



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 488**

51 Int. Cl.:

C07F 17/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06026271 .4**

96 Fecha de presentación : **11.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1808494**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Compuestos electroquímicamente activos.**

30 Prioridad: **07.03.2002 GB 0205455**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.08.2009

73 Titular/es: **Atlas Genetics Limited**
Skurrayfield, 34 Wingfield Road
Trowbridge, Wiltshire BA14 9ED, GB

72 Inventor/es: **Braven, Helen**

74 Agente: **De Elzaburu Marquez, Alberto**

ES 2 324 488 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos electroquímicamente activos.

5 **Campo del invento**

La invención se refiere a sondas de metalocenilo para la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos y métodos asociados con las mismas. La invención también se refiere a dichas sondas para la detección de proteínas unidas a ácidos nucleicos en virtud de su unión preferente a ácidos nucleicos que contienen secuencias de reconocimiento y métodos asociados con las mismas. Más particularmente la invención se refiere a oligonucleótidos marcados adecuados para usar en la detección de ácidos nucleicos y/o proteínas y métodos asociados con los mismos.

Antecedentes del invento

La detección de secuencias de DNA o RNA específicas es importante para una gran variedad de aplicaciones de las industrias alimentaria, medioambiental y de diagnóstico clínico, y en los sectores de investigación genómico, académico, farmacéutico y farmacogenético. Idealmente, las metodologías de detección deberían ser sensibles, específicas de secuencia, relativamente rápidas, de bajo coste, precisas y adecuadas para uso rutinario y/o para automatización. Además, idealmente, debería ser posible integrarlas con las metodologías de multiplicación de DNA existentes, tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*) y otras metodologías de multiplicación de ácido nucleico.

Además de los métodos de detección de ácido nucleico basados en, o integrados con, técnicas de multiplicación tales como la PCR, también se conocen técnicas para detección de ácido nucleico específico de secuencia que se basan en la unión específica de una sonda a una diana que no ha de ser necesariamente multiplicada previamente. Las transferencias Southern y Northern son ejemplos conocidos de tales técnicas. Las técnicas que no incluyen una etapa de multiplicación deben ser normalmente muy sensibles para que se pueda detectar una señal. Típicamente, se usan técnicas basadas en autorradiografía o quimioluminiscencia para producir la sensibilidad requerida.

Las transferencias Southern y Northern requieren la unión del ácido nucleico diana a un sustrato membranoso. Este requisito es desventajoso porque consume mucho tiempo y es poco adecuado para una automatización.

En los métodos para detección de DNA basados en multiplicación se utiliza normalmente una gran variedad de químicas de fluorescencia o de marcadores radiactivos. Frecuentemente, el DNA diana que se va a analizar es enzimáticamente multiplicado, por ejemplo, mediante PCR, y es luego visualizado al utilizar un colorante fluorescente, ligante de DNA, para teñir el DNA que ha sido separado por tamaños mediante electroforesis en gel. Se han desarrollado métodos alternativos en los que no se requiere electroforesis en gel. Estos permiten frecuentemente la detección de la multiplicación de DNA en tiempo real con colorantes fluorescentes no específicos de secuencia, tales como, por ejemplo, SYBR Green y bromuro de etidio. Se han desarrollado también ensayos que integran la multiplicación de DNA por PCR con la detección basada en fluorescencia usando una creciente diversidad de sondas oligonucleotídicas fluorescentemente marcadas que se hibridan con secuencias de DNA específicas. Se han desarrollado diversos ensayos en que se utiliza la actividad nucleasa de una DNA polimerasa. Los ejemplos de ensayos comercialmente asequibles con nucleasas incluyen Invader (marca comercial; Third Wave Technologies), Readit (marca comercial; Promega) y TaqMan (marca comercial; Applied Biosystems). En los ensayos TaqMan descritos, por ejemplo, en las Patentes US 5.487.972, US 5.538.848 y US 5.804.375, un oligonucleótido de hibridación es digerido por la inherente actividad nucleasa 5' de *Taq* polimerasa concomitantemente con la extensión del cebador por la actividad polimerasa de *Taq*.

La aplicación de la electroquímica a la detección de DNA ofrece posibles ventajas con respecto a otros sistemas de detección en términos de sensibilidad y sencillez. Su capacidad de transporte, robustez, facilidad de miniaturización y potencial para altos volúmenes de fabricación hacen que los aparatos para métodos electroquímicos sean especialmente adecuados para diagnósticos clínicos, alimentarios y medioambientales.

El enfoque principal de las sondas génicas de base electroquímica ha estado en las técnicas de hibridación asociadas a electrodos. Típicamente, una sonda de captura (ácido nucleico oligonucleotídico o peptídico) es inmovilizada en la superficie de un electrodo y extrae el ácido nucleico diana complementario de una mezcla compleja de ácidos nucleicos. El proceso de hibridación es transducido hasta una señal electrónica mensurable usando un indicador de hibridación activo por redox (por ejemplo, una sal de rutenio o cobalto) o un indicador activo por redox puesto en contacto con la diana al usar una sonda secundaria, o mediante la medición directa de cambios en la capacitancia del electrodo causados por cambios en las características físicas de la interfase entre el electrodo y la disolución como resultado de la hibridación. Frecuentemente, estos sistemas requieren una multiplicación previa, por ejemplo, por PCR, de la secuencia diana para que se alcance una sensibilidad suficiente.

Los métodos para detectar proteínas ligantes de ácido nucleico incluyen ensayos de protección de nucleasas. En dichos ensayos, una sonda de ácido nucleico es mezclada en disolución con una supuesta proteína ligante de ácido nucleico. Bajo condiciones apropiadas, se puede hacer que las proteínas ligantes de ácido nucleico se unan a la secuencia de ácido nucleico presente en la sonda. Después de la supuesta unión, toda sonda o región de sonda no unida puede ser digerida por una nucleasa adecuada. La sonda de ácido nucleico unida resultará protegida de la digestión por nucleasa porque la proteína unida impedirá estéricamente la acción de la nucleasa. Las sondas de ácido nucleico

digerida y no digerida son luego separadas, por ejemplo, por filtración en gel o electroforesis en gel o provocando que el ácido nucleico no digerido se una a una membrana u otro sustrato, y son cuantificadas. Típicamente, la sonda es marcada con un isótopo radiactivo con objeto de que se puedan cuantificar ella y sus productos de descomposición. El uso de radioisótopos presenta varios inconvenientes, incluyendo problemas con la desintegración radiactiva que reduce el tiempo de conservación de los reactivos, y asuntos relativos a la salud laboral y el medioambiente.

Las sondas de ácido nucleico adecuadas para detectar proteínas ligantes de ácido nucleico incluyen sustancialmente ácidos nucleicos con la secuencia de la que se sabe que se une a proteínas ligantes de ácido nucleico *in vivo*. Además, las sondas adecuadas para detectar proteínas ligantes de ácido nucleico incluyen aptámeros, que son ácidos nucleicos desarrollados *in vitro* para que desempeñen una función específica [para detalles, véanse, por ejemplo, Brody y Gold, *Reviews in Molecular Biology* 9 (1.999), 324-329; Jäschke *et al.*, *Synlett* 6 (1.999), 825-833; y Griffith y Tawfik, *Current Opinion in Biotechnology* 11 (2.000), 338-353]. Pueden producirse aptámeros que se unan a potencialmente cualquier proteína específica, no sólo a proteínas que son normalmente consideradas proteínas ligantes de ácido nucleico.

Se entenderá que, en esta memoria descriptiva, el uso del término “hibridar” en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la unión específica de un primer ácido nucleico a un segundo ácido nucleico de secuencia complementaria. Se entenderá también que no es necesario que la complementariedad de las secuencias de ácido nucleico sea total para que tenga lugar la hibridación. La hibridación incluye la unión complementaria que incluye el apareamiento erróneo de bases hasta el punto de que dicho apareamiento erróneo no reduzca esencialmente la eficacia de los métodos descritos.

El invento se refiere a sondas de metaloceno para usar en un método de sonda para un ácido nucleico, que comprende poner una disolución de ácido nucleico en contacto con una sonda oligonucleotídica marcada con un marcador electroquímicamente activo, proporcionar unas condiciones bajo las cuales la sonda sea capaz de hibridarse con cualquier secuencia complementaria (diana) que pueda estar presente en la disolución de ácido nucleico, degradar selectivamente la sonda de ácido nucleico hibridada o no hibridada, y determinar electroquímicamente información relativa al marcador electroquímicamente activo. La información relativa al marcador es convenientemente utilizada para obtener información concerniente a la presencia o ausencia de al menos una especie de ácido nucleico. Preferiblemente, las técnicas electroquímicas son utilizadas para cuantificar proporciones relativas de sonda degradada y no degradada. Como se utiliza aquí, el término “degradar” incluye la degradación como resultado de una actividad enzimática, tal como, por ejemplo, por digestión.

Se dispone de diversos métodos para degradar selectivamente la sonda de ácido nucleico hibridada o no hibridada. Estos incluyen métodos enzimáticos y tratamientos químicos. Se pueden utilizar enzimas para degradar una sonda de ácido nucleico mediante una digestión que da lugar a la escisión de un enlace éster fosfórico o la escisión de un enlace sacárido o glicosídico.

Se puede utilizar la nucleasa S1 aislada de *Aspergillus oryzae* o de otra fuente adecuada, o una enzima que tenga una especificidad similar, para digerir selectivamente el ácido nucleico no hibridado. La actividad nucleasa 5' de *Taq* polimerasa o de una enzima similar puede ser utilizada para digerir una sonda de ácido nucleico que se haya hibridado en una posición de la diana situada entre una pareja de cebadores de PCR. En este caso, la sonda sería digerida concomitantemente con la extensión del cebador.

El sistema Invader (marca comercial) de Third Wave Technologies Inc. (véanse los Documentos US 5.846.717, US 5.837.450, US 5.795.763 y US 5.614.402) proporciona un sistema de detección fluorogénica de ácido nucleico que puede ser adaptado para uso con una realización alternativa del sistema de detección electroquímica, como se ilustra en la Figura 14a. En resumen, se deja que dos sondas oligonucleotídicas cortas se hibriden con el ácido nucleico diana. Las sondas son diseñadas de modo que, aunque ambas sean capaces de hibridarse en al menos parte de su longitud para formar un ácido nucleico bicatenario, haya una región de solapamiento de secuencias entre las dos sondas. Esto produce una estructura específica que es reconocida por una enzima que escinde una de las sondas para liberar un “flap 5'” de la región de solapamiento. Una enzima adecuada es la endonucleasa de flap (FEN1) de *Archaeoglobus fulgidus*, vendida bajo la marca comercial “Cleavase VIII”. Se puede unir un marcador electroquímicamente activo al cebador que produce el flap 5', preferiblemente en o hacia el extremo 5' de ese cebador. La presencia del flap 5' en la mezcla de reacción puede ser detectada mediante técnicas electroquímicas. Particularmente, el flap 5' electroquímicamente marcado puede ser discriminado del cebador electroquímicamente marcado en virtud de la porción oligonucleotídica de diferente longitud de cada molécula respectiva.

Alternativamente, y como se ilustra en la Figura 14b, no es necesario que el flap 5' esté unido a un marcador electroquímicamente activo. La liberación del flap 5' es detectada por un casete de reconocimiento de oligonucleótidos que forma una región tricatenaria de ácido nucleico que es también reconocida y escindida por la enzima Cleavase. Se puede unir un marcador electroquímicamente activo al casete de reconocimiento para que la escisión del casete de reconocimiento dé lugar a que el marcador electroquímicamente activo esté unido a un fragmento del casete de reconocimiento en vez de al casete de reconocimiento de longitud completa. El fragmento de casete de reconocimiento electroquímicamente marcado puede ser discriminado del casete de reconocimiento de longitud completa electroquímicamente marcado en virtud de la porción oligonucleotídica de diferente longitud de cada molécula respectiva.

El presente invento, que se refiere a sondas de metaloceno, se basa en la observación de que un marcador electroquímicamente activo tal como el metaloceno presenta diferentes características electroquímicas dependiendo de si está fijado a un nucleótido o no, de si ese nucleótido está incorporado a un oligonucleótido o no, y de la longitud del citado oligonucleótido.

El tamaño y las características de una molécula a la que se fija un marcador electroquímicamente activo pueden influir en las características percibidas del marcador electroquímico al influir, por ejemplo, en su velocidad de migración por difusión o en la respuesta a un campo eléctrico.

La actividad electroquímica de un marcador puede verse también influida por los efectos estéricos que resultan de la presencia de la molécula a la que está unido. Por ejemplo, el impedimento estérico puede evitar que el marcador se aproxime a un electrodo y acepte o done electrones.

Si el marcador está fijado a un oligonucleótido, la estructura secundaria del oligonucleótido (como viene determinada en gran medida por la secuencia primaria) puede influir entonces en las propiedades físicas de ese marcador. Por ejemplo, si el marcador está fijado a un oligonucleótido que contiene una secuencia primaria autocomplementaria, la resultante estructura secundaria de tallos y bucles puede entonces obstaculizar estéricamente al marcador electroquímicamente activo y reducir la señal obtenida por voltametría. Se entenderá que la digestión del oligonucleótido puede destruir o liberar la estructura de tallos y bucles y reducir o anular su influencia sobre el marcador.

También será evidente que, puesto que la estructura secundaria de los oligonucleótidos depende de la temperatura, los efectos que un oligonucleótido ejerce sobre un marcador electroquímicamente activo varían con la temperatura.

Una persona experta en la técnica es capaz de seleccionar una temperatura apropiada a la cual llevar a cabo la técnica electroquímica con objeto de alcanzar una óptima relación de señal a ruido de fondo para la técnica. Si la técnica es incorporada a una reacción PCR o a otra técnica para la cual se utiliza un aparato termociclador, la medición a una temperatura deseada puede realizarse sencillamente en un punto apropiado del régimen de temperaturas de la PCR.

En una forma del método, la digestión de la sonda marcada con un marcador electroquímicamente activo, por nucleasa 5', tiene lugar concomitantemente con la extensión del cebador de la PCR. Resultará evidente que dicho método incluye un método de PCR en tiempo real en que se mide automáticamente la actividad electroquímica de la disolución durante, o después de, cada ciclo de PCR. Es probable que, cuanto más diana esté presente en la muestra, más extensión de cebador y más digestión de sonda tengan lugar. La sonda digerida acumulada se distinguirá de la sonda no digerida a causa de su diferente actividad electroquímica. Como se discutió anteriormente, la temperatura (fase de PCR) a la que se realizan las mediciones puede influir en la calidad de la señal obtenida.

Por sencillez, el método ha sido ampliamente descrito en términos de la detección de una sola especie de ácido nucleico. Sin embargo, se apreciará que el invento incluye un sistema "múltiple" mediante el cual los métodos y aparatos descritos pueden ser usados para detectar simultáneamente más de una especie de ácido nucleico. Los sistemas múltiples tienen las ventajas generales de que permiten que experimentos testigo sean llevados simultáneamente a cabo y bajo unas condiciones iguales a las de un experimento de ensayo y de que permiten que varios análisis sean llevados simultáneamente a cabo y bajo las mismas condiciones. De este modo, el uso de sistemas múltiples ocasiona ahorros de reactivos y de tiempo. Un ejemplo de dicho sistema múltiple es el uso de sondas oligonucleótidas que son complementarias de dos o más dianas diferentes. Esas sondas podrían distinguirse entre sí al ser marcadas con marcadores electroquímicamente activos que tuvieran características redox diferentes y, por lo tanto, ser independientemente identificables mediante cualquier técnica electroquímica adecuada, tal como, por ejemplo, voltametría diferencial de pulsos. Para que fueran adecuados para uso en un experimento múltiple, dos (o más) marcadores deberían tener unas características redox que fueran suficientemente diferentes entre sí para permitir que los dos (o más) marcadores fueran analizados de un modo resoluble. Por ejemplo, si se va a utilizar una voltametría diferencial de pulsos, los trazos voltamográficos de los dos (o más) marcadores deberían tener picos en voltajes que fueran resolubles entre sí. Preferiblemente, se utilizan dos marcadores diferentes. El invento proporciona nuevos marcadores electroquímicos que pueden ser utilizados en un sistema múltiple. La provisión de nuevos marcadores aumenta la gama de marcadores disponibles y, por lo tanto, hace factible el desarrollo de sistemas múltiples.

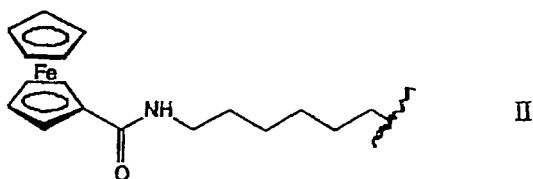
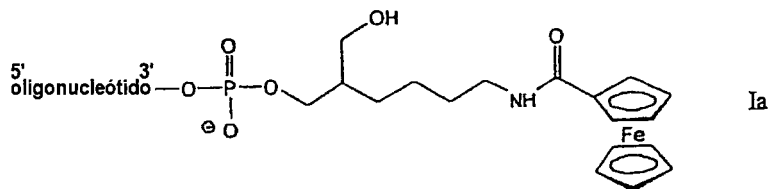
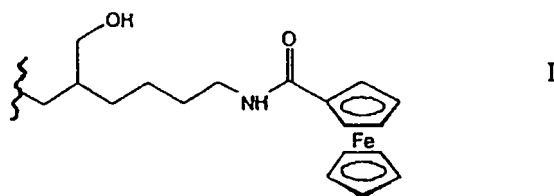
Los oligonucleótidos marcados son capaces de producir una señal electroquímica marcada o potenciada a causa de la liberación de un mononucleótido, dinucleótido u oligonucleótido ferrocenilado procedente de un oligonucleótido de hibridación en un ensayo de nucleasa dependiente de secuencia. Estos ensayos dependen de una actividad nucleasa para causar un cambio en la sonda de modo que se produzca una señal nueva o potenciada tras el reconocimiento de una secuencia específica de ácido nucleico.

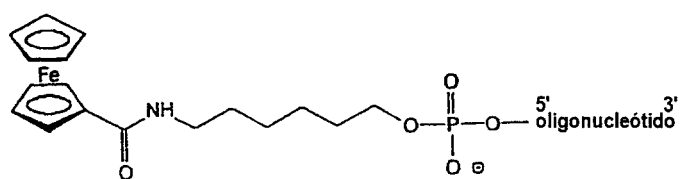
Si se desea, la operación de detección electroquímica puede ser llevada a cabo utilizando uno o más electrodos cubiertos por una membrana que es selectivamente capaz de excluir moléculas basándose en una o más características, por ejemplo, características seleccionadas entre tamaño, carga e hidrofobia. Esto puede ayudar a eliminar la corriente de fondo que surge de, por ejemplo, un ácido nucleico cargado o un oligonucleótido marcado y no digerido.

Los marcadores electroquímicamente activos adecuados incluyen aquellos que comprenden complejos pi metalo-carbocíclicos, es decir, complejos orgánicos con electrones pi parcial o totalmente deslocalizados. Los marcadores adecuados incluyen aquellos que comprenden compuestos sándwich en que dos anillos carbocíclicos son paralelos, y también sándwiches plegados (compuestos angulares) y monociclopentadienilos. En la presente invención, los marcadores electroquímicamente activos son marcadores de metalocenilo; más preferiblemente, son marcadores de ferrocenilo.

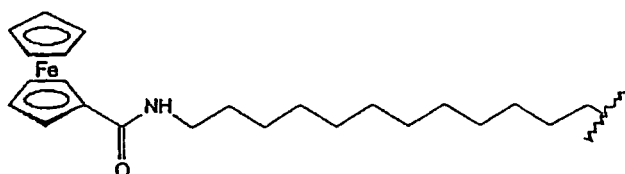
Los marcadores de ferrocenilo y metalocenilo pueden ser ventajosamente ferroceno- o metaloceno-carboxamidas N-sustituidas. El anillo de ferroceno o metaloceno, que constituye el resto de marcación, puede estar sin sustituir. Si se desea, el anillo de ferroceno o metaloceno puede estar sustituido con uno o más sustituyentes cuya naturaleza y posición se seleccionan para que influyan de un modo deseado en las características redox del resto ferroceno o metaloceno. El anillo de ferroceno o metaloceno puede además, o en vez de ello, estar sustituido con cualesquier sustituyentes anulares que no reduzcan esencialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. El resto ferroceno- o metaloceno-carboxamida puede estar unido al nucleótido u oligonucleótido a través del nitrógeno de la carboxamida. La unión al nucleótido u oligonucleótido es preferiblemente a través de un grupo fosfato o a través de la base del nucleótido. Ambos métodos de unión permiten que el marcador se fije a través de cualquier nucleótido situado a lo largo del oligonucleótido. Sin embargo, si la unión es a través de un grupo fosfato, es ventajosamente a través de un grupo fosfato 3' o 5' terminal con objeto de minimizar la probabilidad de que dicha unión impida estéricamente la hibridación Watson-Crick del oligonucleótido o afecte a la actividad nucleasa. Se prevé que la unión a través de una región de la base no implicada en el apareamiento Watson-Crick de bases sea menos perturbadora de dicho apareamiento de bases. Por lo tanto, la unión a través de la base puede ser más adecuada para la marcación en sitios oligonucleotídicos no terminales. El oligonucleótido marcado puede tener un resto conector entre el oligonucleótido y el resto de marcación. Preferiblemente, los oligonucleótidos marcados tienen un resto ferrocenilo de marcación que está unido al oligonucleótido por medio de un resto conector.

Se puede utilizar cualquier resto conector adecuado. Los restos conectores adecuados pueden comprender una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o insaturada. Ventajosamente, el resto conector es una cadena alifática lineal o ramificada que tiene de 4 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 16, especialmente de 8 a 14, y especialmente 12, átomos de carbono. Las cadenas de alquileo pueden estar sustituidas con cualquier sustituyente o pueden estar interrumpidas por cualquier átomo o resto con tal que dicho sustituyente, átomo o resto no reduzca esencialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. Son marcadores ferroceníflicos ilustrativos que pueden ser utilizados aquellos que tienen las fórmulas I a III. Nótese que los compuestos de la invención son los de la fórmula XI más adelante. Las moléculas de fórmula Ia a IIIa son oligonucleótidos marcados con los correspondientes marcadores ferroceníflicos. La fórmula IV es ilustrativa de un marcador ferroceníflico que puede fijarse a través de una base nucleotídica, incluyéndose en la fórmula IV, con fines de ilustración, la base timina amino-modificada.

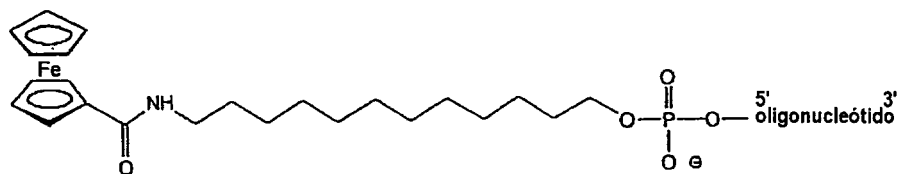




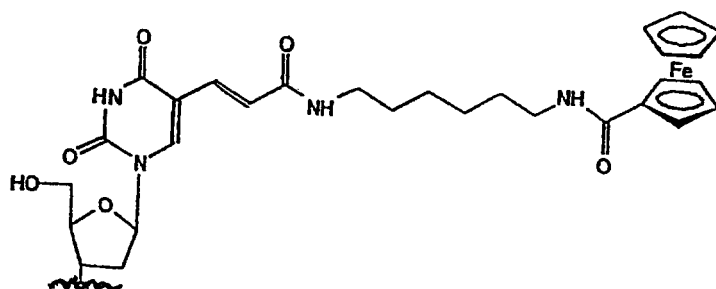
IIa



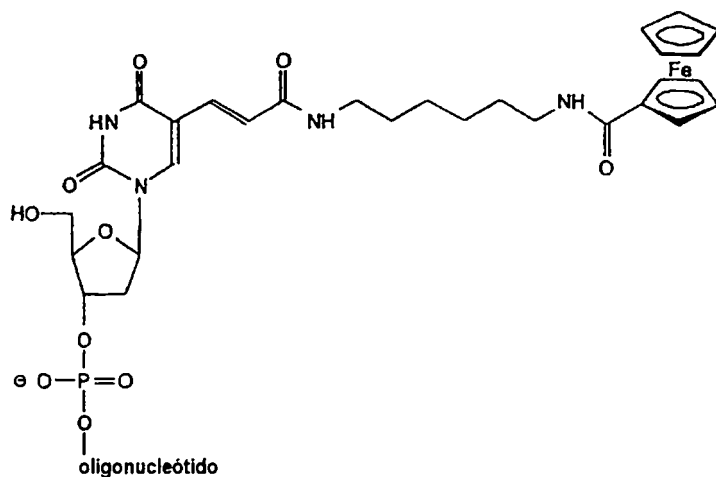
III



IIIa

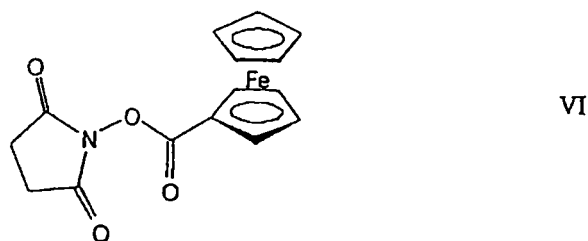
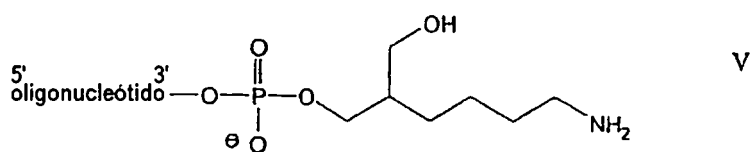


IV

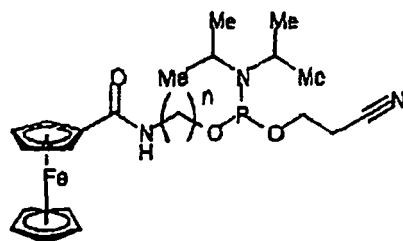
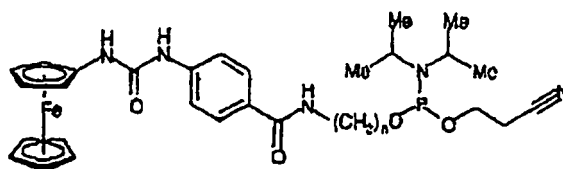


IVa

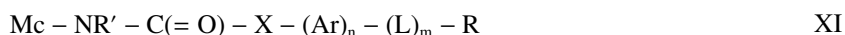
Las sondas marcadas con ferroceno pueden ser preparadas mediante cualquier método adecuado. A modo de ejemplo, el oligonucleótido puede ser un oligonucleótido modificado mediante la introducción de un radical que tiene un grupo amino terminal. El nucleótido modificado de fórmula V es ilustrativo de dichos nucleótidos amino-modificados. El ferroceno puede ser luego incorporado mediante la reacción del nucleótido amino-modificado con el éster N-hidroxi-succinimídico del ácido ferroceno-carboxílico (Fórmula VI), para obtener el oligonucleótido marcado con ferroceno.



En un método alternativo, los oligonucleótidos marcados con ferroceno pueden ser preparados mediante la adición del resto ferroceno durante la síntesis oligonucleotídica en fase sólida. Los marcadores de ferroceno pueden ser introducidos en un oligonucleótido durante la síntesis en fase sólida mediante dos métodos generales: en primer lugar, la adición del oligonucleótido al extremo 3' del oligonucleótido requiere el uso de una resina adecuada. Dicha resina es marcada con un derivado de ferroceno. La adición de ferroceno a un sitio interno, o al extremo 5' de un oligonucleótido, requiere el uso de un reactivo de copulación adecuado para copulación con un oligonucleótido unido a un soporte sólido, por ejemplo, un derivado ferrocenílico de fosoramidita, como se muestra, por ejemplo, con la fórmula IX o X.



La invención proporciona un marcador, etiqueta o resto marcado electroquímicamente activo, alternativo, nuevo. La invención proporciona un compuesto de fórmula XI,



en la que

- Mc es un grupo metalocenilo en el que cada anillo puede estar independientemente sustituido o no sustituido,
- el grupo metalocenilo comprende un ion metálico M seleccionado del grupo que consiste en hierro, cromo, cobalto, osmio, rutenio, níquel o titanio,
- R' es H o alquilo inferior,
- X es NR' u O,
- Ar es un grupo arilo sustituido o no sustituido,
- n es 0 ó 1,
- L es un grupo conector,

ES 2 324 488 T3

- m es 0 ó 1, y

- R representa un resto que se va a marcar o R es un resto que comprende un grupo lábil.

5

El grupo Mc puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilo inferior (por ejemplo, alquilo C₁ a C₄), alquilo inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster, amido u otro grupo metaloceno, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster, amido u otro grupo metaloceno, arilo, y arilo sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster, amido u otro grupo metaloceno. El otro grupo metaloceno puede estar sustituido del mismo modo que el grupo Mc con la excepción de que el número total de grupos Mc en la molécula del invento no exceda preferiblemente de cuatro. Preferiblemente, el grupo Mc no está sustituido.

10

Preferiblemente, M es un ion seleccionado entre hierro, osmio y rutenio. Muy preferiblemente, M es un ion de hierro. Cuando M es un ion de hierro, Mc es un ferroceno.

15

El alquilo inferior es preferiblemente un alquilo C₁ a C₄. Preferiblemente, R' es H. Cada R' tiene una identidad distinta de la del otro R'.

20

Preferiblemente, X es NH.

El grupo Ar puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilo inferior (por ejemplo, alquilo C₁ a C₄), alquilo inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, arilo, y arilo sustituido con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido. Preferiblemente, el grupo Ar no está sustituido.

25

Preferiblemente, n = 1. Preferiblemente, m = 1.

Los grupos conectores L adecuados pueden comprender una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o insaturada. Ventajosamente, el resto conector es una cadena alifática lineal o ramificada que tiene de 4 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 16, especialmente de 8 a 14, y más especialmente 12, átomos de carbono. Las cadenas de alquileo pueden estar sustituidas con cualquier sustituyente o pueden estar interrumpidas por cualquier átomo o resto con tal que dicho sustituyente, átomo o resto no reduzca esencialmente la sensibilidad electroquímica del marcador.

30

El compuesto de la invención puede comprender más de un grupo metaloceno. En el compuesto del invento, el grupo metaloceno puede estar sustituido con cualquier otro grupo marcador electroquímicamente activo. El compuesto puede ser uno que sea electroquímicamente activo o que se vuelva electroquímicamente activo después de una escisión parcial.

40

Preferiblemente, el resto que se va a marcar es un aminoácido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido, un nucleósido, un azúcar, un hidrato de carbono, un péptido, una proteína o un derivado de cualquiera de estas moléculas. En una realización preferida, R es un nucleótido o un oligonucleótido. El nucleótido puede ser seleccionado entre adenosina, timidina, guanosina, citidina y uridina. Preferiblemente, el nucleótido está fijado a través de un grupo fijado al grupo ribosa o desoxirribosa del nucleótido, por ejemplo, en la posición 2', 3' o 5'. Muy preferiblemente, el nucleótido está fijado a la posición 3' o 5', por ejemplo, a la posición 5'. Preferiblemente, la fijación a la posición 2', 3' o 5' es a través de un átomo de oxígeno o nitrógeno.

45

En otra realización preferida, R es un grupo que comprende un grupo lábil, preferiblemente un alquilo o un grupo carbonilo que comprende un grupo lábil. Entre los grupos alquilo, se prefieren los grupos alquilo inferior (por ejemplo, grupos alquilo C₁ a C₄). Entre los grupos lábiles, pueden mencionarse hidroxilo, haluros, ácidos orgánicos y N-hidroxidiacilaminas. El grupo lábil puede ser, por ejemplo, cloruro, bromuro o yoduro, ácido acético, un ácido benzoico, ácido 2,6-diclorobenzoico, una N-hidroxisuccinamida, una maleimida, yodoacetamida o isotiocianato. Preferiblemente, el grupo lábil es N-hidroxisuccinamida. El grupo lábil puede ser un grupo activable adecuado para uso en una reacción para copulación a un resto unido a un soporte sólido. Por ejemplo, el grupo lábil puede ser un grupo fosforamida.

55

Cuando R es un grupo que comprende un grupo lábil, el compuesto es un reactivo de marcación que puede ser utilizado para marcar electroquímicamente otra molécula. El reactivo de marcación es particularmente útil para marcar moléculas biológicamente importantes para uso en métodos conocidos o en métodos descritos en la presente memoria. Las moléculas de interés que pueden ser marcadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos, azúcares, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos, hidratos de carbono y derivados de cualesquiera de estas moléculas.

60

El reactivo de marcación puede ser fijado directamente o a través de un conector. El conector puede ser fijado primero al reactivo de marcación o a la molécula que se va a marcar. Si el conector es fijado primero a la molécula que se va a marcar, puede comprender un grupo, por ejemplo, un grupo amino o tiol, que facilite la reacción de marcación. Se prefiere un grupo amino.

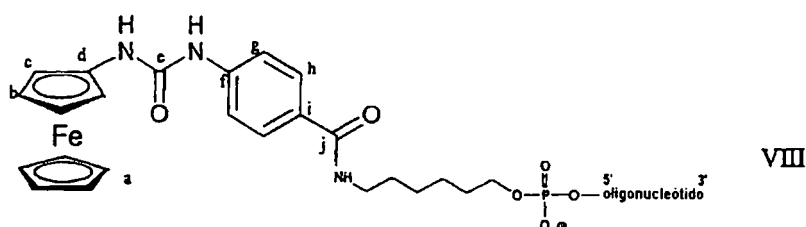
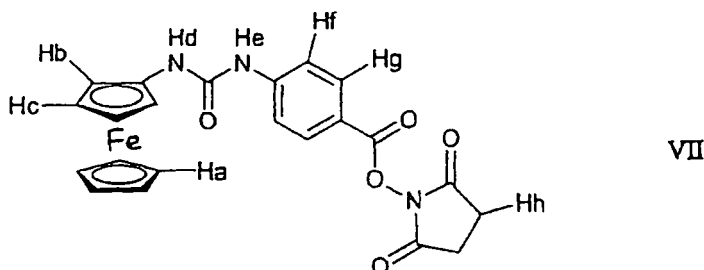
65

Si la molécula que se va a marcar es un nucleótido o un oligonucleótido, la marcación es preferiblemente en el extremo 3' o 5'. El oligonucleótido puede ser amino-modificado para facilitar la reacción de marcación. Los oligonucleótidos amino-modificados pueden ser sintetizados mediante técnicas estándares y son asequibles de una gran variedad de fuentes comerciales, por ejemplo, de Oswel Scientific (Southampton, Reino Unido). El oligonucleótido amino-modificado puede también incorporar un motivo conector; por ejemplo, la modificación puede ser la adición de un grupo 5'-aminohexilo o 3'-aminohexilo o un grupo 5'-amino C₁₂. Una molécula marcada de interés comprende preferiblemente un conector.

En el caso de un oligonucleótido, la secuencia de la porción oligonucleotídica de la molécula es preferiblemente tal que la molécula es capaz de hibridarse con una secuencia diana complementaria y, de este modo, ser utilizada como una sonda en una técnica de biología molecular, por ejemplo, una de las técnicas de detección o calificación de ácido nucleico descritas en esta memoria descriptiva.

Las moléculas biológicas marcadas de acuerdo con el invento pueden ser electroquímicamente activas tanto en el estado digerido como en el no digerido. Idealmente, el grado de actividad electroquímica variará dependiendo del grado de digestión.

La fórmula VIII ilustra un posible modo de fijación del nuevo marcador electroquímicamente activo a un oligonucleótido. La molécula de fórmula VIII puede ser obtenida al hacer reaccionar la molécula mostrada en la fórmula VII con un oligonucleótido modificado con 5'-aminohexilo.



En los Ejemplos 7 y 8 se proporcionan detalles del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico y detalles del uso de dicho compuesto para marcar oligonucleótidos. Sin embargo, será evidente para la persona experta que dicho marcador puede ser fijado a un oligonucleótido en cualquier posición adecuada y que la fijación no se limita al extremo 5' de dicho oligonucleótido. También resultará evidente que no es necesario que la fijación del nuevo marcador sea a través de un conector aminohexílico ni que el marcador sea necesariamente fijado a un oligonucleótido. Existe la posibilidad de que el nuevo marcador sea utilizado para marcar otras moléculas de interés, especialmente moléculas de interés biológico tales como proteínas, hidratos de carbono y anticuerpos.

Los compuestos de acuerdo con la invención tienen una utilidad particular en métodos relacionados con el invento. Bajo las condiciones expuestas en la Tabla 3, el potencial de electrodo de los ácidos ferroceno-carboxílicos sustituidos está en la región de 400 mV. Por otra parte, las moléculas de metaloceno sustituido de acuerdo con el invento tienen un potencial de electrodo en la región de 150 mV. El potencial menor es un potencial al cual la tendencia de las impurezas de fondo a interferir con la recogida de datos es mucho menor. En consecuencia, las moléculas de la invención permiten que se tomen lecturas más sensibles. En la Figura 23, se muestran voltamogramas que ilustran los diferentes potenciales de electrodo de un derivado de ferroceno convencional (el ácido ferroceno-carboxílico XII) en las Figuras 23(a) y (b), y del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico, un derivado de ferroceno con un resto ferroceno como se halla en las moléculas del invento, en las Figuras 23(c) y (d). Como se ve mediante una comparación de las Figuras 23(b) y 23(d), el pico del derivado de ferroceno con un resto ferroceno como el que se encuentra en las moléculas de la invención aparece en una parte del voltamograma de barrido en que la señal de fondo es débil, lo que permite una detección más sensible de esa molécula.

Además se describe un aparato dispuesto para llevar a cabo uno cualquiera o más de los métodos aquí descritos. Dicho aparato puede incluir adecuados electrodos, celdas electroquímicas, elementos de plástico desechables y aparatos para detectar, registrar, manipular y presentar los resultados y, en el caso de métodos para PCR, termocicladores apropiadamente programados o programables. Dichos aparatos pueden también incluir aparatos para el diseño óptimo de cebadores, sondas y condiciones de ciclación.

También se describe un aparato que comprende una o más regiones receptoras de muestras para admitir una o más muestras, medios para controlar la temperatura de dichas regiones receptoras de muestras y medios para medir las propiedades electroquímicas de dicha muestra. Se proporciona un termociclador en el que se pueden utilizar medios convencionales para controlar la temperatura de la muestra pero en el que se ha integrado un medio para realizar mediciones electroquímicas de las muestras. Dicho aparato puede ser fabricado para que se puedan utilizar celdas de electrodo convencionales (por ejemplo, las usadas en los ejemplos presentes).

También se describe un recipiente que comprende una o más regiones receptoras de muestras para alojar una o más muestras. Tal recipiente puede estar basado en el diseño de tubos de polipropileno o placas de 96 pocillos como se usan actualmente en PCR. Idealmente tal recipiente estará adaptado para recibir al menos un componente electrodo. El componente electrodo puede, por ejemplo, estar situado como parte de una tapa para el recipiente de manera que cuando se use para cerrar el recipiente, el(los) componente(s) electrodo(s) alcance(n) la disolución de la muestra. Tal recipiente tendrá ventajas frente a las células electroquímicas convencionales que no se han diseñado para usar en termocicladores y por tanto pueden no tener las características de conductividad térmica óptimas. Además las células electroquímicas convencionales generalmente no se contemplan como desechables debido a su relativamente elevado coste. El uso de material plástico desechable se ha convertido en una práctica habitual en biología molecular debido a que atenúa el riesgo de contaminación de la muestra.

También se describe un recipiente, opcionalmente basado en diseños conocidos de tubos PCR de polipropileno o placas de 96 pocillos, en el que se han integrado uno o más componentes electrodos para usar en los métodos de la invención. Tal recipiente preferiblemente se puede producir en cantidades suficientemente elevadas como para permitir reducir el coste del componente hasta el punto en el que se puede contemplar como desechable.

Figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de una celda electroquímica utilizada en las mediciones por voltametría diferencial de pulsos aquí descritas;

Las Figuras 2a, 2b, 2c y 2d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido BAPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(a);

Las Figuras 3a, 3b, 3c y 3d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido BAPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(b);

Las Figuras 4a, 4b, 4c y 4d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido T1BAPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(c);

Las Figuras 5a, 5b, 5c y 5d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido BAPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(d);

Las Figuras 6a, 6b, 6c y 6d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido GSDPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(e);

Las Figuras 7a, 7b, 7c y 7d son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido MC11PR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(f);

Las Figuras 8a y 8b son voltamogramas diferenciales de pulsos del oligonucleótido BAFR no marcado, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(g);

Las Figuras 9a y 9b son voltamogramas diferenciales de pulsos de reacciones testigo para el oligonucleótido T1BAPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 4(h);

Las Figuras 10a, 10b, 10c y 10d son voltamogramas diferenciales de pulsos de una mezcla de PCR que contiene el oligonucleótido BAPR marcado, como se describe más adelante en el Ejemplo 5(a);

Las Figuras 11a, 11b y 11c son voltamogramas diferenciales de pulsos de otra mezcla de PCR que contiene el oligonucleótido MC11PR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 5(b);

Las Figuras 12a, 12b, 12c y 12d son voltamogramas diferenciales de pulsos de una mezcla de PCR que contiene el oligonucleótido T1BAPR marcado con ferroceno, como se describe en el Ejemplo 5(c);

ES 2 324 488 T3

Las Figuras 13a, 13b, 13c y 13d son voltamogramas diferenciales de pulsos de una mezcla de PCR que contiene el oligonucleótido GSDPR marcado con ferroceno, como se describe más adelante en el Ejemplo 5(d);

Las Figuras 14a y 14b son representaciones esquemáticas del sistema Invader para detección fluorogénica de ácido nucleico, adaptado para uso en relación con la invención;

La Figura 15a ilustra el uso de los métodos en un ensayo de exonucleasa de T7;

La Figura 15b ilustra el uso en un ensayo que incorpora una digestión, con exonucleasa de T7, de una sonda oligonucleotídica marcada e hibridada a productos de PCR;

Las Figuras 16a y 16b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran la especificidad de sustrato de la exonucleasa de T7 (Ejemplo 9);

Las Figuras 17a y 17b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran la digestión, con exonucleasa de T7, de un producto de PCR marcado con cebador 5'-ferrocenilado [Ejemplo 10(a)];

Las Figuras 18a a 20b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran la digestión, con exonucleasa de T7, de una sonda TaqMan (marca comercial de Applied Biosystems) hibridada a un producto de PCR [Ejemplo 10(b)];

Las Figuras 21a y 21b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran una multiplicación por PCR con fragmento Stoffel [Ejemplo 10(c)]; y

Las Figuras 22a y 22b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran experimentos sin exonucleasa de T7 [Ejemplo 10(d)].

Las Figuras 23a y 23b son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran el potencial de electrodo del ácido ferroceno-carboxílico en concentraciones 10 μ M y 1 μ M, respectivamente, y las Figuras 23c y 23d son voltamogramas diferenciales de pulsos que ilustran el potencial de electrodo del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico en concentraciones 10 μ M y 1 μ M, respectivamente.

La Figura 24 muestra voltamogramas diferenciales de pulsos de los productos de reacciones de digestión con nucleasa en que el sustrato era (a) el oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos (2,5 μ M) y el oligonucleótido MC11w marcado en el extremo 5' por el ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico con un resto espaciador de 12 carbonos (1,5 μ M), (b) sólo el oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos (2,5 μ M) y (c) sólo el oligonucleótido MC11w marcado en el extremo 5' por el ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico con un resto espaciador de 12 carbonos (1,5 μ M).

Con referencia a la Figura 1, una celda electroquímica 1 adecuada para uso en los experimentos de voltametría cíclica aquí descritos comprende un recipiente 2 que contiene una disolución 3 de electrolito de fondo, que es una disolución acuosa 100 mM de acetato amónico. Sumergida en la disolución 3 hay una cámara 4 que recibe tanto la muestra que se va a analizar como, sumergido en ella, un electrodo 5 de trabajo de carbono vítreo. Alternativamente, se puede utilizar un electrodo de oro. También sumergidos en la disolución 3 hay un contraelectrodo 6 de alambre de platino y un electrodo 7 de referencia de plata/cloruro de plata sumergido en una disolución 4 M de cloruro potásico, disoluciones que están en comunicación con otras a través de un disco sinterizado.

Con referencia a las Figuras 15a y 15b, la exonucleasa de T7 (a la que a veces se hace referencia como exonucleasa del gen 6 de T7) es una exonucleasa 5' a 3' específica de DNA bicatenario. La enzima digiere oligonucleótidos hibridados a una región diana de DNA con objeto de producir fragmentos mononucleotídicos, dinucleotídicos, y oligonucleotídicos más cortos. La especificidad de sustrato de la enzima es tal que se pueden digerir sondas oligonucleotídicas marcadas en el extremo 5' con un marcador electroquímico tal como ferroceno. Las sondas marcadas con ferroceno digeridas pueden ser detectadas por métodos electroquímicos, por ejemplo, por voltametría diferencial de pulsos. La exonucleasa de T7 no es termoestable y, por lo tanto, no es estable bajo las condiciones de termociclación normalmente utilizadas en PCR.

La exonucleasa de T7 puede ser utilizada de dos maneras en la detección de DNA basada en PCR. Utilizando un cebador marcado en 5', se pueden sintetizar productos de PCR marcados en el extremo 5' con un marcador tal como ferroceno. La exonucleasa de T7 posteriormente añadida a la mezcla de PCR digiere el producto de PCR marcado. El cebador de cadena sencilla no multiplicado no será digerido (Figura 15a). En el segundo método, con objeto de conseguir la detección de productos de PCR específicos de secuencia, en lugar de cebadores marcados se usa una sonda electroquímicamente marcada que es similar a una sonda Taqman (marca comercial de Applied Biosystems) en cuanto que es diseñada para que se hibride con el ácido nucleico diana entre las secuencias cebadoras. Se introduce la sonda en la mezcla de PCR después de la termociclación y se deja que se hibride con la diana. Luego se añade la exonucleasa de T7, y la sonda es digerida sólo si se ha formado un dúplex por hibridación con un producto de PCR complementario.

Ejemplos

Materiales y métodos-Preparación de oligonucleótidos y ensayos

Los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma Gensosys. Todos los oligonucleótidos se obtuvieron desalados y se utilizaron sin una purificación ulterior. La N,N-dimetilformamida (DMF) [99,8%; reactivo de la American Chemical Society (A.C.S.)] y el acetato de zinc dihidratado (99,999%) se obtuvieron de Aldrich.

El bicarbonato potásico (reactivo de A.C.S.), carbonato potásico (mínimo de 99%), acetato amónico (aproximadamente 98%), acetato magnésico (mínimo de 99%), persulfato amónico (reactivo para electroforesis), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y el agua de calidad para biología molecular se obtuvieron de Sigma.

Las columnas NAP10 (marca comercial Sephadex G25 de calidad para DNA) se obtuvieron de Amersham Biosciences.

La nucleasa S1, los dNTPs y el DNA genómico humano se obtuvieron de Promega.

El AmpliTaq Gold, con cloruro magnésico 25 mM y tampón GeneAmp (marca comercial) Gold 10X para PCR suministrados, y la DNA polimerasa AmpliTaq, fragmento Stoffel, con tampón Stoffel 10X y cloruro magnésico 25 mM suministrados, se obtuvieron de Applied Biosystems.

La exonucleasa de T7 se obtuvo de New England Biolabs.

Las incubaciones se llevaron a cabo usando un controlador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc.). Las mediciones de absorbancia a 260 nm se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Cary 100 Bio (Varian Ltd.).

Los geles de poliacrilamida se prepararon con ProtoGel (National Diagnostics) y se tiñeron con SYBR Gold (Molecular Probes Inc.).

Los geles de agarosa se prepararon con agarosa SeaKem LE (BioWhittaker Molecular Applications) y se tiñeron con bromuro de etidio (Aldrich). Los geles fueron sometidos a electroforesis en tampón Tris/borato/EDTA (TBE) 0,5X (Sigma). Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada y tratada en autoclave (sistema WaterPro, Labconco).

Secuencias oligonucleotídicas

Las secuencias oligonucleotídicas de las sondas y cebadores para glucosa-6-fosfatasa y acil-CoA deshidrogenasa de cadena media fueron como describen Kunihiro Fujii, Yoichi Matsubara, Jun Akanuma, Kazutoshi Takahashi, Shigeo Kure, Yoichi Suzuki, Masue Imiazumi, Kazuie Iinuma, Osamu Sakatsume, Piero Rinaldo y Kuniaki Narisawa, *Human Mutation* 15, 189-196 (2.000).

Las secuencias oligonucleotídicas de los cebadores y la sonda para beta-actina fueron como describen Agnetha M. Josefsson, Patrik K. E. Magnusson, Nathelie Ylitalo, Per Sorensen, Pernilla Qwarforth-Tubbin, Per Kragh Andersen, Mads Melbye, Hans-Olov Adami y Ulf B. Gyllenstein, *Lancet* 355, 2.189-2.193 (2.000).

Las secuencias oligonucleotídicas de los cebadores y la sonda para el gen HFE fueron como describen Luis A. Ugozzoli, David Chinn y Keith Hamby, *Analytical Biochemistry* 307, 47-53 (2.002).

ACTB (β -actina)

Sonda

BAPR: ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT

C9-T1BAPR: T(C9)G CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT

[T(C9) = timina amino-modificada con conector C9, fórmula IV]

Cebadores

BAF: CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G

BAR: TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A

BAFR: CAG GTC CCG GCC AGC CAG

ES 2 324 488 T3

1. C282Y (gen HFE, mutación C282Y)

Sonda

5 C282YP: ATA TAC GTG CCA GGT GGA

Cebadores

10 C282YF: CTG GAT AAC TTG GCT GTA C

C282YR: TCA GTC ACA TAC CCC AGA T

2. H63D (gen HFE, mutación H63F)

15 Sonda

H63DP: ATA TAC GTG CCA GGT GGA

20 Cebadores

H63DF: CTT GGT CTT TCC TTG TTT GAA G

25 H63DR: ACA TCT GGC TTG AAA TTC TAC T

CFTR (regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística)

Cebadores

30 CFT01: AGG CCT AGT TGT CTT ACA GTC CT

CFT03: TGC CCC CTA ATT TGT TAC TTC

35 G6PC (glucosa-6-fosfatasa)

Sonda

40 GSDPR: TGT GGA TGT GGC TGA AAG TTT CTG AAC

Cebadores

45 GSDw: CCG ATG GCG AAG CTG AAC

GSDcom: TGC TTT CTT CCA CTC AGG CA

6. ACADM (acil-CoA deshidrogenasa de cadena media)

50 Sonda

MC11PR: CTA GAA TGA GTT ACC AGA GAG CAG CTT GG

55 Cebadores

MC11lw: GCT GGC TGA AAT GGC AAT GA

60 MC11com: CTG CAC AGC ATC AGT AGC TAA CTG A

7. Oligonucleótido en horquilla

65 reHP: CAG AAT ACA GCA GGT GCT CGC CCG GGC GAG CAC CTG TAT

TCT G

8. Oligonucleótido de cadena sencilla

reBAF: CAG AAT ACA GCA GGT TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A

5

El oligonucleótido para uso en los Ejemplos 7 y 8 fue amino-modificado con C12 en el extremo 5'. Los oligonucleótidos para uso en los demás ejemplos quedaron sin modificar.

Materiales y métodos-Detección electroquímica

10

Los siguientes electrodos y la celda de bajo volumen se obtuvieron de BAS, Congleton, Cheshire, Reino Unido:

En los Ejemplos 4 y 5 se usó un electrodo de trabajo de carbono vítreo (número MF-2012 del catálogo). En los Ejemplos 8 a 10 se usó un electrodo de trabajo de oro (número MF-2014 del catálogo).

15

Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (número MF-2079 del catálogo).

Contraelectrodo (electrodo auxiliar) de alambre de platino (número MW-4130 del catálogo).

20

Celda de bajo volumen (número MF-2040 del catálogo) que comprende un vial de vidrio para voltametría y una cámara de vidrio para muestras, con punta reemplazable de vidrio Vycor.

De Windsor Scientific Limited se obtuvo un sistema de procesamiento electroquímico AutoLab (PGSTAT30 con analizador de respuesta en frecuencia o μ AutoLab tipo II, fabricados por Eco Chemie B.V).

25

Ejemplo 1

Este ejemplo describe el método de voltametría cíclica usado más adelante en los Ejemplos 3 a 5 y 8 a 10.

30

Se llenó la celda de bajo volumen de la Figura 1 con aproximadamente 10 ml de disolución de acetato amónico (100 mM).

Se puso una parte alícuota de 200 μ l de la muestra para análisis en la cámara 4 de vidrio para muestras, la cual se puso luego en la celda de bajo volumen junto con el electrodo 7 de referencia y el contraelectrodo 6. Se conectaron los electrodos a un sistema de procesamiento electroquímico AutoLab y se llevó a cabo una voltametría diferencial de pulsos usando los parámetros descritos más adelante. Antes del análisis, el electrodo de trabajo fue pulido (utilizando el sistema BAS de pulimento, número MF-2060 del catálogo), lo que fue seguido de acondicionamiento. El acondicionamiento de electrodo consistía en una voltametría cíclica, barriéndose entre ± 1 voltio en el tampón de fondo apropiado.

40

Parámetros de la voltametría diferencial de pulsos

TABLA 1

45

Parámetros usados en los Ejemplos 4 y 5

Parámetro:	Barrido catódico	Barrido anódico
Potencial de acondicionamiento (V)	0	0
Duración del acondicionamiento (s)	0	0
Potencial de depósito (V)	0,8	-0,1
Duración del depósito (s)	5	5
Tiempo de equilibración (s)	0	0
Tiempo de modulación (s)	0,02	0,02
Intervalo de tiempo (s)	0,1	0,1
Potencial inicial (V)	0,75	-0,1
Potencial final (V)	0,1	0,7
Salto de potencial (V)	0,005	0,005
Amplitud de modulación (V)	0,1	0,1

50

55

60

65

ES 2 324 488 T3

TABLA 2

Parámetros usados en el Ejemplo 8

Parámetro:	Barrido catódico	Barrido anódico
Potencial de acondicionamiento (V)	0	0
Duración del acondicionamiento (s)	0	0
Potencial de depósito (V)	0	0
Duración del depósito (s)	0	5
Tiempo de equilibración (s)	0	0
Tiempo de modulación (s)	0,04	0,04
Intervalo de tiempo (s)	0,1	0,1
Potencial inicial (V)	-0,1	0,3
Potencial final (V)	0,3	-0,1
Salto de potencial (V)	0,0003	0,0003
Amplitud de modulación (V)	0,05	0,05

TABLA 3

Parámetros usados en los Ejemplos 9 y 10

Parámetro:	Barrido anódico
Potencial de acondicionamiento (V)	0
Duración del acondicionamiento (s)	10
Potencial de depósito (V)	0
Duración del depósito (s)	0
Tiempo de equilibración (s)	0
Tiempo de modulación (s)	0,04
Intervalo de tiempo (s)	0,1
Potencial inicial (V)	-0,1
Potencial final (V)	0,7
Salto de potencial (V)	0,003
Amplitud de modulación (V)	0,05

Ejemplo 2

Síntesis del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido ferrocenocarboxílico

Se disolvieron ácido ferrocenocarboxílico (303 mg, 1,32 milimoles) y N-hidroxisuccinimida (170 mg, 1,47 milimoles) en dioxano (15 ml) y se añadió la disolución, con agitación, a una disolución de dicitlohexilcarbodiimida (305 mg, 1,48 milimoles) en dioxano (3 ml). La mezcla fue agitada a temperatura ambiental durante 24 horas, tiempo durante el cual se formó un precipitado. El precipitado fue separado por filtración, el disolvente fue eliminado *in vacuo* del producto de filtración, y el sólido resultante fue purificado por cromatografía en una columna de gel de sílice, realizándose la elución con éter de petróleo:acetato de etilo (8:2). Rendimiento: 320 mg, 74%.

Ejemplo 3

Síntesis de oligonucleótidos ferrocenílicos

Un oligonucleótido amino-modificado liofilizado fue rehidratado en el volumen correcto de tampón de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ (500 mM, pH de 9,0) para obtener una concentración de oligonucleótido de $0,5 \text{ nanomoles} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. El oligonucleótido amino-modificado ($40 \mu\text{l}$, $0,5 \text{ nanomoles} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) fue añadido lentamente, agitándose con formación de remolinos, a una disolución del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido ferrocenocarboxílico en DMF ($40 \mu\text{l}$, 375 mM). La disolución fue sacudida a temperatura ambiental durante la noche. Luego fue diluida con acetato amónico ($920 \mu\text{l}$, 100 mM, pH de 7,0) y purificada utilizando dos columnas NAP 10, realizándose la elución primero con acetato amónico (100 mM, pH de 7,0) y luego con agua desionizada y tratada en autoclave. Los oligonucleótidos ferrocenilados fueron parcialmente purificados en una columna NAP 10 para eliminar la sal y las especies ferrocénicas de bajo peso molecular, para obtener una mezcla de oligonucleótidos no marcados y marcados con ferroceno. No se llevó a cabo otra purificación antes de su utilización. En las reacciones de marcación se utilizaron oligonucleótidos amino-modificados que poseían cuatro diferentes estructuras conectoras, C7, C6, C12 y T(C9), que variaban en cuanto a la estructura y al punto de fijación. Los conectores C6, C12 y T(C9) fueron fijados al extremo 5' del oligonucleótido a través del éster fosfato terminal o la base. El conector C7 fue fijado al extremo 3' del oligonucleótido a través del éster fosfato terminal. Las estructuras de los marcadores se muestran en las fórmulas I a IV. La concentración de oligonucleótido en el eluyente fue determinada midiendo su absorbancia a 260 nm. La presencia del marcador de ferroceno fue confirmada mediante un análisis voltamétrico.

Ejemplo 4

Digestión con nucleasa S1

Las mezclas ($100 \mu\text{l}$) de la reacción de digestión de oligonucleótidos contenían oligonucleótido ($3,5\text{-}9 \mu\text{M}$, concentraciones detalladas más adelante), acetato amónico (250 mM, pH de 6,5), acetato de zinc (4,5 mM) y nucleasa S1 ($0,4 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C durante 1 hora. La digestión completa del oligonucleótido fue confirmada mediante el análisis, en gel de poliacrilamida, de una parte alícuota de $10 \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción cruda. Las múltiples mezclas de reacción fueron reunidas antes del análisis voltamétrico para obtener un volumen final de $200 \mu\text{l}$. A modo de comparación, se llevaron a cabo reacciones “no enzimáticas” del modo anteriormente descrito, excluyendo la nucleasa S1 de la mezcla de reacción. Se llevaron a cabo controles enzimáticos con calefacción del modo anteriormente descrito, utilizando nucleasa S1 que había sido previamente desnaturalizada térmicamente mediante calentamiento a 95°C durante 15 minutos.

En lo que viene a continuación, los reaccionantes y las condiciones son como se describieron anteriormente, y las condiciones de la voltametría son como se indicaron en la Tabla 1 salvo donde se afirma otra cosa.

Ejemplo 4(a)

Oligonucleótido: oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 3' por ferroceno con un resto espaciador de 7 carbonos (fórmula I).

Concentración de oligonucleótido: $7,0 \mu\text{M}$.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1 salvo que el intervalo de tiempo fue 0,09 s y el tiempo de modulación fue 0,5 s.

Los resultados se muestran en la Figura 2a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 2b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 2c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 2d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(b)

Oligonucleótido: oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 6 carbonos (fórmula II).

Concentración de oligonucleótido: $7,0 \mu\text{M}$.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1 salvo que el intervalo de tiempo fue 0,09 s y el tiempo de modulación fue 0,5 s.

ES 2 324 488 T3

Los resultados se muestran en la Figura 3a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 3b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 3c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 3d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(c)

Oligonucleótido: oligonucleótido T1BAPR marcado en la base del extremo 3' por ferroceno con un resto espaciador de 9 carbonos (fórmula IV).

Concentración de oligonucleótido: 8,8 μM .

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados se muestran en la Figura 4a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 4b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 4c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 4d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(d)

Oligonucleótido: oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos (fórmula III).

Concentración de oligonucleótido: 7,0 μM .

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1 salvo que el intervalo de tiempo fue 0,09 s y el tiempo de modulación fue 0,5 s.

Los resultados se muestran en la Figura 5a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 5b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 5c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 5d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(e)

Oligonucleótido: oligonucleótido GSDPR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos (fórmula III).

Concentración de oligonucleótido: 3,5 μM .

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados se muestran en la Figura 6a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 6b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 6c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 6d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(f)

Oligonucleótido: oligonucleótido MC11PR marcado en el extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos (fórmula III).

Concentración de oligonucleótido: 3,5 μM .

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

ES 2 324 488 T3

Los resultados se muestran en la Figura 7a (barrido catódico del testigo “no enzimático”), Figura 7b (barrido catódico de la disolución que incluye nucleasa S1), Figura 7c (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y Figura 7d (barrido anódico de la disolución que incluye nucleasa S1). En la Tabla 2 se exponen los valores de pico medidos, las posiciones de pico y el % de potenciación de pico para la disolución que incluye nucleasa S1 (es decir, con oligonucleótido digerido) en comparación con el testigo “no enzimático”.

Ejemplo 4(g)

(Comparación)

Oligonucleótido: BAFR, no marcado.

Concentración de oligonucleótido: 8,8 μ M.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados se muestran en la Figura 8a (barrido catódico) y Figura 8b (barrido anódico). No se observó ningún pico en ningún barrido.

Ejemplo 4(h)

(Comparación)

Oligonucleótido: oligonucleótido T1BAPR marcado en la base del extremo 5' por ferroceno con un resto espaciador de 9 carbonos (fórmula IV).

Concentración de oligonucleótido: 8,8 μ M.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados se muestran en la Figura 9a (barrido anódico del testigo “no enzimático”) y la Figura 9b (barrido anódico del testigo enzimático calentado que incluye nucleasa S1). En la Figura 9a se registró una altura de pico de 60,6 μ A (posición de pico = 424 mV) mientras que, en la Figura 9b, se registró una altura de pico de 39,9 μ A (posición de pico = 409 mV).

Los picos relacionados con ferroceno se observaron a 300-500 mV. No se observaron picos en este intervalo cuando se analizaron oligonucleótidos no ferrocenilados (Figuras 8a y 8b). La comparación de los testigos no enzimáticos con los oligonucleótidos marcados con ferroceno y digeridos mostró que se obtenía un aumento de la altura de pico tras la digestión del oligonucleótido (Tabla 4).

Con objeto de confirmar que los cambios observados no eran debidos a la presencia de enzima, o a componentes del tampón para almacenamiento de la enzima, se llevaron también a cabo experimentos de digestión usando una enzima térmicamente desnaturalizada [Ejemplo 4(h)]. No se observaron cambios significativos en la señal del ferroceno cuando se compararon testigos no enzimáticos y testigos con enzima térmicamente desnaturalizada.

Se llevaron a cabo experimentos de digestión sobre dos secuencias oligonucleótidas adicionales con el conector C12 de ferroceno-oligonucleótido: ferroceno-C12-MC11PR y ferroceno-C12-GSDPR (Figuras 6 y 10). Para cada secuencia, se observó un aumento de la altura de pico de la señal, relacionada con ferroceno, del oligonucleótido digerido.

TABLA 4

Posiciones y alturas de los picos relacionados con ferroceno en voltamogramas anódicos y catódicos diferenciales de pulsos

Barridos catódicos

	No digerido		Digerido		
Oligo	Posición de pico	Altura de pico	Posición de pico	Altura de pico	% de aumento de la altura de pico tras la digestión
BAPR C7	419	-4,65	424	-10,16	218
BAPR C6	424	-3,24	444	-8,87	274
T1BAPR C9	518	-94,1	533	-456,5	485
BAPR C12	-	-	500	-4,71	
GSDPR C12	533	-30,5	554	-65,43	215
MC11PR C12	553	-21,9	564	-49	224

Barridos anódicos

	No digerido		Digerido		
Oligo	Posición de pico	Altura de pico	Posición de pico	Altura de pico	% de aumento de la altura de pico tras la digestión
BAPR C7	394	3,39	394	9,18	266
BAPR C6	399	1,63	419	10,3	632
T1BAPR C9	434	82,8	444	818	988
BAPR C12	-	-	494	6,7	
GSDPR C12	434	62,9	394	359	571
MC11PR C12	429	60,1	394	196	326

Ejemplo 5

PCR

Se llevó a cabo una multiplicación, por PCR, de DNA genómico humano (40 ng por 100 μ l de mezcla de reacción) o de amplicones de PCR (productos de PCR) purificados en gel. Los amplicones de PCR utilizados para las multiplicaciones subsiguientes se purificaron en gel de agarosa con sistemas Nucleospin Extract (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo proporcionado. Todas las sondas de ferrocenil-oligonucleótido fueron 3'-fosforiladas.

Los cebadores, el molde y la sonda utilizados para la reacciones individuales son los anteriormente detallados.

Las mezclas de reacción, de 100 μ l, contenían Tris-HCl (15 mM, pH de 8,0), cloruro potásico (50 mM), cloruro magnésico (3,5 mM), dATP, TTP, dCTP y dGTP (cada uno 200 μ M), cebador directo (1,0 μ M), cebador inverso (1,0 μ M), sonda de ferrocenil-oligonucleótido (0,9 μ M) y AmpliTaq Gold (0,04 U· μ l⁻¹). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 10 minutos (desnaturalización inicial y activación enzimática), lo que fue seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación y extensión del cebador a 60°C durante 1 minuto.

Se prepararon y reunieron quince mezclas de reacción de 100 μ l. La mezcla de reacción cruda fue luego concentrada hasta un volumen total de 200 μ l antes del análisis voltamétrico.

En lo que viene a continuación, los reaccionantes y las condiciones son como se describieron anteriormente y las condiciones de la voltametría son como se indicaron en la Tabla 1 a menos que se afirme otra cosa.

ES 2 324 488 T3

Ejemplo 5(a)

Oligonucleótido: oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' con un resto espaciador de 12 carbonos (fórmula III).

Reacción positiva: molde (β -actina): amplicón de PCR de β -actina; cebadores: BAF, BAR.

Reacción negativa: molde (regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística): amplicón de PCR de la fibrosis quística; cebadores: CFT 01, CFT 03.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados fueron los siguientes:

Figura 10a reacción negativa, barrido catódico, ningún pico observado.

Figura 10b reacción positiva, barrido catódico, posición de pico: 493 mV; altura de pico: 19,4 nA.

Figura 10c reacción negativa, barrido anódico, ningún pico observado.

Figura 10d reacción positiva, barrido anódico, posición de pico: 373 mV; altura de pico: 27,3 nA.

Ejemplo 5(b)

Oligonucleótido: oligonucleótido MC11PR marcado en el extremo 5' con un resto espaciador de 12 carbonos (fórmula III).

Reacción positiva: molde [acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD; del inglés, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase)] : molde de amplicón de PCR de MCAD o molde genómico; cebadores: MC11w, MC11com.

Reacción negativa: molde (glucosa-6-fosfatasa): amplicón de PCR de glucosa-6-fosfatasa; cebadores: GSDw, GSDcom.

Figura 11a reacción negativa, barrido anódico, posición de pico: 429 mV; altura de pico: 1,84 nA.

Figura 11b reacción positiva (molde de amplicón de PCR), barrido anódico, posición de pico: 388 mV; altura de pico: 7,62 nA.

Figura 11c reacción positiva (molde genómico), barrido anódico, posición de pico: 409 mV; altura de pico: 8,11 nA.

Ejemplo 5(c)

Oligonucleótido: oligonucleótido T1BAPR marcado en el extremo 5' con un resto espaciador de 9 carbonos.

Reacción positiva: molde (β -actina): DNA genómico humano; cebadores: BAF, BAR.

Reacción negativa: molde (glucosa-6-fosfatasa): DNA genómico humano; cebadores: GSDw, GSDcom.

Condiciones de la voltametría: como en la Tabla 1.

Los resultados fueron los siguientes:

Figura 12a reacción negativa, barrido anódico.

Figura 12b reacción positiva, barrido anódico, posición de pico: 429 mV; altura de pico: 36 nA.

Figura 12c reacción negativa, barrido catódico.

Figura 12d reacción positiva, barrido catódico, posición de pico: 498 mV; altura de pico: 14 nA.

Ejemplo 5(d)

Oligonucleótido GSDPR marcado en el extremo 5' con un resto espaciador de 12 carbonos.

Reacción positiva: molde (glucosa-6-fosfatasa): DNA genómico humano; cebadores: GSDw, GSDcom.

Reacción negativa: molde (β -actina): DNA genómico humano; cebadores: BAF, BAR.

Figura 13a reacción negativa, barrido anódico.

Figura 13b reacción positiva, barrido anódico, posición de pico: 439 mV; altura de pico: 23 nA.

Figura 13c reacción negativa, barrido catódico.

Figura 13d reacción positiva, barrido catódico.

En este ejemplo, para demostrar la detección, específica de secuencia, de productos de PCR con sondas oligonucleotídicas ferroceniladas, se utilizaron secuencias de sonda y cebador procedentes de ensayos fluorogénicos de nucleasa 5' previamente optimizados. Se llevó a cabo una multiplicación por PCR de los genes de beta-actina, glucosa-6-fosfatasa y acil-CoA deshidrogenasa de cadena media usando un molde de amplicón purificado o de DNA genómico humano. En todos los experimentos de PCR, se usaron sondas con conectores C12 de ferroceno fijados al extremo 5'. La extensión del extremo 3' de todas las sondas para experimentos de PCR fue bloqueada por fosforilación.

A las mezclas de PCR se añadieron sondas de ferrocenil-oligonucleótido que multiplicaban dianas complementarias (reacciones positivas) y dianas no complementarias (reacciones negativas). Para mejorar la detección de las especies de ferroceno, las mezclas de reacción fueron combinadas y concentradas antes del análisis voltamétrico.

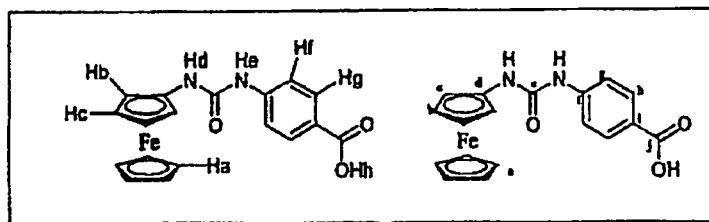
El análisis voltamétrico fue llevado a cabo sobre las mezclas de PCR crudas (Figuras 10 y 11). En cada caso, se observa una señal relacionada con ferroceno para las reacciones positivas (que contienen sonda digerida). No se observa señal alguna para las reacciones negativas (que contienen sonda sin digerir).

Ejemplo 6a

Síntesis de ferroceno-carbonil-azida

Se preparó ferroceno-carbonil-azida a partir de ácido ferrocenocarboxílico por reacción con cloruro de oxalilo y azida sódica.

Ejemplo 6b

Síntesis del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico

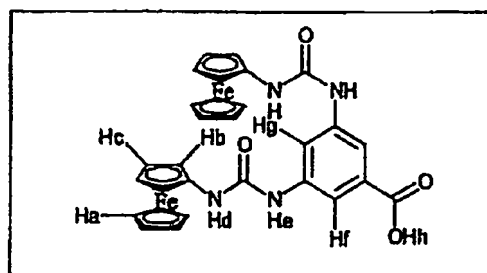
Se cargaron ferroceno-carbonil-azida (300 mg, 1,18 milimoles, 1,00 equivalentes), ácido 4-aminobenzoico (244 mg, 1,78 milimoles, 1,50 equivalentes) y 1,4-dioxano (40 ml), bajo nitrógeno, en un matraz purgado de fondo redondo. La mezcla de reacción fue agitada bajo nitrógeno en un baño a 100°C durante 2 horas y 50 minutos y fue luego dejada enfriar a la temperatura ambiental. Se cargó HCl 2 M (100 ml) en la mezcla de reacción y se extrajo el producto con acetato de etilo (150 ml). Esta fase fue lavada con HCl 2 M (100 ml), secada con sulfato sódico y concentrada *in vacuo* para obtener el producto. Un secado adicional en una estufa de vacío proporcionó el producto en forma de cristales de color naranja (413 mg, 96%). Resonancia magnética nuclear (NMR; del inglés, nuclear magnetic resonance) de ^1H : δ (300 MHz, d_6 -DMSO), 3,96 (2H, b, Hc), 4,14 (5H, s, Ha), 4,53 (2H, b, Hb), 7,54 (2H, m, Hf), 7,85 (2H, m, Hg), 7,98 (1H, s, Hd), 8,87 (1H, s, He), 12,57 (1H, s, Hh), ^{13}C -NMR: δ (75,5 MHz, d_6 -DMSO), 61,0, 64,1, 66,7, 68,1 (Ca, d), 117,2 (Cg), 123,5 (Cj), 130,9 (Ch), 144,6 (Cf), 152,8 (Ce).

Ejemplo 6c

Síntesis del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico

Se disolvió dicitlohexilcarbodiimida (DCC) (194 mg, 0,939 milimoles, 1,14 equivalentes) en 1,4-dioxano anhidro (2 ml) y se cargó la disolución en un matraz purgado de fondo redondo, bajo nitrógeno. Se cargó N-hidroxisuccinimida (108 mg, 0,939 milimoles, 1,14 equivalentes). Se disolvió ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico (300 mg, 0,823 milimoles, 1,0 equivalentes) en 1,4-dioxano anhidro (13 ml) y se cargó gota a gota la disolución en el matraz. La disolución fue agitada a temperatura ambiental durante 23 horas. Una pequeña cantidad de sólido de color marrón claro fue eliminada de la mezcla de reacción de color rojo/naranja mediante filtración a través de un embudo Buchner. Se cargaron agua (100 ml) y acetato de etilo (50 ml) en la mezcla de reacción. La fase de acetato de etilo fue separada y la fase acuosa fue sometida a extracción con acetato de etilo (100 ml). Las fases de acetato de etilo fueron combinadas, secadas con sulfato sódico y concentradas *in vacuo* para obtener el producto crudo en forma de aceite naranja, el cual fue purificado utilizando cromatografía de resolución rápida en sílice con un sistema de gradiente de acetato de etilo (60)/éter de petróleo (40; punto de ebullición de 40-60°C) a acetato de etilo. Un secado en una estufa de vacío proporcionó el éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico en forma de cristales finos de color naranja (237 mg, 66%). R_f [acetato de etilo/éter de petróleo (punto de ebullición de 40-60°C), 5:1] = 0,41. $^1\text{H-NMR}$, δ (300 MHz, d_6 -DMSO), 2,88 (4H, s, Hh), 3,98 (2H, t, J = 1,8 Hz, Hc), 4,16 (5H, s, Ha), 4,55 (2H, t, J = 1,8 Hz, Hb), 7,68 (2H, m, Hf), 8,00 (2H, m, Hg), 8,11 (1H, s, Hd), 9,16 (1H, s, He). $^{13}\text{C-NMR}$: δ (75,5 MHz, d_6 -DMSO), 25,9 (C1), 61,1, 64,2 (Cb y Cc), 69,1 (Ca), 117,7 (Cg), 131,9 (Ch), 170,9 (Ck). Espectrometría de masas (MS; del inglés, *mass spectrometry*) por bombardeo con átomos rápidos (FAB; del inglés, *fast atom bombardment*): m/z , 462,07 [M+H].

Ejemplo 6d

Síntesis del ácido 3,5-di(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico

Se cargaron ferroceno-carbonil-azida (800 mg, 3,14 milimoles, 2,5 equivalentes), ácido 3,5-diaminobenzoico (194 mg, 1,25 milimoles, 1,00 equivalentes) y 1,4-dioxano (60 ml), bajo nitrógeno, en un matraz purgado de fondo redondo. La mezcla de reacción fue agitada bajo nitrógeno en un baño a 100°C durante 1 hora y fue luego dejada enfriar a la temperatura ambiental. Se cargaron agua (300 ml) y acetato de etilo (150 ml) en la mezcla de reacción. Para mejorar la separación, la fase acuosa fue acidificada con HCl. La fase de acetato de etilo fue lavado con agua (100 ml) y, tras reposar, comenzó a precipitar un sólido. La disolución fue concentrada *in vacuo* para obtener el producto crudo en forma de aceite naranja, el cual fue luego secado con un azeótropo de tolueno (100 ml) para obtener un sólido de color naranja claro. El producto fue purificado utilizando cromatografía de resolución rápida en sílice y utilizando un sistema de gradiente de diclorometano/MeOH (90/10) a diclorometano/MeOH (50/50). Un secado en una estufa de vacío proporcionó (19) en forma de cristales de color naranja (205 mg, 27%). $^1\text{H-NMR}$, δ (300 MHz, d_6 -DMSO), 3,95 (4H, b, Hc), 4,14 (10H, s, Ha), 4,54 (4H, b, Hb), 7,69 (2H, s, Hf), 7,81 (1H, s, Hg), 8,08 (2H, s, Hd), 8,94 (2H, s, He). MS (FAB+): m/z , 607,07 [M+H].

Ejemplo 7

Síntesis de oligonucleótidos-ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico

Un oligonucleótido amino-modificado y liofilizado fue rehidratado en el volumen correcto de tampón de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ (500 mM, pH de 9,0) para obtener una concentración de oligonucleótido de 0,5 nanomoles· μl^{-1} . El oligonucleótido amino-modificado (40 μl , 0,5 nanomoles· μl^{-1}) fue añadido lentamente, agitándose con formación de remolinos, a una disolución del éster activado con ferroceno en DMSO (40 μl , 375 mM). La disolución fue sacudida a temperatura ambiental durante la noche y fue luego diluida con acetato amónico (920 μl , 100 mM, pH de 7,0) y purificada utilizando dos columnas NAP 10 (siguiendo el protocolo proporcionado), realizándose la elución primero con acetato amónico (100 mM, pH de 7,0) y luego con agua desionizada y tratada en autoclave. La concentración de oligonucleótido en el eluyente fue determinada midiendo su absorbancia a 260 nm. La presencia del marcador de ferroceno fue confirmada mediante un análisis voltamétrico.

Ejemplo 8

Nucleasa S1 y PCR con sustratos/sondas marcados con ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico

- 5 Mediante el uso de sustratos/sondas marcados con ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico y parámetros voltamétricos como los expuestos en la Tabla 2, se repitieron los Ejemplos 4 y 5 con concentraciones de todos los reactivos como las descritas en esos ejemplos. El potencial de pico de los nucleótidos-ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico es menor que el de los nucleótidos marcados con ferroceno. Esto aumenta la sensibilidad con que puede detectarse el marcador electroquímico. En consecuencia, en los experimentos del Ejemplo 8 no fue necesario llevar a cabo la operación de concentración de muestras usada en los Ejemplos 4 y 5 y el protocolo del método resultó significativamente simplificado. Los resultados del Ejemplo 8 (no mostrados) demuestran que se observa una buena sensibilidad sin la operación de concentración de muestras.

Ejemplo 9

- 15 *Especificidad de sustrato de la exonucleasa de T7*

- 20 Se añadieron 200 μl de oligonucleótido en horquilla y 200 μl de oligonucleótido de cadena sencilla a tubos de reacción separados en una concentración de 7 μM en tampón 1x para reacción de T7. Se añadió enzima de T7 a cada tubo (5 μl , 2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron las mezclas durante 1 hora a 25°C. Ambos oligonucleótidos habían sido previamente marcados con ferroceno a través de un conector C12.

Los resultados fueron los siguientes:

- 25 Figura 16a: Línea A - Digestión del oligonucleótido bicatenario en horquilla.
 Figura 16a: Línea B - Testigo no enzimático del oligonucleótido bicatenario en horquilla.
 Figura 16b: Línea A - Digestión del oligonucleótido de cadena sencilla.
 30 Figura 16b: Línea B - Testigo no enzimático del oligonucleótido de cadena sencilla.

Ejemplo 10

- 35 *Multiplicación por PCR con digestión con exonucleasa de T7*

Ejemplo 10(a)

- 40 *Multiplicación por PCR con cebador 5' ferrocenilado y digestión con exonucleasa de T7*

- Se llevó a cabo una multiplicación de DNA genómico humano (40 ng por 100 μl de mezcla de reacción) por PCR. Los cebadores, el molde y la sonda usados para las reacciones individuales se detallan en la sección de resultados. Las mezclas de reacción, de 100 μl , contenían Tris-HCl (15 mM, pH de 8,0), cloruro potásico (50 mM), cloruro magnésico (3,5 mM), dATP, TTP, dCTP y dGTP (cada uno 200 μM), cebador directo 5' ferrocenilado (0,5 μM), cebador inverso (0,5 μM), DNA polimerasa AmpliTaq Gold (0,1 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y albúmina sérica bovina (0,1 $\text{mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 10 minutos (desnaturalización inicial y activación enzimática), lo que fue seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación y extensión del cebador a 60°C durante 1 minuto. Las muestras fueron inmediatamente enfriadas a 25°C y fueron incubadas a 25°C durante 5 minutos. Se añadió exonucleasa de T7 (5 μl , 2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a la mezcla de PCR cruda y se incubaron las muestras durante otros 20 minutos.

Se prepararon y reunieron dos mezclas de reacción de 100 μl antes del análisis voltamétrico.

- 55 Los resultados fueron los siguientes:

Cebador directo: MW11w ferrocenilado a través de un conector C12.

- 60 Cebador inverso: MC11com

Figura 17a: Línea A - PCR positiva en cuanto a multiplicación de MCAD por PCR

Figura 17a: Línea B - Testigo negativo de PCR de MCAD, sin Taq

- 65 Figura 17b: Líneas A y B - Como la Figura 17a pero con datos corregidos en cuanto a la línea de base.

ES 2 324 488 T3

Ejemplo 10(b)

Multiplicación por PCR con cebadores no modificados, hibridación de punto final de la sonda y digestión con exonucleasa de T7

Se llevaron a cabo multiplicaciones por PCR del modo anteriormente descrito. Una vez completada la PCR, las muestras fueron calentadas a 95°C durante 2 minutos, tiempo durante el cual se añadió la sonda oligonucleotídica ferrocenilada (concentración final de 0,5 μM). Las muestras fueron enfriadas a 25°C e incubadas a 25°C durante 5 minutos. Se añadió exonucleasa de T7 (5 μl , 2 U· μl^{-1}) a la mezcla de PCR cruda y se incubaron las muestras durante otros 20 minutos.

Se prepararon y reunieron dos mezclas de reacción de 100 μl antes del análisis voltamétrico.

Los resultados fueron los siguientes:

Multiplicación de beta-actina por PCR: La línea A muestra una reacción positiva de multiplicación de diana por PCR y la línea B muestra un testigo de multiplicación de no diana de principio a fin.

Sonda: BAPR ferrocenilada a través de un conector C12

Cebador directo de la multiplicación de la diana; BAF

Cebador inverso de la multiplicación de la diana; BAR

Cebador directo de la multiplicación de no diana; GSDF

Cebador inverso de la multiplicación de no diana; GSDR

Figura 18a: datos normales, barrido anódico

Figura 18b: datos corregidos en cuanto a la línea de base, barrido anódico

Multiplicación del gen HFE por PCR: La línea A muestra una reacción positiva de multiplicación de diana por PCR y la línea B muestra un testigo de multiplicación de no diana de principio a fin.

Sonda: H63DP ferrocenilada a través de un conector C12

Cebador directo de la multiplicación de la diana; H63DF

Cebador inverso de la multiplicación de la diana; H63DR

Cebador directo de la multiplicación de no diana; C282YF

Cebador inverso de la multiplicación de no diana; C282YR

Figura 19a: datos normales, barrido anódico

Figura 19b: datos corregidos en cuanto a la línea de base, barrido anódico

Multiplicación de la mutación C282Y del gen HFE por PCR: La línea A muestra una reacción positiva de multiplicación de diana por PCR y la línea B muestra un testigo de multiplicación de no diana de principio a fin.

Sonda: C282YP ferrocenilada a través de un conector C12

Cebador directo de la multiplicación de la diana; C282YF

Cebador inverso de la multiplicación de la diana; C282YR

Cebador directo de la multiplicación de no diana; H63DF

Cebador inverso de la multiplicación de no diana; H63DR

Figura 20a: datos normales, barrido anódico

Figura 20b: datos corregidos en cuanto a la línea de base, barrido anódico

Ejemplo 10(c)

Multiplicación por PCR con cebadores no modificados, hibridación de punto final de la sonda y digestión con exonucleasa de T7: Fragmento Stoffel

Se llevaron a cabo la PCR, la inhibición de la sonda y la digestión con exonucleasa de T7 del modo descrito en la sección anterior, sustituyendo la DNA polimerasa AmpliTaq Gold y el tampón suministrado por Fragmento Stoffel de DNA polimerasa AmpliTaq y el tampón suministrado.

Los resultados fueron los siguientes:

Multiplicación del gen HFE por PCR: La línea A muestra una reacción positiva de multiplicación de diana por PCR y la línea B muestra un testigo de multiplicación de no diana de principio a fin.

Sonda: C282YP ferrocenilada a través de un conector C12

Cebador directo de la multiplicación de la diana; C282YF

Cebador inverso de la multiplicación de la diana; C282YR

Cebador directo de la multiplicación de no diana; H63DF

Cebador inverso de la multiplicación de no diana; H63DR

Figura 21a: datos normales, barrido anódico

Figura 21b: datos corregidos en cuanto a la línea de base, barrido anódico

Ejemplo 10(d)

Multiplicación por PCR con cebadores no modificados, hibridación de punto final de la sonda y digestión con exonucleasa de T7: Sin testigo de exonucleasa de T7

Se llevaron a cabo la PCR y la inhibición de la sonda del modo descrito en el Ejemplo 9c, usando la DNA polimerasa AmpliTaq Gold. No se añadió exonucleasa de T7 a la mezcla de PCR.

Los resultados fueron los siguientes:

Multiplicación del gen HFE por PCR: La línea A muestra una reacción positiva de multiplicación de diana por PCR y la línea B muestra un testigo de multiplicación de no diana de principio a fin.

Sonda: C282YP ferrocenilada a través de un conector C12

Cebador directo de la multiplicación de la diana; C282YF

Cebador inverso de la multiplicación de la diana; C282YR

Cebador directo de la multiplicación de no diana; H63DF

Cebador inverso de la multiplicación de no diana; H63DR

Figura 22a: datos normales, barrido anódico

Figura 22b: datos corregidos en cuanto a la línea de base, barrido anódico

Ejemplo 11

Análisis del ácido ferroceno-carboxílico y del ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico por voltametría diferencial de pulsos

Se prepararon disoluciones de ácido ferroceno-carboxílico y de ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico, en concentraciones 10 μM y 1 μM , en disolución acuosa 100 mM de cloruro sódico con DMSO al 10%. Se usaron volúmenes de muestra de 200 μl para el análisis diferencial de pulsos en un aparato como el descrito en el Ejemplo 1, con un electrodo de trabajo de oro. Las condiciones de la voltametría diferencial de pulsos fueron como en la Tabla 3. Los voltamogramas se muestran en la Figura 23, en la que las Figuras 23 (a) y (b) muestran los voltamogramas para el ácido ferroceno-carboxílico en concentraciones 10 μM y 1 μM , respectivamente, y las Figuras 23 (c) y (d) muestran los voltamogramas para el ácido 4-(3'-ferrocenilureido)-1-benzoico en concentraciones 10 μM y 1 μM , respectivamente.

Ejemplo 12

Análisis, por voltametría diferencial de pulsos, de la digestión, con nucleasa S1, de una mezcla de oligonucleótidos ferrocenilados

5

Se llevaron a cabo tres reacciones de digestión de oligonucleótidos del modo anteriormente detallado en el Ejemplo 4. En la reacción (a), los sustratos fueron el oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' mediante ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos ($2,5\ \mu\text{M}$) y el oligonucleótido MC11w marcado en el extremo 5' mediante ácido 4-(3-ferrocenilureido)-1-benzoico con un resto espaciador de 12 carbonos ($1,5\ \mu\text{M}$). En la reacción (b), el sustrato fue sólo el oligonucleótido BAPR marcado en el extremo 5' mediante ferroceno con un resto espaciador de 12 carbonos ($2,5\ \mu\text{M}$). En la reacción (c), el sustrato fue sólo el oligonucleótido MC11w marcado en el extremo 5' mediante ácido 4-(3-ferrocenilureido)-1-benzoico con un resto espaciador de 12 carbonos ($1,5\ \mu\text{M}$).

10

15

20

Tras la compleción de cada reacción de digestión, las mezclas de reacción fueron analizadas por voltametría diferencial de pulsos bajo las condiciones detalladas en la Tabla 3 salvo por el potencial final, que fue 0,5 V. Se usó un electrodo de trabajo de oro. Los voltamogramas se presentan en las Figuras 24 (a), (b) y (c), respectivamente. Los datos se presentan con corrección en cuanto a la línea de base. Como se ve en las figuras, el marcador de ácido 4-(3-ferrocenilureido)-1-benzoico tiene un pico a aproximadamente 130 mV mientras que el marcador de ferroceno tiene un pico a aproximadamente 370 mV. Los picos están suficientemente separados para ser resolubles en una mezcla, como se ve en la Figura 24(a). La capacidad de resolución de los dos picos hace que los dos marcadores sean adecuados para uso en un experimento múltiple en que dos secuencias diana diferentes son simultáneamente sondadas en la misma mezcla de reacción.

25

30

35

40

45

50

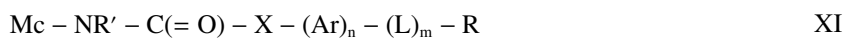
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula XI,



en la que

- Mc es un grupo metallocenilo en el que cada anillo puede estar independientemente sustituido o no sustituido,
- el grupo metallocenilo comprende un ion metálico M seleccionado del grupo que consiste en hierro, cromo, cobalto, osmio, rutenio, níquel o titanio,
- R' es H o alquilo inferior,
- X es NR' u O,
- Ar es un grupo arilo sustituido o no sustituido,
- n es 0 ó 1,
- L es un grupo conector,
- m es 0 ó 1, y
- R representa un resto que se va a marcar o R es un resto que comprende un grupo lábil.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el grupo Mc está sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo inferior (por ejemplo alquilo C₁ a C₄), alquilo inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halógeno, ciano, oxo, amino, éster o amido, alqueno inferior, alqueno inferior sustituido con un grupo hidroxilo, halógeno, ciano, oxo, amino, éster o amido, arilo o arilo sustituido con un grupo hidroxilo, halógeno, ciano, oxo, amino, éster o amido.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que R es un resto que se va a marcar y R comprende un aminoácido, nucleótido, nucleósido, azúcar, péptido, proteína, oligonucleótido, polinucleótido, carbohidrato o derivado de cualquiera de ellos.

4. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R es un grupo que comprende un grupo saliente.

5. Un compuesto según la reivindicación 4, en el que R es un grupo que comprende N-hidroxisuccinimida.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia que le permite hibridarse con una diana.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto es electroquímicamente activo o se hace electroquímicamente activo siguiendo una escisión parcial.

8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el grupo metalloceno está sustituido por cualquier otro grupo marcador electroquímicamente activo.

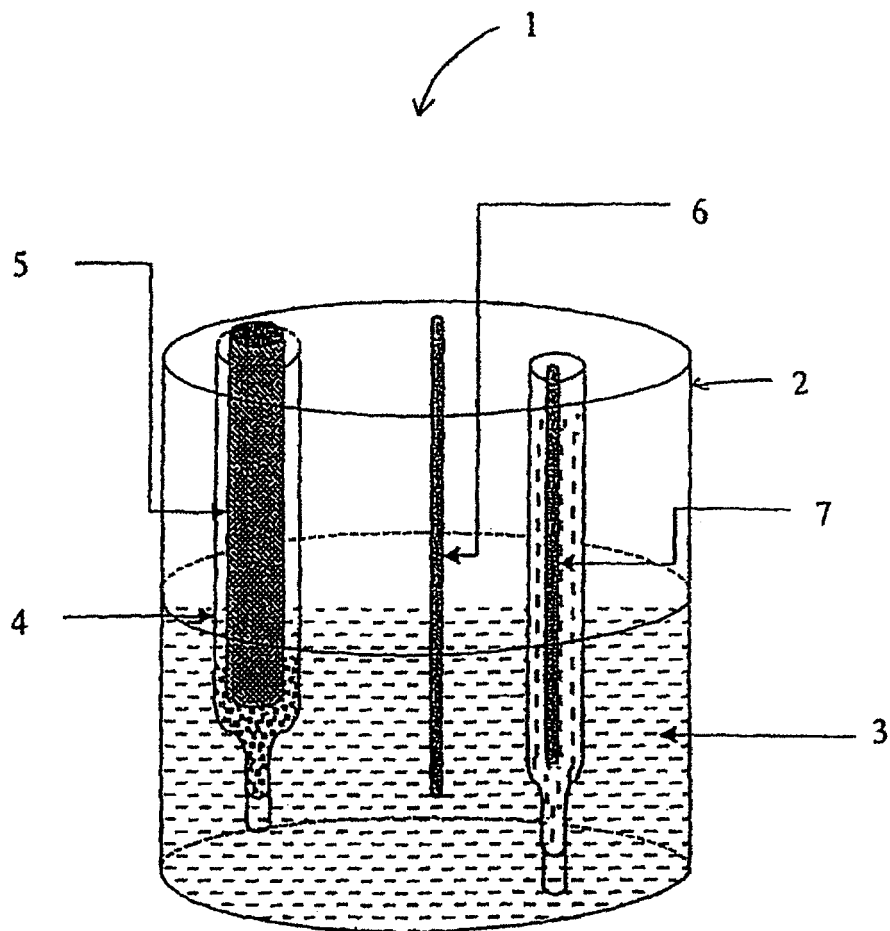


Fig. 1

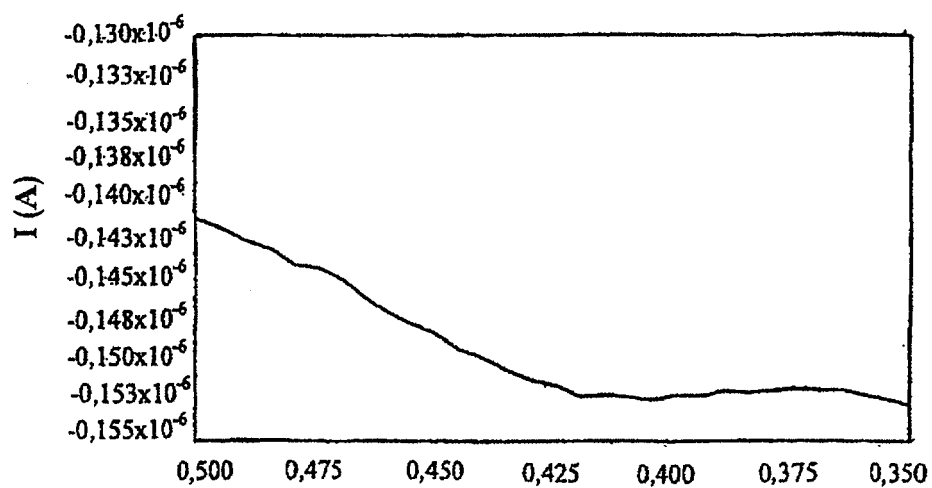


Fig. 2a

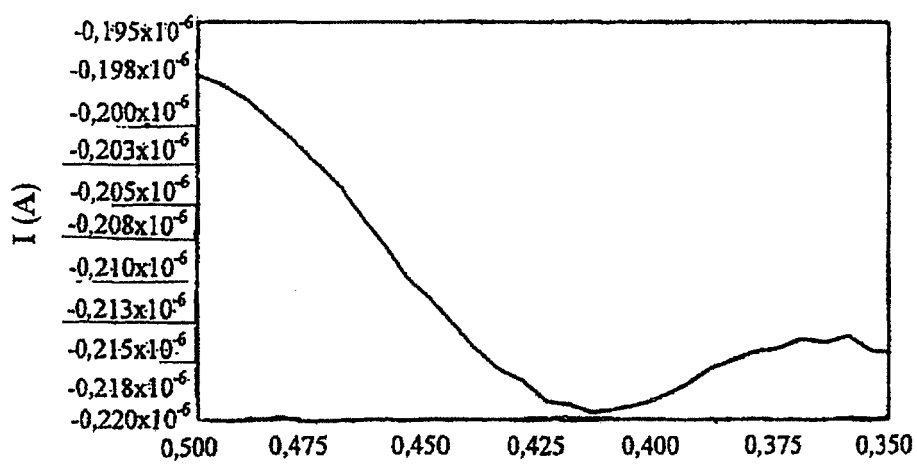


Fig. 2b

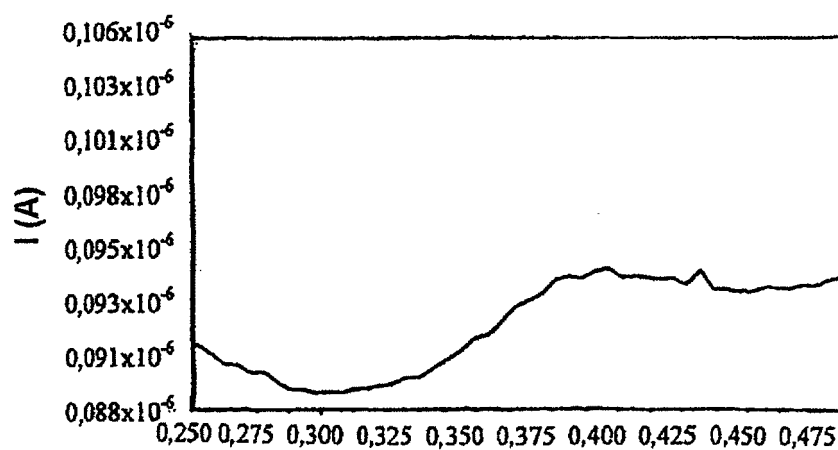


Fig. 2c

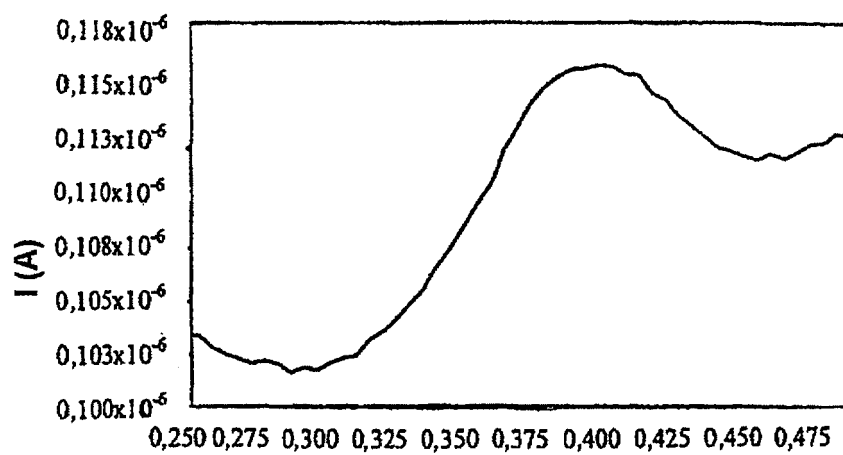


Fig. 2d

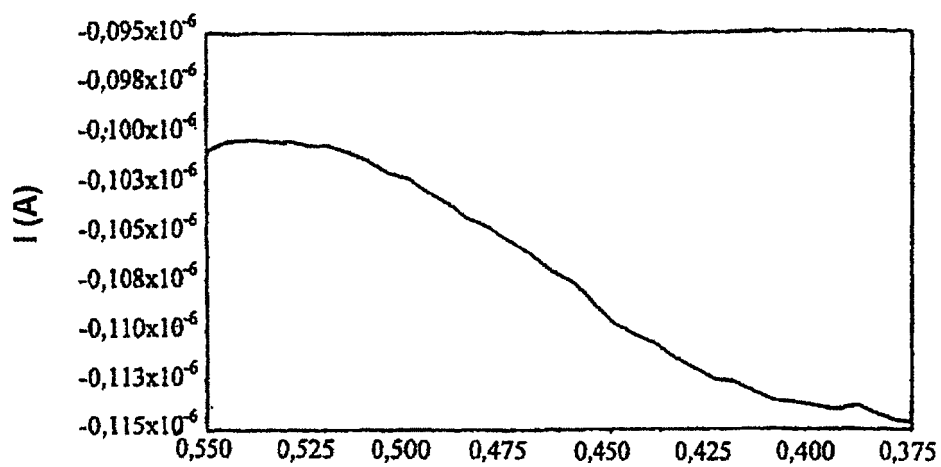


Fig. 3a

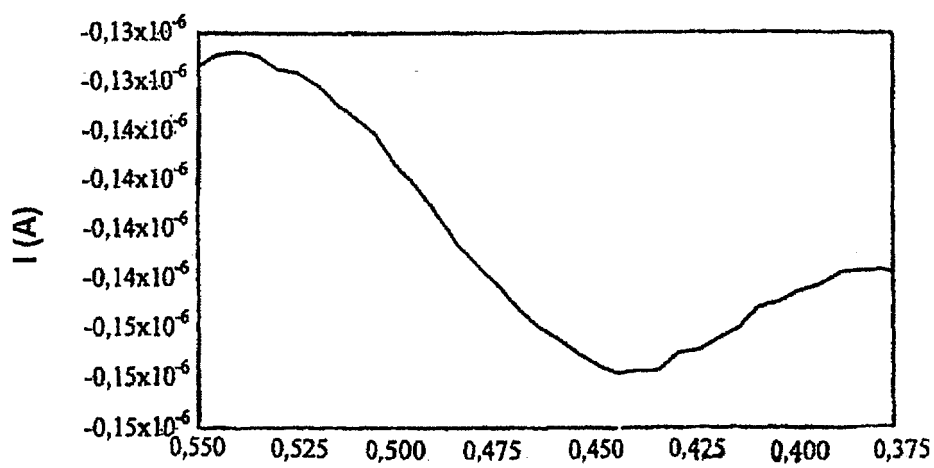


Fig. 3b

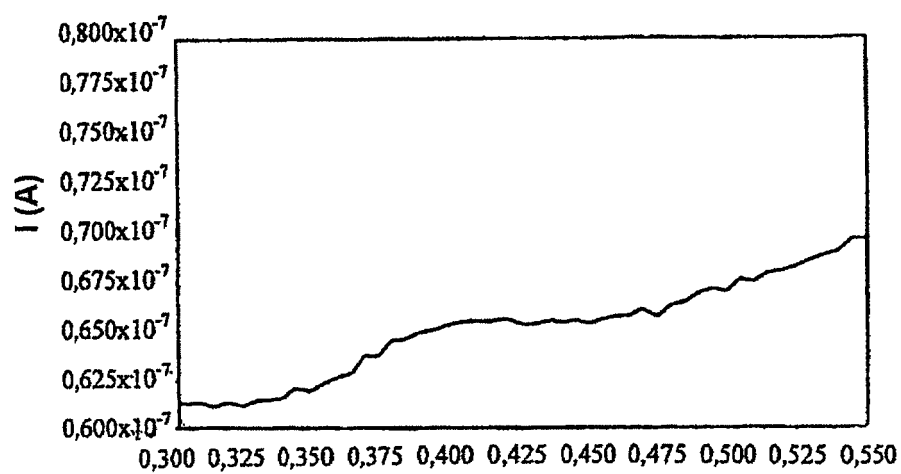


Fig. 3c

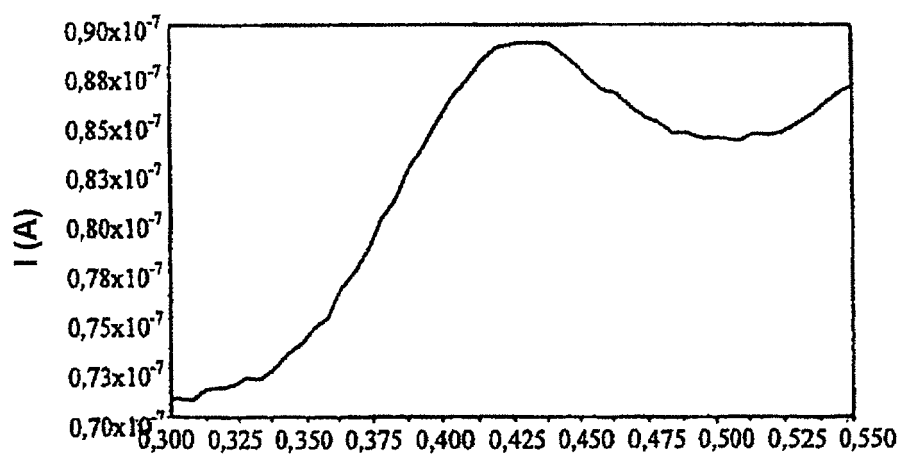


Fig. 3d

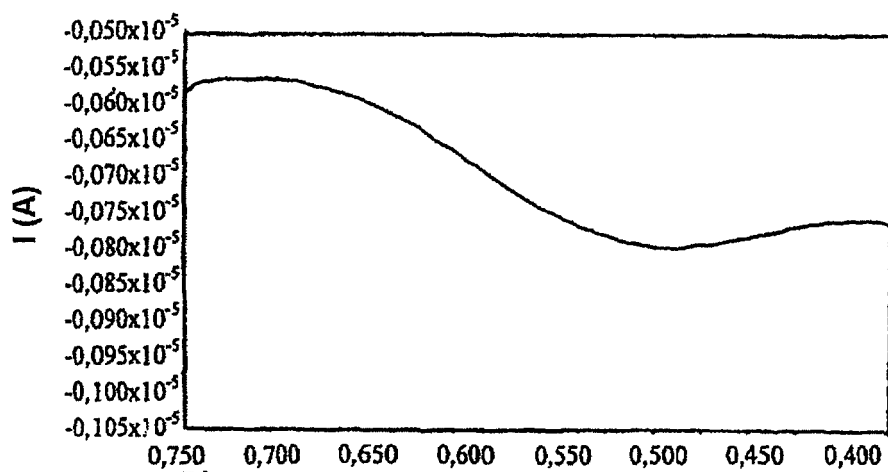


Fig. 4a

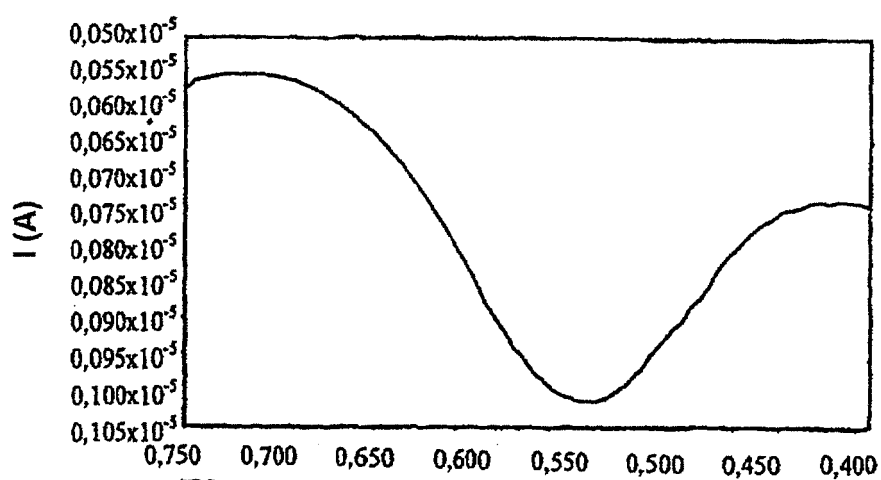


Fig. 4b

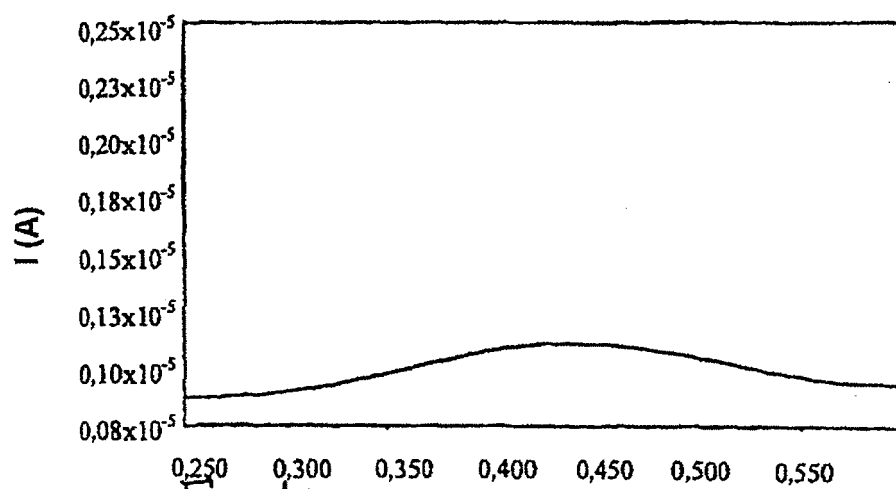


Fig. 4c

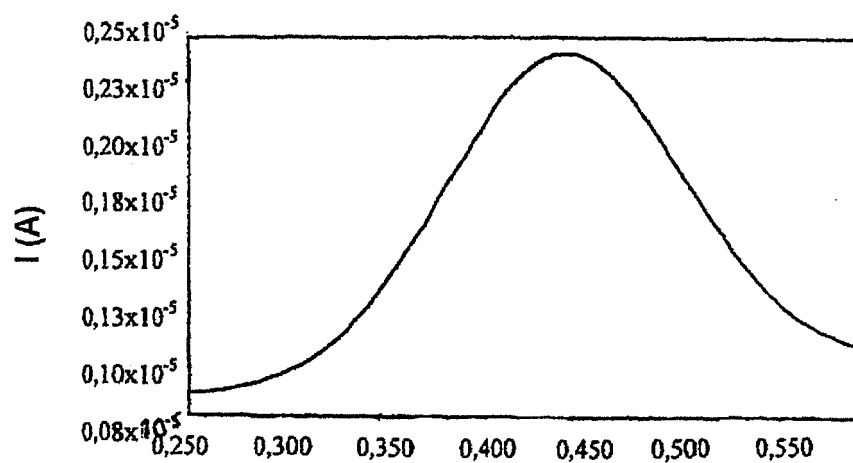


Fig. 4d

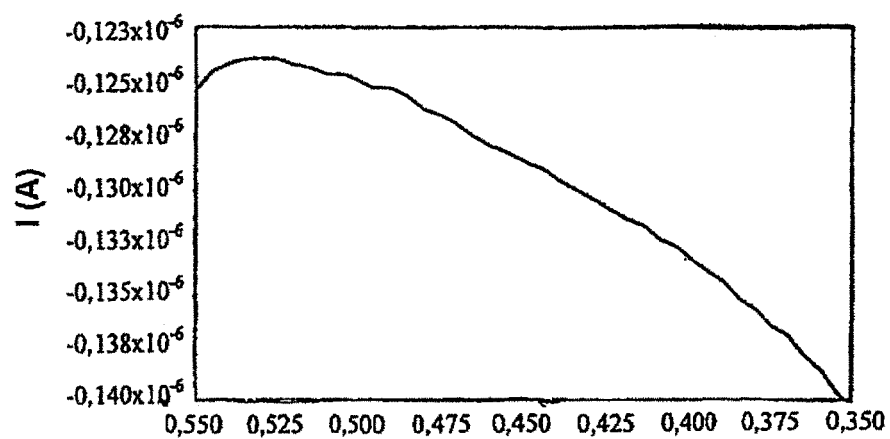


Fig. 5a

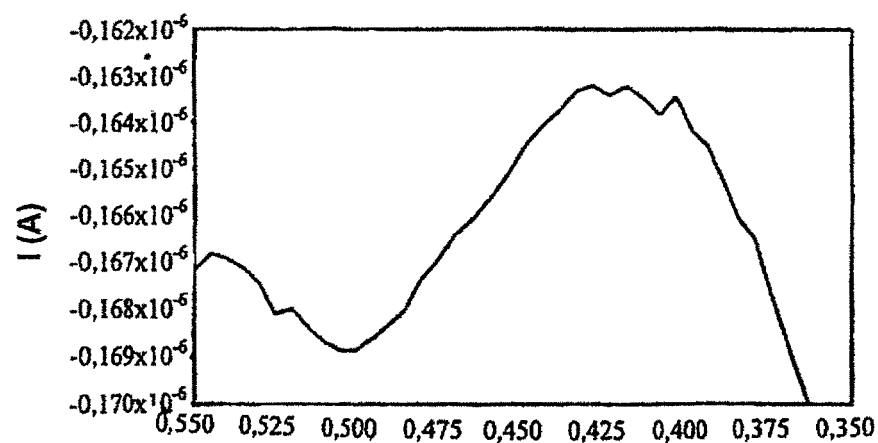


Fig. 5b

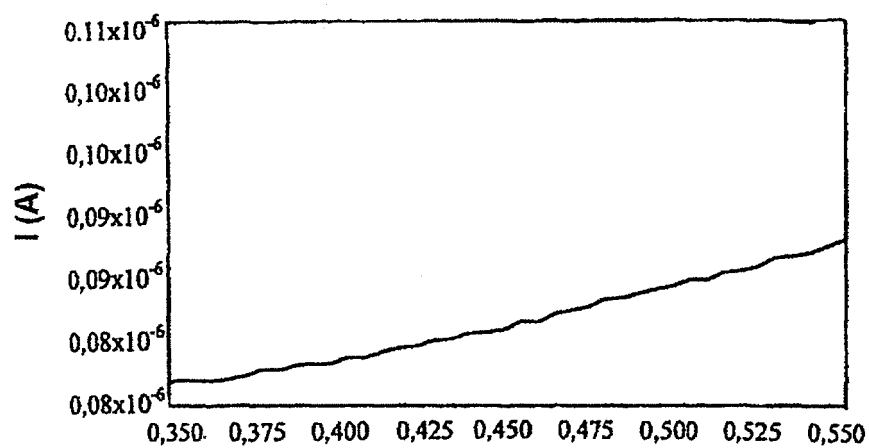


Fig. 5c

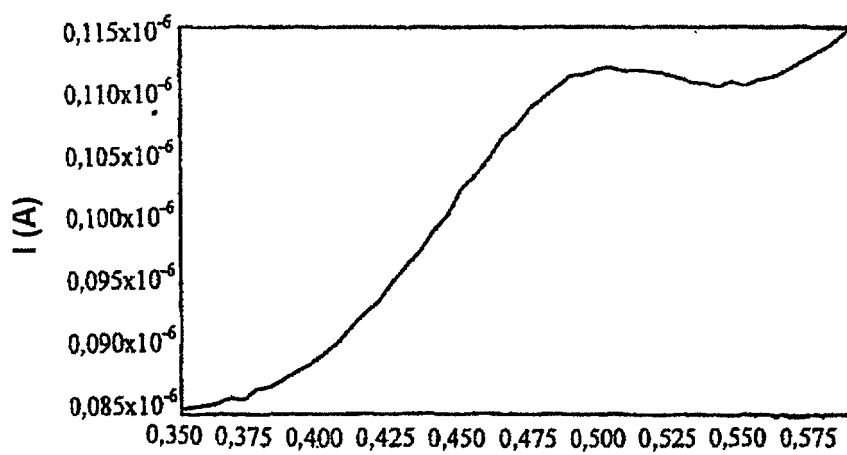


Fig. 5d

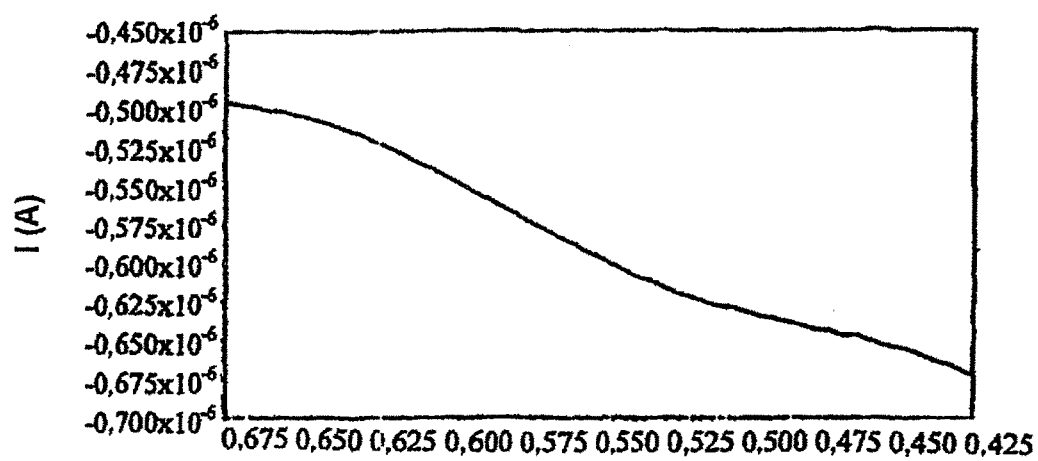


Fig. 6a

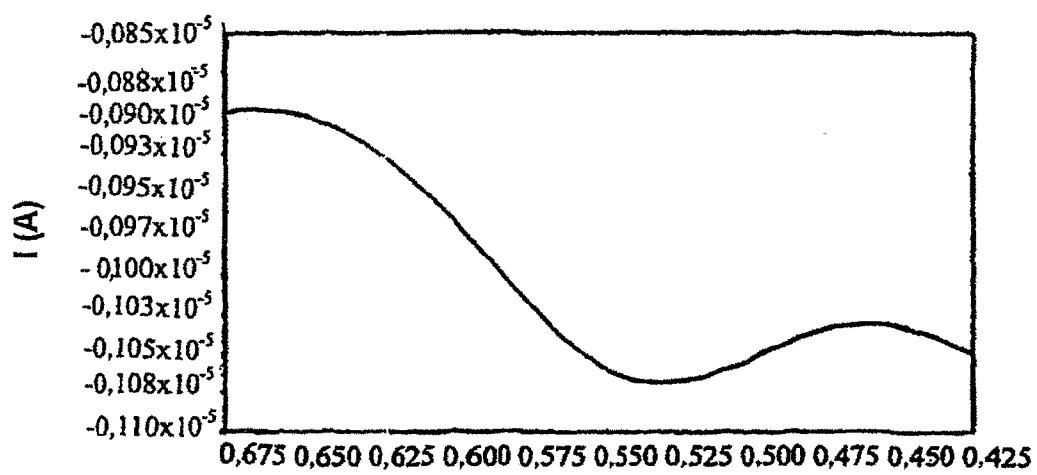


Fig. 6b

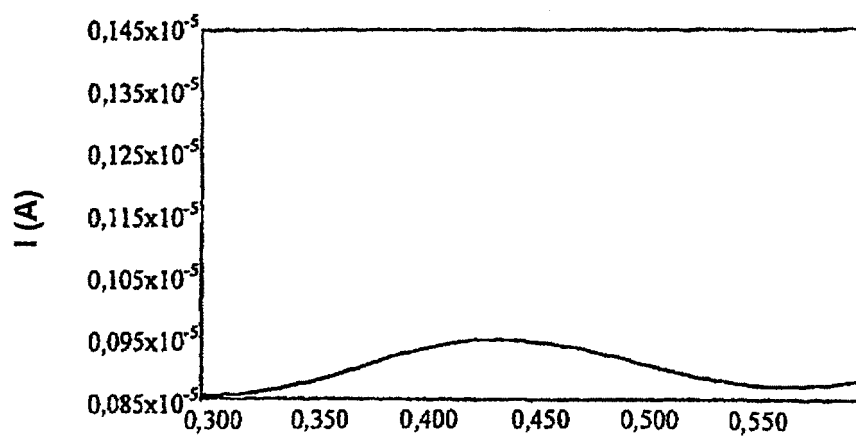


Fig. 6c

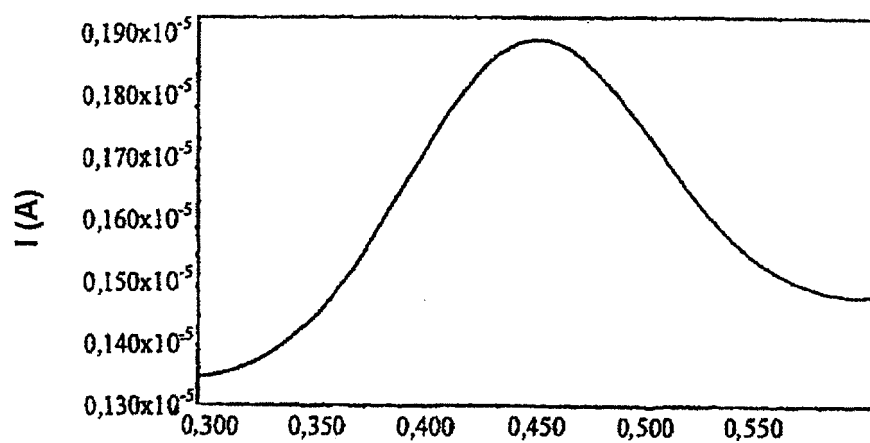


Fig. 6d

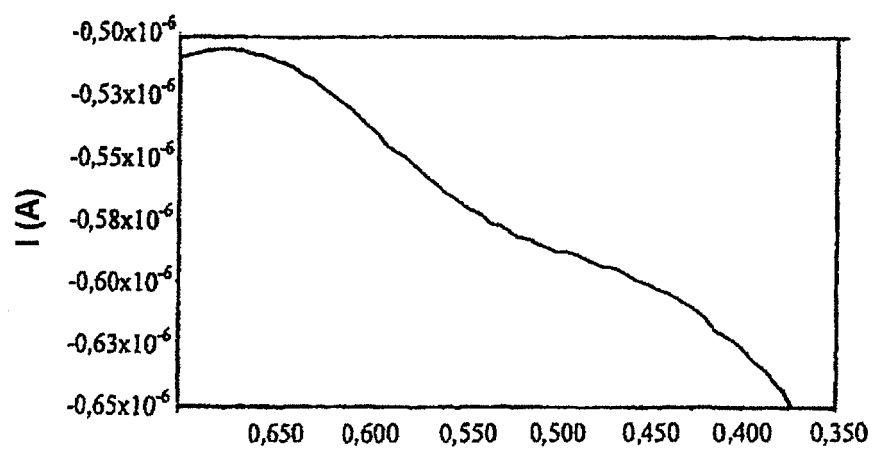


Fig. 7a

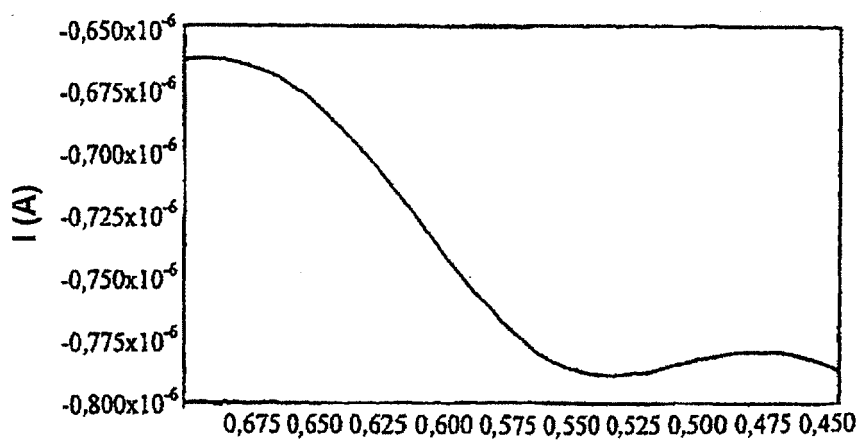


Fig. 7b

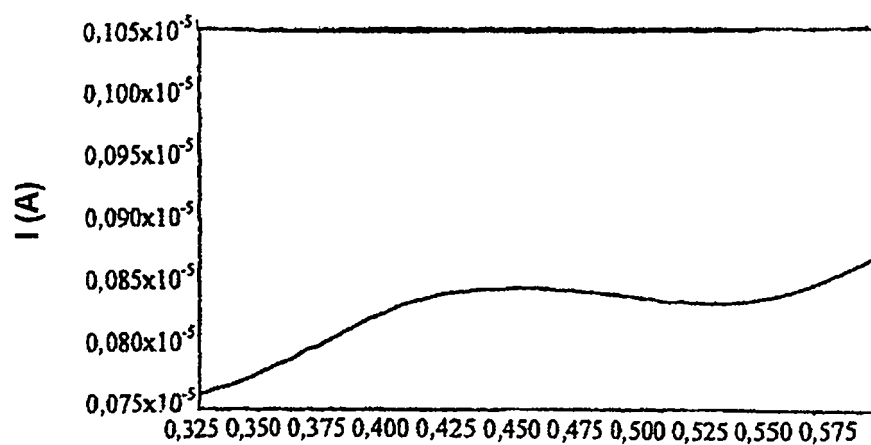


Fig. 7c

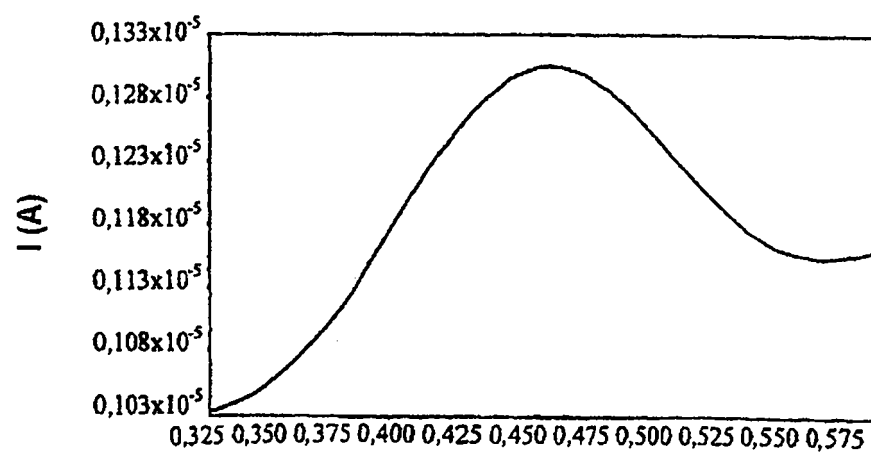


Fig. 7d

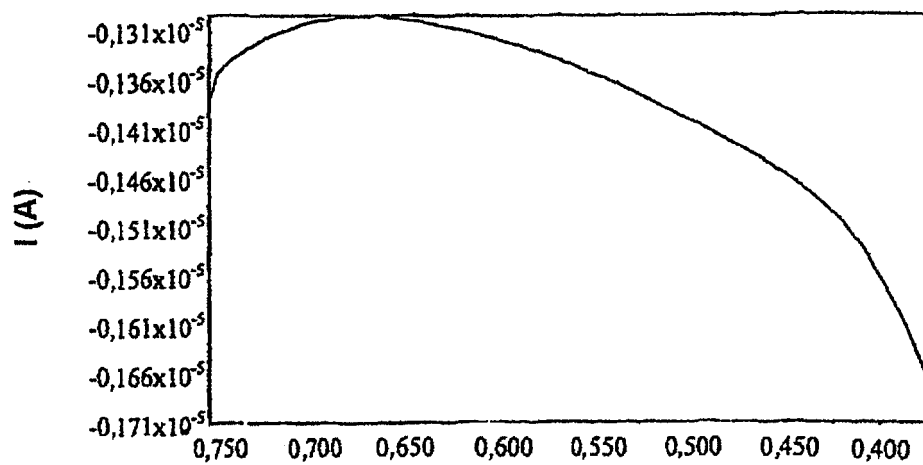


Fig. 8a

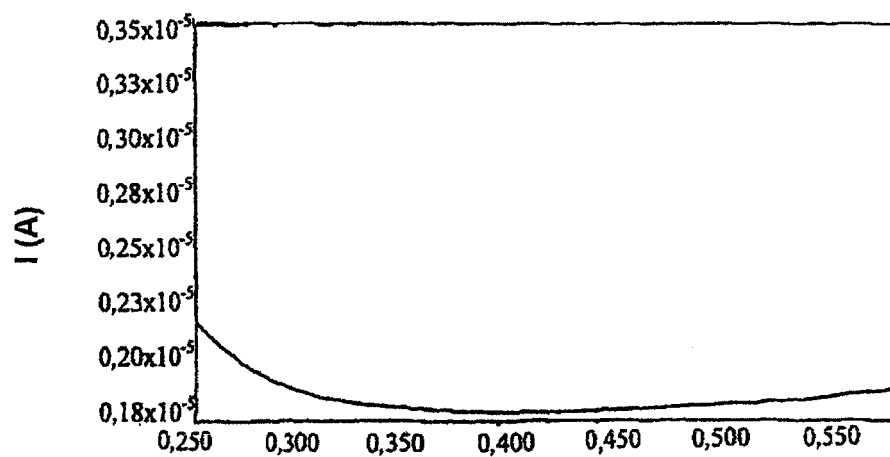


Fig. 8b

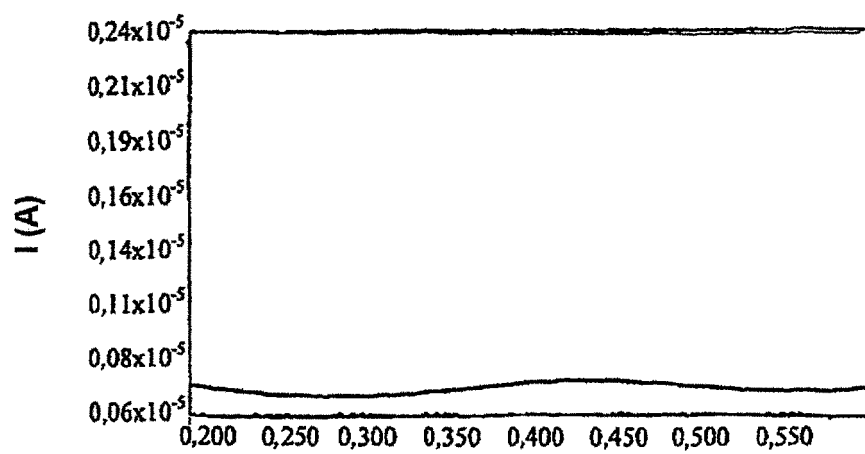


Fig. 9a

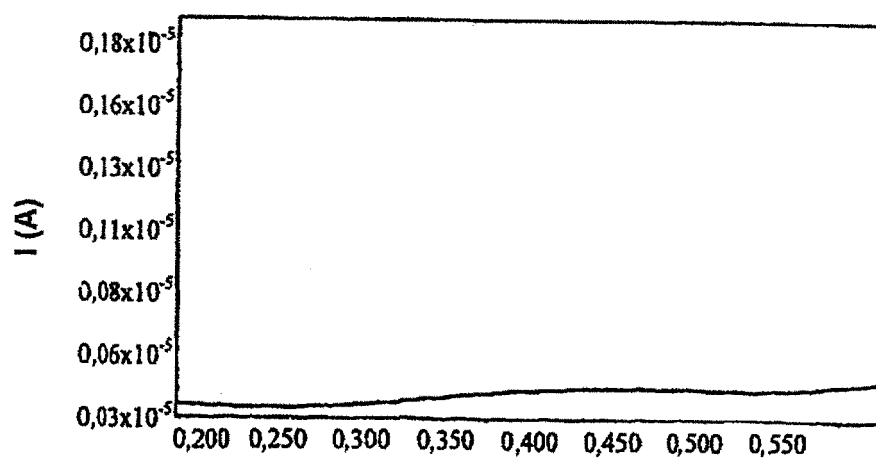


Fig. 9b

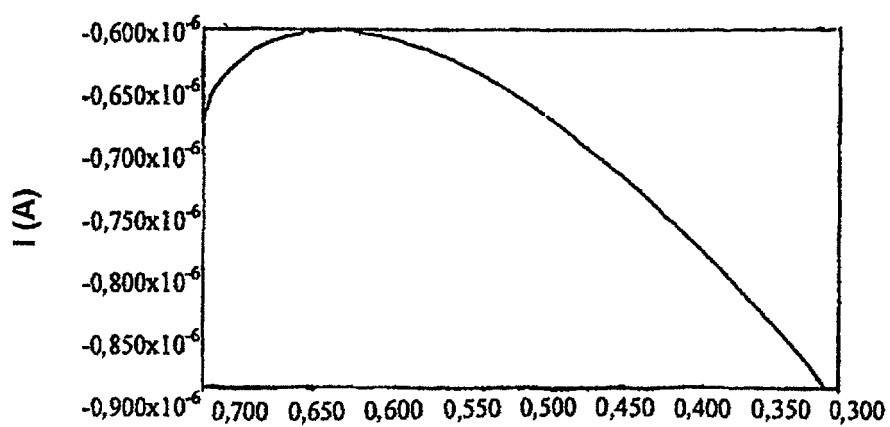


Fig. 10a

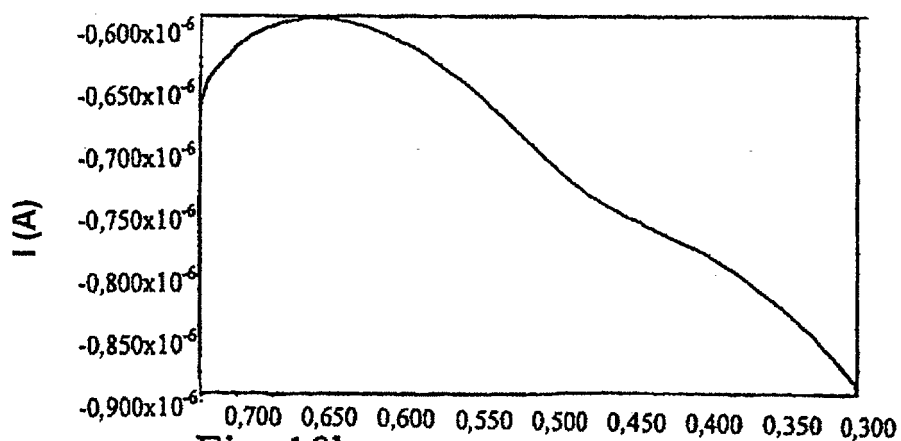


Fig. 10b

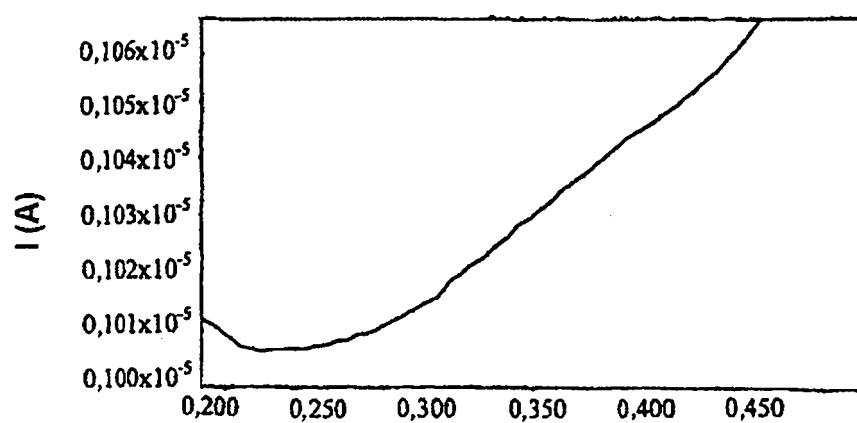


Fig. 10c

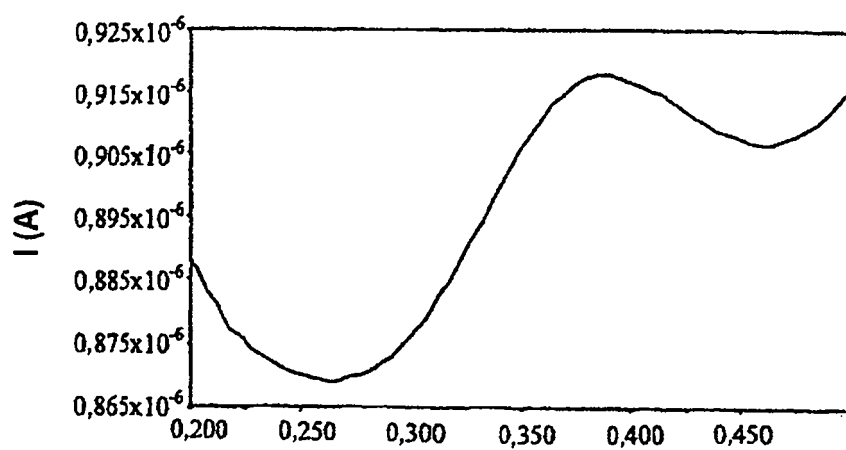


Fig. 10d

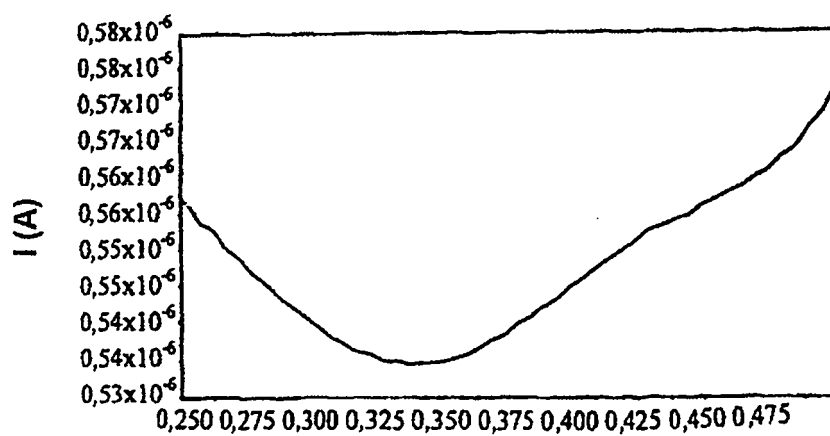


Fig. 11a

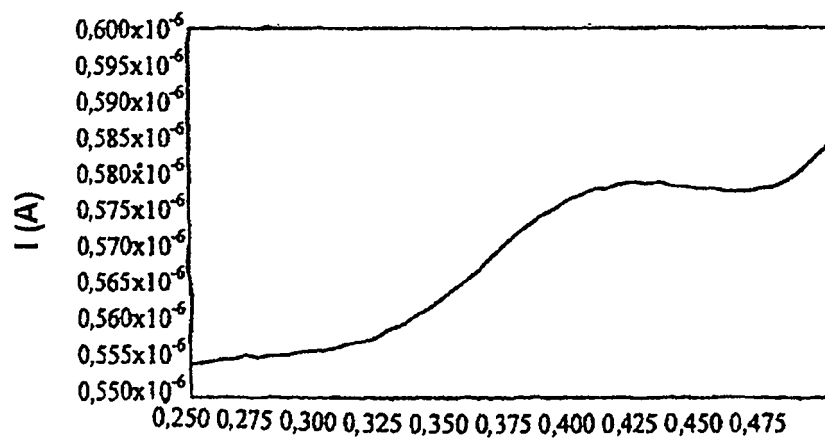


Fig. 11b

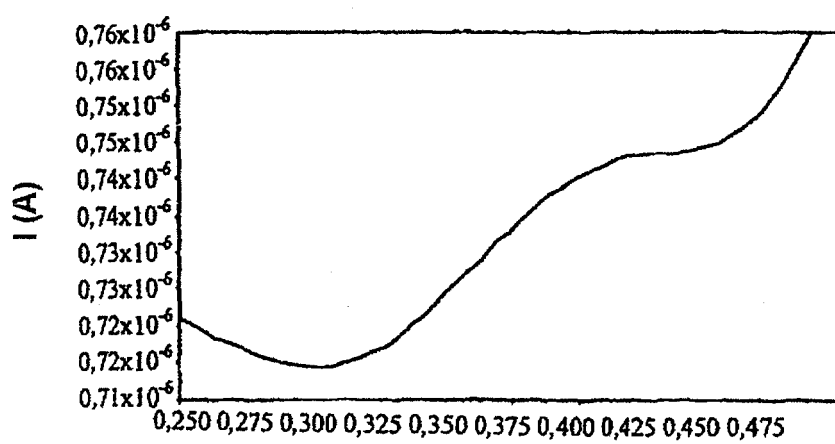
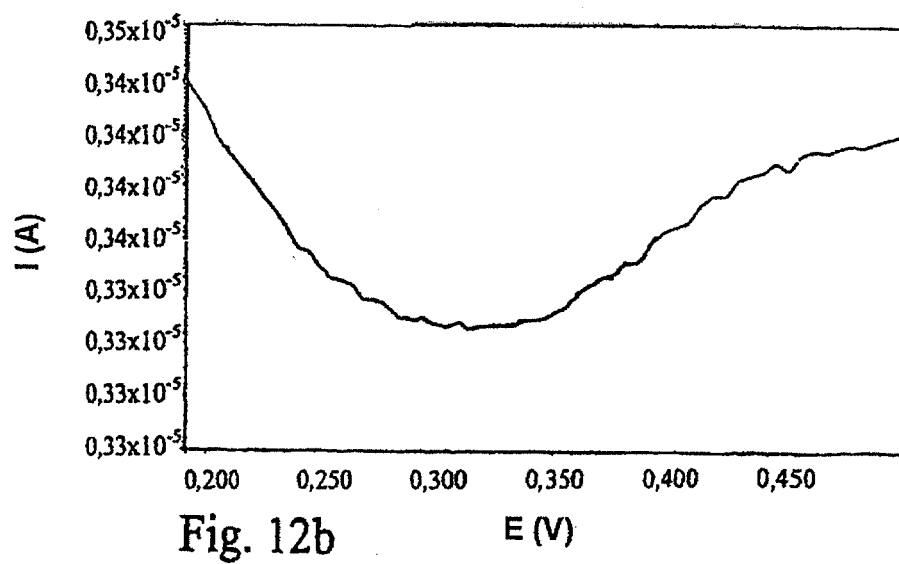
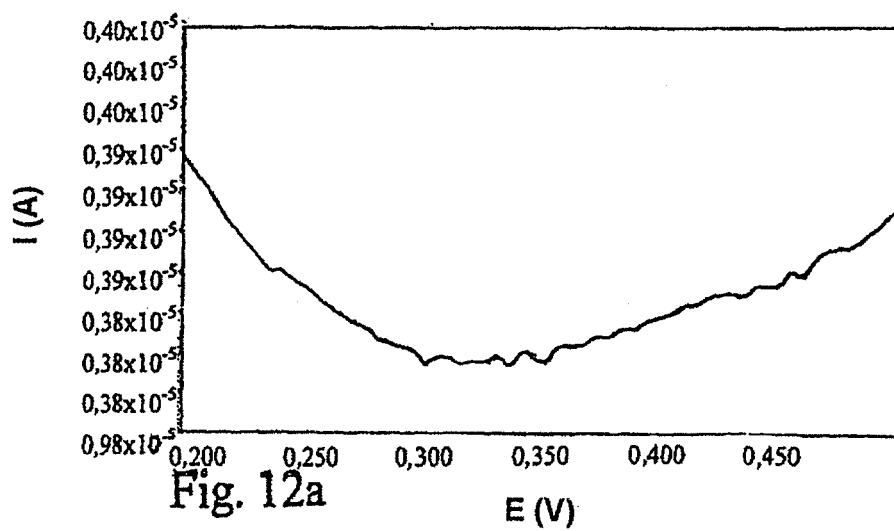
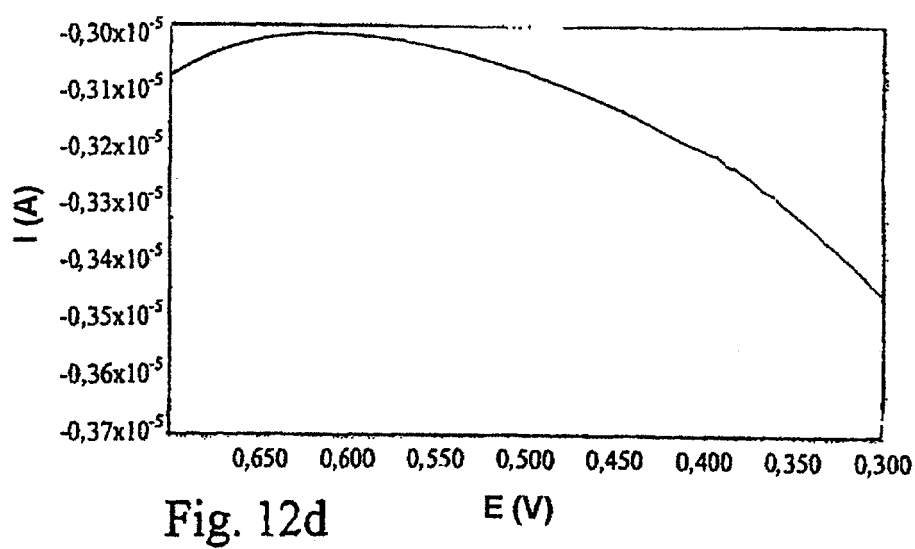
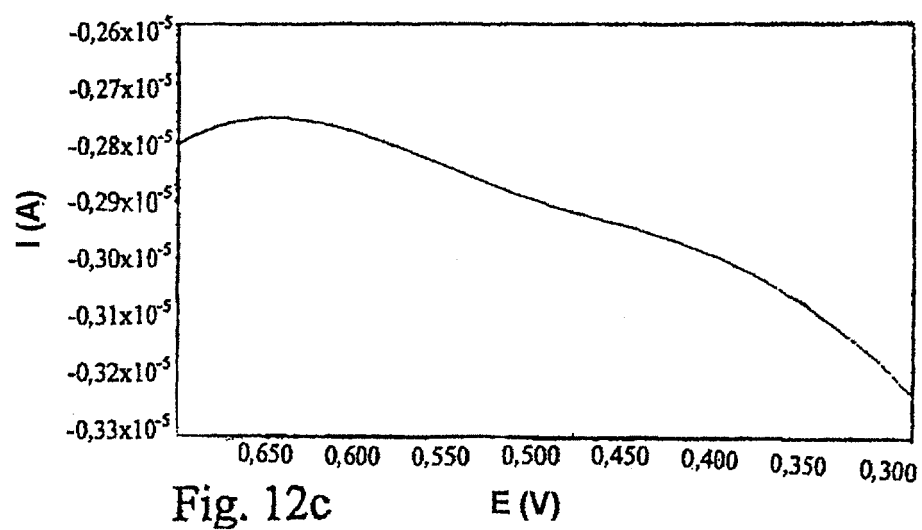


Fig. 11c





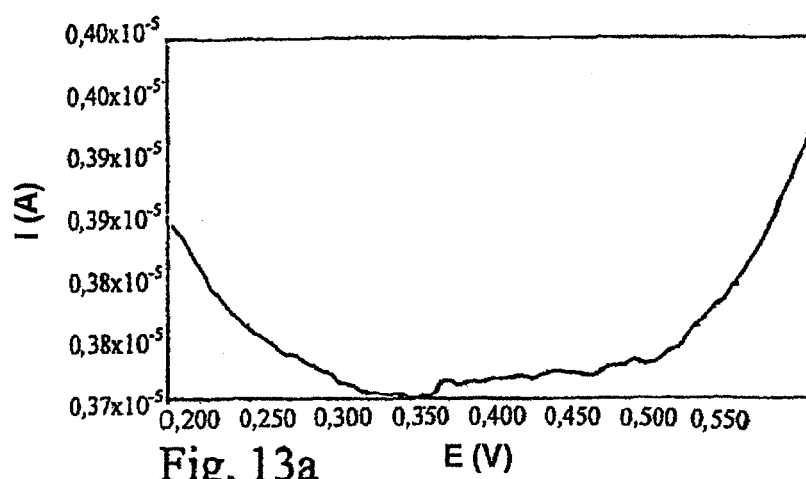


Fig. 13a

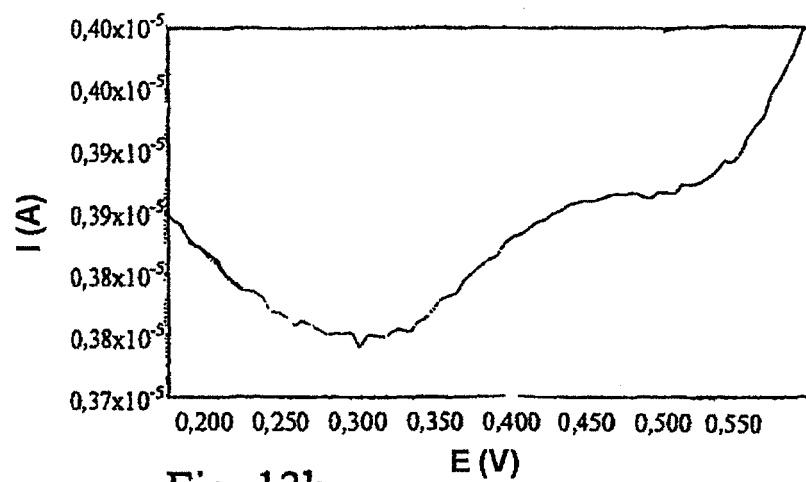
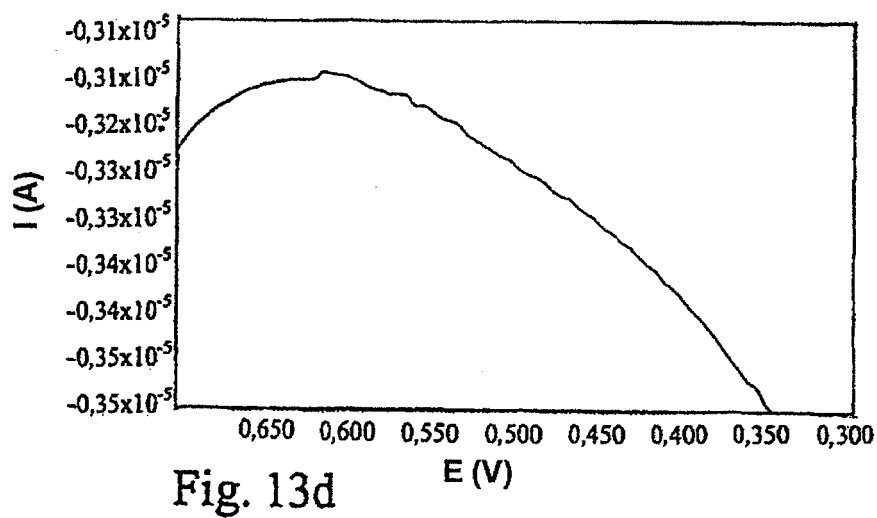
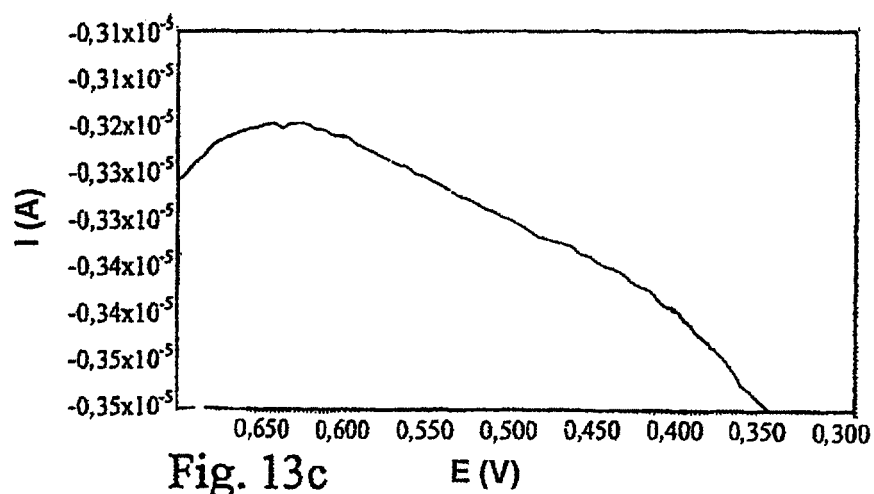


Fig. 13b



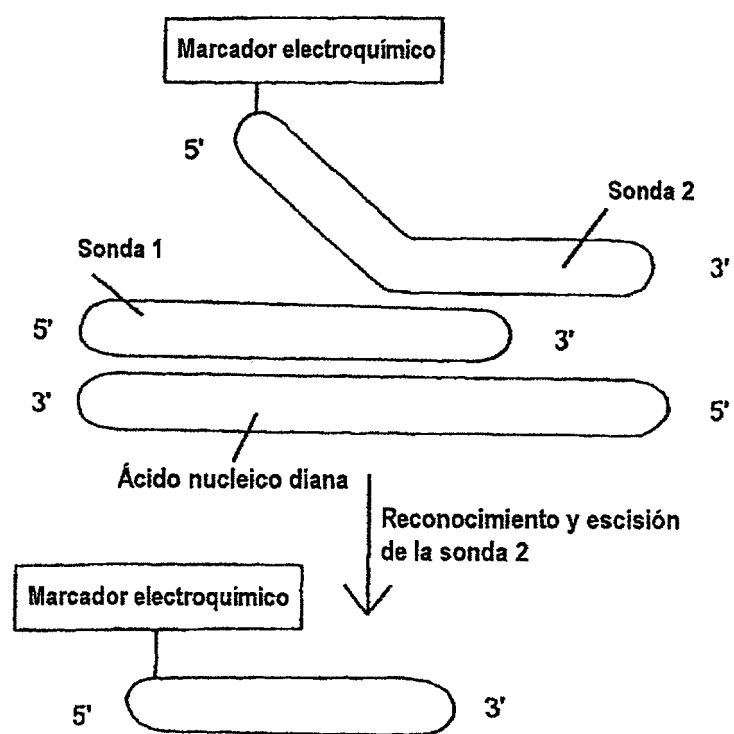


Figura 14a

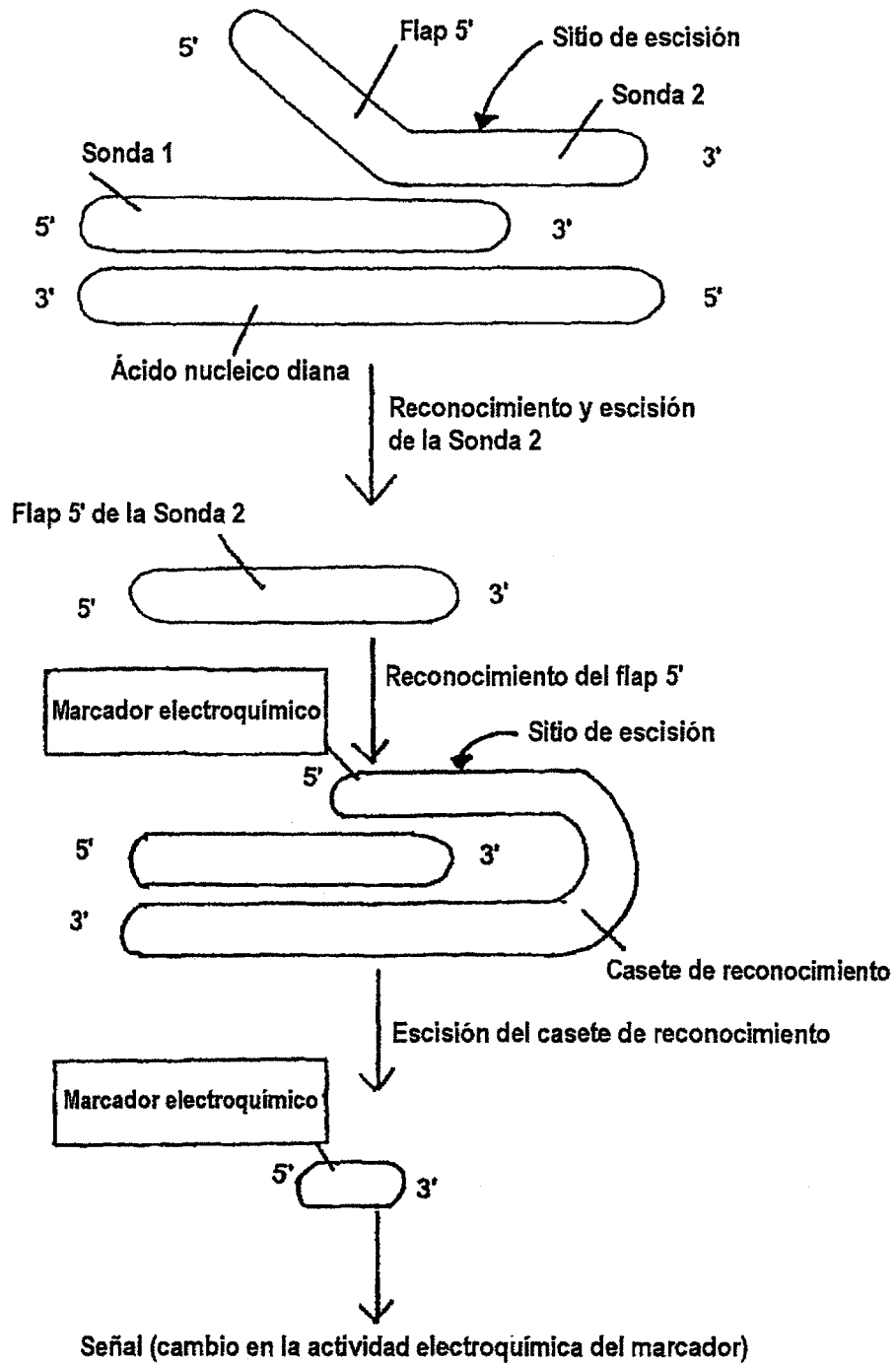


Figura 14b

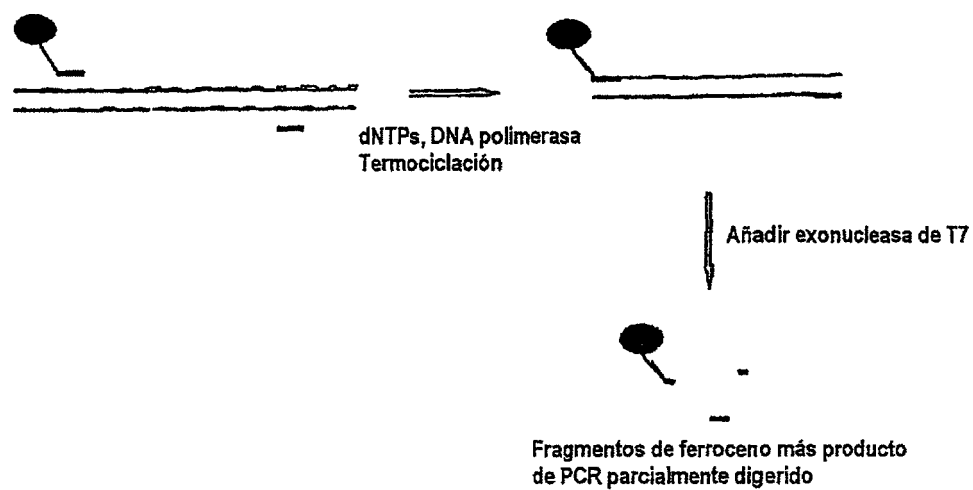


Figura 15a

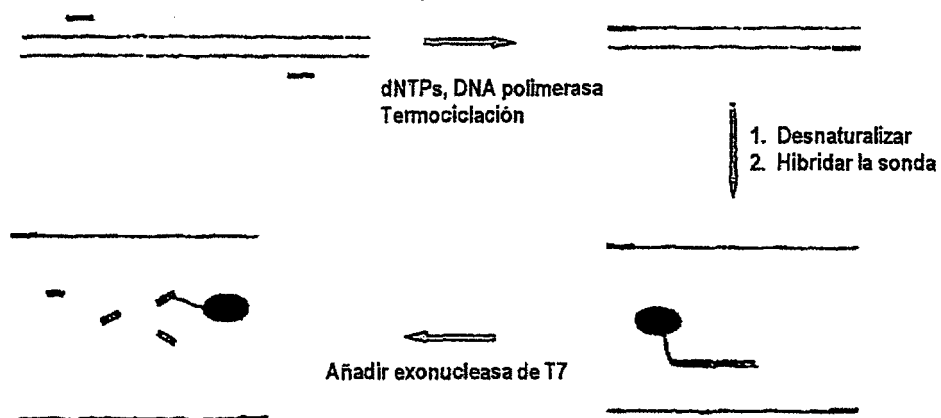


Figura 15b

Figura 15

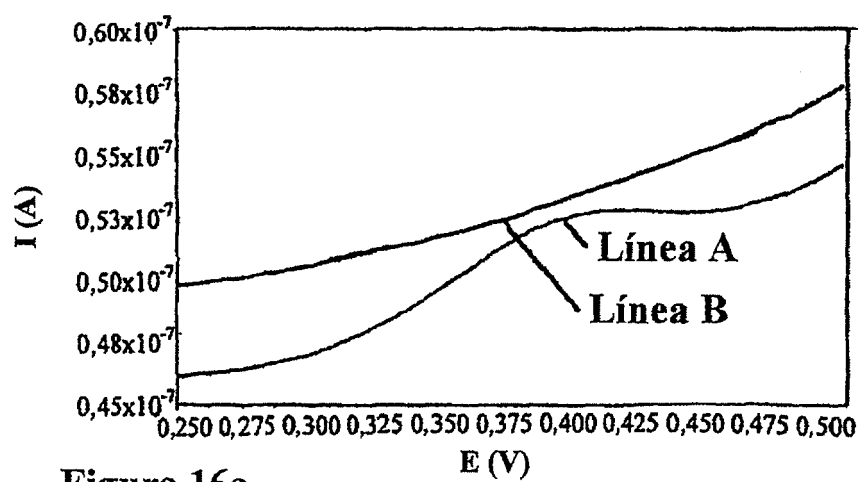


Figura 16a

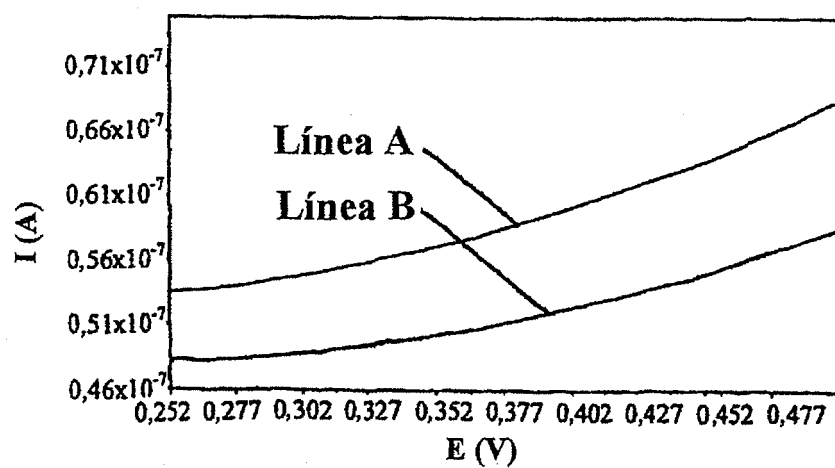


Figura 16b

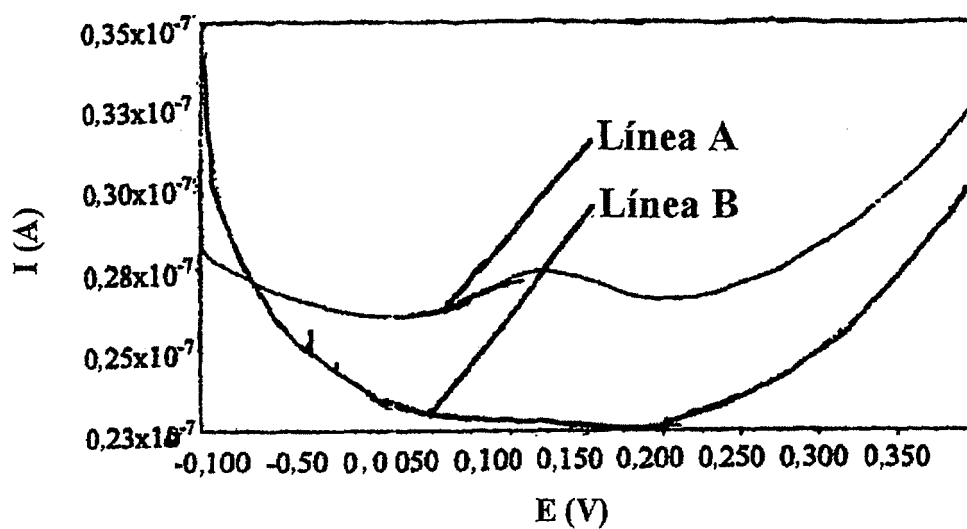


Fig. 17a

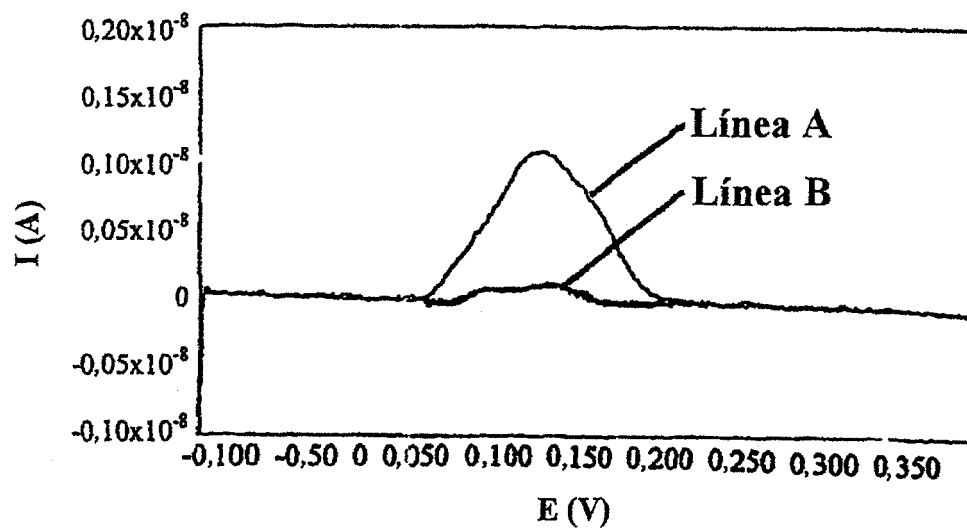


Fig. 17b

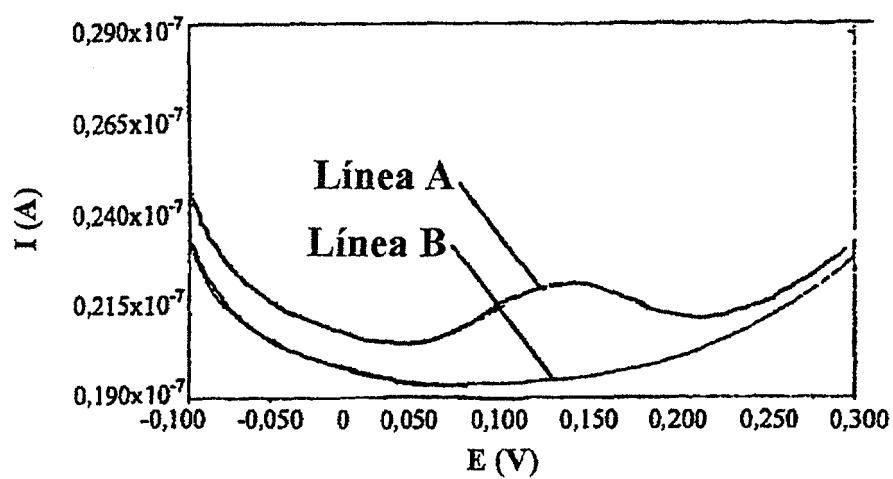


Fig. 18a

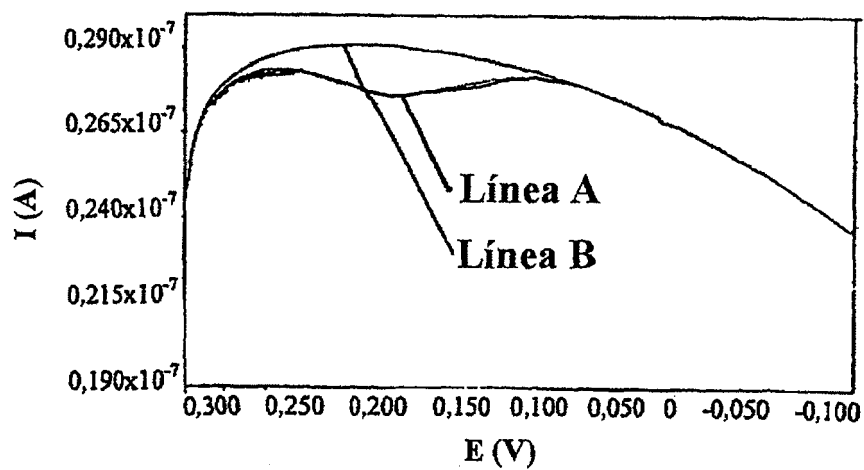


Fig. 18b

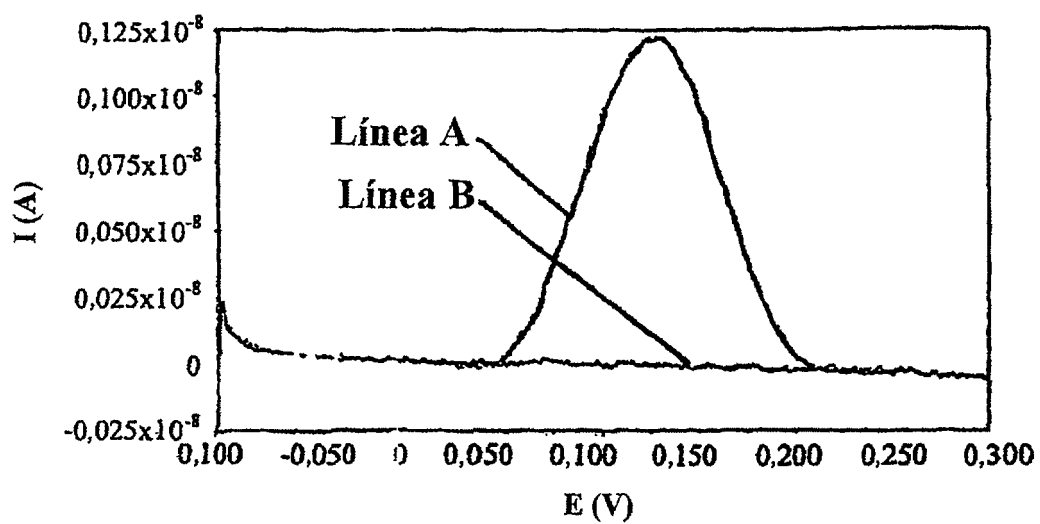


Fig. 18c

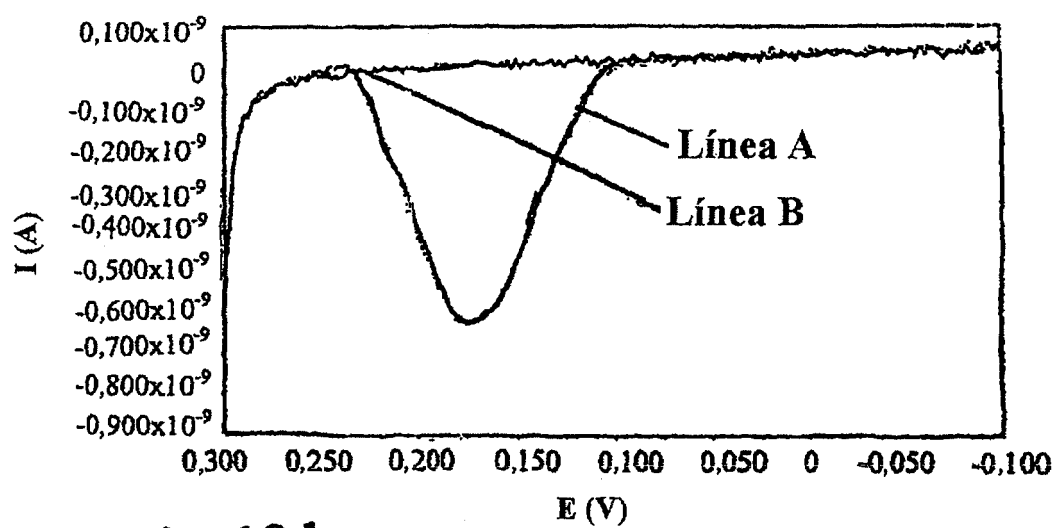


Fig. 18d

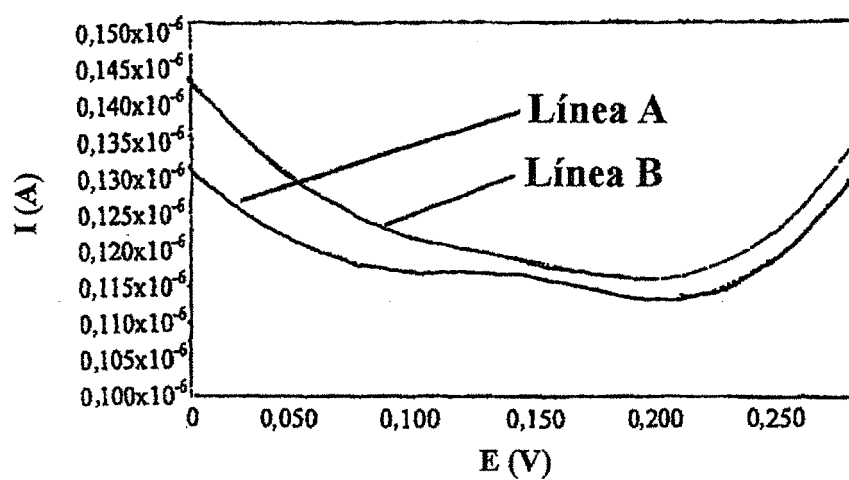


Fig. 19a

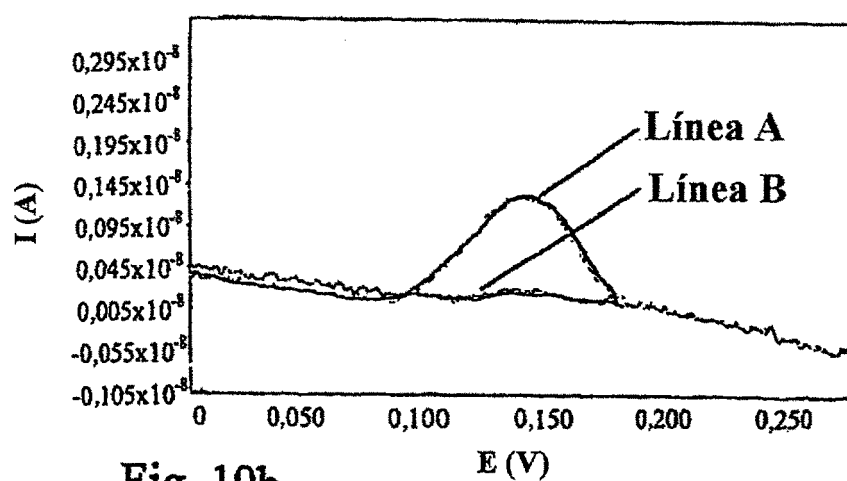


Fig. 19b

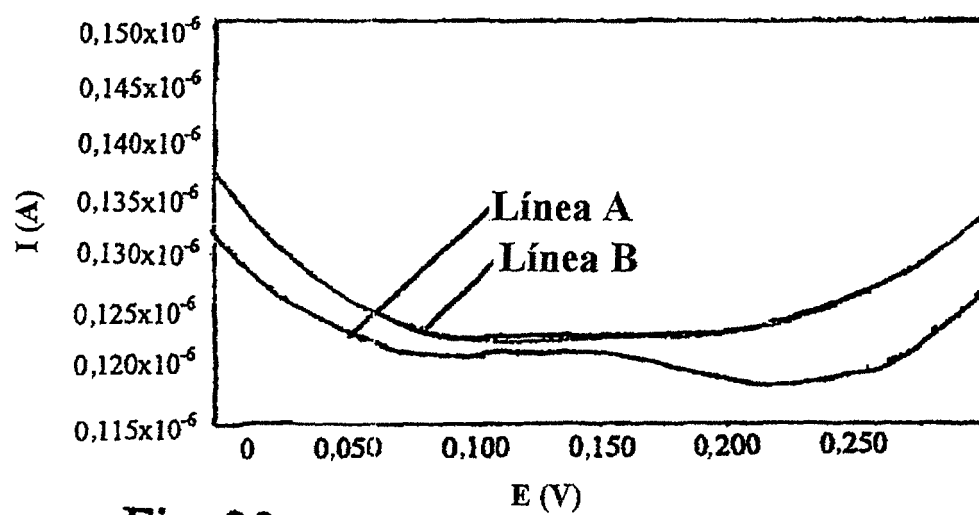


Fig. 20a

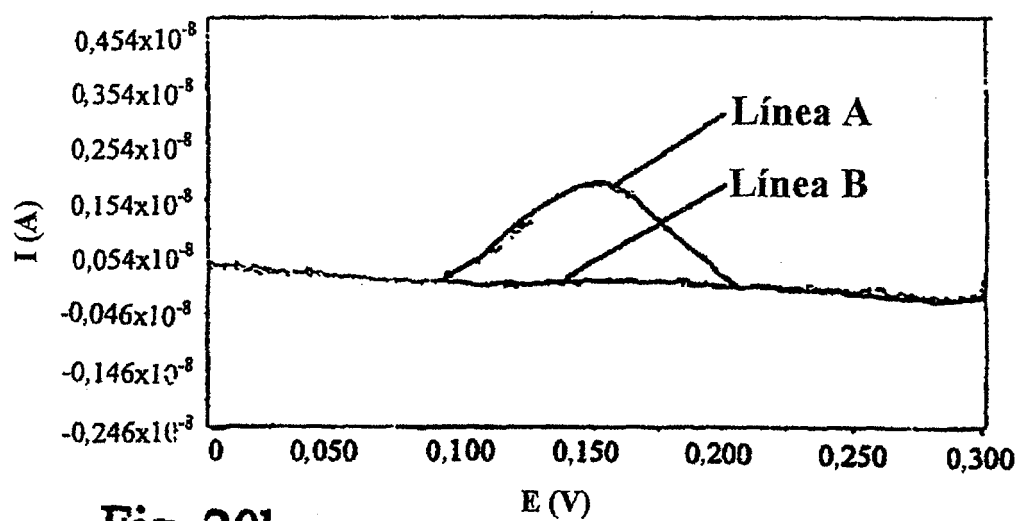


Fig. 20b

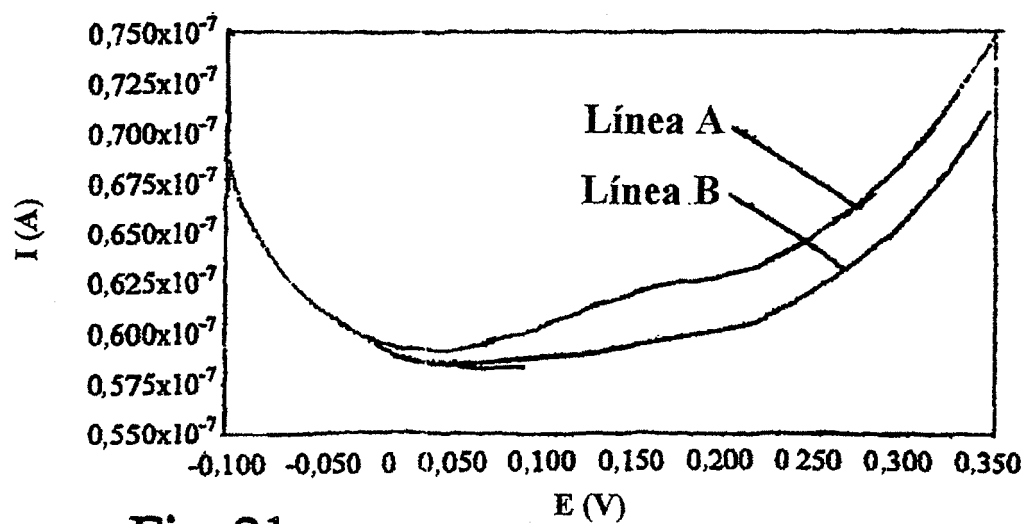


Fig. 21a

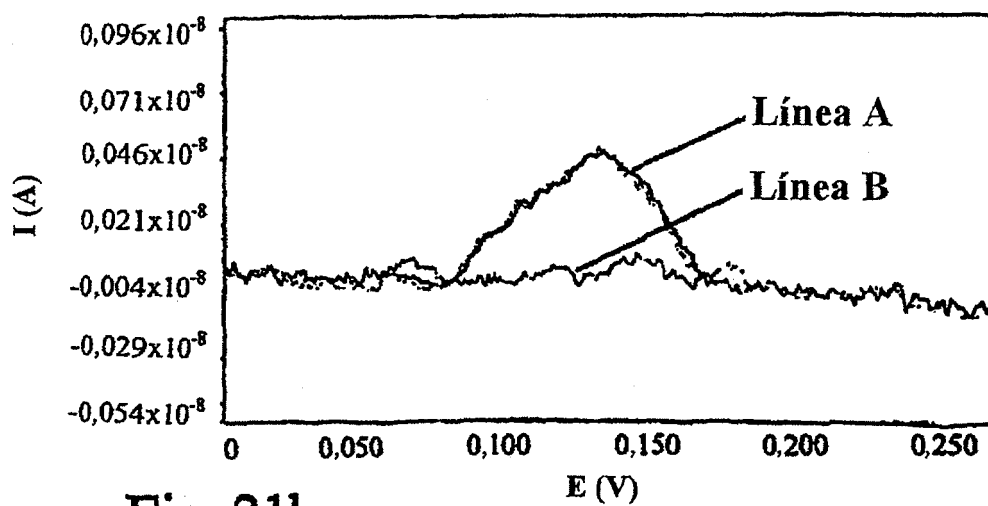


Fig. 21b

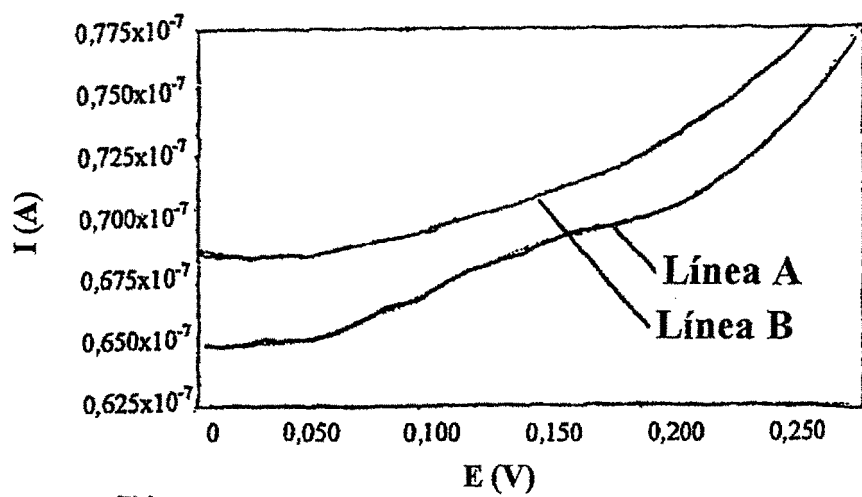


Fig. 22a

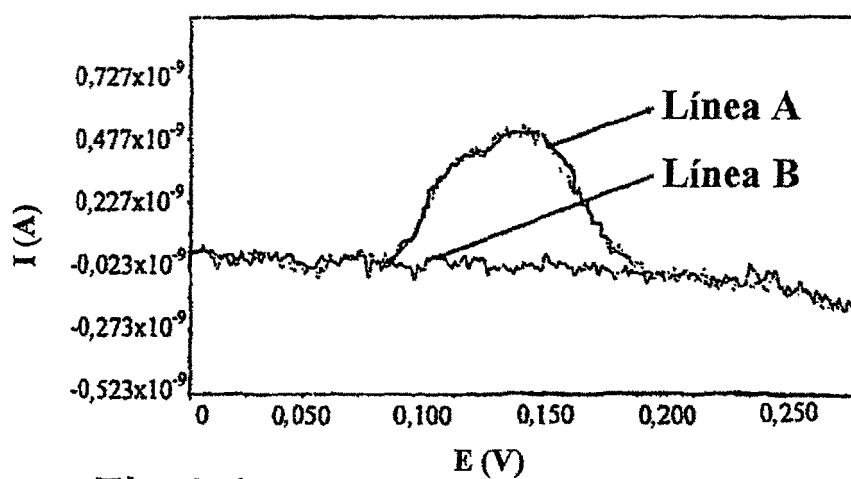


Fig. 22b

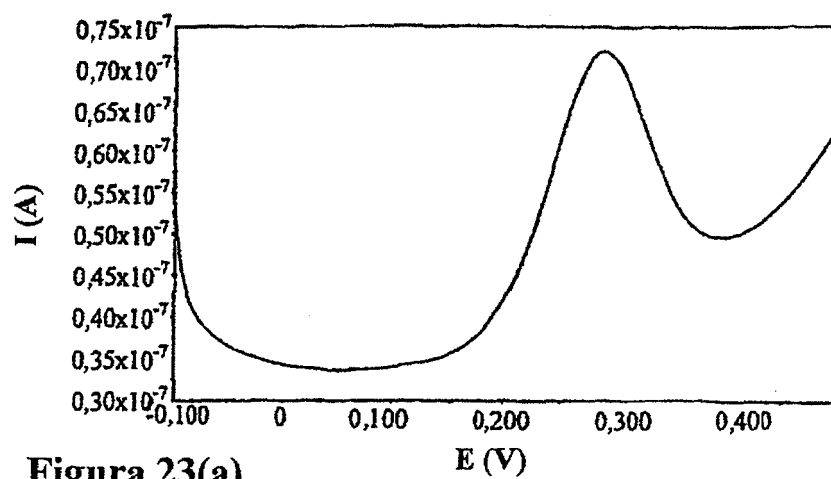


Figura 23(a)

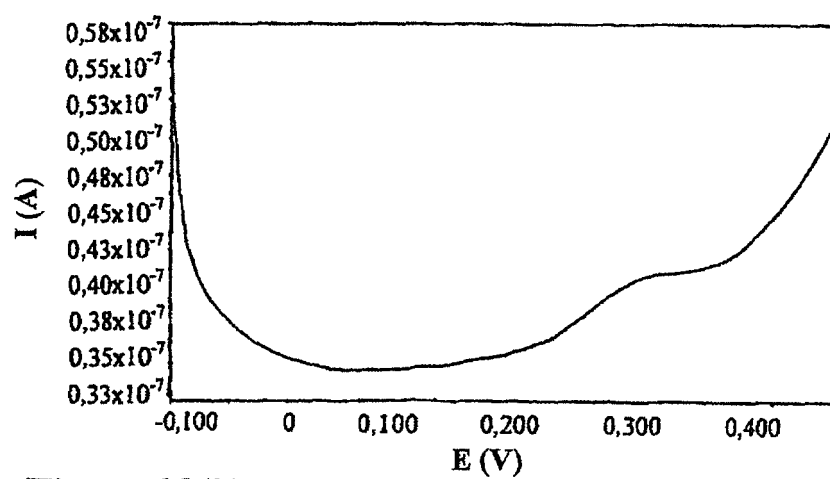


Figura 23(b)

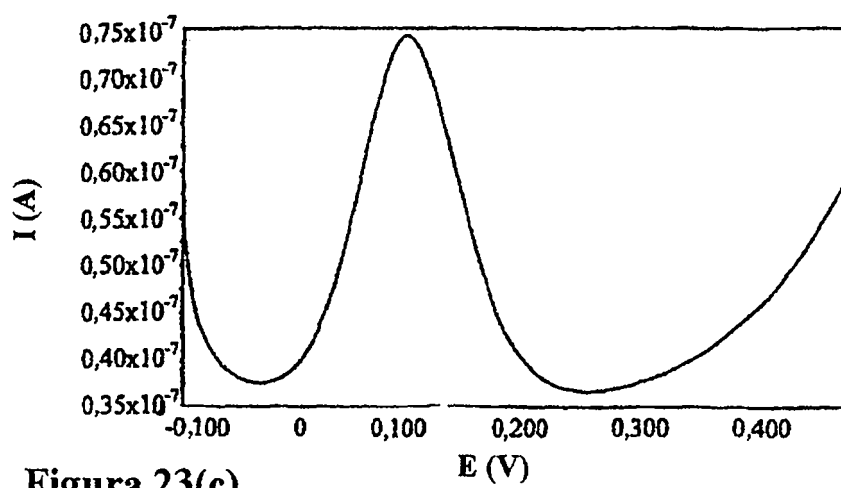


Figura 23(c)

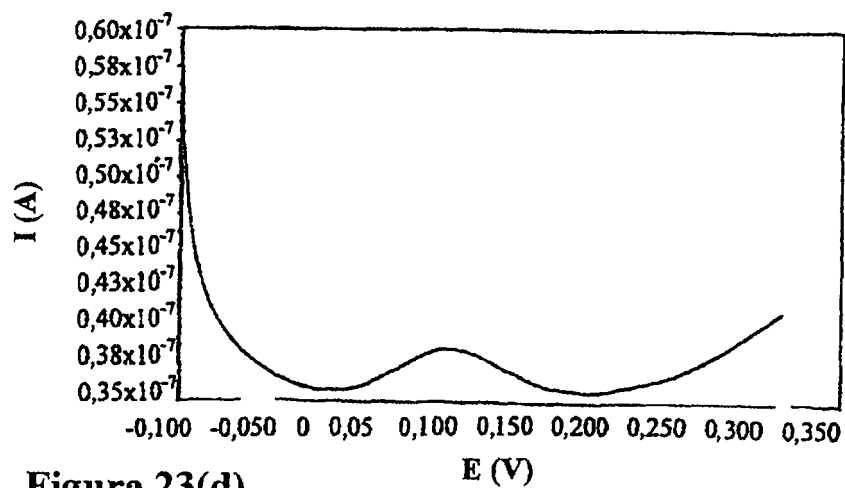


Figura 23(d)

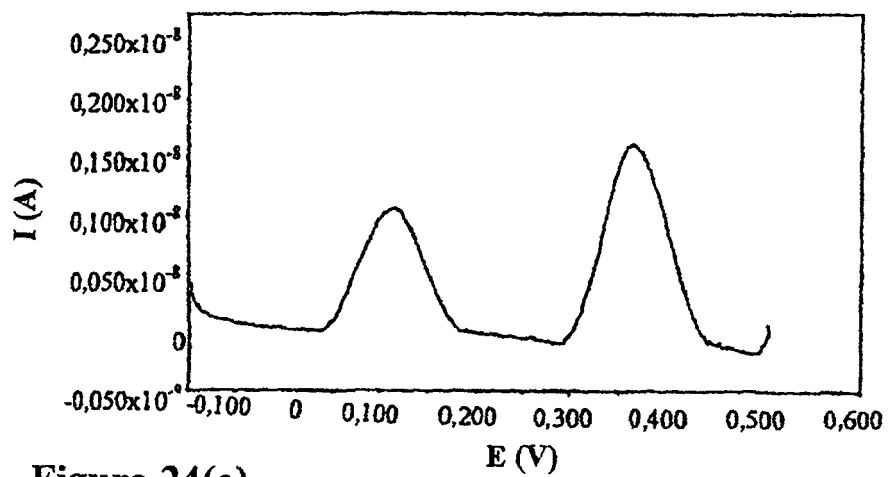


Figura 24(a)

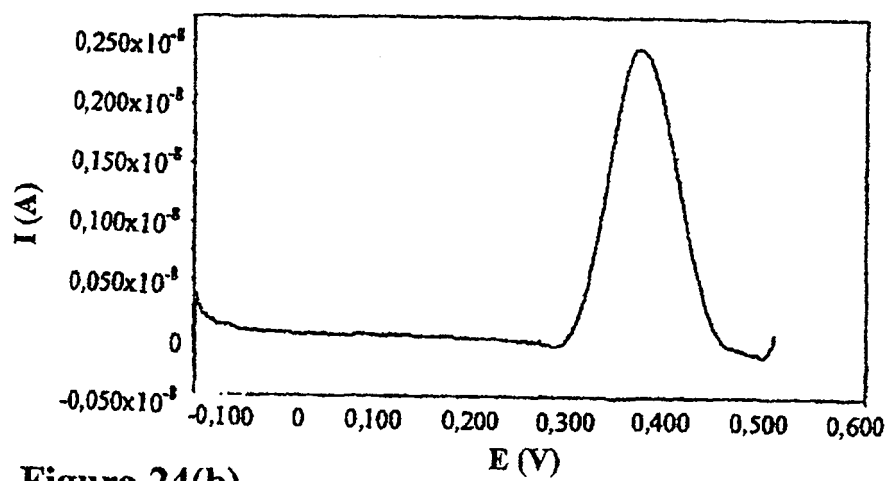


Figura 24(b)

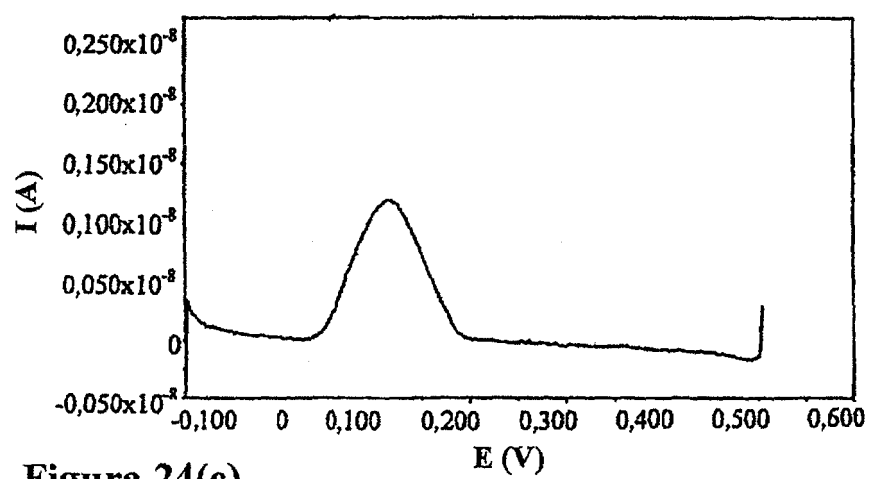


Figura 24(c)