

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 143**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2007 E 07873316 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2164988**

54 Título: **Métodos y materiales fluorescentes para amplificación dirigida de señales de biomarcadores**

30 Prioridad:

**06.10.2006 US 828615 P**

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

**20.04.2016**

73 Titular/es:

**SIRIGEN INC. (100.0%)  
5385 HOLLISTER AVENUE, SUITE 105  
SANTA BARBARA, CA 93111, US**

72 Inventor/es:

**GAYLORD, BRENT S.;  
HONG, JANICE W.;  
FU, TSU-JU y  
SUN, CHENG JUN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 567 143 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y materiales fluorescentes para amplificación dirigida de señales de biomarcadores

5 **Referencia cruzada**

La presente solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/825.615, presentada el 6 de octubre de 2006.

10 **Antecedentes de la invención**

Las sondas de hibridación fluorescentes se han convertido en una herramienta importante en la detección de secuencias específicas de ADN y ARN. Las señales generadas por las etiquetas (o colorantes) fluorescentes añadidas se pueden controlar en tiempo real y proporcionan métodos sencillos, rápidos y sólidos para la detección de dianas y sucesos biológicos. Se ha observado utilidad en aplicaciones que varían desde micromatrices y PCR en tiempo real a hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Un trabajo reciente en el área de cromóforos múltiples, en particular con respecto a un polímero conjugado (CP) ha resaltado el potencial que tienen estos materiales en la mejora de forma significativa de la sensibilidad de detección de este tipo de métodos (Liu y Bazan, Chem. Mater., 2004). Las estructuras de captación de luz de estos materiales se pueden hacer solubles en agua y se pueden adaptar para amplificar la salida de fluorescencia de diversas etiquetas de sonda (Véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 10/600.286, presentada el 20 de junio de 2003 y Gaylord, Heeger, y Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci., 2002).

En particular, los CP catiónicos han mostrado una fuerte afinidad por ácidos nucleicos de carga opuesta, asegurando las distancias requeridas para transferir energía a partir de un polímero fotoexcitado (un dador que capta luz) a un par de sonda/diana etiquetado con fluorescencia. La salida de luz se puede aumentar en 75 veces con respecto al colorante excitado de forma directa solo (Liu y Bazan, J. Am. Chem. Soc., 2005). La amplificación de la señal añade diversos beneficios en formatos de detección tanto homogéneos como heterogéneos.

Los resultados de este tipo indican que los CP son altamente prometedores en el campo del diagnóstico de ácidos nucleicos, en particular cuando las cantidades de muestra son escasas. Sin embargo, existen métodos para la amplificación (o replicación) de dianas de ácido nucleico, es decir, PCR. De forma comparativa, en el campo de reconocimiento de proteínas, no hay métodos sencillos de este tipo para amplificar los materiales a los que se dirigen. Como tal, el aumento de la señal es urgente la aplicación de CP es de gran importancia en esta área.

Algunos anticuerpos etiquetados con colorante se usan de forma regular para la detección de dianas de proteína en aplicaciones tales como inmunohistoquímica, matrices de proteínas, ensayos de ELISA, y citometría de flujo. La integración de los materiales de CP en metodologías de este tipo prometen proporcionar un impulso espectacular en el rendimiento de tales ensayos, lo que permite niveles de detección previamente inalcanzables con colorantes convencionales. *An et al.* (Macromolecular Rapid Communications. Vol. 27 (13), páginas 993-997, 2006) desvela un ensayo de proteína fluorescente de métrica proporcional que usa un polímero conjugado. Un polímero catiónico conjugado y una sonda de fluoresceína biotinilada con carga negativa se usaron para detectar estreptavidina a través de una disminución de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

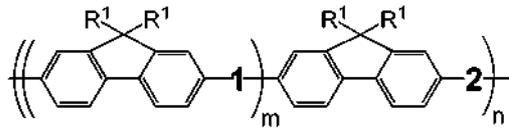
45 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un complejo multicromóforo que incluye un multicromóforo unido de forma covalente al menos una biomolécula como se define en la reivindicación 1.

En una realización, el polímero conjugado es un polímero conjugado catiónico. En otra realización el polímero conjugado es un polímero conjugado aniónico. En una realización más el polímero conjugado es un polímero conjugado con carga neutra.

En realizaciones, el multicromóforo incluye sitios de bioconjugación que incluyen, pero no se limitan a, maleimida, tiol, éster de succinimido (éster NHS), amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo), amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]•TFA), y Sulfo-SBED ([2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinimidilo).

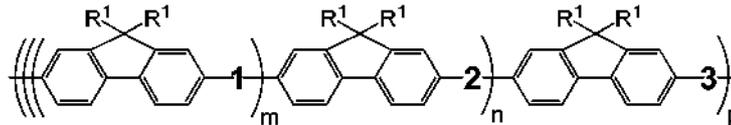
El multicromóforo del complejo tiene la estructura:



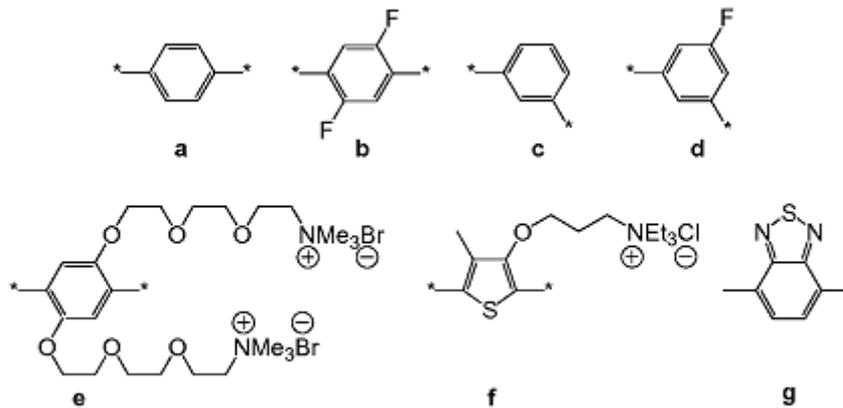
en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

5

En algunas realizaciones, el multicromóforo del complejo tiene la estructura:



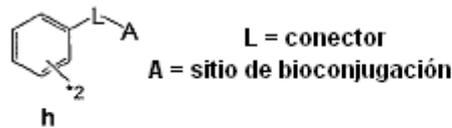
10 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato. En realizaciones en particular, 1, y 2 pueden incluir grupos de unión a - g que tienen la estructura:



\* = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

15

Además, 3 puede ser el grupo h que tiene la estructura:

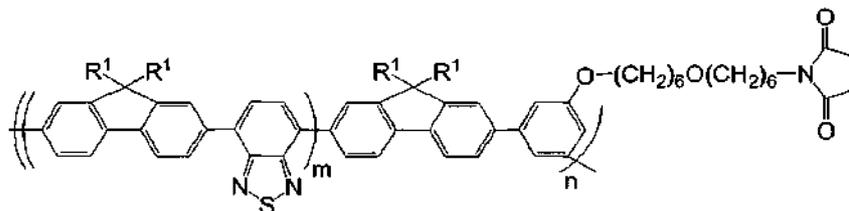


L = conector

A = sitio de bioconjugación

\* = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

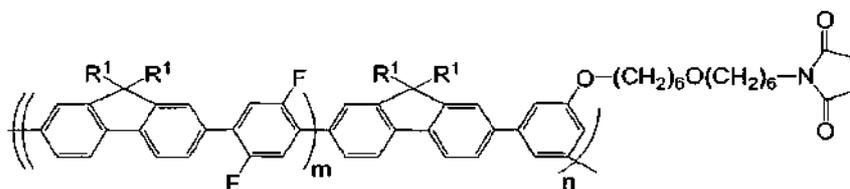
20 En otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:



en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización que incluye, pero no se limita a, oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

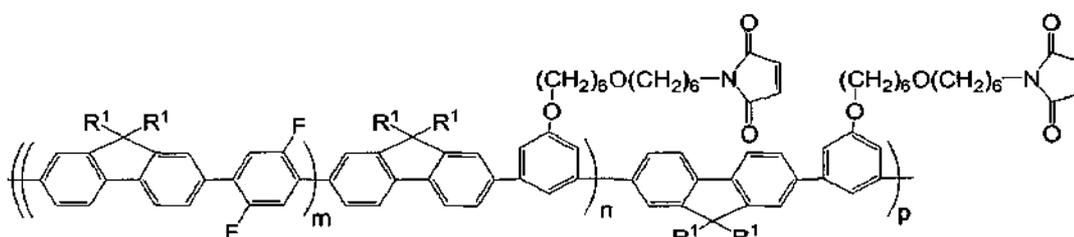
25

Además en otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:



- 5 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

En otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:



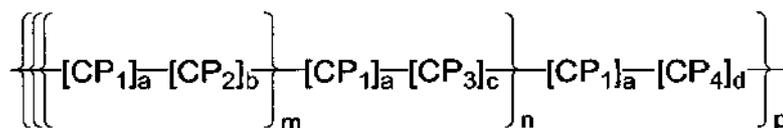
- 10 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización, que incluye oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

- 15 En general, en otro aspecto se proporciona un complejo multicromóforo para identificar una biomolécula diana que incluye un multicromóforo, una biomolécula de sensor unida de forma covalente al multicromóforo, un cromóforo de señalización unido de forma covalente al multicromóforo, en el que el cromóforo de señalización es capaz de recibir energía del multicromóforo después de excitación del multicromóforo y la biomolécula de sensor es capaz de interactuar con la biomolécula diana. En una realización tanto el cromóforo de señalización como la biomolécula de sensor se unen de forma covalente al multicromóforo a través de una pluralidad de conectores. En una realización alternativa tanto el cromóforo de señalización como la biomolécula de sensor se unen de forma covalente al multicromóforo a través de un conector trifuncionalizado que se une de forma covalente al multicromóforo, el cromóforo de señalización y la biomolécula de sensor.

- 25 En una realización el conector tiene una química de unión que incluye, pero no se limita a, maleimida/tiol, éster de succimidilo (éster NHS)/amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida)/amina, amina/Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo)/tiol, y amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]-TFA)/tiol. En una realización en particular el multicromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico.

- 30 En general, en otro aspecto se proporciona un método de ensayo que incluye las etapas de proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un complejo multicromóforo que comprende un multicromóforo, un cromóforo de señalización unido de forma covalente y una biomolécula de sensor unida de forma covalente, en el que el cromóforo de señalización es capaz de recibir energía del multicromóforo después de excitación del multicromóforo y la biomolécula de sensor es capaz de interactuar con la biomolécula diana, poner en contacto la muestra con el complejo de multicromóforo en una solución en condiciones en las que la biomolécula de sensor se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente, aplicar una fuente de luz a la muestra que puede excitar el multicromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización. En una realización en particular el multicromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico.

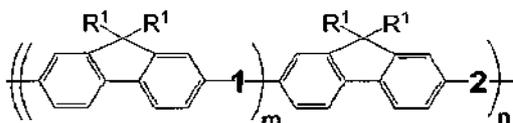
- 45 En general, en otro aspecto se proporciona un método de ensayo que incluye las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un primer bioconjugado conjugado con un cromóforo de señalización y que es capaz de interactuar con la biomolécula diana, proporcionar un segundo bioconjugado conjugado con un multicromóforo, en el que el cromóforo incluye la estructura



en la que CP1, CP2, CP3, y CP4 son segmentos de polímero o estructuras oligoméricas conjugados opcionalmente sustituidos, que son iguales o diferentes entre sí, en la que el segundo bioconjugado se puede unir al primer bioconjugado y en la que después de tal excitación de unión del multicromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización, poner en contacto la muestra con el primer bioconjugado en una solución en condiciones en las que el primer bioconjugado se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente, poner en contacto la solución con el segundo bioconjugado, aplicar una fuente de luz a la muestra que puede excitar el multicromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización. En una realización CP1, CP2, CP3, y CP4 son unidades aromáticas de repetición, que incluyen, pero no se limitan a, benceno, naftaleno, antraceno, fluoreno, tiofeno, furano, piridina, y oxadiazol, cada una opcionalmente sustituida, y en la que CP3 y CP4 pueden contener uno o más sitios de bioconjugación únicos, unidos por un conector. En una realización en particular el multicromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

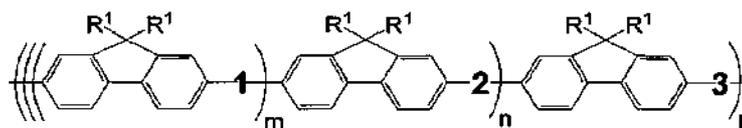
En una realización relacionada el multicromóforo tiene sitios de bioconjugación que incluyen, pero no se limitan a, maleimida, tiol, éster de succinidilo (éster NHS), amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo), amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]•TFA), y Sulfo-SBED ([2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinimidilo).

En una realización en particular el multicromóforo tiene la estructura:



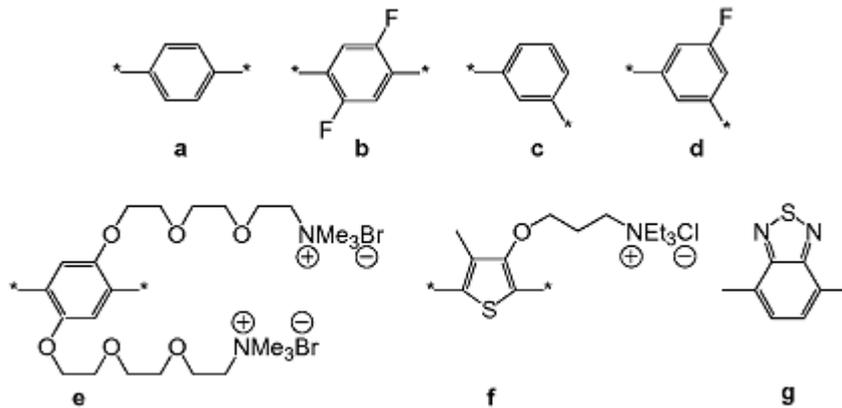
en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

En otra realización el multicromóforo tiene la estructura:



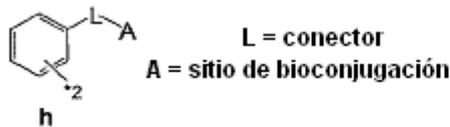
en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

En una realización adicional, 1, y 2 pueden incluir uno o más grupos de unión a - g que tienen la estructura:



\* = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

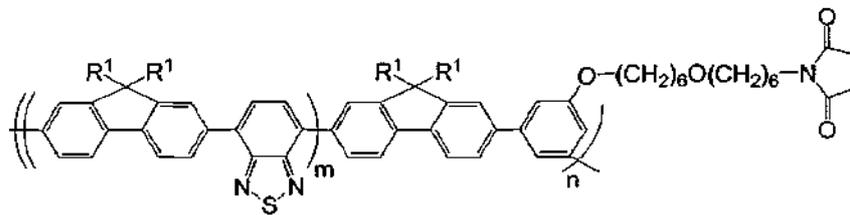
En una realización 3 es el grupo h y tiene la estructura:



\* = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

5

En otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:

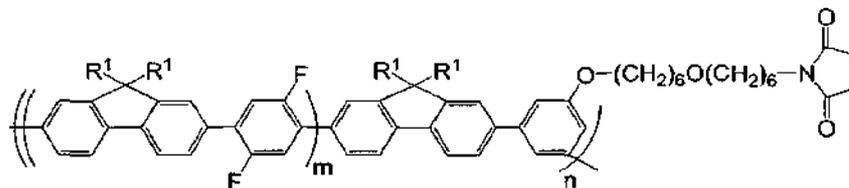


10

en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización que incluye, pero no se limita a, oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

En otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:

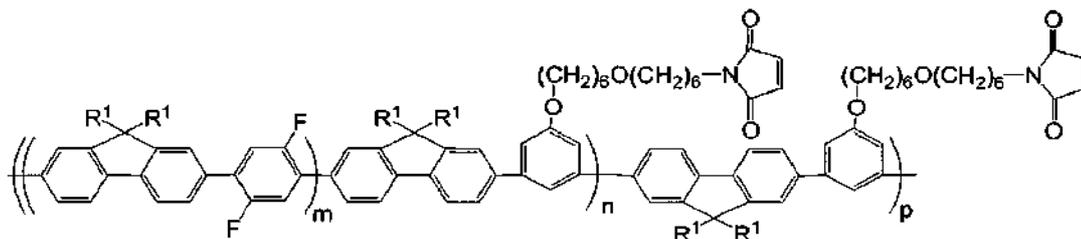
15



en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización que incluye, pero no se limita a, oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato.

20

En otra realización, el multicromóforo del complejo puede tener la estructura:



en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización, que incluyen, pero no se limitan a, oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio, y sales de alcoxi ω-sulfonato. En una realización en particular el multichromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

En una realización al menos uno del primer y segundo bioconjugados es un anticuerpo. En una realización en particular el primer y segundo bioconjugados son anticuerpos.

En general, en otro aspecto se proporciona un método de ensayo que incluye las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un multichromóforo que comprende un primer bioconjugado unido de forma covalente, proporcionar un complejo de biomolécula de sensor que comprende una biomolécula de sensor capaz de interactuar con la molécula diana, un cromóforo de señalización, y un segundo bioconjugado unido de forma covalente capaz de unirse con el primer bioconjugado, en el que después de tal excitación de unión del multichromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización, poner en contacto la muestra con el complejo de biomolécula de sensor en una solución en condiciones en las que la biomolécula de sensor se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente, poner en contacto la solución con el multichromóforo, aplicar una fuente de luz a la muestra que puede excitar el multichromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización. En una realización en particular el multichromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

En una realización el primer y segundo bioconjugados incluyen, pero no se limitan a, una proteína, un anticuerpo y un ácido nucleico. En una realización relacionada el primer bioconjugado es estreptavidina o biotina, la biomolécula de sensor es un anticuerpo, y el segundo bioconjugado es biotina en la que el primer bioconjugado es estreptavidina o biotina en la que el primer bioconjugado es estreptavidina. En otra realización el primer bioconjugado es estreptavidina o biotina, la biomolécula de sensor es un ácido nucleico y el segundo bioconjugado es biotina en la que el primer bioconjugado es estreptavidina o biotina en la que el primer bioconjugado es estreptavidina.

En general, en otro aspecto se proporciona un complejo de biorreconocimiento para identificar una biomolécula. El complejo puede incluir un bioconjugado, un cromóforo de señalización unido de forma covalente al bioconjugado, un multichromóforo unido de forma covalente al bioconjugado, en el que la excitación del multichromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización.

En una realización el bioconjugado puede incluir, pero no se limita a, un anticuerpo o estreptavidina. En una realización en particular el multichromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

En general, en un aspecto se proporciona un método de ensayo que incluye las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un complejo de biorreconocimiento que comprende un bioconjugado, un cromóforo de señalización unido de forma covalente al bioconjugado y un multichromóforo unido de forma covalente al bioconjugado, en el que la excitación del multichromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización, poner en contacto la muestra con el complejo de biorreconocimiento en una solución en condiciones en las que el bioconjugado se puede unir a la biomolécula diana o una biomolécula asociada a diana si estuviera presente, aplicar una fuente de luz a la solución que puede excitar al multichromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización. En una realización en particular el multichromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

En general en otro aspecto, se proporciona un complejo de biorreconocimiento para identificar una biomolécula diana que incluye un bioconjugado, un multichromóforo unido de forma covalente al bioconjugado, y un cromóforo de señalización unido de forma covalente al multichromóforo, en el que la excitación del multichromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización. En una realización el bioconjugado es un anticuerpo. En otra realización el bioconjugado es estreptavidina. En una realización en particular el multichromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero

conjugado con carga neutra.

5 En general en otro aspecto se proporciona un método de ensayo que incluye las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un complejo de biorreconocimiento que comprende un complejo de bioconjugado que comprende un bioconjugado, un multicromóforo unido de forma covalente al bioconjugado, y un cromóforo de señalización unido de forma covalente al multicromóforo, en el que la excitación del multicromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización, poner en contacto la muestra con el complejo de biorreconocimiento en una solución en condiciones en las que el bioconjugado se puede unir a la biomolécula diana o una biomolécula asociada a diana si estuviera presente, aplicar una fuente de luz a la solución que puede excitar al multicromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización. En una realización en particular el multicromóforo es un polímero conjugado, por ejemplo un polímero conjugado policatiónico, un polímero conjugado aniónico y/o un polímero conjugado con carga neutra.

15 En otro aspecto se proporcionan métodos al igual que en cualquiera de un número de los métodos desvelados en el presente documento en los que la expresión de un gen se detecta después de la detección de la biomolécula diana.

20 En otro aspecto se proporcionan métodos al igual que en cualquiera de un número de los métodos desvelados en el presente documento en los que la detección de la biomolécula diana proporciona un resultado usado para diagnosticar una patología de un paciente. En una realización el método para diagnosticar una enfermedad incluye las etapas de revisar o analizar datos con respecto a la presencia de una biomolécula diana en una muestra; y proporcionar una conclusión a un paciente, un proveedor de cuidados para la salud o un gestor de cuidados para la salud, conclusión que se basa en la revisión o análisis de los datos con respecto al diagnóstico de la enfermedad. En una realización relacionada se proporciona una conclusión que incluye transmisión de los datos sobre una red.

25 En general, en otro aspecto se proporcionan kits para identificar una biomolécula diana. En una realización un kit incluye un multicromóforo, una biomolécula de sensor unida de forma covalente al multicromóforo, un cromóforo de señalización unido de forma covalente al multicromóforo, en el que el cromóforo de señalización es capaz de recibir energía del multicromóforo después de excitación del multicromóforo y la biomolécula de sensor es capaz de interactuar con la biomolécula diana. En una realización en particular el kit incluye adicionalmente un sustrato.

### Breve descripción de las figuras

35 Las nuevas características de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrán por referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se usa en los principios de la invención, y las figuras adjuntas de las que:

- 40 FIG. 1. Representación esquemática de unión electrostática de un multicromóforo en una realización de la invención.  
 FIG. 2. Representación de excitación directa de un anticuerpo etiquetado con FITC que ilustra la emisión amplificada del colorante (izquierda) y una representación esquemática de la estructura de un multicromóforo de una realización de la invención (derecha).  
 45 FIG. 3. Representación de excitación directa de un anticuerpo etiquetado con Cy3 que ilustra la emisión amplificada del colorante (izquierda) y una representación esquemática de la estructura de un multicromóforo de una realización de la invención (derecha).  
 FIG. 4. Representación esquemática de un multicromóforo bioconjugado de una realización de la invención.  
 FIG. 5. Representación esquemática de un multicromóforo conjugado con un anticuerpo (izquierda) o un colorante (derecha).  
 50 FIG. 6. Representación esquemática de un multicromóforo conjugado con un anticuerpo secundario que se une a un anticuerpo primario etiquetado con colorante.  
 FIG. 7. Representación esquemática de un multicromóforo conjugado a estreptavidina para unión a un anticuerpo primario etiquetado con colorante y biotina (izquierda) o un ácido nucleico etiquetado con colorante y biotina (derecha).  
 55 FIG. 8. Representación esquemática de un multicromóforo conjugado con un anticuerpo que se conjuga con un colorante (izquierda) y un multicromóforo conjugado con estreptavidina que se conjuga con un colorante (derecha).  
 FIG. 9. Representación esquemática de la estructura de un multicromóforo de una realización de la invención. La  
 FIG. 10. Representación esquemática de un monómero que tiene un sitio de bioconjugación.  
 60 FIG. 11. Representación esquemática de una ruta de síntesis para un monómero de una realización.  
 FIG. 12. Representación esquemática de una ruta de síntesis para un monómero de otra realiza.  
 FIG. 13. Representación esquemática de un multicromóforo bioconjugado con un colorante y una biomolécula a través de conectores (izquierda) o a través de un conector trifuncionalizado (derecha).  
 65 FIG. 14. Representación esquemática de un multicromóforo conjugado tanto con un colorante como con un anticuerpo (izquierda) y un multicromóforo conjugado tanto con un colorante como con una proteína (derecha).

- FIG. 15. Representación de detección individual y múltiple de sondas de ADN etiquetadas con dos colorantes.
- FIG. 16. Representación esquemática de un multicromóforo unido a un colorante y un anticuerpo secundario específico para un anticuerpo primario que se dirige a una proteína.
- 5 FIG. 17. Representación esquemática de un multicromóforo unido a un colorante y estreptavidina para unión con biotina en un anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario se muestra como específico para un anticuerpo primario que se dirigía una proteína.
- FIG. 18. Representación esquemática de la estructura de un multicromóforo de polímero conjugado desvelado en el presente documento.
- 10 FIG. 19. Representación esquemática de la estructura de multicromóforos de polímero conjugado de realizaciones de la invención.
- FIG. 20. Representación esquemática de la estructura de diversas unidades aromáticas de realizaciones de la invención.
- FIG. 21. Representación esquemática de la estructura de multicromóforos de polímero conjugado que tienen sitios de bioconjugación de maleimida.
- 15 FIG. 22. Diagrama de bloques que muestra un dispositivo lógico representativo a modo de ejemplo.
- FIG. 23. Diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de un kit.
- FIG. 24. Representación de un análisis de espectroscopía de infrarrojos (IR) de una realización de la invención.
- La FIG. 25. Representación de los espectros ópticos de una realización de la invención.
- FIG. 26. Representación de los espectros de fluorescencia de una realización de la invención.
- 20 FIG. 27A. Representación esquemática de la estructura que se refiere a biotilación de una realización de la invención.
- FIG. 27B. Representación esquemática de un ensayo de unión de biotina-avidina desvelado en el presente documento.
- FIG. 27C. Representación de los espectros de fluorescencia que se refieren a un ensayo de unión de biotina-avidina desvelado en el presente documento.
- 25 FIG. 28. Representación de un análisis de espectroscopía de infrarrojos (IR) de otra realización de la invención.
- La FIG. 29. Representación de los espectros ópticos de otra realización de la invención.
- FIG. 30A. Representación esquemática de una estructura de polímero de control.
- FIG. 30B. Representación esquemática de una estructura de polímero experimental que se refiere a una realización de la invención.
- 30 FIG. 30C. Representación de los espectros de fluorescencia que se refieren a dicho control un polímero experimental.
- FIG. 31A. Esquemas de estructuras de polímero de control y de polímero experimental que se refieren a una realización de la invención.
- 35 FIG. 31B. Representación esquemática de un ensayo de fluorescencia que se refiere a polímeros de control y experimentales.
- FIG. 32A. Representación de los espectros de fluorescencia para una realización de un polímero de la invención.
- La FIG. 32B. Representación que muestra valores corregidos para espectros de fluorescencia de una realización de la invención.
- 40 FIG. 33A. Representación de la intensidad de la señal de fluorescencia para un polímero de una realización de la invención.
- FIG. 33B. Representación de la amplificación de señales que se refiere a un polímero de una realización de la invención.
- FIG. 34. Representación de los espectros ópticos de una realización adicional de la invención.
- 45 FIG. 35A. Representación esquemática de un ensayo de unión de biotina-avidina de la invención.
- FIG. 35B. Representación de la emisión de fluoresceína para una realización de la invención.
- FIG. 36A. Representación esquemática de una estructura de polímero que se refiere a una realización de la invención.
- FIG. 36B. Representación esquemática de un ensayo de fluorescencia que se refiere a un polímero de una realización de la invención.
- 50 FIG. 36C. Representación de los espectros de fluorescencia para una realización de un polímero de la invención.

### Descripción detallada de la invención

- 55 Aunque algunas estructuras de multicromóforo cargado e interacciones electrostáticas básicas pueden ser eficaces para la amplificación de anticuerpos etiquetados con colorante, algunos métodos más dirigidos de asociación de multicromóforos pueden asegurar fondos más bajos y mejora de la señalización. Los materiales de multicromóforo se pueden conjugar directamente (unir de forma covalente) con anticuerpos y/o colorantes proporcionando control añadido (distancias multicromóforo-colorante) en el ensayo. básicamente, el colorante de señalización se acopla
- 60 muy de cerca con el polímero de amplificación. Además, la conjugación de los multicromóforos no se limita a colorantes o anticuerpos; en su lugar, los multicromóforos se pueden conjugar con cualquier diversidad de biomoléculas, que incluyen proteínas (tales como avidina/estreptavidina), ácidos nucleicos, ligandos de afinidad, azúcares, lípidos, péptidos, y sustratos para enzimas. Estos formatos se pueden aplicar a una gran diversidad de aplicaciones tales como micromatrices de ADN, ensayos de FISH, ensayos de PCR, y también incluyen las
- 65 aplicaciones de detección basadas en proteínas que se han descrito anteriormente. Las propiedades de los materiales de polímero permiten adicionalmente la amplificación de más de un colorante usando una sola longitud de

onda de excitación (láser, filtro, etc). Esto permite la detección simultánea de múltiples dianas (multiplexación). Algunos detalles adicionales que se refieren a multicromóforos y sus usos se desvelan en los siguientes documentos: Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 11/329.495, presentada el 10 de enero de 2006, publicada como documento US 2006-0183140 A1; Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 11/329.861, presentada el 10 de enero de 2006, publicada como documento US 2006-0216734 A1; Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 11/344.942, presentada el 31 de enero de 2006, publicada como documento US 2006-0204984 A1; Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/648.945, presentada el 26 de agosto de 2003, publicada como documento US 2004-0142344 A1; Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/600.286, presentada el 20 de junio de 2003, publicada como documento US 2004-0219556 A1; Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/666.333, presentada el 17 de septiembre de 2003, publicada como documento US 2005-0059168 A1; y Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/779.412, presentada el 13 de febrero de 2004, publicada como documento US 2005-0003386 A1.

Antes de describir la presente invención con mayor detalle, se debe entender que la presente invención no se limita a la metodología, dispositivos, soluciones o aparatos descritos en particular, dado que tales métodos, dispositivos, soluciones o aparatos pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es para la finalidad de describir solamente realizaciones en particular, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención.

El uso de las formas "un", "uno" y "el" en singular incluyen preferencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un sensor de agregación" incluye una pluralidad de sensores de agregación, la referencia a "una sonda" incluye una pluralidad de sondas, y similares. Además, el uso de referencias específicas en plural, tales como "dos", "tres", etc., leídas en números más grandes se refieren al mismo objeto a menos que el contexto lo indique claramente de otro.

Los términos tales como "conectado", "asociado", "conjugado" y "unido" se usan indistintamente en el presente documento que incluyen conexión, asociación, unión o conjugación directa así como indirecta a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo; en un ejemplo, la expresión "polímero conjugado" se usa de acuerdo con su significado habitual en la técnica y se refiere a un polímero que contiene una serie prolongada de enlaces insaturados, y ese contexto indica que el término "conjugado" se debería interpretar como algo más que simplemente una conexión, asociación o unión directa o indirecta.

Cuando se menciona un intervalo de valores, se debe entender que cada valor entero que aparece, y cada fracción del mismo, entre los límites superior e inferior de ese intervalo mencionados también se desvelan de forma específica, junto con cada subintervalo entre tales valores. Los límites superior e inferior de cualquier intervalo se pueden incluir independientemente o excluir del intervalo, y cada intervalo en el que se incluye cualquiera, ninguno o ambos límites también está incluido dentro de la invención. Cuando un valor que se está analizando tiene límites inherentes, por ejemplo cuando un componente puede estar presente a una concentración de un 0 % a un 100 %, o cuando el pH de una solución acuosa puede variar de 1 a 14, esos límites inherentes se desvelan de forma específica. Cuando un valor se menciona de forma explícita, se debe entender que los valores que tienen aproximadamente la misma cantidad o suma que el valor mencionado también están dentro del alcance de la invención, ya que son intervalos basados en los mismos. Cuando se desvela una combinación, cada subcombinación de los elementos de esa combinación también se desvela de forma específica y está dentro del alcance de la invención. Por el contrario, cuando se desvelan diferentes elementos o grupos de elementos, también se desvelan combinaciones de los mismos. Cuando se desvela cualquier elemento de una invención como con una pluralidad de alternativas, algunos ejemplos de esa invención en la que cada alternativa se excluye de forma individual o en cualquier combinación con las otras alternativas también se desvelan por la presente; más de un elemento de una invención puede tener tales exclusiones, y todas las combinaciones de elementos que tienen tales exclusiones se desvelan por la presente.

A menos que se defina de otro modo o el contexto lo indique claramente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento se puede usar en la práctica o ensayo de la invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento son para la finalidad de desvelar y describir los materiales y metodologías en particular para los que se mencionó la referencia. Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento nada se debe interpretar como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a tal divulgación en virtud de la invención anterior.

#### Definiciones

En la descripción de la presente invención, se usarán los siguientes términos, y se pretende su definición como se indica a continuación.

- "Alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado, no ramificado o cíclico de 1 a 24 átomos de carbono opcionalmente sustituido en una o más posiciones, que incluye compuestos policíclicos. Algunos ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo opcionalmente sustituido, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, hexiloctilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares, así como grupos cicloalquilo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, adamantilo, y norbornilo. La expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Algunos sustituyentes a modo de ejemplo en grupos alquilo sustituido incluyen hidroxilo, ciano, alcoxi, =O, =S, -NO<sub>2</sub>, halógeno, haloalquilo, heteroalquilo, carboxialquilo, amina, amida, tioéter y -SH.
- "Alcoxi" se refiere a un grupo "-Oalquilo", en el que alquilo es como se ha definido anteriormente. Un grupo "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi que contiene de uno a seis, más preferentemente de uno a cuatro, átomos de carbono.
- "Alquenilo" se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado, no ramificado o cíclico de 2 a 24 átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Algunos ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), 1-metilvinilo, ciclopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1,4-butadienilo, ciclobutenilo, 1-metilbut-2-enilo, 2-metilbut-2-en-4-ilo, prenilo, pent-1-enilo, pent-3-enilo, 1,1-dimetilalilo, ciclopentenilo, hex-2-enilo, 1-metil-1-etilalilo, ciclohexenilo, heptenilo, cicloheptenilo, octenilo, ciclooctenilo, decenilo, tetradecenilo, hexadecenilo, eicosenilo, tetracosenilo y similares. En el presente documento, los grupos alquenilo preferentes contienen de 2 a 12 átomos de carbono. La expresión "alquenilo inferior" se refiere a un grupo alquenilo de 2 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 4 átomos de carbono. El término "cicloalquenilo" se refiere a un grupo alquenilo cíclico de 3 a 8, preferentemente de 5 o 6, átomos de carbono. Algunos sustituyentes a modo de ejemplo en grupos alquenilo sustituido incluyen hidroxilo, ciano, alcoxi, =O, =S, -NO<sub>2</sub>, halógeno, haloalquilo, heteroalquilo, amina, tioéter y -SH.
- "Alqueniloxi" se refiere a un grupo "-Oalquenilo", en el que alquenilo es como se ha definido anteriormente.
- "Alquilarilo" se refiere a un grupo alquilo que se une de forma covalente a un grupo arilo. Preferentemente, el alquilo es un alquilo inferior. Algunos grupos alquilarilo a modo de ejemplo incluyen bencilo, fenetilo, fenopropilo, 1-benciletilo, fenobutilo, 2-bencilpropilo y similares.
- "Alquilariloxi" se refiere a un grupo "-Oalquilarilo", en el que alquilarilo es como se ha definido anteriormente.
- "Alquinilo" se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado o no ramificado de 2 a 24 átomos de carbono que contiene al menos un triple enlace -C/C-, opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Algunos ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, n-propinilo, isopropinilo, propargilo, but-2-inilo, 3-metilbut-1-inilo, octinilo, decinilo y similares. En el presente documento, los grupos alquinilo preferentes contienen de 2 a 12 átomos de carbono. El término "alquinilo inferior" se refiere a un grupo alquinilo de 2 a 6, preferentemente de 2 a 4, átomos de carbono, y un triple enlace -C=C-. algunos sustituyentes a modo de ejemplo en grupos alquinilo sustituido incluyen hidroxilo, ciano, alcoxi, =O, =S, -NO<sub>2</sub>, halógeno, haloalquilo, heteroalquilo, amina, tioéter y -SH.
- "Anticuerpo" como se denomina en el presente documento se usa en el sentido más amplio, y cubre de forma específica anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv) siempre y cuando presenten actividad de unión o afinidad hacia un antígeno seleccionado.
- "Antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmune.
- "Amida" se refiere a -C(O)NR'R", en el que R' y R" se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, arilo, y alquilarilo.
- "Amino" se refiere a un grupo -N(R')R", en el que R' y R" se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, arilo, y alquilarilo.
- "Arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugados e incluye grupos arilo carbocíclico, heterocíclico, unidos por puente y/o policíclico, y puede estar opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Algunos grupos arilo habituales contienen de 1 a 5 anillos aromáticos, que se pueden fusionar y/o unir. Algunos grupos arilo a modo de ejemplo incluyen fenilo, furanilo, azolilo, tiofuranilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, bifenilo, indenilo, benzofuranilo, indolilo, naftilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, piridopiridinilo, pirrolopiridinilo, purinilo, tetralinilo y similares. Algunos sustituyentes a modo de ejemplo en grupos arilo opcionalmente sustituido incluyen alquilo, alcoxi, alquilcarboxi, alquenilo, alqueniloxi, alquenilcarboxi, arilo, ariloxi, alquilarilo, alquilariloxi, anillos fusionados saturados o insaturados opcionalmente sustituidos, halógeno, haloalquilo, heteroalquilo, -S(O)R, sulfonilo, -SO<sub>3</sub>R, -SR, -NO<sub>2</sub>, -NRR', -OH, -CN, -C(O)R, -OC(O)R, -NHC(O)R, -

$(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}$  o  $-(\text{CH}_2)_n\text{CONRR}'$  en los que  $n$  es 0-4, y en los que  $\text{R}$  y  $\text{R}'$  son independientemente  $\text{H}$ , alquilo, arilo o alquilarilo.

"Arioxi" se refiere a un grupo "-Oarilo", en el que arilo es como se ha definido anteriormente.

5 "Carbocíclico" se refiere a un compuesto opcionalmente sustituido que contiene al menos un anillo y en el que todos los átomos en el anillo son carbono, y puede estar saturado o insaturado.

10 "Arilo carbocíclico" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido en el que los átomos en el anillo son carbono.

"Halo" o "halógeno" se refieren a flúor, cloro, bromo o yodo. "Haluro" se refiere a la forma aniónica de los halógenos.

15 "Haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido en una o más posiciones con un halógeno, e incluye grupos alquilo sustituido solamente con un tipo de átomo de halógeno así como grupos alquilo sustituido con una mezcla de diferentes tipos de átomos de halógeno. Algunos grupos haloalquilo a modo de ejemplo incluyen grupos trihalometilo, por ejemplo trifluorometilo.

20 "Heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más átomos de carbono y átomo o átomos de hidrógeno asociados se reemplazan con un heteroátomo opcionalmente sustituido, e incluye grupos alquilo sustituido solamente con un tipo de heteroátomo así como grupos alquilo sustituido con una mezcla de diferentes tipos de heteroátomos. Algunos heteroátomos incluyen oxígeno, azufre, y nitrógeno. Como se usa en el presente documento, los heteroátomos de nitrógeno y los heteroátomos de azufre incluyen cualquier forma oxidada de nitrógeno y azufre, y cualquier forma de nitrógeno que tenga cuatro enlaces covalentes incluyendo formas protonadas. Un heteroátomo opcionalmente sustituido se refiere a una sustitución de uno o más hidrógenos unidos a un átomo de nitrógeno con alquilo, arilo, alquilarilo o hidroxilo.

30 "Heterocíclico" se refiere a un compuesto que contiene al menos un anillo saturado o insaturado que tiene al menos un heteroátomo y que está opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Algunos grupos heterocíclicos habituales contienen de 1 a 5 anillos, que se pueden fusionar y/o unir, en los que cada uno de los anillos contiene cinco o seis átomos. Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen piperidinilo, morfolinilo y pirrolidinilo. Algunos sustituyentes a modo de ejemplo para grupos heterocíclicos opcionalmente sustituidos son los mismos que para alquilo y arilo en los carbonos del anillo y como para heteroalquilo en los heteroátomos.

35 "Arilo heterocíclico" se refiere a un grupo arilo que tiene al menos 1 heteroátomo en al menos un anillo aromático. Algunos grupos arilo heterocíclico a modo de ejemplo incluyen furanilo, tienilo, piridilo, piridazinilo, pirrolilo, alquilpirrolo N-inferior, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, tetrazinilo, tetrazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, bupiridilo, tripiridilo, tetrapiridilo, fenazinilo, fenantrolinilo, purinilo y similares.

40 "Hidrocarbilo" se refiere a sustituyentes hidrocarbilo que contienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, incluyendo especies ramificadas, no ramificadas y cíclicas así como especies saturadas e insaturadas, por ejemplo grupos alquilo, grupos alquilidenilo, grupos alquenilo, grupos alquilarilo, grupos arilo, y similares. La expresión "hidrocarbilo inferior" se refiere a un grupo hidrocarbilo de uno a seis átomos de carbono, preferentemente de uno a cuatro átomos de carbono.

45 Un "sustituyente" se refiere a un grupo sustituye uno o más hidrógenos unidos a un carbono o nitrógeno. Algunos sustituyentes a modo de ejemplo incluyen alquilo, alquilidenilo, alquilcarboxi, alcoxi, alquenilo, alquencilcarboxi, alquenciloxi, arilo, arioxi, alquilarilo, alquilariloxi,  $-\text{OH}$ , amida, carboxamida, carboxi, sulfonilo,  $=\text{O}$ ,  $=\text{S}$ ,  $-\text{NO}_2$ , halógeno, haloalquilo, anillos fusionados saturados o insaturados opcionalmente sustituidos,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{SO}_3\text{R}$ ,  $-\text{SR}$ ,  $-\text{NRR}'$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}$  o  $-(\text{CH}_2)_n\text{CONRR}'$  en los que  $n$  es 0-4, y en los que  $\text{R}$  y  $\text{R}'$  son independientemente  $\text{H}$ , alquilo, arilo o alquilarilo. Algunos sustituyentes también incluyen la sustitución de un átomo de carbono y uno o más átomos de hidrógeno asociados con un heteroátomo opcionalmente sustituido.

"Sulfonilo" se refiere a  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ , en el que  $\text{R}$  es alquilo, arilo,  $-\text{C}(\text{CN})=\text{C}$ -arilo,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ , alquilarilo, o amina.

55 "Tioamida" se refiere a  $-\text{C}(\text{S})\text{NR}'\text{R}''$ , en el que  $\text{R}'$  y  $\text{R}''$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, arilo, y alquilarilo.

"Tioéter" se refiere a  $-\text{SR}$ , en el que  $\text{R}$  es alquilo, arilo, o alquilarilo.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "par de unión" se refiere a primera y segunda moléculas que se unen de forma específica entre sí con mayor afinidad que a otros componentes en la muestra. La unión entre los miembros del par de unión por lo general no es covalente. Algunos pares de unión a modo de ejemplo incluyen pares de unión inmunológica (por ejemplo, cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o porción de unión o fragmento del mismo, por ejemplo digoxigenina y anti-digoxigenina, fluoresceína y anti-fluoresceína, dinitrofenol y anti-dinitrofenol, bromodesoxiuridina y anti-bromodesoxiuridina, inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina de cabra anti-ratón) y pares de unión no inmunológica (por ejemplo,

65

5 biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona [por ejemplo, tiroxina y cortisol]-proteína de unión a hormona, agonista o antagonista de receptor-receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo del mismo) IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor de enzima, enzima-inhibidor de enzima, y pares de polinucleótidos complementarios capaces de formar duplicados de ácidos nucleicos) y similares. Uno o ambos miembros del par de unión se pueden conjugar con moléculas adicionales.

10 Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, y pueden comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos, o mezclas de los mismos. Estos términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, los términos incluyen ácido desoxirribonucleico de triple, doble y una sola hebra ("ADN"), así como ácido ribonucleico de triple, doble y una sola hebra ("ARN"). También incluye formas modificadas, por ejemplo mediante alquilación, y/o mediante protección, y formas no modificadas del polinucleótido. Algunos detalles adicionales para estos términos así como detalles de la formación de pares de bases se pueden encontrar en la Solicitud de Estados Unidos con n.º 15 de Serie 11/344.942, presentada el 31 de enero de 2006 que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

20 "Complementario" o "básicamente complementario" se refiere a la capacidad para hibridarse o formar pares de bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre un ácido nucleico peptídico sensor y un polinucleótido diana. Algunos nucleótidos complementarios son, por lo general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos polinucleótidos monocatenarios o PNA son básicamente complementarios cuando las bases de una hebra, alineada y comparada de forma óptima con inserciones o supresiones apropiadas, se empareja con al menos aproximadamente un 80 % de las bases de la otra hebra, normalmente al menos aproximadamente de un 90 % a un 95 %, y más preferentemente de aproximadamente un 98 % a un 100 %.

25 Como alternativa, la complementariedad sustancial existe cuando un polinucleótido o PNA se hibrida en condiciones de hibridación selectiva con su complemento. Por lo general, la hibridación selectiva se producirá cuando exista al menos aproximadamente un 65 % de complementariedad con respecto a un tramo de al menos 14 a 25 bases, preferentemente al menos aproximadamente un 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de complementariedad. Véase, M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12: 203 (1984).

30 "Unión preferente" o "hibridación preferente" se refieren al aumento de la tendencia de un polinucleótido o PNA para unirse a su complemento en una muestra en comparación con un polímero no complementario en la muestra.

35 Las condiciones de hibridación para polinucleótidos por lo general incluirán concentraciones de sal inferiores a aproximadamente 1 M, más habitualmente inferior a aproximadamente 500 mM y preferentemente inferior a aproximadamente 200 mM. En el caso de hibridación entre un ácido nucleico peptídico y un polinucleótido, la hibridación se puede realizar en soluciones que contienen un contenido bajo o ningún contenido de sal. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5 °C, pero por lo general son superiores a 22 °C, más habitualmente superiores aproximadamente 30 °C, y preferentemente en exceso de aproximadamente 37 °C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación más elevadas para hibridación específica. En la rigurosidad de la hibridación pueden influir otros factores, que incluyen composición de la base y longitud de las hebras complementarias, presencia de disolventes orgánicos y alcance de la falta de coincidencia de bases, y la combinación de parámetros usados es más importante que la medida absoluta de uno cualquiera solo. Otras 45 condiciones de hibridación que se pueden controlar incluyen el tipo y la concentración del tampón, pH de la solución, presencia y concentración de reactivos del bloqueo para disminuir la unión de fondo tal como secuencias de repetición o soluciones de proteína de bloqueo, tipo o tipos y concentraciones de detergente, moléculas tales como polímeros que aumentan la concentración relativa de los polinucleótidos, ión o iones metálicos y su concentración o concentraciones, agente o agentes quelantes y sus concentraciones, y otras condiciones conocidas en la técnica.

50 "Multiplexación" en el presente documento se refiere a un ensayo u otro método analítico en el que múltiples analitos se pueden someter a ensayo de forma simultánea.

55 "Que tiene" es una expresión abierta como "que comprende" y "que incluye", e incluye circunstancias en las que se incluyen elementos adicionales y circunstancias en las que no se incluyen.

60 "Opcional" u "opcionalmente" se refiere a que el suceso o circunstancia que se describe posteriormente se puede producir o no, y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia se produce y casos en los que no se produce.

La invención desvelada en el presente documento se refiere por lo general a ensayos y complejos que incluyen multicromóforos, y cromóforos de señalización útiles para la identificación de biomoléculas diana o biomoléculas asociadas con moléculas diana a través de aumento de las simplificaciones de señales.

65 En general, en un aspecto, la invención incluye transferencia de energía del multicromóforo a un colorante en un sensor que puede ser una biomolécula que incluye un bioconjugado (por ejemplo, un anticuerpo).

En una realización, se puede seguir un enfoque que modifica un formato que sigue en relación a ensayos de sensor de ácido nucleico como se describe en Gaylord, Heeger, y Bazan, J. Am. Chem. Soc., 2003. De forma específica, la amplificación de señal de multicromóforo se puede basar en sucesos de unión electrostática no específicos para indicar un suceso de hibridación. Como el dador se puede elegir cualquier multicromóforo establecido, y como los sectores se puede elegir uno o más colorantes, preferentemente un colorante con una historia de transferencia de energía eficaz, por ejemplo, fluoresceína y Cy3. Se visualiza que el colorante se puede conjugar directamente a una molécula de sensor. Como se muestra de forma esquemática en la FIG. 1, el sensor puede ser una biomolécula (por ejemplo, un anticuerpo) en una solución o en un sustrato, al que se puede añadir multicromóforo. En la realización mostrada en la FIG. 1, un colorante se puede unir de forma covalente (bioconjugar) con un anticuerpo (estructura con forma de Y), que posee una carga neta negativa. La adición de multicromóforo catiónico (mostrado como líneas onduladas) puede dar como resultado unión electrostática entre el multicromóforo y el anticuerpo, poniendo muy cerca al multicromóforo y el colorante. De este modo, se pueden satisfacer los requisitos de distancia para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), y la excitación del polímero con luz (mostrada como hv) da como resultado la amplificación de la emisión del colorante. Se visualiza que el multicromóforo se puede excitar a una longitud de onda en la que el colorante no tiene una absorbancia significativa. En una realización la emisión del colorante se puede producir a una longitud de onda más larga que la de la emisión del multicromóforo. En la práctica, se visualiza que un método de ensayo puede incluir las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un sensor pardo con un cromóforo de señalización y que es capaz de interactuar con la biomolécula diana, proporcionar un multicromóforo que interactúan de forma electrostática con el sensor y después de excitación es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización de sensor y poner en contacto la muestra con el sensor y el multicromóforo en una solución en condiciones en las que el sensor se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente. A continuación, el método puede incluir la aplicación de una fuente de luz a la muestra que puede excitar el multicromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización.

Un ejemplo de datos producidos a partir de la realización mostrada en la FIG. 1 se presenta en la FIG. 2. Como se muestra en el gráfico, un anticuerpo CD22 de ratón anti-humano etiquetado con FITC se puede excitar tanto de forma directa (línea inferior, FITC etiquetado) o de forma indirecta a través de excitación de multicromóforo unido de forma electrostática (la estructura se muestra en la FIG. 2, derecha) y posterior energía de transferencia a través de FRET (líneas superior, Señal amplificada por polímero etiquetada). Los detalles del experimento incluían excitación directa de un anticuerpo CD22 de ratón anti-humano etiquetado con FITC (línea inferior, FITC etiquetado, excitación a 496 nm, [CD22 de ratón anti-humano etiquetado con FITC] = 1 ng/ml) y emisión de colorante amplificada por multicromóforo (línea superior, excitación a 380 nm, [multicromóforo] =  $1 \times 10^{-6}$  M en unidades de repetición, RU) en 2 ml de 1X SSPE. La estructura de multicromóforo dador se ilustra a la derecha del gráfico. De forma ventajosa, la transferencia de energía en presencia de multicromóforo daba como resultado una amplificación de 5 veces de la intensidad de la señal del colorante, en comparación con la excitación directa.

La FIG. 3 ilustra un segundo ejemplo de datos producidos a partir de la realización mostrada en la FIG. 1. Aquí, el gráfico muestra una comparación de señales de información óptica a la excitación directa (línea inferior, Cy3 etiquetado, excitación a 540 nm) e indirecta (línea superior, excitación a 380 nm) de un anticuerpo secundario de burro anti-ratón etiquetado con Cy3. Las condiciones experimentales fueron similares a las del experimento anterior, pero con la mitad del volumen. La estructura de multicromóforo dador se muestran en la FIG. 3, lado derecho. Las intensidades del colorante amplificado por multicromóforo eran 10 veces más intensas cuando se comparaban con la excitación directa del colorante.

Como se desvela en el presente documento, la unión electrostática entre multicromóforos cargados y anticuerpos etiquetados con colorante puede ser un enfoque viable para aumentar las sensibilidades de detección, por ejemplo de una diana de biomolécula. En una realización más, la unión de forma covalente del multicromóforo a un colorante/biomolécula (por ejemplo, un complejo de anticuerpo ofrece varias ventajas que incluyen reducción del fondo y aumento de la transferencia de energía). En el caso de unión directa a una biomolécula, los sucesos de biorreconocimiento, en lugar de los sucesos de unión electrostática, deberían gobernar la presencia del multicromóforo. De este modo, la unión no específica del multicromóforo a biomoléculas se puede eliminar, reduciendo cualquier emisión de fondo que resulta del propio multicromóforo. Las biomoléculas mencionadas anteriormente incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ligandos de afinidad, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, azúcares, lípidos, y ácidos nucleicos (como sondas de hibridación y/o aptámeros).

En el caso de unión directa a un colorante o complejo de bio molécula/complejo, las distancias de dador-aceptor se pueden fijar, en lugar de que dependan de la fuerza de la unión electrostática, y la eficacia de la transferencia de energía puede aumentar de forma significativa. Esto presenta consecuencias significativas en el contexto de la mejora de la señalización del colorante y la reducción de la fluorescencia del fondo asociada con interacción dador-aceptor. En este caso, la interacción se refiere al solapamiento entre picos de emisión de multicromóforo (dador) y colorante (aceptor). Los multicromóforos que se unen de forma específica a distancias demasiado grandes para transferencia de energía pueden contribuir a la fluorescencia del fondo (o interacción). Las distancias más cortas (fijadas) entre el dador y el acepto no pueden facilitar solamente la amplificación directa del colorante, sino que también pueden inactivar en gran medida la emisión del dador. Esto da como resultado menos emisión del dador a las longitudes de onda de emisión del acepto, que posteriormente reduce o incluso elimina la necesidad de

corrección de la interacción.

En general, en otro aspecto la invención incluye la bioconjugación del multicromóforo a ligandos de afinidad (ligandos de afinidad que describen una biomolécula que tiene una afinidad por otra biomolécula). La FIG. 4 ilustra una clase de materiales en los que un multicromóforo (mostrado como una línea ondulada) se une a un colorante, biomolécula, o complejo de biomolécula/colorantes (etiquetado X). La unión al multicromóforo se puede realizar a través de una primera funcionalidad de conector A en el multicromóforo que sirve como un sitio de bioconjugación capaz de unirse de forma covalente con una segunda funcionalidad de conector A' a una biomolécula y/o colorante (véase X). Esta disposición puede fijar la distancia entre el multicromóforo y X, asegurando de este modo solamente interacciones específicas entre el multicromóforo y X. Se prevé que un componente X de la biomolécula en esta realización puede ser cualquiera de las diversas biomoléculas desveladas en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo, proteína, ligando de afinidad o ácido nucleico.

Se prevé que el componente X en este contexto puede ser, pero no se limita a, un colorante, proteína de fluorescencia, nanomaterial (por ejemplo, Punto Cuántico), un conjugado entre colorante y molécula que genera quimioluminiscencia, un conjugado entre proteína fluorescente y molécula que genera quimioluminiscencia, un conjugado entre nanomaterial (por ejemplo, Punto Cuántico) y molécula que genera quimioluminiscencia, estreptavidina, avidina, enzima, sustrato para una enzima, análogo de sustrato para una enzima, receptor, ligando para un receptor, análogo de ligando para un receptor, ADN, ARN, ácido nucleico modificado, aptámero de ADN, aptámero de ARN, aptámero nucleico modificado, aptámero de péptido, anticuerpo, antígeno, fago, bacteria o conjugado de cualquiera de dos de los elementos descritos anteriormente.

La química de unión para A-A' y B-B' puede incluir, pero no se limita a, maleimida/tiol, éster de succimidilo (éster NHS)/amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilamino-propil]carbodiimida, amina/Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo)/tiol, y amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]•TFA)/tiol.

En otro aspecto, la invención incluye multicromóforos etiquetados. La FIG. 5 muestra dos ejemplos de multicromóforos etiquetados. En una realización, a la izquierda, un multicromóforo (mostrado como una línea ondulada) se muestra conjugado con un anticuerpo que puede ser, por ejemplo, un 1º o 2º anticuerpo. El conjugado del multicromóforo y el anticuerpo se pueden usar como un indicador, por ejemplo, en un ensayo. La excitación del multicromóforo con luz (no se muestra) puede dar como resultado emisión del multicromóforo, lo que indica la presencia del anticuerpo (1º o 2º). En otra realización mostrada en la FIG. 5 a la derecha, el multicromóforo se etiqueta con un colorante, por ejemplo, un cromóforo. En este caso, el multicromóforo puede actuar como un dador y el colorante puede actuar como un aceptor en un proceso de FRET nuestra. Aquí, el multicromóforo puede actuar como un captador de luz, y la excitación del multicromóforo va seguida de la canalización de las excitaciones al colorante a través de un proceso de FRET. Esto da como resultado la amplificación de la emisión del colorante (en comparación con la excitación directa del colorante). La fluorescencia del multicromóforo dador, en una realización, se puede inactivar (por ejemplo, inactivación > 90 %).

En general, en otro aspecto se desvela un método para someter a ensayo una biomolécula diana o una biomolécula diana etiquetada. Como se muestra en la FIG. 6 en una realización un multicromóforo (mostrado como una línea ondulada) se puede unir a un primer bioconjugado (mostrado como un objeto con forma de Y), por ejemplo, un 2º anticuerpo que es específico para un segundo bioconjugado etiquetado con colorante, por ejemplo, un 1er anticuerpo. Aquí, el suceso de reconocimiento entre el 1º y 2º anticuerpos dará como resultado la reducción de la distancia entre el multicromóforo dador y el colorante aceptor. Después de este suceso de reconocimiento, la explicación del multicromóforo dador con luz (se muestra como hv) dará como resultado FRET para el colorante aceptor (mostrado como una flecha curvada), y se observará una amplificación de la emisión del colorante (en comparación con la excitación directa del colorante). En la práctica se prevé que un método de ensayo podría incluir la provisión de una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana mediante las etapas de proporcionar un primer bioconjugado, por ejemplo, un 1er anticuerpo jugado con un cromóforo de señalización y capaz de interactuar con la biomolécula diana. Esto va seguido de la provisión de un segundo bioconjugado, por ejemplo, un 2º anticuerpo, conjugado con un multicromóforo, en el que el segundo bioconjugado se puede unir al primer bioconjugado y en el que después de tal excitación de unión del multicromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización. A continuación, el método incluye poner en contacto la muestra con el primer bioconjugado en una solución en condiciones en las que el primer bioconjugado se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente y poner en contacto la solución con el segundo bioconjugado. A continuación, el método incluye la aplicación de una fuente de luz a la biomolécula diana o biomolécula diana etiquetada, en el que la fuente de luz puede excitar el multicromóforo posteriormente detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización.

En general en otro aspecto, aquí se desvela un método para someter a ensayo una muestra usando un multicromóforo y un complejo de biomolécula de sensor. Como se muestra en la FIG. 7, lado izquierdo, un multicromóforo (mostrado como una línea ondulada) se puede conjugar con un primer bioconjugado, por ejemplo, estreptavidina (SA) que tiene una fuerte afinidad por biotina. En la FIG. 7 a la izquierda, una biomolécula de sensor (por ejemplo, un anticuerpo que puede ser un 1º o 2º anticuerpo), se conjuga tanto con un colorante como con un

segundo bioconjugado (por ejemplo, un resto de biotina). Después de un suceso de biorreconocimiento entre el primer y segundo bioconjugados (por ejemplo, entre SA y biotina), el multicromóforo y el colorante se pondrán muy cerca, y la excitación del multicromóforo dador dará como resultado FRET para el colorante aceptor. La emisión del colorante indicará la presencia del primer bioconjugado (por ejemplo, el anticuerpo). En comparación con la excitación directa del colorante, la amplificación de la intensidad de la señal del colorante se observará cuando se excita de forma indirecta a través de FRET.

En otra realización como se muestra en la FIG. 7, a la derecha, una biomolécula de sensor, por ejemplo, un ácido nucleico, se conjuga tanto con un colorante como con un primer bioconjugado (por ejemplo, un resto de biotina). Después de un suceso de biorreconocimiento entre un segundo bioconjugado (por ejemplo, SA) y el primer bioconjugado (por ejemplo, biotina), el multicromóforo y el colorante se pondrán muy cerca, y la excitación del multicromóforo dador dará como resultado FRET para el colorante aceptor. En comparación con la excitación directa del colorante, la amplificación de la intensidad de la señal del colorante se observará cuando se excita de forma indirecta a través de FRET. La emisión del colorante indicará la presencia de la biomolécula de sensor (por ejemplo, un ácido nucleico).

Un método para usar la realización mostrada en la FIG. 7 puede incluir las etapas de proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un multicromóforo que comprende un primer bioconjugado unido de forma covalente (por ejemplo, SA), proporcionar un complejo de biomolécula de sensor que comprende una biomolécula de sensor capaz de interactuar con la molécula diana, un cromóforo de señalización, y un segundo bioconjugado unido de forma covalente capaz de unirse al primer bioconjugado, en el que después de tal excitación de unión del multicromóforo es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización. El método puede incluir adicionalmente las etapas de poner en contacto la muestra con el complejo de biomolécula de sensor en una solución en condiciones en las que la biomolécula de sensor se puede unir a la biomolécula diana si estuviera presente, poner en contacto la solución con el multicromóforo, aplicar una fuente de luz a la muestra que puede excitar el multicromóforo, y detectar si la luz se emite desde el cromóforo de señalización.

En general en otro aspecto, la invención proporciona a un complejo de biorreconocimiento para identificar una biomolécula que incluye un bioconjugado un cromóforo de señalización y un multicromóforo. La FIG. 8 muestra un multicromóforo conjugado directamente con un bioconjugado etiquetado con colorante, por ejemplo, un anticuerpo (izquierda). La FIG. 8 muestra adicionalmente una realización alternativa en la que un multicromóforo se conjuga con SA etiquetado con colorante (derecha). En la realización ilustrada a la izquierda, las uniones covalentes entre el bioconjugado (mostrado en forma de Y) y el colorante y multicromóforo aseguran la proximidad estrecha del multicromóforo dador y el colorante aceptor. Después de un suceso de biorreconocimiento entre el bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo, y su diana, por ejemplo un antígeno, la excitación del multicromóforo dador dará como resultado FRET para el colorante aceptor. En una realización alternativa, ilustrada en la FIG. 8 a la derecha, el multicromóforo y el colorante permanecen en una posición muy cercana, fija. Como tal, después de un suceso de unión, por ejemplo, entre la SA y con resto de biotina, la excitación del multicromóforo dador dará como resultado FRET para el colorante aceptor. En cualquier realización ilustrada en la FIG. 8, la emisión del colorante amplificada resultaría de la excitación de multicromóforo.

Un ejemplo no limitante de una estructura de CP se muestra en la FIG. 9. La estructura principal puede consistir principalmente en unidades de repetición de fluoreno-fenileno y sirve como el dador en el proceso de FRET. El CP se funcionaliza con grupos R1 y R2. Ambos pueden servir para solubilizar el CP con grupos hidrófilos, que incluyen, pero no se limitan a, aminas cuaternarias o funcionalidades de tipo PEG, aunque R2 también puede servir para modificar las propiedades ópticas a través de modificaciones del nivel de energía. Un tercer grupo fenilo de comonomero funcionalizado con un sitio A permite la bioconjugación con un colorante o biomolécula. El conector A puede ser, pero no se limita a una maleimida, tiol, éster de succimidilo (o éster de NHS), amina, azida, biotina, avidina/estreptavidina, o algún otro ligando-receptor que reaccionará con un conector A' que está disponible en una biomolécula o colorante (véase por ejemplo, como en la FIG. 4).

Un único monómero que permite la síntesis del polímero a modo de ejemplo de la FIG. 9 se muestra en la FIG. 10. Este monómero tiene dos sitios para acoplamiento de Suzuki (véase Liu y Bazan, J. Am. Chem. Soc., 2005; Liu y Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 2005; Bazan, Liu, Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/666.333, presentada el 17 de septiembre de 2003), y lo más importante, un sitio A que permite la bioconjugación. El sitio A puede ser un sitio de bioconjugación por sí mismo, o un precursor, tal como una ftalimida (una amina protegida).

Varios ejemplos de síntesis de monómeros adecuados se ilustran en las FIGS. 11 y 12. La FIG. 11 muestra de forma esquemática la síntesis de un monómero con un grupo funcional ftalimida, que sirve como una amina protegida. La FIG. 12 describe la síntesis de un monómero con una maleimida, que se puede bioconjugarse con tioles.

Algunos ejemplos para las síntesis de dos estructuras monoméricas es para polimerización siguen a continuación. La primera es una síntesis de una etapa para un monómero funcionalizado con una amina protegida (en forma de una ftalimida) para bioconjugación de ésteres de succimidilo, y la segunda es una síntesis de cuatro etapas para un monómero funcionalizado con una maleimida para bioconjugación con tioles.

*N*-4'-(3'',5''-dibromofenoxi)butilftalimida o 1-(4'-ftalimidobutoxi)3,5-dibromobenceno. 3,5-dibromofenol (970 mg, 3,85 mmol) se recristalizó en hexanos. Después de retirar el disolvente, se añadieron *N*-(4-bromobutil)ftalimida (1,38 g, 4,89 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,88 g, 13,6 mmol), 18-corona-6 (53 mg, 0,20 mmol) y acetona (20 ml). Esto se calentó a reflujo durante 1 hora, y después se vertió en 100 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y salmuera, a continuación se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. La retirada del disolvente proporcionó un sólido de color blanco, que se purificó por cromatografía en columna (4:1 de hexanos:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) seguido de recristalización en hexanos para producir agujas incoloras (650 mg, 87 %).

*N*-Metoxicarbonilmaleimida. Maleimida (2,00 g, 20,6 mmol) y *N*-metil morfolina (2,08 g, 20,6 mmol) en acetato de etilo se enfriaron a 0 °C. La adición gota a gota de cloroformiato de metilo (1,4 ml, 20,7 mmol) produjo un precipitado de color blanco. La solución se agitó durante 1 hora a 0 °C, tras lo cual los sólidos se retiraron por filtración. La concentración del filtrado proporciona un aceite de color rosa, que se purificó por cromatografía en columna (eluyente a 3:1 de hexanos:acetato de etilo) para producir cristales de color amarillo pálido.

*N*-(ω-hidroxihexil)maleimida. 6-amino-1-hexanol y NaHCO<sub>3</sub> saturado (20 ml) se enfriaron a 0 °C. *N*-Metoxicarbonilmaleimida se añadió en porciones con agitación. Los sólidos no se disolvieron totalmente. Esto se agitó durante 30 minutos a 0 °C (la mayoría de los sólidos se disolvieron después de 20 minutos), a continuación el baño de hielo se retiró y la solución se agitó durante 30 minutos más, momento en el que la solución era de color rosa pálido. Esto se diluyó 3 veces con agua y se lavó con cloroformo (3 x 40 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y el disolvente se retiró a través de rotavapor.

1-(6'-Bromohexiloxi)-3,5-dibromobenceno. 3,5-Dibromofenol se recristalizó en hexanos. Después de retirar el disolvente, se añadieron 1,6-dibromohexano, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 18-corona-6, y acetona. Esto se calentó a reflujo durante 1 hora, y después se vertió en 100 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y salmuera, después se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. La retirada del disolvente proporcionó un sólido de color blanquecino, que se purificó por cromatografía en columna para producir un sólido de color blanco.

1-(6'-(6''Maleimidohexiloxi)hexiloxi)-3,5-dibromobenceno. *N*-(ω-hidroxihexil)maleimida, 1-(6'-Bromohexiloxi)-3,5-dibromobenceno, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 18-corona-6, y acetona se calentaron la reflujo durante 1 hora, y después se vertieron en 100 ml de agua. La fase acuosa se extraerá con diclorometano (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinarán, se lavaran con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y salmuera, a continuación se secarán sobre MgSO<sub>4</sub> y se filtraran. La retirada del disolvente proporcionará el material en bruto, que se purificará por cromatografía en columna para producir el producto purificado.

En general, en otro aspecto la invención proporciona un complejo multicromóforo incluye un multicromóforo, una biomolécula de sensor y un cromóforo de señalización para identificar una biomolécula diana. Como se representa en la FIG. 13, en una realización un multicromóforo se puede bioconjugarse tanto con un colorante como con una biomolécula, por ejemplo una molécula de biorreconocimiento. Algunas biomoléculas útiles pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos, ligandos de afinidad, ácidos nucleicos, proteínas, nanopartículas o sustratos para enzimas. Los beneficios de la unión covalente de un colorante cercano a un multicromóforo se ha descrito anteriormente. Al fijar tanto un colorante aceptor como una molécula de biorreconocimiento a un multicromóforo, los beneficios son dobles, tanto mediante la fijación de distancias de dador-aceptor, tal como un aceptor se garantiza que está dentro de la proximidad de un multicromóforo dador (y viceversa), como también aumentando la especificidad de la unión del multicromóforo para indicar un suceso de biorreconocimiento. Estos complejos covalente se pueden preparar a través de las químicas de monómero y unión que se describen en el presente documento.

Como se muestra en la FIG. 13, izquierda, en una realización un multicromóforo (línea ondulada) se puede bioconjugarse con un colorante X a través de funcionalidades A-A' de conector y una biomolécula Y a través de funcionalidades B-B' de conector. En una realización alternativa mostrada en la FIG. 13, derecha, un multicromóforo se puede bioconjugarse con un colorante X y una biomolécula Y mediante un conector trifuncionalizado a través de funcionalidades A-A', B-B', y C-C' de conector. En la realización ilustrada en la FIG. 13, el grupo X puede ser, pero no se limita a, un colorante, proteína fluorescente, nanomaterial (por ejemplo, Punto Cuántico), un conjugado entre colorante y molécula que genera quimioluminiscencia, un conjugado entre proteína fluorescente y molécula que genera quimioluminiscencia, o un conjugado entre nanomaterial (por ejemplo, Punto Cuántico) y molécula que genera quimioluminiscencia. El grupo Y puede ser, pero no se limita a, una estreptavidina, avidina, enzima, sustrato para una enzima, análogo de sustrato para una enzima, receptor, ligando para un receptor, análogo de ligando para un receptor, ADN, ARN, ácido nucleico modificado, aptámero de ADN, aptámero de ARN, aptámero nucleico modificado, aptámero de péptido, anticuerpo, antígeno, fago, bacteria o conjugado de cualquiera de dos de los elementos descritos anteriormente.

La química de unión para A-A', B-B' y C-C' puede incluir, pero no se limita a, maleimida/tiol, éster de succinimido (éster NHS)/amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, amina/Sulfo-SMCC (4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimido)/tiol, y amina/BMPH (hidrazida del ácido *N*-[β-maleimidopropiónico]•TFA)/tiol. Un conector trifuncional tal como el Sulfo-SBED, [2-6-

(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato de Sulfosuccinimido, disponible en el mercado puede servir bien en la unión de tres formas entre X, Y, y multicromóforo.

En la práctica, las realizaciones mostradas en la FIG. 13 pueden ser un complejo multicromóforo para identificar una biomolécula diana en la que el complejo incluye un multicromóforo, un cromóforo de señalización unido de forma covalente al multicromóforo y una biomolécula de sensor unida de forma covalente al multicromóforo. El cromóforo de señalización del complejo es capaz de recibir energía del multicromóforo después de excitación del multicromóforo y la biomolécula de sensor es capaz de interactuar con la biomolécula diana. Se prevé que las biomoléculas pueden incluir, pero no se limitan a, un anticuerpo, proteína, ligando de afinidad, péptido, o ácido nucleico.

En general, en otro aspecto la invención proporciona un complejo de biorreconocimiento para identificar una biomolécula en la que el complejo incluye un bioconjugado, un multicromóforo y un cromóforo de señalización. En una realización mostrada en la FIG. 14, izquierda, un multicromóforo se conjuga tanto con un bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo (1º o 2º) como con un colorante. La unión covalente entre el multicromóforo dador y el colorante aceptor aseguran la proximidad cercana. La excitación del multicromóforo dador da como resultado FRET para el colorante aceptor. Cuando el bioconjugado es un anticuerpo, si el anticuerpo se une a su diana (por ejemplo, antígeno), esto se indicará mediante una emisión decolorante después de excitación del multicromóforo dador. En una realización alternativa, como se muestra en la FIG. 14, derecha, un multicromóforo se puede conjugar tanto con una SA como con un colorante. De nuevo, la unión covalente entre el multicromóforo dador y el colorante aceptor asegura una proximidad cercana, y la excitación del multicromóforo dador da como resultado FRET para el colorante aceptor. El complejo de SA se puede usar para etiquetar o detectar una biomolécula etiquetada con biotina tal como un anticuerpo biotinilado o ácido nucleico. La excitación del multicromóforo seguida de FRET para la etiqueta de colorante dará como resultado un mayor aumento de las señales de detección (es decir, mayor sensibilidad).

La FIG. 16 muestra un ejemplo de un multicromóforo etiquetado de forma doble (mostrado como una línea ondulada), bioconjugado tanto con un colorante indicador como con un 2º anticuerpo (estructura con forma de Y). En un ensayo, un 1er anticuerpo sin etiquetar se puede unir a un antígeno, por ejemplo, una proteína diana (mostrará como un triángulo de color negro). La adición del 2º anticuerpo, que se conjuga con un multicromóforo, y además se conjuga con un colorante, se puede unir de forma específica al 1er anticuerpo. La excitación óptica del multicromóforo puede dar como resultado transferencia de energía al colorante, y amplificación de la emisión del colorante, en comparación con los resultados de excitación directa.

La FIG. 17 muestra un ejemplo de un complejo de tipo sándwich de una realización de la invención. Aquí, el complejo de multicromóforo está formado por un multicromóforo (mostrado como una línea ondulada) que se bioconjuga tanto con un colorante como con una biomolécula, por ejemplo, estreptavidina (SA). Después de que se uniera un 1er anticuerpo sin etiquetar se une a la proteína diana, mostrado como un triángulo de color negro, un 2º anticuerpo etiquetado con biotina se une de forma específica al 1er anticuerpo. En una etapa separada, la adición del complejo de multicromóforo dará como resultado la unión específica entre la biotina y estreptavidina, y la excitación del multicromóforo dará como resultado la amplificación de la emisión del colorante, en comparación con la excitación directa del colorante. Las señales que surgen de la emisión del colorante indican la presencia de la proteína diana.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la multiplexación de transferencia de energía de dador para múltiples aceptores. Mediante el uso de un multicromóforo como dador en un sistema de FRET, algunos beneficios también incluyen la capacidad de multiplexación. Un solo dador puede transferir energía a varios colorantes; por lo tanto con una sola fuente de excitación, se puede controlar la intensidad de múltiples colorantes. Esto es útil para aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, formación de imágenes celulares (es decir inmunohistoquímica), en la que los diferentes tipos de células se pueden controlar mediante sucesos de reconocimiento de proteína-anticuerpo.

En una realización, dos anticuerpos etiquetados con colorante se pueden incubar con un material biológico, por ejemplo, una línea de células cultivadas. Los anticuerpos son capaces de reconocer células con una proteína diana expresada en su superficie y unirse de forma específica solamente a esas proteínas. Con el etiquetado de los dos anticuerpos con diferentes colorantes, es posible controlar la expresión de dos proteínas diferentes o tipos de células diferentes de forma simultánea. Por lo general, esto requeriría dos barridos o imágenes, una vez cada uno con la longitud de onda de excitación correcta. Como una etapa final antes del análisis, estas dos imágenes se tendrían que superponer. Usando anticuerpos conjugados tanto para un colorante como para un multicromóforo, se puede usar una longitud de onda de excitación para ambos colorantes, y una sola imagen incluirá conjuntos de datos de cada uno de los dos anticuerpos.

Un ejemplo relevante de esta realización se muestra en la FIG. 15, que muestra los espectros de emisión para un multicromóforo dador individual con transferencia de energía a una sonda de ADN etiquetada con fluoresceína (línea de puntos), transferencia de energía a una sonda de ADN etiquetada con rojo Texas (línea discontinua), y transferencia de energía a ambas sondas (línea continua). Además, los espectros que surgen de la excitación directa de los dos colorantes se muestran como líneas continuas hacia el fondo de la FIG. 15. La amplificación significativa de los colorantes se observa en los tres casos. Además, se observan señales intensas para cada

colorante, independientemente de la presencia o ausencia del otro colorante, lo que indica un buen potencial para formar multiplexación. Se prevén resultados paralelos con diagnóstico de proteínas.

5 Dado el potencial para análisis de multiplexación, se prevé que el multicromóforo se pueda unir a un número de  
 10 colorantes, que incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Rojo Texas, tetrametilrodamina, una  
 carboxirrodamina, carboxirrodamina 6G, carboxirrodol, carboxirrodamina 110, Azul Cascade, Amarillo Cascade,  
 cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy-Chrome, ficoeritrina, PerCP (Proteína clorofila-a peridina),  
 PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y -6)-carboxi-X-rodamina),  
 HEX, Amarillo Lucifer, Azul Marina, Verde Oregon 488, Verde Oregon 500, Verde Oregon 514, Alexa Fluor.RTM.  
 350, Alexa Fluor®430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594,  
 Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético,  
 BOD-IPY.RTM. FL, BODIPY® FL-Br.sub.2, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY®  
 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY®  
 TR, conjugados de los mismos, y combinaciones de los mismos.

15 Se prevé que la invención descrita en el presente documento se pueda usar para aumentar la sensibilidad de  
 cualquiera de un número de ensayos disponibles en el mercado que incluyen, pero no se limitan a, el Ensayo de  
 Anticuerpo VIH-1/2 OraQuick Rapid, fabricado por OraSure Technologies, Inc. (Bethlehem, PA), que es un ensayo  
 de diagnóstico del VIH aprobado por la FDA para muestras de fluido oral. Este ensayo puede proporcionar  
 20 resultados de identificación sistemática con más de un 99 por ciento de precisión en un período tan breve como 20  
 minutos.

#### Multicromóforos

25 Los sistemas de multicromóforo de captación de luz pueden transferir energía de forma eficaz a especies  
 luminiscentes cercanas. Algunos mecanismos para transferencia de energía incluyen, por ejemplo, transferencia de  
 energía de resonancia (transferencia de energía de resonancia (o fluorescencia) de Forster, FRET), intercambio de  
 carga cuántica (transferencia de energía de Dexter) y similares. Por lo general, sin embargo, estos mecanismos de  
 30 transferencia de energía son de un intervalo relativamente corto, y es necesaria una proximidad cercana del sistema  
 de multicromóforo de captación de luz para el cromóforo de señalización para una transferencia de energía eficaz.  
 La amplificación de la emisión se puede reducir cuando el número de cromóforos individuales en el sistema de  
 multicromóforo de captación de luz es grande; la emisión es de un fluoróforo puede ser más intensa cuando la luz  
 incidente (la "luz de bombeo") está a una longitud de onda que es absorbida por el sistema de multicromóforo de  
 captación de luz y se transfiere al fluoróforo que cuando el fluoróforo se excita directamente por la luz de bombeo.

35 Los multicromóforos usados en la presente invención pueden ser de carga neutra, catiónicos o aniónicos. En  
 algunas realizaciones los multicromóforos son multicromóforos policatiónicos.

40 En realizaciones en las que el multicromóforo es policatiónico, pueden interactuar con una biomolécula que  
 comprende múltiples grupos aniónicos, por ejemplo polisacáridos, polinucleótidos, péptidos, proteínas, anticuerpos,  
 etc. En algunas realizaciones, el multicromóforo puede interactuar con un anticuerpo o polinucleótido diana de forma  
 electrostática y por lo tanto poner a un cromóforo de señalización en un polinucleótido de sensor sin carga en  
 proximidad que recibe energía en virtud del reconocimiento de anticuerpo-antígeno o hibridación entre un  
 polinucleótido de sensor y un polinucleótido diana. En los métodos descritos se puede usar cualquier multicromóforo  
 45 policatiónico que pueda absorber luz y preferentemente emitir o transferir energía. Algunos multicromóforos a modo  
 de ejemplo que se pueden usar incluyen polímeros conjugados (CP), polímeros saturados o dendrímeros que  
 incorporan múltiples cromóforo de cualquier manera viable, y nanocristales semiconductores (SCNC). El CP,  
 polímero saturados y dendrímeros se pueden preparar para incorporar múltiples especies catiónicas o se pueden  
 derivatizar para convertirlos en policatiónicos después de la síntesis; algunos nanocristales semiconductores se  
 50 pueden convertir en policatiónicos mediante la adición de especies catiónicas a su superficie. En algunas  
 realizaciones, el multicromóforo policatiónico no se detecta por su capacidad para transferir energía cuando se  
 excita, y por lo tanto algunos métodos que implican tales esquemas de detección no requieren que el multicromóforo  
 emita ni transfiera energía.

55 En algunas realizaciones, el multicromóforo es un CP. En una realización particular, el CP es uno que comprende  
 "unidades de repetición de banda prohibida inferior " de un tipo y en una cantidad que contribuye a una absorción  
 con respecto al polímero en el intervalo de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 1000 nm. Las unidades de  
 repetición de banda prohibida inferior pueden presentar o no tal absorción antes de la polimerización, pero presentan  
 esa absorción cuando se incorporan en el polímero conjugado. Tales características de absorción permiten que el  
 60 polímero se extienda a longitudes de onda que producen menos fluorescencia de fondo en diversos entornos,  
 incluyendo en el análisis de muestras biológicas y formación de imágenes y/o detección de moléculas. El  
 desplazamiento de la absorbancia del CP hasta una energía menor y una longitud de onda más larga permite de  
 este modo métodos más sensibles y sólidos. Además, muchos instrumentos disponibles en el mercado incorporan  
 componentes de formación de imágenes que funcionan a tales longitudes de onda al menos en parte para evitar  
 65 tales cuestiones. Por ejemplo, hay disponibilidad de cicladores térmicos que realizan detección en tiempo real  
 durante reacciones de amplificación y lectores de micromatrices que funcionan en esta región. La provisión de

polímeros que absorben en esta región permite la adaptación de métodos de detección a tales formatos, y también permite que se realicen nuevos métodos totalmente.

5 La incorporación de unidades de repetición que disminuyen la banda prohibida puede producir polímeros conjugados con tales características. Algunas especies opcionalmente instituidas a modo de ejemplo que dan como resultado polímeros que absorben luz a tales longitudes de onda incluyen 2,1,3-benzotiadiazol, benzoselenadiazol, benzoteturodiazol, naftoselenadiazol, 4,7-di(tien-2-il)-2,1,3-benzotiadiazol, colorantes de escuaraina, quinoxalinas, colorantes comerciales de banda prohibida inferior, olefina, y olefinas sustituidas con ciano e isómeros de los mismos. Algunos detalles adicionales con respecto a la composición, estructura, propiedades y síntesis de  
10 multicromóforos adecuados se pueden encontrar en la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/642.901, presentada el 10 de enero de 2005 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 11/329.495, presentada el 10 de enero de 2006, publicada ahora como documento US 2006-0183140 A1.

15 Algunos multicromóforos se pueden describir como un conjunto de unidades cromofóricas unidas de forma covalente o una colección covalente de cromóforos. Los multicromóforos pueden incluir, pero no se limitan a, estructuras lineales, tales como, polímeros conjugados (CP) y estructuras dendríticas (Wang, Gaylord, y Bazan, Adv. Mater., 2004, Wang, Hong, y Bazan, Org. Lett., 2005).

20 La FIG. 18 ilustra una estructura general para un CP como un multicromóforo lineal. En una realización tal CP podría estar formado por esas unidades que se describen en las Tablas 1 y 2 o en el Esquema 1 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/666.333: Conformationally Flexible Cationic Conjugated Polymers, de Liu y Bazan, y también podrían incluir monómeros que contienen uno o más sitios únicos de bioconjugación como se representa en la FIG. 10 en el presente documento. El CP contiene preferentemente al menos un 0,01 % en moles del sitio de bioconjugación, y puede contener al menos aproximadamente un 0,02 % en moles, al menos aproximadamente un 0,05 % en moles, al menos aproximadamente un 0,1 % en moles, al menos aproximadamente un 0,2 % en moles, al menos aproximadamente un 0,5 % en moles, al menos aproximadamente un 1 % en moles, al menos aproximadamente un 2 % en moles, al menos aproximadamente un 5 % en moles, al menos aproximadamente un 10 % en moles, al menos aproximadamente un 20 % en moles, o al menos aproximadamente un 30 % en moles. El CCP puede contener hasta un 100 % en moles del sitio de bioconjugación, y puede contener  
25 aproximadamente un 99 % en moles o menos, aproximadamente un 90 % en moles o menos, aproximadamente un 80 % en moles o menos, aproximadamente un 70 % en moles o menos, aproximadamente un 60 % en moles o menos, aproximadamente un 50 % en moles o menos, o aproximadamente un 40 % en moles o menos.

35 En la FIG. 18, las unidades CP1, CP2, CP3, y CP4 son segmentos de polímero o estructuras oligoméricas conjugados opcionalmente sustituidos, y pueden ser iguales o diferentes entre sí. CP1, CP2, CP3, y CP4 pueden ser unidades de repetición aromáticas, y se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en benceno, naftaleno, antraceno, fluoreno, tiofeno, furano, piridina, y oxadiazol, cada uno opcionalmente sustituido. Además, CP3 y CP4 pueden contener uno o más sitios de bioconjugación únicos, unidos mediante un conector L tal como en la FIG. 3h. Estos sitios de bioconjugación pueden ser, pero no se limitan a, maleimida, tiol, éster de succimidilo (éster NHS), amina, química de azida, carboxi/EDC (Clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo), amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]•TFA), o Sulfo-SBED [2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato de Sulfosuccinimidilo, que pueden servir como una unión de tres formas entre X, Y, y CP en la FIG.  
40 13.

45 Algunas unidades de repetición aromáticas habituales se muestran en la Tabla 1, y algunos segmentos y estructuras oligoméricas representativos se muestran en la Tabla 2 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/666.333: Conformationally Flexible Cationic Conjugated Polymers de Liu y Bazan.

50 La FIG. 18 contiene CP3 y CP4, que pueden ser conectores con forma de ángulo (de forma *meta*), y pueden ser grupos arilo opcionalmente sustituidos mono o policíclicos que tienen de 5 a 20 átomos. Las unidades CP3 y CP4 se pueden distribuir de forma uniforme o de forma aleatoria a lo largo de la cadena principal de polímero.

55 Cada uno de CP1, CP2, CP3, y CP4 está opcionalmente sustituido en una o más posiciones con uno o más grupos seleccionados entre --R1--A, --R2--B, --R3--C y -R4--D, que se pueden unir a través de formación de puentes de grupos funcionales -E- y --F--, con la condición de que el polímero como un conjunto se debe sustituir con una pluralidad de grupos solubles en agua catiónicos, aniónicos, o con carga neutra.

60 R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente entre alquilo, alqueno, alcoxi, alquino, y arilo, alquilarilo, arilalquilo, y óxido de polialquilo, cada uno opcionalmente sustituido, que pueden contener uno o más heteroátomos, o pueden no estar presentes. R1, R2, R3 y R4 se pueden seleccionar independientemente entre alquilo C1-22, alcoxi C1-22, éster C1-22, óxido de polialquilo que tiene de 1 a aproximadamente 22 átomos de carbono, corona éter cíclico que tiene de 1 a aproximadamente 22 átomos de carbono, o no estar presentes. Preferentemente, R1, R2, R3 y R4 se pueden seleccionar entre grupos alquilo lineales o ramificados que tienen de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o grupos alcoxi con 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Se debe observar que se puede añadir más de un grupo funcional a los anillos como se indica en las fórmulas en una o  
65

más posiciones.

5 A, B, C y D se seleccionan independientemente entre H, --SiR'R''R''', --N'R'R''R''', un grupo guanidinio, histidina, una poliamina, un grupo piridinio, y un grupo sulfonio. R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-12</sub> y alcoxi C<sub>1-12</sub> y cicloalquilo C<sub>3-12</sub>. Es preferente que R', R'' y R''' sean grupos alquilo inferior o alcoxi inferior.

10 E y F se seleccionan independientemente entre no presente, --O--, --S--, --C(O)--, --C(O)O--, --C(R)(R')--,-N(R')-- y --Si(R')(R''), en los que R' y R'' son como se han definido anteriormente.

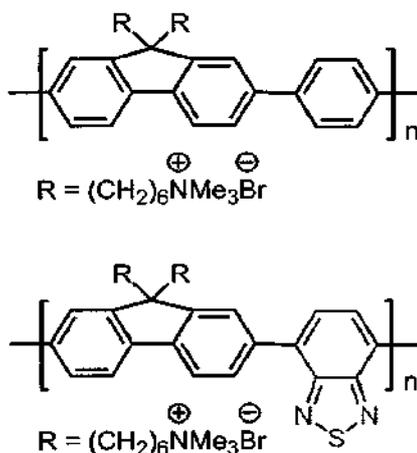
10 X es O, S, Se, --N(R')-- o --C(R')(R'')-- , e Y y Z se seleccionan independientemente entre --C(R)= y --N=, en los que R, R' y R'' son como se han definido anteriormente.

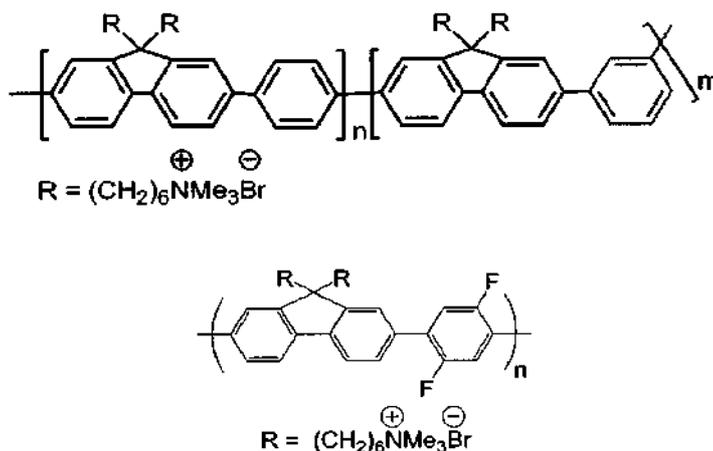
15 La FIG. 19 muestra un CP formado por una estructura principal que contienen unidades de fluoreno inmunidades aromáticas 1, 2, y 3. Las unidades 1, y 2 pueden ser, pero no se limitan a, las estructuras mostradas en la FIG. 20. La unidad 3 contiene un sitio de bioconjugación. La funcionalidad R1 se indica como un grupo de solubilización, y puede ser, pero no se limitara, funcionalidades alquilo con carga (es decir, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NMe<sub>3</sub>Br, o (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>Na) o grupos hidrófilos (es decir, unidades de etilenglicol, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>).

20 Las unidades conjugadas con π, 1, 2, y 3, de la FIG. 19 incluyen las que se describen en las Tablas 1 y 2 y en el Esquema 1 de Liu y Bazan, Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Serie 10/666.333: Conformationally Flexible Cationic Conjugated Polymers. La FIG. 20 muestra varios ejemplos específicos de unidades conjugadas con π que pueden estar contenidas dentro de una estructura general de CP, representada en la FIG. 19, con asteriscos que representan puntos de unión covalente con la estructura principal de CP. Estas unidades incluyen unidades de benceno conectadas con la estructura principal de CP de una forma *para* habitual (a, b, y e) o conectadas de una forma *meta*, que permite más flexibilidad dentro de la estructura principal de CP (c y d). Estas unidades se pueden funcionalizar con restos que alteran la estructura electrónica (a, d, y e), incluyendo grupos donantes ( unidades de alcoxi o etilenglicol) y grupos a tractores (flúor) o mejorar la solubilidad en agua (e) con unidades hidrófilas de etilenglicol o grupos cargados, tales como aminas cuaternarias o sulfonatos. También se incluyen unidades tales como tiofenos (f) y grupos benzotiadiazol (g), que sirven como un medio para alterar la estructura electrónica. Estas unidades también se pueden funcionalizar como se ha descrito anteriormente. La unidad h contiene un sitio de bioconjugación A específico, por ejemplo, maleimida, que se une de forma covalente al segmento conjugado con π mediante un conector L, por ejemplo, un grupo alcoxi, y se puede incorporar en la estructura principal de un CP de una forma *orto*, *para*, o *meta*.

35 Varias variaciones de estructuras políticas específicas incluyen las mostradas en la FIG. 21, que contienen un porcentaje de unidades con un sitio de bioconjugación de maleimida o éster de succimidilo unidas a través de uniones éter y alcoxi.

40 Algunos polímeros conjugados útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:





### Interacciones de Antígeno-Anticuerpo

- 5 Las interacciones entre antígenos y anticuerpos son las mismas que para otras interacciones no covalentes de proteína-proteína. En general, existen cuatro tipos de interacciones de unión entre antígenos y anticuerpos: (i) en la desde hidrógeno, (ii) fuerzas de dispersión, (iii) fuerzas electrostáticas entre ácidos de Lewis y bases de Lewis, e (iv) interacciones hidrófobos. Ciertas fuerzas físicas contribuyen a la unión de antígeno-anticuerpo, por ejemplo, el ajuste o la complementariedad de formas de epítopos con diferentes sitios de unión a anticuerpo. Además, otros materiales
- 10 y antígenos pueden tener reacción cruzada con un anticuerpo, compitiendo de ese modo por el anticuerpo libre disponible.

La medida de la constante de afinidad y la especificidad de unión entre antígenos y anticuerpos es un elemento fundamental para la determinación de la eficacia de un inmunoensayo, no solamente para evaluación de las mejores preparaciones de antígeno y anticuerpo a usar sino también para mantener el control de calidad una vez que el diseño del inmunoensayo básico está en su lugar.

15

### Anticuerpos

- 20 Las moléculas de anticuerpo pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas denominadas inmunoglobulinas, cuyo componente básico, el pliegue o dominio de inmunoglobulina, se usa en diversas formas en muchas moléculas del sistema inmune y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina habitual tiene cuatro cadenas de polipéptidos, que contienen una región de unión antígeno conocida como una región variable y una región no variable conocida como la región constante.

25 Los anticuerpos nativos e inmunoglobulinas son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, formadas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada.

30

35 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar diferentes clases. Existen al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien. Algunos detalles adicionales con respecto a la estructura, función, uso y preparación del anticuerpo se analizan en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.998.241, presentado el 14 de febrero de 2006.

40

### Ensayos de Sándwich

- 45 Los expertos en la materia conocen bien algunos ensayos de sándwich de anticuerpo o múltiples anticuerpos incluyendo lo desvelado en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.486.530, presentado el 4 de diciembre de 1984, y referencias indicadas en el mismo. Las estructuras que se describen en las FIGS. 6, 7, 8 y 14 se pueden usar directamente como se describe o en diversas configuraciones de sándwich. Una configuración de sándwich o
- 50 un ensayo de sándwich se refieren al uso de sucesos de reconocimiento sucesivos para construir capas de diversas

biomoléculas y elementos indicadores para señalar la presencia de una biomolécula en particular, por ejemplo una biomolécula diana o una biomolécula asociada a diana. Un ejemplo convencional de esto sería el uso sucesivo de anticuerpos. En estos ensayos, un anticuerpo primario se unía la diana, el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario, un tercer anticuerpo se puede unir al secundario y así sucesivamente. Con cada capa sucesiva adicional se pueden añadir grupos indicadores. Otra estrategia es el uso de una adición repetitiva de capas alternativas de dos (o más) componentes que se pueden reconocer mutuamente, o más de dos componentes en una relación de reconocimiento de cadena, que comprende uno o ambos de los componentes en una forma de estructura multimérica. En tal configuración, uno o más del grupo o grupos funcionales en cada una de las estructuras multiméricas se puede etiquetar con grupo o grupos indicadores y el grupo o grupos funcionales no ocupados puede servir como el sitio de reconocimiento para el otro componente o componentes, y este sistema proporcionará posteriormente una plataforma para amplificación de señales. Un ejemplo habitual de este enfoque es el uso de conjugado de estreptavidina-conjugado de indicador y anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado. En tales ensayos, se puede usar una molécula de sensor biotinilada (ácido nucleico anticuerpo) para unirse a una biomolécula diana, que posteriormente se reconoce mediante un sistema de detección que contiene un conjugado de estreptavidina-indicador y anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado. La estructura de sándwich en este caso se puede construir con sucesivas rondas de interacción de anticuerpos biotinilados y complejos de estreptavidina etiquetados para conseguir la amplificación de la señal. Con una conjugación adicional de un multicromóforo con cualquiera del anticuerpo biotinilado o el complejo de estreptavidina-indicador, es posible aumentar adicionalmente la salida de la señal. En esencia, la integración de un multicromóforo en este tipo de sistema de amplificación de señales puede amplificar adicionalmente señales hasta un nivel superior.

Los complejos de polímero bioconjugado que se describen en las FIGS. 6, 7, 8, 14, 16 y 17 se pueden usar para crear ensayos de sándwich potenciados de forma óptica mediante integración de forma directa de un multicromóforo de captación de luz en elementos de reconocimiento usados normalmente. Los beneficios de las estructuras conjugadas con multicromóforo también se pueden aplicar directamente a los elementos primarios de reconocimiento de diana sin la necesidad de elementos de reconocimiento sucesivos. Por ejemplo, un anticuerpo primario se puede conjugar directamente con un complejo de multicromóforo-colorante tal como se muestra en la FIG. 14. Tal complejo se puede usar para investigar directamente la presencia de una biomolécula diana.

### 30 Polinucleótidos

Los polinucleótidos diana amplificados se pueden someter a tratamientos posteriores de amplificación. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser deseable fragmentar el polinucleótido diana antes de hibridación para proporcionar segmentos a los que se puede acceder más fácilmente. La fragmentación de los ácidos nucleicos se puede realizar con cualquier método que produzca fragmentos de un tamaño útil en el ensayo que se está realizando; en la técnica se conocen algunos métodos físicos, químicos y enzimáticos adecuados.

Una reacción de amplificación se puede realizar en condiciones que permiten que el polinucleótido sensor se divida con el producto de amplificación durante al menos parte de un ciclo de amplificación. Cuando el ensayo se realiza de esta manera, la detección en tiempo real de este suceso de hibridación se puede producir mediante el control de la emisión de luz durante la amplificación.

El análisis de productos de PCR en tiempo real (y PCR de transcripción inversa en tiempo real relacionadas) proporciona una técnica bien conocida para el control de PCR en tiempo real que se ha usado en diversos contextos, que se puede adaptar para uso con los métodos que se describen en el presente documento (véase Laurendeau *et al.*, (1999) "TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency" *Clin Chem* 45 (7): 982-6; Laurendeau *et al.*, (1999) "Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay" *Clin Chem* 59 (12): 2759-65; y Kreuzer *et al.*, (1999) "LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts" *Cancer Research* 59 (13): 3171-4).

### La Muestra

En principio, la muestra puede ser cualquier material sospechoso de contener un agregante capaz de causar la agregación del sensor de agregación. En algunas realizaciones, la muestra puede ser cualquier fuente de material biológico que comprende polinucleótidos que se pueden obtener a partir de un organismo vivo directa o indirectamente, incluyendo células, tejido o fluido, y los depósitos dejados por ese organismo, incluyendo virus, micoplasmas y fósiles. La muestra puede comprender un agregante preparado a través de medios sintéticos, en su totalidad o en parte. Por lo general, la muestra se obtiene o se dispersa en un medio predominantemente acuoso. Algunos ejemplos no limitantes de la muestra incluyen sangre, orina, semen, leche, esputo, moco, un hisopo bucal, un hisopo vaginal, un hisopo rectal, un aspirado, una biopsia de aguja, una sección de tejido obtenida por ejemplo mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, las secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, tumores, órganos, muestras de componentes de cultivo celular *in vitro* (que incluyen, pero no se limitan a, medio acondicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo celular, células supuestamente infectadas por virus, células recombinantes, y componentes celulares), y una biblioteca recombinante que comprende secuencias de polinucleótidos.

La muestra puede ser una muestra de control positivo que se sabe que contiene el agregante o un sustituto del mismo. También se puede usar una muestra de control negativo que, aunque no se espera que contenga el agregante, se sospecha que lo contiene (a través de contaminación de uno o más de los reactivos) u otro componente capaz de producir un falso positivo, y se somete al ensayo para confirmar la ausencia de contaminación por el polinucleótido diana de los reactivos usados en un ensayo dado, así como para determinar si un conjunto dado de condiciones de ensayo produce falsos positivos (una señal positiva incluso en ausencia de polinucleótido diana en la muestra).

La muestra se puede diluir, disolver, suspender, extraer o tratar de otro modo para solubilizar y/o purificar cualquier polinucleótido diana presente o para que sea accesible a reactivos que se usan en un esquema de amplificación o para detección de reactivos. Cuando la muestra contiene células, las células se pueden lisar o permeabilizar para liberar los polinucleótidos dentro de las células. Se pueden usar tampones de permeabilización de una etapa para lisar células que permitan la realización de etapas adicionales directamente después de la lisis, por ejemplo una reacción en cadena de la polimerasa.

### Cromóforos de Señalización

En algunas realizaciones, se puede usar un cromóforo o fluoróforo de señalización, por ejemplo para recibir energía transferida desde un estado excitado de una unidad prácticamente activa, o para intercambiar energía con una sonda etiquetada, o en múltiples esquemas de transferencia de energía. Algunos fluoróforos útiles en las invenciones descritas en el presente documento incluyen cualquier sustancia que pueda absorber energía de una longitud de onda apropiada y emitir o transferir energía. Para ensayos multiplexados, se puede usar una pluralidad de fluoróforos diferentes con espectros de emisión diferentes que se pueden detectar. Algunos fluoróforos habituales incluyen colorante fluorescentes, nanocristales semiconductores, quelatos de lantánidos, y proteína fluorescente de color verde.

Algunos colorantes fluorescentes a modo de ejemplo incluyen fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Rojo Texas, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6G, carboxirrodol, carboxirrodamina 110, Azul Cascade, Amarillo Cascade, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy-Chrome, ficoeritrina, PerCP (Proteína clorofila-a peridina), PerCPCy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimelhoxifluoresceína), NED, ROX (5-(and-6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Amarillo Lucifer, Azul Marina, Verde Oregon 488, Verde Oregon 500, Verde Oregon 514, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético, BODIPY® FL, BODIPY® FL-Br<sub>2</sub>, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, conjugados de los mismos, y combinaciones de los mismos. Algunos quelatos de lantánidos a modo de ejemplo incluyen quelatos de europio, quelatos de terbio y quelatos de samario.

En la técnica se conoce una amplia diversidad de nanocristales semiconductores fluorescentes ("SCNC"); algunos métodos para producir y usar nanocristales semiconductores se describen en: Publ. de PCT n.º WO 99/26299 publicada el 27 de mayo de 1999, inventores Bawendi *et al.*; documento USPN 5.990.479 presentado el 23 de noviembre de 1999 de Weiss *et al.*; y Bruchez *et al.*, Science 281: 2013, 1998. Algunos nanocristales semiconductores se pueden obtener con bandas de emisión muy estrechas con longitudes de onda de emisión con picos bien definidos, que permiten un gran número de diferentes SCNC a usar como cromóforos de señalización en el mismo ensayo, opcionalmente en combinación con otros tipos de cromóforos de señalización que no son SCNC.

Algunos colorantes específicos de polinucleótido a modo de ejemplo incluyen naranja de acridina, homodímero de acridina, actinomicina D, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), 9-amino-6-clor-2-metoxiacridina (ACMA), yoduro de BOBO™-1 (462/481), yoduro de BOBO™-3 (570/602), yoduro de BO-PRO™-1 (462/481), yoduro de BO-PRO™-3 (575/599), 4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato (DAPI), 4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato (DAPI), 4',6-diamidino-2-fenilindol, dilactato (DAPI, dilactato), dihidroetidio (hidroetidina), dihidroetidio (hidroetidina), dihidroetidio (hidroetidina), bromuro de etidio, cloruro de diazida de etidio, homodímero-1 de etidio (EthD-1), homodímero-2 de etidio (EthD-2), bromuro de monoazida de etidio (EMA), yoduro de hexidio, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580, Hoechst S769121, hidroxistilbamidina, metanosulfonato, yoduro de JOJO™-1 (529/545), yoduro de JO-PRO™-1 (530/546), yoduro de LOLO™-1 (565/579), yoduro de LO-PRO™-1 (567/580), NeuroTrace™ 435/455, NeuroTrace™ 500/525, NeuroTrace™ 515/535, NeuroTrace™ 530/615, NeuroTrace™ 640/660, OliGreen, PicoGreen® ssDNA, PicoGreen® dsDNA, yoduro de POPO™-1 (434/456), yoduro de POPO™-3 (534/570), yoduro de PO-PRO™-1 (435/455), yoduro de PO-PRO™-3 (539/567), yoduro de propidio, RiboGreen®, *SlowFade®*, *SlowFade® Light*, SYBR® Verde I, SYBR® Verde II, SYBR® Oro, SYBR® 101, SYBR® 102, SYBR® 103, SYBR® DX, TO-PRO®-1, TO-PRO®-3, TO-PRO®-5, TOTO®-1, TOTO®-3, YO-PRO®-1 (amarillo de oxazol), YO-PRO®-3, YOYO®-1, YOYO®-3, TO, SYTOX® Azul, SYTOX® Verde, SYTOX® Naranja, SYTO® 9, SYTO® BC, SYTO® 40, SYTO® 41, SYTO® 42, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, SYTO® Azul, SYTO® 11, SYTO® 12, SYTO® 13, SYTO® 14, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 21, SYTO® 22, SYTO® 23, SYTO® 24, SYTO® 25, SYTO® Verde, SYTO® 80, SYTO® 81, SYTO® 82, SYTO® 83, SYTO® 84, SYTO® 85, SYTO® Naranja, SYTO® 17, SYTO® 59, SYTO® 60, SYTO® 61, SYTO® 62, SYTO® 63, SYTO® 64, SYTO® Rojo, netropsina, distamicina, naranja de acridina, 3,4-benzopireno, naranja de tiazol, TOMEHE, daunomicina, acridina, pentil-TOTAB, y butil-

TOTIN. Como el colorante específico de polinucleótido se pueden usar algunos colorantes de cianina asimétricos. Otros colorantes de interés incluyen los que describen Geierstanger, B.H. y Wemmer, D.E., *Annu. Rev. Vioshys. Biomol. Struct.* 1995, 24, 463-493, por Larson, C.J. y Verdine, G.L., *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Hecht, S.M., Ed., Oxford University Press: New York, 1996; pp 324-346, y por Glumoff, T. y Goldman, A. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2ª ed., Blackburn, G.M. y Gait, M.J., Eds., Oxford University Press: Oxford, 1996, pp 375-441. El colorante específico de polinucleótido puede ser un colorante de intercalado, y puede ser específico para polinucleótidos de doble hebra. Otros colorantes y fluoróforos se describen en [www.probes.com](http://www.probes.com) (Molecular Probes, Inc.).

La expresión "proteína fluorescente de color verde" se refiere tanto a una proteína fluorescente de color verde de *Aequorea* nativa como a versiones mutadas que se han identificado como que presentan características de fluorescencia alteradas, incluyendo máximos de excitación y emisión alterados, así como espectros de excitación y emisión de diferentes formas (Delgrave, S. *et al.* (1995) *Bio/Technology* 13: 151-154; Heim, R. *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12501-12504; Heim, R. *et al.*, (1995) *Nature* 373: 663-664). Delgrave *et al.*, isolated mutants of cloned *Aequorea victoria* GFP that had red-shifted excitation spectra. *Bio/Technology* 13: 151-154 (1995). Heim, R. *et al.*, informaron de un mutante (Tyr66 para His) con una fluorescencia de color azul (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) *USA* 91: 12501-12504).

### El Sustrato

En algunas realizaciones, un componente del ensayo se puede localizar sobre un sustrato. El sustrato puede comprender una amplia gama de materiales, ya sea biológicos, no biológicos, orgánicos, inorgánicos, o una combinación de cualquiera de los mismos. Por ejemplo, el sustrato puede ser una película de Langmuir Blodgett polimerizada, vidrio funcionalizado, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO<sub>2</sub>, SiN<sub>4</sub>, silicio modificado, o una cualquiera de una gran diversidad de geles o polímeros tales como (poli)tetrafluoroetileno, difluoruro de (poli)vinilideno, poliestireno, poliestireno reticulado, poliacrílico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli(lactida coglicólido), polianhídridos, poli(metacrilato de metilo), poli(etileno-co-acetato de vinilo), polisiloxanos, sílice polimérica, látex, polímeros de dextrano, epoxis, policarbonatos, o combinaciones de los mismos. Se pueden usar polímeros conductores y materiales fotoconductores.

Los sustratos pueden ser sustratos cristalinos planos tales como sustratos basados en sílice (por ejemplo, vidrio, cuarzo, o similares), o sustratos cristalinos usados, por ejemplo, en las industrias de semiconductores y microprocesadores, tales como silicio, arseniuro de galio, GaN dopado con indio y similares, e incluyen nanocristales semiconductores.

El sustrato puede tomar la forma de un fotodiodo, un sensor optoelectrónico tal como un chip semiconductor optoelectrónico o semiconductor optoelectrónico de película fina, o un biochip. La ubicación o ubicaciones de la sonda(s) en el sustrato se pueden dirigir; esto se puede realizar en formatos de alta densidad, y la ubicación o ubicaciones pueden ser microdirigibles o nanodirigibles.

Como sustratos también se pueden usar aerogeles de sílice, y se pueden preparar con métodos conocidos en la técnica. Algunos sustratos de aerogel se pueden usar como sustratos de permanencia libre o como un revestimiento de superficie para otro material de sustrato.

El sustrato puede tener cualquier forma y por lo general es una placa, portaobjetos, perla, gránulo, disco, partícula, micropartícula, nanopartícula, hebra, precipitado, gel opcionalmente poroso, láminas, tubo, esfera, recipiente, capilar, lecho, porción, película, chip, placa o disco de múltiples pocillos, fibra óptica, etc. El sustrato puede tener cualquier forma que sea rígida o semi-rígida. El sustrato puede contener regiones elevadas o deprimidas en las que se encuentra un componente del ensayo. La superficie del sustrato se puede grabar usando técnicas bien conocidas para proporcionar características de superficie deseadas, por ejemplo ranuras, hendiduras en forma de V, estructuras de tipo mesa, o similares.

Las superficies sobre el sustrato pueden estar formadas por el mismo material que el sustrato o se pueden preparar a partir de un material diferente, y se pueden acoplar al sustrato por medios químicos o físicos. Tales superficies acopladas pueden estar formadas por cualquiera de una gran diversidad de materiales, por ejemplo, polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, o cualquiera de los materiales de sustrato mencionados anteriormente. La superficie puede ser ópticamente transparente y puede tener la funcionalidades de Si-OH de superficie, tales como las que se encuentran en las superficies de sílice.

El sustrato y/o su superficie opcional se pueden elegir para proporcionar características adecuadas para los métodos de síntesis y/o detección usados. El sustrato y/o la superficie pueden ser transparentes para permitir la exposición del sustrato a la luz aplicada desde múltiples direcciones. El sustrato y/o la superficie pueden estar provistos de estructuras de "espejo" reflectantes para aumentar la recuperación de la luz.

El sustrato y/o su superficie por lo general son resistentes a, o se tratan para que resista, las condiciones a las que se van a exponer en el uso, y se pueden tratar opcionalmente para eliminar cualquier material resistente después de la exposición a condiciones de este tipo.

5 Algunas sondas de polinucleótidos se pueden fabricar sobre o unir al sustrato mediante cualquier método adecuado, por ejemplo los métodos que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.143.854, Publ. de PCT n.º WO 92/10092, Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Ser. 07/624.120, presentada al 6 de diciembre de 1990 (ahora abandonada), Fodor *et al.*, Science, 251: 767-777 (1991), y Publ. de PCT n.º WO 90/15070). Algunas técnicas para la síntesis de estas matrices usando estrategias de síntesis mecánica se describen, por ejemplo, en la Publicación de PCT n.º WO 93/09668 y en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.384.261.

10 Además, algunas técnicas adicionales incluyen técnicas basadas en perlas tales como las que se describen en la Sol. de PCT n.º PCT/US93/04145 y métodos basados en fijación tales como los que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.288.514.

15 Algunos métodos adicionales de canal de flujo o aplicación puntual se pueden aplicar a la unión de polinucleótidos de sensor al sustrato se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con n.º de Ser. 07/980.523, presentada el 20 de noviembre de 1992, y en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.384.261. Los reactivos se administran al sustrato por cualquiera de (1) flujo dentro de un canal definido en regiones definidas previamente o (2) "aplicación puntual" en regiones definidas previamente. Un revestimiento protector tal como un revestimiento hidrófilo o hidrófobo (dependiendo de la naturaleza del disolvente) se puede usar sobre partes del sustrato a proteger, en ocasiones en combinación con materiales que facilitan la humectación por la solución de reactivo en otras regiones. De esta manera, se impide aún más que las soluciones que fluyen pasen fuera de sus vías de flujo designadas.

20 Algunos dispensadores habituales incluyen una micropipeta opcionalmente controlada de forma robótica, una impresora de inyección de tinta, una serie de tubos, un colector, un conjunto de pipetas, o similares de modo que diversos reactivos se pueden administrar a las regiones de reacción de forma secuencial o simultánea.

30 El sustrato o una región del mismo se puede codificar de modo que se puede determinar la identidad del sensor situado en el sustrato o región que se consulta. Se puede usar cualquier esquema de codificación adecuado, por ejemplo, códigos ópticos, etiquetas de RFID, códigos magnéticos, códigos físicos, códigos fluorescentes, y combinaciones de códigos.

### 35 Excitación y Detección

Para la excitación se puede usar cualquier instrumento que proporcione una longitud de onda que pueda excitar al sensor de agregación y que sea más corta que la longitud o longitudes de onda de emisión a detectar. Algunos dispositivos disponibles en el mercado pueden proporcionar longitudes de onda de excitación adecuadas así como componentes de detección adecuados.

45 Algunas fuentes de excitación a modo de ejemplo incluyen una fuente de luz UV de banda ancha tal como una lámpara de deuterio con un filtro apropiado, la salida de una fuente de luz blanca, tal como una lámpara de xenón o una lámpara de deuterio después de pasar a través de un monocromador para extraer las longitudes de onda deseadas, un láser de gas de onda continua (cw), un láser de diodo de estado sólido, o cualquiera de los láseres pulsados. La luz emitida se puede detectar a través de cualquier dispositivo o técnica adecuados; en la técnica se conocen muchos enfoques adecuados. Por ejemplo, para detectar si la muestra de ensayo emite luz de una longitud de onda característica del cromóforo de señalización después de la excitación del multicromóforo se puede usar un fluorímetro o espectrofotómetro.

### 50 Composiciones de Materia

También se proporcionan composiciones de materia de cualquiera de las moléculas descritas en el presente documento en cualquiera de diversas formas. Los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos como se describe en el presente documento se pueden proporcionar en forma purificada y/o aislada. Los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos se pueden proporcionar en forma cristalina.

60 Los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos se pueden proporcionar en solución, que puede ser una solución predominantemente acuosa, que puede comprender uno o más de los componentes de la solución adicionales descritos en el presente documento, que incluyen, pero no se limitará, disolventes adicionales, tampones, biomoléculas, polinucleótidos, fluoróforos, etc. Los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos pueden estar presentes en solución a una concentración en la que una primera emisión de las primeras unidades ópticamente activas se puede detectar en ausencia de la diana de biomolécula o una biomolécula asociada con la misma. La solución puede comprender componentes adicionales como se describe en el presente documento, incluyendo sondas etiquetadas tales anticuerpos o polinucleótidos etiquetados con fluorescencia,

específicas para una especie de una clase de diana de biomolécula o una biomolécula asociada con la misma para los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos.

5 Los multicromóforos y complejos que incluyen multicromóforos se pueden proporcionar en forma de una película. Las composiciones de materia se pueden reivindicar por cualquier propiedad descrita en el presente documento, incluyendo la estructura propuesta, el método de síntesis, el espectro de absorción y/o emisión, análisis elemental, espectros de RMN, o mediante cualquier otra propiedad o característica.

10 En algunas realizaciones se detecta la expresión de un gen en una muestra. En una realización adicional para diagnosticar una patología en un paciente, se puede usar un resultado medido para detectar una biomolécula diana o una biomolécula asociada con la misma. En otra realización, el método de detección de la invención puede incluir adicionalmente un método para diagnosticar una patología. En una realización relacionada, el método para diagnosticar una enfermedad puede incluir la revisión o análisis de los datos relativos a la presencia de una biomolécula diana o una biomolécula asociada con la misma y proporcionar una conclusión a un paciente, un proveedor de cuidados para la salud o un gestor de cuidados para la salud conclusión que se basa en la revisión o análisis de los datos con respecto al diagnóstico de la enfermedad. La revisión o análisis de estos datos se puede facilitar usando un ordenador u otro dispositivo digital y una red como se describe en el presente documento. Se prevé que la información relativa a tales datos se pueda transmitir sobre la red.

20 En la práctica de los métodos de la presente invención, opcionalmente se usan muchas técnicas convencionales en biología molecular. Estas técnicas se conocen bien y se explican por ejemplo, en Ausubel *et al.*, (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I, II, y III, (1997), Ausubel *et al.*, (Eds.), Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5ª Ed., John Wiley & Sons, Inc. (2002), Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000), e Innis *et al.*, (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Elsevier Science & Technology Books (1990).

30 La FIG. 22 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de dispositivo lógico a través del que se puede conseguir la revisión o análisis de datos que se refieren a la presente invención. Tales datos pueden estar en relación con una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. La FIG. 22 muestra un sistema informático (o dispositivo digital) 800 conectado a un aparato 820 para su uso con el multicromóforo o complejos de multicromóforos 824 para, por ejemplo, producir un resultado. El sistema informático 800 se puede comprender como un aparato lógico que puede leer instrucciones del medio 811 y/o puerto de red 805, que se puede conectar opcionalmente con el servidor 809 que tiene el medio fijo 812. El sistema mostrado en la FIG. 22 incluye CPU 801, unidades de disco 803, dispositivos de entrada opcionales tales como teclado 815 y/o ratón 816 y monitor 807 opcional. La comunicación de datos opcional se puede conseguir a través del medio de comunicación indicado con un servidor 809 a una ubicación local o remota. El medio de comunicación puede incluir cualquier medio de transmisión y/o recepción de datos. Por ejemplo, el medio de comunicación puede ser una conexión de red, una conexión inalámbrica o una conexión a Internet. Se prevé que los datos relativos a la presente invención se puedan transmitir a través de dichas redes o conexiones.

45 En una realización, un medio que se puede leer por ordenador incluye un medio adecuado para transmisión de un resultado de un análisis de una muestra biológica. El medio puede incluir un resultado con respecto a una afección o patología de un sujeto, en el que tal resultado se obtiene usando los métodos que se describen en el presente documento.

#### Kits

50 También se proporcionan kits que comprenden reactivos útiles para la realización de los métodos descritos.

En algunas realizaciones, un kit comprende reactivos que incluyen multicromóforo o complejos de multicromóforos, bioconjugados, por ejemplo, anticuerpos, y otros componentes como se describe en el presente documento.

55 El kit puede contener opcionalmente uno o más de los siguientes: una o más etiquetas que se pueden incorporar en multicromóforo o complejos de multicromóforos; y uno o más sustratos que pueden contener o no una matriz, etc.

60 Los componentes de un kit se pueden retener con una carcasa. Las instrucciones para usar el kit para la realización de un método se pueden proporcionar con la carcasa, y se pueden proporcionar en cualquier medio fijo. Las instrucciones se pueden localizar dentro de la carcasa o fuera de la carcasa, y se pueden imprimir en el interior o exterior de cualquier superficie que forma la carcasa que hace que las instrucciones se puedan leer. Un kit puede estar en forma multiplex para la detección de una o más biomoléculas diana diferentes o biomoléculas asociadas a las mismas.

65 Como se describe en el presente documento y se muestra en la FIG. 23, en ciertas realizaciones un kit 903 puede incluir un contenedor o carcasa 902 para alojar diversos componentes. Como se muestra en la FIG. 23 y se describe en el presente documento, en una realización, se proporciona un kit 903 que comprende uno o más reactivos de

multicromóforo o complejos de multicromóforos 905, y, opcionalmente, un sustrato 900. Como se muestra en la FIG. 23, y como se describe en el presente documento, el kit 903 puede incluir opcionalmente instrucciones 901. Se prevén otras realizaciones del kit 903 en las que los componentes incluyen diversas características adicionales que se describen en el presente documento.

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1

10 Protocolo general para el método de ELISA de sándwich con anticuerpo conjugado a polímero-colorante:

- 15 1. Unir el anticuerpo sin etiquetar al fondo de cada pocillo mediante la adición de aproximadamente 50 µl de solución de anticuerpo a cada pocillo (20 µg/ml en PBS) en una placa de microtitulación de cloruro de polivinilo (PVC) de 96 pocillos. El PVC se unirá aproximadamente a 100 ng/pocillo (300 ng/cm<sup>2</sup>). La cantidad de anticuerpo usada dependerá del ensayo individual.
2. Incubar la placa durante una noche a 4 °C para permitir la unión completa.
3. Lavar los pocillos dos veces con PBS.
4. Los sitios restantes para unión de proteína en la placa de microtitulación se deben saturar mediante incubación con tampón de bloqueo. Llenar los pocillos hasta la parte superior con un 3 % de BSA/PBS con azida sódica al 20 0,02 %. Incubar durante 2 h. hasta durante una noche en una atmósfera húmeda a temperatura ambiente.
5. Lavar los cuchillos dos veces con PBS.
6. Añadir 50 µl de la solución de antígeno (o muestra) a los pocillos (la solución de antígeno se debería valorar). Todas las diluciones se deberían realizar en el tampón de bloqueo (BSA al 3 %/PBS). Incubar durante al menos 2 h. a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda.
- 25 7. Lavar la placa cuatro veces con PBS.
8. Añadir cantidad de acceso de cualquiera de los conjugados de polímero-colorante-segundo anticuerpo (Ejemplo A o C) o anticuerpo etiquetado con biotina.
9. Incubar durante 2 h. o más a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda.
10. Lavar con varios cambios de PBS.
- 30 11. Cuando el anticuerpo etiquetado con biotina se usa en la Etapa 8, añadir conjugado de estreptavidina-polímero y un colorante (Ejemplo B o D, en PBS que contiene NaCl 1 M) e incubar durante 2 h. o más a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda
12. Medir las densidades ópticas a longitudes de onda diana en un lector de placas de ELISA.

35 Para resultados cuantitativos, comparar la señal de nuestras desconocidas con respecto a las de una curva estándar. Los patrones se deben realizar con cada ensayo para asegurar la precisión.

En los ensayos de ELISA, las moléculas de anticuerpo primario se unen en el lado y el fondo de los pocillos en una placa de microtitulación. Cuando la muestra que contiene las moléculas diana se añade el pocillo, el anticuerpo 40 primario y movilizado solamente capturará esas dianas y el resto de los componentes en la muestra se retirarán por lavado. En comparación con el anticuerpo etiquetado con fluorescencia usado normalmente, los conjugados de polímero-colorante-anticuerpo secundario descritos pueden emitir una señal mucho más intensa (10-100 veces) que la preparación regular debido a su capacidad de captación de luz más elevada y a su diseño dentro de la misma molécula para una mejor eficacia de la transferencia de energía. Estas ventajas tales se pueden traducir en un 45 ensayo con sensibilidad más elevada. Cuando la comparación adicional de los conjugados de polímero-colorante-anticuerpo secundario con el otro anticuerpo secundario equipado con una funcionalidad de amplificación de señales (por ejemplo, anticuerpo etiquetado con peroxidasa de rábano picante), los conjugados de polímero-colorante-anticuerpo secundario pueden proporcionar un proceso de una etapa (sin sustrato enzimático adicional) para conseguir la finalidad de la amplificación de señales. También se espera que relación coste-eficacia (tanto en tiempo 50 como material) de los conjugados descritos tenga una aceptación en el mercado mejor.

### Ejemplo 2

Protocolo general para etiquetado de micromatrices con anticuerpo conjugado con polímero-colorante:

55

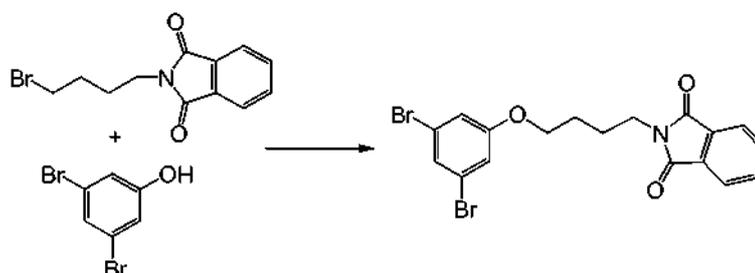
1. Preparar ARN o ARNm total.
2. Usar cebador T7-oligo(dT) para realizar síntesis de ADNc de un ciclo o dos ciclos.
3. Limpiar el ADNc de doble hebra.
4. Usar kit de amplificación de IVT (transcripción *in vitro*) para incorporar ribonucleótido etiquetado con biotina en 60 ARNc.
5. Fragmentación de ARNc.
6. Hibridar fragmentos de ARNc en chip.
7. Retirar por lavado el ARNc residual y teñir el chip con conjugado de estreptavidina-polímero-colorante (Ejemplo B o)
- 65 8. Retirar por lavado los reactivos residuales en el chip.
9. Hacer barrido de micromatrices.

En la práctica regular de la metodología de micromatrices, una integración de nucleótidos etiquetados con biotina en las secuencias de ARNc es el medio para secuestrar el conjugado de estreptavidina y ficoeritrina y anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado para informe de la señal amplificada. Debido a la complejidad de la preparación del conjugado de estreptavidina y ficoeritrina, la variación de lote a lote es significativa. Por lo tanto, el conjugado de estreptavidina-copolímero-colorante puede ser una alternativa muy buena para estilo y el conjugado de estreptavidina y ficoeritrina. Además, las publicaciones anteriores han demostrado que algunos MULTICROMÓFOROS pueden amplificar las señales de fluorescencia hasta 75 veces a través de sus funcionalidad desde captación de luz y transferencia de energía. Es razonable esperar que el conjugado de estreptavidina-polímero-colorante pueda funcionar de una forma equivalente o mejor que la ficoeritrina.

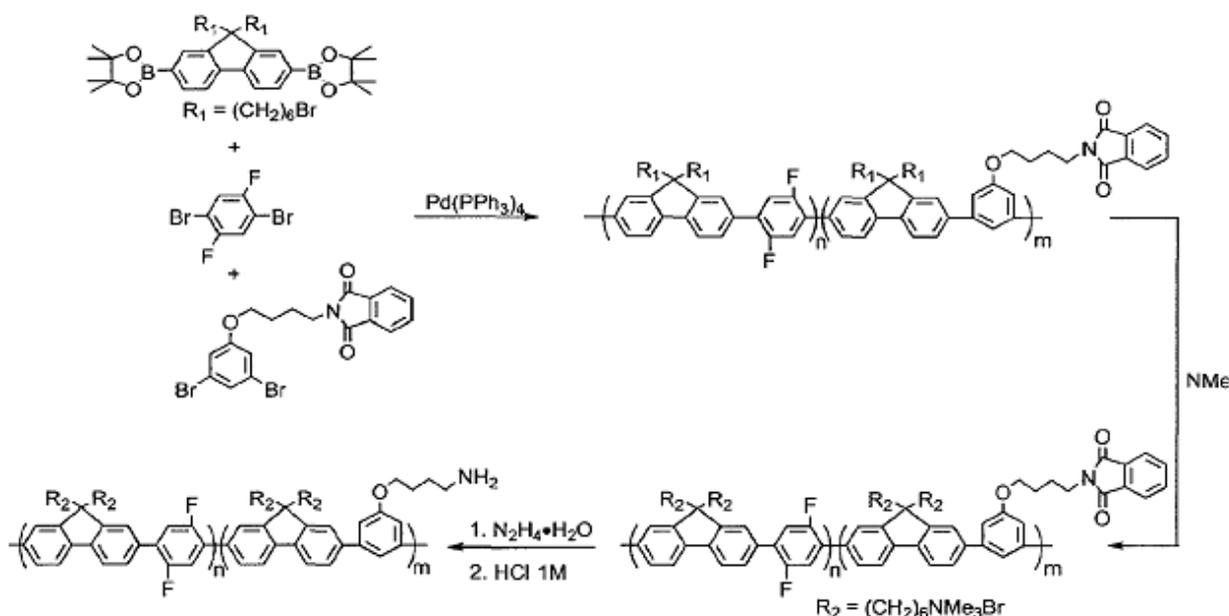
Aunque en el presente documento se han mostrado y descrito realizaciones preferentes de la presente invención, para los expertos en la materia será evidente que tales realizaciones se proporcionan solamente a modo de ejemplo.

### Ejemplo 3.

Síntesis de polímero conjugado catiónico con un grupo funcional amino, CA001:



- 1-(4'-Ftalimidobutoxi)-3,5-dibromobenceno: 3,5-dibromofenol (970 mg, 3,85 mmol) se recristalizó en hexanos. Después de retirada de disolvente, se añadieron *N*-(4-bromobutil)ftalimida (1,38 g, 4,89 mmol),  $K_2CO_3$  (1,88 g, 13,6 mmol), 18-corona-6 (53 mg, 0,20 mmol) y acetona (20 ml). Esto se calentó a reflujo durante 1 hora, y después se vertió en 100 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 30 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua,  $NaHCO_3$  saturado, y salmuera, después se secaron sobre  $MgSO_4$  y se filtraron. La retirada del disolvente proporcionó un sólido de color blanco, que se purificó por cromatografía en columna (4:1 de hexanos: $CH_2Cl_2$ ) seguido de recristalización en hexanos para producir agujas incorporadas (650 mg, 87 %). RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ): 7,860 (m, 2H); 7,733 (m, 2H); 7,220 (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H); 6,964 (d,  $J = 2,0$  Hz, 2H); 3,962 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H); 3,770 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 1,846 (m, 4H).



Poli[[2,7-{9,9-bis(6'-bromohexil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-bromohexil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)]: Una solución de 2,7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9,9-bis(6'-

bromoheíl)fluoreno (1,001 g, 1,34 mmol), 1,4-dibromo-2,5-difluorobenceno (346,6 mg, 1,274 mmol), 1-(4'-ftalimidobutoxi)-3,5-dibromobenceno (30,8 mg, 0,068 mmol), carbonato potásico (2,15 g, 15,5 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (37,2 mg, 0,032 mmol) en THF (45 ml) y agua (15 ml) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador de reflujo con camisa de agua se desgasificó a través de cuatro ciclos de congelación-bombeo-descongelación, con introducción de argón después de la tercera y cuarta rondas de desgasificación. A continuación, la solución se calentó a reflujo durante 48 horas en una atmósfera de argón. Después de un periodo de refrigeración, la solución se añadió gota a gota a 40 ml de metanol en agitación para precipitar el polímero, que se recogió por centrifugación. Esto fue seguido de decantación y lavado con metanol (dos veces) para retirar fracciones de bajo peso molecular, proporcionando un polvo esponjoso, de color amarillo (500 mg, 62 %). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 7,912-7,419 (m, 8H); 3,322 (t, J = 7,4 Hz, 4H); 2,120 (s a, 4H); 1,693 (t, J = 7,0 Hz, 4H); 1,237 (s a, 4H); 1,153 (s a, 4H); 0,788 (s a, 4H). Mn 17K, PDI 2.1.

Poli[(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)]: Se condensó trimetilamina (1 ml) en una solución de poli[(2,7-{9,9-bis(6'-bromoheíl)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-bromoheíl)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)] (130 mg, 0,215 mmol) en THF (10 ml) a presión reducida. Esta solución se agitó durante 24 h. En el que el polímero precipito de la solución. El metanol se añadió (50 ml) para solubilizar el polímero, a continuación se condensó 1 ml de trimetilamina en el matraz de reacción a presión reducida. Esto se agitó durante un periodo adicional de 24 horas, y a continuación se retiraron todos los disolventes y el exceso de trimetilamina a presión reducida para dar una película de color amarillo pálido (140 mg, 90 %). RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O): 7,871-7,423 (m, 8H); 3,148 (m, 4H); 2,970 (s a, 18H); 2,116 (s a, 4H); 1,525 (s a, 4H); 1,119 (s a, 8H); 0,681 (s a, 4H).

CA001, poli[(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-aminobutoxi}fenileno)]: Una solución de monohidrato de hidrazina (73,1 mg, 1,46 mmol), poli[(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-(bromuro de N,N,N-trimetilamonio)hexil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)] (100 mg, 0,137 mmol) en metanol (10 ml) se calentaron a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron a continuación 0,9 ml de HCl 1 M a la solución, que a continuación se calentó a reflujo durante un periodo adicional de 2 horas. La solución resultante se sometió a diálisis frente a un 50 % de metanol en agua, y a continuación se evaporó a sequedad.

Se determinó un método para evaluar la incorporación de los monómeros funcionalizados en las estructuras del polímero final. Los grupos funcionales amino se protegieron como ftalimida durante la reacción de polimerización para evitar la contaminación del catalizador. Este grupo protector tiene una firma única en espectroscopía de infrarrojos (IR), mostrada en forma de una línea continua en la Figura 24. Los picos indicados corresponden a picos únicos de C=O solamente presentes para el grupo protector de ftalimida. La desprotección posterior del grupo ftalimida (que proporciona una amina libre) proporciona una firma de IR de CA001 que carece de los picos de C=O de la firma de ftalimida (línea discontinua, Figura 24), e indica una amina activa disponible para conjugación.

Los espectros ópticos de CA001 se muestran en la Figura 25, en la que la línea continua indica la absorción y la línea discontinua indica en los espectros de emisión.

#### Ejemplo 4

Síntesis de polímero conjugado catiónico - conjugado de FAM, CA001-FAM:

El polímero CA001 desprotegido (que tiene una amina libre) se hizo reaccionar con un éster de succimidilo FAM, 5(6)FAM-SE (Invitrogen, n.º C1311), adaptado a partir de protocolos disponibles en [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) (última visita 04/10/07). Como un control negativo, el mismo polímero se incubó con fluoresceína (sin grupo reactivo) en las mismas condiciones de reacción. El protocolo para este procedimiento sigue a continuación.

Conjugación de NHS-FAM con CA001

Finalidad:

Biotinilar CA001 con NHS-FAM y demostrar FRET para colorante unido de forma covalente.

Materiales:

Fluorómetro, con cubetas transparentes para UV

Instrumento de UV-VIS

CA001 purificado

NHS-FAM (Invitrogen n.º C-1311)

NEt<sub>3</sub> 0,5 M (dilución a 1:14 de NEt<sub>3</sub> de reserva (7,2 M))

Filtros MC30

Procedimiento:

1. Crear reacciones usando 10 veces de XS de NH-FAM con respecto a copolímero de amina. Usar 50 ug de prepolímero y 8,0 ug de NHS-FAM por 10 ul de rxn:

Muestra	ul de Rxn	90 % de M1T	CA001	NEt <sub>3</sub> 0,25 M	NHS-FAM, 8,0 mg/ml de DMSO	Fluoresceína, 8,0 mg/ml de DMSO
CA001 + NHS-FAM:	10	(8-x) ul	x ul	1,0 ul	1,0 ul	--
CA001 - NHS-FAM:	10			1,0	--	1,0 ul

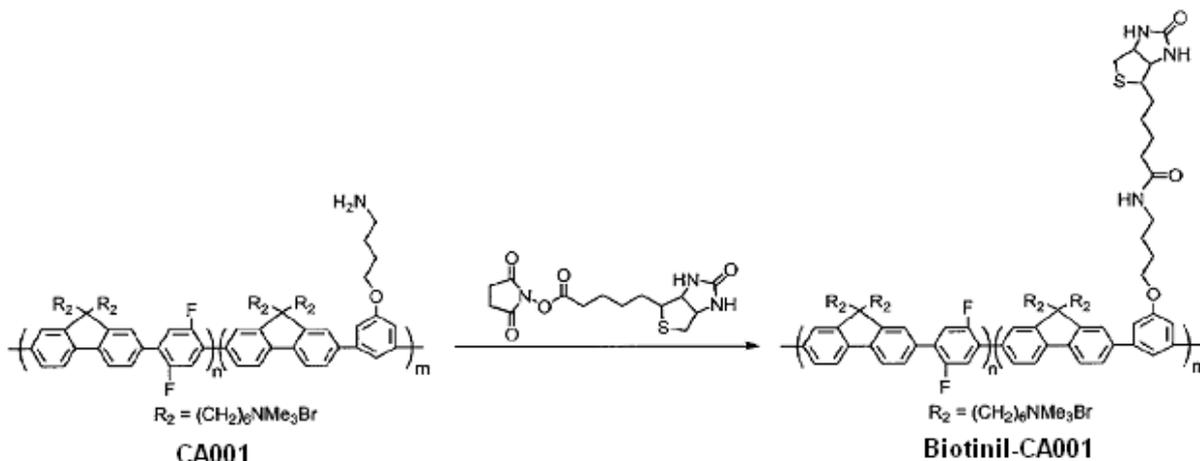
2. Cuando se ha combinado todo excepto el colorante, disolver 1-2 mg de colorante en DMSO a 130 ul de DMSO anhidro/mg de colorante. Usado reactivos de NHS sin retraso después de la disolución. n.º de Expediente de WSGR 32942-701.601

- 5 3. Incubar a 25 °C en bloqueo de calor durante 30 min.
4. Diluir en 90M1T (10 ul en 400 ul)
5. Desalar con MC30, 2X
6. Ensayo para concentración con UV/Vis

- 10 Los espectros de fluorescencia resultantes para cada de reacción se muestran en la Figura 26. La fluorescencia que surge del control positivo se muestra en forma de una línea continua. Cuando el polímero se excita, se produce FRET para el colorante aceptor (ahora unido de forma covalente al polímero), dando como resultado una emisión de fluoresceína intensa. La fluorescencia que surge del control negativo se muestra como una línea de puntos. Dado que la fluoresceína para el control negativo no se puede unir al polímero, cuando el polímero se excita, no se produce FRET y solamente se observa la emisión del polímero. Estos datos indican que la amina en CA001 está disponible para conjugación.
- 15

#### Ejemplo 5

- 20 Síntesis de un polímero conjugado biotilado, biotilil-CA001:



- 25 El grupo funcional amino en CA001 se convirtió en una funcionalidad biotina usando un conector de NHS-biotina disponible en Pierce (n.º 20217). El protocolo para este procedimiento se modificó a partir del protocolo de Pierce, encontrado en la página web de Pierce, [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) (última visita del 23/09/2007). El protocolo para este procedimiento sigue de forma análoga al indicado en el Ejemplo 12.

#### Ejemplo 6

- 30 Procedimiento para la amplificación de señal con biotilil-CA001, Avidina DN, y biotilil-fluoresceína:

Finalidad:

- 35 Demostrar la amplificación de la señal fluorescente a través de FRET, usando biotilil-CA001, Avidina DN, y biotilil-fluoresceína

Materiales:

- Fluorómetro NanoDrop
- Fluorómetro de Perkin-Elmer, modelo PE-LS55
- Cubetas de 1 ml de plástico transparentes para UV
- 40 pipeteadores + puntas
- biotilil-CA001 (BCA)
- CA001 (CA)

biotinil-fluoresceína (BFL)  
 Avidina DN (ADN)  
 TBS

5 Procedimiento:

1. En un tubo Eppendorf, combina reactivos como se indica en la tabla que sigue a continuación. asegurarse de la adición de ADN en último lugar y mezclar en conjunto otros reactivos antes de la adición de ADN. Diluir las combinaciones 100 veces antes de la medida en un fluorómetro, ya sea 1 ul en 100 ul para el fluorómetro NanoDrop, o 10 ul en una cubeta de 1 ml para un fluorómetro de sobremesa.

2. Excitar la fluoresceína de forma directa a 488 nm así como de forma indirecta a través de FRET mediante excitación del polímero a 380 nm.

3. Recoger datos en alturas de los picos a longitudes de onda relevantes. Restar el fondo de los alturas de los picos, incluyendo estas fuentes

15

3a) Tamponar solamente el control

3b) Seguir el pico del polímero (~5 %) de FRET con respecto a picos de fluoresceína

	TBS	B-FL 5 uM	CA 5 uM	BCA 5 uM	ADN 5 uM	Exc. (nm)	alt. pico a 415 nm	alt. pico a 533 nm	alt. pico a 533 nm
solamente TBS	20 ul					488	--		
solamente BFL	20 ul	1 ul				488	--		
solamente CA	20 ul		1 ul			380			
BFL+CA+ADN, 1:1:1	20 ul	1 ul	1 ul		1 ul	488			
						380			
BFL+BCA+ADN, 1:1:1	20 ul	1 ul		1 ul	1 ul	488			
						380			
BFL+CA+ADN, 1:2:1	20 ul	1 ul	2 ul		1 ul	488			
						380			
BFL+BCA+ADN, 1:2:1	20 ul	1 ul		2 ul	1 ul	488			
						380			

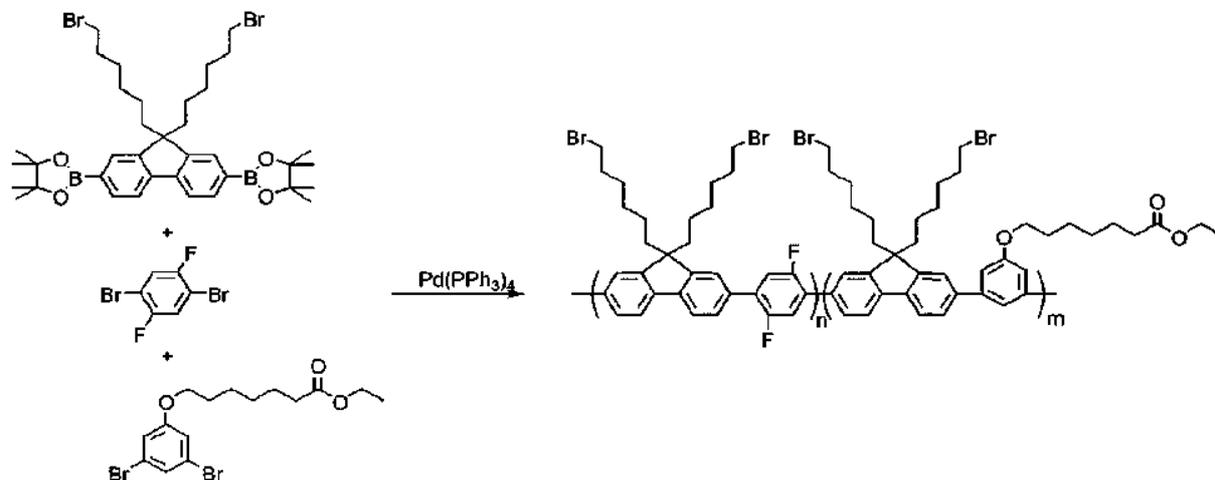
20 Ejemplo 7

Análisis de amplificación de señal con Biotinil-CA001, Avidina DN, y Biotinil-fluoresceína:

La Figura 27A muestra la biotilación de CA001. El polímero de amina, CA001 (precursor para el polímero de biotilado) no se debería unir a la avidina, y se usa como el polímero de control negativo. La Figura 27B representa el ensayo de forma esquemática. El colorante biotilado y el polímero se ponen juntos de forma específica mediante unión de biotina-avidina. El polímero de control negativo (polímero de amina, CA001, indicado como CA) no se debería unir a la avidina. La Figura 27C muestra los espectros de fluorescencia resultantes del ensayo seguido en el protocolo mencionado anteriormente (Ejemplo 6). La línea de puntos muestra los espectros de fluorescencia después de excitación a 380 nm del polímero no especificó (CA) en solución con Avidina DN (AvDN) y fluoresceína biotilada (B-F1). Solamente se observa la emisión del polímero, centrada en 420 nm. La línea continua muestra los espectros de fluorescencia después de excitación a 380 nm del polímero biotilado (BCA) en solución con Avidina DN (AvDN) y fluoresceína biotilada (B-F1). Se observa una fuerte transferencia de energía, dando como resultado la emisión adicional que surge de la fluoresceína, entrada a 530 nm. FRET se produce solamente para biotil-CA001, lo que indica que el biotil-CA 001 dador y la fluoresceína aceptora se ponen muy cerca de través de unión de biotina-avidina. Esto corrobora la biotilación de CA001 después del procedimiento de Pierce (Ejemplo 5). La excitación directa del colorante a 488 nm se muestra como una línea discontinua. La comparación de la línea discontinua con la línea continua revela una amplificación del colorante de 19 veces cuando se excita indirectamente (a través de FRET) con respecto a directamente.

## Ejemplo 8

Síntesis de precursor de polímero conjugado catiónico con un grupo funcional carboxilato, CC001:



5

Poli[(2,7-{9,9-bis(6'-bromohexil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(6'-bromohexil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{7'-éster de etiloheptoxi}fenileno)]: Una solución de 2,7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9,9-bis(6'-bromohexil)fluoreno (500 mg, 0,670 mmol), 1,4-dibromo-2,5-difluorobenceno (173,2 mg, 0,637 mmol), 1-(7'-éster de etiloheptoxi)-3,5-dibromobenceno (13,6 mg, 0,033 mmol), carbonato potásico (1,12 g, 8,12 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (21 mg, 0,018 mmol) en THF (15 ml) y agua (5 ml) en un matraz de fondo redondo de 50 ml equipado con un condensador de reflujo con camisa de agua se desgasificó a través de cuatro ciclos de congelación-bombeo-descongelación, con introducción de argón después de la tercera y cuarta rondas de desgasificación. A continuación, la solución se calentó a reflujo durante 48 horas en una atmósfera de argón. Después de un periodo de refrigeración, la solución se añadió gota a gota a 40 ml de metanol en agitación para precipitar el polímero, que se recogió por centrifugación. Esto fue seguido de decantación y lavado con metanol (dos veces) para retirar fracciones de bajo peso molecular, proporcionando un polvo esponjoso, de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 7,887-7,406 (m, 8H); 3,322 (t, J = 6,6 Hz, 4H); 2,080 (s a, 4H); 1,710 (t, J = 7,0 Hz, 4H); 1,269 (s a, 4H); 1,158 (s a, 4H); 0,799 (s a, 4H). Mn 39,5K, PDI 2,1.

10

15

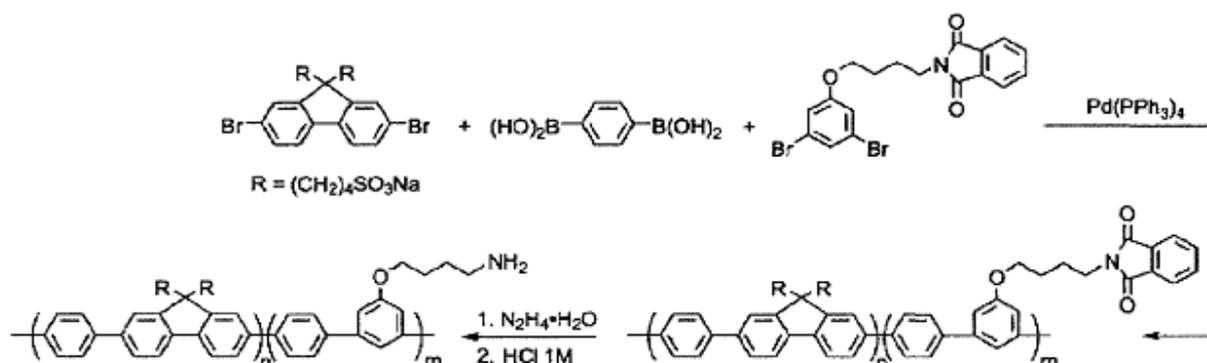
20

25

Para evaluar la incorporación de los monómeros funcionalizados en las estructuras del polímero final se usó espectroscopia de IR. Los grupos funcionales carboxilato se protegieron como ésteres durante la reacción de polimerización para evitar la contaminación del catalizador. Este grupo protector tiene una firma única en espectroscopía de infrarrojos (IR), como se muestra en la Figura 28. Los picos mostrados corresponden a picos únicos de C=O solamente presentes para el grupo protector de carboxilato. La línea discontinua en la Figura 28 corresponde a los espectros de IR del monómero, mientras que la línea continua corresponde a los espectros de IR del polímero. En ambos casos, se observa un pico de carboxilato, lo que indica la incorporación del monómero funcional.

## 30 Ejemplo 9

Síntesis de un polímero conjugado aniónico con un grupo funcional amino, AA003:



35

5 Poli[(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)]: Una solución de 2,7-dibromo-9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)fluoreno (129,5 mg, 0,202 mmol), ácido 1,4-diborónico (37,4 mg, 0,225 mmol), 1-(4'-ftalimidobutoxi)-3,5-dibromobenceno (10,4 mg, 0,023 mmol), carbonato potásico (366 mg, 2,65 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (8,8 mg, 0,008 mmol) en DMF (20 ml) y agua (20 ml) en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador de reflujo con camisa de agua se desgasificó a través de cuatro ciclos de congelación-bombeo descongelación, con introducción de argón después de la tercera y cuarta rondas de desgasificación. A continuación, la solución se calentó a reflujo durante 48 horas en una atmósfera de argón. Durante el transcurso de la reacción, se formó un precipitado de color negro. Después de un periodo de refrigeración, la solución se retiró y el precipitado se lavó con acetona para dar un polvo de color marrón. RMN <sup>1</sup>H (DMSO): 7,910-7,597 (m, 10H); 2,206 (s a, 8H); 1,400 (s a, 4H); 0,668 (s a, 4H). IR: 1696 cm<sup>-1</sup>, que indica una amina protegida (ftalimida).

15 AA003, Poli[(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-aminobutoxi}fenileno)]: Una solución de monohidrato de hidrazina (29,9 mg, 0,598 mmol) y poli[(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-1,4-{2,5-difluoro}fenilen)-co-(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-alt-3,5-1-{4'-aminobutoxi}fenileno)] (45 mg, 0,081 mmol) en 50 % de metanol/agua (5 ml) se calentaron a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el pH de la solución se ajustó a 3 con HCl 1 M, a continuación se calentó a reflujo durante un periodo adicional de 2 horas. Después de enfriar y transferir a un tubo Falcon de 15 ml, AA003 se purificó con el siguiente protocolo.

20 Purificación de AA003 Desprotegido

Finalidad:

Enriquecer polímero aniónico activado con amina

Materiales:

25 Cubetas de 1 ml de plástico transparentes para UV

Centrifugadora

Espectrofotómetro de UV-Vis

Pipeteadores + puntas

NaOH, 1,0 M, 0,1 ml:

NaOH, 10 M            10 ul

H<sub>2</sub>O                    90 ul

30

AA003 en bruto

MeOH al 90 %, T20 al 1 % (90M1T, 50 ml)

Filtros MC30

35 Procedimiento:

1. Ordenar las fracciones:

40 1a) Si hay una película que reviste la parte interior del tubo (polímero precipitado), verter el sobrenadante en un tubo nuevo. Usando una punta de pipeta, retirar todo el sobrenadante completamente, y dejar la parte.

1b) Procesar la película (ppt) que reviste el tubo:

45 i. Añadir 0,5 ml de agua y comprobar el pH con papel de tornasol. Si fuera necesario, neutralizar a pH ~\*7-8 mediante la adición de NaOH (al principio cantidades de 1-5 ul de NaOH 0,1 M, la continuación de NaOH 1,0 M si fuera más práctico), mezclar, sedimentar, comprobar con papel de tornasol. Avanzar a través de varios ciclos de ensayo de adición-mezcla-sedimentación-comprobación de pH hasta que el pH se mantenga en 8.

ii. Retirar el extracto acuoso, y colocar en un Eppi. de 1,5 ml

iii. Centrifugar a 14kr<sub>cf</sub>, 2'. Guardar sup. y sedimento.

50

iv. Liofilizar el sedimento.

1c) Procesar el sobrenadante de la etapa 1a):

55 i. Tomar muestra de 0,5 ml de sobrenadante (normalmente una suspensión) y colocar en un Eppi. de 1,5 ml.

ii. Comprobar el pH con el tornasol y registrar el pH.

iii. Neutralizar a pH ~7-8 como en la etapa 1b1 anterior.

iv. Centrifugar a 14kr<sub>cf</sub>, 2'.

v. Separar sup. del sedimento, manteniendo ambos.

60

vi. Liofilizar el sedimento.

vii. Volver a suspender el sedimento en amt. mínima de DMSO anhidro.

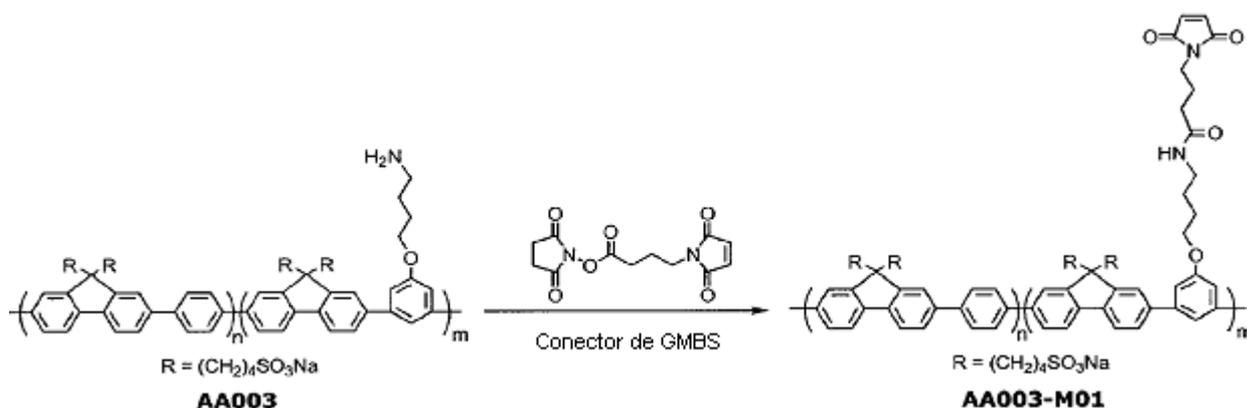
viii. Realizar espec. UV/Vis en agua, registrar la absorbancia y calcular la concentración de todas las fracciones, usando Coef. de Ext. Válido.

2. Desalar con MC30.

Los espectros ópticos de AA003 se muestran en la Figura 29, en la que la línea continua indica la solución y la línea discontinua indica los espectros de emisión. El polímero AA003 desprotegido (que tiene una amina libre) se hizo reaccionar con uno de éster de succimidilo FAM, 5(6)FAM-SE (Invitrogen, n.º C1311), adaptado a partir de protocolos disponibles en [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) (última visita el 04/10/07). Como un control negativo, el mismo polímero se incubó con fluoresceína (sin grupo reactivo) en las mismas condiciones de reacción. El protocolo para este procedimiento sigue de forma análoga al del Ejemplo 4.

10 Ejemplo 10

Síntesis de polímero conjugado aniónico con un grupo funcional maleimido, AA003-M01:



15 La funcionalidad amina en un multicromóforo se puede convertir a otras funcionalidades con el uso de un conector funcional doble, tal como GMBS. Esta estrategia se usó para convertir AA003 en AA003-M01. El protocolo para este procedimiento se modificó a partir del protocolo de Pierce, encontrado en la página web de Pierce, [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) (última visita del 23/09/2007). El protocolo usado se puede encontrar a continuación.

20

- Conjugación de GMBS con AA003
- Finalidad:
- Funcionalizar AA003 con GMBS para dar un resto de maleimida
- Materiales:
- 25 Centrifugadora
- Espectrofotómetro de UV-Vis
- Cubetas de 1 ml transparentes para UV
- Pipeteadores + puntas
- AA003
- 30 GMBS (n.º 22309 de Pierce)
- MeOH al 90 %, T20 al 1 % (90M1T, 50 ml)
- DMSO
- NEt<sub>3</sub>
- Filtros de MC30

35

Procedimiento:

1. Para funcionalizar AA003 con Maleimida, algunas cantidades útiles a usar:

40 1a) Para 40X XS, usar polímero 0,3 mM y GMBS 12 mM. Esto se refiere a 3,0 nmol de polímero/10 ul de rxn como sigue a continuación:

Muestra	Vol. de Rxn.	90 % de M1T	DMSO	AA003	NEt <sub>3</sub> 0,5 M	GMBS, 120 mM
AA003 +G	10 ul	5,7 ul	--	2,3 ul	1,0 ul	1,0 ul
AA003 -G	10	5,7	1,0 ul	2,3 ul	1.0	--

2. Cuando se han combinado todos los reactivos excepto el conector:

45 2a) Disolver GMBS en DMSO (Usar GMBS sin retraso después de la disolución):

i. GMBS 120 mM = 3.,4 mg/0,1 ml de DMSO, o 30 ul/mg

2b) Incubar a 25 °C en bloqueo de calor durante 30 min. Comprobar la transparencia.

5 3. Retirar XS GMBS con MC30:

3a) Antes de aplicar a la cubeta de MC, diluir DMSO hasta < 5 %

3b) Por separado, combinar cada 400 ul en p/ de 90M1T de reacción

3c) Aplicar a la cubeta

10 3d) Centrifugar 10 min a 14k rcf

3e) Determinar si es necesario más tiempo de centrifugación mediante el cálculo del volumen de fracción retenida

3f) Desechar el filtrado

3g) Añadir 400 ul más de 90M1T y repetir la centrifugación

15 3h) Si la fracción retenida parece casi seca, añadir 20 ul de 90M1T girar un poco en la cubeta

3i) Invertir y centrifugar para recoger la fracción retenida

3j) Medir los volúmenes finales de fracción retenida = \_\_ul

3k) Determinar la concentración con UV-vis, y a continuación ajustar la concentración final a 25 uM en 0,5X de 90M1T.

20

#### Ejemplo 11

Síntesis de polímero conjugado aniónico – conjugado de fluoresceína, AA003-M01-F1:

25 El grupo funcional maleimido en AA003-M01 se sometió a ensayo para reactividad de tiol haciendo reaccionar con SAMSA-fluoresceína (Invitrogen) usando protocolos adaptados a partir de [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) (última visita el 04/10/07). AA003 se usó como un control negativo. El protocolo modificado se puede encontrar a continuación.

Ensayo de SAMSA para Maleimida

30

Finalidad: Demostrar que AA003-M01 tiene un resto de maleimida activo usando 10X XS SAMSA-fluoresceína con respecto a AA003-M01

Materiales:

Centrifugar

35 Cubetas de 1 ml transparentes para UV

Fluorómetro, modelo PE-LS55

pipeteadores + puntas

fos potásico, 0,5 M, pH 7,0, 0,2 ml:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M 62 ul

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M 39 ul

H<sub>2</sub>O 100 ul

40

HCl, 6 M, 0,2 ml:

H<sub>2</sub>O 0,1 ml

HCl, 12 M 0,1 ml

NaOH, 0,1 M, 1 ml:

45

NaOH, 10 M 10 ul

H<sub>2</sub>O 990 ul

AA003

AA003-M01

SAMSA-fluoresceína (Invitrogen, producto A685)

50 Filtros de MC30

Procedimiento:

1. Preparar SAMSA desprotegido 1,0 mM:

55

1a) Disolver 1,0 mg de SAMSA/95 ul de NaOH 0,1 M (SAMSA 20 mM)

- 1b) Incubar a TA durante 15 min para retirar el grupo protector de acetilo  
 1c) Neutralizar con HCl 6 M: 1,4 ul/mg de SAMSA (SAMSA 20 mM)  
 1d) Tamponar con 20 ul de fos. sódico 0,5 M, pH 7/mg de SAMSA (SAMSA 16 mM)  
 1e) Diluir 16 veces a SAMSA 1,0 mM con agua.

5

2. Configurar rxns mediante la adición de:

- 2a) Para AA003-M01: 10 ul de SAMSA desprotegido 1,0 mM con respecto a 10 ul de AA003 25 uM + GMBS (3.k+G a partir del protocolo en el Ejemplo 10)  
 2b) Para AA003: 10 ul de SAMSA desprotegido 1,0 mM con respecto a 10 ul de AA003 25 uM - GMBS (3.k-G a partir del protocolo en el Ejemplo 10)

10

3. Incubar en bloqueo de calor a 25 °C, 30 min

4. Retirar XS SAMSA con MC30:

15

- 4a) Antes de aplicar a la cubeta de MC, diluir DMSO hasta < 5 %  
 4b) Por separado combinar cada rxn 400 ul en p/ de 90M1T  
 4c) Aplicar a la cubeta  
 4d) Centrifugar 10 min a 14k rcf  
 4e) Determinar si es necesario más tiempo de centrifugación mediante cálculo de vol. de fracción retenida  
 4f) Desechar el filtrado  
 4g) Añadir 400 ul más de 90M1T y repetir la centrifugación  
 4h) Si la fracción retenida parece casi seca, añadir 20 ul de 90M1T girar un poco en la cubeta  
 4i) Invertir y centrifugar para recoger la fracción retenida

20

25

5. Analizar la fluorescencia a excitación 488 y 380 de muestras tanto de AA003-M01 como de AA003 de la etapa 4.i.

30

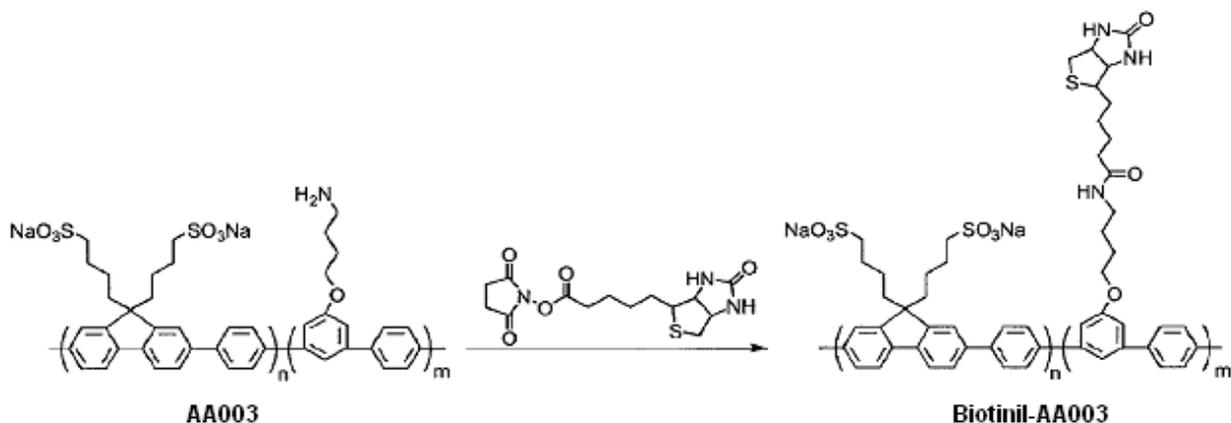
La Figura 30C muestran los resultados de este ensayo. AA003-M01 (Figura 30B, indicado como polímero funcionalizado con Maleimida) y un polímero de control negativo (no maleimida, AA003 Figura 30A indicado como polímero de control Negativo) se hicieron reaccionar con una fluoresceína tiolada (SAMSA-fluoresceína) de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. El polímero funcionalizado con maleimida, AA003-M01, reacciona con la fluoresceína tiolada, y se llega a unir de forma covalente a la fluoresceína, asegurando una distancia fija entre el polímero dador y el colorante aceptor. Por lo tanto, la excitación del polímero da como resultado FRET para el colorante aceptor, y se observa una inyección intensa del colorante (línea continua, Figura 30C). El control negativo no se une de forma covalente a la fluoresceína, y cuando el polímero se excita, solamente se observa la emisión del polímero (línea de puntos, Figura 30C).

35

### Ejemplo 12

40

Síntesis de un polímero conjugado aniónico biotinilado, Biotinil-AA003:



45

La funcionalidad amina en AA003 se convirtió en una biotina usando un conector de NHS-biotina disponible en Pierce (n.º 20217). El protocolo para este procedimiento se modificó a partir del protocolo de Pierce, encontrado en la página web de Pierce, [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) (última visita el 23/09/2007). El protocolo usado se puede encontrar a continuación.

Procedimiento para la Conjugación de NHS-Biotina con AA003

Finalidad:

Biotinilar AA003 con NHS-Biotina.

Materiales:

Fluorómetro, con cubetas transparentes para UV

5 Instrumento de UV-VIS

AA003 purificado (AA3)

NHS-biotina (Pierce n.º 20217)

NEt<sub>3</sub> 0,5 M (dilución a 1:14 de NEt<sub>3</sub> (7,2 M) de reserva)

DMSO

10 Filtros de MC30

Procedimiento:

1. Configurar las reacciones, polímero 0,5 mM y NHS-biotina 20 mM:

Muestra	ul de Rxn	90 % de M1T	DMSO	AA3, 5,0 mmol/10 ul	NEt <sub>3</sub> 0,5 M	NHS-biotina, 200 mM
PC: CA1+Biot	10	6,8 ul	--	1,2 ul	1,0 ul	1,0 ul
NC: CA1-Biot	10	6,8	1,0 ul	1,2 ul	1,0	--
AA3+B	40	0	--	38 ul	4,0	4,02 ul
AA3+B	10	0	1,0	9,6 ul	1,0	--
2b3SUP+B	35	0	--	34 ul	3,5	3,5 ul
2b3SUP-B	10	0	1,0	9,8 ul	1,0	--
2b3PEL+B	70	20	--	36 ul	7,0	7,0 ul
2b3PEL-B	10	2,9	1,0	5,1 ul	1,0	--

15 2. Cuando se ha combinado todo excepto la biotina, disolver 1-2 mg de NHS-biotina en DMSO a 15 ul de DMSO anhidro/mg de NHS-biotina (o 1,7 mg/0,025 ml; 200 mM). Usar reactivos de NHS sin retraso después de la disolución.

3. Incubar a 25 °C en bloqueo de calor durante 30 min.

20 4. Diluir a 1:100 en 90M1T (1 ul en 100, o 4 en 400 ul)

5. Desalar con MC30, 2X

6. Ensayo para concentración con UV/Vis.

### Ejemplo 13

25 Procedimiento para notificación de señal con Biotinil-AA003 y Avidina D-fluoresceína:

Finalidad:

30 Demostrar la señal de fluorescencia específica a través de FRET usando biotinil-AA003 y Avidina D-Fluoresceína.

Materiales:

Fluorómetro (NanoDrop o Perkin-Elmer PE-LS55)

Cubetas de 1 ml transparentes para UV

Pipeteadores y + puntas

35 biotinil-AA003 (BAA)

AA003 (AA)

Avidina D-Fluoresceína (A-F1)

TBS

40 Procedimiento:

1. En un tubo Eppendorf, combinar reactivos como se indica en la tabla que sigue a continuación. Incubar durante cinco minutos, a continuación diluir las combinaciones 100 veces antes de la medida en un fluorómetro, ya sea 1 ul en 100 ul para el fluorómetro NanoDrop, o 10 ul en cubeta de 1 ml para un fluorómetro de sobremesa 1.

45 2. Excitar A-F1 de forma directa a 488 nm así como de forma indirecta a través de FRET mediante excitación del polímero a 380 nm.

3. Recoger datos en alturas de los picos a longitudes de onda relevantes. Restar el fondo de los alturas de los picos, incluyendo estas fuentes

3a) Tamponar solamente el control

3b) Seguir el pico del polímero (~5 %) de FRET con respecto a picos de fluoresceína

50

	TBS	A-F1 5 uM	AA 5 uM	BAA 5 uM	Exc. (nm)	alt. pico a 415 nm	alt. pico a 566 nm	alt. pico a 533 nm
solamente TBS	20 ul				550	--		
					380			
solamente AA	20 ul		3 ul		380			
AA+A-F1 6:1	20 ul	0,5 ul	3 ul		550			
					380			
solamente BAA	20 ul			3 ul	380			
BAA+A-F1 6:1	20 ul	0,5 ul	3 ul	3 ul	488			
					380			

#### Ejemplo 14

Análisis de amplificación de señal con Biotinil-AA003 y Avidina D etiquetada con fluoresceína:

5

Este ensayo se describe a modo de procedimiento en el Ejemplo 13. Un esquema de este ensayo se muestra en la Figura 31B. Biotinil-AA003 (véase la Figura 31A indicado como polímero de Biotinilo) se incubó con Avidina D etiquetada con fluoresceína. Como un control negativo, el polímero de amina, AA003, (véase la Figura 31A indicado como polímero de control Negativo) se incubó con Avidina D etiquetada con fluoresceína de una manera similar. En cada caso, el polímero se excita, y se observa la emisión de fluoresceína. Para el AA003 de control negativo, solamente se observa la emisión del polímero (centrada en 420 nm), mientras que para el biotinil-AA003, se observa una emisión fuerte del colorante.

10

Los resultados de este ensayo se muestran en las Figuras 32A-B. El biotinil-AA003 se sometió a ensayo con Avidina D que contenía 4 colorantes por avidina. Las señales del polímero de control y del colorante solo también se registraron y se presentan en las Figuras 32A-B. La Figura 32A muestra los espectros de fluorescencia resultantes. Las señales del colorante a 523 nm a partir de este conjunto de datos se resumen en la Figura 32B.

15

Estos datos indican que la señal de fluoresceína (a 523 nm) se amplifica en presencia del polímero (Figura 32A, espectros de líneas continuas con respecto a líneas discontinuas, a la izquierda y biotinil-AA003 con respecto a colorante solo, derecha) y las señales observadas se debían a los complejos específicos de polímero-Avidina D (Figura 32A, espectros de líneas continuas con respecto a líneas discontinuas, izquierda y polímero de biotinilo con respecto a control, derecha). El control de polímero de amina (sin biotina) no era capaz de unirse a la avidina y por lo tanto se observaba una transferencia de energía mínima (especificidad de un 88 %). La especificidad se define como  $1 - (\text{señal de control} / \text{señal específica del colorante})$ . La figura a la derecha ilustra la diferencia de la señal del colorante con y sin polímero y entre las muestras de control positivas y negativas. Los datos presentados en la Figura 32B se corrigen para señales que surgen del tampón y de la cola de polímero. La contribución de la cola de polímero a 523 nm es de un 5 % de la altura del pico del polímero a 419 nm.

20

#### Ejemplo 15

Efectos de amplificación de proporciones variables de Colorante:Avidina D.

30

Se sometieron a ensayo diferentes proporciones de polímero con respecto a colorante. Esto se evaluó usando conjugados de Avidina D de Vector Laboratories que contenían un promedio de 0,8, 1,5 y 4 colorantes de fluoresceína por avidina. A medida que el número de colorantes aumenta, la proporción de coeficientes de extinción (las) entre el polímero y el colorante disminuye. Por lo tanto, se predijo que para este conjunto de Avidina D etiquetada con fluoresceína, los mejores valores de amplificación se observarían para los conjugados de avidina que contenían el número menor de colorantes. La concentración del polímero se mantuvo constante a dos equivalentes de polímero por Avidina D.

35

40

Los datos mostrados en las Figuras 33A-B indican una dependencia de la proporción de polímero con respecto a colorante tal como se esperaba. Esta proporción variaba con el aumento del número de colorantes por Avidina D a concentraciones constantes de polímero y avidina. Los datos indican que la proporción de colorante:avidina aumenta de 0,8 a 4 a medida que la intensidad de la señal del colorante aumenta (Figura 33A) aunque la amplificación observada disminuye (Figura 33B). A medida que el número de colorantes aumenta, también lo hace la señal directa

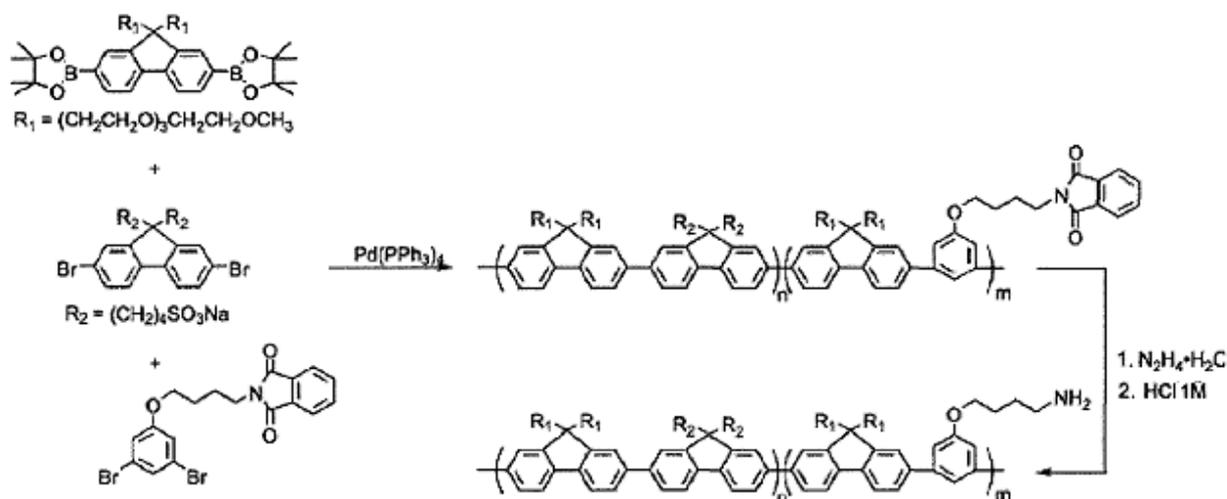
45

del colorante debido a la absorbancia más elevada y por lo tanto fluorescencia más elevada (barras de color gris, Figura 33A).

### Ejemplo 16

5

Síntesis de polímero conjugado aniónico con un grupo amino funcional, AA002, capaz de excitación a 405 nm:



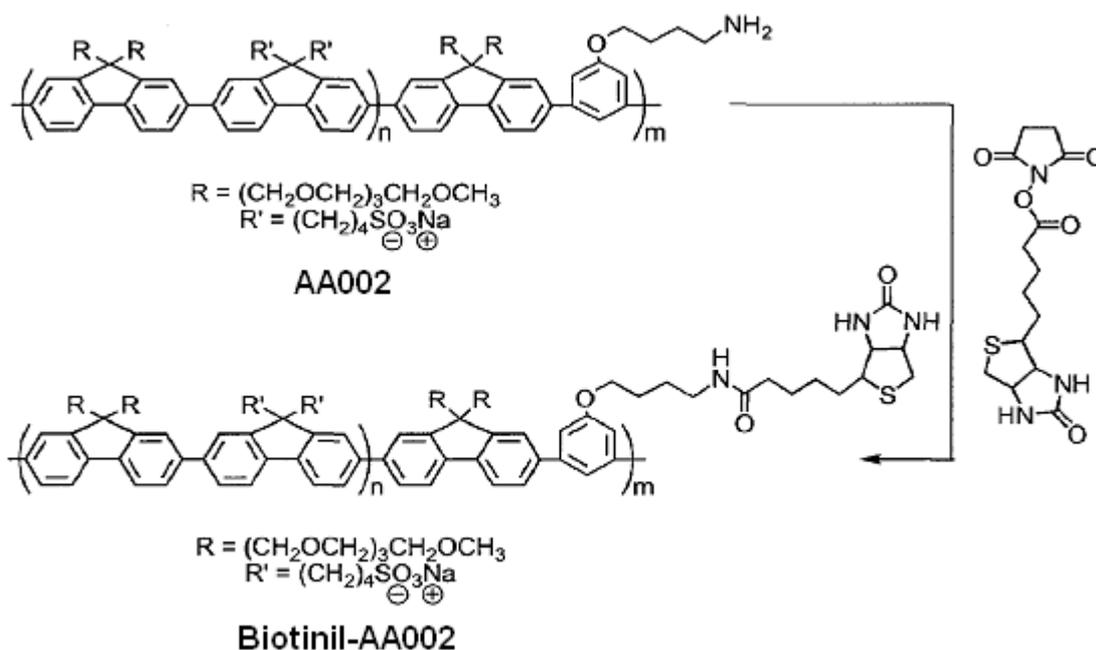
- 10 Poli[2,7-{9,9-bis(1-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etoxi))}-co-alt-(2,7-{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno-co-2,7-{9,9-bis(1-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etoxi))}-co-alt-3,5-1-{4'-ftalimidobutoxi}fenileno)]: Una solución de 2,7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9,9-bis(1-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etoxi))fluoreno (120,1 mg, 0,150 mmol), 2,7-dibromo{9,9-bis(4'-(sulfonato sódico)butil)}fluoreno (91,3 mg, 0,143 mmol), 1-(4'-ftalimidobutoxi)-3,5-dibromobenceno (3,7 mg, 0,0082 mmol), carbonato potásico (234 mg, 1,7 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (6,2 mg, 0,0054 mmol) en DMF (3,8 ml), THF (2,5 ml), y agua (2,5 ml) en un tubo Schlenck de 48 ml se desgasificó mediante burbujeo con argón durante 20 minutos. a continuación, la solución se calentó a 85 °C durante 3 días en una atmósfera de argón. La solución se añadió gota a gota en acetona en agitación para dar un sólido de color marrón oscuro. A continuación con el sólido se agitó con metanol, el filtrado se recogió, y el disolvente se retiró para producir un sólido de color amarillo brillante. RMN  $^1\text{H}$  (DMSO): 8,055-7,828 (m, 12H); 3,558-3,293 (m, 24H); 3,188 (m, 12H); 2,217-2,161 (m, 8H); 1,417 (s a, 4H); 0,664 (s a, 4H). Bimodal, Mn 7,3K, PDI 1,02, y Mn 49K, PDI 1,2.
- 15
- 20

A continuación, este polímero se desprotegió y se purificó para dar AA002, usando procedimientos análogos a los indicados en el Ejemplo 9. Los espectros ópticos para AA002 se muestran en la Figura 34, en la que la línea continua indica la absorción y la línea discontinua a indicados espectros de emisión.

25

### Ejemplo 17

Síntesis de un polímero conjugado biotinilado, Biotinil-AA002:



El grupo funcional amino en AA002 se convirtió en un grupo funcional de biotina usando un conector de NHS-biotina disponible en Pierce (n.º 20217). El protocolo para este procedimiento se modificó a partir del protocolo de Pierce, encontrado en el sitio web de Pierce, [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) (visitado la última vez el 23/09/2007). De forma análoga, el protocolo para este procedimiento sigue el indicado en el Ejemplo 12.

#### Ejemplo 18

#### 10 Efectos de amplificación de proporciones variables de polímero:Avidina D

Avidina D etiquetada con fluoresceína, o Avidina D-FI (0,8 colorantes por avidina), mantenida a una concentración constante, se incubó con una serie de concentraciones crecientes de biotinil-AA002 que variaban de 0 a 8 equivalentes. Esto se muestra de forma esquemática en la Figura 35A para los primeros dos equivalentes de biotinil-AA002. Para cada proporción, la fluorescencia del colorante se registró para excitación directa e indirecta (a través de FRET). A medida que aumentaba la proporción de polímero con respecto a colorante, las señales que surgían de la excitación directa permanecían casi constantes, mientras que las señales que surgían de la excitación indirecta aumentaban, como se muestra en la Figura 35B, una representación de emisión de fluoresceína como una función de la proporción de AA002 con respecto a Avidina D-FI. Una meseta de este aumento de la señal se alcanzó a aproximadamente cuatro equivalentes de biotinil-AA002, coherente con la ocupación de todos los sitios de unión a biotina en la Avidina D.

Estos datos son coherentes con la unión específica de biotinil-AA002 a Avidina D etiquetada con fluoresceína. Se observa una amplificación de la señal elevada, con mesetas a cuatro equivalentes de polímero, que indican la ocupación de todos los sitios disponibles de unión a biotina.

#### Ejemplo 19

#### Amplificación electrostática de señales de colorante

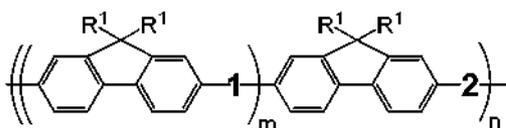
Como se muestra de forma esquemática en la Figura 36B, cada una de las proteínas etiquetadas con colorante (IgG etiquetada con Cy3 BSA etiquetada con fluoresceína) se incubó independientemente con el polímero catiónico PFP-2F (véase la Figura 36A). Se produjo una asociación electrostática no específica entre el polímero y cada proteína etiquetada con colorante. Cada solución se excitó a 380 nm, y los espectros de emisión se recogieron. Estos espectros se compararon con los espectros de emisión recogidos de la excitación directa del colorante, como se muestra en la Figura 36C lo que indica una amplificación de 30 veces de la IgG etiquetada con Cy3 y una amplificación de 25 veces de la BSA etiquetada con fluoresceína. La IgG etiquetada con Cy3 usada fue un anticuerpo anti-digoxigenina que se usa para dirigirse a anticuerpos etiquetados con digoxigenina.

Aunque en el presente documento se han mostrado y descrito realizaciones preferentes de la presente invención, para los expertos en la materia será evidente que tales realizaciones se proporcionan solamente a modo de ejemplo.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo multicromóforo que comprende:

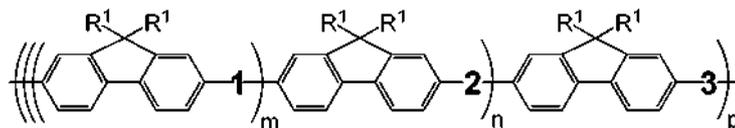
- 5 un multicromóforo unido de forma covalente a al menos una biomolécula seleccionada entre el grupo que consiste en una biomolécula sensora y un bioconjugado, en donde el multicromóforo se une adicionalmente de forma covalente a un cromóforo de señalización y en donde el multicromóforo comprende la estructura



- 10 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio y sales de alcoxi ω-sulfonato.

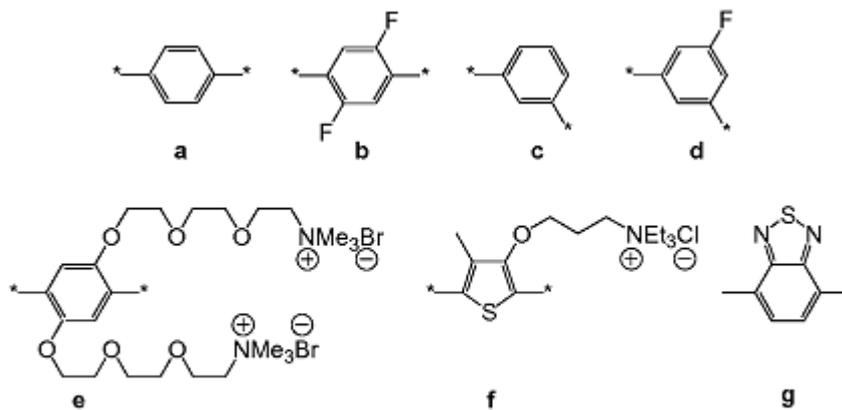
2. El multicromóforo de la reivindicación 1, en donde el multicromóforo comprende la estructura:

15



20 en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio y sales de alcoxi ω-sulfonato.

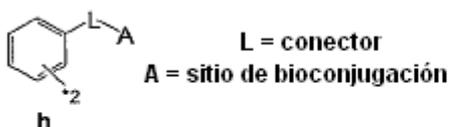
- 20 3. El multicromóforo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que 1 y 2 se seleccionan entre el grupo que consiste en grupos de unión a-g que tienen la estructura



<sup>\*</sup> = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

25

y 3, cuando está presente, es el grupo h que tiene la estructura



<sup>\*</sup> = sitio para unión covalente a cadena principal insaturada

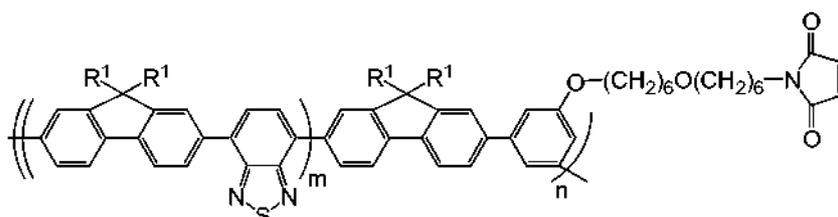
- 30 4. El multicromóforo de la reivindicación 1, en donde el multicromóforo es un polímero conjugado catiónico.

5. El multicromóforo de la reivindicación 1, en donde el multicromóforo es un polímero conjugado aniónico.

6. El multicromóforo de la reivindicación 1, en donde el multicromóforo es un polímero conjugado con carga neutra.

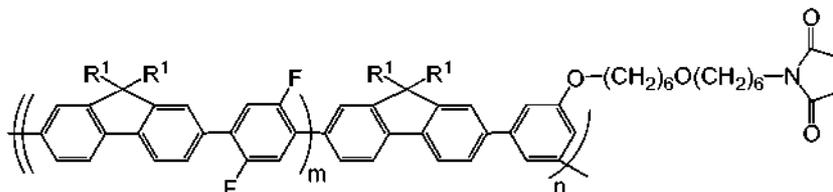
7. El multicromóforo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente sitios de bioconjugación seleccionados entre el grupo que consiste en maleimida, tiol, éster de succinidilo (éster NHS), amina, química de azida, carboxi/EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilamino-propil]carbodiimida), Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinidilo), amina/BMPH (hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico]•TFA) y Sulfo-SBED ([2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato de sulfosuccinidilo).

8. El multicromóforo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la estructura



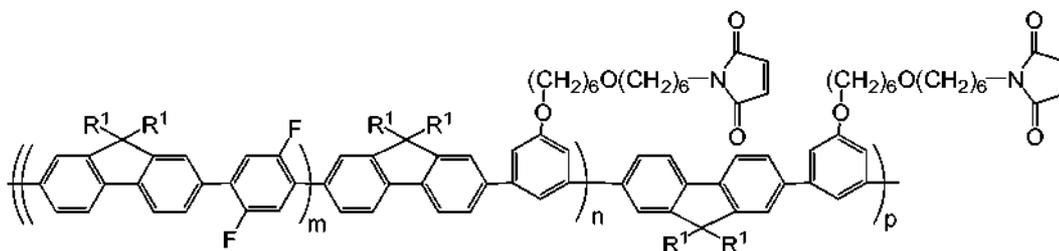
en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio y sales de alcoxi ω-sulfonato.

9. El multicromóforo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la estructura



en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización seleccionado entre el grupo que consiste en oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio y sales de alcoxi ω-sulfonato.

10. El multicromóforo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la estructura



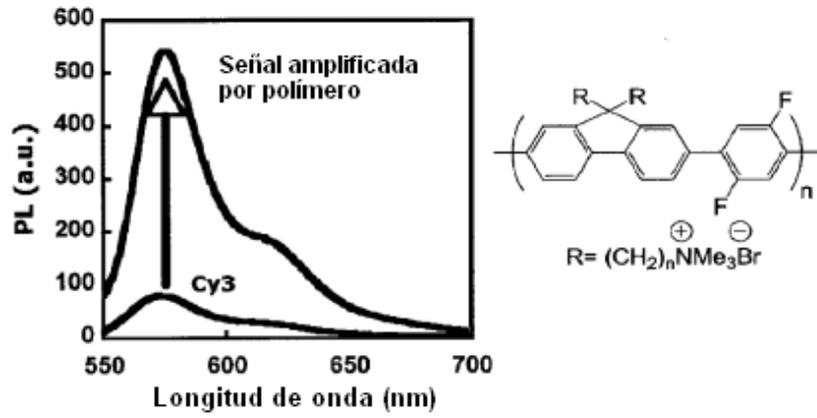
en la que R<sup>1</sup> es un grupo de solubilización, que incluye oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales de alcoxi ω-amonio y sales de alcoxi ω-sulfonato.

11. El complejo multicromóforo de la reivindicación 1, en el que el cromóforo de señalización es un colorante fluorescente, un nanocrystal semiconductor, un quelato de lantánido o una proteína fluorescente de color verde.

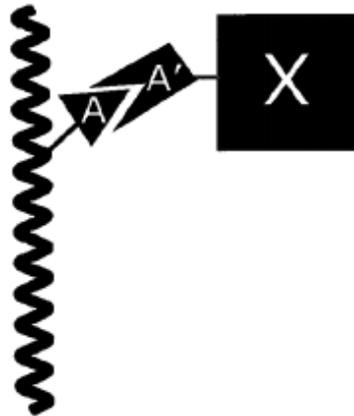
12. El complejo multicromóforo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el cromóforo de señalización es un colorante fluorescente, seleccionado entre el grupo que consiste en fluoresceína, 6-FAM, rodamina, Rojo Texas, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6G, carboxirrodo, carboxirrodamina 110, Azul Cascade, Amarillo Cascade, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy-Chrome, ficoeritrina, PerCP (Proteína clorofila-a peridinina), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-

- (y -6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Amarillo Lucifer, Azul Marina, Verde Oregon 488, Verde Oregon 500, Verde Oregon 514, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético, BODIPY® FL, BODIPY® FL-Br2, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, conjugados de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 5
13. El complejo multicromóforo de la reivindicación 1, en el que la biomolécula es un anticuerpo.
- 10
14. El complejo multicromóforo de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es un oligómero de etilenglicol.
15. El complejo multicromóforo de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es un polímero de etilenglicol.





**FIG. 3**



**FIG. 4**

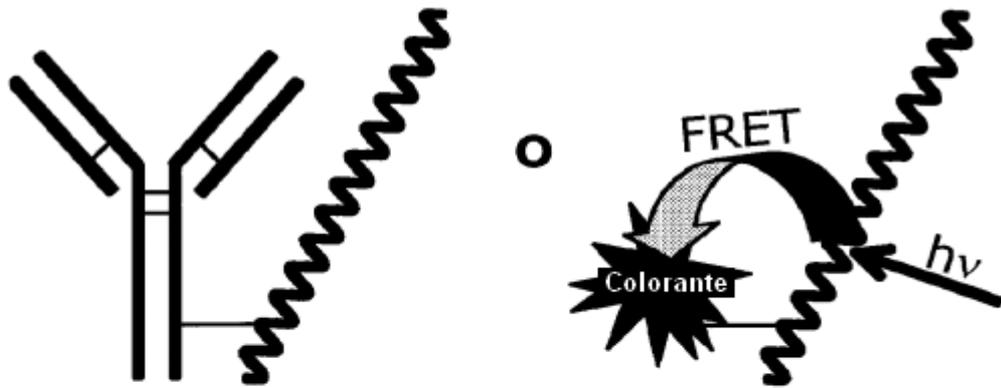


FIG. 5

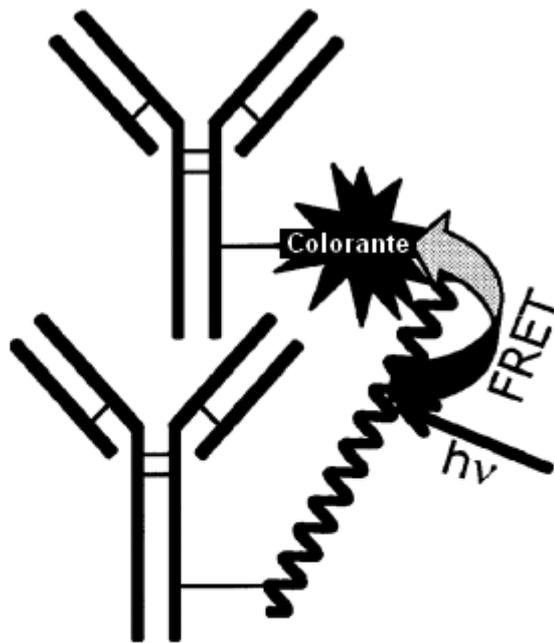


FIG. 6

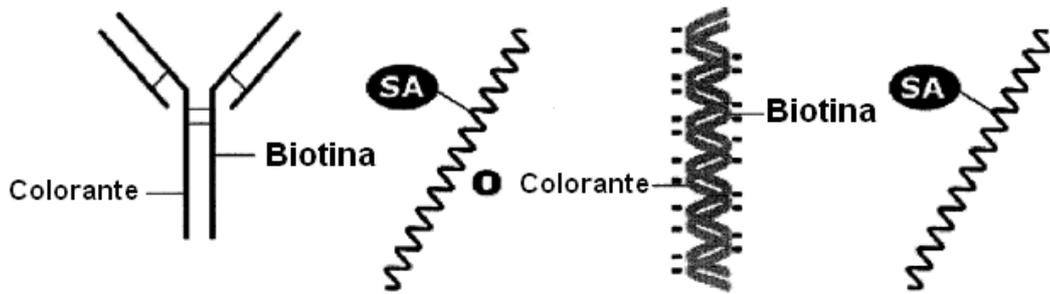


FIG. 7

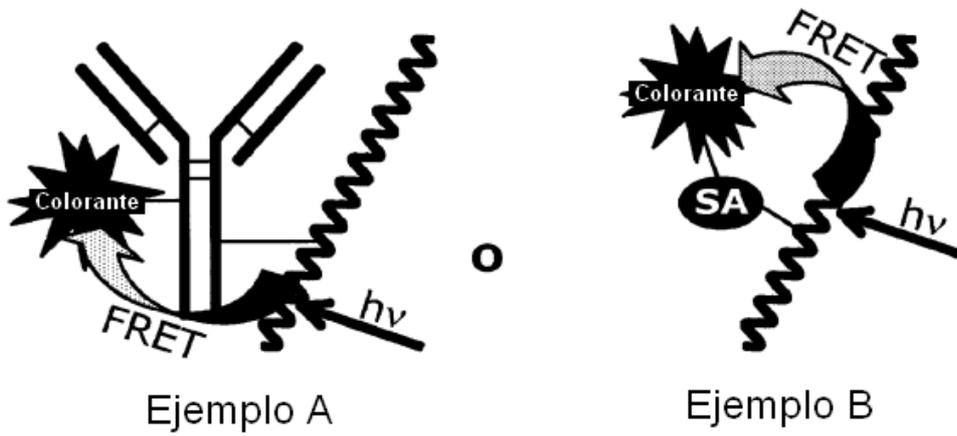
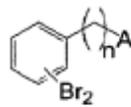


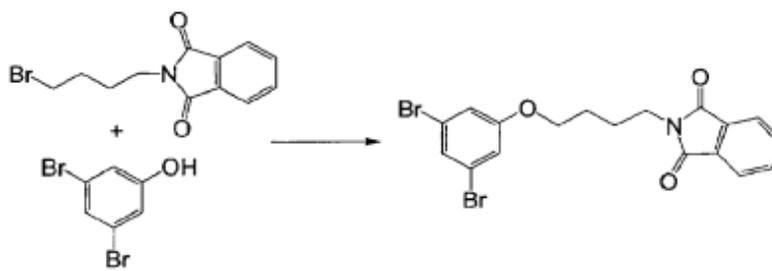
FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

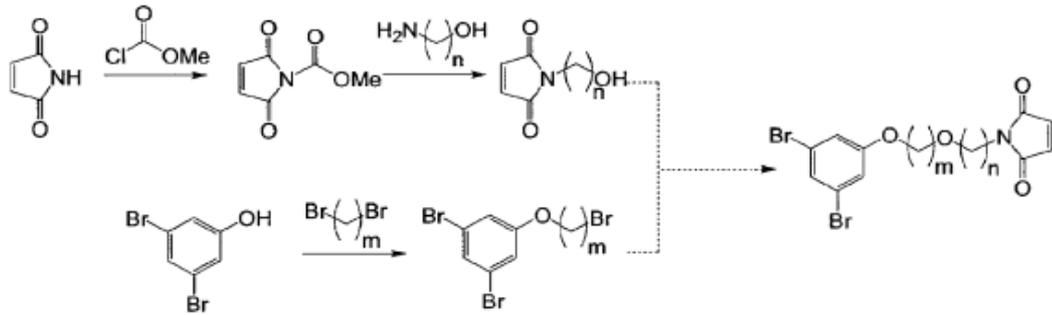


FIG. 12

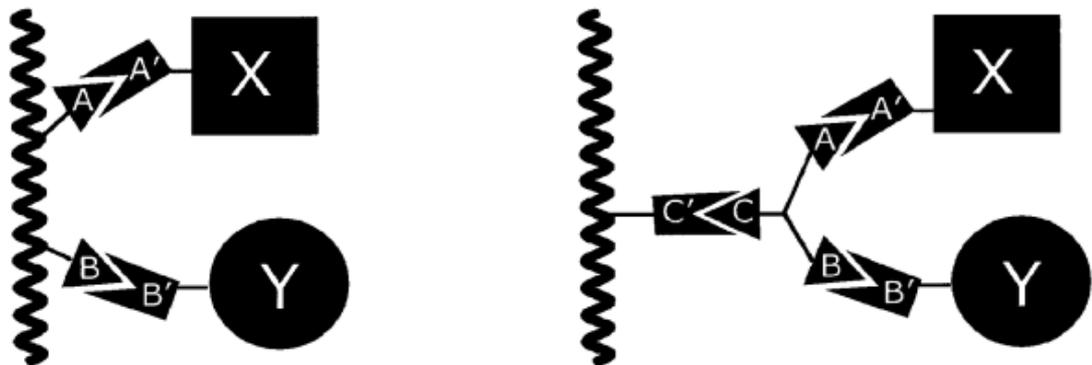


FIG. 13

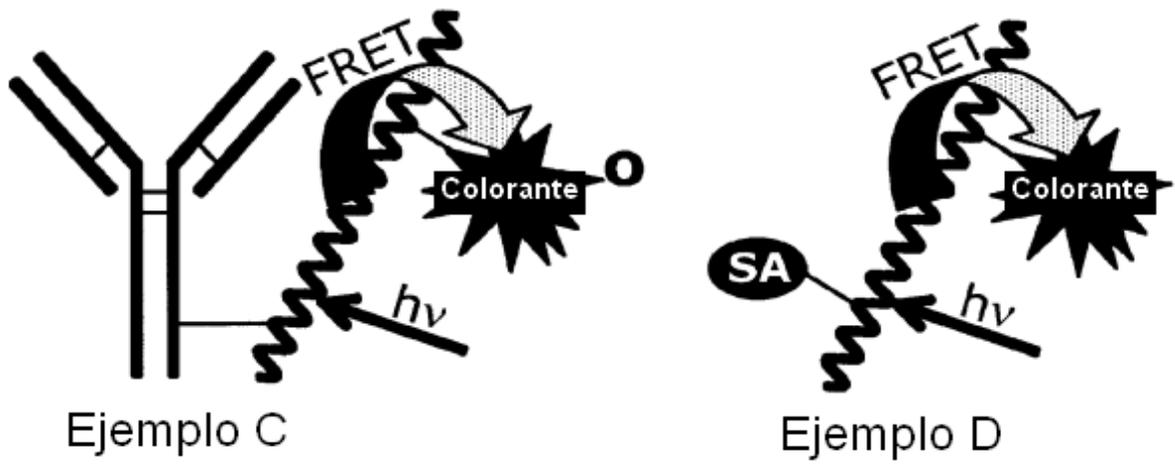


FIG. 14

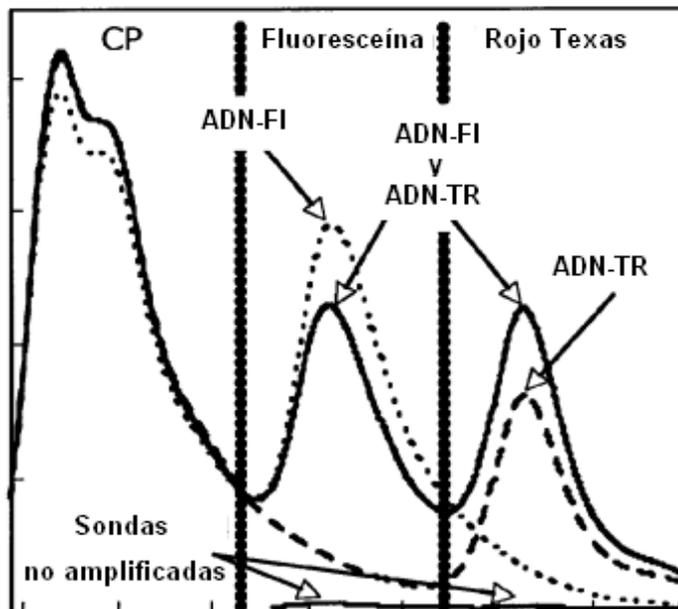


FIG. 15

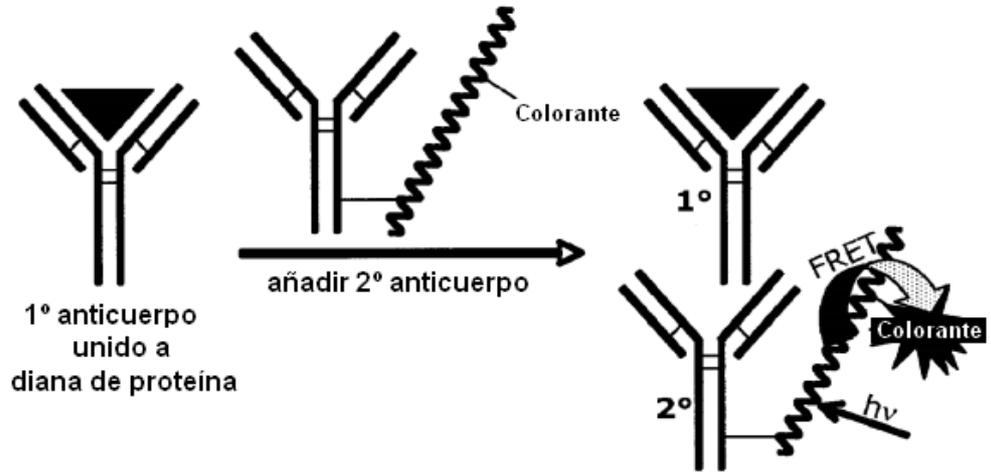


FIG. 16

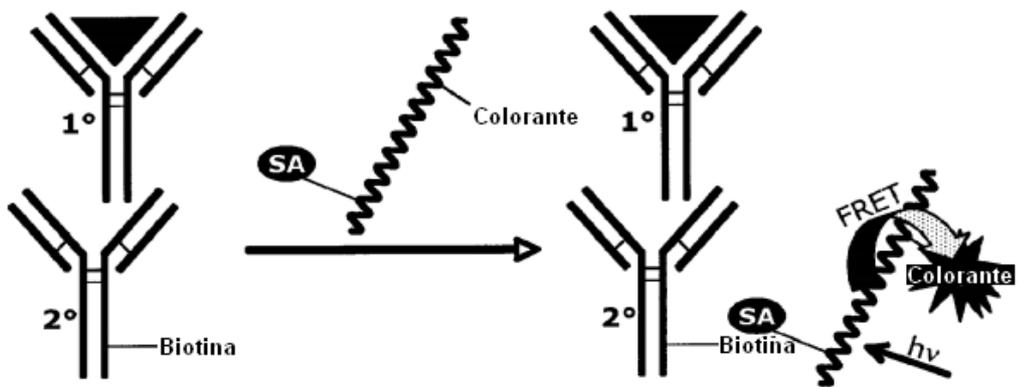
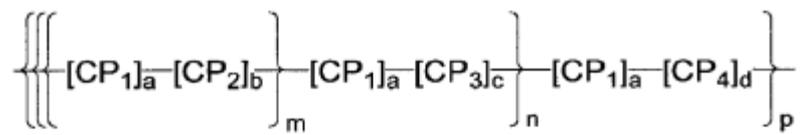


FIG. 17

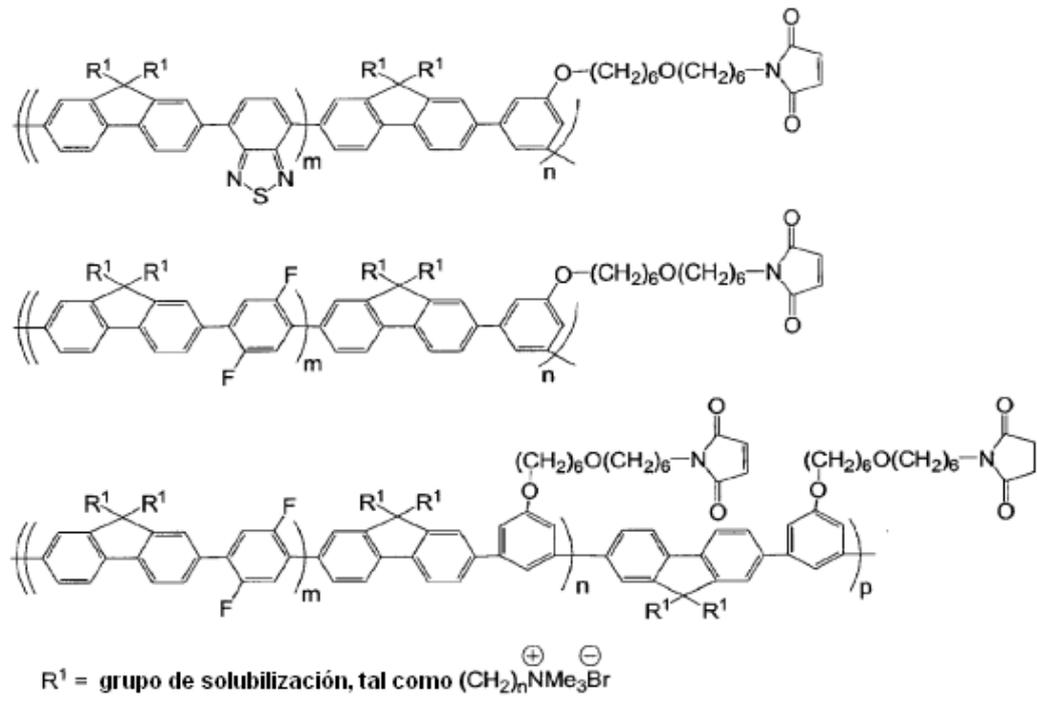


**FIG. 18**



**FIG. 19**





**FIG. 21**

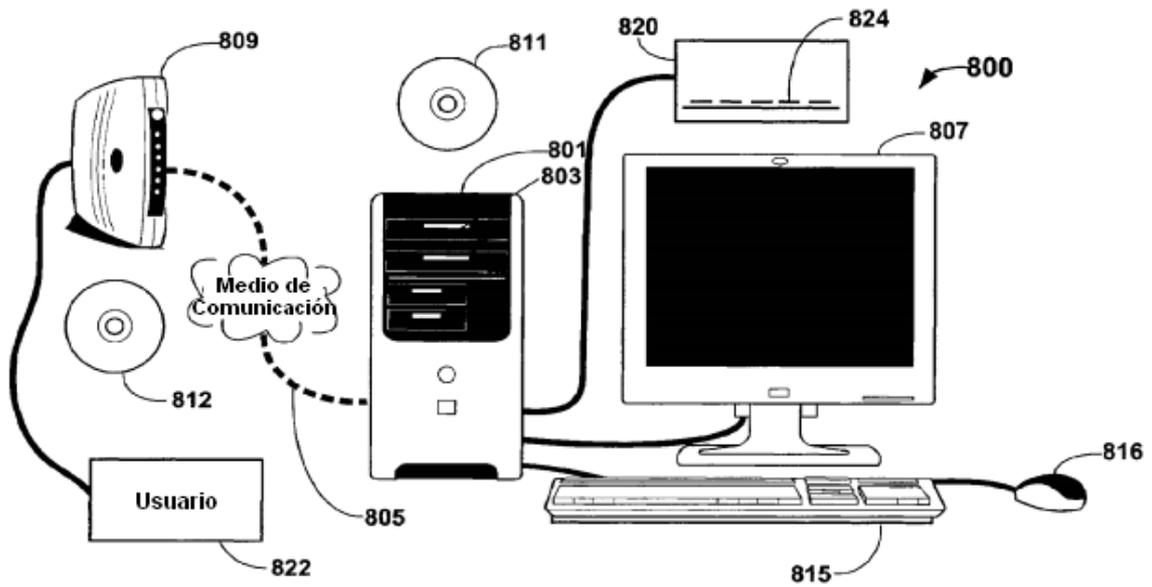
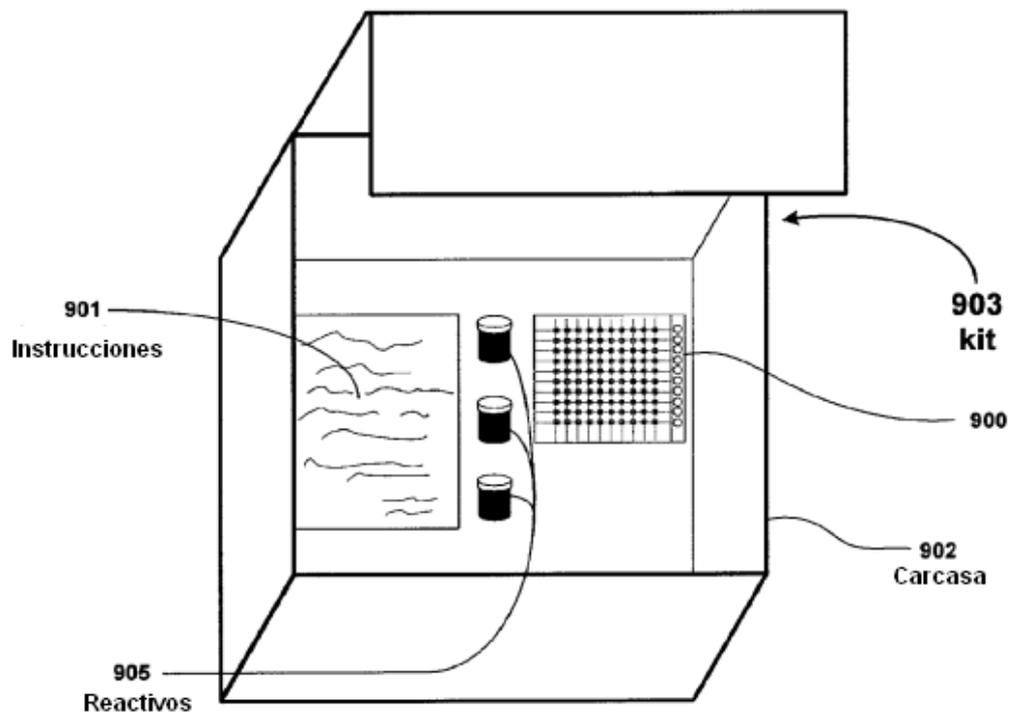
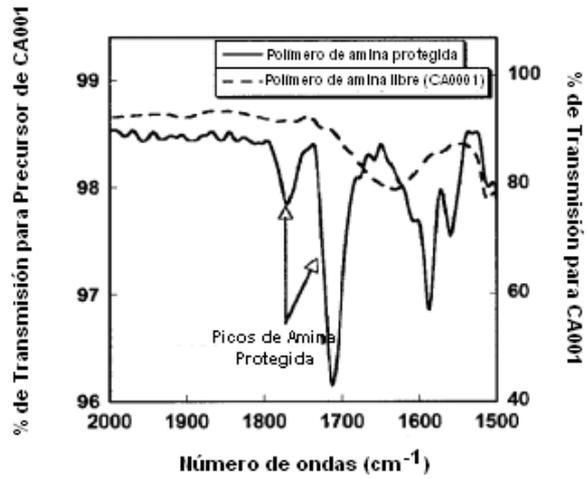


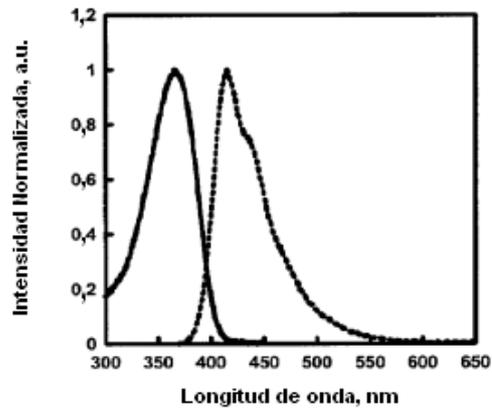
FIG. 22



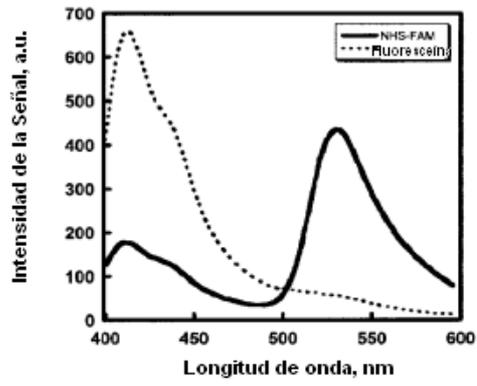
**FIG. 23**



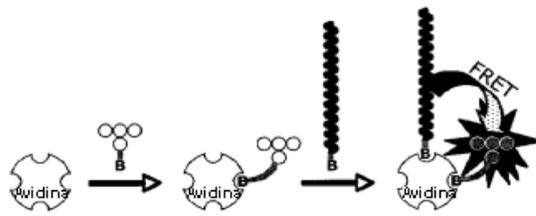
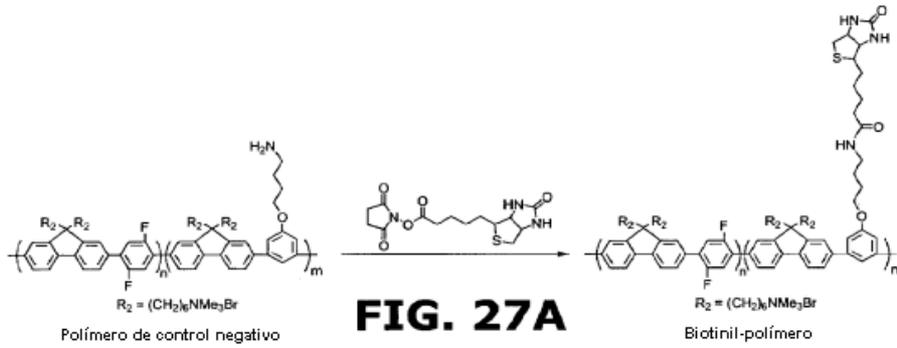
**Fig. 24**



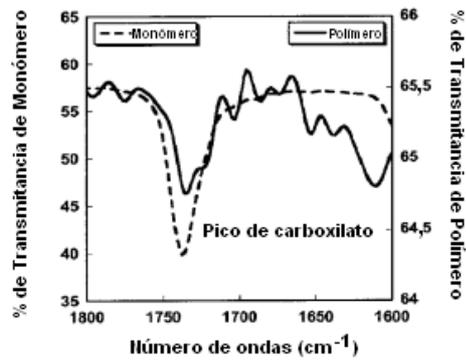
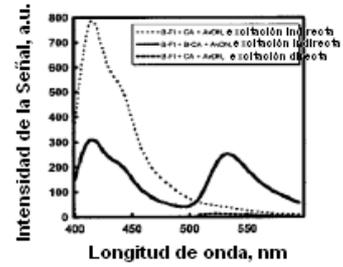
**Fig. 25**

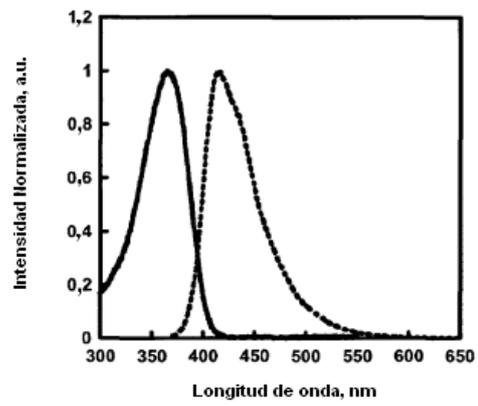


**FIG. 26.**

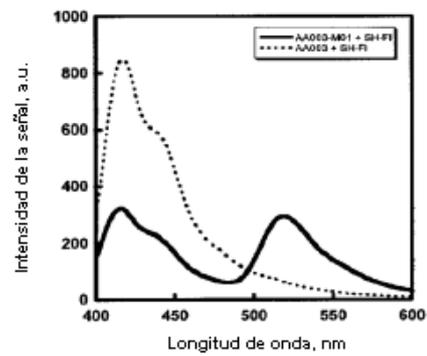
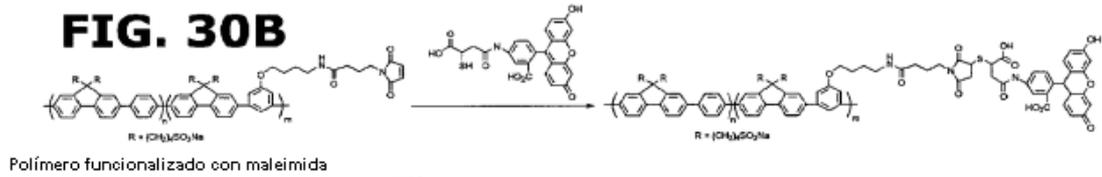
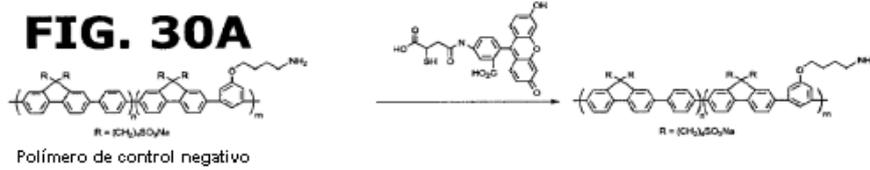


**FIG. 27B**

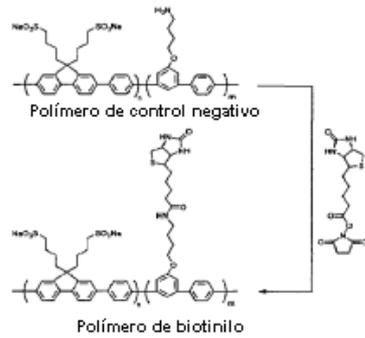




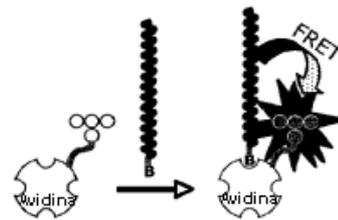
**FIG. 29.**



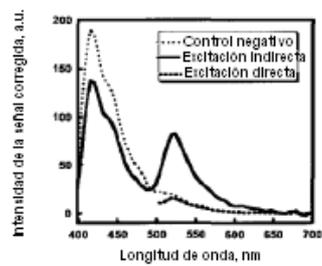
**FIG. 30C**



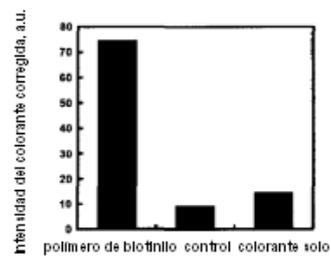
**FIG. 31A**



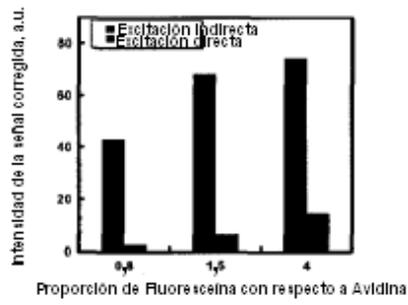
**FIG. 31B**



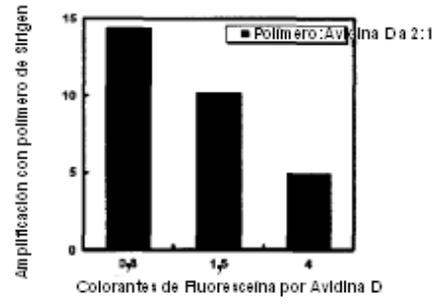
**FIG. 32A**



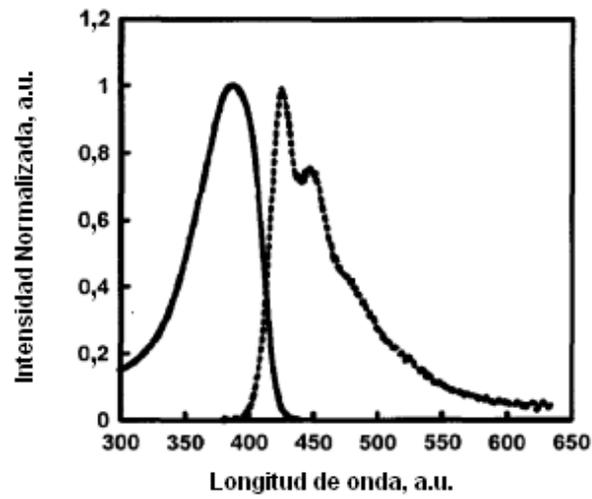
**FIG. 32B**



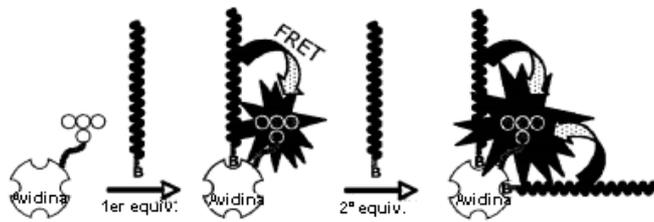
**FIG. 33A**



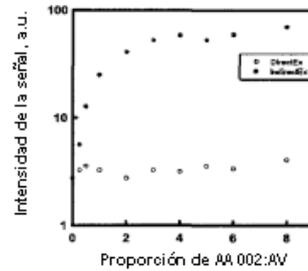
**FIG. 33B**



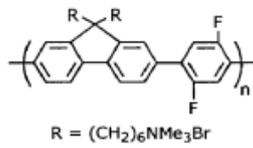
**FIG. 34**



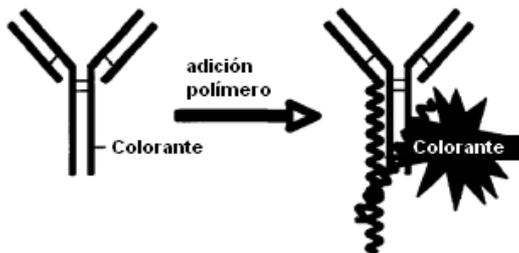
**FIG. 35A**



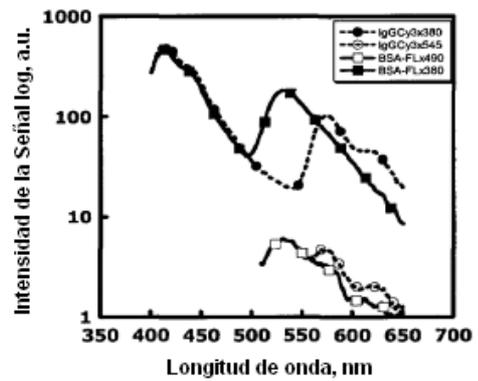
**FIG. 35B**



**FIG. 36A**



**FIG. 36B**



**FIG. 36C**