

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 359**

51 Int. Cl.:

**C08G 61/02** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C08G 61/10** (2006.01)  
**C09D 165/00** (2006.01)  
**C09K 11/06** (2006.01)  
**H01B 1/00** (2006.01)  
**H01B 5/00** (2006.01)  
**H01M 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011** **E 21200790 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3981819**

54 Título: **Nuevos reactivos para la amplificación dirigida de la señal de un biomarcador**

30 Prioridad:

**19.01.2010 US 29637910 P**  
**24.06.2010 US 35840610 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**22.08.2024**

73 Titular/es:

**SIRIGEN II LIMITED (100.0%)**  
**The Danby Building, Edmund Halley Road,**  
**Oxford Science Park**  
**Oxford, OX4 4DQ, GB**

72 Inventor/es:

**GAYLORD, BRENT S.;**  
**BARTHOLOMEW, GLENN P.;**  
**BALDOCCHI, RUSSELL A.;**  
**HONG, JANICE W.;**  
**HUISMAN, WILLIAM H.;**  
**LIANG, YONGCHAO;**  
**NGUYEN, TRUNG;**  
**TRAN, LAN P.;**  
**WHEELER, JEAN M.;**  
**PLAMER, ADRIAN CHARLES VERNON y**  
**UCKERT, FRANK PETER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 977 359 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

Nuevos reactivos para la amplificación dirigida de la señal de un biomarcador

## 5 Antecedentes de la invención

Las sondas de hibridación fluorescente se han convertido en una herramienta importante en la detección de secuencias específicas de ADN y ARN. Las señales generadas por los marcadores (o colorantes) fluorescentes añadidas se pueden controlar en tiempo real y proporcionar métodos sencillos, rápidos y sólidos para la detección de dianas y acontecimientos biológicos. Se ha observado utilidad en aplicaciones que van desde micromatrices y PCR en tiempo real hasta hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*).

Trabajos recientes en el área de multicromóforos, en particular en lo que respecta a los polímeros conjugados (PC), han destacado el potencial que tienen estos materiales para mejorar significativamente la sensibilidad de detección de dichos métodos (Liu y Bazan, Chem. Mater., 2004). Las estructuras de captación de luz de estos materiales pueden hacerse hidrosolubles y adaptarse para amplificar la salida fluorescente de varios marcadores de sonda (véase la solicitud de patente de EE. UU. n.º 10/600.286, presentada el 20 de junio de 2003, y Gaylord, Heeger y Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci., 2002).

Resultados como estos indican que los PC son muy 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 ácidos nucleicos, es decir, PCR. En comparación, en el campo del reconocimiento de proteínas, no existen métodos tan simples para amplificar los materiales diana. Por ello, la mejora de la señal que surge de la aplicación de PC tiene grandes consecuencias en esta área.

Los anticuerpos marcados con colorante se utilizan habitualmente para la detección de dianas proteicas en aplicaciones tales como inmunohistoquímica, matriz de proteínas, pruebas ELISA y citometría de flujo. La integración de materiales de PC en dichas metodologías promete proporcionar un impulso espectacular en el rendimiento de dichos ensayos, permitiendo niveles de detección que antes eran inalcanzables con indicadores fluorescentes convencionales (por ejemplo, colorantes).

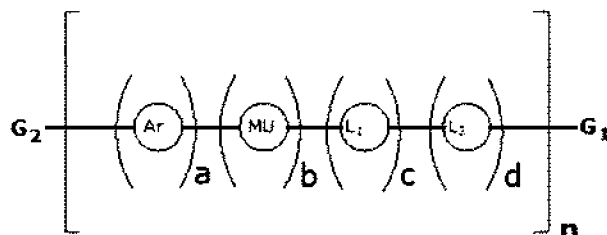
Más allá de la señal de adición, otro de los factores clave en los formatos de detección biológica es la capacidad de detectar múltiples analitos en la misma prueba o multiplexación. Esto se consigue normalmente mediante el uso de indicadores fluorescentes que operan a diferentes longitudes de onda. Los materiales de PC son ideales para proporcionar una plataforma para la multiplexación ampliada. Esto se puede conseguir mediante el ajuste de la estructura de diferentes PC para que funcionen a diferentes longitudes de onda o mediante la incorporación de un colorante dentro del conjugado de polímero y biomolécula.

El material y los métodos para producir ensayos biológicos de mayor sensibilidad y aumentar la multiplexación son muy deseados tanto en formato molecular (ácido nucleico) como de inmunoensayo. El documento US 2008/293164 A1 describe métodos y composiciones que incluyen un multicromóforo y/o complejo multicromóforo para identificar una biomolécula diana. El documento WO 2010/151807 A1 describe dispositivos y métodos para detectar analitos marcados y sin marcar, tales como ácidos nucleicos y proteínas, mediante polímeros catiónicos, aniónicos y neutros conjugados. El documento WO 2006/083932 A2 describe sensores de agregación para la detección y análisis de agregantes en una muestra. El sensor comprende unidades ópticamente activas. El documento EP 2 117 062 A1 describe películas poliméricas reticulantes. El documento US 2009/321723 A1 describe materiales electrónicos orgánicos que tienen una estructura polimérica. El documento WO 2005/024971 A1 describe dispositivos electrónicos que comprenden un polímero reticulado. El documento WO 2005/053056 A1 describe películas semiconductoras que comprenden polímeros reticulantes. El documento WO 03/006468 A2 describe compuestos de transporte de carga polimerizables. El documento JP 2008 280506 A describe materiales electrónicos orgánicos que comprenden un polímero. El documento WO 2009/123269 A1 describe compuestos poliméricos que tienen una alta capacidad de transporte de huecos, para su uso en la formación de películas. Grimsdale *et al.* (Chem. Rev. 2009, 109, 897-1091) describe la síntesis de polímeros conjugados emisores de luz para aplicaciones en dispositivos electroluminiscentes.

## 55 Sumario de la invención

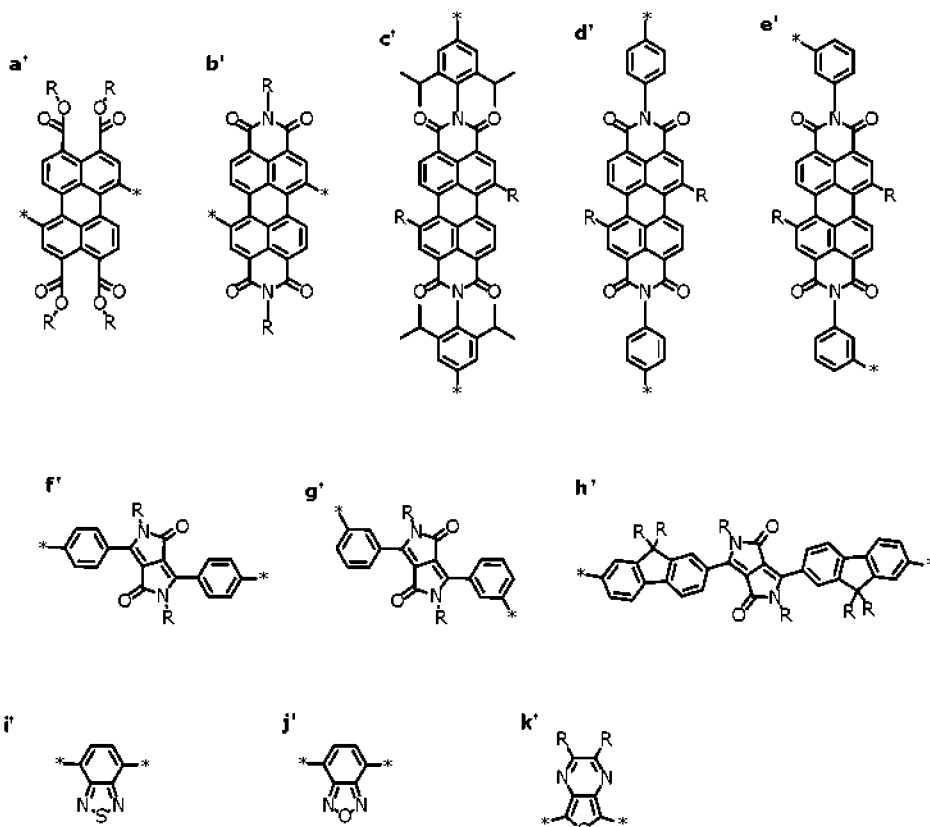
En un aspecto, la invención proporciona un polímero conjugado hidrosoluble como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polímero conjugado hidrosoluble de la invención en un ensayo de citometría de flujo para identificar diferentes marcadores celulares o tipos de células o para tinción intracelular. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polímero conjugado hidrosoluble para clasificar células para su uso en tratamientos. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polímero conjugado hidrosoluble en un método de ensayo como se define en las reivindicaciones.

El polímero conjugado hidrosoluble de acuerdo con la invención reivindicada tiene la estructura de la siguiente fórmula:



en donde:

- 5 (i) Ar es un arilo o heteroarilo y está sustituido con  $(CH_2)_{x'}(OCH_2CH_2)_{y'}OCH_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de modo que el polímero conjugado sea soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato;
- (ii) MU se selecciona del grupo que consiste en a' a k' que tienen la estructura:



\* = sitio de unión covalente a la cadena principal insaturada

en donde R es un grupo lateral no iónico capaz de impartir solubilidad en agua superior a 10 mg/ml;

(iii) cada enlazador opcional  $L_1$  y  $L_2$  son grupos arilo o heteroarilo distribuidos de manera uniforme o aleatoria a lo largo de la cadena principal del polímero y están sustituidos con una o más cadenas colgantes terminadas con un grupo funcional para conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula seleccionada de amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos;

(iv)  $G_1$  y  $G_2$  se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno, amina, carbamato, ácido carboxílico, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tiol, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilo sustituido con halógeno, arilo sustituido con ácido borónico, arilo sustituido con éster borónico, ésteres borónicos, ácidos borónicos, fluoreno opcionalmente sustituido y arilo o heteroarilo sustituido con una o más cadenas colgantes terminadas con un grupo funcional seleccionado de i) amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida,

ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos para conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula

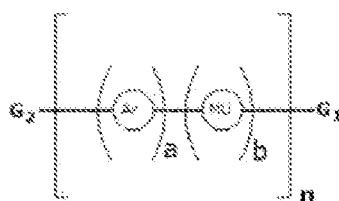
con la condición de que al menos uno de  $G_1$  y  $G_2$  comprenda un sitio de conjugación funcional para la conjugación funcional con otra molécula, sustrato o biomolécula;

en donde el polímero comprende al menos 1 grupo funcional seleccionado de amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos y tioles dentro de  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $L_1$  o  $L_2$  que permiten la conjugación funcional con otra molécula, sustrato o biomolécula;

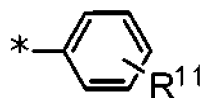
$n$  es un número entero de 1 a aproximadamente 10.000; y

$a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$  definen el % molar de cada unidad dentro de la estructura, cada una de las cuales puede repetirse de manera uniforme o aleatoria y donde  $a$  es un % molar del 10 al 100 %,  $b$  es un % molar del 0 al 90 % y cada una de  $c$  y  $d$  es un % molar del 0 al 25 %.

En algunas realizaciones, el polímero tiene la siguiente estructura:



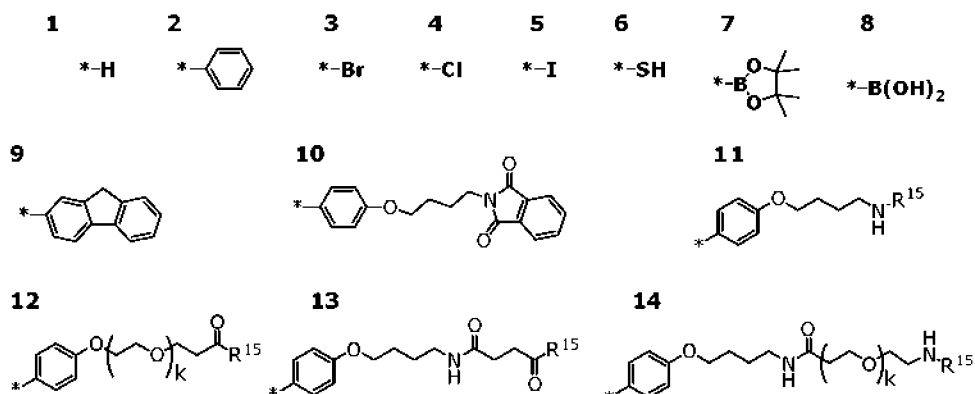
En algunas realizaciones,  $G_1$  y  $G_2$  se seleccionan independientemente de las estructuras representadas por:

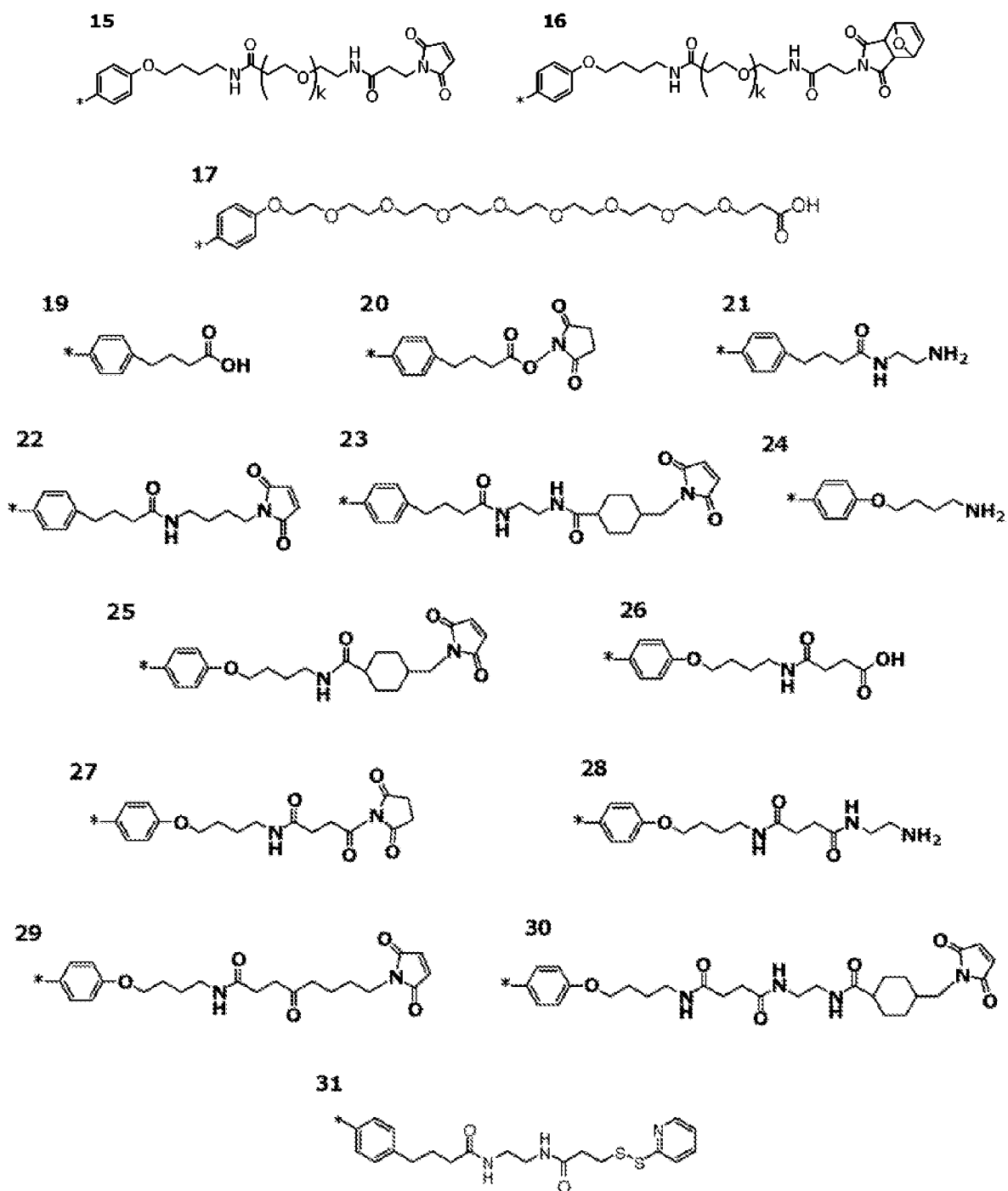


\* = sitio para la unión covalente a la cadena principal

en donde  $R^{11}$  es uno cualquiera o una combinación de un enlace, alquilo  $C_1-C_{20}$ , alcoxi  $C_1-C_{20}$ , alqueno  $C_2-C_{20}$ , alquino  $C_2-C_{20}$ , cicloalquilo  $C_3-C_{20}$ , haloalquilo  $C_1-C_{20}$ ,  $(CH_2)_x(OCH_2CH_2)_p(CH_2)_x$  donde cada  $x$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $p$  es independientemente un número entero de 0 a 50, arilo, (hetero)arilo  $C_2-C_{18}$ , fenoxi, amido, amino, carbamato, carboxilato, carbonatos, sulfuro, disulfuro o imido terminados con i) un grupo funcional seleccionado de amina, carbamato, carboxilato, ácido carboxílico, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos para su conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula.

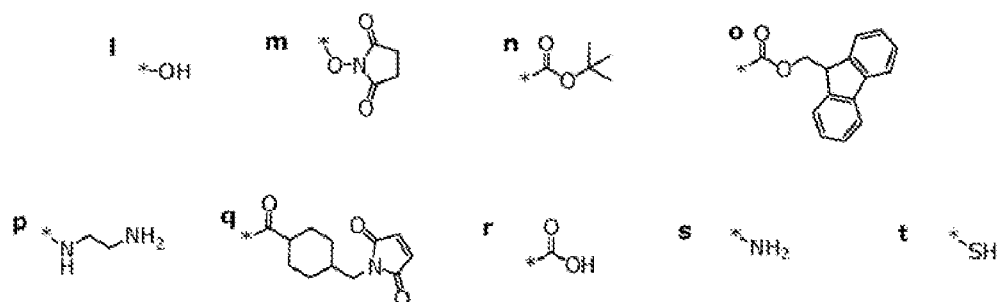
En algunas realizaciones, al menos uno de  $G_1$  y  $G_2$  se selecciona de:





en donde R<sup>15</sup> se selecciona del grupo que consiste en l a t que tienen la estructura:

5

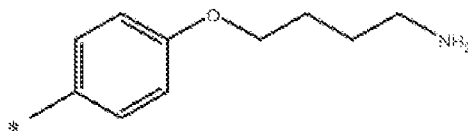


y k es 2, 4, 8, 12 o 24.

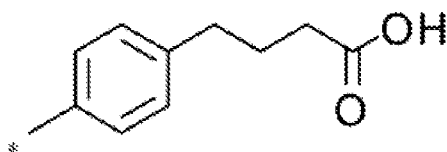
En algunas realizaciones, el polímero se conjuga con un anticuerpo.

En algunas realizaciones,  $G_1$  y  $G_2$  son iguales. En otras realizaciones,  $G_1$  y  $G_2$  son diferentes. En realizaciones adicionales, el polímero contiene un único sitio de conjugación en un solo extremo de la cadena polimérica  $G_1$  o  $G_2$ .

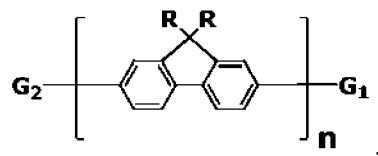
En otras realizaciones adicionales,  $G_1$  y  $G_2$  es



o

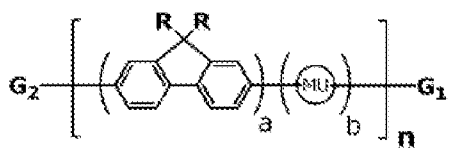


En alguna realizaciones, el polímero conjugado hidrosoluble tiene la estructura de fórmula:



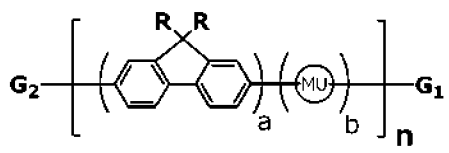
en donde R es  $(CH_2)_x(OCH_2CH_2)_yOCH_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde al menos uno de  $G_1$  o  $G_2$  comprende un sitio de conjugación funcional.

En algunas realizaciones, el polímero conjugado hidrosoluble tiene la estructura de fórmula:



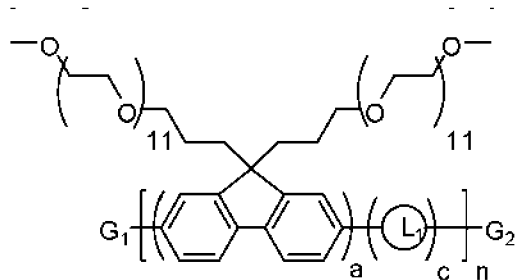
en donde R es  $(CH_2)_x(OCH_2CH_2)_yOCH_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde  $L_1$  comprende un sitio de conjugación funcional.

En algunas realizaciones, el polímero conjugado hidrosoluble tiene la estructura de fórmula:

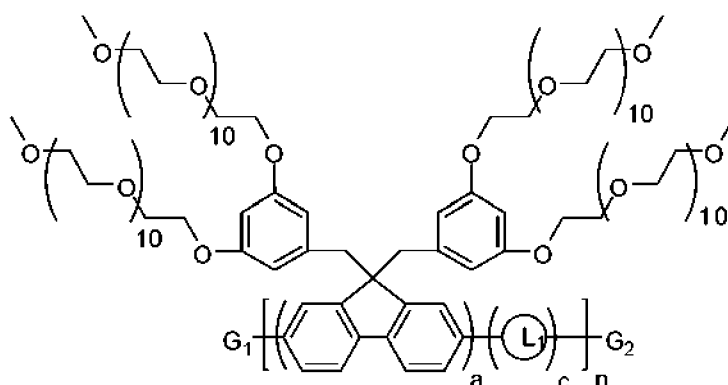


en donde R es  $(CH_2)_x(OCH_2CH_2)_yOCH_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0-20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde al menos uno de  $G_1$  o  $G_2$  comprende un sitio de conjugación funcional.

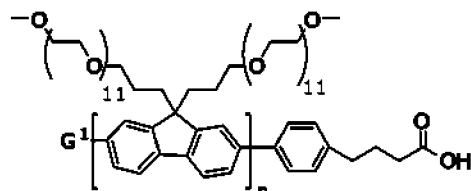
En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:



5 En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:

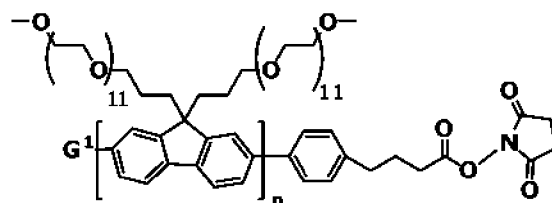


10 En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:

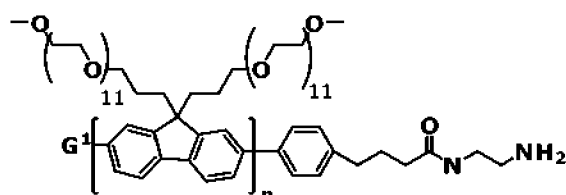


En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:

15

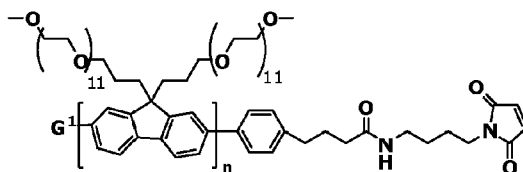


En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:



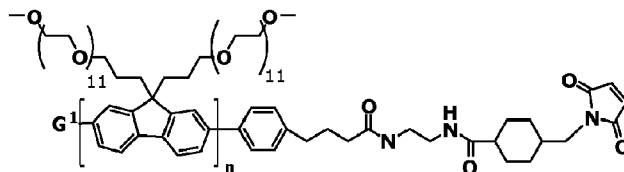
20

En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:

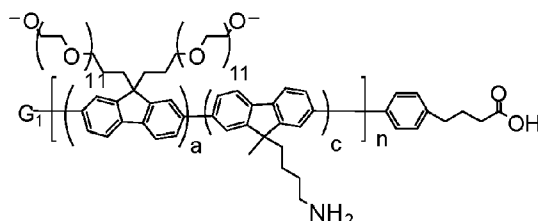


5

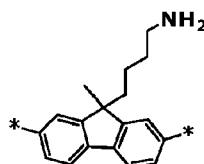
En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:



10 En otras realizaciones, el polímero tiene la estructura de fórmula:



15 En algunos casos, un cromóforo de señalización se une al polímero a través del grupo  $\text{NH}_2$ . En determinados casos, el cromóforo de señalización es el colorante Cy3 o Dylight 594. En determinados casos, el enlazador,



20 es aproximadamente un 10 % del polímero total. En otros casos, el polímero se conjuga con un indicador colorante secundario y un anticuerpo.

En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero se conjuga además con moléculas adicionales. En algunas realizaciones, el polímero se conjuga con estreptavidina, un anticuerpo o un ácido nucleico y se utiliza como indicador fluorescente directo. En determinadas realizaciones, el polímero se conjuga con una estreptavidina. En otras realizaciones, el polímero se conjuga con grupos tiol en la región bisagra de un anticuerpo. En aún otras realizaciones, el polímero se conjuga con un grupo amina en una proteína que está modificada con un enlazador heterobifuncional. En realizaciones adicionales, el polímero se conjuga con un ácido nucleico. En otras realizaciones adicionales, el polímero se conjuga con un anticuerpo. En determinados casos, el polímero se conjuga con un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo secundario o un anticuerpo primario. En otros casos, se excita un conjugado de anticuerpo polimérico a aproximadamente 405 nm en un ensayo de citometría de flujo donde la señal específica es al menos 3 veces mayor que la del mismo anticuerpo conjugado con Pacific Blue.

En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico. En otras realizaciones, el polímero tiene una pureza  $\geq 95\%$ .

En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero se utiliza en ensayos de citometría de flujo para identificar diferentes marcadores celulares o tipos de células. En otras realizaciones, el polímero se utiliza para clasificar células. En aún otras realizaciones, el polímero se utiliza para clasificar células para su uso en tratamientos.

En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero se utiliza para la tinción intracelular. En determinados casos, el polímero se utiliza en ensayos de citometría de flujo para identificar diferentes marcadores celulares o tipos de células.

En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero comprende un peso molecular promedio en número mínimo superior a 40.000 g/mol y una solubilidad en agua superior a 50 mg/ml en agua pura o una solución salina tamponada con fosfato.

5 En algunas realizaciones de polímeros conjugados descritos en el presente documento, el polímero comprende al menos dos enlazadores de conjugación únicos que pueden conjugarse con dos materiales únicos.

10 También se proporciona en el presente documento el uso de un polímero conjugado de la invención reivindicada en métodos de ensayo que comprenden proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana; proporcionar una proteína sensora conjugada con al menos un cromóforo de señalización y que sea capaz de interactuar con la biomolécula diana o una biomolécula asociada a la diana; proporcionar un polímero conjugado hidrosoluble descrito en el presente documento; poner en contacto la muestra con la proteína sensora y el polímero conjugado en una solución en condiciones en las que la proteína sensora pueda unirse a la biomolécula diana o a una biomolécula asociada a la diana si está presente; aplicar una fuente de luz a la muestra que pueda excitar el polímero conjugado; y detectar si se emite luz desde el cromóforo de señalización.

20 En algunas realizaciones, la proteína sensora es un anticuerpo. En otras realizaciones, la proteína sensora comprende una pluralidad de proteínas sensoras conjugadas con una pluralidad de cromóforos de señalización, en donde al menos dos de la pluralidad de cromóforos emiten diferentes longitudes de onda de luz tras la transferencia de energía desde el multicromóforo.

25 También se proporcionan en el presente documento complejos poliméricos conjugados que comprenden un polímero de la invención acoplado a al menos una biomolécula seleccionada del grupo que consiste en una biomolécula sensora, un bioconjugado y una biomolécula diana en donde el polímero está unido covalentemente por al menos un sitio de bioconjugación colgante del mismo, y el polímero comprende un cromóforo de señalización o un cromóforo de señalización opcionalmente está unido covalentemente al polímero o a la biomolécula sensora; en donde el polímero es como se define en las reivindicaciones.

30 algunas realizaciones, la biomolécula sensora se selecciona del grupo que consiste en una avidina, estreptavidina, neutravidina, avidinDN y avidinD. En otras realizaciones, el complejo polimérico conjugado está configurado además para unirse a un complejo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo marcado con biotina, proteína marcada con biotina y biomolécula diana marcada con biotina.

35 En realizaciones adicionales, la biomolécula sensora es un anticuerpo. En otras realizaciones adicionales, tanto el cromóforo de señalización como la biomolécula sensora están unidos covalentemente al multicromóforo a través de una pluralidad de enlazadores. En algunas otras realizaciones, tanto el cromóforo de señalización como la biomolécula sensora están unidos covalentemente al polímero a través de un sitio de enlace central que une covalentemente el polímero, el cromóforo de señalización y la biomolécula sensora. En aún otras realizaciones, el cromóforo de señalización, cuando se une covalentemente al polímero o a la biomolécula sensora, es un colorante orgánico.

### Breve descripción de los dibujos

45 La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo. No obstante, para el experto está claro qué polímeros conjugados en las figuras están dentro del alcance de las reivindicaciones, y cuáles son polímeros conjugados de referencia útiles para comprender la invención reivindicada. Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos en los cuales:

FIG. 1. Esquema de unión de un polímero conjugado en una realización de la invención.

FIG. 2. Esquema de un polímero bioconjugado de una realización de la invención.

55 FIG. 3. Esquema de polímeros conjugados ilustrativos conjugados con (A) anticuerpo; (B) una avidina; (C) ácido nucleico; (D) colorante, por ejemplo, cromóforo.

FIG. 4. Esquema de (A) un polímero conjugado con un anticuerpo marcado con colorante que da como resultado FRET; (B) un polímero conjugado con estreptavidina marcada con colorante que da como resultado FRET; (C) secuencias de sondas de ácido nucleico marcadas con una molécula desactivadora conjugadas con un polímero conjugado; (D) secuencias de sondas de ácido nucleico marcadas con una molécula desactivadora conjugadas con un complejo en tándem de polímero-colorante.

60 FIG. 5. Esquema de varios métodos de ensayo para una biomolécula diana o una biomolécula asociada a la diana. (A) Polímero conjugado unido a un bioconjugado; (B) polímero y anticuerpos marcados con colorante reconocen una diana común; (C) biomolécula sensora conjugada tanto con un colorante como con un segundo bioconjugado; (D) el segundo bioconjugado y el cromóforo de señalización, ambos conjugados con un ácido nucleico.

65 FIG. 6. Esquema de una adición de un segundo sitio de enlace dentro del polímero.

FIG. 7. Esquema de un polímero conjugado con un colorante y una biomolécula y la transferencia de energía resultante (A) el polímero está conjugado con ambos bioconjugados; (B) el polímero está conjugado con una estreptavidina y un colorante; (C) el polímero está conjugado con un ácido nucleico y un colorante.

FIG. 8. Esquema de asociaciones indirectas con una biomolécula sensora o una biomolécula asociada a la diana.

(A) anticuerpo biotinilado que interactúa con un conjugado covalente del polímero conjugado; (B) complejo en tándem de polímero y colorante conjugado con anticuerpo biotinilado; (C) ácido nucleico biotinilado que interactúa con un conjugado covalente del polímero conjugado; (D) complejo en tándem de polímero y colorante conjugado con ácido nucleico biotinilado; (E) ácido nucleico con fracción digoxigenina que interactúa con un conjugado covalente del polímero conjugado; (F) complejo en tándem de polímero y colorante conjugado con ácido nucleico con fracción digoxigenina.

FIG. 9. Esquema de polímeros conjugados ilustrativos conjugados con anticuerpos secundarios (A) y anticuerpos primarios (B).

FIG. 10. Esquema de un complejo de tipo sándwich. (A) complejo polimérico conjugado bioconjugado con una estreptavidina; (B) el anticuerpo primario marcado con biotina se utiliza para sondear la proteína diana directamente.

FIG. 11. Esquema de la adición de una o dos unidades de protección de fenilo a un polímero de fluoreno.

FIG. 12. Diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de dispositivo lógico.

FIG. 13. Diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de un kit.

FIG. 14. Esquema de una conjugación de estreptavidina con un polímero conjugado y la estructura conjugada resultante (arriba) y gel de agarosa teñido con Coomassie representativo del PC unido a estreptavidina (abajo).

FIG. 15. Representación representativa del gel de acrilamida del polímero biotinilado solo o unido a estreptavidina marcada con Cy5.

FIG. 16. Esquema de la unión del polímero conjugado unido a estreptavidina de la figura 14 a microesferas biotiniladas (arriba) y gráfico de la excitación de fluorescencia de las microesferas biotiniladas de control y las microesferas unidas al polímero conjugado con estreptavidina.

FIG. 17. Esquema del polímero conjugado unido a estreptavidina de la figura 14 unido selectivamente a microesferas biotiniladas y transferencia de energía a aceptores colorantes en conjugados de colorante y estreptavidina colocalizados (arriba) y gráfico de transferencia de energía desde el polímero conjugado unido a estreptavidina al aceptor colorante (abajo).

FIG. 18. Esquema de la unión del polímero biotinilado de la figura 14 a microesferas recubiertas de estreptavidina (arriba) y gráfico de la excitación de fluorescencia de microesferas recubiertas de estreptavidina de control y microesferas unidas al polímero biotinilado.

FIG. 19. Esquema de la unión del polímero biotinilado de la figura 14 a conjugados de estreptavidina marcados con colorante y FRET (arriba); gráfico de la transferencia de energía del polímero biotinilado a dos aceptores colorantes diferentes (abajo a la izquierda) y gráfico de valoración de la saturación del polímero (abajo a la derecha).

FIG. 20. Análisis de citometría de flujo del marcaje CD4 de células Cyto-trol con conjugados de polímero y estreptavidina de 440 nm.

FIG. 21. (A) Estructura polimérica del ejemplo 38b conjugada con (de izquierda a derecha) FITC, Cy3, DyLight 594 y DyLight633; (B) Comparación de la fluorescencia del colorante (DyLight594) excitado cerca de su máximo de absorbancia (curva inferior) y el conjugado de polímero y colorante excitado a 405 nm (curva superior); (C) Comparación de la señal fluorescente del polímero base (sin colorante, emisión máxima cerca de 420 nm) con la del conjugado de polímero y colorante (emisión máxima cerca de 620 nm).

FIG. 22. Gráfico de prueba de flujo de conjugados de anticuerpo monoclonal (anti-CD4) en muestras de sangre completa lisada.

FIG. 23. Gráfico de fluorescencia de un colorante (DyLight594) y un conjugado de polímero y colorante mediante excitación del colorante a 594 nm y del conjugado de polímero y colorante a 380 nm.

FIG. 24. Gráfico de inmunoensayo fluorescente (ELISA) con polímero conjugado unido a estreptavidina.

FIG. 25. Gráfico de intensidad fluorescente frente a temperatura de un conjugado de polímero y oligómero de ADN hibridado con una diana.

FIG. 26. Cromatograma de intercambio iónico para un conjugado de anticuerpo polimérico para eliminar el polímero libre (izquierda) y un cromatograma SEC que muestra la separación del conjugado final del anticuerpo libre. En ambos cromatogramas la absorbancia se controló a 280 nm (curvas inferiores) y a 407 nm (curvas superiores).

FIG. 27. Inmunoensayo sándwich en el ensayo Luminex (izquierda) y resultados correspondientes en el sistema Luminex utilizando excitación a 532 nm tanto del polímero conjugado como de los conjugados de detección de PE y estreptavidina.

FIG. 28. Los datos de la izquierda muestran los resultados obtenidos con perlas de compensación, mientras que los datos de la derecha son el resultado de un ensayo de 4 colores en muestras de sangre humana.

FIG. 29. (A) y (B) Esquema del enlace covalente del polímero conjugado al anticuerpo secundario.

FIG. 30. Esquema de polímeros conjugados en inmunoensayo fluorescente (FIA). (A) Polímero conjugado unido covalentemente a un anticuerpo de detección; (B) proteína de unión a biotina unida covalentemente al polímero conjugado e interactuando con un anticuerpo de detección biotinilado; (C) anticuerpo secundario unido covalentemente al polímero conjugado e interactuando con un anticuerpo de detección.

FIG. 31. (A) Esquema de secuencias de sondas de ácido nucleico marcadas con una molécula desactivadora conjugadas con un polímero conjugado; (B) secuencias de sondas de ácido nucleico marcadas con una molécula desactivadora conjugadas con un complejo en tándem de polímero y colorante conjugado.

FIG. 32. Esquema de modificaciones de la técnica de detección HybProbe. (A) polímero conjugado unido

covalentemente a la sonda donante y transferencia de energía resultante a la sonda aceptora; (B) Modificación de "señal de apagado" del enfoque HybProbe donde el polímero conjugado se inactiva mediante una sonda aceptora. FIG. 33. Comparación de la unión no específica en varios polímeros (arriba) en un modelo de células Jurkat (línea celular de linfocitos); (abajo) gráfico que clasifica los polímeros en términos de señal generada puramente por unión no específica (NSB, del inglés *non-specific binding*).

FIG. 34. Histogramas recopilados del análisis de citometría de flujo (excitación a 405 nm en un citómetro BD LSR-II) utilizando una estirpe celular Jurkat; (izquierda) células sin teñir y un control negativo, polímero P4 aniónico; gama (intermedia) de diferentes polímeros y combinaciones de cadenas laterales de polímeros probadas en las mismas células; (derecha) el polímero neutro P20 casi no mostró desplazamiento con respecto a las células no tratadas.

FIG. 35. Electroforesis en gel que muestra la movilidad relativa de la avidina en función del grado de conjugación con el polímero AA1.

FIG. 36. Fraccionamiento de mezclas crudas de conjugados de polímero y avidina en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200; (arriba) seguimiento de fracciones mediante absorbancia UV; (abajo) electroforesis en gel de fracciones seleccionadas para visualizar el grado en que la avidina estaba unida al polímero.

FIG. 37. Electroforesis en gel de reacciones de conjugación realizadas con polímero en exceso molar variable con estreptavidina; (izquierda) iluminación UV; (derecha) excitación a 532 nm.

FIG. 38. Gráfico que representa la purificación de conjugados de polímero y estreptavidina con polímeros ejemplificados en el ejemplo 9, denominados P30, (arriba) muestras brutas; (abajo) conjugados purificados.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos y se pretende que se definan 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, e incluye compuestos policíclicos. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, opcionalmente sustituidos, metilo, 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. El término "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Los sustituyentes ilustrativos en grupos alquilo sustituidos 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", donde alquilo es como se ha definido anteriormente. Por grupo "alcoxi inferior" se entiende 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. Los 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. Los grupos alquenilo preferidos en el presente documento contienen de 2 a 12 átomos de carbono. El término "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 5 o 6, átomos de carbono. Los sustituyentes ilustrativos en grupos alquenilo sustituidos 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 donde alquenilo es como se define anteriormente.

"Alquilarilo" se refiere a un grupo alquilo que está unido covalentemente a un grupo arilo. Preferentemente, el alquilo es un alquilo inferior. Los grupos alquilarilo ilustrativos incluyen bencilo, fenetilo, fenopropilo, 1-benciletililo, fenobutilo, 2-bencilpropilo y similares.

"Alquilariloxi" se refiere a un grupo "-Oalquilarilo", donde alquilarilo es como se define 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. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, n-propinilo, isopropinilo, propargilo, but-2-inilo, 3-metilbut-1-inilo, octinilo, decinilo y similares. Los grupos alquinilo preferidos en el presente documento 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-. Los sustituyentes ilustrativos en grupos alquinilo sustituidos incluyen hidroxilo, ciano, alcoxi, =O, =S, -NO<sub>2</sub>, halógeno, haloalquilo, heteroalquilo, amina, tioéter y -SH.

"Anticuerpo", tal como se menciona en el presente documento, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv) siempre que presenten actividad o afinidad de unión por un antígeno seleccionado.

"Antígeno", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmunitaria.

"Amida" se refiere a -C(O)NR'R", donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo y alquilarilo.

"Amina" se refiere a un grupo -N(R')R", donde R' y R" se seleccionan independientemente de 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 conjugado e incluye grupos arilo carbocíclicos, heterocíclicos, con puente y/o policíclicos, y pueden estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones. Los grupos arilo típicos contienen de 1 a 5 anillos aromáticos, que pueden estar fusionados y/o enlazados. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, furanilo, azolilo, tiofuranilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, bifenilo, indenilo, benzofuranilo, indolilo, naftilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, piridopiridinilo, pirrolopiridinilo, purinilo, tetralinilo y similares. Los sustituyentes ilustrativos en grupos arilo opcionalmente sustituidos incluyen alquilo, alcoxi, alquilcarboxi, alquenilo, alquenilo, 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, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>R o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONRR' donde n es de 0 a 4, y en donde R y R' son independientemente H, alquilo, arilo o alquilarilo.

"Arliloxi" se refiere a un grupo "-Oarilo", donde arilo es como se define anteriormente.

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

"Arilo carbocíclico" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido en donde los átomos del anillo son carbono.

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

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

"Heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo en donde uno o más átomos de carbono y átomo(s) de hidrógeno asociados están reemplazados por un heteroátomo opcionalmente sustituido, e incluye grupos alquilo sustituidos con sólo un tipo de heteroátomo así como grupos alquilo sustituidos con una mezcla de diferentes tipos de heteroátomos. Los heteroátomos incluyen oxígeno, azufre y nitrógeno. Como se utiliza 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, incluidas las formas protonadas. Un heteroátomo opcionalmente sustituido se refiere a la sustitución de uno o más hidrógenos unidos a un átomo de nitrógeno con alquilo, arilo, alquilarilo o hidroxilo.

"Heterocíclico" se refiere a un compuesto que contiene al menos un anillo saturado o insaturado que tiene al menos un heteroátomo y opcionalmente sustituido en una o más posiciones. Los grupos heterocíclicos típicos contienen de 1 a 5 anillos, que pueden estar fusionados y/o enlazados, donde cada anillo contiene cinco o seis átomos. Ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen piperidinilo, morfolinilo y pirrolidinilo. Sustituyentes ilustrativos para grupos heterocíclicos opcionalmente sustituidos son los de alquilo y arilo en los carbonos del anillo y los de heteroalquilo en los heteroátomos.

"Arilo heterocíclico" se refiere a un grupo arilo que tiene al menos 1 heteroátomo en al menos un anillo aromático. Los grupos arilo heterocíclicos ilustrativos incluyen furanilo, tienilo, piridilo, piridazinilo, pirrolilo, N-alquilo inferior-pirrol, pirimidilo, pirazinilo, triazinilo, tetrazinilo, triazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, bupiridilo, tripiridilo, tetrapiridilo, fenazinilo, fenantrolinilo, purinilo, perileno, perileno diimida, dicetopirrolpirrol, benzotiodiazol, benzoxadiazol, tienopirazina y similares.

"Hidrocarbilo" se refiere a sustituyentes hidrocarbilo que contienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, incluidas 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. El término

"hidrocarbilo inferior" se refiere a un grupo hidrocarbilo de uno a seis átomos de carbono, preferentemente de uno a cuatro átomos de carbono.

Un "sustituyente" se refiere a un grupo que reemplaza uno o más hidrógenos unidos a un carbono o nitrógeno. Los sustituyentes ilustrativos incluyen alquilo, alquilidenilo, alquilcarboxi, alcoxi, alquenilo, alquenilcarboxi, alqueniloxi, arilo, ariloxi, alquilarilo, alquilariloxi, -OH, amida, carboxamida, carboxi, sulfonilo, =O, =S, -NO<sub>2</sub>, halógeno, haloalquilo, anillos fusionados saturados o insaturados opcionalmente sustituidos, -S(O)R, -SO<sub>3</sub>R, -SR, -NRR', -OH, -CN, -C(O)R, -OC(O)R, -NHC(O)R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>R o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONRR' donde n es de 0 a 4, y en donde R y R' son independientemente H, alquilo, arilo o alquilarilo. Los 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 -S(O)<sub>2</sub>R, donde R es alquilo, arilo, -C(CN)=C-arilo, -CH<sub>2</sub>CN, alquilarilo o amina.

"Tioamida" se refiere a -C(S)NR'R", donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo y alquilarilo.

"Tioéter" se refiere a -SR, donde R es alquilo, arilo o alquilarilo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "par de unión" se refiere a la primera y segunda moléculas que se unen específicamente entre sí con mayor afinidad que a otros componentes de la muestra. La unión entre los miembros del par de unión suele ser no covalente. Los pares de unión ilustrativos incluyen pares de unión inmunológica (por ejemplo, cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o parte o fragmento de unión del mismo, por ejemplo digoxigenina y antidigoxigenina, fluoresceína y antifluoresceína, dinitrofenol y antidinitrofenol, bromodesoxiuridina y antibromodesoxiuridina, inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina de cabra antirratón) y pares de unión no inmunológica (por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormonas [por ejemplo, tiroxina y cortisol]-proteína fijadora de hormonas, agonista o antagonista del receptor-receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo del mismo) IgG-proteína A, lectina-hidrato de carbono, enzima-cofactor de enzima, enzima-inhibidor de enzima y pares de polinucleótidos complementarios capaces de formar dúplex de ácidos nucleicos) y similares. Uno o ambos miembros del par de unión pueden conjugarse con moléculas adicionales.

Las expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, y pueden comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos o mezclas de los mismos. Estas expresiones se refieren solo a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, los términos incluyen el ácido desoxirribonucleico ("ADN") tricatenario, bicatenario y monocatenario, así como el ácido ribonucleico ("ARN") tricatenario, bicatenario y monocatenario. También incluye modificaciones, por ejemplo mediante alquilación y/o mediante protección y formas no modificadas del polinucleótido. Se pueden encontrar detalles adicionales para estos términos, así como para detalles de la formación de pares de bases, en la solicitud de EE. UU. número de serie 11/344.942, presentada el 31 de enero de 2006.

"Complementario" o "sustancialmente complementario" se refiere a la capacidad de hibridar o emparejar bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, entre un ácido nucleico peptídico sensor y un polinucleótido diana. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos polinucleótidos monocatenarios o APN son sustancialmente complementarios cuando las bases de una cadena, alineadas y comparadas de forma óptima y con las inserciones o eliminaciones adecuadas, se emparejan con al menos aproximadamente un 80 % de las bases de la otra cadena, normalmente al menos de aproximadamente un 90 % a un 95 %, y más preferentemente de aproximadamente un 98 al 100 %.

Como alternativa, existe una complementariedad sustancial cuando un polinucleótido o APN se hibrida en condiciones de hibridación selectiva con su complemento. Normalmente, se producirá hibridación selectiva cuando haya al menos aproximadamente un 65 % de complementariedad en 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).

"Unión preferencial" o "hibridación preferencial" se refiere a la mayor propensión de un polinucleótido o APN a unirse a su complemento en una muestra en comparación con un polímero no complementario en la muestra.

Las condiciones de hibridación para polinucleótidos incluirán normalmente concentraciones de sal inferiores a aproximadamente 1 M, más habitualmente inferiores a aproximadamente 500 mM y preferentemente inferiores 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 contengan poca o ninguna sal. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5 °C, pero normalmente son superiores a 22 °C, más usualmente superiores a aproximadamente 30 °C, y preferentemente superiores a aproximadamente 37 °C. Los fragmentos más largos pueden necesitar temperaturas de hibridación más elevadas para una hibridación específica. Otros factores pueden afectar la rigurosidad de la hibridación, incluyendo la composición de la base y la longitud de las cadenas complementarias, la

presencia de disolventes orgánicos y el grado de desapareamientos de bases, y la combinación de parámetros utilizados es más importante que la medida absoluta de cualquiera de ellos por sí solo. Otras condiciones de hibridación que pueden controlarse incluyen el tipo y la concentración del tampón, el pH de la solución, la presencia y concentración de reactivos de bloqueo para disminuir la unión de fondo, tales como secuencias repetidas o soluciones de proteínas de bloqueo, el tipo(s) de detergente y concentraciones, moléculas tales como polímeros que aumentan la concentración relativa de los polinucleótidos, ion(es) metálico(s) y su(s) concentración(es), quelante(s) y sus concentraciones, y otras condiciones conocidas en la materia.

"Multiplexación" en el presente documento se refiere a un ensayo u otro método analítico en el que se pueden analizar múltiples analitos simultáneamente.

La invención proporciona composiciones de polímeros conjugados que no sólo proporcionan sitios de conjugación activos sino que también se solubilizan mediante el uso de cadenas laterales no iónicas (sin cargas formales). Dichas realizaciones presentan una solubilidad en agua excepcional y proporcionan interacciones mínimas con moléculas biológicas y otros componentes comunes de ensayos biológicos.

Las realizaciones divulgadas en el presente documento se refieren además en general a ensayos y complejos que incluyen polímeros conjugados útiles para la identificación de biomoléculas diana o biomoléculas asociadas con moléculas diana a través de una señal mejorada proporcionada por sus propiedades únicas.

En determinadas realizaciones generales, el polímero conjugado sirve directamente como indicador óptico unido a una biomolécula, sustrato u otro componente del ensayo. Los polímeros conjugados actúan como estructuras captadoras de luz extendidas que, cuando se excitan, pueden absorber más energía que los colorantes orgánicos convencionales. A continuación, el polímero vuelve a emitir la luz que puede detectarse o medirse. Las señales generadas a partir de dichos complejos poliméricos conjugados pueden ser significativamente mayores que las obtenidas de otros indicadores fluorescentes.

En otras realizaciones, un aspecto incluye la transferencia de energía desde polímeros conjugados a colorantes unidos al polímero o a un sensor que puede ser una biomolécula que incluye un bioconjugado (por ejemplo, un anticuerpo, una estreptavidina o una secuencia de ácido nucleico). En dichas realizaciones es común observar una señal colorante amplificada (con respecto a la excitación directa del colorante) como resultado de la excitación del polímero conjugado y la posterior transferencia de energía. Además, es posible utilizar una variedad de colorantes con energía variable para crear una base para un formato de detección multicolor o múltiple.

En determinadas realizaciones, los polímeros conjugados neutros se unen a anticuerpos para la identificación de marcadores celulares y tipos de células específicos en citometría de flujo y ensayos de clasificación celular. En otras realizaciones, los polímeros conjugados están unidos además a un indicador colorante secundario. En realizaciones adicionales, el polímero y las estructuras de polímero y colorante están unidas a anticuerpos monoclonales.

En otras realizaciones, los polímeros conjugados neutros se unen a anticuerpos para su uso en diversos inmunoensayos de tipo sándwich.

En una realización, un enfoque que modifica un formato como el siguiente en relación con los ensayos de sensores de ácido nucleico como se describe en Gaylord, Heeger y Bazan, J. Am. Chem. Soc., 2003, se puede seguir. De manera específica, la amplificación de la señal de polímeros conjugados puede basarse en acontecimientos de unión para indicar un acontecimiento de hibridación. Se puede elegir como donante cualquier polímero conjugado establecido, y uno o más colorantes, preferentemente un colorante con un historial de transferencia de energía eficaz, por ejemplo, fluoresceína y Cy3, pueden elegirse como aceptores. Se prevé que el colorante pueda conjugarse directamente con una molécula sensora. Como se muestra de manera esquemática (Figura 1), el sensor puede ser una biomolécula (por ejemplo, un anticuerpo) en una solución o en un sustrato, al que se pueden añadir polímeros conjugados. En la realización mostrada en la figura 1, un colorante puede unirse covalentemente (bioconjugarse) a un anticuerpo (estructura en forma de Y), que posee una carga neta negativa. La adición de polímeros conjugados (que se muestran como líneas onduladas) puede dar como resultado una interacción o unión entre el polímero conjugado y el anticuerpo, acercando los polímeros conjugados y el colorante. La interacción o unión se puede lograr mediante cualquier método conocido que incluye, pero sin limitación, marcado con avidina/biotina. De este modo se pueden cumplir los requisitos de distancia para la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*), y la excitación del polímero con luz (mostrada como hv) da como resultado una emisión del colorante amplificada. Se prevé que los polímeros conjugados puedan excitarse a una longitud de onda en la que el colorante no tenga una absorbancia significativa. En una realización, la emisión del colorante puede tener una longitud de onda más larga que la emisión del polímero conjugado. En uso, se prevé que un método de ensayo pueda incluir las etapas de proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un sensor conjugado a un cromóforo de señalización y capaz de interactuar con la biomolécula diana, proporcionar un polímero conjugado que interactúa con el sensor y, tras la excitación, es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización del sensor y poner en contacto la muestra con el sensor y el polímero conjugado en una solución en condiciones en las que el sensor puede unirse a la biomolécula diana, si está presente. Seguidamente, el método puede incluir aplicar una fuente de luz a la muestra que pueda excitar el polímero conjugado y detectar si el

cromóforo de señalización emite luz.

Como se divulga en el presente documento, la interacción o unión entre polímeros conjugados y anticuerpos marcados con colorante puede ser un enfoque viable para aumentar la sensibilidad de detección, por ejemplo de una biomolécula diana. En una realización adicional, la unión covalentemente de los polímeros conjugados a un colorante, biomolécula (por ejemplo, un complejo de anticuerpos) o ambos ofrece varias ventajas que incluyen un fondo reducido y/o una transferencia de energía mejorada. En el caso de enlace directo a una biomolécula, los acontecimientos de biorreconocimiento, en lugar de la interacción polimérica no específica o acontecimientos de unión (como los descritos anteriormente en la figura 1), deberían regir la presencia del polímero conjugado. De esta manera, se puede eliminar la unión no específica de polímeros conjugados a biomoléculas, reduciendo cualquier emisión de fondo resultante del propio polímero conjugado. Las biomoléculas mencionadas anteriormente incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, ligandos de afinidad, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, azúcares, lípidos, enzimas y ácidos nucleicos (como sondas de hibridación y/o aptámeros).

En general, en otro aspecto, la invención incluye la bioconjugación de polímeros con ligandos de afinidad (ligandos de afinidad que describen una biomolécula que tiene afinidad por otra biomolécula). En la figura 2 se ilustra una clase de materiales en los que un polímero conjugado (mostrado como una línea ondulada) está unido a un colorante, biomolécula o complejo biomolécula/colorante (marcado con una X). La unión al polímero conjugado puede realizarse a través de un enlazador A de primera funcionalidad en el polímero conjugado que sirve como sitio de bioconjugación capaz de unirse covalentemente con un enlazador A' de segunda funcionalidad unido a una biomolécula y/o colorante (véase X). Esta disposición puede fijar la distancia entre el polímero conjugado y X, asegurando así sólo interacciones específicas entre el polímero y X. Se prevé que un componente biomolécula X en esta realización puede ser cualquiera de las diversas biomoléculas divulgadas en el presente documento, que incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo, proteína, ligando de afinidad, enzima o ácido nucleico.

El enlazador A puede estar en cualquier parte del polímero conjugado, incluidas las posiciones terminales del polímero, internamente en una subunidad repetida, entre subunidades repetidas o cualquier combinación de las mismas. De mismo modo, el enlazador A' se puede unir en cualquier parte de una biomolécula y/o colorante. La química de enlace para A-A' puede incluir, pero sin limitación, maleimida/tiol; tiol/tiol; piridilditiol/tiol; yodoacetato de succinimidilo/tiol; N-succinimidiléster (éster NHS), éster de sulfodiclorofenol (éster de SDP) o éster de pentafluorofenilo (éster de PFP)/amina; bissuccinimidiléster/amina; imidoésteres/aminas; hidracina o amina/aldehído, dialdehído o benzaldehído; isocianato/hidroxilo o amina; hidratos de carbono-periodato/hidrazina o amina; analito químico de diazirina/aril azida; analito químico de piridilditiol/aril azida; alquino/azida; carboxi-carbodiimida/amina; amina/sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo)/tiol; y amina/BMPH (ácido N-[β-maleimidopropiónico]hidrazida•TFA)/tiol.

Se prevé que la X en este contexto pueda ser, pero sin limitación, un colorante, proteína fluorescente, nanomaterial (por ejemplo, Quantum Dot), molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre un colorante y una molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre una proteína de fluorescencia y una molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre nanomaterial (por ejemplo, Quantum Dot) y una molécula generadora de 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 peptídico, anticuerpo, antígeno, fago, bacteria o conjugado de dos cualesquiera de los elementos descritos anteriormente.

En otro aspecto, la invención incluye el uso de polímeros conjugados como marcadores directos. En la figura 3 se muestran ejemplos de polímeros conjugados marcados. En una realización, la figura 3A, se muestra un polímero (mostrado como hexágonos rodeados por un círculo) conjugado con un anticuerpo que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo primario o secundario. El conjugado del polímero y el anticuerpo se puede utilizar como indicador directo, por ejemplo, en un ensayo. En realizaciones adicionales, la señal del polímero no está modulada por otros componentes del ensayo, sino que depende de su presencia en el ensayo en el momento de la detección como función del reconocimiento de biomoléculas específicas. La excitación del polímero con luz (no mostrada) puede dar como resultado la emisión del polímero, lo que indica la presencia del anticuerpo (primario o secundario) en el ensayo o solución de ensayo. En la figuras 3B y 3C se ejemplifica además el uso de polímeros conjugados como marcadores de biomoléculas capaces de detectar dianas específicas y biomoléculas asociadas a dianas. En la figura 3B se representa un conjugado de polímero y avidina (estreptavidina, avidina neutral, etc.) capaz de unirse a moléculas modificadas con biotina, biomoléculas o sustratos. En la figura 3C se representa un conjugado de ácido nucleico (ADN, ARN, APN, etc.) capaz de hibridarse con secuencias de ácidos nucleicos complementarias. La unión o conjugación de un polímero conjugado fluorescente con una molécula capaz de reconocer una biomolécula diana o una molécula asociada a una diana (como las ejemplificadas en la figura 3) proporciona un medio directo de detección. En realizaciones adicionales, las señales generadas por la excitación del polímero conjugado no están moduladas por otros componentes del ensayo excepto aquellos que están directamente conjugados con el polímero. En dichas realizaciones, el complejo polimérico actúa directamente como marcador fluorescente.

En una realización mostrada en la figura 3D, el polímero conjugado está marcado con un colorante, por ejemplo, un cromóforo. En este caso, el polímero conjugado puede actuar como donante y el colorante puede actuar como aceptor

en un proceso de transferencia de energía. En el presente documento, el polímero conjugado puede actuar como un captador de luz, y a la excitación del polímero conjugado le sigue la canalización de las excitaciones al colorante mediante un proceso de transferencia de energía que incluye, pero sin limitación, FRET. Esto da como resultado una emisión del colorante amplificada (en comparación con la excitación directa del colorante). La fluorescencia del polímero conjugado donante, en una realización, se puede desactivar (por ejemplo, >90 % de desactivación). Esto se ejemplifica en el ejemplo 38 y se muestra en la figura 21, solo a modo de ejemplo. En algunos casos, el polímero conjugado en la figura 3D (y dibujos similares divulgados en el presente documento) puede tener múltiples uniones de colorante que se pueden colocar internamente o en el extremo de la estructura polimérica (un colorante único se muestra solo con fines ilustrativos).

En el caso de enlace directo a un colorante (Figura 3D) o complejo biomolécula/colorante (como se ejemplifica en la figura 4), las distancias donante-aceptor pueden ser fijas, en lugar de depender de la fuerza de la interacción o unión, y la eficacia de la transferencia de energía puede aumentar significativamente. Esto tiene consecuencias importantes en el contexto de mejorar la señalización (o desactivación) del colorante y reducir la fluorescencia de fondo asociada con la interferencia entre donante y aceptor. La interferencia en este caso se refiere a la superposición entre los picos de emisión del polímero conjugado (donante) y del colorante (aceptor). Los polímeros conjugados que se unen de manera no específica a distancias demasiado grandes para la transferencia de energía pueden contribuir a la fluorescencia de fondo (o interferencia). Las distancias más cortas (fijas) entre el donante y el aceptor no sólo pueden facilitar la amplificación directa del colorante, sino también puede desactivar en gran medida la emisión del donante, como se representa en la figura 21 sólo a modo de ejemplo. Esto da como resultado una menor emisión del donante en las longitudes de onda de emisión del aceptor, lo que posteriormente reduce o incluso elimina la necesidad de corrección de la interferencia.

En realizaciones adicionales, la localización del polímero conjugado y un cromóforo de señalización se unen mediante un acontecimiento de reconocimiento, por ejemplo, mediante la unión de dos pares de afinidad o mediante el reconocimiento conjunto de la misma molécula diana o molécula asociada a la diana (Figura 5). Dichas realizaciones podrían realizarse en formatos basados en solución o en configuraciones donde uno o más elementos están unidos a otra biomolécula (célula, tejido, proteína, ácido nucleico, etc.) o a un sustrato (perla, placa de pocillos, superficie, tubo, etc.).

En general, otro aspecto de la invención incluye un método para analizar una biomolécula diana o una biomolécula asociada a la diana. Como se muestra en la figura 5A, en una realización, un polímero conjugado (mostrado como una línea ondulada) puede unirse a un primer bioconjugado (mostrado como un objeto en forma de Y), por ejemplo, un anticuerpo secundario que es específico para el segundo bioconjugado marcado con colorante, por ejemplo, un anticuerpo primario. En el presente documento, el acontecimiento de reconocimiento entre el anticuerpo primario y secundario dará como resultado la reducción de la distancia entre el polímero conjugado donante y el colorante aceptor. En una realización similar representada en la figura 5B, el polímero y los anticuerpos marcados con colorante reconocen una diana común. Después de cualquiera de estos acontecimientos de reconocimiento, la excitación del polímero conjugado donante con luz (mostrada como  $h\nu$ ) dará como resultado la transferencia de energía, por ejemplo, FRET, al colorante aceptor (mostrada como una flecha curva), y se observará una emisión del colorante amplificada (en comparación con la excitación directa del colorante). En uso, se prevé que un método de ensayo podría incluir proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana mediante las etapas de proporcionar un primer bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo primario conjugado con un cromóforo de señalización y capaz de interactuar con la biomolécula diana. A esto le sigue proporcionar un segundo bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo secundario o un anticuerpo primario, conjugado a un polímero, en donde el segundo bioconjugado se puede unir al primer bioconjugado o diana y en donde, tras dicha unión, la excitación del polímero conjugado es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización. Seguidamente, el método incluye poner en contacto la muestra con el primer bioconjugado en una solución en condiciones en las que el primer bioconjugado pueda unirse a la biomolécula diana si está presente y poner en contacto la solución con el segundo bioconjugado. A continuación, el método incluye aplicar una fuente de luz a la biomolécula diana o a la biomolécula diana marcada, en donde la fuente de luz puede excitar el polímero conjugado y posteriormente detectar si se emite luz desde el cromóforo de señalización.

En otro aspecto, la invención incluye un método para analizar una muestra mediante un polímero conjugado y un complejo de biomolécula sensora. Como se muestra en las figuras 5C y D, un polímero (mostrado como una línea ondulada) puede conjugarse con un primer bioconjugado, por ejemplo, estreptavidina (SA), que tiene una fuerte afinidad por la biotina. En la figura 5C, una biomolécula sensora (por ejemplo, un anticuerpo que puede ser un anticuerpo primario o secundario), se conjuga tanto con un colorante como con un segundo bioconjugado (por ejemplo, una fracción de biotina). En la figura 5D se muestran realizaciones similares donde el segundo bioconjugado (por ejemplo, una fracción de biotina) y el cromóforo de señalización están ambos conjugados con un ácido nucleico. Después de un acontecimiento de biorreconocimiento entre el primer y el segundo bioconjugado (por ejemplo, entre SA y biotina), el polímero conjugado y el colorante se acercarán mucho y la excitación del polímero conjugado donante dará como resultado la transferencia de energía al colorante aceptor. La emisión del colorante indicará la presencia del primer bioconjugado (por ejemplo, el anticuerpo o el ácido nucleico). En comparación con la excitación directa del colorante, se observará una amplificación de la intensidad de la señal del colorante cuando se excita indirectamente a través de un proceso de transferencia de energía, por ejemplo, FRET.

Un método para utilizar la realización mostrada en las figuras 5C y D pueden incluir las etapas de proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana, proporcionar un polímero conjugado que comprende un primer bioconjugado unido covalentemente (por ejemplo, SA), proporcionar un complejo de biomolécula sensora que comprende una biomolécula sensora capaz de interactuar con la molécula diana, un cromóforo de señalización y un segundo bioconjugado unido covalentemente capaz de unirse con el primer bioconjugado, en donde, tras dicha excitación de unión, el polímero conjugado es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización. El método puede incluir además las etapas de poner en contacto la muestra con el complejo de biomolécula sensora en una solución en condiciones en las que la biomolécula sensora puede unirse a la biomolécula diana si está presente, poner en contacto la solución con el polímero conjugado, aplicar una fuente de luz a la muestra que pueda excitar el polímero conjugado y detectar si se emite luz desde el cromóforo de señalización.

Además, el polímero conjugado puede contener un sitio de enlace adicional adecuado para la conjugación o unión a más de una especie. En la figura 6 se ejemplifica la adición de un segundo sitio de enlace dentro del polímero. Dichos enlazadores A y B pueden ser iguales o diferentes para permitir la conjugación ortogonal de diferentes especies. Los enlazadores pueden estar en cualquier parte del polímero, incluidas las posiciones terminal e interna. Los analitos químicos de enlace para A-A' y B-B' (y opcionalmente C-C', D-D', etc.) puede incluir, pero sin limitación, maleimida/tiol; tiol/tiol; piridilditiol/tiol; yodoacetato de succinimidilo/tiol; N-succinimidiléster (éster NHS), éster de sulfodicolorfenol (éster de SDP) o éster de pentafluorofenilo (éster de PFP)/amina; bissuccinimidiléster/amina; imidoésteres/aminas; hidracina o amina/aldehído, dialdehído o benzaldehído; isocianato/hidroxilo o amina; hidratos de carbono-periodato/hidrazina o amina; analito químico de diazirina/aril azida; analito químico de piridilditiol/aril azida; alquino/azida; carboxi-carbodiimida/amina; amina/sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo)/tiol; y amina/BMPH (ácido N-[β-maleimidopropiónico]hidrazida•TFA)/tiol. Un enlazador trifuncional, tal como el Sulfo-SBED, sulfosuccinimidil[2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-etil-1,3'-ditiopropionato, disponible comercialmente, puede servir bien en el enlace de tres vías entre X, Y y polímero conjugado.

En la realización ilustrada en la figura 6, X o Y pueden ser, pero sin limitación, un colorante, proteína fluorescente, nanomaterial (por ejemplo, Quantum Dot), molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre un colorante y una molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre una proteína de fluorescencia y una molécula generadora de quimioluminiscencia, un conjugado entre nanomaterial (por ejemplo, Quantum Dot) y una molécula generadora de 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 peptídico, anticuerpo, antígeno, fago, bacteria o conjugado de dos cualesquiera de los elementos descritos anteriormente.

En general, en otro aspecto, la invención proporciona un complejo polimérico conjugado que incluye un polímero, una biomolécula sensora y un cromóforo de señalización para identificar una biomolécula diana. Como se muestra en la figura 6, en una realización, un polímero (línea ondulada) se puede bioconjugarse con un colorante X mediante las funcionalidades del enlazador A-A' y con una biomolécula Y mediante las funcionalidades del enlazador B-B'. Como se representa en la figura 7, en una realización, un polímero se puede bioconjugarse tanto con un colorante como con una biomolécula, por ejemplo una molécula de biorreconocimiento. Las biomoléculas útiles pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos (Figura 7A), derivados de avidina (Figura 7B), ligandos de afinidad, ácidos nucleicos (Figura 7C), proteínas, nanopartículas o sustratos para enzimas. Los beneficios de unir covalentemente un colorante cerca de un polímero se han descrito anteriormente. Mediante la fijación tanto de un colorante aceptor como de una molécula de biorreconocimiento a un polímero, los beneficios son dobles, ambos fijan las distancias entre donante y aceptor, de modo que se garantiza que un aceptor estará cerca de un polímero conjugado donante (y viceversa), y también aumenta la especificidad de la unión del polímero para indicar un acontecimiento de biorreconocimiento. Estos complejos covalentes se pueden formar a través de las químicas de monómero, polímeros y enlace descritas en el presente documento.

Durante el uso, las realizaciones mostradas en la figura 6 pueden ser un complejo polimérico conjugado para identificar una biomolécula diana en donde el complejo incluye un polímero conjugado, un cromóforo de señalización unido covalentemente al polímero conjugado y una biomolécula sensora unida covalentemente al polímero conjugado. El cromóforo de señalización del complejo es capaz de recibir energía del polímero conjugado tras la excitación del polímero conjugado y la biomolécula sensora es capaz de interactuar con la biomolécula diana. Se prevé que las biomoléculas puedan incluir, pero sin limitación, un anticuerpo, proteína, ligando de afinidad, péptido o ácido nucleico.

En una realización mostrada en la figura 7A, un polímero se conjuga tanto con un bioconjugado, por ejemplo, un anticuerpo (primario o secundario) como con un colorante. El enlace covalente entre el polímero conjugado donante y el colorante aceptor garantiza una estrecha proximidad. La excitación del polímero conjugado donante da como resultado la transferencia de energía, por ejemplo, FRET, al colorante aceptor. Cuando el bioconjugado es un anticuerpo, si el anticuerpo se une a su diana (por ejemplo, antígeno), esto estará indicado por la emisión del colorante tras la excitación del polímero donante. En una realización alternativa, como se muestra en la figura 7B, un polímero se puede conjugar tanto con SA como con un colorante. De nuevo, el enlace covalente entre el polímero conjugado donante y el colorante aceptor asegura una estrecha proximidad, y la excitación del polímero conjugado donante da como resultado la transferencia de energía al colorante aceptor. El complejo con SA se puede utilizar para marcar o detectar una biomolécula marcada con biotina, tal como un anticuerpo o ácido nucleico biotinilado. La excitación del

polímero seguida de la transferencia de energía al marcador colorante dará como resultado señales de detección muy mejoradas (es decir, mayor sensibilidad).

El ejemplo ejemplificado en la figura 7A es un polímero conjugado marcado con un aceptor de colorante y además conjugado con un anticuerpo. Esta configuración en tándem se puede utilizar de manera similar a las descritas para la estructura en la figura 3A, pero son útiles para generar una señal secundaria para detección, a menudo en formatos múltiples. Los complejos poliméricos conjugados de la figura 7 puede tener múltiples uniones de colorante que se pueden colocar internamente o en el extremo de la estructura polimérica (se muestra un colorante único solo con fines ilustrativos).

En otras realizaciones como se muestra en las figuras 3A y 7A, una biomolécula sensora, por ejemplo un anticuerpo primario (forma de Y), se conjuga covalentemente con el polímero conjugado (hexágonos rodeados por un círculo) o con el complejo en tándem polímero conjugado-colorante (hexágonos con una estrella colgante rodeada). Tras la excitación del polímero conjugado, la emisión del polímero conjugado (Figura 3A) o colorante (Figura 7A) indicará la presencia del biocomplejo y, por extensión, con un diseño de ensayo apropiado, la del de la diana reconocida por la molécula sensora que permite su uso como indicador, por ejemplo en un ensayo. En las figuras 29A y 29B se representan ejemplos comparables con enlace covalente del polímero conjugado a un anticuerpo secundario.

Como una realización alternativa, el polímero conjugado puede estar asociado indirectamente con la biomolécula sensora o la biomolécula asociada a la diana. En las figuras 8C y 8D se ilustra una sonda oligonucleotídica específica de secuencia (línea ondulada) conjugada covalentemente con una fracción de biotina (forma de gota). En este caso, el polímero conjugado (hexágonos rodeados por un círculo) o el complejo en tándem polímero conjugado-colorante (hexágonos con una estrella colgante rodeada) se une o conjuga covalentemente a una proteína que reconoce biotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o similar con elevada afinidad específica por el ligando biotina). En las figuras 8A y 8B se ilustran ejemplos comparables con un anticuerpo biotinilado que interactúa con un conjugado covalente del polímero conjugado (Figura 8A) y el complejo en tándem de polímero conjugado-colorante (Figura 8B) con la proteína que reconoce la biotina. La asociación indirecta de la biomolécula asociada a la diana con el polímero conjugado no se limita a interacciones mediadas por biotina. En las figuras 8E y F se representan oligonucleótidos de secuencia específica (línea ondulada) que se han marcado covalentemente con una fracción de digoxigenina (estrella de 7 puntas). A su vez, la fracción de digoxigenina es reconocida por un anticuerpo primario unido covalentemente al polímero conjugado (Figura 8E) y al complejo en tándem de polímero conjugado-colorante (Figura 8F). Aunque no se muestra gráficamente, están previstas realizaciones adicionales que emplean detección indirecta de digoxigenina mediante anticuerpos biotinilados y proteínas que reconocen biotina unidas covalentemente a polímeros conjugados (o complejos en tándem de polímero conjugado-colorante) o anticuerpos primarios no marcados que reconocen digoxigenina y anticuerpos secundarios adecuados unidos covalentemente al polímero conjugado (o complejos en tándem de polímero conjugado-colorante).

Varias realizaciones adicionales también se basan en la transferencia de energía (por ejemplo, pero sin limitación, FRET) entre el polímero conjugado y un colorante aceptor. Dado el potencial para el análisis de multiplexación, se prevé que el polímero conjugado pueda unirse a varios colorantes o cromóforos de señalización, que incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, rojo Texas, rojo california, iFluor594, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6G, carboxirrodol, carboxirrodamina 110, Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy7®, Cy-cromo, Dylight 350, Dylight 405, Dylight 488, Dylight 549, Dylight 594, Dylight 633, Dylight 649, Dylight 680, Dylight 750, Dylight 800, ficoeritrina, PerCP (proteína peridina clorofila-a), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dime11oxifluoresceína), NED, ROX (5-(y-6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Amarillo Lucifer, Marina Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 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-metilcumarin-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. Estas realizaciones incluyen modificaciones de los ejemplos anteriores donde el colorante aceptor sirve como indicador del ensayo (como se ejemplifica en las figuras 3D, 4D, 7, 8B, 8D, 8E, 29B, en donde la estrella de diez puntas rodeada representa el colorante).

En determinadas realizaciones, los conjugados de polímeros conjugados proporcionados en las figuras 2 a 10, 29 y 30 están destinados, pero sin limitación, a su uso en citometría de flujo, clasificación celular, diagnóstico molecular, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), inmunohistoquímica (IHC), reacción en cadena de la polimerasa, microscopía fluorescente, confocal, de 2 fotones, etc.), transferencia (por ejemplo, northern, southern o western), matrices de perlas citómicas (formatos Luminex, etc.), ensayo inmunológico fluorescente (FIA o ELISA), secuenciación de ácidos nucleicos y micromatrices.

También se prevén realizaciones donde se utilizan polímeros conjugados para mejorar la detección y cuantificación de ácidos nucleicos mediante sondas fluorescentes específicas de secuencia combinadas con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa, amplificación mediada por transcripción, amplificación de círculo rodante, amplificación de la polimerasa recombinasa, amplificación dependiente de helicasa y reacción en cadena de la polimerasa lineal después de la exponencial.

En la figura 32 se representan modificaciones de la técnica de detección HybProbe. En la figura 32A, el colorante utilizado convencionalmente como donante de transferencia de energía se reemplaza por el polímero conjugado (cadena de hexágonos) que está unido covalentemente a la sonda donante (estructura helicoidal ondulada representada como un dúplex helicoidal derecho debido a la asociación con el ácido nucleico diana representado como una línea ondulada helicoidal más larga). Tras la hibridación específica de secuencia, las sondas donante y aceptora (representadas de manera similar a la sonda donante, pero en el lado izquierdo del ácido nucleico diana) se yuxtaponen espacialmente en la cadena de ácido nucleico diana de interés en una proximidad suficientemente cercana para permitir que tenga lugar la transferencia de energía entre los fluorescentes. La energía de excitación se transduce a través del polímero conjugado y el colorante (estrella de diez puntas rodeada por un círculo) la emite como una señal legible para permitir la cuantificación, detección y/o caracterización del ácido nucleico. La presencia de una plantilla aumentada permite un mayor número de acontecimientos de hibridación conjunta de la sonda y, por lo tanto, se correlaciona con una mayor señal específica del colorante aceptor. En combinación con la técnica de la curva de fusión comúnmente empleada en los experimentos de HybProbe, se prevé que la información específica de la secuencia correspondiente a las variaciones de la secuencia se pueda recopilar en experimentos diseñados de manera adecuada. En la figura 32B se representa una modificación de "señal de apagado" del enfoque HybProbe donde el polímero conjugado se desactiva mediante una sonda aceptora que consiste en un desactivador de fluorescencia de molécula pequeña (por ejemplo, pero sin limitación, Black Hole Quenchers™, Iowa Black® o Dabsyl).

En otra realización, el polímero conjugado y los complejos en tándem de polímero conjugado-colorante similares a los descritos en las figuras 4C y 4D se utilizan en la detección, cuantificación y/o caracterización de dianas de ácidos nucleicos. Las secuencias de sondas de ácido nucleico marcadas con una molécula desactivadora (círculo negro, por ejemplo, pero sin limitación, Black Hole Quenchers™, Iowa Black® o Dabsyl) también están conjugadas con un polímero conjugado (Figuras 4C y 31A) y un complejo en tándem de polímero conjugado-colorante (Figuras 4D y 31B). En las figuras 4C y D, el reconocimiento de la secuencia diana conduce a una hibridación y separación del desactivador del polímero conjugado o del complejo en tándem de polímero conjugado-colorante y tras la excitación del polímero produce un aumento en la señal fluorescente. En las figuras 31A y 31B, el conjugado de sonda de ácido nucleico se hibridará con una secuencia diana complementaria y mediante tratamiento con enzimas específicas la secuencia de sonda se escinde o hidroliza liberando el polímero conjugado o el complejo en tándem de polímero conjugado-colorante conjugado del desactivador y tras la excitación del polímero se produce un aumento de la señal fluorescente. El ejemplo más común de los métodos descritos en la figura 31 es el uso de enzimas ADN polimerasas que contienen actividad nucleasa (por ejemplo, ensayos de PCR TaqMan).

En la figura 9 se muestran ejemplos de polímero conjugado (hexágonos) conjugados con anticuerpos secundarios (Figura 9A) y anticuerpos primarios (Figura 9B) (anticuerpos mostrados como estructuras en forma de Y). En un ensayo, un anticuerpo primario no marcado se puede unir a un antígeno, por ejemplo, una proteína diana (mostrada como un triángulo negro). La adición del anticuerpo secundario, que está conjugado con un polímero, se puede unir específicamente al anticuerpo primario. Después de lavar para eliminar el anticuerpo secundario no unido y tras la aplicación de luz de longitud de onda de excitación adecuada, la observación de la emisión del polímero es indicativa de unión específica (Figura 9A). En otras realizaciones del ensayo, un anticuerpo primario marcado con polímero se puede unir directamente a una proteína diana, mostrada como un triángulo negro, y después del lavado para eliminar el anticuerpo primario no unido y tras la aplicación de luz de longitud de onda de excitación adecuada, la observación de la emisión del polímero es indicativa de unión específica (Figura 9B). Opcionalmente, el polímero, ya sea conjugado con el anticuerpo primario o secundario, puede conjugarse además con un colorante. En tal caso, la excitación óptica del polímero conjugado puede dar como resultado una transferencia de energía al colorante y una emisión del colorante amplificada, en comparación con los resultados de excitación directa del colorante. La observación de la emisión del colorante es indicativa de unión específica.

En la figura 10 se muestra un ejemplo de un complejo de tipo sándwich de una realización de la invención. En el ensayo mostrado en la figura 10A, el complejo polimérico conjugado está compuesto por un polímero (mostrado como hexágonos) que está bioconjugado con una biomolécula, por ejemplo, estreptavidina (forma de X). Después de que un anticuerpo primario sin marcar se une a la diana (por ejemplo, proteína), mostrada como un triángulo negro, un anticuerpo secundario marcado con biotina se une específicamente al anticuerpo primario. En una etapa separada, la adición del complejo polimérico conjugado dará como resultado una unión específica entre la biotina y la estreptavidina. La excitación del polímero conjugado dará como resultado la emisión del polímero, lo que indica la presencia de la proteína diana. Además, en otra realización, se puede utilizar un anticuerpo primario marcado con biotina para sondear la proteína diana directamente (Figura 10B). Después de que este acontecimiento de unión tenga lugar, la adición de un complejo polimérico con estreptavidina dará como resultado una unión específica entre la biotina y la estreptavidina, y la excitación del polímero conjugado dará como resultado la emisión del polímero, lo que indica la presencia de la proteína diana. Opcionalmente, el polímero puede conjugarse además con un colorante. En tal caso, la excitación óptica del polímero dará como resultado una emisión del colorante amplificada, en comparación con la excitación directa del colorante. Las señales que surgen de la emisión del colorante indicarán la presencia de la proteína diana.

En la figura 30 se representan realizaciones ilustrativas sobre el uso de polímeros conjugados en inmunoensayo fluorescente (FIA). En los dibujos A a C de la figura 30, el antígeno analizado se inmoviliza en una superficie que

puede incluir, pero sin limitación, un pocillo de placa de microvaloración, partícula de perla, portaobjetos de vidrio, portaobjetos de plástico, tira de flujo lateral, dispositivo de flujo laminar, dispositivo microfluídico, virus, fago, superficie celular o tisular. A continuación, las moléculas de analito se detectan mediante el uso de conjugados de detección marcados o biomoléculas sensoras. En la figura 30A, para la detección se utiliza un polímero conjugado unido covalentemente a un anticuerpo de detección. En la figura 30B, para la detección se utiliza una proteína de unión a biotina (por ejemplo, pero sin limitación, avidina, estreptavidina u otros derivados específicos de biotina de afinidad elevada) unida covalentemente al polímero conjugado y que interactúa con un anticuerpo de detección biotinilado. En la figura 30C, para la detección se utiliza un anticuerpo secundario unido covalentemente al polímero conjugado y que interactúa con un anticuerpo de detección. En la figura 5B, también se realiza un ejemplo homogéneo basado en solución donde dos anticuerpos separados se unen cada uno al antígeno de interés. Un anticuerpo está unido covalentemente al polímero conjugado, el otro a un colorante. Cuando se unen al antígeno, los respectivos fluoróforos se acercan espacialmente lo suficiente para que se produzca la transferencia de energía. En ensayos basados en los diseños de la figura 30 y la figura 5B, se explora la muestra con luz correspondiente a la excitación del polímero conjugado y se indica la señal en la longitud de onda de emisión del colorante. En los ejemplos incorporados en las figuras 30 A a C se divulga además el uso de un complejo en tándem de polímero-colorante. En dichos casos, la excitación óptica del polímero dará como resultado una emisión del colorante amplificada, en comparación con la excitación directa del colorante. Las señales que surgen de la emisión del colorante indicarán la presencia de la diana.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la multiplexación de la transferencia de energía del donante a múltiples aceptores. Mediante el uso de un polímero conjugado como donante en un sistema de transferencia de energía, los beneficios también incluyen la capacidad de multiplexar. Un único donante puede transferir energía a varios colorantes; por lo tanto con una única fuente de excitación, se puede controlar la intensidad de múltiples colorantes. Esto es útil para aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, imágenes celulares (es decir, inmunohistoquímica), citometría de flujo y clasificación de células, donde los diferentes tipos de células se pueden controlar mediante acontecimientos de reconocimiento de proteínas y anticuerpos.

En una realización, se pueden incubar dos anticuerpos marcados con colorante con un material biológico, por ejemplo, una estirpe celular cultivada, una sección de tejido o una muestra de sangre. Los anticuerpos son capaces de reconocer células con una proteína diana expresada en su superficie y unirse específicamente sólo a esas proteínas. Mediante el marcaje de los dos anticuerpos con colorantes diferentes, es posible controlar la expresión de dos proteínas diferentes o diferentes tipos de células a la vez. Normalmente, esto necesitará dos exploraciones, excitaciones o toma de imágenes, una vez con la longitud de onda de excitación correcta. Como etapa final previa al análisis, estas dos imágenes o conjuntos de datos tendrían que superponerse o combinarse. Mediante el uso de anticuerpos conjugados tanto con un colorante como con un polímero conjugado, se puede utilizar una longitud de onda de excitación para que el polímero conjugado excite ambos colorantes, y una sola imagen o exploración incluirá conjuntos de datos de cada uno de los dos anticuerpos. Esto se puede hacer con cualquier número de combinaciones de anticuerpos siempre que haya suficiente capacidad para resolver las señales resultantes.

Se prevé que la invención descrita en el presente documento se pueda utilizar para aumentar la sensibilidad de cualquiera de una serie de pruebas disponibles comercialmente que incluyen, pero sin limitación, la prueba rápida de anticuerpos contra el VIH-1/2 OraQuick, fabricada por OraSure Technologies, Inc. (Bethlehem, PA), que es una prueba de diagnóstico del VIH aprobada por la FDN para muestras de líquidos orales. Esta prueba puede proporcionar resultados de detección con una precisión superior al 99 por ciento en tan solo 20 minutos.

#### **Polímeros conjugados**

Los sistemas de polímeros conjugados que captan la luz pueden transferir energía de manera eficiente eficaz a especies luminiscentes cercanas. Los mecanismos para la transferencia de energía incluyen, por ejemplo, transferencia de energía resonante (transferencia de energía de resonancia de Forster (o fluorescencia), FRET), intercambio de carga cuántica (transferencia de energía Dexter) y similares. Normalmente, sin embargo, estos mecanismos de transferencia de energía son de alcance relativamente corto y se necesita una estrecha proximidad del sistema de polímero conjugado que capta la luz al cromóforo de señalización para una transferencia de energía eficaz. La amplificación de la emisión puede ocurrir cuando el número de cromóforos individuales en el sistema polimérico conjugado captador de luz es grande; la emisión de un fluoróforo puede ser más intensa cuando la luz incidente (la "luz de bombeo") tiene una longitud de onda que es absorbida por el sistema de polímero conjugado que recoge la luz y se transfiere al fluoróforo que cuando el fluoróforo es excitado directamente por la luz de bombeo.

Los polímeros conjugados utilizados en la presente invención pueden ser de carga neutra, catiónicos o aniónicos. En algunas realizaciones, los polímeros conjugados son polímeros conjugados policatiónicos. En otras realizaciones, los polímeros conjugados son polímeros conjugados polianiónicos. En realizaciones adicionales, los polímeros conjugados pueden incluir grupos catiónicos, aniónicos y/o neutros en varias subunidades repetidas. En aún otras realizaciones, los polímeros conjugados son polímeros conjugados neutros. En algunos casos, los polímeros conjugados contienen grupos tales como oligómeros de etilenglicol, polímeros de etilenglicol, sales alcoxi de  $\omega$ -amonio y/o sales alcoxi de  $\omega$ -sulfonato que confieren solubilidad en soluciones acuosas. En algunos casos, los polímeros conjugados neutros con cadenas laterales no iónicas son solubles en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato y en determinados casos la solubilidad es superior a 50 mg/ml. En algunas realizaciones, los

polímeros conjugados contienen un sitio de enlace terminal (por ejemplo, unidad de protección), un sitio de enlace interno o ambos.

En algunas realizaciones, un polímero conjugado es aquel que comprende "unidades repetidas de banda prohibida baja" de un tipo y en una cantidad que contribuyen a una absorción del polímero en el intervalo de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 1000 nm. Las unidades de repetición de banda prohibida baja pueden presentar o no dicha absorción antes de la polimerización, pero introduce esa absorción cuando se incorpora al polímero conjugado. Dichas características de absorción permiten que el polímero se excite a longitudes de onda que producen menos fluorescencia de fondo en una variedad de entornos, incluido en el análisis de muestras biológicas y la obtención de imágenes y/o la detección de moléculas. Cambiar la absorbancia del polímero conjugado a una energía más baja y una longitud de onda más larga permite métodos más sensibles y sólidos. De manera adicional, muchos instrumentos disponibles comercialmente incorporan componentes de imágenes que funcionan en dichas longitudes de onda, al menos en parte, para evitar estos problemas. Por ejemplo, se encuentran disponibles termocicladores que realizan detección en tiempo real durante reacciones de amplificación y lectores de micromatrices que operan en esta región. Proporcionar polímeros que absorban en esta región permite la adaptación de métodos de detección a dichos formatos y también permite realizar métodos completamente nuevos.

La incorporación de unidades repetidas que disminuyen la banda prohibida puede producir polímeros conjugados con dichas características. Las especies opcionalmente sustituidas ilustrativas que dan como resultado polímeros que absorben luz en dichas longitudes de onda incluyen 2,1,3-benzotiadiazol, benzoxidazol, benzoselenadiazol, benzoteturodiazol, naftoselenadiazol, 4,7-di(tien-2-il)-2,1,3-benzotiadiazol, colorantes de escuaraina, quinoxalinas, perileno, perileno diimidaz, dicetopirrololpirrol, colorantes comerciales de banda prohibida baja de tienopirazina, olefinas y olefinas sustituidas con ciano e isómeros de los mismos. Se pueden encontrar detalles adicionales relacionados con la composición, estructura, propiedades y síntesis de polímeros conjugados adecuados en la solicitud de patente de EE. UU. número de serie 11/329.495, presentada el 10 de enero de 2006, publicada ahora como US 2006-0183140 A1.

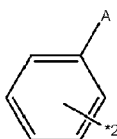
La invención proporciona polímeros conjugados como se define en las reivindicaciones.

Los grupos laterales no iónicos capaces de impartir solubilidad en agua, como se utilizan en el presente documento, se refieren a grupos laterales que no están cargados y permiten que el polímero resultante sea soluble en agua o en soluciones acuosas sin partículas visibles. En algunas realizaciones, cada R es independientemente un grupo lateral no iónico capaz de impartir solubilidad en agua superior a 15 mg/ml, superior a 20 mg/ml, superior a 25 mg/ml, superior a 30 mg/ml, superior a 35 mg/ml, superior a 40 mg/ml, superior a 45 mg/ml, superior a 50 mg/ml, superior a 60 mg/ml, superior a 70 mg/ml, superior a 80 mg/ml, superior a 90 mg/ml o superior a 100 mg/ml.

En algunas realizaciones, los polímeros conjugados descritos en el presente documento comprenden un peso molecular promedio en número mínimo superior a 5.000 g/mol, superior a 10.000 g/mol, superior a 15.000 g/mol, superior a 20.000 g/mol, superior a 25.000 g/mol, superior a 30.000 g/mol, superior a 40.000 g/mol, superior a 50.000 g/mol, superior a 60.000 g/mol, superior a 70.000 g/mol, superior a 80.000 g/mol, superior a 90.000 g/mol o superior a 100.000 g/mol.

En algunas realizaciones, los polímeros conjugados descritos en el presente documento no contienen los enlazadores opcionales, L<sub>1</sub> y/o L<sub>2</sub>. En otras realizaciones, los polímeros conjugados contienen al menos aproximadamente un 0,01 % en moles, 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 aproximadamente un 25 % en moles de los enlazadores opcionales, L<sub>1</sub> y/o L<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, los polímeros conjugados contienen hasta un 50 % en moles en total de los enlazadores opcionales, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, y pueden contener aproximadamente un 40 % en moles o menos, aproximadamente un 30 % en moles o menos, aproximadamente un 25 % en moles o menos, aproximadamente un 20 % en moles o menos, aproximadamente un 15 % en moles o menos, aproximadamente un 10 % en moles o menos, o aproximadamente un 5 % en moles o menos. Los enlazadores pueden distribuirse de manera uniforme o aleatoria a lo largo de la cadena principal del polímero.

En algunas realizaciones, los enlazadores opcionales L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> tienen la estructura representado por:



\* = sitio de unión covalente a la cadena principal insaturada  
en donde A es un sitio para la conjugación, extensión de cadena o reticulación y es  $[-O-CH_2-CH_2-]_n-W$  o alcoxi (C<sub>1</sub>-

$C_{12}$ )-X;

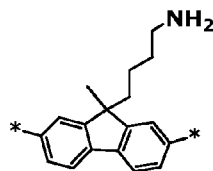
W es -OH o -COOH;

X es -NH<sub>2</sub>, -NHCOOH, -NHCOOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -NHCocicloalquil(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>)alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-N-maleimida; o -NHCO[CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O]<sub>u</sub>NH<sub>2</sub>;

5 t es un número entero de 1 a 20; y

u es un número entero de 1 a 8.

En determinadas realizaciones, los enlazadores opcionales L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> son

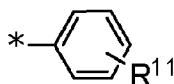


10

En otras realizaciones, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son iguales. En realizaciones adicionales, G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> son diferentes. G<sup>1</sup> y G<sup>2</sup> pueden ser unidades activadas que permitan una mayor conjugación, reticulación o extensión de la cadena polimérica, o pueden ser unidades de terminación no activadas.

15

En algunas realizaciones, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de estructuras representadas por:



20

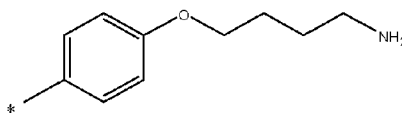
\* = sitio de unión covalente a la cadena principal

en donde R<sup>11</sup> es uno cualquiera o una combinación de un enlace, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> donde cada x es independientemente un número entero de 0 a 20, p es independientemente un número entero de 0 a 50, arilo, grupos (hetero)arilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, fenoxi, amido, amino, carbamato, carboxilato, carbonatos, sulfuro, disulfuro o imido terminados con un grupo funcional seleccionado de amina, carbamato, carboxilato, ácido carboxílico, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos para conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula, siempre que al menos uno de G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub> comprenda un sitio de conjugación funcional para dicha conjugación.

25

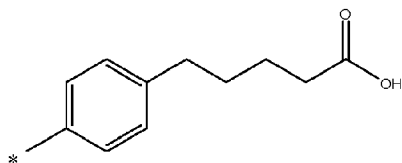
30

En realizaciones adicionales, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> es



o

35

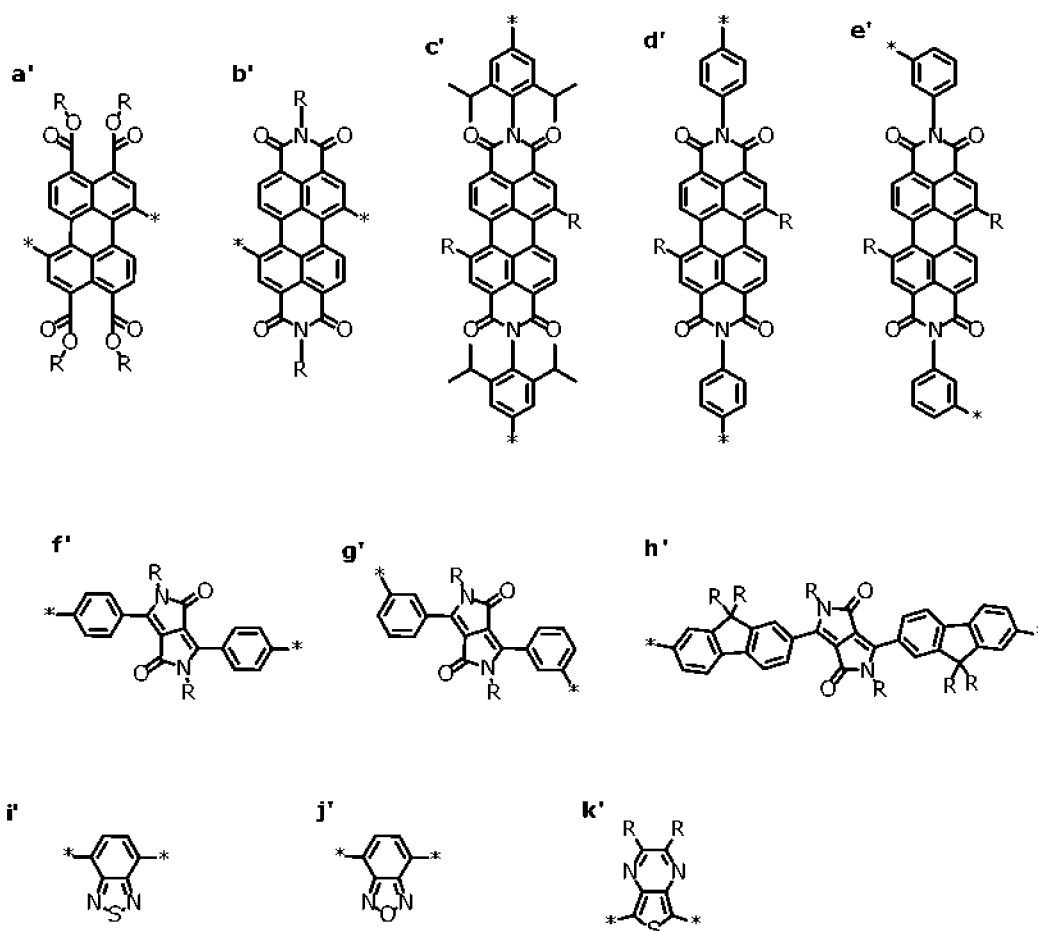


En algunas realizaciones, los enlazadores opcionales, L<sub>1</sub> y/o L<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y/o G<sub>2</sub> se pueden conjugar además con un colorante orgánico, una biomolécula o un sustrato. El enlace covalente se puede introducir mediante cualquier método conocido y puede incluir, pero sin limitación, analitos químicos que impliquen maleimida/tiol; tiol/tiol; piridilditiol/tiol; yodoacetato de succinimidilo/tiol; N-succinimidiléster (éster NHS), éster de sulfodiclorofenol (éster de SDP) o éster de pentafluorofenilo (éster de PFP)/amina; bissuccinimidiléster/amina; imidoésteres/aminas; hidracina o amina/aldehído, dialdehído o benzaldehído; isocianato/hidroxilo o amina; hidratos de carbono-periodato/hidrazina o amina; analito químico de diazirina/aril azida; analito químico de piridilditiol/aril azida; alquino/azida; carboxi-carbodiimida/amina; amina/sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo)/tiol; y amina/BMPH (ácido N-[β-maleimidopropiónico]hidrazida•TFA)/tiol.

40

45

MU se selecciona del grupo que consiste en a' a k' que tienen la estructura:

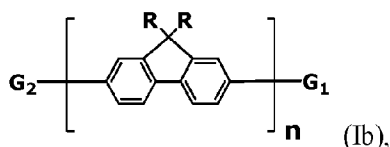


\*= sitio de unión covalente a la cadena principal insaturada

- 5 en donde R es un grupo lateral no iónico capaz de impartir una solubilidad en agua superior a 10 mg/ml. Los grupos laterales no iónicos incluyen los descritos previamente para polímeros de fórmula (I).

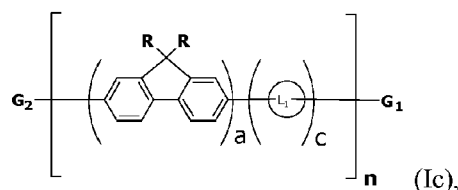
10 Como se utiliza en el presente documento, en algunas realizaciones, una cadena colgante es una cualquiera o una combinación de un enlace, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> donde cada x es independientemente un número entero de 0 a 20, p es independientemente un número entero de 0 a 50, grupos arilo, (hetero)arilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, fenoxi, amido, amino, carbamato, carboxilato, carbonatos, sulfuro, disulfuro o imido que conectan un polímero con un grupo funcional para su conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula.

- 15 En un aspecto adicional, los polímeros conjugados tienen la estructura de fórmula (Ib):



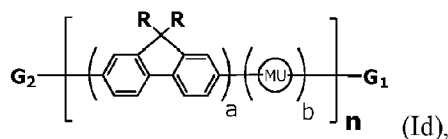
20 en donde R es (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>OCH<sub>3</sub> donde cada x' es independientemente un número entero de 0 a 20, y' es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde al menos uno de G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub> comprende un sitio de conjugación funcional.

- 25 En un aspecto adicional, los polímeros conjugados tienen la estructura de fórmula (Ic):



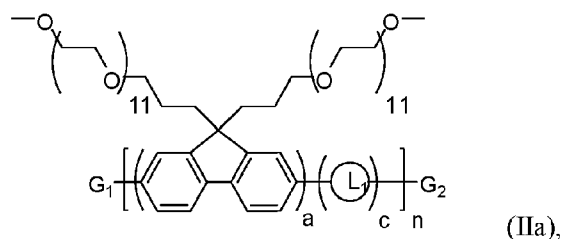
en donde R es  $(\text{CH}_2)_{x'}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{y'}\text{OCH}_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde  $L_1$  comprende un sitio de conjugación funcional.

En un aspecto adicional, los polímeros conjugados tienen la estructura de fórmula (Id):



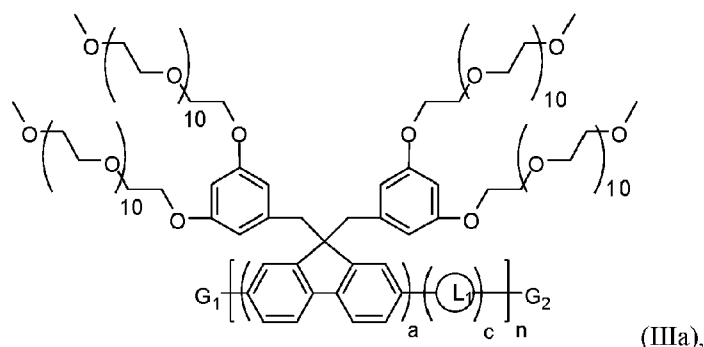
en donde R es  $(\text{CH}_2)_{x'}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{y'}\text{OCH}_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, en donde al menos uno de  $G_1$  o  $G_2$  comprende un sitio de conjugación funcional.

En algunas realizaciones, los polímeros conjugados tienen la estructura de fórmula (IIa):



en donde R es  $(\text{CH}_2)_{x'}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{y'}\text{OCH}_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato, y en donde  $L_1$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $a$ ,  $c$  y  $n$  son como se describen anteriormente para la fórmula (I).

En algunas realizaciones, los polímeros conjugados tienen la estructura de fórmula (IIIa):



en donde R es  $(\text{CH}_2)_{x'}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{y'}\text{OCH}_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de manera que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas en donde  $L_1$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $a$ ,  $c$  y  $n$  son como se describen previamente para la fórmula (I).

En los siguientes ejemplos se describen realizaciones adicionales de polímeros conjugados.

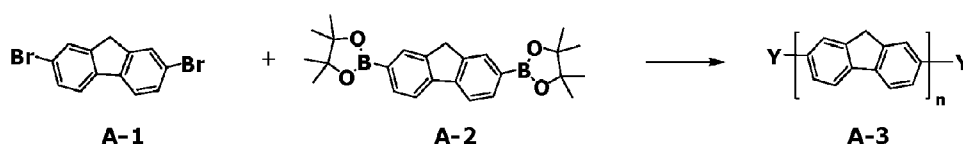
#### Preparación de polímeros conjugados

La síntesis de polímeros conjugados descritos en el presente documento se puede lograr utilizando medios descritos en la bibliografía química, utilizando los métodos que se describen en la presente memoria o una combinación de los mismos.

Los polímeros conjugados descritos en el presente documento se pueden sintetizar mediante técnicas sintéticas convencionales conocidas por los expertos en la materia o mediante métodos conocidos en la materia en combinación con los métodos descritos en el presente documento. Además, los disolventes, las temperaturas y otras condiciones de reacción presentadas en el presente documento pueden variar de acuerdo con la práctica y el conocimiento de los expertos en la materia.

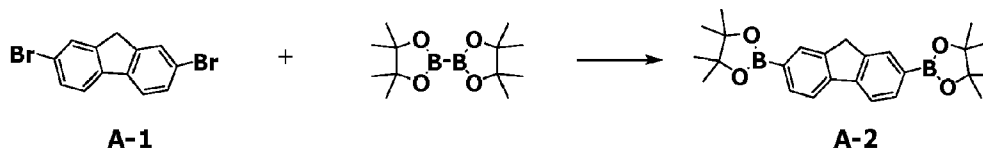
El material de partida utilizado para la síntesis de los polímeros conjugados de fórmula (1) y los polímeros que tienen las estructuras descritas en la sección anterior como se describe en el presente documento se pueden obtener de fuentes comerciales, tales como Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo), o los materiales de partida se pueden sintetizar. Los polímeros descritos en el presente documento y otros polímeros relacionados que tienen diferentes sustituyentes se pueden sintetizar mediante técnicas y materiales conocidos por los expertos en la materia, tal y como se describe, por ejemplo, en March, *Advanced Organic Chemistry* 4.<sup>a</sup> ed., (Wiley 1992); Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* 4.<sup>a</sup> ed., vol. A y B (Plenum 2000, 2001), y Green y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* 3.<sup>a</sup> ed., (Wiley 1999). Los métodos generales para la preparación de polímeros divulgados en el presente documento pueden proceder de reacciones conocidas en el campo, y las reacciones pueden modificarse mediante el uso de reactivos y condiciones adecuados, como reconocería el experto en la materia, para la introducción de las diversas fracciones que se encuentran en las fórmulas que se proporcionan en el presente documento. Como guía, pueden utilizarse los siguientes métodos de síntesis.

En general, la polimerización de estructuras poliméricas de fluoreno se puede lograr mediante técnicas de polimerización conocidas por los expertos en la materia o mediante métodos conocidos en la materia en combinación con los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la polimerización se puede lograr mediante el acoplamiento de Suzuki con un monómero de fluoreno-dihaluro disponible comercialmente, por ejemplo, 2,7-dibromofluoreno y su ácido diborónico o su derivado éster:

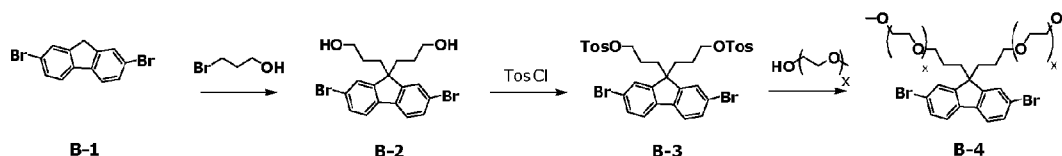


Las estructuras A-1 y A-2 se catalizan mediante un catalizador metálico para formar el polímero A-3 ilustrativo con puntos de terminación, marcados como Y. Cada Y es independientemente -H, -Br, -B(OH)<sub>2</sub> o éster borónico, por ejemplo, 4,4,5,5,-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano.

La síntesis de derivados de éster diborónico a partir de un monómero de fluoreno-dihaluro también se puede lograr mediante el acoplamiento de Suzuki con bis(pinacolato)diboro:



Se pueden unir sustituyentes, tales como oligómeros de etilenglicol o polímeros de etilenglicol, a monómeros antes de la polimerización o al propio polímero después de la polimerización. Un esquema ilustrativo de síntesis de monómeros de fluoreno sustituidos con grupos mPEGilados es el siguiente:



2,7-dibromofluoreno (B-1) y 3-bromopropanol en presencia de una base fuerte, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o similar, y un catalizador de transferencia de fase, por ejemplo, bromuro de tetrabutilamonio, se calientan y se hacen reaccionar hasta su finalización para formar 2,7-dibromo-9,9-di(3'-hidroxipropil)fluoreno (B-2). Los grupos -OH de B-2 se tosilan con cloruro de tosilo en presencia de piridina y se dejan reaccionar hasta completarse para formar 2,7-dibromo-9,9-di(3'-metilbencenosulfonatopropil)fluoreno (B-3). A continuación, B-3 se hace reaccionar con un alcohol mPEG(x) en presencia de *tert*-butóxido de potasio para formar B-4 con cadenas de mPEG

unidas. Los alcoholes mPEG pueden tener de 1 a 50 cadenas de mPEG. Los tamaños típicos incluyen, pero sin limitación, mPEG5, mPEG8, mPEG11, mPEG24. En un esquema alternativo, los alcoholes mPEG se pueden tosilar primero mediante cloruro de tosilo y después hacer reaccionar a B-2 para formar B-4.

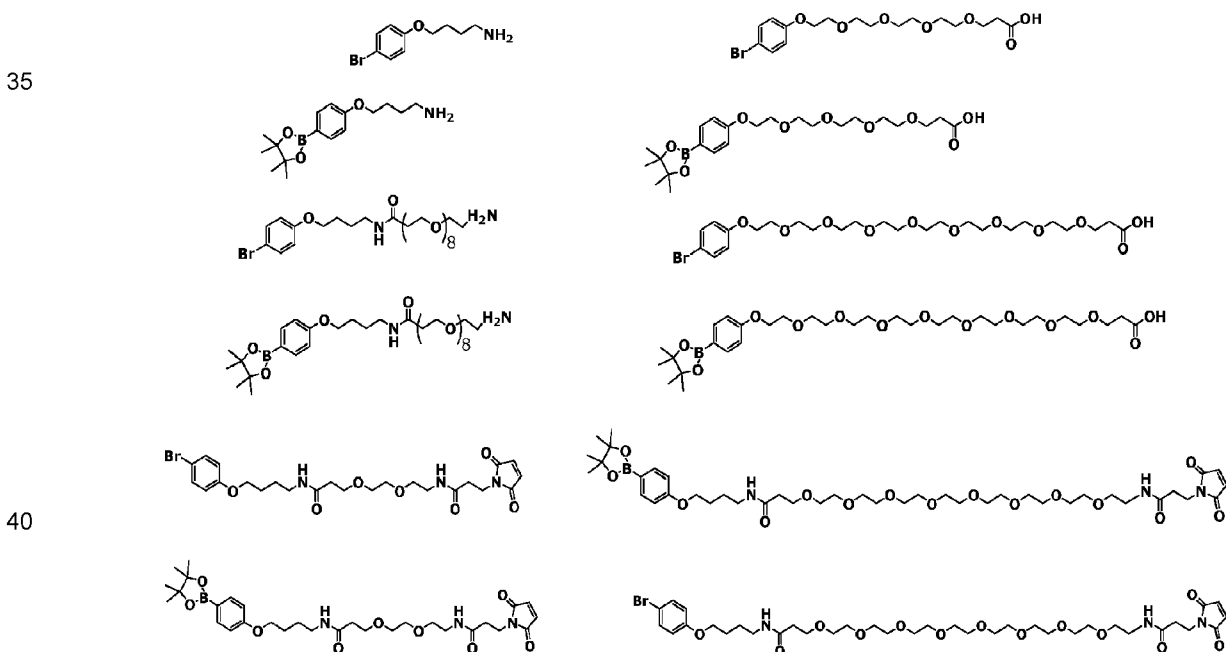
- 5 Los monómeros sustituidos, tales como la estructura B-4 ilustrativa, se pueden derivar aún más a ésteres diborónicos en los esquemas divulgados en el presente documento y posteriormente utilizarse para polimerización, tal como mediante acoplamiento de Suzuki. Los fluorenos poliméricos también se pueden obtener mediante el uso de otros esquemas de reacción que implican catálisis organometálica. Por ejemplo, la reacción de Yamamoto utiliza un catalizador a base de níquel (0) para el homoacoplamiento de monómeros de haluro de arilo como la estructura B-4
- 10 ilustrativa. De manera adicional, los polímeros conjugados se pueden sintetizar mediante reacciones de acoplamiento de Stille, Heck y Sonogashira. Véanse, por ejemplo, Yamamoto *et al.*, *Macromolecules* 25: 1214-1223, 1992; Kreyenschmidt *et al.*, *Macromolecules* 28: 4577-4582, 1995; y Pei *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118: 7416-7417, 1996 con respecto a los esquemas de reacción de Yamamoto. Véanse, además, Leclerc, *Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 39: 2867-2873, 2001 para esquemas de reacción de Stille; Mikroyannidis *et al.*, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 45: 4661-4670, 2007 para esquemas de reacción de Heck; y Sonogashira *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 16: 4467-4470, 1975 y
- 15 Lee *et al.*, *Org. Lett.* 3: 2005-2007, 2001 para los esquemas de reacción de Sonogashira.

Los enlazadores y las unidades de protección se pueden conjugar con una cadena principal de polímero de fluoreno mediante mecanismos similares a los descritos anteriormente. Por ejemplo, se pueden utilizar ésteres de bromo y borónicos de unidades de protección para unir uno o ambos extremos de un polímero. La utilización de ésteres de bromo y borónicos de unidades de protección añadirá ambos extremos del polímero. Utilizando sólo una forma, ya sea un éster de bromo o borónico de una unidad de protección, añadirá solo aquellos extremos terminados con su complemento respectivo y para polimerizaciones simétricas A-A + B-B se puede utilizar para modificar estadísticamente solo un extremo de un polímero. Para polímeros asimétricos, este enfoque se utiliza para garantizar

20 químicamente que los polímeros solo se modifican en un extremo de cadena única. En la figura 11 se representa la adición de un polímero de fluoreno ilustrativo con extremos Y con uno o más grupos fenilo con bromobenceno, ácido fenilborónico o ambos usando el acoplamiento de Suzuki.

Las unidades de protección también se pueden añadir de manera asimétrica haciendo reaccionar primero una unidad de protección de bromo con un polímero con extremos en Y y posteriormente haciendo reaccionar el polímero con una

30 unidad de protección de éster borónico. Las unidades de protección de éster de bromo y borónico ilustrativas incluyen, pero sin limitación, las siguientes estructuras:



Se pueden encontrar unidades de protección adicionales en las estructuras 1 a 31 descritas en el presente documento o en los siguientes ejemplos y métodos para su unión.

45

La incorporación de enlazadores opcionales en cadenas principales de polímeros conjugados se describe con más detalle en la solicitud de EE. UU. n.º de serie 11/868.870, presentada el 8 de octubre de 2007 y publicada como solicitud de EE. UU. n.º 2008/0293164.

50

Se puede lograr una incorporación de enlazador opcional deseada mediante la variación de la relación molar de enlazador opcional a monómero bifuncional. Por ejemplo, se puede incorporar un enlazador opcional mediante la sustitución de un porcentaje de uno de los monómeros bifuncionales por un enlazador opcional bifuncional similar que comprende el sitio de conjugación de interés. El número y tipo de sitio de enlace incluido en el polímero está controlado por la relación de alimentación de los monómeros al enlazador opcional en la reacción de polimerización. Al variar la relación de alimentación, los polímeros conjugados pueden contener al menos aproximadamente un 0,01 % en moles del enlazador, L, y pueden 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. Los polímeros conjugados pueden contener hasta el 100 % en moles del enlazador, L, y pueden contener 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. Los enlazadores pueden distribuirse de manera uniforme o aleatoria a lo largo de la cadena principal del polímero. En realizaciones adicionales, un enlazador opcional puede permitir además la unión covalente del polímero resultante a biomoléculas, indicadores secundarios u otros componentes del ensayo.

En realizaciones alternativas, los métodos descritos en el presente documento para incorporar enlazadores opcionales se pueden utilizar en combinación con métodos para introducir unidades de protección con sitios de enlace para producir polímeros con sitios de enlace internos y terminales para la conjugación. Una aplicación no limitante de un polímero con enlazadores opcionales y unidades de protección terminal con sitios de enlace para la conjugación son conjugados en tándem de polímero-colorante-biomolécula donde el polímero se utiliza como donante en la transferencia de energía, tal como en FRET, a un aceptor colorante secundario, cambiando así la longitud de onda de emisión a la del colorante correspondiente.

El experto en la materia puede apreciar más diversas síntesis y métodos de polimerización y realizaciones de la presente divulgación tras la revisión de los siguientes ejemplos ilustrativos y no limitantes.

### **Interacciones antígeno-anticuerpo**

Las interacciones entre antígenos y anticuerpos son las mismas que para otras interacciones proteína-proteína no covalentes. En general, existen cuatro tipos de interacciones de unión entre antígenos y anticuerpos: (i) enlaces de hidrógeno, (ii) fuerzas de dispersión, (iii) fuerzas electrostáticas entre ácidos de Lewis y bases de Lewis, y (iv) interacciones hidrófobas. Determinadas fuerzas físicas contribuyen a la unión antígeno-anticuerpo, por ejemplo, el ajuste o la complementariedad de formas de epítopos con diferentes sitios de unión a anticuerpos. Así mismo, otros materiales y antígenos pueden tener reacciones cruzadas con un anticuerpo, compitiendo así por el anticuerpo libre disponible.

La medición de la constante de afinidad y la especificidad de unión entre antígeno y anticuerpo es un elemento fundamental para determinar la eficacia de un inmunoensayo, no sólo para evaluar las mejores preparaciones de antígenos y anticuerpos a utilizar, sino también para mantener el control de calidad una vez que se haya implementado el diseño básico del inmunoensayo.

### **Anticuerpos**

Las moléculas de anticuerpos pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas, cuyo componente básico, el pliegue o dominio de la inmunoglobulina, se utiliza en diversas formas en muchas moléculas del sistema inmunitario y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina típica tiene cuatro cadenas polipeptídicas, que contienen una región de unión a antígeno conocida como región variable y una región no variable conocida como región constante.

Los anticuerpos e inmunoglobulinas naturales son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L, del inglés *light*) idénticas y dos cadenas pesadas (H, del inglés *heavy*) idénticas. Cada cadena ligera está unida 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 tiene también puentes disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios 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 está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a distintas clases. Hay al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-

4; IgA-1 e IgA-2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Más detalles sobre la estructura, función, uso y preparación de anticuerpos se analizan en la patente de EE. UU. n.º 6.998.241, presentada el 14 de febrero de 2006.

## 5 Ensayos de tipo sándwich

Los expertos en la materia conocen bien los ensayos de tipo sándwich de un anticuerpo o de múltiples anticuerpos, incluidos los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 4.486.530, presentada el 4 de diciembre de 1984 y las referencias allí indicadas. Las estructuras descritas en las figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 14 se pueden utilizar directamente como se describe o en diversas configuraciones de tipo sándwich, incluidas las descritas en el ejemplo 37. Una configuración sándwich o un ensayo sándwich se refiere al uso de acontecimientos de reconocimiento sucesivos para construir capas de varias biomoléculas y elementos indicadores para señalar la presencia de una biomolécula particular, por ejemplo, una biomolécula diana o una biomolécula asociada a una diana. Un ejemplo convencional de esto sería el uso sucesivo de anticuerpos. En estos ensayos, un anticuerpo primario se une a la diana, el anticuerpo secundario se une al primario, un tercer anticuerpo se puede unir al secundario y así sucesivamente. Con cada capa sucesiva se pueden añadir grupos de indicadores adicionales. Otra estrategia es utilizar una adición repetitiva de capas alternas de dos (o más) componentes mutuamente reconocibles, o más de dos componentes en una relación de reconocimiento en cadena, que comprenden uno o ambos de los componentes en forma de estructura multimérica. En dicha configuración, uno o más de los grupos funcionales en cada una de las estructuras multiméricas se pueden marcar con grupos indicadores y los grupos funcionales desocupados pueden servir como sitio de reconocimiento para los otros componentes, y este sistema, posteriormente, proporcionará una plataforma para la amplificación de señales. Un ejemplo típico de este enfoque es el uso de un conjugado de indicador y estreptavidina y un anticuerpo antiestreptavidina biotinilado. En dichos ensayos, se puede utilizar una molécula sensora biotinilada (ácido nucleico o anticuerpo) para unirse a una biomolécula diana, que posteriormente es reconocida por un sistema de detección que contiene un conjugado de indicador y estreptavidina y un anticuerpo antiestreptavidina biotinilado. La estructura de tipo sándwich en este caso puede construirse mediante rondas sucesivas de interacción de anticuerpos biotinilados y complejos de estreptavidina marcados para lograr la amplificación de la señal. Con una conjugación adicional de un polímero conjugado con el anticuerpo biotinilado o el complejo de indicador y estreptavidina, es posible aumentar aún más la salida de señal. Esencialmente, la integración de un polímero conjugado en este tipo de sistema de amplificación de señales puede amplificar aún más las señales a un nivel superior.

Los complejos poliméricos bioconjugados descritos en las figuras 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16 y 17 se pueden utilizar para crear ensayos de tipo sándwich ópticamente mejorados mediante la integración directa de un polímero conjugado de captación de luz en elementos de reconocimiento comúnmente utilizados. Los beneficios de las estructuras conjugadas de polímero conjugado también se pueden aplicar directamente a los elementos de reconocimiento de dianas primarios sin necesidad de elementos de reconocimiento sucesivos. Por ejemplo, un anticuerpo primario puede conjugarse directamente con un complejo de polímero y colorante tal como se muestra en la figura 14. Dicho complejo se puede utilizar para investigar directamente la presencia de una biomolécula diana.

## 40 Polinucleótidos

Los polinucleótidos diana amplificados pueden someterse a tratamientos posteriores a la amplificación. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser deseable fragmentar el polinucleótido diana antes de la hibridación para proporcionar segmentos que sean más fácilmente accesibles. La fragmentación de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mediante cualquier método que produzca fragmentos de un tamaño útil en el ensayo que se realiza; los métodos físicos, químicos y enzimáticos adecuados son conocidos en la materia.

Se puede realizar una reacción de amplificación en condiciones que permitan que el polinucleótido sensor se hibride 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 acontecimiento de hibridación puede tener lugar mediante el seguimiento de la emisión de luz durante la amplificación.

El análisis de productos de PCR en tiempo real (y de la PCR de transcripción inversa en tiempo real relacionada) proporciona una técnica bien conocida para el control de la PCR en tiempo real que se ha utilizado en una variedad de contexto, que se puede adaptar para su uso con los métodos descritos 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.

## Muestras

En principio, una muestra puede ser cualquier material que se sospeche que contiene una biomolécula diana (por ejemplo, anticuerpo, proteína, ligando de afinidad, péptido, ácido nucleico y similares) capaz de provocar la excitación de un complejo polimérico conjugado. En algunas realizaciones, la muestra puede ser cualquier fuente de material

biológico que comprenda biomoléculas que puedan obtenerse de manera directa o indirecta de un organismo vivo, incluidas células, tejido o líquidos, y los depósitos dejados por ese organismo, incluidos virus, micoplasma y fósiles. La muestra puede comprender una biomolécula diana preparada mediante medios sintéticos, en su totalidad o en parte. Normalmente, la muestra se obtiene como, o dispersa en, un medio predominantemente acuoso. Ejemplos no limitantes de la muestra incluyen sangre, orina, semen, leche, esputo, mucosidad, un hisopo bucal, un hisopo vaginal, un hisopo rectal, un aspirado, una biopsia con aguja, una sección de tejido obtenida, por ejemplo, mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, líquido espinal, líquido linfático, las secciones externas de la piel, los aparatos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, tumores, órganos, muestras de componentes de cultivo celular *in vitro* (incluidos, pero sin limitación, medio condicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo celular, células supuestamente infectadas con 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 la biomolécula diana o un sustituto de la misma. También se puede utilizar una muestra de control negativo que, aunque no se espera que contenga la biomolécula diana, se sospecha que la contiene (mediante la contaminación de uno o más reactivos) u otro componente capaz de producir un falso positivo, y se prueba para confirmar la ausencia de contaminación por la biomolécula diana de los reactivos utilizados en un ensayo determinado, así como para determinar si un conjunto determinado de condiciones de ensayo produce falsos positivos (una señal positiva incluso en ausencia de la biomolécula 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 hacerlo accesible a los reactivos que se utilizan en un esquema de amplificación o a los reactivos de detección. Cuando la muestra contiene células, las células pueden lisarse o permeabilizarse para liberar los polinucleótidos dentro de las células. Se pueden utilizar tampones de permeabilización de una etapa para lisar células que permiten realizar etapas adicionales directamente después de la lisis, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa.

#### Colorantes orgánicos

Los colorantes orgánicos incluyen cromóforos y fluoróforos de señalización. En algunas realizaciones, se puede emplear un cromóforo o fluoróforo de señalización, por ejemplo, para recibir energía transferida desde un estado excitado de una unidad ópticamente activa, o para intercambiar energía con una sonda marcada, o en múltiples esquemas de transferencia de energía. Los fluoróforos útiles en las invenciones descritas en el presente documento incluyen cualquier sustancia que pueda absorber energía de una longitud de onda adecuada y emitir o transferir energía. Para ensayos multiplexados, se pueden utilizar varios fluoróforos diferentes con espectros de emisión detectables diferentes. Los fluoróforos típicos incluyen colorantes fluorescentes, nanocristales semiconductores, quelatos de lantánidos y proteínas fluorescentes.

Los colorantes fluorescentes ilustrativos incluyen fluoresceína, 6-FAM, rodamina, rojo Texas, tetrametilrodamina, una carboxirrodamina, carboxirrodamina 6G, carboxirrodamina 110, Cascade Blue, Cascade Yellow, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy-cromo, Dylight 350, Dylight 405, Dylight 488, Dylight 549, Dylight 594, Dylight 633, Dylight 649, Dylight 680, Dylight 750, Dylight 800, ficoeritrina, PerCP (proteína peridina clorofila-a), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dime1hoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y-6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Amarillo Lucifer, Marina Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 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-metilcumarin-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. Los quelatos de lantánidos ilustrativos incluyen quelatos de europio, quelatos de terbio y quelatos de samario.

En la materia se conoce una amplia variedad de nanocristales semiconductores ("SCNC", del inglés *semiconductor nanocrystals*) fluorescentes; los métodos para producir y utilizar nanocristales semiconductores se describen en: la publicación PCT n.º WO 99/26299, publicada el 27 de mayo de 1999, Bawendi *et al.*; USPN 5.990.479 presentada el 23 de noviembre de 1999 a Weiss *et al.*; y Bruchez *et al.*, Science 281:2013, 1998. Los nanocristales semiconductores se pueden obtener con bandas de emisión muy estrechas con longitudes de onda de emisión máximas bien definidas, lo que permite utilizar una gran cantidad de SCNC diferentes como cromóforos de señalización en el mismo ensayo, opcionalmente en combinación con otros tipos de cromóforos de señalización que no son SCNC.

Los colorantes específicos de polinucleótidos ilustrativos incluyen naranja de acridina, homodímero de acridina, actinomicina D, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), BOBO™-1 yoduro (462/481), BOBO™-3 yoduro (570/602), BO-PRO™-1 yoduro (462/481), BO-PRO™-3 yoduro (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,

- hidroxiestilbamidina, metanosulfonato, JOJO™-1 yoduro (529/545), JO-PRO™-1 yoduro (530/546), LOLO™-1 yoduro (565/579), LO-PRO™-1 yoduro (567/580), NeuroTrace™ 435/455, NeuroTrace™ 500/525, NeuroTrace™ 515/535, NeuroTrace™ 530/615, NeuroTrace™ 640/660, verde oliva, ADNmc PicoGreen®, ADNbc PicoGreen®, POPO™-1 yoduro (434/456), POPO™-3 yoduro (534/570), PO-PRO™-1 yoduro (435/455), PO-PRO™-3 yoduro (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 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 tiazol, TOMEHE, daunomicina, acridina, pentil-TOTAB y butil-TOTIN. Se pueden utilizar colorantes de cianina asimétricos como colorante específico de polinucleótido. Otros colorantes de interés incluyen los descritos por 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: Nueva York, 1996; págs. 324-346, y por Glumoff, T. y Goldman, A. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2.ª ed., Blackburn, G. M. y Gait, M. J., Eds., Oxford University Press: Oxford, 1996, págs. 375-441. El colorante específico de polinucleótido puede ser un colorante intercalante y puede ser específico para polinucleótidos bicatenarios.
- La expresión "proteína fluorescente" incluye tipos de proteínas que se sabe que absorben y emiten luz. Una de las clases de dichos materiales más comúnmente utilizadas son las ficobiliproteínas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ficoeritrina (PE y R-PE), alofocianina (APC) y PerCP. Otras clases incluyen proteína verde fluorescente y versiones relacionadas.
- La expresión "proteína verde fluorescente" se refiere tanto a la proteína verde fluorescente nativa *Aequorea* y versiones mutadas que se han identificado por presentar características de fluorescencia alteradas, incluidos máximos de excitación y emisión alterados, así como espectros de excitación y emisión de las 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.* aislaron mutantes de la GFP *Aequorea victoria* clonada que tenían espectros de excitación desplazados al rojo. *Bio/Technology* 13:151-154 (1995). Heim, R. *et al.* informaron de un mutante (Tyr66 a His) que tenía una fluorescencia azul (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) *USA* 91:12501-12504).

### Sustratos

- En algunas realizaciones, un componente de ensayo puede ubicarse sobre un sustrato. El sustrato puede comprender una amplia gama de materiales, ya sean biológicos, no biológicos, orgánicos, inorgánicos o una combinación de cualquiera de estos. 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 amplia variedad de geles o polímeros, tales como (poli)tetrafluoroetileno, (poli)difluoruro de vinilideno, poliestireno, poliestireno reticulado, poliacrílico, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(láctida coglicolida), polianhídridos, poli(metacrilato de metilo), poli(acetato de etileno-co-vinilo), polisiloxanos, sílice polimérica, látex, polímeros de dextrano, epoxis, policarbonatos o combinaciones de los mismos. Se pueden utilizar polímeros conductores y materiales fotoconductores.
- Los sustratos pueden ser sustratos cristalinos planos, tales como sustratos a base de sílice (por ejemplo, vidrio, cuarzo o similares) o sustratos cristalinos utilizados en, por ejemplo, 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 un semiconductor optoelectrónico de película delgada, o un biochip. La(s) ubicación(es) de la(s) sonda(s) en el sustrato pueden ser direccionables; esto se puede hacer en formatos muy densos y las ubicaciones pueden ser microdireccionables o nanodireccionables.
- También se pueden utilizar aerogeles de sílice como sustratos y se pueden preparar mediante métodos conocidos en la materia. Los sustratos de aerogel se pueden utilizar como sustratos independientes o como revestimiento superficial para otro material de sustrato.
- El sustrato puede adoptar cualquier forma y normalmente es una placa, portaobjetos, perla, microgránulo, disco, partícula, micropartícula, nanopartícula, cadena, precipitado, gel opcionalmente poroso, láminas, tubo, esfera, recipiente, capilar, compresión, corte, película, microplaca, placa o disco multipocillo, fibra óptica, etc. El sustrato puede tener cualquier forma que sea rígida o semirrígida. El sustrato puede contener regiones elevadas o deprimidas en las que se ubica un componente de ensayo. La superficie del sustrato se puede grabar usando técnicas bien conocidas para proporcionar las características superficiales deseadas, por ejemplo surcos, ranuras en V, estructuras de meseta o similares.
- Las superficies del sustrato pueden estar compuestas del mismo material que el sustrato o pueden estar hechas de un material diferente y pueden acoplarse al sustrato por medios químicos o físicos. Dichas superficies acopladas

pueden estar compuestas de cualquiera de una amplia variedad de materiales, por ejemplo, polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas o cualquiera de los materiales de sustrato mencionados anteriormente. La superficie puede ser ópticamente transparente y puede tener funcionalidades Si-OH superficiales, tales como las que se encuentran en superficies de sílice.

El sustrato y/o su superficie opcional se pueden elegir para proporcionar características adecuadas para los métodos sintéticos y/o de detección utilizados. 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 "espejos" reflectantes para aumentar la recuperación de la luz.

El sustrato y/o su superficie son generalmente resistentes a, o están tratados para resistir, las condiciones a las que van a estar expuestos en uso, y pueden tratarse opcionalmente para eliminar cualquier material resistente después de la exposición a dichas condiciones.

Se pueden fabricar sondas de polinucleótidos o polipéptidos en el sustrato o unirlos al mismo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, los métodos descritos en la patente de EE. UU. n.º 5.143.854, la publicación PCT n.º WO 92/10092, la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 07/624.120, presentada el 6 de diciembre de 1990 (ahora abandonada), Fodor *et al.*, Science, 251: 767-777 (1991) y la publicación PCT n.º WO 90/15070). Las técnicas para la síntesis de estas matrices mediante estrategias de síntesis mecánica se describen en, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 93/09668 y la patente de EE. UU. n.º 5.384.261.

Aún otras técnicas incluyen técnicas basadas en perlas, tales como las descritas en la solicitud PCT n.º PTC/US93/04145 y métodos basados en agujas, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 5.288.514.

El canal de flujo adicional o los métodos de manchado aplicables a la unión de polinucleótidos o polipéptidos sensores al sustrato se describen en la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 07/980.523, presentada el 20 de noviembre de 1992 y la patente de EE. UU. n.º 5.384.261. Los reactivos se administran al sustrato ya sea (1) fluyendo dentro de un canal definido en regiones predefinidas o (2) "manchando" en regiones predefinidas. Se puede utilizar un revestimiento protector, tal como un revestimiento hidrófilo o hidrófobo (dependiendo de la naturaleza del disolvente), en partes del sustrato a proteger, a veces junto con materiales que facilitan la humectación mediante la solución reactiva en otras regiones. De esta manera, se evita además que las soluciones que fluyen pasen fuera de sus rutas de flujo designadas.

Los dispensadores típicos incluyen una micropipeta opcionalmente controlada robóticamente, una impresora de chorro de tinta, una serie de tubos, un colector, una matriz de pipetas o similares, de modo que se puedan administrar varios reactivos a las regiones de reacción de manera secuencial o simultánea.

El sustrato o una región del mismo puede codificarse de modo que pueda determinarse la identidad del sensor ubicado en el sustrato o región que se está consultando. Se puede utilizar cualquier esquema de codificación adecuado, por ejemplo, códigos ópticos, marcadores RFID, códigos magnéticos, códigos físicos, códigos fluorescentes y combinaciones de códigos.

### Excitación y detección

Para la excitación se puede utilizar cualquier instrumento que proporcione una longitud de onda que pueda excitar el complejo polimérico conjugado y que sea más corta que la(s) longitud(es) de onda de emisión a detectar. Los dispositivos disponibles comercialmente pueden proporcionar longitudes de onda de excitación adecuadas, así como componentes de detección adecuados.

Las fuentes de excitación ilustrativas incluyen una fuente de luz UV de banda ancha, tal como una lámpara de deuterio con un filtro adecuado, la salida de una fuente de luz blanca, tal como una lámpara de xenón o una lámpara de deuterio, después de pasar por un monocromador para extraer las longitudes de onda deseadas, un láser de gas de onda continua (cw, del inglés *continuous wave*), un láser de diodo de estado sólido o cualquiera de los láseres pulsados. La luz emitida se puede detectar mediante cualquier dispositivo o técnica adecuada; se conocen en la materia muchos enfoques adecuados. Por ejemplo, se puede utilizar un fluorímetro o espectrofotómetro para detectar si la muestra de prueba emite luz de una longitud de onda característica del cromóforo de señalización tras la excitación del polímero conjugado.

### Composiciones de materia

También se proporcionan composiciones de materia de cualquiera de las moléculas descritas en el presente documento en cualquiera de sus diversas formas. Los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados como se describen en el presente documento pueden proporcionarse en forma purificada y/o aislada. Los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados se pueden proporcionar en forma cristalina o amorfa.

Los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados pueden proporcionarse en solución, que puede ser una solución predominantemente acuosa, que puede comprender uno o más de los componentes de solución adicionales descritos en el presente documento, incluidos, sin limitación, disolventes adicionales, tampones, biomoléculas, polinucleótidos, fluoróforos, etc. Además, una mezcla de PC en solución también puede proporcionar una sensibilidad de detección mejorada en comparación con la de un único sistema PC/colorante. Los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados pueden estar presentes en solución a una concentración en la que se puede detectar una primera emisión de las primeras unidades ópticamente activas en ausencia de una biomolécula diana o una biomolécula asociada a la misma. La solución puede comprender componentes adicionales como se describe en el presente documento, incluidas sondas marcadas, tales como anticuerpos o polinucleótidos marcados fluorescentemente, específicas para una especie o una clase de biomolécula diana o una biomolécula asociada con la misma para los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados.

Los polímeros conjugados y los complejos que incluyen polímeros conjugados pueden presentarse en forma de película. Las composiciones de materia se pueden reivindicar por cualquier propiedad descrita en el presente documento, incluso por la estructura propuesta, por el método de síntesis, por el espectro de absorción y/o emisión, por el análisis elemental, por los espectros de RMN o por cualquier otra propiedad o característica.

En algunas realizaciones, la expresión de un gen se detecta en una muestra. En una realización adicional, la identificación de un marcador celular o tipo de célula se detecta en una muestra en un citómetro de flujo, clasificador de células, microscopio, lector de placas o generador de imágenes de fluorescencia. En una realización adicional, la identificación del tipo de célula o marcador se utiliza en el diagnóstico de linfoma u otros cánceres circulantes. En una realización adicional, la identificación del tipo de célula o marcador se utiliza en el diagnóstico y seguimiento de la infección por VIH. En una realización adicional, la identificación del tipo de célula o marcador se utiliza para clasificar células para aplicación terapéutica. En una realización adicional, un resultado medido de la detección de una biomolécula diana o una biomolécula asociada con la misma se puede utilizar para diagnosticar un estado patológico de un paciente. En otra realización más, el método de detección de la invención puede incluir además un método para diagnosticar un estado patológico. En una realización relacionada, el método de diagnosticar una enfermedad puede incluir revisar o analizar datos relacionados con la presencia de una biomolécula diana o una biomolécula asociada con la misma y proporcionar una conclusión a un paciente, un profesional sanitario o un gestor sanitario, basándose la conclusión en la revisión o análisis de datos relacionados con el diagnóstico de una enfermedad. La revisión o el análisis de dichos datos se puede facilitar utilizando un ordenador u otro dispositivo digital y una red como se describe en el presente documento. Se prevé que la información relativa a dichos datos pueda transmitirse a través de la red.

En la práctica de los métodos de la presente invención, opcionalmente se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, 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*, 5.<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc. (2002), Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000), Innis *et al.* (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Elsevier Science & Technology Books (1990), y Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2.<sup>a</sup> Ed., Academic Press, Inc. (2008).

La figura 12 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de dispositivo lógico a través del cual se puede lograr revisar o analizar datos relacionados con la presente invención. Dichos datos pueden estar relacionados con una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. En la figura 12 se muestra un sistema informático (o dispositivo digital) 800 conectado a un aparato 820 para su uso con los polímeros conjugados o complejos de polímeros conjugados 824 para, por ejemplo, producir un resultado. El sistema informático 800 puede entenderse como un aparato lógico que puede leer instrucciones desde el medio 811 y/o un puerto de red 805, que puede conectarse opcionalmente al servidor 809 que tiene un medio fijo 812. El sistema mostrado en la figura 12 incluye una CPU 801, unidades de disco 803, dispositivos de entrada opcionales, tales como un teclado 815 y/o ratón 816 y un monitor 807 opcional. La comunicación de datos se puede lograr a través del medio de comunicación indicado a un servidor 809 en 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 relacionados con la presente invención puedan transmitirse a través de dichas redes o conexiones.

En algunos casos, un medio legible por ordenador incluye un medio adecuado para la transmisión de un resultado de un análisis de una muestra biológica. El medio puede incluir un resultado con respecto a una enfermedad, afección o estado de un sujeto, en donde dicho resultado se obtiene mediante los métodos descritos en el presente documento.

## Kits

También se describen kits que comprenden reactivos útiles para realizar los métodos descritos, a efectos de comprender la invención reivindicada.

En algunos casos, un kit comprende reactivos que incluyen polímeros conjugados o complejos de polímeros conjugados, bioconjugados, por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos y otros componentes como se describe en el presente documento.

- 5 Opcionalmente, el kit puede contener uno o más de los siguientes: uno o más marcadores que se pueden incorporar en polímeros conjugados o complejos de polímeros conjugados; y uno o más sustratos que pueden contener o no una matriz, etc.

10 Los componentes de un kit pueden quedar retenidos por una carcasa. Las instrucciones para utilizar el kit para realizar un método descrito se pueden proporcionar con la carcasa y se pueden proporcionar en cualquier medio fijo. Las instrucciones pueden estar ubicadas dentro o fuera de la carcasa y pueden estar impresas en el interior o exterior de cualquier superficie que forme la carcasa que haga legibles las instrucciones. Un kit puede estar en forma múltiple para la detección de una o más biomoléculas diana diferentes o biomoléculas asociadas con las mismas.

15 Como se describe en el presente documento y se muestra en la figura 13, en determinados casos, un kit 903 puede incluir un recipiente o alojamiento 902 para alojar varios componentes. Como se muestra en la figura 13 y se describe a en el presente documento, en un caso, se proporciona un kit 903 que comprende uno o más polímeros conjugados o complejos de polímeros conjugados reactivos 905 y, opcionalmente, un sustrato 900. Como se muestra en la figura 13 y se describe a en el presente documento, el kit 903 puede incluir opcionalmente las instrucciones 901. Se prevén  
20 otros casos del kit 903 en donde los componentes incluyen varias características adicionales descritas en el presente documento.

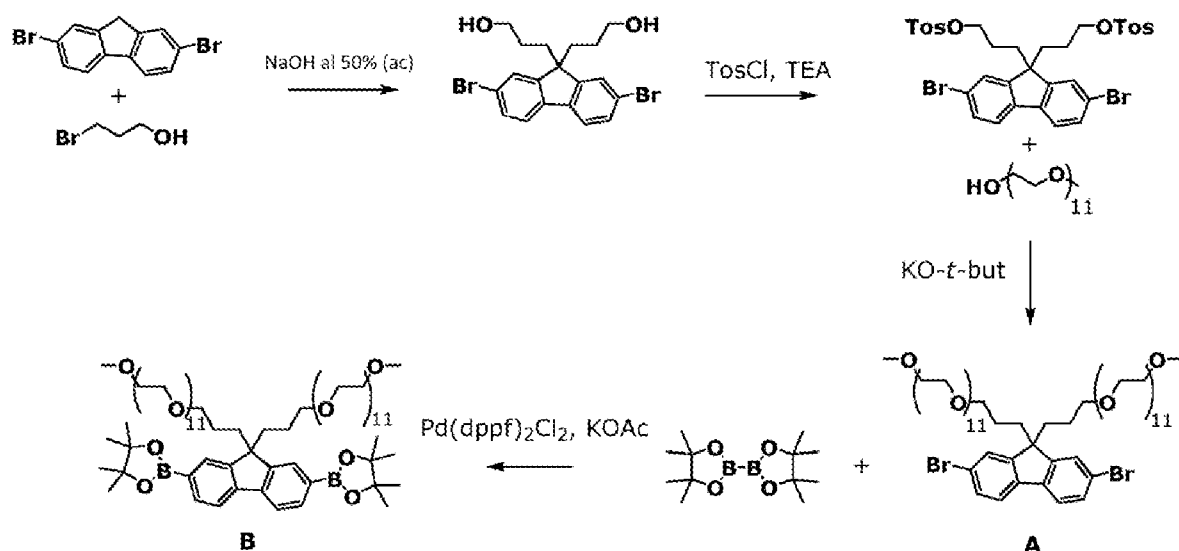
### Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos proporcionan métodos ilustrativos para fabricar y probar la eficacia de los polímeros conjugados descritos en el presente documento. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con propósitos ilustrativos y no limitan el ámbito de las reivindicaciones proporcionadas en el presente documento. Todos los métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación. La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir  
30 más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo. No obstante, para el experto está claro qué polímeros conjugados en los ejemplo están dentro del alcance de las reivindicaciones, y cuáles son polímeros conjugados de referencia útiles para comprender la invención reivindicada.

### 35 Ejemplo 1: Síntesis de un polímero de fórmula (I)

Ejemplo 1a: Síntesis de los monómeros, 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (**A**) y 9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (**B**), para la posterior polimerización

40



Etapas 1: 2,7-dibromo-9,9-di(3'-hidroxipropánil)fluoreno.

45 Se añadieron 2,7-dibromofluoreno (9,72 g, 30 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (300 mg, 0,93 mmol) y DMSO (100 ml) a un matraz de 3 bocas en una atmósfera de nitrógeno (g), seguido de la adición de NaOH al 50 % (15 ml,

188 mmol) con una jeringa. La mezcla se calentó a 80 °C y se añadió gota a gota 3-bromopropanol (6,70 ml, 77 mmol) mediante un embudo de adición y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante otras 2 horas. Tras completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se detuvo con agua (250 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 partes de 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua, después se secaron en MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. Se eliminó el disolvente y el residuo se recrystalizó en cloroformo para producir cristales en forma de agujas de color amarillo pálido (9,20 g, 70 %).

**Etapa 2:** 2,7-dibromo-9,9-di(3'-metilbencenosulfonatopropanil)fluoreno.

Se disolvió 2,7-dibromo-9,9-di(3'-hidroxipropanil)fluoreno (500 mg, 1,14 mmol) en diclorometano (5 ml) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno (g). A la mezcla, se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (650 mg, 3,40 mmol), seguido de piridina (0,39 ml, 4,77 mmol). Se dejó que la reacción se agitara a 0 °C y aumentara naturalmente a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo con agua (15 ml). La eliminación del disolvente al vacío dio como resultado la formación de sólidos. Los sólidos se filtraron para producir sólidos blancos (758 mg, 89 %).

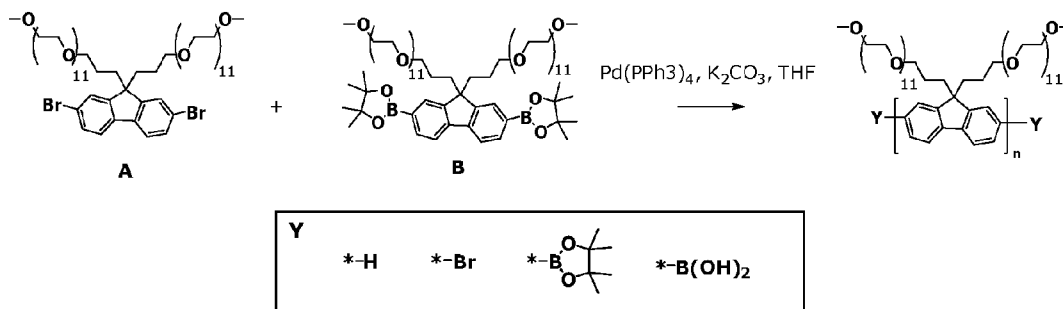
**Etapa 3:** 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (**A**).

Se disolvió alcohol mPEG11 (770 mg, 1,49 mmol) en THF anhidro (2 ml) a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. A la mezcla, se añadió *terc*-butoxido de potasio (1,63 mmol, 1,63 ml, 1 M en THF). Después de 10 minutos de agitación, se añadió 2,7-dibromo-9,9-di(3'-metilbencenosulfonatopropanil)fluoreno (504 mg, 0,673 mmol) en 10 ml de THF con una jeringa. La mezcla se dejó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con THF. La sal inorgánica insoluble se eliminó mediante filtración. La concentración del filtrado produjo el producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna (DCM-MeOH) para producir un aceite incoloro (605 mg, 62,5 %).

**Etapa 4:** 9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (**B**).

Se mezclaron 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (1,510 g, 1,501 mmol), bis(pinacolato)diboro (800 mg, 3,15 mmol), acetato de potasio (619 mg, 6,31 mmol), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaladio (II) (51,5 mg, 0,063 mmol) y DMSO (30 ml) en atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla se calentó a 80 °C durante 5,5 horas. Tras completarse, se destiló la DMF y se añadió agua (50 ml). El producto se extrajo con DCM (3 × 40 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (DCM-MeOH) para dar un aceite incoloro (1,015 g, 63 %).

**Ejemplo 1b:** Polimerización de los monómeros (A) y (B)

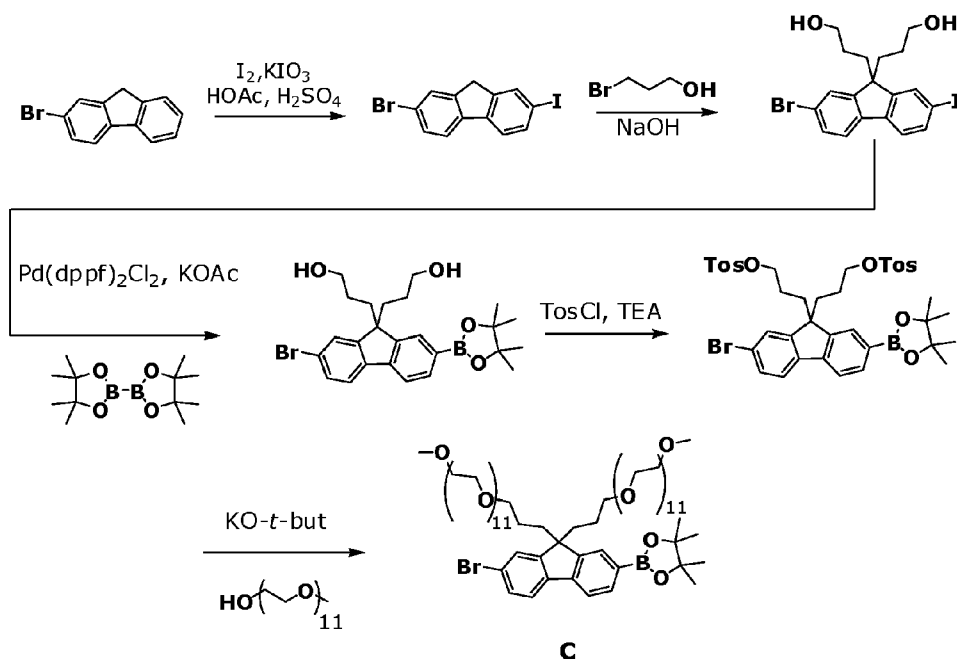


Se combinaron 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (**A**) (0,084 mmol, 120 mg), 9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (**B**) (0,088 mmol, 135 mg) y tetra(trifenilfosfina) de paladio (0,0035 mmol, 4 mg) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora. Seguidamente, se añadieron 0,35 ml de carbonato potásico (acuoso) 2 M y 1,9 ml de tetrahidrofurano y se equipó el matraz con un adaptador de vacío y se puso en una línea Schlenk. La mezcla se desgasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación. La mezcla desgasificada se calentó a 80 °C en atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa durante 18 horas. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. El semisólido resultante se diluyó con unos 50 ml de agua y se filtró a través de papel de filtro de fibra de vidrio. Se añadió etanol para ajustar el disolvente a etanol al 20 % en agua. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realizó con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se eliminó con evaporación rotatoria y se recogieron 100 mg de poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35'-dodecaoxaoctatriacontan))fluoreno] en forma de un aceite de color ámbar.

**Ejemplo 2:** Síntesis de polímeros asimétricos de fórmula (I) mediante acoplamiento de Suzuki

**Ejemplo 2a:** Síntesis del monómero asimétrico, 2-bromo-9,9-di(2',5',8', 11', 14', 17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (**C**), para su posterior

polimerización



#### 5 Etapla 1: 2-dibromo-7-yodofluoreno.

Se mezclaron en atmósfera de nitrógeno 2-bromofluoreno (10,01 g, 40,84 mmol), ácido acético (170 ml), agua (8 ml), yodo (4,34 g, 17,20 mmol), yodato de potasio (2,18 g, 10,19 mmol) y ácido sulfúrico (4 ml). La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 2 h y se enfrió hasta la temperatura ambiente. El precipitado formado, que es el producto deseado, se recogió después de filtración y lavado con ácido acético (13,68 g, 90 %).

#### Etapla 2: 2-dibromo-9,9-di(3'hidroxipropnil)-7-yodofluoreno.

Se añadieron 2-dibromo-7-yodofluoreno (2,186 g, 5,892 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (60 mg, 0,186 mmol) y DMSO (25 ml) a un matraz de 3 bocas en atmósfera de nitrógeno (g), seguido de la adición de NaOH al 50 % (4 ml, 50 mmol) con una jeringa. La mezcla se calentó a 80 °C, se añadió lentamente 3-bromopropanol (1,33 ml, 14,7 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 1 hora más. Tras completarse, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se detuvo con agua (50 ml). El precipitado como producto bruto se recogió después de la filtración. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo) para dar un sólido amarillo pálido (2,15 g, 75 %).

#### Etapla 3: 2-bromo-9,9-di(3'-hidroxipropnil)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno.

Se mezclaron en N<sub>2</sub> 2-dibromo-9,9-di(3'hidroxipropnil)-7-yodofluoreno (2,454 g, 5,037 mmol), bis(pinacolato)diboro (1,407 g, 5,541 mmol), acetato de potasio (1,483 g, 15,11 mmol), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (123 mg, 0,15 mmol) y DMSO (25 ml). La mezcla se calentó a 80 °C durante 1,5 horas. Tras completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se detuvo con agua (50 ml). El producto se extrajo con DCM (3 × 40 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo) para dar un sólido pálido (2,09 g, 85 %).

#### Etapla 4: 2-bromo-9,9-di(3'-metanosulfanotopropnil)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno.

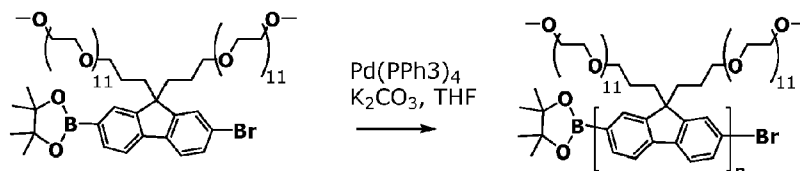
Se disolvieron 2-bromo-9,9-di(3'-hidroxipropnil)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (2,280 g, 4,694 mmol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (2,684 g, 14,08 mmol) en diclorometano a temperatura ambiente en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se añadió lentamente trietilamina (3,95 ml, 28,2 mmol) con una jeringa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la mezcla se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-EtOAc) para producir un sólido pálido (2,66 g, 72 %).

#### Etapla 5: 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11,14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)flúor (**C**).

Se disolvió alcohol mPEG11 (3,331 g, 6,448 mmol) en THF anhidro (20 ml) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. A la mezcla, se añadió *tert*-butóxido de potasio (7,74 mmol, 7,74 ml, 1 M en THF). Después de 10 minutos de agitación,

se añadió 2-bromo-9,9-di(3'-metanosulfanopropanil)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)flúor (2,052 g, 2,579 mmol) en 20 ml de THF anhidro con una jeringa. La mezcla se dejó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Después de la evaporación del THF, se añadió salmuera (50 ml) y el producto bruto se extrajo con diclorometano (3 × 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron y purificaron mediante cromatografía en columna (DCM-isopropanol) para dar un producto similar a un gel incoloro (2,164 g, 57 %).

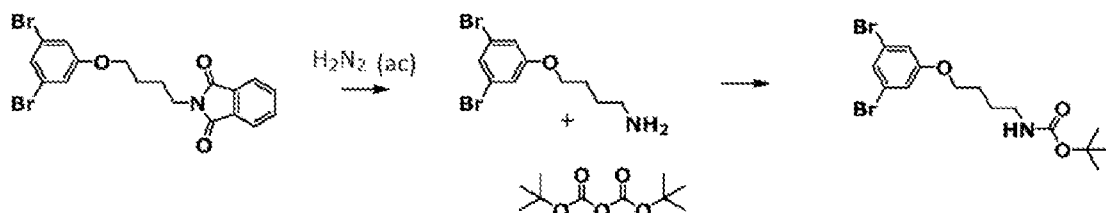
**Ejemplo 2b:** Síntesis de un polímero asimétrico mediante polimerización por acoplamiento de Suzuki



Los polímeros asimétricos se sintetizan mediante condiciones similares a las condiciones de polimerización como se describe en el ejemplo 1b.

**Ejemplo 3: Síntesis de un enlazador o unidad de protección**

**Ejemplo 3a:** Síntesis del enlazador o unidad de protección, *terc*-butil 4-(3,5-dibromofenoxi)butilcarbamato



**Etapas 1:** 4-(3,5-dibromofenoxi)butan-1-amina.

Se disolvió 1-(4'-ftalimidobutoxi)3,5-dibromobenceno (1,0 g, 2,20 mmol) en etanol (45 ml) durante 5 minutos en atmósfera de nitrógeno. Se añadió monohidrato de hidrazina (610 mg, 12,1 mmol) y la reacción se sometió a reflujo a 80 °C durante 2 horas. A la reacción se le añadió HCl acuoso 1 M (17,7 ml, 17,7 mmol) y se sometió a reflujo a 105 °C durante otras 2 horas. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 × 150 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> saturado (3×), agua y salmuera, después se secaron en MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. La eliminación del disolvente produjo un aceite amarillo (560 mg, 78 %).

**Etapas 2:** *Terc*-butil 4-(3,5-dibromofenoxi)butilcarbamato.

Se disolvió 4-(3,5-dibromofenoxi)butan-1-amina (397 mg, 1,23 mmol) en THF anhidro (24,6 ml) en atmósfera de nitrógeno. Se añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (423 ml, 1,84 mmol) a la mezcla y la reacción se sometió a reflujo a 40 °C durante 2 horas. Después de la extracción de la reacción con diclorometano (2 × 50 ml), las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> saturado, agua y salmuera, después se secaron en MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. Se eliminó el disolvente y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (9:1, hexanos: EtOAc) para dar un sólido blanco (306 mg, 59 %).

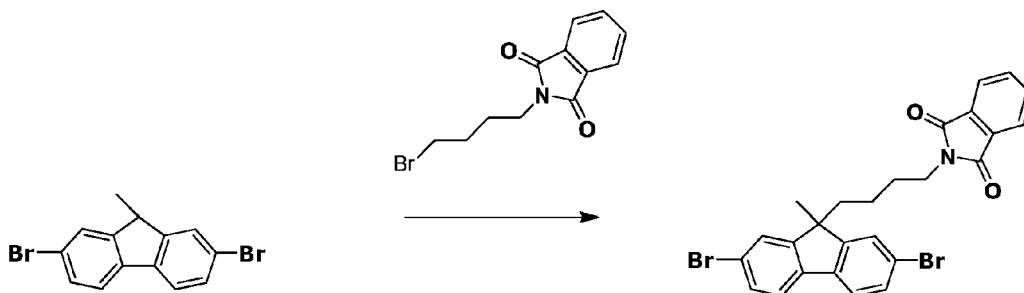
**Ejemplo 3b:** Síntesis del enlazador o unidad de protección, *terc*-butil-4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butilcarbamato



**Etapas 1:** 2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoreno.

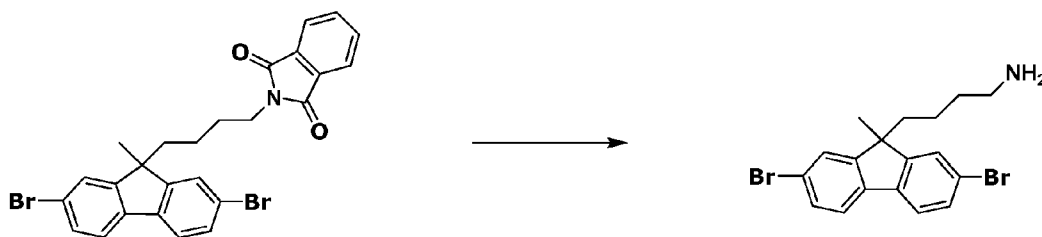
Se disolvió 2,7-dibromofluoreno (30 g, 92,59 mmol) en THF anhidro (300 ml) en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a -78 °C. A la solución a -78 °C, se añadió *n*-butillitio (40,36 ml, 100,9 mmol) durante 5 minutos y se dejó agitar la reacción durante otros 10 minutos. A continuación, se añadió a la reacción yoduro de metilo (6,29 ml, 100,9 mmol) y se dejó reaccionar en agitación a -78 °C durante 2,0 horas. La reacción se vertió en una mezcla de diclorometano y agua. La capa orgánica se recogió y la capa acuosa se volvió a extraer con diclorometano. Se combinaron todas las

capas orgánicas y se eliminó el disolvente mediante *vacío*. El material bruto se trituró con hexanos y se filtró usando un embudo Buchner para dar sólidos blancos (22 g, 70 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,62 (s, 2H), 7,56-7,58 (d, 2H), 7,48-7,50 (dd, 2H), 3,90-3,94 (c, 1H), 1,49-1,51 (d, 3H).



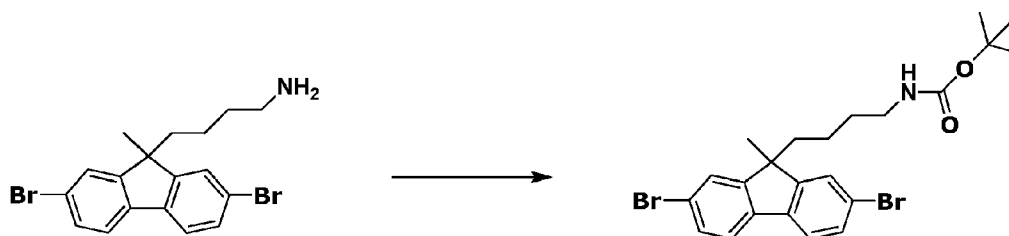
**Etapa 2:** 2-(4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butil)isoindolin-1,3-diona.

Se disolvió 2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoreno (10,0 g, 29,58 mmol) en 50 ml de DMSO en una atmósfera de nitrógeno. A la mezcla se le añadió KOH (2,01 g, 35,79 mmol), agua (1,5 ml), N-(4-bromobutyl)ftalimida (9,93 g, 35,2 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,0 horas, y después a 50 °C durante 3,0 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera (2×) y agua. La eliminación del disolvente produjo un sólido, que se purificó mediante cromatografía en columna (7:3, hexanos:EtOAc) para producir sólidos blancos (3,08 g, 20 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,81-7,83 (m, 2H), 7,68-7,71 (m, 2H), 7,48-7,51 (m, 4H), 7,41-7,44 (dd, 2H), 3,46-3,49 (t, 2H), 2,00-2,04 (p, 2H), 1,47-1,49 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 0,65-0,68 (m, 2H).



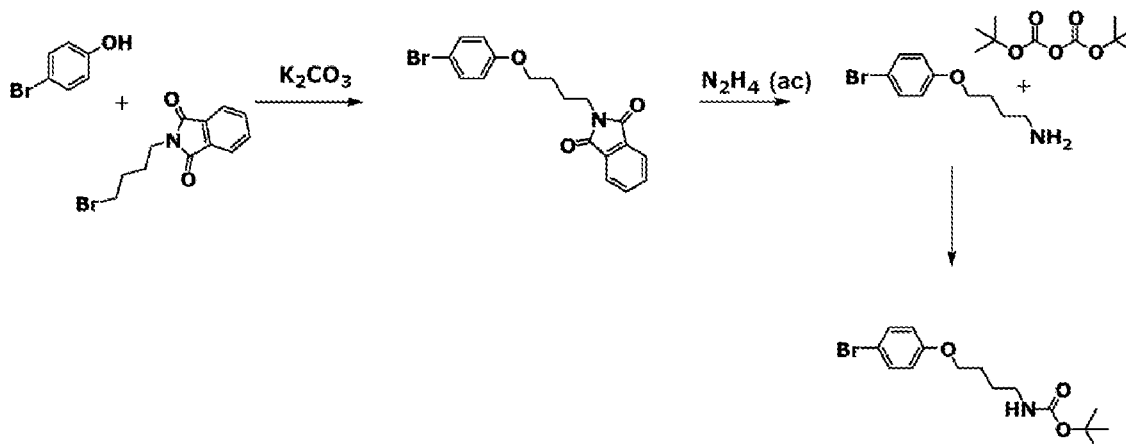
**Etapa 3:** 4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butan-1-amina.

Se disolvió 2-(4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butil)isoindolin-1,3-diona (3,08, 5,71 mmol) en etanol (250 ml) en una atmósfera de nitrógeno. A la mezcla se le añadió monohidrato de hidrazina (2,77 ml, 57,1 mmol) y la reacción se sometió a reflujo a 80 °C durante 3,0 horas. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió HCl 1 M (~100 ml). La mezcla se agitó durante 30 minutos o hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se añadió diclorometano a la solución y la capa orgánica se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  saturado tres veces y se lavó con agua. Las capas orgánicas se recogieron y se eliminó el disolvente mediante *vacío* para dar un aceite amarillo (2,33 g, 100 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  = 7,57 (d, 2H), 7,52 (d, 2H), 7,46-7,48 (dd, 2H), 2,39-2,42 (t, 2H), 1,95-1,98 (t, 2H), 1,44 (s, 3H), 1,17-1,23 (m, 2H), 0,59-0,65 (m, 2H).



**Etapa 4:** terc-butil-4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butilcarbamato.

Se disolvió 4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoren-9-il)butan-1-amina (2,39 g, 5,84 mmol) en THF anhidro (20 ml) en nitrógeno. A la solución se añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (2,01 ml, 8,76 mmol) y la reacción se agitó a 40 °C durante 3 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. Los sólidos brutos se trituraron con hexanos y se filtraron con un embudo Büchner para producir los sólidos blancos deseados (2,34 g, 79 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,53 (d, 2H), 7,45-7,47 (d, 4H), 4,30 (s, 1H), 2,88-2,90 (c, 2H), 1,93-1,96 (t, 2H), 1,43 (s, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,25-1,28 (m, 2H), 0,59-0,66 (m, 2H).

**Ejemplo 4: Síntesis de un enlazador o unidad de protección**Ejemplo 4a: Síntesis de *tert*-butil 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamatoEtapas 1: *N*-(4-(4-bromofenoxi)butil)ftalimida.

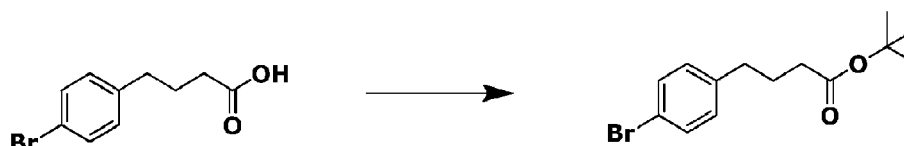
Se combinaron 4-bromofenol (4,64 g, 26,8 mmol), *N*-(4-bromobutilftalimida) (6,30 g, 22,33 mmol),  $K_2CO_3$  (11,09 g, 80,38 mmol), 18-corona-6 (265 mg, 1,00 mmol) y acetona (100 ml), y la reacción se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno a 70 °C durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó al vacío. La mezcla bruta se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó con agua (3×), después se secó sobre  $MgSO_4$  y se filtró. Se eliminó el disolvente, seguido de trituración con hexanos y se filtró con un embudo Buchner para producir un sólido blanco (6,03 g, 71 %).

Etapas 2: 4-(4-bromofenoxi)butan-1-amina.

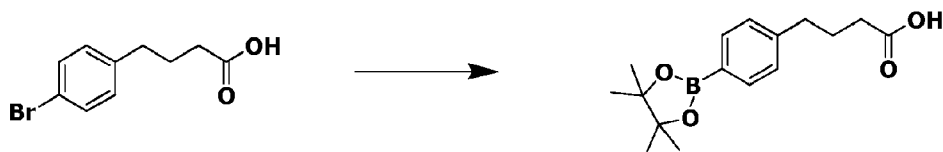
Se disuelve *N*-(4-(4-bromofenoxi)butil)ftalimida (6,01 g, 16,1 mmol) en etanol (200 ml) en atmósfera de nitrógeno, seguido de la adición de monohidrato de hidracina (7,8 ml, 161 mmol). La reacción se sometió a reflujo a 80 °C durante 2 horas. Una vez completada la reacción (se formaron sólidos en la capa superior), se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se neutralizó con HCl 1 M (50 ml). La mezcla se deja agitar hasta que todos los sólidos se disuelven completamente y se diluye con diclorometano (150 ml). La solución se extrajo con dos partes de  $NaHCO_3$  saturado (2×). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y agua, después se secaron en  $MgSO_4$  y se filtraron. La eliminación del disolvente produce un aceite amarillo (2,93 g, 75 %).

Etapas 3: *Terc*-butil 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato.

Se disolvió 4-(4-bromofenoxi)butan-1-amina (1,0 g, 4,09 mmol) en THF anhidro (20 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se agitó hasta que la solución fue homogénea. Se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (1,34 g, 6,14 mmol) y la reacción se agitó a 40 °C durante 2 horas. La reacción se detuvo con agua (30 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1,0 hora. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 ml × 2). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con  $NaHCO_3$  saturado, agua y salmuera, después se secaron en  $MgSO_4$  y se filtraron. La eliminación del disolvente produjo un sólido, que se purificó mediante cromatografía en columna (9:1, hexanos:EtOAc) para producir sólidos blancos (1,0 g, 71 %).

Ejemplo 4b: Síntesis de *tert*-butil 4-(4-bromofenil)butanoato

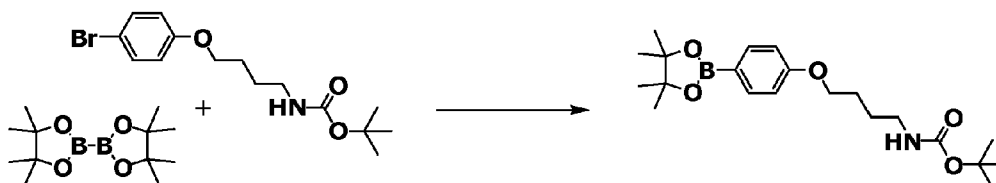
Se deja fundir el *tert*-butanol y se añaden 20 ml al matraz de fondo redondo. A la solución, se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (1,79 g, 8,22 mmol) y ácido 4-(4-bromofenil)butírico (1,0 g, 4,11 mmol). A continuación, se añadió a la reacción DMAP (150,7 mg, 1,23 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se concentró al vacío y se volvió a diluir en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con HCl 1 M, salmuera y agua. Tras retirar el disolvente, los sólidos brutos se purificaron mediante cromatografía en columna (20:1, hexanos:EtOAc) para dar el producto deseado (570 mg, 46 %), que es un aceite claro.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  = 7,39-7,41 (d, 2H), 7,03-7,09 (d, 2H), 2,57-2,60 (t, 2H), 2,18-2,21 (t, 2H), 1,83-1,186 (p, 2H), 1,42 (s, 9H).

**Ejemplo 4c:** Síntesis del ácido 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)butanoico

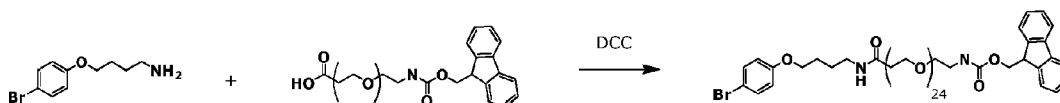
5

Se combinaron ácido 4-(4-bromofenil)butírico (10 g, 41,13 mmol), bis(pinacolato)diboro (15,67 g, 61,70 mmol), acetato de potasio (12,11 g, 123,4 mmol) y DMSO (100 ml), y se purgó la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente. A la reacción en nitrógeno, se añadió Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> y se purgó la reacción nuevamente con nitrógeno durante otros 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se sometió a reflujo a 80 °C durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con agua y se agitó durante 1,0 hora. Los sólidos formados se filtraron con un embudo Buchner. Los sólidos brutos se purificaron mediante cromatografía en columna (8,5:1,5, hexanos/EtOAc). Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron al vacío y se trituraron con hexanos y se filtraron para dar los sólidos blancos deseados (6,7 g, 56%).

10

**Ejemplo 5:** Síntesis del enlazador o unidad de protección, 4(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)butilcarbamato de *terc*-butilo

Se combinó 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato de *terc*butilo del ejemplo 4a (500 mg, 1,45 mmol), acetato de potasio (428 mg, 4,36 mmol), bis(pinacolato)diboro (737 mg, 2,90 mmol) y DMSO (12 ml), y se purgó la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla se añadió Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (59,3 mg, 0,07 mmol) y se continuó agitando la solución a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante otros 20 minutos. Después de someterla a reflujo a 80 °C durante 3 horas, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se detuvo con agua (30 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (50 ml × 2). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, después se secaron en MgSO<sub>4</sub> y se filtraron. La eliminación del disolvente produjo un aceite de color marrón oscuro, que se purificó mediante cromatografía en columna (9:1, hexanos:EtOAc) para producir un aceite de color amarillo claro (539 mg, 95 %).

**Ejemplo 6:** Síntesis de un enlazador o unidad de protección con un espaciador de oligoéter largo entre haluro de arilo de fenilo y una amina primaria protegida por Fmoc

4-(4-bromofenoxi)butan-1-amina + oligoéter-Fmoc + N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

(9H-fluoren-9-il)metil

80-(4-bromofenoxi)-75-oxo-

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-tetracosaoxa-76-azaoctacontilcarbamato. Se combinaron 4-(4-bromofenoxi)butan-1-amina (21,5 mg, 0,09 mmol), ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-pentacosaoxa-4-azanonaheptacontan-79-oico (100 mg, 0,073 mmol) y N,N'-dimetilaminopiridina (5,4 mg, 0,044 mmol) en un matraz de fondo redondo enjuagado con nitrógeno y se cargaron con una barra agitadora de teflón. A continuación, se añadieron 5 ml de diclorometano anhidro con una jeringa. Se transfiere N,N'-diciclohexilcarbodiimida (23 mg, 0,11 mmol) a un segundo matraz enjuagado con nitrógeno y se carga con una barra agitadora y se añaden 5 ml de diclorometano anhidro con una jeringa. Mientras se agita la primera solución, se añade lentamente la solución de diciclohexilcarbodiimida, gota a gota. A continuación, se deja que la reacción prosiga durante la noche. Al día siguiente, los sólidos de la reacción se separaron por filtración y el filtrado se concentró en sílice. La cromatografía en columna en metanol y diclorometano dio un aceite espeso claro (83,3 mg, rendimiento del 71 %).

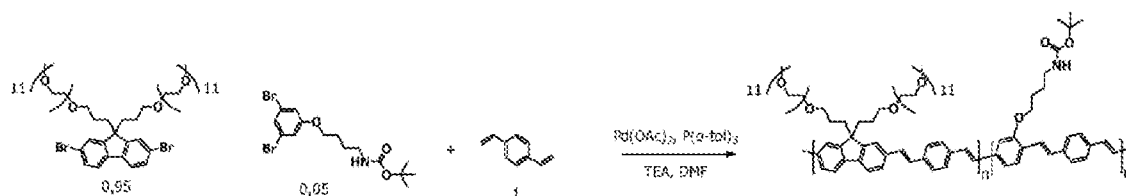
**Ejemplo 7:** Síntesis del polímero, poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}-co-3,5-fenilbut-1'-oxi-4"-amina], con un sitio de enlace interno

La incorporación de sitios de conjugación internos en cadenas principales de polímeros conjugados se describe en la

solicitud de EE. UU. n.º de serie 11/868.870, presentada el 8 de octubre de 2007 y publicada como solicitud de EE. UU. n.º 2008/0293164. Se proporciona una síntesis modificada basada en el protocolo.

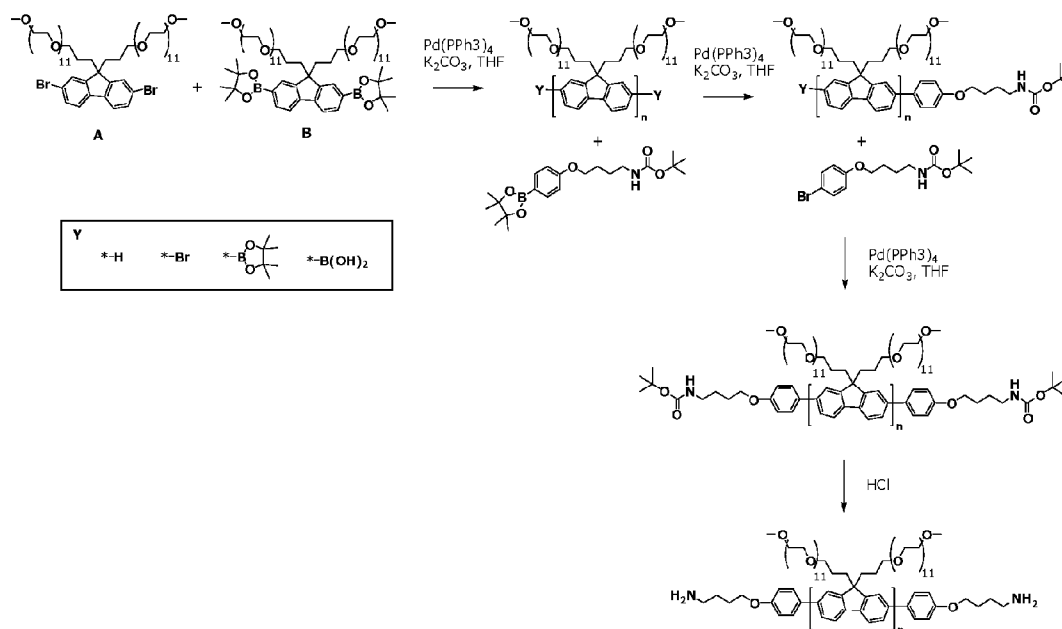
Se combinan 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11,14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (0,084 mmol, 120 mg), 9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (0,088 mmol, 135 mg), -4-(3,5-dibromofenoxi)butilcarbamato de *tert*-butilo (0,0044 mmol, 2,0 mg) y tetra(trifenilfosfina) de paladio (0,0035 mmol, 4 mg) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora. Seguidamente, se añaden 0,35 ml de carbonato potásico (acuoso) 2 M y 1,9 ml de tetrahidrofurano y se equipa el matraz con un adaptador de vacío y se coloca en una línea Schlenk. La mezcla se desgasifica mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación. La mezcla desgasificada se calienta a 80 °C en atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa durante 18 horas. A continuación, se enfría la mezcla de reacción y el disolvente se elimina con evaporación rotatoria. Seguidamente, se añaden 4 ml de HCl 4 M en dioxano y la mezcla se agita durante no menos de 4 horas. La solución se neutraliza con una solución de carbonato de potasio 2 M. La mayor parte del disolvente se elimina de nuevo mediante evaporación rotatoria. El semisólido resultante se diluye con unos 50 ml de agua y se filtra a través de papel de filtro de fibra de vidrio. Se añade etanol para ajustar el disolvente a etanol al 20 % en agua. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realiza con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se elimina con evaporación rotatoria y se recogen 100 mg de poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35'-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}-co-3,5-*tert*-butil-4-(4-bromofenoxi)amina] en forma de un aceite de color ámbar.

#### Ejemplo 8: Síntesis del copolímero de fenileno vinileno con un sitio de enlace interno



Una síntesis modificada similar a la descrita en los ejemplos 7 y 15.

#### Ejemplo 9: Síntesis del polímero con unidades de protección de aminas exclusivamente terminales



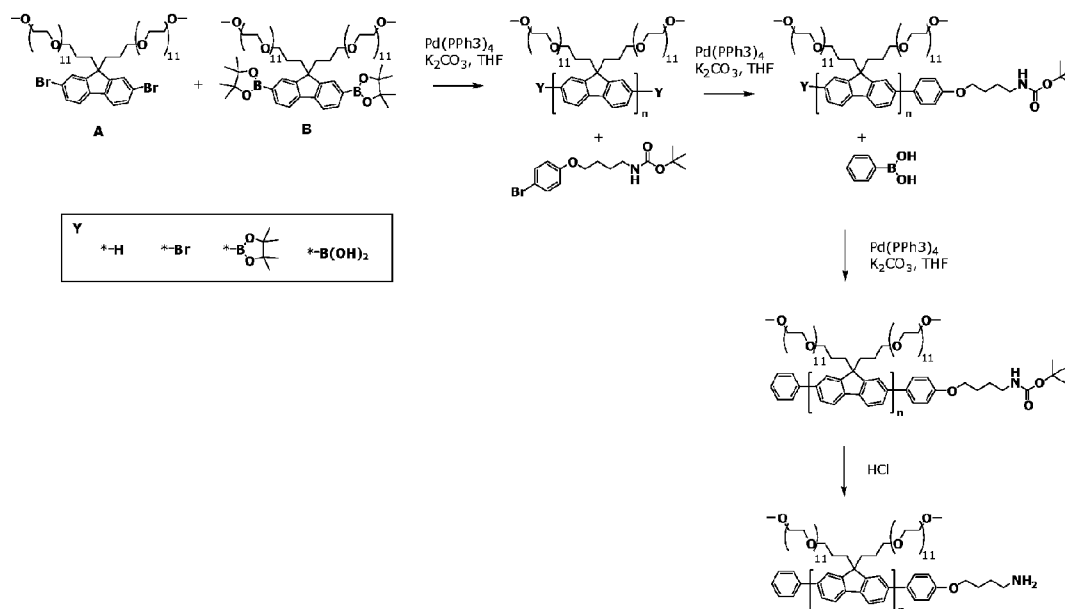
2,7-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35'-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}]-difen-4-oxibutil-4'-amina.

Se combinan 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (0,163 mmol, 235 mg), 9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (0,163 mmol, 250 mg) y tetra(trifenilfosfina) de paladio (0,0065, 7,5 mg) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora. Seguidamente, se añaden 0,75 ml de carbonato potásico (acuoso) 2 M y 3 ml de tetrahidrofurano y se equipa el matraz con un adaptador de vacío. La mezcla de reacción se pone en una línea Schenk y se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-

descongelación y después se calienta a 80 °C en atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa durante 18 horas. Una solución de 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)butilcarbamato de *tert*-butilo (0,064 mmol, 25 mg) en 0,5 ml de tetrahidrofurano se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añaden a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. Se deja que la reacción continúe durante 4 horas más a 80 °C con agitación. Seguidamente, una solución de 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato de *tert*-butilo (0,192 mmol, 66 mg) en 0,5 ml de THF se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añade a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. La reacción se dejó proseguir durante la noche. La mezcla de reacción se dejó enfriar y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. Se añadió al residuo una parte de 4 ml de HCl 4 M en dioxano y se agitó durante un mínimo de 4 horas. La solución se neutralizó con carbonato potásico (acuoso) 2 M y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo resultante se diluyó hasta aproximadamente 30 ml con etanol al 20 % en agua y se filtró. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realiza con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se elimina con evaporación rotatoria y se recogen 337 mg de polímero en forma de un aceite de color ámbar.

El orden de adición del enlazador terminal (hiluro de arilo o éster/ácido borónico) se puede invertir. Se pueden utilizar procesos similares para añadir enlazadores alternativos o unidades de protección terminal.

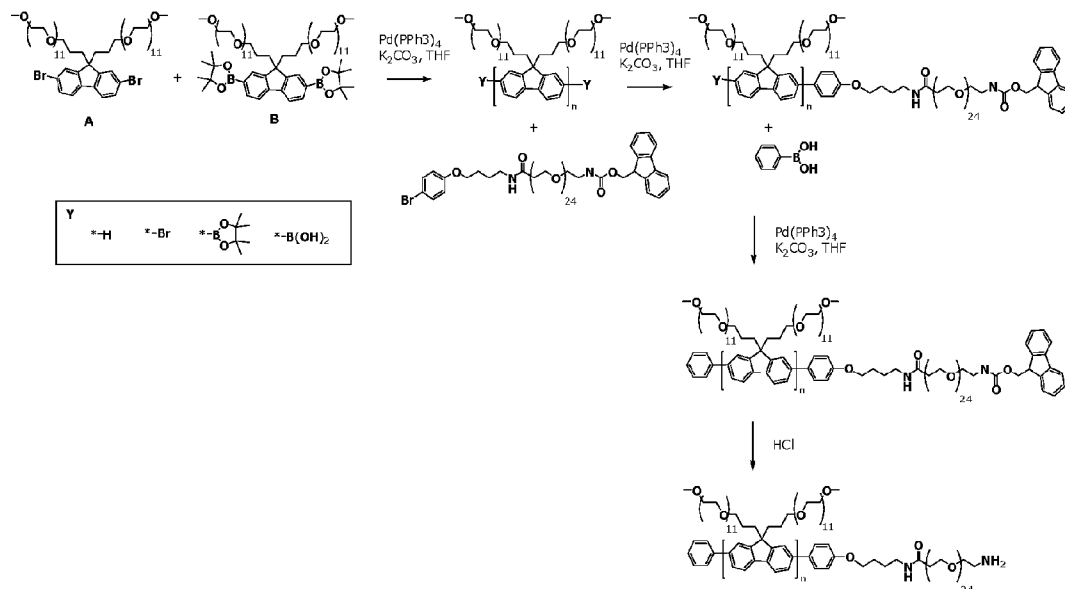
**Ejemplo 10: Síntesis del polímero, 2-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}]-fen-4-oxibutil-4'-amina, enriquecido estadísticamente en cadenas con una única unidad de protección terminal de amina**



Se combinan 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontano)-38'-il)fluoreno (0,163 mmol, 235 mg), 9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontano)-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (0,163 mmol, 250 mg) y tetra(trifenilfosfina) de paladio (0,0065, 7,5 mg) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora. Seguidamente, se añaden 0,75 ml de carbonato potásico (acuoso) 2 M y 3 ml de tetrahidrofurano y se equipa el matraz con un adaptador de vacío. La mezcla de reacción se pone en una línea Schenk y se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calienta a 80 °C en atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa durante 18 horas. Una solución de 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato de *tert*-butilo (0,049 mmol, 17 mg) en 0,5 ml de tetrahidrofurano se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añade a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. Se deja que la reacción continúe durante 4 horas más a 80 °C con agitación. Seguidamente, una solución de ácido fenilborónico (0,150 mmol, 18 mg) en 0,5 ml de THF se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añade a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. La reacción se dejó proseguir durante la noche. La mezcla de reacción se dejó enfriar y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. Se añadió al residuo una parte de 4 ml de HCl 4 M en dioxano y se agitó durante al menos 4 horas. La solución se neutralizó con carbonato potásico (acuoso) 2 M y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo resultante se diluyó hasta aproximadamente 30 ml con etanol al 20 % en agua y se filtró. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realiza con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se elimina con evaporación rotatoria y se recogen 315 mg de polímero en forma de un aceite de color ámbar. Los polímeros resultantes contienen cadenas con una fracción enriquecida de cadenas con un enlazador de amina más cadenas con 2 enlazadores y sin enlazadores.

**Ejemplo 11: Síntesis del polímero estadísticamente enriquecido en cadenas con una única unidad de protección terminal con un espaciador de oligoéter largo (24 repeticiones) entre la cadena del polímero y el grupo de enlace de la amina primaria**

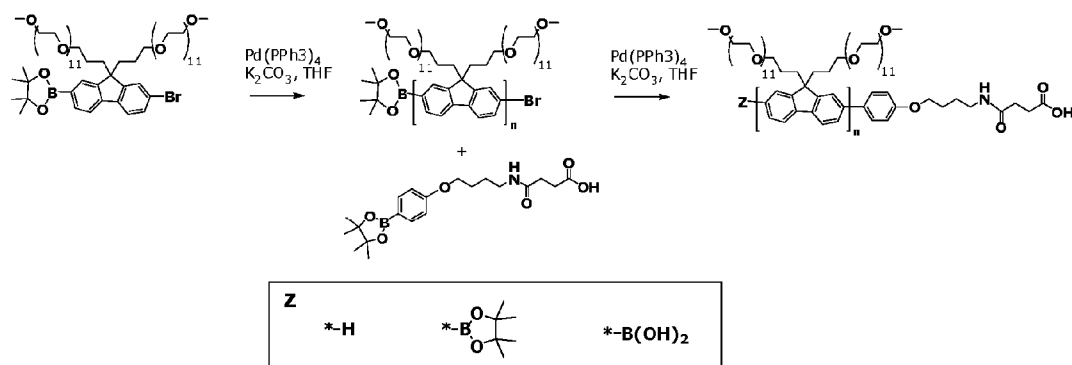
5



2-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}]-fen-4-oxibutilo-4'-amina. Se combina 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (0,163 mmol, 235 mg), 9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)fluoreno (0,163 mmol, 250 mg) y tetra(trifenilfosfina) de paladio (0,0065, 7,5 mg) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora. Seguidamente, se añaden 0,75 ml de carbonato potásico (acuoso) 2 M y 3 ml de tetrahidrofurano y se equipa el matraz con un adaptador de vacío. La mezcla de reacción se pone en una línea Schenk y se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calienta a 80 °C en atmósfera de nitrógeno con agitación vigorosa durante 18 horas. Una solución de 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato de *tert*-butilo (0,049 mmol, 17 mg) en 0,5 ml de tetrahidrofurano se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añade a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. Se deja que la reacción continúe durante 4 horas más a 80 °C con agitación. Seguidamente, una solución de ácido fenilborónico (0,150 mmol, 18 mg) en 0,5 ml de THF se desgasifica con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añade a la reacción de polimerización mediante una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. La reacción se dejó proseguir durante la noche. La mezcla de reacción se dejó enfriar y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. Se añadió al residuo una parte de 4 ml de HCl 4 M en dioxano y se agitó durante un mínimo de 4 horas. La solución se neutralizó con carbonato potásico (acuoso) 2 M y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo resultante se diluyó hasta aproximadamente 30 ml con etanol al 20 % en agua y se filtró. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realiza con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se elimina con evaporación rotatoria y se recogen 315 mg de polímero en forma de un aceite de color ámbar.

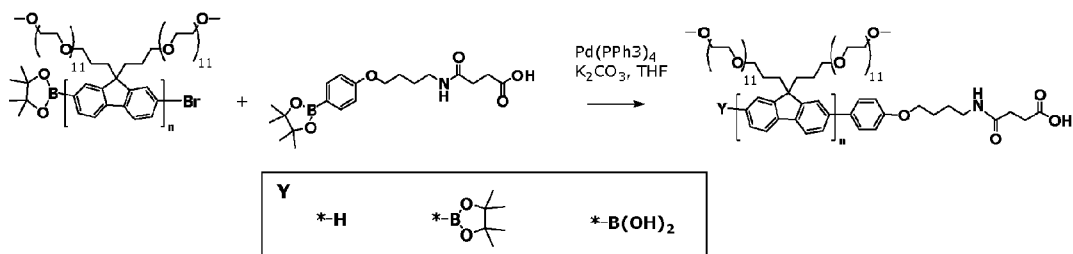
**Ejemplo 12: Síntesis de un polímero asimétrico con una unidad de protección carboxílica terminal añadida durante la reacción de polimerización**

30



El monómero de enlace se añade durante la reacción de polimerización como se describe en los ejemplos 9, 10 y 11. El grupo ácido carboxílico se puede convertir posteriormente en un éster activado, tal como N-hidroxisuccinimido, como se describe en el ejemplo 29.

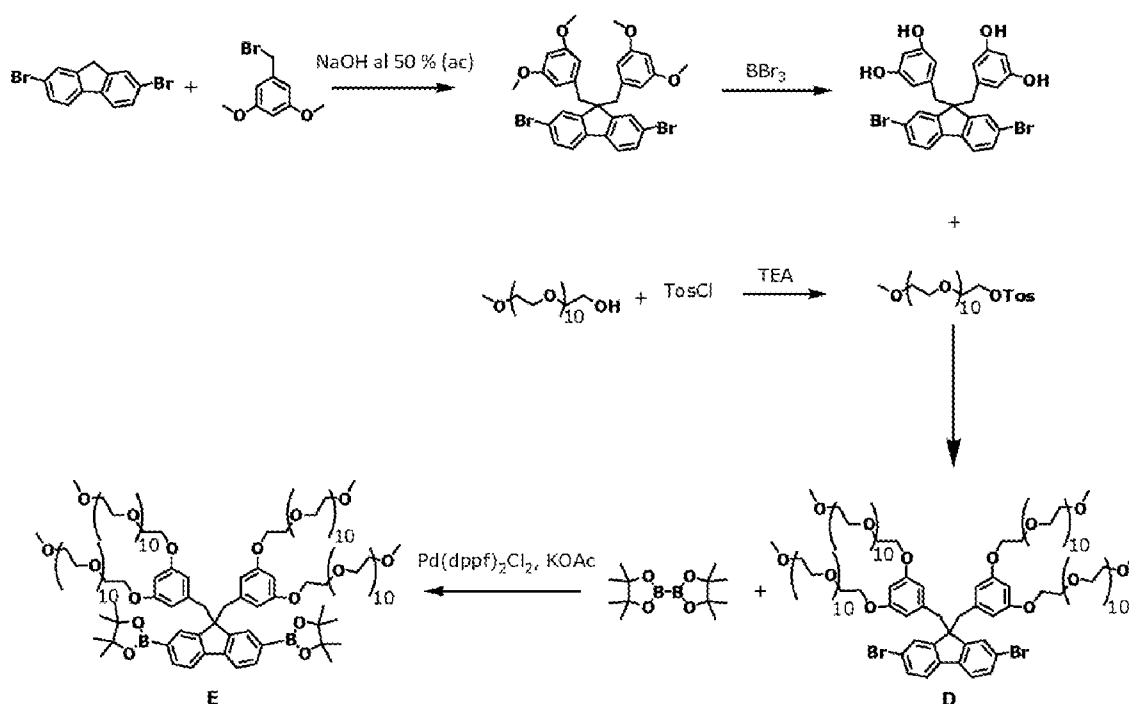
**5 Ejemplo 13: Síntesis de un polímero asimétrico con una unidad de protección de ácido carboxílico terminal añadida después de la polimerización**



10 El monómero de enlace se añade después de que se completa la reacción de polimerización y se purifica el polímero. La adición del enlazador se realiza en condiciones de reacción similares a las descritas en los ejemplos 9, 10 y 11. El grupo ácido carboxílico se puede convertir posteriormente en un éster activado, tal como N-hidroxisuccinimido, como se describe en el ejemplo 29.

**15 Ejemplo 14: Síntesis de un polímero con grupos PEG ramificados**

Ejemplo 14a: Síntesis de los monómeros, (D) y (E) para su posterior polimerización



Etapas 1: 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-dimetoxibencil)fluoreno.

Se añadieron 2,7-dibromofluoreno (4,16 g, 12,8 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (362 mg, 1,12 mmol) a un matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora de teflón. Seguidamente, se añadieron 60 ml de dimetilsulfóxido al matraz y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Se añadió una parte de solución acuosa de NaOH al 50 % (5,2 ml) seguido inmediatamente de bromuro de 3,5-dimetoxibencilo (7,14 g, 31 mmol). En el transcurso de 2 horas la solución cambia de color de naranja a azul. La reacción se agita durante la noche. La mezcla resultante se vierte lentamente en 200 ml de agua y después se extrae con tres partes de 100 ml de diclorometano. Las capas orgánicas se combinan y se secan sobre sulfato de magnesio y después se filtran. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna con hexanos y diclorometano como eluyente para dar un sólido amarillo pálido (6,63 g, rendimiento del 79 %).

Etapas 2: 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-dihidroxibencil)-9H-fluoreno.

Se añadió 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-dimetoxibencil)-9H-fluoreno (1,3 g, 2,08 mmol) a un matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora y equipado con una membrana de goma. El matraz se purga con nitrógeno durante 10 min. Se transfiere diclorometano anhidro (20 ml) al matraz mediante una cánula y la mezcla se agita hasta que los sólidos se disuelven completamente. A continuación, se enfría la solución con un baño de hielo seco/acetona durante 10 minutos. Se añade gota a gota  $\text{BBr}_3$  (6,1 ml, 63,3 mmol) mediante una cánula con agitación constante. Se deja calentar el baño hasta temperatura ambiente y la mezcla se agita durante la noche. La reacción se detiene con la adición lenta de 125 ml de agua. Después, se extrae la solución con 3 partes de acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica se seca sobre  $\text{MgSO}_3$ , se filtra y se seca en sílice. La cromatografía ultrarrápida del bruto con acetato de etilo en diclorometano da un sólido cristalino blanquecino (800 mg, rendimiento del 68 %).

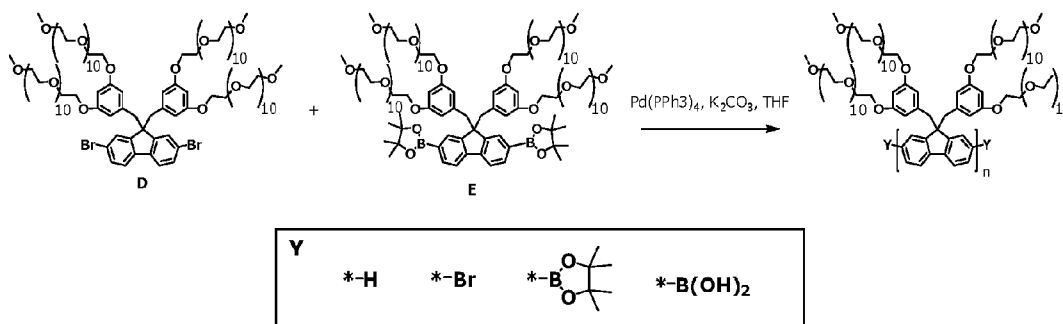
**Etapas 3:** 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaotatetriacontan-34-il)bencil)-9H-fluoreno (D).

Se transfieren 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-dihidroxibencil)-9H-fluoreno (537 mg, 0,945 mmol), 4-metilbencenosulfonato de 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaotatetriacontan-34-ilo (2,788 g, 4,156 mmol), carbonato de potasio (1,57 g, 11,34 mmol) y acetona (80 ml) a un matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora de teflón y equipado con un condensador de reflujo. La mezcla se calienta a reflujo con agitación constante durante la noche. A continuación, se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se elimina la acetona al vacío. Después de extraer con 3 partes de diclorometano, la capa orgánica se seca en  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y el filtrado se concentra en sílice. La cromatografía en columna con metanol y diclorometano proporciona el producto en forma de un aceite espeso ligeramente coloreado (1,69 g, rendimiento del 70 %).

**Etapas 4:** 2,7-di(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolanil)-9,9-bis(3,5-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaotatetriacontan-34-il)bencil)-9H-fluoreno (E).

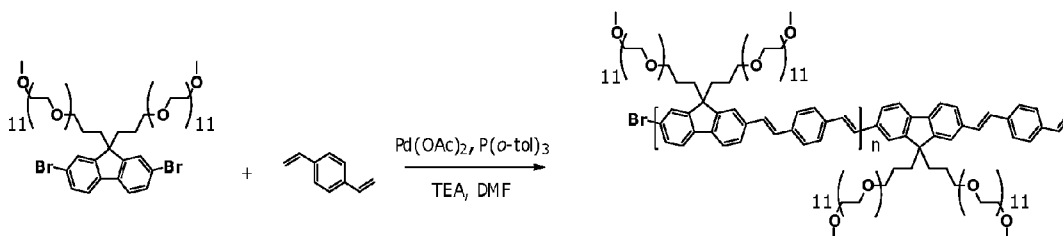
El monómero (E) se sintetiza en condiciones similares a las condiciones descritas en el ejemplo 1.

**Ejemplo 14b:** Polimerización de (D) y (E)

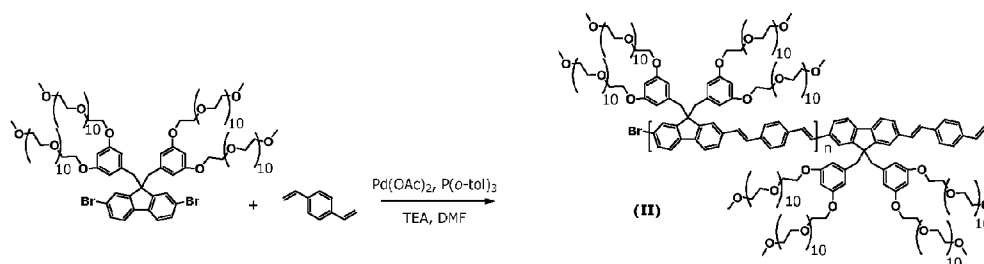


Se polimerizan (D) y (E) en condiciones similares a las condiciones de polimerización como se describe en el ejemplo 1b.

**Ejemplo 15: Síntesis de un copolímero de fenileno vinileno de base neutra**

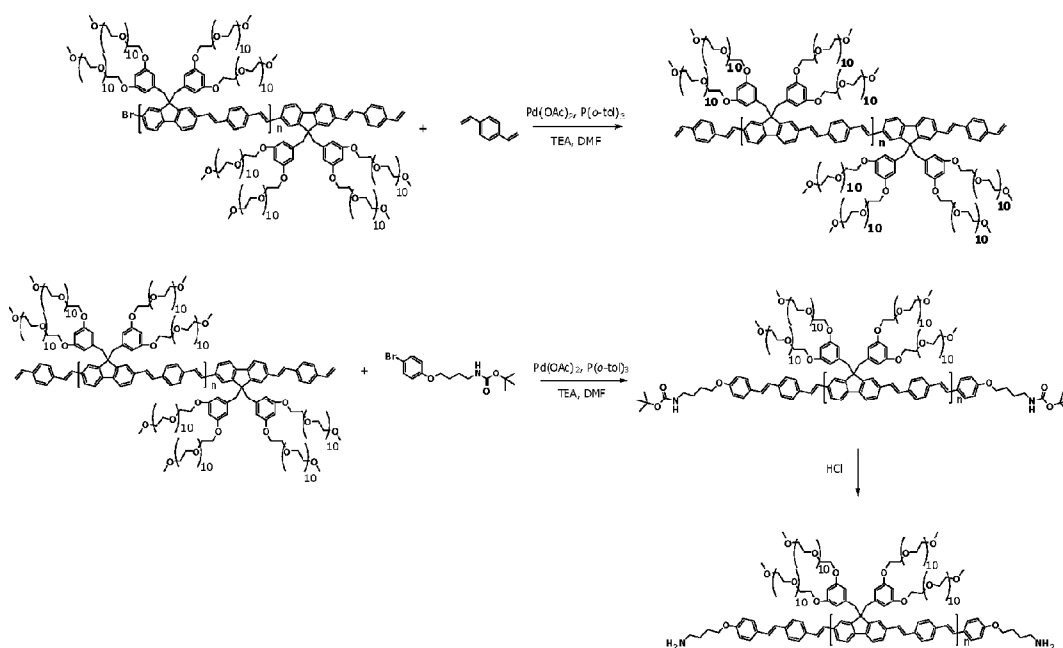


Se combinan 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)fluoreno (0,25 mmol), 1,4-divinilbenceno (32,3 mg, 0,25 mmol), acetato de paladio (3 mg, 0,013 mmol), tri-orto-tolilfosfina (10 mg, 0,033 mmol) y carbonato de potasio (162 mg, 1,2 mmol) con 5 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora recubierta de teflón. El matraz se equipa con una válvula de aguja y se coloca en una línea de Schlenk. La solución se desgasifica mediante tres ciclos de congelación, bombeo y descongelación. A continuación, la mezcla se calienta hasta 100 °C durante la noche. El polímero se puede hacer reaccionar posteriormente con enlazadores o unidades de protección terminales mediante protocolos (*in situ*) similares a los proporcionados en los ejemplos anteriores (9, 10 y 11) o mediante la modificación después de la polimerización como un conjunto de reacciones separado.

**Ejemplo 16: Síntesis de un copolímero de fenileno vinileno ramificado**

- 5 Se combinaron 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradeca-34-yl)bencil)-9H-fluoreno (636 mg, 0,25 mmol), 1,4-divinilbenceno (32,3 mg, 0,25 mmol), acetato de paladio (3 mg, 0,013 mmol), tri-orto-tolilfosfina (10 mg, 0,033 mmol) y carbonato de potasio (162 mg, 1,2 mmol) con 5 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora recubierta de teflón. El matraz se equipó con una válvula de aguja y se colocó en una línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación, bombeo y descongelación. A continuación, la mezcla se calentó hasta 100 °C durante la noche. El polímero se puede hacer reaccionar posteriormente con enlazadores o unidades de protección terminales mediante protocolos (*in situ*) similares a los proporcionados en el ejemplo 5 o mediante la modificación después de la polimerización como un conjunto de reacciones separado.

- 15 **Ejemplo 17: Síntesis de un copolímero de fenileno vinileno ramificado con aminas funcionales para conjugación covalente. Poli[2,7-divinil{9,9-bis(3,5-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradeca-34-yl)bencil)-9H-fluoreno}-alt-1,4-benceno-co-4-fenoxibutil-N-t-butilcarbamato].**

**Etapla 1: Polimerización**

- 25 Se combinaron 2,7-dibromo-9,9-bis(3,5-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradeca-34-yl)bencil)-9H-fluoreno (636 mg, 0,25 mmol), 1,4-divinilbenceno (32,3 mg, 0,25 mmol), acetato de paladio (3 mg, 0,013 mmol), tri-orto-tolilfosfina (10 mg, 0,033 mmol) y carbonato de potasio (162 mg, 1,2 mmol) con 5 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora recubierta de teflón. El matraz se equipó con una válvula de aguja y se colocó en una línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación, bombeo y descongelación. A continuación, la mezcla se calentó hasta 100 °C durante la noche.

**Etapla 2: Adición del enlazador**

- 35 A la mañana siguiente se transfirió divinilbenceno (10 mg, 0,077 mmol) a un pequeño matraz de fondo redondo con 1 ml de DMF. El matraz se equipó con una válvula de aguja y se colocó en una línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación, bombeo y descongelación. La solución se transfirió con una cánula a través de las válvulas de aguja y hacia la reacción de polimerización. Después de esta adición, se dejó que la reacción

continuara a 100 °C durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamatato de *terc*-butilo (53 mg, 0,15 mmol) y 1 ml de DMF a un pequeño matraz de fondo redondo. El matraz se equipó con una válvula de aguja y se colocó en una línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación, bombeo y descongelación. La solución se transfirió con una cánula a través de las válvulas de aguja y hacia la reacción de polimerización. Después de esta adición, se dejó que la reacción continuara a 100 °C durante la noche.

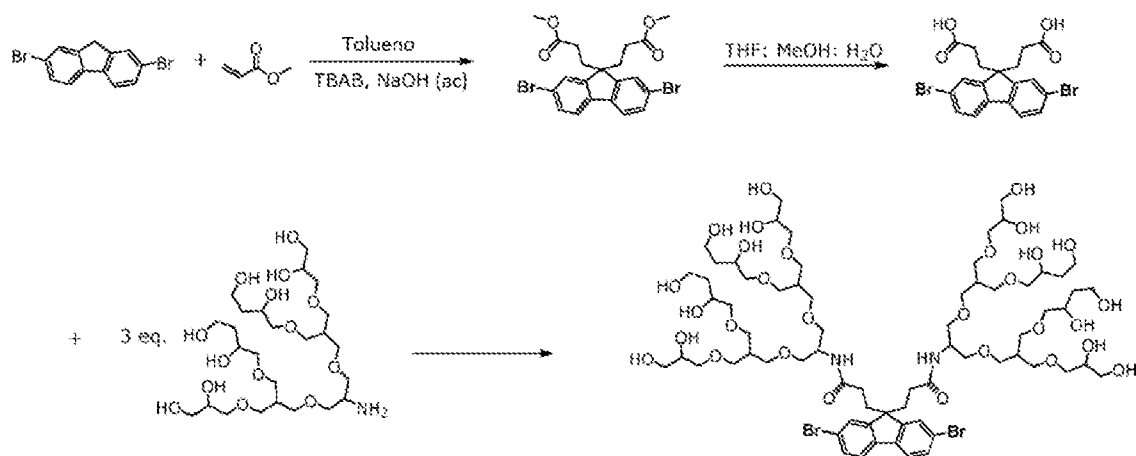
### Etapa 3: Elaboración

A continuación, se enfría la reacción y se diluye con 100 ml de agua. La solución acuosa se filtró dos veces a través de papel de filtro de fibra de vidrio G-6. El filtrado se evaporó hasta la sequedad y se volvió a diluir con diclorometano. La capa orgánica se secó en  $\text{MgSO}_4$  y se filtró. El filtrado se evaporó para producir un aceite de color ámbar (342 mg, rendimiento del 56 %).

Se añadió una parte de 4 ml de HCl 4 M en dioxano al residuo polimérico y se agitó durante un mínimo de 4 horas. La solución se neutralizó con carbonato potásico (acuoso) 2 M y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo resultante se diluyó hasta aproximadamente 30 ml con etanol al 20 % en agua y se filtró. La cromatografía de permeación en gel preparativa se realiza con medio desalinizador G-25 para eliminar el exceso de sales del polímero. El disolvente de las fracciones se elimina con evaporación rotatoria y el polímero se recoge en forma de un aceite de color ámbar.

Las etapas de adición de enlazador o unidad de protección se pueden realizar en la reacción de polimerización como se presentó anteriormente o, como alternativa, en algunas realizaciones, se puede realizar en un conjunto separado de reacciones después del proceso de polimerización. En el último caso, el polímero se hace reaccionar en condiciones análogas a las proporcionadas en el ejemplo. En otras realizaciones, también es posible hacer reaccionar con una combinación de monómeros terminales para introducir polímeros con bifuncionalidad, permitiendo que el polímero se conjugue con más de una entidad.

### Ejemplo 18: Síntesis de un monómero de fluoreno con dendrímeros a base de glicerol



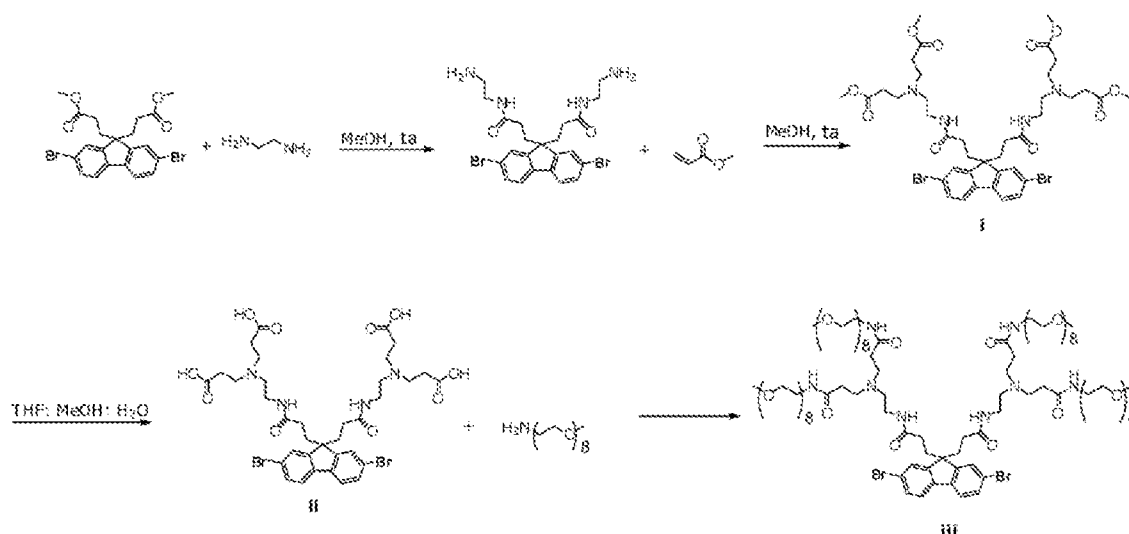
**Etapa 1:** 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)dipropionato de dimetilo. Se añadieron 2,7-dibromofluoreno (1 g, 3,1 mmol), acrilato de metilo (861 mg, 10 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (100 mg, 0,3 mmol) y tolueno (5 ml) a un pequeño matraz de fondo redondo con una barra agitadora recubierta de teflón. A continuación, se añaden 2 ml de NaOH (acuoso) al 50 % mientras se agita. Se deja que la reacción prosiga durante la noche. Al día siguiente, la capa de tolueno se transfiere a un matraz y la capa acuosa se extrae con dos partes de tolueno. Las capas orgánicas se combinan, se secan con  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  y se filtran. Se añade sílice (2 g) al filtrado y se evapora la solución. El producto se obtiene como un sólido blanco (1,23 g, rendimiento del 80 %) después de la purificación mediante cromatografía en columna.

**Etapa 2:** Ácido 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)dipropánico. Se transfiere 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)dipropionato de dimetilo (1,23 g, 2,5 mmol) a un pequeño matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón. Se añade una mezcla de THF:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:2:1, (10 ml) y la mezcla se agita durante 1 h. A continuación, se añade una parte de 1 ml de NaOH (acuoso) 1 M y la mezcla se agita durante la noche. Al día siguiente, se aísla la capa de agua y se extrae con partes de 20 ml de éter dietílico tres veces. A continuación se acidifica la capa de agua hasta -pH 2. La capa de agua se extrae tres veces con partes de 20 ml de diclorometano. Las capas orgánicas se combinan y se secan con  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ . La solución orgánica se filtra y el disolvente se evapora para obtener el producto en forma de un sólido blanquecino (948 mg, rendimiento del 90 %).

**Etapa 3:** 3,3'-(2,7-Dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)bis(N-(7,15-bis((2,3-dihidroxipropoxi)metil)-1,3,19,21-tetrahidroxi-

5,9,13,17-tetraoxahenicosan-11-il)propanamida). Se combinaron ácido 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)dipropoico (500 mg, 1,1 mmol), 11-amino-7,15-bis((2,3-dihidroxipropoxi)metil)-5,9,13,17-tetraoxahenicosano-1,3,19,21-tetraol (1,954, 3,3 mmol) (preparado según la referencia de Heek, T.; Fasting, C.; Rest, C.; Zhang, X.; Wurthner, F.; Haag, R. Chem. Commun., 2010, 46, 1884-1886) y N,N'-dimetilaminopiridina (61 mg, 0,5 mmol) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón y sellado con una membrana de goma. El matraz se enjuagó con N<sub>2</sub> y se añadieron 10 ml de diclorometano anhidro con una jeringa. La mezcla se agita para disolver los sólidos. En otro matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón, se transfiere dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 910 mg, 4,4 mmol) y se sella el matraz con una membrana de goma. Seguidamente, se transfieren 5 ml de diclorometano anhidro al matraz con una jeringa. La solución de DCC se transfiere a la mezcla de reacción de fluoreno con una jeringa gota a gota. Se deja reaccionar la reacción durante la noche. Al día siguiente, se filtra la mezcla de reacción. El filtrado se purifica mediante cromatografía en columna para proporcionar un aceite transparente (1,24 g, rendimiento del 70 %).

**Ejemplo 19: Síntesis de una cadena lateral dendrítica a base de monómero de fluoreno PAMAM recubierta con cadenas de metilPEG**



**Etapas 1: 9,9'-(3,3'-diamido(tetrametil PAMAM G[2])-2,7-dibromofluoreno (i).**

Se transfiere 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluoren-9,9-diil)dipropoato de dimetilo (1 g, 2,0 mmol) a un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora y se sella con una membrana de goma. El matraz se enjuaga con nitrógeno y se transfieren 10 ml de metanol seco al matraz con una jeringa y el sólido se disuelve mediante agitación. Se añade lentamente etilendiamina (5,5 ml, 82 mmol) con una jeringa y la mezcla se deja en agitación durante 2 horas. Se retira la membrana y se eliminan al vacío el metanol y la etilendiamina que no ha reaccionado. Se añade otra parte de 10 ml de metanol y se agita y después se evapora para eliminar cualquier etilendiamina restante. El residuo que quedó en el matraz se volvió a cerrar con una membrana, se enjuagó con nitrógeno y se añadió metanol seco (10 ml) y se agitó. Se añade lentamente acrilato de metilo (7,2 ml, 80 mmol) con una jeringa y la mezcla se deja en agitación durante 2 horas. Se retira de nuevo la membrana y se eliminan al vacío el metanol y el acrilato de metilo. Se añade una parte de 10 ml de tolueno, la mezcla se agita y el disolvente se elimina al vacío proporcionando un sólido blanquecino (1,79 g, rendimiento cuantitativo).

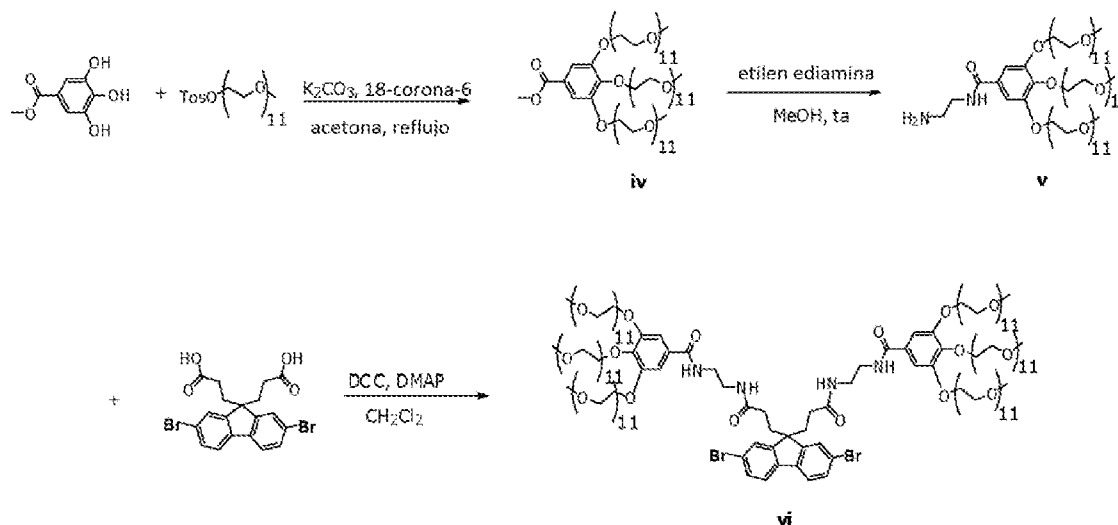
**Etapas 2: 9,9'-(3,3'-diamido(PAMAM G[2] tetraácido)-2,7-dibromofluoreno (ii).**

Se transfiere 9,9'-(3,3'-Diamido(tetrametil PAMAM G[2])-2,7-dibromofluoreno (i) (1,79 g, 2 mmol) a un pequeño matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón. Se añade una mezcla de THF:MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:2:1, (10 ml) y la mezcla se agita durante 1 h. A continuación, se añade una parte de 1 ml de NaOH (acuoso) 1 M y la mezcla se agita durante la noche. Al día siguiente, se aísla la capa de agua y se extrae con partes de 20 ml de éter dietílico tres veces. A continuación se acidifica la capa de agua hasta -pH 2. La capa de agua se extrae tres veces con partes de 20 ml de diclorometano. Las capas orgánicas se combinan y se secan con Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solución orgánica se filtra y el disolvente se evapora para obtener el producto en forma de un sólido blanquecino (1,51 g, rendimiento del 90 %).

**Etapas 3: 9,9'-(3,3'-diamido(PAMAM G[2]N-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)propionamidil)-2,7-dibromofluoreno (iii).**

Se combinan 9,9'-(3,3'-diamido(PAMAM G[2] tetraácido)-2,7-dibromofluoreno (ii) (500 mg, 0,6 mmol), 2,5,8,11,14,17,20,23-octaioxapentacosan-25-amina (1,15 g, 3 mmol) y N,N'-dimetilaminopiridina (12 mg, 0,1 mmol) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón y sellada con una membrana de goma. El matraz se enjuagó con N<sub>2</sub> y se añadieron 10 ml de diclorometano anhidro con una jeringa. La mezcla se agita para disolver los sólidos. En otro matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón, se transfiere dicitlohexilcarbodiimida (DCC, 825 mg, 4,0 mmol) y se sella el matraz con una membrana de goma. Seguidamente, se transfieren 5 ml de diclorometano anhidro al matraz con una jeringa. La solución de DCC se transfiere a la mezcla de reacción de fluoreno con una jeringa gota a gota. Se deja reaccionar la reacción durante la noche. Al día siguiente, se filtra la mezcla de reacción. El filtrado se purifica mediante cromatografía en columna para proporcionar un aceite transparente (967 g, rendimiento del 70 %).

**Ejemplo 20: Síntesis de un monómero de fluoreno con cadenas laterales PEGiladas altamente ramificadas basadas en un enlace trihidroxibenceno**



**Etapas 1:** 3,4,5-tris(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo)benzoato de metilo (iv).

Se transfieren 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (200 mg, 1,1 mmol), 4-metilbencenosulfonato de 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo (2,58 g, 3,85 mmol) y 18-corona-6 (100 mg, 0,38 mmol) a un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón. Se añade acetona (10 ml) y el matraz se equipa con un condensador de reflujo. La mezcla se calienta a reflujo con agitación constante durante la noche. Al día siguiente, se añade sílice (4 g) y se evapora el disolvente. Después de la purificación por cromatografía en columna, se obtiene un aceite transparente (887 mg, rendimiento del 48 %).

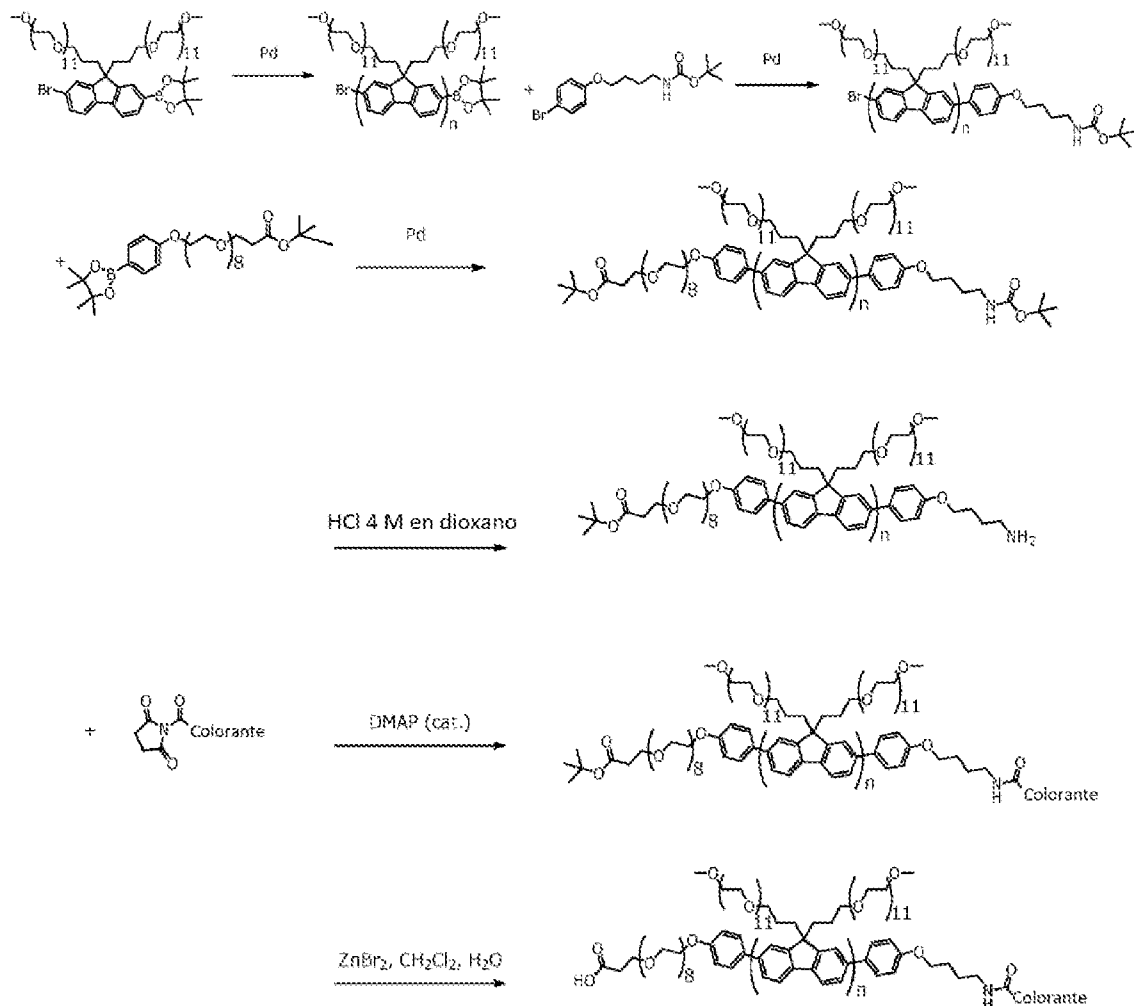
**Etapas 2:** 3,4,5-tris(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo)-N-(2-aminoetil)benzamida (v).

Se transfiere el matraz de 3,4,5-tris(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo)benzoato de metilo (iv) (887 mg, 0,52 mmol) a un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora y sellado con una membrana de goma. El matraz se enjuaga con nitrógeno y se transfieren 10 ml de metanol seco al matraz con una jeringa y el sólido se disuelve mediante agitación. Se añade lentamente etilendiamina (0,7 ml, 10,4 mmol) con una jeringa y la mezcla se deja en agitación durante 2 horas. Se retira la membrana y se eliminan al vacío el metanol y la etilendiamina que no ha reaccionado. El producto se obtiene en forma de aceite (886 mg, rendimiento cuantitativo).

**Etapas 3:** 3,3'-(2,7-Dibromo-9H-fluorene-9,9'-diil)bis(N-(2-3,4,5-tris(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo)-benzamidil-N amidoetil)propanamida) (vi).

Se combinan 3,4,5-Tris(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undeca-oxatetradecacontan-34-ilo)-N-(2-aminoetil)benzamida (v) (886 mg, 0,52 mmol), ácido 3,3'-(2,7-dibromo-9H-fluorene-9,9'-diil)diopropanoico (112 mg, 0,24 mmol) y N,N'-dimetilaminopiridina (12 mg, 0,1 mmol) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón y sellado con una membrana de goma. El matraz se enjuagó con N<sub>2</sub> y se añadieron 10 ml de diclorometano anhidro con una jeringa. La mezcla se agita para disolver los sólidos. En otro matraz de fondo redondo equipado con una barra agitadora recubierta de teflón, se transfiere dicitlohexilcarbodiimida (DCC, 148 mg, 0,72 mmol) y se sella el matraz con una membrana de goma. Seguidamente, se transfieren 5 ml de diclorometano anhidro al matraz con una jeringa. La solución de DCC se transfiere a la mezcla de reacción de fluoreno con una jeringa gota a gota. Se deja reaccionar la reacción durante la noche. Al día siguiente, se filtra la mezcla de reacción. El filtrado se purifica mediante cromatografía en columna para proporcionar un aceite transparente (924 mg, rendimiento del 70 %).

**Ejemplo 21. Polímero protegido con doble extremo utilizado para crear un polímero-marcador colorante para la conjugación de biomoléculas o sustratos**



**Etap 1:** Síntesis de un polímero hidrosoluble neutro asimétrico con un grupo colgante de amina protegido con t-BOC en un extremo del polímero.

2-bromo-7-(4"-fenoxibutil-1-*terc*-carbamato de butilo)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno.

Se transfirieron 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontano-38'-il)-7-(4",4",5",5"-tetrametil-1",3",2"-dioxaborolan-2-il)fluoreno (1,0 g, 0,674 mmol), 3 ml de tetrahidrofurano y 2 ml de carbonato de potasio 2 M (acuoso) a un pequeño matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora de teflón. Se equipó el matraz con una membrana y la solución se desgasificó mediante rociado de Ar durante 15 minutos. Se añadió tetra(trifenilfosfina) de paladio (15,6 mg, 0,013 mmol) a través del cuello del matraz y el matraz se transfirió a un condensador de reflujo equipado con una válvula de aguja y se fijó a una línea de Schlenk. La solución se congeló rápidamente con nitrógeno líquido y se desgasificó adicionalmente utilizando la técnica de congelación-bombeo-descongelación. Una vez desgasificada, la reacción se calentó a 80 °C con agitación constante. La reacción se dejó proseguir durante la noche. Al día siguiente, se desgasificó 4-(4-bromofenoxi)butilcarbamato de *terc*-butilo (35 mg, 0,10 mmol) en 1 ml de THF con tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se añadió a la reacción de polimerización con una cánula bajo exceso de presión de nitrógeno. La reacción continuó durante la noche a 80 °C. Al día siguiente se enfrió la mezcla de reacción y se eliminó la mayor parte del disolvente al vacío. El material restante se transfirió a un pequeño matraz Erlenmeyer con un total de ~50 ml de diclorometano. La solución se agitó durante 30 minutos. Se añadió aproximadamente 1 g de MgSO<sub>4</sub>(anhidro) a la solución y la mezcla se filtró a través de un filtro de papel acanalado. El filtrado se evaporó y se recogieron 410 mg (rendimiento del 47 %) de un aceite de color ámbar.

**Etap 2:** Síntesis para añadir un monómero de enlace terminal con un éster t-butilico en el extremo opuesto al colgante

de amina protegida.

2-(4-(*tert*-butil 1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oato))-7-(4"-fenoxibutil-1-*tert*-carbamato de butilo)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno.

Se transfirieron 2-bromo-7-(4"-fenoxibutil-1-*tert*-(carbamato de butilo)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno (410 mg, 0,32 mmol de unidad repetida), *tert*-butil 1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxtetracosan-24-oato (33 mg, 0,048 mmol), 2 ml de tetrahidrofurano y 1,5 ml de carbonato de potasio 2 M (acuoso) a un pequeño matraz de fondo redondo cargado con una barra agitadora de teflón. Se equipó el matraz con una membrana y la solución se desgasificó mediante rociado de Ar durante 15 minutos. Se añadió tetra(trifenilfosina) de paladio (15 mg, 0,013 mmol) a través del cuello del matraz y el matraz se transfirió a un condensador de reflujo equipado con una válvula de aguja y se fijó a una línea de Schlenk. La solución se congeló rápidamente con nitrógeno líquido y se desgasificó adicionalmente utilizando la técnica de congelación-bombeo-descongelación. Una vez desgasificada, la reacción se calentó a 80 °C con agitación constante. La reacción se dejó proseguir durante la noche. El material restante se transfirió a un pequeño matraz Erlenmeyer con un total de ~50 ml de diclorometano. La solución se agitó durante 30 minutos. Se añadió aproximadamente 1 g de MgSO<sub>4</sub>(anhidro) a la solución y la mezcla se filtró a través de un filtro de papel acanalado. El filtrado se evaporó y se recogieron 351 mg (rendimiento del 78 %) de un aceite de color ámbar.

Etapa 3: Síntesis de un polímero hidrosoluble neutro con una amina primaria en un extremo y en un colgante de éster *t*-butílico por el otro.

2-(4-(*tert*-butil 1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oato))-7-(4"-fenoxibutil-1-amino)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno.

Se combinaron 2-(4-(*tert*-butil 1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oato))-7-(4"-fenoxibutil-1-*tert*-carbamato de butilo)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno (23 mg, 0,018 mmol) y 0,5 ml de HCl 4 M en dioxano en un frasco de 3,70 ml (1 dram) con una barra agitadora recubierta de teflón. La mezcla se agitó durante 4 horas. La mezcla se neutralizó con carbonato de potasio 2 M (acuoso). A continuación, la solución se diluyó en 50 ml de aproximadamente etanol al 20 % en agua y se filtró a través de papel de filtro de fibra de vidrio G-6. El filtrado se desalinizó mediante centrifugación en un filtro centrífugo divisorio de 10 KDa de 4 ml. El retenido se evaporó al vacío y se añadieron dos partes de 1 ml de tolueno y se eliminaron al vacío para eliminar el agua restante. Se recuperó un líquido espeso de color ámbar de la desalación (21 mg, rendimiento del 85 %).

Etapa 4: Unión de un colorante funcionalizado con NHS a un colgante de amina primaria en un polímero hidrosoluble neutro.

2-(4-(*tert*-butil 1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oato))-7-(4"-fenoxibutil-1-amido-colorante)-poli-2,7 {9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno.

Se disolvió 2-(4-(*tert*-butil 1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oato))-7-(4"-fenoxibutil-1-amino)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno (518 µg, 0,4 µM) en 100 µl de diclorometano seco en un frasco de vidrio. Se añadió un pequeño cristal de 4-N,N'-dimetilaminopiridina. En otro frasco, se disolvieron 65 µg (0,06 µM) de DyLight 594 funcionalizado con NHS (Pierce) en 50 µl de diclorometano seco. Se combinaron las dos soluciones y se dejaron agitar en un frasco sellado durante 4 horas cubierto con papel de aluminio. A continuación, se evaporó el disolvente y el material restante se disolvió en etanol al 95 % y se inyectó en una columna de Sepharose 6. El colorante restante se separó del polímero. Se obtuvo una solución de polímero marcado con colorante combinando las fracciones (~100 µg, rendimiento del 20 %).

Etapa 5: Hidrólisis del colgante de éster *t*-butílico en el polímero hidrosoluble neutro marcado con colorante para formar el colgante de ácido carboxílico en uno de los extremos.

2-(4-(1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosano-27-ácido))-7-(4"-fenoxibutil-1-amido-colorante)-poli-2,7 f 9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno.

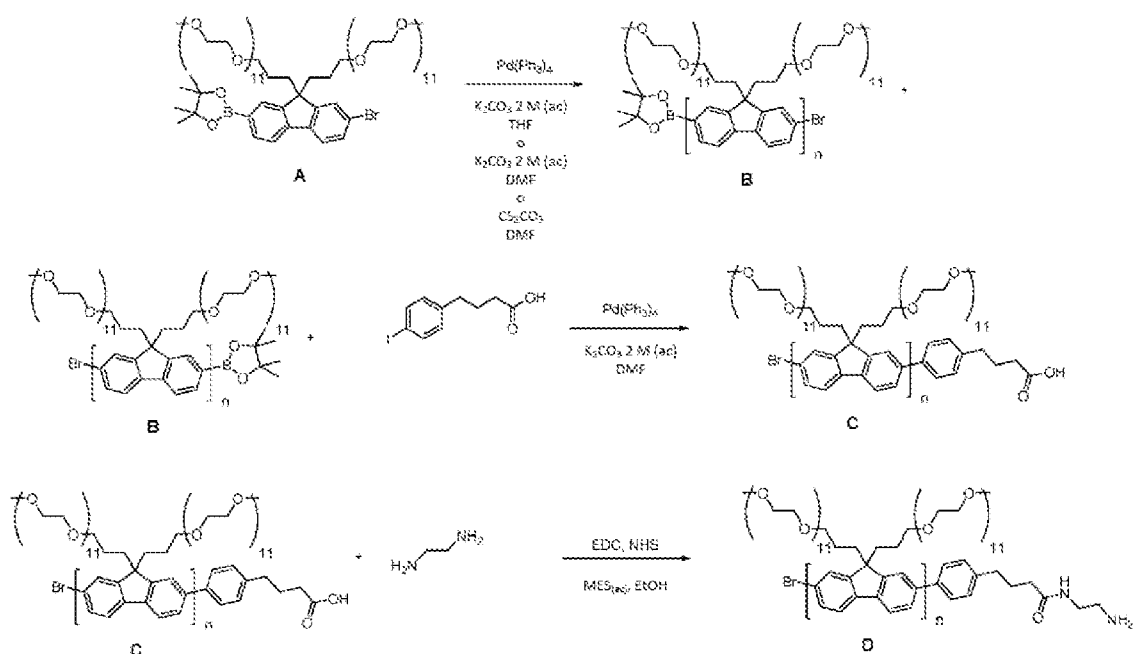
El polímero se combinó con ZnBr<sub>2</sub> en diclorometano y se agitó durante la noche. Al día siguiente se añadió una parte de agua y la mezcla se agitó durante 1 hora. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en etanol al 20 % en agua. A continuación, el filtrado se desalinizó mediante centrifugación en un filtro centrífugo divisorio de 10 KDa de 4 ml. El retenido se evaporó al vacío y se añadieron dos partes de 1 ml de tolueno y se eliminaron al vacío para eliminar el agua restante.

La activación (para la conjugación posterior) del segundo grupo funcional en este ejemplo (ácido carboxílico) se puede lograr mediante varios métodos diferentes, incluidos los descritos en el ejemplo 29 y otros ejemplos con ácido carboxílico a amina a maleimida. Uno de dichos métodos se proporciona a continuación en la etapa 6, solo a modo de ejemplo. Etapa 6: Activación por NHS del ácido carboxílico de un polímero hidrosoluble neutro marcado con colorante.

2-(4-(1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosano-27-N-hidroxisuccinimidil éster))-7-(4"-fenoxibutil-1-amido-colorante)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno. Se combinan 2-(4-(1-fenoxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosano-27-ácido))-7-(4"-fenoxibutil-1-amido-colorante)-poli-2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio y DIPEA en acetonitrilo seco y se dejan reaccionar en atmósfera de nitrógeno durante 30 min. La solución se evapora y el sólido se resuspende en diclorometano seco. Los sólidos se separan por filtración y el filtrado se evapora para dar el éster de NHS.

En realizaciones adicionales, se pueden utilizar varios grupos protectores comúnmente utilizados con los grupos funcionales proporcionados (amina y ácido carboxílico). Además, se pueden utilizar diferentes monómeros de protección y combinaciones de grupos protectores para producir polímeros con diferentes grupos funcionales para la conjugación. Eliminar o sustituir la etapa de marcado con colorante por otra entidad dará como resultado un polímero con dos grupos funcionales diferentes para la conjugación. La unión del colorante mediante analitos químicos NHS/amina se puede realizar en una variedad de condiciones comúnmente utilizadas. La unión del colorante también se puede realizar con otros analitos químicos funcionales.

## Ejemplo 22. Síntesis de polifluoreno asimétrico utilizando condiciones de Suzuki no reguladas



### Etapas 1: Polimerización

**Método A:** Se añadió una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en agua (2 M, 4 ml) a una mezcla agitada de 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (**A**) (2,3 g, 1,5 mmol) y THF (6 ml) en un matraz de fondo redondo. Esta mezcla se desgasificó con argón durante 15 min. A la mezcla se le añadió tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (38,5 mg, 0,03 mmol) y el matraz se unió a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se desgasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C durante 12 h.

La mezcla de reacción se enfrió a 23 °C y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. El residuo resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se diluyó con EtOH al 20 %/ $\text{H}_2\text{O}$  (75 ml). Se añadió EDTA (300 mg, 1,0 mmol) a la mezcla y se agitó a 23 °C durante 1 h. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio y el papel de filtro se enjuagó con EtOH al 20 %/ $\text{H}_2\text{O}$ . Después, el filtrado resultante se filtró a través de un filtro de copa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La mezcla de reacción filtrada se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés *tangential flow filtration*) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de celulosa regenerada Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass) hasta que la conductividad del filtrado midió menos de 0,01 mS/cm. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}] (**B**) como un producto similar a un gel (1,41 g, 71 %) Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno

(Mn = 51.000, Mw = 108.000, Mp = 90.000, D = 2,1). El grado de incorporación del enlazador terminal se determinó mediante la conversión primero del ácido en un éster de NHS (protocolo similar al proporcionado en el ejemplo 29) y después haciendo reaccionar con un colorante con función amina. Después de la purificación del colorante libre, la relación entre colorante y polímero se determinó a partir de mediciones de absorbancia, teniendo en cuenta la diferencia en los coeficientes de extinción y el peso molecular del polímero.

**Método B:** Se añadió una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua (2 M, 4 ml) a una mezcla agitada de 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaooctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (**A**) (2,3 g, 1,5 mmol) y DMF (6 ml) en un matraz de fondo redondo. Esta mezcla se desgasificó con argón durante 15 min. A la mezcla se le añadió tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (38,5 mg, 0,03 mmol) y el matraz se unió a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se desgasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C durante 12 h. El tratamiento y la purificación se realizaron de manera similar al método A descrito previamente. El peso molecular se determinó mediante análisis GPC con respecto a patrones de poliestireno (Mn = 96.000, Mw = 231.000, Mp = 185.000, D = 2,4).

**Método C:** Se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,08 g, 6,4 mmol) a una mezcla agitada de 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaooctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (**A**) (200 mg, 0,135 mmol) y DMF (7 ml) en un matraz de fondo redondo. Esta mezcla se desgasificó con argón durante 15 min. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (15,6 mg, 10 % molar) a la mezcla y el matraz se conectó a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se desgasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C durante 12 h. El tratamiento y la purificación se realizaron de manera similar al método A descrito previamente. El peso molecular se determinó mediante análisis GPC con respecto a patrones de poliestireno (Mn = 95.000, Mw = 218.000, Mp = 206.000, D = 2,3).

#### Etapas 2: Protección terminal

Se lavó ácido (4-yodofenil)butanoico (227 mg, 0,783 mmol) en un matraz que contenía poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaooctatriacontano)fluoreno}] (**B**) (1,00 g, 0,783 mmol) usando THF (3,5 ml). Se añadió una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua (2 M, 2,3 ml) al matraz y esta mezcla se desgasificó con argón durante 15 min. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (36 mg, 4 % molar) a la mezcla y el matraz se conectó a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se desgasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C durante 12 h.

La mezcla de reacción se enfrió a 23 °C y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. El residuo resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se diluyó con EtOH al 20 %/H<sub>2</sub>O (150 ml). Se añadió EDTA (500 mg) a la mezcla y se agitó a 23 °C durante 1 h. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio y el papel de filtro se enjuagó con EtOH al 20 %/H<sub>2</sub>O. Después, el filtrado resultante se filtró a través de un filtro de copa de 0,45 µm.

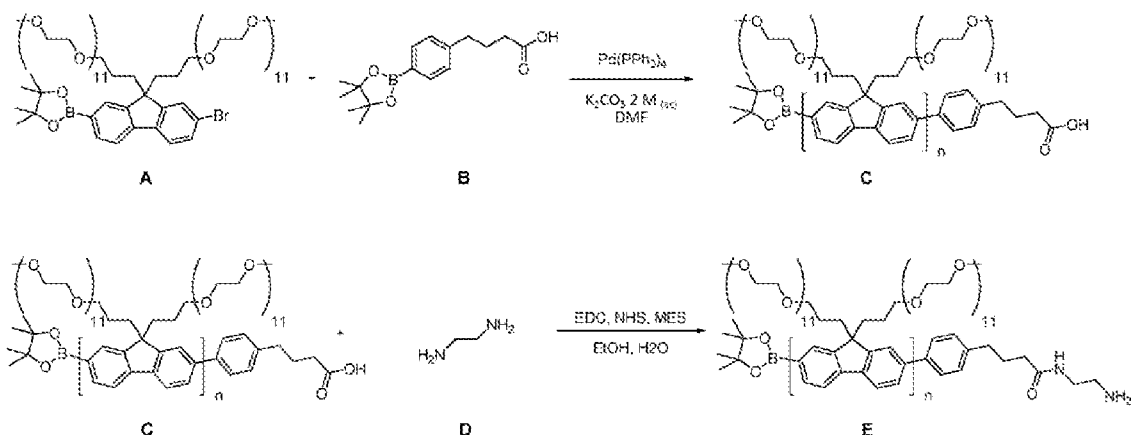
La mezcla de reacción filtrada se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés *tangential flow filtration*) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de celulosa regenerada Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass) hasta que la conductividad del filtrado midió menos de 0,01 mS/cm. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar ácido 4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaooctatriacontano)fluoreno}]fenil)butanoico (**C**) como un producto similar a un gel (388 mg, 39 %) Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno (Mn = 89.000, Mw = 196.000, Mp = 124.000, D = 2,2). El grado de incorporación del enlazador terminal se determinó mediante la conversión primero del ácido en un éster de NHS (protocolo similar al proporcionado en el ejemplo 29) y después haciendo reaccionar con un colorante con función amina. Después de la purificación del colorante libre, la relación entre colorante y polímero se determinó a partir de mediciones de absorbancia, teniendo en cuenta la diferencia en los coeficientes de extinción y el peso molecular del polímero.

#### Etapas 3: Activación de aminas

Se disolvió el ácido 4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaooctatriacontano)fluoreno}]fenil)butanoico (**C**) (200 mg, 0,156 mmol) en 2 ml de etanol, después se añadió gota a gota a 23 ml de tampón MES (50 mM, pH 5) a 4 °C mientras se agitaba. Se añadió en partes clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (576 mg, 3,00 mmol), seguido de N-hidroxisuccinimida (115 mg, 1,00 mmol) en una parte. La solución se agitó durante 30 minutos, se añadió gota a gota etilendiamina (0,501 ml, 7,50 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se desalinizó la mezcla de reacción en una columna de desalinización G25 y se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria para dar N-(2-aminoetil)-4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaooctatriacontano)fluoreno}]butanamida como un aceite amarillo claro (190 mg, 95 %). Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno (Mn = 89.000, Mw = 196.000, Mp = 124.000, D = 2,2). El grado de conversión de amina se determinó haciendo reaccionar el polímero de amina con un colorante activo NHS de manera similar a la descrita en el ejemplo 38.

**Ejemplo 23. Síntesis de polifluoreno asimétrico utilizando protectores finales modificados con enlazador para**

## regular la polimerización de Suzuki

5 Etapla 1: Polimerización/protección terminal/elaboración

- Se añadió una solución de  $K_2CO_3$  en agua (2 M, 4 ml) a una mezcla agitada de 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaocotriacontano-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5''-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-il)fluoreno (**A**) (2,3 g, 1,55 mmol), ácido 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)butanoico (**B**) (6,7 mg, 2 % molar) y DMF (6 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con una llave de paso de brazo lateral. Esta mezcla se desgasificó con argón durante 25 min. A continuación, se añadió a la mezcla tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (38,5 mg, 2 % molar) y el matraz se unió a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se desgasificó adicionalmente mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C.
- Por separado, se disolvió ácido 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)butanoico (**B**) (230 mg, 0,793 mmol) en DMF (3 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con una llave de paso en el brazo lateral. La solución se roció con argón durante 15 minutos, se conectó a un condensador de reflujo y se desgasificó mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación. Tras la descongelación, se añadió la solución a la mezcla de reacción después de dos horas de tiempo de reacción usando una jeringa irrigada con argón. La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas adicionales a 80 °C.

La mezcla de reacción se enfrió a 23 °C y el disolvente se eliminó con evaporación rotatoria. El residuo resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se diluyó con EtOH al 20 %/H<sub>2</sub>O (75 ml). Se añadió EDTA (300 mg, 1,00 mmol) a la mezcla y se agitó a 23 °C durante 1 h. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio y el papel de filtro se enjuagó con EtOH al 20 %/H<sub>2</sub>O. Después, el filtrado resultante se filtró a través de un filtro de copa de 0,45 µm.

La mezcla de reacción filtrada se purificó y se fraccionó por tamaño mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 30.000 (sistema de cartucho de polietersulfona Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass) hasta que la conductividad del filtrado mida menos de 0,01 mS/cm y  $M_n$  del retenido midió más de 70.000 por GPC. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar ácido 4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaocotriacontano)}fluoreno]il)fenil)butanoico como un producto similar a un gel (1,41 g, 71 %). Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno ( $M_n$  = 68.000,  $M_w$  = 134.000,  $M_p$  = 122.000,  $D$  = 1,9). El grado de incorporación del enlazador terminal se determinó mediante la conversión primero del ácido en un éster de NHS (protocolo similar al proporcionado en el ejemplo 29) y después haciendo reaccionar con un colorante con función amina. Después de la purificación del colorante libre, la relación entre colorante y polímero se determinó a partir de mediciones de absorbancia, teniendo en cuenta la diferencia en los coeficientes de extinción y el peso molecular del polímero.

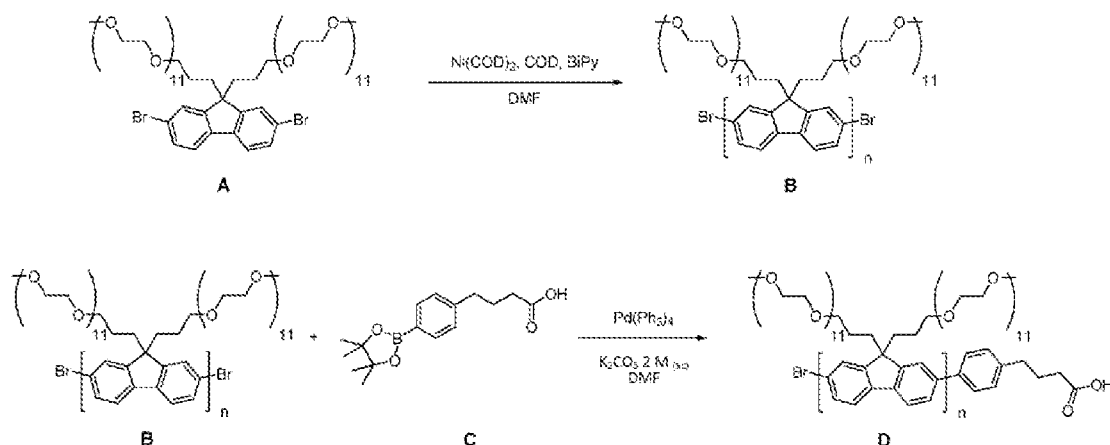
A pesar de tener un peso molecular superior a 50.000 g/mol, el polímero es soluble tanto en agua como en soluciones salinas tamponadas con fosfato en concentraciones fácilmente superiores a 10 mg/ml. En muchos experimentos de conjugación, el polímero proporcionado (y otros descritos en el presente documento con estructura similar) se concentró a 50 mg/ml o más, lo cual es notable para un polímero conjugado neutro. El peso molecular moderado también proporciona coeficientes de extinción superiores a 2.500.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. El gran coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico del 60 % (PBS) proporcionan indicadores fluorescentes excepcionalmente brillantes para su uso en ensayos biológicos, incluido su uso en citometría de flujo.

Etapla 2: Activación de aminas

Se disolvió el ácido 4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-

dodecaoxaoctatriacontano)fluoren]il)fenil)butanoico (C) (500 mg, 0,13 mmol) en 2 ml de etanol, después se añadió gota a gota a 23 ml de tampón MES (50 mM, pH 5) a 4 °C mientras se agitaba. Se añadió en partes clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, seguido de N-hidroxisuccinimida (0,52 g) en una parte. La solución se agitó durante 30 minutos, se añadió gota a gota etilendiamina (2,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se desalinizó la mezcla de reacción en una columna de desalinización G25 y se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria para dar N-(2-aminoetil)-4-(poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoren]il)butanamida como un aceite amarillo (450 mg, 90 %). El grado de conversión de amina se determinó haciendo reaccionar el polímero de amina con un colorante activo NHS de manera similar a la descrita en el ejemplo 38.

#### Ejemplo 24. Polimerización de Yamamoto de polifluoreno modificado con PEG



#### Etap 1: Polimerización de Yamamoto/Elaboración

En una caja seca, se añadieron  $\text{Ni(COD)}_2$  (0,387 g, 1,41 mmol), 2,2'-bipiridilo (0,220 g, 1,41 mmol), COD (0,152 g, 1,41 mmol) y DMF anhidra (16 ml) a un matraz de fondo redondo y cuello largo. Se pesó 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontano-38'-il)fluoreno (**A**) (1,00, 0,696) en un frasco de 40 ml y se disolvió en DMF anhidra (8 ml). El matraz se selló con una membrana y el frasco se cerró con un tapón de rosca con membrana. La mezcla de catalizador y la solución de monómero se transfirieron fuera de la caja seca y se colocaron bajo argón estático. El matraz de reacción se calentó a 70 °C durante 45 min. A continuación, se transfirió rápidamente la solución de monómero del frasco al matraz de mezcla de catalizador con una jeringa irrigada con argón. Después, la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 6 h.

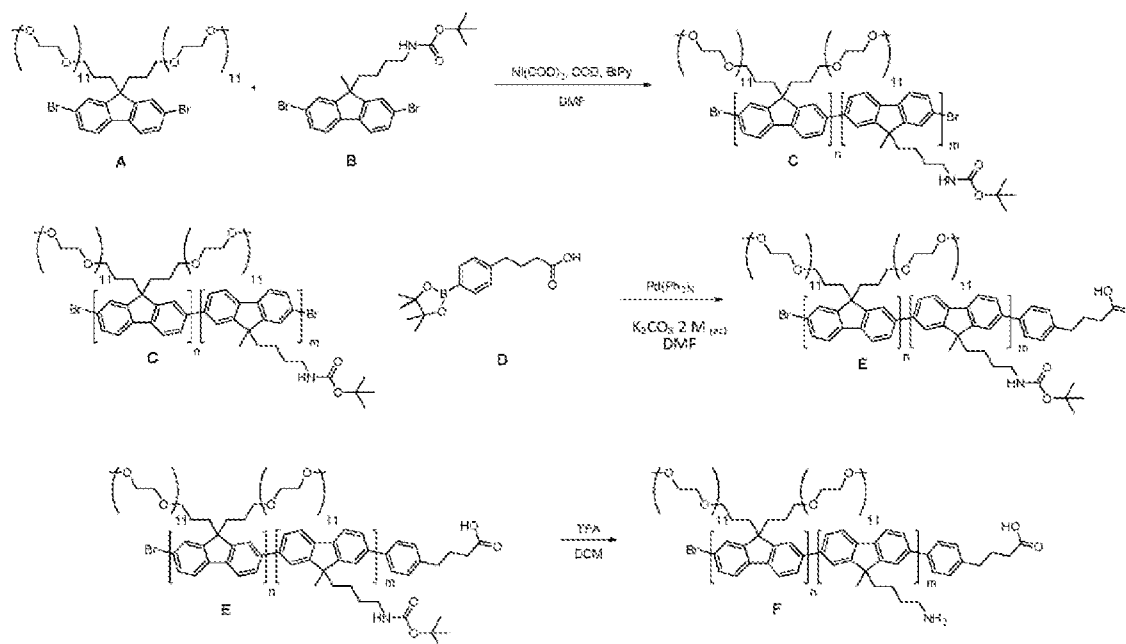
La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. El residuo negro resultante se volvió a disolver en EtOH al 20 % (80 ml) y se centrifugó a 2400 rpm durante 12 horas. Después se decantó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de copa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La mezcla de reacción filtrada se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de polietersulfona Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass.) hasta que el análisis GPC del retenido indicó la ausencia de material de bajo peso molecular. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno}] (**B**) como un aceite viscoso (0,700 g, 79 %) Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno ( $M_n = 62.000$ ,  $M_w = 127.000$ ,  $M_p = 93.000$ ,  $D = 2,0$ ).

**Etap 2:** Protección terminal: La protección de los extremos se realiza de manera similar al ejemplo 22, etapa 2.

**Etap 3:** Activación de aminas: La activación de aminas se realiza de manera similar al ejemplo 22, etapa 3.

#### Ejemplo 25. Síntesis de un polímero en tándem con dos enlazadores diferentes



#### Etapla 1: Polimerización

- 5 En una caja seca, se añadieron  $\text{Ni(COD)}_2$  (0,765 g, 2,78 mmol), 2,2'-bipiridilo (0,435 g, 2,78 mmol), COD (0,301 g, 2,78 mmol) y DMF anhidra (20 ml) a un matraz de fondo redondo y cuello largo. Se añadieron 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontano-38'-il)fluoreno (**A**) (1,80, 1,26 mmol) y 4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoreno-9-il)butilcarbamato de *tert*-butilo (**B**) (0,071 g, 0,126 mmol) a un frasco de 40 ml y se disolvieron en DMF anhidra (30 ml). El matraz se selló con una membrana y el frasco se cerró con un tapón de rosca con membrana. La mezcla de catalizador y la solución de monómero se transfirieron fuera de la caja seca y se colocaron bajo argón estático. El matraz de reacción se calentó a 70 °C durante 45 min. A continuación, se transfirió rápidamente la solución de monómero del frasco al matraz de mezcla de catalizador con una jeringa irrigada con argón. Después, la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 6 h.
- 10
- 15 La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. El residuo negro resultante se volvió a disolver en EtOH al 20 % (80 ml) y se centrifugó a 2400 rpm durante 12 horas. Después se decantó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de copa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

- La mezcla de reacción filtrada se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de polietersulfona Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass.) hasta que el análisis GPC del retenido indicó la ausencia de material de bajo peso molecular. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar 2,7-dibromo-poli-[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno-co-2,7-(9-metil-9'-(butil-4-t-butilcarbamato)fluoreno)] (**C**) como un aceite viscoso (1,3 g, 45 %) Peso molecular determinado por análisis GPC relativo a patrones de poliestireno ( $M_n = 72.000$ ,  $M_w = 156.000$ ,  $M_p = 138.000$ ,  $D = 2,1$ ).
- 20
- 25

#### Etapla 2: Protección terminal

- Se añadió una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en agua (2 M, 4 ml) a una mezcla agitada de 2,7-dibromo-poli-[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontano)fluoreno-co-2,7-(9-metil-9'-(butil-4-t-butilcarbamato)fluoreno)] (**C**) (800 mg, 0,67 mmol), ácido 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)butanoico (**D**) (120 mg, 0,41 mmol) y DMF (6 ml) en un matraz de fondo redondo. Esta mezcla se degasificó con argón durante 15 min. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina) de paladio (50 mg, 6 % molar) a la mezcla y el matraz se conectó a un condensador de reflujo. El recipiente de reacción se degasificó mediante 3 ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se calentó a 80 °C durante 12 h.
- 30
- 35

- La mezcla de reacción se enfrió a 23 °C y se concentró al vacío hasta un volumen de 2 ml. La mezcla de reacción bruta se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se diluyó con EtOH al 20 %/ $\text{H}_2\text{O}$  (75 ml). Se añadió EDTA (300 mg, 2,00 mmol) a la mezcla y se agitó a 23 °C durante 1 h. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro de fibra de vidrio y el papel de filtro se enjuagó con EtOH al 20 %/ $\text{H}_2\text{O}$ . Después, el filtrado resultante se filtró a través de un filtro de copa de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 40

La mezcla de reacción filtrada se purificó y se fraccionó por tamaño mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de

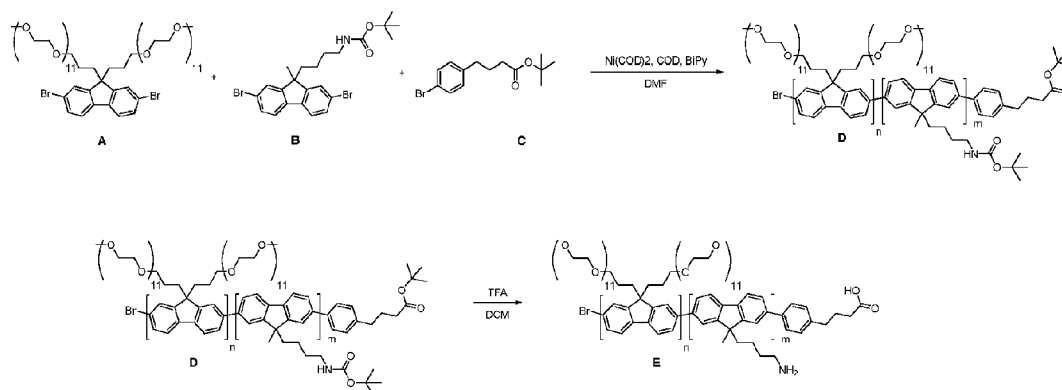
polietersulfona Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass) hasta que la conductividad del filtrado midió menos de 0,01 mS/cm. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar ácido 4-(4-(2-bromo-poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaocatactriacontano)fluoreno-co-2,7-(9-metil-9'-(butil-4-t-butilcarbamato)fluoreno)]]fenil)butanoico (**E**) como un aceite amarillo (660 mg, 82 %).

### Etapa 3: Desprotección del enlazador

Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (4 ml) a una solución agitada de ácido 4-(4-(2-bromo-poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaocatactriacontano)fluoreno-co-2,7-(9-metil-9'-(butil-4-t-butilcarbamato)fluoreno)]]fenil)butanoico (**E**) (200 mg, 0,169 mmol) y diclorometano (16 ml) en un matraz de fondo redondo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se concentró al vacío. El residuo se volvió a suspender en EtOH al 20 % como mínimo y se añadió HCl 1 M a la solución hasta pH = 7. A continuación, se desalinizó la solución neutralizada en gel G25 y el material resultante se concentró hasta la sequedad para producir un aceite amarillo pálido transparente (**F**).

Los ejemplos de incorporación de colorantes, activación del enlazador y bioconjugación están contenidos en el ejemplo 38 adicional y ejemplos relacionados.

### Ejemplo 26: Síntesis de un polímero en tándem con dos enlazadores diferentes utilizando unidades de protección terminal para regular la reacción de polimerización



### Etapa 1: Polimerización de Yamamoto

En una caja seca, se añadieron  $\text{Ni}(\text{COD})_2$  (0,433 g, 8,40 mmol), 2,2'-bipiridilo (0,246 g, 8,40 mmol), COD (0,170 g, 8,40 mmol) y DMF anhidra (15 ml) a un matraz de fondo redondo y cuello largo. Se añadieron 2,7-dibromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',23',26',29',32',35'-dodecaoxaocatactriacontano-38'-il)fluoreno (**A**) (1,00, 0,696 mmol), 4-(2,7-dibromo-9-metil-9H-fluoreno-9-il)butilcarbamato de *tert*-butilo (**B**) (0,037 g, 0,069 mmol) y 4-(4-bromofenil)butanoato de *tert*-butilo (**C**) (0,004 g, 0,007 mmol) a un frasco de 40 ml y se disolvieron en DMF anhidra (10 ml). El matraz se selló con una membrana y el frasco se cerró con un tapón de rosca con membrana. La mezcla de catalizador y la solución de monómero se transfirieron fuera de la caja seca y se colocaron bajo argón estático. El matraz de reacción se calentó a 70 °C durante 45 min. A continuación, se transfirió rápidamente la solución de monómero del frasco al matraz de mezcla de catalizador con una jeringa irrigada con argón. Después, la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 6 h.

La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria. El residuo negro resultante se volvió a disolver en EtOH al 20 % (80 ml) y se centrifugó a 2400 rpm durante 12 horas. Después se decantó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de copa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La mezcla de reacción filtrada se purificó mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y se diafiltró en etanol al 20 % con una membrana divisoria de peso molecular de 10.000 (sistema de cartucho de polietersulfona Prep/Scale TFF, Millipore, Billerica, Mass.) hasta que el análisis GPC del retenido indicó la ausencia de material de bajo peso molecular. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío para dar 4-(4-(2-bromo-poli[2,7{9,9-bis(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaocatactriacontano)fluoreno-co-2,7-(9-metil-9'-(butil-4-t-butilcarbamato)fluoreno)]]fenil)butanoato de *tert*-butilo (**D**) como un aceite viscoso (664 g, 80 %). Peso molecular determinado mediante análisis GPC en relación con patrones de poliestireno ( $M_n = 50.000$ ,  $M_w = 88.000$ ,  $M_p = 174.000$ ,  $D = 1,8$ ).

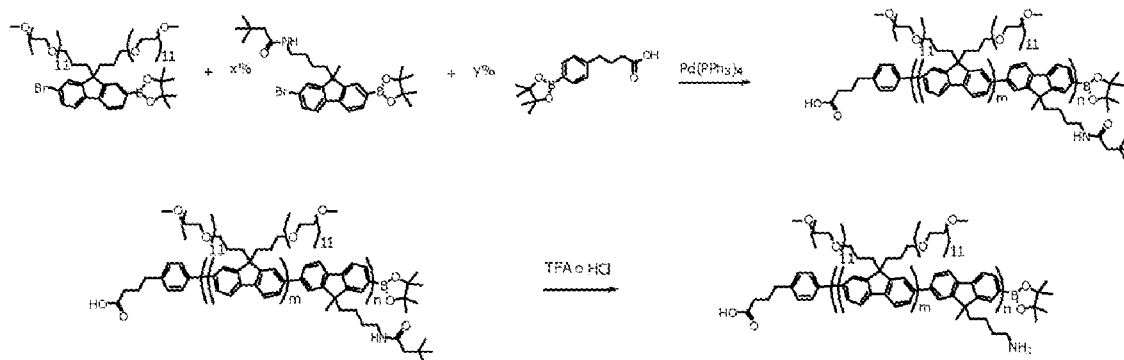
### Etapa 2: Desprotección del enlazador

Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (6 ml) a una solución agitada de polímero (300 mg, X mmol) y diclorometano (24 ml) en un matraz de fondo redondo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se concentró al vacío. El residuo se volvió a suspender en EtOH al 20 % como mínimo y se añadió

HCl 1 M a la solución hasta pH = 7. A continuación, se desalinizó la solución neutralizada en gel G25 y el material resultante se concentró hasta la sequedad para producir un aceite naranja pálido transparente (261 mg, 87 %).

Los ejemplos de incorporación de colorantes, activación del enlazador y bioconjugación están contenidos en el ejemplo 38 adicional y ejemplos relacionados.

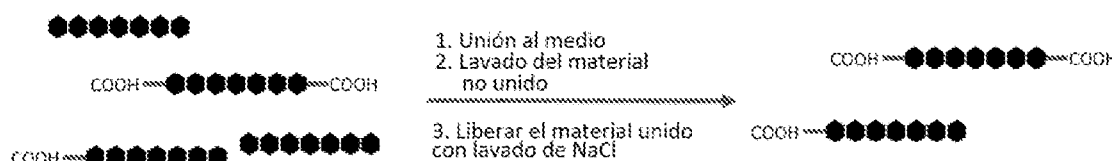
**Ejemplo 27. Polímero asimétrico de doble función con sitios de conjugación internos y terminales utilizado para crear un polímero-marcador colorante para la conjugación de biomoléculas o sustratos**



Se realiza la polimerización de Suzuki de 2-bromo-9,9-di(2',5',8',11',14',17',20',23',26',29',32',35'-dodecaoxaoctatriacontan-38'-il)-7-(4'',4'',5'',5'')-tetrametil-1'',3'',2''-dioxaborolan-2-yl)fluoreno en las condiciones descritas en el ejemplo 23 donde y% es el % molar del enlazador terminal utilizado para regular la polimerización y asegurar una incorporación elevada del enlazador. El enlazador en este ejemplo es el ácido 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)fenil)butanoico. En este ejemplo, también se añade x % molar del enlazador interno a la polimerización para incorporar el segundo sitio de enlace en el polímero. Este método para incorporar el enlazador interno se describe generalmente en los ejemplos 21, 25 y 26. El enlazador interno debe incorporarse durante la polimerización como se indica, sin embargo, se espera que sea posible añadir el enlazador terminal como una etapa separada como se describe en los ejemplos 9, 10, 11 y 21.

**Ejemplo 28: Enriquecimiento de polímeros funcionalizados con enlazadores**

La síntesis de polímeros funcionalizados con enlazadores puede producir una mezcla de cadenas con y sin funcionalidades de enlazadores. Debido a que se espera que la eficiencia de la conjugación mejore con polímeros de mayor pureza para la conjugación, los métodos descritos en este ejemplo abordan esto mediante el enriquecimiento de cadenas que contienen enlazadores.



Para un lote de polímero que contiene una mezcla de un polímero modificado con COOH y no modificado: Disolver el polímero en EtOH al 95 %, después diluir con agua hasta una concentración final de EtOH del 20 %. Desalar el polímero con un filtro MWCO de 10 kDa hasta que la conductancia sea <0,1 mS/cm. Inyectar en la columna Q-Sepharose, asegurándose que la carga de polímero sea adecuada para la capacidad de la columna. Pasar EtOH al 20 % en agua sobre la columna para eliminar el polímero no unido. Liberar el material unido mediante el cambio del tampón de elución a NaCl 1 M en EtOH al 20 % en agua durante dos volúmenes de columna para desencadenar la liberación del material polimérico unido. Recoger el material enriquecido.

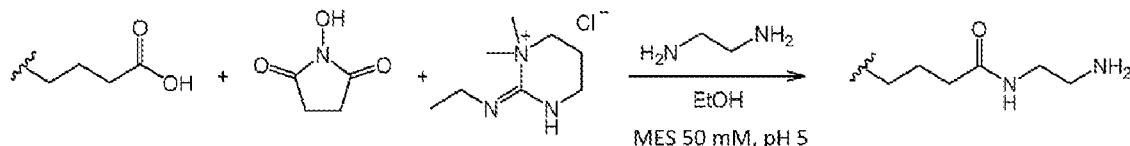
El polímero se pasa a través de un intercambiador de aniones fuerte, tal como una columna Q-Sepharose. Las cadenas poliméricas que llevan un grupo ácido carboxílico funcional se unirán al intercambiador aniónico fuerte, y el polímero que no está funcionalizado no se unirá y, en cambio, se lavará. Después de que el polímero no funcionalizado haya pasado a través de la columna, la columna se lava con NaCl 1 M, lo que desencadena la liberación del polímero funcionalizado con ácido mediante la selección del grupo ácido del medio. Mediante el uso de este método, se ha demostrado que el porcentaje de polímero funcional aumenta del 25 % de las cadenas poliméricas que llevan un grupo ácido carboxílico a >80 % de las cadenas poliméricas que llevan un grupo ácido carboxílico. Este aumento en las cadenas funcionales se ha demostrado mediante el análisis de las relaciones de absorbancia de los conjugados de polímero y colorante antes y después del enriquecimiento. Este procedimiento también se describe en el ejemplo 38. Se ha validado un proceso similar para el enriquecimiento de polímeros que contienen aminas. En ese caso, se carga

una resina de intercambio aniónico, SP Sephrose (o similar), con conductividad reducida (por debajo de 0,01 mS/cm).

### Ejemplo 29: Preparación de conjugados de polímero y estreptavidina mediante acoplamiento NHS/amina

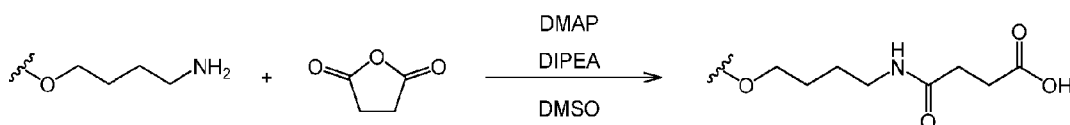
#### 5 Ejemplo 29a: Modificaciones de polímeros

##### Modificación de polímeros: conversión de ácido carboxílico a amina



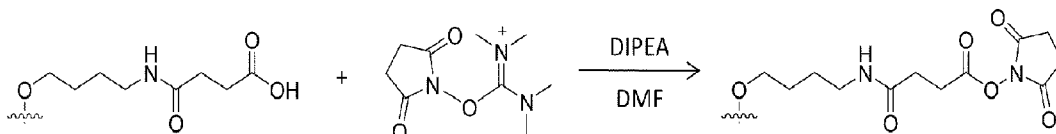
10 Se disolvieron 1,35 g de un polímero terminado en ácido carboxílico en 9 ml de etanol, después se añadió gota a gota a 80 ml de MES 50 mM a 4 °C, pH 5 mientras se agitaba. Se añadieron 0,52 g de *N*-hidroxisuccinimida en una parte. Una vez se había disuelto la *N*-hidroxisuccinimida, se añadieron 2,3 g de hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida en partes. Después de agitar la solución durante 30 minutos, se añadieron gota a gota 2,8 ml de etilendiamina. La solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se purificó mediante filtración de flujo tangencial (MWCO = 10 kDa). 1,22 g, rendimiento del 90 %.

##### Modificación de polímeros: conversión de amina a ácido carboxílico



20 Se disolvieron 70 mg de un polímero terminado en amina en 7 ml de DMSO. Se añadieron 2,3 mg de DIPEA a la solución de polímero. Se disolvieron 2,2 mg de DMAP en 220 µl de DMSO y se añadieron a la solución polimérica resultante. Se disolvieron 5,5 mg de anhídrido succínico en 550 µl de DMSO y se añadieron a la solución polimérica resultante. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la reacción se purificó sobre unidades de filtración centrífuga Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) con tampón MES 25 mM, pH 5. 62 mg, rendimiento del 89 %.

##### Modificación de polímeros: conversión de ácido carboxílico a éster NHS



35 Se disolvieron 60 mg de un polímero terminado en ácido carboxílico en 600 µl de acetonitrilo. Se añadieron 1,2 µg de DIPEA a la solución de polímero. Se disolvieron 2,8 mg de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(*N*-succinimidil)uronio en 370 µl de acetonitrilo y se añadió a la solución polimérica. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez completada la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida. 50 mg, rendimiento del 83 %.

#### Ejemplo 29b: Conjugación proteína-polímero

40 La proteína estreptavidina se disuelve en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,2 para preparar una solución de 1 mg/ml. Se añade una solución de polímero activado bruto (10 a 15 eq o según sea necesario) de la etapa 2 a la solución acuosa de proteína de estreptavidina; la concentración de proteína se ajusta con tampón para garantizar que el volumen del disolvente orgánico añadido sea <10 % del volumen total, si fuera necesario. La solución se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y la reacción se transfiere a un filtro Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) para eliminar la DMF. La proteína se recupera en el volumen inicial con tampón de PO<sub>4</sub> 25 mM pH 6,5.

##### Purificación del conjugado de proteína y polímero

50 Se equilibra una columna HiTrap SP Sepharose FF de 1 ml con tampón citrato de sodio 20 mM, pH 3. Se carga 1 ml (0,3 a 1 mg/ml) de conjugado de estreptavidina y polímero en NaHPO<sub>4</sub> 25 mM pH 6,5. La muestra se lava a través de la columna con tampón citrato de Na 20 mM, pH 3, hasta que se obtiene un calor inicial estable. Posteriormente se pueden cargar y lavar múltiples alícuotas de 1 ml de muestra. La columna se lava con un mínimo de 10 volúmenes de columna de tampón citrato de sodio 20 mM, pH 3. El conjugado se eluye con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6, y la columna se extrae con 10 volúmenes de columna de etanol al

20 % en el tampón de elución. El máximo de elución se concentra con un filtro Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) para reducir el volumen a -200 µl. Se equilibra una columna Superose 12 de 10 × 300 mm con citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6. Se cargan 200 µl de conjugado concentrado de estreptavidina y polímero y se eluyen con citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6. Las fracciones se agrupan y el tampón se intercambia en PBS + NaN<sub>3</sub> al 0,05 % con filtros de centrifugación Amicon Ultra (10 kDa MWCO). Las eluciones se concentran hasta la concentración deseada para realizar las pruebas; a alrededor de 2 µM de estreptavidina.

#### Caracterización de un conjugado de proteína y polímero purificado

Se prepara un gel Tris-HCl Ready de acrilamida al 4-20 % (BioRad) y el gel se carga con el conjugado junto con estreptavidina libre y polímero libre en carriles separados. La electroforesis en gel se realiza en Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3 y teñida con Coomassie para visualizar la proteína. El gel se tiñe durante 30 minutos y después se decolora con decolorante comercial durante la noche. También se utilizaron condiciones de gel de agarosa para caracterizar los conjugados de polímero y estreptavidina, cuyo ejemplo se muestra en la figura 29.

En realizaciones alternativas, el ejemplo anterior se puede adaptar para permitir la conjugación del polímero con biomoléculas o colorantes, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y ácidos nucleicos. La amina del polímero se convierte en una maleimida y un ácido carboxílico (activado adicionalmente para formar el éster NHS) utilizando modificadores o reticulantes alternativos. En determinadas realizaciones, la conjugación del mismo polímero con otras biomoléculas (estreptavidina, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos) se facilita mediante analitos químicos de malimida-tiol (utilizando enlazadores SATA para convertir aminas libres en la biomolécula o reducción con TCEP (o DPP) de un anticuerpo para crear tioles libres).

#### **Ejemplo 30: Preparación de conjugados de polímero y estreptavidina mediante acoplamiento hidrazida/benzaldehído**

##### Etapas 1: Modificación de estreptavidina-4FB

La proteína estreptavidina se reconstituye a 1,7 mg/ml y se intercambia en tampón de reacción, NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 8. Se añaden 15 equivalentes molares de enlazador bifuncional benzaldehído/succinimidilo, S-4FB (Solulink, San Diego, CA) 20 mg/ml en DMSO anhidro a estreptavidina, lo que asegura que la fase orgánica sea inferior al 10 % del volumen total. La reacción se mezcla en un agitador durante 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtra el enlazador sin reaccionar a través de un filtro Amicon Ultra, MWCO de 10 kDa con tampón MES de 50 mM, pH 5; se centrifuga a 2400 rpm y se realiza un lavado repetido ×3. La proteína estreptavidina se recupera en su volumen inicial, con el objetivo de 1,7 mg/ml en tampón de conjugación, NaPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6,5.

##### Etapas 2: Modificación de polímeros

El polímero con grupo amina terminal (1 eq molar) se disuelve con DMF para preparar una solución de 10 mg/ml. Se añaden 20 equivalentes molares de un enlazador bifuncional hidrazina/succinimidilo, SHTH (Solulink, San Diego, CA) a 80 mg/ml en DMSO anhidro a la solución de polímero. Se añade 1 gota de DIPEA a la reacción con una jeringa y una aguja de 22 g. La solución se agita a temperatura ambiente durante 4 horas y la reacción se transfiere a un filtro Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) lleno con tampón MES 25 mM, pH 5. A continuación, se centrifuga la solución. El filtro se vuelve a rellenar y se lava con los siguientes tampones de lavado:

1× H<sub>2</sub>O DI + 1 gota de HCl 1 M

1× H<sub>2</sub>O DI + 1 gota de NaOH 1 M

3× MES 50 mM, pH 5

##### Etapas 3: Conjugación proteína-polímero

Se añaden 15 equivalentes del polímero modificado de la etapa 2 con la cantidad deseada de proteína modificada de la etapa 1. Se añade anilina a la reacción hasta una concentración final de 10 mM y se deja mezclar durante 12 horas. La reacción se purifica con filtro Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) para eliminar DMF y se recupera con tampón de PO<sub>4</sub> 25 mM pH 6,5.

##### Etapas 4: Purificación del conjugado de proteína y polímero

Se equilibra una columna HiTrap SP Sepharose FF de 1 ml con tampón citrato de sodio 20 mM, pH 3. Se carga 1 ml (0,3 a 1 mg/ml) de conjugado de estreptavidina y polímero en NaHPO<sub>4</sub> 25 mM pH 6,5. La muestra se lava a través de la columna con tampón citrato de Na 20 mM, pH 3, hasta que se obtiene un calor inicial estable. Posteriormente se pueden cargar y lavar múltiples alícuotas de 1 ml de muestra. La columna se lava con un mínimo de 10 volúmenes de columna de tampón citrato de sodio 20 mM, pH 3. El conjugado se eluye con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6, y la columna se extrae con 10 volúmenes de columna de etanol al

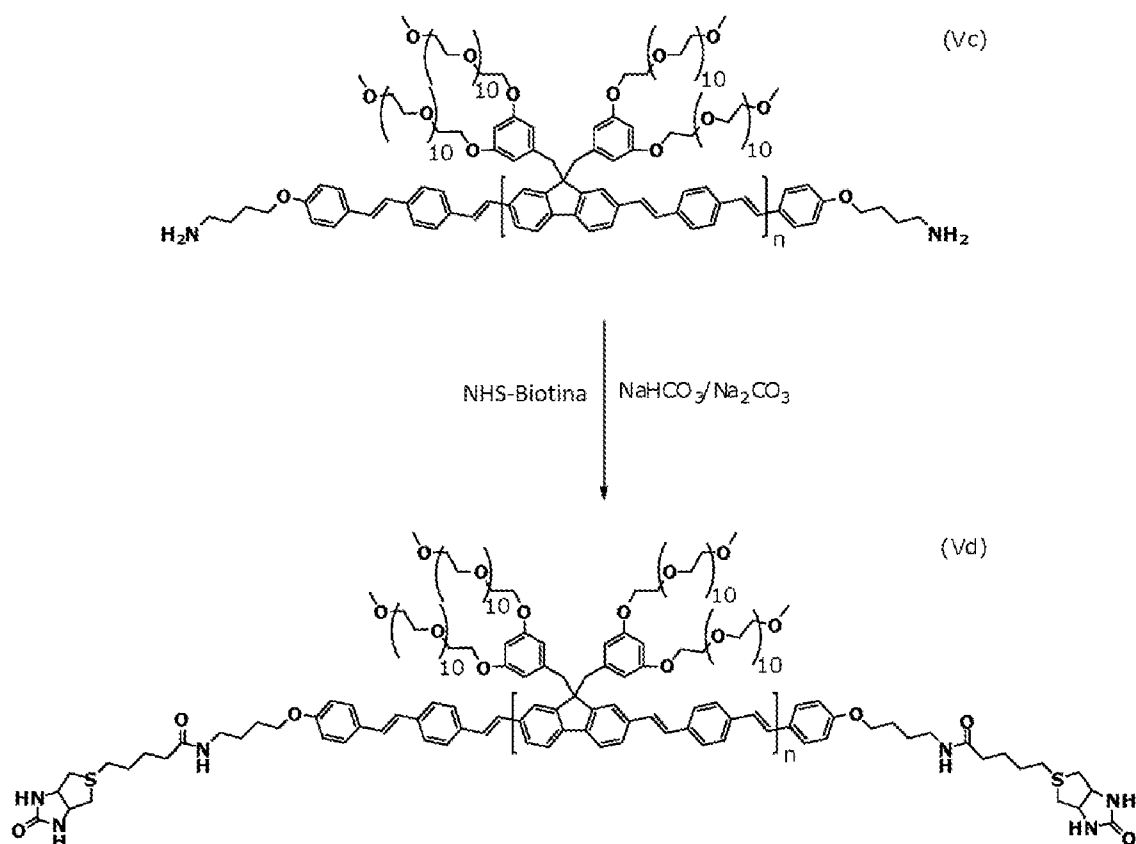
20 % en el tampón de elución. El máximo de elución se concentra con un filtro Amicon Ultra (MWCO = 10 kDa) para reducir el volumen a ~200 µl. Se equilibra una columna Superose 12 de 10 × 300 mm con citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6. Se cargan 200 µl de conjugado concentrado de estreptavidina y polímero y se eluyen con citrato de sodio 20 mM en tampón de NaCl 0,6 M, pH 7,6. Las fracciones se agrupan y el tampón se intercambia en PBS + NaN<sub>3</sub> al 0,05 % con filtros de centrifugación Amicon Ultra (10 kDa MWCO). Las eluciones se concentran hasta la concentración deseada para realizar las pruebas; a alrededor de 2 µM de estreptavidina.

#### Etapas 5: Caracterización de un conjugado de proteína y polímero purificado

- 10 Se prepara un gel Tris-HCl Ready de acrilamida al 4-20 % (BioRad) y el gel se carga con el conjugado junto con estreptavidina libre y polímero libre en carriles separados. La electroforesis en gel se realiza en Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3 y teñida con Coomassie para visualizar la proteína. El gel se tiñe durante 30 minutos y después se decolora con decolorante comercial durante la noche.
- 15 En la figura 14 arriba, se representa la conjugación de estreptavidina con un polímero de fórmula (Vb) en formato de diagrama. La figura 14, inferior, es una tinción de Coomassie de gel de acrilamida que muestra que la movilidad del conjugado se retrasa en relación con la proteína libre, lo que indica un aumento de masa. Un polímero neutro por sí solo no muestra evidencia de tinción y sin una carga formal, el polímero no es móvil en el campo electroforético.
- 20 En realizaciones alternativas, el ejemplo anterior se puede adaptar para permitir la conjugación del polímero con biomoléculas o colorantes, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y ácidos nucleicos. La amina del polímero se convierte en una maleimida y un ácido carboxílico (activado adicionalmente para formar el éster NHS) utilizando modificadores o reticulantes alternativos. En determinadas realizaciones, la conjugación del mismo polímero con otras biomoléculas (estreptavidina, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos) se facilita utilizando analitos químicos de malimida-tiol (usando enlazadores SATA para convertir aminas libres en la biomolécula o la reducción con TCEP de un anticuerpo para crear tioles libres) y analitos químicos de amina NHS (haciendo reaccionar el polímero NHS directamente con lisinas en la proteína o ácido nucleico).
- 25

#### **Ejemplo 31: Preparación de polímeros marcados con biotina**

30



El polímero funcionalizado con amina de fórmula (Vc) se disuelve a 10 mg/ml en DMF anhidra y se divide en dos partes. Se disuelven NHS-biotina (0,9 mg en 90 µl, 88 equivalentes) (Pierce, 20217) y NHS-LC-LC-biotina (Pierce, 21343) a 10 mg/ml (1,5 mg en 150 µl, 88 equivalentes) en solución DMF anhidra. Las soluciones NHS-biotina y NHS-LC-LC-biotina se añaden inmediatamente a las dos partes de solución polimérica y se dejan mezclar en un agitador

35

durante la noche en la oscuridad. El exceso de reactivo se elimina mediante el lavado de la solución con cartuchos de filtro Amicon Ultra-4ml 10 kDa de MWCO en una serie de etapas de lavado: En primer lugar, primero se llena el cartucho aproximadamente hasta la mitad con agua y posteriormente se añade la solución de reacción (con una pipeta) directamente al agua. Seguidamente, el cartucho se llena de agua hasta llenarlo. La solución se mezcla pipeteando arriba y abajo. Después, el cartucho se centrifuga a 2400 rpm durante 30 minutos, o hasta que el volumen se reduzca a 250 µl. A continuación, se vuelve a llenar el cartucho con agua y se añade 1 gota de HCl 1 M; la solución se mezcla y se centrifuga a 2400 rpm durante 30 minutos, o hasta que el volumen se redujo a 250 µl. Seguidamente, el cartucho se vuelve a llenar con agua, se añade 1 gota de NaOH 1 M; la solución se mezcla y se centrifuga a 2400 rpm durante 30 minutos, o hasta que el volumen se reduce a 250 µl. A continuación, el cartucho se vuelve a llenar con agua, se mezcla y se centrifuga a 2400 rpm durante 30 minutos, o hasta que el volumen se reduzca a 250 µl. Esta última etapa se repite durante un total de 5 lavados. Caracterización de un polímero purificado marcado con biotina

El exceso de polímero marcado con biotina se incuba con estreptavidina marcada con Cy5 en tampón DPBS más BSA al 0,2 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 %. Se prepara un gel de agarosa al 0,8 % y el gel se carga con el conjugado junto con Cy5-estreptavidina libre y polímero biotinilado libre en carriles separados. La electroforesis en gel se realiza en NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, pH 10, y se visualiza con un generador de imágenes de gel Typhoon con excitación láser de 457 nm y 635 nm. La figura 15 (abajo) representa el retraso de la movilidad del complejo de polímero y estreptavidina con respecto a la proteína libre, lo que indica un aumento de masa. El polímero por sí solo muestra poca movilidad debido a la falta de carga formal.

Este protocolo está adaptado para modificar con éxito con biotina una serie de polímeros conjugados que contienen enlazadores de amina tanto internos como terminales.

#### **Ejemplo 32: Pruebas funcionales de conjugados de polímero covalente y estreptavidina mediante unión selectiva a microesferas biotiniladas**

##### **Materiales necesarios:**

1× TBST: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %, pH 7,5; microesferas de biotina (10 mg/ml en TBST); BSA (1 mg/ml); AvDN (220 µM); y conjugado de polímero y estreptavidina (SA): (1 µM con respecto a SA, proporcionado a 5 µM).

##### **Preparación de mezclas maestras:**

Preparar en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml marcados:

| Mezcla maestra experimental      | Mezcla maestra de control negativo |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 14 µl de TBST                    | 9 µl de TBST                       |
| 6 µl de solución madre de BSA    | 6 µl de solución madre de BSA      |
| 5 µl de solución madre de perlas | 5 µl de solución madre de avidina  |
|                                  | 5 µl de solución madre de perlas   |

Agitar brevemente ambos tubos y esperar entre 20 y 30 minutos para preincubar las perlas de control negativo con exceso de avidina antes de continuar. Se sugiere un mezclador orbital de velocidad variable a 800 rpm para la incubación para evitar que las perlas se asienten.

##### **Hibridación de las perlas:**

Pipetear 10 µl de cada mezcla maestra en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml marcados por separado. Añadir 2 µl de conjugado de polímero y SA a cada uno. Preparar un tubo adicional que contenga 10 µl de mezcla maestra y ningún polímero para utilizarlo como blanco. Agitar brevemente todos los tubos con vórtex y centrifugar. Transferir a un mezclador orbital de velocidad variable e incubar durante 30 minutos a 800 rpm.

##### **Procesamiento/lavado de las perlas:**

Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 480 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 500 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Repetir las etapas 3 y 4. Eliminar la mayor cantidad posible de sobrenadante restante utilizando una pipeta P200 sin alterar el sedimento de perlas. Añadir 100 µl de TBST y agitar brevemente con vórtex para resuspender las perlas.

**Medición de las perlas:**

Transferir 100 µl de perlas positivas, negativas y en blanco a una placa negra de 96 pocillos. Excitar los pocillos a 430 nm y recoger las emisiones en el intervalo de 450 a 650 nm utilizando los anchos de hendidura requeridos y/o la configuración de sensibilidad para lograr señales medibles por encima del fondo. Comparar la emisión de las perlas de control positivas y negativas.

En la figura 16 se muestra que el conjugado de polímero y estreptavidina estaba unido a una microesfera biotinilada. La excitación a 440 nm en un fluorómetro dio como resultado la emisión del polímero como lo indica la curva continua. La curva discontinua representa el control negativo donde la perla de biotina se trató primero con un exceso de avidina para bloquear los sitios de unión a biotina antes del tratamiento con el conjugado de polímero y estreptavidina.

**Ejemplo 33: Pruebas funcionales de conjugados covalentes de polímero y estreptavidina mediante unión selectiva a microesferas biotiniladas y FRET a aceptores colorantes en conjugados de estreptavidina y colorante colocados**

**Materiales necesarios:**

1× TBST: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %, pH 7,5. Microesferas de biotina (10 mg/ml en TBST). Cy3-SA (1 µM o 50 µg/ml). Conjugado de polímero y estreptavidina (SA): (1 µM con respecto a SA, proporcionado a 5 µM).

**Preparación e hibridación de las perlas:**

Preparar en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml marcados:

| Control de blanco                | Control con Cy3-SA               | Control con FRET-SA                     |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|
| 16 µl de TBST                    | 14 µl de TBST                    | 14 µl de TBST                           |
| 4 µl de solución madre de perlas | 2 µl de solución madre de Cy3-SA | 2 µl de solución madre de Cy3-SA        |
|                                  | 4 µl de solución madre de perlas | 2 µl de solución madre de polímero y SA |
|                                  |                                  | 4 µl de solución madre de perlas        |

Agitar brevemente con vórtex todos los tubos y transferir a un mezclador orbital de velocidad variable para una incubación de al menos 30 minutos a 800 rpm.

**Procesamiento/lavado de las perlas:**

Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 480 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 500 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Repetir las etapas 3 y 4. Eliminar la mayor cantidad posible de sobrenadante restante utilizando una pipeta P200 sin alterar el sedimento de perlas. Añadir 100 µl de TBST y agitar brevemente con vórtex para resuspender las perlas.

**Medición de las perlas:**

Transferir 100 µl de todas las muestras a una placa negra de 96 pocillos. Excitar los pocillos a 430 nm y recoger las emisiones en el intervalo de 450 a 650 nm utilizando los anchos de hendidura requeridos y/o la configuración de sensibilidad para lograr señales medibles por encima del fondo. Detectar y registrar la emisión de los polímeros en el intervalo de 480 a 500 nm y la emisión de Cy3 en los 570 nm esperados.

En la figura 17 se muestra que el conjugado de polímero y estreptavidina estaba unido a una microesfera biotinilada. La excitación a 440 nm en un fluorómetro dio como resultado una transferencia de energía entre el polímero y un colorante Cy3 conjugado con una proteína estreptavidina diferente, como lo indica la curva superior continua. La curva discontinua muestra perlas solas y la curva continua inferior excitación directa del conjugado de Cy3 y estreptavidina a 440 nm.

**Ejemplo 34: Pruebas funcionales de polímeros marcados con biotina mediante unión selectiva a microesferas recubiertas de avidina**

**Materiales necesarios:**

1× TBST: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %, pH 7. Microesferas de SA (10 mg/ml en TBST). Biotina (1 mM). Conjugado de biotina y polímero de 440 nm: (46 µM).

#### Preparación e hibridación de las perlas:

5

Preparar en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml marcados:

| Control de blanco                | Control negativo                  | Control positivo                 |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 16 µl de TBST                    | 11 µl de TBST                     | 15 µl de TBST                    |
| 4 µl de solución madre de perlas | 4 µl de solución madre de biotina | 4 µl de solución madre de perlas |
|                                  | 4 µl de solución madre de perlas  |                                  |

10

Agitar brevemente con vórtex todos los tubos y transferir a un mezclador orbital de velocidad variable para una incubación de 20 a 30 minutos a 800 rpm para garantizar que la biotina haya bloqueado todos los sitios de SA en las perlas de control negativo. Añadir 1 µl de solución madre de polímero y biotina a los tubos de control positivo y negativo. Agitar brevemente con vórtex y transferir a un mezclador orbital de velocidad variable e incubar durante 30 minutos a 800 rpm.

#### 15 Procesamiento/lavado de las perlas:

20

Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 480 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Añadir 0,5 ml de TBST a todas las muestras y controles y agitar con vórtex brevemente. Centrifugar a 1200g durante 2 minutos y eliminar 500 µl de sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el sedimento de perlas. Repetir las etapas 3 y 4. Eliminar la mayor cantidad posible de sobrenadante restante utilizando una pipeta P200 sin alterar el sedimento de perlas. Añadir 100 µl de TBST y agitar brevemente con vórtex para resuspender las perlas.

#### Medición de las perlas:

25

Transferir 100 µl de todas las muestras a una placa negra de 96 pocillos. Excitar los pocillos a 430 nm y recoger las emisiones en el intervalo de 450 a 650 nm utilizando los anchos de hendidura requeridos y/o la configuración de sensibilidad para lograr señales medibles por encima del fondo. Comparar la emisión de las perlas de control positivas y negativas.

30

En la figura 18 se muestra que el polímero modificado con biotina estaba unido a una microesfera de estreptavidina (arriba). En la figura 18 (abajo), la excitación a 440 nm en un fluorómetro dio como resultado la emisión del polímero como lo indica la curva superior continua. La curva continua inferior representa el control negativo donde la perla de estreptavidina se trató primero con un exceso de biotina para bloquear los sitios de unión antes del tratamiento con el polímero biotinilado. La curva continua inferior representa perlas solas.

35

#### Ejemplo 35: Unión selectiva del polímero marcado con biotina a conjugados de SA marcados con colorante para validar las propiedades de FRET y la actividad funcional de la modificación del polímero

40

#### Materiales necesarios:

Conjugado de biotina y polímero: (46 µM). Conjugado de Cy3 y SA (1 mg/ml o 18,9 µM). Placa negra de 96 pocillos.

#### Formación del complejo biotina y estreptavidina:

45

En un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, combinar 9,4 µl del conjugado de biotina y polímero y 2,9 µl de Cy3-SA. Agitar con vórtex para mezclar, después incubar en un agitador (debajo de papel de aluminio) durante 0,5 h. También son adecuados tiempos de incubación más prolongados.

#### 50 Configuración del instrumento:

Los experimentos modelo se realizaron en BioTek Synergy 4 en el modo fluorescencia con las siguientes configuraciones: Emisión: 400 a 750 nm en etapas de 5 nm y nivel de sensibilidad: 50.

55

#### Disposición de la placa:

Preparar soluciones en una placa negra de 96 pocillos como se muestra en la siguiente tabla. Tener cuidado de añadir la solución A + B al final, después de que se hayan añadido todos los demás materiales:

| Material                                                                              | Pocillo 1 | Pocillo 2 | Pocillo 3 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Polímero-biotina                                                                      | 9,4 µl*   | 9,4 µl    | -         |
| Cy3-SA                                                                                | 2,9 µl*   | -         | 2,9 µl    |
| Tampón                                                                                | 100 µl    | 100 µl    | 100 µl    |
| *Preincubado en la primera etapa, formación del complejo de biotina y estreptavidina. |           |           |           |

En la figura 19 se muestra que el polímero modificado con biotina se unió a una estreptavidina marcada con colorante (Cy3 o Texas Red - arriba). La excitación a 440 nm en un fluorómetro dio como resultado una emisión de los aceptores colorante en sus respectivas longitudes de onda de emisión (aproximadamente 570 nm y 620 nm respectivamente, abajo a la izquierda), así como algunas emisiones residuales del polímero (aproximadamente 520 nm). También se realizó una valoración para saturar la unión del polímero a la estreptavidina (abajo a la derecha). La curva continua indica la emisión del marcador Cy3 en la estreptavidina mediante la transferencia de energía desde el polímero a una excitación de 440 nm. La curva de puntos representa el control negativo donde la estreptavidina se trató primero con un exceso de biotina para bloquear los sitios de unión antes del tratamiento con el polímero biotinilado.

### Ejemplo 36: Conjugados de polímero y estreptavidina para su uso en citometría de flujo

Los bioconjugados de polímeros se evalúan mediante el índice de tinción, según lo definido por Becton Dickinson (BD) Biosciences en un citómetro de flujo. Véase, por ejemplo, H. Maeker y J. Trotter, BD Biosciences Application Note: "Selecting Reagents for Multicolour Flow Cytometry", septiembre de 2009. El índice de tinción indica una medida del brillo del polímero, la unión no específica y también puede relacionarse mediante el índice de resolución en un citómetro de flujo. La citometría de flujo proporciona un método mediante el cual se miden células de un fenotipo específico o analitos de interés en microesferas específicas. Esto se puede hacer con el marcado directo de un anticuerpo primario o, si se desea amplificar la señal, a través de un anticuerpo secundario o la formación de complejos de avidina y biotina con conjugados de avidina y polímero.

### Procedimiento para la tinción celular

Las células de interés se absorben en cantidad suficiente, al menos  $10^5$  por condición de prueba. A continuación, las células se centrifugan a 250 fcr durante 3 minutos, se lavan en DPBS + BSA al 0,2 % y  $\text{NaN}_3$  al 0,05 % (tampón de tinción), después se resuspenden en tampón de tinción a  $1 \times 10^7$  células/ml.

Para la incubación primaria, las células se incuban con un conjugado primario (anticuerpo indicador marcado) específico para un antígeno de interés, las células negativas sirven como referencia de unión negativa no específica. Como control positivo se utiliza una población de control o un conjugado comercial establecido. Los conjugados de polímero primario se incuban a 4 °C con  $4 \times 10^5$  alícuotas de células a concentraciones con diluciones de volumen de 10 a 330 nM durante 30 minutos. Después de la incubación primaria, las células se enjuagan con 5 volúmenes de tampón de tinción y se centrifugan a 250 fcr durante 3 minutos; este enjuague se repite tres veces. Las células se resuspenden para realizar pruebas a  $8 \times 10^5$  células/ml en DPBS + BSA al 0,2 %,  $\text{NaN}_3$  al 0,05 %.

Para el marcado con anticuerpos secundarios, se incuban un anticuerpo primario no marcado contra el antígeno de interés a 0,4 µg/µl, u otra cantidad valorada, a 4 °C con  $4 \times 10^5$  células por condición de prueba durante 30 min. Después de la incubación primaria, las células se enjuagan con 5 volúmenes de tampón de tinción y se centrifugan a 250 fcr durante 3 minutos; este enjuague se repite tres veces. Los conjugados de polímeros secundarios reactivos a especies se incuban a 4 °C con  $4 \times 10^5$  alícuotas de células a concentraciones con diluciones de volumen de 10 a 330 nM durante 30 minutos. Después de la incubación secundaria, las células se enjuagan con 5 volúmenes de tampón de tinción y se centrifugan a 250 fcr durante 3 minutos; este enjuague se repite tres veces. Las células se resuspenden para realizar pruebas a  $8 \times 10^5$  células/ml en DPBS + BSA al 0,2 %,  $\text{NaN}_3$  al 0,05 %.

Para el marcado del conjugado de estreptavidina y polímero, las células se incuban con un anticuerpo primario biotinilado contra el marcador de interés, como se detalló anteriormente para el marcado de anticuerpos secundarios, en lugar de un primario sin marcar. Después del lavado primario, las células se resuspenden y se dividen en  $4 \times 10^5$  alícuotas de células y se incuban con conjugados de estreptavidina y polímero en diluciones de volumen de 1 a 100 nM durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación secundaria, las células se enjuagan con 5 volúmenes de tampón de tinción y se centrifugan a 250 fcr durante 3 minutos; este enjuague se repite tres veces. Las células se resuspenden para realizar pruebas a  $8 \times 10^5$  células/ml en DPBS + BSA al 0,2 %,  $\text{NaN}_3$  al 0,05 %. Si desea una mayor amplificación de la señal, las células se incubarán con un anticuerpo primario no marcado y después seguirán con un anticuerpo secundario biotinilado reactivo a especies antes de la incubación con conjugados de estreptavidina. Las etapas de incubación, el protocolo de lavado y el protocolo de prueba deben seguirse como se detalló anteriormente.

Estos procedimientos de prueba de flujo se han desarrollado específicamente para los marcadores CD4 en las células Cyto-trol. Los protocolos de preparación e incubación de células pueden variar según el tipo de célula y se debe

desarrollar un protocolo óptimo de tinción, lavado y manipulación específico para el tipo de célula. Se han identificado intervalos de concentración de trabajo de anticuerpos como óptimos para los marcadores CD4 (35 al 50 % de la población) y CD45 (85 % de la población) en los linfocitos de control Cyto-trol, así como en la sangre entera lisada (solo para anticuerpos primarios). Los marcadores que tienen poblaciones significativamente diferentes a estos intervalos pueden quedar fuera de los intervalos de valoración sugeridos.

También se realizaron pruebas en una estirpe celular Jurkat cultivada siguiendo protocolos similares. En estas pruebas se utilizó un marcador CD45. Como no hay poblaciones de células negativas, se utilizó un procedimiento de control negativo diferente. En las muestras de control negativo, el anticuerpo primario se omitió de la etapa de incubación primaria. Esta etapa y todas las etapas posteriores se realizaron de acuerdo con el protocolo convencional. De nuevo se utilizó como control positivo un conjugado de colorante y anticuerpo o de colorante y estreptavidina comercial.

#### Procedimiento para el análisis de citometría de flujo

La prueba de flujo se realizó en tubos de ensayo, a volúmenes de 0,5 ml en un citómetro de flujo BD LSR II. Las pruebas de flujo se realizan utilizando los ajustes de voltaje determinados a partir de la calibración diaria del citómetro con partículas de calibración por parte del personal de la instalación de flujo. La selección específica de linfocitos mediante dispersión directa frente a dispersión lateral se realiza en muestras de células no teñidas como control de fondo. La activación doble convencional se realiza tanto para el área de dispersión frontal como para la dispersión lateral frente a los perfiles de ancho. Con un solo color, no se requiere compensación. Se recogen datos para todos los parámetros de dispersión frontal y lateral y las mediciones de fluorescencia se realizan con el canal Pacific Blue convencional de BD. Los datos de Pacific Blue utilizan excitación con láseres violetas de 408 nm y un filtro 450/50 BP. Se recogen muestras de 30.000 acontecimientos dentro de los parámetros de activación establecidos.

#### Experimentos representativos:

Se midió el marcado de CD4 en células Cyto-trol, linfocitos humanos liofilizados para analizar el rendimiento del polímero en flujo. Se reconstituyeron células Cyto-trol (Beckman Coulter) en el tampón de reconstitución proporcionado y se dejaron hinchar durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron a 250 fcr durante 3 minutos, se lavaron en DPBS + BSA al 0,2 % y  $\text{NaN}_3$  al 0,05 % (tampón de tinción/prueba), después se resuspenden en tampón de tinción a  $1 \times 10^7$  células/ml. La suspensión celular se dividió en dos; la mitad de las células se incubaron con anti-CD4 biotinilado a 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , la otra mitad de las células se incubaron con tampón de tinción como control negativo durante 30 min. Después de la incubación primaria, las células se enjuagaron con 5 volúmenes de tampón de tinción y se centrifugaron a 250 fcr durante 3 minutos; este enjuague se repitió tres veces. Las células se resuspendieron al volumen anterior en tampón de tinción. Se midieron  $4 \times 10^5$  células por prueba y se dividieron en consecuencia, se incubaron conjugados de estreptavidina y fluoróforo preparados en el ejemplo 19 a 100 nM con cada alícuota de células durante 30 min, lo que permitió que se formara el complejo de avidina y biotina. Después de la incubación secundaria, las células se enjuagaron y detallaron previamente. Se realizaron suspensiones celulares finales para realizar pruebas a  $8 \times 10^5$  células/ml.

El análisis de flujo se realizó en un citómetro de flujo BD LSR II en el The Scripps Research Institute (TSRI), San Diego, California. El personal del TSRI realizó la calibración de rutina con partículas fluorescentes Rainbow para alinear los canales fluorescentes en el citómetro, se utilizaron todos los voltajes calibrados, según la recomendación del personal. Todas las muestras se excitaron con un láser violeta de 408 nm, el conjugado polimérico se midió en el canal AmCyan con un filtro 525/50. Inicialmente, todas las muestras se referían a células no teñidas. El conjugado de polímero y estreptavidina de la figura 14 mostró un marcado secundario específico de las células CD4 positivas identificadas primariamente, con las células positivas como el 44 % de la población. El conjugado de polímero y estreptavidina demostró un índice de tinción positivo y mostró una baja unión no específica con referencia a las células no teñidas y su respectivo control negativo (Figura 20). (A)). Esto proporciona evidencia de que el polímero, aunque su absorbancia máxima sea de 440 nm, es un material fluorescente viable para su uso en citometría de flujo con excitación con láser violeta.

#### Conjugado de polímero y anticuerpo secundario en células Cyto-trol

El polímero 405 funcionalizado con amina se conjugó con un anticuerpo purificado IgG  $\kappa 1$  de cabra antirrátón mediante conjugación maleimida-tiol y reducción parcial del anticuerpo con TCEP. El polímero y el procedimiento de conjugación se proporcionan específicamente en el ejemplo 46.

Los conjugados se probaron en células Cyto-trol (Beckman Coulter), una población de células linfocitarias fijadas y liofilizadas para pruebas de control de antígenos humanos específicos. La tinción celular siguió el protocolo de tinción celular secundaria. Las células se incubaron con y sin (control negativo) anti-CD4 no marcado (clon RPA-T4, BD Biosciences) cultivado en ratón contra el antígeno humano. Después del lavado completo de la incubación del anticuerpo primario, las células se incubaron con conjugados de polímero marcado con antirrátón de cabra para el marcado específico de células CD4 positivas identificadas primariamente. El marcado secundario se produce mediante el reconocimiento de Fc y la unión del anticuerpo primario de ratón por la IgG secundaria de cabra, cultivado contra especies murinas. Se utilizó un control positivo mediante incubación con IgG de cabra antirrátón Pacific Blue disponible

comercialmente (Invitrogen) como especie de marcado secundario.

En la figura 20 (B) se representa el reconocimiento específico de células CD4 específicas por los conjugados fluorescentes secundarios. Las células no teñidas muestran un control negativo y una autofluorescencia natural de las células, y la incubación del conjugado polimérico en células sin marcado primario muestra una unión no específica mínima del conjugado a las células no marcadas. El control positivo, el antirratón de cabra Pacific Blue, muestra el patrón disponible comercialmente para el marcado de CD4 mediante anticuerpo secundario con excitación violeta. El conjugado de polímero 405 y antirratón de cabra (rojo) muestra una identificación positiva de células CD4 positivas, un cambio mínimo en la población de células negativas y una gran señal fluorescente y resolución que el patrón Pacific Blue.

En la figura 20 (C) se representan conjugados de polímero y estreptavidina en células Jurkat. Se produjeron conjugados con el polímero proporcionado en el ejemplo 11 usando el protocolo definido en el ejemplo 29. El índice de tinción para el conjugado de polímero y estreptavidina fue más de 10 veces mayor que el obtenido para el conjugado de control de estreptavidina Pacific Blue disponible comercialmente.

En la figura 20 (D) se representa un conjugado de polímero y anticuerpo monoclonal primario (anti-CD4, RPA-T4) evaluado en células Cyto-trol usando los protocolos definidos anteriormente. El conjugado se preparó con los polímeros y protocolos definidos en el ejemplo 46. También se pueden encontrar detalles adicionales de la conjugación en el ejemplo 39.

### **Ejemplo 37: Preparación de polímero conjugado con perlas COOH mediante acoplamiento EDC**

#### **Materiales (por 100 µl de perlas):**

Perlas magnéticas funcionalizadas con COOH LodeStars (Varian, Inc. PL6727-0001) (100 µl de suspensión con un especificación de 30 mg/ml). Polímero con extremos terminales amina del ejemplo 17 (125 µl a 1,6 µM en MES 25 mM pH 5, para un exceso de 10 veces sobre la capacidad teórica de las perlas). NaOH 10 mM (2 ml). H<sub>2</sub>O DI (3 ml). MES frío 25 mM, pH 5. EDC a 50 mg/ml en MES frío 25 mM, pH 5 (100 µl). NHS a 50 mg/ml en MES frío 25 mM, pH 5 (100 µl). Tris-HCl 100 mM (pH 7,4 (1 ml). Centrifuga y placa negra de 96 pocillos de fondo plano.

La capacidad de los anticuerpos se proporcionó a 10 µg/mg de perla, dando una capacidad de acoplamiento de amina de 2 nmol de polímero/ml de perla (a 30 mg/ml). Se utilizó un exceso de polímero 10 veces superior a la capacidad sugerida para alcanzar la concentración de anticuerpos indicada en el protocolo de Varian.

#### **Lavado de las perlas**

Las perlas se lavaron juntas en 600 µl y después se dividieron en muestras de 6 × 100 µl para el acoplamiento. Las perlas se lavaron 2× con 1 ml de NaOH 10 mM, después 3× con 1 ml de H<sub>2</sub>O DI; entre los lavados, el tubo se centrifugó durante 1 min a 3000 rpm para recoger las perlas en forma de sedimento, se descartó el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en el siguiente lavado. Tras el lavado final, las perlas se resuspendieron en 600 µl de MES frío 25 mM, pH 5, y se dividieron en alícuotas en volúmenes de 6 × 100 µl en tubos de microcentrifuga. Las perlas se centrifugaron de nuevo durante 1 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante.

#### **Activación con EDC**

Se añadieron 100 µl de la solución de EDC a cada conjunto de reacción. Se añadieron 100 µl de la solución de NHS a cada conjunto de reacción. Las perlas se resuspendieron mediante agitación con vórtex y después se dejaron mezclar en un rotador durante 30 minutos. Las perlas se lavaron 2× en MES frío 25 mM, pH 5, se sedimentaron mediante centrifugación durante 1 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las perlas se resuspendieron en 125 µl de MES frío 25 mM, pH 5.

#### **Acoplamiento del polímero**

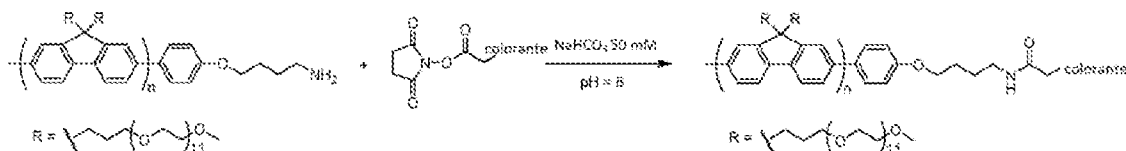
Se añadieron 125 µl de polímero a 1,6 µM. Las muestras se agitaron con vórtex para mezclarlas completamente y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente en un mezclador durante 3 horas. Las perlas se sedimentaron mediante centrifugación durante 1 min a 3000 rpm; el sobrenadante se descartó. Las perlas se resuspendieron en 1 ml de Tris/HCl 100 mM para bloquear los sitios COOH que no reaccionaron, se agitaron con vórtex y se mezclaron durante 1 hora.

Las perlas se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de MES 25 mM. En este punto, el sobrenadante de varios tubos era de color amarillo y tenía una absorbancia significativa a 440 nm; las perlas se lavaron 6 veces hasta que la absorbancia estuvo en el valor inicial. Las perlas reposaron durante 2 días adicionales antes de la medición de la fluorescencia, después de permanecer en solución durante 2 días, el sobrenadante volvió a ser de color amarillo y tenía una absorbancia medible. Las perlas se lavaron 3 veces más con mezclas de 30 minutos entre ellas hasta que no se pudo medir la absorbancia. 2 días después de las mediciones de fluorescencia, el sobrenadante

permaneció claro y libre de absorbancia medible.

### Ejemplo 38: Preparación de conjugados de polímero y colorante

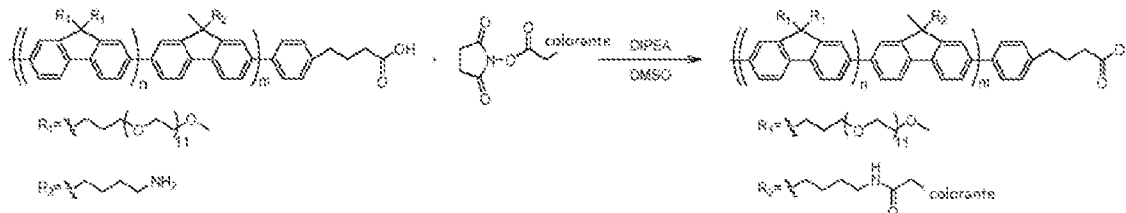
#### 5 Ejemplo 38a: Preparación de conjugado de polímero y colorante en el extremo del polímero



Se disolvieron 0,5 mg de polímero terminado en amina en 15  $\mu$ l de DMSO. A continuación, la solución de polímero se intercambió por tampón  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM, pH 8 y se recuperó en tampón a  $\sim 5$  mg/ml según lo determinado por absorbancia UV-VIS. Se disolvieron 50  $\mu$ g de colorante éster NHS (DyLight 594) a 10 mg/ml en DMSO anhidro, que después se añadió inmediatamente a 120  $\mu$ g de polímero. El tubo se mezcló en un agitador (600 a 800 rpm) durante 1 h y posteriormente se diluyó a 100  $\mu$ l con EtOH al 20 % en agua. La mezcla se añadió a una columna Superdex 200 SEC de 30 cm en NaCl 0,6 M y EtOH al 20 % para separar el conjugado de polímero y colorante del colorante sin reaccionar. La adición de colorante se puede utilizar para estimar la incorporación del enlazador en la estructura del polímero mediante la medición de una relación de absorbancia basada en los coeficientes de extinción relativos del polímero y el colorante. Con el peso molecular del polímero es posible estimar el número de cadenas poliméricas que contienen un enlazador.

En realizaciones adicionales, los polímeros con una cadena lateral de ácido carboxílico se modifican con colorantes con funcionalidad amina usando procedimientos de conjugación con EDC convencionales o mediante la conversión primero al éster NHS usando un protocolo similar al descrito en el ejemplo 29. También se han demostrado colorantes de tiol conjugados con polímeros terminados en maleimida. Se esperaría que cualquier intervalo de pares químicos funcionara de manera similar para conjugar un polímero y un colorante.

#### 25 Ejemplo 38b: Preparación del conjugado de polímero y colorante en posición interna



En una caja de manipulación con guantes, se disolvieron 100 mg de polímero con funcionalidades de amina interna en 10 ml de DMSO anhidro en un frasco de centelleo de color ámbar de 20 ml. Se añadieron 0,32 ml de DIPEA a la solución de polímero. Se disolvieron 24 mg de colorante éster NHS (Cy3) en 2,4 ml en DMSO anhidro y se añadieron a la solución polimérica. El frasco se cerró herméticamente, después se sacó de la caja de manipulación con guantes y se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. A continuación, la reacción se purificó en unidades de filtración centrífuga Amicon Ultra (MWCO = 30 kDa) con etanol al 20 % en agua hasta que se eliminó todo el colorante libre. La pureza se verificó pasando una muestra de 0,15 mg a través de una columna Superdex 200 SEC de 30 cm en NaCl 0,6 M y etanol al 20 %. 90 mg, rendimiento del 90 %.

La adición de colorante se puede utilizar para estimar la incorporación de monómeros enlazadores en la estructura del polímero mediante la medición de una relación de absorbancia basada en los coeficientes de extinción relativos del polímero y el colorante. Para los polímeros descritos anteriormente, la relación de monómeros enlazadores (o fijaciones de colorante) por monómero de fluoreno en el polímero final concuerda en general con la relación de alimentación molar de los monómeros utilizados en la reacción de polimerización.

Los polímeros con una cadena lateral de ácido carboxílico también se pueden modificar con colorantes con funcionalidad amina mediante procedimientos de conjugación con EDC convencionales o mediante la conversión primero al éster NHS usando un protocolo similar al descrito en el ejemplo 29.

Se pueden utilizar procedimientos análogos para conjugar una variedad de colorantes que incluyen Cy3, Dylight 549, Dylight 633, FAM, FITC, Alexa633, Alexa647 y varios otros. Los polímeros con una cadena lateral de ácido carboxílico también se pueden modificar con colorantes con función amina mediante procedimientos de conjugación con EDC convencionales.

En la figura 21 (A) se muestra la estructura polimérica anterior conjugada con (de izquierda a derecha) FITC, Cy3,

DyLight 594 y DyLight633. El polímero solo se muestra como referencia (extremo izquierdo). Obsérvese que en cada caso la cantidad de emisión residual del donante (polímero) es mínima. Los datos destacan la capacidad de generar varias señales de diagnóstico en diferentes longitudes de onda para múltiples aplicaciones. En esta realización, una única fuente de luz es capaz de generar cinco longitudes de onda de emisión distintas.

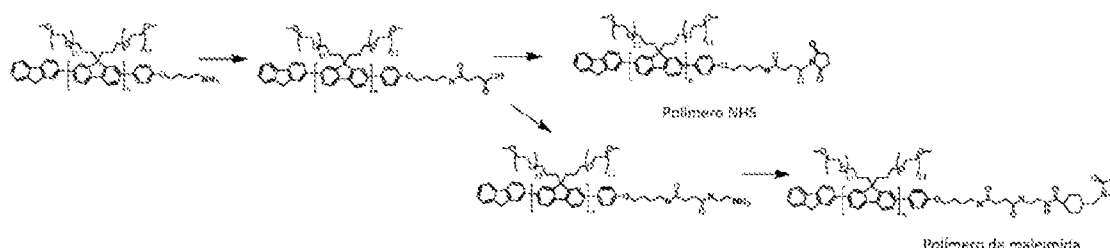
**Ejemplo 38c:** Evaluación de la transferencia de energía para conjugados de polímero y colorante basada en la excitación del polímero para su uso en conjugados poliméricos en tándem

En la figura 21 (B) se representa una comparación de la fluorescencia del colorante (DyLight594) excitado cerca de su máximo de absorbancia (curva inferior) y el conjugado de polímero y colorante excitado a 405 nm (curva superior). La emisión del colorante alrededor de 620 nm fue más de 5 veces más brillante a partir del conjugado de polímero y colorante a la misma concentración molar de colorante frente a la excitación directa del colorante. Dichas realizaciones resaltan la amplificación de señal proporcionada por los donantes poliméricos divulgados en procesos de transferencia de energía. La imagen en la esquina superior izquierda resalta el cambio de color visual en la emisión del complejo basado en la conjugación de colorantes. La solución de polímero emite azul en ausencia de colorante y rojo tras la conjugación con el colorante (pospurificación).

En la figura 21 (C) se compara la señal fluorescente del polímero base (sin colorante, emisión máxima cerca de 420 nm) con la del conjugado de polímero y colorante (emisión máxima cerca de 620 nm). El colorante DyLight594 desactiva >98 % de la emisión del polímero cuando se conjugaba con el polímero anterior (Ejemplo 38b). Esta es una característica de los materiales poliméricos, ya que cualquier emisión restante del donante podría manifestarse como señal de fondo en formatos de múltiples ensayos. La capacidad de conjugar el colorante directamente con la estructura del polímero y variar el número de sitios de unión proporciona una transferencia eficaz que puede regularse mediante diseño químico.

#### **Ejemplo 39: Prueba de flujo de conjugados de anticuerpos monoclonales (anti-CD4) en muestras de sangre completa lisada**

Se produjeron conjugados poliméricos de anticuerpo primario anti-CD4 (clon RPA-T4) mediante 3 rutas de conjugación diferentes como se proporciona en los ejemplos 45, 46 y 49. 1) Polímero modificado con amina convertido en un grupo reactivo de maleimida usando SMCC (entrecruzador de maleimida/NHS) reaccionado con grupos tiol en el anticuerpo introducido mediante la reacción de SATA (entrecruzador tiol/NHS) con grupos lisina (amina) (CJ11-2, figura 22). 2) El mismo polímero modificado con SMCC (maleimida) pero con grupos tiol introducidos en el anticuerpo usando TCEP para reducir parcialmente los enlaces disulfuro en el anticuerpo (CJ13-2, figura 22 y figura 20D). 3) Un polímero terminado en ácido carboxílico activado con TSTU para formar el éster NHS se hizo reaccionar directamente con los grupos lisina (amina) en el anticuerpo (CJ04-2, figura 22). Todos los conjugados se prepararon a partir de la misma estructura polimérica y lote. El polímero se sintetizó mediante el protocolo representado en el ejemplo 12 con una unidad de protección terminal de amina en lugar de la unidad de protección de ácido carboxílico que se muestra. La conjugación NHS/amina se realizó con el protocolo descrito en el ejemplo 45. Las reacciones de conjugación maleimida/tiol se realizaron siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 46 y 49.

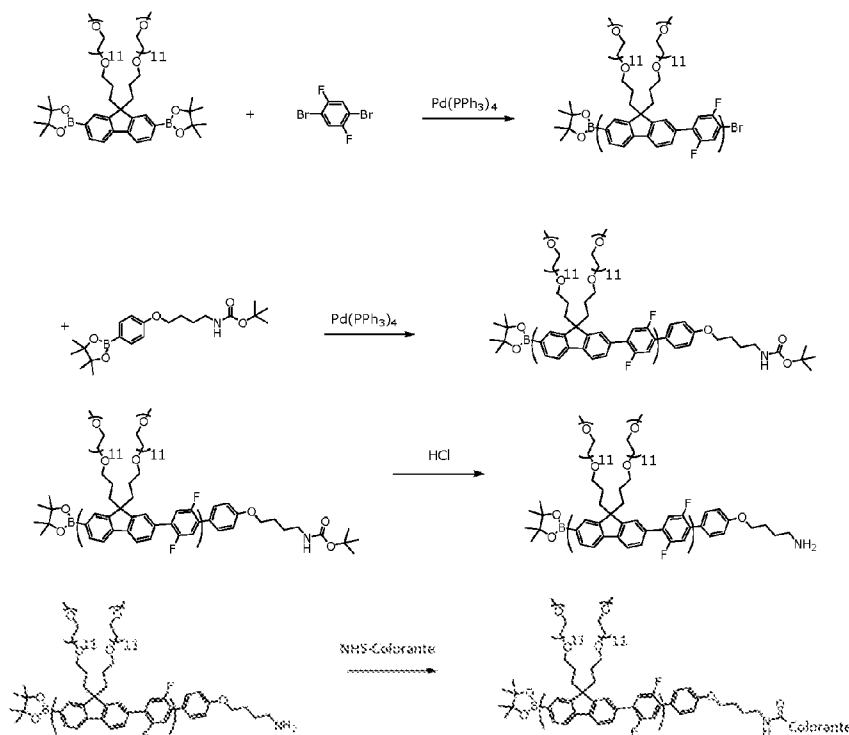


En la figura 22 se representa el rendimiento de estos conjugados en citometría de flujo realizada de la siguiente manera. Se repartieron en alícuotas 100  $\mu$ l de sangre humana completa de un voluntario sano en tubos FACS (duplicados para cada muestra). Los conjugados de anticuerpos se diluyeron en tampón de lavado (PBS con BSA al 0,5 % y azida sódica al 0,1 %) y se añadieron a la sangre en concentraciones específicas. Las muestras se agitaron con vórtex vigorosamente y después se incubaron durante 15 a 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de solución 1 $\times$  BD FACS Lyse a cada muestra y se mezclaron mediante agitación con vórtex vigorosa antes de una incubación adicional de 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 500g y el sobrenadante se extrajo y se descartó. Las muestras se agitaron con vórtex y se añadieron 3 ml de tampón de lavado (PBS con BSA al 0,5 % y azida sódica al 0,1 %). La centrifugación se repitió a 500g durante 5 min más. El sobrenadante resultante se extrajo y se descartó y el sedimento celular restante se agitó con vórtex. Las muestras se procesaron en un citómetro de flujo BD LSRII adquiriendo todos los canales violetas equipados con un láser violeta y un filtro de 450/50 nm que se había configurado y precalibrado frente a perlas BD CST. Todas las muestras de conjugados de polímeros (líneas CJ04-2, CJ11-2 y CJ13-1) mostraron una unión no específica mínima en comparación con las células no teñidas. Además, todos los conjugados de polímero produjeron

señales positivas significativamente más elevadas que un conjugado de control Pacific Blue disponible comercialmente del mismo clon de anticuerpo que se utiliza normalmente para citometría de flujo en longitudes de onda compatibles. Los conjugados de mejor rendimiento de este conjunto proporcionaron un índice de tinción 6 veces mayor que el anticuerpo de control Pacific Blue disponible comercialmente.

5

#### Ejemplo 40: Preparación del conjugado de polímero y colorante



10

El polímero se conjugó con un colorante, DyLight 594, y se purificó de manera similar a los métodos descritos en el ejemplo 36. En la figura 23 se representa una comparación de la fluorescencia del colorante (DyLight594) y el conjugado de polímero y colorante. El colorante se excitó a 594 nm y el conjugado de polímero y colorante a 380 nm.

15

#### Ejemplo 41: Inmunoensayo fluorescente (ELISA) con polímero conjugado con estreptavidina

Se desarrolló un inmunoensayo para IgG humana como sistema demostrativo en formato de placa de 96 pocillos. En realizaciones adicionales, una funcionalidad similar sería igualmente aplicable en otros formatos, incluidas microesferas suspendidas y micromatrices de chips de proteínas.

20

##### Etapas 1: Preparación de reactivos.

25

El concentrado de lavado se preparó mediante la disolución de 79,2 g de cristales preestablecidos de base Tris (pH 7,7), 225 g de cloruro de sodio y 0,5 g de timerosol en 1000 ml de agua desionizada. La solución de lavado se preparó mediante la adición de 100 ml de concentrado de lavado a 2400 ml de agua desionizada. Posteriormente, se añadieron 10 ml de Triton X-100 al 10 %. El tampón de ensayo básico se preparó mediante la disolución de 14,8 g de cristales preestablecidos de base Tris (pH 7,7), 18 g de cloruro de sodio y 0,5 g de timerosol en 2000 ml de agua Milli-Q (conductividad 18,2 mΩcm). Posteriormente, se añadieron 2 ml de Tween 20 al 10 % y 10 g de fracción V de seroalbúmina bovina, esencialmente libre de gamma globulina. La solución se filtró y se almacenó a 4 °C.

30

##### Etapas 2: Preparación de placas recubiertas con anticuerpos de captura.

35

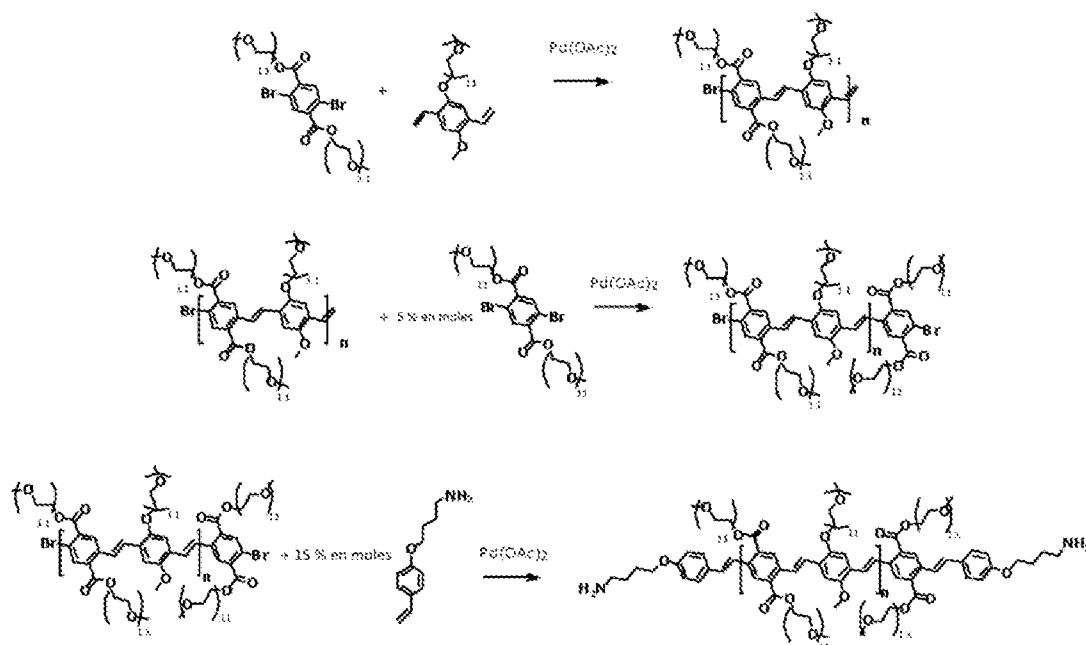
El anticuerpo de captura recubrió la superficie de placas Nunc white Maxisorp de 96 pocillos a una concentración de aproximadamente 1 microgramo por pocillo. Las placas se sellaron y almacenaron durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las placas se lavaron una vez con solución de lavado y se secaron con golpecitos en papel absorbente. A menos que se indique de otro modo, todo el lavado de placas en este ejemplo se realizó en un lavador de placas de microvaloración automatizado. Se añadieron a cada pocillo doscientos cincuenta (250) microlitros de tampón de bloqueo (PBS 0,1 M que contiene BSA al 2 %), las placas se volvieron a sellar y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

40

##### Etapas 3: Inmunoensayo.

Las placas de microvaloración recubiertas con anticuerpos de captura se lavaron dos veces con solución de lavado y se secaron con golpecitos en papel absorbente. Se añadieron doscientos (200)  $\mu$ l de muestra convencional de ensayo o experimental desconocida por cuadruplicado a los pocillos adecuados de la placa recubierta. Las placas se incubaron en un agitador durante 2 horas a 18 °C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado, se secaron con golpecitos en papel absorbente y se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ l de anticuerpo de detección biotinilado a una concentración óptima previamente determinada (diluido en tampón de ensayo y filtrado antes de su uso). Las placas se incubaron en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 60 minutos más. A continuación, se lavaron las placas tres veces y se secaron golpeteando en papel absorbente. Doscientos (200)  $\mu$ l de conjugado de estreptavidina y polímero filtrado con jeringa de 0,2 micrómetros, tal como se preparó en el ejemplo 30, se diluyeron hasta una concentración previamente determinada como adecuada en tampón de ensayo. El polímero era un polímero de fluoreno con cadenas laterales neutras de PEG11 y un sitio de conjugación de amina. Las placas se incubaron en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 2 horas más. A continuación, se lavaron las placas seis veces, se secaron con golpecitos, se giraron 180° y se volvieron a lavar seis veces más. Las placas se secaron nuevamente con golpecitos en papel absorbente. Se añadieron doscientos (200)  $\mu$ l de reactivo de liberación filtrado (hidróxido de sodio 0,1 M, Triton X-100 al 2 %) utilizando una pipeta multicanal, las placas se agitaron durante 60 minutos a temperatura ambiente y la fluorescencia se midió con un fluorómetro Victor. A continuación se selló la placa, se almacenó durante la noche a 4 °C y se volvió a leer en el fluorómetro Victor a la mañana siguiente. Los recuentos de fluorescencia se analizaron utilizando el programa informático Multicalc de Perkin Elmer para determinar el límite inferior de detección del ensayo y una variedad de parámetros similares. También se evaluaron condiciones alternativas para liberar el conjugado de la superficie de la placa de pocillos para mejorar la lectura fluorescente. En la figura 24 se muestra un conjunto de datos representativo. También se hicieron comparaciones con conjugados de SA y colorante disponibles comercialmente. Los conjugados poliméricos demostraron límites de detección superiores en relación con los conjugados colorantes como se esperaba debido a las propiedades ópticas colectivas.

#### Ejemplo 42: Síntesis, conjugación y aplicación del copolímero de para-fenileno vinileno con enlazador funcional activo para bioconjugación



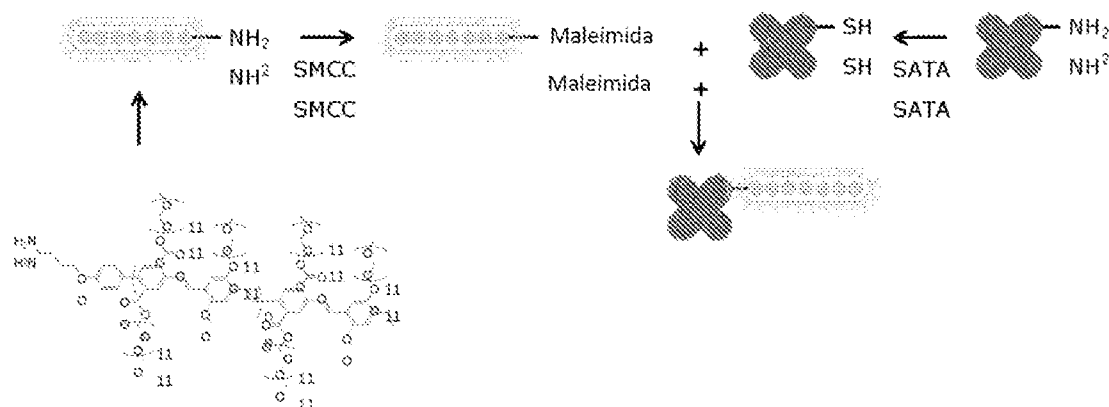
Poli(1,4-(di(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontan-34-il 2,5-dibromotereftalato)-vinil-alt-para(2-metoxi-5-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontan-34-il-benceno)-vinileno) con extremos fenilbutoxiamino.

Se combinaron 2,5-dibromotereftalato de di-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontan-34-ilo (2,0 g, 1,52 mmol), 34-(4-metoxi-2,5-divinilfenoxi)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontano (1,11 g, 1,52 mmol), acetato de paladio (13,6 mg, 0,061 mmol), tri-*o*-tolilfosfina (37 mg, 0,121 mmol), trietilamina (1 ml, 7,6 mmol) y 4 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo, equipado con una barra de teflón, equipado con una válvula de aguja y transferido a una línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación, se puso en nitrógeno y se calentó a 100 °C con agitación constante durante la noche. A continuación, se combinaron 2,5-dibromotereftalato de di-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontan-34-ilo (2,0 g, 1,52 mmol) (100 mg, 5 % molar), acetato de paladio (5 mg) y tri-*o*-tolilfosfina y 0,5 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo que estaba equipado con una válvula de aguja y se transfirió

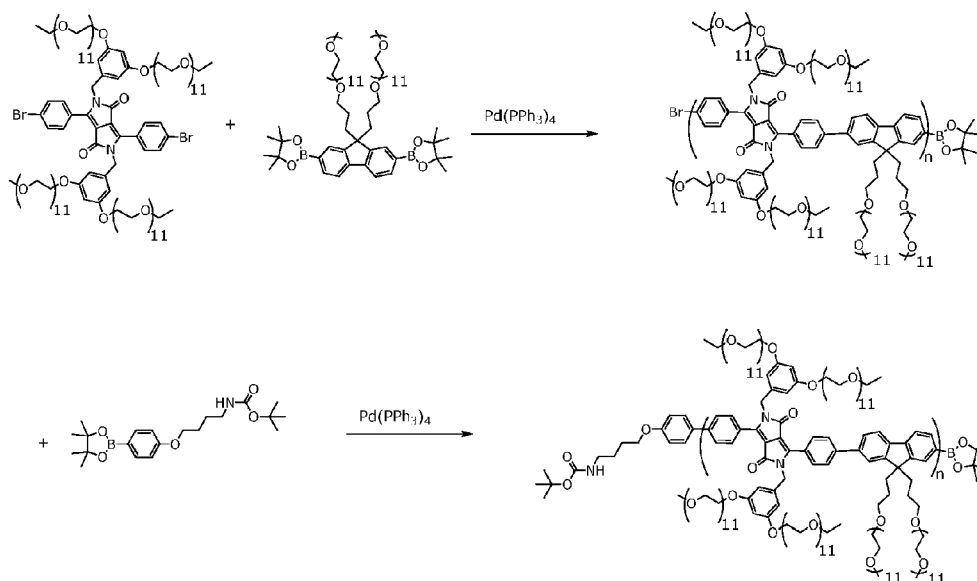
a la línea de Schlenk. La solución se desgasificó mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y una vez calentada a temperatura ambiente se transfirió a la reacción de polimerización con una cánula para excluir el aire y la humedad. Se dejó reaccionar la mezcla durante la noche. A continuación, se combinaron 4-(4-bromofenoxi)butan-1-amina (43 mg, 15 % molar) y 0,5 ml de DMF en un pequeño matraz de fondo redondo, equipado con una barra de teflón, equipado con una válvula de aguja y transferido a una línea de Schlenk. Una vez calentada a temperatura ambiente, la solución se transfirió a la reacción de polimerización con una cánula para excluir el aire y la humedad. Se dejó reaccionar la mezcla durante la noche. Al día siguiente, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y la mayor parte de la trietilamina se eliminó al vacío. La mezcla de reacción se diluyó con ~30 ml de agua y se filtró a través de papel de filtro de fibra de vidrio G6. El filtrado se transfirió a varios filtros Amicon (límite de 10 kDa) para concentrar el polímero y eliminar la DMF. El agua restante se elimina al vacío y el residuo se extrae con cloruro de metileno. La solución de cloruro de metileno se seca en sulfato de magnesio y se filtra. El disolvente se elimina dejando un aceite espeso de color rojo oscuro, aproximadamente 900 mg.

Se encontró que el polímero tenía un  $M_n$  de 20.400 g/mol según lo determinado mediante análisis GPC con respecto a patrones de poliestireno. La incorporación del enlazador de amina se verificó mediante la conjugación de un colorante con el polímero final como se describe en el ejemplo 38.

A continuación, se conjugó el polímero con la proteína estreptavidina de la siguiente manera: El polímero de amina se disolvió a 50 mg/ml, se desalinizó y se intercambió el tampón por un tampón fosfato 100 mM, pH 7,5. La concentración del polímero se evaluó mediante absorbancia y se añadieron 25 equivalentes molares de SMCC (10 mg/ml en DMSO anhidro). La reacción se mezcló durante 60 minutos a temperatura ambiente y después se desalinizó y se intercambió el tampón en PBS pH 7,0 + EDTA 5 mM antes de repetir la determinación de la concentración del polímero y confirmar la funcionalidad de maleimida mediante la prueba de colorante de fluoresceína SAMSA. Se activó la estreptavidina (5 mg/ml en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5) mediante la adición de 20 equivalentes molares de SATA (5 mg/ml en DMSO anhidro). La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de desactivarla (>15 minutos a temperatura ambiente) con EDTA 50 mM al 10 % (v/v), hidroxilamina 2,5 M, pH 7,0. La proteína activada se desalinizó y el tampón se intercambió por el mismo tampón que el del polímero activado antes de realizar un ensayo de Ellman para confirmar y cuantificar la incorporación de tiol. Tanto el polímero activado como la estreptavidina se utilizaron sin demora como sigue. Se añadió un exceso molar superior al orden de magnitud de polímero activado por SMCC a la estreptavidina activada por SATA y los dos se mezclaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de la desactivación con 20 equivalentes molares de N-etilmaleimida que se mezcló durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó cromatografía de intercambio iónico y exclusión por tamaño para purificar el bioconjugado de polímero sin reaccionar y estreptavidina. Se combinaron las fracciones adecuadas para maximizar el rendimiento y los resultados y después se concentraron mediante ultrafiltración.



Se probó el conjugado y se comparó su rendimiento con un conjugado de estreptavidina y ficoeritrina (SA-PE) disponible comercialmente diseñado específicamente en un ensayo modelo Luminex xMap (Figura 27, izquierda). El anticuerpo IgG de burro antirratón se conjugó covalentemente con perlas xMap. A continuación, se realizó una valoración de curva convencional de IgG de ratón en condiciones de ensayo Luminex xMap convencionales (Figura 27, derecha). Se detectaron muestras repetidas utilizando 4  $\mu$ g/ml de estreptavidina-ficoeritrina o un conjugado de polímero conjugado con estreptavidina preparado como anteriormente (la concentración no se controla rigurosamente). Después se leyeron las muestras en un instrumento Luminex. Se encontró que las señales absolutas eran menores con el polímero conjugado. Esto se atribuye en parte a una coincidencia no ideal entre los espectros del polímero y las ópticas de excitación y emisión en el instrumento, así como a la supuesta concentración más baja del reactivo de detección utilizado en comparación con el producto de ficoeritrina disponible comercialmente. Sin embargo, el fondo proporcional (señal no específica) del polímero también fue notablemente menor, lo que dio como resultado un límite inferior de detección muy comparable para ambos formatos de detección (punto más elevado de fluorescencia en la curva convencional/concentración cero de fluorescencia del analito (MFI/cero): 21,8 PE, 26,6 polímero).

**Ejemplo 43: Síntesis de un copolímero de fluoreno con una unidad modificadora de banda prohibida DPP**

5

A un matraz de fondo redondo de 25 ml se le añadió: monómero de dibromo-DPP PEGilado (110 mmol), éster diborónico de fluoreno PEGilado (110 mmol), disolvente THF (2,4 ml),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2 M (1,6 ml) y catalizador de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (3,3 mmol). La mezcla se desgasificó mediante tres ciclos de congelación-bombeo-descongelación y después se agitó en una atmósfera de argón a 80 °C durante la noche. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente y se diluyó con agua. El polímero se recogió después de la extracción con diclorometano.

10

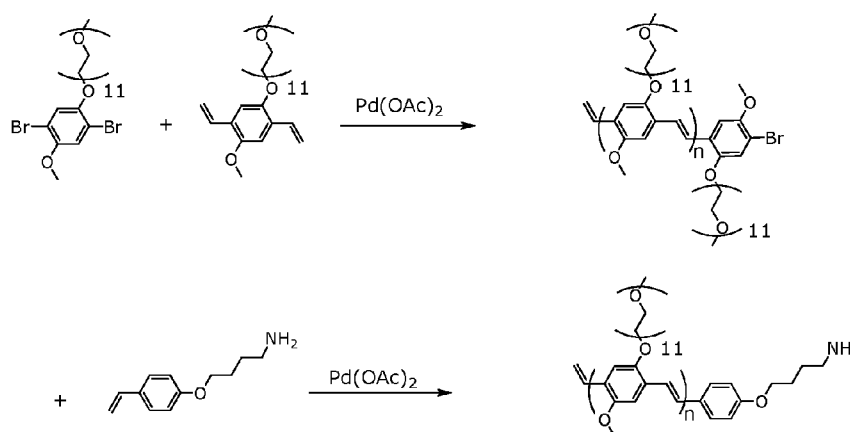
Se encontró que el polímero resultante tenía un máximo de absorción a 520 nm y un máximo de emisión a 590 nm con un rendimiento cuántico del 6 % en agua. El polímero tenía un MW estimado en 16.000 mediante análisis GPC en relación con los patrones de poliestireno y era soluble en agua, metanol y diclorometano.

15

La incorporación del enlazador terminal se puede realizar mediante métodos similares a los descritos anteriormente e incluidos los métodos descritos en los ejemplos 9, 10 y 11.

**Ejemplo 44: Síntesis de un polímero de divinilbenceno sustituido**

20

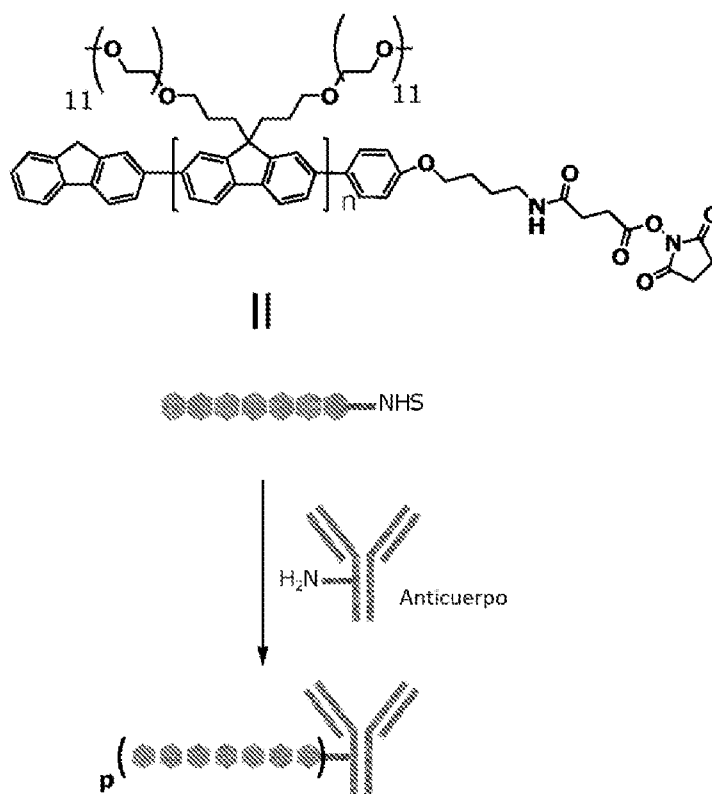


Los métodos utilizados para preparar el polímero anterior fueron similares a los proporcionados en el ejemplo 38. Los métodos generales para la preparación de polímeros de divinilbenceno divulgados en el presente documento pueden proceder de reacciones conocidas en la materia así como de métodos encontrados en el presente documento, y las reacciones pueden modificarse mediante el uso de reactivos y condiciones adecuados, como reconocería el experto en la materia, para la introducción de las diversas fracciones que se encuentran en las fórmulas que se proporcionan en el presente documento.

25

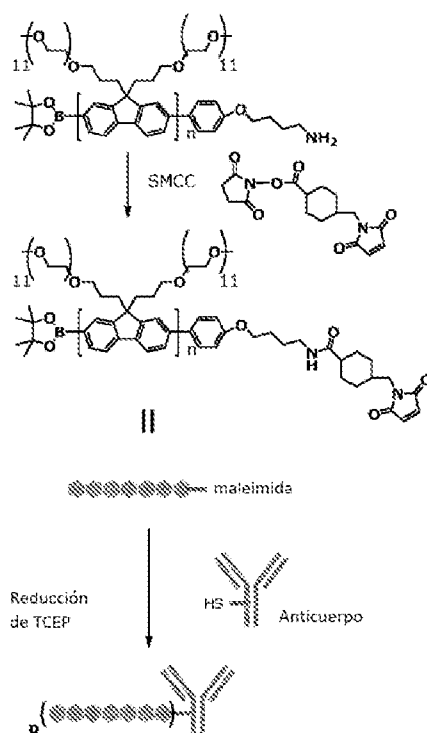
**Ejemplo 45: Conjugación de un polímero con una amina en un anticuerpo primario**

30



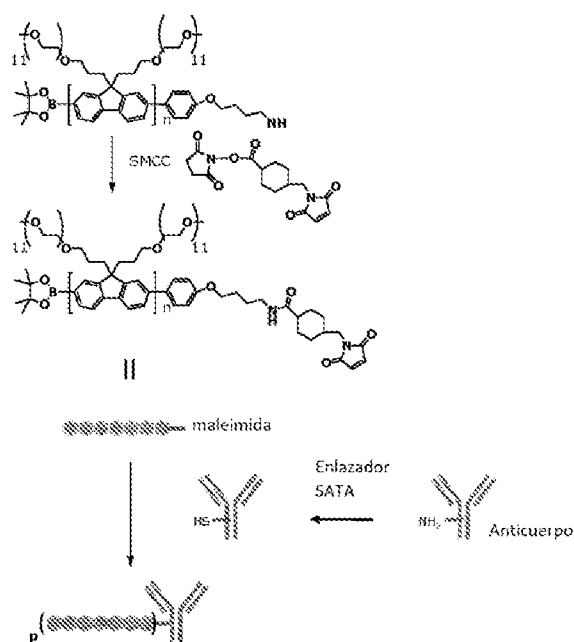
#### Procedimiento para la producción de conjugado de polímero de éster NHS y anticuerpo

- 5 Se desalinizó el anticuerpo monoclonal primario anti-CD4 (clon RPA-T4) y se intercambió en tampón  $\text{NaHCO}_3$  50 mM, pH 8,2 a 1 mg/ml. El polímero funcionalizado con NHS enriquecido se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro a 100 mg/ml. Se añadió solución de polímero con un exceso molar de 30 veces de anticuerpo a la solución de anticuerpo y se dejó mezclar mediante agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. La concentración de proteína se ajustó con tampón antes de la incubación para garantizar que el volumen del disolvente orgánico fuera <10 % del volumen
- 10 total. Después de la ultrafiltración en un dispositivo de filtro de MWCO de 10 KDa, se utilizaron técnicas cromatográficas de intercambio iónico y exclusión por tamaño para purificar el bioconjugado de polímero y anticuerpo sin reaccionar, respectivamente. Se combinaron las fracciones adecuadas para maximizar el rendimiento y se intercambió el tampón en PBS +  $\text{NaN}_3$  al 0,05 % y simultáneamente se concentra por ultrafiltración como anteriormente. Se determinó el grado de marcado (indicado como *p* arriba) a través de la absorbancia a 405 nm y un
- 15 valor corregido a 280 nm. El conjugado de polímero (CJ04-02) proporcionado en el ejemplo 39 (Figura 22) tenía un F/P (n.º de polímeros por anticuerpo) de aproximadamente 2,04. Este conjugado demostró rendimiento de flujo según lo determinado por las mediciones del índice de tinción que fueron más de 3 veces superiores que un conjugado de control Pacific Blue del mismo anticuerpo.
- 20 **Ejemplo 46: Conjugación de un polímero con un anticuerpo usando analitos químicos de maleimida/tiol**  
**Conjugación de polímeros con maleimida/tiol con anticuerpos parcialmente reducidos**



Se reconstituyó el anticuerpo secundario IgG de cabra antirratón (H + L) en PBS + ácido acético 10 mM y se desalinizó/intercambió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 1,0 mg/ml. Se disolvió TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, se añadió con un exceso molar de 6 con una concentración final de TCEP de 10 mM y se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente. La proteína modificada se purificó en una columna de desalación PD-10 para eliminar el exceso de TCEP y se intercambió con tampón de reacción, NaPO<sub>4</sub> 100 mM, tampón de reacción a pH 6,5 con EDTA 10 mM. El polímero activado con amina se disolvió en DMSO anhidro a 10 mg/ml y se mezcló con un enlazador de succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC). El enlazador se añadió a 50 mg/ml, un exceso molar de 20 en DMSO a la solución de polímero y se activó mediante diisopropiletilamina (DIPEA). La reacción se purificó en filtros de centrifugación Amicon Ultra y se intercambió en tampón de reacción, NaPO<sub>4</sub> 100 mM, tampón de reacción a pH 6,5 con EDTA 10 mM. Inmediatamente después de la reducción con disulfuro, se añadió polímero funcionalizado con maleimida en tampón de reacción a 10 mg/ml en un exceso molar de 20 de anticuerpo y se dejó mezclar durante 4 horas. A continuación, se utilizaron técnicas cromatográficas de intercambio iónico y exclusión por tamaño para purificar el bioconjugado de polímero y anticuerpo sin reaccionar, respectivamente. Se determina el grado de marcado (indicado como *p* arriba) a través de la absorbancia a 405 nm y un valor corregido a 280 nm. El conjugado de polímero proporcionado en el ejemplo 36 (Figura 20B) tenía un F/P (n.º de polímeros por anticuerpo) de aproximadamente 2. Este conjugado demostró rendimiento de flujo según lo determinado por las mediciones del índice de tinción que fueron más de 4 veces superiores que un conjugado de control Pacific Blue del mismo anticuerpo.

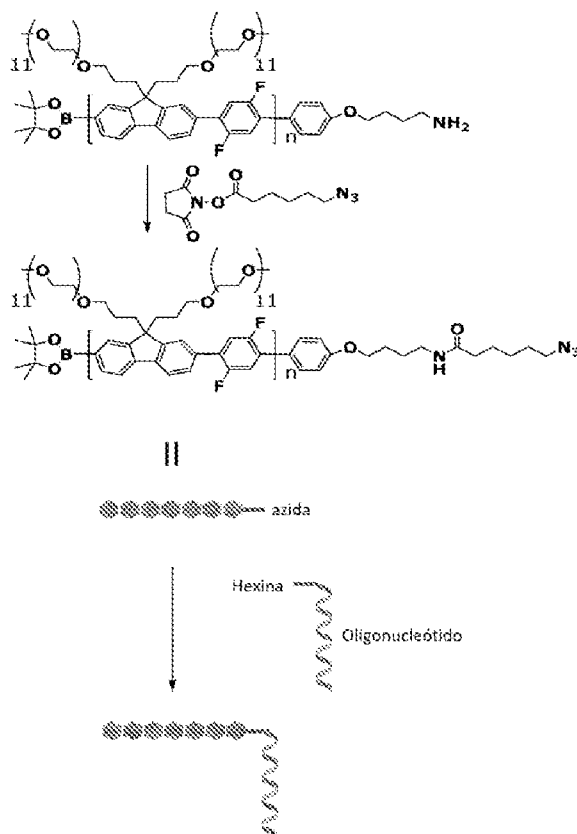
#### Conjugación de maleimida/tiol de polímeros con anticuerpos modificados con tiol



Se reconstituyó el anticuerpo secundario IgG de cabra antirratón (H + L) en PBS + ácido acético 10 mM y se desalinizó/intercambió en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5. Se disolvió SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato) en DMSO anhidro, se añadió con un exceso molar de 15 y se mezcló durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de desactivar con una solución de hidroxilamina, la proteína modificada se desalinizó en una columna PD-10 para eliminar el exceso de SATA y se intercambió en tampón de reacción, EDTA 5 mM, tampón PBS pH 7,0. El polímero activado con amina se disolvió en DMSO anhidro a 10 mg/ml y se mezcló con un enlazador de succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC). El enlazador se añadió a 50 mg/ml, un exceso molar de 20 en DMSO a la solución de polímero y se activó mediante diisopropiletilamina (DIPEA). La reacción se purificó en filtros de centrifugación Amicon Ultra y se intercambió en tampón de reacción, EDTA 5 mM, tampón PBS pH 7,0. Inmediatamente después de la activación del anticuerpo, se añadió polímero funcionalizado con maleimida en tampón de reacción a 10 mg/ml en un exceso molar de 20 de anticuerpo y se dejó mezclar durante 4 horas. A continuación, se utilizaron técnicas cromatográficas de intercambio iónico y exclusión por tamaño para purificar el bioconjugado de polímero y anticuerpo sin reaccionar, respectivamente. Se determina el grado de marcado (indicado como *p* arriba) mediante la absorbancia a 405 nm y un valor corregido a 280 nm. Los conjugados purificados resultantes se sometieron a pruebas de flujo de manera similar a las descritas en el ejemplo 36 para los conjugados preparados usando reducción con TCEP (datos no proporcionados).

Las estructuras poliméricas definidas en el ejemplo 39 se utilizaron para preparar conjugados de anticuerpo primario anti-CD4 (RPA-T4) de manera similar a los descritos en el ejemplo anterior. Se hicieron reaccionar 30 eq de polímero con el anticuerpo modificado SATA (CJ11-2, figura 22) y anticuerpo reducido con TCEP (CJ13-1, figura 20D y figura 22) para producir conjugados de polímeros para pruebas en ensayos de citometría de flujo después de la purificación. Los polímeros modificados con SMCC de los ejemplos 23 y 26 también se conjugaron con éxito con anticuerpos anti-CD4 (RPA-T4) y anti-CD8 (RPA-T8) mediante el método de reducción con TCEP. La reducción con DTT también se realizó con éxito en lugar de TCEP. El rendimiento en citometría de flujo de los conjugados anti-CD4 y anti-CD8 se evaluó de manera similar a los descritos en el ejemplo 39 (Figura 22).

#### Ejemplo 47: Conjugación del polímero con un oligómero de ADN



#### Síntesis del polímero de azida para conjugación Click con oligonucleótido de ADN terminado en alquino

- 5 Se añadió una solución de éster NHS del ácido azidoheptanoico (2,5 mg) en DMF anhidra (100  $\mu$ l) a una solución del polímero con función amina (9,9 mg) en DMF anhidra (100  $\mu$ l) en atmósfera de argón. Después se añadió diisopropiletilamina (2  $\mu$ l). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. A continuación, se añadió agua (0,8 ml) y el polímero modificado con azida se purificó en una columna NAP-10. El eluyente se liofilizó durante la noche. Rendimiento 9,4 mg, 95 %.

#### Síntesis de oligonucleótido con alquino colgante (hexino) para conjugación Click con polímero de azida

El oligonucleótido de propanol en 3' A8885 (secuencia YATTTTACCCTCTGAAGGCTCCP, donde Y = grupo hexinilo y P = grupo propanol) se sintetizó utilizando una columna espaciadora en 3' SynBase™ CPG 1000 en un sintetizador automatizado de ADN/ARN Applied Biosystems 394. Se utilizó un ciclo convencional de fosforamidita de 1,0  $\mu$ mol de destrilación catalizada por ácido, acoplamiento, protección y oxidación con yodo. El tiempo de acoplamiento para los monómeros convencionales fue de 40 s y el tiempo de acoplamiento para el monómero de alquino en 5' fue de 10 min.

El oligonucleótido se escindió del soporte sólido y se desprotegió mediante exposición a amoníaco acuoso concentrado durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de calentamiento en un tubo sellado durante 5 h a 55 °C. Después se purificó el oligonucleótido mediante RP-HPLC en condiciones convencionales. Rendimiento 34 DO.

#### Conjugación de Click de la fase de solución: Síntesis de la sonda

- 25 Se añadió una solución de sulfato de cobre pentahidrato desgasificado (0,063 mg) en cloruro de sodio acuoso (0,2 M, 2,5  $\mu$ l) a una solución desgasificada de ligando tris-benzotriazol (0,5 mg) y ascorbato de sodio (0,5 mg) en cloruro de sodio acuoso (0,2 M, 12,5  $\mu$ l). Posteriormente, se añadieron una solución desgasificada de oligonucleótido A8885 (50 nmol) en cloruro de sodio acuoso (0,2 M, 30  $\mu$ l) y una solución desgasificada de polímero de azida (4,5 mg) en DMF anhidra (50  $\mu$ l), respectivamente. La reacción se desgasificó una vez más con argón durante 30 segundos antes de sellar el tubo e incubar a 55 °C durante 2 h. A continuación, se añadió agua (0,9 ml) y el oligonucleótido modificado se purificó en una columna NAP-10. El eluyente se liofilizó durante la noche. El conjugado se aisló como una banda distinta mediante purificación PAGE y se caracterizó por espectrometría de masas. Rendimiento estimado entre el 10 y el 20 %.

#### Estudios de fluorescencia

El conjugado de oligonucleótido y polímero se utilizó como sonda en estudios de fluorescencia. La sonda se hibridó con la diana A8090 (secuencia GGAGCCTTCAGAGGGTAAAAT-Dabcyl), que se marcó con dabcyl en el extremo 3' para actuar como desactivador de fluorescencia. La diana y la sonda se hibridaron y se controló la fluorescencia en un fluorímetro de temperatura variable controlado de Peltier. La fluorescencia se exploró cada 5 °C en un intervalo de temperatura de 30 °C a 80 °C a una velocidad de 2 °C/min. En la figura 25 se muestra una intensidad o emisión de fluorescencia creciente al aumentar la temperatura, lo que indica que a medida que el par sonda-diana se funde, el polímero y el desactivador se separan y se recupera la fluorescencia.

La conjugación de polímeros con ácidos nucleicos también se puede realizar mediante métodos adaptados de los protocolos descritos en los ejemplos 14, 45 y 46.

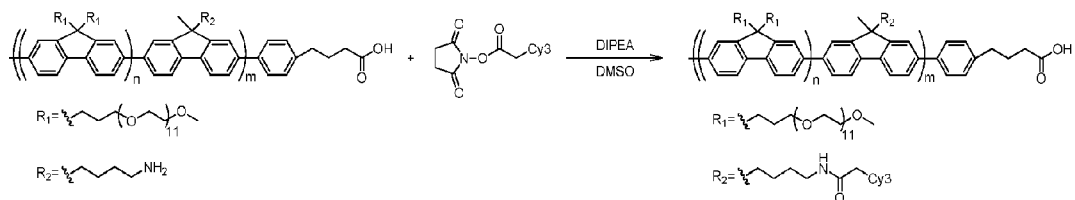
### Ejemplo 48: Purificación de conjugados de polímero y anticuerpo

Los conjugados de polímero y anticuerpo producidos mediante los protocolos descritos en los ejemplos 45, 46 y 49 se purificaron mediante un método de dos etapas. El primer intercambio iónico se utiliza para eliminar el polímero sin reaccionar libre. Como los polímeros descritos en esta invención no poseen ninguna carga formal, no se unen a los medios de intercambio iónico. Las proteínas (anticuerpos), sin embargo, contienen grupos cargados y comúnmente están unidos a varios medios de intercambio iónico para su purificación. En los ejemplos proporcionados, el pH y la conductividad de la solución de conjugado (posterior a la reacción) se redujeron para mejorar la unión del anticuerpo libre y el conjugado a la resina de intercambio catiónico. Después de cargar el conjugado, la resina se lava hasta el nivel inicial (midiendo la absorbancia a 280 y 407 nm) para garantizar que se elimine todo el polímero libre. El anticuerpo unido y el conjugado de polímero y anticuerpo se eluyen mediante el aumento del pH y la fuerza iónica. Un ejemplo representativo de esta separación se proporciona a continuación en la figura 26 (izquierda) donde el pico izquierdo representa el polímero libre y el pico derecho el conjugado eluido y la proteína libre. La eliminación del polímero libre también se puede lograr mediante métodos de cromatografía de afinidad de manera similar. Se puede utilizar una resina de afinidad específica para unir la proteína libre y el conjugado mientras se elimina el polímero.

Una vez eliminado el polímero, la solución de conjugado se concentra y se carga en una columna de exclusión por tamaño para separar del polímero cualquier anticuerpo libre o que no haya reaccionado. Las composiciones poliméricas descritas en los ejemplos 43 y 44 eluyen mucho antes que los anticuerpos a pesar de tener un peso molecular más bajo. Se espera que esto sea el resultado de la estructura rígida del polímero. Por lo tanto, los conjugados eluyen mucho antes que cualquier anticuerpo libre, lo que proporciona una separación cercana a la línea base del conjugado deseado. El aislamiento de fracciones cerca del centro de la distribución también garantiza que no se incluyan anticuerpos libres. Un ejemplo representativo de esta separación se proporciona a continuación en la figura 26 (derecha) donde el pico izquierdo representa el conjugado y el pico pequeño en el extremo derecho el anticuerpo libre. Los tiempos de retención de los componentes individuales se verificaron en un experimento independiente.

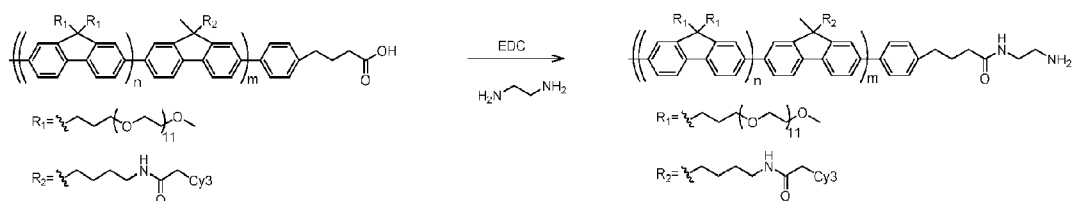
En conjunto, la purificación garantiza que se eliminen tanto el anticuerpo libre como el polímero libre. La pureza de los conjugados resultantes se estima razonablemente en >95 %. Las muestras agrupadas se pueden concentrar y medir la concentración mediante absorbancia a 280 y 407 nm, asegurándose de corregir la absorbancia del polímero a 280 nm. Dichas mediciones también permiten la determinación de las relaciones de marcado de polímero a anticuerpo (F/P).

### Ejemplo 49: Marcado con colorantes y activación del enlazador del polímero en tándem



### Conjugación de colorante en tándem

En una caja de manipulación con guantes, se disolvieron 93 mg de polímero en tándem (del ejemplo 26) a 15 mg/ml en DMSO anhidro en un frasco de vidrio con barra agitadora. También se disolvieron 22,5 mg de éster Cy3-NHS a 15 mg/ml en DMSO anhidro y se añadieron a la solución de polímero, seguido de 0,3 ml de diisopropiletilamina. Después de agitar durante 48 horas a temperatura ambiente, la solución se diluyó hasta 90 ml con EtOH al 20 % en agua y se concentró en filtros Amicon Ultra-15. El retenido se diluyó repetidamente y se concentró en los filtros hasta que se eliminó el exceso de Cy3. Rendimiento del 90 %. El contenido de marcado y enlazador se validó mediante la medición y toma de la proporción de absorbancia de polímero y colorante como se describe en el ejemplo 38.



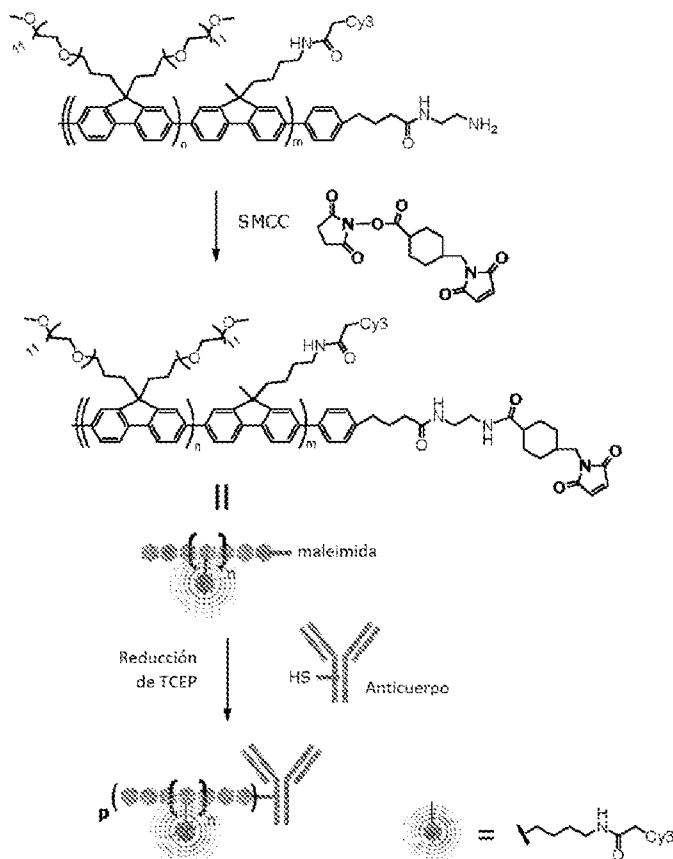
### Modificación amina del tándem (condiciones acuosas)

- 5 Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero y colorante a 150 mg/ml en etanol. Esto se añadió gota a gota a 6 ml de tampón MES 50 mM (pH 5) a 4 °C. Se añadieron 38 mg de N-hidroxisuccinimida en una parte y la solución se agitó para disolver los sólidos. Después de la disolución, se añadieron 192 mg de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida en partes mientras se agitaba. Después de agitar la solución durante 30 minutos, se añadieron 33 µl de etilendiamina. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la solución se diluyó hasta 90 ml  
10 con EtOH al 20 % en agua y se concentró en filtros Amicon Ultra-15. El retenido se diluyó y concentró repetidamente sobre en filtros un total de cuatro veces para eliminar las impurezas. Rendimiento del 90 %, conversión del 60 %. La conversión del enlazador se verificó mediante la conjugación de un segundo colorante con la amina terminal como se describe en el ejemplo 38.

15 Conjugación en tándem con un anticuerpo primario

Se desalinizó/intercambió el anticuerpo monoclonal primario, anti-CD8 (clon RPA-T8) en tampón EDTA 5 mM, fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Se disolvió TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) en agua, se añadió en un exceso molar de 12 y se mezcló durante 90 minutos a 30 °C. La proteína modificada se purificó en una columna de desalinización PD-10 para eliminar el exceso de TCEP y se intercambió en tampón EDTA 5 mM, fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0.

El polímero en tándem activado con amina se disolvió en etanol a 50 mg/ml y esta solución se mezcló con dos volúmenes de tampón fosfato 100 mM, pH 7,5. A continuación, esta solución se desalinizó/intercambió en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5, mediante una columna de desalinización PD-10.



A esta solución se le añadió un exceso de 25 molar de enlazador de succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-

carboxilato (SMCC) (preparado como una solución de 10 mg/ml en DMSO anhidro). La solución resultante se mezcló con un rodillo a 20 °C durante 60 minutos antes de desalarla/cambiarla en tampón EDTA 5 mM, fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0, mediante una columna de desalinización PD-10. Inmediatamente después de la reducción con disulfuro, el polímero funcionalizado con maleimida se añadió en un exceso de 25 molar de anticuerpo y se dejó mezclar durante 2 horas a 20 °C. Después se utilizaron técnicas cromatográficas de intercambio iónico y exclusión por tamaño para purificar el bioconjugado de polímero y anticuerpo sin reaccionar, respectivamente. Se determina el grado de marcado (indicado como *p* a continuación) a través de absorbancia y un valor corregido a 280 nm.

Análisis de citometría de flujo del conjugado en tándem de polímero en experimento multicolor

El conjugado en tándem anti-CD8 resultante se evaluó tanto en perlas de compensación como en muestras de sangre completa en un citómetro de flujo. Se utilizaron perlas de compensación anti-IgG de ratón para capturar el anticuerpo y cuantificar el desbordamiento de la señal en canales de detección (detectores con filtros de emisión únicos) distintos del destinado al conjugado. En la figura 28 (izquierda) se muestra la señal medida cuando el conjugado en tándem se excitó con un láser violeta con emisión detectada mediante un filtro de 610 nm adaptado a la emisión de los conjugados (marcado con QDotA). En este gráfico de la figura también se muestran las interferencias con los otros canales del citómetro de flujo emparejados con el láser de excitación violeta (DAPI-A y AmCyan-A) y dos canales del láser de 488 nm (FITC-A y PE-A). Los datos muestran una interferencia mínima en el filtro de 450/50 nm (DAPI-A), que detecta específicamente la emisión del polímero residual (donante). La señal significativamente más alta del indicador Cy3 en el tándem (filtro de 610 nm) en relación con los otros canales anteriores ilustra que se necesita una compensación mínima (como máximo no más del 6 % en este ejemplo y caso por caso a menudo mucho menor).

El conjugado en tándem anti CD8 se evaluó posteriormente en un ensayo de flujo de 4 colores con otros anticuerpos marcados (anti-CD3 Pacific Blue, anti-CD45 Ficoeritrina y anti-CD4 fluoresceína) en sangre humana completa de un voluntario sano utilizando protocolos de tinción y análisis acordes y desarrollados a partir del ejemplo 39. Los datos de la figura 28 (derecha) muestran claramente la compatibilidad del marcador en tándem con la instrumentación común de citometría de flujo multicolor, los reactivos y los protocolos. De manera específica, se observa una tinción intensa y específica de los linfocitos CD8 positivos y dentro del subconjunto CD4 positivo, la fácil discriminación de las células CD8 expresivas y no expresivas es clara.

En conjunto, los datos resaltan la viabilidad de los conjugados en tándem de polímero y colorante en ensayos de flujo multicolor como se describe en la invención divulgada (Véanse, por ejemplo, la figura 20 y la figura 22).

#### **Ejemplo 50: Validación de cadenas laterales de polímeros no iónicos para solubilidad en agua y aplicación de citometría de flujo**

Se produjo una serie de diferentes polímeros de polifluoreno para investigar la interacción de los polímeros conjugados hidrosolubles con las células. Esto se hizo mediante la síntesis primero de una variedad de monómeros sustituidos con diferentes cadenas laterales solubilizantes (por ejemplo, sustituidos con PEG, sulfonato, amina cuaternaria o zwitterion) que luego se polimerizaron mediante un acoplamiento de Suzuki. El propósito era determinar qué influencia tenían las cadenas laterales tanto en la unión celular no específica como en la solubilidad del polímero en tampones normales utilizados en ensayos biológicos, en particular, los utilizados en citometría de flujo (por ejemplo, PBS y DPBS).

El número y la diversidad de propiedades de los polímeros candidatos sintetizados hicieron poco práctico producir conjugados purificados de cada uno para pruebas de citometría de flujo. Por lo tanto, se desarrolló un sistema para calificar cada polímero candidato en función de su contribución a la unión no específica a las células. Dicho sistema permitió clasificar los polímeros, con valor predictivo sobre si funcionarían suficientemente una vez conjugados. Se desarrolló un "índice" de unión no específica (NSB) en torno a un modelo de células Jurkat (estirpe celular de linfocitos). En esta, las células se incubaron con una concentración fija de cada polímero, se lavaron y analizaron por flujo. En la figura 33 se muestra el resultado después de dicho análisis e ilustra la amplia variación en la señal generada por cada tipo de polímero. Los polímeros en la figura 33 se evaluaron con un grupo protector ftalamida en la amina colgante con la excepción de P9.

Los datos clasifican estos polímeros en términos de señal generada exclusivamente por NSB. Se permitió una evaluación más precisa de la NSB relativa mediante el ajuste aún más de la normalización de la señal de flujo mediante diferencias en la eficacia de la fluorescencia (evaluación bruta del rendimiento cuántico) de cada forma de polímero cuando se ensayó de forma independiente en tampón de tinción con excitación de 405 nm en un fluorómetro y controlando la emisión en el intervalo de 420 a 460 nm (para estimar un filtro de 440/40 nm en el citómetro). Los polímeros representativos P5, P2, P9 y P12 mostraron un aumento de NSB en relación con las células no teñidas (curva del extremo izquierdo, intensidad representada en el eje de abscisas).

Los datos de la figura 34 continúan resaltando la diferencia en los polímeros producidos con cadenas laterales de PEG no iónicas neutras (denominadas P20) frente a aquellas que también incorporan cadenas laterales aniónicas (denominadas P4). Los datos son histogramas recogidos a partir del análisis de citometría de flujo (excitación a 405 nm en un citómetro BD LSR-II) utilizando una estirpe celular Jurkat como en la figura 33. El gráfico de la izquierda muestra

células sin tefir y un control negativo (células tratadas con un conjugado no específico marcado con Pacific Blue), que son las dos curvas del extremo izquierdo. Se observa poca o ninguna tinción no específica para el control con Pacific Blue. En este mismo gráfico, sin embargo, la curva de la derecha representa células tratadas con el polímero aniónico P4 y tiene un claro desplazamiento en la señal (eje de abscisas) como se muestra. Por el contrario, el polímero neutro P20 casi no mostró desplazamiento con respecto a las células no tratadas, lo que está en línea con el control con Pacific Blue. El panel del medio representa una variedad de diferentes combinaciones de polímeros y cadenas laterales de polímeros probadas en las mismas celdas.

Los datos resaltaron la ventaja de las cadenas laterales neutras. Esta ventaja también se ha trasladado a otros formatos de ensayo, incluidos los inmunoensayos basados en placas y las matrices de perlas citométricas (datos no mostrados). Las cadenas laterales neutras también dieron como resultado inesperadamente un aumento significativo en la solubilidad de los polímeros conjugados en soluciones acuosas con respecto a los preparados previamente con cadenas laterales iónicas. Esto fue particularmente cierto en tampones que contenían incluso una fuerza iónica moderada (como los utilizados en protocolos celulares básicos). También se observó que los rendimientos cuánticos de la solución aumentaban, posiblemente debido a la mayor solubilidad acuosa (y menor agregación). La escasa solubilidad en los tampones también dificultó la conjugación de proteínas, y los conjugados de estreptavidina producidos a partir de P4 mostraron signos de agregación en los tampones de ensayo normales, como la solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esto no fue cierto para los polímeros y conjugados producidos en otros ejemplos divulgados en el presente documento.

#### **Ejemplo 51: Purificación y caracterización de conjugados de polímero y avidina Análisis en gel de conjugados de polímero y avidina**

Para verificar la conjugación exitosa con avidina (AvDN), se desarrolló y utilizó un método de electroforesis en gel de agarosa para evaluar la movilidad relativa de la AvDN en función del grado de conjugación con el polímero (Figura 35). Antes de la carga del gel, la reacción de conjugación se tiñó con biotinitilo-fluoresceína, que unía el conjugado de polímero y AvDN y la AvDN libre. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,8 %, se vertió y se ejecutó en un tampón de borato de sodio 10 mM, pH 11. El gel se visualizó bajo iluminación UV (para visualizar el polímero) y mediante excitación a 532 nm (para visualizar la fluoresceína) para evaluar el grado de conjugación. Bajo la iluminación UV, se observó una sola banda para el polímero. Bajo la excitación a 532 nm, se observaron bandas para biotinitilo-fluoresceína libre, AvDN sin reaccionar y conjugado de polímero y AvDN que coincidió con la banda de polímero libre, lo que indica que el polímero sin reaccionar coeluyó con el conjugado de polímero y AvDN (Figura 35). La conjugación se confirmó por la intensidad de la banda conjugada.

La clave en la parte superior de las imágenes del gel (Figura 35) indica qué componentes se incluyeron en la reacción de conjugación, así como si las muestras se preincubaron con biotinitilo fluoresceína antes de la carga y la electroforesis. La imagen de la izquierda visualiza el polímero mediante excitación UV, mientras que la imagen de la derecha captura el resultado de la excitación de la fluoresceína. En la imagen de la derecha, se puede observar que la fluoresceína biotinilada se asocia con el polímero cuando la conjugación se realizó en presencia, pero no en ausencia, de enlazadores heterobifuncionales NHS-etoxi-maleimida (los enlazadores se utilizaron para funcionalizar la amina polimérica, mientras que las aminas proteicas se convirtieron parcialmente en tioles mediante el reactivo de Traut, antes del acoplamiento maleimida-tiol). Abreviaturas: AvDN = avidina DN, AA1 = polímero, Enlazador = enlazador heterobifuncional NHS-Maleimida incluido en la reacción, Biot-F = tinción previa con biotinitilo fluoresceína antes de la electroforesis.

#### **Purificación: Eliminación de avidina sin reaccionar mediante cromatografía SEC**

La mezcla de conjugado en bruto se fraccionó en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200, mientras que las fracciones se controlaron mediante absorbancia UV (Figura 36, arriba). Para validar el método, las fracciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se ha descrito anteriormente, este método de electroforesis permitió visualizar el grado de unión de la avidina al polímero y, en este caso, analizar la composición de cada fracción de la columna. Las fracciones seleccionadas se incubaron con biotinitilo-fluoresceína (1 equivalente molar con respecto a la avidina) antes de la carga del gel, con biotinitilo-fluoresceína cargada por separado como marcador (carril más a la izquierda, Figura 36, abajo). La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,8 %, se vertió y se ejecutó en un tampón de borato de sodio 10 mM, pH 11. El gel se visualizó mediante excitación a 532 nm. El retardo de las bandas visualizadas con fluoresceína para las fracciones C2-C6 indica un conjugado de polímero y avidina purificado, mientras que las dos bandas observadas para la fracción C8 indican una mezcla de conjugado de polímero y avidina y avidina libre. Las fracciones C10-D2 muestran sólo avidina libre.

#### **Evaluación de la eficiencia de la conjugación mediante análisis de gel**

Para determinar la mejor proporción de polímero a estreptavidina en reacciones de conjugación, los equivalentes molares de polímero a estreptavidina se variaron de 0 a 24 equivalentes. Después de la conjugación, los productos de conjugación se incubaron con biotinitilo-fluoresceína antes de la electroforesis. El gel se visualizó mediante iluminación UV y excitación a 532 nm (Figura 37). A 0 equivalentes molares de polímero a estreptavidina, la estreptavidina libre se observa como una banda con una movilidad relativamente elevada. A medida que los

equivalentes molares del polímero aumentan de 3 equivalentes a 12 equivalentes, la banda de estreptavidina libre disminuye en intensidad mientras que la banda de conjugado de polímero y estreptavidina aumenta en intensidad. A 24 equivalentes de polímero, sólo se observa la banda del conjugado mediante excitación a 532 nm.

## 5 Impacto de la purificación en el rendimiento del conjugado en el análisis celular mediante citometría de flujo

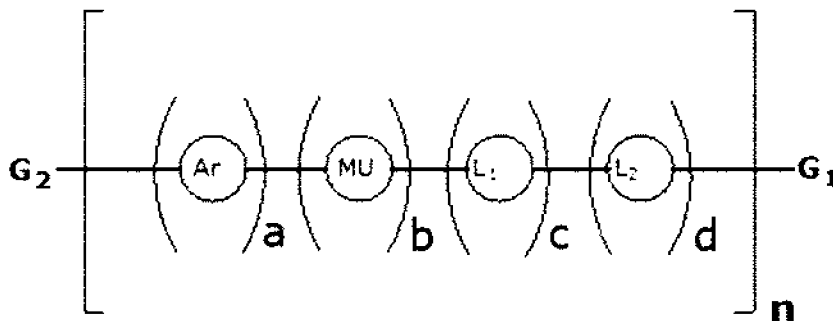
La purificación de conjugados de polímero y estreptavidina (estructura polimérica ejemplificada en el ejemplo 9, denominada P30 en la figura 38) se realizó para determinar el impacto en el rendimiento de la citometría de flujo. La cromatografía de intercambio catiónico se implementó en la purificación para mejorar la eliminación del exceso de polímero libre. El polímero sin carga eluyó en el flujo continuo mientras que el medio retuvo las aminas protonadas en las proteínas. Por lo tanto, la estreptavidina, ya sea conjugada con el polímero o sin reaccionar, se retuvo. Esta fase de purificación de intercambio iónico se mantuvo simple con un gradiente escalonado, lo que dio como resultado la coelución de SA conjugada y sin reaccionar. Se permitió un fraccionamiento adicional mediante cromatografía de exclusión por tamaño posterior, lo que proporcionó una mejor resolución del conjugado a partir de SA libre. Se observaron beneficios de rendimiento en citometría de flujo de este nuevo método de purificación utilizando células Jurkat incubadas con conjugado de polímero y estreptavidina que se analizaron mediante citometría de flujo. Se hicieron comparaciones entre muestras brutas (Figura 38 arriba) y conjugados purificados (Figura 38 abajo). Se utilizaron conjugados Pacific Blue-estreptavidina disponibles comercialmente como comparador de brillo, unión no específica e índice de tinción. Se demostró una mejora en el índice de tinción general de aproximadamente 3 veces para las células Jurkat, con NSB similar tanto para conjugados de polímero como para PB-SA según los histogramas mostrados en la figura 38. Las pruebas en sangre (datos no mostrados) indicaron una reducción significativa de NSB a niveles similares a PB-SA tras la purificación del conjugado.

En un experimento separado con un polímero similar (ejemplificado en el ejemplo 11), se obtuvieron conjugados con proporciones variables de polímero a estreptavidina mediante SEC. Aquellos con la proporción más elevada proporcionaron un rendimiento de flujo en comparación con aquellos con un marcado más bajo. Las proporciones se determinaron en función de una proporción de absorbancia a 385 nm/280 nm. El rendimiento relativo con respecto a un control con Pacific Blue mostró un aumento desde un índice de tinción 10,9 veces superior (proporción 385/280 de 3,6) hasta un índice de tinción 13,8 veces superior al de Pacific Blue (proporción A3 85/280 de 4,7).

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solamente a modo de ejemplo. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento en la práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

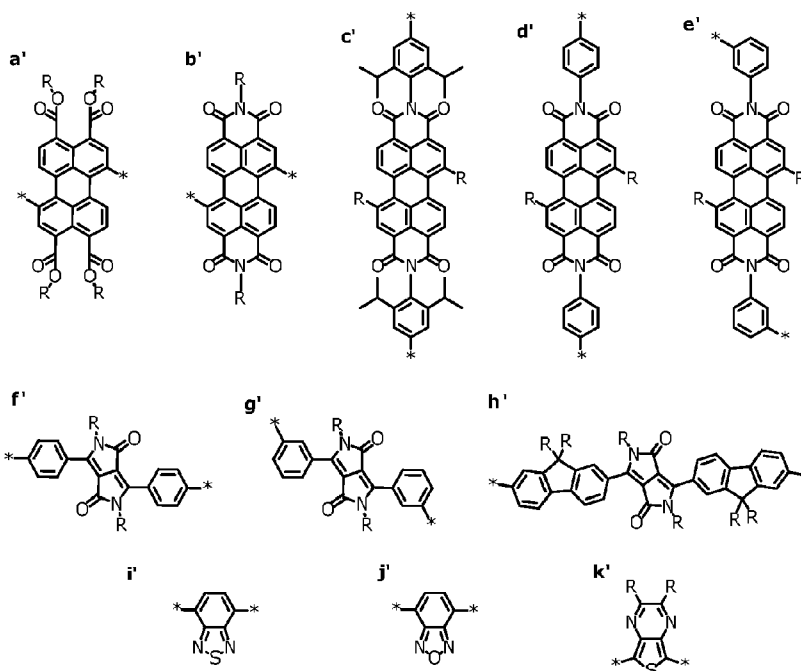
## REIVINDICACIONES

1. Un polímero conjugado hidrosoluble que tiene la estructura de fórmula:



en donde:

- (i) Ar es un arilo o heteroarilo y está sustituido con  $(CH_2)_{x'}(OCH_2CH_2)_{y'}OCH_3$  donde cada  $x'$  es independientemente un número entero de 0 a 20,  $y'$  es independientemente un número entero de 0 a 50 de modo que el polímero conjugado es soluble en más de 10 mg/ml en agua o soluciones salinas tamponadas con fosfato;
- (ii) MU se selecciona del grupo que consiste en a' a k' que tienen la estructura:



\* = sitio de unión covalente a la cadena principal insaturada

en donde R es un grupo lateral no iónico capaz de impartir solubilidad en agua superior a 10 mg/ml;

(iii) cada enlazador opcional  $L_1$  y  $L_2$  son grupos arilo o heteroarilo distribuidos de manera uniforme o aleatoria a lo largo de la cadena principal del polímero y están sustituidos con una o más cadenas colgantes terminadas con un grupo funcional para la conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula seleccionado de amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos;

(iv)  $G_1$  y  $G_2$  cada uno se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, amina, carbamato, ácido carboxílico, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tiol, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, arilo sustituido con halógeno, arilo sustituido con ácido borónico, arilo sustituido con éster borónico, ésteres borónicos, ácidos borónicos, fluoreno opcionalmente sustituido y arilo o heteroarilo sustituido con una o más cadenas colgantes terminadas con un grupo funcional seleccionado de i) amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos para conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula

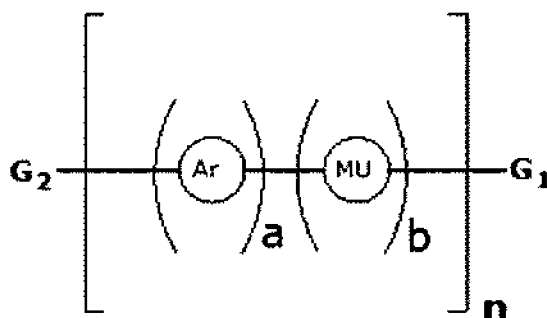
siempre que al menos uno de  $G_1$  y  $G_2$  comprenda un sitio de conjugación funcional para la conjugación funcional con otra molécula, sustrato o biomolécula;

en donde el polímero comprende al menos 1 grupo funcional seleccionado de amina, carbamato, ácido carboxílico, carboxilato, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos y tioles dentro de G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub> que permiten la conjugación funcional con otra molécula, sustrato o biomolécula;

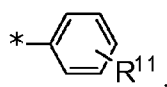
n es un número entero de 1 a aproximadamente 10.000; y

a, b, c y d definen el % molar de cada unidad dentro de la estructura, cada una de las cuales puede repetirse de manera uniforme o aleatoria y donde a es un % molar del 10 al 100 %, b es un % molar del 0 al 90 % y cada una de c y d es un % molar del 0 al 25 %.

2. El polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la estructura:



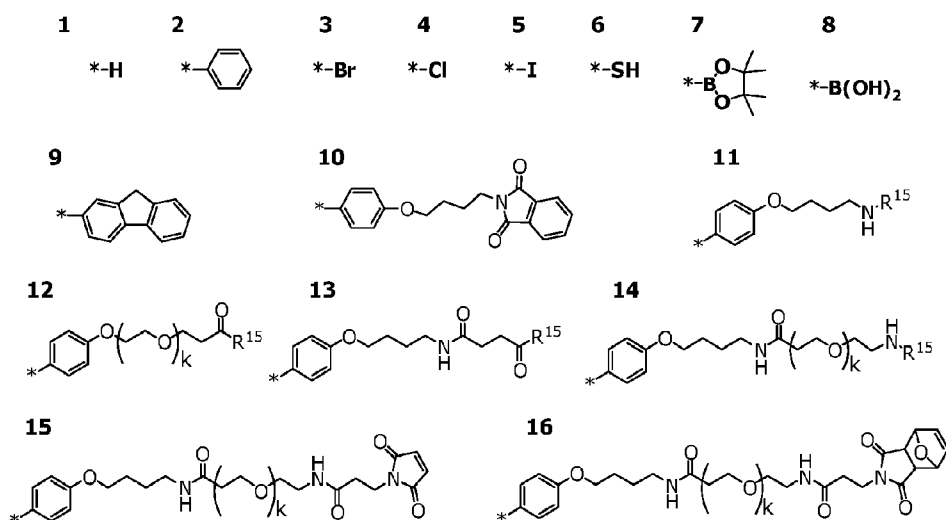
3. El polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $G_1$  y  $G_2$  se seleccionan independientemente de las estructuras representadas por:

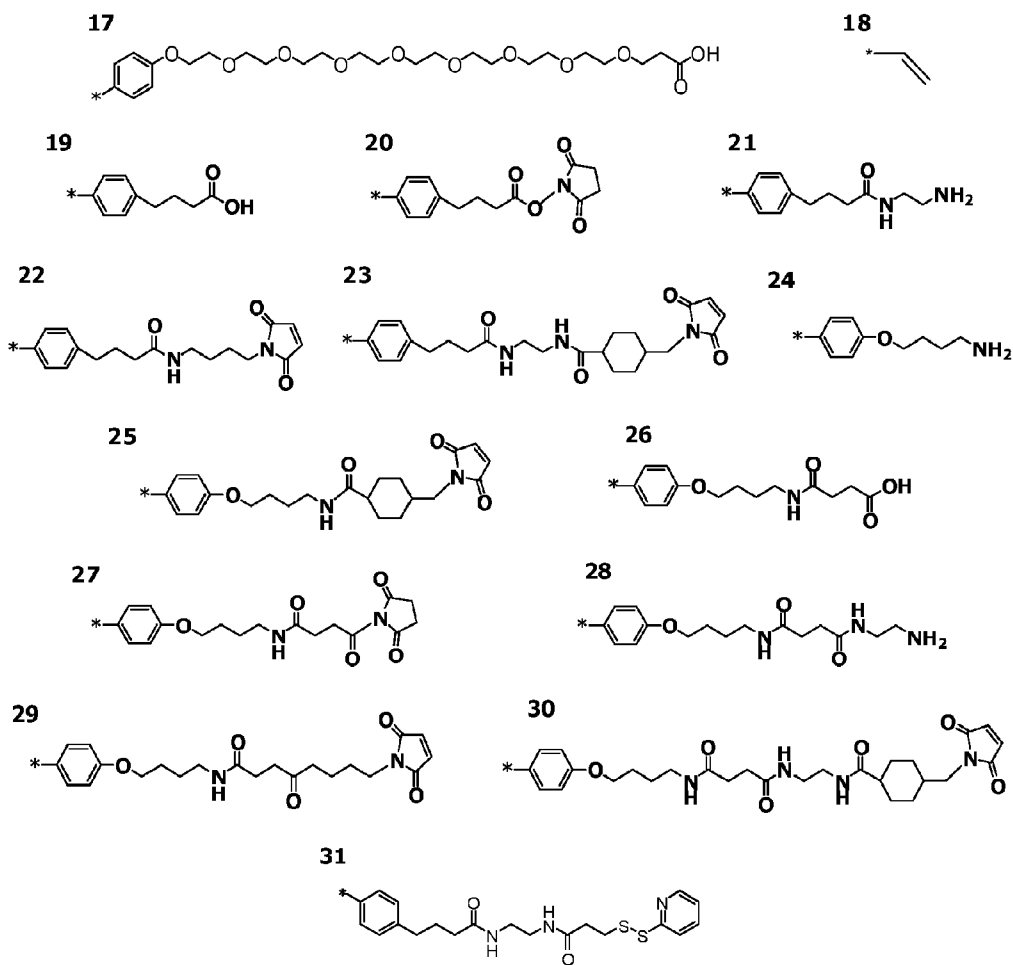


\* = sitio de unión covalente a la cadena principal

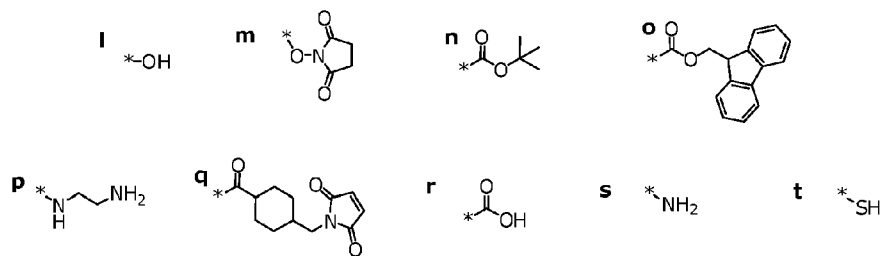
en donde R<sup>11</sup> es uno cualquiera o una combinación de un enlace, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> donde cada x es independientemente un número entero de 0 a 20, p es independientemente un número entero de 0 a 50, grupos arilo, (hetero)arilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, fenoxi, amido, amino, carbamato, carboxilato, carbonatos, sulfuro, disulfuro o imido terminados con i) un grupo funcional seleccionado de amina, carbamato, carboxilato, ácido carboxílico, maleimida, ésteres activados, N-hidroxisuccinimidilo, hidracinas, hidracidas, hidrazonas, acida, alquino, aldehídos, tioles y grupos protegidos de los mismos para conjugación con otro sustrato, molécula o biomolécula.

4. El polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos uno de  $G_1$  y  $G_2$  se selecciona de:





15 en donde  $R^{15}$  se selecciona del grupo que consiste en  $l$  a  $t$  que tienen la estructura:



20 y k es 2, 4, 8, 12 o 24.

5. El polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polímero está conjugado con un anticuerpo.

25 6. Uso de un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un ensayo de citometría de flujo para identificar diferentes marcadores celulares o tipos de células.

7. Uso de un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para clasificar células para su uso en  
30 tratamientos.

8. Uso de un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un método de ensayo, comprendiendo el método de ensayo:

35 (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene una biomolécula diana;  
(b) proporcionar una proteína sensora conjugada con al menos un cromóforo de señalización y que es capaz de interactuar con la biomolécula diana o una biomolécula asociada a la diana;  
(c) proporcionar el polímero;

- (d) poner en contacto la muestra con la proteína sensora y el polímero en una solución en condiciones en las que la proteína sensora pueda unirse a la biomolécula diana o una biomolécula asociada a la diana si está presente;
- (e) aplicar una fuente de luz a la muestra que pueda excitar el polímero y
- (f) detectar si se emite luz desde el cromóforo de señalización.

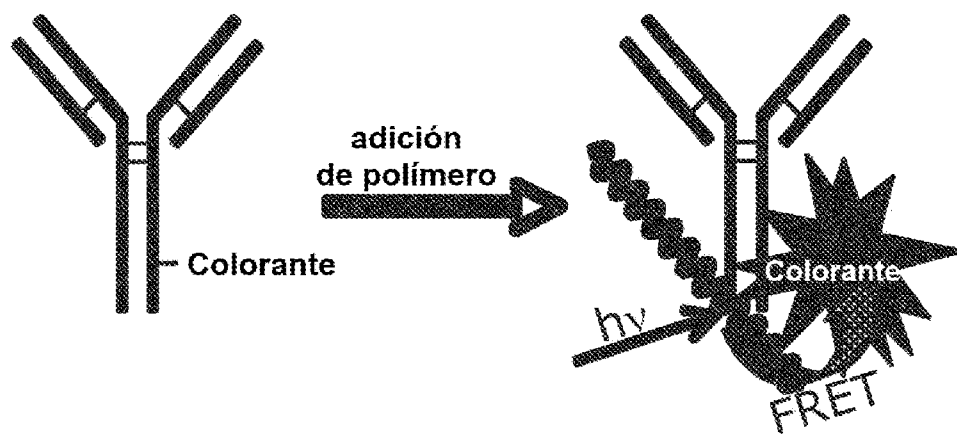


FIG. 1

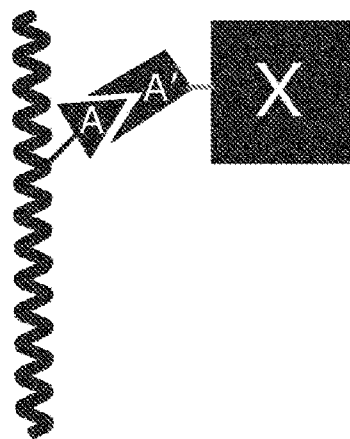


FIG. 2

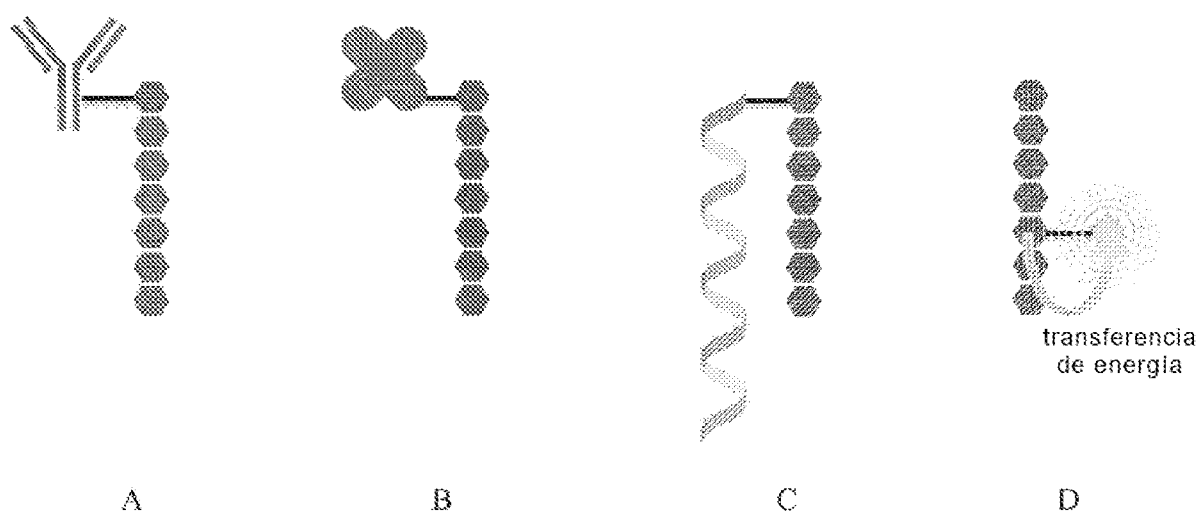


FIG. 3

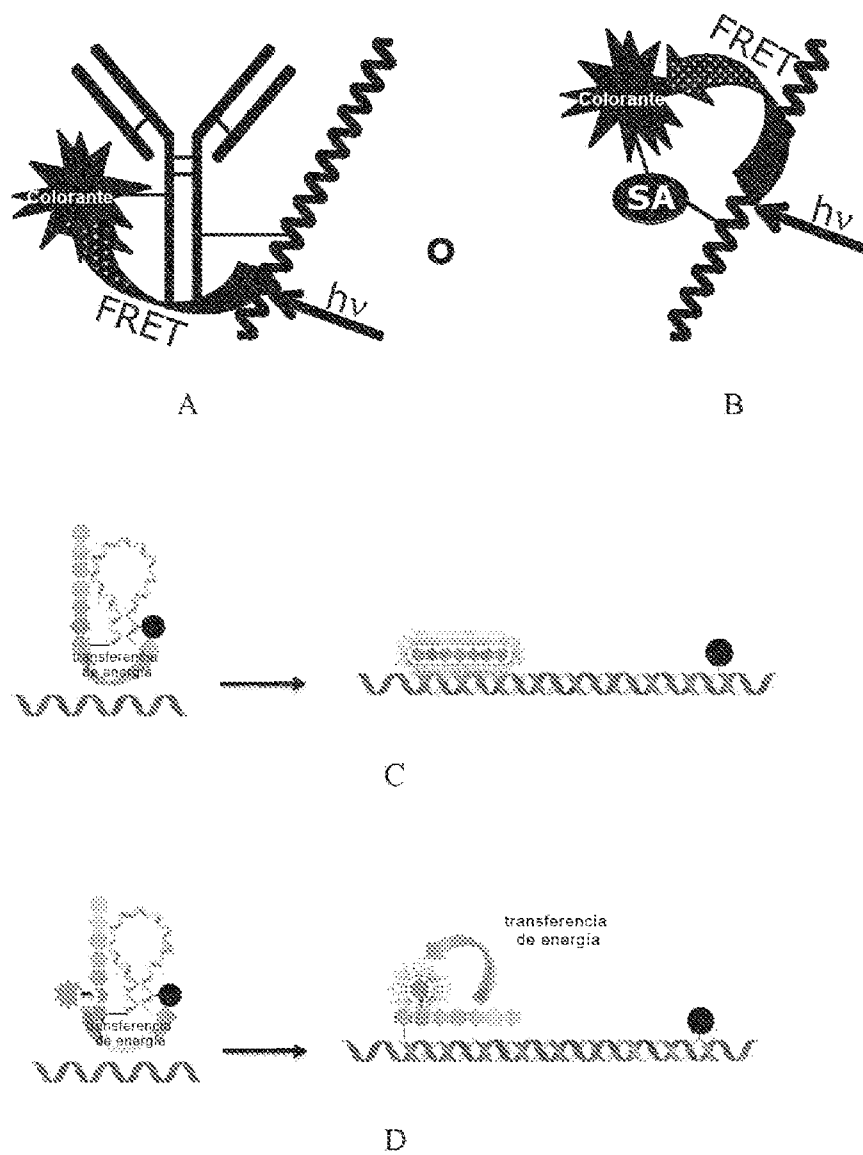


FIG. 4

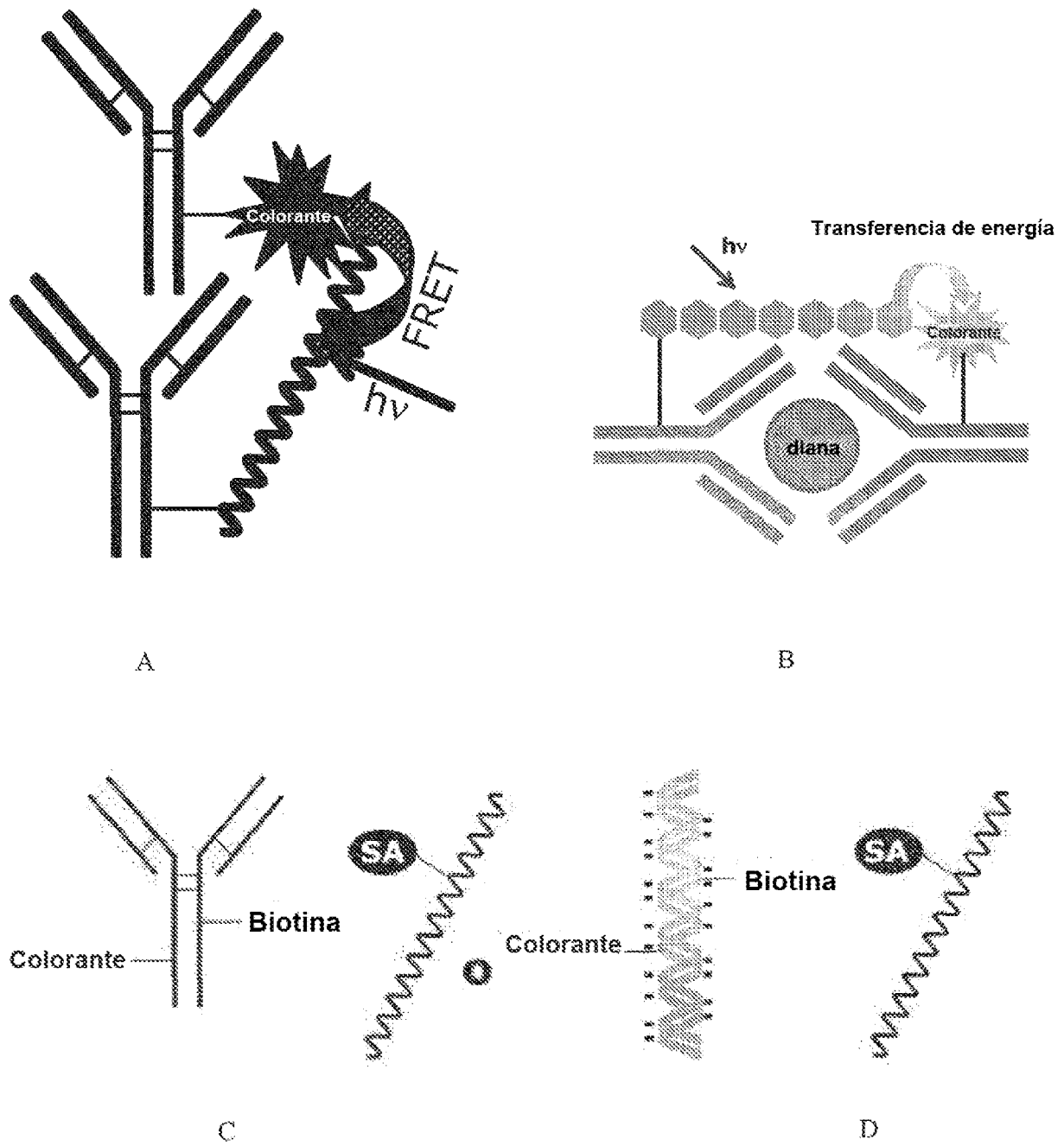


FIG. 5

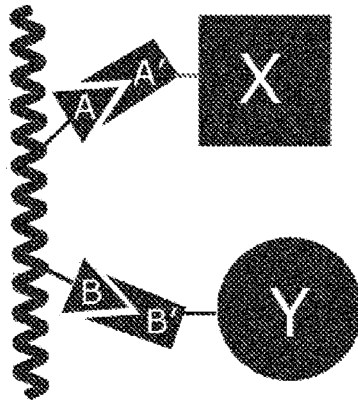
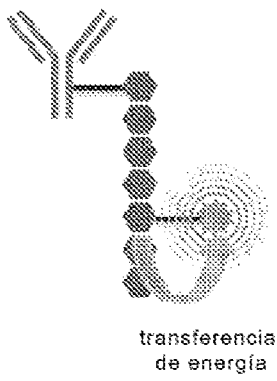
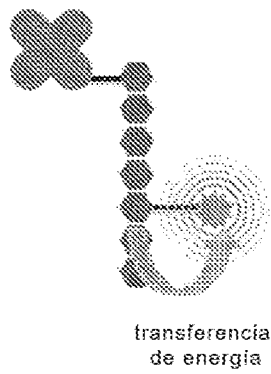


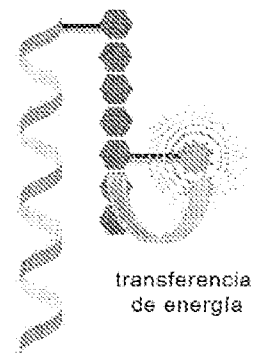
FIG. 6



A



B



C

FIG. 7

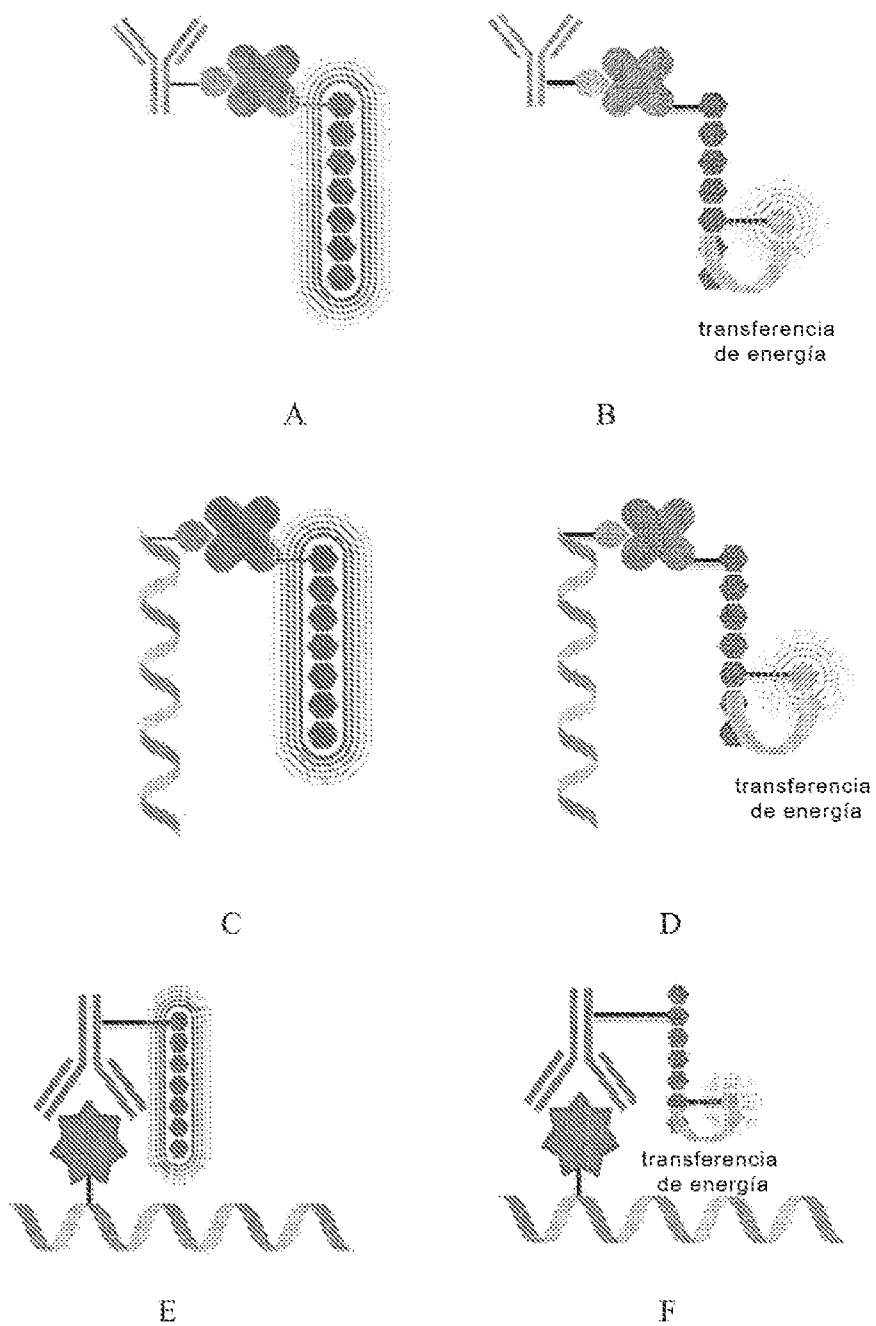
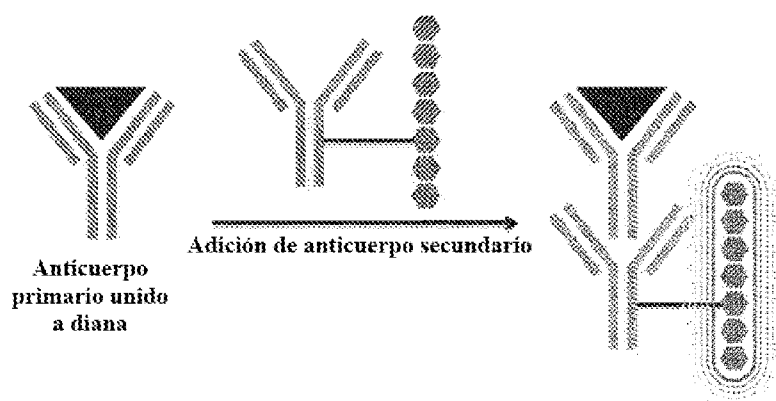
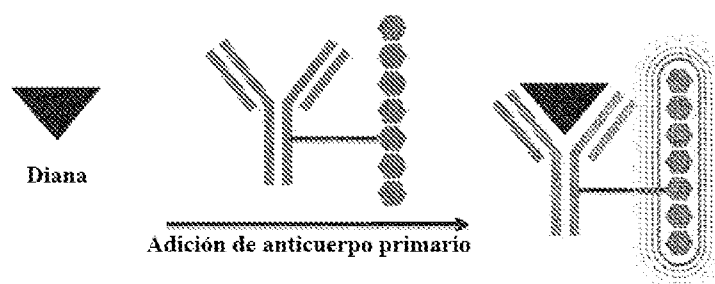


FIG. 8



A



B

FIG. 9

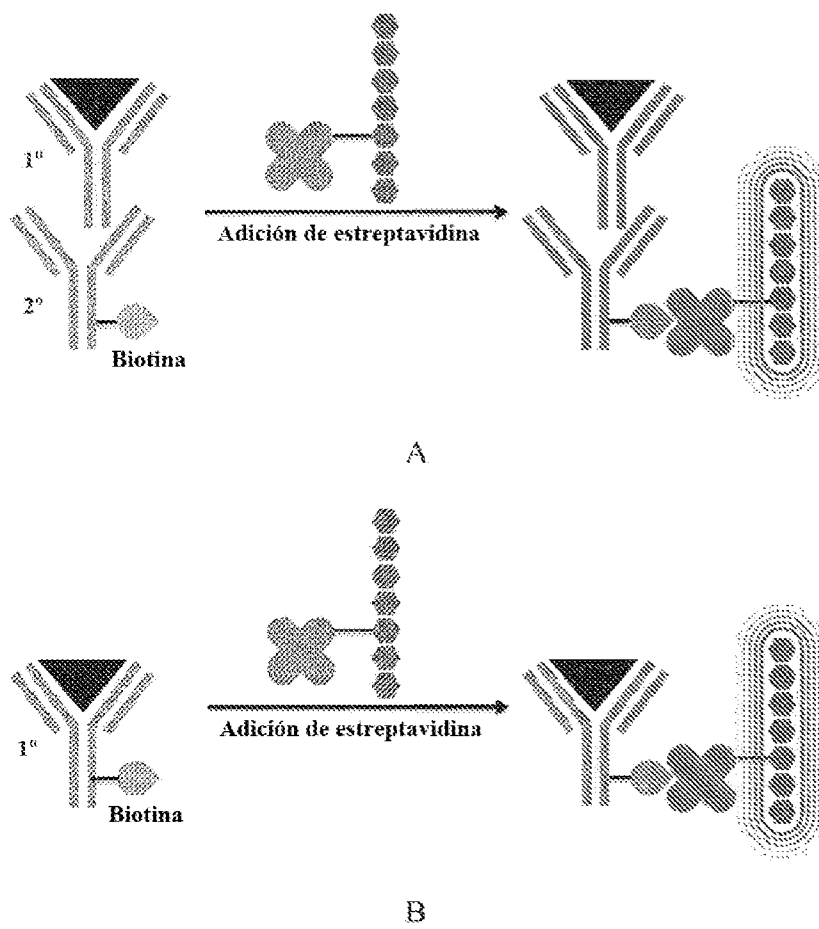


FIG. 10

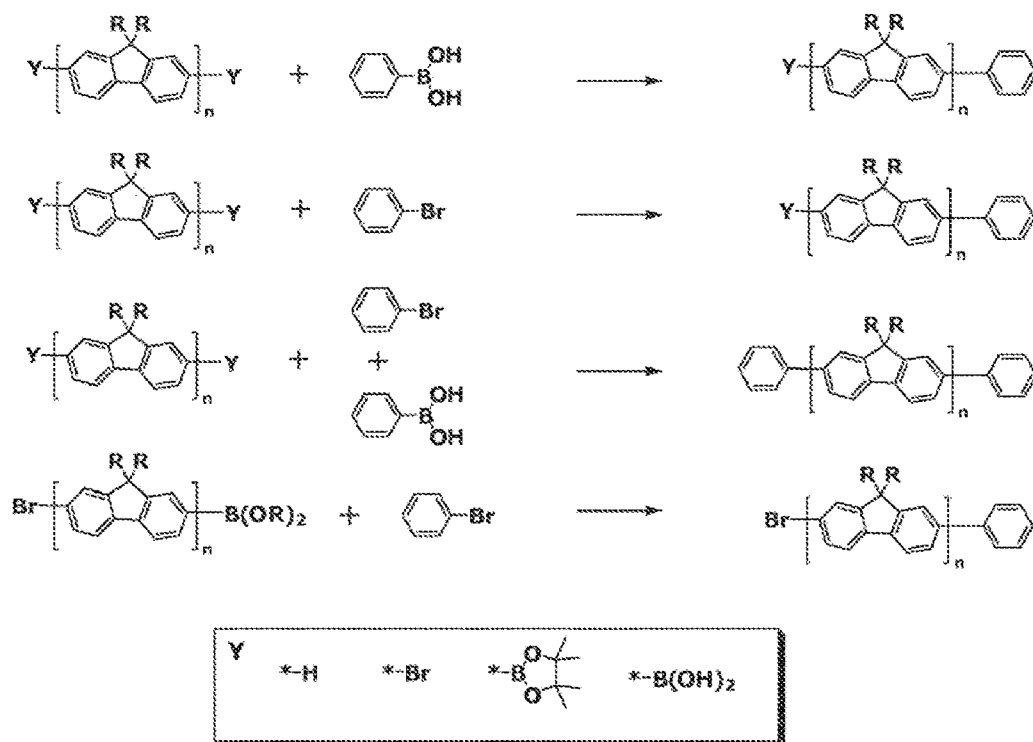


FIG. 11

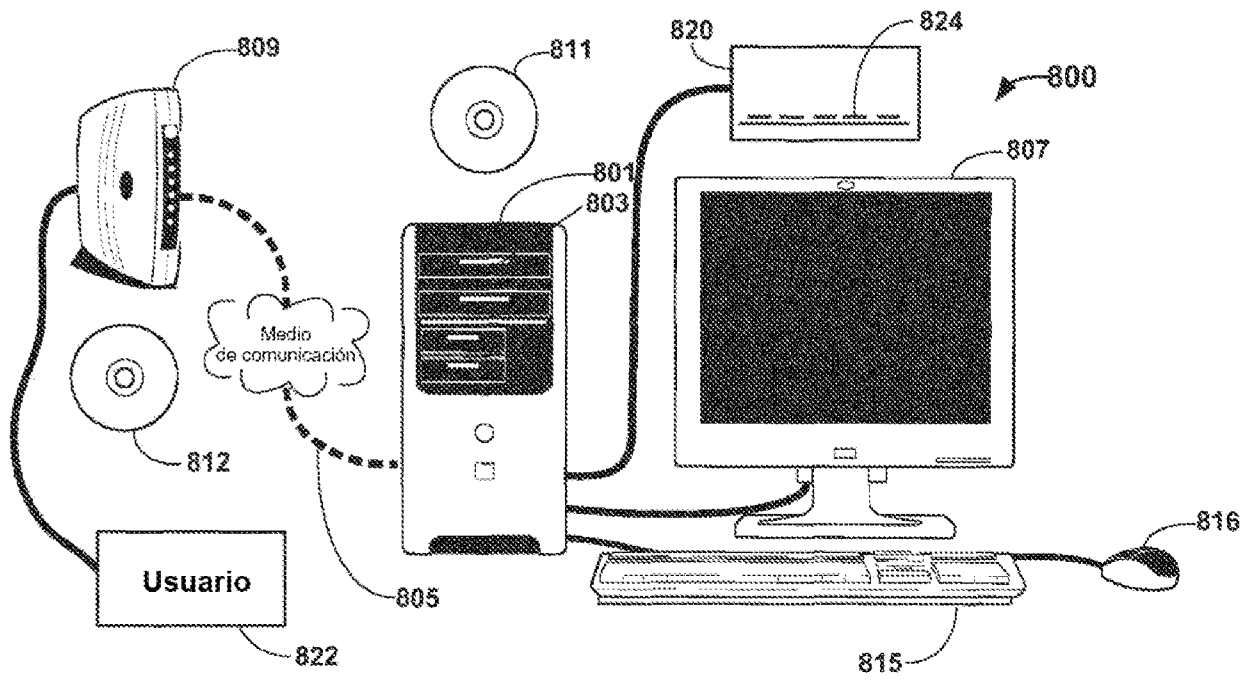


FIG. 12

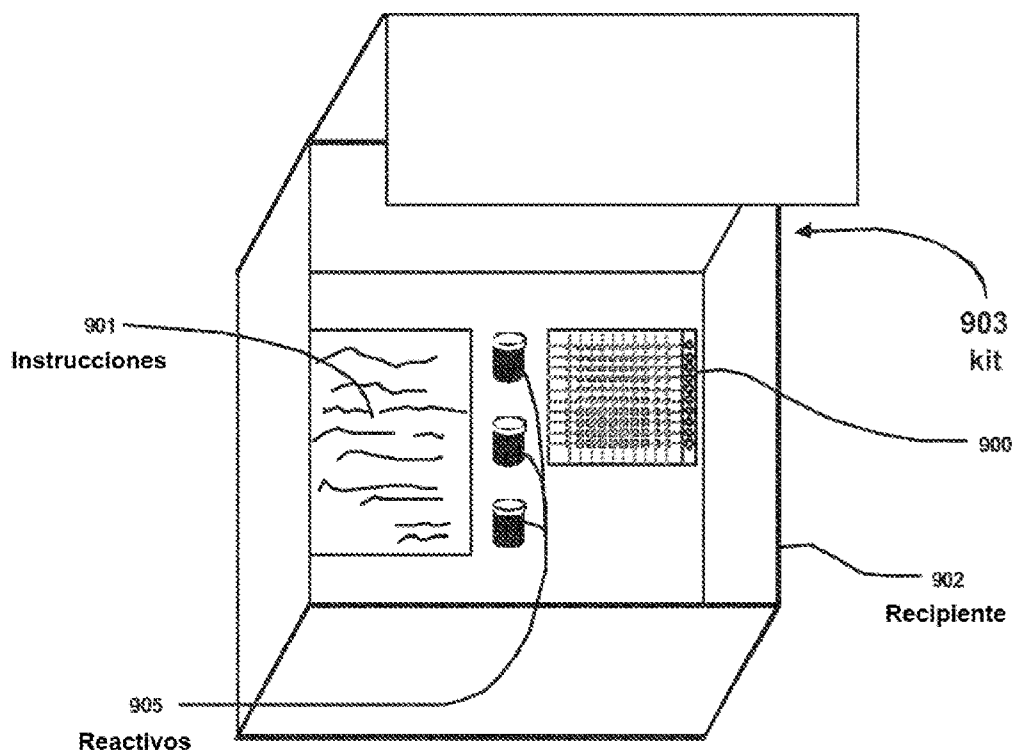


FIG. 13

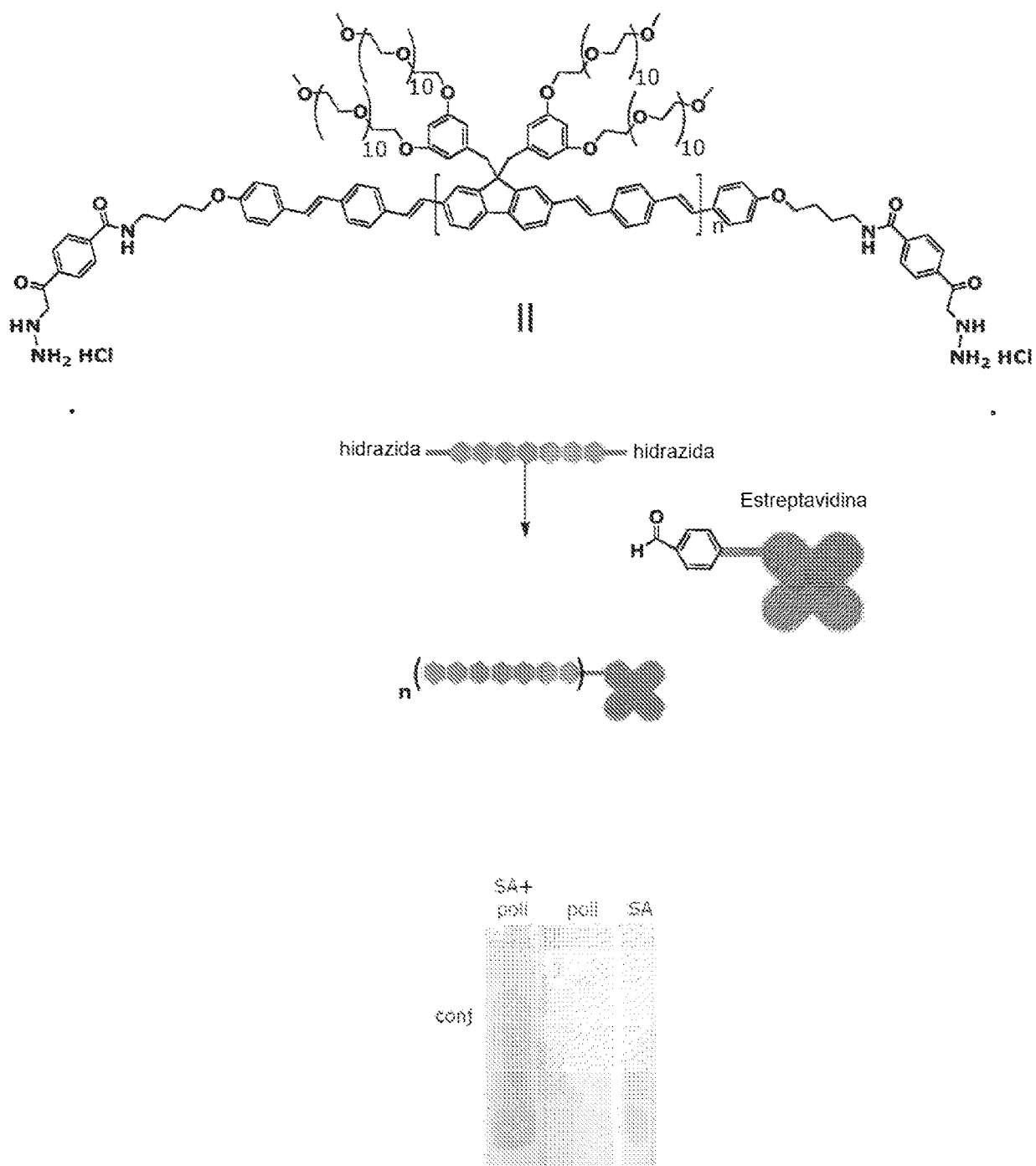


FIG. 14

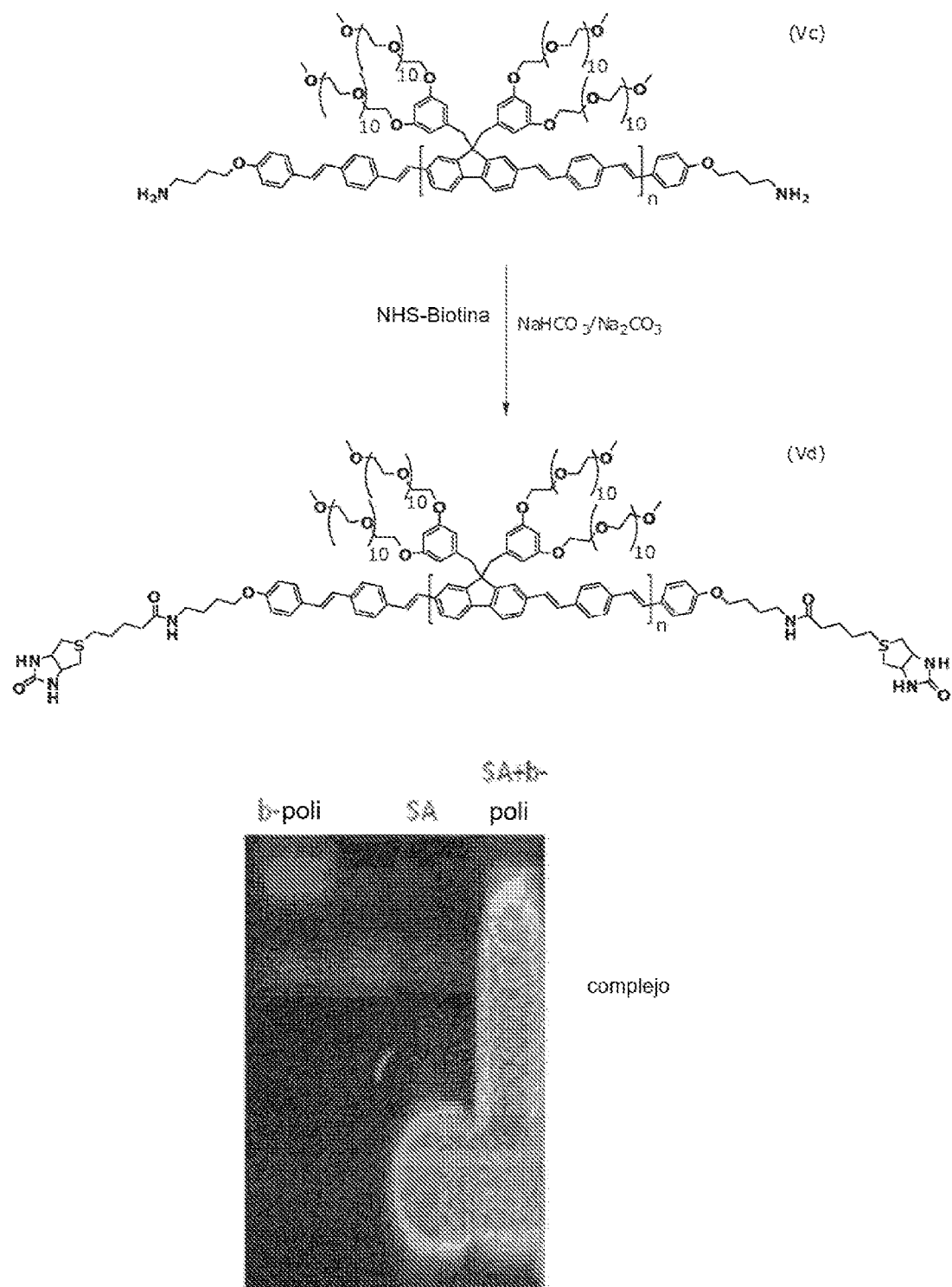


FIG. 15

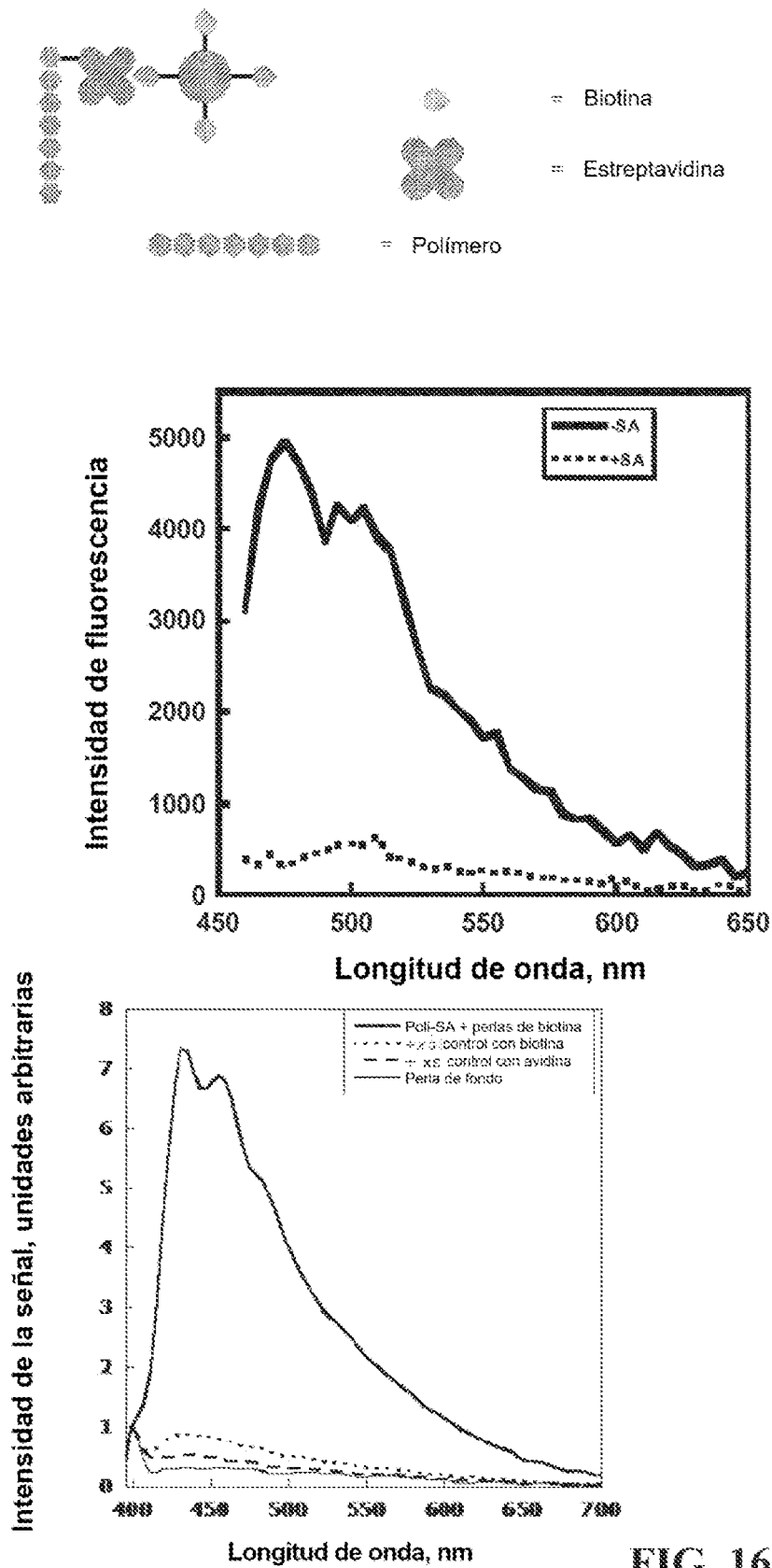


FIG. 16

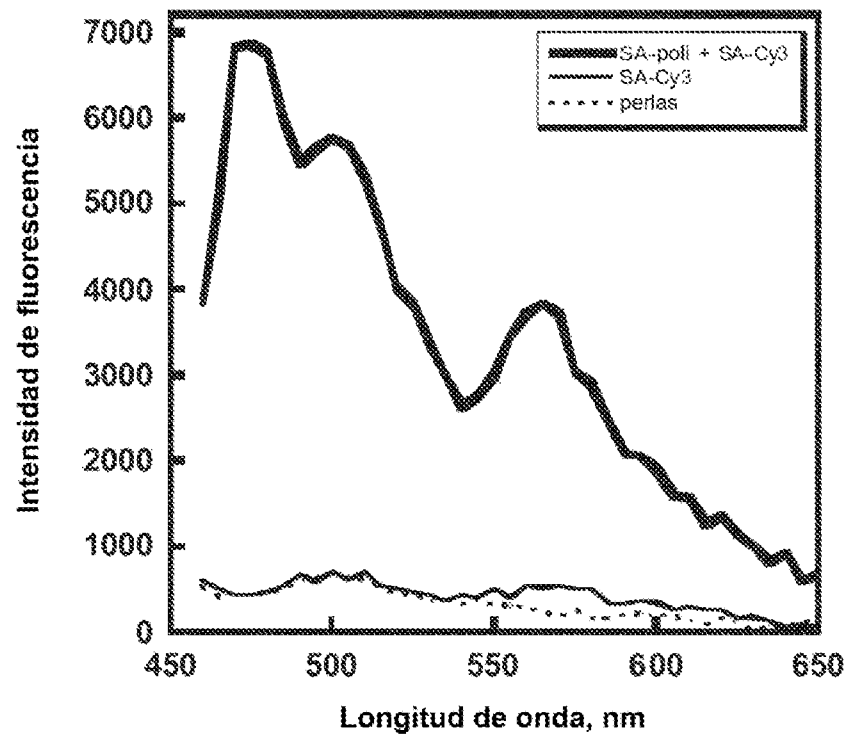
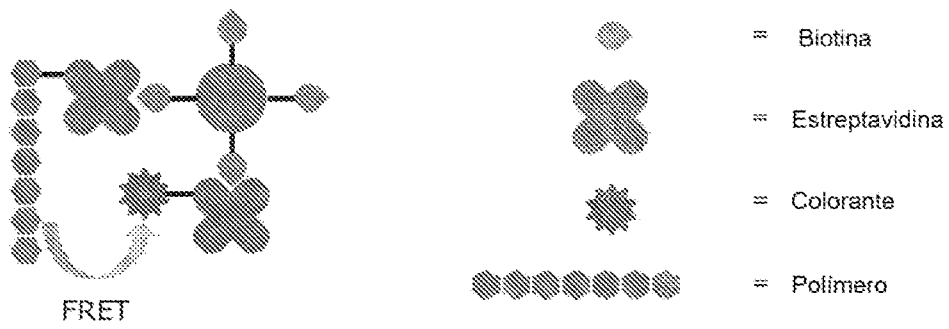


FIG. 17

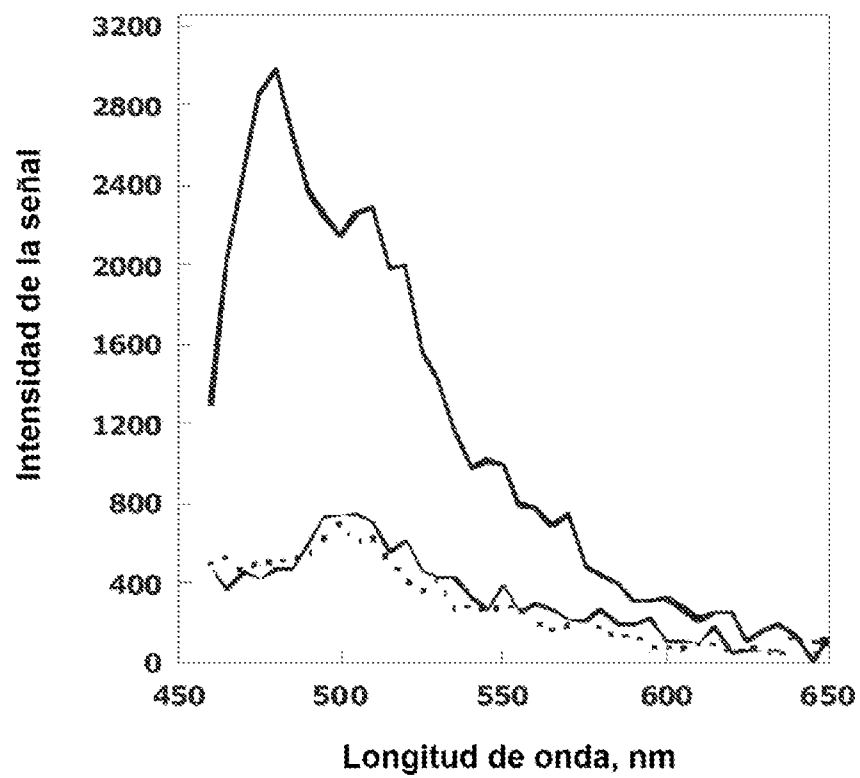
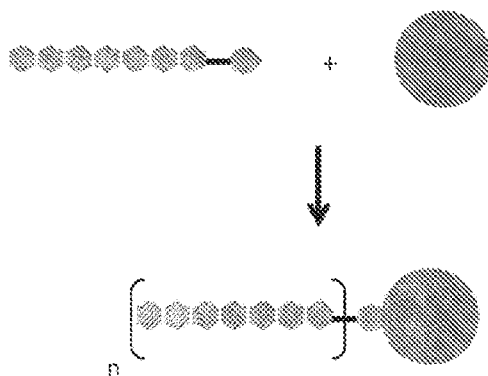


FIG. 18

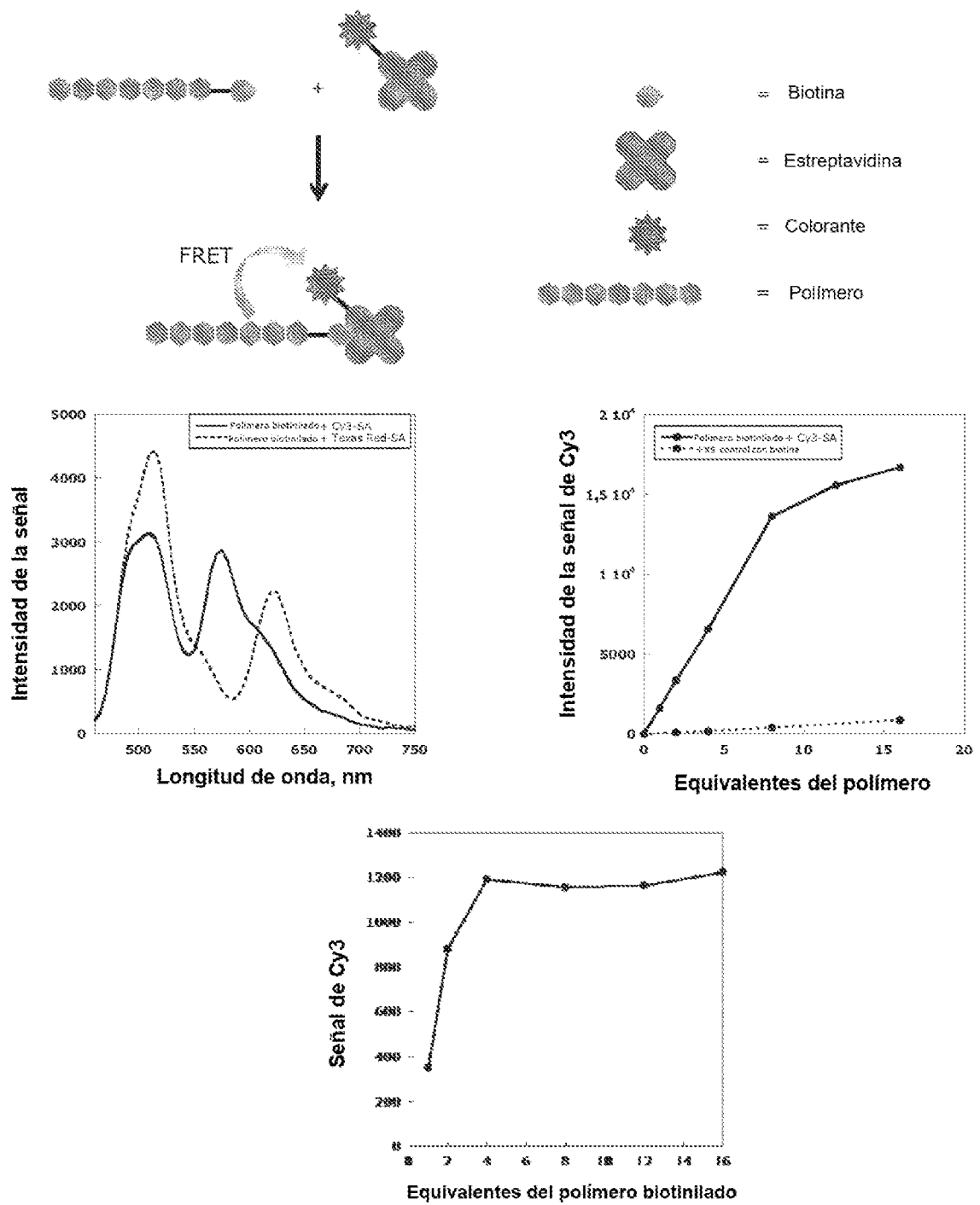


FIG. 19

— Células + Ac primario biotinilado + SA-polímero  
 - - - Células + SA-polímero (sin control con Ac primario)

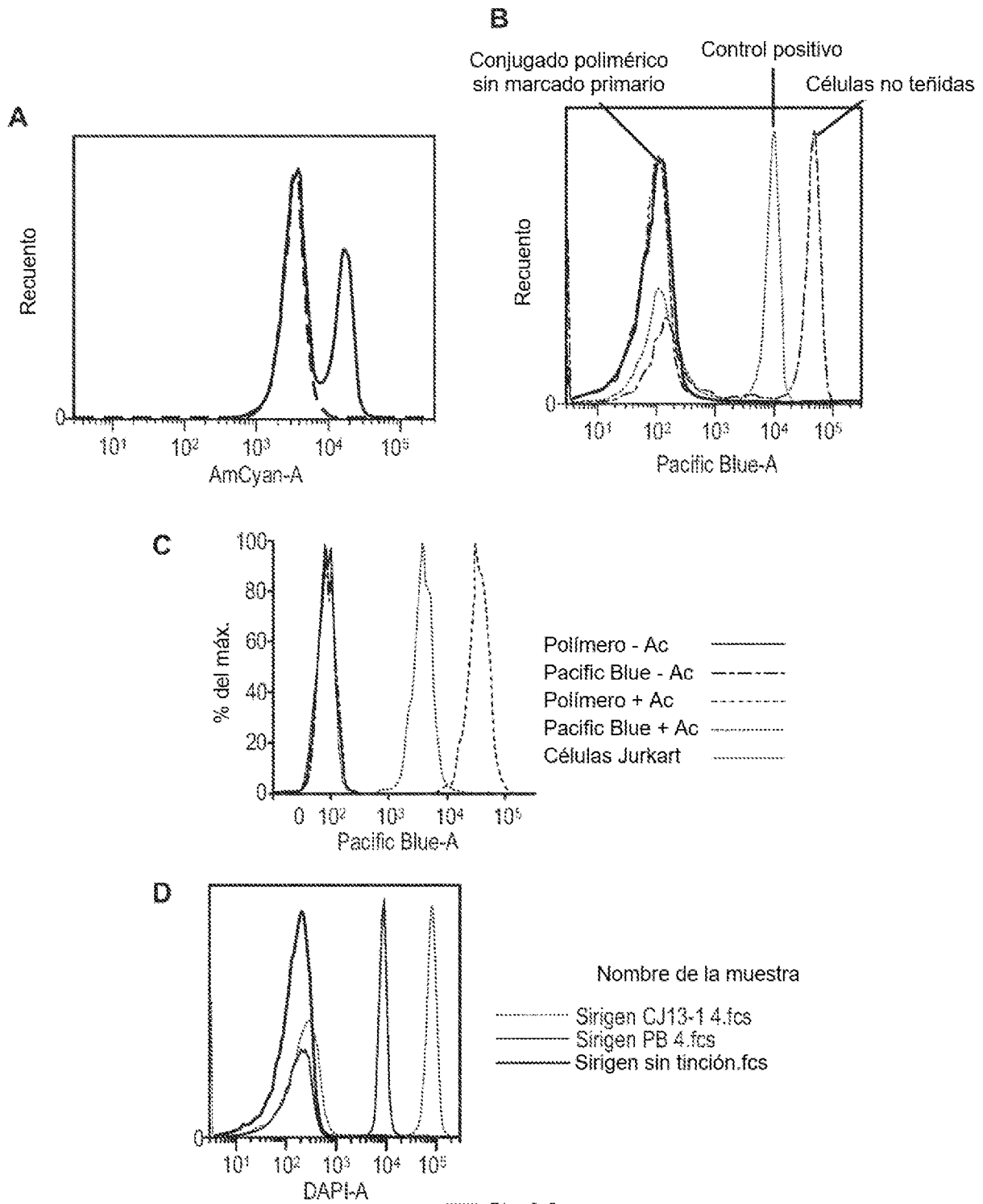
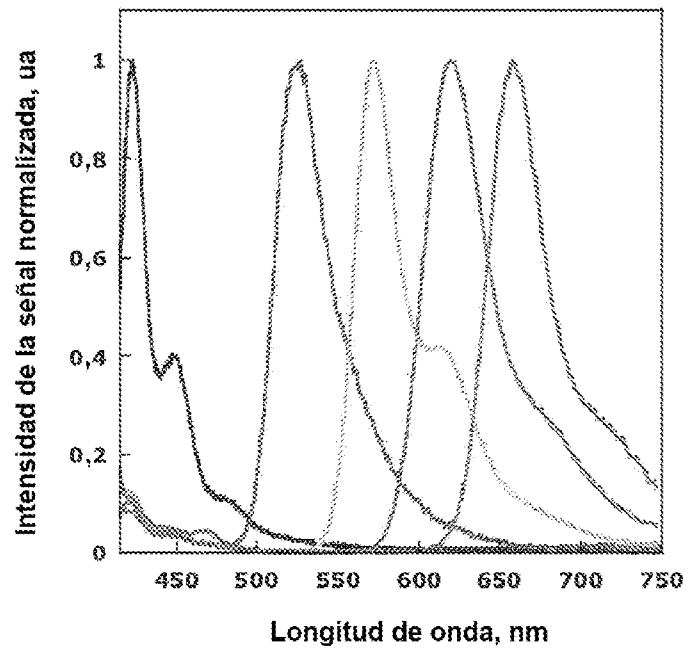
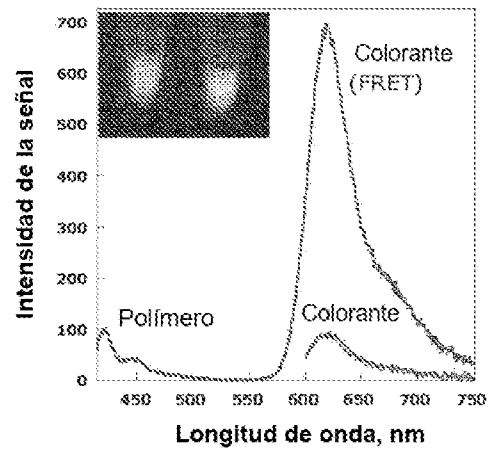


**FIG. 20**

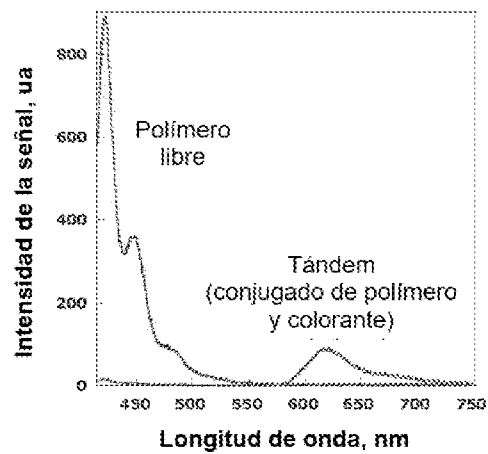


A



B

FIG. 21.



C

FIG. 21.

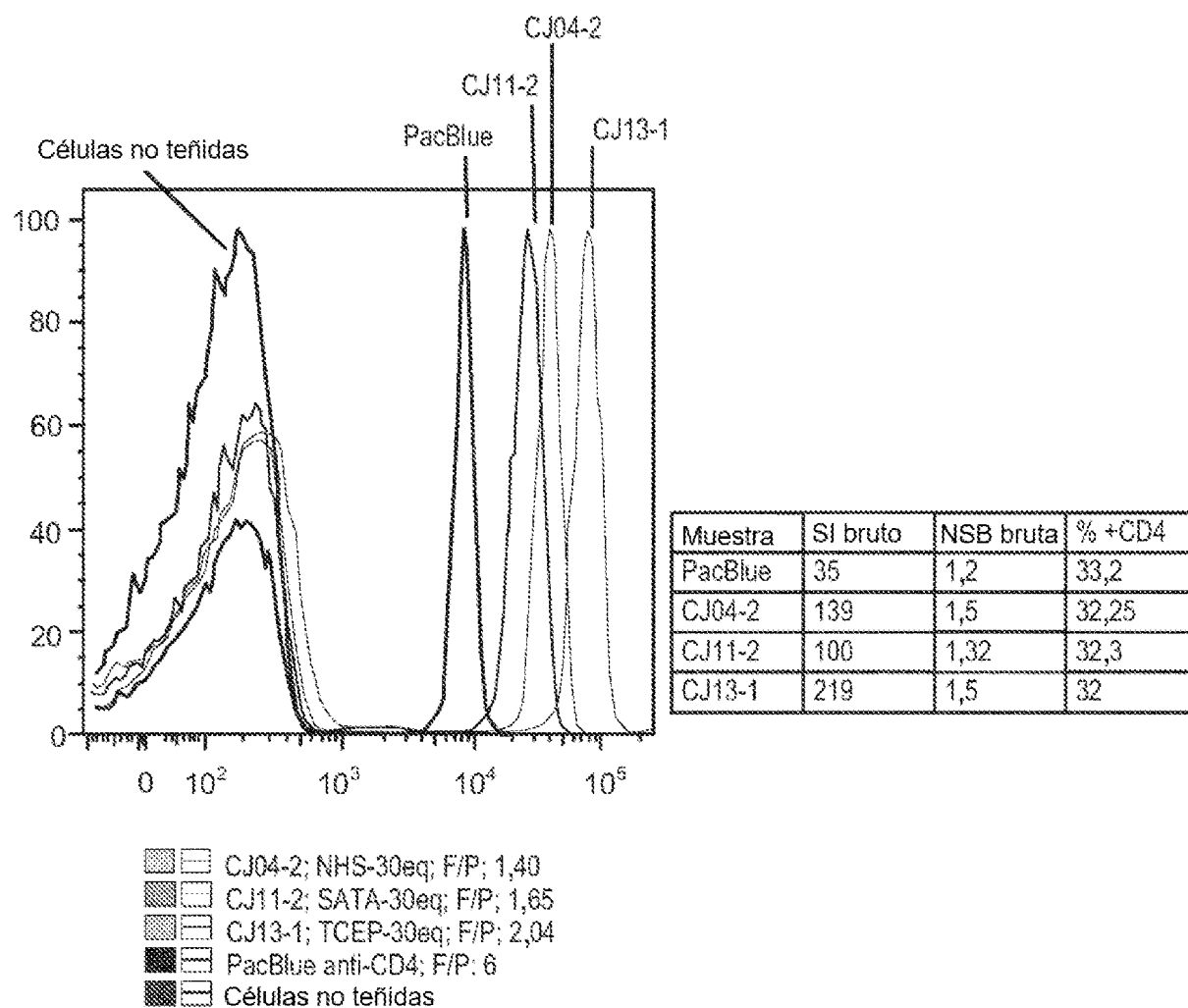


FIG. 22

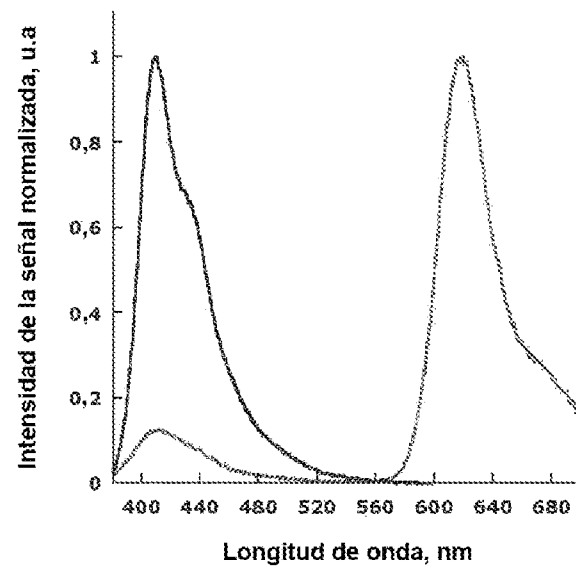


**FIG. 23.**

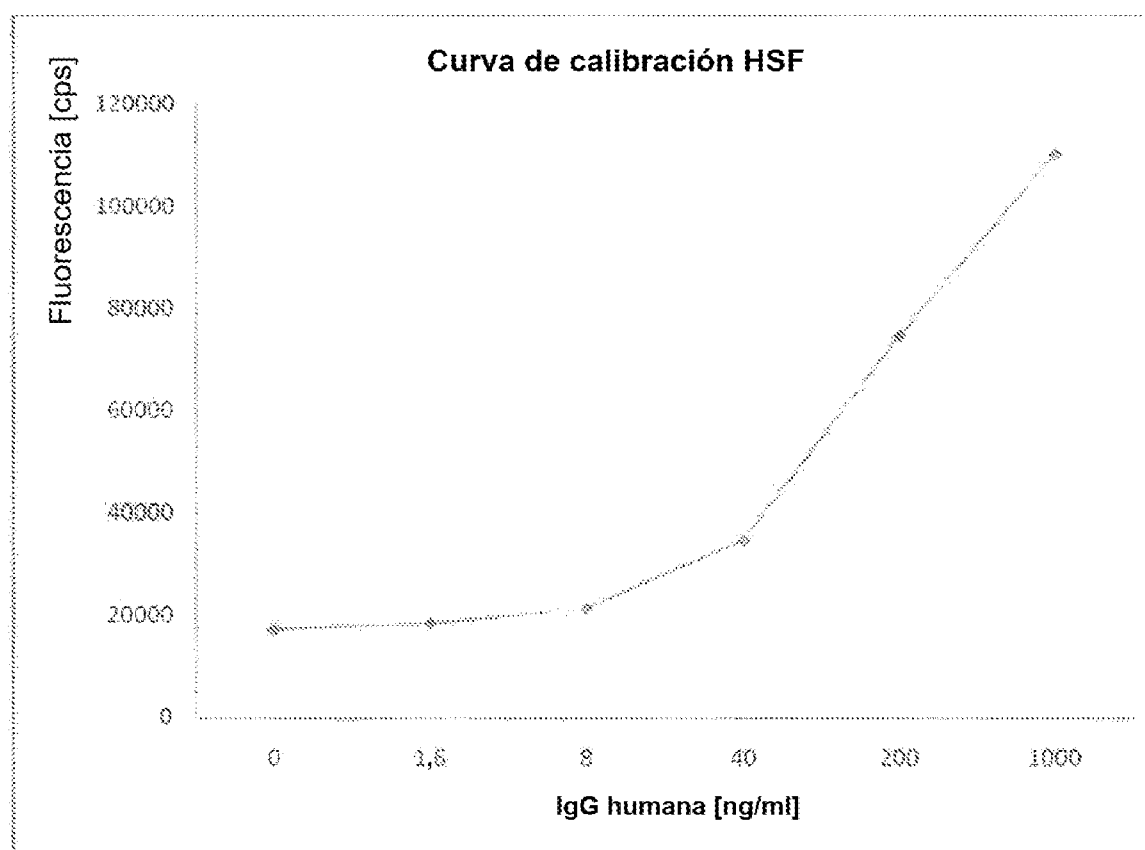


**FIG. 24.**

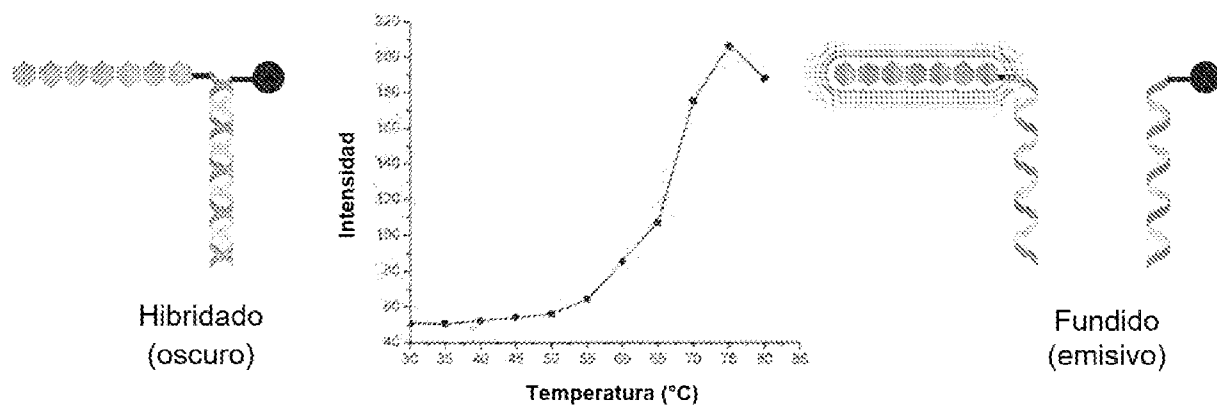


FIG. 25

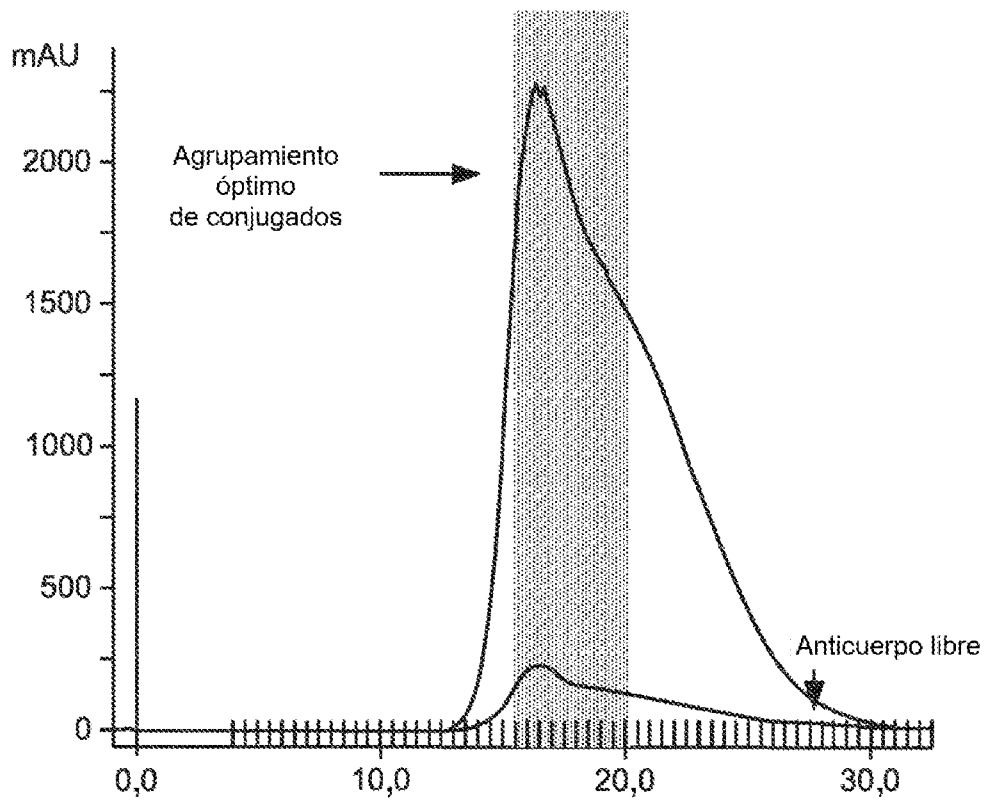
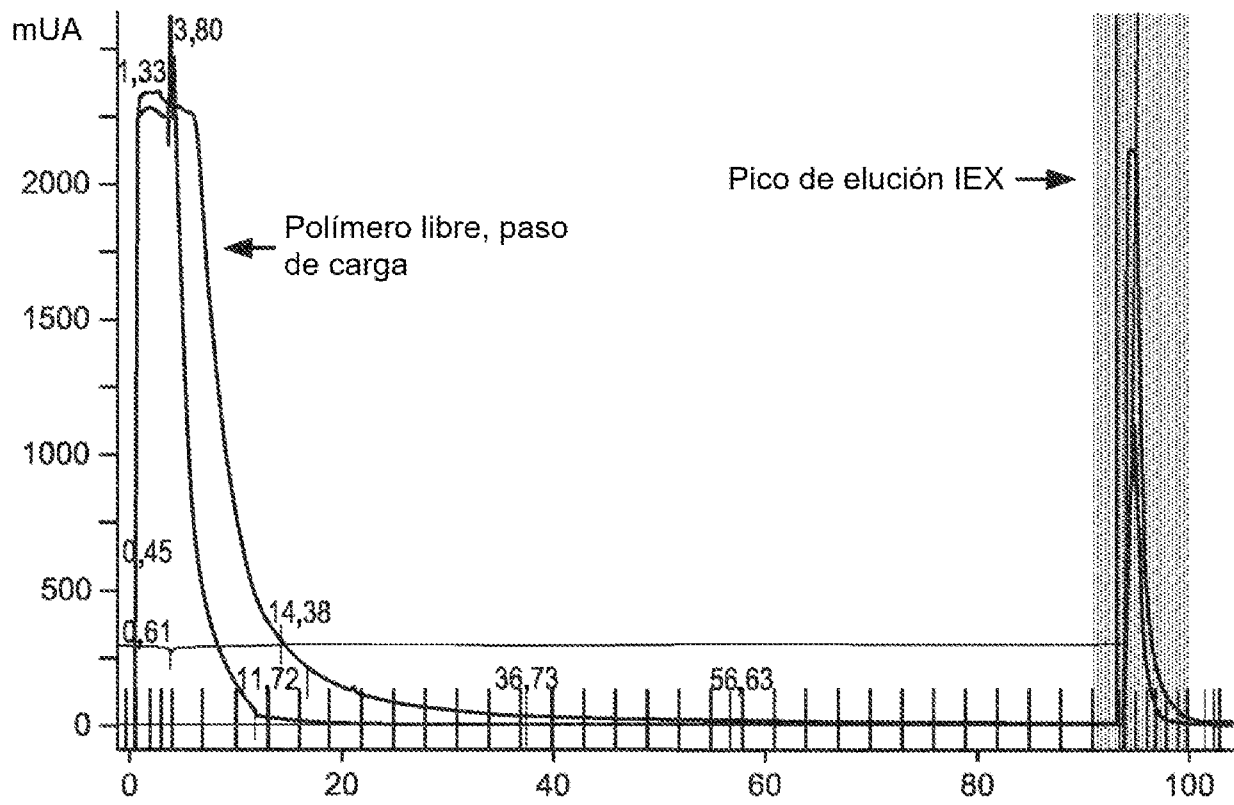


FIG. 26

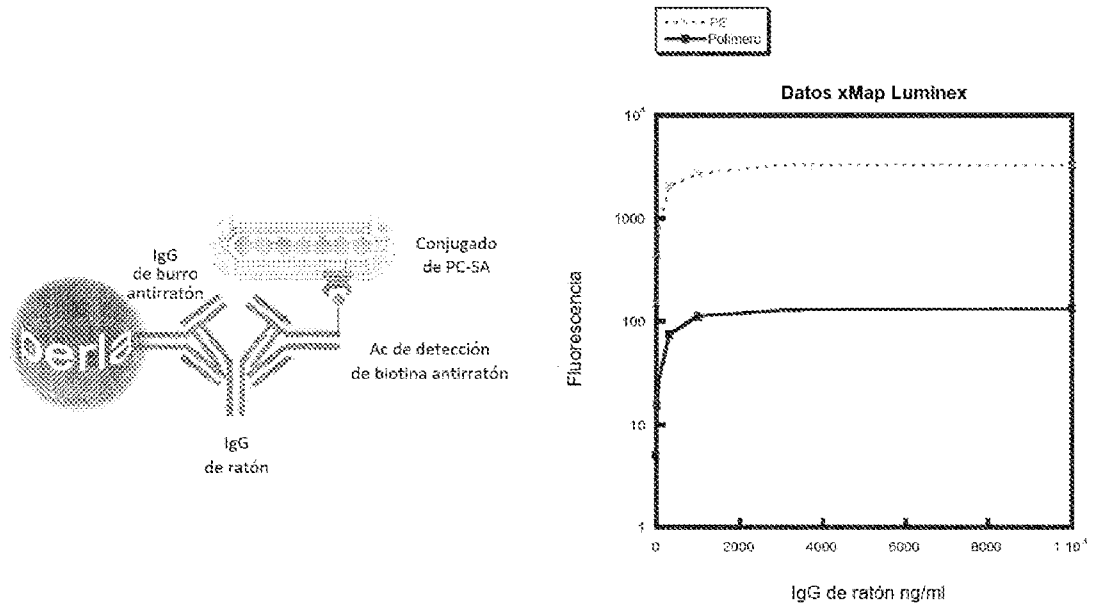


FIG. 27

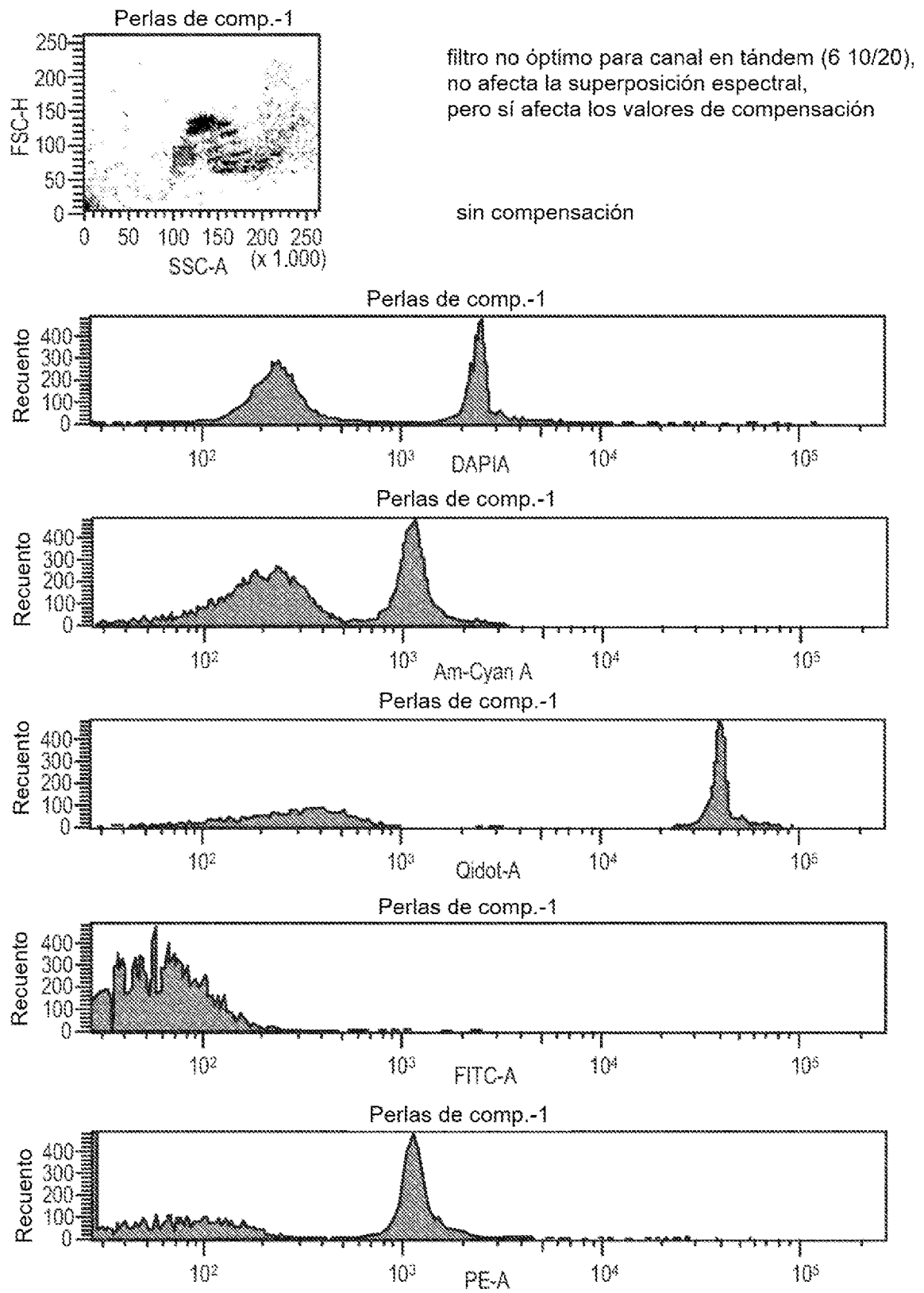


FIG. 28

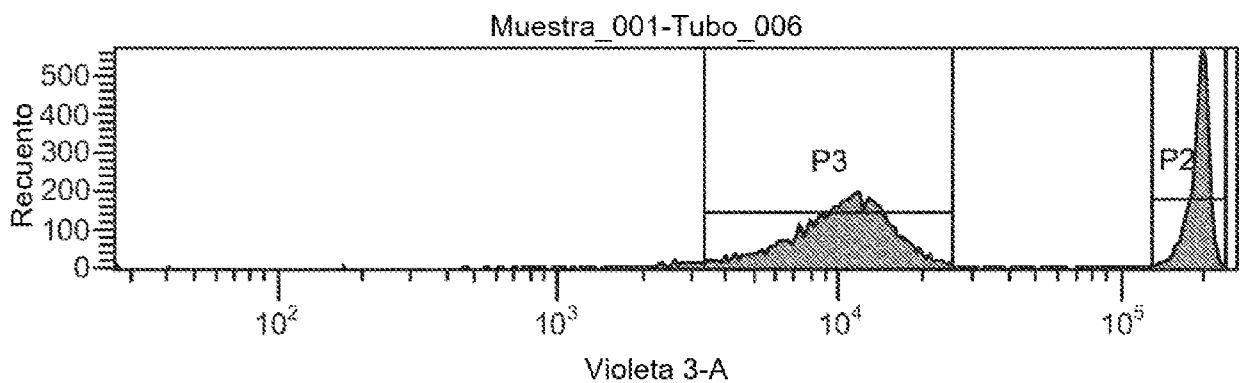
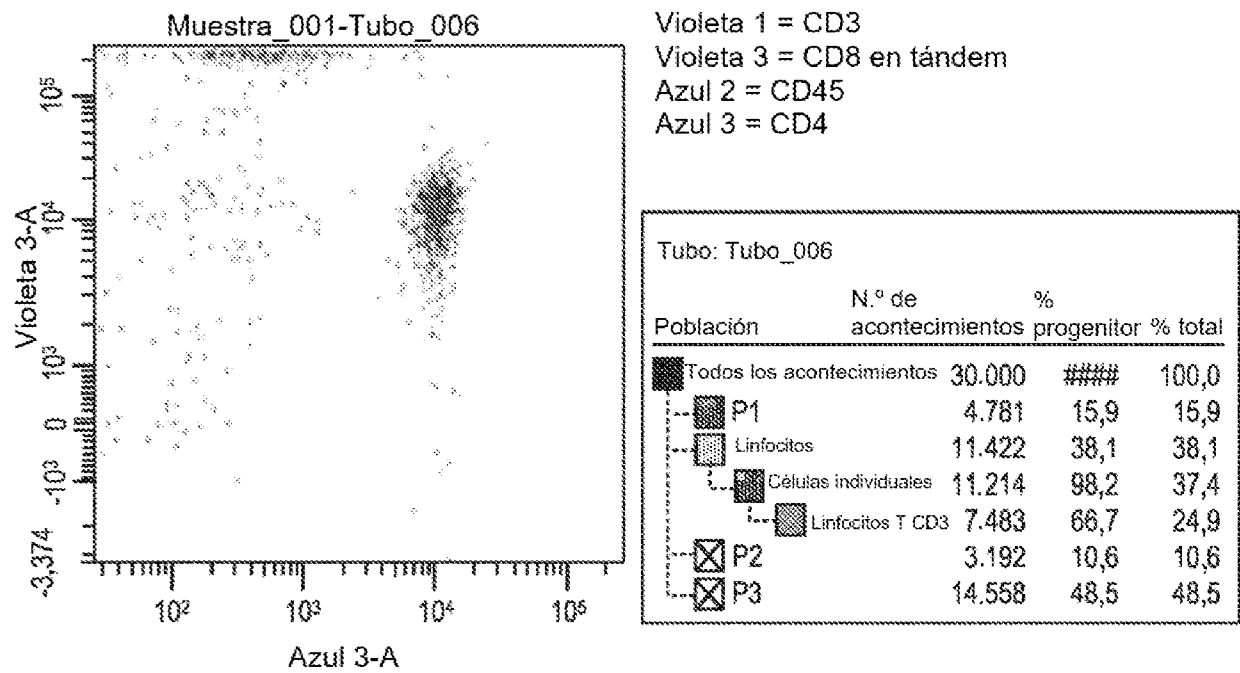


**FIG. 28**  
(Continuación)

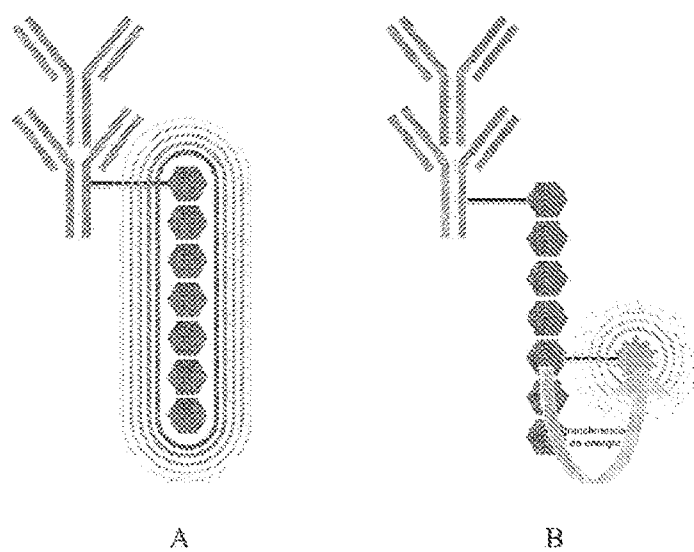


**FIG. 29**

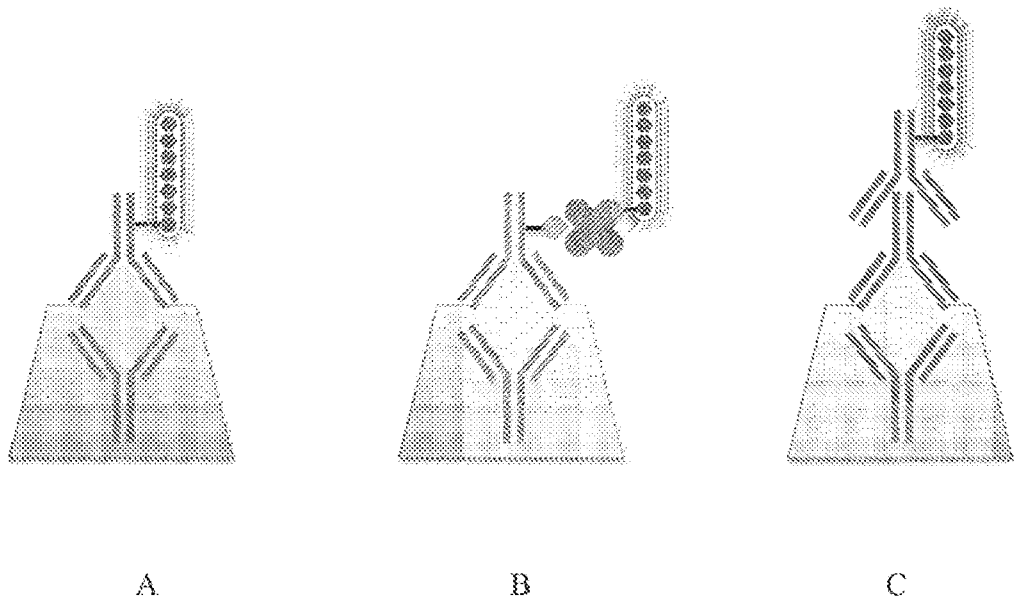


**FIG. 30**

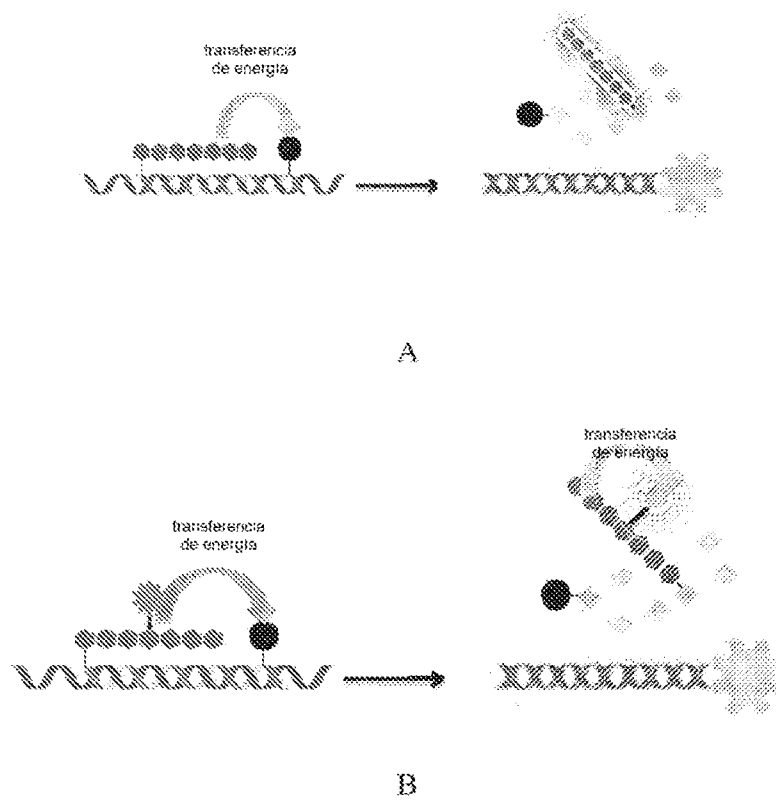
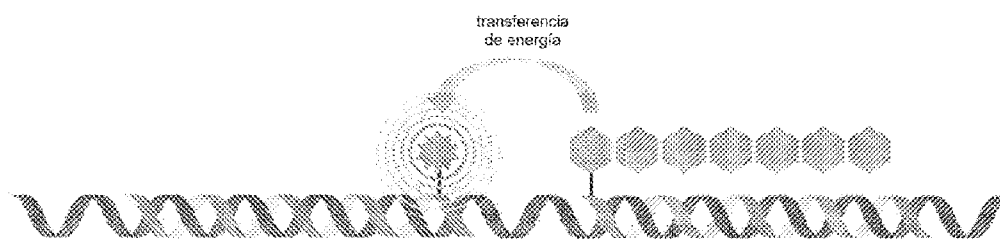
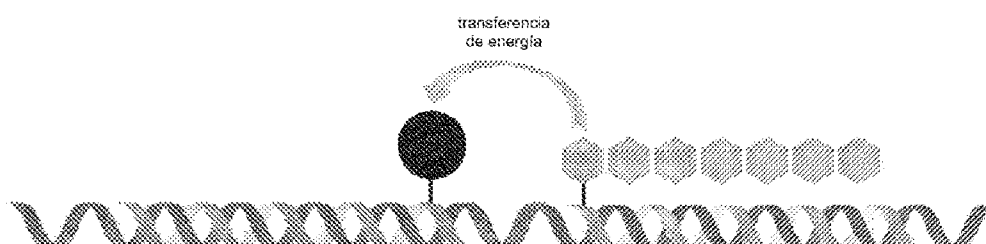


FIG. 31



A



B

**FIG. 32**

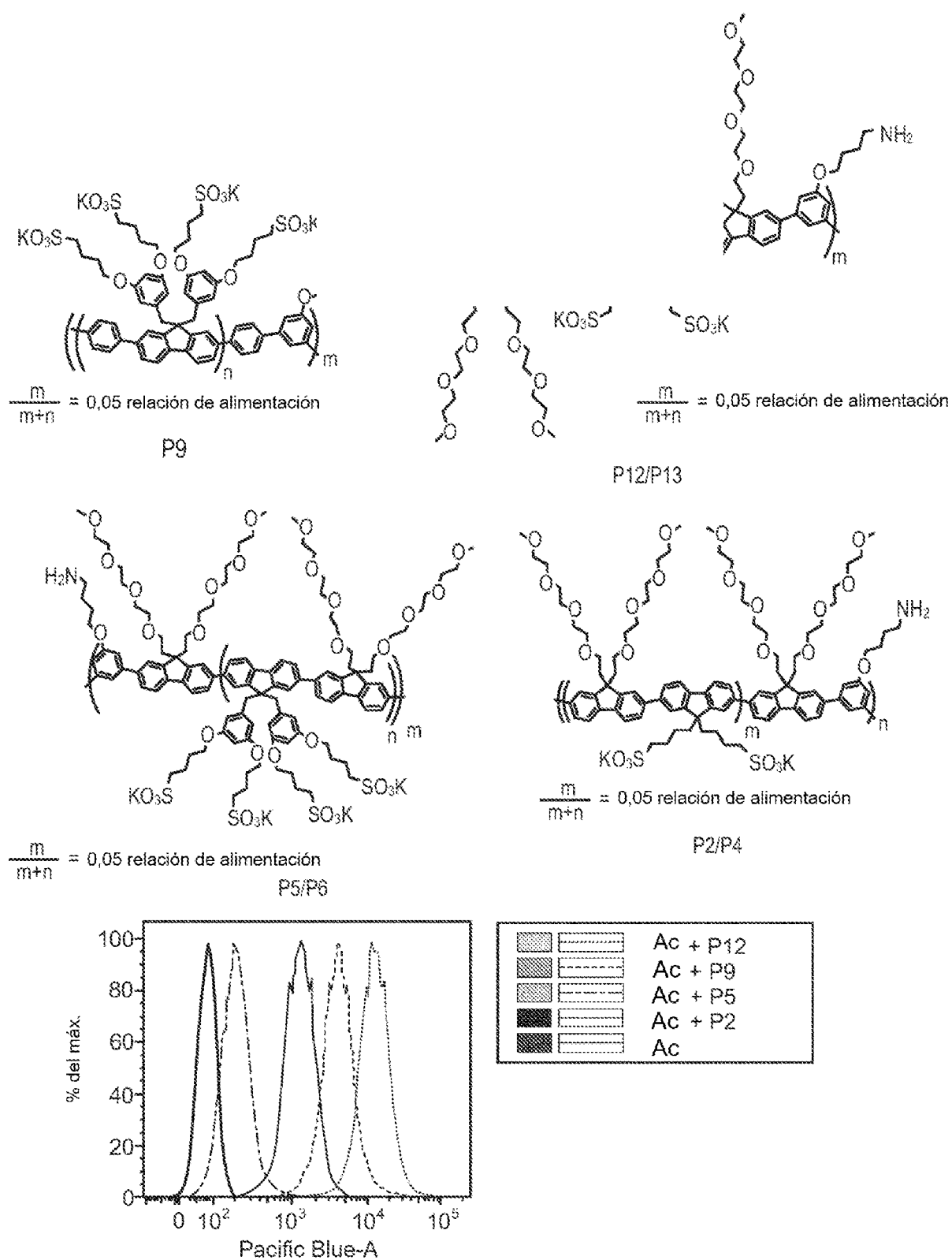


FIG. 33

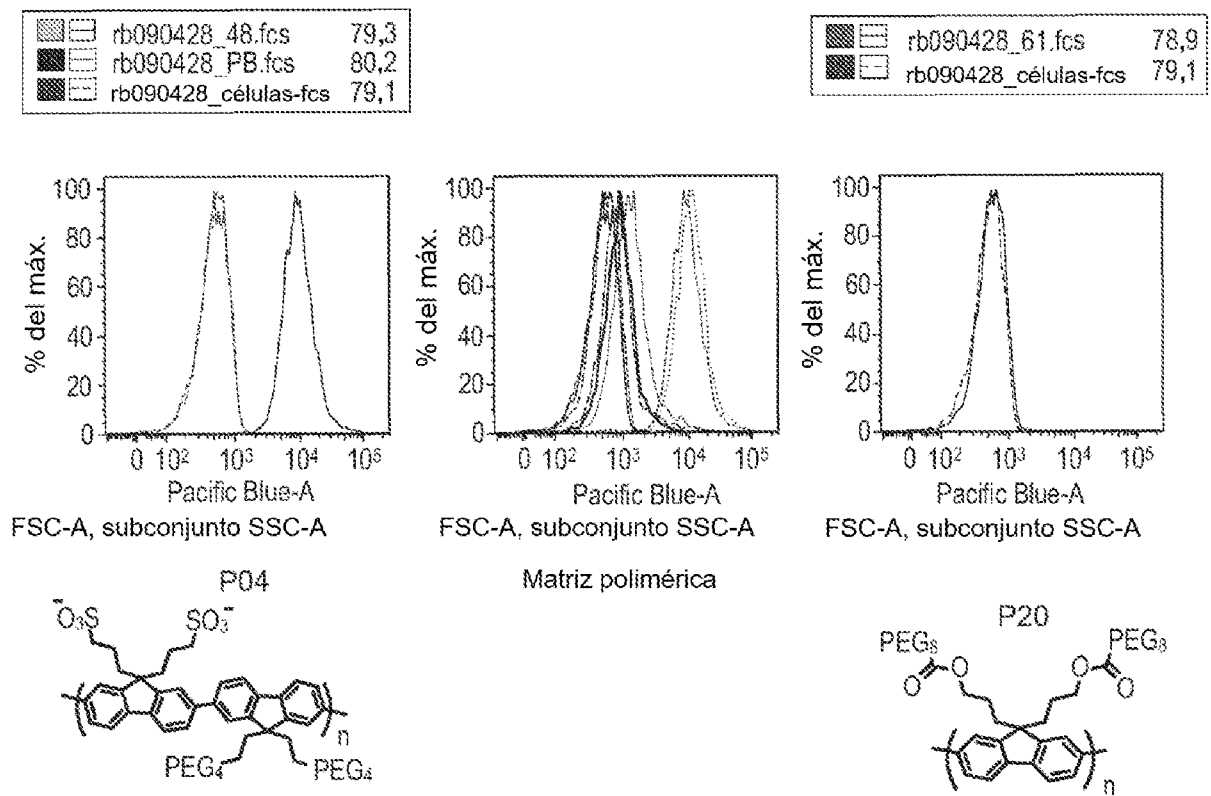


FIG. 34

$\frac{m}{m+n}$  0,05 relación de alimentación

AAI

|             |   |   |   |   |
|-------------|---|---|---|---|
| AvDn        | * | ~ | ~ | * |
| AAI         | * | * | ~ | * |
| Enlazarador | * | ~ | ~ | ~ |
| Sirot-P     | * | ~ | * | * |

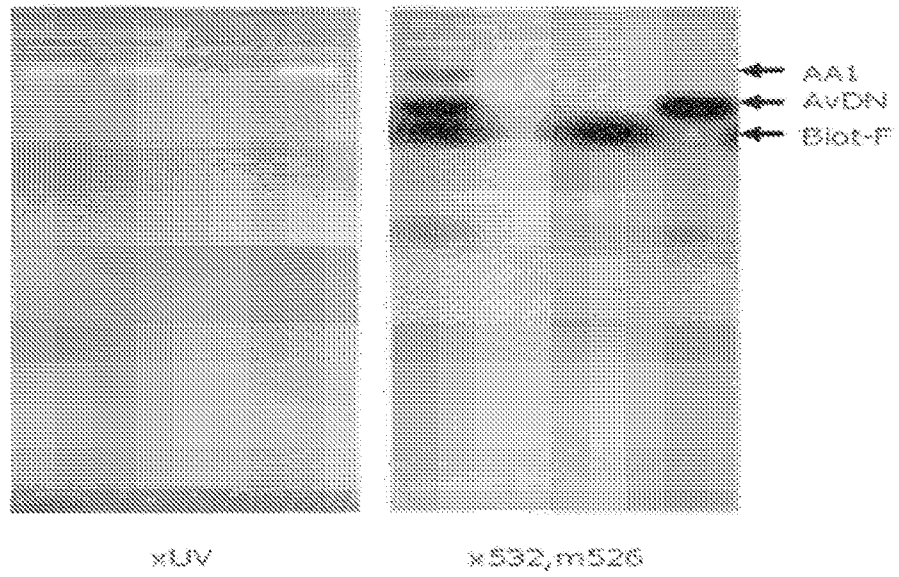


FIG. 35

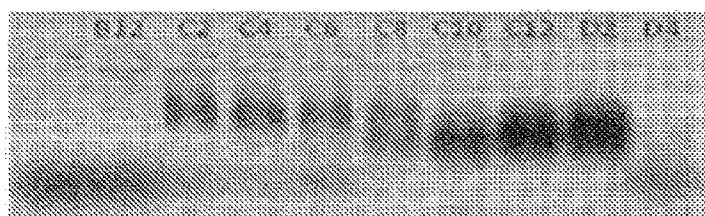
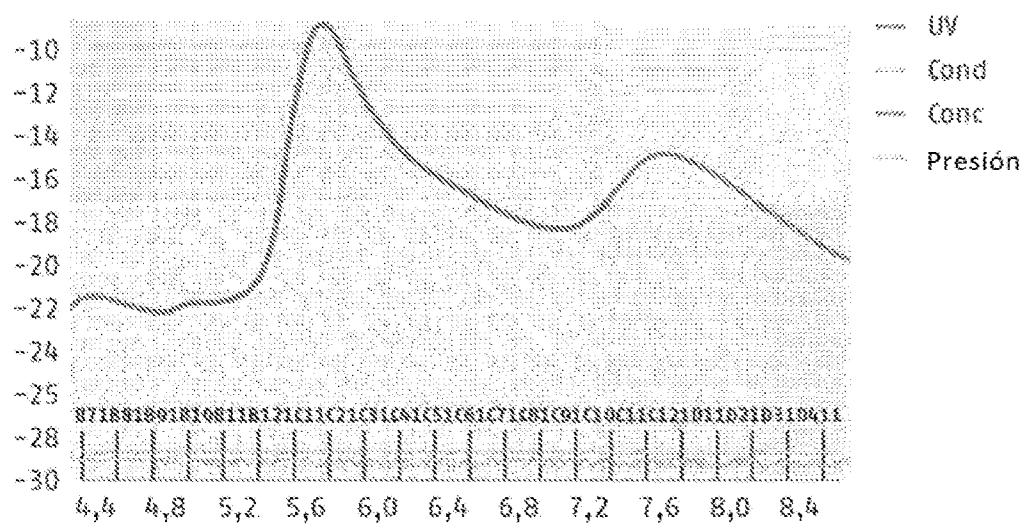


FIG. 36

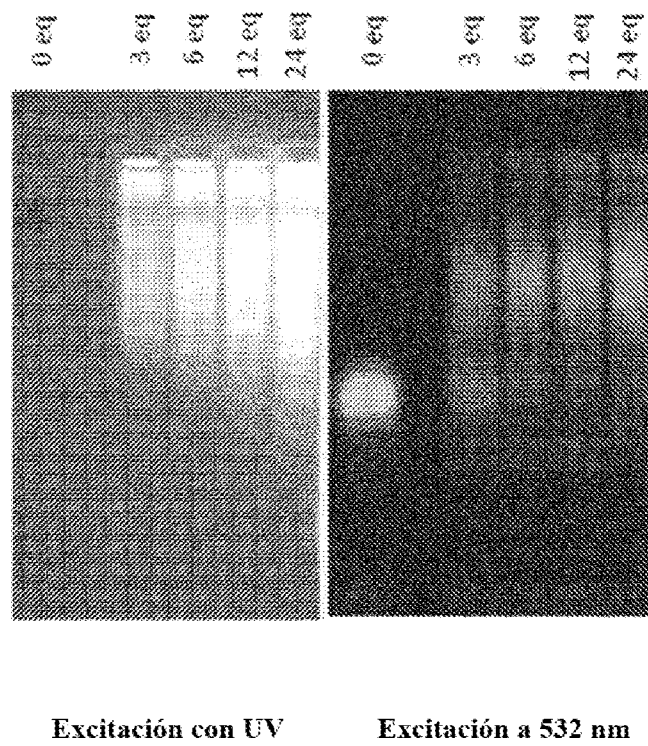


**FIG. 37**

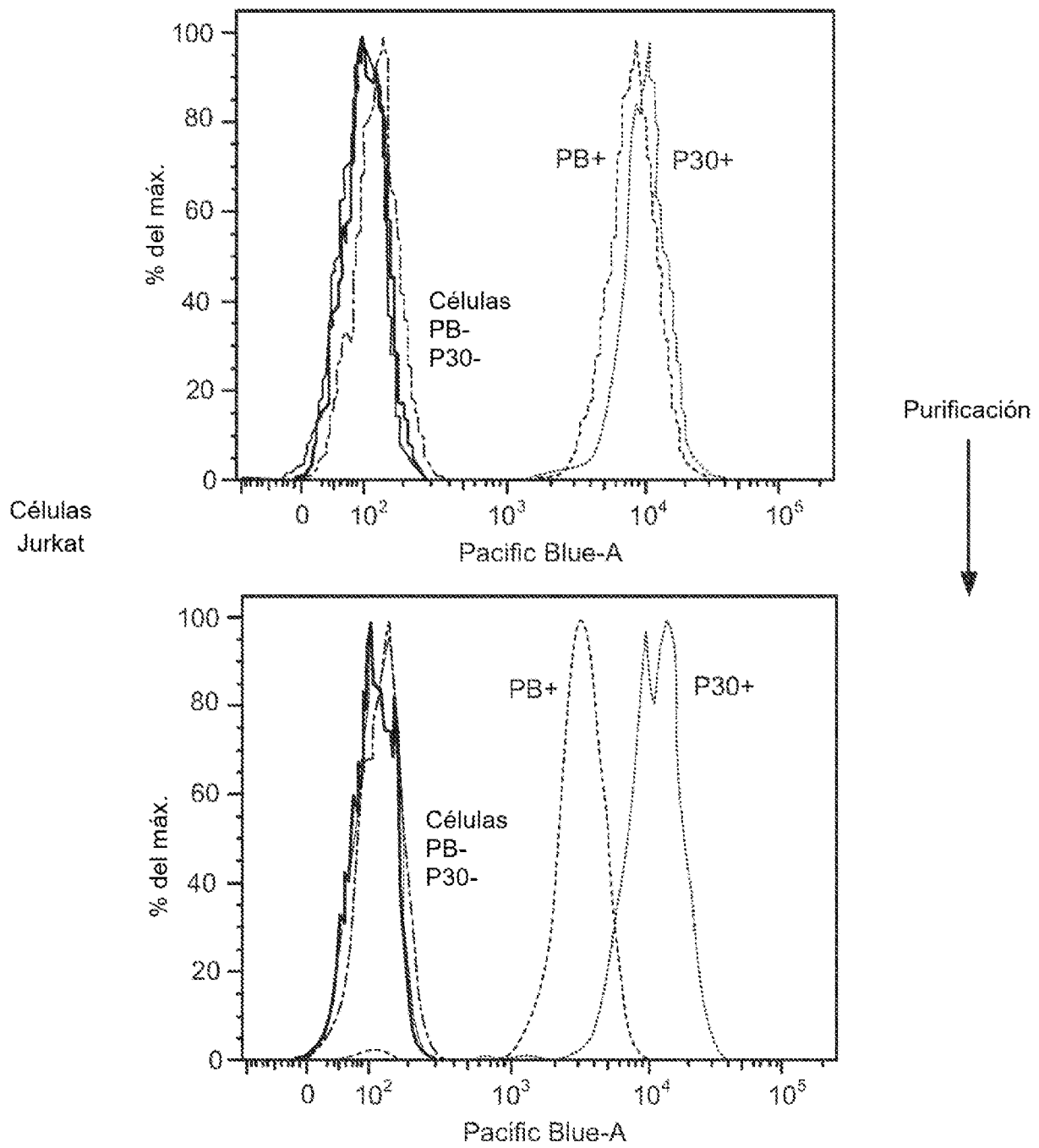


**FIG. 38**