



(10)授权公告号 CN 104781269 B

(45)授权公告日 2017.12.22

(21)申请号 201380043830.6

(22)申请日 2013.06.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104781269 A

(43)申请公布日 2015.07.15

(30)优先权数据

1211157.1 2012.06.22 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.02.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/051643 2013.06.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/190328 EN 2013.12.27

(73)专利权人 阿特莱斯遗传学有限公司

地址 英国威尔特郡

(72)发明人 B·马什 C·弗罗斯特

D·皮尔斯

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳

(51)Int.Cl.

C07F 17/02(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 27/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 2011073675 A2,2011.06.23,

W0 2005005657 A1,2005.01.20,

Dong-Jei Cho et al..Chiral C2-symmetric bisferrocenyldiamines as ligands for transition metal catalyzed asymmetric cyclopropanation and aziridination.《Tetrahedron: Asymmetry》.1999,

Xiang Ping Hu et al..Synthesis and Potential Application of Novel C2-Symmetrical Bis(ferrocenyl) P2N Ligand.《Chinese Chemical Letters》.2003,

Martin Lamac et al..Preparation of planar-chiral multidonor phosphanylferrocene carboxamides and their application as ligands for palladium-catalysed asymmetric allylic alkylation.《Applied Organometallic Chemistry》.2010,

Janett Kuhnert et al..Phosphinoferrocenyl-terminated amidoamines: Synthesis and catalytic utilization in palladium-mediated C-C bond forming reactions.《Journal of Molecular Catalysis A: Chemical》.2008,

审查员 秦茜

权利要求书5页 说明书31页

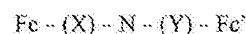
(54)发明名称

1,1'-[[[(取代的烷基)亚氨基]双(亚烷基)]双二茂铁及其通过标记感兴趣底物而在电化学检定中的用途

(57)摘要

通式I的化合物,其中Fc和Fc'可以相同或不同,且为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基和氰基的环取代基,其中如果氰基作为唯一的

取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上;X为间隔基,Y为间隔基,Z为间隔基;且R为连接基团。化合物I可用于制备被标记底物、被标记底物制备所用的官能化化合物,且可用作电化学检定



中的标记物。



1. 通式I的化合物在电化学检定中作为标记物的用途：



$$|$$

$$|$$


其中：

Fc为取代的二茂铁基部分，其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基的环取代基，其中如果氰基作为唯一的取代基存在，则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上；

Fc'为取代的二茂铁基部分，其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基和氰基的环取代基，其中如果氰基作为唯一的取代基存在，则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上，且Fc'可与Fc相同或不同；

X为C1至C6亚烷基链，其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔，其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基；

Y为C1至C6亚烷基链，其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔，其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基，其可以与X相同或不同；

Z为C1至C12亚烷基链，其可任选地被取代且/或可任选地被-O-、-S-、环烷基、-CO-、-CONR<sup>1</sup>-、-NR<sup>1</sup>CO-或-NR<sup>1</sup>-间隔，其中R<sup>1</sup>表示氢或C1至C4烷基；

且

R为羟基或受保护的羟基，或者包括羟基或受保护的羟基的基团。

2. 根据权利要求1所述的用途，其中：X表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基，Y表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基，且Z表示任选地被氧间隔的C1至C8亚烷基。

3. 根据权利要求1所述的用途，其中：X为-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>，其中x为1或2；Y为-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>，其中y为1或2；Z为(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>，其中z为1至8。

4. 根据权利要求1所述的用途，其中Fc和Fc'相同，且X和Y相同。

5. 根据权利要求1所述的用途，其中所述检定用于检测被电化学标记的底物。

6. 根据权利要求1所述的用途，其中所述检定用于检测选自核苷酸、核苷，或选自氨基酸、肽和蛋白质的生物底物。

7. 根据权利要求6所述的用途，其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。

8. 根据权利要求1所述的用途，其中所述检定用于检测选自合成的核苷酸、核苷，或选自合成的氨基酸、肽和蛋白质的合成底物。

9. 根据权利要求8所述的用途，其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途，其中Fc和Fc'相同。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途，其中Fc和Fc'相同，且各自包括至少一种选自以下的取代基：

选自硫基、亚磺酰基和磺酰基的含硫基团、

选自膦基和氧膦基的含磷基团、

碘、

氯、

包含两个或多个氟原子的氟烷基、  
杂芳基和  
取代的苯基。

12. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途,其中Fc和Fc' 相同,且存在位于各个所述Fc和Fc' 部分各自近侧的环戊二烯基环上的氰基作为所述取代基。

13. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途,其中Fc和Fc' 相同,且各自包括至少一个选自含硫基团和含磷基团的环取代基。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中存在至少一个选自式 $R^{15}S(O)_2$ -的基团的磺酰基取代基作为所述含硫基团,其中 $R^{15}$ 选自支链或直链的烷基、卤代烷基、和取代或未取代的芳基。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中 $R^{15}$ 表示C1至C4烷基或C1至C4卤代烷基。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述C1至C4卤代烷基为C1至C4氟烷基。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述C1至C4氟烷基为三氟甲基。

18. 根据权利要求14所述的用途,其中 $R^{15}$ 表示 $(R^{16})_a$ -Ar-或 $(R^{16})_a$ -HeAr-,其中Ar表示芳基;HeAr表示杂芳基; $R^{16}$ 为选自卤素、烷基、硝基、氰基、卤代烷基和烷氧基的取代基;且a为在0至与芳基或杂芳基环中最大能取代的环位置相等的数目的范围内的整数。

19. 根据权利要求13所述的用途,其中Fc和Fc' 相同,且各自包括至少一个选自式 $(R^{17})_2P(O)$ -的基团的取代基,其中 $R^{17}$ 独立地选自支链或直链的烷基、卤代烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中 $R^{17}$ 表示C1至C4烷基。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中 $R^{17}$ 表示未取代的芳基或未取代的杂芳基或表示 $(R^{18})_b$ -Ar-或 $(R^{18})_b$ -HeAr-,其中Ar为芳基;HeAr为杂芳基; $R^{18}$ 为选自卤素、烷基、硝基、氰基、卤代烷基和烷氧基的取代基;且b为在0至与芳基或杂芳基环中最大能取代的环位置相等的数目的范围内的整数。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中Ar表示苯基并包括一个或多个选自卤素、烷基、卤代烷基、硝基、氰基、烷氧基和含硫基团的 $R^{18}$ 取代基,所述一个或多个 $R^{18}$ 取代基可以相同或不同。

23. 根据权利要求20所述的用途,其中 $R^{17}$ 表示支链C1至C4烷基。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述支链C1至C4烷基为叔丁基。

25. 根据权利要求11所述的用途,其中在各个二茂铁基上存在至少一个取代的苯基作为所述取代基,其中所述苯基具有至少一个选自卤素、C1至C4烷基、硝基、氰基、C1至C4卤代烷基、C1至C4烷氧基和含硫基团的取代基。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中含硫基团为亚磺酰基、硫基或磺酰基。

27. 根据权利要求11所述的用途,其中在各个二茂铁基上存在至少一个杂芳基作为所述取代基,其可为未取代的,或被至少一个选自卤素、C1至C4烷基、硝基、氰基、C1至C4卤代烷基和C1至C4烷氧基的取代基取代。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述杂芳基为呋喃基。

29. 根据权利要求11所述的用途,其中在各个二茂铁基上存在至少一个碘原子或氯原子作为所述取代基。

30. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途,其中Fc和Fc'相同,且各自包括至少一个甲硅烷基取代基作为所述取代基。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述甲硅烷基取代基为烷基甲硅烷基。

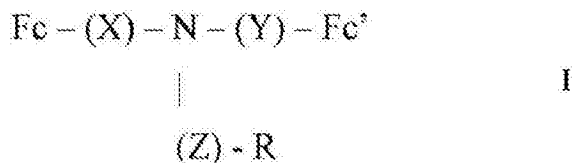
32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述烷基甲硅烷基为三甲基甲硅烷基。

33. 根据权利要求10所述的用途,其中各个二茂铁基部分进一步被至少一个额外的取代基取代。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中各个二茂铁基部分进一步被至少一个选自溴、氟、C1至C4烷基、卤代烷基和C1至C4烯基的额外的取代基取代。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中Fc和Fc'各自在其远侧环上额外包括至少一个氰基取代基。

36. 一种用于制造包括用于电化学检定的标记部分的官能化标记化合物的方法,包括使通式I的化合物与官能化化合物反应:



其中:

Fc为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基的环取代基,其中如果氰基作为唯一的取代基存在,则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上;

Fc'为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基的环取代基,其中如果氰基作为唯一的取代基存在,则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上,且Fc'可与Fc相同或不同;

X为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基;

Y为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基,其可以与X相同或不同;

Z为C1至C12亚烷基链,其可任选地被取代且/或可任选地被-O-、-S-、环烷基、-CO-、-CONR<sup>1</sup>-、-NR<sup>1</sup>CO-或-NR<sup>1</sup>-间隔,其中R<sup>1</sup>表示氢或C1至C4烷基;

且

R为羟基或受保护的羟基,或者包括羟基或受保护的羟基的基团,

从而得到包括琥珀酰亚胺酯基、亚磷酰胺基、马来酰亚胺基、生物素或叠氮基的官能化标记化合物。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中通式I的化合物如权利要求10-35中任一项所限定。

38. 一种用于制造被标记底物的方法,包括使如权利要求36中所限定的官能化标记化合物与底物反应以形成被标记底物。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述底物选自氨基酸、核苷酸、核苷、糖、肽、蛋白质、碳水化合物、微粒和纳米粒子。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。
41. 根据权利要求38所述的方法,其中所述底物为选自核苷酸、核苷,或选自氨基酸、肽和蛋白质的生物底物。
42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。
43. 根据权利要求38所述的方法,其中所述底物为选自合成的核苷酸、核苷,或选自合成的氨基酸、肽和蛋白质的合成底物。
44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。
45. 根据权利要求38所述的方法,其中通式I的化合物如权利要求10-35中任一项所限定。
46. 一种用于权利要求38所述的方法中的官能化标记化合物,其中所述化合物是权利要求1所述化合物的官能化衍生物,其中所述官能化衍生物包括选自琥珀酰亚胺酯基、亚磷酸胺基、马来酰亚胺基、生物素或叠氮基的部分。
47. 根据权利要求46所述的官能化标记化合物,其中通式I的化合物如权利要求10-35中任一项所限定。
48. 一种用于电化学检定的被标记底物,其中所述底物被权利要求46限定的官能化衍生物标记。
49. 根据权利要求48所述的被标记底物,其中所述底物选自核苷酸、核苷。
50. 根据权利要求49所述的被标记底物,其中所述核苷酸为寡核苷酸或多核苷酸。
51. 根据权利要求49所述的被标记底物,其中所述底物是合成的或天然出现的寡核苷酸或包括合成的或天然出现的寡核苷酸。
52. 根据权利要求48所述的被标记底物,其中所述底物选自氨基酸、糖、肽和蛋白质。
53. 根据权利要求48所述的被标记底物,其中通式I的化合物如权利要求10-35中任一项所限定。
54. 一种用于确定检定靶标的存在的检定试剂盒,其中所述检定试剂盒包括根据权利要求48所述的被标记底物。

55. 一种通式I的化合物



$$|$$

$$(\text{Z}) - \text{R}$$

$$\text{I}$$

其中:

Fc为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基的环取代基,其中如果氰基作为唯一的取代基存在,则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上;

Fc' 为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基的环取代基,其中如果氰基作为唯一的取代基存在,则所述氰基位于近侧环戊二烯基环上,且Fc' 可与Fc相同或不同;

X为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基;

Y为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基,其可以与X相同或不同;

Z为C1至C12亚烷基链,其可任选地被取代且/或可任选地被-O-、-S-、环烷基、-CO-、-CONR<sup>1</sup>-、-NR<sup>1</sup>CO-或-NR<sup>1</sup>-间隔,其中R<sup>1</sup>表示氢或C1至C4烷基;

且

R为羟基或受保护的羟基,或者包括羟基或受保护的羟基的基团。

56. 根据权利要求55所述的化合物,其中 (a) X表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基,Y表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基,且Z表示任选地被氧间隔的C1至C8亚烷基;或 (b) X表示-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-,其中x为1至6,且Y表示-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-,其中y为1至6。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的化合物,其中Z表示任选地被氧间隔的C6至C8亚烷基。

58. 根据权利要求55所述的化合物,其中通式I的化合物如权利要求10-35中任一项所限定。

59. 一种化合物,选自

6-(双((2-叔丁基-磺酰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((2-氰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((2-二叔丁基-氧膦基-二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((1'-碘二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((1'-(4-硝基苄基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((1'-(1-呋喃基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((1'-氯二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((2-叔丁基-亚磺酰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇;

6-(双((2-叔丁基-硫基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。

60. 一种根据权利要求59所述的化合物的官能化衍生物,其中所述官能化衍生物包括选自琥珀酰亚胺酯基、亚磷酰胺基、马来酰亚胺基、生物素或叠氮基的部分。

61. 一种检测核酸的方法,包括在允许探针与扩增子之间的杂交的条件下,使核酸与互补核酸探针接触,之后进行使杂交的或未杂交的探针选择性地降解的步骤,其中所述探针标记有根据权利要求55-58中任一项所述的化合物,并且其中所述方法提供对标记所述探针的化合物的电化学活性进行测量的步骤,其中所述电化学活性定量地或定性取决于所述探针的降解程度。

62. 一种对标记有根据权利要求55所述的化合物的氨基酸、肽或蛋白质进行检测的方法,包括测量所述化合物的电化学活性的步骤。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中使用包括至少两种标记物的检定装置,各个标记物包括根据权利要求46-53,55-58中任一项所述的化合物、官能化标记化合物或底物。

64. 一种核酸,标记有根据权利要求55-59中任一项所述的化合物。

## 1,1'-[[ (取代的烷基) 亚氨基] 双 (亚烷基)] 双二茂铁及其通过标记感兴趣底物而在电化学检定中的用途

[0001] 本申请要求英国专利申请1211157.1 (2012年6月22日提交) 的权益,其全部内容出于所有目的并入本文以供参考。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及电化学检测方法。更具体地,本发明涉及电化学检定、用于电化学检测方法中的电化学活性标记物(labels)及其用途。

### 背景技术

[0003] 某些生物分子的检测在生命的许多方面发挥重要作用。例如,在医学领域中,始终存在对检测细菌或病毒病原体或生物分子的需求。必需灵敏检定的其他领域包括食品和饮料工业。

[0004] W003/074731公开了一种探测核酸的方法。使核酸溶液与具有电化学活性标记物(marker)的寡核苷酸探针接触。使探针至少部分地与可能存在于核酸溶液中的任何互补靶序列杂交。在核酸探针酶促降解后,在电化学方面测定与标记物相关的信息。还公开了用于该方法的化合物。

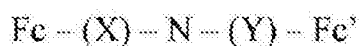
[0005] W02005/005657公开了一种检测蛋白酶活性的方法,其中,在样品中可能存在的任何蛋白酶皆可降解蛋白酶底物的条件下,使样品溶液与具有电化学活性标记物的蛋白酶底物接触,并在电化学方面测定与具电化学活性标记物相关的信息。还公开了在该过程中使用的某些新的化合物。

[0006] W02012/085591描述了某些用作电化学标记物的双二茂铁基化合物。

[0007] 对能够检测生物底物或指示物的小浓度存在的标记物的开发存在持续的需求,该生物底物或指示物例如核酸(以分离形式或较大分子的形式,例如天然的或合成的寡核苷酸)或氨基酸(以分离形式或较大分子的形式,例如天然的或合成的肽)。尤其地,对具有不同氧化电位且/或具有不同化学或物理性质的新标记物存在持续的需求,从而拓宽可能的可用检定的范围,并增加对于多重反应开发的范围。

### 发明内容

[0008] 本发明提供根据通式I的化合物:



[0009] 
$$\begin{array}{c} | \\ (\text{Z})-\text{R} \end{array} \quad \text{I}$$

[0010] 其中:

[0011] Fc为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基(其中如果作为唯一的

取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基;

[0012] Fc' 为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基(其中如果作为唯一的取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基,且Fc' 可与Fc相同或不同;

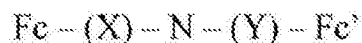
[0013] X为间隔基(spacer);

[0014] Y为间隔基;

[0015] Z为间隔基;且

[0016] R为连接基团。

[0017] 本发明还提供通式I的化合物在电化学检定中作为标记物的用途:



[0018] 
$$\begin{array}{c} | \\ \text{(Z)}-\text{R} \end{array} \quad \text{I}$$

[0019] 其中:

[0020] Fc为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代苯基、和氰基(其中如果作为唯一的取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基;

[0021] Fc' 为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基(其中如果作为唯一的取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基,且Fc' 可与Fc相同或不同;

[0022] X为间隔基;

[0023] Y为间隔基;

[0024] Z为间隔基;且

[0025] R为连接基团。

[0026] 已发现,根据本发明使用的化合物是用于电化学检定的有效标记物。尤其地,化合物可用于形成被标记的底物。作为可被标记的底物的感兴趣的分子包括,但不限于:氨基酸、核苷酸、核苷、糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸、碳水化合物以及任何这些分子的衍生物或合成类似物。其它可使用本发明的化合物标记的底物包括乳胶(latex)/顺磁性微粒和纳米粒子。可将通式I的标记化合物以及包括可衍生自标记化合物的标记物的被标记分子用于电化学技术,其中可利用它们的电化学特性,以得到关于标记物或其环境的信息。例如,本发明的化合物可在如W003/074731中描述的方法中使用,或在如W02005/005657中描述的方法中使用。本发明的标记化合物和由其衍生的被标记底物提供了使其成为先前已知的标记化合物的有用补充物的特征,从而允许更广的应用,例如,提供额外的避免测量电势可能因可能存在的杂质的干扰而受影响的条件的机会,和/或提供不同的电化学电势值和/或允许多重检定中更大的灵活性。大量化合物及相应的被标记底物具有相对较高的电势值,具体如下文的实施例4所示。据信,尤其地,本发明的具有含硫或含磷取代基的化合物以及其相应的被标记底物可用于测量电势较高的检定,例如,超过400mV、例如超过450mV或甚至超过500mV的检定。具有至少450mV,例如500mV或更高的电化学电势的化合物在扩大可用电势值的范围时特别有用,因此,例如,在潜在地提供更有效的多重检定时特别有用。本发

明的其它具有高度吸电子取代基(例如三氟甲基或氰基)的化合物被认为在提供高电势值方面具有相似的优点,从而扩大有用标记物和被标记底物的范围。此外,本发明的一些化合物及相应的被标记底物提供了具有较窄电压峰的优点,其有利于提供在多重检定中使用较大数目的标记物的选项,因为较窄的测量峰导致峰之间较宽的间隙,如果需要其可通过引入电势处于间隙内的额外标记物而得以使用。

[0027] 在本发明的所有方面,优选以下的间隔基:X为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基;Y为C1至C6亚烷基链,其任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>-间隔,其中R<sup>5</sup>表示氢或C1至C6烷基;且Z为C1至C12亚烷基链,其可任选地被-O-、-S-、环烷基、-CO-、-CONR<sup>1</sup>-、-NR<sup>1</sup>CO-或-NR<sup>1</sup>-取代且/或可任选地被-O-、-S-、环烷基、-CO-、-CONR<sup>1</sup>-、-NR<sup>1</sup>CO-或-NR<sup>1</sup>-间隔,其中R<sup>1</sup>表示氢或C1至C4烷基。

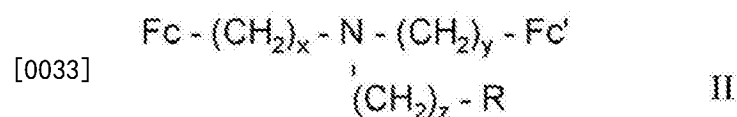
[0028] 在根据本发明使用的化合物中,优选地,X表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基;Y表示任选地被氧间隔的C1至C6亚烷基;且Z表示任选地被氧间隔的C1至C8亚烷基。因此,在这些实施方式中,X、Y和Z可由式(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>表示,其中a≥0且b≥0。对于X和Y,a+b=1-6。对于Z,a+b=1-8。理想地,a≥1且b≥1。

[0029] X优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-,其中x为由1至6,优选为1至4,尤其为1或2;或者为被氧间隔的C1至C6亚烷基,例如-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-或-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-。

[0030] Y优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-,其中y为1至6,优选为1至4,尤其为1或2;或者为被氧间隔的C1至C6亚烷基,例如-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-或-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-。

[0031] 优选地,X与Y相同。优选地,Fc与Fc'相同且X与Y相同。在实施方式中,Z为C1至C12亚烷基链,其可任选地被取代且/或可任选地被-O-、-S-或-NR<sup>1</sup>-间隔,其中R<sup>1</sup>表示氢或C1至C4烷基。优选地,Z为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-,其中z为1至8,z优选地表示1至6,尤其为2至6;或者为被氧间隔的C1至C8亚烷基,例如-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-或-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-。在一个优选的实施方式中:X为-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-,其中x为1或2;Y为-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-,其中y为1或2;且Z为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-,其中z为1至8。当X和Y表示被-NR<sup>5</sup>-间隔的亚烷基链时,R<sup>5</sup>优选地表示氢或C1至C4烷基,更优选地表示氢。

[0032] 在一个优选的实施方式中,本发明提供通式II的化合物作为电化学标记物的用途:



[0034] 其中:

[0035] Fc为如上文参照通式I定义的取代的二茂铁基部分,

[0036] Fc'为如上文参照通式I定义的取代的二茂铁基部分,且可与Fc相同或不同;

[0037] x为1或2;

[0038] y为1或2;

[0039] z为1至8;

[0040] 且R为连接基团。

[0041] 优选地,x和y各自等于1。

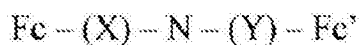
[0042] 优选地,二茂铁基部分相同,且因此Fc和Fc'优选地在相同的位置携带相同的取代基。

[0043] 除非上下文中明显相反,贯穿本文件的剩余部分,使用术语“底物”来包括天然出现的底物和合成的底物,且在本文中提及为氨基酸、核苷酸、核苷、糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸或碳水化合物,并应当理解为指天然出现的或合成的氨基酸、核苷酸、核苷、糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸或碳水化合物。底物也可多肽。合成的底物包括天然出现的底物的合成类似物。底物包括单个核苷酸和单个氨基酸。在基于例如通过酶裂解底物的检定的情况下,单个氨基酸可以被认为是底物,因为,尽管其缺乏能够被蛋白酶裂解的内部键,但这样的键可以经由标记物的连接而形成。当在本文中提及天然出现的底物的衍生物时,这些衍生物可为底物的天然出现的衍生物或合成的衍生物。

[0044] 本发明提供使用根据本发明的化合物检测化学实体的方法。根据本发明的电化学检定中的用途可为,例如用于检测被电化学标记的底物的检定中的用途。电化学检定可为,例如,用于测定被电化学标记的底物的量的检定。检定可有利地用于检测或测定被标记底物的量,其中被标记底物选自氨基酸、核苷酸、核苷、糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸、碳水化合物、微粒和纳米粒子。在某些优选的实施方式中,检定用于检测或测定被标记底物的量,其中该被标记底物选自核苷酸、核苷、寡核苷酸或多核苷酸。在另一个有利的实施方式中,检定用于检测或测定被标记底物的量,其中该被标记底物选自氨基酸、肽和蛋白质。

[0045] 出于连接底物的目的,可通过加入官能化基团使标记物官能化。因此,本发明进一步提供包括如下部分(moiety)的官能化衍生物,该部分可衍生自本发明的化合物且与适用于增强与底物的连接的官能化基团连接。

[0046] 本发明还提供用于制造包括用于电化学检定的标记部分的官能化标记化合物的方法,包括使通式I的化合物与官能化化合物反应:



[0047]



[0048] 其中:

[0049] Fc为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基(其中如果作为唯一的取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基;

[0050] Fc' 为取代的二茂铁基部分,其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、具有两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基(其中如果作为唯一的取代基存在,则氰基位于近侧环戊二烯基环上)的环取代基,且Fc' 可与Fc相同或不同;

[0051] X为间隔基;

[0052] Y为间隔基;

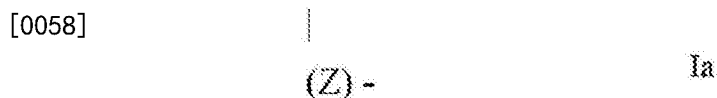
[0053] Z为间隔基;且

[0054] R为连接基团,

[0055] 从而得到通式III的官能化标记化合物:

[0056] A-L-F III

[0057] 其中A表示



[0059] 其中

[0060] Fc、Fc'、X、Y和Z如上文参照通式I所定义；

[0061] F表示官能化部分，尤其是用于与底物反应以将标记部分与底物连接的官能化部分；且

[0062] L表示连接部分。

[0063] 连接部分L通常是可衍生自连接基团R的连接部分。例如，当R是或包含OH基时，L通常表示或包括-O-。

[0064] 此外，本发明提供用于制造被标记底物的方法，包括使通式III的化合物与底物反应，以形成被标记底物：



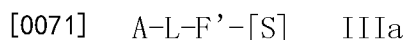
[0066] 其中A、L和F如上文所定义。

[0067] 本发明还提供用于制造被标记底物的官能化标记化合物，该官能化标记化合物具有通式III：

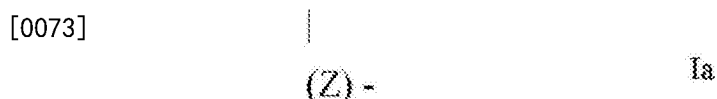
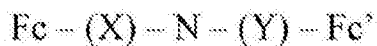


[0069] 其中A、L和F如上文所定义；

[0070] 本发明还提供用于电化学检定的被标记底物，该被标记底物具有通式IIIa：



[0072] 其中A表示



[0074] 其中：

[0075] Fc为取代的二茂铁基部分，其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基（其中如果作为唯一的取代基存在，则氰基位于近侧环戊二烯基环上）的环取代基；

[0076] Fc'为取代的二茂铁基部分，其具有至少一个选自含硫基团、含磷基团、碘、氯、甲硅烷基、包含两个或多个氟原子的氟烷基、杂芳基、取代的苯基、和氰基（其中如果作为唯一的取代基存在，则氰基位于近侧环戊二烯基环上）的环取代基，且Fc'可与Fc相同或不同；

[0077] X为间隔基；

[0078] Y为间隔基；

[0079] Z为间隔基；

[0080] L-F'表示连接部分；且

[0081] [S]表示底物。

[0082] 连接部分-L-F'-通常是可衍生自根据通式III的-L-F部分的部分或可衍生自根据

通式I的-R部分的部分。在一实施方式中,连接部分-L-F'-为可衍生自根据通式III的-L-F部分的部分。

[0083] 通过类推,本发明还提供用于电化学检定的被标记底物,该被标记底物具有通式IIIb:

[0084]  $A-L-R'-[S]$  IIIb

[0085] 其中R' 为当使本发明的化合物与底物反应时形成的R的残基(residue)。

[0086] 本发明进一步提供包括根据本发明的底物的检定。

## 具体实施方式

[0087] 除非很明显地有相反指示,本文中提及的“烷基”为直链或支链的烷基,其优选地具有1至6个碳原子,更优选地具有1至4个碳原子,任选地被选自O、S和N的杂原子间隔,且/或任选地具有一个或多个取代基;或为环烷基。示例说明性的烷基包括,例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基。

[0088] 本文中提及的“环烷基”为具有高达8个、优选高达6个环原子的环烷基,任选地包括一个或多个杂原子。示例说明性的环烷基包括,例如环己基和杂环基团如哌啶基和吗啉基。

[0089] 本文中提及的“烯基”为直链或支链的烯基,其优选地具有1至6个碳原子,更优选地具有1至4个碳原子,任选地具有一个或多个取代基。示例说明性的烯基包括,例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基。

[0090] 除非有相反指示,本文中使用的术语“卤代烷基”是指具有一个或多个作为取代基存在的卤原子的烷基,所述一个或多个卤原子选自氟、氯、溴和碘。

[0091] 除非有相反指示,“含硫基团”将被理解为不受限制地包括:包括-S(O)<sub>2</sub>-部分的取代基(在本文中称为“磺酰基(sulfonyl)”)、包括-S(O)-部分的取代基(在本文中称为“亚磺酰基(sulfinyl)”)或包括-S-部分的取代基(在本文中称为“硫基(sulfenyl)”)。根据本发明的可作为取代基存在于二茂铁基环上的优选的含硫基团为硫原子直接键合到环碳的那些。

[0092] 除非有相反指示,“含磷基团”将被理解为不受限制地包括:包括基于磷或氧化磷的取代基,更特别的是磷基(>P-)和氧磷基(>P(O)-)。根据本发明的可作为取代基存在于二茂铁基环上的优选的含磷基团为磷原子直接键合到环碳的那些。

[0093] 本文中提及的“杂芳基”将被理解为包括包含一个或多个杂原子的任意单环或稠环芳族部分,杂原子优选地选自氧、硫和氮。当存在多于一个杂原子时,杂原子可相同或不同,各自有利地独立选自氧、硫和氮。示例说明性的杂芳基不受限制地包括呋喃基、咪唑基、噻唑基。

[0094] 本文中提及的“芳基”将被理解为包括任何单环或稠环芳族环体系,且包括杂环和其它环体系。

[0095] 本文中所使用的表述“取代的苯基”包括任何具有一个或多个在环的任意环碳原子处与苯基连接的取代基的苯基。当在苯环上存在多于一个取代基时,这些取代基可相同或彼此不同。

[0096] 相比于荧光检测,电化学检测的应用具有很多优点。电化学检测具有非常高水平

灵敏性的潜能,并表现出比荧光更宽的线性动态范围。不需要样品是光学透明的。来自背景污染物的干扰也更少(很多生物样品自发荧光)。

[0097] 电化学检测基于以下观察,即根据是否连接至底物以及底物的性质,电化学活性标记物表现出不同的电化学特性。例如,在连接至氨基酸的电化学标记物的情况中,所表现的特性不仅取决于氨基酸的特性(identity),还取决于氨基酸残基是否引入到肽或蛋白质中,以及任何这些肽或蛋白质的长度。在合适的环境下,连接到氨基酸残基的标记物的电化学活性可以在失去单个或非常少的氨基酸残基的连接之后具有可检测程度的变化。

[0098] 电化学活性标记物所连接的分子的尺寸和特性影响电化学标记物的可观察特性。这可能例如通过影响标记物经由扩散的迁移速率或其响应于电场的迁移速率而出现。

[0099] 标记物的电化学活性也可受其所连接的分子的存在而引起的空间效应的影响。例如,空间位阻可以防止标记物接近电极以及接收或提供电子。

[0100] 如果标记物连接到肽,则肽的二级结构(主要由一级序列决定)可以影响标记物的物理特性。例如,如果标记物连接到肽中的氨基酸残基,使得肽的结构从空间上阻碍电化学活性标记物,则可减少通过伏安法可观测到的信号。肽的消化可以破坏或释放二级结构元素,因而减少或消除肽结构对标记物的影响。因此,肽的消化引起标记部分所生成的电化学信号的变化,通常引起增加。在微分脉冲伏安法实验中,在特定的施加电压下的法拉第电流响应可以在消化肽时增加。

[0101] 类似地,如果标记物连接至核苷酸,核苷酸是否引入到寡核苷酸中、该寡核苷酸的长度以及特别是在连接点附近的寡核苷酸的序列会影响电化学特性。

[0102] 与电化学活性标记物相关的信息可以通过伏安法或通过安培法来获得。微分脉冲伏安法特别合适。如果需要的话,电化学检测步骤可以使用一个或更多个电极来执行,该电极由能够基于一个或更多个特性例如尺寸、电荷或疏水性而选择性地排除分子的膜覆盖。这可以帮助消除由例如溶液中的带电物种引起的背景噪音电流。

[0103] 在根据本发明所使用的化合物(包括标记化合物、官能化标记化合物和被标记底物)中,其包括根据通式I、II和III的化合物、通式IIIa的被标记底物以及通式Ia的标记部分,两个二茂铁基Fc和Fc'各自独立地选自具有一个或多个如上文中参照通式I定义的取代基的取代的二茂铁基团。一个或每个二茂铁基部分的一个或两个环戊二烯基环可被一个或多个取代基取代,选择取代基的性质和位置,以使其以期望的方式影响二茂铁部分的氧化还原特性。除了上文所定义的取代基,二茂铁基部分的环戊二烯基环还可进一步被任何不实质上降低标记物的电化学灵敏度的另外的环取代基取代,或被任何将在任何方面提高标记物的电化学特性或其它特性的另外的环取代基取代。

[0104] 在一优选的实施方式中,Fc和Fc'相同,且各自包括至少一种选自以下的取代基:

[0105] 选自巯基、亚磺酰基和磺酰基的含硫基团,

[0106] 选自膦基和氧膦基的含磷基团,

[0107] 碘,

[0108] 氯,

[0109] 包含两个或更多个氟原子的氟烷基,尤其是三氟烷基,

[0110] 杂芳基,和

[0111] 取代的苯基。

[0112] 在另一个实施方式中, Fc和Fc' 相同, 且存在位于每个所述Fc和Fc' 部分各自近侧的环戊二烯基环上的氰基作为取代基。

[0113] 在一个优选的实施方式中, Fc和Fc' 相同, 且各自包括至少一个选自含硫基团和含磷基团的环取代基。在下文的来自含硫基团和含磷基团的一个示例说明性的实施例中, 公开了电化学电势值超过500mV的化合物。据信本发明的包括含硫基团或含磷基团的化合物, 尤其是硫或磷原子与二茂铁基的环碳直接连接的那些化合物将有利于扩大这些标记物的可用电势值的范围, 使其可用作电化学检定中的标记物。特别地, 这些化合物提供了在高电化学电势值可能有价值的检定中进行使用的可能性, 例如在使用一系列具有可区分的电化学电势的不同标记物的多重检定中进行使用。

[0114] 在某些优选的化合物中, 存在至少一个磺酰基取代基作为所述含硫基团, 其选自式 $R^{15}S(O)_2-$ 的基团, 其中 $R^{15}$ 选自支链或直链的烷基、卤代烷基和取代或未取代的芳基。示例说明性的烷基 $R^{15}$ 包括, 例如甲基、乙基、丙基或丁基, 尤其是叔丁基。优选的卤代烷基 $R^{15}$ 包括, 例如具有一个或多个氟取代基的氟烷基, 尤其是三氟甲基。在某些优选的实施方式中,  $R^{15}$ 表示未取代的C1至C4烷基; 或C1至C4卤代烷基, 例如C1至C4氟烷基, 尤其是三氟甲基。示例说明性的芳基 $R^{15}$ 尤其包括苯基, 其可为取代的或未取代的, 优选的取代基包括, 例如, 卤素、未取代的烷基 (优选为C1至C4烷基)、取代的烷基 (例如卤代烷基)、硝基、氰基、烷氧基 (例如C1至C4烷氧基, 优选为甲氧基) 和含硫基团例如磺酰基。其它示例说明性的芳基取代基 $R^{15}$ 包括包含至少一个选自氧、硫和氮的杂原子的杂芳基。优选的芳基 $R^{15}$ 的示例为通式 $(R^{16})_a-Ar-$ 或 $(R^{16})_a-HeAr-$ 的化合物, 其中Ar表示芳基; HeAr表示杂芳基;  $R^{16}$ 为选自卤素、烷基、硝基、氰基、卤代烷基、烷氧基和含硫基团例如磺酰基的取代基; 且a为在0至与芳基或杂芳基环中最大可取代的环位置相等的数目范围内的整数。例如,  $R^{15}$ 可表示被F、Cl、Br、I、未取代的C1至C4烷基、C1至C4卤代烷基 (例如三氟甲基)、硝基、氰基、甲氧基、或含硫基团 (例如磺酰基) 取代的苯基。

[0115] 在进一步的实施方式中, 存在通式 $(R^{17})_2P(O)-$ 的基团作为所述含磷取代基, 其中每个 $R^{17}$ 独立地选自支链或直链的烷基、卤代烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。有利地,  $R^{17}$ 表示C1至C4烷基, 其优选地为未取代的C1至C4烷基, 例如甲基、乙基、丙基或丁基, 尤其是叔丁基。

[0116] 示例说明性的芳基取代基 $R^{17}$ 包括苯基和包含至少一个选自氧、硫和氮的杂原子的杂芳基, 其各自可为未取代的或取代的。优选的芳基 $R^{17}$ 包括通式 $(R^{18})_b-Ar-$ 或 $(R^{18})_b-HeAr-$ 的那些, 其中Ar为芳基, HeAr为杂芳基;  $R^{18}$ 为选自卤素、烷基、硝基、氰基、卤代烷基、烷氧基和含硫基团 (例如磺酰基) 的取代基; 且b为在0至与芳基或杂芳基环中最大可取代的环位置相等的数目范围内的整数。例如,  $R^{17}$ 可表示被F、Cl、Br、I、未取代的C1至C4烷基、C1至C4卤代烷基 (例如三氟甲基)、硝基、氰基、或甲氧基取代的苯基。优选地, Ar表示苯基, 并包括一个或多个选自卤素、烷基、卤代烷基、硝基、氰基和烷氧基的取代基 $R^{18}$  (其可为相同的或不同的)。更优选地, 每个 $R^{17}$ 为相同的, 且表示具有至少一个取代基的苯基, 尤其是在4位具有一个取代基的苯基。在一个优选的实施方式中,  $R^{17}$ 表示支链C1至C4烷基, 例如叔丁基。

[0117] 在另一个有利的实施方式中, 二茂铁基为相同的, 且在每个二茂铁基上存在至少一个取代的苯基作为所述取代基, 其中苯基具有至少一个选自卤素、C1至C4烷基、硝基、氰基、C1至C4卤代烷基、C1至C4烷氧基、和含硫基团 (例如磺酰基) 的取代基。这种取代基的示

例如,例如氟、氯、溴、碘原子、硝基、氰基、三氟甲基和甲氧基。在某些实施方式中,每个苯基具有一个可位于4位的取代基,例如4-硝基苯基(其中二茂铁基在1位与苯基连接)。

[0118] 在进一步的实施方式中,在每个二茂铁基上存在至少一个杂芳基作为所述取代基,其可为未取代的,或被至少一个选自卤素、C1至C4烷基、硝基、氰基、C1至C4卤代烷基、和C1至C4烷氧基的取代基取代。例如,可存在作为杂芳基的呋喃基。

[0119] 在再进一步的实施方式中,可在每个二茂铁基上存在至少一个碘或氯原子作为所述取代基。其它可能的取代基包括至少一个甲硅烷基取代基,优选为选自烷基甲硅烷基的甲硅烷基,例如三烷基甲硅烷基,尤其是三甲基甲硅烷基。

[0120] 除了参考本文的通式I所定义的至少一个取代基之外,每个二茂铁基部分还可任选地进一步被至少一个额外的取代基取代,例如被至少一个选自溴、氟、C1至C4烷基、卤代烷基、和C1至C4烯基的额外的取代基取代。根据进一步的实施方式,Fc和Fc'可各自在其远侧环上额外包括至少一个氰基取代基。

[0121] 二茂铁基部分优选为是相同的。这被认为会提供更强的信号。

[0122] Z部分可为未取代的或取代的。当存在时,取代基可为,例如,选自羟基、卤素、氰基、氨基、和取代或未取代的C1-C4烷基、C1-C4烯基、或芳基的一个或多个取代基;其中在每种情况下,任选的取代基非限制性地包括羟基、卤素、氰基、氧代、氨基、酯或酰胺基。如果需要,Z部分可被一个或任选地多于一个选自-O-、-S-、环烷基(包括杂环烷基)、-CO-、-CONH-、-NHCO-、-NH-和-NR<sup>1</sup>- (其中R<sup>1</sup>为C1至C4烷基)的原子或部分间隔。可作为间隔包括在Z部分内的环烷基部分的示例为具有5至7个环原子的环烷基环,尤其是具有6个环原子的环烷基环,例如环己基、哌啶基、吗啉基。

[0123] X和Y部分优选为相同的,有利地链长为1至6个碳原子,优选为1至4个碳原子,尤其为一个或两个碳原子,且更尤其为一个碳原子。X和Y部分可各自表示任选地被-O-、-S-或-NR<sup>5</sup>- (例如-NH-) 间隔的亚烷基链。优选的X和Y部分包括,例如-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-和-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-。

[0124] 在一些实施方式中,根据本发明的标记物可通过使2当量的合适的取代的二茂铁甲醛在合适的溶剂中在还原剂的存在下进行反应而制备。可通过选择合适的起始原料和/或合成方法的常规修改,来确定所需的标记物的结构,包括Z部分的结构。例如,在一个示例说明性方法中,二茂铁衍生物,例如1'-碘代二茂铁甲醛、1'-氯代二茂铁甲醛、1'-呋喃基二茂铁甲醛或2-叔丁基磺酰基二茂铁甲醛可与合适的胺(例如6-氨基己-1-醇、甘氨酸或(氨基乙氧基)乙醇)在合适的溶剂(例如THF)在还原剂(例如三乙酰氧基硼氢化钠)的存在下进行反应。当使用甘氨酸作为胺时,可进一步修改所得的双二茂铁基甘氨酸衍生物,以产生所需的结构。例如,其可与二氯甲烷中的草酰氯进行反应,随后用4-(羟基甲基)哌啶进行处理,以产生2-((二-二茂铁基甲基)氨基-1-(4-羟基甲基)哌啶-1-基)乙酮的二茂铁取代的衍生物。在另一个实施方式中,当使用甘氨酸作为胺时,所得的双二茂铁基甘氨酸衍生物可进一步与二氯甲烷中的草酰氯进行反应,随后用6-氨基己-1-醇进行处理,以产生N,N-2-(双二茂铁基甲基氨基)乙酰基-6-氨基己醇(也称为N-(6-羟基己基)-2-((双二茂铁基甲基)氨基)-乙酰胺)的二茂铁取代的衍生物。鉴于本文的公开内容,用于合成根据本发明的其它化合物的合适的方法对于本领域的技术人员来说将是明显的。

[0125] 与底物的连接可以通过任何合适的连接,通常通过与底物侧链的连接。通式I的化

合物中的连接基团R可以是适用于直接地或经由本文所述官能化基团实现与底物的连接的任何基团。有利但非必须地,R为包括氧原子的连接基团。R优选为羟基或受保护的羟基或含有羟基或受保护的羟基的基团。然而,应理解,可以根据使用中化合物将要连接的底物来选择任何其它合适的连接基团R。已经开发出多种合成方法,以用于蛋白质、肽或氨基酸侧链,或者蛋白质、肽或氨基酸端部的衍生。例如,蛋白质中的赖氨酸残基可以通过与琥珀酰亚胺酯的反应而进行衍生。对于在其它氨基酸残基处的衍生,可以使用其它已知的合成法。例如,可以使用马来酰亚胺试剂来使半胱氨酸残基衍生。可以使用N-羟基琥珀酰亚胺酯来使蛋白质或肽的氨基端或侧链氨基、或氨基酸的氨基部分衍生。

[0126] 用于核苷酸的合适衍生法也是熟知的,例如,使用亚磷酰胺部分。

[0127] 上述衍生法是可以用来将本发明化合物与底物连接的方法的示例,尽管可以使用其它方法。

[0128] 根据本发明的被标记底物可以通过根据本发明的化合物与底物(例如选自氨基酸、核苷酸(例如寡聚脱氧核糖核苷酸或寡聚核糖核苷酸)、核苷、糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸、碳水化合物及任意这些分子的衍生物)的反应来制备,任选地在官能化获得官能化标记化合物之后。

[0129] 在优选实施方式中,底物是核苷酸或寡核苷酸。核苷酸可以选自腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷或尿苷。优选地,核苷酸、或寡核苷酸的核苷酸经由例如在2'、3'、或5'位连接到核苷酸的核糖或脱氧核糖基团的基团,例如经由氧或氮原子而连接至标记物。最优选地,核苷酸在3'或5'位,例如在5'位连接。在其它位置的连接也是可行的。

[0130] 在核苷酸的情况下,连接本发明的标记物的一个有利方式是用亚磷酰胺进行官能化。亚磷酰胺基团与寡核苷酸的连接广泛地在寡核苷酸合成中实施,因此,用亚磷酰胺官能化的标记物与寡核苷酸连接的方法和条件是熟知的,且对于本领域技术人员是常规方式。此外,有利地允许使用标准寡聚制备法。

[0131] 根据本发明用于检定中的寡核苷酸有利地为核苷酸为2~50个的核苷酸,更优选核苷酸为2~40个,特别地核苷酸为15~35个,特别优选核苷酸为18~30个。对于一些应用,更短的寡核苷酸可以是有用的,例如,核苷酸为2~14个的寡核苷酸,更优选核苷酸为2~10个。

[0132] 例如经由半胱氨酸或赖氨酸而与蛋白质的连接,在一些情况中可通过将蛋白质和二茂铁基标记物一起在室温下在合适的缓冲溶液中孵育来完成。当标记物有利地连接至半胱氨酸或赖氨酸但是底物序列在合适的位置不包含半胱氨酸或赖氨酸时,如果需要的话,可以使序列突变,以添加一个或更多个半胱氨酸或赖氨酸残基,作为额外的残基或作为对另一个残基的取代。用于与蛋白质连接的可选方法可以包括标记物的生物素化以及商用链霉亲和素化蛋白质的使用(或反之亦然)。通过示例的方式,底物可以经任何标准技术而生物素化,例如通过使用市售的生物素化试剂盒。生物素化底物会与链霉亲和素或亲和素结合化合物例如抗体(其为商用且广泛可得)相结合。

[0133] 然而,对于本领域技术人员明显的是,可以通过使用合适的标记官能团,将相似的标记物在多个位置中所选的一个位置处与底物连接。

[0134] 在通式III的官能化标记化合物中:

[0135] A-L-F III

[0136] A-L优选为从通式I的化合物衍生而来的部分,且F是官能化基团。优选的通式III的官能化标记化合物包括通式IIIb的化合物:

[0137] A-O-F IIIb

[0138] 其中A-O是从通式I的化合物衍生而来的部分,当通式I的连接基团R是羟基或含羟基基团或是受保护的羟基时,优选通过羟基氢原子或保护基团的失去而衍生,且F是官能化基团。

[0139] 可以与本发明的标记物一起使用的适当官能化基团,包括为通式III和通式IIIb中的官能化基团F,其可以包括但不限于,琥珀酰亚胺酯基、亚磷酰胺基、马来酰亚胺基、生物素和叠氮基。然而,将意识到,可以使用促进标记化合物与将要被标记的底物的连接的任何官能化基团。

[0140] 本发明还提供检测样品中核酸(例如RNA或DNA)的方法,包括扩增核酸的任选步骤(例如通过PCR或另一核酸扩增技术),之后是在允许探针与扩增子(或核酸)之间的杂交的条件下使扩增子(或核酸)与互补核酸探针接触的步骤,之后是选择性地降解杂交的或未杂交的探针的步骤(例如,通过使用单链或双链特定核酸酶),其中所述探针用本发明的电化学生活性化合物进行标记,并且其中该方法提供对标记探针的化合物的电化学生活性进行测量的步骤,其中所述电化学生活性定量或定性地取决于探针降解的程度。

[0141] 本发明还提供使用本发明的电化学生活性化合物来检测抗体或衍生物(例如其可以与检定中的靶抗原结合)的方法,包括测量化合物的电化学生活性的步骤。该方法可定量或定性地进行的。

[0142] 本发明还提供在受试者中对疾病进行诊断或监测的方法,包括将本发明的方法用于检测受试者组织或体液中与所述疾病相关的蛋白酶或蛋白酶抑制剂。蛋白酶的底物可根据本发明进行标记。

[0143] 本发明还提供在受试者中对疾病进行诊断或维护的方法,包括使用本发明的方法来检测受试者组织或体液中与所述疾病相关的肽或蛋白质。

[0144] 本发明还提供在受试者中对疾病进行诊断或监测的方法,包括将本发明的方法用于检测受试者组织或体液中与所述疾病相关的核酸酶或核酸酶抑制剂。

[0145] 此外,本发明提供本发明方法在检测受试者的疾病中的用途。

[0146] 本发明还提供检测微生物(特别是病原体或其它不期望有机体例如食物腐败有机体)的方法,包括使用本发明所述的方法。来自微生物(或源自病原体,例如使用病原体中的靶核酸序列产生的核酸扩增子)的底物可根据本发明进行标记。对被标记底物的检测可用于指示微生物的检测。

[0147] 本发明还提供一种检定,包括使用本发明的被标记底物,任选地与其它检定组分例如样品容器、含有电化学生检测用电极的容器、用于检定的酶或标准品和对照组合在一起的步骤。所述检定可以使用多于一种的不同的本发明的被标记底物。如果是那种情况的话,不同的被标记底物的存在可以通过用具有不同电化学生特性(例如,不同的氧化电位)的本发明电化学生标记物对其标记而进行区别检测,从而使得检定是多重(例如双重)检定,其中,当不同的底物存在于同一样品容器中时,可以对其进行区分。本发明也包括单重检定。

[0148] 以下表1a列出根据本发明的化合物的某些示例说明的通式,其可以用作本发明电化学生检定中的标记物,且其可以用于制备本发明的官能化标记化合物和被标记底物。表1a

还在第二列中列出根据本发明的示例说明性的相应官能化标记化合物。表1b、2、3和4列出本发明进一步示例说明性化合物的通式。尽管并未示出与表1b、2、3和4中的化合物相应的官能化化合物,但应当理解,所示出的化合物可通过加入任何适合的官能化部分而官能化。在表1a、1b和2至4的通式中,除考虑针对其减少空间位阻外,每个二茂铁基可具有多于一个的取代基,其可为相同或不同的,且可在任何环位置上。两个二茂铁基优选在相同的位置具有相同的取代基,即两个二茂铁基是相同的。

[0149]

表 1a: 根据本发明的具有环戊二烯基环取代基的示例说明性实施方式

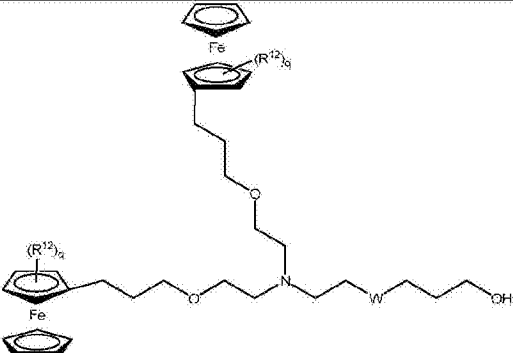
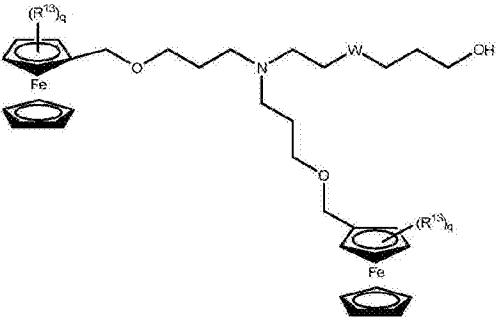
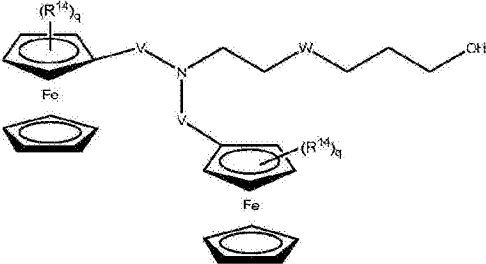
| 化合物的通式 | 通式-示例说明性的官能化标记物 | 符号标识                                                                                                                                                                |
|--------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      |                 | $R^{10}$ 表示选自含 S 基团、含 P 基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、 $CF_3$ 、杂芳基、取代的苯基的基团; q 表示 1 至 5, 例如 1; 且 W 表示 n 为 0 至 6 的 $(CH_2)_n$ 、O、S 或 $NR^{20}$ , 其中 $R^{20}$ 为烷基, 例如 C1 至 C4 烷基    |
| 2      |                 | $R^{11}$ 表示选自含 S 基团、含 P 基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、 $CF_3$ 、杂芳基、取代的苯基和氧基的基团; r 表示 1 至 5, 例如 1; 且 W 表示 n 为 0 至 6 的 $(CH_2)_n$ 、O、S 或 $NR^{20}$ , 其中 $R^{20}$ 为烷基, 例如 C1 至 C4 烷基 |

[0150]

|   |  |                                                                                                                                                                                                                                    |
|---|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 |  | <p>R<sup>12</sup>表示选自含S基团、含P基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、CF<sub>3</sub>、杂芳基、取代的苯基的基团；q表示1至5，例如1；且W表示n为0至6的(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、O、S或NR<sup>20</sup>，其中R<sup>20</sup>为烷基，例如C1至C4烷基</p>                                                    |
| 4 |  | <p>R<sup>13</sup>表示选自含S基团、含P基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、CF<sub>3</sub>、杂芳基、取代的苯基的基团；q表示1至5，例如1；且W表示n为0至6的(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、O、S或NR<sup>20</sup>，其中R<sup>20</sup>为烷基，例如C1至C4烷基</p>                                                    |
| 5 |  | <p>R<sup>14</sup>表示选自含S基团、含P基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、CF<sub>3</sub>、杂芳基、取代的苯基的基团；q表示1至5，例如1；W表示n为0至6的(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、O、S或NR<sup>20</sup>，其中R<sup>20</sup>为烷基，例如C1至C4烷基；且V表示任选地被O原子间隔的(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>，其中m表示2至6</p> |

[0151] 表1b:根据本发明的具有环戊二烯基环取代基的进一步示例说明性的实施方式

[0152]

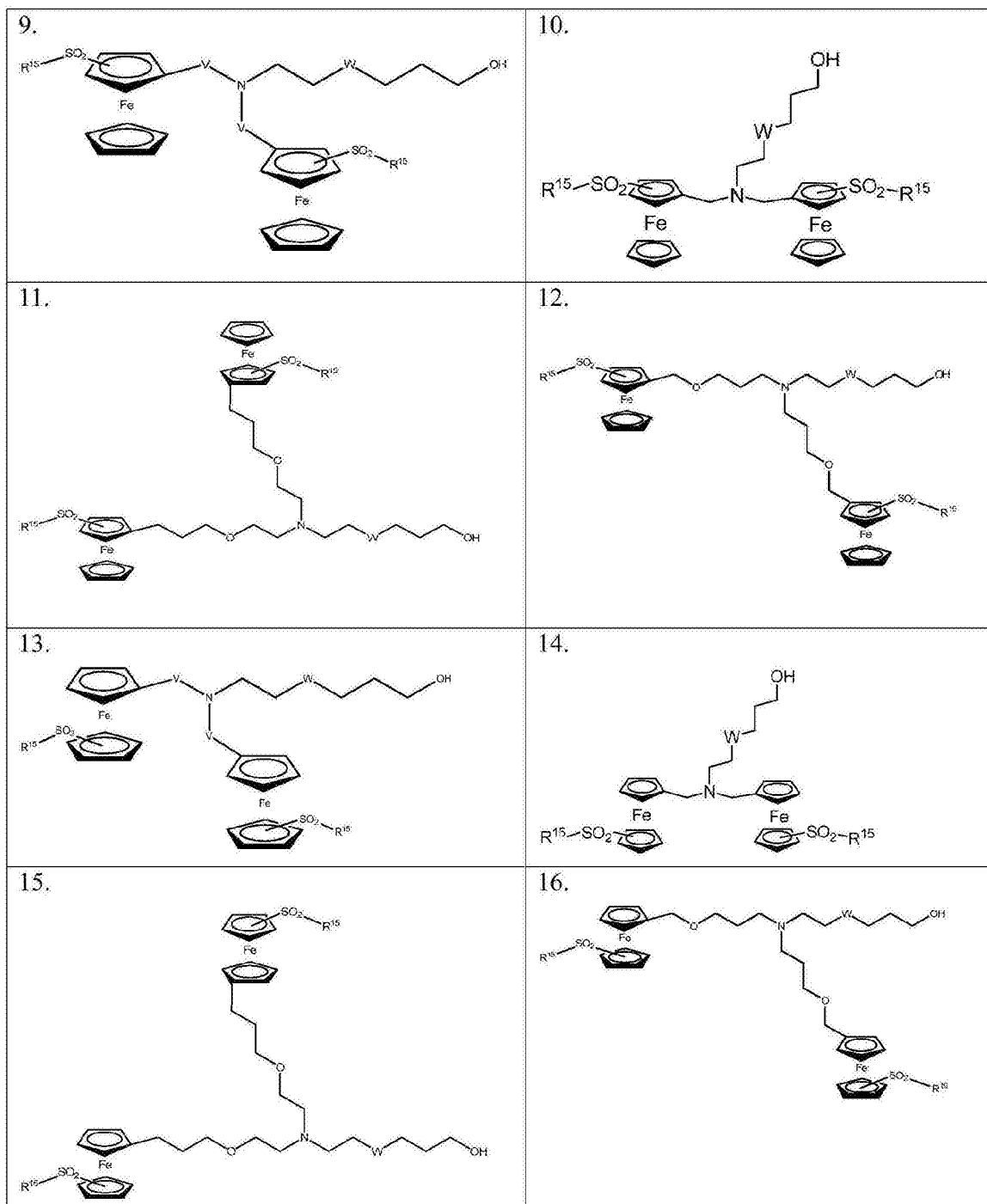
|   | 化合物的通式                                                                             | 符号标识                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6 |   | <p><math>R^{12}</math> 表示选自含 S 基团、含 P 基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、<math>CF_3</math>、杂芳基、取代的苯基、氰基的基团；q 表示 1 至 4，例如 1；且</p> <p>W 表示 n 为 0 至 6 的 <math>(CH_2)_n</math>、O、S 或 <math>NR^{20}</math>，其中 <math>R^{20}</math> 为烷基，例如 C1 至 C4 烷基</p>                                               |
| 7 |   | <p><math>R^{13}</math> 表示选自含 S 基团、含 P 基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、<math>CF_3</math>、杂芳基、取代的苯基、氰基的基团；q 表示 1 至 4，例如 1；且 W 表示 n 为 0 至 6 的 <math>(CH_2)_n</math>、O、S 或 <math>NR^{20}</math>，其中 <math>R^{20}</math> 为烷基，例如 C1 至 C4 烷基</p>                                                      |
| 8 |  | <p><math>R^{14}</math> 表示选自含 S 基团、含 P 基团、I、Cl、三烷基甲硅烷基、<math>CF_3</math>、杂芳基、取代的苯基、氰基的基团；q 表示 1 至 5，例如 1；W 表示 n 为 0 至 6 的 <math>(CH_2)_n</math>、O、S 或 <math>NR^{20}</math>，其中 <math>R^{20}</math> 为烷基，例如 C1 至 C4 烷基；且 V 表示任选地被 O 原子间隔的 <math>(CH_2)_m</math>，其中 m 表示 2 至 6</p> |

[0153] 以上的化合物6-8可通过任何合适的方法官能化，例如通过与上表1中示出的化合物1-5类似的磷酰胺化反应 (phosphoramidation) 官能化。

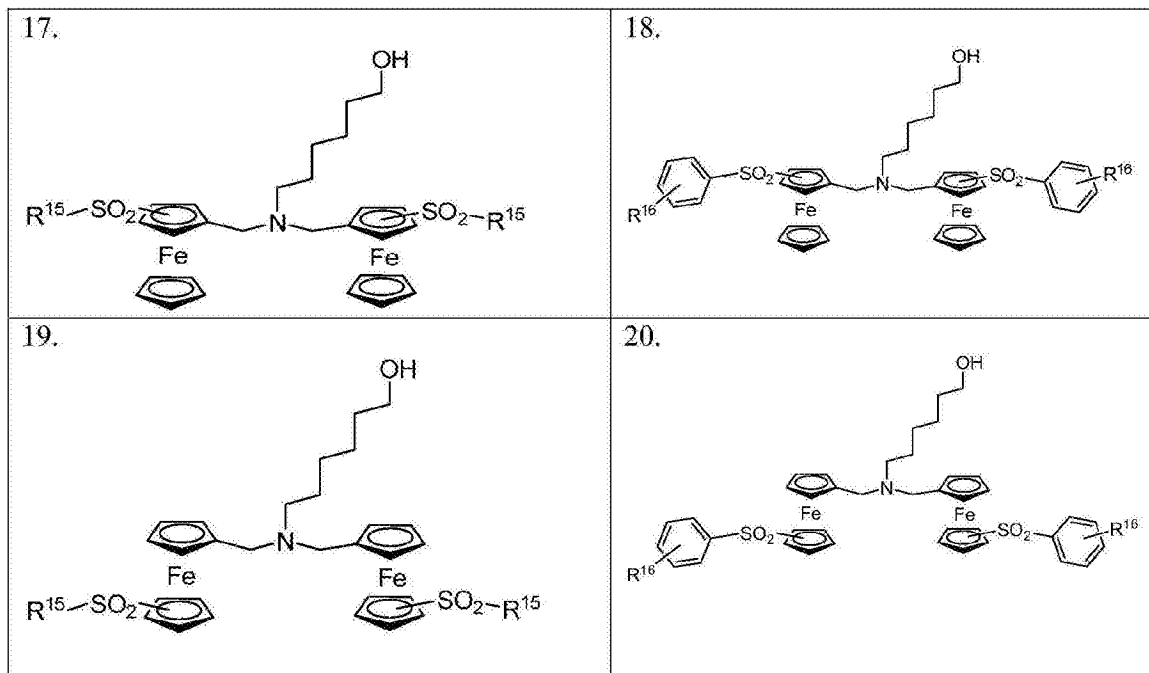
[0154] 在下表2中示出了描述本发明的某些优选实施方式的通式，其中每个二茂铁基被磺酰基取代。下表3中示出了描述本发明的某些优选实施方式的通式，其中每个二茂铁基被氧磷基取代。表2和表3中的化合物可各自通过任何合适的方法官能化，例如磷酰胺化反应。本发明包括在表1a、1b、2和3中定义的化合物的官能化类似物，以及由其衍生的被标记底物。

[0155] 表2: 磺酰基作为环戊二烯基环取代基的示例说明性实施方式

[0156]



[0157]

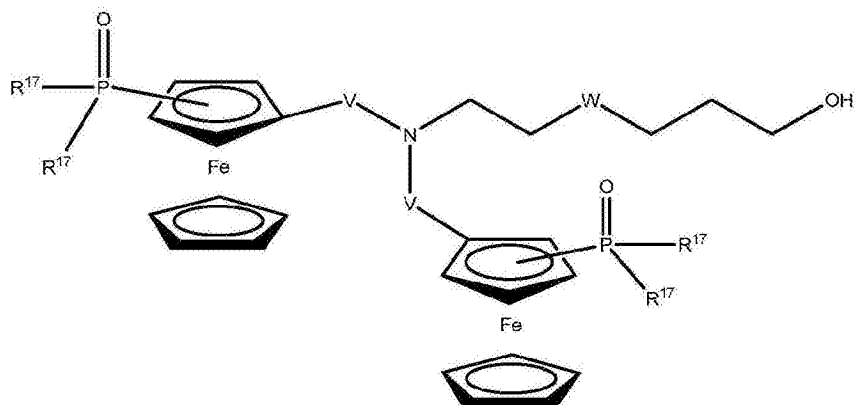


[0158] 其中在以上的式9~20中存在:

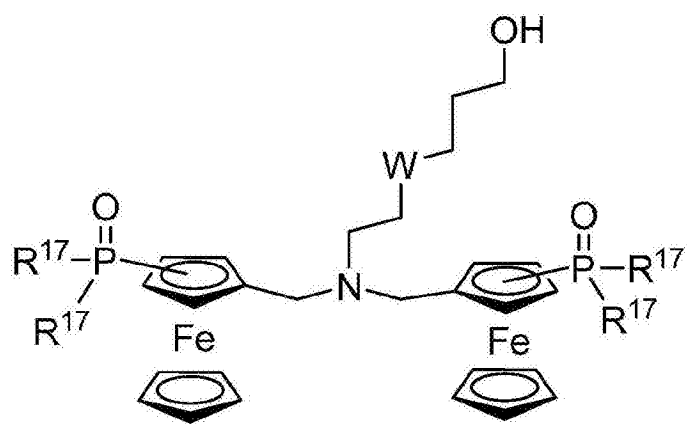
[0159]  $R^{15}$ 表示烷基,例如叔丁基、卤代烷基,尤其是氟烷基,例如 $CF_3$ 、苯基、或取代的苯基;[0160] W表示n为0至6的 $(CH_2)_n$ 、O、S或 $NR^{20}$ ,其中 $R^{20}$ 为烷基,例如C1至C4烷基;且[0161] 当存在时,V表示任选地被O原子间隔的 $(CH_2)_m$ ,其中m表示2至6;且[0162] 当存在时, $R^{16}$ 表示选自F、Cl、Br、I、烷基、 $NO_2$ 、氰基、 $CF_3$ 、和甲氧基的一个或多个基团。

[0163] 表3:氧磷基作为环戊二烯基环取代基的示例说明性实施方式

21.

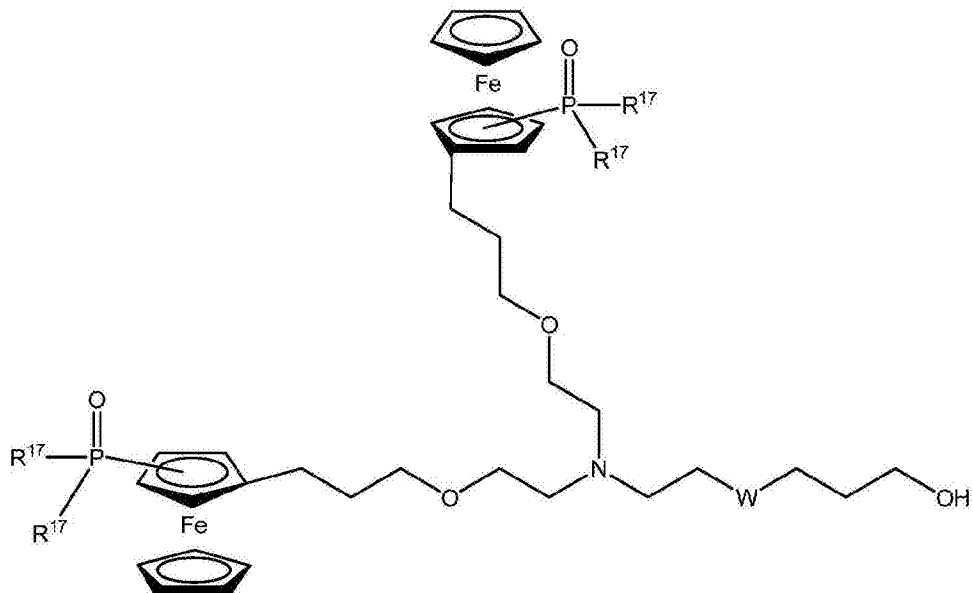


22.

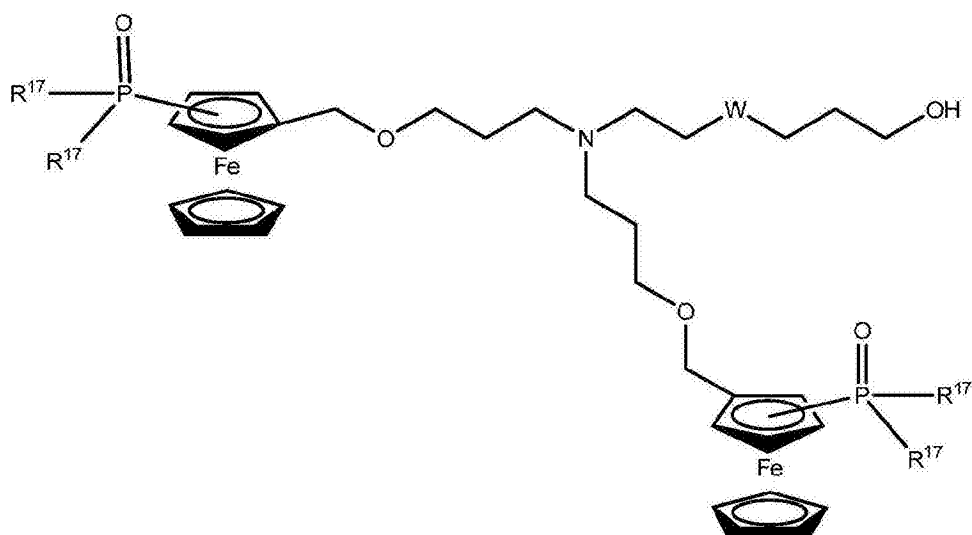


[0164]

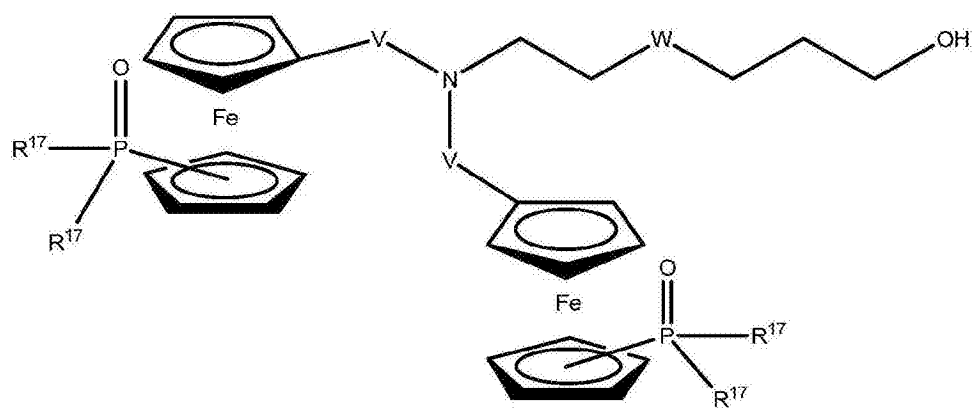
23.



24.

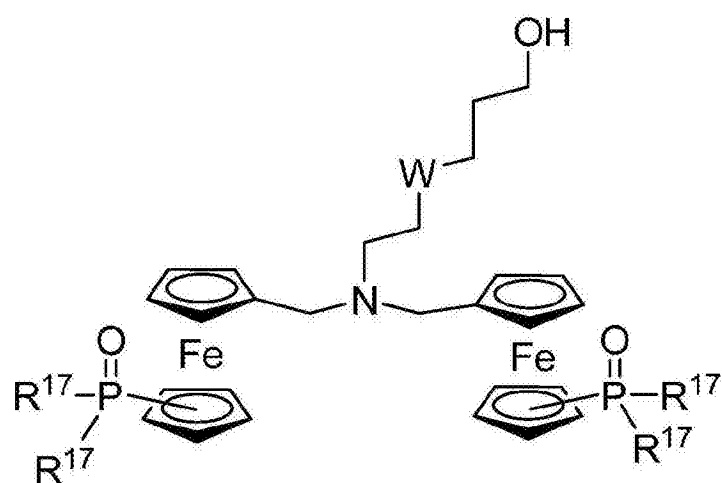


25.

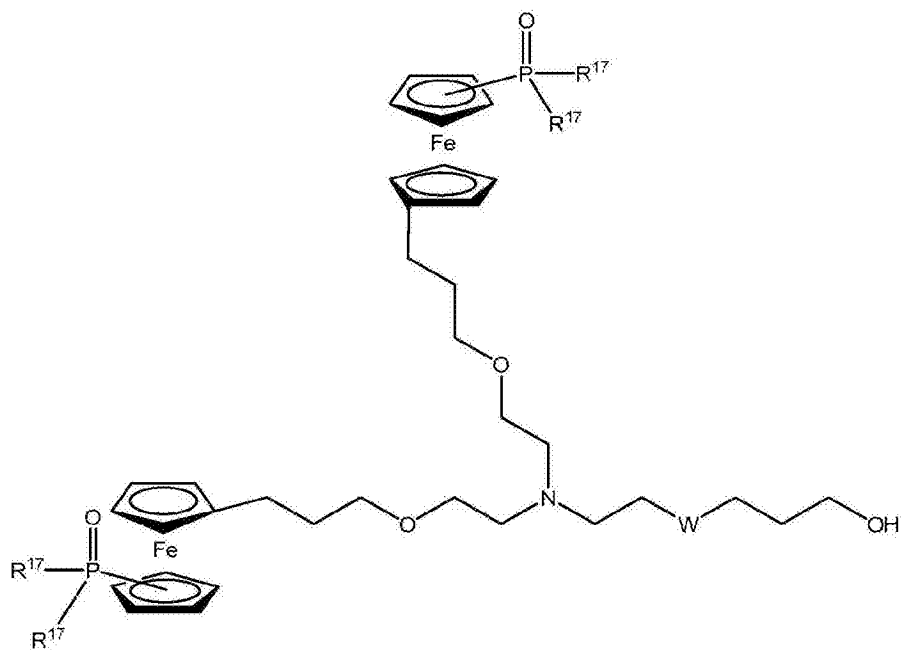


[0165]

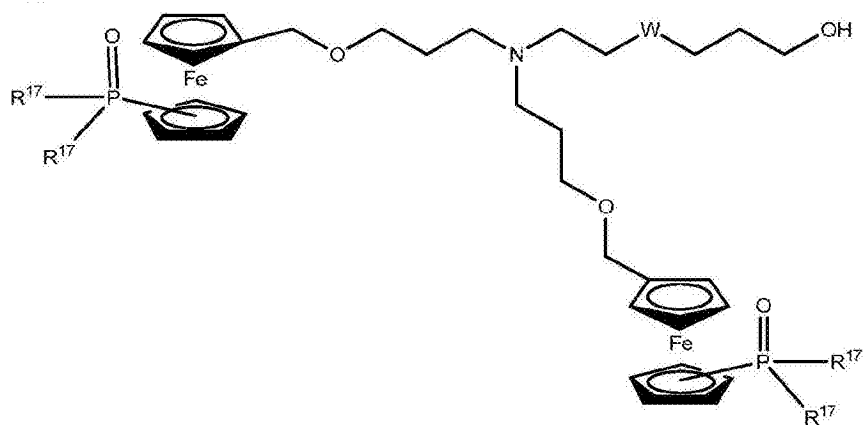
26.



27.

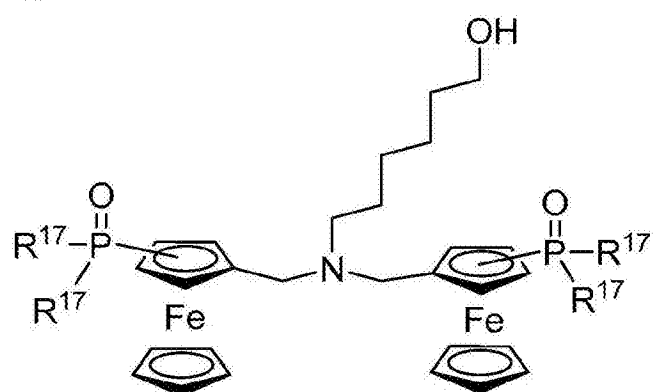


28.

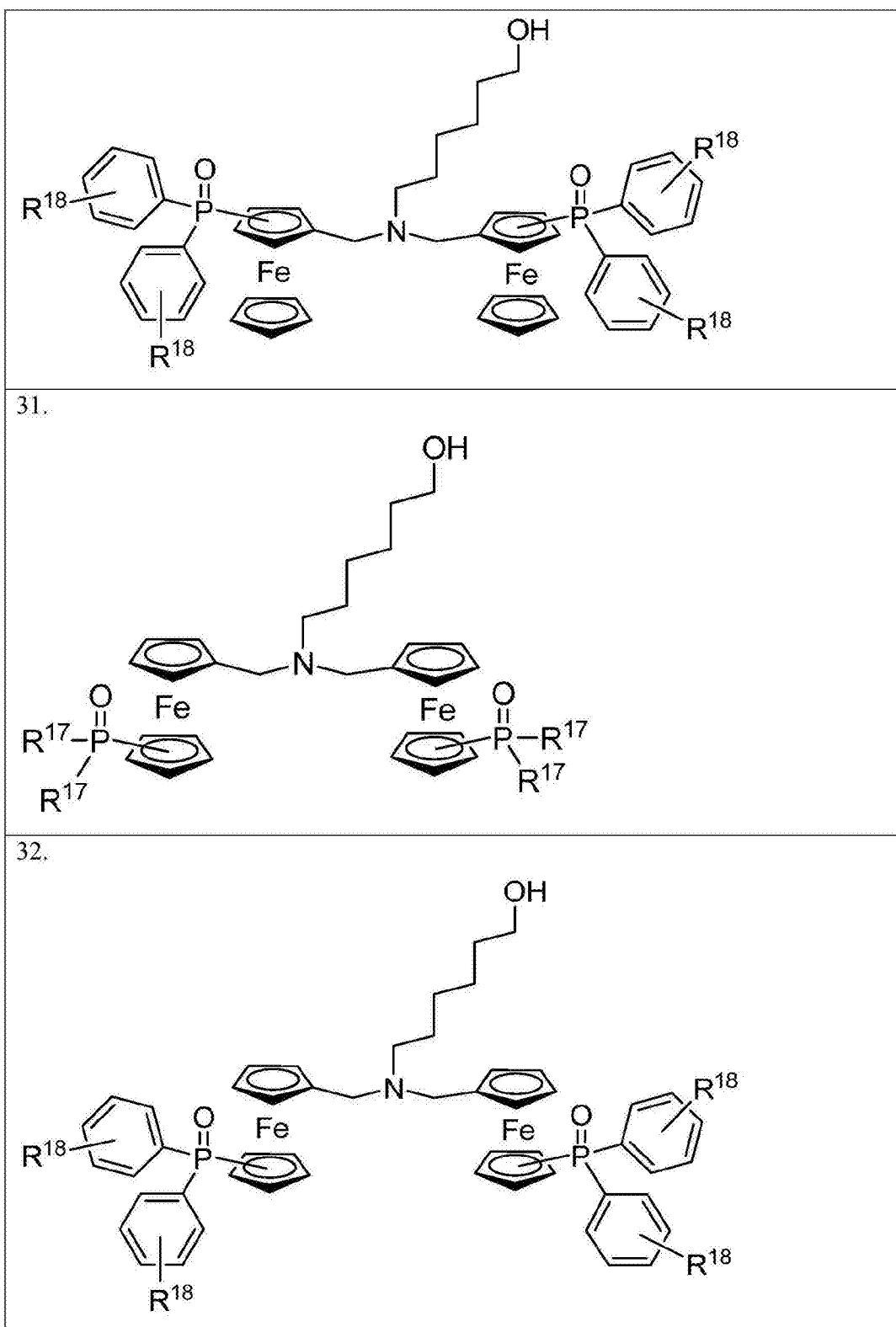


[0166]

29.



30.



[0168] 其中在以上各式21至32中存在：

[0169]  $R^{17}$ 表示烷基，例如叔丁基、苯基或取代苯基；

[0170] W表示n为0至6的 $(CH_2)_n$ 、O、S或 $NR^{20}$ ，其中 $R^{20}$ 为烷基，例如C1至C4烷基；

[0171] V表示任选地被0原子间隔的 $(CH_2)_m$ ，其中m表示2至6；且

[0172]  $R^{18}$ 表示选自F、Cl、Br、I、烷基、 $NO_2$ 、氰基、 $CF_3$ 、和甲氧基的一个或多个基团；在尤其

优选的实施方式中,  $R^{18}$  表示所述基团中的一个, 并位于4位。

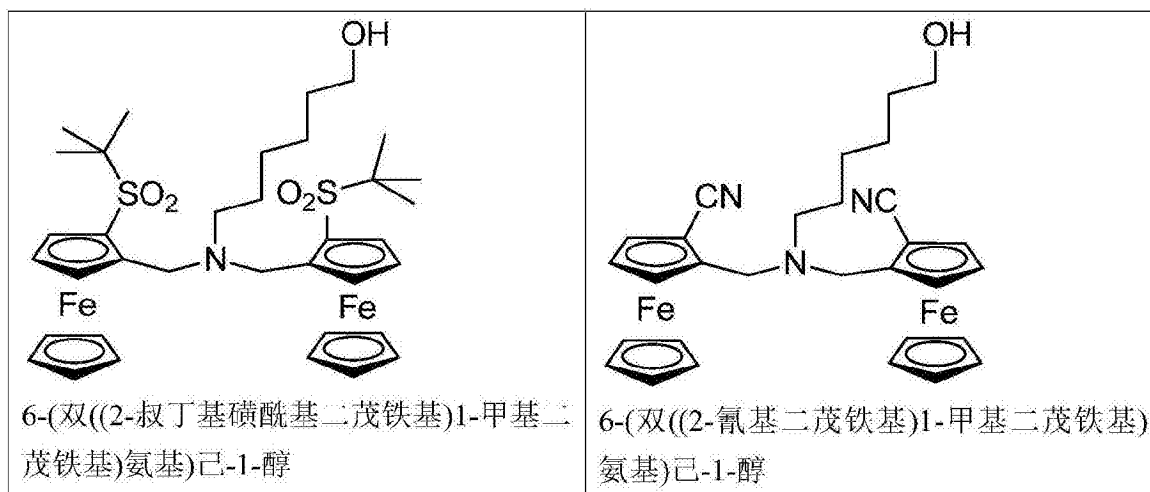
[0173] 在表1a、1b、2和3中的通式及其官能化的对应物中, 当一个或多个环取代基存在于各个二茂铁基的近侧戊二烯基环(即直接与分子的剩余部分键合的环)时, 优选在该键的近侧环位置处存在所述环取代基。当多于一个的环取代基存在于各个近侧戊二烯基环上时, 这些取代基可以相对于彼此在任意位置上。当多于一个的环取代基存在于各个二茂铁基的各个远侧戊二烯基环(即远离将二茂铁基连接到分子剩余部分的键的环)上时, 这些取代基可以相对于彼此在任意位置上。尽管在上表所示的化合物中在近侧或远侧环上显示出环取代基, 也可以使各个二茂铁基的两个戊二烯基环携带一个或多个取代基。

[0174] 如在本文的实施例中所说明的, 可在每个二茂铁基上引入一个或多个取代基(每个二茂铁基上的取代基相同)以获得具有改性的电化学特性的化合物, 从而通过合适的取代基选择, 提供一系列化合物, 可出于多重反应的目的从中选择两个或多个。

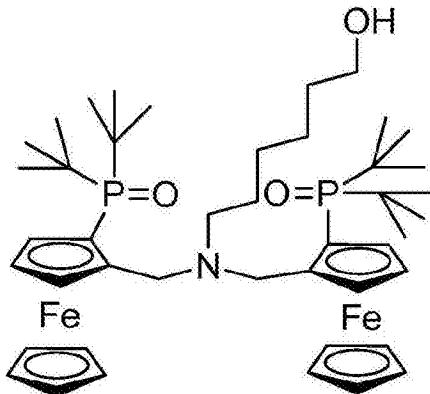
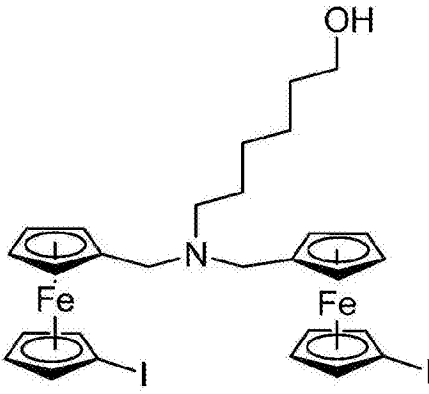
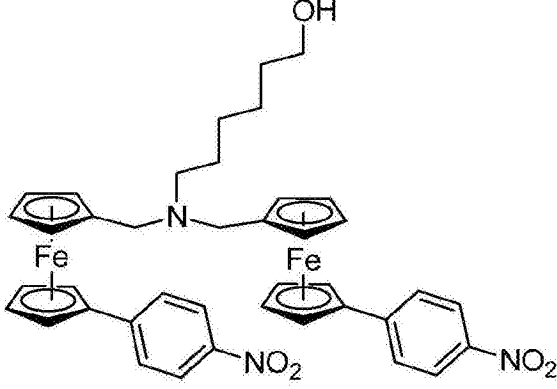
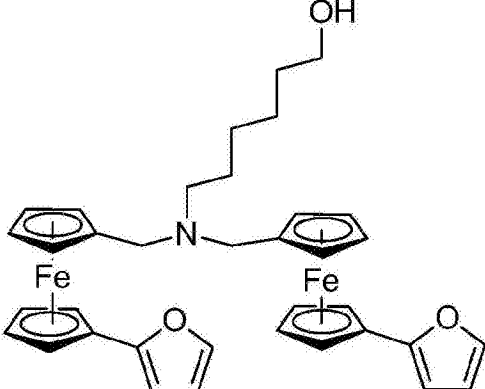
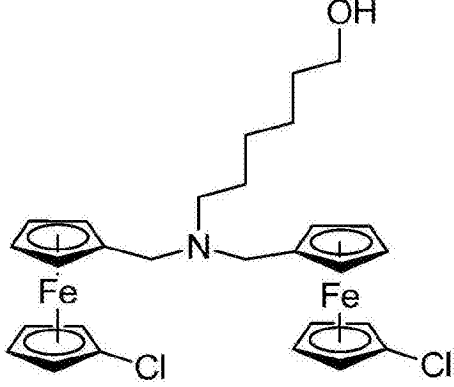
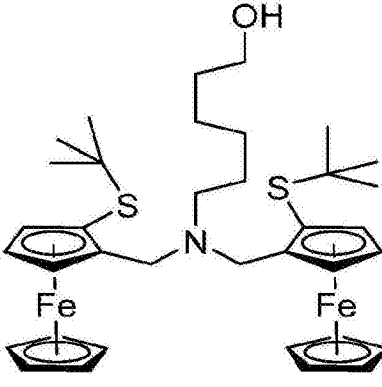
[0175] 在下表4中列出根据本发明的已被发现具有较好电化学特性的某些示例说明性化合物。除表4中的化合物之外, 本发明还包括官能化标记化合物和被标记底物, 其可衍生自根据本发明的这些化合物。

[0176] 表4: 根据本发明的示例说明性标记化合物

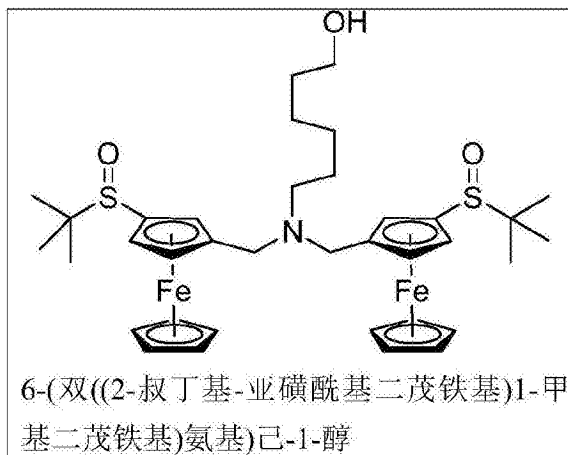
[0177]



[0178]

|                                                                                                                                    |                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>6-((2,2-二叔丁基-氧磷基)-1-甲基二茂铁基)氨基己-1-醇</p>        |  <p>6-((双((1'-碘二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇</p>        |
|  <p>6-((双((1'-(4-硝基苄基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇</p> |  <p>6-((双((1'-(1-呋喃基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇</p> |
|  <p>6-((双((1'-氯二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇</p>       |  <p>6-((双((2-叔丁基-硫基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇</p>  |

[0179]



[0180] 某些优选实施方式的详细说明

[0181] 以下的实施例说明了本发明的化合物,其中Fc和Fc' 是相同的:

[0182] 材料和方法

[0183] 使用Organometallics,2011,30,3504-3511中描述的方法,由碘代二茂铁合成1'-碘代二茂铁甲醛。

[0184] 使用根据Angewandte Chemie,2006,45,1282-1284而调整的方法,由1'-碘代二茂铁甲醛合成1'-呋喃基二茂铁甲醛。

[0185] 使用根据Organometallics,1985,7,1297-1302而调整的方法,由二甲基氨基甲基二茂铁合成1-[(二甲基氨基)甲基]-2-(二叔丁基氧膦基)-二茂铁。

[0186] 使用Coll.Czechoslovak.Chem.Comm.,1987,52,174-181中的步骤,由氯代二茂铁制备1'-氯代二茂铁甲醛。

[0187] 使用根据Organometallics,1985,7,1297-1302而调整的方法,由二甲基氨基甲基二茂铁合成2-叔丁基磺酰基二茂铁甲醛。

[0188] 从Sigma-Aldrich获得2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺。

[0189] 使用根据Journal of Organic Chemistry,1997,62,6733-6745而调整的方法,由(+/-)-4-(甲氧基甲基)-2-二茂铁基-1,3-二噁烷合成6-(双((2-甲酰基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。

[0190] 使用根据Journal of Organometallic Chemistry,2011,696,1536-1540而调整的方法,使用碘作为合适的亲电体,由二茂铁合成碘代二茂铁。

[0191] 使用根据J.Organomet.Chem.,1996,512,219-224修改的步骤,使用六氯乙烷作为氯化试剂,由二茂铁制备氯代二茂铁。

[0192] 从Sigma-Aldrich获得6-氨基己醇、二茂铁、二甲基氨基甲基二茂铁和4-硝基苯硼酸。

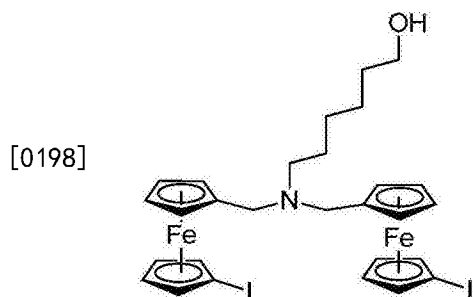
[0193] 使用Organomet.,1988,7,1297-1302的步骤制备1-[(二甲基氨基)甲基]-2-(叔丁基硫基)-二茂铁。

[0194] 根据Chem.Comm.,2004,598-599中描述的步骤制备3-叔丁基亚磺酰基二茂铁甲醛。

[0195] 电化学电势的测定

[0196] 使用电化学电池测量下文中提到的电化学电势值,该电化学电池包括100mM的氯化钠水溶液作为背景电解质,使用印刷碳工作电极、印刷碳对电极以及银/氯化银参比电极,全部使用银连接器(connector)。该电极为墨类(ink based),且丝网印刷于聚合物基质(例如Mylar)上,随后进行热固化。通过示例说明的方式,样品可如下制备:将二茂铁基标记物前体(2ng)溶解在DMSO(1mL)中。从该溶液中取出10 $\mu$ L的等分试样,之后在缓冲液(500 $\mu$ L)中进一步稀释。之后将等分试样(20 $\mu$ L)施加到丝网印刷电极,以进行电化学扫描。在W02012/085591中描述和图示出示例说明形式的合适电池。

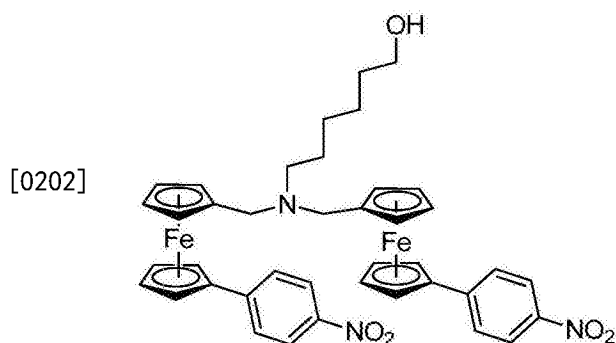
[0197] 实施例1:6-(双((1'-碘二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇的合成



[0199] 将1'-碘代二茂铁甲醛(259mg,0.76mmol)溶解于干THF(7cm<sup>3</sup>)中,并相继用6-氨基己-1-醇(44mg,0.38mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(313mg,1.91mmol)进行处理。使该溶液在室温下搅拌过夜。在此之后,通过加入NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(10cm<sup>3</sup>)淬灭反应。分离有机层,随后使用EtOAc(3 $\times$ 10cm<sup>3</sup>)反萃取水层。将合并的有机萃取物经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,然后真空浓缩,以得到橙色油状物。通过硅胶色谱纯化产物,用1:1(EtOAc:己烷)+1%NH<sub>3</sub>OH洗脱,以得到期望产物,其为橙色油状物,123mg,42%。<sup>1</sup>H NMR(300MHz;d<sub>6</sub>-苯) $\delta$ <sub>H</sub>:4.28(4H,t,J 1.8,FcH),4.14(4H,t,J 1.5,FcH),4.11(4H,t,J 1.5,FcH),4.06(4H,t,J 1.8,FcH),3.60(2H,t,J 6.6,CH<sub>2</sub>O),3.41(4H,s,FcCH<sub>2</sub>N),2.27(2H,t,J 7.4,NCH<sub>2</sub>),1.55-1.23(8H,m,CH<sub>2</sub>);<sup>13</sup>C NMR(75MHz;d<sub>6</sub>-苯) $\delta$ <sub>C</sub>:85.2,75.1,73.3,70.9,69.4,62.98,52.02,51.8,40.5,32.7,27.1,27.0,25.5;HRMS(ESI)C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NOFe<sub>2</sub>I<sub>2</sub>计算m/z765.9428,测得m/z765.9460。

[0200] 对电化学电势进行测量,得到442mV。

[0201] 实施例2:6-(双((1'-(4-硝基苯基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇的合成



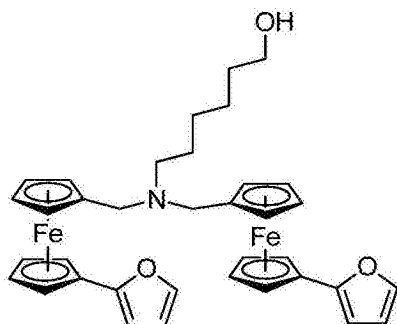
[0203] 向Schlenk管中加入4-硝基苯硼酸(39.6mg,0.23mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>-1.9mg,2mol%)、三环己基膦(1.4mg,4.8mol%)。将烧瓶密封,并排空和回充氩四次。随后,将1,4-二噁烷(2cm<sup>3</sup>)中的6-(双((1'-碘二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇(83mg,0.11mmol)加入烧瓶中,随后加入1.27M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(aq)(141 $\mu$ L,0.18mmol)。烧瓶随后

在100℃下加热过夜。在此之后,使反应冷却至室温,随后使用EtOAc (5cm<sup>3</sup>) 和H<sub>2</sub>O (5cm<sup>3</sup>) 进行稀释。分离有机层,随后使用EtOAc (3×5cm<sup>3</sup>) 反萃取水层。然后将合并的有机物用盐水(饱和)(10cm<sup>3</sup>) 洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,并真空浓缩以得到紫色固体。通过硅胶色谱纯化产物,用EtOAc+1%NH<sub>3</sub>OH洗脱,以得到期望产物,其为非晶形固体11mg,13%。<sup>1</sup>H NMR (300Mhz; d<sub>6</sub>-苯) δ<sub>H</sub>:8.05 (4H, app d, J 8.9, ArH), 7.08 (4H, app t, J 8.9, ArH), 4.39 (4H, t, J 1.8, FcH), 4.24 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.96 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.88 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.52 (2H, t, J 5.8, CH<sub>2</sub>OH), 3.01 (4H, s, CH<sub>2</sub>Fc), 2.28 (2H, t, J 6.9, NCH<sub>2</sub>), 1.50-1.26 (8H, m, CH<sub>2</sub>)。

[0204] 对电化学电势进行测量,得到437mV。

[0205] 实施例3:6-(双((1'-(1-呋喃基)二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇的合成

[0206]

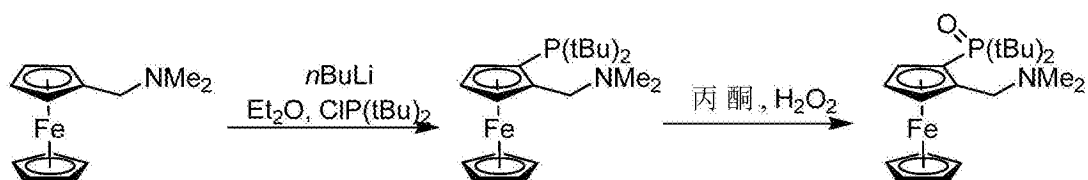


[0207] 将1'-(呋喃基)二茂铁甲醛(34mg, 0.12mmol)溶解在干THF (1cm<sup>3</sup>) 中,并相继用6-氨基己-1-醇(7mg, 0.06mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(49mg, 0.3mmol)进行处理。使该溶液在室温下搅拌过夜。在此之后,通过加入NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(5cm<sup>3</sup>)淬灭反应。分离有机层,随后使用EtOAc (3×5cm<sup>3</sup>) 反萃取水层。将合并的有机萃取物经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,然后真空浓缩,以得到橙色油状物。通过硅胶色谱纯化产物,用1:1 (EtOAc:己烷)+1%NH<sub>3</sub>OH洗脱,以得到期望产物,其为橙色油状物15mg,39%。<sup>1</sup>H NMR (300Mhz; d<sub>6</sub>-苯) δ<sub>H</sub>:7.26 (2H m, ArH), 6.25 (2H, dd, J 6.5, 1.8, ArH), 6.20 (2H, dd, J 6.5, 0.7, ArH), 4.61 (4H, t, J 1.9, FcH), 4.21 (4H, t, J 1.9, FcH), 4.12 (4H, t, J 1.9, FcH), 4.05 (4H, t, J 1.9, FcH), 3.44 (2H, t, J 6.3, CH<sub>2</sub>OH), 3.35 (4H, s, CH<sub>2</sub>Fc), 2.40 (2H, t, J 7.2, CH<sub>2</sub>N), 1.56-1.27 (8H, m, CH<sub>2</sub>), <sup>13</sup>C NMR (75Mhz; d<sub>6</sub>-苯) δ<sub>C</sub>:154.2, 141.6, 111.9, 104.4, 86.1, 77.8, 72.2, 69.6, 66.5, 63.03, 52.4, 33.5, 27.9, 27.63, 26.3, HRMS (ESI) C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>Fe<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>计算m/z 668.15264,测得m/z 668.1558。

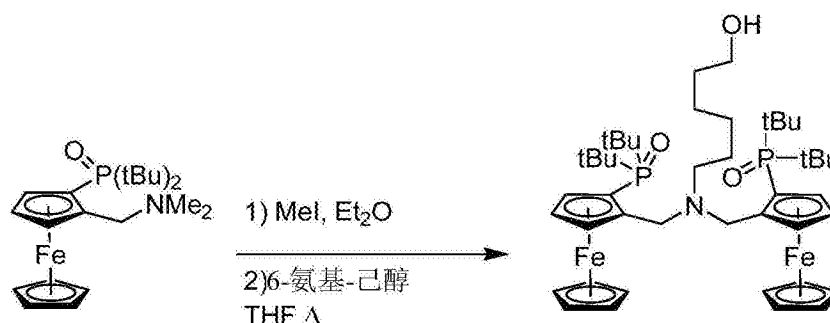
[0208] 对电化学电势进行测量,得到339mV。

[0209] 实施例4:6-(双((2-二叔丁基-氧磷基-二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇的合成

[0210] 如以下路线所示,合成6-(双((2-二叔丁基-氧磷基-二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。



[0211]



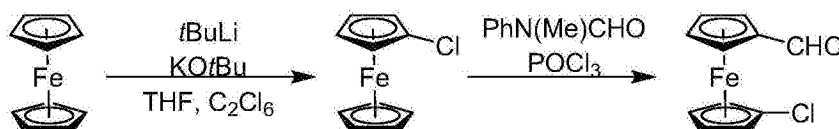
[0212] 向1-[(二甲基氨基)甲基]-2-(二叔丁基氧膦基)-二茂铁(145mg, 0.3mmol)在二乙醚(5cm<sup>3</sup>)中的溶液中加入甲基碘(111μl, 1.7mmol)。使橙色溶液在N<sub>2</sub>下在室温下搅拌1小时。然后真空浓缩所形成的橙色混悬液,以得到亮橙色固体。然后将亮橙色固体溶于干乙腈(3cm<sup>3</sup>)中,随后用6-氨基己-1-醇(17.5mg, 0.15mmol)进行处理。然后将烧瓶密封并回流加热18小时。在此之后,使暗橙色溶液冷却至室温。将反应在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5cm<sup>3</sup>)与NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(5cm<sup>3</sup>)之间分配,将有机层分离,然后使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,随后减压浓缩,以获得棕色油状物。使用基础氧化铝色谱,用2%MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>洗脱进行纯化,得到期望产物,其为橙色油状物(8mg, 收率7%)。

[0213] <sup>1</sup>H NMR (250MHz; d<sub>6</sub>-苯) δ<sub>H</sub>4.63 (2H, app s, FcH), 4.14 (12H, s, FcH), 3.85 (6H, br s, FcH+FcNCH<sub>2</sub>), 3.55 (2H, app s, OCH<sub>2</sub>), 2.45 (2H, app s, CH<sub>2</sub>N), 1.47-0.95 (44H, m, tBu+CH<sub>2</sub>), <sup>31</sup>P NMR (121MHz; d<sub>6</sub>-苯) δ<sub>P</sub>61.3, HRMS (ESI μTOF) C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Fe<sub>2</sub>P<sub>2</sub>计算m/z 834.3529, 测得m/z 834.3603。

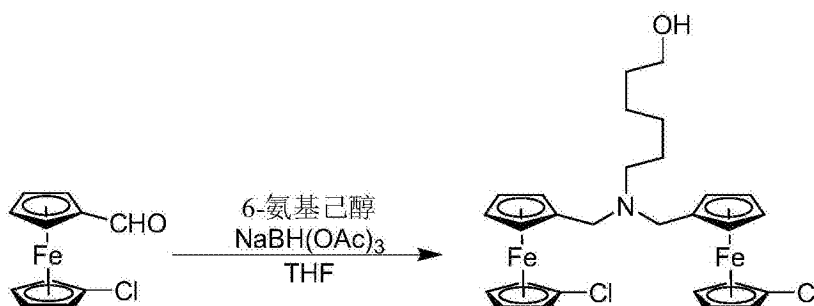
[0214] 对电化学电势(DPV)进行测量,得到512mV。

[0215] 实施例5: 6-(双((1'-氯二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇

[0216] 如下路线所示,合成6-(双((1'-氯二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。



[0217]



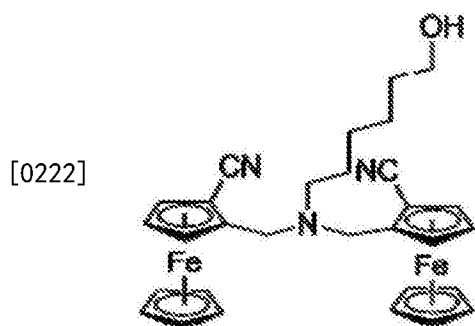
[0218] 将1'-氯代二茂铁甲醛(1.35g, 5.44mmol)溶解在干THF(50cm<sup>3</sup>)中,并相继用6-氨基己-1-醇(318mg, 2.72mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(1.11g, 6.80mmol)进行处理。使该溶液在室温下搅拌过夜。在此之后,通过加入NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(30cm<sup>3</sup>)淬灭反应。分离有机层,随

后使用EtOAc ( $3 \times 30\text{cm}^3$ ) 反萃取水层。将合并的有机萃取物经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,然后真空浓缩,以得到橙色油状物。通过硅胶色谱纯化产物,用1:1 (EtOAc:己烷)+1% NH<sub>3</sub>OH洗脱,以得到期望产物,其为橙色油状物892mg,56%。

[0219] <sup>1</sup>H NMR (300MHz; d<sub>6</sub>-苯)  $\delta_{\text{H}}$  4.18 (4H, t, J 1.6, FcH), 4.14 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.98 (4H, t, J 1.6, FcH), 3.65 (4H, t, J 1.8, FcH), 3.65 (4H, s, NCH<sub>2</sub>, FcCH<sub>2</sub>N), 3.34 (2H, t, J 6.3, OCH<sub>2</sub>), 2.41 (2H, t, J 7.0, NCH<sub>2</sub>), 1.55–1.23 (8H, m, CH<sub>2</sub>), <sup>13</sup>C NMR (75MHz; d<sub>6</sub>-苯)  $\delta_{\text{C}}$  93.4, 86.6, 72.9, 70.6, 69.1, 68.1, 67.3, 63.0, 52.8, 33.6, 28.1, 27.7, 26.3, HRMS (ESI-TOF) C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NOFe<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 计算m/z 582.0716, 测得m/z 582.0722,

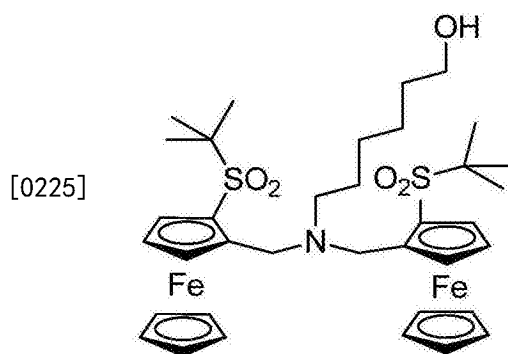
[0220] 对电化学电势 (DPV) 进行测量,得到452mV。

[0221] 实施例6:6-(双((2-氰基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇



[0223] 将6-(双((2-甲酰基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇 (1eq) 溶解于乙醇中,并用盐酸羟胺 (5eq) 和乙酸钠 (5eq) 进行处理。随后将所得的混悬液回流加热18小时。在此之后,使反应冷却至室温,并真空浓缩。然后将固体残余物在氯仿与NaHCO<sub>3</sub> (饱和) 之间分配。分离有机层,并将其使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩以得到相应的肟 (oxime)。然后将肟溶于干THF中,并用(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐 (BOP-2eq) 进行处理并搅拌5分钟。随后加入1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯 (2.3eq)。随后将溶液搅拌90分钟。随后将反应应用EtOAc稀释,并用水和盐水 (饱和) 洗涤。将有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,然后真空浓缩。

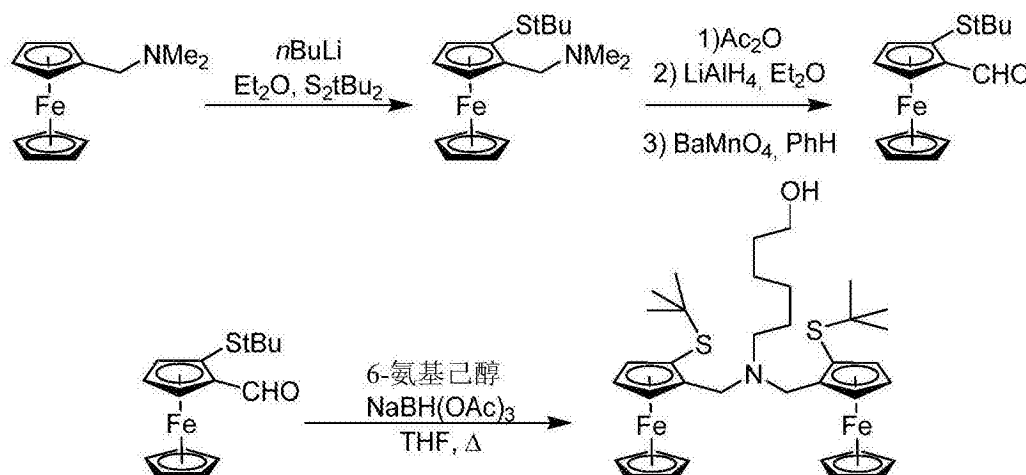
[0224] 实施例7:6-(双((2-叔丁基-磺酰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇



[0226] 将2-叔丁基-磺酰基二茂铁甲醛 (1eq) 溶解于干THF中,然后用6-氨基己-1-醇 (0.5eq) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (2.5eq) 进行处理。使溶液在室温下搅拌过夜。在此之后,通过加入NaHCO<sub>3</sub> (饱和) 淬灭反应。分离有机层,随后使用EtOAc反萃取水层。将合并的有机萃取物经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,然后真空浓缩。

[0227] 实施例8:6-(双((2-叔丁基-硫基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇

[0228] 如以下路线所示,合成6-(双((2-叔丁基-硫基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。



[0229]

[0230] 将1-[(二甲基氨基)甲基]-2-(叔丁基硫基)-二茂铁(1.21g, 3.49mmol)溶解于乙酸酐(10cm<sup>3</sup>)中。然后将棕色溶液回流1小时,此时的TLC指示出起始原始的完全消耗。使溶液冷却至室温,然后真空浓缩至原始体积的约90%。随后将所得的棕色油状物溶于EtOAc(25cm<sup>3</sup>)中,并用NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(20cm<sup>3</sup>)和盐水(饱和)(20cm<sup>3</sup>)洗涤。然后将棕色溶液经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩以得到期望的乙酰氧基酯,其为橙色/棕色油(1.12g, 93%),并不需要进一步的纯化。

[0231] <sup>1</sup>H NMR(250MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ5.37(2H, d, J=1.43Hz), 4.51(1H, dd, J=2.6, 1.4), 4.44(1H, dd, J=2.6, 1.4), 4.07(1H, t, J=2.6), 4.07(5H, s), 1.82(s, 3H), 1.33(9H, s)。

[0232] 在0℃向氢化铝锂(369mg, 9.71mmol)于Et<sub>2</sub>O(15cm<sup>3</sup>)中的混悬液中通过注射器逐滴加入乙酰氧基酯(1.12g, 3.23mmol)。在结束添加后,使浆料温热至室温,并搅拌30分钟。在此之后,使烧瓶冷却至0℃,然后通过依次加入H<sub>2</sub>O(369μl)、然后15%NaOH(aq)(369μl)和H<sub>2</sub>O(1.1cm<sup>3</sup>)而淬灭。然后使混悬液温热至室温,搅拌10分钟,过滤并真空浓缩至期望产物,其为橙色固体(790mg, 80%),不需要进一步的纯化。

[0233] <sup>1</sup>H NMR(250MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ4.64(2H, s), 4.41(1H, dd, J=2.4, 1.5Hz), 4.32(1H, dd, J=2.4, 1.5Hz), 4.17(5H, s), 4.08(1H, t, J=2.6Hz), 1.28(9H, s)。

[0234] 将1-叔丁基硫基-2-羟基甲基二茂铁(304mg, 1mmol)和锰酸钡(1.02g, 4mmol)置于一个Schlenk管中,密封烧瓶,然后排空并回充氩四次,最终置于氩氛中。然后对烧瓶装载苯(15cm<sup>3</sup>),并使浆料在室温搅拌过夜。然后将浆料通过硅藻土(celite)过滤,并使用Et<sub>2</sub>O洗涤,直至洗涤液变为透明。将橙色溶液真空浓缩以得到期望产物,其为红色油状物(239mg, 79%),不需要进一步的纯化。

[0235] <sup>1</sup>H NMR(250MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ10.69(1H, s), 5.08(1H, dd, J=2.5, 1.3Hz), 4.47(1H, dd, J=2.5, 1.3Hz), 4.27(1H, t, J=2.5Hz), 4.13(5H, s), 1.17(9H, s)。

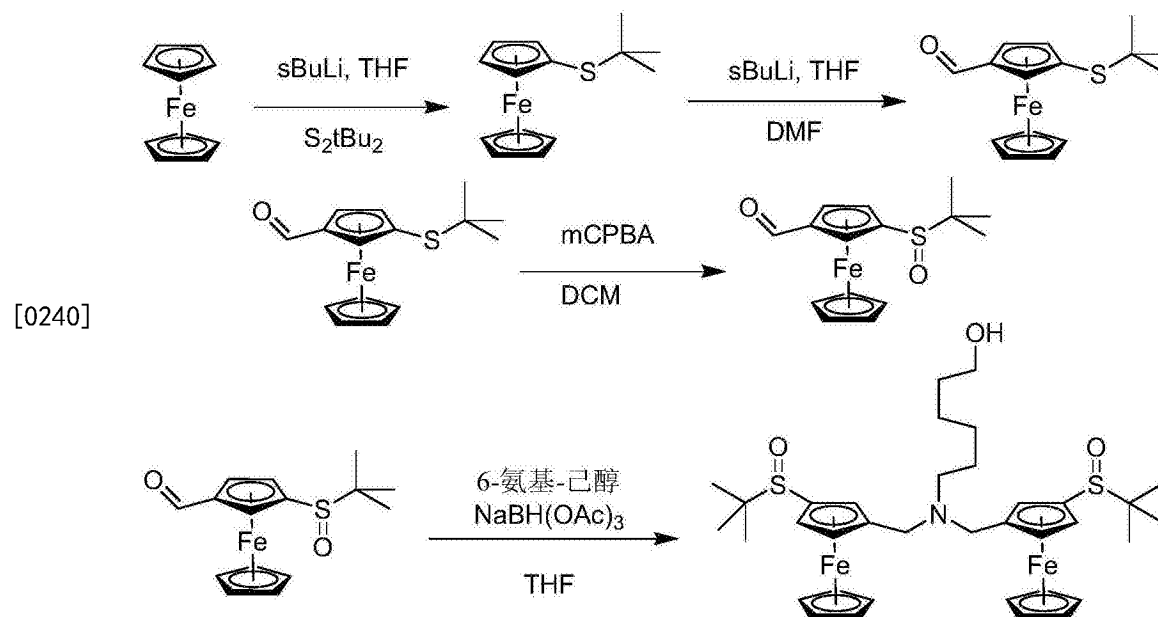
[0236] 将2-叔丁基硫基-二茂铁甲醛(237mg, 0.78mmol)与6-氨基-己醇(46mg, 0.39mmol)置于圆底烧瓶中,并溶解于干THF(5cm<sup>3</sup>)。然后将混悬液用三乙酰氧基硼氢化钠(322mg, 1.96mmol)进行处理。对烧瓶装配冷凝器,并回流过夜。在此之后,使烧瓶冷却至室温。通过加入NaHCO<sub>3</sub>(饱和)(10cm<sup>3</sup>)淬灭反应。分离有机物并使用EtOAc(3×5cm<sup>3</sup>)反萃取水层。将合并的有机物使用盐水(饱和)(10cm<sup>3</sup>)洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩以获得棕色油状

物。通过硅胶色谱纯化,用50%EtOAc:nHex+2%TEA洗脱,得到期望产物,其为橙色油状物(18mg,7%)。

[0237]  $^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  4.52 (2H, app s), 4.19-4.15 (14H, m), 3.91 (4H, s), 3.54 (2H, t,  $J=7.3$ ), 2.64 (2H, t,  $J=7.3$ ), 1.69-1.43 (26H, m);  $m/z$  (ESI $\mu$ TOF,  $M+H$ )  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{NOS}_2\text{Fe}_2$  计算 $m/z$  690.2143,测得 $m/z$  690.2158。电化学电势 (DPV) 369mV。

[0238] 实施例9:6-(双((2-叔丁基-亚磺酰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇

[0239] 如以下路线所示,合成6-(双((2-叔丁基-亚磺酰基二茂铁基)1-甲基二茂铁基)氨基)己-1-醇。

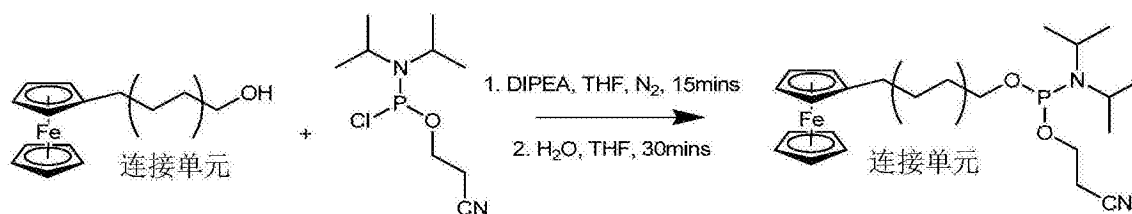


[0241] 将3-叔丁基亚磺酰基二茂铁甲醛(26.5mg, 0.083mmol)溶解于干THF(1cm<sup>3</sup>)中,并用6-氨基-己-1-醇(4.8mg, 0.041mmol)进行处理。将棕色溶液搅拌10分钟,随后以一份加入三乙酰氧基硼氢化钠(34mg, 0.2mmol)。然后将棕色混悬液在室温搅拌过夜。在此之后,将材料真空浓缩以得到棕色固体。通过硅胶色谱纯化,用2.5%MeOH: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ +2% $\text{NH}_3\text{OH}$ 洗脱,得到期望产物,其为黄色油状物(4mg, 14%)。

[0242]  $^1\text{H}$  NMR (250MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  5.12 (2H, app s), 4.92 (2H, app s), 4.39 (14H, m), 4.22 (4H, s), 3.69 (2H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 2.45 (2H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 1.50-1.18 (26H, m),  $m/z$  (ESI $\mu$ TOF,  $M+H$ )  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Fe}_2$  计算 $m/z$  722.2087,测得 $m/z$  722.2089;电化学电势 (DPV) 为532mV。

[0243] 实施例10:用于连接亚磷酸胺官能团的一般合成步骤

[0244]



[0245] 作为以上反应路线中的起始原料所示的二茂铁基衍生物是示例说明性的,并可以替换为摩尔当量的任何在以上实施例1~9中制备的化合物。

[0246] 在氮氛下,将N,N-二异丙基乙胺(0.4mL, 8.4mmol)添加到二茂铁衍生物(2.1mmol)

于干THF (25mL) 的搅拌溶液中。逐滴加入2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺 (0.2ml, 3.15mmol), 并搅拌所得混合物15分钟。加入MilliQ过滤水 (200mL), 并再搅拌溶液30分钟。加入乙酸乙酯-三乙胺 (1:1, 25mL), 形成沉淀物。用饱和NaHCO<sub>3</sub> (25mL) 和MilliQ过滤水 (25mL) 洗涤混合物。经MgSO<sub>4</sub>干燥有机部分, 并在真空下除去溶剂。之后, 通过硅胶色谱 (石油醚: 乙酸乙酯9:1) 来纯化粗产物。

[0247] 实施例11: 标记物结合至蛋白质

[0248] 通过将本发明的标记物与例如肽中的赖氨酸残基的游离胺连接, 将该标记物连接至肽。可通过常规的技术, 包括将标记化合物官能化以形成活性NHS酯, 并使官能化的酯与肽的游离胺基团进行反应, 来完成连接。

[0249] 实施例12: 标记物结合至微粒

[0250] 将生物素分子结合至标记物 (例如在实施例1至9中任一例中所制造的标记物)。可以在自动寡核苷酸合成器中或使用标准的实验室条件, 通过二茂铁基亚磷酰胺标记物与生物素的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯的反应来执行生物素化。

[0251] 将顺磁性链霉亲和素颗粒洗涤×3 (磷酸盐缓冲液) 并与生物素化标记物混合, 之后在室温下, 伴随着混合而孵育1小时。将颗粒洗涤×2 (磷酸盐缓冲液) 并洗涤×1 (PCR缓冲液)。将其重悬在最终缓冲液中 (PCR缓冲液)。在各个洗涤步骤之后, 测试上清液的电化学信号, 并且如果需要的话, 重复洗涤直至上清液显示出没有游离电化学标记物的迹象。

[0252] 使用颗粒的磁性捕获和在一系列缓冲液体积中的重悬, 在一定浓度范围检定这些颗粒, 以证实所观察到的电化学信号归因于与磁颗粒结合的标记物。

[0253] 在下表5中, 列出实施例1至5、8和9中制备的化合物的电极电势, 以及与N,N-双二茂铁基甲基-6-氨基己醇 (二茂铁基未被取代的化合物) 的比较值。在W02012/085591中公开了用于合成N,N-2双二茂铁基甲基-6-氨基己醇的方法。

[0254] 表5: 二茂铁基部分上的取代基对电极电势的效应

[0255]

| 实施例 | Fc取代基       | 电极电势  |
|-----|-------------|-------|
| A   | 无           | 275mV |
| 1   | 1'-碘        | 442mV |
| 2   | 1'-(4-硝基苯基) | 437mV |
| 3   | 1'-呋喃基      | 339mV |
| 4   | 2-二叔丁基氧膦基   | 512mV |
| 5   | 1'-氯        | 452mV |
| 8   | 2-叔丁基-硫基    | 369mV |
| 9   | 2-叔丁基-亚磺酰基  | 532mV |

[0256] 上表中的数据表明, 实施例1至5、8和9的化合物提供了有用的电化学活性标记物。可使用这些标记物来提供在所需范围值内的电化学信号。它们可用作具有类似电势值的其它标记化合物的替代标记物, 例如在所述其它标记化合物在所讨论的检定中具有不利性质, 例如与杂质不相容或与检定中存在的其它组分不相容或与测量条件不相容 (其中的任一项可影响测量灵敏度) 的情况下。以及或替代的, 其可在多重检定中与一种或多种其它标记物一起使用, 在该多重检定中存在多于一种标记物, 以在单个样品中提供两种或多种测

定。在这些情况下使用具有不同电化学特性的两种或多种标记物,允许了与各个待测物相关的测量之间的有效区分。