

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 700**

51 Int. Cl.:

**C07F 17/02** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 27/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11805925 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2655387**

54 Título: **Nuevas etiquetas de ferroceno para ensayo electroquímico y su uso en métodos analíticos**

30 Prioridad:

**22.12.2010 GB 201021896**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.02.2015**

73 Titular/es:

**ATLAS GENETICS LIMITED (100.0%)  
Derby Court Epsom Square, White Horse  
Business Park  
Trowbridge, Wiltshire BA14 0XG, GB**

72 Inventor/es:

**MARSH, BARRIE;  
SHARP, JONATHAN;  
FLOWER, STEPHEN y  
FROST, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 528 700 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).

**Nuevas etiquetas de ferroceno para ensayo electroquímico y su uso en métodos analíticos****Descripción**

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos de detección electroquímicos. Mas especialmente, la invención se refiere a ensayos electroquímicos, a etiquetas electroquímicamente activas para su uso en métodos de detección electroquímicos, y a su uso.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La detección de ciertas moléculas biológicas juega una parte importante en muchos aspectos de la vida. Por ejemplo, en el campo médico, hay una necesidad siempre presente de detectar patógenos bacterianos o virales, o moléculas biológicas. Otros campos en los que son esenciales ensayos sensibles incluyen las industrias de comida y bebida.

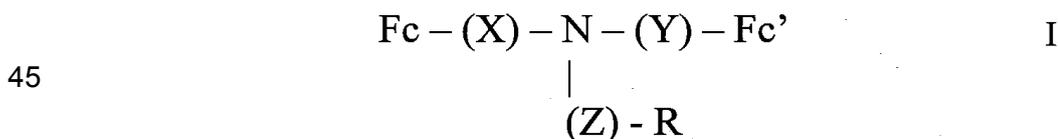
La WO 03/074731 divulga un método de sondeo de un ácido nucleico. Una solución de ácido nucleico se pone en contacto con una sonda de oligonucleótidos con un marcador electroquímicamente activo. Se provoca que la sonda hibride al menos parcialmente con cualquier secuencia diana complementaria que pueda estar presente en la solución de ácidos nucleicos. Después de la degradación enzimática de la sonda de ácidos nucleicos, la información se determina electroquímicamente en relación al marcador. También se divulgan los compuestos para su uso en el método.

La WO2005/05657 divulga un método para detectar actividad de proteasa en el que una solución de muestra se pone en contacto con un sustrato de proteasa con un marcador electroquímicamente activo, proporcionando condiciones bajo la que cualquier proteasa que pueda estar presente en la muestra pueda degradar el sustrato de proteasa y la información relativa al marcador electroquímicamente activo se determina electroquímicamente. También se divulgan ciertos compuestos nuevos para su uso en el proceso.

Hay una necesidad continua de desarrollar etiquetas que permitan la detección de la presencia en concentraciones pequeñas de sustratos o indicadores biológicos, por ejemplo, ácidos nucleicos (en forma aislada o en la forma de moléculas más grandes, por ejemplo, oligonucleótidos naturales o sintéticos), o aminoácidos (en forma aislada o en la forma de moléculas más grandes, por ejemplo, péptidos naturales o sintéticos). En particular, hay una necesidad continua de nuevas etiquetas con diferentes potenciales de oxidación ampliando de esta manera el intervalo de ensayos disponibles posibles y aumentando el ámbito para el desarrollo de reacciones múltiplex.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona el uso como una etiqueta en un ensayo electroquímico de un compuesto de la fórmula general I:



en la que:

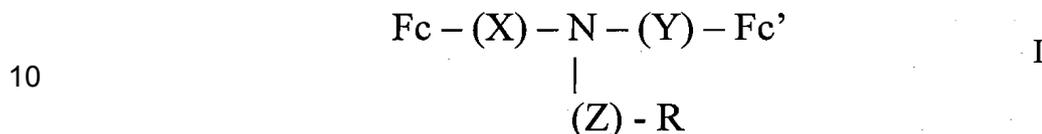
50 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 55 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
 60 representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y R es un grupo conector.

Se ha descubierto que los compuestos usados de acuerdo con la invención son etiquetas efectivas para su uso en ensayos electroquímicos. En particular, los compuestos pueden ser usados para formar sustratos etiquetados. Las moléculas de interés como sustratos que pueden ser etiquetadas incluyen, pero no están limitadas a aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos, azúcares, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos, carbohidratos y derivados de cualquiera de estas moléculas. Otros sustratos que podrían ser etiquetados usando los



de los compuestos de la invención unidos a un grupo de funcionalización adecuado para potenciar la unión a un sustrato.

5 La invención también proporciona un método para fabricar un compuesto de etiquetado funcionalizado que comprende un resto de etiqueta para su uso en un ensayo electroquímico, que comprende reaccionar un compuesto de la fórmula general I:



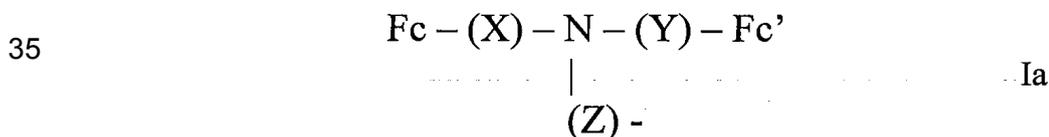
15 en la que:

15 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 20 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
 25 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
 representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y R es un grupo conector que comprende un átomo de oxígeno.

30 con un compuesto de funcionalización para obtener un compuesto de etiquetado funcionalizado de la fórmula general III:



en la que A representa



40 en donde Fc, Fc', X, Y y Z son como se ha definido anteriormente con referencia a la fórmula general I; F representa un resto de funcionalización, especialmente un resto de funcionalización para reaccionar con un sustrato para la unión del resto de etiquetado con el sustrato; y L representa un resto conector. El resto conector L será generalmente un resto conector derivado del grupo conector R. Por ejemplo donde R es o contiene un grupo L OH representará habitualmente o comprenderá - O -.

45 Además la invención proporciona un método para la fabricación de un sustrato, que comprende reaccionar un compuesto de la fórmula general III:



en la que A, F y L son como se ha definido anteriormente;  
 con un sustrato para forma un sustrato etiquetado.

55 La invención proporciona además un compuesto de etiquetado funcionalizado para su uso en la fabricación de un sustrato, el compuesto de etiquetado funcionalizado teniendo la fórmula general III:

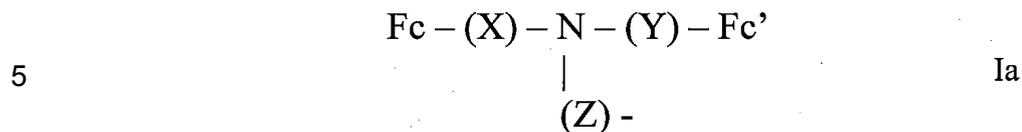


60 en la que A, L y F son como se ha definido anteriormente.

La invención también proporciona un sustrato etiquetado para su uso en un ensayo electroquímico, el sustrato etiquetado siendo de la fórmula general IIIa:



en la que A representa



en la que:

- 10 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 15 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
 representa hidrógeno o alquilo C1 a C4;  
 20 L-F' representa un resto conector; y  
 [S] representa un sustrato.

El resto conector -L-F' es en general un resto derivado del resto -L-F- de acuerdo con la fórmula general III.

La invención proporciona además ensayos que comprenden sustratos de acuerdo con la invención.

## 25 DESCRIPCION DETALLADA

30 La aplicación de la detección electroquímica tiene un número de ventajas sobre la detección fluorescente. La detección electroquímica tiene el potencial de niveles altos de sensibilidad y muestra un intervalo dinámico lineal más amplio que la fluorescencia. No hay requisitos para que las muestras sean claras ópticamente. Hay también menos interferencia de contaminantes de fondo (auto-fluorescencia de muchas muestras biológicas).

35 La detección electroquímica se basa en la observación de que un marcador electroquímicamente activo muestra características electroquímicas diferentes dependiendo de si está o no unido a un sustrato y en la naturaleza del sustrato. Por ejemplo, en el caso de una etiqueta electroquímica unida a un aminoácido, las características mostradas dependerán no sólo de la identidad del aminoácido sino también de si ese residuo de aminoácido está incorporado o no en un péptido o proteína, y en la longitud de cualquiera de dichos péptidos proteínas. Bajo las circunstancias apropiadas, la actividad electroquímica de un marcador unido a un residuo de aminoácido puede cambiar por un grado detectable después de la pérdida de unión de un único o unos pocos  
 40 residuos de aminoácidos.

45 El tamaño y características de una molécula a la que el marcador electroquímicamente activo está unido influyen en las características observables del marcador electroquímico. Eso puede ocurrir, por ejemplo, influyendo la tasa de migración del marcador por difusión o su tasa de migración en respuesta a un campo eléctrico.

La actividad electroquímica de un marcador también puede ser influida por efectos estéricos resultantes de la presencia de la molécula a la que está ligada. Por ejemplo, el impedimento estérico puede evitar que el marcador se acerque a un electrodo y acepta o done electrones.

50 Si el marcador está unido un péptido entonces la estructura secundaria del péptido (como se determina en gran medida por la secuencia primaria) puede influir en las propiedades físicas del marcador. Por ejemplo, si el marcador está unido a un residuo de aminoácidos en un péptido de tal manera que la estructura del péptido impide estéricamente al marcador electroquímicamente activo entonces las señales observables por voltamperometría puede ser reducida. La digestión del péptido puede destruir o liberar elementos de la estructura secundarios y reducir o suprimir por lo tanto la influencia de la estructura del péptido en el marcador. Por consiguiente, la digestión del péptido resulta en un cambio, habitualmente un incremento, en la señal electroquímica producida por el resto del marcador. En un experimento de voltamperometría de pulso diferencial, la respuesta de la corriente farádica en un voltaje particular aplicado puede aumentar en el momento de la digestión del péptido.

60 De forma análoga, si un marcador está unido a un nucleótido, las características electroquímicas se verán influenciadas si el nucleótido está o no incorporado en un oligonucleótido, por la longitud de ese oligonucleótido, y por la secuencia del oligonucleótido especialmente en las proximidades del punto de unión.

65 La información relativa al marcador electroquímicamente activo se puede obtener por voltamperometría o por un método amperométrico. La voltamperometría de pulso diferencial es particularmente adecuada. Si se desea

el paso de detección electroquímica puede llevarse a cabo usando uno o más electrodos cubiertos por una membrana que es capaz de excluir selectivamente moléculas en base a una o más características, por ejemplo tamaño, carga o hidrofobicidad. Esto puede ayudar a eliminar el ruido de fondo corriente que surge de, por ejemplo, especies cargadas en la solución.

5 En una realización de la invención, los compuestos de la fórmula general I usado en el ensayo electroquímico son N,N-di-(ferrocenilalquilo)aminoalcoholes, el resto de aminoalcohol teniendo ventajosamente de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 8 átomos de carbono, especialmente de 3 a 6 átomos de carbono. Preferiblemente, el resto de alcohol es un resto de alcohol de cadena lineal que está no sustituido o sustituido y que está opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos y/o uno o más grupos. Ejemplos ilustrativos de heteroátomos son, por ejemplo, oxígeno, azufre o nitrógeno. Los grupos que pueden estar presentes incluyen sin limitación -O-, -S-, cicloalquilo, incluyendo heterocicloalquilo, -CO-, -CONH-, -NHCO- y -NH- y -NR<sup>1</sup>- en donde R<sup>1</sup> es alquilo C1 a C4. Los sustituyentes, cuando están presentes, pueden ser por ejemplo alquilo C1-C4 que puede ser opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; alqueno C1-C4, alqueno C1-C4 sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; arilo; o arilo sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido.

20 Preferiblemente, el resto alqueno del grupo diferrocenilalquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente uno o dos átomos de carbono. Preferiblemente, el resto alqueno es el mismo en ambos grupos ferrocenilalquilo. Así, preferiblemente, el grupo diferrocenilalquilo es diferrocenilmetilo o diferroceniletilo, en los que el resto ferrocenilo puede en cada caso estar independientemente no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes.

25 En los compuestos (incluyendo compuestos de etiquetado, compuestos de etiquetado funcionalizados y sustratos etiquetados) usados de acuerdo con la invención, incluyendo los compuestos de acuerdo con las fórmulas generales I, II y III y el resto de la etiqueta de la fórmula general IA, los dos grupos ferrocenilo Fc y Fc' son cada uno independientemente seleccionados de grupos ferrocenilo no sustituidos y sustituidos. En una realización los dos grupos ferrocenilo en los compuestos de acuerdo con las fórmulas generales I, II y III y el resto de etiquetación de la fórmula general la son cada uno ferrocenilo no sustituido. En otras realizaciones, uno o ambos anillos de pentadienilo de uno o cada uno de los restos de ferrocenilo pueden ser sustituidos por uno o más sustituyentes, la naturaleza y localización de los cuales son seleccionadas para influir de una manera deseada en las características redox del resto de ferroceno. Los anillos de pentadienilo del resto de ferrocenilo pueden adicionalmente o en su lugar ser sustituidos por cualquier sustituyente del anillo que no reduzca materialmente la sensibilidad electroquímica de la etiqueta. En una realización, al menos uno y preferiblemente ambos de los grupos ferrocenilo son restos de ferrocenilo sustituidos que tienen uno o más sustituyentes seleccionados de halo, alquilo C1-C4 que puede ser opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; alqueno C1-C4; alqueno C1-C4 sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; arilo; o arilo sustituido con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido. Los sustituyentes preferidos incluyen alquilo C1 a C4, por ejemplo metilo o etilo; alquilo C1-C4 sustituido con NH<sub>2</sub>, NHR<sup>2</sup>, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en donde R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno seleccionados independientemente de alquilo C1 a C4 de cadena lineal o ramificada; halo por ejemplo bromo o flúor; o alqueno C1 a C4, por ejemplo vinilo.

45 Por ejemplo, en una realización de la invención, cada grupo ferrocenilo incluye un único sustituyente en una posición del anillo adyacente a la posición en la que el grupo ferrocenilo está unido al resto de la molécula. Ilustrativo de esa realización es el compuesto bis((2-(dimetilamino)ferrocenilo)metilo)-6-aminohexanol. En otra realización ambos grupos ferrocenilo son no sustituidos. Ilustrativo de esa realización es el compuesto N,N-di(ferrocenilmetilo)-6-aminohexanol. Grupos ferrocenilo ilustrativos adicionales incluyen 1'-metilferrocenilo; 2-metilferrocenilo; 1'-vinilferrocenilo; 1'-bromoferrocenilo; y 2,3,4,5-tetrametil-1',2',3',4',5'-pentametilferrocenilo.

50 Se prefiere que los restos de ferrocenilo sean idénticos. Que se cree que da una señal más fuerte.

El resto Z puede ser sustituido o no sustituido. Los sustituyentes, cuando están presentes, pueden ser por ejemplo uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halo, ciano, amino, y alquilo C1-C4 no sustituido o sustituido, alqueno C1-C4, o arilo; en donde en cada caso los sustituyentes opcionales incluyen sin limitación hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido. El resto Z puede, si se desea, ser interrumpido por uno, o opcionalmente más de uno, átomo o resto seleccionado de -O-, -S-, cicloalquilo, incluyendo heterocicloalquilo, -CO-, -CONH-, -NHCO- y -NH- y -NR<sup>1</sup>- en donde R<sup>1</sup> es alquilo C1 a C4. Restos de cicloalquilo ilustrativos que pueden ser incluidos como interrupciones dentro del resto Z son anillos de cicloalquilo con de 5 a 7 átomos de anillo, especialmente 6 átomos de anillo, por ejemplo ciclohexilo, piepidinilo, morfolinilo.

60 Los restos X e Y, que son preferiblemente el mismo, tienen ventajosamente una longitud de cadena de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, especialmente uno o dos átomos de carbono, y más especialmente un átomo de carbono. Los restos X e Y pueden cada uno representar una cadena de alqueno, opcionalmente interrumpida por -O-, -S- o -NR<sup>5</sup>- por ejemplo -NH-. Los restos preferidos de X e Y incluyen, por ejemplo, CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-).

El ligamiento con el sustrato puede ser cualquier ligamiento adecuado, típicamente por ligamiento a una cadena lateral del sustrato. El grupo conector R en los compuestos de la fórmula general I puede ser cualquier grupo adecuado para efectuar el ligamiento con el sustrato ya sea directamente o a través de un grupo de funcionalización como se describe en la presente. R es preferiblemente un grupo hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido o un grupo que contiene un grupo hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido. Se apreciará, sin embargo, que cualquier otro grupo conector R puede ser seleccionado teniendo en cuenta el sustrato al cual, en uso, el compuesto va a ser unido. Se han desarrollado varios métodos sintéticos para la derivatización de cadenas laterales de proteínas, péptidos o aminoácidos o restos terminales de proteínas, péptidos o aminoácidos. Por ejemplo, los residuos de lisina en una proteína pueden derivatizarse por la reacción con un éster de succinimidilo. Para la derivatización en otros residuos de aminoácidos, se pueden usar otros métodos sintéticos conocidos. Por ejemplo, se puede usar un reactivo de maleimida para derivatizar residuos de cisteína. Se puede usar un éster de N-hidroxi succinimida para derivatizar el término amino o el grupo amino de la cadena lateral de una proteína o péptido, o un resto amino de un aminoácido.

Los métodos de derivatización adecuados para nucleótidos son también bien conocidos, por ejemplo, usando el resto de fosforamidita.

Los métodos de derivatización anteriores son ilustrativos de los métodos que pueden usarse para conectar los compuestos de la invención con un sustrato, aunque se pueden emplear otros métodos.

Los sustratos etiquetados de acuerdo con la invención pueden prepararse por la reacción de un compuesto de acuerdo con la invención, opcionalmente después de la funcionalización para obtener un compuesto de etiquetado funcionalizado, con un sustrato, por ejemplo, con un sustrato seleccionado de aminoácidos, nucleótidos (por ejemplo, oligo desoxirribonucleótidos u oligo ribonucleótidos), nucleósidos, azúcares, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos, carbohidratos y derivados de cualquiera de esas moléculas.

En una realización preferida, el sustrato es un nucleótido o un oligonucleótido. El nucleótido puede ser seleccionado de adenosina, timidina, guanosina, citidina o uridina. Preferiblemente el nucleótido, o un nucleótido del oligonucleótido, está unido a la etiqueta a través de un grupo unido al grupo ribosa o desoxirribosa del nucleótido, por ejemplo en la posición 2', 3' ó 5', por ejemplo a través de un átomo de oxígeno o nitrógeno. Más preferiblemente, el nucleótido está unido en la posición 3' o 5', por ejemplo en la posición 5'. El ligamiento en otras posiciones también es posible.

En el caso de nucleótidos, una manera ventajosa de ligar etiquetas de la invención es por la funcionalización con fosforamidita. El ligamiento de los grupos fosforamidita con oligonucleótidos es practicado ampliamente en síntesis de oligonucleótidos y así los métodos y condiciones para la unión a un oligonucleótido de etiquetas funcionalizadas con fosforamidita será bien conocido y un asunto rutinario para los expertos en la técnica. Además, permite ventajosamente el uso de métodos de fabricación de oligo estándar.

Los oligonucleótidos para su uso en un ensayo de acuerdo con la invención son ventajosamente nucleótidos que tienen de 2 a 50 nucleótidos, más preferiblemente de 2 a 40 nucleótidos especialmente de 15 a 35 nucleótidos, prefiriéndose especialmente de 18 a 30 nucleótidos. Para algunas aplicaciones pueden ser útiles oligonucleótidos más cortos, por ejemplo oligonucleótidos con de 2 a 14 nucleótidos, más preferiblemente de 2 a 10 nucleótidos.

La unión con proteínas, por ejemplo a través de cisteína, lisina, puede conseguirse en algunos casos por la incubación de la proteína y la etiqueta de ferrocenilo juntas a temperatura ambiente en una solución tampón apropiada. Cuando la etiqueta va a ser ligada ventajosamente con la cisteína o lisina pero la secuencia del sustrato no contiene cisteína o lisina en una posición adecuada la secuencia puede si se desea ser mutada para añadir uno o más residuos de cisteína o lisina ya sea como un residuo adicional o como una sustitución para otro residuo. Un método alternativo para la unión con proteínas puede incluir la biotilación de las etiquetas y el uso de proteínas estraptivinizadas comerciales (o viceversa). A modo de ejemplo, el sustrato puede ser biotilado por cualquier técnica estándar por ejemplo por el uso de un kit de biotilación comercialmente disponible. El sustrato biotilado enlazará con los compuestos conjugados de estreptavidina o avidina como los anticuerpos (que están disponibles comercial y ampliamente).

Será sin embargo aparente para el experto en la técnica que se pueden unir etiquetas similares con un sustrato en una selección de un número de localizaciones por el uso del grupo funcional de etiquetado apropiado.

En los compuestos de etiquetado funcionalizados de la fórmula general III:



A-L es preferiblemente un resto derivado de un compuesto de acuerdo con la fórmula general I y F es un grupo de funcionalización. Los compuestos de etiquetado funcionalizados preferidos de la fórmula general III

incluyen compuestos de la fórmula general IIIb:



5 en donde A-O es un resto derivado de un compuesto de acuerdo con la fórmula general I, preferiblemente por la pérdida de un átomo de hidrógeno de hidroxilo o grupo protector cuando el grupo conector R de la fórmula general I es hidroxilo o un grupo que contiene hidroxilo o es un grupo hidroxilo protegido, y F es un grupo de funcionalización.

10 Los grupos de funcionalización adecuados que pueden ser utilizables con etiquetas de la invención, incluyendo como el grupo de funcionalización F de la fórmula general III y la fórmula general IIIb, pueden incluir, sin limitación grupos éster de succinimidilo, grupos fosforamídita, grupos maleimida, grupos de biotina y azida. Se apreciará, sin embargo, que se puede usar cualquier grupo de funcionalización que facilite la unión del compuesto de etiquetado con el sustrato a ser etiquetado.

15 La invención también proporciona un método para detectar un ácido nucleico (por ejemplo ARN o ADN) en una muestra que comprende el paso opcional de amplificar el ácido nucleico (por ejemplo por PCR u otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos) seguido por el paso de poner en contacto el amplicón con una sonda de ácido nucleico complementaria bajo condiciones que permiten la hibridación entre la sonda y el amplicón, seguido por el  
20 paso de degradar selectivamente la sonda hibridada o sin hibridar (por ejemplo por el uso de nucleasas específicas de cadena sencilla o doble), en donde dicha sonda es etiquetada con un compuesto electroquímicamente activo de la invención y en donde el método proporciona el paso de medir la actividad electroquímica del compuesto que etiqueta la sonda en donde dicha actividad electroquímica es dependiente ya sea cuantitativamente o cualitativamente de la extensión de la degradación de la sonda.

25 La invención también proporciona un método para detectar un anticuerpo o derivado (que puede por ejemplo estar enlazado a un antígeno diana en un ensayo) con un compuesto electroquímicamente activo de la invención que comprende el paso de medir la actividad electroquímica del compuesto.

30 La invención también proporciona métodos para diagnosticar o monitorizar una enfermedad en un sujeto que comprenden usar un método de la invención en la detección de una proteasa o inhibidor de la proteasa asociados con dicha enfermedad en un tejido o fluido corporal del sujeto.

35 La invención también proporciona métodos para diagnosticar o monitorizar una enfermedad en un sujeto que comprende usar un método de la invención para detectar un péptido proteína asociados con dicha enfermedad en un tejido o fluido corporal del sujeto.

40 La invención también proporciona métodos para diagnosticar o monitorizar una enfermedad en un sujeto que comprende usar un método de la invención en la detección de una nucleasa o inhibidor de la nucleasa asociados con dicha enfermedad en un tejido o fluido corporal del sujeto.

Además, la invención proporciona el uso de un método de la invención para detectar una enfermedad en un sujeto.

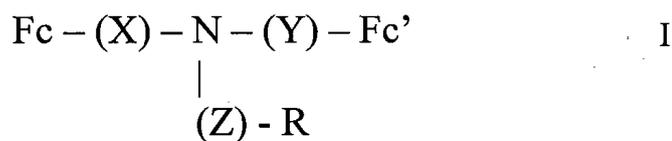
45 La invención también proporciona métodos para detectar un patógeno u otro organismo no deseado, por ejemplo un organismo del deterioro de alimentos, que comprende usar un método de la invención.

50 Además, la invención proporciona el uso de un derivado de N,N-di(ferrocenilalquilo)glicina, por ejemplo un derivado de N,N-di(ferrocenilalquilo)glicinamido, como una etiqueta electroquímica en un método de medición electroquímico.

55 La invención también proporciona un ensayo que comprende un sustrato etiquetado de la invención, opcionalmente en combinación con otros componentes del ensayo por ejemplo un recipiente de muestras, un contenedor que comprende electrodos para la detección electroquímica, enzimas para su uso en el ensayo o estándares y controles. Dicho ensayo puede comprender más de un sustrato etiquetado diferente de la invención. Si ese es el caso la presencia de sustratos etiquetados diferentes puede ser detectada diferencialmente etiquetándolos con etiquetas electroquímicas de la invención que tengan diferentes características electroquímicas (por ejemplo diferentes potenciales de oxidación) permitiendo de esta manera que el ensayo sea un ensayo multiplex (por ejemplo uno duplex) en el que sustratos diferentes puedan ser discriminados cuando están presentes en el mismo recipiente.

60 La invención proporciona en una realización adicional un compuesto de acuerdo con la fórmula general I

65



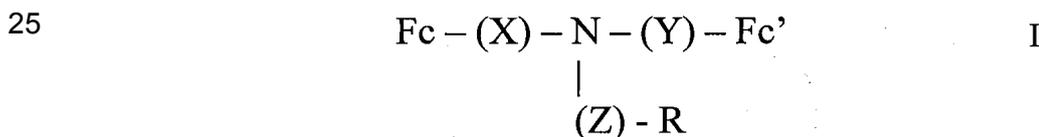
5

en la que:

- 10 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 15 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y  
 R es un grupo conector.

- 20 En esa realización se prefiere que cada resto de ferrocenilo sea sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, arilo, alqueno C1 a C4 y ciano.

En una realización adicional, la invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula general I



30

en la que:

- 35 Fc y Fc' son cada uno un resto de ferrocenilo sustituido,  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CONH -, - NHCO - o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y  
 40 R es un grupo conector.

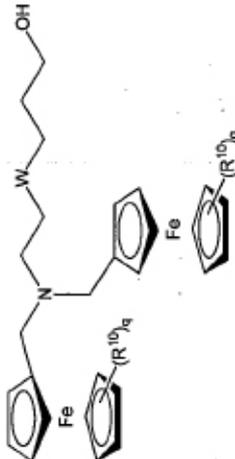
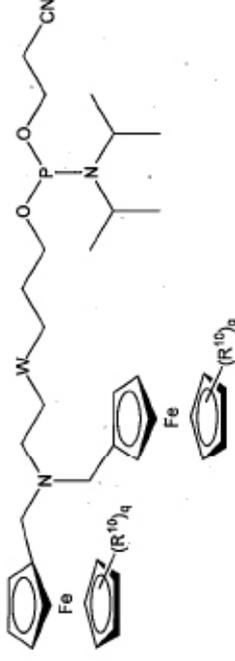
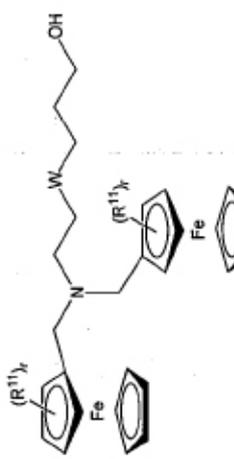
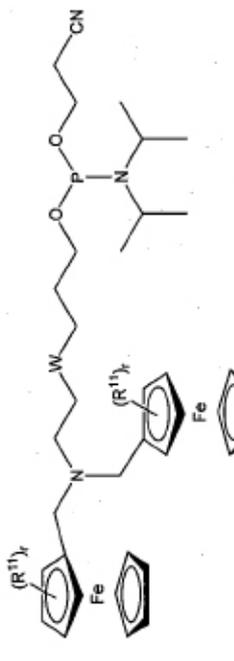
- 45 En esa otra realización adicional, se prefiere que X represente - (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> - en la que x es de 1 a 6; e Y representa - (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub> - en la que y es de 1 a 6.

- 50 En las mencionadas realizaciones adicionales y otras adicionales, Z preferiblemente representa alquileo C6 a C8 opcionalmente interrumpida por oxígeno. Preferiblemente, el grupo conector R comprende un grupo capaz de reaccionar con un grupo compatible de un resto de funcionalización o de un sustrato para unir el compuesto con dicho resto de funcionalización o dicho sustrato, por ejemplo R puede ser hidroxilo, hidroxilo protegido o un resto que contiene un hidroxilo o grupo protegido hidroxilo.

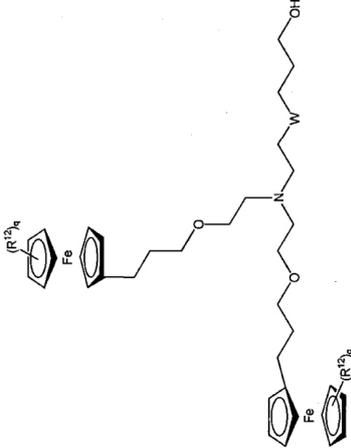
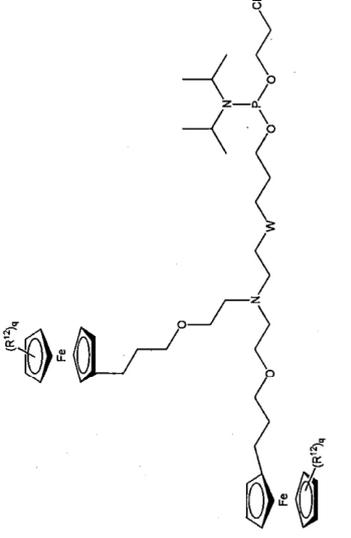
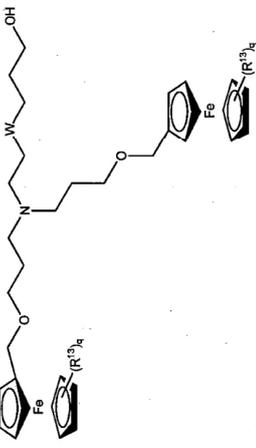
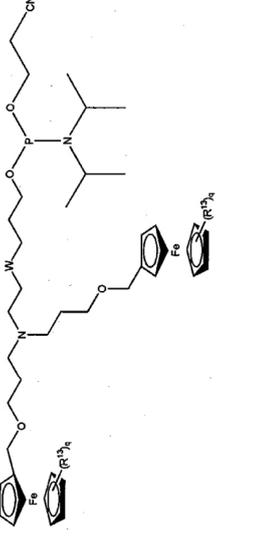
- 55 La Tabla 1 a continuación establece en las fórmulas generales IVa, Va, VIa, VIIa y VIIIa ciertos compuestos preferidos de acuerdo con la invención que pueden usarse como etiquetas en ensayos electroquímicos de acuerdo con la invención, y que pueden ser usados para hacer compuestos de etiquetado funcionalizados y sustratos etiquetados de acuerdo con la invención. La Tabla 1 también establece en las fórmulas generales IVb, Vb, VIb, VIIb y VIIIb compuestos de etiquetación funcionalizados correspondientes ilustrativos de acuerdo con la invención. En las fórmulas en la Tabla 1, excepto cuando las consideraciones de impedimento estérico mitigan contra ello, cada ferrocenilo puede tener más de un sustituyente R, que puede ser el mismo o diferente, y en cualquier posición del anillo. Cuando hay uno o más sustituyentes en uno de los grupos ferrocenilo, el otro grupo ferrocenilo se entiende que tiene los mismos sustituyentes en las mismas posiciones.

65

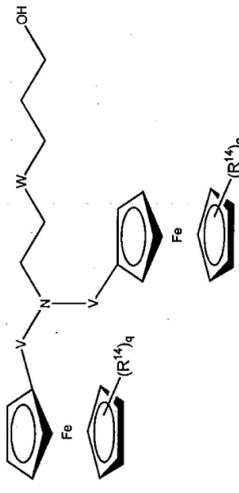
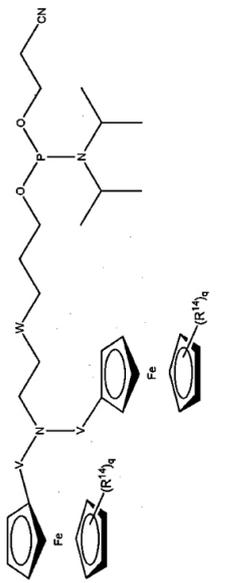
Tabla 1: Compuestos ilustrativos y compuestos de etiquetado funcionalizados

IVa	 <p>en la que R<sup>10</sup> si está presente representa halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, especialmente fluoroalquilo, fenilo, alqueno C1 a C4, por ejemplo, vinilo o ciano; q representa de 0 a 5, por ejemplo 1; y W representa (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es de 0 a 6, O, S o NR<sup>2a</sup> donde R<sup>2a</sup> es alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4</p>	IVb	 <p>En las que R<sup>10</sup>, q y W son como se define con referencia a la fórmula general IVa</p>
Va	 <p>en la que R<sup>11</sup> si está presente representa alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4, arilo, por ejemplo fenilo, o amino alquilo, especialmente amino alquilo sustituido por dialquilo, por ejemplo di(alquilo C1-C4)aminometilo; r representa de 1 a 4, por ejemplo 1; y W representa (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es de 0 a 6, O, S o NR<sup>2a</sup> donde R<sup>2a</sup> es alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4</p>	Vb	 <p>En la que R<sup>11</sup>, r y W son como se define con referencia a la fórmula general Va</p>

(continuada)

<p>VIIa</p>	 <p>en la que R<sup>12</sup> si está presente representa halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, especialmente fluoroalquilo, fenilo, alquenos C1 a C4, por ejemplo vinilo o ciano; q representa de 0 a 5, por ejemplo 1; y W representa (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde n es de 0 a 6, O, S o NR<sup>20</sup>, donde R<sup>20</sup> es alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4</p>	<p>VIIb</p>	 <p>en la que R<sup>12</sup>, q y W son como se define con referencia a la fórmula general VIIa</p>
<p>VIIa</p>	 <p>en la que R<sup>13</sup> si está presente representa halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, especialmente fluoroalquilo, fenilo, alqueno C1 a C4, por ejemplo vinilo, o ciano; r representa de 1 a 4, por ejemplo 1; y W representa (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde n es de 0 a 6, O, S o NR<sup>20</sup>, donde R<sup>20</sup> es alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4</p>	<p>VIIb</p>	 <p>en la que R<sup>13</sup>, r y W son como se define en referencia a la fórmula general VIIa</p>

(continuada)

<p>VIIa</p>	 <p>en la que R<sup>14</sup> si está presente representa halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, especialmente fluoroalquilo, fenilo, alqueno C1 a C4, por ejemplo vinilo, o ciano; q representa de 0 a 5, por ejemplo 1; W representa (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> donde n es de 0 a 6, O, S o NR<sup>20</sup> donde R<sup>20</sup> es alquilo, por ejemplo alquilo C1 a C4; y V representa (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> donde m representa de 2 a 6</p>
<p>VIIIb</p>	 <p>En la que R<sup>14</sup>, q, W y V son como se define en referencia a la fórmula general VIIa</p>

5 En las fórmulas generales IVa, Va, VIa, VIIa y VIIIa y sus contrapartes funcionalizadas en la Tabla 1, cuando uno o más sustituyentes del anillo R<sup>11</sup> o R<sup>13</sup>, están presentes en el anillo de pentadienilo proximal de cada ferrocenilo, es decir, el anillo que está enlazado directamente con el resto de la molécula, hay preferiblemente un sustituyen de dicho anillo en una posición del anillo adyacente con ese enlace. Cuando está presente más de un sustituyente del anillo R<sup>11</sup> o R<sup>13</sup> en cada anillo de pentadienilo proximal, esos sustituyentes pueden estar en cualquier posición uno respecto del otro. Cuando está presente más de un sustituyente del anillo R<sup>10</sup>, R<sup>12</sup> o R<sup>14</sup> en cada anillo de pentadienilo distal de cada ferrocenilo, es decir el anillo alejado del enlace que liga el ferrocenilo con el resto de la molécula, esos sustituyentes pueden estar en cualquier posición en relación uno del otro. Mientras que en las fórmulas generales IVa, Va, VIa, VIIa y VIIIa y sus contrapartes funcionalizadas en la Tabla 1 se muestran sustituyentes del anillo en o el anillo proximal o el distal, es también posible que ambos anillos de pentadienilo de cada ferrocenilo lleven uno o más sustituyentes.

15 En una realización especialmente preferida el compuesto es N,N-di(ferrocenilmetilo)-6-aminohexanol (referido en los Ejemplos siguientes como Etiqueta A). Otras etiquetas preferidas que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen:

2-(((diferrocenilmetil)amino)-1-(4-hidroximetil)piperidina-1-il)etanona; y  
N,N-di-(ferrocenilmetil)-2-aminoetoxi) etanol

20 en la que el o cada resto de ferrocenilo puede estar no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes. El compuesto N,N-diferrocenilmetil-6-aminohexanol, en el que los grupos ferrocenilo están ambos no sustituidos, se ha descubierto que tiene buenas características electroquímicas. Como se ilustra en los Ejemplos en la presente, la incorporación de uno o más sustituyentes en cada uno de los grupos ferrocenilo (los sustituyentes en cada ferrocenilo siendo los mismos) en ese compuesto puede usarse para obtener compuestos con características electroquímicas modificadas, proporcionando a través de la selección de sustituyentes apropiada un paquete de compuestos de los que dos o más pueden ser seleccionados para el propósito de reacciones multiplex.

30 Ciertos compuestos ilustrativos de acuerdo con la invención que se ha descubierto que tienen buenas propiedades electroquímicas se exponen en la Tabla 2:

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2: Compuestos de etiquetado ilustrativos de acuerdo con la invención

<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) terminating in a hydroxyl group (-OH).</p>	<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a short alkyl chain (approximately 2 carbons) ending in a hydroxyl group (-OH).</p>
<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a short alkyl chain ending in a carboxylic acid group (-COOH).</p>	<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. This nitrogen atom is also connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) ending in a hydroxyl group (-OH). Another nitrogen atom, substituted with two methyl groups, is also connected to the ferrocene core via a methylene bridge.</p>
<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a short alkyl chain ending in an amide group (-CONH-), which is then connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) terminating in a hydroxyl group (-OH).</p>	<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. This nitrogen atom is part of a complex side chain that includes a phosphonate group (-O-P(=O)(O-)-O-) and a dimethylamino group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).</p>
<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a short alkyl chain ending in an amide group (-CONH-), which is then connected to a piperidine ring. The piperidine ring has a long alkyl chain (approximately 4 carbons) terminating in a hydroxyl group (-OH).</p>	<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) ending in a hydroxyl group (-OH). Two additional ferrocene units are attached to the nitrogen atom via methylene bridges.</p>
<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) ending in a hydroxyl group (-OH). Two additional ferrocene units, each substituted with a bromine atom (Br), are attached to the nitrogen atom via methylene bridges.</p>	<p>Chemical structure showing a ferrocene core (two cyclopentadienyl rings sandwiching an iron atom, labeled 'Fe') connected via a methylene bridge to a nitrogen atom. The nitrogen atom is further connected to a long alkyl chain (approximately 7 carbons) ending in a hydroxyl group (-OH). Two additional ferrocene units are attached to the nitrogen atom via methylene bridges.</p>

## BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 es una representación esquemática de una célula electroquímica usada en las mediciones con voltamperometría de pulso diferencial descritas en la presente;

La Figura 2 es un voltamperograma de pulso diferencial de la Etiqueta A como la fabricada en el Ejemplo 1 a continuación;

La Figura 3 es un voltamperograma de pulso diferencial de la Etiqueta B como la fabricada en el Ejemplo 2 a continuación;

10 La Figura 4 es un voltamperograma de pulso diferencial de la Etiqueta C como la fabricada en el Ejemplo 3 a continuación;

La Figura 5 muestra exploraciones voltamperométricas para tanto la muestra positiva como negativa de *Chlamydia* de acuerdo con el Ejemplo 5(a) a continuación;

La Figura 6 es un análisis de espectrometría de masas de un mononucleótido y un dinucleótido sintetizados con la etiqueta electroquímica etiqueta A como se describe en el Ejemplo 5(a) a continuación;

15 La Figura 6 es un análisis de espectrometría de masas del producto del ensayo del Ejemplo 5(a);

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra las mediciones corrientes tomadas cuando una diana *Chlamydia* es añadida directamente a una reacción de PCR en un intervalo de concentraciones y detectada usando una sonda de oligonucleótidos como se describe en el Ejemplo 5(b) a continuación;

20 La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra la corriente de pico en un intervalo de concentraciones cuando la diana *Chlamydia* fue añadida a un proceso de extracción de ADN y la salida del proceso de extracción fue amplificada usando PCR, después detectada usando una sonda de oligonucleótidos etiquetada con la Etiqueta A, como se describe en el Ejemplo 5(a) a continuación;

La Figura 10 muestra una comparación entre la detección electroquímica usando la sonda de la etiqueta A y un ensayo qPCR basado en SYBR Green para Norovirus;

25 La Figura 11 muestra una comparación entre la detección electroquímica usando la sonda de la etiqueta A y un ensayo qPCR basado en SYBR Green para *Streptococcus equi*;

La Figura 12a es una exploración voltamperométrica usando la etiqueta A acoplada a una IgG anti-cabra comercialmente disponible;

La Figura 12b muestra exploraciones voltamperométricas de micropartículas de acuerdo con el Ejemplo 8 a varias concentraciones;

30 La Figura 14 es una voltamperometría de pulso diferencial de la etiqueta D como la fabricada en el Ejemplo 9 a continuación;

## DESCRIPCION DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES PREFERIDAS

35 Con referencia a la Figura 1, se muestra esquemáticamente una célula electroquímica 1 adecuada para su uso en los experimentos de voltamperometría cíclicos descritos en la presente. La célula comprende un recipiente 2, que contiene una solución de electrolito de fondo 3, que es una solución de 100 mM acuosa de cloruro sódico. Sumergido en la solución 3 hay un electrodo de trabajo de carbono impreso 5, un contra electrodo de carbono impreso 6 y un electrodo de referencia de cloruro de plata/plata 7, todos con conectores de plata. La muestra es esparcida en la superficie del electrodo de trabajo y la voltamperometría se realiza conectando los conectores de plata con los cables apropiados en el potenciómetro. A modo de ilustración la muestra se puede preparar como sigue: el precursor de la etiqueta de Ferroceno (2ng) se disuelve en DMSO (1mL). Se toma una alícuota de 10  $\mu$ L de esta solución y se diluye adicionalmente en el tampón (500 $\mu$ L). Después se aplica una alícuota (20 $\mu$ L) al electrodo impreso de la pantalla para ejecutar la exploración electroquímica.

45

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

## MATERIALES Y METODOS -Síntesis y ensayos de etiquetas

50 El ácido carboxílico de ferroceno se obtuvo de Sigma-Aldrich. El carboxaldehído de ferroceno se obtuvo de Sigma-Aldrich.

El 6-Aminohexanol se obtuvo de Sigma-Aldrich.

La glicina se obtuvo de Sigma-Aldrich.

55 La N,N-diisopropiletilamina se obtuvo de Sigma-Aldrich.

La 2-cianoetildiisopropilclorofosforoamidita se obtuvo de Sigma-Aldrich.

La solución de papaína a una concentración de 1 mg/ml se obtuvo de Sigma-Aldrich.

La IgG anti-cabra y la IgG de cabra biotinilada se obtuvieron de Sigma.

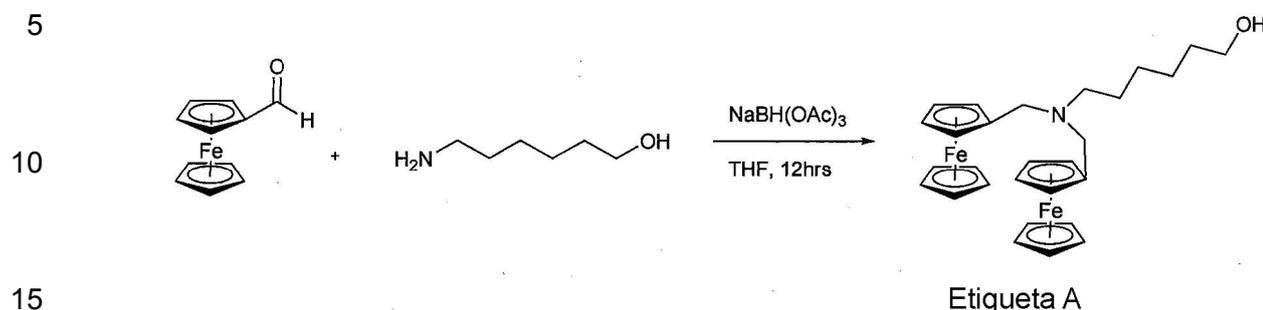
60 Los métodos de PCR se realizaron usando un Controlador Térmico Programable PTC-100 o PTC-200 (MJ Research Inc.) o un termociclador de lecho plano PeqLab. Los pocillos de microtitulación recubiertos con estreptavidina fueron pocillos de alta densidad Sigma Screen™.

MATERIALES Y METODOS - *Detección electroquímica*

65 Los electrodos están basados en tinta y son impresos en pantalla a un sustrato de polímero (por ejemplo

Mylar) seguido por curado por calor - producidos por Placa de Identificación GM (Seattle, WA).

### EJEMPLO 1 - Síntesis de N,N-diferrocenilometil-6-aminohexanol [Etiqueta A]



20

25

30

Se añadieron carboxaldehído de ferroceno (2,1 g, 9,81 mmol) y 6-aminohexano-1-ol (0,5 g, 4,27 mmol) en THF seco (25 mL) a un recipiente secado en horno. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (2,3 g, 10,90 mmol) en porciones a la solución. La reacción se dejó durante la noche. La reacción se recogió en acetato de etilo (40 mL), la capa orgánica se lavó con NaCO<sub>3</sub> (sat; 20 mL), Salmuera (20 mL) y agua MilliQ (20 mL). La fracción orgánica fue después secada sobre sulfato de magnesio y el solvente se eliminó al vacío. El producto bruto es después columnado usando 9:1 solución B:solución A (solución A: acetato de etilo 95% TEA 5%, solución B: éter de petróleo 40-60 95%, TEA 5%) para obtener el producto puro (sólido naranja oscuro). 85 de Rendimiento <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.18 (2H, s, Cp), 4.17 (2H, s, Cp), 4.13 (15H, s, Cp), 3.66 (4H, t, J = 6.25Hz, CH<sub>2</sub>), 3.48 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.20 (2H, t, J = 6, CH<sub>2</sub>), 1.59 - 1.31 (6H, m, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75.5 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 77.83, 77.40, 76.98, 70.58, 68.88, 63.36, 53.02, 52.17, 33.10, 27.43, 25.88. HRMS (ESI) calculado para C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>Fe<sub>2</sub> m/z 519.1430 encontrado 519.1438.

La electroquímica del compuesto **Etiqueta A** se muestra en el voltamperograma de la Figura 2.

Se descubrió que la etiqueta del producto tenía un potencial de redox de 0,275 V.

### EJEMPLO 2 - Síntesis de di-((dimetilamino)metilferrocenilmetil)-6-aminohexanol (Etiqueta B)

35

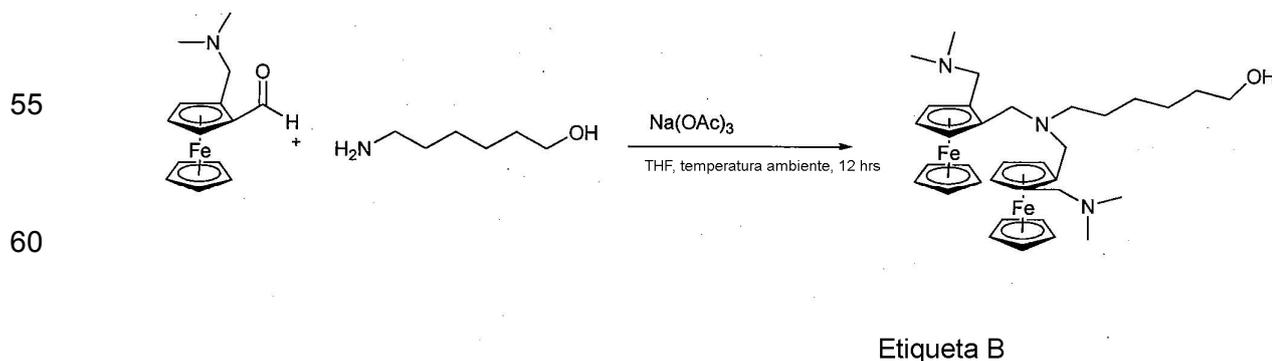
(a) Síntesis de Dimetilamino)metil ferrocenecarobaldehído (Diaminometil)metilferroceno (1g, 5mmol) se disolvió en Et<sub>2</sub>O, se añadió n -butil litio (2,51 mL, 6,25 mmol) despacio y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas.

40

Después de 16 horas, la mezcla de la reacción se inactivó con DMF (0,4 mL, 6,25 mmol) y se agitó de nuevo a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió después agua (15 mL) a la reacción. La fase orgánica fue después extraída con éter (2x25mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y el solvente fue eliminado bajo vacío para proporcionar el producto en un rendimiento del 72% (aceite rojo/marrón) oscuro. <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.81 (1H, s, CHO), 4.21(2H, s, Cp), 4.14 (5H, s, Cp), 3.64 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.08 (6H, s, NMe<sub>2</sub>) <sup>13</sup>C NMR (75.5 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.2, 86.7, 83.4, 77.8, 77.5, 77.0, 76.62, 75.8, 71.8, 70.3, 70.2, 70.0, 68.4, 68.0, 59.2, 56.6, 44.8, 44.7. HRMS (ESI) calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>Fe<sub>1</sub> m/z 272.0737 encontrado 272.0731

Ref: Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L. A., Brocard, J. S., Domarle, O., Blampain, G., Millet, P., Georges, A. J., Abessolo, H., Dive, D., Lebibi, J. J. Med. Chem. 1997, 40, 3715-3718.

50 (b) Síntesis de Etiqueta B

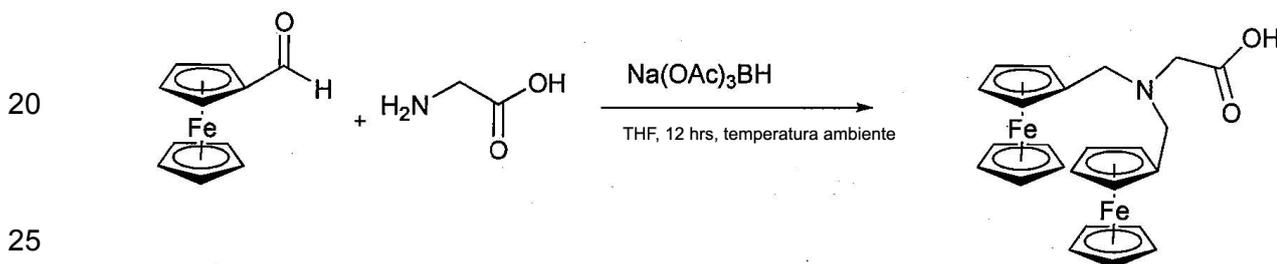


Se disolvió (dimetilamino)metil ferrocenocarboxaldehído (1,2 g, 4,04 mmol) en THF seco (30mL). Se añadió 6-aminohexano-1-ol (0,25 g, 2,13 mmol). Después se añadió el triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g, 6,16 mmol) a la mezcla de la reacción. La solución se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron acetato de etilo (20 mL) y 1N NaOH (sat; 20 mL) y la capa orgánica se extrajo con NaCO<sub>3</sub> (25 mL), Salmuera (25 mL) y agua filtrada Milli Q (25 mL) después se seco sobre MgSO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó al vacío para producir un aceite naranja (0,95, 75%). <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.18 (2H, s, Cp), 4.17 (2H, s, Cp), 4.13 (15H, s, Cp), 3.66 (4H, t, J = 6.25Hz, CH<sub>2</sub>), 3.48 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.20 (2H, t, J = 6, CH<sub>2</sub>), 2.17 (12H, s, CH<sub>3</sub>) 1.59 -1.31 (6H, m, CH<sub>2</sub>). HRMS (ESI) calculado para C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>1</sub>Fe<sub>2</sub> m/z 627.3012 encontrado 627.3126.

La electroquímica del compuesto del producto se muestra en el voltamperograma en la Figura 3. Se descubrió que el producto etiqueta B tenía un potencial redox de 0,38V.

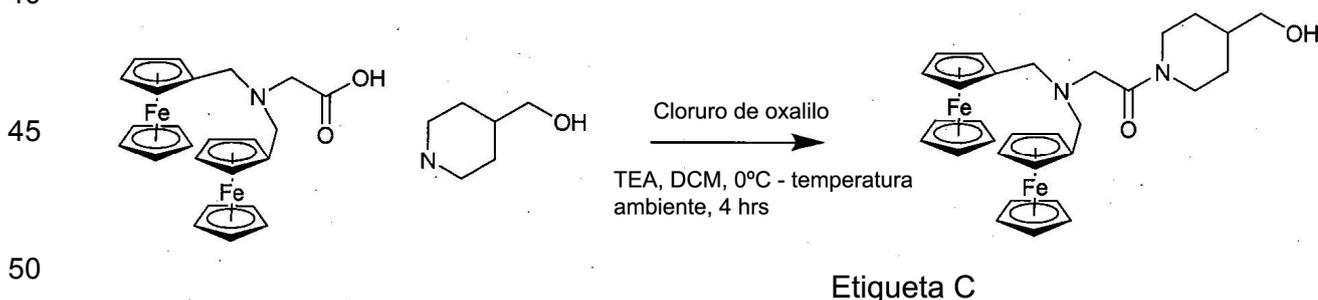
### EJEMPLO 3: Síntesis de 2-((diferrocenilmetil)amino)-1-(4-(hidroximetil)-piperidin-1-il)etanona (Etiqueta C)

(a) Síntesis de N,N-(diferrocenilmetil)glicina



se añadió carboxaldehído de ferroceno (2,1 g) a un matraz de fondo redondo que contenía THF seco (20 mL). Se añadió glicina (0,5 g) a la solución y la reacción se agitó bajo N<sub>2</sub>. Se añadió en porciones triacetoxiborohidruro de sodio (2,3 g) a la solución de agitación. La reacción se agitó durante la noche. La solución fue después particionada entre acetato de etilo (40 mL) y hidróxido de sodio acuoso 1M (40 mL). La fracción orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (sar; 20 mL), salmuera (40 mL) y agua (40 ml). La fracción orgánica se secó usando MgSO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó. El producto bruto fue después columnado (solvente A: éter de petróleo 40-60: TEA 95:5, Solvente B. acetato de etilo: TEA 95:5). El producto fue un sólido naranja oscuro (80%). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.099 (1H, s, CpH), 4.052 (1H, s, CpH), 4.022 (7H, s, FcCpH), 3.549 (4H, t, J = 6.75, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.348 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 1.979 (1H, s, OH). <sup>13</sup>C NMR (75.5Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.5, 78.0, 77.5, 77.1, 68.9, 67.4, 61.1. HRMS (ESI) calculado para C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub> m/z: 477.3974 encontrado 477.4213

(b) Síntesis de etiqueta C de diferrocenilglicina

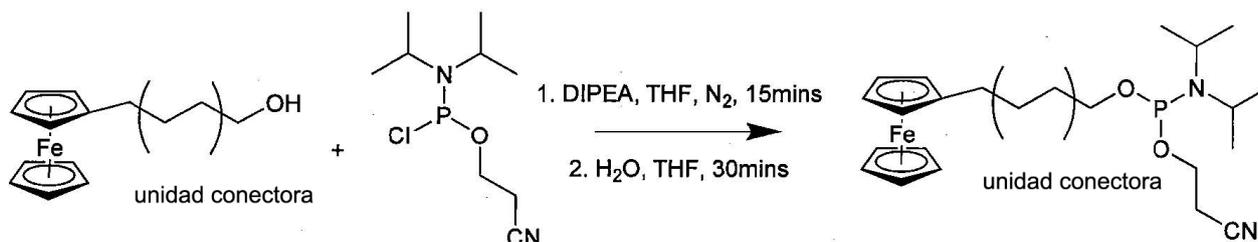


Se añadió cloruro de oxalilo (0,87 mL) en DCM seco (2 mL) gota a gota a través de un embudo de goteo de igualación de presión a una solución agitada del derivado de di-ferrocenil glicina obtenido en el 3(a) anterior en DCM seco (100 mL) a 0° C bajo N<sub>2</sub>. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Después se eliminó el solvente y el producto de cloruro de ácido se recogió en DCM seco (75 mL). Se añadió 6-amino hexano-1-ol (0,56 g) en DCM seco (75 mL) gota a gota a través de un embudo de goteo a 0° C bajo N<sub>2</sub>. La reacción fue después agitada durante 2 horas mientras se calentaba a temperatura ambiente. La solución fue después lavada con NaHCO<sub>3</sub> (sat; 100 mL) y 1.0M HCL (100 ml). Se secó la fracción orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> después se eliminó el solvente para dar el producto (58%). Un sólido naranja/amarillo. <sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.11 (12H, s, FcCp), 3.65 (4H, t, J = 6.0Hz, CH<sub>2</sub>), 3.55 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 1.48 -1.18 (5h, m, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75.5Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.32, 77.80, 77.39, 76.90, 62.10, 38.85, 35.45, 32.02, 30.67, 26.75, 25.54, 25.44. m/z: 576.

La electroquímica del compuesto del producto Etiqueta C se muestra en la Tabla 3 a continuación y en el voltamperograma de la Figura 4.

Tabla 3: Actividad Electroquímica de la Etiqueta C

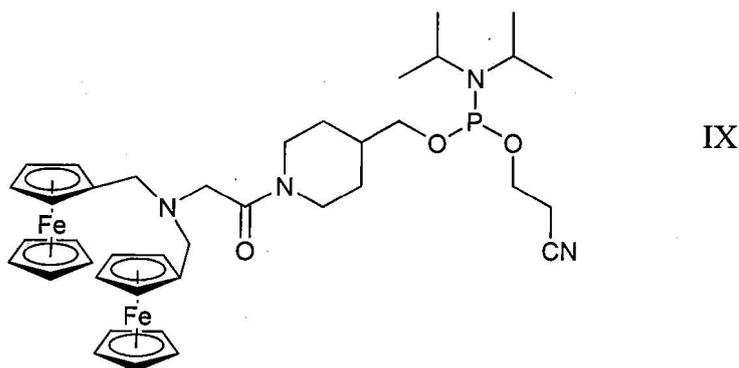
Posición del Pico(mV)	Altura del Pico
410	6.79e <sup>-6</sup>
425	8.47e <sup>-6</sup>
415	8.56e <sup>-6</sup>

**EJEMPLO 4: Procedimiento sintético general para unir grupo funcional de fosforamidita**

El derivado de ferrocenilo mostrado como un material de partida en el esquema de la reacción anterior es ilustrativo, y puede ser reemplazado por un equivalente molar de cualquiera de los compuestos hechos en los Ejemplos 1 a 3 anteriores o los Ejemplos 9 a 13 a continuación.

Se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,4 mL, 8,4 mmol) a una solución agitada del derivado de ferroceno (2,1 mmol) en THF seco (25 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió 2-cianoetildiisopropilclorofosforamidita (0,2 ml, 3,15 mmol) gota a gota y la mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. Se añadió agua filtrada MilliQ (200 mL) y la solución se agitó durante 30 minutos adicionales. Se añadió acetato de etilo -trietilamina (1:1, 25 mL), se formó un precipitado. La mezcla se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 mL) y agua filtrada MilliQ (25 mL). La fracción orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y el solvente se eliminó bajo vacío. El producto bruto fue después purificado por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo; acetato de etilo 9:1).

Usando el proceso anteriormente descrito con la Etiqueta C como el material de partida de ferrocenilo, se obtuvo un compuesto funcionalizado de fosforamidita de fórmula IX, que tiene los datos de caracterización enumerados a continuación.



<sup>1</sup>H NMR (500MHZ, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.23 (2H, s, Cp), 4.18 (2H, s, Cp), 4.13 (15H, s, Cp), 3.90-3.82 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.71-3.54 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.44 (4H, s, CH<sub>2</sub>), 2.64 (2H, t, J = 6, CH<sub>2</sub>), 2.35 (2H, t, J = 6.5, CH<sub>2</sub>), 1.69 -1.35 (85H, m, CH<sub>2</sub>, CH), 1.23 (12H, t, J = 7, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P NMR (DEC) (202.5Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.23. HRMS (ESI) calculado para C<sub>39</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Fe<sub>2</sub>P<sub>1</sub> m/z: 768.0973 encontrado 768.1254.

**EJEMPLO 5 - Uso de Etiqueta A acoplada a la sonda de oligonucleótidos**

La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo usando técnicas de síntesis en fase sólida de oligonucleótidos estándar los nucleótidos siendo añadidos paso a paso en el extremo 5' de la cadena de oligonucleótidos. Cada adición a la cadena de oligonucleótidos implica cuatro reacciones que son los pasos de desbloqueo, acoplamiento, taponado y oxidación. Una vez que la secuencia de oligonucleótidos ha sido completada a la longitud deseada la etiqueta electroquímica se añadió a través de un ligamiento de fosforamidita.

**Método**

5 La secuencia diana fue amplificada de una diana de *Chlamydia trachomatis* por un método PCR estándar usando cebadores específicos de la diana 5' y 3' y un Paso de uracil-ADN glicosilasa (UDG). Las condiciones del PCR se resumen en la Tabla 1 siguiente. Cuando la reacción de PCR se completó, se añadió una sonda de oligonucleótidos (etiquetada con la Etiqueta electroquímica A en el 5' terminal) complementaria a una secuencia intermedia en la posición de la diana entre los cebadores 5' y 3' a los productos de la reacción de PCR y se permitió que emparejase con su diana en el amplicón. Se añadió T7 exonucleasa (Que es específica para ácido nucleico de cadena doble) al tubo y se incubó para permitirle digerir el dsARN. La sonda fue digerida por la T7 exonucleasa en la medida en que fue emparejada con el amplicón del PCR. Se llevo entonces a cabo la detección electroquímica, mostrando un pico en un potencial redox característico de 0,2 V para el nucleótido del producto de la digestión etiquetado con la Etiqueta A.

15

Tabla 4

Componente	Concentración
Tampón de PCR	1X
MgCl <sub>2</sub>	5mM
dUTP mix	1X
Cebador directo	0.04µM
Cebador inverso	0.3µM
Taq	2.5 U
UNG	0.5 U

20

25

30

**Protocolo de UNG**

35 37°C x 10 minutos  
37°C x 10 minutos

**Protocolo de PCR:**

40 94°C x 30 segundos

58° C x 45 segundos

72°C x 60 segundos

45 Repetir los pasos x 39 ciclos (40 ciclos en total)

72°C x 7 minutos

**Resultados**

50

La Figura 5 muestra la altura del pico, como una corriente, en el potencial redox conocido (específico de la etiqueta) para tanto la muestra positiva (el pico fuerte) como la muestra negativa (ausencia de pico) de la *Chlamydia trachomatis*.

55

La Figura 6 muestra un análisis de espectrometría de masas de un mononucleótido y un dinucleótido sintetizados con la etiqueta electroquímica etiqueta A. La Figura 7 es un análisis de espectrometría de masas del producto del ensayo, que muestra la correlación exacta con un mononucleótido acoplado con la etiqueta electroquímica etiqueta A , el resto electroquímico detectado en el ensayo.

60

La Figura 8 muestra los resultados de un experimento donde la diana de *Chlamydia* se añade directamente a la reacción de PCR en un intervalo de concentraciones. Esta es amplificada usando PCR, después detectada usando una sonda de oligonucleótidos de la etiqueta A.

65

La Figura 9 muestra el resultado para un experimento donde se añaden un intervalo de concentraciones de la diana de *Chlamydia* a un proceso de extracción de ADN (es decir, no añadidas directamente al PCR) y la salida

del proceso de extracción se amplifica usando PCR, después se detecta usando una sonda de oligonucleótidos con la Etiqueta A.

**EJEMPLO 6 - Comparación de rendimiento con qPCR**

a) La Figura 10 muestra una comparación entre la detección electroquímica usando la sonda de la Etiqueta A y un ensayo qPCR basado en SYBR Green para Norovirus. Los materiales y protocolos son como sigue:

**Bioline SensiMix dU**  
**Bioline 1X SYBR Green**  
**0.3 μM cebador directo**  
**0.3 μM cebador inverso**  
**0.5 U UNG**  
**protocolo de UNG:**

37°C x 10 minutos  
 60° C x 2 minutos

**protocolo de qPCR**

95°C x 10 minutos (paso de activación de taq)  
 95°C x 10 segundos  
 45°C x 10 segundos  
 72°C x 10 segundos (adquisición de SYBR)  
 Repetir los 3 últimos pasos x 39 ciclos (40 ciclos en total)  
 47°C - 95°C en incrementos de 1°C (fundir el punto final para comprobar la amplificación no específica)

Un inverso decimalizado del valor de Ct se ha usado para los resultados del qPCR para proporcionar una comparación directa con los resultados electroquímicos.

Los datos muestran el límite de detección para el ensayo electroquímico que sea 200 ag. El límite de detección para el ensayo de qPCR se muestra como entre 2 y 20 fg. Por debajo de este nivel el valor de Ct es mayor que el punto de corte de 40 ciclos, mostrado en la línea horizontal como el inverso de un valor de Ct de 40. Los negativos del qPCR no superan el umbral. Esto demuestra la sensibilidad ventajosa del ensayo electroquímico usando la Etiqueta A.

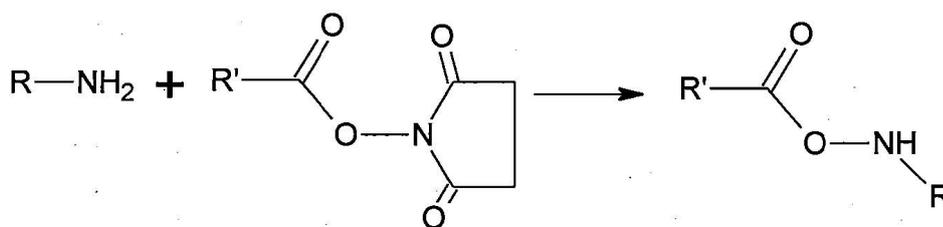
b) La Figura 11 muestra una comparación entre la detección electroquímica usando la sonda de la Etiqueta A y un qPCR basado en SYBR Green para *Streptococcus equi*.

Los datos muestran que tanto el ensayo electroquímico como el ensayo de qPCR son capaces de detectar hasta la concentración de ADN más baja probada en este experimento (20fg). La proporción señal:ruido para la detección electroquímica a 20fg fue de 4:1 en este experimento. 20 fg se equipara a 8 copias genómicas de ADN de *S. equi*.

**EJEMPLO 7 - Etiqueta A enlazada directamente con la proteína**

a) La Figura 12a es una exploración voltamperométrica usando la Etiqueta A acoplada directamente con la amina primaria de una IgG anti-cabra comercialmente disponible, usando un éster NHS activo (éster de N-hidroxisuccinimida).

El siguiente esquema de reacción generalizado ilustra la unión de la etiqueta con una amina libre de, por ejemplo, un residuo de lisina en la IgG anti-cabra.



Amina libre, por ejemplo, lisina

Ester de NHS activo de ácido R' carboxílico

Conjugado de amina

La IgG de cabra biotinizada comercialmente disponible fue inmovilizada en un pocillo de microtitulación cubierto con estreptavidina. La IgG anti-cabra de la etiqueta A fue después incubada en el pocillo que

contenía la IgG de cabra inmovilizada, esta fue después eliminada con lavado. Se añadió una solución de papaína al pocillo y se incubó para permitir la digestión del anticuerpo secundario, con la solución resultante leída electroquímicamente. El control en este experimento siguió el mismo procedimiento, pero la incubación final se llevó a cabo sólo en tampón, sin papaína.

La Figura 12a muestra que una señal electroquímica en el potencial de oxidación conocido para la etiqueta A se libera cuando hay presente papaína, pero no está presente en ausencia de papaína. Esto muestra que la etiqueta A está enlazada directamente con el anticuerpo en este ensayo y la señal sólo se observa cuando el anticuerpo es digerido, liberando la etiqueta electroquímica.

b) Los datos en la Figura 12b usa el mismo modelo de ensayo que en el Ejemplo 7a) anterior, excepto que se muestra un experimento del curso temporal de la digestión de la papaína. EN este experimento el control fue el anticuerpo secundario de la etiqueta A (IgG anti-cabra) que se añadió a un pocillo sin anticuerpo de IgG de cabra inmovilizado.

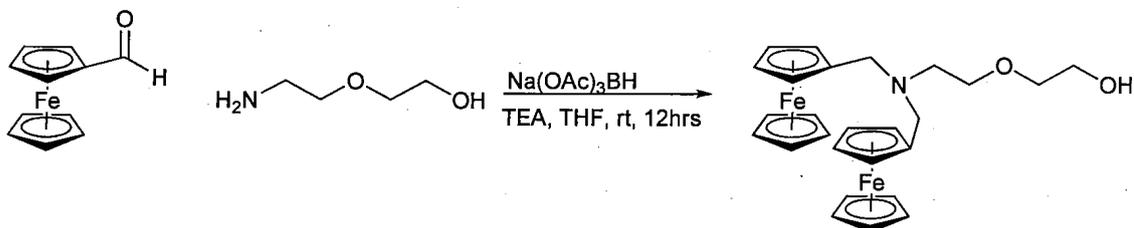
### EJEMPLO 8 - Etiqueta A enlazada a micropartículas

Se acopló una molécula de biotina con la etiqueta A. La biotilación puede llevarse a cabo en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado o usando condiciones de laboratorio estándar por la reacción de la etiqueta de fosoramidita de ferrocenilo con ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de biotina. Las partículas de treptavidina paramagnéticas se lavaron x 3 (tampón de fosfato) y se mezclaron con la etiqueta biotilada, seguido por la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclado. Las partículas se lavaron x2 (tampón de fosfato) y se lavaron x1 (tampón de PCR). Fueron resuspendidas en un tampón final (tampón de PCR).

Después de cada paso de lavado se probaron los sobrenadantes para señal electroquímica, y si era necesario se repitió el lavado hasta que los sobrenadantes no mostraron indicación de etiqueta electroquímica libre.

Estas partículas se analizaron a un intervalo de concentraciones para validar que la señal electroquímica observada era atribuible a la etiqueta A acoplada con las partículas magnéticas. Esto implicó la captura magnética de las partículas y la resuspensión en un intervalo de volúmenes de tampón. Los resultados se muestran en la Figura 13.

### EJEMPLO 9 - Síntesis de (N,N-diferrocenilmetil-2-aminoetoxi) etanol (Etiqueta D)



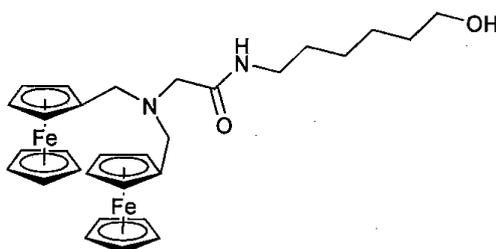
Se añadieron carboxaldehído de ferroceno (2,1 g, 9,81 mmol) y (aminoetoxi) etanol (0,5 g, 4,27 mmol) en THF seco (25 mL) a un matraz secado en horno. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (2,3 g, 10,90 mmol) en porciones a la solución. La reacción se dejó durante la noche. LA reacción se recogió en acetato de etilo (40 mL), la capa orgánica se lavó con NaCO<sub>3</sub> (sat; 20 mL), Salmuera (20 mL) y agua MilliQ (20 mL). LA fracción orgánica fue después secada sobre sulfato de magnesio y el solvente eliminado al vacío. El producto bruto es después columnado usando 9:1 solución B:solución A (solución A. acetato de etilo 95% TEA 5%, solución B: éter de petróleo 40-60 95%, TEA 5%) para obtener la etiqueta D del producto puro (sólido naranja oscuro). 85% de rendimiento <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.18 (2H, s, Cp), 4.17 (2H, s, Cp), 4.13 (15H, s, Cp), 3.66 (4H, t, J = 6.25Hz, CH<sub>2</sub>), 3.48 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.20 (2H, t, J = 6, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75.5 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 77.83, 77.40, 76.98, 70.58, 68.88, 63.36, 53.02, 52.17, 33.10, 27.43, 25.88. HRMS (ESI) calculado para C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>NiO<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub> m/z 501.1430 encontrado 501.1438.

La electroquímica de la Etiqueta D se muestra en la tabla siguiente y en el voltamperograma en la Figura 14:

Tabla 5: Actividad electroquímica de la Etiqueta D

Posición del Pico (mV)	Altura del Pico
242	9.31e <sup>-6</sup>
245	9.38e <sup>-6</sup>
239	9.76e <sup>-6</sup>

**EJEMPLO 10 -Síntesis de di-ferrocenilo glicina amino alcohol N,N-2-(diferrocenilmetilamino)acetil-6-aminohexanol también denominado N-(6-hidroxihexil)-2-((diferrocenilmetil) amino)-acetamida (Etiqueta E)**



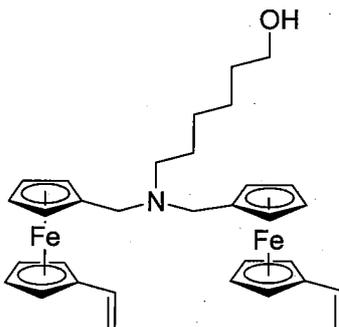
Se añadió cloruro de oxalilo (0,87 mL) en DCM seco (2 mL) gota a gota a través de un embudo de goteo de igualación de presión a una solución agitada de di-ferrocenil glicina (obtenida como se describe en el Ejemplo 3a) en DCM seco (100 mL) a 0°C bajo N<sub>2</sub>. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Después el solvente se eliminó y el producto del cloruro de ácido se recogió un DCM seco (75 mL). Se añadió 6-aminohexano-1-ol (0,56 g) en DCM seco (75 mL) gota a gota a través de un embudo de goteo a 0°C bajo N<sub>2</sub>. La reacción se agitó después durante 2 horas mientras se calentaba a temperatura ambiente. La solución se lavó entonces con NaHCO<sub>3</sub> (sat; 100 mL) y 1.0M HCL (100 mL). La fracción orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> el solvente se eliminó después para obtener el producto Etiqueta E (85%). Un sólido naranja/amarillo. <sup>1</sup>H NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.11 (12H, s, FcCp), 3.55 (4H, t, J = 6.0Hz, CH<sub>2</sub>), 3.31 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 1.48 - 1.18 (12h, m, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75.5Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.32, 77.80, 77.39, 76.90, 62.10, 38.85, 35.45, 32.02, 30.67, 26.75, 25.54, 25.44. HRMS (ESI) calculado para C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub> m/z: 576.0988 encontrado 576.1264.

La electroquímica de la Etiqueta E se ilustra en los datos en la tabla siguiente:

Tabla 6: Actividad Electroquímica de la Etiqueta E

Posición del Pico	Altura del Pico
504	6.61e <sup>-6</sup>
506	5.51e <sup>-6</sup>
507	3.28e <sup>-6</sup>

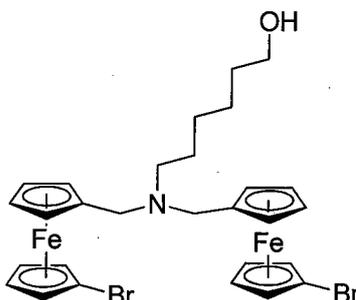
**EJEMPLO 11 - 6-(bis((1'-vinilferrocenil)1-metilferrocenil)amino(haxano-1-ol**



Se disolvió 1'-vinil ferroceno carboxaldehído (122 mg, 0,5 mmol) en THF seco (5 cm<sup>3</sup>) y se trató con 6-aminohexano-1-ol (29 mg, 0,25 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (205 mg, 1,25 mmol) sucesivamente. Se permitió que la solución agitase a temperatura ambiente durante la noche. Después de este tiempo la reacción se inactivó por la adición de 10 cm<sup>3</sup> de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se separó, después la capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (3 x 10 cm<sup>2</sup>). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y continuación se concentraron al vacío para dar un sólido rojo. El producto se purificó por cromatografía en sílice, eluyendo con 1:1 (Acetato de etilo: hexano) + 1% de hidróxido de amonio para dar el producto deseado como un aceite naranja 72 mg, en un rendimiento del 50%.

<sup>1</sup>H NMR (500 Mhz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 6.38 (2H, dd, J 17.6, 10.7 =CH), 5.30 (2H, dd, J 10.7, 1.5, =CH<sub>2</sub>), 5.03 (2H, dd, J 10.7, 1.5, =CH<sub>2</sub>), 4.25 (4H, t, J 1.8, CpH), 4.15 (4H, t, J 1.8, CpH), 4.07 (8H, s, CpH), 3.59 (2H, t, J 6.6, OCH<sub>2</sub>), 3.32 (4H, s, 2,3 FcCH<sub>2</sub>), 2.23, (2H, app t, J 7.4, NCH<sub>2</sub>), 1.49 - 1.55 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.33-1.39 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.22-1.33 (4H, m, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 Mhz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 134.3, 111.3, 83.7, 83.6, 71.4, 69.2, 69.0, 67.2, 62.8, 52.1, 32.7, 27.1, 25.5; HRMS, m/z (ESI) 566.1825 (1.8%, [M+H], C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>Fe<sub>2</sub>NO requiere 566.1808); **Potencial de electrodo:** 298mV.

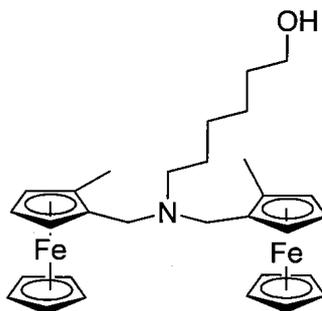
#### 15 EJEMPLO 12: 6-(bis((1'-bromoferrocenilo)1-metilferrocenilo)amino)hexano-1-ol



Se disolvió 1'-bromo ferroceno carboxaldehído (85 mg, 0,29 mmol) en THF seco (3 cm<sup>3</sup>) y se trató con 6-aminohexano-1-ol (25 mg, 0,144 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (59,3 mg, 0,36 mmol) sucesivamente. Se permitió que la solución agitase a temperatura ambiente durante la noche. Después de este tiempo la reacción se inactivó por la adición de 5 cm<sup>3</sup> de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La capa orgánica se separó, después la capa acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (3 x 10 cm<sup>2</sup>). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y continuación se concentraron al vacío para dar un sólido rojo. El producto se purificó por cromatografía en sílice, eluyendo con 1:1 (Acetato de etilo: hexano) + 1% de hidróxido de amonio para dar el producto deseado como un aceite amarillo 17 mg, en un rendimiento del 17%.

<sup>1</sup>H NMR (500 Mhz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 4.32, (4H, t, J 1.8, FcH), 4.21 (8H, s, FcH), 4.05 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.63 (2H, t, J 6.5, OCH<sub>2</sub>), 3.46 (4H, s, FcCH<sub>2</sub>N), 2.31 (2H, t, J 7.1, NCH<sub>2</sub>), 1.45-1.58 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.27-1.36 (4H, m, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 Mhz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 78.4, 72.9, 70.8, 70.5, 68.6, 67.9, 63.1, 62.8, 52.1, 33.0, 27.3, 26.0; HRMS, m/z (ESI) 669.7929 (2.7%, [M+H], C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>Fe<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>NO requiere 669.9705); **Potencial de electrodo:** 437mV.

#### 45 EJEMPLO 13: 6-(bis((2-metilferrocenilo)metil)amino)hexano-1-ol



Se disolvió metilferrocenocarboxaldehído (1 g, 5 mmol) en THF seco (20 cm<sup>3</sup>). Se añadió 4-aminohexano-1-ol (0,25 g, 2,13 mmol). Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g, 6,16 mmol) a la mezcla de la reacción. La solución se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron después acetato de etilo (20 cm<sup>3</sup>) y 1M NaOH (20 cm<sup>3</sup>) y la capa orgánica se extrajo a continuación con NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 cm<sup>3</sup>), salmuera (25 cm<sup>3</sup>) y agua filtrada Milli Q (25 cm<sup>3</sup>) después se secó sobre sulfato de magnesio y el solvente se eliminó al vacío para proporcionar un aceite naranja. El producto bruto es después columnado usando 9:1 solución B: solución A (solución A: acetato de etilo 95% TEA 5%, solución B éter de petróleo 40-60 95%, TEA 5%) para obtener el producto

puro (aceite naranja). (0.95, 65%). <sup>1</sup>H NMR (300MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 4.18 (2H, s, CpH), 4.17 (2H, s, CpH), 4.13 (15H, s, CpH), 3.66 (4H, t, J 6.25, CH<sub>2</sub>), 3.48 (2H, s, CH<sub>2</sub>), , 2.36 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.20 (2H, t, J 6.1, CH<sub>2</sub>), 1.59-1.31 (6H, m, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75.5 Hz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 77.8, 77.4, 76.9, 70.5, 68.9, 63.3, 53.0, 52.1, 33.1, 27.4, 25.8, 12.4; HRMS, *m/z* (ESI) 539.8156 (10%, [M+H], C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>Fe<sub>2</sub> requiere 539.8232); **Potencial de electrodo:** 330mV.

5

Tabla 7: Efecto del potencial de electrodo de los sustituyentes en los restos de ferrocenilo de la Etiqueta A

Ejemplo	Sustituyente de Fc	Potencial de Electrodo
1	Ninguno	275mV
2	Dimetilaminometilo	380mV
11	1'-vinilo	298mV
12	1'-bromo	437mV
13	2-metilo	330mV

10

15

20

Los datos en la tabla anterior ilustran como la inclusión de un sustituyente en los restos de ferrocenilo y la selección de ese sustituyente pueden usarse para influir en el potencial de electrodo. Esto permite que la detección electroquímica de los compuestos se lleve a cabo bajo una variedad de condiciones diferentes, por ejemplo seleccionando un potencial de medición óptimo o evitando condiciones bajo las cuales la sensibilidad de la medición puede ser comprometida por la interferencia con impurezas que pueda haber presentes. Además, el uso de etiquetas con diferentes potenciales de electrodo permite el desarrollo de reacciones multiplex, en las que se puede llevar a cabo más de una determinación en la misma muestra.

25

30

35

40

45

50

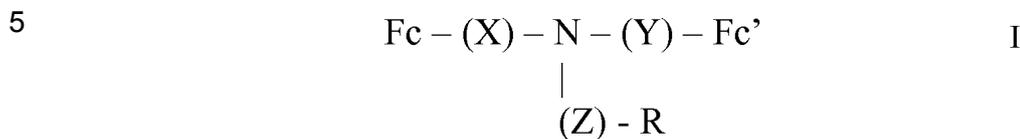
55

60

65

**Reivindicaciones**

1. El uso de una etiqueta en un ensayo electroquímico de un compuesto de la fórmula general I:



10 en la que:

Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,

Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;

15 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

20 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y

R es un grupo conector.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

25 X representa alquileo C1 a C6 interrumpido opcionalmente por oxígeno;

Y representa alquileo C1 a C6 interrumpido opcionalmente por oxígeno;

Z representa alquileo C1 a C6 interrumpido opcionalmente por oxígeno;

30 preferiblemente, en donde:

X es - (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> - en la que x es 1 ó 2;

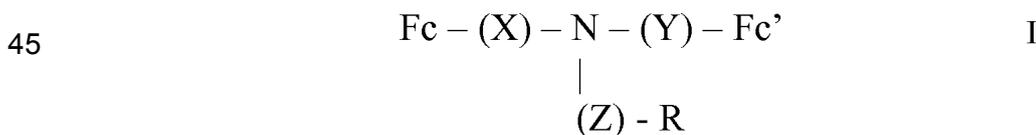
Y es - (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub> - en la que y es 1 ó 2;

Z es - (CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub> - en la que z es de 1 a 8.

35 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde Fc y Fc' son el mismo y X e Y son el mismo.

40 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ensayo es para detectar un sustrato electroquímicamente etiquetado, preferiblemente un sustrato biológico seleccionado de nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos y polinucleótidos o un sustrato biológico seleccionado de aminoácidos, péptidos y proteínas.

5. Un método para fabricar un compuesto de etiquetado funcionalizado que comprende un resto de etiqueta para su uso en un ensayo electroquímico, que comprende reaccionar un compuesto de la fórmula general I:



50 en la que:

Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,

Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;

55 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

60 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y

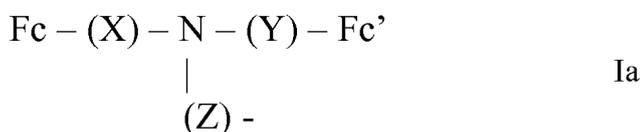
R es un grupo conector que comprende un átomo de oxígeno

con un compuesto de funcionalización para obtener un compuesto de etiquetado funcionalizado de la fórmula general III:

65

A-L-F III

5 en la que A representa



10

15

en donde Fc, Fc', X, Y y Z son como se ha definido anteriormente,  
F representa un resto de funcionalización; y  
L representa un resto conector.

6. Un método para la fabricación de un sustrato etiquetado, que comprende reaccionar un compuesto de la fórmula general III:

20

A-L-F III

en donde A, F y L son como se define en la reivindicación 5;  
con un sustrato para formar un sustrato etiquetado.

25

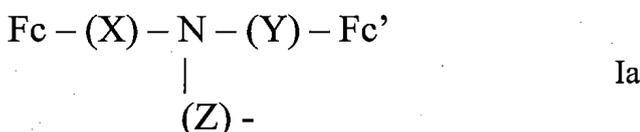
7. Un compuesto de etiquetado funcionalizado para su uso en el método de la reivindicación 6, el compuesto de etiquetado funcionalizado teniendo la fórmula general III:

A-L-F III

30 en la que

A representa un resto de etiquetado de la fórmula general Ia;

35



40 en la que:

Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,  
Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
45 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
50 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
representa hidrógeno o alquilo C1 a C4;

55

L representa un resto conector;  
y en la que F represente un resto de funcionalización para reaccionar con un sustrato para la unión del resto  
de etiquetado con el sustrato.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o un compuesto de etiquetado funcionalizado de acuerdo con la  
reivindicación 7, en donde el mencionado sustrato es seleccionado de aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos,  
azúcares, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos, carbohidratos, micropartículas y nanopartículas.

60

9. Un compuesto de etiquetado funcionalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde (i)  
el resto de funcionalización F es seleccionado de grupos éster de succinimidilo, grupos fosforamidita, grupos  
maleimida, grupos de biotina y azida y/o (ii) el resto de funcionalización es o es derivable de un resto de  
fosforamidita.

65

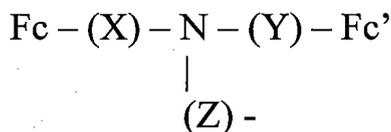
10. Un sustrato etiquetado para su uso en un ensayo electroquímico, el sustrato etiquetado siendo de la fórmula

general IIIa:

A-L-F<sup>1</sup>-[S]

IIIa

5 en la que A representa



Ia

10

en la que:

15 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido o no sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 20 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
 representa hidrógeno o alquilo C1 a C4;

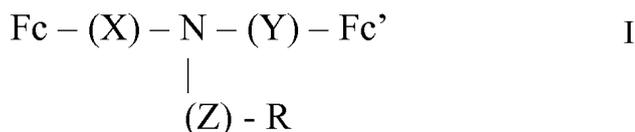
25 L-F' representa un resto conector; y  
 [S] representa un sustrato.

30 **11.** Un sustrato etiquetado de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sustrato es seleccionado de moléculas  
 biológicas, micropartículas y nanopartículas, preferiblemente en donde el sustrato es una molécula biológica  
 seleccionada de aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos, azúcares, péptidos, proteínas, oligonucleótidos,  
 polinucleótidos y carbohidratos, más preferiblemente en donde el sustrato es seleccionado de nucleótidos,  
 nucleósidos, oligonucleótidos y polinucleótidos o aminoácidos, azúcares, péptidos y proteínas, preferiblemente en  
 donde el sustrato es o comprende un oligonucleótido.

35 **12.** Un kit de ensayo para determinar la presencia de una diana del ensayo, en donde el kit de ensayo comprende un  
 sustrato etiquetado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11.

**13.** Un compuesto de acuerdo con la fórmula general I

40



I

45

en la que a):

50 Fc es un resto de ferrocenilo sustituido,  
 Fc' es un resto de ferrocenilo sustituido, y puede ser el mismo o diferente de Fc;  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;  
 55 Z es una cadena de alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar  
 opcionalmente interrumpida por - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup>  
 representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y  
 R es un grupo conector  
 opcionalmente en donde cada resto ferrocenilo está sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de  
 halo, alquilo C1 a C4, haloalquilo, arilo, alqueno C1 a C4 y ciano; o

60

b):

65 Fc y Fc' son cada uno un resto de ferrocenilo sustituido,  
 X es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la  
 que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

Y es una cadena de alquileo C1 a C6 que está opcionalmente interrumpida por - O -, - S-, o - NR<sup>5</sup> -, en la que R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C6;

Z es una cadena de alquileo C6 a C12 o es un alquileo C1 a C12 que puede estar opcionalmente sustituida y/o puede estar opcionalmente interrumpida por un resto seleccionado de - O -, - S -, cicloalquilo, - CO -, CON R<sup>1</sup> -, - NR<sup>1</sup> CO- o - NR<sup>1</sup> - en la que R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo C1 a C4; y

R es un grupo conector

5

14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en donde:

10

(i) X representa - (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> - en la que x es de 1 a 6; e

Y representa - (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub> - en la que y es de 1 a 6, o

(ii) Z representa alquileo C6 a C8 interrumpido opcionalmente por oxígeno.

15

15. EL uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o el método de la reivindicación 5, o el compuesto de la reivindicación 13 ó 14, en la que el grupo conector R comprende un grupo capaz de reaccionar con un grupo compatible de un resto de funcionalización o de un sustrato para unir el compuesto a dicho resto de funcionalización o dicho sustrato.

20

16. Un compuesto seleccionado de

25

30

35

40

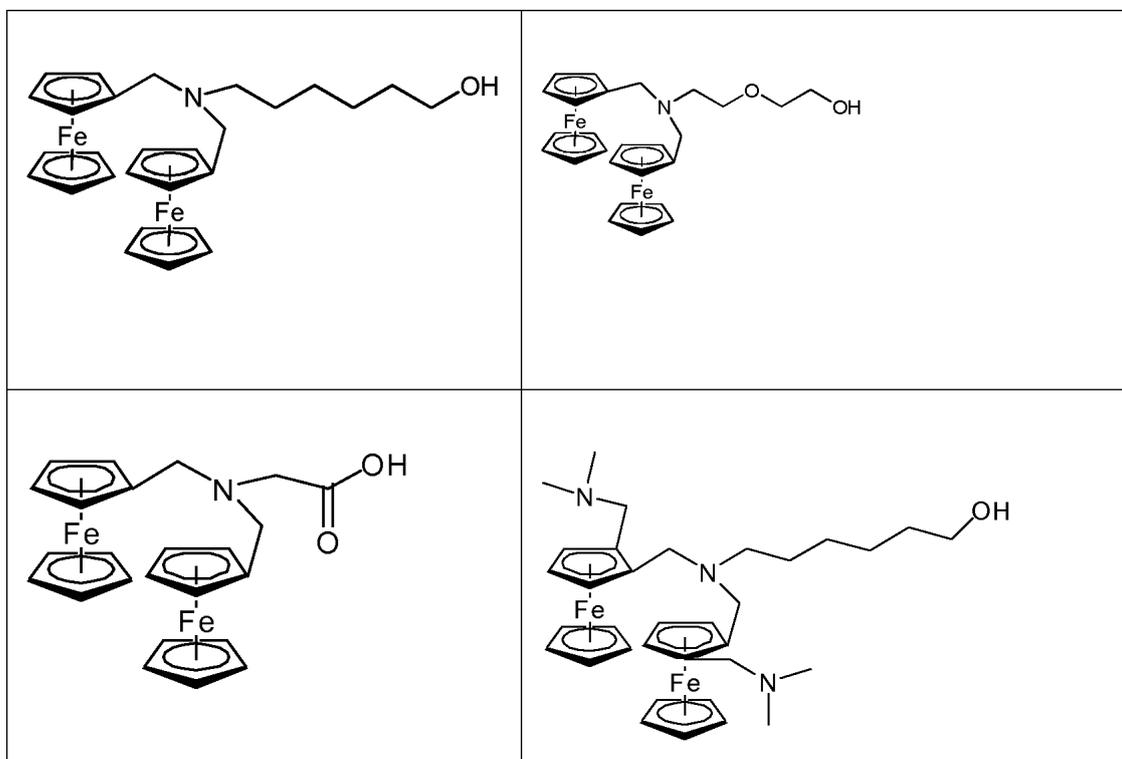
45

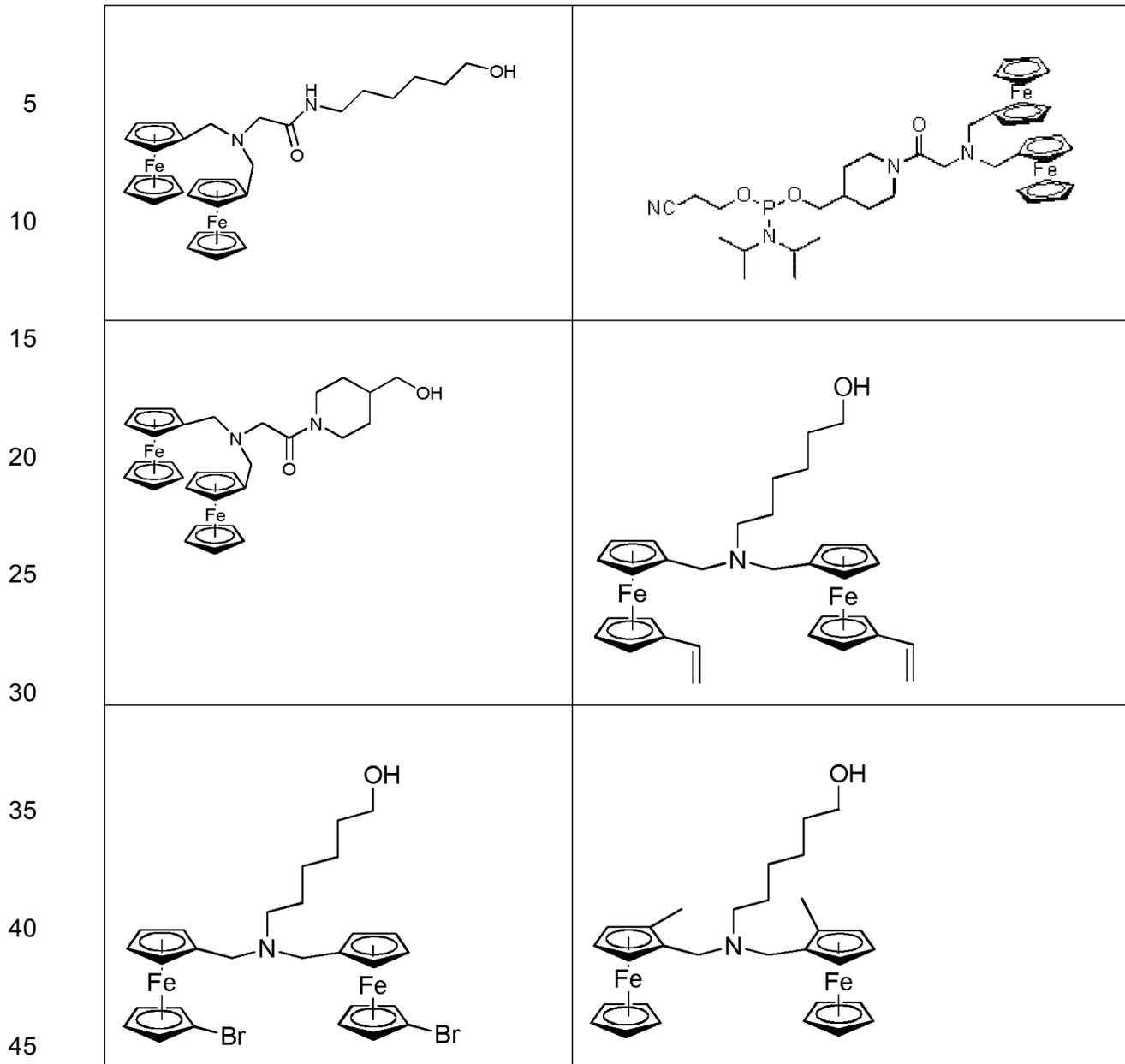
50

55

60

65



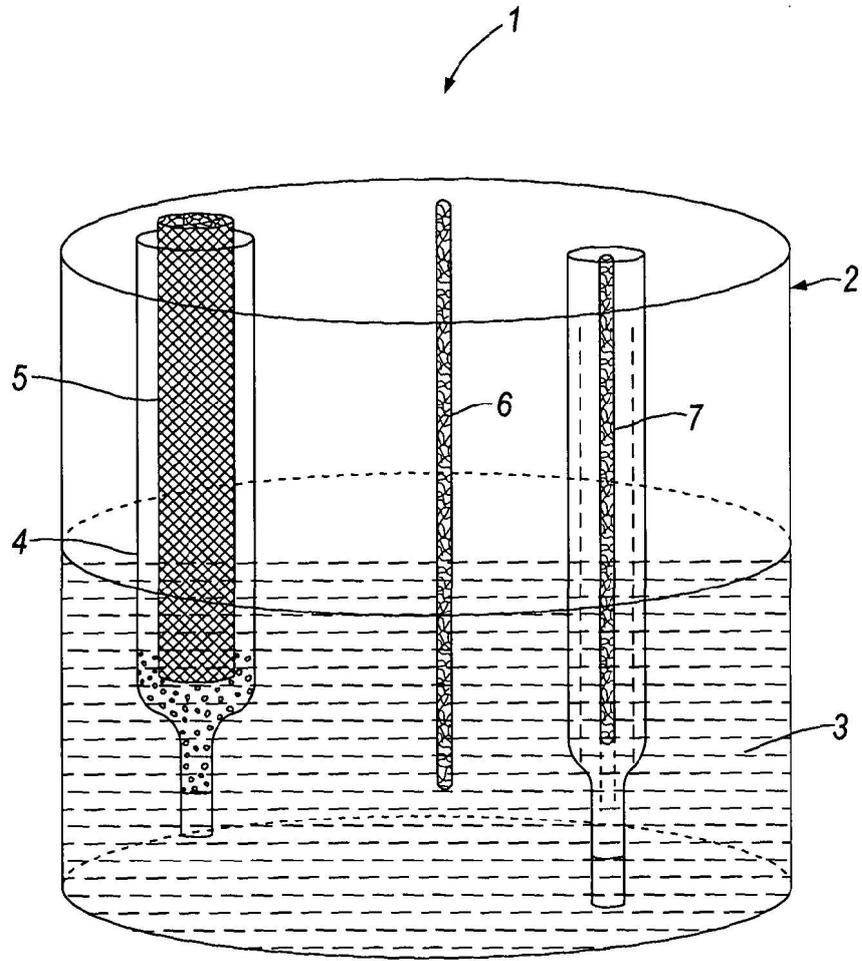


17. N,N-diferrocenilmetil-6-aminohexanol o un análogo del mismo en el que ambos grupos ferrocenilo están sustituidos por uno o más sustituyentes; o, un sustrato etiquetado que comprende un resto de etiquetación derivado de N,N-diferrocenilmetil-6-aminohexanol o de un análogo del mismo en el que ambos grupos ferrocenilo están sustituidos por uno o más sustituyentes.

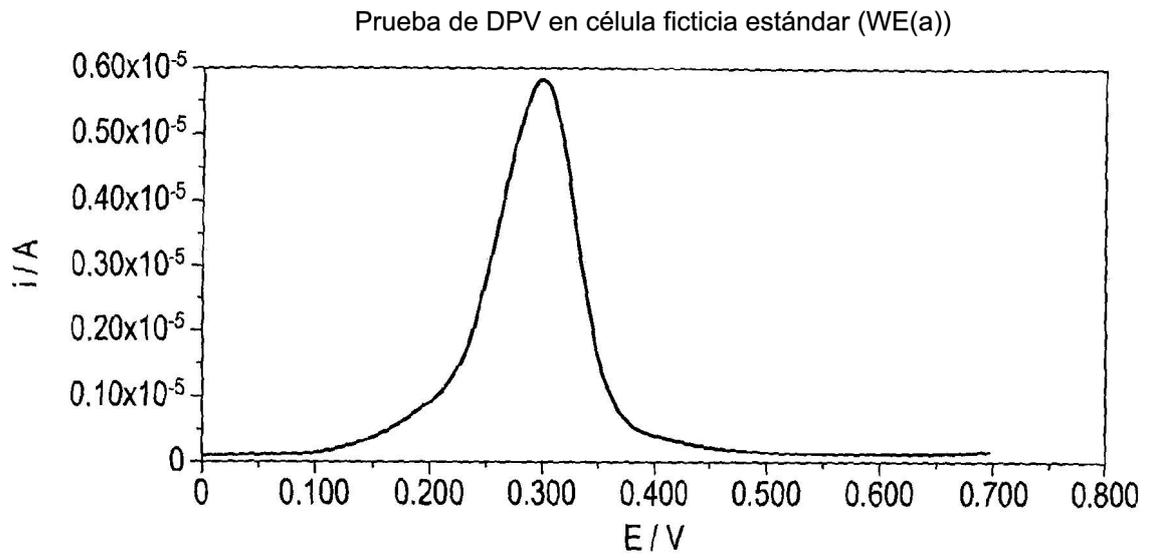
18. Un método de detectar:

- (i) un ácido nucleico que comprende poner en contacto el ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico complementaria bajo condiciones para permitir la hibridación entre la sonda y el amplicón, seguido por el paso de degradar selectivamente la sonda hibridada o sin hibridar, en donde dicha sonda está etiquetada con un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 y en donde el método proporciona el paso de medir la actividad electroquímica del compuesto que etiqueta la sonda o en donde dicha actividad electroquímica es dependiente o cuantitativamente o cualitativamente de la extensión de la degradación de la sonda; o,
- (ii) un aminoácido, péptido o proteína etiquetados con un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, que comprende el paso de medir la actividad electroquímica del compuesto.

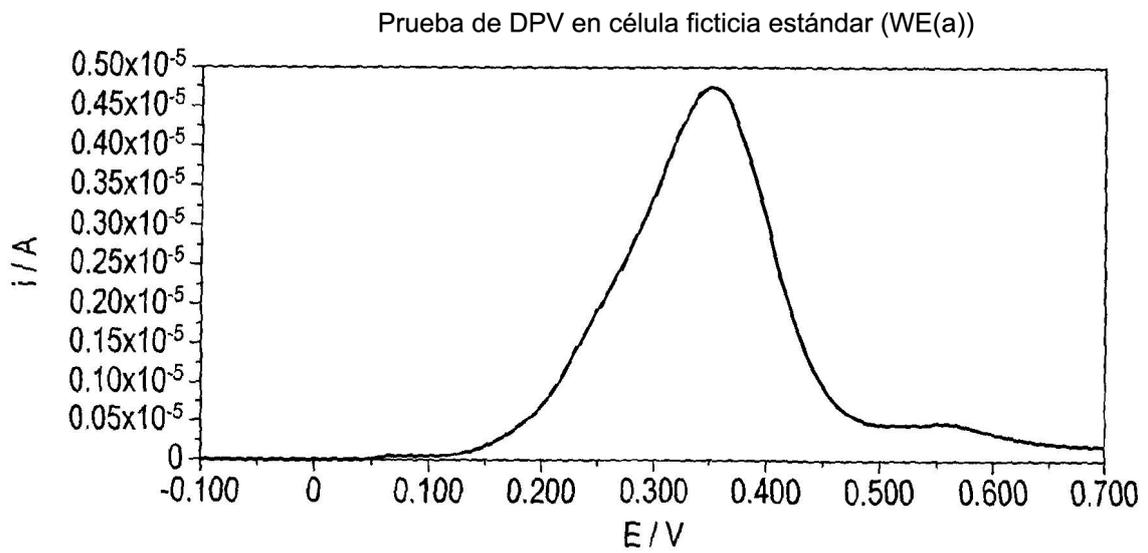
65



*Fig.1*

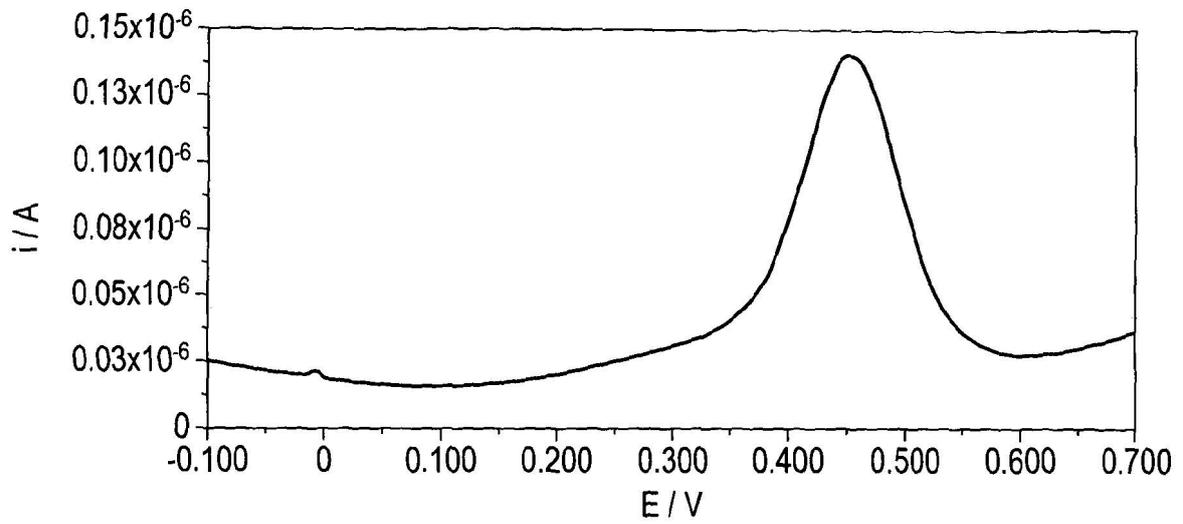


*Fig.2*

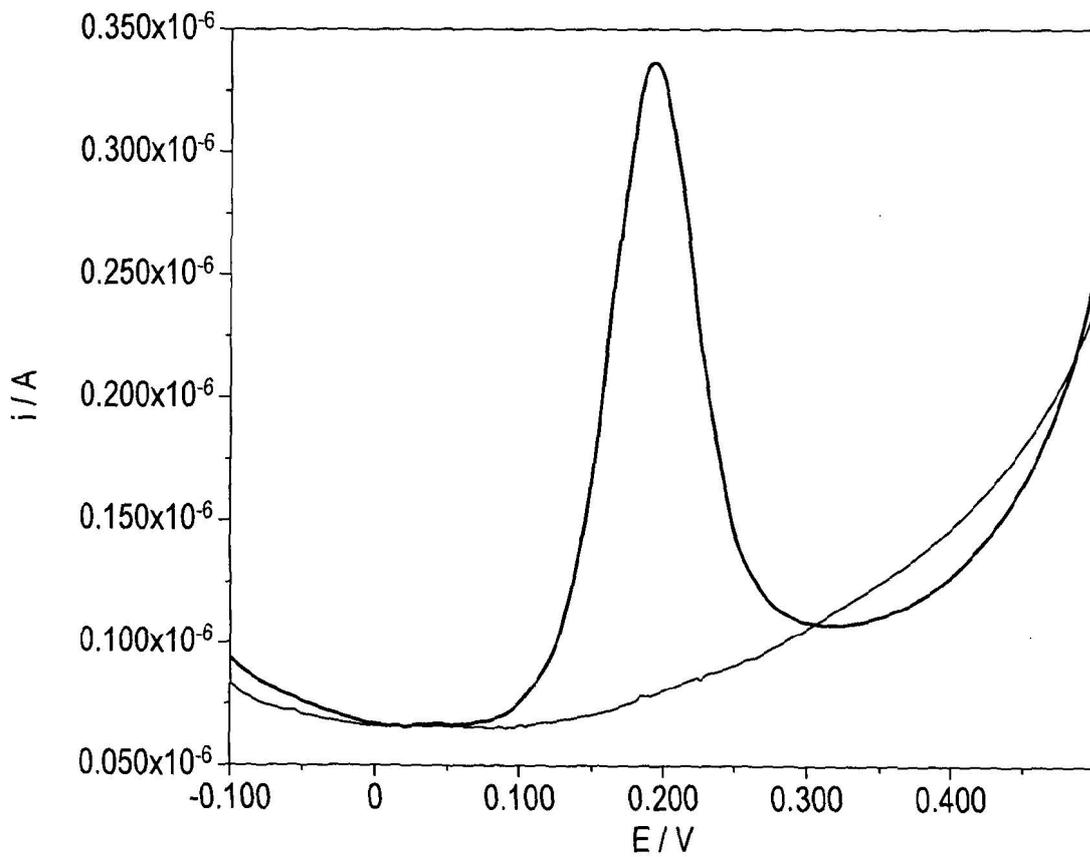


*Fig.3*

Prueba de DPV en célula ficticia estándar (WE(a))



*Fig.4*



*Fig.5*

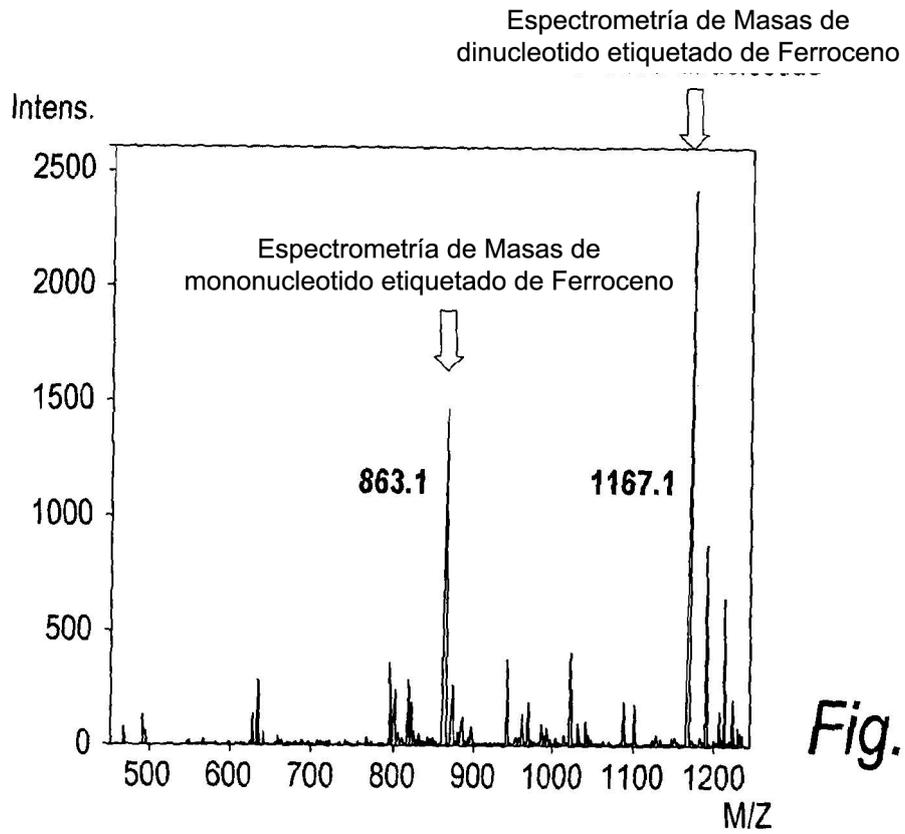


Fig.6

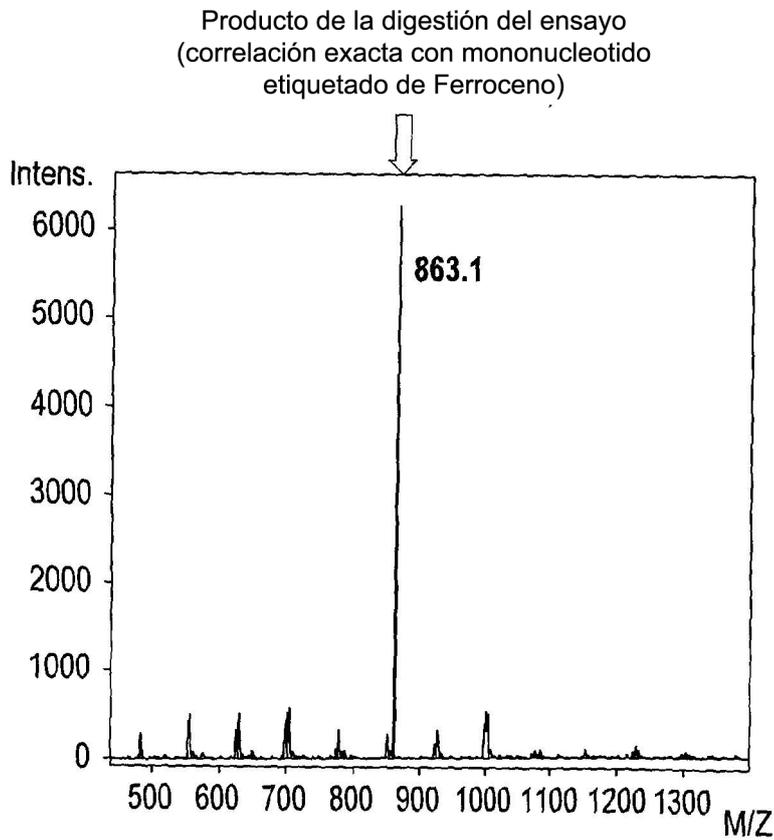
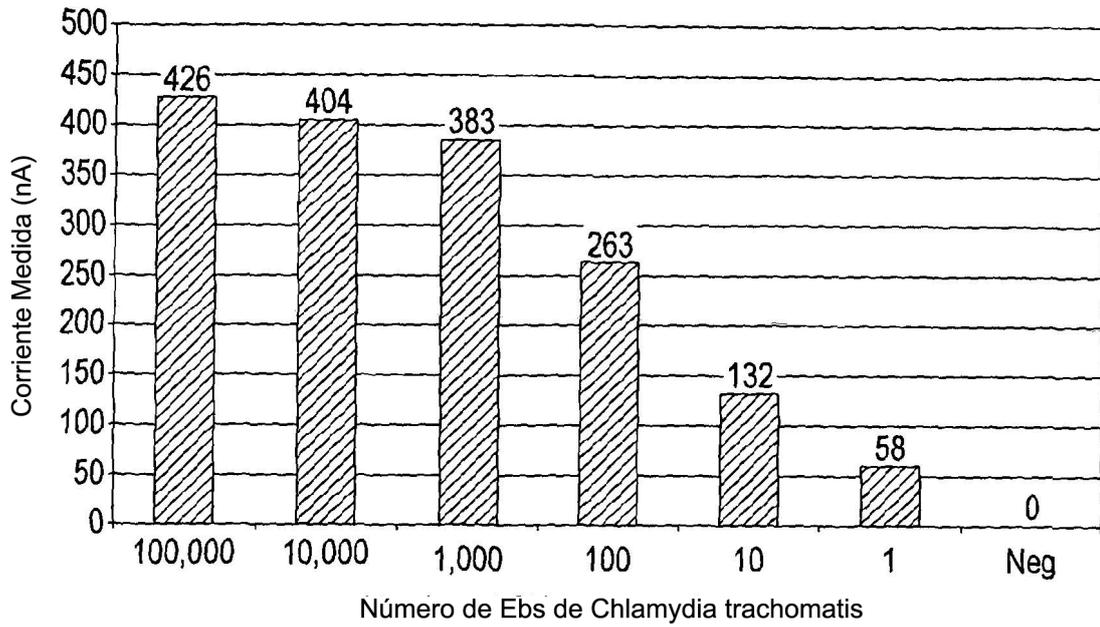
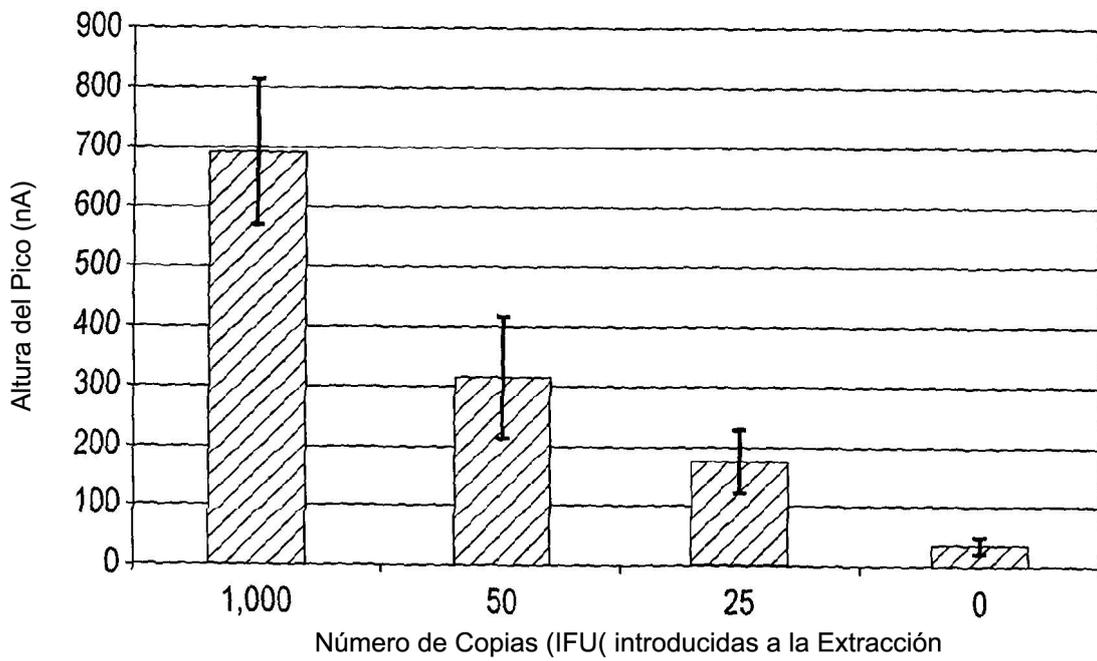


Fig.7



*Fig.8*



*Fig.9*

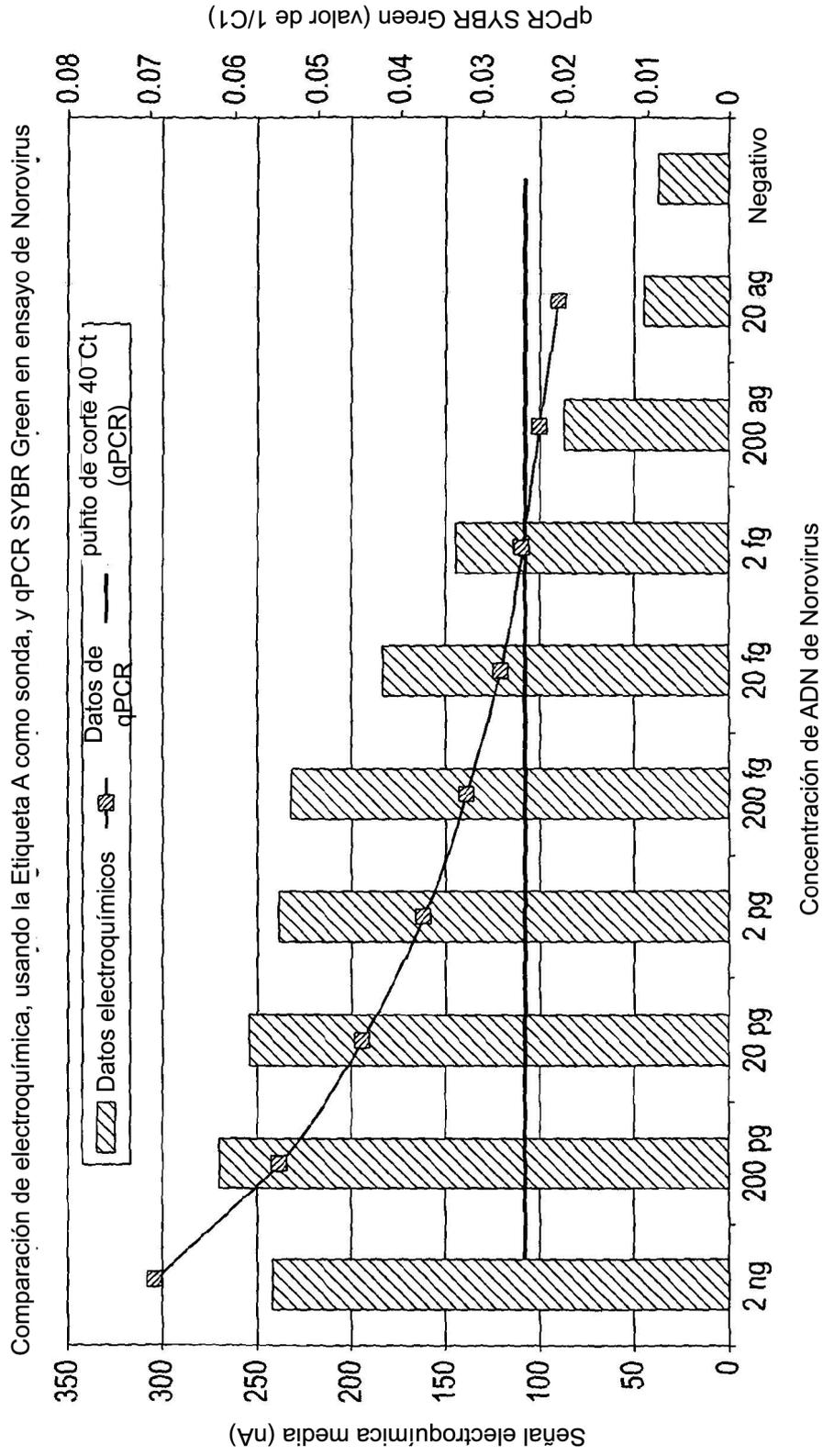


Fig.10

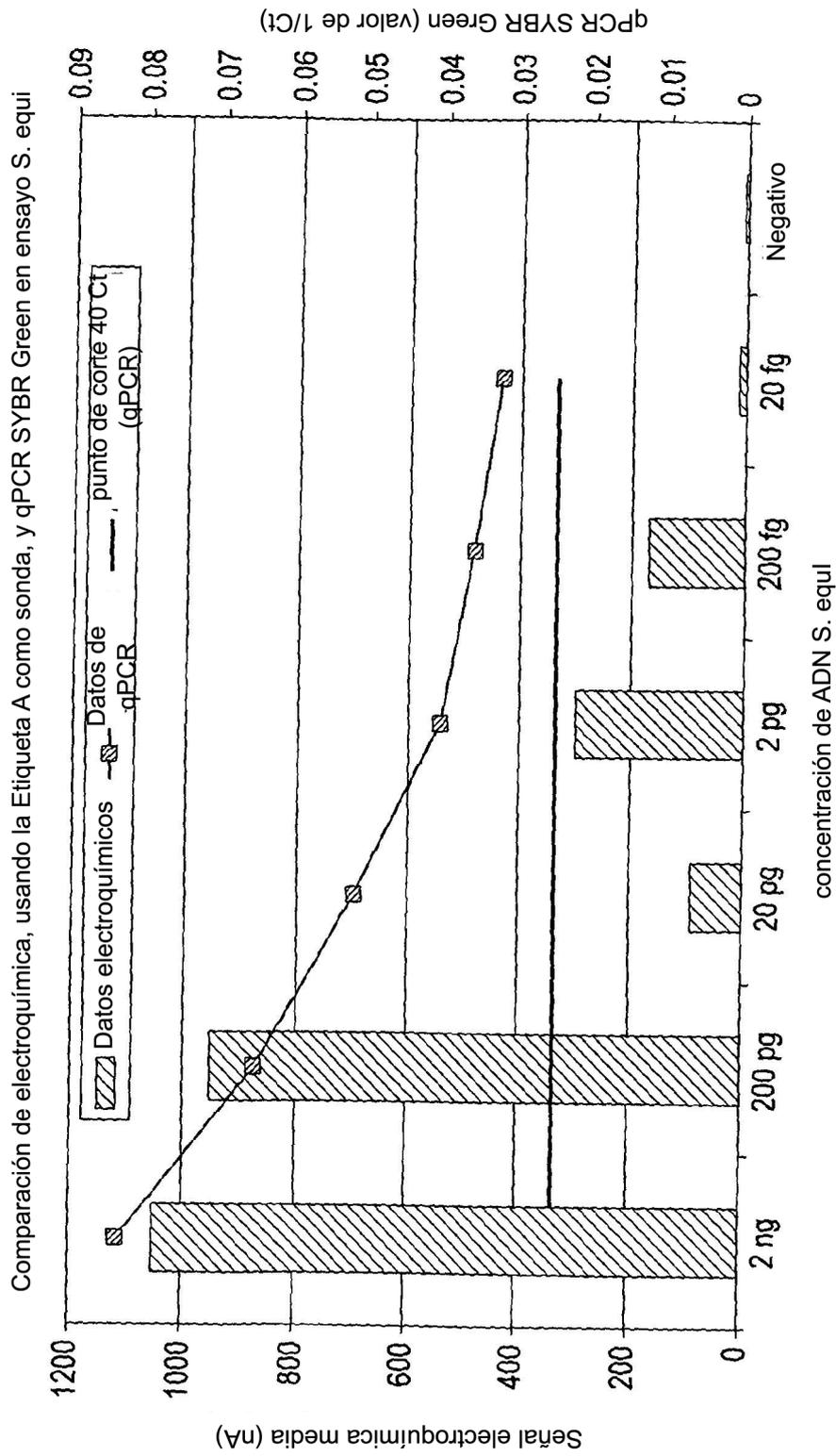


Fig.11

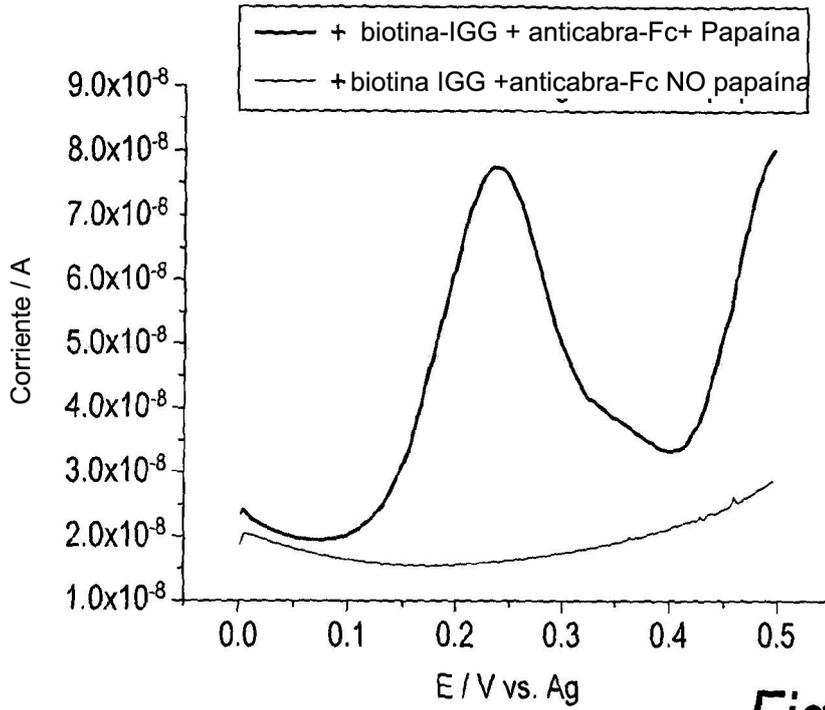


Fig. 12a

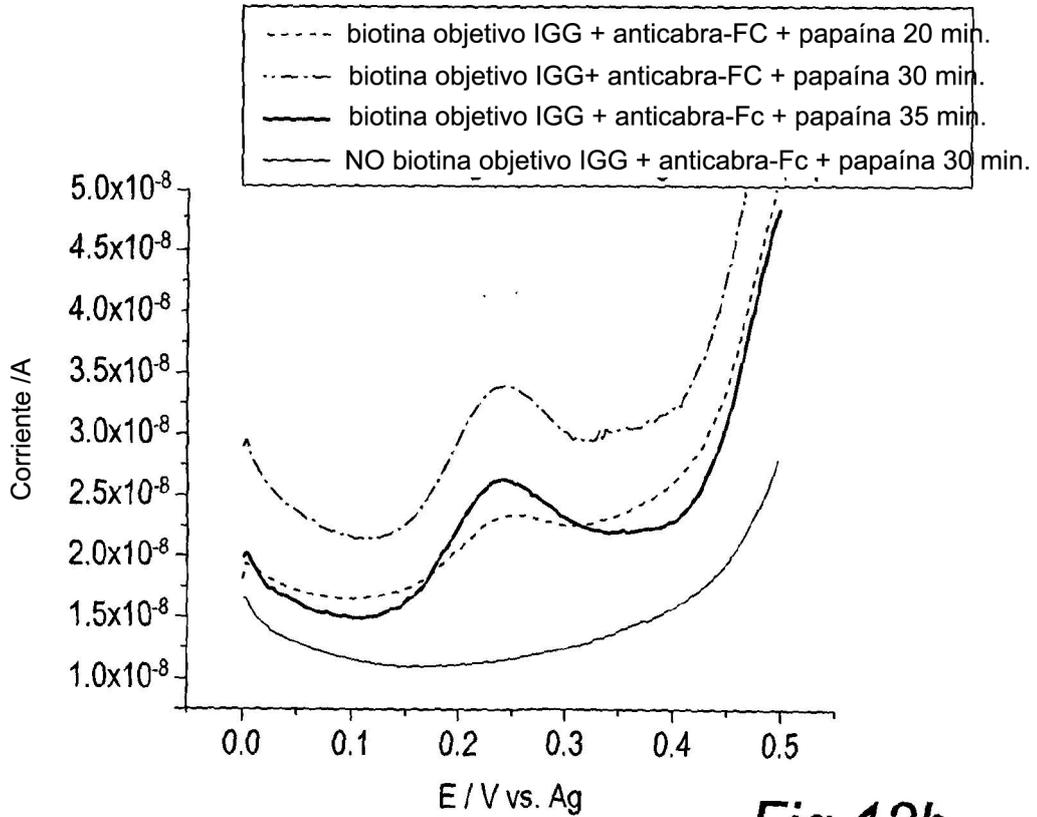


Fig. 12b

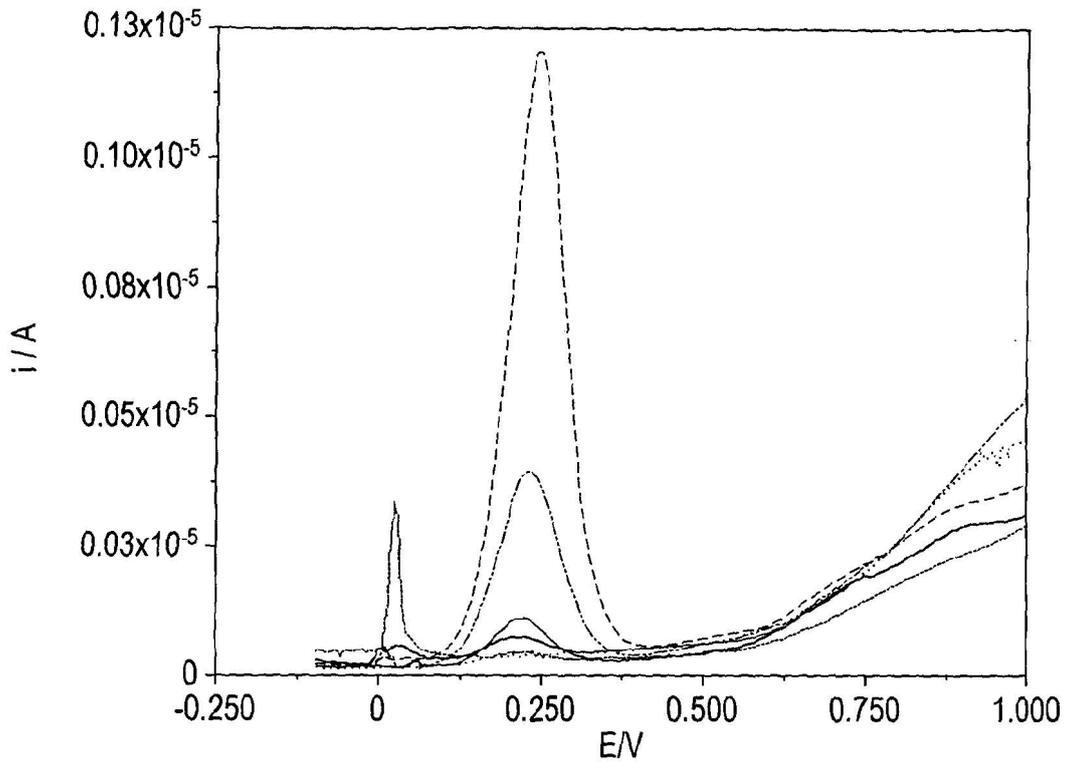


Fig. 13

Prueba de DPV en célula ficticia estándar (WE(a))

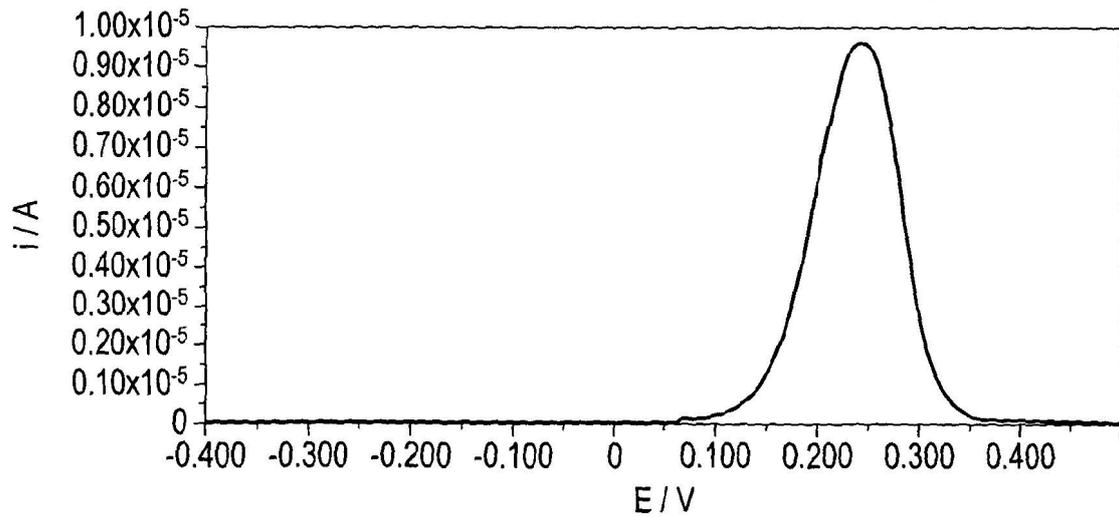


Fig. 14