



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 511**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/52** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **03813810 .3**  
86 Fecha de presentación : **19.12.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1579210**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **Sensores colorimétricos contruidos de materiales de diacetileno.**

30 Prioridad: **19.12.2002 US 325801**  
**16.12.2003 US 738573**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

73 Titular/es: **3M Innovative Properties Company**  
**3M Center, P.O. Box 33427**  
**St. Paul, Minnesota 55133-3427, US**

72 Inventor/es: **Prince, Ryan, B.;**  
**Hays, David, S.;**  
**Dillow, Angela, K.;**  
**Brown, Randall, P.;**  
**Bommarito, G., Marco y**  
**Battiste, John, L.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**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

Sensores colorimétricos contruidos de materiales de diacetileno.

La presente invención se refiere a una técnica para la detección de analitos usando cambios espectrales perceptibles en montajes de polidiacetileno. Más específicamente, esta invención se refiere a un sensor colorimétrico que comprende montajes de polidiacetileno y un método para usar el sensor para detectar un analito.

Los diacetilenos son típicamente incoloros y experimentan polimerización por adición, bien térmicamente o por radiación actínica. A medida que transcurre la polimerización, estos compuestos experimentan un cambio de color de contraste a azul o púrpura. Cuando se exponen a estímulos externos tales como calor, tensión física o un cambio de disolventes o contraiones, los polidiacetilenos presentan un cambio de color adicional producido por la distorsión de la conformación de la cadena principal planar. Se sabe que los montajes de polidiacetileno cambian de color de azul a rojo con un incremento de la temperatura o cambios en el pH debido a cambios conformacionales en la cadena principal conjugada como se describe en Mino, *et al.*, *Langmuir*, Vol. 8, pág. 594, 1.992; Chance, *et al.*, *Journal of Chemistry and Physics*, Vol. 71, 206, 1.979; Shibutag, *Thin Solid Films*, Vol. 179, pág. 433, 1.989; Kaneko, *et al.*, *Thin Solid Films*, Vol. 210, 548, 1.992 y la patente de EE.UU. N°. 5.672.465. Se conoce la utilización de esta clase de compuestos para su uso como indicadores biocrómicos como se discute en la patente de EE.UU. N°. 5.622.872 y la publicación de patente internacional WO 02/00920.

Las aplicaciones propuestas de los polidiacetilenos para la detección de analitos se discuten en las patentes de EE.UU. Nos. 6.395.561 B1; 6.306.598 B1; 6.277.652; 6.183.722; 6.080.423 y la publicación de patente internacional WO 01/71317. En particular, se han hecho intentos para construir biosensores con receptores que reaccionen específicamente con bacterias patógenas, virus, toxinas y similares, incorporados en membranas de polidiacetileno y se induce el cambio de color (azul a rojo) cuando los receptores se unen a sus analitos específicos (bacterias patógenas, virus, toxinas, etc.) Dichos métodos requieren que sea conocida la estructura de unión del receptor y el analito e identificado el receptor. La síntesis de tanto los receptores como las membranas de polidiacetileno puede ser complicada y difícil.

Las membranas de polidiacetileno pueden presentar insuficiente cambio de color en la unión con un analito, requiriendo otras sustancias para fomentar el cambio estructural o mejorar el equipo analítico para observar el cambio de color.

S. Kolusheva, *et al.* describen en *Nature* **2.000**, 18, 225-227, un análisis colorimétrico para la investigación rápida de péptidos antimicrobianos.

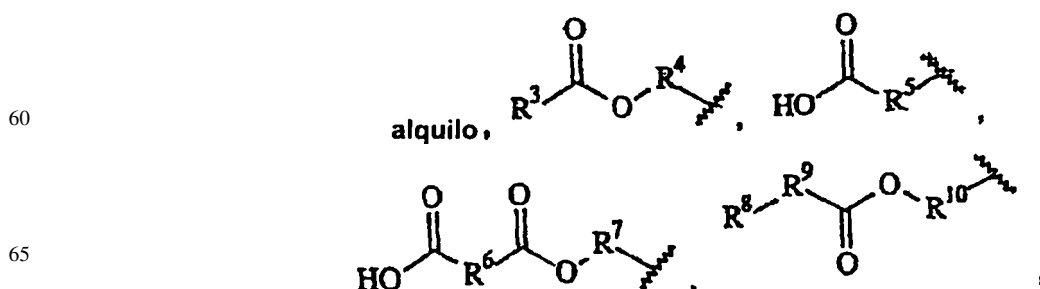
Continúa existiendo una necesidad de hacer dispositivos sensibles que empleen diacetilenos más precisos, más adaptados a una aplicación dada, menos complejos y más disponibles para personal no técnico en una amplia variedad de entornos. Son particularmente deseables dispositivos que se puedan transportar convenientemente y usar individualmente para una aplicación particular que se puedan después desechar.

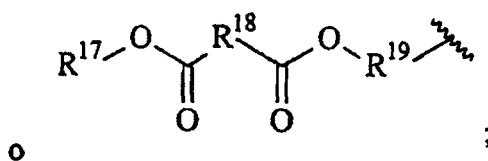
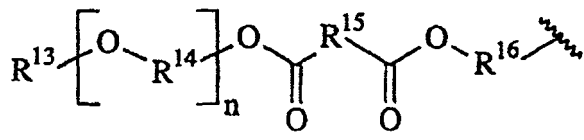
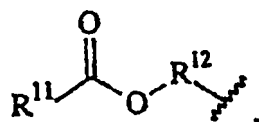
La presente invención proporciona un sensor colorimétrico para detectar la presencia de analitos por cambios espectrales (cambios de color visibles a simple vista o con un colorímetro) que tienen lugar como resultado de la unión específica de los analitos a montajes de polidiacetileno. Los montajes de polidiacetileno indican la presencia de un analito de una manera simple aún altamente sensible.

La presente invención proporciona un sensor colorimétrico que comprende un receptor y el producto de la reacción de polimerización que comprenda al menos un compuesto de fórmula:

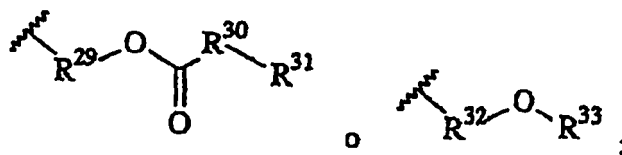
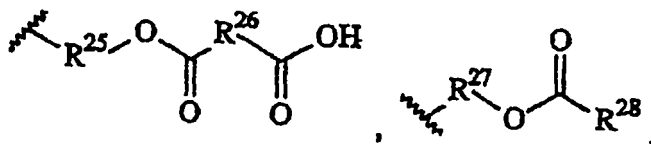
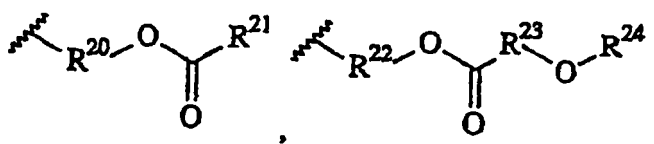


donde  $R^1$  es





$R^2$  es



$R^3, R^8, R^{13}, R^{21}, R^{24}, R^{31}$  y  $R^{33}$  son independientemente alquilo;  $R^4, R^5, R^7, R^{14}, R^{16}, R^{19}, R^{20}, R^{22}, R^{25}$  y  $R^{32}$  son independientemente alquileno;  $R^6, R^{15}, R^{18}$  y  $R^{26}$  son independientemente: alquileno, alquenileno o arileno;  $R^9$  es alquileno o  $-NR^{34}-$ ;  $R^{10}, R^{12}, R^{27}$  y  $R^{29}$  son independientemente alquileno o alquileno-arileno;  $R^{11}$  y  $R^{28}$  son independientemente alquilino;  $R^{17}$  es un grupo activador de éster;  $R^{23}$  es arileno;  $R^{30}$  es alquileno o  $-NR^{36}-$ ;  $R^{34}$  y  $R^{36}$  son independientemente H o alquilo  $C_1-C_4$ ; p es 1-5 y n es 1-20 y donde  $R^1$  y  $R^2$  no son lo mismo.

También se proporciona una preparación más fácil y el uso de montajes de polidiacetileno en disolución y por deposición sobre un sustrato.

También se proporciona un dispositivo y un método para la detección de moléculas pequeñas, organismos patógenos y no patógenos, toxinas, receptores y fragmentos de membrana, compuestos orgánicos volátiles, enzimas y sustratos enzimáticos, anticuerpos, antígenos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos peptídicos.

También se proporciona un estuche de análisis económico, de fácil uso, cuya fiabilidad es relativamente estable en un amplio intervalo de condiciones medioambientales y cuando el analito se mezcla con una serie de materiales distintos.

También se proporciona un método para usar el sensor colorimétrico para detectar un analito poniendo en contacto el sensor colorimétrico con un analito y observándose un cambio de color.

También se proporciona un método para la detección indirecta de un analito poniendo en contacto el sensor colorimétrico con una sonda que presente afinidad por tanto el analito como el receptor y no observándose cambio de color.

No se desea que el compendio anterior de la presente invención describa cada realización descrita o cada aplicación de la presente invención. La descripción detallada que sigue más particularmente ejemplifica estas realizaciones.

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un sensor colorimétrico de la presente invención.

La Fig. 2 muestra una representación esquemática de una disposición de sensores colorimétricos de la presente invención.

La Fig. 3 muestra una representación esquemática de un sensor colorimétrico para poner en contacto el sensor con un analito.

La Fig. 4 muestra una representación esquemática de un sensor colorimétrico plegable para poner en contacto el sensor con un analito.

La Fig. 5 muestra una representación esquemática de un sensor colorimétrico de la presente invención con un tipo de distribución de analito.

La Fig. 6 muestra una representación esquemática de una disposición de sensores colorimétricos de la presente invención con un tipo de distribución de analito.

La Fig. 7 es un diagrama de fases que muestra los colores de la película de polidiacetileno recubierta y seca como una función del ángulo de contacto del sustrato.

La Fig. 8 es un diagrama de fases que muestra los colores de la película de polidiacetileno recubierta y seca como una función de la tensión superficial del sustrato.

La presente invención proporciona un sensor colorimétrico que comprende materiales diacetilénicos y un método para usar el sensor para detectar un analito.

Para las siguientes terminologías definidas, se aplicarán estas definiciones a menos que se de una definición diferente en las reivindicaciones o donde quiera en esta memoria descriptiva.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “alquilo” se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente, de cadena lineal o ramificada o cíclico, con un número especificado de átomos de carbono. Los grupos alquilo incluyen aquéllos con uno a veinte átomos de carbono. Los ejemplos de “alquilo” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, isobutilo e isopropilo y similares. Se tiene que entender que donde se deseen restos cíclicos, al menos deben estar presentes tres carbonos en dicho alquilo. Dichos restos cíclicos incluyen: ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “alquilenos” se refiere a un radical hidrocarbonado divalente de cadena lineal o ramificada o cíclico, con un número especificado de átomos de carbono. Los grupos alquilenos incluyen aquéllos con uno a catorce átomos de carbono. Los ejemplos de “alquilenos” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno y similares. Se tiene que entender que donde se deseen restos cíclicos, al menos deben estar presentes tres carbonos en dicho alquilenos. Dichos restos cíclicos incluyen: ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y cicloheptileno.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “alquenileno” se refiere a un radical hidrocarbonado divalente de cadena lineal o ramificado o cíclico, con un número especificado de átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los grupos alquenileno incluyen aquéllos con dos a ocho átomos de carbono. Los ejemplos de “alquenileno” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, eteno-1,2-diilo o propeno-1,3-diilo.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “arileno” se refiere a radicales carboxílicos aromáticos insaturados, divalentes, con un único anillo tal como fenileno o múltiples anillos condensados tales como naftileno o antrileno. Los grupos arileno incluyen aquéllos con seis a trece átomos de carbono. Los ejemplos de “arileno” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, benceno-1,2-diilo, benceno-1,3-diilo, benceno-1,4-diilo o naftaleno-1,8-diilo.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “alquilenos-arileno”, se refiere a un resto alquilenos como se definió anteriormente unido a un resto arileno como se definió anteriormente. Los ejemplos de “alquilenos-arileno” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, -CH<sub>2</sub>-fenileno, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-fenileno y -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-fenileno.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “alquileno” se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente, de cadena lineal o ramificada o cíclico, que tiene de dos a treinta carbonos y al menos un triple enlace carbono-

carbono. Los ejemplos de “alquínilo” como se usa en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, etínilo, propínilo y butínilo.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “analito(s)” se refiere a cualquier material que se pueda detectar por el sensor de la presente invención. Dichos materiales incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, organismos patógenos y no patógenos, toxinas, receptores y fragmentos de membrana, compuestos orgánicos volátiles, enzimas y sustratos enzimáticos, anticuerpos, antígenos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos peptídicos.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “bacterias” se refiere a todas las formas de microorganismos que se considera que son bacterias incluyendo: cocos, bacilos, espiroquetos, seroplastos, protoplastos, etc.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “receptor” se refiere a cualquier molécula con una afinidad de unión por un analito de interés. Receptor incluye, pero no se limita a, receptores que se encuentran en la naturaleza tales como proteínas de membrana superficial, enzimas, lectinas, anticuerpos, proteínas recombinantes, etc.; proteínas sintéticas; ácidos nucleicos; c-glicósidos; carbohidratos; gangliósidos y agentes quelantes.

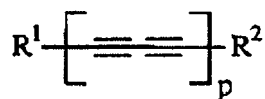
Como se usa en la presente memoria, las terminologías “montaje” o “automontaje”, se refieren a cualquier autoordenación de moléculas de diacetileno previamente a la polimerización. J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (2ª Ed.), Academic Press, Nueva York (1.992), págs. 321-427.

Como se usa en la presente memoria, la terminología “monocapa(s) de automontaje” (las SAM, por sus siglas en inglés) se refiere a cualquier película orgánica ultrafina ordenada formada en un sustrato dado por autoordenamiento espontáneo. A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, Nueva York (1.991), págs. 237-301.

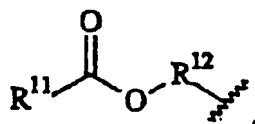
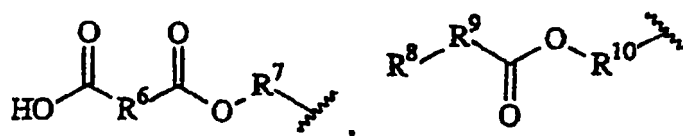
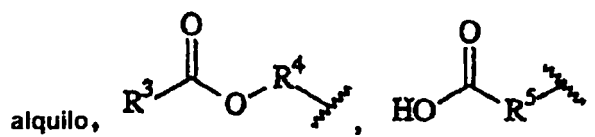
Como se usa en la presente memoria, la terminología “transductor” describe un material capaz de convertir una prueba de reconocimiento al nivel molecular en una señal perceptible.

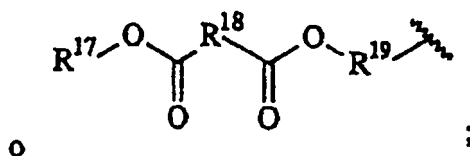
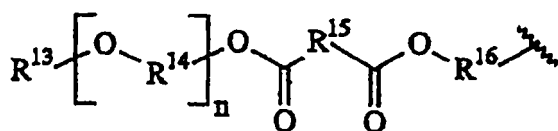
Se supone en esta memoria que todos los números se modifican por la terminología “aproximadamente”. La recitación de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ej., 1 a 5 incluye 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,80; 4 y 5).

La presente invención proporciona un sensor colorimétrico que comprende montajes novedosos de polidiacetileno incorporados con un receptor para la detección de un analito. Los montajes de polidiacetileno son compuestos polimerizados de fórmula:

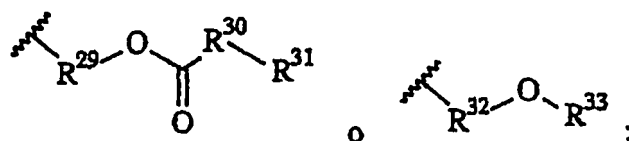
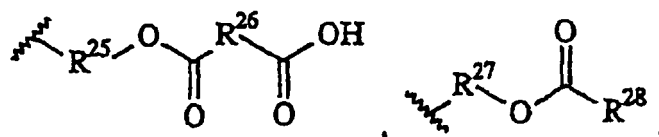
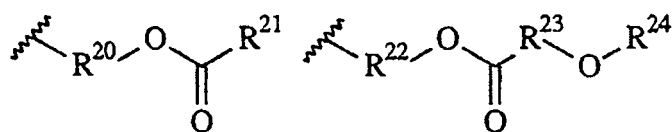


donde  $R^1$  es





R<sup>2</sup> es



R<sup>3</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>24</sup>, R<sup>31</sup> y R<sup>33</sup> son independientemente alquilo; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>22</sup>, R<sup>25</sup> y R<sup>32</sup> son independientemente alquileno; R<sup>6</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>18</sup> y R<sup>26</sup> son independientemente: alquileno, alquenileno o arileno; R<sup>9</sup> es alquileno o -NR<sup>34</sup>-; R<sup>10</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>27</sup> y R<sup>29</sup> son independientemente alquileno o alquileno-arileno; R<sup>11</sup> y R<sup>28</sup> son independientemente alquinilo; R<sup>17</sup> es un grupo activador de éster; R<sup>23</sup> es arileno; R<sup>30</sup> es alquileno o -NR<sup>36</sup>-; R<sup>34</sup> y R<sup>36</sup> son independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; p es 1-5 y n es 1-20 y donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no son lo mismo.

Los ejemplos de R<sup>1</sup> cuando R<sup>1</sup> es alquilo incluyen: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> y alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>1</sup> cuando R<sup>1</sup> es alquilo incluyen dodecilo y hexadecilo.

Los ejemplos de R<sup>3</sup> incluyen: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> y alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>3</sup> incluyen undecilo y pentadecilo.

Los ejemplos de R<sup>4</sup> incluyen alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> y alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>4</sup> incluyen: metileno (-CH<sub>2</sub>-), trimetileno, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y tetrametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

Los ejemplos de R<sup>5</sup> incluyen alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> y alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>5</sup> incluyen etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y trimetileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

Los ejemplos de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es alquileno incluyen alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> y alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es alquileno incluyen etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y trimetileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). Los ejemplos de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es alquenileno incluyen alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> y alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>. Un ejemplo adicional de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es alquenileno incluye etenileno (-C=C-). Los ejemplos de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es arileno incluyen arileno C<sub>6</sub>-C<sub>13</sub> y fenileno. Un ejemplo adicional de R<sup>6</sup> cuando R<sup>6</sup> es arileno es benceno-1,2-diilo.

Los ejemplos de R<sup>7</sup> incluyen alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> y alquileno C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>. Los ejemplos adicionales de R<sup>7</sup> incluyen: etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), trimetileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), tetrametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), pentametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), hexametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), heptametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), octametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y nonametileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

## ES 2 286 511 T3

Los ejemplos de  $R^8$  incluyen alquilo  $C_1$ - $C_{16}$  y alquilo  $C_1$ - $C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^8$  incluyen: butilo, pentilo y hexilo.

$R^9$  es independientemente alquileo o  $-NR^{34}$ -, donde  $R^{34}$  es H o alquilo  $C_1$ - $C_4$ ;

Los ejemplos de  $R^9$  cuando  $R^9$  es alquileo incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_1$ - $C_3$ , tal como metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) por ejemplo. Los ejemplos de  $R^9$  cuando  $R^9$  es  $-NR^{34}$ - incluyen:  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$  y  $-\text{N}(\text{CH}_3)-$ .

Los ejemplos de  $R^{10}$  cuando  $R^{10}$  es alquileo incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_1$ - $C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{10}$  cuando  $R^{10}$  es alquileo incluyen: metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), tetrametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ),  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$  y  $-\text{CH}((\text{CH}_2)_{1-4}\text{CH}_3)-$ . Los ejemplos de  $R^{10}$  cuando  $R^{10}$  es alquileo-arileno incluyen (alquileo  $C_1$ - $C_{14}$ )-arileno y (alquileo  $C_1$ - $C_{14}$ )-fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{10}$  cuando  $R^{10}$  es alquileo-arileno incluye  $-\text{CH}_2$ -fenileno.

Los ejemplos de  $R^{11}$  incluyen alquínilo  $C_2$ - $C_{30}$  y alquínilo  $C_{20}$ - $C_{25}$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{11}$  incluyen alquínilo  $C_2$ - $C_{30}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ) y alquínilo  $C_{20}$ - $C_{25}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono. Otros ejemplos de  $R^{11}$  incluyen alquínilo  $C_{22}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono, alquínilo  $C_{24}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono. Otros ejemplos más de  $R^{11}$  incluyen  $-(\text{CH}_2)_8-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$  y  $-(\text{CH}_2)_8-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ .

Los ejemplos de  $R^{12}$  cuando  $R^{12}$  es alquileo incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_1$ - $C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{12}$  cuando  $R^{12}$  es alquileo incluyen: metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), tetrametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ),  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$  y  $-\text{CH}((\text{CH}_2)_{1-4}\text{CH}_3)-$ . Los ejemplos de  $R^{12}$  cuando  $R^{12}$  es alquileo-arileno incluyen (alquileo  $C_1$ - $C_{14}$ )-arileno y (alquileo  $C_1$ - $C_{14}$ )-fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{12}$  cuando  $R^{12}$  es alquileo-arileno incluye  $-\text{CH}_2$ -fenileno.

Los ejemplos de  $R^{13}$  incluyen alquilo  $C_1$ - $C_4$ , tal como metilo por ejemplo.

Los ejemplos de  $R^{14}$  incluyen alquileo  $C_1$ - $C_4$ , tal como etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) por ejemplo.

Los ejemplos de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es alquileo incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_1$ - $C_3$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es alquileo incluyen etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ). Los ejemplos de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es alquénilo incluyen alquénilo  $C_2$ - $C_8$  y alquénilo  $C_2$ - $C_4$ . Un ejemplo adicional de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es alquénilo incluye etenileno ( $-\text{C}=\text{C}-$ ). Los ejemplos de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es arileno incluyen arileno  $C_6$ - $C_{13}$  y fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{15}$  cuando  $R^{15}$  es arileno es benceno-1,4-diilo.

Los ejemplos de  $R^{16}$  incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_2$ - $C_9$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{16}$  incluyen: etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), tetrametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), pentametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), hexametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), heptametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), octametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y nonametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

Los ejemplos de  $R^{17}$  incluyen grupos que activan el grupo éster vecino hacia transferencia de acilo. Dichos grupos activantes de éster incluyen: pentafluorofenol, pentaclorofenol, 2, 4, 6-triclorofenol, 3-nitrofenol, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxifitalimida y los descritos en M. Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", (Springer-Verlag 1.984), por ejemplo. Un ejemplo adicional de  $R^{17}$  es 2,5-dioxo-1-pirrolidinilo.

Los ejemplos de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es alquileo incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_1$ - $C_3$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es alquileo incluyen etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ). Los ejemplos de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es alquénilo incluyen alquénilo  $C_2$ - $C_8$  y alquénilo  $C_2$ - $C_4$ . Un ejemplo adicional de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es alquénilo incluye etenileno ( $-\text{C}=\text{C}-$ ). Los ejemplos de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es arileno incluyen arileno  $C_6$ - $C_{13}$  y fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{18}$  cuando  $R^{18}$  es arileno es benceno-1,2-diilo.

Los ejemplos de  $R^{19}$  incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_2$ - $C_9$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{19}$  incluyen: etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), tetrametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), pentametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), hexametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), heptametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), octametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y nonametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

Los ejemplos de  $R^{20}$  incluyen: alquileo  $C_1$ - $C_{14}$ , alquileo  $C_1$ - $C_9$  y alquileo  $C_1$ - $C_4$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{20}$  incluyen: metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), tetrametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), pentametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), hexametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), heptametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), octametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y nonametileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ).

Los ejemplos de  $R^{21}$  cuando  $R^{21}$  es alquilo incluyen: alquilo  $C_1$ - $C_{20}$ , alquilo  $C_6$ - $C_{18}$  y alquilo  $C_{10}$ - $C_{17}$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{21}$  cuando  $R^{21}$  es alquilo incluyen: decilo, undecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, heptadecilo.

Los ejemplos de  $R^{22}$  incluyen alquileo  $C_1$ - $C_{14}$  y alquileo  $C_2$ - $C_9$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{22}$  incluyen: etileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), trimetileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) y tetrametileno.

## ES 2 286 511 T3

Los ejemplos de  $R^{23}$  incluyen arileno  $C_6-C_{13}$  y fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{23}$  cuando  $R^{23}$  es arileno es benceno-1,4-diilo.

Los ejemplos de  $R^{24}$  incluyen alquilo  $C_1-C_{20}$  y alquilo  $C_6-C_{18}$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{24}$  incluyen: metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y dodecilo.

Los ejemplos de  $R^{25}$  incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_2-C_9$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{25}$  incluyen: etileno ( $-CH_2CH_2-$ ), trimetileno ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), tetrametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), pentametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), hexametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), heptametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), octametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ) y nonametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ).

Los ejemplos de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es alquilenos incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_1-C_3$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es alquilenos incluyen etileno ( $-CH_2CH_2-$ ) y trimetileno ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ). Los ejemplos de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es alquilenos incluyen alquilenos  $C_2-C_8$  y alquilenos  $C_2-C_4$ . Un ejemplo adicional de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es alquilenos incluye etenileno ( $-C=C-$ ). Los ejemplos de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es arileno incluyen arileno  $C_6-C_{13}$  y fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{26}$  cuando  $R^{26}$  es arileno es benceno-1,2-diilo.

Los ejemplos de  $R^{27}$  cuando  $R^{27}$  es alquilenos incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_1-C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{27}$  cuando  $R^{27}$  es alquilenos incluyen: metileno ( $-CH_2-$ ), etileno ( $-CH_2CH_2-$ ), trimetileno ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), tetrametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ),  $-C(CH_3)_2-$  y  $-CH((CH_2)_{1-4}CH_3)-$ . Los ejemplos de  $R^{27}$  cuando  $R^{27}$  es alquilenos-arileno incluyen (alquilenos  $C_1-C_{14}$ )-arileno y (alquilenos  $C_1-C_{14}$ )-fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{27}$  cuando  $R^{27}$  es alquilenos-arileno incluye  $-CH_2$ -fenileno.

Los ejemplos de  $R^{28}$  incluyen alquilenos  $C_2-C_{30}$  y alquilenos  $C_{20}-C_{25}$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{28}$  incluyen alquilenos  $C_2-C_{30}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono ( $-C\equiv C-$ ) y alquilenos  $C_{20}-C_{25}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono. Otros ejemplos de  $R^{28}$  incluyen alquilenos  $C_{22}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono, alquilenos  $C_{24}$  con al menos dos enlaces triples carbono-carbono. Otros ejemplos más de  $R^{28}$  incluyen  $-(CH_2)_8-C\equiv C-C\equiv C-(CH_2)_9CH_3$  y  $-(CH_2)_8-C\equiv C-C\equiv C-(CH_2)_{11}CH_3$ .

Los ejemplos de  $R^{29}$  cuando  $R^{29}$  es alquilenos incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_1-C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{29}$  cuando  $R^{29}$  es alquilenos incluyen: metileno ( $-CH_2-$ ), etileno ( $-CH_2CH_2-$ ), trimetileno ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), tetrametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ),  $-C(CH_3)_2-$  y  $-CH((CH_2)_{1-4}CH_3)-$ . Los ejemplos de  $R^{29}$  cuando  $R^{29}$  es alquilenos-arileno incluyen (alquilenos  $C_1-C_{14}$ )-arileno y (alquilenos  $C_1-C_{14}$ )-fenileno. Un ejemplo adicional de  $R^{29}$  cuando  $R^{29}$  es alquilenos-arileno incluye  $-CH_2$ -fenileno.

$R^{30}$  es independientemente alquilenos o  $-NR^{36}-$ , donde  $R^{36}$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ .

Los ejemplos de  $R^{30}$  cuando  $R^{30}$  es alquilenos incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_1-C_3$ , tal como metileno ( $-CH_2-$ ) por ejemplo. Los ejemplos de  $R^{30}$  cuando  $R^{30}$  es  $-NR^{36}-$  incluyen:  $-NH-$ ,  $-N(CH_2CH_3)-$  y  $-N(CH_3)-$ .

Los ejemplos de  $R^{31}$  incluyen alquilo  $C_1-C_{16}$  y alquilo  $C_1-C_8$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{31}$  incluyen: butilo, pentilo y hexilo.

Los ejemplos de  $R^{32}$  incluyen alquilenos  $C_1-C_{14}$  y alquilenos  $C_2-C_9$ . Los ejemplos adicionales de  $R^{32}$  incluyen: etileno ( $-CH_2CH_2-$ ), trimetileno ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), tetrametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), pentametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ) y hexametileno ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ).

Los ejemplos de  $R^{33}$  incluyen: alquilo  $C_1-C_{20}$ , alquilo  $C_6-C_{18}$  y alquilo  $C_{10}-C_{16}$ .

Ejemplos adicionales de  $R^{33}$  incluyen: dodecilo, tetradecilo, hexadecilo y octadecilo.

Los compuestos de la presente invención también incluyen aquéllos donde p puede ser 1 ó 2 y n puede ser: 1-20, 3-17, 6-14 ó 9-11.

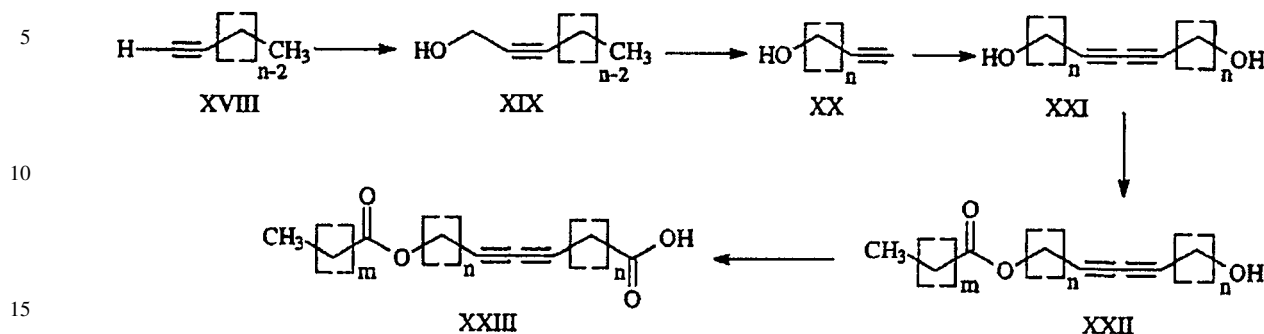
La invención incluye los compuestos descritos en la presente memoria incluyendo isómeros tales como isómeros estructurales e isómeros geométricos, sales, solvatos o polimórficos.

### *Preparación de los compuestos de diacetileno*

Se pueden preparar diacetenos de Fórmula XXIII como se explica en líneas generales en el Esquema 1, donde n es típicamente 1 a 4 y m es típicamente 10 a 14.



Esquema 1



Se pueden preparar compuestos de fórmula XXIII mediante la oxidación de compuestos de fórmula XXII por reacción con un agente de oxidación adecuado en un disolvente adecuado tal como DMF por ejemplo. Los agentes de oxidación adecuados incluyen reactivo de Jones y dicromato de piridinio, por ejemplo. La reacción mencionada se lleva a cabo típicamente durante un periodo de tiempo de 1 hora a 48 horas, generalmente 8 horas, a una temperatura de 0°C a 40°C, generalmente de 0°C a 25°C.

Se pueden preparar compuestos de fórmula XXII a partir de compuestos de fórmula XXI por reacción con un cloruro de ácido adecuado. Los cloruros de ácido adecuados incluyen cualquier cloruro de ácido que proporcione el producto deseado tal como: cloruro de lauroilo, cloruro de 1-dodecanoilo, cloruro de 1-tetradecanoilo, cloruro de 1-hexadecanoilo y cloruro de 1-octadecanoilo, por ejemplo. Los disolventes adecuados incluyen: éter, tetrahidrofurano, diclorometano y cloroformo, por ejemplo. La reacción mencionada se lleva a cabo típicamente durante un periodo de tiempo de 1 hora a 24 horas, generalmente 3 horas, a una temperatura de 0°C a 40°C, generalmente de 0°C a 25°C, en presencia de una base tal como trietilamina o base piridínica.

Los compuestos de fórmula XXI bien están comercialmente disponibles (por ej., donde n es 1-4) o se pueden preparar a partir de compuestos de fórmula XVIII mediante los compuestos XIX y XX como se explica en líneas generales en el Esquema 1 y se describe en Abrams, Suzanne R.; Shaw, Angela C. "Triple-bond isomerizations: 2- a 9-decin-1-ol", *Org. Synth.* (1988), 66, 127-31 y Brandsma, L. "Preparative Acetylenic Chemistry", (Elsevier Pub. Co.: Nueva York, 1971), por ejemplo.

También se pueden preparar compuestos diacetilénicos como se describe en la presente memoria haciendo reaccionar compuestos de fórmula XXII con un anhídrido tal como anhídrido succínico, glutárico o ftálico en presencia de un disolvente adecuado tal como tolueno. La reacción mencionada se lleva a cabo típicamente durante un periodo de tiempo de 1 hora a 24 horas, generalmente 15 horas, a una temperatura de 50°C a 125°C, generalmente de 100°C a 125°C.

Los compuestos diacetilénicos como se describen en la presente memoria se autoensamblan en disolución para formar montajes ordenados que se pueden polimerizar usando cualquier radiación actínica tal como, por ejemplo, radiación electromagnética en el intervalo UV o visible del espectro electromagnético. La polimerización de los compuestos diacetilénicos da como resultado productos de la reacción de polimerización que presentan un color en el espectro visible menor que 570 nm, entre 570 nm y 600 nm o mayor que 600 nm dependiendo de su conformación y exposición a factores externos. Típicamente, la polimerización de los compuestos diacetilénicos descritos en la presente memoria da como resultado redes poliméricas de fase azul metaestables que incluyen una cadena principal de polidiacetileno. Estas redes poliméricas de fase azul metaestables experimentan un cambio de color de azulado a naranja rojizo cuando se exponen a factores externos tales como: calor, un cambio de disolvente o contraíón, si está disponible o tensión física por ejemplo.

Los productos de la polimerización de algunos de los compuestos diacetilénicos descritos en la presente memoria pueden presentar un cambio de color reversible y/o un cambio de color de tres estados. Por ejemplo, después de la polimerización la red polimérica de fase azul resultante puede cambiar de color a un estado naranja rojizo cuando se expone a calor, un cambio de disolvente o contraíón o tensión física. Esta red polimérica naranja rojiza puede cambiar después de color a un estado naranja amarillento cuando se expone además a calor, un cambio de disolvente o contraíón o tensión física. Adicionalmente, las redes poliméricas descritas en la presente memoria pueden ciclarse entre estos estados naranja rojizo y naranja amarillento de una manera reversible.

La capacidad de los compuestos diacetilénicos y sus productos de polimerización descritos en la presente memoria para experimentar un cambio de color visible cuando se exponen a tensión física, los hace candidatos ideales para la preparación de dispositivos sensibles para la detección de un analito. Los montajes de polidiacetileno formados a partir de los compuestos de diacetileno descritos pueden funcionar como un transductor en aplicaciones biosensibles.

Los requerimientos estructurales de una molécula diacetilénica para una aplicación sensible dada son típicamente aplicaciones específicas. Características tales como longitud total de cadena, solubilidad, polaridad, cristalinidad y presencia de grupos funcionales para otra modificación molecular determinan todas cooperativamente una capacidad de la molécula diacetilénica para servir como material sensible, útil. Por ejemplo, en el caso de biodetección de un analito en medio acuoso, la estructura del compuesto diacetilénico debería ser capaz de formar una dispersión estable en agua, polimerizándose eficazmente a un material coloreado, incorporando química de receptores apropiada para unirse a un analito y transducir esa interacción de unión por medio de un cambio de color. Estas capacidades dependen de las características estructurales de los compuestos diacetilénicos.

Los compuestos diacetilénicos de la presente invención poseen las capacidades descritas anteriormente y se pueden polimerizar fácilmente y eficazmente en montajes de polidiacetileno que experimenten los cambios de color deseados. Adicionalmente, los compuestos diacetilénicos permiten la incorporación de grandes excesos de material no polimerizable tal como un receptor descrito a continuación, mientras se está formando aún una disolución polimerizable, estable.

Los compuestos diacetilénicos descritos se pueden sintetizar de una manera rápida de alta producción incluyendo métodos de síntesis de alto rendimiento. La presencia de funcionalidad en las cadenas principales de los compuestos diacetilénicos, tales como heteroátomos por ejemplo, proporciona la posibilidad de elaboración estructural fácil para satisfacer los requerimientos de una aplicación sensora dada. Se pueden polimerizar los compuestos diacetilénicos en la red que contiene cadena principal de polidiacetileno, deseada, por adición del diacetileno a un disolvente adecuado, tal como agua por ejemplo, sometiendo a ultrasonidos la mezcla e irradiando después la disolución con luz ultravioleta, típicamente a una longitud de onda de 254 nm. En la polimerización la disolución experimenta un cambio de color a púrpura azulado.

#### 25 *Sensores Colorimétricos que comprenden montajes de polidiacetileno*

Los sensores colorimétricos de la presente invención que comprenden los compuestos de diacetileno descritos pueden servir como la base para la detección colorimétrica de una prueba de reconocimiento molecular en disolución o recubiertos en un sustrato. Dicho dispositivo de reconocimiento molecular se puede preparar por adición de un receptor al sistema de monómero de diacetileno bien antes de o después de la polimerización. En la polimerización o después, el receptor se incorpora eficazmente dentro de la red polimérica de manera que la interacción del receptor con un analito de como resultado un cambio de color visible debido a la perturbación de la cadena principal de polímero eno-ino conjugado.

En una realización, el receptor se mezcla físicamente y se dispersa entre los montajes de polidiacetileno. En una realización alternativa, el receptor está unido mediante enlaces covalentes a los montajes de polidiacetileno. Los ejemplos de receptores útiles incluyen, pero no se limitan a proteínas de membrana superficial, enzimas, lectinas, anticuerpos, proteínas recombinantes, etc.; proteínas sintéticas; ácidos nucleicos; c-glicósidos; carbohidratos; gangliósidos y agentes quelantes. En una realización, el receptor es un fosfolípido. En una realización alternativa, el receptor es un glicerol incorporado al montaje de diacetileno por métodos conocidos tales como el discutido en Alcaraz, Marie-Lyne; Peng, Ling; Klotz, Phillippe; Goeldner, Maurice, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 192-201.

Los sensores colorimétricos de la presente invención formados a partir de los compuestos de diacetileno descritos son responsables de una variedad de aplicaciones que demandan diagnósticos de coste eficaz, estables, precisos, consistentes y rápidos, fuera del ajuste de laboratorio. Las aplicaciones incluyen análisis del punto de atención, diagnósticos de análisis particulares, detección militar e industrial de patógenos en suspensión en el aire o en el agua y los VOC y elaboración de alimentos.

En una realización, se pueden usar los sensores colorimétricos para la detección de bacterias gramnegativas en fluidos biológicos para diagnosticar la presencia de una infección. Por ejemplo, la presencia de bacterias gramnegativas en la orina es indicativo de una infección de orina. Un sensor colorimétrico que comprenda los montajes de polidiacetileno de la presente invención puede indicar la presencia de bacterias gramnegativas en la orina u otros fluidos biológicos por cambio de color bien en una disolución o como un recubrimiento en un sustrato.

En ciertas realizaciones, los sensores colorimétricos de la presente invención se podían acoplar con otros métodos de diagnóstico conocidos para proporcionar un análisis en múltiples puntos de la presencia de bacterias u otros analitos. Por ejemplo, en el análisis en muestras de orina, un análisis colorimétrico que detecta actividad de esterasa en leucocitos (glóbulos blancos o los WBC, por sus siglas en inglés), como se describe en la patente de EE.UU. N. 4.299.917 hace pensar en piuria (pus en la orina) y se puede interpretar como una señal de la presencia de una infección. Se podía usar un sensor que combine un análisis para leucocitos, en forma completa o lisada, así como un análisis para bacterias gramnegativas basado en los montajes de polidiacetileno de la presente invención, para deducir no sólo la presencia de una infección sino si la infección está causada por bacterias gramnegativas o grampositivas. Un resultado negativo en este sensor de combinación para detección gramnegativa observada en la porción de polidiacetileno del sensor junto con un resultado positivo en la porción de leucocitos del sensor, se podía interpretar como la presencia de una infección bacteriana grampositiva. A la inversa, un resultado positivo en el análisis gramnegativo indicaría una infección bacteriana gramnegativa. Otros métodos potenciales para detectar leucocitos podían usar análisis fluorométricos para valorar directamente la presencia de estas células, tal como se describe en Peyman, Khoobehi B. "Fluorescent labeling of blood cells for evaluation of retinal and choroidal circulation", *Ophthalmic Surg. Lasers* (Feb. 1.999), 30(2):140-5

o para detectar liberación de peróxido de leucocitos activados, como se describe en Mohanty, J. G., Jaffe, Jonathan S., Schulman, Edward S., Raible, Donald G. "A highly sensitive fluorescent micro-assay of  $H_2O_2$  release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative," *J. Immunological Methods* (1.997), 202, 133-141, por ejemplo.

La capacidad de diagnóstico rápido actual, es decir, menor que 15 minutos, en análisis de muestras de orina está limitada a la detección bacteriana usando la combinación de un análisis de leucocitos con un análisis de nitratos, tal como el análisis de nitratos descrito en la patente de EE.UU. N°. 5.434.235. El análisis de nitratos está basado en un análisis colorimétrico capaz de detectar nitratos como subproducto de metabolismo bacteriano. El análisis está seriamente limitado por su incapacidad para detectar la presencia de las bacterias directamente y el hecho que no todas las bacterias producen nitratos y así no se detectarían algunos grupos de bacterias.

Para diagnóstico rápido de bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, el sensor colorimétrico de la presente invención y el análisis de leucocitos se podían recubrir en el mismo sustrato para determinar la presencia o ausencia de bacterias gramnegativas y grampositivas, como se describió anteriormente. Esto podía minimizar la necesidad de esperar 16-24 horas para los resultados de un cultivo de muestra de orina para identificar la clase de bacterias antes de que empiece el tratamiento con antibióticos. En esos casos en que se prescribe un antibiótico antes de que se obtengan los resultados del cultivo, el antibiótico podía ser objetivo para la clase de bacterias basándose en los resultados del análisis de los sensores.

En una realización alternativa, se podían usar los sensores colorimétricos de la presente invención junto con apósitos de heridas para detectar la presencia de una infección. El sensor podía estar integrado en el apósito como una capa directa o indirectamente en contacto con la herida. El sensor también podía estar insertado en el apósito durante su uso. Alternativamente, se podía concebir una construcción de apósito donde se pudiera dirigir el exudado de la herida desde la herida a una porción del apósito no puesta en contacto con la herida donde esté situado el sensor, por canales microfluídicos tales como los descritos en la patente de EE.UU. N°. 6.420.622 B 1. El sensor también se podía usar como un diagnóstico autónomo en la valoración de una infección de una herida por análisis del analito extraído de un hisopo de la herida.

Se puede obtener un sensor que comprenda los montajes de polidiacetileno sin la necesidad de formar una película por el procedimiento convencional LB (Langmuir-Blodgett) antes de transferirlo a un soporte apropiado. Alternativamente, los montajes de polidiacetileno se pueden formar en un sustrato usando el procedimiento LB conocido como se describe en A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, Nueva York (1.991), págs. 101-219.

La presente invención proporciona capacidades biosensoras en un producto adhesivo desechable. Los sensores se autocontienen y no requieren instrumentación adicional para transferir un resultado mensurable. Alternativamente, es posible el uso con otra instrumentación analítica para mejorar además la sensibilidad, tal como fluorescencia con la fase "roja" fluorescente desarrollada después de la detección del analito. La función de los sensores para proporcionar un dispositivo de investigación rápido, es decir, menos de 30 minutos y preferiblemente menos de 15 minutos, cuando se desea la detección de una presencia umbral de un analito específico. Adicionalmente, los sensores de la presente invención son desechables y relativamente económicos.

En una realización de la invención, el sensor colorimétrico comprende un transductor formado a partir de un receptor incorporado dentro de los montajes de polidiacetileno en disolución. La disolución se puede proporcionar en un sistema de viales simple, con el analito directamente añadido a un vial que contiene una disolución con el transductor específico al analito de interés. Alternativamente, el sensor colorimétrico podía comprender múltiples viales en un estuche, conteniendo cada vial un transductor que comprende montajes de polidiacetilenos con receptores incorporados particulares para diferentes analitos. Para esas aplicaciones en que el analito no se puede añadir directamente al transductor de polidiacetileno, se podía usar un sistema de viales en dos partes. Un compartimento del vial podía contener reactivos para la preparación de la muestra del analito físicamente separado del segundo compartimento que contiene el transductor formado a partir de los montajes de polidiacetileno. Una vez que termina la preparación de la muestra, se eliminaría la barrera física que separa los compartimentos para permitir que el analito se mezcle con el transductor para la detección.

En otra realización de la presente invención, el sensor colorimétrico es un indicador rápido en un formato de cinta o de etiqueta como se representa en la Figura 1. La Figura 1 muestra una cinta o etiqueta 10 recubierta con un adhesivo 20 sensible a la presión y un transductor 30 recubierto en un sustrato 40. El adhesivo 20 sensible a la presión puede fijar la cinta o etiqueta 10 a una superficie para la detección directa de un analito. El adhesivo 20 sensible a la presión se aísla del transductor 30 que contiene los montajes de polidiacetileno para minimizar potencialmente los efectos adversos. En la Figura 1, el adhesivo 20 sensible a la presión rodea al transductor 30 situado en el centro de la cinta o etiqueta 10. En una realización alternativa (no mostrado), se combinan el adhesivo sensible a la presión y el transductor.

Opcionalmente, la cinta o etiqueta 10 contendrá una ventana transparente en el lado de la cinta o etiqueta 10 que no contenga adhesivo 20 sensible a la presión. La ventana estaría centrada debajo del transductor 30 para permitir que el usuario visualice el cambio de color sin retirar la cinta o etiqueta 10 de la superficie que contiene al analito.

En la Figura 2, la cinta o etiqueta 110 se muestra como disposición 111 compuesta de múltiples transductores 112, 113, 114, 115 y 116. Cada uno de los transductores 112, 113, 114, 115 y 116 podía estar formado de los mismos o de diferentes montajes de polidiacetileno incorporando cada montaje de polidiacetileno el mismo o diferente receptor. Variando los transductores 112, 113, 114, 115 y 116, se puede diseñar la disposición 111 para detectar múltiples analitos a diversos niveles de concentración. Alternativamente, se puede reemplazar uno cualquiera de los transductores 112, 113, 114, 115 con un análisis de diagnóstico alternativo, tal como el análisis de leucocitos.

En otra realización mostrada en la Figura 3, la cinta o etiqueta 100 comprende un sustrato 101 plegable con adhesivo 102 sensible a la presión en un lado del sustrato 101 plegable y transductor 103 colocado en el lado opuesto del sustrato 101 plegable frente a adhesivo 102 sensible a la presión. Se podía poner en contacto la superficie que contiene un analito objetivo, con adhesivo 102 sensible a la presión para recoger la muestra. Una vez que se recoge la muestra que contiene el analito, el sustrato 101 plegable se plegaría para poner en contacto el adhesivo 102 sensible a la presión con el transductor 103 como se muestra en la Figura 4. Opcionalmente, se podría perforar el sustrato 101 plegable para permitir la separación del sustrato 101 plegable en dos o más partes, conteniendo una parte adhesivo 102 sensible a la presión y conteniendo otra parte el transductor 103. Tanto la característica plegable como/o las perforaciones del sustrato 101 plegable permiten que el usuario evite que el transductor se ponga en contacto con la superficie de la muestra que contiene al analito para aplicaciones que requieran esa funcionalidad.

Opcionalmente, el sustrato 101 plegable en la Figura 3 también podía incluir múltiples transductores, como se muestra en la Figura 2 y se describió anteriormente. Además, el sustrato 101 plegable podía incluir una ventana transparente en el transductor 103 en el lado opuesto para visualizar cualquier cambio de color después de que se pliegue el sustrato 101 plegable para poner en contacto el transductor 103 con adhesivo 102 sensible a la presión.

Se muestran realizaciones alternativas en las Figuras 5 y 6 que permiten distribuir una muestra de fluido al transductor mediante un elemento microfluídico tal como los descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 6.375.871 y 6.451.191. En la Figura 5, la cinta o etiqueta 301 contiene un elemento 302 microfluídico que distribuye el analito al transductor 303. En una aplicación, se podía suministrar adhesivo sensible a la presión en la cinta o etiqueta 301 en el transductor 303 del lado opuesto para permitir que se una la cinta o etiqueta a una superficie para propósitos de almacenamiento o soporte tales como la unión a una pared o envase.

En la Figura 6, se proporciona un elemento 401 microfluídico en la cinta o etiqueta 402. El elemento 401 microfluídico suministra el analito a múltiples pozos 403, 404, 405 y 406 que contienen los mismos o diferentes transductores. Cada uno de los transductores en los múltiples pozos 403, 404, 405 y 406 podía estar formado de los mismos o diferentes montajes de polidiacetileno incorporando cada montaje de polidiacetileno el mismo o diferente receptor. Variando los transductores, se podían diseñar múltiples pozos 403, 404, 405 y 406 para proporcionar detección de múltiples analitos a diversos niveles de concentración.

Para las aplicaciones que requieren preparación de la muestra del analito, un estuche podía contener un vial para almacenamiento de reactivos y mezclamiento del analito antes de poner en contacto el sensor colorimétrico recubierto en un sustrato bidimensional. En una realización, el estuche podía comprender un vial para almacenamiento de reactivos y preparación de analitos, con un sistema de tapa que contiene el transductor de la presente invención recubierto en un sustrato.

La presente invención también proporciona un método para análisis de un analito, que comprende poner en contacto el sensor colorimétrico mencionado con una muestra de disolución o superficie que contenga un analito y utilizar una medición de absorción o una observación visual a simple vista para detectar cambio de color en el sensor colorimétrico.

En una realización alternativa, la presente invención proporciona un método para la detección indirecta de un analito por selección de una sonda con afinidad para unirse con tanto el receptor incorporado en los montajes de polidiacetileno como el analito. La sonda seleccionada demostrará una afinidad competitiva con el analito. Cuando está presente el analito de interés, la sonda se unirá al analito más bien que al receptor en la cadena principal de polidiacetileno, no dando como resultado cambio de color. Si está ausente el analito, la sonda se unirá al receptor incorporado en la cadena principal de polidiacetileno, dando como resultado un cambio de color de azul a rojo. La sonda puede estar en contacto con el transductor después de que el analito se pone en contacto con el transductor o se puede mezclar con el analito previamente a que la mezcla se ponga en contacto con el transductor.

La sonda se puede poner en contacto con el transductor en disolución o recubierta en un sustrato. La sonda será cualquier molécula con afinidad por tanto el analito objetivo como el receptor. Las sondas posibles para uso en la presente invención incluyen péptidos de ruptura de membrana tales como: alameticina, magainina, gramicidina, sulfato de polimixina B y melitina.

Usando el método indirecto de detección, la alta sensibilidad que proporciona hace posibles bajos niveles de detección basándose en la concentración de sonda usada. Para la estrategia de detección, se pueden elegir concentraciones de la sonda que correspondan a niveles deseados de concentración de detección. El método de detección

indirecta usando la sonda permite el diseño del sistema alrededor del tipo y la concentración de la sonda para la sensibilidad deseada en una aplicación dada. Esto permite que el transductor sea universal a múltiples analitos de interés. Por ejemplo, podría servir un único transductor (combinación de polidiacetileno/receptor) para detectar múltiples analitos variando la sonda en contacto con el transductor de acuerdo con la afinidad de la sonda por el analito.

#### *Características del Substrato*

Los substratos de la presente invención se pueden caracterizar poniendo en contacto mediciones del ángulo usando agua milli-Q (Miliporo) y líquidos de sonda de yoduro de metileno (Aldrich). Para una medición de ángulo de contacto, se usa un goniómetro de Rame-Hart para medir el ángulo de contacto que forma una gota de un líquido de sonda cuando se coloca en un substrato. Aunque la gota cubre un área macroscópica del substrato, la interacción del líquido y la superficie sólo explora los  $1 \times 10^{-10}$  -  $5 \times 10^{-10}$  m (1-5 Angstroms) más externos de la superficie. Así, el análisis de ángulo de contacto proporciona una técnica precisa y sensible para caracterizar energéticas superficiales como se discute en A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, Nueva York (1.991), págs. 48-58.

Se puede considerar que los substratos de recubrimiento usados en la presente invención incluyen dos amplias categorías. La primera de estas categorías incluye substratos altamente planos, tales como oro evaporado en láminas de silicio (111) atómicamente planas, láminas de silicio (111) atómicamente planas o vidrio flotado, que están solos y modificados con monocapas autoensambladoras (las SAM) para modificar su energía superficial de una manera sistemática. La segunda clase de superficies comprendía superficies con una topografía altamente texturada que incluía muchas clases diferentes de materiales oscilando desde substratos de papel a recubrimientos receptores de tinta poliméricos a películas poliméricas estructuradas, películas microporosas y materiales de membrana. Son características comunes entre estos substratos la gran rugosidad y/o porosidad superficial. En estas superficies altamente texturadas, las mediciones de ángulos de contacto y la determinación de energías de superficie polares y dispersivas de estas mediciones de ángulo de contacto no se pueden ver como una caracterización de equilibrio de sus verdaderas energías termodinámicas. Para los propósitos de la presente invención, los ángulos de contacto indican una energía superficial “eficaz” o “práctica” que se puede usar para clasificar estos substratos para propósitos comparativos.

La Tabla 1 resume los substratos recubiertos con los montajes de polidiacetileno para uso como sensor colorimétrico de la presente invención. Las SAM usadas para modificar el substrato se enumeran con el substrato cuando se usa. Se muestran los ángulos de contacto del substrato cuando se miden con agua y yoduro de metileno, así como los componentes dispersivos y polares de la energía superficial calculada por el Método de la Media Geométrica como se muestra en S. Wu; *Polymer Interface and Adhesion*; Marcel Dekker, Nueva York (1.982). La última columna enumera el color del recubrimiento de PDA seco.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 286 511 T3

TABLA 1

Número	Substrato	Fabricante	$\theta$ Progr. (Agua) (°)	$\theta$ (MI) Progr. (°)	$\gamma$ (Dispersivo) (dinas/cm) [N/m]	$\gamma$ (Polar) (dinas/cm) [N/m]	Color de Recubrimiento Seco
1	Cromatografía Inversa Placa Gel de Si	Aldrich; Milwaukee, WI	158±3,0	<5	101,7 (0,102)	39,5 (0,039)	Azul
2	Papel Plegador Manila	Smead, No. 2- 153L-2, Hastings, MN	115±5,0	<5	76,2 (0,076)	7,9 (0,008)	Azul
3	Vidrio Flotado Limpio	Trabajos Vidrio Corning; Corning, NY	90±3,8	42±2,4	39,6 (0,039)	0,9 (0,009)	Azul
4	papel gráfico Texturado	3M Parte No. 34- 8506-6373-2; St. Paul, MN	123±5,4	<5	82,1 (0,082)	13,3 (0,013)	Azul
5	papel gráfico Brillo	3M Parte No. 34- 8506-6378-1; St. Paul, MN	105±8,0	30±1,3	58,1 (0,058)	1,5 (0,001)	Azul
6	Tarjeta PE IR	3M Tipo 61- 100-12; St. Paul, MN	144±0,6	<5	95,4 (0,095)	30,0 (0,030)	Azul
7	Tarjeta PTFE± IR	3M Tipo 62- St. Paul, MN	133±2,3	66±2,5	44,0 (0,044)	7,6 (0,008)	Azul
8	Octadeciltri- clorosilano SAM en Si (111)	Gelest, Inc.; Morrisville, PA	112±1,1	69±1,9	28,3 (0,028)	0,1 (0,001)	Rojo
9	Perfluorodecil- 1H,1H,2H,2H- triclorsilano en Lámina de Si (111)	Gelest, Inc.; Morrisville, PA	113±1,6	91±1,3	11,7 (0,012)	0,7 (0,007)	Rojo
10	SAM Octadeciltri- clorosilano en Si (111)	de Gelest, Inc.; Morrisville, PA	112±2,2	65±1,8	31,9 (0,032)	0,3 (0,003)	Rojo
11	SAM Dodecanotiol en Au Evaporado	de Aldrich; Milwaukee, WI	108±3,0	65±4,4	30,0 (0,030)	0 (0)	Rojo

12	SAM de Aldrich; Octadecanotiol en Au Evaporado	Milwaukee, WI	107±0,6	67±2,7	27,7 (0,028)	0 (0)	Rojo
13	PP Microestructurado	3M muestra No. PP-3445; St. Paul, MN	155±4,5	110±6,0	9,8 (0,009)	2,5 (0,002)	Rojo
14	Membrana FC TIPS	muestra 3M; St. Paul, MN	112±5,5	127±11,5	0,1 (1x10 <sup>-4</sup> )	8,7 (0,009)	Rojo
15	Membrana PVDF	Millipore Corporation XFIJ076T8; Bedford, MA	86±2,9	61±1,1	22,8 (0,023)	5,4 (0,005)	Rojo
16	Lámina de Si (111) Solo	Siltec Corporation Salem, OR	52±2,6	47±2,8	18,7 (0,019)	29,2 (0,029)	Mixto
17	Au Evaporado Solo	Muestra 3M, St. Paul, MN	97±4,5	48±0,6	38,9 (0,039)	0,1 (1x10 <sup>-4</sup> )	Mixto
18	11-Mercapto- 1-undecanol en Au Evaporado	Aldrich; Milwaukee, WI	58±1,6	38±1,7	26,0 (0,026)	19,8 (0,019)	Mixto
19	16-Mercapto- hexadecanoico en Au Evaporado	Aldrich; Milwaukee, WI	40±1,6	35±6,0	21,4 (0,021)	35,7 (0,036)	Mixto

Las Figuras 6 y 7 muestran el diagrama de fases basado en las observaciones colorimétricas de los recubrimientos secos y el análisis de ángulos de contacto de los sustratos recubiertos. La Figura 6 muestra el color resultante del sustrato recubierto como una función del ángulo de contacto progresivo de agua frente a ángulo de contacto progresivo de yoduro de metileno. La Figura 7 muestra el color resultante del sustrato recubierto como una función del componente polar de la energía superficial del sustrato frente al componente dispersivo de esa energía superficial cuando se calcula por el método de la Media Geométrica a partir de los ángulos de contacto progresivos del agua y yoduro de metileno como se proporciona en S. Wu; *Polymer Interface and Adhesion*; Marcel Dekker, Nueva York (1.982). Las superficies para las que el recubrimiento de polidiacetileno permanece en su color azul inicial se identifican por un círculo relleno en cada gráfica. Las superficies identificadas con un círculo son aquellas en que la fase “azul” inicial se transforma en la fase roja en el secado. Finalmente, los puntos triangulares identifican superficies en que el recubrimiento seco muestra una mezcla de las fases azul y roja.

Los números en la Tabla 1 asignados a los diversos sustratos se correlacionan con los símbolos en las Figuras 6 y 7.

En una realización de la invención que mantiene la fase “azul” original de los montajes de polidiacetileno en el secado, los sustratos recubiertos presentan ángulos de contacto progresivos con yoduro de metileno por debajo de 50°, como se representa en la Figura 6. Esta condición corresponde a sustratos caracterizados por un componente dispersivo de su energía superficial mayor que 40 dinas/cm (0,040 N/m) en la Figura 7. Para aplicaciones que requieran la retención de la fase “azul” original, la topografía y la energía superficial afectarán a la eficacia del transductor en el sustrato en características tales como contraste de color en la detección y tiempo de durabilidad.

En una realización alternativa, los sustratos con estas propiedades con un ángulo de contacto progresivo con agua menor que 90° dan como resultado recubrimientos secos que contienen una mezcla de las fases azul y roja, como se representa en la Figura 6. Esta condición correspondería a superficies en que el componente de la energía superficial dispersiva podía ser menor que 40 dinas/cm (0,040 N/m) pero con un componente de energía superficial polar mayor que al menos 10 dinas/cm (0,010 N/m) en la Figura 7.

## Ejemplos

Todas las partes, porcentajes, relaciones, etc. en los ejemplos y el resto de la memoria descriptiva son en moles a menos que se indique lo contrario. Todos los disolventes y reactivos sin un suministrador mencionado se adquirieron de Aldrich Chemical; Milwaukee, WI. Se purificó agua por el uso de un purificador de agua Milli-Q U-V con una resistividad de 18,2 Mohms/cm. (Millipore, Bedford MA).

Para las mezclas de diacetileno que se sometieron a ultrasonidos por sonda, se preparó un intervalo de muestras por separación de la disolución inicial de diacetileno en diversos viales para exposición a los ultrasonidos por sonda durante un intervalo de energía y tiempos para determinar los ajustes que inducen el automontaje exitoso en los monómeros de diacetileno. Aunque se hizo exposición a los ultrasonidos por sonda a un ajuste de energía de 5, durante 1 minuto, en los siguientes ejemplos, un experto en la materia sabría que pueden crear empíricamente el mismo resultado ajustes apropiados en energía y tiempo.

Se determinó la respuesta colorimétrica (RC) por el porcentaje en el cambio de color azul representado por la ecuación  $RC = [(PB_{\text{inicial}} - PB_{\text{muestra}}) / PB_{\text{inicial}}] \times 100$  donde PB = color azul en la muestra cuando se determina usando el programa informático de imagen Adobe Photoshop, versión 5.

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura o Nombre Comercial	Descripción
11-Bromo-1-undecanol	$Br(CH_2)_{11}OH$
Ácido 11-bromoundecanoico	$Br(CH_2)_{10}C(O)OH$
TBDMSCI	Cloruro de terc-butildimetilsililo
Diina-1	Bis(trimetilsilil)butadieno Comercialmente disponible de Gelest, Tullytown, PA
THF	Tetrahidrofurano
1-Bromododecano	$Br(CH_2)_{11}CH_3$
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
HMPA	Hexametilfosforamida
1-Bromohexadecano	$Br(CH_2)_{15}CH_3$
Cloruro de metanosulfonilo	
$CH_2Cl_2$	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
cloruro de oxalilo	$ClCOCOCi$
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina; comercialmente disponible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL.
ATCC	Recogida de Cultivos de Tipo Americano
PDC	Dicromato de piridinio
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
KAPA	3-Aminopropilamida de potasio preparada de acuerdo con Abrams, S. R.; Shaw, A.C. <i>Organic Syntheses</i> , <b>1.988</b> , 66,127-131.
PP	Polipropileno
PE	Polietileno
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Poli(fluoruro de vinilideno)



## Ejemplo 1

Preparación de  $\text{HO(O)C(CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

## Etapa 1

Preparación de  $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

En un recipiente de reacción de vidrio, se mezclaron 600 miligramos de 5,7-dodecadiin-1,12-diol ( $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{OH}$ ), 0,275 mililitros de piridina y 10 mililitros de THF. A esta disolución se añadieron 676 miligramos de cloruro de lauroilo y se agitó la mezcla resultante durante 15 horas. La mezcla se diluyó después con dietil éter y se lavó con HCl 0,1 N y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y el disolvente se retiró para producir un sólido blanco. El sólido se purificó sobre gel de sílice (gradiente de 25% a 50% en volumen de acetato de etilo en hexanos) para producir 570 miligramos de  $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  como un sólido blanco.

## Etapa 2

Preparación de  $\text{HO(O)C(CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

En un recipiente de reacción de vidrio, se disolvieron 377 miligramos de  $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  preparados en la Etapa 1, en 3 mililitros de DMF y se añadieron 1,32 gramos de PDC. La mezcla resultante se agitó durante 8 horas y después se dio tratamiento final con agua y dietil éter. Las capas de éter combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se retiró el disolvente para producir un sólido blanco. El sólido se purificó sobre gel de sílice eluyendo con 25/74 /1 de acetato de etilo/hexanos/ácido fórmico en volumen para producir 0,21 gramos de  $\text{HO(O)C(CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  como un sólido blanco.

## Ejemplos 2-5

Preparación de  $\text{HO(O)C(CH}_2)_{a-1}\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_a\text{O(O)C(CH}_2)_b\text{CH}_3$

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 1, mostrado en la Tabla 2, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO(O)C(CH}_2)_{a-1}\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_a\text{O(O)C(CH}_2)_b\text{CH}_3$  (a y b se definen en la Tabla 2).

TABLA 2

Ejemplo	Diol, valor de a	Cloruro de Ácido, valor de b
2	$\text{HO(CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_3\text{OH}$ , a=3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C(O)Cl}$ , b=14
3	$\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C(O)Cl}$ , b=12
4	$\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C(O)Cl}$ , b=14
5	$\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C(O)Cl}$ , b=16

## Ejemplo 6

Preparación de  $\text{HO(O)C(CH}_2)_2\text{C(O)O(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{12}\text{CH}_3$

## Etapa 1

Preparación de  $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{12}\text{CH}_3$

En un recipiente de reacción de vidrio, se mezclaron 4,99 gramos de 5,7-dodecadiin-1,12-diol ( $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{OH}$ ), 2,2. gramos de piridina y 50 mililitros de THF. A esta disolución se añadieron 6,34 gramos de cloruro de miristol y la mezcla resultante se agitó durante 15 horas. La mezcla se diluyó después con dietil éter y se lavó con HCl 0,1 N y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se retiró el disolvente para producir un sólido blanco. El sólido se purificó sobre gel de sílice (15% en volumen de acetato de etilo en diclorometano a gradiente de acetato de etilo al 100%) para producir 5,0 gramos de  $\text{HO(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{12}\text{CH}_3$  como un sólido blanco.

## ES 2 286 511 T3

### Etapa 2

*Preparación de  $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_4C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4O(O)C(CH_2)_{12}CH_3$*

En un tubo sellable, se combinaron 1,41 gramos de  $HO(CH_2)_3C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4O(O)C(CH_2)_{12}CH_3$  preparados en la Etapa 1, 0,435 gramos de anhídrido succínico, 13 mililitros de tolueno y 0,106 gramos de DMAP y se selló el tubo. La mezcla se calentó a 105°C, durante 14,5 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 0,15 mililitros de agua, se volvió a sellar el tubo y se calentó de nuevo a 105°C, durante 30 minutos. La mezcla se diluyó después con dietil éter y se lavó con HCl 0,1 N y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y el disolvente se retiró para producir un sólido blanco. El sólido se purificó sobre gel de sílice eluyendo con 10/89/1 de acetato de etilo/diclorometano/ácido fórmico en volumen para producir 1,70 gramos de  $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_4C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4O(O)C(CH_2)_{12}CH_3$  como un sólido blanco.

### Ejemplos 7-17

*Preparación de  $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_aC\equiv C-C\equiv C(CH_2)_aO(O)C(CH_2)_bCH_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 1, mostrado en la Tabla 3, para dar los compuestos con la estructura general  $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_aC\equiv C-C\equiv C(CH_2)_aO(O)C(CH_2)_bCH_3$  (a y b se definen en la Tabla 3).

TABLA 3

Ejemplo	Diol, valor de a	Cloruro de Ácido, valor de b
7	$HO(CH_2)_2C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_2OH$ , a=2	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)Cl$ , b=10
8	$HO(CH_2)_2C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_2OH$ , a=2	$CH_3(CH_2)_{12}C(O)Cl$ , b=12
9	$HO(CH_2)_2C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_2OH$ , a=2	$CH_3(CH_2)_{14}C(O)Cl$ , b=14
10	$HO(CH_2)_2C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_2OH$ , a=2	$CH_3(CH_2)_{16}C(O)Cl$ , b=16
11	$HO(CH_2)_3C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_3OH$ , a=3	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)Cl$ , b=10
12	$HO(CH_2)_3C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_3OH$ , a=3	$CH_3(CH_2)_{12}C(O)Cl$ , b=12
13	$HO(CH_2)_3C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_3OH$ , a=3	$CH_3(CH_2)_{14}C(O)Cl$ , b=14
14	$HO(CH_2)_3C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_3OH$ , a=3	$CH_3(CH_2)_{16}C(O)Cl$ , b=16
15	$HO(CH_2)_4C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4OH$ , a=4	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)Cl$ , b=10
16	$HO(CH_2)_4C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4OH$ , a=4	$CH_3(CH_2)_{14}C(O)Cl$ , b=14
17	$HO(CH_2)_4C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_4OH$ , a=4	$CH_3(CH_2)_{16}C(O)Cl$ , b=16

### Ejemplo 18

*Preparación de  $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_5C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_5O(O)C(CH_2)_{10}CH_3$*

#### Etapa 1

*Preparación de  $HO(CH_2)_5C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_5OH$*

Se preparó  $HO(CH_2)_5C\equiv CH$  por la isomerización activada de KAPA de  $HOCH_2C\equiv C(CH_2)_3CH_3$  preparado de acuerdo con Miller, J. G.; Oehlschlager, A.C. J. Org. Chem. 1984, 49, 2.332-2.338 o  $HO(CH_2)_2C\equiv C(CH_2)_2CH_3$  (comercialmente disponible de GFS Chemicals; Powell, OH). Se llevó a cabo acoplamiento oxidativo de  $HO(CH_2)_5C\equiv CH$  en un recipiente de reacción de vidrio disolviendo 6,95 gramos de  $HO(CH_2)_5C\equiv CH$  en piridina/metanol (2,0 ml/6,2 ml) y añadiendo 307 gramos de CuCl seguido por agitación en presencia de oxígeno hasta que se consumió todo el material de partida. Se dio tratamiento final a la mezcla de reacción con dietil éter y HCl 4 N, se secaron las capas orgánicas combinadas sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró. La recrystalización del residuo de hexanos/terc-butil metil éter 1/1 produjo 5,35 gramos de  $HO(CH_2)_5C\equiv C-C\equiv C(CH_2)_5OH$ .

## ES 2 286 511 T3

### Etapa 2

*Preparación de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$*

- 5 Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6 Etapa 1 excepto que en vez de 5,7-dodecadiin-1,12-diol se usó el diol preparado en la Etapa 1 anterior.

### Etapa 3

10 *Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6, Etapa 2.

15 Ejemplos 19-21

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$*

- 20 Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 18 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 2, mostrado en la Tabla 4, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$  (b se define en la Tabla 4).

TABLA 4

Ejemplo	Diol	Cloruro de Ácido, valor de b
19	$\text{HO}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=12
20	$\text{HO}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=14
21	$\text{HO}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=16

35 Ejemplos 22-25

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$*

- 40 Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 18, Etapa 1, para preparar el diol  $\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  empezando a partir de 1-heptino. Se siguió el procedimiento restante para el Ejemplo 18 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 2, mostrado en la Tabla 5, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$  (b se define en la Tabla 5).

TABLA 5

Ejemplo	Diol	Cloruro de Ácido, valor de b
22	$\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=10
23	$\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=12
24	$\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=14
25	$\text{HO}(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=16

60 Ejemplos 26-29

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$*

- 65 Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 18, Etapa 1, para preparar el diol  $\text{HO}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{OH}$  empezando a partir de 1-octino. Se siguió el procedimiento restante para el Ejemplo 18 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 2, mostrado en la Tabla 6, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$  (b se define en la Tabla 6).

# ES 2 286 511 T3

TABLA 6

Ejemplo	Diol	Cloruro de Ácido
26	$\text{HO}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=10
27	$\text{HO}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=12
28	$\text{HO}(\text{CH}_2)_7\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=16

Ejemplos 29-32

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 18, Etapa 1, para preparar el diol  $\text{HO}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{OH}$  empezando a partir de 1-decino. Se siguió el procedimiento restante para el Ejemplo 18 usando el diol y cloruro de ácido en la Etapa 2, mostrado en la Tabla 7, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$  (b se define en la Tabla 7).

TABLA 7

Ejemplo	Diol	Cloruro de Ácido, valor de b
29	$\text{HO}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=10
30	$\text{HO}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=12
31	$\text{HO}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=14
32	$\text{HO}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ , b=16

Ejemplo 33

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6 excepto que en la Etapa 2 se usó anhídrido glutárico en vez de anhídrido succínico.

Ejemplo 34

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{CHC}=\text{CHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6 excepto que en la Etapa 1 se usó  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$  en vez de  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{C}(\text{O})\text{Cl}$  y en la Etapa 2 se usó anhídrido maleico en vez de anhídrido succínico.

Ejemplo 35

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(1,2-\text{C}_6\text{H}_4)\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$*

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6 excepto que en la Etapa 2 se usó anhídrido ftálico en vez de anhídrido succínico.

Ejemplo 36

*Preparación de  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$*

Etapa 1

*Preparación de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$*

En un recipiente de reacción de vidrio, se preparó una suspensión de 120 miligramos de hidruro de sodio en 10 ml de DMF seco y se añadieron 972 miligramos de 5,7-dodecadiin-1,12-diol ( $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{OH}$ ). Después

## ES 2 286 511 T3

de agitar durante 5 minutos, se añadieron 1,31 gramos de  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$  y la mezcla resultante se agitó durante 15 horas. La mezcla se enfrió rápidamente después por adición de disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se diluyó con 100 mililitros de dietil éter. Se separó la capa orgánica y se lavó 3 veces con salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se retiró el disolvente para producir un aceite amarillo. El aceite se purificó sobre gel de sílice (25%-35% en volumen de gradiente de acetato de etilo en hexano) para producir 606 miligramos de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$  como un sólido blanco.

### Etapla 2

#### Preparación de $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

En un tubo sellable, se combinaron 181 miligramos de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$  preparados en la Etapa 1, 63 miligramos de anhídrido succínico, 2 mililitros de tolueno y 15 miligramos de DMAP y el tubo se selló. La mezcla se calentó a  $110^\circ\text{C}$ , durante 16 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 3 gotas de agua, se volvió a sellar el tubo y de nuevo se calentó a  $110^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. La mezcla se diluyó después con dietil éter y se lavó con  $\text{HCl}$  0,1 N y salmuera. Se separó la capa orgánica, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se retiró el disolvente para producir un sólido blanco. El sólido se purificó sobre gel de sílice eluyendo con 10/89/1 de acetato de etilo/diclorometano/ácido fórmico en volumen para producir  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$  como un sólido blanco.

### Ejemplos 37-41

#### Preparación de $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{O}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 37 usando el diol y bromuro de alquilo en la Etapa 1, mostrado en la Tabla 8, para dar los compuestos con la estructura general  $\text{HO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_b\text{O}(\text{CH}_2)_b\text{CH}_3$  (a y b se definen en la Tabla 8).

TABLA 8

Ejemplo	Diol, valor de a	Bromuro de Alquilo, valor de b
37	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b\text{Br}$ , b=13
38	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b\text{Br}$ , b=15
39	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , a=4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b\text{Br}$ , b=17
40	$\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , a=5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b\text{Br}$ , b=11
41	$\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ , a=5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b\text{Br}$ , b=13

### Ejemplo 42

Se puso una muestra de 10,1 miligramos del compuesto preparado en el Ejemplo 6, en un recipiente de vidrio y se suspendió en 5 mililitros de isopropanol. La mezcla se calentó a ebullición y se añadieron 10 mililitros de agua a  $70^\circ\text{C}$ . La disolución resultante se hizo hervir hasta que la temperatura alcanzó  $95^\circ\text{C}$  indicando que casi todo el isopropanol se había separado por ebullición. La disolución se enfrió a temperatura ambiente y después a  $4^\circ\text{C}$ , durante 16 horas. Se expuso una alícuota de 2 mililitros de la disolución a luz de 254 nanómetros durante 10 minutos, produciendo un color azul oscuro indicativo de que había tenido lugar la polimerización.

### Ejemplo 43

#### Detección de un péptido de membrana en disolución

Se preparó una muestra de concentración 1,0 miliMolar de monómero de diacetileno preparado como en el Ejemplo 6 y DMPC (6:4) en tampón Tris (2 mM, pH = 8,5) en un recipiente de vidrio, se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos Bronson Modelo #1510 (comercialmente disponible de VWR Scientific Products; West Chester, PA) durante 30 minutos y se puso en un refrigerador a  $4^\circ\text{C}$ , durante aproximadamente 16 horas. La muestra se filtró después por un filtro de inyección de  $1,2\ \mu\text{m}$  y se polimerizó por irradiación de la muestra bajo una lámpara de UV de 254 nm (comercialmente disponible de VWR Scientific Products; West Chester, PA) a una distancia de 3 cm, durante 10 minutos. La polimerización dio como resultado la observación de un color púrpura azulado, característico.

Se determinó la propiedad de detección de la disolución por la adición de  $\sim 80 \mu\text{l}$  de una disolución de sulfato de polimixina B (10.050 unidades/ml) a la muestra. Esto dio como resultado una respuesta colorimétrica rápida que se podía determinar fácilmente visualmente como un cambio de azul a rojo y cuantificar por espectroscopía UV-vis como un desplazamiento desde el pico de absorbancia a 640 nm a un pico de absorbancia a 540 nm en espectros tomados después de una hora a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 44

##### *Detección de un péptido de membrana en un sustrato*

La mezcla de PDA/DMPC polimerizada preparada en el Ejemplo 43 se recubrió en un trozo de una placa de gel de sílice C-18 de fase inversa. La disolución se colocó en la placa y se permitió que se secara a temperatura ambiente dando como resultado manchas azules en la placa de análisis. Para analizar esta forma de estado sólido del sensor, se añadió una disolución de análisis ( $40 \mu\text{l}$ ) de un sulfato de polimixina B (10.050 unidades/ml) a la mancha de la muestra. Esto dio como resultado un cambio de color inmediato ( $<15$  segundos) de azul a rosa. Un análisis de control usando sólo agua milli-Q ( $50 \mu\text{l}$ ) no mostró cambio de color.

#### Ejemplo 45

##### *Detección de Interacciones Péptido - Membrana en Disolución*

Se pesó una mezcla de monómero de diacetileno del Ejemplo 6 y DMPC (6:4) en un vial y se suspendió en tampón Tris (2 mM, pH = 8,5) para producir una disolución de concentración 1 mM y se preparó una disolución de detección polimerizada como en el Ejemplo 43.

Se determinó la propiedad de detección de la disolución por la adición de  $\sim 50 \mu\text{l}$  de una disolución de melitina 1 mM a la muestra. Esto dio como resultado una respuesta colorimétrica rápida que se podía determinar fácilmente visualmente como un cambio de azul a rojo y cuantificar por espectroscopía UV-vis como un desplazamiento del pico de absorbancia a 640 nm a un pico de absorbancia a 540 nm en espectros tomados después de una hora a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 46

##### *Detección de Interacciones Péptido-Membrana en un Sustrato*

Se preparó una placa de análisis usando la disolución de detector polimerizada del Ejemplo 45 usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 44. Se pusieron diversas manchas ( $40 \mu\text{l}$  cada una) de las disoluciones polimerizadas en un trozo de una placa de gel de sílice C-18 de fase inversa. Se permitió que las disoluciones se secaran a temperatura ambiente dando como resultado manchas azules. Para analizar la capacidad de los sustratos para detectar péptidos, se añadieron dos muestras que contenían 15 y 30 nanomoles de melitina respectivamente, a las diferentes manchas en la placa de análisis. Esto dio como resultado un cambio de color inmediato ( $<15$  segundos) de azul a rojo. Las muestras de control de agua milli-Q puestas en manchas de análisis separadas no mostraron cambio de color.

#### Ejemplo 47

##### *Detección de Catálisis Enzimática Superficial por Fosfolipasa A2 en Disolución*

Se preparó una disolución de detección como en el Ejemplo 45. Se determinaron las propiedades de detección de las disoluciones por la adición de  $\sim 50 \mu\text{l}$  de una disolución  $75 \mu\text{M}$  de Fosfolipasa A2 a cada una de las muestras. Esto dio como resultado una respuesta colorimétrica que se podía determinar fácilmente visualmente como un cambio de azul a rojo y cuantificar por espectroscopía UV-vis como un desplazamiento del pico de absorbancia a 640 nm a un pico de absorbancia a 540 nm en espectros tomados después de una hora a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 48

##### *Intento de Detección de Interacciones Péptido-Membrana usando Monómeros Diacetilénicos Comercialmente Disponibles en un Sustrato*

Se usaron mezclas de ácido 10,12-tricosadienoico comercialmente disponible (disponible de GFS Chemicals; Powell, OH) y DMPC (6:4) para crear una disolución detectora y placa de análisis como en el Ejemplo 44. La polimerización dio como resultado la observación de un color púrpura azulado, característico. Poniendo la disolución detectora en las placas para análisis algunas disoluciones se secaron dando como resultado un cambio de color a una mancha roja mientras otras muestras se secaron a una mancha coloreada azul.

Para analizar las propiedades de la detección de la interacción péptido-membrana de los montajes polimerizados en un sustrato, se añadieron 30 nanomoles de melitina (comercialmente disponible de Sigma Aldrich; St. Louis, MO) a las manchas que se secaron a un color azul. Esto no dio como resultado ni cambio de color ni aspecto descolorido que reflejara una RC menor que 5% dependiendo de la preparación de la disolución.

## Ejemplo 49

*Intento de Detección de Interacciones Péptido-Membrana usando Monómeros Diacetilénicos Comercialmente Disponibles en un Substrato 2-D*

Se repitió el Ejemplo 48, excepto que para analizar las propiedades de la detección de la interacción péptido-membrana de los montajes polimerizados en el sustrato, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de sulfato de polimixina B (10.050 unidades/ml) a cada una de las manchas en la placa de análisis. Esto dio como resultado un aspecto descolorido que reflejaba una RC menor que 5% del cambio de color dependiendo de la preparación de la disolución.

## Ejemplo 50

*Detección Indirecta de E. coli en un Substrato*

Se prepararon placas de análisis como en el Ejemplo 46.

Para analizar la detección de *E. coli*, se añadió una disolución de sulfato de polimixina B (10.050 unidades/ml) a un vial que contenía sólo agua milli-Q y a un vial que contenía una suspensión de *E. coli* [ATCC25922,  $\sim 10^9$  bacterias/ml en agua milli-Q]. Después de permitir que las dos muestras se asentaran durante 30 minutos, se filtraron por un filtro de inyección de 0,45  $\mu\text{m}$  y se pusieron 40  $\mu\text{l}$  de cada uno de los eluyentes en manchas secas de la mezcla sensora. Después de 15 minutos se retiró el líquido y se examinaron las placas. La muestra sin *E. coli* y sólo polimixina B mostró un cambio de color a rojo mientras las muestras con tanto *E. coli* como polimixina B no mostraron cambio espectacular de color.

## Ejemplo 51

*Detección de E. coli en un fluido biológico en un Substrato*

Se pesó una mezcla de monómero de diacetileno como se preparó en el Ejemplo 6 y DMPC (6:4) en un vial y se suspendió en tampón HEPES (5 mM, pH = 7,2) para producir una disolución 1 mM. La disolución se sometió después a ultrasonidos de sonda usando un aparato de ultrasonidos de sonda Modelo XL2020 (comercialmente disponible de Misonix, Inc.; Farmington, NY) durante 1 minuto a un ajuste de energía de 5 y se puso en un refrigerador a 4°C durante la noche ( $\sim 16$  horas). La muestra se filtró por un filtro de inyección de 1,2  $\mu\text{m}$  y se consiguió la polimerización de una disolución con agitación por irradiación de la muestra bajo una lámpara UV a 254 nm a una distancia de 3 cm durante 20 minutos, dando como resultado la observación de un color azul. Usando una jeringa, se pusieron diversas manchas (40  $\mu\text{l}$  cada una) de la disolución polimerizada en un trozo de una placa de gel de sílice C-18 de fase inversa. Se permitió que las manchas se secaran a temperatura ambiente dando como resultado manchas azules. Para analizar la detección de *E. coli*, se añadió una disolución de sulfato de polimixina B (10.050 unidades/ml) a una disolución de orina humana y una disolución de orina humana contaminada con *E. coli* [ATCC25922,  $\sim 10^9$  bacterias/ml, en agua milli-Q]. Después de permitir que las muestras se incubaran durante 30 minutos a 37°C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se pusieron 40  $\mu\text{l}$  de cada eluyente en una mancha seca de la disolución de PDA/DMPC. Después de 40 minutos se retiró el líquido y se examinaron las placas. Las manchas mostraron un cambio sustancial de color para la muestra sin *E. coli* y sólo polimixina B presente mientras la muestra con *E. coli* y polimixina B presente presentó poco cambio de color.

## Ejemplo 52

*Detección de lipopolisacárido en un Substrato*

Se pesaron mezclas de monómero de diacetileno como se preparó en el Ejemplo 6 y DMPC (6:4) en viales y se suspendieron en tampón HEPES (5 mM, pH = 7,2) para producir una disolución 1 mM. Se prepararon después placas de análisis en una placa de gel de sílice C-18 de fase inversa como en el Ejemplo 43. Para analizar la detección de lipopolisacárido, se añadieron 1.000  $\mu\text{l}$  de una disolución de sulfato de polimixina B (628 unidades/ml) a 1 ml de disolución de endotoxina sin agua y una disolución de 1 ml de endotoxina sin agua contaminada con lipopolisacárido (10.000 unidades/ml). Después de permitir que las muestras se incubaran durante 30 minutos a 37°C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se pusieron 40  $\mu\text{l}$  de cada disolución en una mancha seca de la disolución PDA/DMPC. Después de 60 minutos se retiró el líquido y se examinaron las placas. La muestra sin lipopolisacárido mostró un cambio de color a rojo mientras la disolución con lipopolisacárido y polimixina B no mostró cambio de color.

## Ejemplo 53

*Detección de lipopolisacárido en un Substrato 2-D usando glicerol*

Se pesaron mezclas de monómero de diacetileno como se prepararon en el Ejemplo 6 y éster 12-(4,4,-dihidroxi-butilroxi)-dodeca-5,7-diínflico del ácido tetradecanoico (1:1) en viales y se suspendieron en tampón HEPES (5 mM, pH = 7,2) para producir una disolución 1 mM. Las disoluciones se sometieron después a ultrasonidos de sonda usando un aparato de ultrasonidos de sonda Modelo XL2020 (comercialmente disponible de Misonix, Inc.; Farmington, NY)

durante 1 minuto a un ajuste de energía de 5 y se puso después en un refrigerador a 4°C durante la noche (~16 horas). Se filtraron las muestras por un filtro de inyección de 1,2  $\mu\text{m}$  y se consiguió la polimerización de una disolución con agitación por irradiación de la muestra bajo una lámpara de UV a 254 nm a una distancia de 3 cm durante 60 segundos, dando como resultado la observación de un color azul intenso. Usando una jeringa, se pusieron diversas manchas (40  $\mu\text{l}$  cada una) de las disoluciones polimerizadas en un trozo de una placa de gel de sílice C-18 de fase inversa. Se permitió que las disoluciones se secaran a temperatura ambiente dando como resultado manchas azules. Para analizar la detección de lipopolisacárido, se añadió una disolución de sulfato de polimixina B (5.025 unidades/ml) a una disolución de endotoxina sin agua y una disolución de endotoxina sin agua contaminada con lipopolisacárido. Después de permitir que las muestras se incubaran durante 30 minutos a 37°C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se pusieron 500  $\mu\text{l}$  de cada disolución en una mancha seca de la disolución PDA/DMPC. Después de 15 minutos de agitación suave, se retiró el líquido y se examinaron las placas. Esto dio como resultado una respuesta colorimétrica que se podía determinar fácilmente visualmente como un cambio de azul a rojo en ausencia de lipopolisacárido.

#### Ejemplo 54

#### 15 *Caracterización de sustratos susceptibles de mantener la fase activa de los montajes de polidiacetileno*

Para determinar las características del sustrato identificado en la Tabla 1, se prepararon superficies de la siguiente manera para su evaluación. Se prepararon las superficies de oro por evaporación de oro en una lámina de silicio pulida, imprimada de cromo. La superficie resultante era altamente reflectante con una rugosidad superficial rms menor que  $1,5 \times 10^{-9}$  m (15 Angstroms) cuando se mide por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) usando el Manual de Referencia de Control de Nanoscopia Versión 4.42; Digital Instruments; Secciones 12.5 y 12.6. Se limpiaron las superficies de oro previamente al uso usando una corriente de nitrógeno seco.

25 Se prepararon las superficies de vidrio limpiándolas en un baño oxidante (comercialmente disponible de Nochromix) durante la noche, seguido por enjuague abundante en agua milli-Q hasta que el agua de enjuague pudo mantener una lámina uniforme sobre la superficie de vidrio sin deshumectación. Se limpiaron las superficies de vidrio previamente al uso usando una corriente de nitrógeno seco.

30 Se usaron superficies de lámina de silicio como se recibieron y se limpiaron previamente a su uso usando una corriente de nitrógeno seco. Se formaron superficies modificadas con las SAM por inmersión de la superficie en una disolución nominalmente 1 mM en concentración de SAM. Se usaron como disolventes bien etanol o cloroformo. Los tiempos de inmersión fueron al menos 24 horas, seguido por enjuague extenso con el disolvente neto usado durante el automontaje. Después se permitió que las muestras se secaran en una caja seca durante la noche previamente a las mediciones del ángulo de contacto.

Todas las demás superficies se usaron como se recibieron. Después de la preparación y el tratamiento, cada muestra se cortó en diversos trozos más pequeños, algunos de los cuales se usaron para las mediciones del ángulo de contacto y algunos para recubrimiento con la disolución de PDA. Para recubrir los sustratos, se pesaron mezclas de monómero de diacetileno como se prepararon en el Ejemplo 6 y DMPC (6:4) en viales y se suspendieron en tampón HEPES (5 mM, pH = 7,2) para producir una disolución 1 mM. Las disoluciones se sometieron después a ultrasonidos de sonda usando un aparato de ultrasonidos de sonda Modelo XL2020 (comercialmente disponible de Misonix, Inc.; Farmington, NY) durante 1 minuto a un ajuste de energía de 5 y se pusieron después en un refrigerador a 4°C, durante la noche (~16 horas). Las muestras se filtraron por un filtro de inyección de 1,2  $\mu\text{m}$  y se polimerizó una disolución agitada por irradiación de la muestra bajo una lámpara UV a 254 nm a una distancia de 3 cm, durante 20 minutos, dando como resultado la observación de un color azul. Usando una jeringa, se pusieron diversas manchas (40  $\mu\text{l}$  cada una) de las disoluciones polimerizadas en una serie de sustratos especificados en la Tabla 1. Se permitió que las disoluciones se secaran a temperatura ambiente y se registró el color resultante de las manchas.

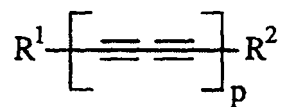


REIVINDICACIONES

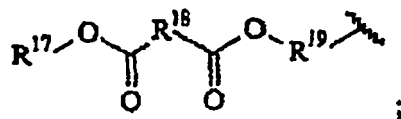
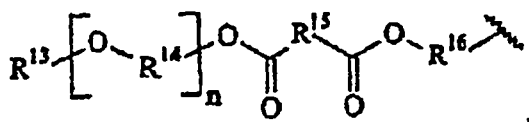
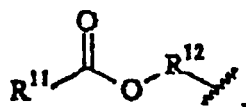
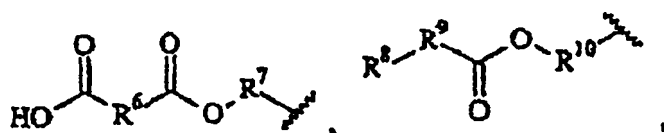
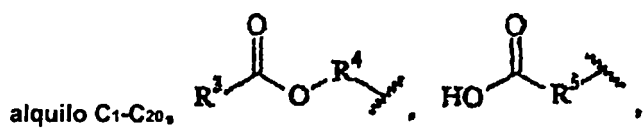
1. Un sensor colorimétrico para detectar un analito, que comprende:

un receptor y

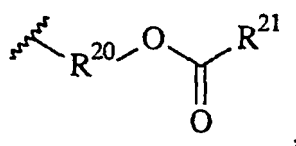
y una composición polimerizada que comprende al menos un compuesto de fórmula:



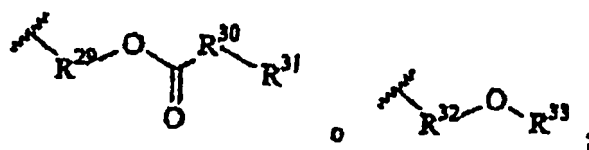
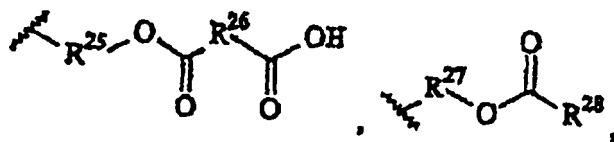
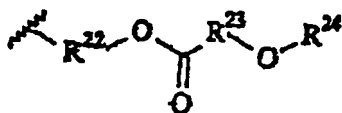
en la que R<sup>1</sup> comprende



o



R<sup>2</sup> comprende



$R^3, R^8, R^{13}, R^{21}, R^{24}, R^{31}$  y  $R^{33}$  son independientemente alquilo  $C_1-C_{20}$ ;

$R^4, R^5, R^7, R^{14}, R^{16}, R^{19}, R^{20}, R^{22}, R^{25}$  y  $R^{32}$  son independientemente alquilenos  $C_1-C_{14}$ ;

$R^6, R^{15}, R^{18}$  y  $R^{26}$  son independientemente: alquilenos  $C_1-C_{14}$ , alquenilenos  $C_2-C_8$  o arilenos  $C_6-C_{13}$ ;

$R^9$  es alquilenos  $C_1-C_{14}$  o  $-NR^{34}-$ ;

$R^{10}, R^{12}, R^{27}$  y  $R^{29}$  son independientemente alquilenos  $C_1-C_{14}$  o (alquilenos  $C_1-C_{14}$ )-(arilenos  $C_2-C_8$ );

$R^{11}$  y  $R^{28}$  son independientemente alquilenos  $C_2-C_{30}$ ;

$R^{17}$  es un grupo activador de éster;

$R^{23}$  es arileno  $C_6-C_{13}$ ;

$R^{30}$  es alquilenos  $C_1-C_{14}$  o  $-NR^{36}-$ ;

$R^{34}$  y  $R^{36}$  son alquilo  $C_1-C_4$ ;

p es 1-5;

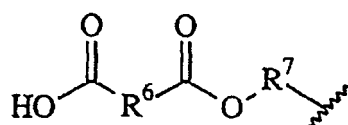
n es 1-20;

en la que  $R^1$  y  $R^2$  no son lo mismo;

en la que el receptor se incorpora en la composición polimerizada para formar un transductor y

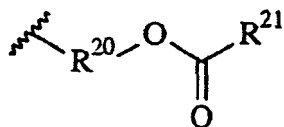
en la que el transductor presenta un cambio de color cuando se pone en contacto con un analito.

2. El sensor según la reivindicación 1, en el que  $R^1$  es



en el que  $R^7$  es: etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, heptametileno, octametileno o nonametileno y  $R^6$  es: etileno, trimetileno, etenileno o fenileno y

en el que  $R^2$  es



en el que  $R^{20}$  es: etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, heptametileno, octametileno o nonametileno y en el que  $R^{21}$  es: undecilo, tridecilo, pentadecilo, heptadecilo y

en el que p es 1.

3. El sensor según la reivindicación 1, en el que el receptor se selecciona del grupo que consiste en fosfolípido y glicerol.

4. El sensor según la reivindicación 1, en el que el transductor está dispersado en una disolución acuosa.

5. El sensor según la reivindicación 1, en el que el transductor está recubierto en un sustrato.

6. El sensor según la reivindicación 5, en el que el sustrato presenta un ángulo de contacto menor que 50 grados usando yoduro de metileno.

7. El sensor según la reivindicación 5, en el que el sustrato se selecciona del grupo que consiste en: placa de gel de sílice, papel, vidrio, papel gráfico texturado, papel gráfico de brillo y película microporosa.

8. El sensor según la reivindicación 1, en el que el receptor está integrado en la composición polimerizada por mezclamiento físico.

9. El sensor según la reivindicación 1, en el que el receptor está unido mediante enlaces covalentes a la composición polimerizada.

10. Un método para la detección de un analito, que comprende

formar el sensor colorimétrico según la reivindicación 1, en el que el receptor se incorpora a la composición polimerizada para formar un transductor capaz de presentar un cambio de color,

poner en contacto el sensor con un analito y

observar un cambio de color si está presente el analito.

11. Un método para la detección de un analito, que comprende

formar el sensor colorimétrico según la reivindicación 1, en el que el receptor se incorpora a la composición polimerizada para formar un transductor capaz de presentar un cambio de color,

poner en contacto el transductor con un analito;

poner en contacto el transductor con una sonda que presente afinidad por tanto el analito como el receptor y

no observar cambio de color si el analito está presente.

12. El método según la reivindicación 11, en el que la sonda y el analito se combinan para formar una mezcla antes de poner en contacto el transductor.

13. El método según la reivindicación 11, en el que la sonda comprende un péptido de ruptura de membrana.

14. El método según la reivindicación 11, en el que la sonda se selecciona del grupo que consiste en: alameticina, magainina, gramicidina, sulfato de polimixina B y melitina.

15. El método según la reivindicación 11, en el que el analito se selecciona del grupo que consiste en bacterias gramnegativas y endotoxina.

## ES 2 286 511 T3

16. Un estuche desechable para detectar la presencia de un analito, que comprende:

uno o más transductores que comprenden el sensor colorimétrico según la reivindicación 1

y un medio para poner en contacto el transductor con un analito.

17. El estuche según la reivindicación 16, que comprende además una o más sondas con afinidad al receptor y uno o más analitos; en el que la sonda está separada físicamente del transductor hasta que se usa el estuche.

18. El estuche según la reivindicación 16, en el que se dispersa uno o más transductores en una disolución acuosa.

19. El estuche según la reivindicación 16, en el que uno o más transductores están recubiertos en un sustrato para formar una disposición.

20. Un método para detectar la presencia de bacterias en un fluido corporal, que comprende la etapa de poner en contacto el sensor según la reivindicación 1 con un fluido corporal.

21. El sensor colorimétrico según la reivindicación 1, que comprende además un análisis de diagnóstico para detectar leucocitos.

22. Un método para detectar la presencia de bacterias en un fluido corporal, que comprende la etapa de poner en contacto el sensor según la reivindicación 21 con un fluido corporal.

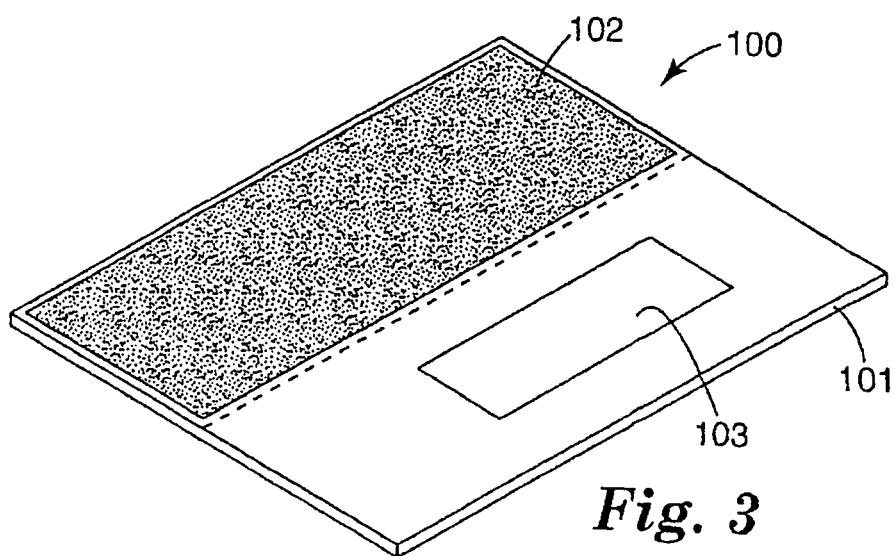
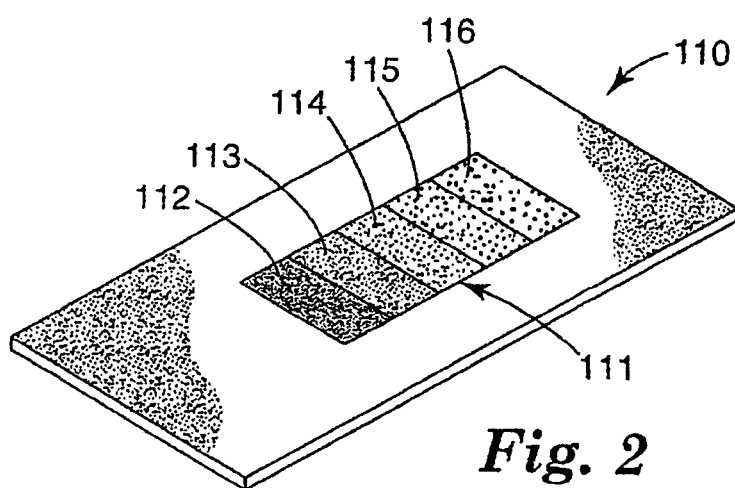
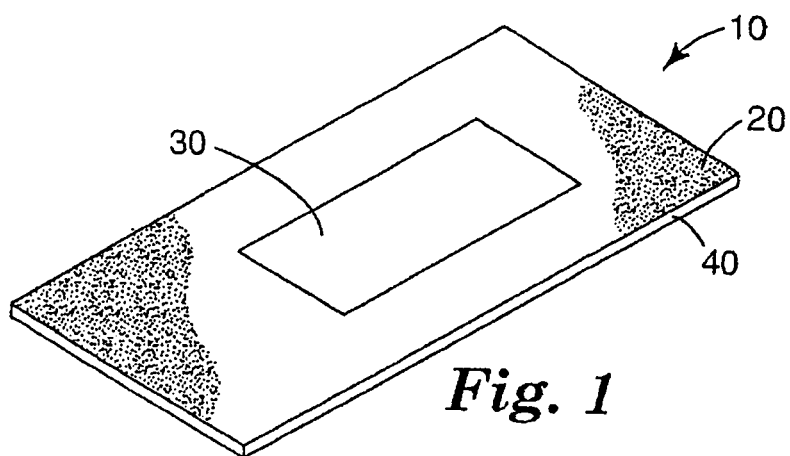
23. El método según la reivindicación 20 ó 21, en el que el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en: orina, mucosidad, exudado de heridas y sangre.

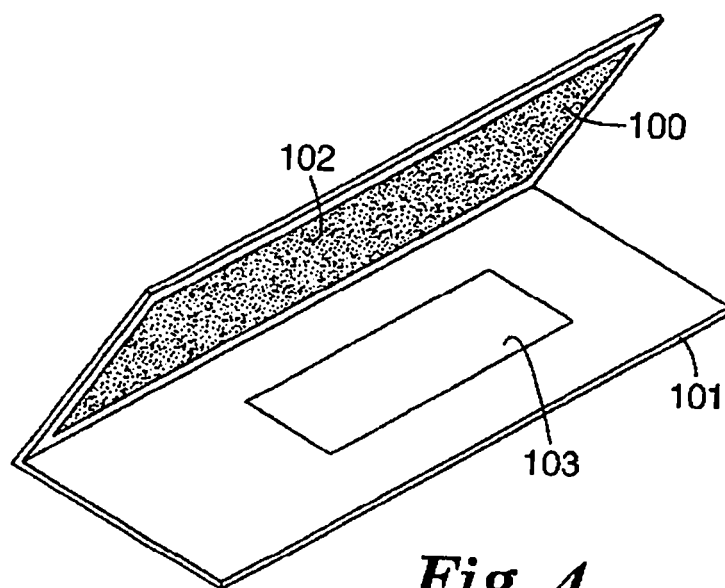
24. Un artículo médico, que comprende un apósito de heridas y el sensor colorimétrico según la reivindicación 1.

25. El artículo médico según la reivindicación 24, en el que el sensor colorimétrico está conectado al lecho de la herida por un sistema de control de fluidos.

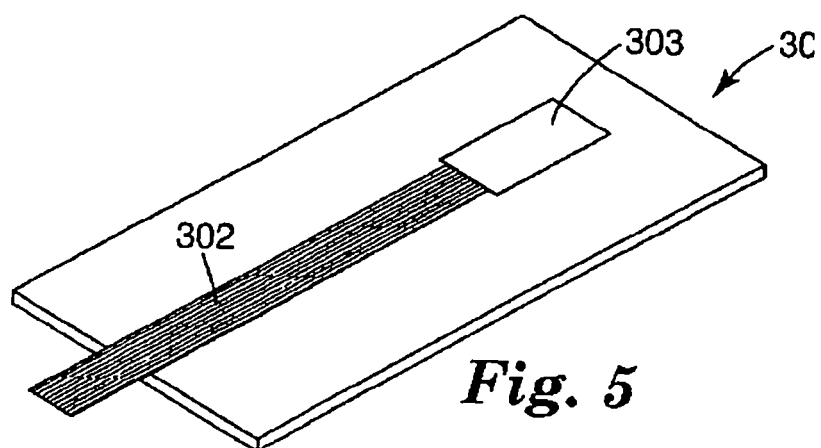
26. El artículo médico según la reivindicación 25, en el que el sistema de control de fluidos es un sistema micro-fluídico.

27. Un método para detectar la presencia de bacterias, comprendiendo el método la etapa de insertar el sensor colorimétrico según la reivindicación 1 en un apósito para heridas.

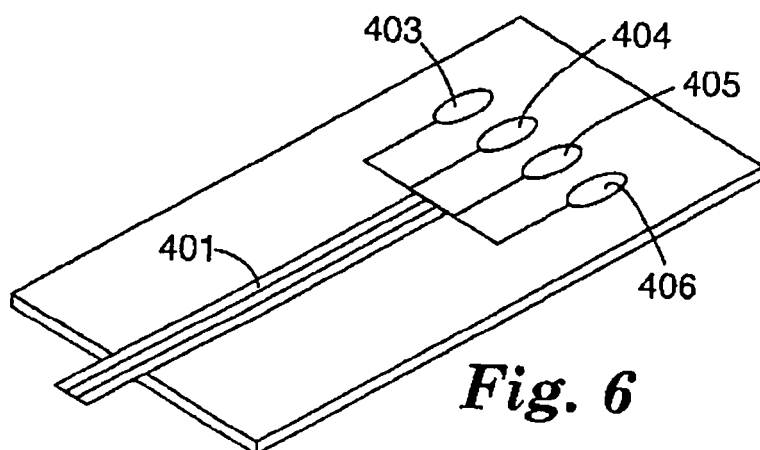




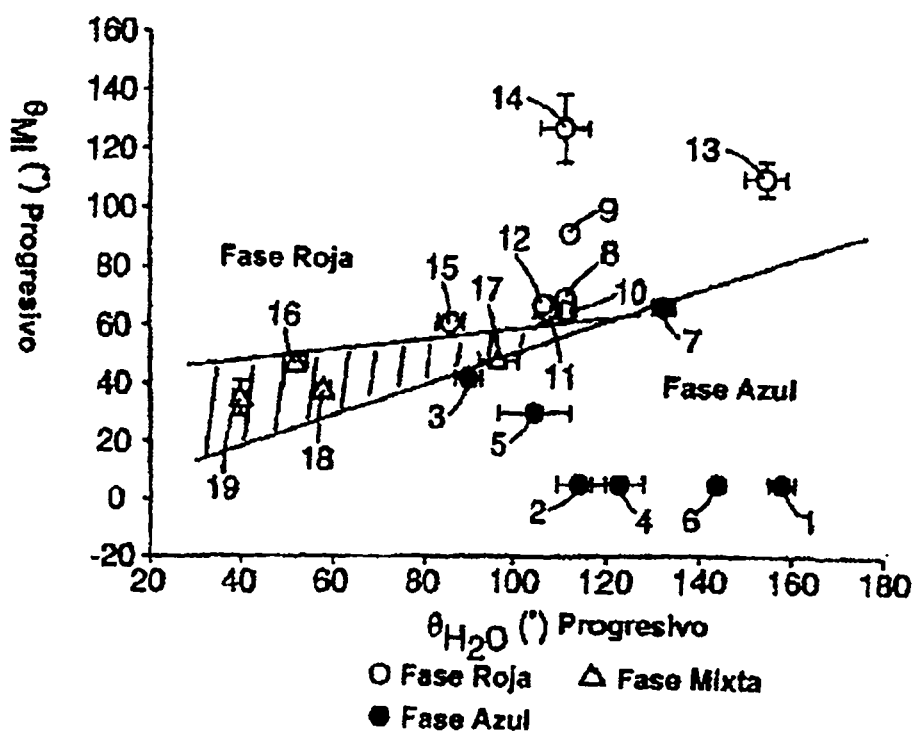
**Fig. 4**



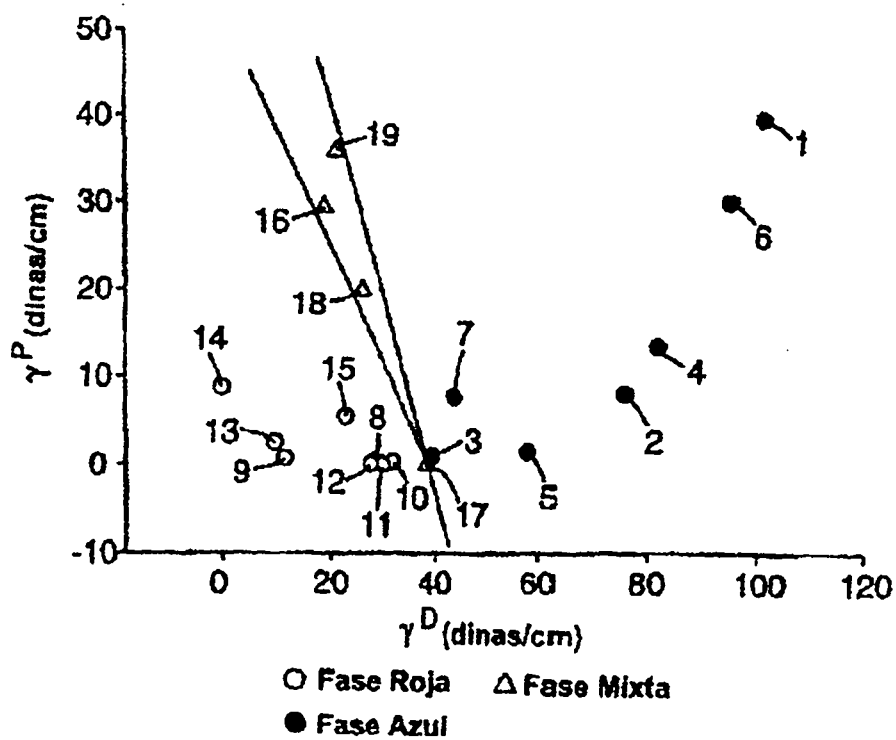
**Fig. 5**



**Fig. 6**



*Fig. 7*



*Fig. 8*