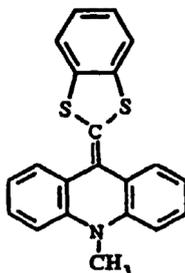
10 Ninguna de las referencias anteriores divulga la oxidación quimioluminiscente de los presentes compuestos por parte de una peroxidasa o la mejora de la quimioluminiscencia con tensioactivos.

15 e. Ensayo usando HRP. Se ha comprobado ampliamente el uso de la enzima de peroxidasa de rábano en inmunoensayos y en ensayos de hidridación de ADN con detección quimioluminiscente usando luminol o isoluminol como sustrato. Se encuentran disponibles comercialmente estuches que usan conjugados de HRP y detección quimioluminiscente con luminol mejorada. Los ensayos con peroxidasa quimioluminiscentes también se divulgan en las patentes de EE.UU. 5.491.072, 5.523.212 y 5.593.845 anteriormente mencionadas. No se divulga referencia alguna al ensayos de peroxidasa quimioluminiscentes que usen los presentes compuestos como sustratos.

20 f. Nuevos sustratos de peroxidasa quimioluminiscentes. Se describió una nueva clase de sustratos de peroxidasa quimioluminiscentes por parte de los solicitantes en su anterior patente de EE.UU. 5.922.558 y en la solicitud de patente publicada PCT N°. WO99/14220.

25 Mientras que la divulgación de estas publicaciones describe una clase de compuestos heterocíclicos genérica de los compuestos de la presente invención, de manera inesperada los presentes compuestos resultan superiores a la hora de producir luz a partir de la reacción con una enzima peroxidasa y una fuente de peróxido.

30 g. Benzoditifulvalenos. Se ha descrito la síntesis de benzoditifulvaleno que tiene la estructura anterior. (K. Akiba, K. Ishikawa, N. Inamoto, Synthesis, 12, 861-2 (1977)). No se conoce información sobre su capacidad para funcionar como sustrato de peroxidasa quimioluminiscente.



35 Akiba et al 1978 ("síntesis de 1,4-ditifulvenos y 1,4-ditifulvalenos de olefinación con carbonilo que usa 2-dimetoxi-fosfinil-1,3-benzoditiol" Bulletin of the chemical society of Japan, vol 51, n°. 9, p 2674-2683) divulga determinados compuestos que presentan una estructura similar a algunos de los compuestos de la invención, pero que carecen de al menos un grupo z que confiere solubilidad en agua.

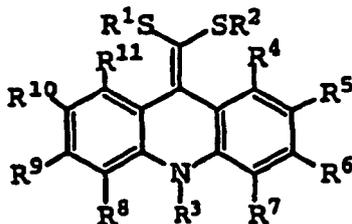
40 El documento WO 99/14220A se refiere a compuestos para generar quimioluminiscencia con una peroxidasa.

El documento WO 99/14358A se refiere a composiciones quimioluminiscentes y a métodos.

Resumen de la invención

45 Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones mejoradas que contienen compuestos que reaccionan con una peroxidasa y un peróxido para proporcionar quimioluminiscencia y para la detección de peroxidasa.

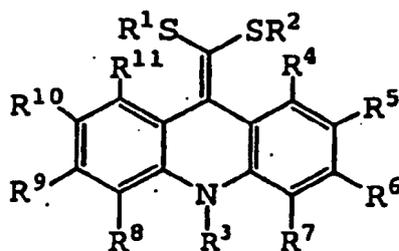
50 Es un objeto particular de la presente invención proporcionar compuestos mejorados y composiciones que los contienen en los que los compuestos mejorados presentan la fórmula:



5 que contienen un doble enlace carbono-carbono sustituido en un término del doble enlace por dos átomos de azufre, cada uno de ellos unido a otro grupo R¹ ó R² y el otro término del doble enlace que forma parte de un sistema de anillo heterocíclico policíclico que contiene un átomo de nitrógeno.

10 Preferentemente, las composiciones que contienen los compuestos de la invención incorporan compuestos mejoradores para favorecer la quimioluminiscencia producida sobre la reacción de los compuestos de la presente invención con una peroxidasa y para mejorar la utilidad analítica de la invención.

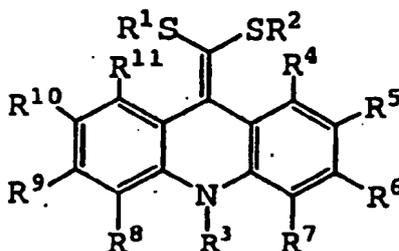
Por consiguiente, la presente invención proporciona, un compuesto de fórmula:



15 en la que R¹ y R² se escogen de forma independiente entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1-20 átomos de carbono, cada uno de R⁴ a R¹¹ es de manera independiente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos de carbono que se escogen entre C, H, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno, y R³ se escoge entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido.

20

También se proporciona un compuesto de fórmula:



25 en la que R¹ y R² están unidos por un anillo que comprende de cinco a treinta átomos, cada uno de R⁴ a R¹¹ es de manera independiente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos de carbono que se escogen entre C, H, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno, y R³ se escoge entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, y en la que el compuesto está sustituido con al menos un grupo Z que confiere solubilidad en agua.

30

También se describen métodos para generar de forma rápida quimioluminiscencia tras la reacción con una peroxidasa y un peróxido que emplea los presentes compuestos y composiciones.

35 También se describen composiciones quimioluminiscentes y métodos para su uso en la detección de peroxidasa y conjugados en inmunoensayos, ensayos con sonda de ácido nucleico, ensayos de inmunotransferencia, ensayo de Southern y otros ensayos por medio de métodos conocidos de forma general que emplean marcadores enzimáticos para la detección de analitos. De este modo, los ensayos resulta útiles para detectar analitos en dichos ensayos

mediante la detección de la peroxidasa o el conjugado y relacionando la quimioluminiscencia producido de esta forma con la presencia o la cantidad de analito.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es una gráfica que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia a 1,5 min emitida por 100 μ l de un reactivo descrito en el Ejemplo 7 que contiene compuesto 14, operado a temperatura ambiente. Se inicia la quimioluminiscencia por medio de la adición de 100 μ l del reactivo sobre 10 μ l de las disoluciones de HEP que contienen entre $1,4 \times 10^{-16}$ y $1,4 \times 10^{-20}$ moles de enzima en los pocillos de una microplaca blanca. El término S-B se refiere a la señal de quimioluminiscencia (S) en Unidades de Luz Relativa (RLU) en presencia de HRP corregida la quimioluminiscencia de fondo (B) en ausencia de HRP. A modo de comparación, también se muestra la relación entre S-B y la cantidad de HRP para el compuesto de referencia 1 medida a 15 min.

15 La Figura 2 es una gráfica que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia a 1,5 min emitida por 100 μ l de un reactivo descrito en el Ejemplo 8 que contiene el compuesto 27, operado a temperatura ambiente. A modo de comparación, también se muestra la relación entre S-B y la cantidad de HRP para el compuesto de referencia 1 medida a 15 min.

20 La Figura 3 es una gráfica que muestra el perfil de tiempo de quimioluminiscencia que resulta de la reacción de $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP a 25 °C con 100 μ l del reactivo que contiene el compuesto 26 descrito en el Ejemplo 1. El perfil de tiempo relativo de quimioluminiscencia demuestra que existe una generación de quimioluminiscencia más rápida que con el compuesto de estructura similar designado Ref 2.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el perfil de tiempo de quimioluminiscencia que resulta de la reacción de $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP a 25 °C con 100 μ l del reactivo que contiene el compuesto 27 descrito en el Ejemplo 12.

25 La Figura 5 es una imagen de películas de rayos-X de un ensayo de inmunotransferencia de β -galactosidasa por medio de un anticuerpo marcado con HRP sobre una membrana de PVDF con composiciones de reactivo quimioluminiscente. Las diluciones de β -galactosidasa que contenían 5000, 1000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, de proteína se detectaron bien con un reactivo de la invención que contenía compuesto 1 o, a modo de comparación, con un reactivo que contenía el compuesto Ref. 1 como se describe en la patente de EE.UU. 5.922.558. Se expusieron las membranas a película de rayos-X durante 5 s, después a una incubación de 11 min en los respectivos reactivos de detección.

30 La Figura 6 muestra imágenes de película de rayos-X para ensayos de inmunotransferencia de β -galactosidasa por medio de un anticuerpo marcado con HRP sobre una membrana de PVDF con composiciones de reactivo quimioluminiscente. Las diluciones de β -galactosidasa que contenían 5000, 1000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, de proteína se detectaron bien con un reactivo de la invención que contenía el compuesto 27 o bien con el compuesto 37.

35 La Figura 7 muestra imágenes de películas de rayos-X de un ensayo de inmunotransferencia de β -galactosidasa por medio de un anticuerpo marcado con HRP sobre una membrana de nitrocelulosa con una composición de reactivo quimioluminiscente que contiene el compuesto 46. Las diluciones de β -galactosidasa que contenían 5000, 1000, 180, 30 y 5 pg, respectivamente, de proteína se detectaron fácilmente durante un período de dos horas como se ha mostrado.

40 La Figura 8 es una gráfica que relaciona la cantidad de HRP con la intensidad de quimioluminiscencia emitida por 100 μ l de un reactivo descrito en el Ejemplo 22 que contiene bien el compuesto 52 o bien el compuesto 53 operado a temperatura ambiente.

45 Descripción de las realizaciones preferidas

Definiciones

50 Alquilo – un grupo de hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada que contiene de 1-20 carbonos. Según se emplea en el presente documento, alquilo inferior se refiere a aquellos grupos alquilo que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

55 Alquileo – un grupo de cadena alquílica divalente.

Alqueno – un grupo de hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada que contiene al menos un doble enlace C-C y que contiene 2-20 carbonos. Según se usa en el presente documento, alqueno inferior se refiere a aquellos grupos alqueno que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

60 Alquino – un grupo de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene al menos un triple enlace C-C y que contiene 2-20 carbonos. Según se usa en el presente documento, alquino inferior se refiere a aquellos grupos alquino que contienen hasta aproximadamente 8 carbonos.

65 Analito – cualquier sustancia cuya presencia o cantidad se mide en una muestra mediante un ensayo. Los analitos incluyen moléculas orgánicas y biológicas para las cuales existe un sitio de enlace específico que tiene una afinidad de enlace específica. Analitos ejemplares incluyen, sin limitación, ADN de hebra sencilla o doble, ARN, complejos de

ADN-ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, híbridos anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Otros analitos ejemplares también incluyen enzimas oxidasa y enzimas peroxidasa.

- 5 Arilo – grupo que contiene un anillo aromático que contiene de 1 a 5 anillos aromáticos carbocíclicos, que pueden estar sustituidos con 1 o más sustituyentes distintos de H.

Halógeno – átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.

- 10 Heteroalquilo – un grupo de cadena alquílica monovalente en el que al menos uno de los átomos de carbono no terminales es sustituido por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre.

Heteroalquilenos – un grupo de cadena alquílica divalente en el que al menos uno de los átomos de carbono no terminales está sustituido por un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre.

- 15 Luminiscente – capaz de emitir luz cuando se excita hasta un estado electrónico excitado. La luz puede ser emitida en forma de fluorescencia cuando vuelve desde un estado excitado de singlete o en forma de fosforescencia cuando vuelve desde un estado excitado de triplete.

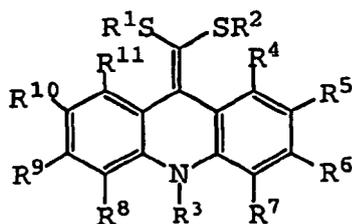
- 20 Peróxido – un compuesto que contiene un enlace O-O, preferentemente agua oxigenada o un complejo de agua oxigenada tal como peróxido de urea, perborato o percarbonato.

- 25 Muestra – un fluido que contiene o que se sospecha que contiene uno o más analitos objeto de ensayo. Las muestras típicas que se analizan por medio de un método de reacción quimioluminiscente son muestras biológicas que incluyen fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, orina, semen, saliva, lisatos celulares, extractos tisulares y similares. Otros tipos de muestras incluyen muestras de alimentos y muestras ambientales tales como suelo o agua.

- 30 Par de enlace específico – dos sustancias que pueden exhibir una afinidad de enlace mutua. Ejemplos incluyen antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o anticuerpo-anticuerpo, oligonucleótidos complementarios o polinucleótidos, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormona-receptor, lectina-carbohidrato, IgG-proteína A, ácido nucleico-ácido nucleico que une una proteína y ácido nucleico-anticuerpo anti-ácido nucleico.

- 35 Sustituido – se refiere a la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno sobre un grupo por un grupo no hidrogenado. Debe notarse que en las referencias a grupos sustituidos se entiende que pueden existir múltiples puntos de sustitución, a menos que se especifique claramente lo contrario.

- 40 Se ha descubierto que los compuestos de fórmula I siguiente reaccionan con un peróxido y una peroxidasa para generar quimioluminiscencia con propiedades superiores no esperadas. Los compuestos de ceteno ditioacetil de la presente invención presentan la fórmula I:

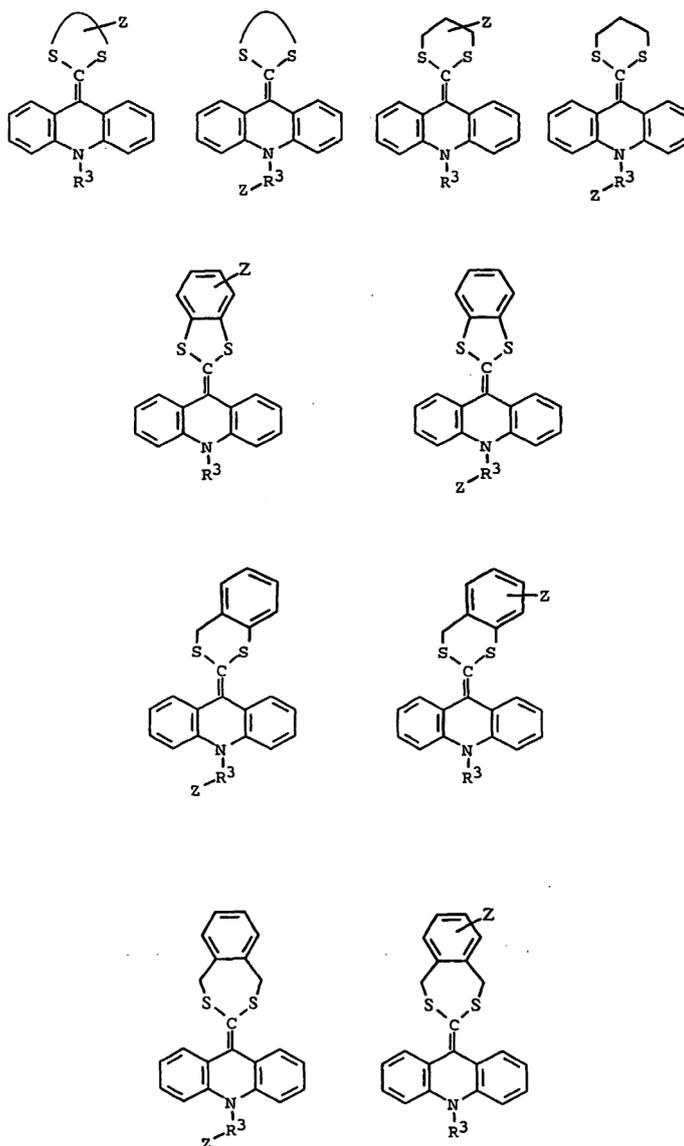


I

- 45 en la que R¹ y R² son cada uno grupos orgánicos que contiene de 1 a aproximadamente 50 átomos no hidrogenados además del número necesario de átomos H requerido para satisfacer las valencias de los átomos del grupo y en la que R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo. Los grupos R¹ y R² pueden contener de 1 a aproximadamente 50 átomos no hidrogenados que se escogen entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno pero más preferentemente de 1 a aproximadamente 20 de tales átomos. Grupos preferidos para R¹ y R² incluyen grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. Los grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido son más preferidos. Se pueden incorporar grupos sustituyentes diferentes de átomos de H, tales como grupos iónicos o grupos polares, en varios números y posiciones escogidas sobre la cadena carbonada o anillo con el fin de modificar las propiedades del compuesto o para proporcionar la conveniencia de la síntesis. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, velocidad de reacción con la enzima, intensidad máxima de emisión de luz, duración de la emisión de luz, longitud de onda de la emisión de luz, solubilidad en el medio de reacción. Grupos preferidos que confieren solubilidad en agua son grupos de sal de sulfonato –SO₃⁻, grupos de sal

de sulfato $-\text{OSO}_3^-$, grupos de sal de fosfonato $-\text{PO}_3^-$, grupos de sal de fosfato OPO_3^{2-} , grupos de sal de carboxilato $-\text{COO}^-$ y grupos de sal de amonio $-\text{NR}_3^+$ y grupos de sal de fosonio $-\text{PR}_3^+$. También se pueden incluir uno o más grupos que permiten el acoplamiento covalente a otra molécula tal como un socio de enlace específico, en forma de sustituyentes sobre R^1 y R^2 . Sustituyentes específicos ejemplares incluyen, sin limitación, grupos alcoxi, ariloxi, hidroxilo, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboxialquilo, carboxamida, ciano y sulfonato.

5 Cuando R^1 y R^2 se unen para formar un anillo, preferentemente el anillo es de 5 a 30 átomos de carbono y está formado por átomos de carbono y/o oxígeno adicionales que se escogen entre cadenas de alquileo, cadenas de heteroalquileo y cadenas insaturadas que contienen enlaces dobles. Los átomos de carbono de la cadena pueden estar sustituidos por átomos no hidrogenados como se ha descrito anteriormente en relación con los grupos R^1 y R^2 .
 10 Tamaños de anillo preferidos son de cinco a siete átomos.



15 En una realización preferida, R^1 y R^2 están unidos para completar un anillo de seis miembros que se encuentra sustituido, sobre el anillo, con al menos un grupo Z que confiere solubilidad en agua como se ha descrito anteriormente. En otra realización, el grupo Z se encuentra sin embargo unido al grupo R^3 . El anillo formado por la
 20 unión de R^1 y R^2 también puede ser un anillo de cinco a siete miembros condensado con un segundo anillo tal como un anillo benzo-condensado. De igual forma, se prefiere que al menos un grupo Z que confiere solubilidad en agua se encuentre sustituido en uno de los anillos condensados o sobre el grupo R^3 . Anteriormente, se han mostrado

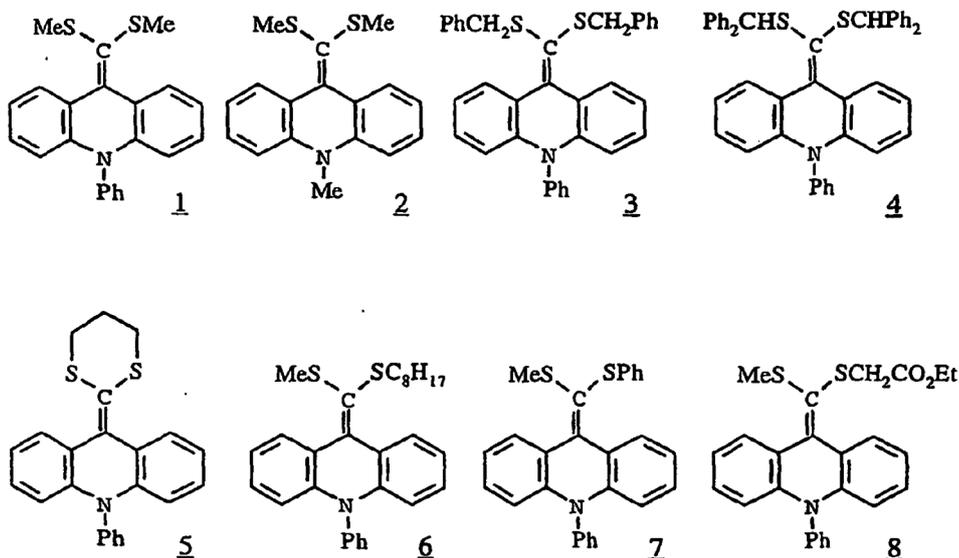
estructuras ejemplares.

En los presentes compuestos, el grupo R^3 es un grupo orgánico que contiene de 1 a 50 átomos no hidrogenados que se escogen entre C, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno además del número necesario de átomos de H requeridos para satisfacer las valencias de los átomos del grupo. Más preferentemente, R^3 contiene de 1 a 20 átomos no hidrogenados. Preferentemente, el grupo orgánico se escoge entre el grupo que consiste en grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. Grupos más preferidos para R^3 incluyen grupos alquilo C_1 - C_4 sustituidos o no sustituidos, grupos naftilo o fenilo sustituidos o no sustituidos y grupos bencilo sustituidos o no sustituidos. Cuando están sustituidos, sustituyentes ejemplares 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 al menos un grupo que confiere solubilidad en agua.

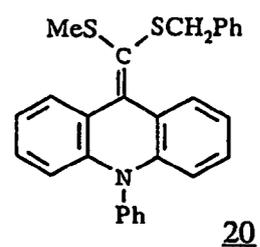
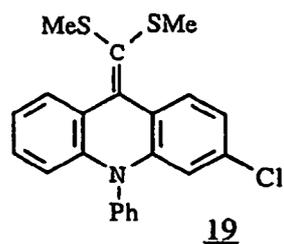
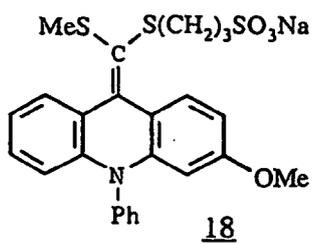
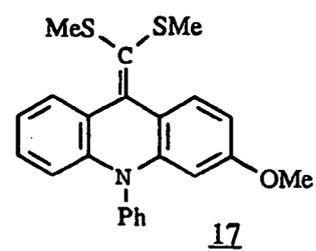
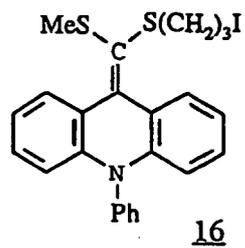
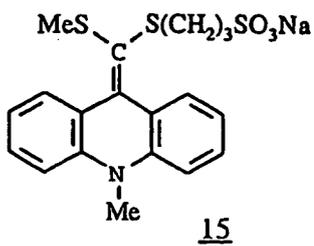
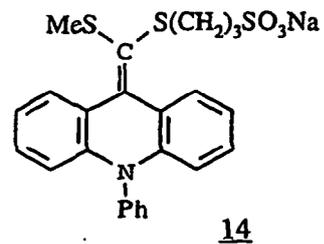
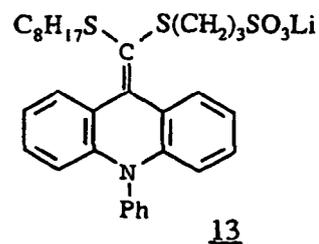
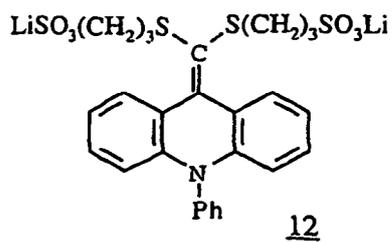
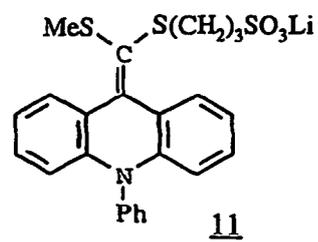
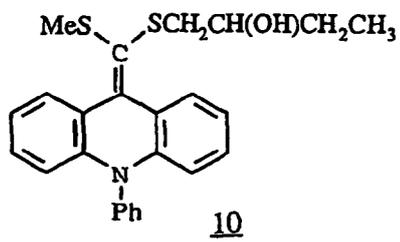
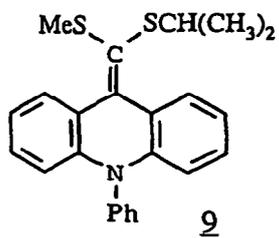
Se pueden incorporar grupos sustituyentes en varias cantidades y en el anillo escogido o en las posiciones de cadena del anillo heterocíclico con el fin de modificar las propiedades del compuesto o para proporcionar la conveniencia de síntesis del compuesto final. Dichas propiedades incluyen, sin limitación, rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, velocidad de reacción con la enzima, intensidad máxima de luz, duración de la emisión de luz, longitud de onda de la emisión de luz y solubilidad en el medio de reacción. Los 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 que se escogen entre C, H, N, O, S, P y átomos de halógeno la producción de luz y que pueden incluir, sin limitación, grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, halógeno, amino, grupos amino sustituidos, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano, sulfonato y fosfato. Es preferible que R^4 a R^{11} se escojan entre hidrógeno, halógeno, grupos alcoxi, amino o amino sustituido con uno o dos grupos alquilo o arilo. Un grupo preferido de compuestos presenta uno de R^5 , R^6 , R^{12} o R^9 como átomo de cloro y el otro de R^4 a R^{11} son átomos de hidrógeno.

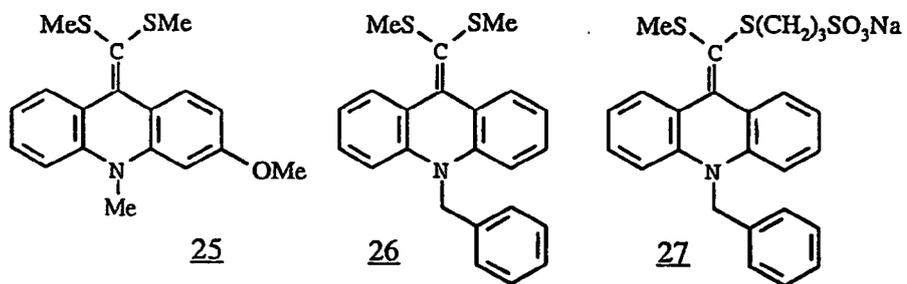
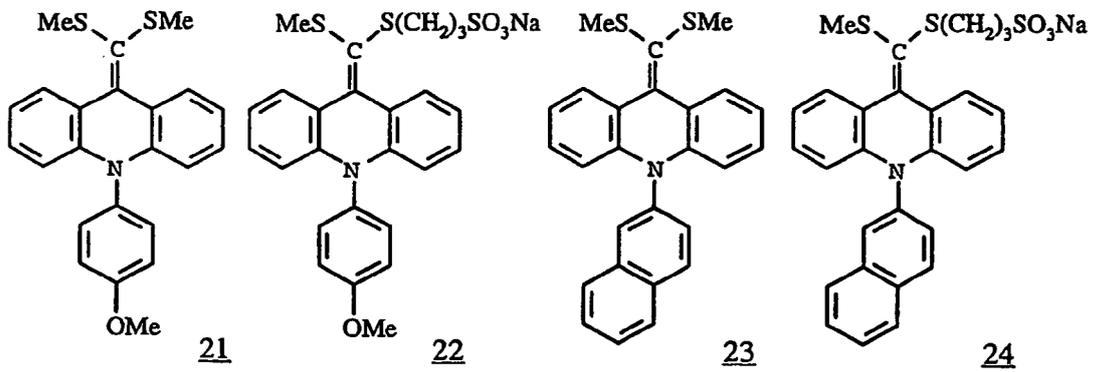
Se pueden unir pares de grupos adyacentes, es decir, R^4 y R^5 , ó R^5 y R^6 , o R^6 y R^7 , o R^8 y R^9 , o R^9 y R^{10} , o R^{10} y R^{11} como sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico que comprende al menos un anillo de 5 o 6 miembros que se encuentra condensado con el anillo que posee el doble enlace exocíclico. Preferentemente, cuando está presente un anillo condensado adicional, es un anillo de benceno condensado adicional lo que convierte al compuesto resultante en un derivado de benzacridano.

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

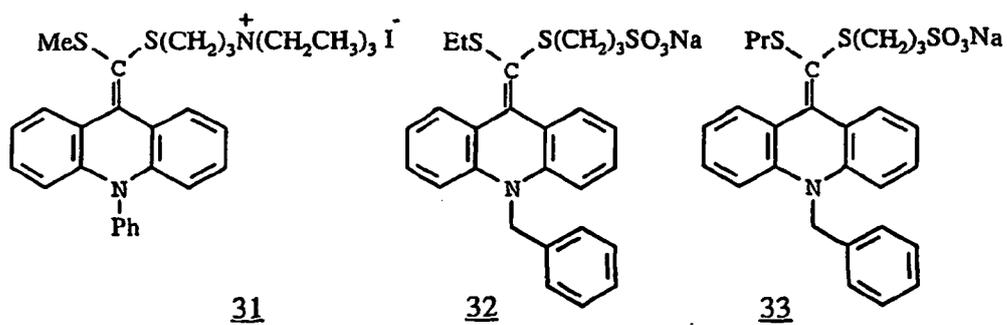
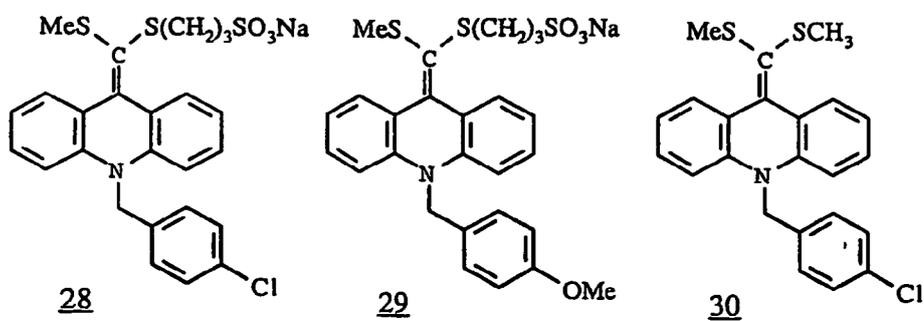


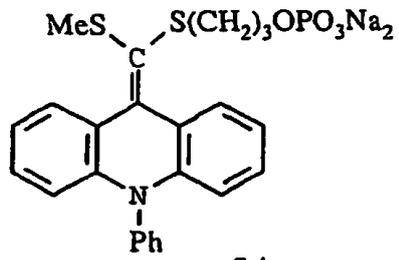
35



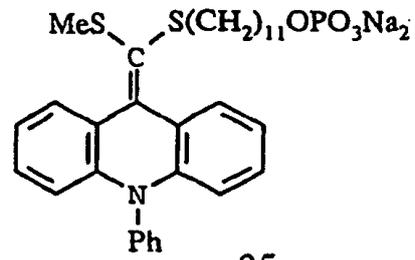


Lumigen PS-atto

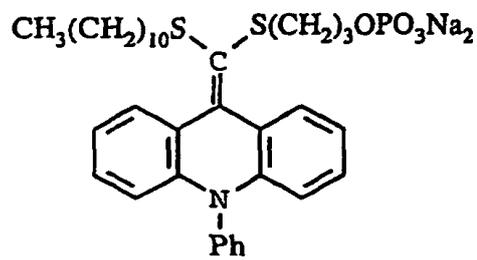




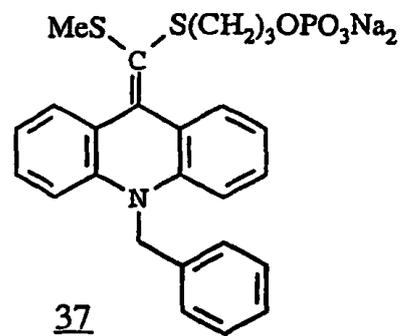
34



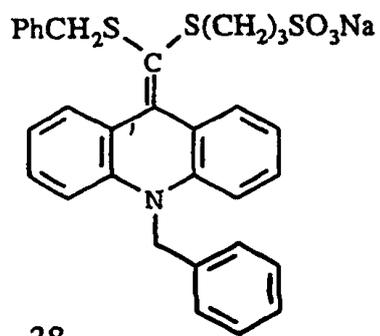
35



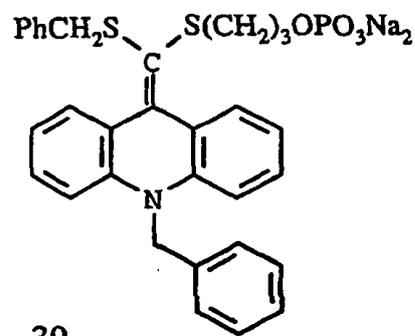
36



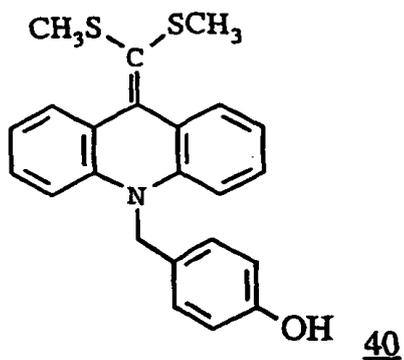
37



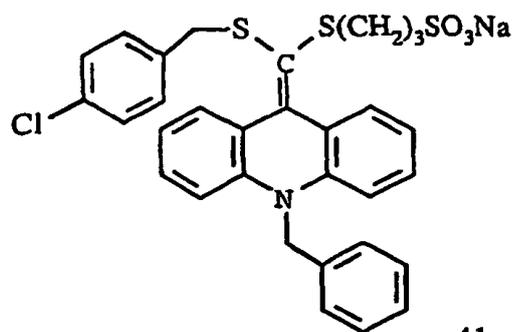
38



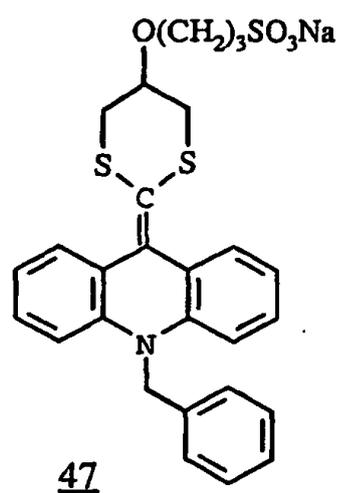
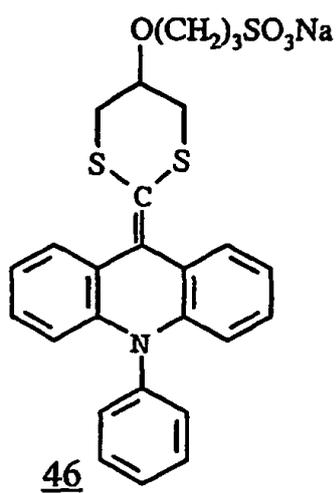
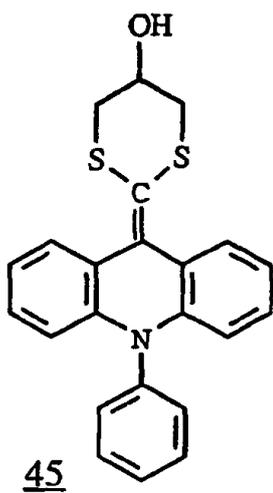
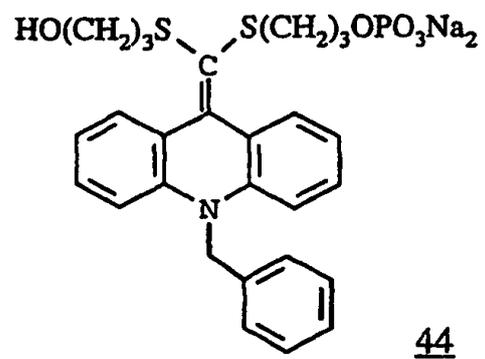
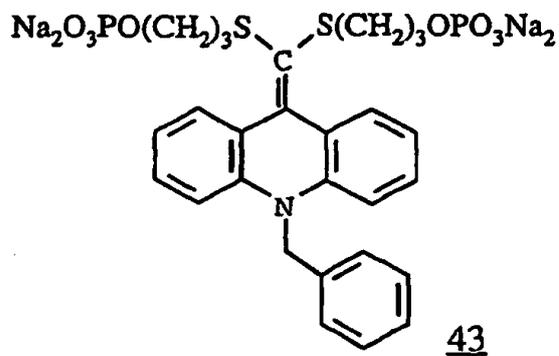
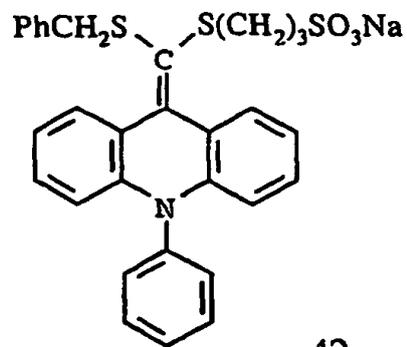
39



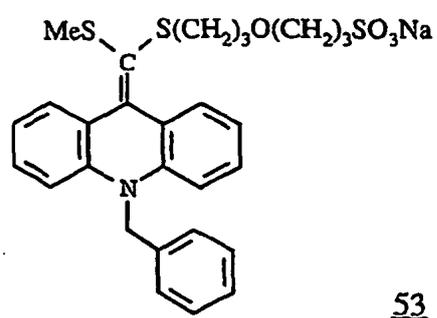
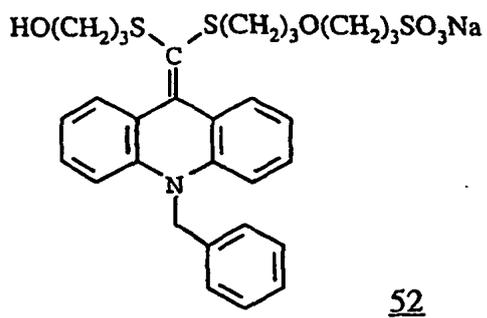
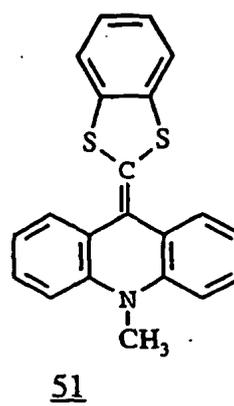
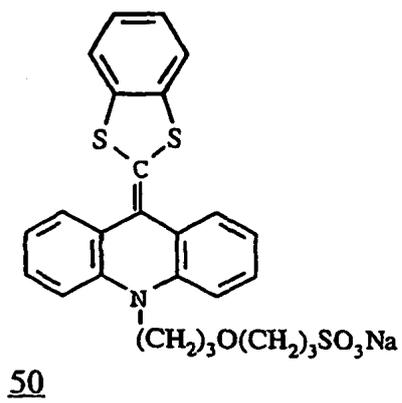
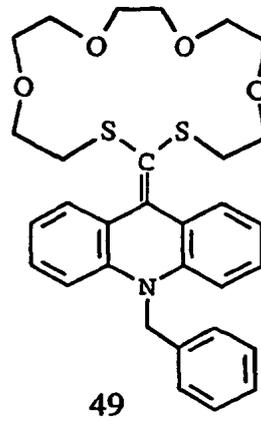
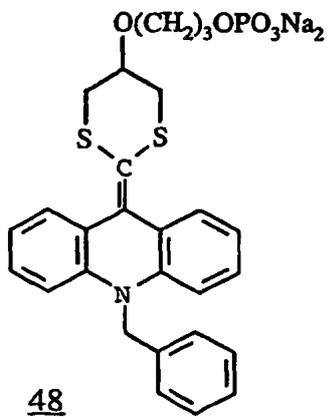
40

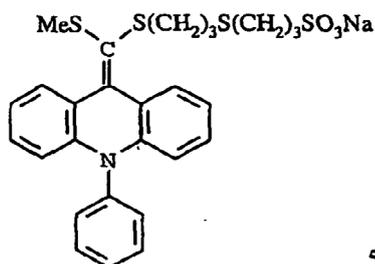
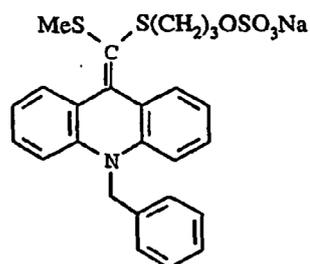
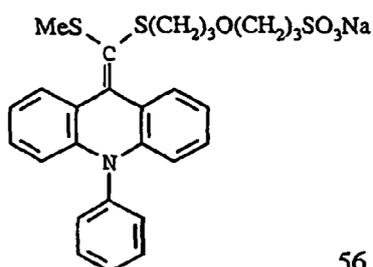


41



Lumigen TMA-6

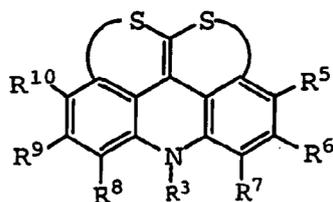
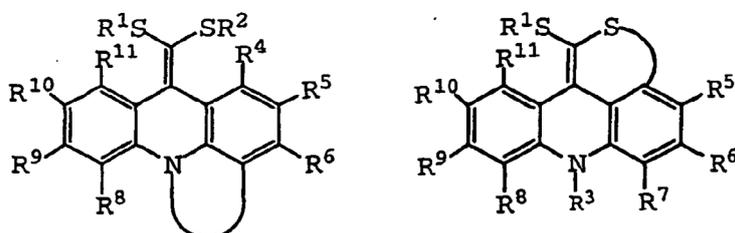


545556

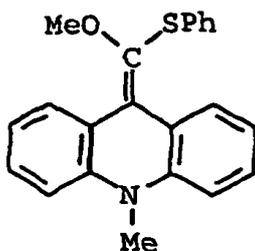
5 Combinaciones preferidas de grupos R^1 - R^3 incluyen compuestos en los que uno o ambos de R^1 y R^2 comprenden un grupo alquilo sustituido con un grupo de sal de sulfonato o un grupo de sal de fosfato y R^3 es fenilo, fenilo sustituido, bencilo o bencilo sustituido. Cuando únicamente está presente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

10 También se considera dentro del alcance de la presente clase de compuestos de la invención están realizaciones en las que R^1 o R^2 o ambos se unen hasta la posición más próxima, es decir, R^4 o R^{11} , del anillo de acridano junto al anillo adicional.

15 En otras realizaciones adicionales el átomo de nitrógeno se encuentra unido a cualquiera de las posiciones más próximas del anillo de acridano R^7 o R^8 para cerrar un anillo adicional de 5-7 miembros y R^1 y R^2 se escogen de manera independiente entre alquilo, alquilo sustituido, arilo sustituido, aralquilo y grupos aralquilo sustituidos de 1-20 átomos de carbono y se pueden unir para formar un anillo de 5 a 30 átomos o R^1 o R^2 o ambos se pueden unir a la posición más próxima del anillo de acridano para cerrar un anillo adicional. Estructuras ilustrativas incluyen:



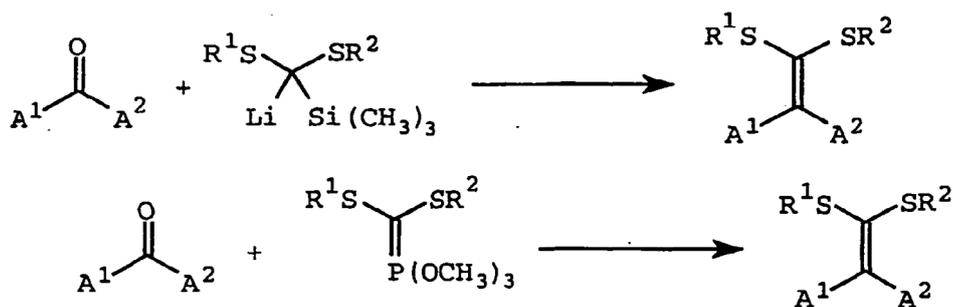
La reacción de los compuestos de ceteno ditioacetato de fórmula I, que incluyen los mostrados anteriormente, con peróxido y una peroxidasa genera quimioluminiscencia que alcanza rápidamente una intensidad muy elevada. La máxima emisión de luz se logra en un minuto o menos y permanece constante durante varios minutos. No se conocen ningún sustrato de peroxidasa quimioluminiscente que genere una quimioluminiscencia de alta intensidad de manera tan rápida. Este comportamiento cinético es inesperado y contrasta con el perfil de tiempo de quimioluminiscencia de compuestos relacionados estructuralmente divulgados en la patente de EE.UU. N.º. 5.922.558 anteriormente mencionada. Por ejemplo, se divulgó que un compuesto que tiene la fórmula:



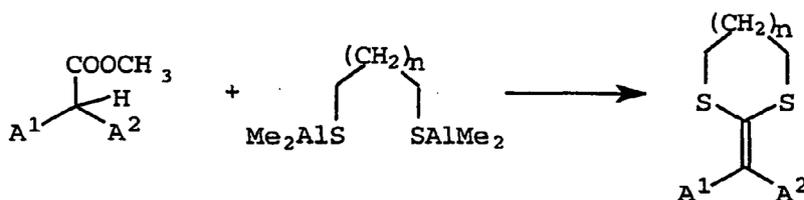
reaccionó con HRP para alcanzar la intensidad máxima de quimioluminiscencia en 7 min. La capacidad de los compuestos de la presente invención para alcanzar la máxima intensidad de luz estable de manera tan rápida los hace más apropiados que otros compuestos para los ensayos rápidos de alto rendimiento demandados en la actualidad.

De manera inesperada, los presentes compuestos exhiben una elevada estabilidad a lo largo de un intervalo de pH de al menos 5 hasta 10,5, permitiendo su formulación y uso tanto a valores de pH ácido como a valores de pH alcalino. Las disoluciones acuosas tamponadas de los compuestos de fórmula I exhiben una estabilidad prolongada durante el almacenamiento a temperatura ambiente y son estables de manera indefinida a 4 °C. Las disoluciones de los compuestos de fórmula I que transportan grupos que favorecen la solubilidad en agua se pueden preparar a sus concentraciones de trabajo y no requieren co-disolventes. Se han preparado formulaciones de reactivos mejoradas que permiten la detección sensible a pH 5-6, siendo el pH de actividad óptima de la peroxidasa de rábano.

Los métodos de preparación de los compuestos de fórmula I incluyen la adición nucleófila de un compuesto de litiosilano o un iluro de fósforo a un compuesto de carbonilo apropiado de acuerdo con los esquemas siguientes (F.A. Carey, A.S. Court, J. Org. Chem. 37, 1926-29 (1972)).

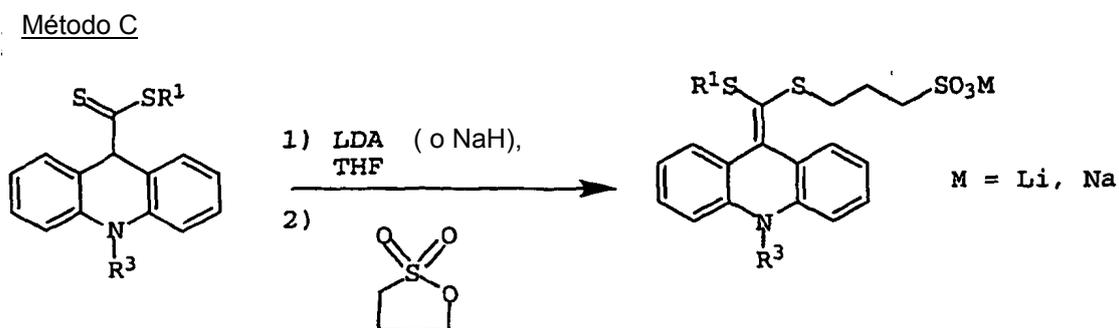
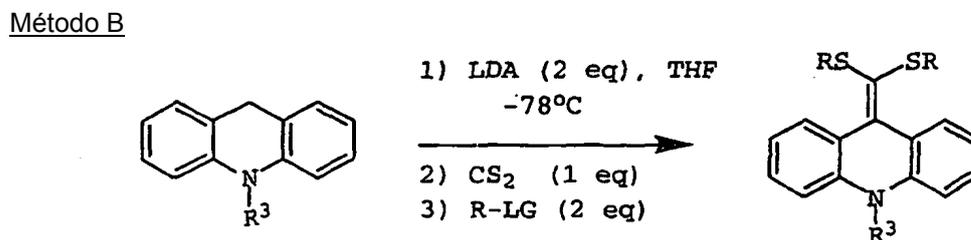
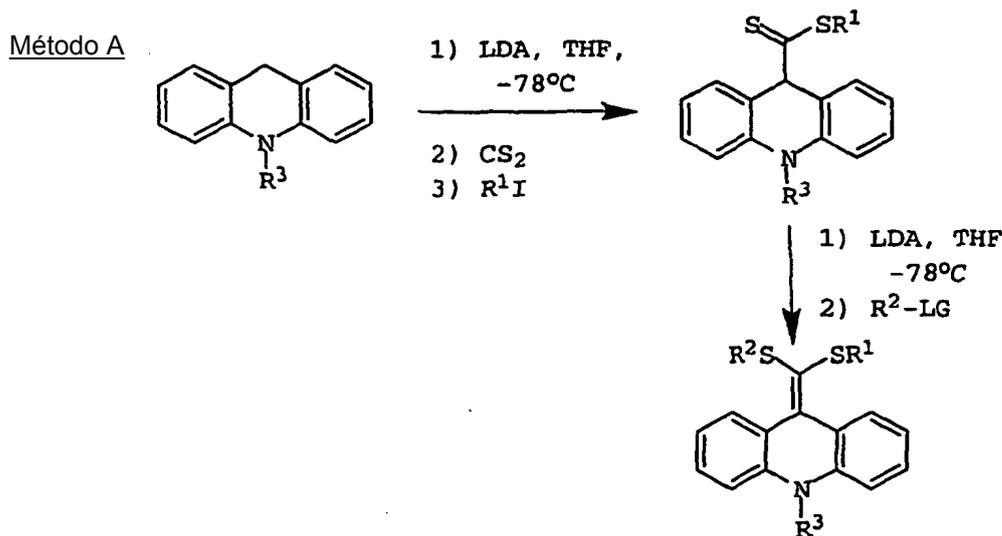


En otro método, se convierte un éster en un ceteno ditioacetato mediante reacción con un reactivo de bis(dialquilaluminio)-ditiol como se divulga en E.J. Corey y A.P. Kozikowski, Tetrahedron Lett., 925-8 (1975) y se muestra a continuación.

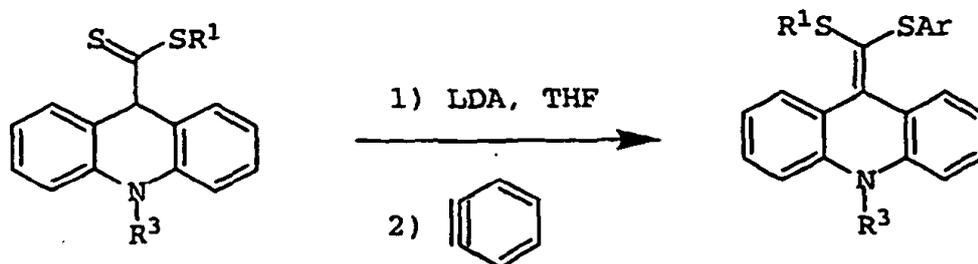


En otro método, se hace reaccionar un anión de un grupo metileno activo con CS₂ y se hace reaccionar el

5 ditiocarboxilato con un reactivo R^1 -LG que contiene el grupo R1 para formar un ditióéster. Un ejemplo de la última metodología se divulga en I. Shahak and Y. Sasson, Tetrahedron Lett., 4207-10 (1973). El ditióéster se convierte en el enolato y se hace reaccionar con un reactivo de fórmula R^2 -LG. Grupos salientes típicos incluyen halógenos, tales como cloruro, bromuro y yoduro, sulfonatos tales como metanosulfonato y p-toluensulfonato y trifluorometanosulfonato, carboxilatos tales como acetato y benzoato, particularmente cuando Y es un grupo acilo en cuyo caso X-LG sería un anhídrido de ácido; sulfatos tales como metosulfato, y otros grupos tales como grupos imidazol, triazol y tetrazol, maleimida y succinimidoxi.



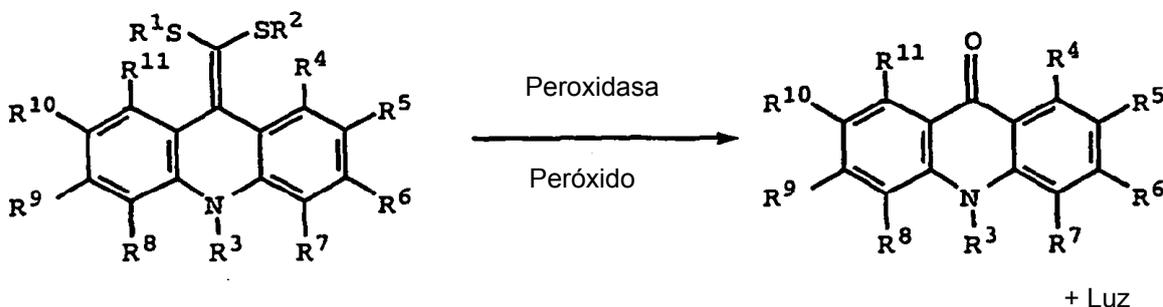
Método D



El método D anterior implica la generación de un intermedio de bencina como especie arilante reactiva. El intermedio de bencina se pueden genera *in situ* por ejemplo mediante 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)).

Otro método sintético comprende la reacción de un iluro de fósforo derivado de benzoditiol con un compuesto de acridona. De manera general, los procedimientos y las condiciones se definen en la referencia anteriormente mencionada de Akiba, et al, así como también en K. Isikawa, K. Akiba y N. Inamoto, Tetrahedron Lett., 41, 3695-3698 (1976).

Los compuestos y las composiciones de la presente invención resultan útiles en un método para producir quimioluminiscencia mediante reacción con una peroxidasa. La reacción del compuesto de la invención con una peroxidasa y un peróxido en una disolución acuosa tampón produce quimioluminiscencia visible fácilmente detectable. La intensidad de luz alcanza un nivel máximo de forma rápida a temperatura ambiente, típicamente en aproximadamente 1 minuto. De manera opcional, la reacción se lleva a cabo en presencia de un mejorador.



En un método preferido para producir quimioluminiscencia, el compuesto I se hace reaccionar con una peroxidasa, un peróxido y un mejorador en un tampón alcalino con un pH de entre aproximadamente 8 y 10 para producir una señal de quimioluminiscencia continua que comienza tras la reacción de la enzima y el compuesto I. Se puede incrementar la sensibilidad analítica mediante la incorporación de un tensioactivo no iónico como se describe con más detalle a continuación.

En un método preferido para producir luz a partir de la reacción del compuesto I con peroxidasa, la reacción se lleva a cabo a una temperatura entre 5 °C y 50 °C, preferentemente entre 20 °C y 40 °C, en una disolución acuosa tampón a un pH entre aproximadamente 5 y 10,5, preferentemente entre 7 y 10. El compuesto I se usa a una concentración entre 1 μM y 20 mM, preferentemente entre 10 μM y 5 mM. La enzima puede ser una peroxidasa libre o un conjugado de peroxidasa.

Típicamente los compuestos de la presente invención producen luz sobre un ancho de banda de emisión de 100-200 nm, que exhibe un intensidad máxima a longitudes de onda en el la región del ultravioleta próximo al visible del espectro electromagnético. Las longitudes de onda típicas de la intensidad máxima λ_{max} se encuentran en el intervalo de 350-500 nm. Se contempla que los compuestos de fórmula I que transportan un fluoróforo unido covalentemente experimentan transferencia de energía intramolecular que da lugar a la emisión a longitudes de onda más elevadas desde el estado excitado del fluoróforo.

Se puede usar más que un compuesto de fórmula I de manera concurrente en un método para producir luz mediante la acción de una peroxidasa. En algunos casos, puede resultar ventajoso hacer reaccionar de forma simultánea dos

o más compuestos de fórmula I con la peroxidasa. Cuando los dos o más compuestos presentan diferentes propiedades de quimioluminiscencia y propiedades físicas, la combinación de los dos puede resultar deseable para producir una reacción de emisión de luz con características que no se pueden lograr de forma sencilla a través del uso de un compuesto cualquiera. Ejemplos de propiedades físicas y luminiscentes que pueden diferir entre los compuestos de fórmula I incluyen el espectro de emisión, la duración de la emisión de luz, la renovación de la enzima, la tasa de incremento de emisión hasta el máximo, el carácter hidrófobo/hidrófilo y la solubilidad.

El componente de peróxido es cualquier peróxido o hidroperóxido de alquilo capaz de reaccionar con la peroxidasa. Peróxidos preferidos incluyen agua oxigenada, peróxido de urea y sales de perborato.

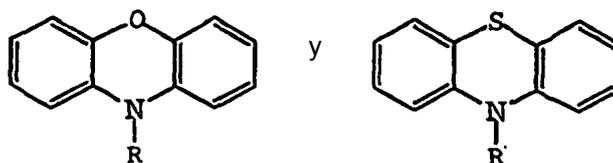
La peroxidasa que puede experimentar la reacción de quimioluminiscencia incluye lactoperoxidasa, microperoxidasa, mieloperoxidasa, haloperoxidasa, por ejemplo bromoperoxidasa de vanadio, peroxidasa de rábano, peroxidases fúngicas tales como peroxidasa de lignina y peroxidasa de *Arthromyces ramosus* y peroxidasa dependiente de Mn producida en hongos de necrosis blanca y peroxidasa de soja. Otros compuestos miméticos de peroxidasa que no son enzimas pero que poseen actividad similar a la de peroxidasa, que incluyen complejos de hierro y Mn-TPPS₄ (Y.-X. Ci, et al., *Mikrochem. J.*, 52, 257-62 (1995)), cuya actividad catalítica de la oxidación quimioluminiscente de luminol resulta conocida, se consideran de manera explícita dentro del alcance del significado de peroxidasa según se emplea en el presente documento.

Los conjugados o los complejos de peroxidasa y molécula biológica también se pueden usar en el método para producir quimioluminiscencia, con la única condición de que el conjugado muestre actividad peroxidasa. Moléculas biológicas que se pueden conjugar a una o más moléculas de peroxidasa incluyen ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, híbridos anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. También se pueden usar en los métodos de la presente invención complejos que incluyen o que incorporan una peroxidasa tales como liposomas, micelas, vesículas y polímeros que se encuentran funcionalizados para la unión a moléculas biológicas.

La incorporación de determinados compuestos mejoradores en la mezcla de reacción favorece la reactividad de la enzima. Incluidos entre estos mejoradores están compuestos fenólicos y aminas aromáticas conocidos por mejorar otras reacciones de peroxidasa y descritos en las referencias anteriormente mencionadas por Thorpe, Kricka y por Li, et al., y en las patentes de EE.UU. Nos. 5.171.668 y 5.206.149.

Los compuestos de ácido arilborónico sustituidos y no sustituidos y sus derivados de éster y de anhídrido, como se divulgan en la patente de EE.UU. 5.512.451 también son considerados como parte del alcance de los mejoradores útiles en la presente invención. Mejoradores preferidos incluyen, pero no se limitan a, p-fenilfenol, p-yodofenol, p-bromofenol, ácido p-hidroxicinámico, p-imidazolilfenol, acetaminofenol, 2,4-diclorofenol, 2-naftol y 6-bromo-2-naftol. También se pueden emplear mezclas de más que un mejorador de las clases mencionadas anteriormente.

Se ha comprobado que los mejoradores adicionales que resultan eficaces para mejorar la producción de quimioluminiscencia a partir de los compuestos de la presente invención son los derivados de fenoxazina y fenotiazina que presentan las fórmulas siguientes.



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

Los aditivos de tensioactivo no iónico en los presentes reactivos quimioluminiscentes resultan útiles con fines de solubilidad. La incorporación de tensioactivos no iónicos a las reacciones para producir quimioluminiscencia mediante el uso de una peroxidasa puede conducir a una mejora de la sensibilidad analítica con respecto a la peroxidasa. Tensioactivo no iónicos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo, poli(alquifenoles oxietilenados), poli(alcoholes oxietilenados), poli(éteres oxietilenados) y poli(ésteres de sorbitol oxietilenados).

Los tensioactivos catiónicos, que incluyen compuestos de sales de amonio cuaternario tales como CTAB, resultan ventajosos para su uso a la hora de incrementar el nivel de quimioluminiscencia emitida cuando determinados

compuestos de la presente invención se hacen reaccionar con una peroxidasa y con un peróxido. Por ejemplo, la intensidad de luz de la reacción del compuesto 11 mostrada por debajo de acuerdo con la presente invención se incrementó más que 20 veces cuando se incluyó CTAB en la mezcla de reacción.

5 La reacción de los compuestos de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo en una disolución tal como un tampón acuoso que puede estar en contacto con la superficie de un soporte sólido tal como una perla, tubo, membrana o placa de micropocillos revestida con peroxidasa. Tampones apropiados incluyen cualquiera de los tampones usados comúnmente capaces de mantener el pH en el intervalo de 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 método preferido para la puesta en práctica de la invención a este respecto viene determinado por los requisitos del uso particular que se pretenda.

15 La luz emitida por dicho método se puede detectar por cualquier medio conocido apropiado tal como un luminómetro, película de rayos-X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, un contador de centelleo, un actinómetro químico o visualmente. Cada medio de detección presenta diferente sensibilidad espectral. De manera óptima, el ojo humano es sensible a la luz verde, las cámaras CCD muestran una sensibilidad máxima frente a luz roja, las películas de rayos-X se encuentran disponibles con máxima respuesta bien a la luz W hasta azul o a la luz verde. La elección del dispositivo de detección viene determinada por la aplicación y las consideraciones en cuanto a coste, conveniencia y la posibilidad de que sea necesaria la creación de un registro permanente.

20 Un uso importante de los métodos de quimioluminiscencia descritos actualmente es para detectar la presencia o la cantidad de un analito en un procedimiento de ensayo por medio de una reacción de quimioluminiscencia. El método comprende las etapas de poner en contacto una muestra susceptible de contener el analito con el compuesto quimioluminiscente de la presente invención, una fuente de peróxido y una peroxidasa, detectando la luz producida en un método cualitativo y, si se desea la cuantificación, relacionando la cantidad de luz producida con la cantidad de analito. La relación entre la intensidad de luz y la cantidad de analito se pueden discernir fácilmente construyendo una curva de calibración con cantidades conocidas de analito. Típicamente, el compuesto I se usa en una concentración de aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 10^{-2} M, preferentemente entre aproximadamente 10^{-4} M y aproximadamente 10^{-3} M. Preferentemente, la peroxidasa se encuentra por debajo de aproximadamente 10^{-9} M cuando se detecta en disolución. Las muestras típicas que se analizan por el método de reacción quimioluminiscente son fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, orina, semen, saliva, CSF y similares.

35 Los analitos que se pueden someter a ensayo por medio de los métodos que emplean los compuestos de la invención incluyen peroxidases, en cuyo caso resulta necesario la adición de una peroxidasa adicional, inhibidores de peroxidases, y varias clases de moléculas orgánicas y biológicas que se pueden marcar con una peroxidasa o que se pueden detectar de manera específica por medio de socios de enlace específicos marcados con enzima. La enzima se puede incorporar directamente como el marcaje sobre el compuesto de enlace de analito. De manera alternativa, el compuesto de enlace del analito se pueden unir a al menos una sustancia de enlace específica marcada con enzima para el compuesto de enlace de analito. De manera alternativa, el compuesto de enlace de analito se puede marcar con al menos una segunda sustancia de enlace específica que posteriormente se une al socio de enlace marcado con enzima para la segunda sustancia de enlace específica.

45 Los compuestos de la presente invención pueden también encontrar uso en un método para detectar agua oxigenada en un procedimiento de ensayo por medio de una reacción quimioluminiscente con un compuesto de fórmula I y una enzima peroxidasa, en el que la cantidad de luz producida está relacionada con la presencia o con la cantidad de peroxidasa presente. Resultará evidente para los expertos en la técnica de los ensayos de quimioluminiscencia que se pueden usar dichos métodos para detectar enzimas oxidasa y enzimas deshidrogenasa. Estas enzimas generan agua oxigenada a través de la reducción de oxígeno y la oxidación de sus respectivos sustratos. El agua oxigenada producida de este modo se puede hacer reaccionar posteriormente, bien de manera concurrente a medida que es generada o bien en una etapa posterior, con el compuesto I de la presente invención y una peroxidasa para producir luz. Posteriormente, se relaciona la propiedad de la luz producida con la cantidad de enzima oxidasa o deshidrogenasa. Además, la enzima oxidasa o deshidrogenasa pueden estar presentes en forma de conjugado a una molécula biológica o a un miembro de un par de enlace específico en un ensayo para un analito.

55 La reacción de un compuesto de fórmula I con una peroxidasa para producir quimioluminiscencia constituye un método rápido y sensible para detectar la presencia o la cantidad de peroxidasa. Por tanto, se puede llevar a cabo el uso de dicho método con el fin de determinar la presencia o la cantidad de una peroxidasa en una muestra midiendo la cantidad o la intensidad de luz producido por medio de la reacción de la muestra con el compuesto de fórmula I. Dicha determinación puede encontrar su uso por ejemplo para detectar la actividad de peroxidasa de sangre de mamífero como evidencia en investigaciones forenses.

65 Una segunda área de aplicación para la medición quimioluminiscente de la actividad de peroxidasa es en la detección y medición de inhibidores de enzimas. Por ejemplo, los inhibidores de peroxidasa incluyen cianuro, sulfuro y concentraciones elevadas de agua oxigenada. La medición de la cantidad o de las características del inhibidor, tal como la constante de inhibición K_i , o semivida de inhibición, $t_{1/2}$ se lleva a cabo midiendo la actividad de la muestra que contiene enzima de 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 el compuesto quimioluminiscente se lleva a cabo en presencia y en ausencia del inhibidor y los resultados se comparan para determinar la presencia o cantidad del inhibidor. El efecto del inhibidor puede tener uno o más de cualquiera de tres efectos, un descenso de la intensidad de luz, una tasa menor de aumento de la intensidad de luz o un período de retardo antes de que comience la emisión de luz.

Dado que la reacción está catalizada por la peroxidasa, cantidades extremadamente pequeñas de la enzima son suficientes para producir una cantidad detectable de luz. Se han conseguido sensibilidades por debajo de 1 amol (1×10^{-18} mol). La capacidad para detectar cantidades tan pequeñas de peroxidasa hacen que la tecnología quimioluminiscente resulte apropiada para los análisis de muchos tipos de analitos que usan ensayos ligados a enzima que pueden detectar pequeñas cantidades de analito presente en baja abundancia en una muestra en una muestra de tamaño limitado. En este tipo de ensayo, la peroxidasa se conjuga con un miembro de un par de enlace específico. Un ejemplo son los inmunoensayos ligados a enzima quimioluminiscente, tal como ELISA. Varios formatos de ensayo y protocolos para llevar a cabo las etapas inmunoquímicas se conocen bien en la técnica e incluyen tanto ensayos competitivos como ensayos de tipo sandwich. El par de enlace marcado de manera detectable formado de este modo se pueden someter a ensayo con los compuestos y los métodos de la presente invención. Cuando el marcaje detectable es la enzima peroxidasa, es detectada de manera directa. Cuando el marcaje detectable es un miembro de otro par de enlace específico, por ejemplo, un hapteno, un conjugado de su socio de enlace con una peroxidasa, primero se hace reaccionar y posteriormente se detecta la peroxidasa de acuerdo con los presentes métodos. La medición se puede llevar a cabo con especies marcadas con enzima unidas a superficies sólidas o soportes conocidos en la técnica o libres en disolución o incluidos en el interior de un ensamblaje organizado tal como un liposoma, en cuyo caso se emplea un agente lítico para someter a lisis el liposoma y liberar la enzima detectable.

Otro uso ejemplar es la detección de proteínas por medio de la técnica de ensayo de inmunotransferencia. Se detecta una muestra que contiene un analito de proteína con un anticuerpo principal específico y un anticuerpo secundario marcado con enzima que reconoce y se une al anticuerpo principal. La enzima marcada se detecta por medio de quimioluminiscencia usando un compuesto de la presente invención como ensayo quimioluminiscente que usa un reactivo de la invención. Se considera que las variaciones de esta técnica tal como el uso de anticuerpos biotinilados y avidin-HRP se encuentran dentro del alcance de los ensayos que se pueden llevar a cabo usando los métodos de la invención.

Los compuestos de la presente invención también resultan útiles para la detección de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas de ácido nucleico marcadas con enzimas. Métodos ejemplares incluyen ensayos de hibridación en disolución, detección de ADN en ensayos de Southern, detección de ARN mediante ensayo de Southern, secuenciación de ADN, huella dactilar de ADN, hibridaciones de colonia y desplazamientos en placa, cuya realización resulta bien conocida por los expertos en la técnica. Para adaptar estos métodos con el fin de poder usarlos con los presentes compuestos, se emplea una peroxidasa como marcaje. La peroxidasa puede estar presente en forma de conjugado directo con un oligonucleótido de sonda u oligonucleótido de captura o se puede incorporar a través de medios de enlace indirectos usando métodos bien conocidos en la técnica.

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

También se describe una composición de reactivo para producir quimioluminiscencia mediante 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 de 0,01-10 mM y un peróxido a una concentración de 0,01-10 mM. De manera opcional, las composiciones además puede comprender al menos un mejorador en una cantidad eficaz para mejorar la quimioluminiscencia, preferentemente entre 0,001 y 10 mg/ml. De manera opcional, la composición también puede comprender un tensioactivo a una concentración entre 0,01 y 10 mg/ml.

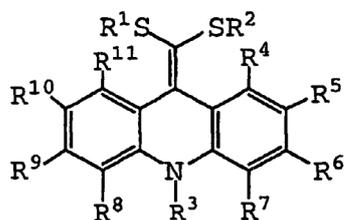
Una composición de reactivo preferida para producir quimioluminiscencia mediante reacción con una peroxidasa comprende un tampón acuoso con un pH entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9, un compuesto de fórmula I a una concentración de 0,01 – 10 mM, un peróxido a una concentración de 0,01-10 mM,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

Con el fin de describir completamente varios aspectos de la invención, se presentan los siguientes ejemplos, los cuales no limitan en modo alguno el alcance de la invención.

Ejemplos

1. Síntesis de ceten ditioacetales

Se prepararon los siguientes compuestos.



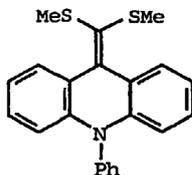
5

Compuesto	R ⁴⁻¹¹	R ³	R ¹	R ²
1	-	Ph	Me	Me
2	-	Me	Me	Me
3	-	Ph	Bencilo	Bencilo
4	-	Ph	CHPh ₂	CHPh ₂
5	-	Ph		-(CH ₂) ₃
6	-	Ph	Me	n-Octilo
7	-	Ph	Me	Ph
8	-	Ph	Me	CH ₂ COOEt
9	-	Ph	Me	Isopropilo
10	-	Ph	Me	2-Hidroxibutilo
11	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li
12	-	Ph	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li
13	-	Ph	n-Octilo	(CH ₂) ₃ SO ₃ Li
14	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
15	-	Me	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
16	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ I
17	6-OMe	Ph	Me	Me
18	6-OMe	Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
19	6-Cl	Ph	Me	Me
20	-	Ph	Me	CH ₂ Ph
21	-	An	Me	Me
22	-	An	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
23	-	Np	Me	Me
24	-	Np	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
25	6-OMe	Me	Me	Me
26	-	CH ₂ Ph	Me	Me
27	-	CH ₂ Ph	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
28	-	CH ₂ -p-C ₆ H ₄ Cl	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
29	-	CH ₂ -p-C ₆ H ₄ OMe	Me	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
30	-	CH-p-C ₆ H ₄ Cl	Me	Me
31	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ N ⁺ (Et) ₃ I ⁻
32	-	CH ₂ Ph	Et	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
33	-	CH ₂ Ph	Pr	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
34	-	Ph	Me	(CH ₂) ₃ OPO ₃ Na ₂
35	-	Ph	Me	(CH ₂) ₁₁ OPO ₃ Na ₂
36	-	Ph	C ₁₁ H ₂₃	(CH ₂) ₁₁ OPO ₃ Na ₂
37	-	CH ₂ Ph	Me	(CH ₂) ₁₁ OPO ₃ Na ₂
38	-	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₁₁ SO ₃ Na ₂
39	-	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₁₁ OPO ₃ Na ₂

Me = metilo, Et = etilo, Pr = n-propilo, Ph = fenilo, Np = 2-naftilo, An = p-anisilo (4-MeOPh), R⁴-R¹¹ son H a menos que se indique lo contrario. Los compuestos 3, 4 y 6 se obtienen como mezclas de isómeros de enlace dobles. Cada uno de estos compuestos genera quimioluminiscencia en la presente invención.

10 2. Preparación de precursores de N-acridano

15 Se prepararon los compuestos de N-fenilacridano, N-(4-metoxi)fenilacridano y N-(2-naftil)acridano mediante acoplamiento catalizado con paladio de acridano y un compuesto aromático halogenado, preferentemente un yoduro de arilo o bromuro de arilo. Por ejemplo, se puede usar bromobenceno, 4-bromoanisil y 2-bromonaftaleno en la reacción de acoplamiento. La etapa catalizada por paladio se llevó a cabo usando métodos conocidos de manera general en la bibliografía usando un catalizador de paladio formado a partir de una fosfina terciaria y un compuesto de paladio tal como PdCl₂ o Pd(OAc)₂.

3. Procedimientos sintéticos representativos1

5 Síntesis del compuesto 1. Se añadió N-fenilacridano (9,00 g, 35 mmol) en THF (50 ml) a una disolución de LDA (37 mmol) preparada a partir de diisopropilamina y n-butillitio en THF (150 ml) a -78 °C. Se agitó la mezcla a -78 °C durante 1 h. Posteriormente se añadió CS₂ (2,35 ml, 39 mmol). Trascorrida 1 h a -78 °C, se dejó calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiente (1 h). Se enfrió la mezcla de reacción hasta -78 °C de nuevo al añadir Mel (2,86 ml, 46 mmol). Tras la adición, se retiró el baño de hielo seco y se continuó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se evaporó la mezcla de reacción a vacío y se sometió el residuo a cromatografía en columna (hexanos/CH₂Cl₂ 7:1), dando lugar a 9,21 g de 9-ditiocarboxilato de N-fenilacridano en forma de cristal sólido de color amarillo. Rendimiento 76 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,54 (s, 3H), 6,02 (s, 1H), 6,37 (d, 2H), 7,07 (t, 2H), 7,35-7,43 (m, 4H), 7,53 (m, 1H), 7,64 (m, 2H).

15 Se añadió el tioéster (0,347 g, 1 mmol) en THF (5 ml) a una disolución de LDA (1,1 mmol) en THF (30 ml) a -78 °C. Se agitó la mezcla a -78 °C durante 1 h. Posteriormente se añadió Mel (0,10 ml, 1,6 mmol) por medio de una jeringa a -78 °C. Se agitó la mezcla resultante durante la noche a temperatura ambiente. Tras retirar el disolvente a vacío, se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice (hexanos/EtOAc 20:1), dando lugar a 0,317 g de Compuesto 1 en forma de sólido ligeramente amarillento (rendimiento de 88 %). ¹H RMN (CDCl₃): 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).

20 También se prepararon los compuestos 2, 6, 8, 9, 10, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 26 y 30 mediante un procedimiento análogo a partir de los correspondientes intermedios de ditiéster usando bien LDA o NaH como base.

25 Compuesto 2: Rendimiento de 80 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,29 (s, 6H), 3,48 (s, 3H), 7,01-7,09 (m, 4H), 7,30 (m, 2H), 7,82 (dd, 2H).

30 Compuesto 6: Rendimiento de 29 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H), 1,20 (a, 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: Rendimiento de 63 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,19 (t, 3H), 2,25 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 4,08 (c, 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).

35 Compuesto 9: Rendimiento de 83 %. ¹H RMN (CDCl₃): 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).

40 Compuesto 10: Rendimiento de 65 %, usando 1,2-epoxibutano como agente alquilante. ¹H RMN (CDCl₃): δ 0,86 (t, 3H), 1,38 (p, 2H), 1,74 (a, 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: Rendimiento de 96 %. ¹H RMN (CDCl₃): 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).

45 Compuesto 17: Rendimiento de 49 %. ¹H RMN (CDCl₃): 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: Rendimiento de 90 %. ¹H RMN (CDCl₃): 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).

50 Compuesto 20: Rendimiento de 86 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 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).

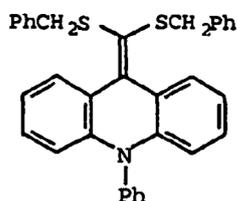
55 Compuesto 21: Rendimiento de 96 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,30 (s, 6H), 3,92 (s, 3H), 6,50 (d, 2H), 7,00-7,15 (m, 6H), 7,28 (d, 2H), 7,87 (dd, 2H).

Compuesto 23: Rendimiento de 84 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 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: Rendimiento de 94 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 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).

5 Compuesto 30: Rendimiento de 90 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 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).

10 Procedimiento alternativo para ditiocarboxilación. Se añadieron 67 ml de disolución de n-BuLi 2,5 M a una disolución de N-bencilacridano (43,8 g) en THF (800 ml) bajo argón a -78°C . Se agitó la mezcla a -78°C durante 3 horas, se retiró el baño de refrigeración y se continuó agitando durante otros 30 min. Se enfrió de nuevo la disolución hasta -78°C y se añadieron 10,65 ml de CS_2 . Trascurridas 1 h a -78°C , se dejó calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiente (1 h). Se añadió yoduro de metilo (29,71 g) y se continuó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente se evaporó la mezcla de reacción a vacío y se disolvió el residuo en CH_2Cl_2 . El paso de la disolución a través de un pequeño paquete de sílice y la evaporación del disolvente dieron lugar a un sólido de color naranja que se cristalizó a partir de acetato de etilo caliente (10 ml/g de sólido).



3

20 Síntesis del compuesto 3. Se añadió N-fenilacridano (1,285 g, 5,0 mmol) en THF (20 ml) a una disolución de LDA (11,0 mmol) en THF (60 ml) a -78°C . Se agitó la mezcla resultante a -78°C durante 1 h. Se añadió CS_2 (0,33 ml, 5,5 mmol). Trascurridos 30 min a -78°C se calentó lentamente la reacción hasta temperatura ambiente (1h) y se agitó durante 30 min. Se enfrió la reacción hasta -78°C cuando se añadió el bromuro de bencilo (1,67 ml, 14 mmol). Trascurridos 20 min a -78°C , se dejó calentar la reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Tras el desarrollo, la cromatografía sobre sílice dio lugar a 1,565 g de 3 (rendimiento de 61 %). ^1H RMN (CDCl_3): δ 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 forma similar.

30 Compuesto 4: Rendimiento de 26 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 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: Rendimiento de 16 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 2,28 (s, 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).

35 Se preparó el compuesto 5 de igual forma mediante alquilación del ditiocarboxilato correspondiente con 1,3-diyodopropano en THF con un rendimiento de 44 %. ^1H RMN (CDCl_3): 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).

40 Se prepararon los compuestos 11, 12, 14, 15, 18, 22, 24, 21, 28, 29, 32, 33 y 38, conteniendo cada uno de ellos uno o dos grupos de sal de ácido propanosulfónico, mediante alquilación del ditiocarboxilato o del éster de alquilo de ditiocarboxilato con propano sulfona.

45 Compuesto 11 (rendimiento 98 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 1,92 (p, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,67 (t, 2H), 2,81 (t, 2H), 6,41 (d, 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 (rendimiento 68 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

50 Compuesto 14 (rendimiento 53 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

55 Compuesto 15 (rendimiento 94 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

Compuesto 18 (rendimiento 84 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 1,93 (m, 2H), 2,26 (s, 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).

Compuesto 22 (rendimiento 90 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

5 Compuesto 24 (rendimiento 78 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

Compuesto 27 (rendimiento 83 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

10 Compuesto 28 (rendimiento 87 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

15 Compuesto 29 (rendimiento 91 %). ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

Compuesto 32. ^1H RMN (CD_3OD): δ 1,14 (t, 3H), 1,89 (p, 2H), 2,63 (t, 2H), 2,72 (c, 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).

20 Compuesto 33. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

Compuesto 38. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

25 Síntesis de compuestos 7. Se añadió 9-ditiocarboxilato de N-fenilacridano (0,347 g, 1,0 mmol) en THF (10 ml) a una disolución de LDA (2,5 mmol) en THF (30 ml). Tras 1 h a -78°C , se dejó calentar la reacción hasta -20°C y a continuación se añadió bromobenceno. Se dejó calentar lentamente la reacción después de la adición y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La retirada del disolvente a vacío seguido de la cromatografía (hexanos/EtoAc 20:1) dio lugar a 0,255 g de Compuesto 7 (rendimiento de 60 %). ^1H RMN (CDCl_3): δ 2,20 (s, 3H), 6,45 (d, 1H), 6,53 (d, 1H), 6,92 (t, 1H), 7,03-7,24 (m, 4H), 7,37-7,47 (m, 6H), 7,56 (m, 1H), 7,66 (m, 2H), 7,87-7,94 (m, 2H).

30 Síntesis del compuesto 13. Se convirtió 9-ditiocarboxilato de N-fenilacridano en tioéster de n-octilo mediante reacción con 1-yodoctano. Se añadió 9-ditiocarboxilato de N-fenilacridano (1,90 g, 4,26 mmol) en THF (20 ml) a una disolución de LDA (4,48 mmol) en THF (70 ml) a -78°C . Se agitó al mezcla resultante a -78°C durante 1 h. A continuación se añadió propanosultona (0,78 g, 6,39 mmol) en THF (10 ml). Tras 45 min a -78°C se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó más durante 3 h. La retirada del disolvente dio lugar a un residuo sólido que se disolvió en un volumen mínimo de CH_2Cl_2 y se precipitó con hexanos. Se repitió el procedimiento hasta que la disolución no mostró componente fluorescente sobre placa TLC. Tras secado a vacío, se obtuvieron 2,270 g de 13 en forma de polvo amarillento. Rendimiento 93 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 0,84 (t, 3H), 1,13-1,40 (m, 12H), 2,02 (c, 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).

35 Síntesis del compuesto 31. Se agitó el compuesto 16 (0,250 g, 0,49 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml) con trietilamina (9 ml) a temperatura ambiente durante 2,5 días. Se retiraron los volátiles a vacío. Se disolvió el residuo en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 y se precipitó con éter. Se repitió el procedimiento hasta que los lavados no mostraron componente fluorescente. Tras el secado a vacío, se obtuvieron 0,140 g de Compuesto 31 en forma de sólido amarillento. Rendimiento 47 %. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

40 Síntesis del compuesto 35. Se añadió NaH (0,460 g, suspensión 60 % en aceite mineral, 11,5 mmol) a una disolución de 9-ditiocarboxilato de N-fenilacridano (1,735 g, 5,00 mmol) en THF (80 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación se añadió bromoundecano-1-ol (1,633 g, 6,50 mmol) en THF (20 ml). Tras agitación durante la noche, se añadieron 4 ml de MeOH a la mezcla de reacción para descomponer el exceso de NaH. La retirada del disolvente a vacío dio un residuo que se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (hexano/EtoAc 4:1), dando el derivado de 11-hidroxiundecil ceten ditioacetil en forma de jarabe, 2,550 g, rendimiento de 98 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 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.

45 Síntesis del compuesto 35. Se añadió piridina (0,52 ml, 6,40 mmol) seguido de POCl_3 (0,60 ml, 6,40 mmol) a una disolución del compuesto preparado anteriormente (2,55 g, 4,92 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml) a 0°C . Se continuó la reacción a 0°C durante 1 h antes de retirar el baño de hielo para permitir que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente (30 min). A continuación se añadió 3-hidroxipropionitrilo (1,35 ml, 19,7 mmol) en piridina (3,18 ml, 39,4 mmol). Tras agitar durante la noche, se lavó la mezcla de reacción con agua en un embudo de decantación. Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se evaporó y se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice (EtoAc) para dar el derivado fosfato de bis(cianoetilo), 2,70 g, rendimiento de 79 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 1,19-1,50 (m, 16H), 1,71 (m, 2H), 2,31 (s,

60 Se añadió piridina (0,52 ml, 6,40 mmol) seguido de POCl_3 (0,60 ml, 6,40 mmol) a una disolución del compuesto preparado anteriormente (2,55 g, 4,92 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml) a 0°C . Se continuó la reacción a 0°C durante 1 h antes de retirar el baño de hielo para permitir que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente (30 min). A continuación se añadió 3-hidroxipropionitrilo (1,35 ml, 19,7 mmol) en piridina (3,18 ml, 39,4 mmol). Tras agitar durante la noche, se lavó la mezcla de reacción con agua en un embudo de decantación. Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se evaporó y se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice (EtoAc) para dar el derivado fosfato de bis(cianoetilo), 2,70 g, rendimiento de 79 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 1,19-1,50 (m, 16H), 1,71 (m, 2H), 2,31 (s,

65 Se añadió piridina (0,52 ml, 6,40 mmol) seguido de POCl_3 (0,60 ml, 6,40 mmol) a una disolución del compuesto preparado anteriormente (2,55 g, 4,92 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml) a 0°C . Se continuó la reacción a 0°C durante 1 h antes de retirar el baño de hielo para permitir que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente (30 min). A continuación se añadió 3-hidroxipropionitrilo (1,35 ml, 19,7 mmol) en piridina (3,18 ml, 39,4 mmol). Tras agitar durante la noche, se lavó la mezcla de reacción con agua en un embudo de decantación. Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se evaporó y se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice (EtoAc) para dar el derivado fosfato de bis(cianoetilo), 2,70 g, rendimiento de 79 %. ^1H RMN (CDCl_3): δ 1,19-1,50 (m, 16H), 1,71 (m, 2H), 2,31 (s,

3H), 2,70 (t, 2H), 2,79 (t, 4H), 4,13 (c, 2H), 4,38 (c, 4H), 6,45 (t, 2H), 7,05 (m, 4H), 7,35 (d, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,88 (dd, 1H), 7,94 (dd, 1H) ppm.

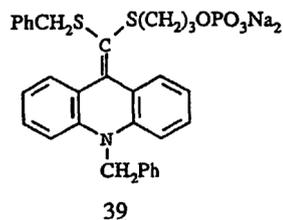
Se llevó a cabo la hidrólisis de los grupos protectores de cianoetilo mediante tratamiento de 2,70 g (3,84 mmol) del fosfato protegido con NaOH 1 M (7,68 ml, 7,69 mmol) en acetona (40 ml) durante la noche, dando 2,36 g del compuesto 35 (rendimiento de 96 %). $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 1,08-1,34 (m, 16H), 1,56 (m, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,64 (t, 2H), 3,79 (c, 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, 1H), 7,89 (d, 1H).

Se prepararon los compuestos 34, 36 y 37 de forma similar a 36, comenzando por el ditioéster de undecilo. **Compuesto 34.** $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 1,77 (p, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,85 (t, 2H), 3,79 (c, 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. $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 0,88 (t, 3H), 1,09-1,35 (m, 18H), 1,87 (p, 2H), 2,66 (t, 2H), 2,90 (t, 2H), 3,84 (c, 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, 1H), 7,95 (d, 1H).

Compuesto 37. $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 1,75 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,89 (t, 2H), 3,83 (c, 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



Se preparó el compuesto 39 por medio del siguiente proceso sintético. La reacción del anión de N-bencilacridano con CS_2 en THF a -78°C , dejando la reacción calentar lentamente hasta temperatura ambiente (1 h) seguido de la adición de bromuro de bencilo da lugar al tioéster de bencilo de N-bencilacridano. Se trata una disolución de este ditioéster en THF con NaH y se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente. A continuación se añade 3-bromopropan-1-ol (1,633 g, 6,50 mmol) y se lleva a cabo la reacción durante la noche. Se somete a fosforilación el ceteno ditioacetil formado de este modo de acuerdo con el proceso descrito en conexión con la síntesis del compuesto 35.

5. Mejora de la quimioluminiscencia de compuestos de ceteno ditioacetil

Se sometieron a ensayo varios mejoradores en un protocolo de ensayo que implicó la reacción de peroxidasa de rábano con una disolución del mejorador, peróxido, EDTA y bien el compuesto 1 o bien el compuesto 14, en un tampón que contenía Tween 20. Se determinó la intensidad pico de luz. Entre los mejoradores preferidos estuvieron 2-naftol, 6-bromo-2-naftol, ácido p-hidroxicinámico, 1,6-dibromo-2-naftol, 7-metoxi-2-naftol, 4-fenilfenol, sales de ácido 3-(N-fenotiacinil)propanosulfónico, sales de ácido 3-(N-fenoxazinil)propanosulfónico, sales de ácido 4-(N-fenoxazinil)butanosulfónico, sales de ácido 5-(N-fenoxazinil)pentanoico y N-metil-fenoxacina.

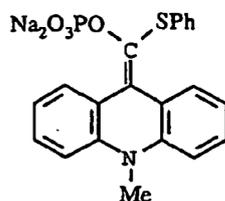
6. Detección quimioluminiscente de HRP con el Compuesto 1

Se sometieron a ensayo composiciones de reactivo que comprendían 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 compuesto 1 5×10^{-5} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de 100 μl con 10 μl de HRP dentro del intervalo de $1,4 \times 10^{20}$ moles. Se siguió la producción de luz tras la mezcla y se alcanzó una intensidad máxima en aproximadamente 1 min. El diagrama log-log de intensidad de quimioluminiscencia vs cantidad de enzima fue lineal a lo largo de todo el intervalo sometido a ensayo.

7. Detección quimioluminiscente de HRP con el Compuesto 14

Se sometieron a ensayo composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y compuesto 14 3×10^{-4} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de 100 μl con 10 μl de HRP dentro del intervalo de $1,4 \times 10^{-16}$ hasta $1,4 \times 10^{-20}$ moles. Se siguió la producción de luz tras la mezcla y se alcanzó una intensidad máxima en aproximadamente 1 min. La Figura 1 muestra la relación entre la intensidad de quimioluminiscencia y la cantidad de enzima detectada. A modo de comparación, también se muestra la relación

entre S-B y la cantidad de HRP para el compuesto de referencia 1 que tiene la fórmula:



Ref. 1

- 5 Se midieron los resultados para el compuesto de referencia 15 minutos después de la adición de 10 μ l de disoluciones de HRP que contienen entre $1,4 \times 10^{-15}$ y $1,4 \times 10^{-19}$ moles de enzima sobre 100 μ l del reactivo que comprendía 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.

10 8. Detección quimioluminiscente de HRP con el Compuesto 27

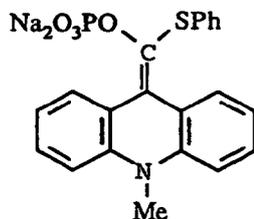
- 15 Se sometieron a ensayo composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y compuesto 27 3×10^{-4} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado alícuotas de 100 μ l con 10 μ l de HRP dentro del intervalo de $1,4 \times 10^{-16}$ hasta $1,4 \times 10^{-20}$ moles. Se siguió la producción de luz tras la mezcla y se alcanzó una intensidad máxima en aproximadamente 1 min. La Figura 2 muestra la relación entre la intensidad de quimioluminiscencia a 1,5 min y la cantidad de enzima detectada, junto con los resultados del compuesto de Ref. 1 a 15 min como se ha descrito anteriormente.

20 9. Comparación de la intensidad de señal

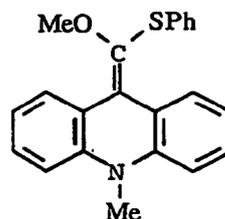
- 25 Se sometieron a ensayo las composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,01 M, pH 8, peróxido de urea 0,5 mM, p-fenilfenol 0,1 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,025 % y cada uno de los compuestos de la tabla siguiente 5×10^{-5} M, exceptuando el compuesto designado como Ref. 1, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100 μ l con $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP. La formulación de reactivo para Ref. 1 estaba formada por tampón tris 0,05 M, pH 8,6, peróxido de urea 0,25 mM, p-fenilfenol 0,05 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,0125% y Ref. 1 $3,3 \times 10^{-4}$ M. A modo de comparación, se proporcionan datos para los compuestos de referencia 1 y 2.

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

30



Ref. 1



Ref. 2

35 10. Comparación de la intensidad de señal

- Se comparó la señal máxima producida para cada uno de los compuestos 14 y 27-29 haciendo reaccionar una alícuota de 100 μ l de las composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y el compuesto de ensayo 3×10^{-4} M con $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP. Cada reactivo alcanzó la intensidad máxima de luz en aproximadamente 1 minuto.

Compuesto	Señal/Fondo
14	2491
27	6933
28	6717
29	6621
38	26000

11. Perfil de tiempo de quimioluminiscencia usando ceten ditionoacetato 26

5 Se sometieron a ensayo las composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,01 M, pH 8,0, peróxido de urea 0,5 mM, p-fenilfenol 0,01 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0,025 % y compuesto 26 5×10^{-5} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100 μ l con $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP. La Figura 3 muestra el perfil de tiempo de quimioluminiscencia y demuestra una generación de quimioluminiscencia más rápida que el compuesto estructuralmente similar designado como Ref. 2. El perfil de tiempo de quimioluminiscencia que usaba otros ceteno ditionoacetato listados en el Ejemplo 1 exhibieron un aumento rápido similar.

12. Perfil de tiempo de quimioluminiscencia usando ceteno ditionoacetato 27

15 Se sometieron a ensayo las composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxibenzoico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y compuesto 27 3×10^{-4} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar una alícuota de 100 μ l con $3,5 \times 10^{-16}$ moles de HRP. La Figura 4 muestra el perfil de tiempo de quimioluminiscencia y demuestra una generación de quimioluminiscencia rápida y un nivel de señal generado más elevado que en el caso de los reactivos del ejemplo anterior.

13. Ensayo de inmunotransferencia usando un sustrato de ceteno ditionoacetato

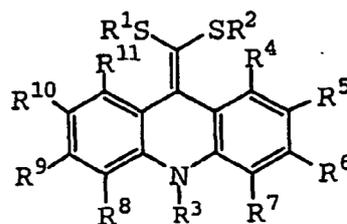
25 Se llevó a cabo un ensayo de inmunotransferencia de β -galactosidasa como antígeno de ensayo de acuerdo con el procedimiento descrito en U.K. Laemmli, Nature (Londres), 227, 680 (1970) usando una membrana de PVDF. Los estándares de β -galactosidasa estaban en el intervalo de 5000- 5 pg. El reactivo de detección que contenía Compuesto 1 permitió llevar a cabo la detección en 1 minuto. La Figura 5 demuestra la detección de β -gal tras 11 min con una exposición de 5 segundos. A modo de comparación, los resultados del ensayo de inmunotransferencia que usaba el reactivo que contenía el compuesto Ref. 1, como se describe en la patente de EE.UU. 5.922.558, produjeron una intensidad de quimioluminiscencia menor y requirieron exposiciones más prolongadas para conseguir la misma imagen de bandas más abundantes. Además, el reactivo de la invención fue capaz de formar una imagen con menos bandas de abundancia de 1 pg o menos, lo que no fue posible con el reactivo que contenía el compuesto de referencia.

14. Ensayo de inmunotransferencia usando un sustrato adicional de ceteno ditionoacetato

35 Se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia de acuerdo con el Ejemplo 13 usando reactivos de detección que contenían bien el compuesto 27 o bien el compuesto 37 y un mejorador y peróxido. La Figura 6 demuestra la detección de β -galactosidasa después de 60 minutos con una exposición de 1 minuto usando el compuesto 27 y una exposición de 1 minuto tras 8 minutos usando el compuesto 37.

15. Ceteno ditionoacetato adicionales

Se prepararon los siguientes compuestos:



Compuesto.	R ⁴⁻¹¹	R ³	R ¹	R ²
40	-	CH ₂ -P-C ₆ H ₄ OH	CH ₃	CH ₃
41	-	CH ₂ Ph	CH ₂ -P-C ₆ H ₄ Cl	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na
42	-	Ph	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na

43	-	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₃ OP ₃ Na ₂	(CH ₂) ₃ OP ₃ Na ₂
44	-	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₃ OH	(CH ₂) ₃ OP ₃ Na ₂
45	-	Ph		-CH ₂ CH(OH)CH ₂ -
46	-	Ph		-CH ₂ CH(O(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na)CH ₂ -
47	-	CH ₂ Ph		-CH ₂ CH(O(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na)CH ₂ -
48	-	CH ₂ Ph		-CH ₂ CH(O(CH ₂) ₃ OP ₃ Na ₂)CH ₂ -
49	-	CH ₂ Ph		-CH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₄
50	-	(CH ₂) ₃₀ (CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na		O-C ₆ H ₄
51	-	CH ₃		O-C ₆ H ₄
52	-	CH ₂ Ph	(CH ₂) ₃ OH	(CH ₂) ₃ O(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na
53	-	CH ₂ Ph	CH ₃	(CH ₂) ₃ O(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na
54	-	Ph	CH ₃	(CH ₂) ₃ S(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na
55	-	CH ₂ Ph	CH ₃	(CH ₂) ₃ OS ₃ O ₃ N ^a
56	-	Ph	CH ₃	(CH ₂) ₃ O(CH ₂) ₃ S ₃ O ₃ Na

Se preparó el compuesto 51 como se describe en el artículo de Akiba anteriormente mencionado.

16. Síntesis adicional y caracterización

5 Compuesto 40. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,28 (s, 6H), 4,74 (s, 1H), 5,21 (s, 2H), 6,76 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 7,00 (m, 4H), 7,12 (t, 2H), 7,85 (d, 2H).

10 Compuesto 41. ¹H RMN (CDCl₃): 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. ¹H RMN (CDCl₃): 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).

15 Compuesto 43. ¹H RMN (D₂O): δ 1,77 (p, 4H), 2,88 (t, 4H), 3,69 (c, 4H), 5,30 (s, 2H), 6,98 (d, 2H), 7,06 (m, 4H), 7,18-7,29 (m, 5H), 7,88 (d, 2H).

20 Compuesto 44. ¹H RMN (CD₃OD): δ 1,70 (p, 2H), 1,88 (p, 2H), 2,78 (t, 2H), 2,92 (t, 2H), 3,15 (t, 2H), 3,85 (c, 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).

25 Síntesis del compuesto 45. Se añadió N-fenilacridano (3,86 g, 15,0 mmol) en THF (20 ml) a una disolución de LDA (30,8 mmol) en THF (250 ml). Se agitó la mezcla resultante a -78 °C durante 1,5 horas. A continuación se añadió CS₂ (0,99 ml, 16,5 mmol). Transcurridos 45 minutos a -78 °C, se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante otros 30 minutos antes de añadir [2-(1,3-dibromo)propoxi]-terc-butildimetilsilano (5,23 g, 15,8 mmol) en THF (130 ml). Tras agitar durante la noche, se retiró el disolvente y se sometió el residuo a cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/CH₂Cl₂: 1/2,5). Se obtuvo el compuesto 45 (rendimiento de 81 %). La desprotección del grupo siloxi con TBAF dio lugar a 45 con un rendimiento de 85 %. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,76 (dd, 2H), 2,82 (a, 1H), 3,19 (dd, 2H), 4,22 (m, 1H), 6,76 (d, 2H), 7,01-7,13 (m, 4H), 7,38 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,62-7,72 (m, 4H).

30 Síntesis del compuesto 46. Se añadió hidruro de sodio (0,108 g, en aceite mineral 60 %, 2,70 mmol) a una disolución de 45 (1,00 g, 2,57 mmol) en DMF (10 ml) bajo argón. Transcurrida aproximadamente 1 h y 20 minutos, se obtuvo una disolución transparente. A continuación, se añadió 3-propanosultona y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 60 horas. Se concentró la mezcla de reacción hasta un volumen de aproximadamente 3 ml retirando el DMF a vacío. Se añadió acetona (7 ml) para precipitar el producto. Se agitó la mezcla durante 20 minutos antes de recoger el sólido por medio de filtración. Se lavó el sólido con acetona (3 x 5 ml) y se secó para dar 1,12 g de producto puro. La recristalización con agua e isopropanol dio lugar a 0,80 g de producto puro 46 en forma de sólido amarillento (rendimiento de 58 %). ¹H RMN (CDCl₃): 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).

40 Compuesto 47. ¹H RMN (CD₃OD): δ ,03 (2H, m), 2,87 (4H, s), 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 = 6,5 Hz).

45 Compuesto 48. ¹H RMN (CD₃OD): δ 1,85 (2H, m), 2,84 (2H, s), 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). ³¹P NMR (CD₃OD): δ 10,27 (s).

Compuesto 49. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,92 (4H, t, J = 7,1 Hz), 3,51-3,63 (16H, m), 5,27 (2H, s), 6,85 (2H, t, 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. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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).

5 17. Comparación de la intensidad de señal

Se comparó la señal máxima producida por cada uno de los compuestos 40-51 haciendo reaccionar una alícuota de 100 μl de composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y el compuesto de ensayo 1 mM, 0,3 mM, 0,15 mM ó 0,05 mM con 3×10^{-16} moles de HRP. Cada reactivo alcanzó la intensidad máxima de luz en 1-3 minutos.

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

Los compuestos 49 y 51 fueron muy poco solubles en la formulación acuosa.

15 18. Ensayo de inmunotransferencia usando sustrato de cetén ditioacetil 46

Se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia de β -galactosidasa de acuerdo con el Ejemplo 31 pero usando una membrana de nitrocelulosa y un reactivo de detección que comprendía tampón tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y compuesto 46 1 mM. La Figura 7 demuestra la detección rápida y conveniente de β -gal con excelente sensibilidad en varios momentos de tiempo hasta 120 minutos.

19. Compuestos adicionales

25 Compuesto 52. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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, 1H), 7,88 (d, 1H) ppm.

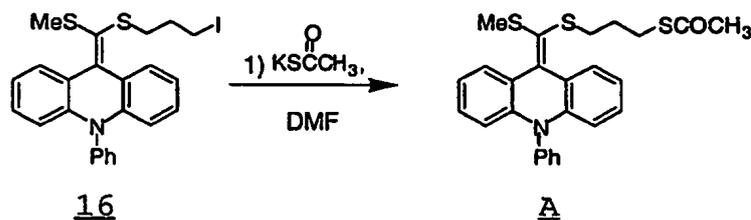
30 Compuesto 53. ^1H RMN (CD_3OD): δ 1,54 (p, 2H), 1,92 (m, 2H), 2,21 (s, 6H), 2,70-2,82 (m, 4H), 3,10 (t, 2H), 3,29 (t, 2H), 5,30 (s, 2H), 6,01-7,02 (m, 4H), 7,08-7,26 (m, 7H), 7,78 (d, 1H), 7,89 (d, 1H) ppm.

Compuesto 56. ^1H RMN (CD_3OD): δ 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.

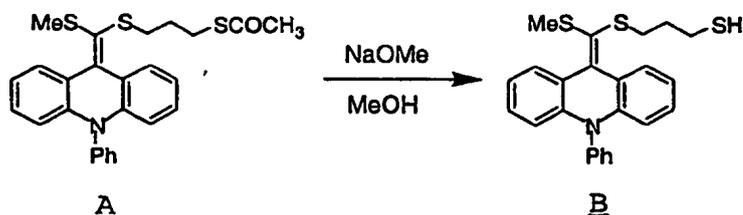
35 20. Síntesis del compuesto 54

Se agitó una mezcla de compuesto 16 (0,500 g, 0,97 mmol) y tioacetato de potasio (0,166 g, 1,45 mmol) en DMF (10ml) bajo argón y a temperatura ambiente durante la noche. Tras retirar el DMF a vacío, se recogió el residuo con CH_2Cl_2 y se pasó a través de un paquete de gel de sílice. La retirada del disolvente dio lugar a 0,46 g de A en forma de sólido de tipo espuma.

40



Se disolvió el compuesto A en una mezcla de MeOH (10 ml) y THF (10 ml) bajo argón. Se añadió NaOMe (0,054 g, 0,97 mmol) a esta disolución. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se usó la resina de intercambio iónico Dowex 50 WX8-100 para ajustar el pH a 5-6. Se filtró la resina y se evaporó el filtrado hasta sequedad. Se recogió el residuo con acetona y se pasó a través de un paquete de gel de sílice. Tras retirar el disolvente, se obtuvieron 0,41 g de B en forma de sólido de tipo espuma.



B: $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 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.

Se convirtió el compuesto B en el compuesto 54 por medio de reacción con propanosultona y NaH en DMF como se ha descrito anteriormente. $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 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.

21. Síntesis del compuesto 55

Se agitó una mezcla del ditioéster (1,00 g, 2,77 mmol) y NaH (2,77 mmol) en DMF bajo argón durante 1 hora, a continuación se añadió sulfato cíclico de 1,3-propanodiol y se agitó la mezcla resultante durante la noche a temperatura ambiente. Tras la retirada del DMF, se lavó el residuo con acetona/éter (1:3) y se recristalizó con MeOH/2-propanol para dar 1,40 g de 55 (rendimiento de 96 %). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 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.

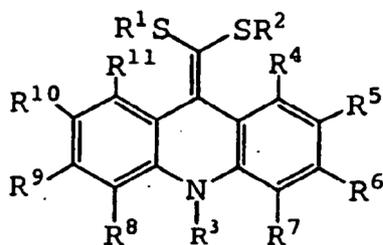
22. Detección quimioluminiscente de HRP con los compuestos 52 y 53

Se sometieron a ensayo composiciones de reactivo que comprendían tampón tris 0,025 M, pH 8,0, peróxido de urea 2,5 mM, ácido p-hidroxicinámico 4 mM, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,1 % y compuesto 52 o 53 3×10^{-4} M, en cuanto a la producción de quimioluminiscencia haciendo reaccionar por triplicado 100 μl de HRP en el intervalo de $1,4 \times 10^{-16}$ a $1,4 \times 10^{-21}$ moles. La producción de luz se obtuvo tras mezcla y alcanzó una intensidad máxima de forma rápida. La Figura 8 muestra la relación entre la intensidad pico de quimioluminiscencia y la cantidad de enzima.

La descripción anterior y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no deben considerarse como restrictivos. Se reconoce que se pueden llevar a cabo modificaciones de los compuestos específicos y de los métodos no divulgados específicamente sin que ello suponga alejarse del alcance de la presente invención. El alcance de la invención se encuentra únicamente limitado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5

en la que R^1 y R^2 se escogen de forma independiente entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1-20 átomos de carbono, cada uno de R^4 a R^{11} es de manera independiente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos que se escogen entre C, H, N, O, S, P, Si y átomos de halógeno, y R^3 se escoge entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido.

10

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que al menos uno de R^4 a R^{11} se escoge entre alquilo, alcoxi, halógeno, amino o amino sustituido con uno o dos grupos alquilo o arilo y el resto de R^4 a R^{11} son hidrógeno.

15

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que cada R^4 a R^{11} es un átomo de hidrógeno.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que cada R^3 se escoge entre grupos metilo, fenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, 2-naftilo y p-anisilo.

20

5. El compuesto de la reivindicación 1, que se encuentra sustituido con al menos un grupo Z que confiere solubilidad en agua.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que al menos R^1 y R^2 se escogen entre alquilo sustituido con un grupo que se escoge entre grupos de sal de sulfonato, grupos de sal de sulfato, grupos de sal de fosfonato, grupos de sal de fosfato, grupo de sal de carboxilato, grupos de sal de amonio y grupos de sal de fosfonio.

25

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que al menos uno de R^1 y R^2 es un grupo alquilo sustituido con un grupo de sal de sulfonato.

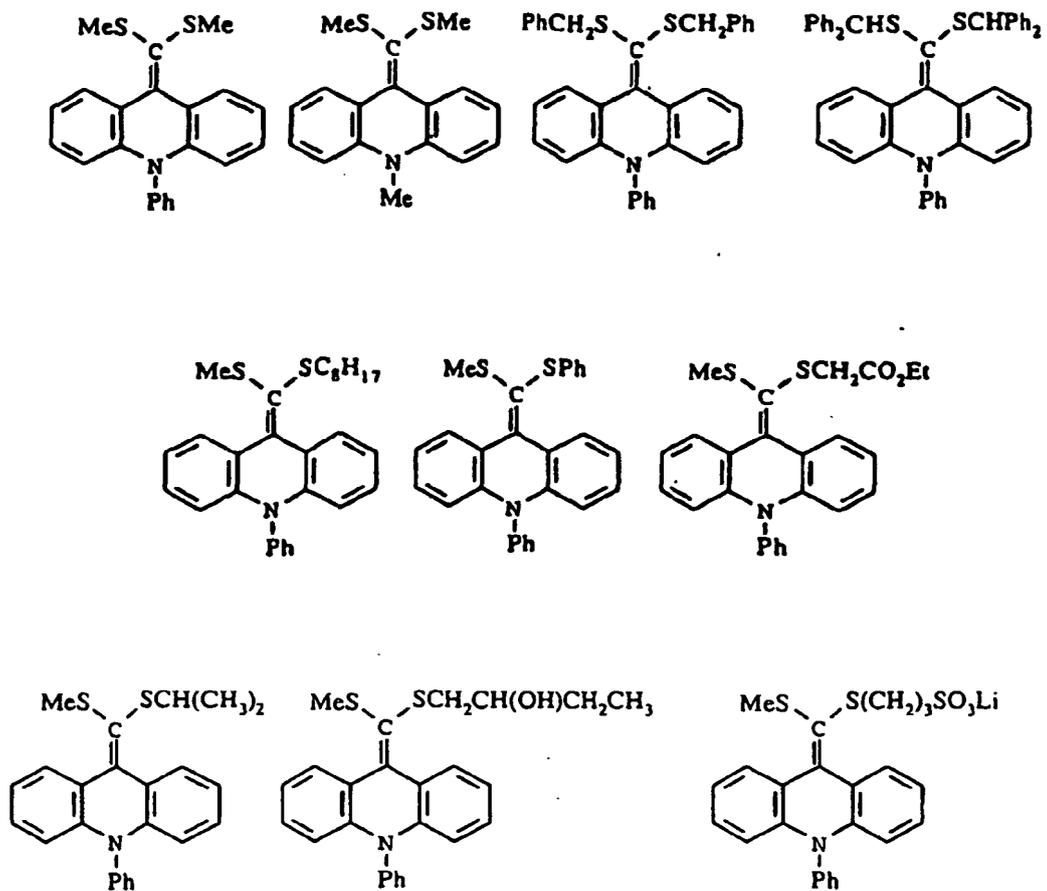
30

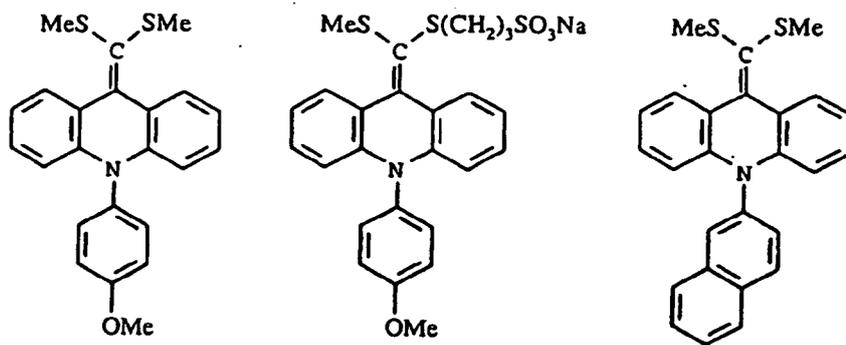
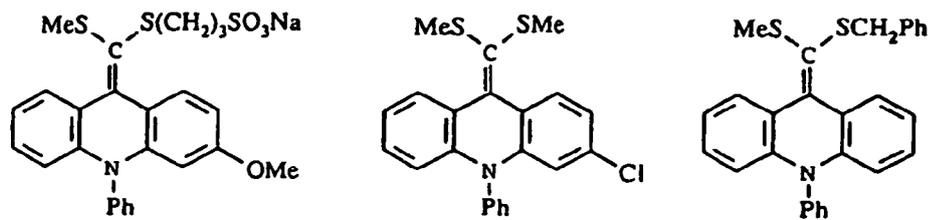
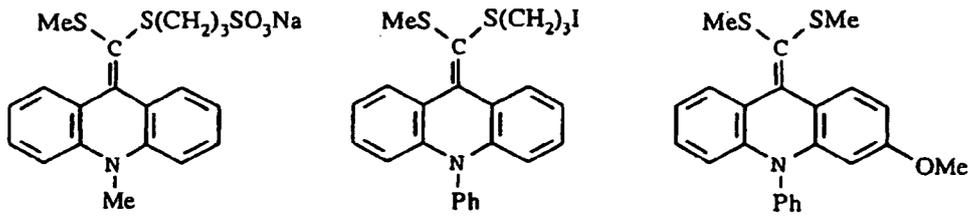
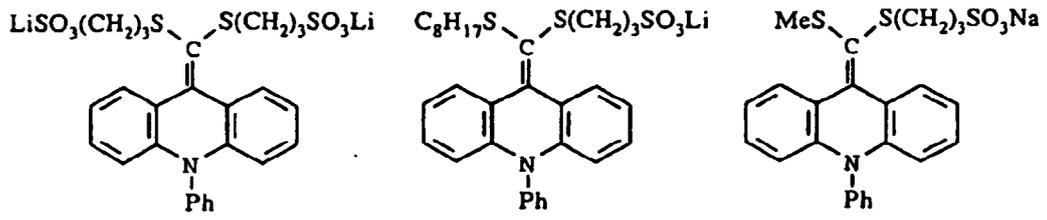
8. El compuesto de la reivindicación 6, en el que al menos uno de R^1 y R^2 es un grupo alquilo sustituido con un grupo de sal de fosfato.

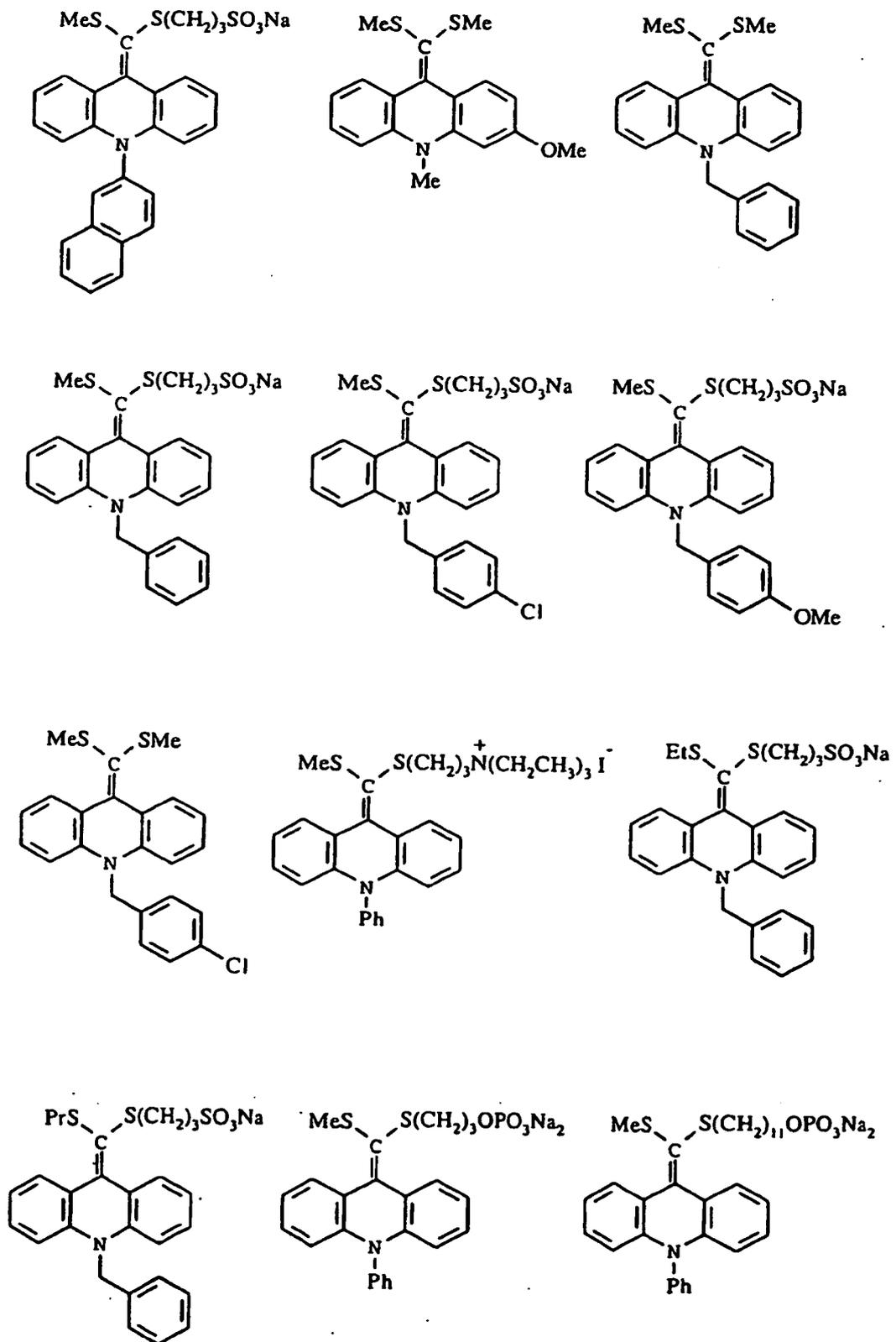
9. El compuesto de la reivindicación 6, en el que R^3 se escoge entre grupos fenilo, fenilo sustituido, bencilo y bencilo sustituido.

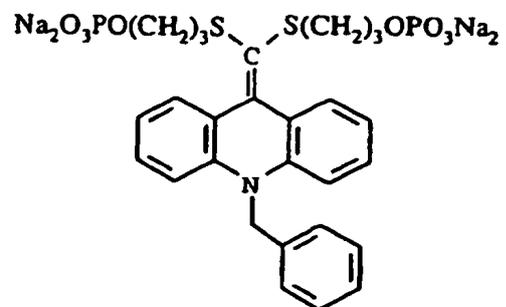
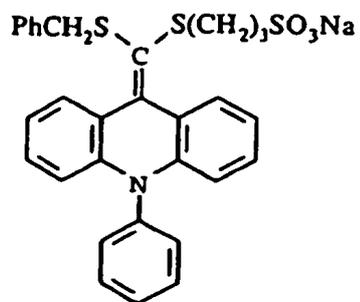
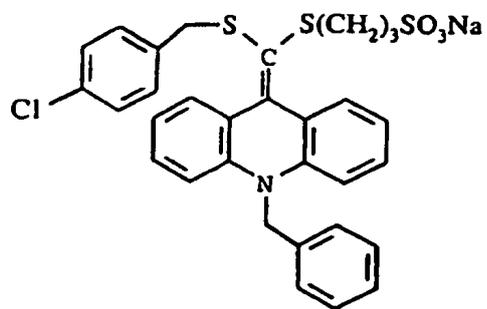
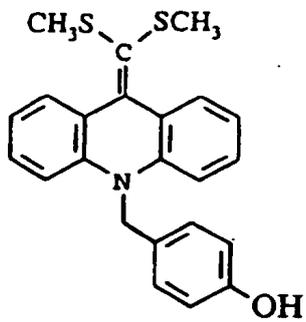
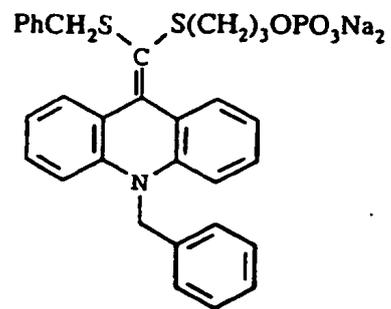
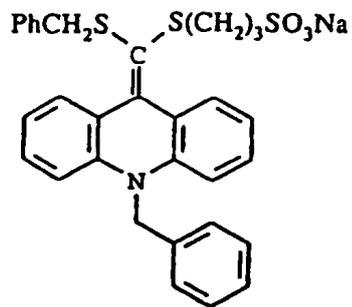
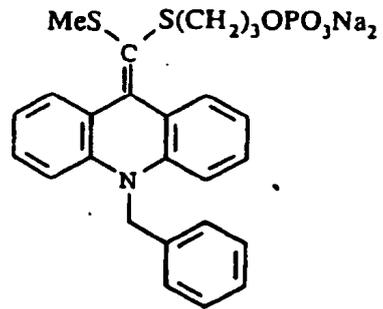
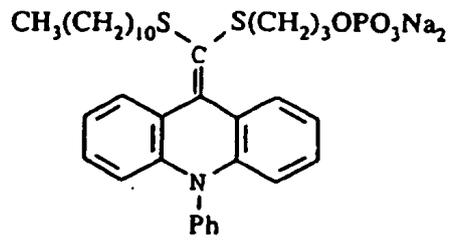
35

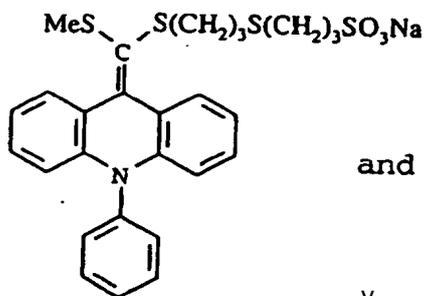
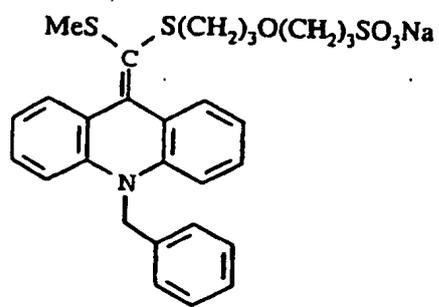
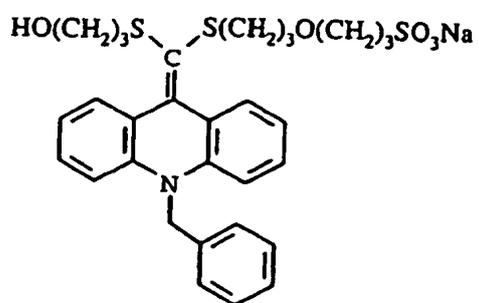
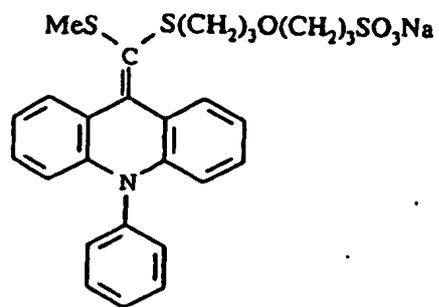
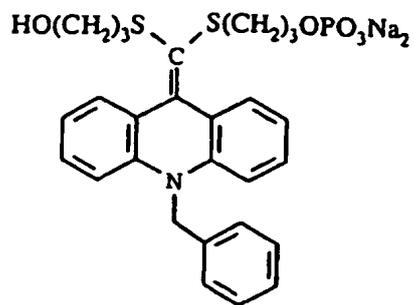
10. El compuesto de la reivindicación 1, que se escoge entre el grupo



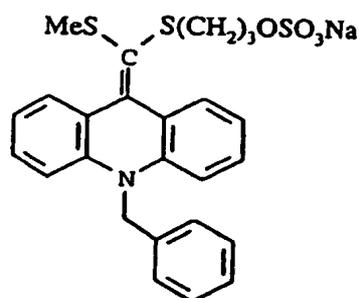






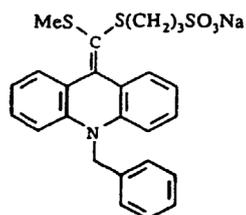


and

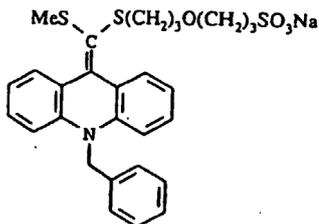


y

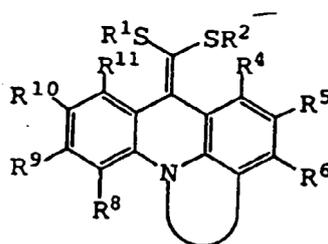
11. El compuesto de la reivindicación 10 que presenta la fórmula:



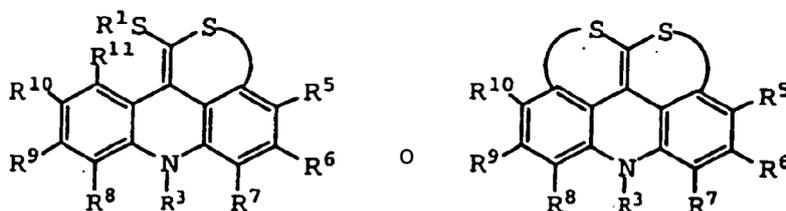
5 12. El compuesto de la reivindicación 10 que presenta la fórmula:



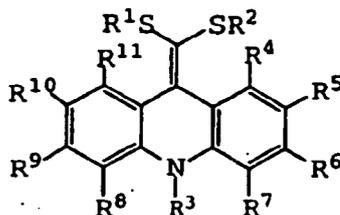
13 El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se escogen de forma independiente entre grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1-20 átomos de carbono y que cada uno se puede unir de forma independiente a la posición de anillo respectiva más cercana R^4 o R^{11} para cerrar un anillo adicional y pueden unirse para formar un anillo de 5 a 30 átomos, y el átomo de nitrógeno se encuentra unido para cerrar un anillo adicional de 5-7 miembros y que tiene la fórmula:



14 El compuesto de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los átomos de azufre se une a la posición de anillo respectiva más cercana R^4 o R^{11} para formar un anillo de 5 a 7 átomos, y cuando solo uno de los átomos de azufre se une de esta forma, R^1 se escoge entre grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido de 1-20 átomos de carbono y que tienen la fórmula:



15. Un compuesto de fórmula



15 en la que R^1 y R^2 están unidos por un anillo que comprende de cinco a treinta átomos, cada uno de R^4 a R^{11} es de manera independiente un sustituyente que puede contener de 1 a 50 átomos que se escogen entre C, H, N, O, S, P y átomos de halógeno, R^3 se escoge entre grupos alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, y en la que el compuesto se encuentra sustituido con al menos un grupo Z que confiere solubilidad en agua.

16. El compuesto de la reivindicación 15, en el que el anillo es un alquileno sustituido o una cadena de heteroalquileno.

17. El compuesto de la reivindicación 15, en el que el grupo R^3 está sustituido con al menos un grupo Z que confiere solubilidad.

18. El compuesto de la reivindicación 15, en el que el anillo que conecta R^1 y R^2 comprende de cinco a siete átomos.

19. El compuesto de la reivindicación 16, en el que R^3 se escoge entre grupos alquilo, heteroalquilo, fenilo y bencilo.

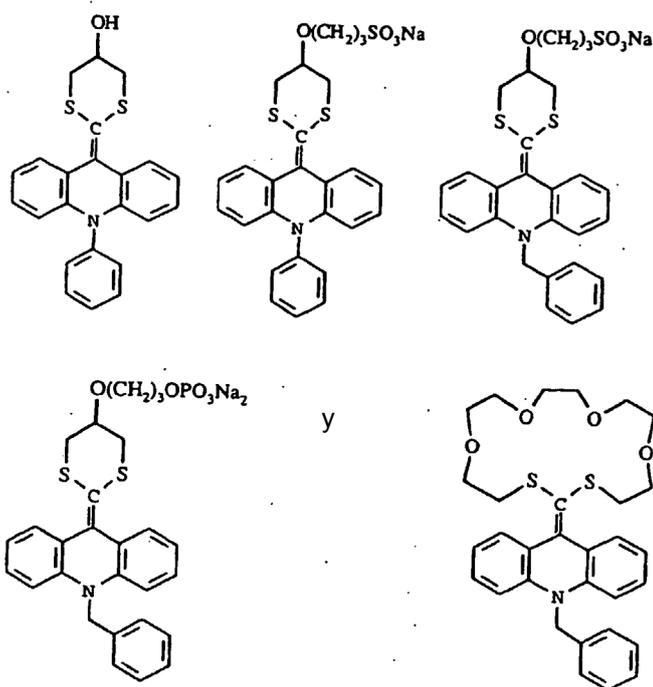
20. El compuesto de la reivindicación 15, en el que Z se escoge entre grupos de sal de sulfonato, grupos de sal de sulfato, grupos de sal de fosfonato, grupos de sal de fosfato, grupos de sal de carboxilato, grupos de sal de amonio y grupos de sal de fosfonio.

5 21. El compuesto de la reivindicación 17, en el que Z se escoge entre grupos de sal de sulfonato, grupos de sal de sulfato, grupos de sal de fosfonato, grupos de sal de fosfato, grupos de sal de carboxilato, grupos de sal de amonio y grupos de sal de fosfonio.

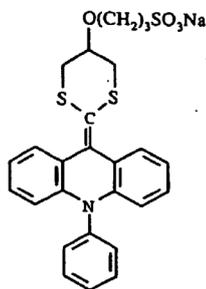
10 22. El compuesto de la reivindicación 15, en el que al menos uno de R^4 a R^{11} se escoge entre alquilo, alcoxi, halógeno, amino o amino sustituido con uno o dos grupos alquilo o arilo y el resto de R^4 a R^{11} son hidrógeno.

23. El compuesto de la reivindicación 15, en el que cada R^4 a R^{11} es un átomo de hidrógeno.

15 24. El compuesto de la reivindicación 15 que se escoge entre el grupo de



20 25. El compuesto de la reivindicación 24 que presenta la fórmula:



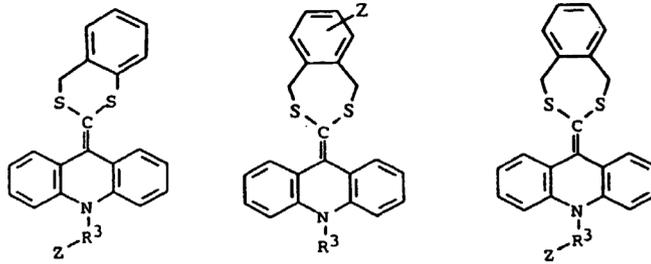
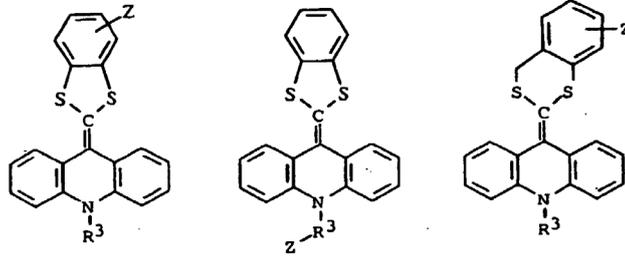
25 26. El compuesto de la reivindicación 15, en el que R^1 y R^2 están unidos por medio de un anillo que comprende de cinco a treinta átomos condensados con un segundo anillo, y que además comprende un grupo Z que confiere solubilidad en agua.

27. El compuesto de la reivindicación 26, en el que el segundo anillo condensado es un anillo de benceno o un anillo de benceno sustituido.

30 28. El compuesto de la reivindicación 26, en el que el segundo anillo se encuentra sustituido con al menos un grupo

Z que confiere solubilidad en agua.

29. El compuesto de la reivindicación 26 que se escoge entre



5

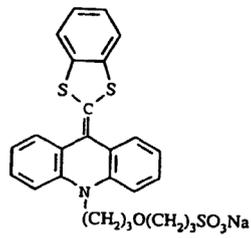


FIG. 1

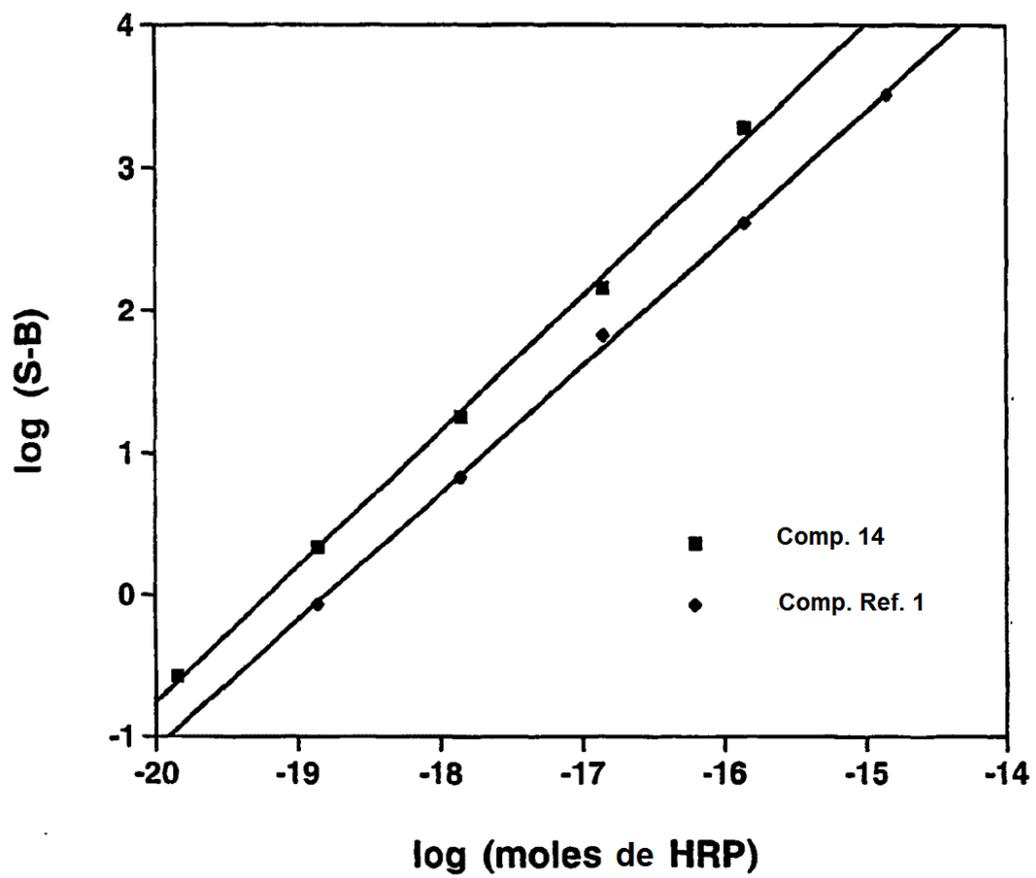


FIG. 2

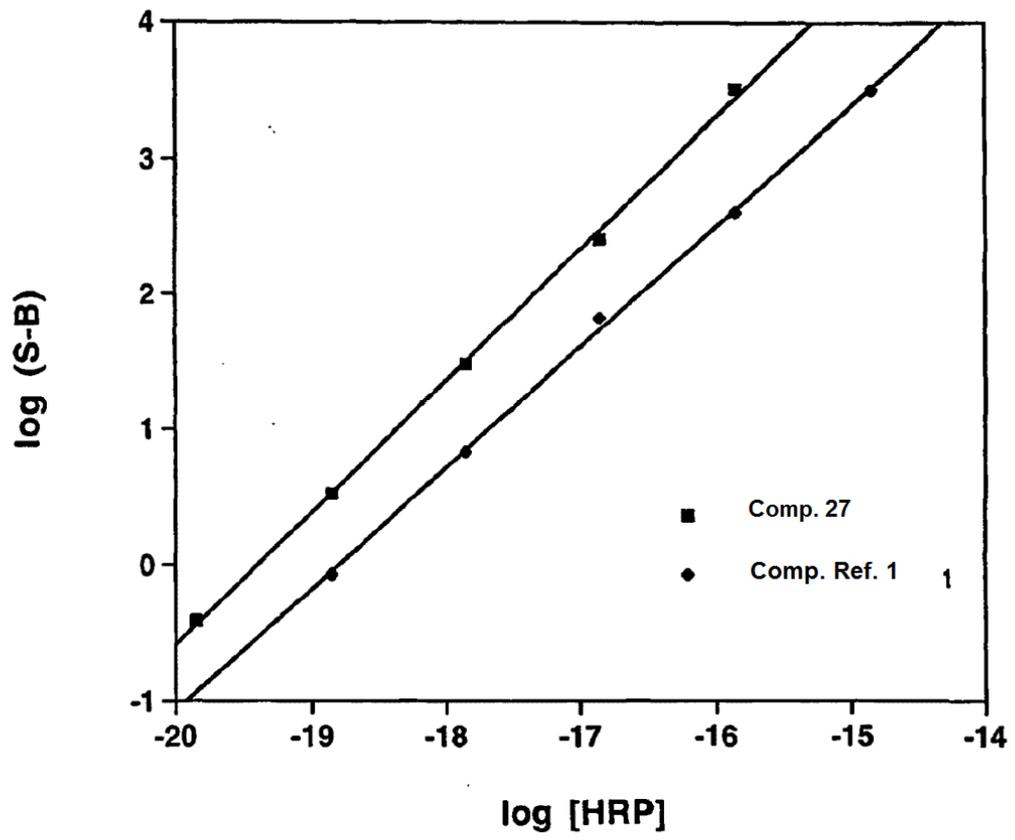


FIG. 3

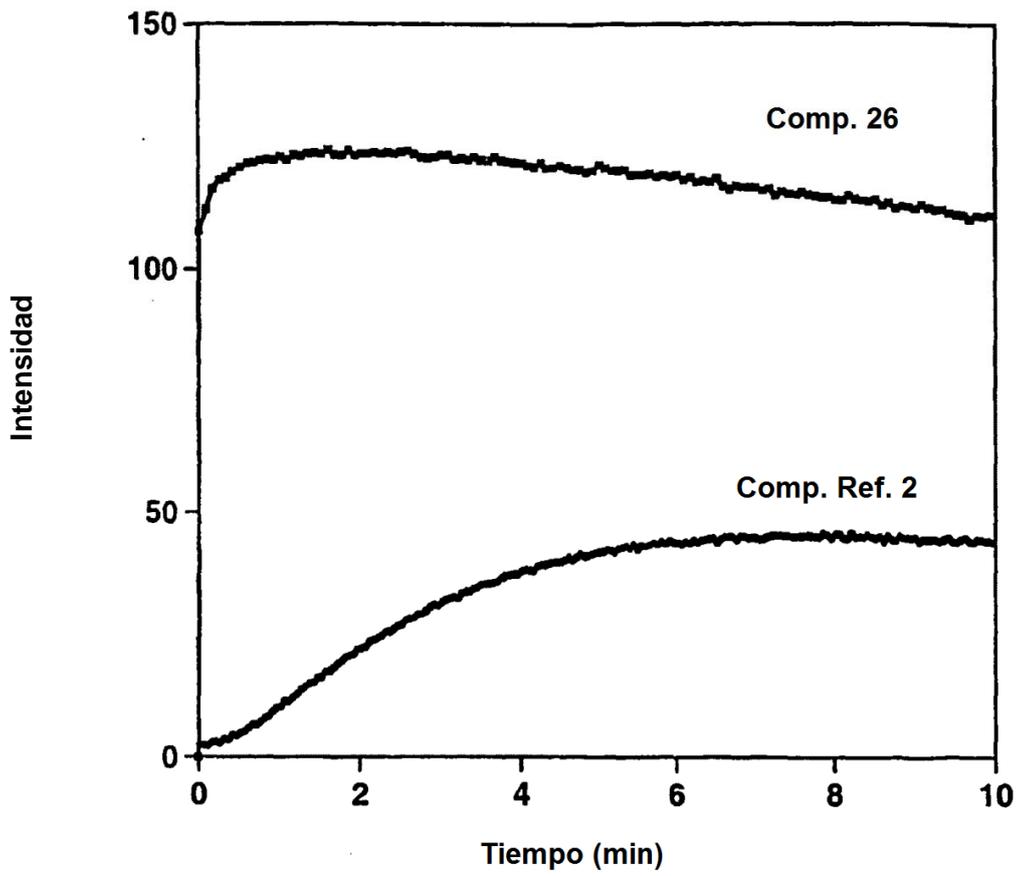


FIG. 4

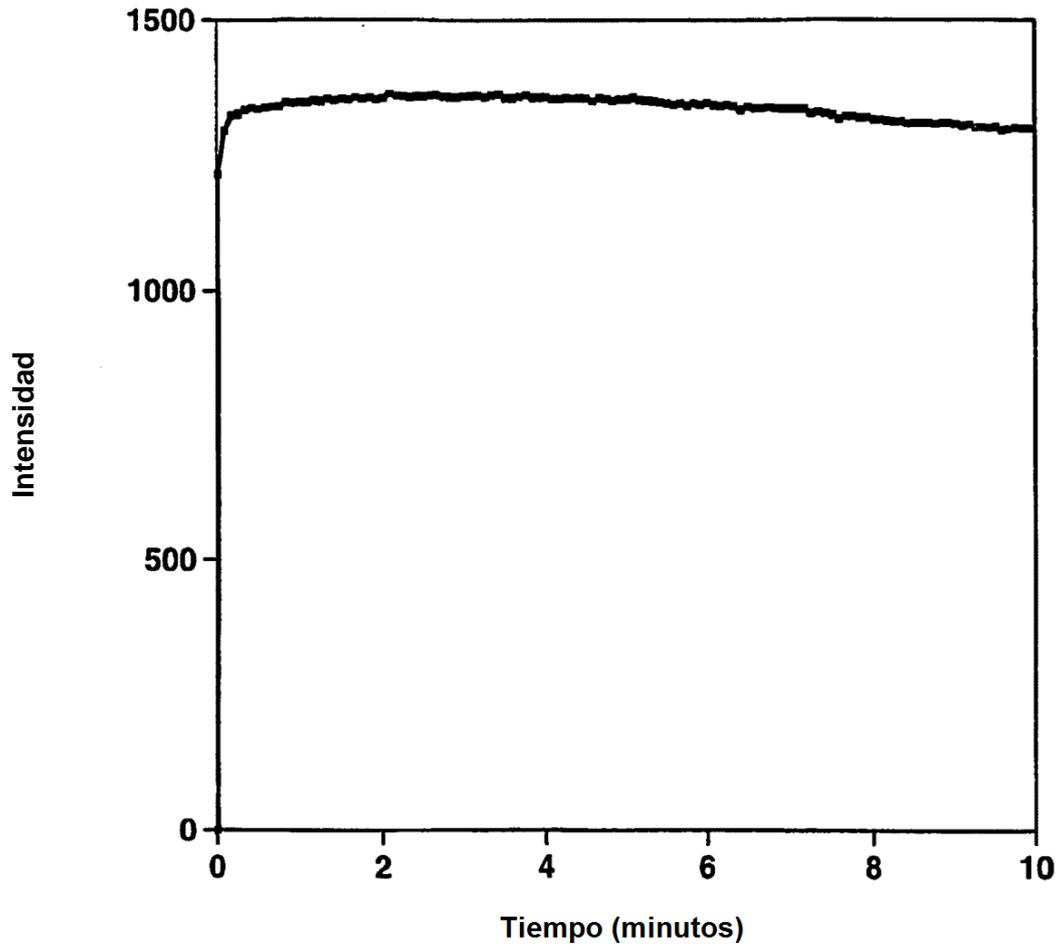


FIG. 5

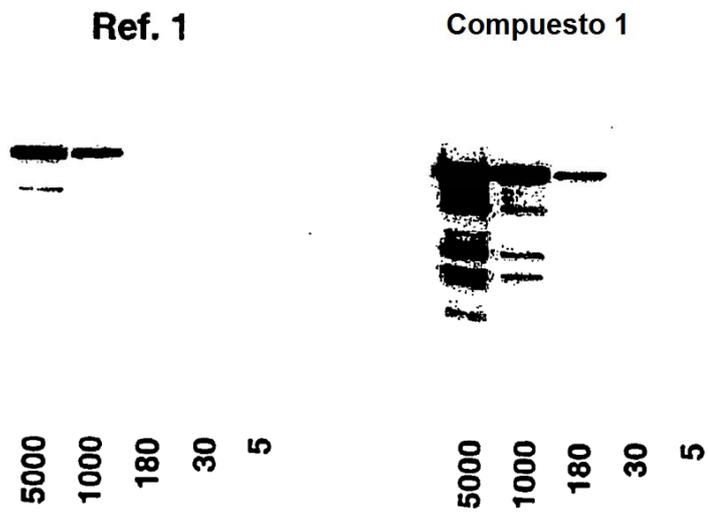
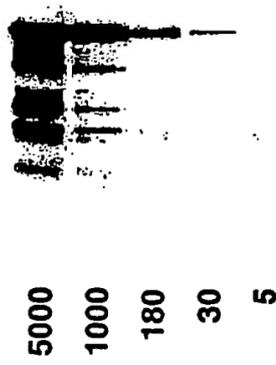


FIG. 6

Compuesto 27



Compuesto 37



FIG. 7

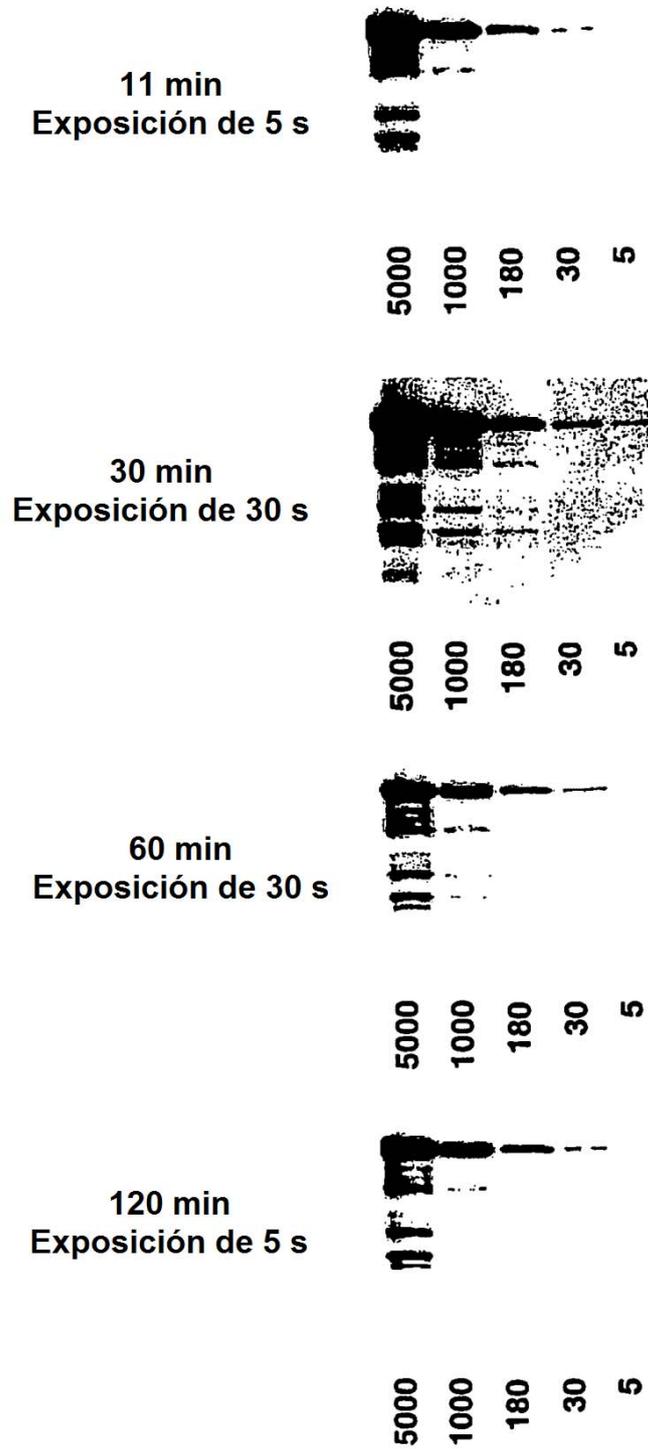


FIG. 8

