

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 965**

51 Int. Cl.:

C09B 69/10 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C09B 69/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2019 PCT/US2019/024662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2019 WO19191482**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2019 E 19778242 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3775052**

54 Título: **Colorantes poliméricos solubles en agua que tienen cromóforos colgantes**

30 Prioridad:

30.03.2018 US 201862650935 P
07.08.2018 US 201862715722 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2024

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (33.3%)
1 Becton Drive, MC110
Franklin Lakes, New Jersey 07417, US;
LIANG, YONGCHAO (33.3%) y
MOUREAU, DAVID (33.3%)

72 Inventor/es:

BARTHOLOMEW, GLENN P.;
LIANG, YONGCHAO;
WALL, BRIAN y
MOUREAU, DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 965 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

Colorantes poliméricos solubles en agua que tienen cromóforos colgantes

Introducción

5 Se conocen colorantes fluorescentes y métodos para la preparación de colorantes fluorescentes a partir de la técnica anterior, por ejemplo, a partir de los documentos CN 105 602 276 A, US 8835 000 B2, WO 2017/196954 A1 y JP 2015 218304 A. Los colorantes fluorescentes son compuestos que, cuando se irradian con luz de una longitud de onda que absorben, emiten luz de una longitud de onda (habitualmente) diferente. Los colorantes fluorescentes encuentran uso en una variedad de aplicaciones en bioquímica, biología y medicina, por ejemplo, en kits de diagnóstico, en microscopía o en cribado de fármacos. Los colorantes fluorescentes se caracterizan por una serie de parámetros que permiten a un usuario seleccionar un colorante adecuado dependiendo del propósito deseado. Los parámetros de interés incluyen el máximo de longitud de onda de excitación, el máximo de longitud de onda de emisión, el desplazamiento de Stokes, el coeficiente de extinción, el rendimiento cuántico de fluorescencia y la vida útil de la fluorescencia. Los colorantes pueden seleccionarse según la aplicación de interés para, por ejemplo, permitir la penetración de radiación excitante en muestras biológicas, para minimizar la fluorescencia de fondo y/o para lograr una alta razón señal-ruido.

El reconocimiento molecular implica la unión específica de dos moléculas. Las moléculas que tienen especificidad de unión por una biomolécula diana encuentran uso en una variedad de aplicaciones de investigación y diagnóstico, tales como el marcaje y la separación de analitos, citometría de flujo, hibridación *in situ*, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, separaciones celulares magnéticas y cromatografía. Pueden detectarse biomoléculas diana mediante marcaje con un colorante fluorescente.

Sumario

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. En particular, la invención se expone en un colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1 y un miembro de unión específica marcado según la reivindicación 13.

Breve descripción de las figuras

Se entiende que los dibujos, descritos a continuación, son únicamente con fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

La figura 1 representa la estructura general de un colorante polimérico en tándem a modo de ejemplo donde el "Colorante" es un fluoróforo aceptor.

30 La figura 2 muestra un espectro de absorción normalizado para un multicromóforo a modo de ejemplo y espectros de emisión para una serie de colorantes poliméricos en tándem que incluyen el multicromóforo.

La figura 3 muestra los espectros de emisión para un multicromóforo a modo de ejemplo y una serie de colorantes poliméricos en tándem que incluyen el multicromóforo, todos a una absorción de 0,04 DO.

35 La figura 4 representa la estructura de un colorante polimérico en tándem a modo de ejemplo que tiene una cadena principal peptídica. D es un grupo colgante donador BODIPY, A es un colorante aceptor y el bioenlazador es un enlazador que incluye un grupo funcional quimioselectivo para la unión del colorante en tándem a una biomolécula.

40 La figura 5A muestra los espectros de absorción y emisión para el grupo colgante donador BODIPY que se usó para preparar el multicromóforo de la figura 4. La figura 5B muestra los espectros de absorción y emisión para el colorante aceptor usado para preparar el multicromóforo de la figura 4. La figura 5C muestra los espectros de absorción y emisión para el colorante polimérico en tándem a modo de ejemplo de la figura 4.

45 La figura 6A ilustra la transferencia de energía homogénea entre cromóforos donadores colgantes que conduce preferentemente a una transferencia de energía reversible continuada entre cromóforos iguales en lugar de emisión desde un único cromóforo. Este proceso puede dar como resultado autoextinción y rendimientos cuánticos que son significativamente menores que los observados para un único cromóforo aislado. La figura 6B ilustra la transferencia de energía heterogénea que conduce principalmente a una transferencia de energía unidireccional entre diferentes cromóforos. La transferencia de energía al cromóforo secundario conduce preferentemente a emisión, limitada por el rendimiento cuántico del aceptor y un único cromóforo donador.

50 Las figuras 7A-7B ilustran esquemas de síntesis para la preparación de multicromóforos a modo de ejemplo que tienen un colorante BODIPY unido ("Colorante") (figura 7A) y un colorante polimérico en tándem (figura 7B) usando métodos de polimerización click. "Colorante" y "Donador" pueden referirse a un colorante donador tal como un BODIPY y "Aceptor" es un fluoróforo aceptor.

La figura 8 muestra los espectros de absorción y emisión de un multicromóforo a modo de ejemplo de la figura 7A que incluye colorantes BODIPY colgantes unidos.

Las figuras 9A-9B muestran los espectros de absorción (figura 9A) y emisión (figura 9B) de una serie de colorantes poliméricos en tándem a modo de ejemplo que incluyen colorantes donadores BODIPY colgantes unidos y una variedad de colorantes aceptores que tienen diferentes longitudes de onda máximas de emisión.

Definiciones

- 5 Antes de describir ejemplos a modo de ejemplo con mayor detalle, se exponen las siguientes definiciones para ilustrar y definir el significado y alcance de los términos usados en la descripción.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Todavía, ciertos términos se definen a continuación por motivos de claridad y facilidad de referencia.

- 10 Debe observarse que, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un colorante” se refiere a uno o más colorantes, es decir, un único colorante y múltiples colorantes. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como “únicamente”, “solo” y similares en relación con la mención de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación “negativa”.

- 15 Como se usan en el presente documento, los términos “grupo funcional quimioselectivo” y “etiqueta quimioselectiva” se usan indistintamente y se refieren a un grupo funcional que puede reaccionar selectivamente con otro grupo funcional compatible para formar un enlace covalente, en algunos casos, después de la activación opcional de uno de los grupos funcionales. Los grupos funcionales quimioselectivos de interés incluyen, pero no se limitan a, tioles y maleimida o yodoacetamida, aminas y ácidos carboxílicos o ésteres activos de los mismos, así como grupos que pueden reaccionar entre sí mediante química click, por ejemplo, grupos azida y alquino (por ejemplo, grupos ciclooctino), tetrazina, transcicloocteno, dienos y dienófilos, y azida, química de intercambio de fluoruro de azufre (VI) (SuFEX), fluoruro de sulfonilo, así como hidroxilo, hidrazido, hidrazino, aldehído, cetona, azido, alquino, fosfina, epóxido y similares.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término “muestra” se refiere a un material o mezcla de materiales, en algunos casos en forma líquida, que contiene uno o más analitos de interés. En algunos ejemplos, el término como se usa en su sentido más amplio se refiere a cualquier material vegetal, animal o bacteriano que contiene células o que produce metabolitos celulares, tal como, por ejemplo, tejido o fluido aislado de un individuo (incluyendo sin limitación plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, linfa, lágrimas, saliva y secciones tisulares) o de constituyentes de cultivo celular *in vitro*, así como muestras del entorno. El término “muestra” también puede referirse a una “muestra biológica”. Como se usa en el presente documento, el término “una muestra biológica” se refiere a un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, fluidos corporales, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, moco, fluido linfático, fluido sinovial, fluido cerebroespinal, saliva, fluido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, fluido vaginal y semen). Una “muestra biológica” también puede referirse a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o porción de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores y órganos. En ciertos ejemplos, la muestra se ha extraído de un animal o planta. Las muestras biológicas pueden incluir células. El término “células” se usa en su sentido convencional para referirse a la unidad estructural básica de organismos vivos, tanto eucariotas como procariotas, que tienen al menos un núcleo y una membrana celular. En ciertos ejemplos, las células incluyen células procariotas, tales como de bacterias. En otros ejemplos, las células incluyen células eucariotas, tales como células obtenidas de muestras biológicas de animales, plantas u hongos.

- 35 Los términos “enlazado a soporte” y “unido a un soporte” se usan indistintamente y se refieren a un resto (por ejemplo, un miembro de unión específica) que está unido covalentemente o no covalentemente a un soporte de interés. La unión covalente puede implicar la reacción química de dos grupos funcionales compatibles (por ejemplo, dos grupos funcionales quimioselectivos, un electrófilo y un nucleófilo, etc.) para formar un enlace covalente entre los dos restos de interés (por ejemplo, un soporte y un miembro de unión específica). En algunos casos, la unión no covalente puede implicar la unión específica entre dos restos de interés (por ejemplo, dos restos de afinidad tales como un hapteno y un anticuerpo o un resto biotina y una estreptavidina, etc.). En ciertos casos, la unión no covalente puede implicar la absorción a un sustrato.

- 40 El término “polipéptido” se refiere a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo péptidos que varían de 2-50 aminoácidos de longitud y polipéptidos que son mayores de 50 aminoácidos de longitud. Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento. El término “polipéptido” incluye polímeros de aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos química o bioquímicamente modificados o derivados, y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados en los que el esqueleto convencional se ha sustituido por esqueletos de origen no natural o sintéticos. Un polipéptido puede ser de cualquier longitud conveniente, por ejemplo, 2 o más aminoácidos, tal como 4 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 20 o más aminoácidos, 50

o más aminoácidos, 100 o más aminoácidos, 300 o más aminoácidos, tal como hasta 500 o 1000 o más aminoácidos. Los "péptidos" pueden ser de 2 o más aminoácidos, tal como 4 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 20 o más aminoácidos, tal como hasta 50 aminoácidos. En algunos ejemplos, los péptidos tienen entre 5 y 30 aminoácidos de longitud.

5 Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un resto de interés que está libre al menos en un 60 %, libre al menos en un 75 %, libre al menos en un 90 %, libre al menos en un 95 %, libre al menos en un 98 % e incluso libre al menos en un 99 % de otros componentes con los que está asociado el resto antes de la purificación.

10 Una "pluralidad" contiene al menos 2 miembros. En ciertos casos, una pluralidad puede tener 5 o más, tal como 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 90 o más, 100 o más, 300 o más, 1000 o más, 3000 o más, 10.000 o más, 100.000 o más miembros.

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

15 El término "unión específica" se refiere a la capacidad de un agente de captura (o un primer miembro de un par de unión específica) para unirse preferentemente a un analito particular (o un segundo miembro de un par de unión específica) que está presente, por ejemplo, en una mezcla homogénea de diferentes analitos. En algunos casos, una interacción de unión específica discriminará entre analitos deseables y no deseables en una muestra con una especificidad de 10 veces o más para un analito deseable sobre analitos no deseables, tal como 100 veces o más, o 1000 veces o más. En algunos casos, la afinidad entre un agente de captura y el analito cuando se unen específicamente en un complejo de agente de captura/analito es al menos 10^{-8} M, al menos 10^{-9} M, tal como hasta 10^{-10} M.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de unión, estando correlacionada la afinidad de unión aumentada con una Kd inferior.

25 Los métodos descritos en el presente documento incluyen múltiples etapas. Cada etapa puede realizarse después de que haya transcurrido una cantidad de tiempo predeterminada entre etapas, según se desee. Como tal, el tiempo entre realizar cada etapa puede ser de 1 segundo o más, 10 segundos o más, 30 segundos o más, 60 segundos o más, 5 minutos o más, 10 minutos o más, 60 minutos o más e incluyendo 5 horas o más. En ciertos ejemplos, cada etapa posterior se realiza inmediatamente después de la finalización de la etapa anterior. En otros ejemplos, puede realizarse una etapa después de una incubación o tiempo de espera después de la finalización de la etapa anterior, por ejemplo, de unos pocos minutos a un tiempo de espera durante la noche.

30 Como se usa en el presente documento, los términos "evaluar", "determinar", "medir" y "valorar" y "ensayar" se usan indistintamente e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

El término "separación", como se usa en el presente documento, se refiere a la separación física de dos elementos (por ejemplo, por tamaño o afinidad, etc.) así como a la degradación de un elemento, dejando el otro intacto.

35 El término "enlazador" o "unión" se refiere a un resto de unión que conecta dos grupos y tiene una cadena principal de 100 átomos o menos de longitud. Un enlazador o unión puede ser un enlace covalente que conecta dos grupos o una cadena de entre 1 y 100 átomos de longitud, por ejemplo, una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o más átomos de carbono de longitud, donde el enlazador puede ser lineal, ramificado, cíclico o un solo átomo. En algunos casos, el enlazador es un enlazador de ramificación que se refiere a un resto de unión que conecta tres o más grupos. En ciertos casos, uno, dos, tres, cuatro o cinco o más átomos de carbono de una cadena principal enlazadora pueden estar opcionalmente sustituidos con un heteroátomo de azufre, nitrógeno u oxígeno. En algunos casos, la cadena principal del enlazador incluye un grupo funcional de unión, tal como un éter, tioéter, amino, amida, sulfonamida, carbamato, tiocarbamato, urea, tiourea, éster, tioéster o imina. Los enlaces entre los átomos de la cadena principal pueden ser saturados o insaturados, y en algunos casos no más de uno, dos o tres enlaces insaturados están presentes en una cadena principal enlazadora. El enlazador puede incluir uno o más grupos sustituyentes, por ejemplo, con un grupo alquilo, arilo o alquenilo. Un enlazador puede incluir, sin limitaciones, polietilenglicol; éteres, tioéteres, aminas terciarias, alquilos, que pueden ser lineales o ramificados, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo) y similares. La cadena principal enlazadora puede incluir un grupo cíclico, por ejemplo, un grupo arilo, heterociclo o cicloalquilo, donde 2 o más átomos, por ejemplo, 2, 3 o 4 átomos, del grupo cíclico están incluidos en la cadena principal. Un conector puede ser escindible o no escindible.

50 Los términos "poli(óxido de etileno)", "PEO", "polietilenglicol" y "PEG" se usan indistintamente y se refieren a un grupo polimérico que incluye una cadena descrita por la fórmula $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ o un derivado del mismo. En algunos ejemplos, "n" es 5000 o menos, tal como 1000 o menos, 500 o menos, 200 o menos, 100 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, tal como de 3 a 15, o de 10 a 15. Se entiende que el grupo polimérico de PEG puede ser de cualquier longitud conveniente y puede incluir una variedad de grupos terminales y/o grupos sustituyentes adicionales, incluyendo pero sin limitarse a, grupos alquilo, arilo, hidroxilo, amino, acilo, aciloxi y amido terminales y/o sustituyentes. Los grupos PEG que pueden adaptarse para su uso en los multicromóforos objeto incluyen aquellos PEG descritos por S. Zalipsky en "Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates", *Bioconjugate Chemistry* 1995, 6 (2), 150-165; y por Zhu *et al.* en "Water-Soluble Conjugated Polymers for Imaging, Diagnosis, and Therapy", *Chem. Rev.*, 2012, 112 (8), págs. 4687-4735.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente saturado de cadena lineal o ramificada derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano parental. Los grupos alquilo de interés incluyen, pero no se limitan a, metilo; etilo, propilos tales como propan-1-ilo o propan-2-ilo; y butilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metil-propan-1-ilo o 2-metil-propan-2-ilo. En algunos ejemplos, un grupo alquilo incluye de 1 a 20 átomos de carbono. En algunos ejemplos, un grupo alquilo incluye de 1 a 10 átomos de carbono. En ciertos ejemplos, un grupo alquilo inferior incluye de 1 a 6 átomos de carbono, tal como de 1 a 4 átomos de carbono. Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarbilo lineales y ramificados tales como metilo (CH₃-), etilo (CH₃CH₂-), n-propilo (CH₃CH₂CH₂-), isopropilo ((CH₃)₂CH-), n-butilo (CH₃CH₂CH₂CH₂-), isobutilo ((CH₃)₂CHCH₂-), sec-butilo ((CH₃)(CH₃CH₂)CH-), t-butilo ((CH₃)₃C-), n-pentilo (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-) y neopentilo ((CH₃)₃CCH₂-).

El término "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo como se define en el presente documento en donde uno o más átomos de carbono en la cadena de alquilo se han reemplazado opcionalmente con un heteroátomo tal como -O-, -N-, -S-, -S(O)_n (donde n es de 0 a 2), -NR- (donde R es hidrógeno o alquilo) y que tiene de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxi, tioheteroariloxi, tioheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo y -NR^aR^b, en donde R y R' pueden ser iguales o diferentes y se eligen entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, arilo, heteroarilo y heterocíclico.

"Alcoxi" se refiere al grupo -O-alquilo, en donde alquilo es como se define en el presente documento. Alcoxi incluye, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi y similares. El término "alcoxi" también se refiere a los grupos alqueno-O-, cicloalquilo-O-, cicloalqueno-O- y alquino-O-, donde alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno y alquino son como se definen en el presente documento.

El término "alcoxi sustituido" se refiere a los grupos alquilo sustituido-O-, alqueno sustituido-O-, cicloalquilo sustituido-O-, cicloalqueno sustituido-O- y alquino sustituido-O- donde alquilo sustituido, alqueno sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido y alquino sustituido son como se definen en el presente documento.

"Alquino" se refiere a grupos hidrocarbilo monovalentes lineales o ramificados que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y preferiblemente de 2 a 3 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de triple enlace. Los ejemplos de tales grupos alquino incluyen acetileno (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH).

El término "alquino sustituido" se refiere a un grupo alquino como se define en el presente documento que tiene de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxi, tioheteroariloxi, tioheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo.

"Amino" se refiere al grupo -NH₂. El término "amino sustituido" se refiere al grupo -NRR donde cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo siempre que al menos un R no sea hidrógeno.

"Arilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático. Los grupos arilo de interés incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de acenitrileno, acenafileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadieno, pireno, piranteno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno y similares. En ciertos ejemplos, un grupo arilo incluye de 6 a 20 átomos de carbono. En ciertos ejemplos, un grupo arilo incluye de 6 a 12 átomos de carbono. Ejemplos de un grupo arilo son fenilo y naftilo.

"Arilo sustituido", a menos que se limite de otro modo por la definición para el sustituyente arilo, se refiere a un grupo arilo sustituido con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, carboxialquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioheteroariloxi, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo y trihalometilo.

“Heteroarilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical heteroaromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de un sistema de anillo heteroaromático. Los grupos heteroarilo de interés incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de acridina, arsinol, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinnolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, triazol, benzotriazol, tiofeno, triazol, xanteno, benzodioxol y similares. En ciertos ejemplos, el grupo heteroarilo es heteroarilo de 5-20 miembros. En ciertos ejemplos, el grupo heteroarilo es heteroarilo de 5-10 miembros. En ciertos ejemplos, los grupos heteroarilo son aquellos derivados de tiofeno, pirrol, benzotiofeno, benzofurano, indol, piridina, quinolina, imidazol, oxazol y pirazina.

“Heterociclo”, “heterocíclico”, “heterocicloalquilo” y “heterociclilo” se refieren a un grupo saturado o insaturado que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados, incluyendo sistemas de anillos condensados con puente y espiro, y que tiene de 3 a 20 átomos de anillo, incluyendo de 1 a 10 heteroátomos. Estos átomos de anillo se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno, azufre u oxígeno, en donde, en sistemas de anillos condensados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, siempre que el punto de unión sea a través del anillo no aromático. En ciertos ejemplos, el/los átomo(s) de nitrógeno y/o azufre del grupo heterocíclico se oxida(n) opcionalmente para proporcionar los restos N-óxido, -S(O)- o -SO₂-.

Los ejemplos de heterociclos y heteroarilos incluyen, pero no se limitan a, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también denominado tiamorfolinilo), 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofuranilo y similares.

“Heteroarilo sustituido”, a menos que se limite de otro modo por la definición para el sustituyente, se refiere a un grupo heteroarilo sustituido con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, carboxialquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioheteroariloxi, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo y trihalometilo.

El término “alcarilo” o “aralquilo” se refiere a los grupos -alquileo-arilo y alquileo sustituido-arilo en donde alquileo, alquileo sustituido y arilo se definen en el presente documento.

“Alquileo” se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos divalentes que tienen preferiblemente de 1 a 6 y más preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono que son de cadena lineal o ramificada, y que están opcionalmente interrumpidos con uno o más grupos seleccionados de -O-, -NR¹⁰-, -NR¹⁰C(O)-, -C(O)NR¹⁰- y similares. Este término incluye, a modo de ejemplo, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-), n-propileno (-CH₂CH₂CH₂-), iso-propileno (-CH₂CH(CH₃)-), (-C(CH₃)₂CH₂CH₂-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)NH-), (-CH(CH₃)CH₂-), y similares. “Alquileo sustituido” se refiere a un grupo alquileo que tiene de 1 a 3 hidrógenos reemplazados con sustituyentes como se describe para carbonos en la definición de “sustituido” a continuación.

“Sustituido” se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados independientemente con el mismo o diferente(s) sustituyente(s). Los sustituyentes de interés incluyen, pero no se limitan a, alquilendioxo (tal como metilendioxo), -M, -R⁶⁰, -O-, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -S-, =S, -NR⁶⁰R⁶¹, =NR⁶⁰, -CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)₂O-, -S(O)₂OH, -S(O)₂R⁶⁰, -OS(O)₂O-, -OS(O)₂R⁶⁰, -P(O)(O⁻)₂, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(S)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O-, -C(S)OR⁶⁰, -NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(S)NR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(NR⁶³)NR⁶⁰R⁶¹ y -C(NR⁶²)NR⁶⁰R⁶¹ en donde M es halógeno; R⁶⁰, R⁶¹, R⁶² y R⁶³ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, u opcionalmente R⁶⁰ y R⁶¹ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido; y R⁶⁴ y R⁶⁵ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, u opcionalmente R⁶⁴ y R⁶⁵ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido. En ciertos ejemplos, los sustituyentes incluyen -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -S-, =S, -NR⁶⁰R⁶¹, =NR⁶⁰, -CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)₂R⁶⁰, -OS(O)₂O-, -OS(O)₂R⁶⁰, -P(O)(O⁻)₂, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(S)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O-, -NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹. En ciertos ejemplos, los sustituyentes incluyen -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -NR⁶⁰R⁶¹, -CF₃, -CN, -NO₂, -S(O)₂R⁶⁰, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -O(O)O-. En ciertos ejemplos, los sustituyentes incluyen -M, -R⁶⁰, =O, -OR⁶⁰, -SR⁶⁰, -NR⁶⁰R⁶¹, -CF₃, -CN, -NO₂, -S(O)₂R⁶⁰, -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)R⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)O-, donde R⁶⁰, R⁶¹ y R⁶² son como se han definido anteriormente. Por ejemplo, un grupo

sustituido puede llevar un sustituyente metilendioxi o uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre un átomo de halógeno, un grupo alquilo (C1-4) y un grupo alcoxi (C1-4). Cuando el grupo que está sustituyéndose es un grupo arilo o heteroarilo, el/los sustituyente(s) (por ejemplo, como se describe en el presente documento) puede(n) denominarse "sustituyente(s)" arilo".

5 "Sulfonilamino" se refiere al grupo $-NR^{21}SO_2R^{22}$, en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido y donde R^{21} y R^{22} se unen opcionalmente junto con los átomos unidos a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y en donde alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en el presente documento.

15 Se entiende que, en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, los polímeros a los que se llega definiendo sustituyentes con sustituyentes adicionales a sí mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como sustituyente que está sustituido por sí mismo con un grupo arilo sustituido, que está sustituido adicionalmente con un grupo arilo sustituido, etc.) no pretenden incluirse en el presente documento. En tales casos, el número máximo de tales sustituciones es tres. Por ejemplo, las sustituciones en serie de grupos arilo sustituidos contemplados específicamente en el presente documento se limitan a arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

20 A menos que se indique lo contrario, se llega a la nomenclatura de sustituyentes que no se definen explícitamente en el presente documento nombrando la porción terminal de la funcionalidad seguida por la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquiloalcarbonilo" se refiere al grupo (aril)-(alquil)-O-C(O)-.

25 En cuanto a cualquiera de los grupos divulgados en el presente documento que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que tales grupos no contienen ninguna sustitución o patrón de sustitución que sea estéricamente poco práctico y/o sintéticamente inviable. Además, los compuestos objeto incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.

Otras definiciones de términos pueden aparecer a lo largo de la memoria descriptiva.

Descripción detallada

30 Como se ha resumido anteriormente, se proporcionan multicromóforos de recolección de luz solubles en agua que tienen una pluralidad de grupos cromóforos colgantes. El multicromóforo de recolección de luz tiene una cadena principal polimérica que incluye unidades de repetición no conjugadas y una pluralidad de grupos cromóforos donadores colgantes, cada uno unido independientemente a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica. Un grupo cromóforo colgante puede ser un grupo BODIPY sustituido con uno o más grupos solubles en agua. También se proporcionan colorantes poliméricos en tándem basados en los multicromóforos objeto que incluyen además un fluoróforo aceptor unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica y configurado en proximidad receptora de energía a al menos un grupo cromóforo donador colgante del multicromóforo de recolección de luz. También se proporcionan miembros de unión específica marcados que incluyen los colorantes poliméricos en tándem objeto. También se proporcionan métodos para evaluar una muestra para determinar la presencia de un analito diana y métodos para marcar una molécula diana en los que los colorantes poliméricos en tándem objeto encuentran uso. También se proporcionan sistemas y kits para poner en práctica los métodos objeto.

45 Antes de describir la presente invención con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a los ejemplos particulares descritos, ya que, por supuesto, puede variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir ejemplos particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se abarcan dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

55 Ciertos intervalos se presentan en el presente documento con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que está cerca o es aproximadamente el número al que precede el término. Al determinar si un número está cerca o es aproximadamente un número enumerado específicamente, el número no citado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número enumerado específicamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también puede usarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

Se observa que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la mención de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

En la descripción adicional de la presente invención, los multicromóforos de recolección de luz y los colorantes poliméricos en tándem relacionados que incluyen un fluoróforo aceptor se describen en primer lugar con mayor detalle. A continuación, se describen miembros de unión específica marcados que incluyen los colorantes poliméricos en tándem objeto. A continuación, se revisan métodos de interés en los que los colorantes poliméricos en tándem objeto encuentran uso. También se describen sistemas y kits que pueden usarse en la práctica de métodos de la presente divulgación.

MULTICROMÓFOROS DE RECOLECCIÓN DE LUZ

Como se resumió anteriormente, la presente divulgación incluye un multicromóforo de recolección de luz que tiene un armazón modular al que se unen grupos cromóforos absorbentes de luz colgantes. El término "grupo colgante" se refiere a un grupo de cadena lateral que está conectado a la cadena principal del armazón modular pero que no es parte de la cadena principal. En contraste con los comonomeros absorbentes de luz de colorantes poliméricos conjugados, los grupos cromóforos absorbentes de luz colgantes de los multicromóforos objeto no están conjugados en π entre sí y no forman un sistema de electrones π deslocalizados. Más bien, el armazón modular de los multicromóforos objeto proporciona la configuración de una pluralidad de grupos cromóforos absorbentes de luz en un área compacta suficiente para una transferencia de energía eficaz entre los cromóforos (véase, por ejemplo, la figura 6A), y cuando está presente, a un fluoróforo aceptor (véase, por ejemplo, la figura 6B). Tomada conjuntamente, esta configuración de grupos cromóforos absorbentes de luz colgantes forma un multicromóforo de recolección de luz que tiene una longitud de onda de absorción (por ejemplo, como se describe en el presente documento) a la que los grupos cromóforos ópticamente activos absorben luz para formar un estado excitado. Como tal, los grupos cromóforos absorbentes de luz están configurados en proximidad receptora de energía entre sí y son capaces de donar energía a un fluoróforo aceptor cuando está presente.

Los términos "multicromóforo de recolección de luz" y "colorante polimérico" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de la presente divulgación que tiene una pluralidad de grupos cromóforos colgantes capaces de recolectar luz con una longitud de onda máxima de absorción particular y convertirla en luz emitida a una longitud de onda máxima de emisión más larga. El polímero puede tener una cadena principal que está saturada o parcialmente insaturada.

También pueden unirse al armazón modular grupos colgantes adicionales tales como fluoróforos aceptores, cromóforos donadores secundarios, enlazadores y etiquetas quimioselectivas capaces de conjugación de biomoléculas y grupos solubilizantes en agua. En algunos casos, puede instalarse un fluoróforo aceptor junto con dos tipos de cromóforos donadores (un cromóforo donador primario y uno secundario) para proporcionar una emisión fluorescente deseada del fluoróforo aceptor. El número y la colocación de los fluoróforos aceptores en relación con la configuración de los cromóforos donadores colgantes puede controlarse.

Una configuración particular de grupos colgantes puede determinarse y controlarse mediante la disposición de las unidades de repetición del armazón modular subyacente al que están unidos los grupos colgantes. Los multicromóforos objeto pueden incluir una pluralidad de grupos solubilizantes en agua unidos al armazón y/o los grupos colgantes en cualquier ubicación conveniente para proporcionar un multicromóforo de recolección de luz soluble en agua. El armazón modular puede estar compuesto de unidades de repetición que forman una cadena principal polimérica que tiene grupos de cadena lateral a los que pueden unirse los grupos colgantes. Las unidades de repetición pueden disponerse en una variedad de configuraciones para proporcionar un multicromóforo de recolección de luz soluble en agua que tenga propiedades espectroscópicas deseables. Las distancias y la disposición entre los sitios para la unión covalente de los cromóforos donadores colgantes y el fluoróforo aceptor (cuando está presente) pueden controlarse para proporcionar procedimientos de transferencia de energía deseables. Esto puede conducir a propiedades deseables de elevada recolección de luz y amplificación de señal.

Como se representa en la figura 6A, la configuración de los grupos cromóforos donadores colgantes puede presentar, tras la excitación con luz incidente, autoextinción de la fluorescencia en relación con un grupo cromóforo donador aislado no extinguido. Por autoextinción se entiende que el 10 % o más, tal como el 20 % o más, el 25 % o más, el 30 % o más, el 40 % o más, o el 50 % o más de la fluorescencia en relación con los grupos cromóforos donadores aislados no extinguidos.

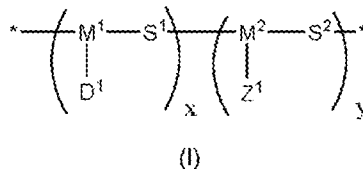
El armazón modular puede estar compuesto por una cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas que tienen cualquier configuración conveniente, tal como una configuración lineal, ramificada o de dendrímico. La cadena principal polimérica puede ser un polímero lineal. La cadena principal polimérica puede estar ramificada. En algunos casos, el multicromóforo de recolección de luz incluye una pluralidad de grupos cromóforos donadores colgantes, cada uno unido independientemente a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica. La configuración de los grupos colgantes puede instalarse durante o después de la síntesis de la cadena principal polimérica. La incorporación de grupos colgantes puede conseguirse con una configuración aleatoria, una configuración de bloque, o de una manera específica de secuencia mediante síntesis por etapas, dependiendo del método particular de síntesis utilizado.

5 El término "unidad" se refiere a una subunidad estructural de un polímero. El término unidad pretende incluir monómeros, comonómeros, bloques conjuntos, unidades de repetición, y similares. Una "unidad que se repite" o "unidad de repetición" es una subunidad de un polímero que se define por el número mínimo de características estructurales distintas que se requieren para que la unidad se considere monomérica, de manera que cuando la unidad se repite n veces, la estructura resultante describe el polímero o un bloque del mismo. En algunos casos, el polímero puede incluir dos o más unidades de repetición diferentes, por ejemplo, cuando el polímero es un polímero multibloque, una disposición aleatoria de unidades o una secuencia definida, cada bloque puede definir una unidad de repetición distinta. Se entiende que son posibles una variedad de disposiciones de unidades o bloques de repetición y que, en la fórmula representada de los multicromóforos objeto descritos en el presente documento, puede incluirse cualquier disposición lineal conveniente de diversas longitudes dentro de la estructura del polímero global. Se entiende que el polímero también puede representarse por una fórmula en cuanto a valores de % en moles de cada unidad en el polímero y que tal fórmula puede representar una variedad de disposiciones de unidad de repetición, tal como polímero aleatorio o multibloque o una secuencia definida de residuos. En algunos casos, una unidad de repetición del polímero incluye un único grupo monómero. En ciertos casos, una unidad de repetición del polímero incluye dos o más grupos de monómero, es decir, grupos de comonómero, tales como dos, tres, cuatro o más grupos de comonómero. El término "comonómero" o "grupo de comonómero" se refiere a una unidad estructural de un polímero que puede ser parte por sí mismo de una unidad de repetición del polímero.

El multicromóforo de recolección de luz incluye un armazón modular que tiene una cadena principal polimérica lineal de unidades de repetición no conjugadas. El armazón modular puede tener una cadena principal polimérica que incluye una configuración aleatoria de unidades de repetición no conjugadas. El armazón modular puede tener una cadena principal polimérica que incluye una configuración de bloque o bloque conjunto de unidades de repetición no conjugadas. Alternativamente, el armazón modular puede tener una cadena principal polimérica que incluye una secuencia definida particular de unidades de repetición no conjugadas, por ejemplo, residuos de aminoácidos de una secuencia polipeptídica. Estas configuraciones pueden caracterizarse por segmentos poliméricos de unidades de repetición (por ejemplo, como se describe en el presente documento), segmentos que pueden repetirse a su vez a lo largo del armazón modular.

Por "no conjugado" quiere decirse que al menos una parte de la unidad de repetición incluye un grupo de cadena principal saturado (por ejemplo, un grupo que tiene dos o más enlaces covalentes sencillos consecutivos) que impide la conjugación pi o una estructura electrónica deslocalizada extendida a lo largo de la cadena principal polimérica de una unidad de repetición a la siguiente. Se entiende que, aunque una unidad de repetición puede no estar conjugada con una unidad de repetición adyacente, tal unidad de repetición puede incluir uno o más grupos insaturados aislados que incluyen un enlace insaturado (por ejemplo, de un grupo alqueniilo o un grupo alquiniilo) y/o un grupo arilo o heteroarilo, grupos que pueden ser una parte de la cadena principal. En algunos casos, cada unidad de repetición de la cadena principal polimérica incluye una cadena lateral que incluye un grupo colgante unido o una etiqueta quimiosselectiva para unirse a un grupo colgante.

En algunos casos, el multicromóforo incluye un segmento de fórmula (I):



en donde:

cada M^1 y M^2 es independientemente un comonómero insaturado;

cada S^1 y S^2 es independientemente una unidad espaciadora no conjugada;

50 cada D^1 es independientemente un cromóforo absorbente de luz colgante (por ejemplo, como se describe en el presente documento) unido a M^1 ;

cada Z^1 es independientemente una etiqueta quimiosselectiva unida a M^2 ;

x es el 75 % en moles o más; y

y es el 25 % en moles o menos, donde * es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo.

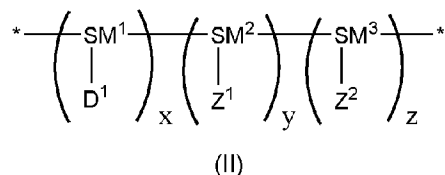
5 En algunos casos de fórmula (I), M¹ y S¹ forman una primera unidad de repetición (M¹-S¹) y M² y S² forman una segunda unidad de repetición (M²-S²) de la cadena principal polimérica. Las unidades de repetición primera y segunda pueden estar dispuestas en una configuración aleatoria o de bloques conjuntos. En las primeras unidades de repetición, D¹ puede estar unido a M¹ a través de la conjugación de una primera etiqueta quimioselectiva a un precursor D¹. En las segundas unidades de repetición, los grupos Z¹ pueden conjugarse adicionalmente a una molécula de interés a través de una segunda etiqueta quimioselectiva (Z²) para instalar un grupo colgante, tal como un segundo cromóforo absorbente de luz, un fluoróforo aceptor o una biomolécula unida (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos de fórmula (I), los grupos colgantes D¹ de las primeras unidades de repetición incluyen dos o más (por ejemplo, dos o tres) tipos distintos de cromóforos de recolección de luz colgantes que juntos proporcionan un sistema de multicromóforo de recolección de luz. En ciertos casos de fórmula (I), los grupos colgantes D¹ de las primeras unidades de repetición son todos los mismos.

15 En algunos casos de fórmula (I), x es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (I), y es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos.

20 Puede utilizarse cualquier comonomero insaturado conveniente como grupos M¹ y M² en los multicromóforos objeto, por ejemplo, de fórmula (I). Por comonomero insaturado quiere decirse un comonomero que tiene al menos un enlace covalente insaturado en la cadena principal polimérica. Los comonomeros insaturados de interés incluyen, pero no se limitan a, comonomeros de arilo o heteroarilo, comonomeros de alquiniilo (por ejemplo, etinileno) o segmentos y comonomeros de alqueniilo (por ejemplo, vinileno) o segmentos. Los comonomeros de arilo o heteroarilo de interés que encuentran uso en los multicromóforos (por ejemplo, de fórmula (I)) incluyen, pero no se limitan a, comonomeros de fenilo, comonomeros de bifenilo, comonomeros de benzooxazol, comonomeros de benzotiazol, comonomeros de poli-fenileno y comonomeros tricíclicos condensados, tales como comonomeros de fluoreno, comonomeros de carbazol, comonomeros de silol y comonomeros de bifenilo con puente. Los comonomeros de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente, por ejemplo, como se describe en el presente documento. En algunos casos de fórmula (I), cada M¹ y M² incluye independientemente uno o más grupos seleccionados de fluoreno, carbazol, silol, bifenileno y fenileno.

35 El multicromóforo de recolección de luz de fórmula (I) incluye una cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas en donde cada S¹ y S² es independientemente una unidad espaciadora saturada que impide la conjugación pi entre comonomeros M¹ y/o M² adyacentes. En algunos casos, S¹ y S² se seleccionan independientemente de un polietilenglicol (PEG) divalente y un grupo PEG modificado divalente. Por divalente quiere decirse un enlazador de PEG o PEG modificado que conecta dos comonomeros adyacentes. En ciertos casos, el PEG o PEG modificado incluye de 3 a 100 unidades de polietilenglicol, tal como de 6 a 100 unidades (por ejemplo, PEG₆ a PEG₁₀₀).

En algunos casos, el multicromóforo incluye un segmento de fórmula (II):



40 en donde:

la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonomeros SM¹, SM² y SM³ que son cada uno independientemente un comonomero no conjugado;

cada D¹ es independientemente un cromóforo absorbente de luz colgante unido a SM¹;

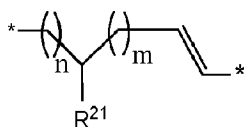
cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva unida a SM²;

45 cada Z² es un grupo de cadena lateral opcional unido a SM³;

x es el 50 % en moles o más; y

y+z es el 50 % en moles o menos, donde * es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo.

- comonómeros pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con una etiqueta quimioselectiva. Los comonómeros pueden polimerizarse o unirse usando cualquier química conveniente, incluyendo pero sin limitación, polimerización de alqueno, polimerización de apertura de anillo, polimerización de radicales y química click o conjugaciones entre etiquetas o grupos funcionales quimioselectivos compatibles. Los monómeros ADMET de interés incluyen, pero no se limitan a, los descritos por Mutlu *et al.* ("Acyclic diene metathesis: a versatile tool for the construction of defined polymer architectures", Chem. Soc. Rev., 2011,40, 1404-1445). En algunos casos, SM¹, SM² y/o SM³ tienen la fórmula siguiente:



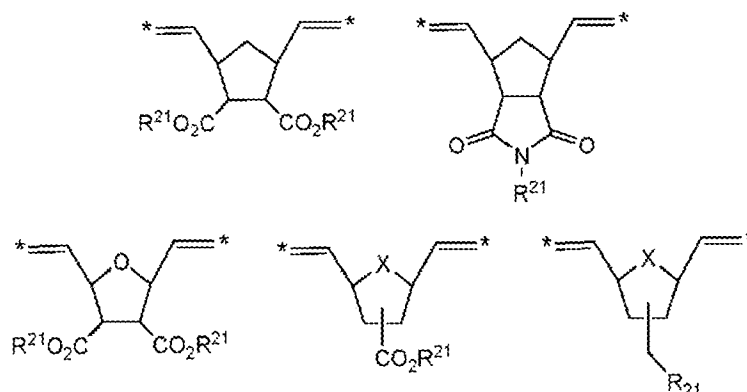
en donde:

- 10 R²¹ es -L¹-D¹ o -L²-Z¹, donde D¹ es un cromóforo donador colgante, Z¹ es una etiqueta quimioselectiva y L¹ y L² son enlazadores opcionales;

n y m son independientemente un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1 o 2); y

* es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo.

- 15 Los monómeros ROMP de interés incluyen, pero no se limitan a, los descritos por Song *et al.* ("Scope of the Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP) Reaction of 1-Substituted Cyclobutenes", J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (30), págs. 10513-10520.). En algunos casos, SM¹, SM² y/o SM³ tienen una de las fórmulas siguientes:



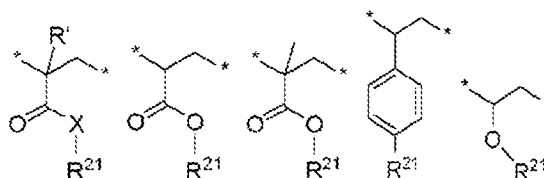
en donde:

- 20 R²¹ es -L¹-D¹ o -L²-Z¹, donde D¹ es un cromóforo donador colgante, Z¹ es una etiqueta quimioselectiva y L¹ y L² son enlazadores opcionales;

X es CH₂ u O; y

* es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo.

En algunos casos, SM¹, SM² y/o SM³ incluyen una de las fórmulas siguientes:



- 25

en donde:

R²¹ es -L¹-D¹ o -L²-Z¹;

D¹ es un cromóforo donador colgante;

Z¹ es una etiqueta quimioselectiva;

- 30 L¹ y L² son enlazadores opcionales;

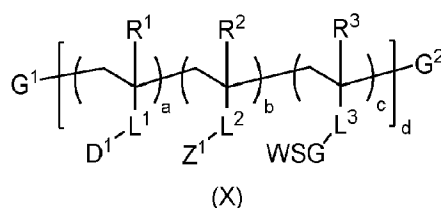
X es O NR^{''};

R' es H o alquilo inferior (por ejemplo, metilo);

R^{''} es H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido y WSG; y

5 * es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo. En algunos casos, la cadena principal polimérica incluye una mezcla de comonómeros derivados de poliestireno y acrilato o acrilamida (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

10 El multicromóforo puede tener una cadena principal hidrocarbonada preparada usando cualquier procedimiento de polimerización conveniente. En algunos casos, la cadena principal hidrocarbonada se deriva de comonómeros de acrilato, acrilamida o estireno, o un derivado de los mismos. En algunos casos, el multicromóforo se describe por la fórmula (X):



en donde:

cada D¹ es independientemente un cromóforo donador colgante;

cada Z¹ es una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

15 cada L¹, L² y L³ es independientemente un enlazador;

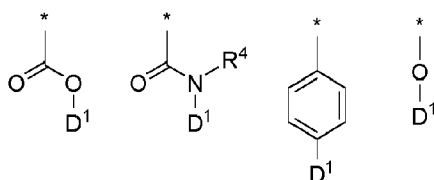
a, b y c son valores de % en moles para cada comonómero;

d representa la polimerización total o la longitud media del polímero (por ejemplo, d es 2-1000, tal como 2-500, 2-200, 2-100 o 2-50);

WSG es un grupo solubilizante en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento); y

20 G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de grupo terminal, segmento de polímero, grupo cromóforo donador, fluoróforo aceptor, enlazador y un miembro de unión específica unido. En algunos casos de fórmula (X), c = 0. En algunos casos de fórmula (X), a > 0 y b > 0. En algunos casos de fórmula (X), a es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (X), b es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos. En algunos casos de fórmula (X), a es el 65-95 % en moles, b es el 5-35 % en moles y c es el 0-30 % en moles, donde a+b+c=100 %. En ciertos casos de fórmula (X), L¹-L³ incluye una unión a la cadena principal del polímero seleccionado de: -COO-, -CONR^{''}-, -Ph-, -O-, donde R^{''} es H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido o WSG. Tales uniones pueden utilizarse para conectar D¹, Z¹ y WSG a la cadena principal del polímero.

En ciertos casos de fórmula (X), L¹-D¹ se describe por uno de los siguientes:

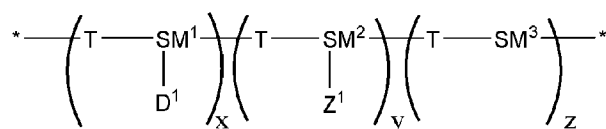


35 en donde R⁴ es H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido o WSG. En ciertos casos de fórmula (X), el WSG es un grupo solubilizante en agua como se describe en uno cualquiera de los ejemplos y estructuras de tales grupos descritos en el presente documento.

40 El multicromóforo puede tener una cadena principal derivada de comonómeros conectados a través de uniones o grupos que se derivan de reacciones de conjugación de química click (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Cualquier grupo de comonómero divalente conveniente puede derivatizarse con etiquetas quimioselectivas terminales y polimerizarse mediante conjugación de etiqueta quimioselectiva compatible. Las figuras

7A y 7B ilustran esquemas a modo de ejemplo para la polimerización de comonómeros que tienen etiquetas quimioselectivas de alquino y azida mediante química click. En algunos casos, los comonómeros incluyen uno o más grupos óxido de etileno o etilenamino que forman parte de la cadena principal del polímero. Tales grupos pueden proporcionar una solubilidad en agua deseable del colorante polimérico resultante. El comonómero puede incluir además una unidad trivalente para unirse a un grupo de cadena lateral tal como un colorante donador o aceptor o un WSG. En algunos casos, el comonómero incluye un grupo óxido de propileno o propilenamino en la cadena principal que está sustituido adicionalmente en la posición 2 con un grupo o sustituyente de cadena lateral. Este grupo puede incluir una etiqueta quimioselectiva unida, un colorante donador o aceptor unido o un WSG unido.

En algunos casos de fórmula (II), el multicromóforo es de fórmula (XXI):



(XXI)

en donde:

la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonómeros SM¹, SM² y SM³ que están unidos cada uno a través de un grupo T que es el producto de una reacción de conjugación de química click o de grupos quimioselectivos (por ejemplo, una química click de azida-alquino);

SM³ comprende opcionalmente un WSG unido;

cada D¹ es independientemente un cromóforo absorbente de luz colgante unido a SM¹;

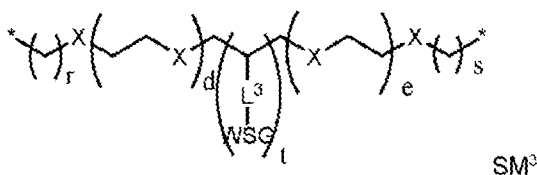
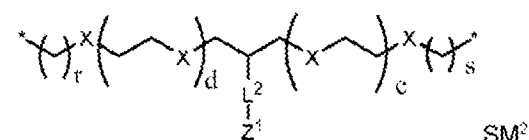
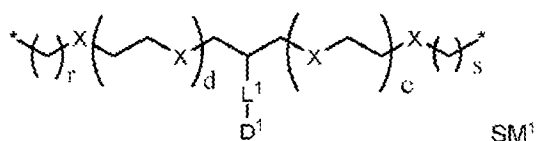
cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva unida a SM²;

cada Z² es un grupo de cadena lateral opcional unido a SM³;

x es el 50 % en moles o más; y

y+z es el 50 % en moles o menos, donde * es una conexión a la cadena principal polimérica del multicromóforo o un grupo terminal, por ejemplo, como se describe en el presente documento. En ciertos casos de fórmula (XXI), SM¹, SM² y SM³ comprenden unidades de repetición seleccionadas de óxido de etileno, etilenamino, óxido de propileno 2-sustituido y propilenamino 2-sustituido. En algunos casos de fórmula (II), cada T es 1,2,3-triazol 1,4-sustituido, es decir, el producto de la reacción de conjugación de química click de azida-alquino.

En algunos casos de fórmula (XXII), SM¹, SM² y SM³ tienen las estructuras siguientes:



en donde:

cada X es independientemente O o NR³¹ en donde R³¹ es H, alquilo, alquilo sustituido, alcanoílo o alcanoílo sustituido;

cada r y s es independientemente 1-6 (por ejemplo, 1, 2 o 3);

cada d y e es independientemente 1-12 (por ejemplo, 1-6, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6);

t es 0 o 1;

D¹ es un cromóforo donador colgante;

Z¹ es una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

5 WSG es un grupo solubilizante en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

cada L¹, L² y L³ es independientemente un enlazador; y

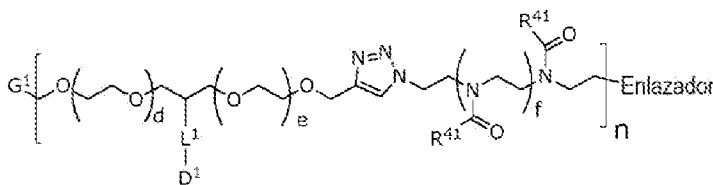
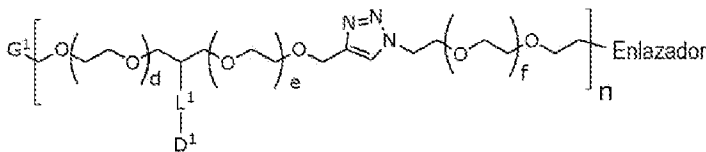
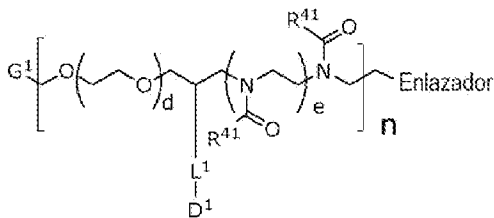
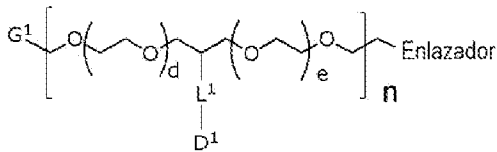
* es una conexión a un 1,2,3-triazol 1,4-sustituido (T).

Se entiende que, para cualquiera de los comonómeros de los que se derivan las estructuras de SM¹-SM³ descritas anteriormente, puede utilizarse un grupo azida o alquino en el terminal del comonómero para la unión durante la
 10 polimerización. Como tal, el 1,2,3-triazol 1,4-sustituido (T) puede estar presente en una de las dos posibles orientaciones como sigue:



Los terminales de la cadena principal polimérica pueden incluir cualquier grupo terminal conveniente, tal como un grupo azida o alquino, enlazador o resto de unión específica unido.

15 Se muestran estructuras de multicromóforos a modo de ejemplo y precursores de las mismas en el ejemplo 3 de la sección experimental y en las siguientes estructuras:



en donde:

G¹ es un grupo terminal (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

20 L¹ y L² son independientemente un enlazador;

D¹ es un cromóforo colgante (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

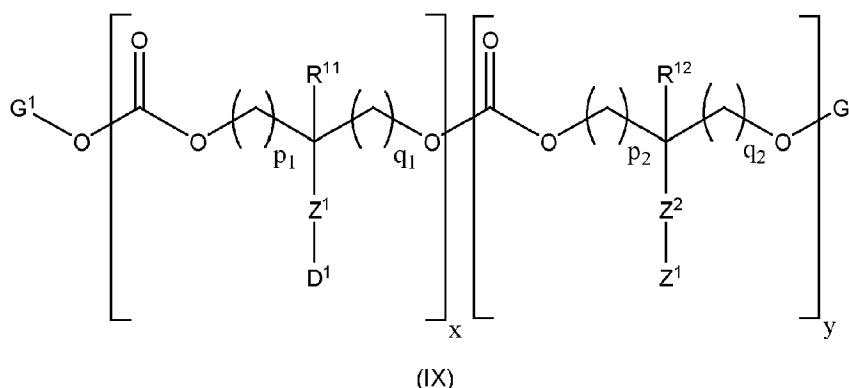
cada d, e y f es independientemente 1-6;

n es 1-1000 (por ejemplo, 2-1000, 2-500, 2-100 o 2-50);

cada R⁴¹ se selecciona de alquilo, alquilo sustituido y WSG; y

“Enlazador” es un enlazador que incluye un grupo funcional quimioselectivo opcional, por ejemplo, para la conjugación con un comonomero o una biomolécula. En algunos casos de fórmula (XXI), L¹-L³ comprenden una unión a la cadena principal del polímero seleccionado de -NHCO-alquilo.

- 5 Los monómeros de carbonato cíclico y carbonato protegido de interés que pueden adaptarse para su uso en la preparación de cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto (véase, por ejemplo, la fórmula (IX) como se describe en el presente documento) incluyen, pero no se limitan a, los descritos por Barnes *et al.* en el documento WO2013036532, Cooley *et al.* (J. Am. Chem. 131, 45, 1640-3, 2009) y Rothbard *et al.* en la patente estadounidense 7.169.814. Tales monómeros se utilizan en una reacción de polimerización usando un iniciador y una razón de alimentación adecuada de monómeros de carbonato cíclico para proporcionar una cadena principal polimérica. Como alternativa, los monómeros de carbonato protegidos pueden ensamblarse en una síntesis por etapas para proporcionar una secuencia definida. En algunos casos de fórmulas (II)-(III), la cadena principal polimérica tiene una cadena principal de policarbonato. Como tal, el multicromóforo puede tener la fórmula (IX):



- 15 en donde:

cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva;

cada L¹ y L² es independientemente un enlazador;

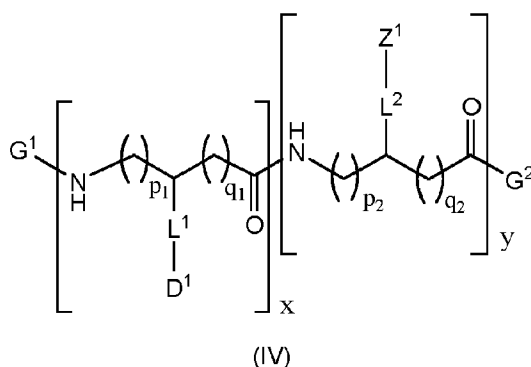
x es el 75 % en moles o más;

- 20 y es el 25 % en moles o menos; y

G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

- 25 En ciertos ejemplos, las unidades de repetición (SM¹, SM² y/o SM³) de fórmulas (II)-(III) están dispuestas en una secuencia lineal definida. Cualquier comonomero conveniente que pueda polimerizarse de una manera por etapas definida puede utilizarse en la construcción de un multicromóforo de fórmulas (II)-(III). Los comonomeros pueden derivarse de aminoácidos, monómeros peptoides o un monómero de carbonato protegido o cíclico.

- 30 En algunos casos de fórmulas (II)-(III), la cadena principal polimérica es un polipéptido que tiene una secuencia definida de residuos de α-aminoácidos y/o residuos de β-aminoácidos. Dos tipos de β-aminoácidos y polipéptidos pueden encontrar uso en las cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto: aquellos con el grupo de cadena lateral próximo a la amina se denominan β3-péptidos/residuos y aquellos con el grupo de cadena lateral próximo al grupo carbonilo se denominan β2-péptidos/residuos. En ciertos ejemplos, el multicromóforo es de fórmula (IV):



en donde:

cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo absorbente de luz colgante;

cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimiosselectiva;

5 cada L¹ y L² son independientemente un enlazador;

p₁ y q₁ son independientemente 0 o 1, en donde p₁ + q₁ ≤ 1;

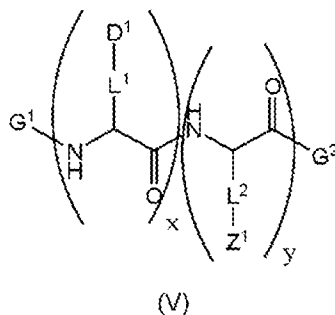
p₂ y q₂ son independientemente 0 o 1, en donde p₁ + q₁ ≤ 1;

x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

10 G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo absorbente de luz (por ejemplo, donador), un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

En algunos ejemplos de fórmula (IV), p₁ y p₂ son cada uno 0 y q₁ y q₂ son cada uno 1 (por ejemplo, residuos de β3-aminoácidos). En algunos ejemplos de fórmula (IV), p₁ y p₂ son cada uno 1 y q₁ y q₂ son cada uno 0 (por ejemplo, residuos de β2-aminoácidos). En algunos casos, p₁, p₂, q₁ y q₂ son cada uno 0 y el multicromóforo es de fórmula (V):



en donde:

cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimiosselectiva;

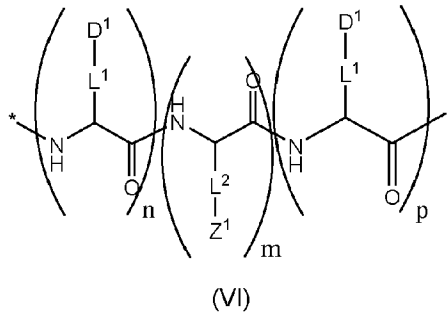
20 L¹ y L² son cada uno independientemente un enlazador;

x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

25 G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo absorbente de luz (por ejemplo, donador), un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido. Se entiende que los multicromóforos descritos por la fórmula (V) incluyen cualquier disposición conveniente de comonómeros en una secuencia lineal definida, que tienen en total las proporciones en % en moles definidas de x e y. En algunos casos, los comonómeros que contienen Z¹ están separados a lo largo de la secuencia de la cadena principal polimérica y como tales están siempre flanqueados en ambos lados por uno o más comonómeros que contienen D¹.

En ciertos casos de fórmula (V), el multicromóforo incluye un segmento de fórmula (VI):



en donde:

cada D^1 es independientemente un grupo cromóforo absorbente de luz colgante;

5 cada Z^1 es independientemente una etiqueta quimiosselectiva;

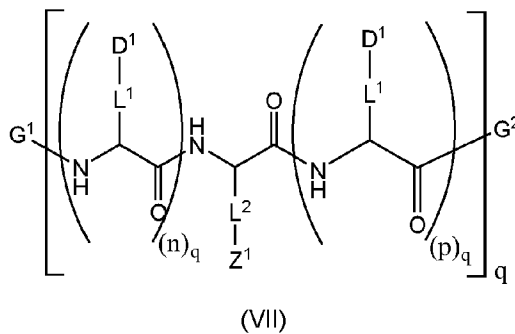
cada L^1 y L^2 son independientemente un enlazador;

n y p son cada uno independientemente un número entero de 1 a 20 en donde $n+p \geq 2$; y

m es 1 o 2.

10 En algunos casos de fórmula (VI), n y p son cada uno independientemente de 1 a 10, tal como de 2 a 20, de 3 a 10 o de 3 a 6. En algunos casos de fórmula (VI), $n+p$ es un número entero de 2 a 20, tal como de 3 a 20, de 4 a 20, de 5 a 20, de 5 a 15 o de 5 a 12. En ciertos ejemplos de fórmula (VI), m es 1.

15 El multicromóforo objeto puede incluir múltiples segmentos de fórmula (VI) donde cada segmento incluye un comonómero que contiene Z^1 aislado flanqueado por bloques de comonómeros que contienen D^1 . En algunos casos, el multicromóforo incluye dos o más segmentos de fórmula (VI) ubicados dirigidos adyacentes entre sí para proporcionar dos comonómeros que contienen Z^1 aislados separados por un bloque de 2-20 comonómeros que contienen D^1 , tales como un bloque de 3 a 20, de 4 a 20, de 5 a 20, de 5 a 15 o de 5 a 12 comonómeros que contienen D^1 . Como tal, en ciertos ejemplos, el multicromóforo incluye q segmentos de un copolímero de bloques y es de fórmula (VII):



20 en donde: cada $(n)_q$ y cada $(p)_q$ es independientemente un número entero de 1 a 20, en donde para cada uno de los q segmentos $(n)_q + (p)_q \geq 3$; y q es un número entero de 1 a 100.

25 Se entiende que un residuo de α -aminoácido de fórmulas (V)-(VII) podría reemplazarse con un residuo de β 2-aminoácido o residuo de β 3-aminoácido para proporcionar un producto polipeptídico correspondiente. En las fórmulas (V)-(VII), D^1 puede unirse al enlazador de cadena lateral de aminoácidos L^1 mediante conjugación de una primera etiqueta quimiosselectiva a un precursor D^1 . En las fórmulas (V)-(VII), los grupos Z^1 pueden conjugarse adicionalmente con una molécula de interés a través de una segunda etiqueta quimiosselectiva (Z^2) para instalar un grupo colgante, tal como un segundo cromóforo de recolección de luz, un fluoróforo aceptor o una biomolécula unida (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

30 Cualquier aminoácido conveniente puede adaptarse para su uso para proporcionar una cadena principal polimérica a la que pueden unirse covalentemente grupos colgantes. Los aminoácidos pueden ser de origen natural o no natural. Por ejemplo, aminoácidos tales como lisina, ornitina tienen grupos amino de cadena lateral adecuados para la conjugación con un grupo reactivo con amino tal como un ácido carboxílico activado. La cisteína incluye un grupo tiol de cadena lateral adecuado para la conjugación con un grupo reactivo con tiol tal como una maleimida o un haloacetilo. El aspartato y el glutamato tienen grupos ácido carboxílico de cadena lateral que pueden conjugarse con un grupo

ES 2 988 965 T3

En algunos ejemplos, la cadena principal polimérica del multicromóforo tiene, o se deriva de, uno o más de los siguientes segmentos de secuencia polipeptídica:

- 5
KCKK (SEQ ID NO: 1)
KKCK (SEQ ID NO: 2)
KKYKK (SEQ ID NO: 3)
KKKYKK (SEQ ID NO: 4)
KKYKKK (SEQ ID NO: 5)
KKKYKKK (SEQ ID NO: 6)
KKKYKKKK (SEQ ID NO: 7)
10
KKKKYKKK (SEQ ID NO: 8)
KKKKCKKKKK (SEQ ID NO: 9)
KKKKCKKKKK (SEQ ID NO: 10)
KKKKCKKKKKK (SEQ ID NO: 11)
KKKKCKKKKKKK (SEQ ID NO: 12)
15
KKKKCKKKKKKKK (SEQ ID NO: 13)
KKKKCKKKKKKKKK (SEQ ID NO: 14)
KKKKCKKKKKKKKKK (SEQ ID NO: 15)
C(K)_nC (SEQ ID NO: 16)
KC(K)_nCK (SEQ ID NO: 17)
20
KKC(K)_nCKK (SEQ ID NO: 18)
KKKC(K)_nCKKK (SEQ ID NO: 19)
KKKCC(K)_nCKKKKKK (SEQ ID NO: 20)
KKKKCC(K)_nCKKKKKK (SEQ ID NO: 21)

25
en donde: cada K es un residuo de lisina, un residuo de lisina protegido, o un residuo de lisina unido covalentemente a través del grupo amino de cadena lateral a un grupo cromóforo donador colgante; n es un número entero de 2 a 20 (tal como de 2 a 10, de 3 a 10, de 4 a 10 o de 5 a 10, por ejemplo, n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10); y C es un residuo de cisteína o un residuo de cisteína protegido.

En algunos ejemplos, la cadena principal polimérica del multicromóforo tiene, o se deriva de, uno o más de los siguientes segmentos de secuencia polipeptídica:

- 30
OCCO (SEQ ID NO: 22)
OOCO (SEQ ID NO: 23)
OCCOO (SEQ ID NO: 24)
OOCOO (SEQ ID NO: 25)
OOCOOO (SEQ ID NO: 26)
35
OOCOOOO (SEQ ID NO: 27)
OOCOOOOO (SEQ ID NO: 28)
OOCOOOOO (SEQ ID NO: 29)
OOCOOOOO (SEQ ID NO: 30)
OOCOOOOOO (SEQ ID NO: 31)

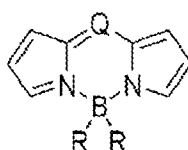
el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos.

Grupos cromóforos colgantes

5 Cualquier grupo cromóforo absorbente de luz conveniente puede adaptarse para su uso en los multicromóforos objeto. Los términos "grupo cromóforo absorbente de luz" y "grupo cromóforo donador" se usan indistintamente y se refieren a un grupo colgante del multicromóforo capaz de absorber luz a una longitud de onda máxima de absorción particular y transferir energía a un cromóforo o fluoróforo aceptor próximo o convertirla en luz emitida a una longitud de onda máxima de emisión más larga.

Grupos cromóforos BODIPY

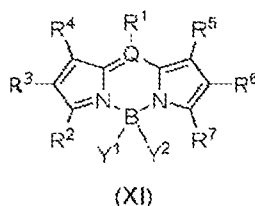
10 Un grupo cromóforo colgante puede ser un grupo BODIPY. En algunos casos de fórmulas (I)-(IX), cada D¹ es independientemente un grupo BODIPY. En algunos casos, el grupo BODIPY es un grupo cromóforo donador colgante. El término "grupo BODIPY" se refiere a un grupo colgante del multicromóforo que incluye un cromóforo que tiene la siguiente estructura central de boro-dipirrometeno (BODIPY):



15 donde Q es C o N y cada R es cualquier sustituyente boro conveniente. En algunos casos, Q es C. En algunos casos, cada R se selecciona independientemente de F, OH, H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquinilo y alquinilo sustituido.

20 La estructura central de BODIPY puede estar unida a una unidad de repetición del multicromóforo a través de cualquier posición conveniente de la estructura central, a través de un enlazador de cadena lateral opcional. La estructura central de BODIPY puede estar opcionalmente sustituida adicionalmente. En ciertos ejemplos, el grupo BODIPY define un grupo de cadena lateral de un comonomero que es parte de una unidad de repetición. Cualquier estructura que contenga BODIPY conveniente puede adaptarse para su uso en los multicromóforos objeto como grupo BODIPY. Las estructuras que contienen BODIPY de interés incluyen, pero no se limitan a, los colorantes y derivados de BODIPY descritos por Loudet y Burgess en "BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties", Chem. 2007, 107 (11): 4891-4932, Suzuki *et al.* en la patente estadounidense n.º 8.193.350, Ulrich *et al.* en la patente estadounidense n.º 8.476.461 y Ulrich *et al.* en la patente estadounidense n.º 7.897.786.

25 Un grupo cromóforo colgante BODIPY puede describirse mediante la fórmula (XI):



en donde:

Q es C o N;

30 R¹-R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, grupo solubilizante en agua (WSG) y -L¹-Z¹, o

35 opcionalmente uno o más pares de sustituyentes seleccionados de R⁶ y R⁷, R² y R³, R⁵ y R⁶, R³ y R⁴, R⁴ y R¹ y R⁵ y R¹ forman juntos un radical divalente y están unidos cíclicamente y junto con los átomos de carbono a los que están unidos proporcionan un anillo heterociclo, carbociclo, arilo o heteroarilo condensado de 5 o 6 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 o 6 miembros que comprende átomos de carbono y 0-3 heteroátomos seleccionados de O, S y N), anillo que puede estar sin sustituir o sustituido adicionalmente con un sustituyente seleccionado independientemente de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, grupo solubilizante en agua (WSG) y -L¹-Z¹;

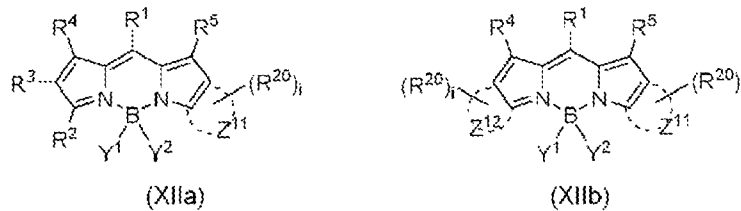
40 L¹ es un enlazador;

Z¹ es una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica; y

Y¹ e Y² se seleccionan independientemente de F, OH, H, ciano, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido y WSG;

5 en donde uno de Y¹, Y² y R¹-R⁷ está unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica. En la fórmula (XI), se entiende que los sustituyentes Y¹, Y² y R¹-R⁷ pueden seleccionarse de grupos que no inhiben la fluorescencia del grupo BODIPY. En ciertos casos de fórmula (XI), Q es C. Se entiende que para cualquiera de las fórmulas de grupos BODIPY descritas en el presente documento, puede incluirse una fórmula correspondiente en donde el átomo representado por Q en la fórmula (XI) es un átomo de nitrógeno. En ciertos ejemplos de fórmula (XI), uno o más de Y¹, Y² y R¹-R⁷ incluye un WSG. En ciertos casos de fórmula (XI), Y¹ e Y² incluye cada uno un WSG. En ciertos casos de fórmula (XI), el enlazador de -L¹-Z¹ incluye un WSG.

15 En la fórmula (XI), los pares sustituyentes R⁶ y R⁷ y/o R² y R³ puede unirse cíclicamente para proporcionar un anillo condensado de 5 o 6 miembros, anillo que no está sustituido o está sustituido. En algunos casos de fórmula (XI), el anillo condensado de 5 o 6 miembros es un anillo arilo o heteroarilo seleccionado de furano, tiofeno, pirrol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, imidazol y pirazol. En algunos casos de fórmula (XI), el grupo BODIPY es de fórmula (XIIa) o (XIIb):



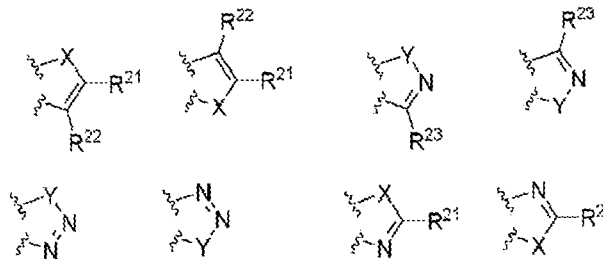
en donde:

20 Z¹¹ y Z¹² son independientemente el anillo heterociclo, carbociclo, arilo o heteroarilo condensado de 5 o 6 miembros;

cada "i" es independientemente 0-3; y

cada R²⁰ es independientemente un grupo sustituyente como se define para R²-R⁷ en la fórmula (X).

25 En ciertos ejemplos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), Z¹¹ y Z¹² son independientemente un anillo arilo o heteroarilo condensado de 5 o 6 miembros. En algunos casos, Z¹¹ y Z¹² se seleccionan independientemente entre furano, tiofeno, pirrol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, imidazol y pirazol. En algunos casos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), Z¹¹ y/o Z¹² son furano o tiofeno. En ciertos casos de fórmula (XIIa), ninguno de R¹-R⁵ está cíclicamente unido. En algunos casos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), Z¹¹ y Z¹² se seleccionan independientemente entre los anillos siguientes:

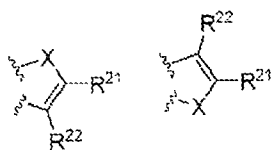


30 en donde:

X es O o S;

Y es O, S o NR, en donde R es H, alquilo, alquilo sustituido o un sustituyente como se define para R²⁰ en las fórmulas (XIIa)-(XIIb); y

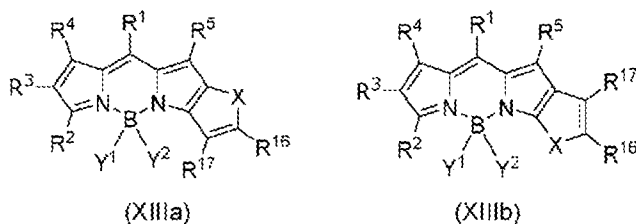
35 R²¹-R²³ se seleccionan independientemente de H y un sustituyente como se define para R²⁰ en las fórmulas (XIIa)-(XIIb). En ciertos casos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), Z¹¹ y Z¹² se seleccionan independientemente entre los anillos siguientes:



como se ha definido anteriormente.

En ciertos casos de fórmulas (XIb), Z¹¹ y Z¹² son los mismos anillos. En ciertos casos, Z¹¹ y Z¹² incluyen anillos diferentes.

- 5 En ciertos ejemplos de fórmula (XIIa), el grupo BODIPY es de fórmula (XIIIa) o (XIIIb):



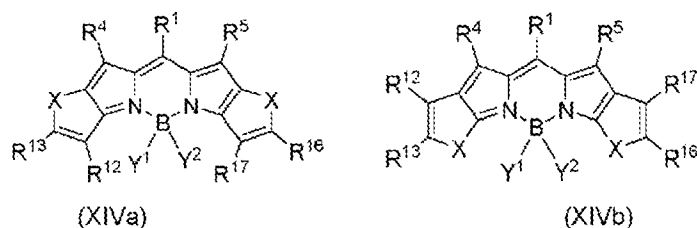
en donde:

X es O o S; y

R¹⁶ y R¹⁷ son sustituyentes como se definen para R⁶ y R⁷ en la fórmula (I).

- 10 En ciertos casos de fórmula (XIIa) o (XIIb), ninguno de R¹-R⁵ está cíclicamente unido.

En ciertos ejemplos de fórmula (XI) y (XIIb), el grupo BODIPY es de fórmula (XIVa) o (XIVb):



en donde:

cada X es O o S; y

- 15 R¹², R¹³, R¹⁶ y R¹⁷ son sustituyentes como se definen para R², R³, R⁶ y R⁷ en la fórmula (I).

En ciertos ejemplos de fórmulas (XI)-(XIVb), el grupo BODIPY incluye un grupo funcional quimioselectivo unido o molécula de interés, tal como un multicromóforo de recolección de luz (por ejemplo, -L¹-Z¹). En algunos casos, uno de R¹-R⁷ incluye -L¹-Z¹. En ciertos casos, Y¹ o Y² incluye -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XI)-(XIVb), R¹ es -L¹-Z¹ en donde L¹ es un enlazador y Z¹ es un grupo funcional quimioselectivo o un multicromóforo de recolección de luz.

- 20 En ciertos ejemplos de fórmulas (XI)-(XIVb), R⁴ o R⁵ es -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XI), (XIIa) y (XIIa)-(XIIb), R² o R⁷ es -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XI), (XIIa) y (XIIa)-(XIIb), R³ o R⁶ es -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), un sustituyente R²⁰ es -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XIIa)-(XIIb), R¹⁶ o R¹⁷ es -L¹-Z¹. En ciertos ejemplos de fórmulas (XIVa)-(XIVb), R¹², R¹³, R¹⁶ o R¹⁷ es -L¹-Z¹.

- 25 En algunos casos, R¹ es -L¹-Z¹ en donde L¹ es un enlazador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que tiene una cadena principal de 20 átomos o menos de longitud. En algunos casos de R¹, L¹ se selecciona de un enlazador de alquilo o alquilo sustituido, un enlazador de alcoxi o alcoxi sustituido, un enlazador de PEG, un enlazador de sulfonamido-alquilo o sulfonamido-alquilo sustituido, un enlazador de amido-alquilo o amido-alquilo sustituido y un enlazador de alquil-amido-alquilo o alquil-amido-alquilo sustituido. El enlazador puede estar sustituido con un WSG, tal como un grupo PEG. En ciertos casos de R¹, L¹ se selecciona de un enlazador de alquilo C₁-C₁₂ o alquilo sustituido, un enlazador de alcoxi C₁-C₁₂ o alcoxi sustituido, un enlazador de amido-alquilo C₁-C₁₂ o amido-alquilo sustituido y un enlazador de alquilo C₁-C₁₂-amido-alquilo o alquil-amido-alquilo sustituido. En ciertos casos de R¹, Z¹ se conjuga con el grupo BODIPY a través de un ácido carboxílico o un éster activo del mismo.

- 35 En ciertos casos de fórmulas (XI)-(XIVb), R¹ incluye un grupo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido unido a una unidad de repetición del multicromóforo de recolección de luz o a un grupo funcional quimioselectivo. En ciertos casos, R¹ es un arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido unido a una unidad de repetición del multicromóforo

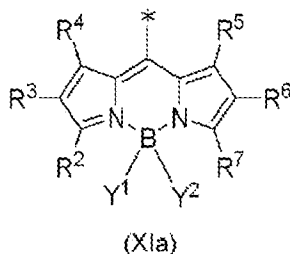
de recolección de luz, por ejemplo, a través de un grupo funcional quimioselectivo. Los grupos carbocíclicos o heterocíclicos bivalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, 1,4-ciclohexilo, 1,3-ciclohexilo, piperidinilo (por ejemplo, 1,4-piperidinilo), piperazinilo (por ejemplo, 1,4-piperazinilo), y similares. Los grupos arilo o heteroarilo bivalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, 1,4-fenilo, 1,3-fenilo, 2,5-piridilo, 2,6-piridilo, 3,5-piridilo y similares.

5 El grupo carbocíclico o heterocíclico bivalente o el grupo arilo o heteroarilo bivalente de R¹ puede estar unido a -L²-Z¹, donde L² es un grupo de unión, por ejemplo, como se describe en uno cualquiera de los ejemplos en el presente documento.

En algunos ejemplos de fórmula (XI), Q es C y R¹-R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo y alquinilo sustituido.

10 En ciertos casos de fórmula (XI), Y¹ e Y² incluyen cada uno uno o más grupos solubilizantes en agua (WSG). En algunos casos, Y¹ e Y² son un alquinilo sustituido con un WSG. En algunos casos, Y¹ e Y² son cada uno un alquinilo sustituido con un WSG ramificado. En algunos casos de fórmula (XI), Y¹ e Y² son cada uno -CC-CH₂)_n-O(CH₂CH₂O)_m-R, en donde n es de 1 a 6, m es de 2 a 50, tal como de 2 a 30, de 2 a 20, de 6 a 20, de 8 a 20, o de 10 a 20, y R es H, alquilo o alquilo sustituido (por ejemplo, metilo).

15 En algunos ejemplos de fórmula (XI), el grupo cromóforo donador colgante BODIPY puede describirse mediante la fórmula (XIa):

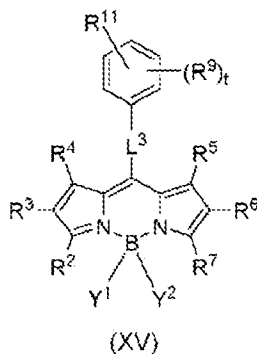


en donde:

* es un punto de unión a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

20 Y¹ e Y² son cada uno alquinilo sustituido con uno o más WSG. En algunos casos, Y¹ e Y² son cada uno alquinilo sustituido con un WSG ramificado. En algunos casos de fórmula (XIa), cada R¹⁰ es -CC-CH₂)_n-O(CH₂CH₂O)_m-R, en donde n es de 1 a 6, m es de 2 a 50, tal como de 2 a 30, de 2 a 20, de 6 a 20, de 8 a 20, o de 10 a 20, y R es H, alquilo o alquilo sustituido (por ejemplo, metilo).

En ciertos casos de fórmula (XI), el grupo BODIPY es de fórmula (XV):



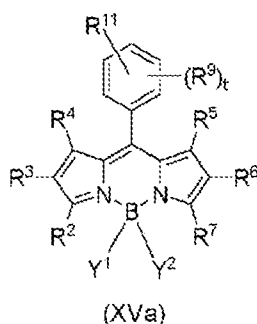
25 en donde:

L³ es un enlace covalente, oxo (-O-), alquilenilo (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₆), -O-alquilenilo o una versión sustituida del mismo;

R¹¹ es como se define para R¹;

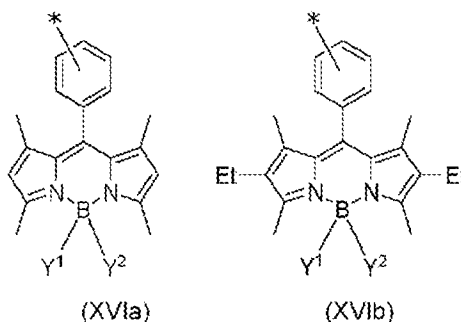
30 cada R⁹ es un sustituyente opcional seleccionado de halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y t es 0-4. En ciertos casos de fórmula (XV), L³ es un enlace covalente. En algunos casos de fórmula (XV), L³ es oxo. En ciertos casos de fórmula (XV), L³ es un enlace covalente.

En ciertos casos de fórmula (XV), el grupo BODIPY es de fórmula (XVa):



en donde: R¹¹ es como se define para R¹; cada R⁹ es un sustituyente opcional seleccionado de halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y t es 0-4. En algunos casos de fórmulas (XV)-(XVa), R¹¹ es L¹-Z¹ (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos de fórmulas (XV)-(XVa), R¹¹ incluye un enlazador de sulfonamido-alquilo o sulfonamido-alquilo sustituido, un enlazador de amido-alquilo o amido-alquilo sustituido o un enlazador de alquil-amido-alquilo o alquil-amido-alquilo sustituido. En ciertos casos de fórmulas (XV)-(XVa), R², R⁴, R⁵ y R⁷ son cada uno independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. En ciertos casos de fórmulas (XV)-(XVa), R³ y R⁶ son cada uno independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. En algunos casos, R³ y R⁶ son cada uno H. En ciertos casos de fórmulas (XV)-(XVa), R², R⁴, R⁵ y R⁷ son cada uno independientemente alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido.

En ciertos casos de fórmula (XV), el grupo BODIPY es de fórmula (XVIa) o (XVIb):

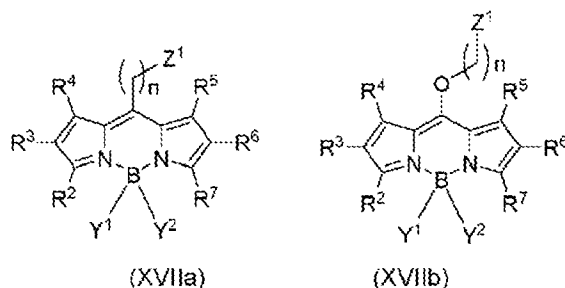


en donde:

* es un punto de unión a una unidad de repetición del multicromóforo de recolección de luz o un grupo funcional quimioselectivo; y

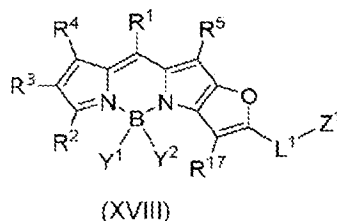
Y¹ e Y² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en F, OH, H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido y WSG.

En ciertos casos de fórmula (XI), el grupo BODIPY es de fórmula (XVIIa) o (XVIIb):

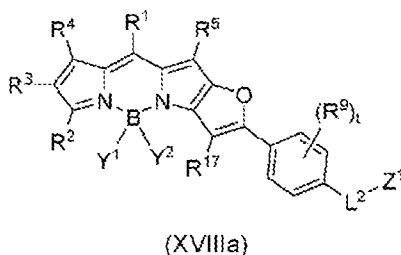


en donde: n es 0-12 y Z¹ es un grupo funcional quimioselectivo (por ejemplo, como se describe en el presente documento) o molécula unida de interés. En ciertos casos de fórmulas (XVIIa)-(XVIIb), n es 1-12 o 1-6, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En ciertos casos de fórmulas (XVIIa)-(XVIIb), R²-R⁴ y R⁵-R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertos casos de fórmulas (XVIIa)-(XVIIb), R² y R⁴ y/o R⁵ y R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertos casos de fórmulas (XVIIa)-(XVIIb), R³ y/o R⁶ son H. En ciertos casos de fórmulas (XVIIa)-(XVIIb), R³ y/o R⁶ son alquilo o alquilo sustituido.

En ciertos casos de fórmula (XIIa), el grupo BODIPY es de fórmula (XVIII):

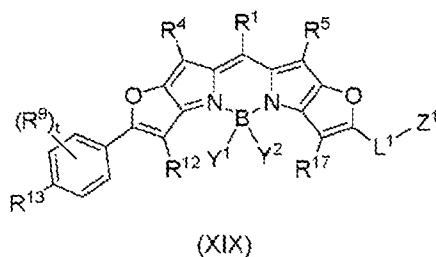


5 en donde: L¹ es un enlazador y Z¹ es una unidad de repetición no conjugada unida de la cadena principal polimérica (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos de fórmula (XVIII), el grupo BODIPY es de fórmula (XVIIIa):

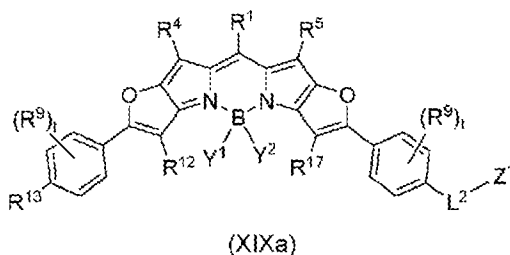


en donde: L² es un enlazador (por ejemplo, un componente de grupo de unión de L¹); cada R⁹ es un sustituyente opcional seleccionado de halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y t es 0-4.

10 En ciertos casos de fórmula (XIVa), el grupo BODIPY es de fórmula (XIX):



en donde: R¹² y R¹³ son sustituyentes como se definen para R² y R³ en la fórmula (XI); L¹ es un enlazador y Z¹ es una unidad de repetición no conjugada unida de la cadena principal polimérica (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos de fórmula (XIX), el grupo BODIPY es de fórmula (XIXa):



15 en donde: L² es un enlazador (por ejemplo, un componente de grupo de unión de L¹); cada R⁹ es un sustituyente opcional seleccionado de halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y t es 0-4.

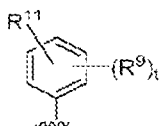
20 En cualquiera de los ejemplos de fórmula (XI)-(XIXa) descritos en el presente documento, el grupo BODIPY puede incluir un grupo L¹-Z¹ particular tal como se describe en uno de los ejemplos siguientes.

25 L¹ puede ser un enlazador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que tiene una cadena principal de 20 átomos o menos de longitud. En algunos casos, L¹ se selecciona de un enlazador de alquilo o alquilo sustituido, un enlazador de alcoxi o alcoxi sustituido, un enlazador de PEG, un enlazador de sulfonamido-alquilo o sulfonamido-alquilo sustituido, un enlazador de amido-alquilo o amido-alquilo sustituido y un enlazador de alquil-amido-alquilo o alquil-amido-alquilo sustituido. El enlazador puede estar sustituido con un WSG, tal como un grupo PEG. En ciertos

casos, L^1 se selecciona de un enlazador de alquilo C_1 - C_{12} o alquilo sustituido, un enlazador de alcoxi C_1 - C_{12} o alcoxi sustituido, un enlazador de amido-alquilo C_1 - C_{12} o amido-alquilo sustituido y un enlazador de alquil C_1 - C_{12} -amido-alquilo o alquil-amido-alquilo sustituido. El enlazador L puede incluir varios componentes unidos, tales como uno o grupos de unión seleccionados independientemente de alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno (-CH=CH-), alquienileno sustituido, alquinileno (-CC-), amido sustituido o no sustituido (por ejemplo, -NRCO- o -CONR-, donde R es H, alquilo o alquilo sustituido), sulfonamido sustituido o no sustituido (por ejemplo, -NRSO₂- o -SO₂NR-, donde R es H, alquilo o alquilo sustituido), oxo (-O-), tio (-S-), etilenglicol (-OCH₂CH₂O-), polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂CH₂O)_n- donde n es 2-20, tal como 2-10 o 2-6, o 2, 3, 4, 5 o 6), arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, residuo de alfa-aminoácido, residuo de beta-aminoácido, y similares.

La unidad de repetición no conjugada unida de la cadena principal polimérica (Z^1) puede conjugarse al grupo BODIPY a través de cualquier grupo funcional quimioselectivo conveniente, por ejemplo, un grupo funcional adecuado para la conjugación con una molécula de interés que tiene un grupo funcional compatible. Los grupos funcionales quimioselectivos de interés que encuentran uso en la unión de los grupos BODIPY objeto a la cadena principal polimérica incluyen, pero no se limitan a, grupos amina (por ejemplo, -NH₂), ácido carboxílico (-CO₂H), éster activo (por ejemplo, NHS o éster sulfo-NHS), tiol, maleimida, yodoacetamida, hidroxilo, hidrazido, hidrazino, aldehído, cetona, azido, alquino, tetrazina, alqueno, fosfina y epóxido. Se entiende que, en algunos casos, el grupo funcional quimioselectivo usado para unir un grupo BODIPY es un precursor sintético o versión protegida del grupo funcional de interés, que puede convertirse en un grupo funcional reactivo capaz de conjugarse con la cadena principal polimérica. Por ejemplo, un ácido carboxílico es un grupo funcional quimioselectivo que puede acoplarse con un grupo amina en una molécula de interés. El ácido carboxílico puede convertirse en un éster activo que se acopla con el grupo amina, *in situ* o antes del acoplamiento.

En algunos ejemplos de fórmulas (XI)-(XIa), L^1 incluye un grupo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica. En ciertos casos, L^1 es un arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. Los grupos carbocíclicos o heterocíclicos bivalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, 1,4-ciclohexilo, 1,3-ciclohexilo, piperidinilo (por ejemplo, 1,4-piperidinilo), piperazinilo (por ejemplo, 1,4-piperazinilo), y similares. Los grupos arilo o heteroarilo bivalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, 1,4-fenilo, 1,3-fenilo, 2,5-piridilo, 2,6-piridilo, 3,5-piridilo y similares. El grupo carbocíclico o heterocíclico bivalente o el grupo arilo o heteroarilo bivalente de L^1 puede estar unido a $-L^2-Z^1$, donde L^2 es un grupo de unión, por ejemplo, como se describe en uno cualquiera de los ejemplos en el presente documento. En algunos ejemplos de fórmulas (I)-(IXa), $-L^1-Z^1$ se describe por una de las estructuras siguientes:

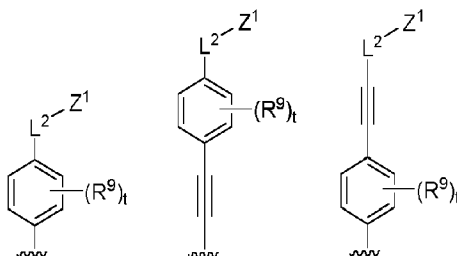


en donde:

R^{11} es L^2-Z^1 ;

L^2 es un enlazador y Z^1 es una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

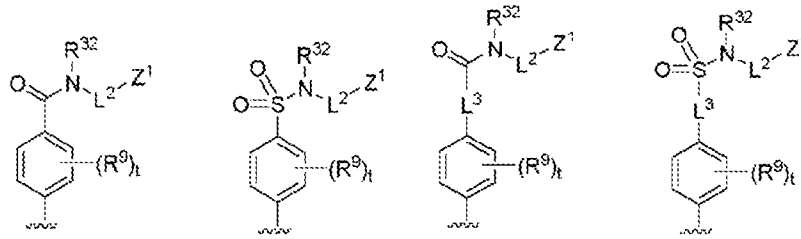
t es 0-4; y cada R^9 se selecciona independientemente de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, hidroxilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halógeno, ácido sulfónico y grupo solubilizante en agua (WSG). En ciertos ejemplos, $-L^1-Z^1$ se describe por una de las estructuras siguientes:



en donde:

L^2 es un enlazador y Z^1 es una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

t es 0-4; y cada R^9 se selecciona independientemente de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, hidroxilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halógeno, ácido sulfónico y grupo solubilizante en agua (WSG). En ciertos ejemplos, $-L^1-Z^1$ se describe por una de las estructuras siguientes:



en donde:

L² es un enlazador y Z¹ es una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

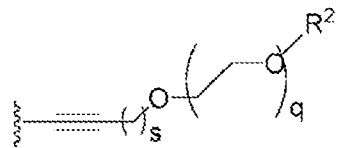
R³² es H, alquilo, alquilo sustituido y grupo solubilizante en agua (WSG);

5 L³ es un enlazador seleccionado de alquilenos (por ejemplo, alquilenos C1-C₆), -O-alquilenos y versiones sustituidas de los mismos;

t es 0-4; y cada R⁹ se selecciona independientemente de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, hidroxilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halógeno, ácido sulfónico y grupo solubilizante en agua (WSG).

10 En cualquiera de los ejemplos de fórmulas (XI)-(XIXa) descritos en el presente documento, el grupo BODIPY puede incluir grupos Y¹ e Y² particulares como se describe en uno de los ejemplos siguientes. En algunos casos de fórmulas (XI)-(XIXa), Y¹ incluye un grupo solubilizante en agua (WSG). En ciertos casos, Y¹ es alquilo sustituido con WSG. Y² puede ser igual que Y¹ o diferente. En algunos casos de fórmulas (XI)-(XIXa), Y² se selecciona de F, OH, H, ciano, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino y alquino sustituido. En algunos casos, Y² se selecciona de F, CN, fenilo y fenilo sustituido.

15 En algunos casos de fórmulas (XI)-(XIXa), Y¹ e Y² comprende cada uno un grupo solubilizante en agua (WSG). En ciertos casos, Y¹ y/o Y² es alquilo sustituido con un WSG (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos, Y¹ y/o Y² es alquilo sustituido con polietilenglicol (PEG) o (PEG) modificado. En ciertos casos de cualquiera de los ejemplos de fórmulas (I)-(IXa), Y¹ y/o Y² es de fórmula:



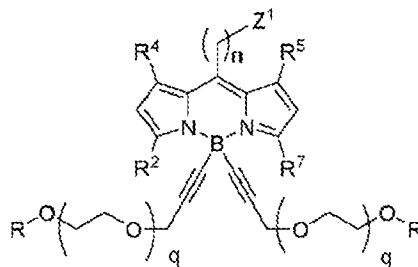
en donde:

s es de 1 a 12;

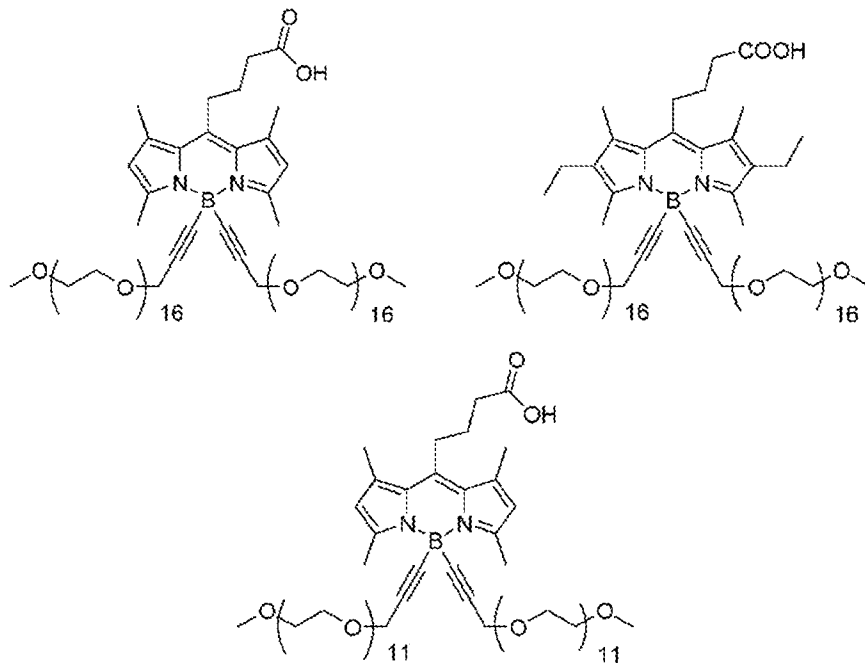
q es de 0 a 50; y

25 R²¹ es H, alquilo o alquilo sustituido. En ciertos casos, s es de 1 a 6, tal como 1, 2 o 3. En algunos casos, q es de 1 a 50, de 1 a 30, de 2 a 30, de 4 a 30, de 6 a 30, de 8 a 30, de 10 a 30, de 10 a 20 o de 11 a 16. En ciertos casos, q es de 10 a 50, tal como de 10 a 30, de 10 a 20 o de 11 a 16.

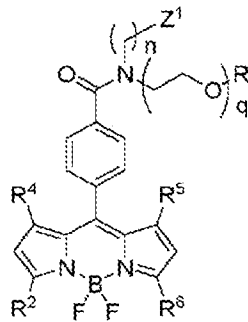
En ciertos ejemplos de fórmula (XI) y (XVIIa), el grupo BODIPY tiene la estructura:



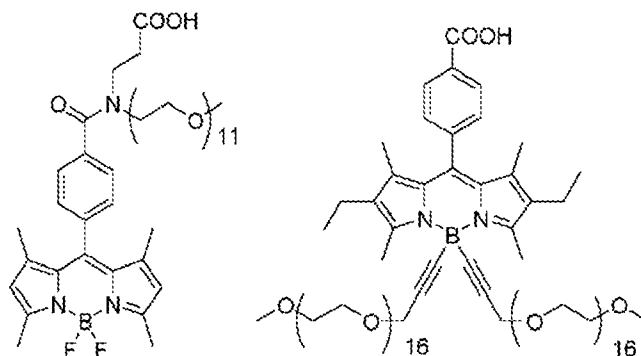
30 en donde Z¹ es una unidad de repetición no conjugada unida de la cadena principal polimérica; n es 0-6; cada R, R², R⁴, R⁵ y R⁷ es independientemente H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido; y cada q es 6-20 (por ejemplo, 10-20). En ciertos ejemplos de fórmula (XI) y (XVIIa), el grupo BODIPY tiene una de las siguientes estructuras:

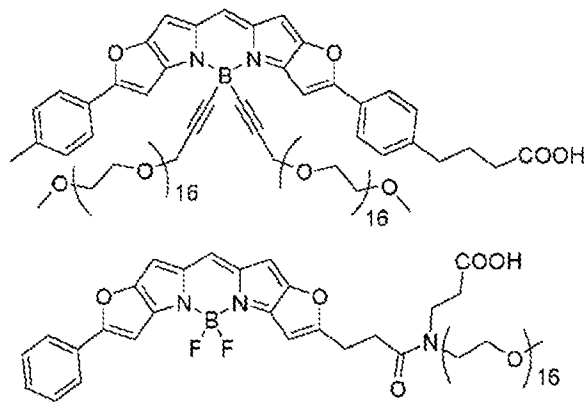


En ciertos ejemplos de fórmulas (XV) y (XVa), el colorante BODIPY tiene la estructura:

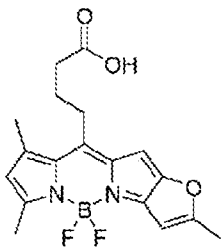


- 5 en donde Z¹ es una unidad de repetición no conjugada unida de la cadena principal polimérica; n es 0-6; R, R², R⁴, R⁵ y R⁷ es independientemente H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido; y cada q es 6-20 (por ejemplo, 10-20). En ciertos ejemplos de fórmulas (XV), (XVa) y (XVIa) o (XVIb), el colorante BODIPY tiene una de las siguientes estructuras:

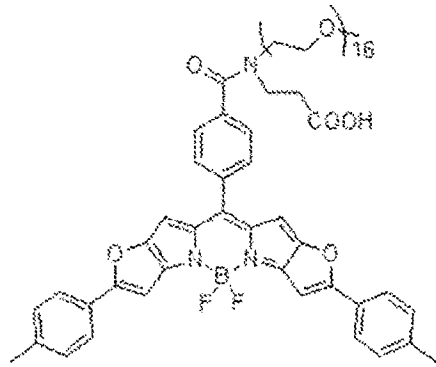




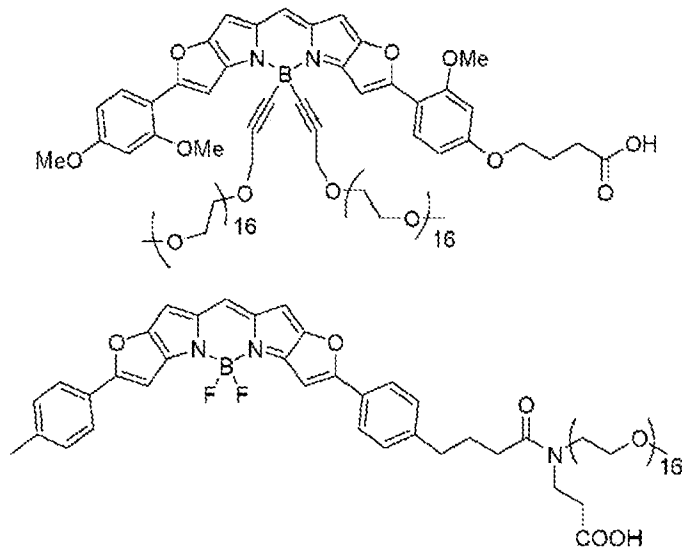
En ciertos ejemplos de fórmulas (XIIIa), el grupo BODIPY tiene la estructura:

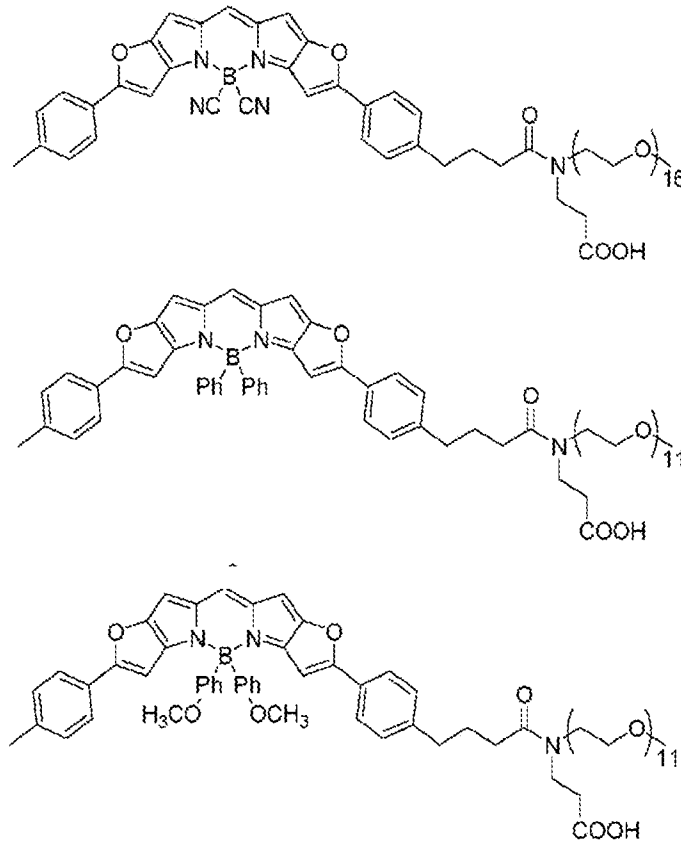


5 En ciertos ejemplos de fórmulas (XIVa), el grupo BODIPY tiene la estructura:



En ciertos ejemplos de fórmulas (XIXa), el grupo BODIPY tiene una de las estructuras siguientes:





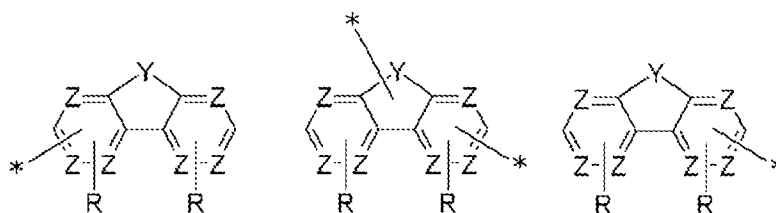
Grupos cromóforos arilo o heteroarilo

- 5 El grupo cromóforo absorbente de luz puede ser un grupo cromóforo arilo o heteroarilo. Los grupos cromóforos arilo o heteroarilo de interés que encuentran uso en los multicromóforos objeto (por ejemplo, de fórmulas (I)-(IX) incluyen, pero no se limitan a, grupos fenilo, bifenilo, benzooxazol, benzotiazol, poli-fenileno y tricíclicos condensados, tales como fluoreno, carbazol, silol, bifenilo y bifenilo con puente. Los grupos cromóforos arilo o heteroarilo pueden estar
- 10 opcionalmente sustituidos adicionalmente, por ejemplo, con un grupo solubilizante en agua y/o un sustituyente arilo o heteroarilo que confiere propiedades de absorción de luz deseables al grupo arilo o heteroarilo. En algunos casos de fórmulas (I)-(IX), cada D¹ incluye independientemente un arilo o heteroarilo tricíclico condensado. En algunos casos de fórmulas (I)-(IX), cada D¹ incluye independientemente uno o más grupos seleccionados de fluoreno, carbazol, silol, bifenilo y bifenilo con puente.

15 Un cromóforo tricíclico condensado es un grupo que incluye un grupo aromático tricíclico que tiene tres anillos condensados en una configuración en donde dos anillos de 6 miembros de arilo o heteroarilo están condensados con un anillo carbocíclico o heterocíclico de 5 o 6 miembros central. En algunos casos, el grupo tricíclico condensado incluye dos anillos benzo o pirido condensados a un anillo carbocíclico o heterocíclico de 5 o 6 miembros central. El grupo tricíclico condensado puede estar unido a la cadena lateral de un comonomero en la cadena principal polimérica a través de cualquier átomo de anillo conveniente de los anillos condensados. El anillo de 5 o 6 miembros central

20 puede ser un carbociclo o un heterociclo, aromático o parcialmente saturado, y puede incluir además un sustituyente de cadena lateral, por ejemplo, un WSG y/o un enlazador a una etiqueta quimiosselectiva o la cadena lateral de comonomero. Un comonomero de bifenilo con puente es un grupo tricíclico condensado que tiene un grupo bifenilo en donde los dos anillos de fenilo están unidos adicionalmente entre sí a través de un anillo carbocíclico o heterocíclico de 6 miembros central.

- 25 En ciertos casos del multicromóforo (por ejemplo, en las fórmulas (I)-(IX)), un grupo cromóforo donador colgante es un arilo o heteroarilo tricíclico condensado que tiene una de las siguientes fórmulas:



en donde:

* es un punto de unión a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

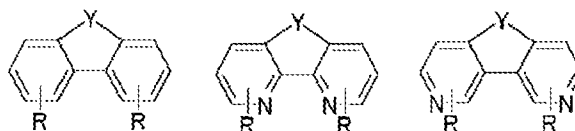
Y es $C(R^{13})_2$, $-C(R^{13})_2C(R^{13})_{2-}$, $-C(R^{13})_2Si(R^{13})_{2-}$, NR^{13} , $Si(R^{13})_2$ o Se;

cada Z es independientemente CH, CR o N;

5 cada R^{13} se selecciona independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, acilo, acilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amido, amido sustituido, un aralquilo, un aralquilo sustituido, un resto PEG, $L^{11}-Z^1$, donde L^{11} es un enlazador y Z^1 es una unidad de repetición no conjugada y un WSG, o en donde dos grupos R^3 convenientes cualesquiera están opcionalmente unidos cíclicamente; y

10 cada R es independientemente H o uno o más sustituyentes (por ejemplo, WSG) y en donde dos cualesquiera grupos R convenientes están opcionalmente unidos cíclicamente. En algunos casos, uno de R y R^{13} está unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica.

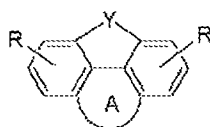
En ciertos casos, el grupo tricíclico condensado se describe por una de las siguientes estructuras:



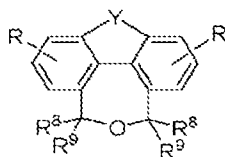
15 en donde Y y cada R son como se han definido anteriormente; y el grupo tricíclico condensado puede estar unido a la unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica a través de Y o R.

En ciertos casos, el grupo tricíclico condensado es un fluoreno donde Y es $C(R^3)_2$. En algunos casos, el grupo tricíclico condensado es un carbazol donde Y es NR^3 . En algunos casos, el grupo tricíclico condensado es un silol donde Y es $Si(R^3)_2$. En algunos casos, el grupo tricíclico condensado es un bifenilo con puente donde Y es $-C(R^3)_2C(R^3)_{2-}$ o es $-C(R^3)_2Si(R^3)_{2-}$. En algunos casos, el tricíclico condensado es un bifenilo con puente donde Y es $-CHR^3CHR^3-$. En ciertos casos de cualquiera de los grupos tricíclicos condensados descritos en el presente documento, cada R se selecciona independientemente entre H, halógeno, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilo y alquilo sustituido. En ciertos casos, cada R se selecciona independientemente de H, fluoro, cloro, metoxi, alcoxi sustituido, alquilo y alquilo sustituido.

25 En ciertos ejemplos del grupo tricíclico condensado, el grupo incluye dos grupos sustituyentes R que están unidos cíclicamente para proporcionar un anillo carbocíclico o heterocíclico A que está opcionalmente sustituido adicionalmente:



30 en donde Y es $C(R^3)_2$, $-C(R^3)_2C(R^3)_{2-}$, $-C(R^3)_2Si(R^3)_{2-}$, NR^3 , $Si(R^3)_2$ o Se; y cada R^3 se selecciona independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, acilo, acilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amido, amido sustituido, un aralquilo, un aralquilo sustituido, un resto PEG, $L^{11}-Z^1$, donde L^{11} es un enlazador y Z^1 es una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, una etiqueta que incluye un grupo funcional quimioselectivo) y un WSG; cada R es como se definió anteriormente; y el grupo tricíclico condensado puede estar unido a la unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica a través de R^3 o R. En ciertos casos, el grupo tricíclico condensado tiene la estructura:



40 en donde R^8-R^9 se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, acilo, acilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amido, amido sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, un resto PEG, $L^{11}-Z^1$, donde L^{11} es un enlazador y Z^1 es una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, una etiqueta que incluye un grupo funcional quimioselectivo) y un WSG; Y y cada R es como se definió anteriormente; y el grupo tricíclico condensado puede estar unido a la unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica a través de Y, R^8-R^9 o R. En algunos casos del comonomero, Y es $C(R^3)_2$.

Grupos solubilizantes en agua

La presente divulgación incluye multicromóforos de recolección de luz solubles en agua que tienen grupos cromóforos colgantes y colorantes poliméricos en tándem que incluyen fluoróforos aceptores. El multicromóforo puede estar sustituido con una pluralidad de grupos solubilizantes en agua (WSG). En algunos casos, los WSG son grupos colgantes conectados directamente al armazón modular, por ejemplo, como cadenas laterales de una cadena principal polimérica. En ciertos casos, los WSG son grupos sustituyentes unidos a un cromóforo donador colgante o fluoróforo aceptor colgante. En algunos casos, cada uno de los grupos cromóforos donadores colgantes se sustituye con uno o más WSG.

Como se usa en el presente documento, los términos "grupo solubilizante en agua", "grupo soluble en agua" y WSG se usan indistintamente y se refieren a un grupo o sustituyente que está bien solvatado en entornos acuosos, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, y que confiere una solubilidad en agua mejorada a la molécula a la que se une. Un WSG puede aumentar la solubilidad de un multicromóforo en una solución predominantemente acuosa, en comparación con un multicromóforo de control que carece del WSG. Los grupos solubilizantes en agua pueden ser cualquier grupo hidrófilo conveniente que esté bien solvatado en entornos acuosos.

Un multicromóforo soluble en agua de la presente divulgación tiene solubilidad en condiciones acuosas que lo hace especialmente adecuado para su aplicación a una variedad de ensayos biológicos. Los multicromóforos solubles en agua y colorantes poliméricos en tándem, y conjugados de los mismos, pueden ser resistentes a la agregación no deseable que proporciona propiedades espectroscópicas y de fluorescencia ventajosas en diversos ensayos biológicos. La agregación de colorantes no es deseable porque puede conducir a señales fluorescentes reducidas, por ejemplo, mediante la desactivación provocada por la agregación de la fluorescencia del colorante. Los multicromóforos solubles en agua y colorantes poliméricos en tándem pueden usarse como indicadores fluorescentes para una variedad de biosensores y proporcionar señales de brillo excepcional con una gama de opciones para la longitud de onda de excitación y emisión para aplicaciones tales como citometría de flujo y obtención de imágenes.

Puede adaptarse una variedad de grupos poliméricos solubles en agua para su uso en el WSG de los multicromóforos objeto. Cualquier grupo solubilizante en agua (WSG) conveniente puede incluirse en los multicromóforos descritos en el presente documento para proporcionar una mayor solubilidad en agua. Aunque el aumento en la solubilidad puede variar, en algunos casos el aumento (en comparación con el compuesto sin el/los WSG) es 2 veces o más, por ejemplo, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces o más. En algunos casos, el grupo hidrófilo solubilizante en agua está cargado, por ejemplo, cargado positiva o negativamente. En ciertos casos, el grupo hidrófilo solubilizante en agua es un grupo hidrófilo neutro. En algunos ejemplos, el WSG está ramificado (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos, el WSG es lineal. En algunos ejemplos, el WSG es un polímero hidrófilo, por ejemplo, un polietilenglicol, un PEG modificado, una secuencia peptídica, un peptido, un hidrato de carbono, una oxazolona, un polioliol, un dendrón, un poliglicerol dendrítico, una celulosa, un quitosano o un derivado de los mismos. Los grupos solubilizantes en agua de interés incluyen, pero no se limitan a, carboxilato, fosfonato, fosfato, sulfonato, sulfato, sulfonato, sulfonio, éster, polietilenglicoles (PEG) y PEG modificados, hidroxilo, amina, aminoácido, amonio, guanidinio, piridinio, poliamina y sulfonio, polialcoholes, sacáridos de cadena lineal o cíclicos, aminas y poliaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, grupos fosfonato, grupos fosfinato, grupos ascorbato, glicoles, incluyendo poliéteres, $-\text{COOM}'$, $-\text{SO}_3\text{M}'$, $-\text{PO}_3\text{M}'$, $-\text{NR}_3^+$, Y' , $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{R}$ y mezclas de los mismos, donde Y' puede ser cualquier anión que contenga halógeno, sulfato, sulfonato u oxígeno, p puede ser de 1 a 500, cada R puede ser independientemente H o un alquilo (tal como metilo) y M' puede ser un contraión catiónico o hidrógeno, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{XR}^{yy}$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}-$, $-\text{X}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2-$, glicol y polietilenglicol, en donde yy se selecciona de 1 a 1000, X se selecciona de O , S y NR^{ZZ} , y R^{ZZ} y R^{YY} se seleccionan independientemente de H y alquilo C_{1-3} . En algunos casos, un WSG es $(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OCH}_3$ donde cada x es independientemente un número entero de 0-20, cada y es independientemente un número entero de 0 a 50. En algunos casos, el grupo solubilizante en agua incluye un polímero no iónico (por ejemplo, un polímero de PEG) sustituido en el terminal con un grupo iónico (por ejemplo, un sulfonato).

En algunos ejemplos de las fórmulas, el grupo colgante de interés incluye un sustituyente seleccionado de $(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OCH}_3$ en donde cada x es independientemente un número entero de 0-20, cada y es independientemente un número entero de 0 a 50; y un bencilo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, hidroxilo, alcoxi C_{1-12} o $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z$ donde cada z es independientemente un número entero de 0 a 50. En algunos casos, el sustituyente es $(\text{CH}_2)_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{11}\text{OCH}_3$. En algunos ejemplos, uno o más de los sustituyentes es un bencilo sustituido con al menos un grupo WSG (por ejemplo, uno o dos grupos WSG) seleccionado de $(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OCH}_3$ donde cada x es independientemente un número entero de 0-20 y cada y es independientemente un número entero de 0 a 50.

Pueden incluirse múltiples WSG en una única ubicación en los multicromóforos objeto a través de un enlazador de ramificación. En ciertos ejemplos, el enlazador de ramificación es un sustituyente aralquilo, disustituido adicionalmente con grupos solubilizantes en agua. Como tal, en algunos casos, el grupo enlazador de ramificación es un sustituyente del multicromóforo que conecta el multicromóforo a dos o más grupos solubilizantes en agua. En ciertos ejemplos, el enlazador de ramificación es un aminoácido, por ejemplo, un aminoácido de lisina que está conectado a tres grupos a través de los grupos amino y ácido carboxílico. En algunos casos, la incorporación de múltiples WSG a través de enlazadores de ramificación confiere una solubilidad deseable al multicromóforo. En algunos casos, el WSG es un

grupo de cadena lateral no iónica capaz de conferir solubilidad en agua superior a 50 mg/ml. En algunos casos, el WSG es un grupo de cadena lateral no iónica capaz de conferir solubilidad en agua superior a 100 mg/ml. En algunos ejemplos, el multicromóforo incluye sustituyente(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en, un grupo alquilo, aralquilo y heterocíclico, cada grupo sustituido adicionalmente con un grupo de polímero hidrófilo que incluye grupos solubilizantes en agua, tal como un polietilglicol (PEG) (por ejemplo, un grupo PEG de 2-20 unidades).

Los polímeros solubles en agua de interés que pueden utilizarse en el WSG incluyen grupos polietilenglicol (PEG) o grupos PEG modificados. Los polímeros solubles en agua de interés incluyen, pero no se limitan a, polímeros basados en poli(óxido de alquileno), tales como polietilenglicol "PEG" (véase, por ejemplo, "Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications", J. M. Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1992); y Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications", J. M. Harris y S. Zalipsky, Eds., ACS (1997); y las solicitudes de patente internacional: WO 90/13540, WO 92/00748, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28937, WO 95/11924, WO 96/00080, WO 96/23794, WO 98/07713, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/30727, WO 99/32134, WO 99/33483, WO 99/53951, WO 01/26692, WO 95/13312, WO 96/21469, WO 97/03106, WO 99/45964 y las patentes estadounidenses n.ºs 4.179.337; 5.075.046; 5.089.261; 5.100.992; 5.134.192; 5.166.309; 5.171.264; 5.213.891; 5.219.564; 5.275.838; 5.281.698; 5.298.643; 5.312.808; 5.321.095; 5.324.844; 5.349.001; 5.352.756; 5.405.877; 5.455.027; 5.446.090; 5.470.829; 5.478.805; 5.567.422; 5.605.976; 5.612.460; 5.614.549; 5.618.528; 5.672.662; 5.637.749; 5.643.575; 5.650.388; 5.681.567; 5.686.110; 5.730.990; 5.739.208; 5.756.593; 5.808.096; 5.824.778; 5.824.784; 5.840.900; 5.874.500; 5.880.131; 5.900.461; 5.902.588; 5.919.442; 5.919.455; 5.932.462; 5.965.119; 5.965.566; 5.985.263; 5.990.237; 6.011.042; 6.013.283; 6.077.939; 6.113.906; 6.127.355; 6.177.087; 6.180.095; 6.194.580; 6.214.966).

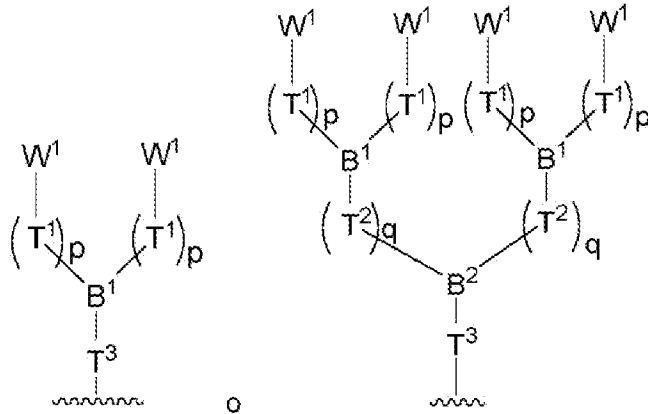
Los ejemplos de polímeros solubles en agua de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen un poli(óxido de alquileno), óxido de alquileno de poliamida o derivados de los mismos, incluyendo poli(óxido de alquileno) y óxido de alquileno de poliamida que comprende una unidad de repetición de óxido de etileno de fórmula $-(CH_2-CH_2-O)-$. Otros ejemplos de polímeros de interés incluyen una poliamida que tiene un peso molecular mayor de 1.000 Daltons de fórmula $-[C(O)-X-C(O)-NH-Y-NH]_n-$ o $-[NH-Y-NH-C(O)-X-C(O)]_n-$, en donde X e Y son radicales divalentes que pueden ser iguales o diferentes y pueden ser ramificados o lineales, y n es un número entero diferenciado de 2-100, tal como de 2 a 50, y en donde uno o ambos de X e Y comprende una unidad de repetición soluble en agua biocompatible, sustancialmente no antigénica que puede ser lineal o ramificada. Otros ejemplos de unidades de repetición solubles en agua comprenden un óxido de etileno de fórmula $-(CH_2-CH_2-O)-$ o $-(O-CH_2-CH_2)-$. El número de tales unidades de repetición solubles en agua puede variar significativamente, siendo el número de tales unidades de 2 a 500, de 2 a 400, de 2 a 300, de 2 a 200, de 2 a 100, 6-100, por ejemplo, de 2 a 50 o de 6 a 50. Un ejemplo de un ejemplo es uno en donde uno o ambos de X e Y se seleccionan de: $-((CH_2)_{n1}-(CH_2-CH_2-O)_{n2}-(CH_2)-$ o $-(CH_2)_{n1}-(O-CH_2-CH_2)_{n2}-(CH_2)_{n-1}-$, donde n1 es de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4 o de 1 a 3, y donde n2 es de 2 a 50, de 2 a 25, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 8 o de 2 a 5. Un ejemplo adicional de un ejemplo es uno en donde X es $-(CH_2-CH_2)-$ y en donde Y es $-(CH_2-(CH_2-CH_2-O)_3-CH_2-CH_2-CH_2)-$ o $-(CH_2-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2)-$.

El término polímero modificado, tal como un PEG modificado, se refiere a polímeros solubles en agua que se han modificado o derivatizado en uno o ambos terminales, por ejemplo, para incluir un sustituyente terminal (por ejemplo, un alquilo terminal, alquilo sustituido, alcoxi o alcoxi sustituido, etc.) y/o un grupo funcional de unión terminal (por ejemplo, un grupo amino o ácido carboxílico adecuado para la unión a través de la formación de enlaces amida) adecuado para la unión del polímero al multicromóforo (por ejemplo, a través de un grupo de ramificación). Los polímeros solubles en agua objeto pueden adaptarse para incluir cualquier grupo de unión conveniente. Se entiende que, en algunos casos, el polímero soluble en agua puede incluir cierta dispersidad con respecto a la longitud del polímero, dependiendo del método de preparación y/o la purificación de los materiales de partida poliméricos. En algunos casos, los polímeros solubles en agua son monodispersos.

El polímero soluble en agua puede incluir uno o más espaciadores o enlazadores. Los ejemplos de espaciadores o enlazadores incluyen restos lineales o ramificados que comprenden una o más unidades de repetición empleadas en un polímero soluble en agua, unidades de diamino y o diácido, aminoácidos naturales o no naturales o derivados de los mismos, así como restos alifáticos, incluyendo alquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, alcoxi y similares, que pueden contener, por ejemplo, hasta 18 átomos de carbono o incluso una cadena de polímero adicional.

El resto de polímero soluble en agua, o uno o más de los espaciadores o enlazadores del resto de polímero, cuando está presente, puede incluir cadenas o unidades de polímero que son bioestables o biodegradables. Por ejemplo, los polímeros con uniones de repetición tienen grados variables de estabilidad en condiciones fisiológicas dependiendo de la labilidad del enlace. Los polímeros con tales enlaces pueden clasificarse por sus velocidades relativas de hidrólisis en condiciones fisiológicas basándose en velocidades de hidrólisis conocidas de análogos de bajo peso molecular, por ejemplo, de menos estable a más estable, por ejemplo, poliuretanos $-(NH-C(O)-O)-$ > poliortoésteres $-(O-C((OR)(R'))-O)-$ > poliamidas $-(C(O)-NH)-$. De manera similar, los sistemas de unión que unen un polímero soluble en agua a una molécula diana pueden ser bioestables o biodegradables, por ejemplo, de menos estable a más estable: carbonato $-(O-C(O)-O)-$ > éster $-(C(O)-O)-$ > uretano $-(NH-C(O)-O)-$ > ortoéster $-(O-C((OR)(R'))-O)-$ > amida $-(C(O)-NH)-$. En general, puede ser deseable evitar el uso de un polisacárido sulfatado, dependiendo de la labilidad del grupo sulfato. Además, puede ser menos deseable usar policarbonatos y poliésteres. Estos enlaces se proporcionan a modo de ejemplo, y no pretenden limitar los tipos de enlaces empleables en las cadenas de polímero o sistemas de unión de los polímeros solubles en agua útiles en los WSG descritos en el presente documento.

En algunos casos, el WSG es un grupo soluble en agua (WSG) no iónico ramificado que comprende un grupo de ramificación unido y proporciona uniones adicionales a dos, tres o más polímeros solubles en agua no iónicos. En algunos casos, el WSG no iónico ramificado tiene una de las siguientes fórmulas:



5 en donde:

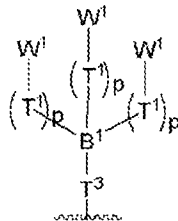
cada B¹ y B² son independientemente un grupo de ramificación;

cada W¹ es independientemente un polímero soluble en agua no iónico, por ejemplo, que comprende 6 o más unidades monoméricas;

T³ es un enlazador opcional al grupo colgante o unidad de repetición del multicromóforo; y

10 cada p y q son independientemente 0 o 1, en donde, si está presente, cada T¹ y cada T² son independientemente un enlazador. En ciertos casos, cada W¹ es independientemente un PEG o polímero de PEG modificado. En ciertos casos, cada W¹ se selecciona independientemente de un grupo alquilo sustituido, PEG o PEG modificado y un WSG. En ciertos casos, cada W¹ es independientemente un PEG o polímero de PEG modificado de 6-30 unidades monoméricas, tal como 6-24 o 10-30, 10-24 o 10-20, 12-24, 12-20, 12-16
15 o 16-20 unidades monoméricas.

En algunos casos, el WSG no iónico ramificado tiene la siguiente fórmula:



en donde:

cada B¹ es un grupo de ramificación;

20 cada W¹ es independientemente un polímero soluble en agua no iónico, por ejemplo, que comprende 6 o más unidades monoméricas;

T³ es un enlazador opcional al comonomero tricíclico condensado 6-5-6; y

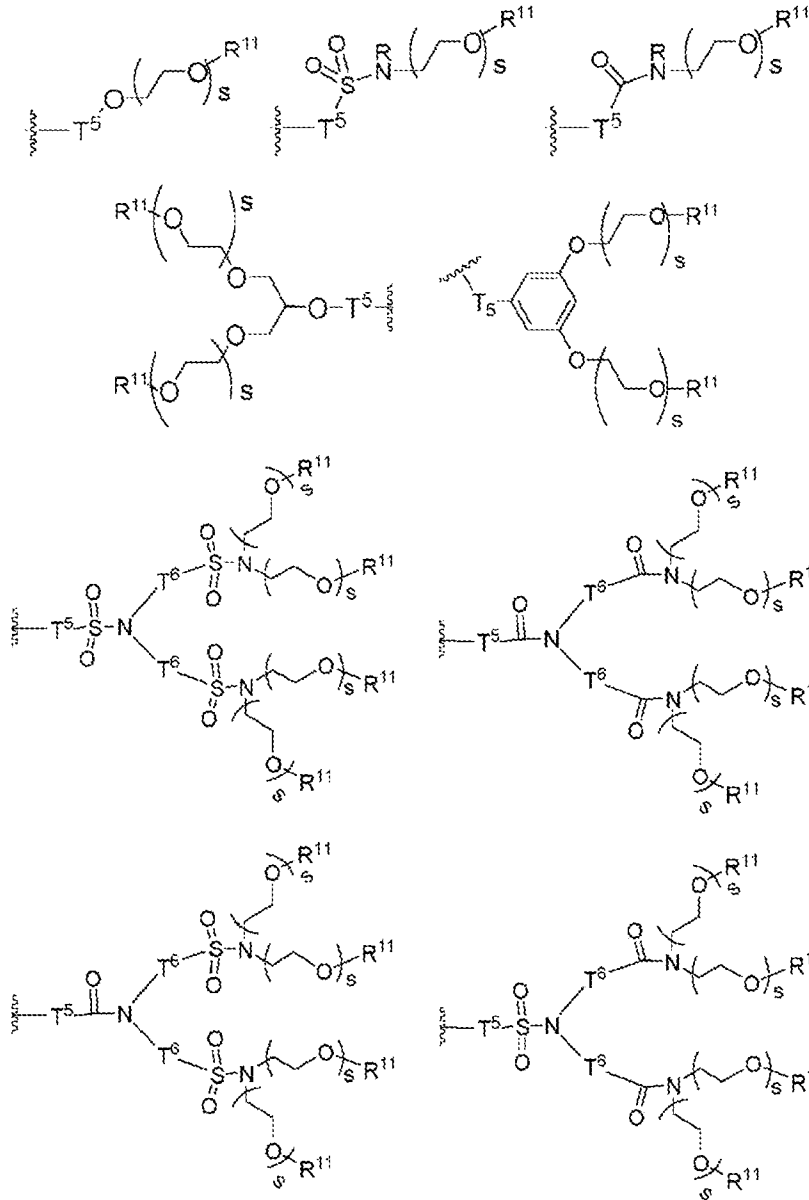
25 cada p es independientemente 0 o 1, en donde, si está presente, cada T¹ es independientemente un enlazador. En ciertos casos, cada W¹ es independientemente un PEG o polímero de PEG modificado. En ciertos casos, cada W¹ se selecciona independientemente de un grupo alquilo sustituido, PEG o PEG modificado y un WSG. En ciertos casos, cada W¹ es independientemente un PEG o polímero de PEG modificado de 6-30 unidades monoméricas, tal como 6-24 o 10-30, 10-24 o 10-20, 12-24, 12-20, 12-16 o 16-20 unidades monoméricas. En algunos ejemplos de WSG no iónico ramificado, B¹ es un grupo arilo tetrasustituido (por ejemplo, un 1,3,4,5-fenilo).

30 En algunos ejemplos del WSG no iónico ramificado (por ejemplo, como se representa en las fórmulas anteriores), B¹ se selecciona de CH, N, C(=O)N y SO₂N, un grupo arilo tri-sustituido (por ejemplo, un 1,3,5-fenilo), un grupo arilo tetra-

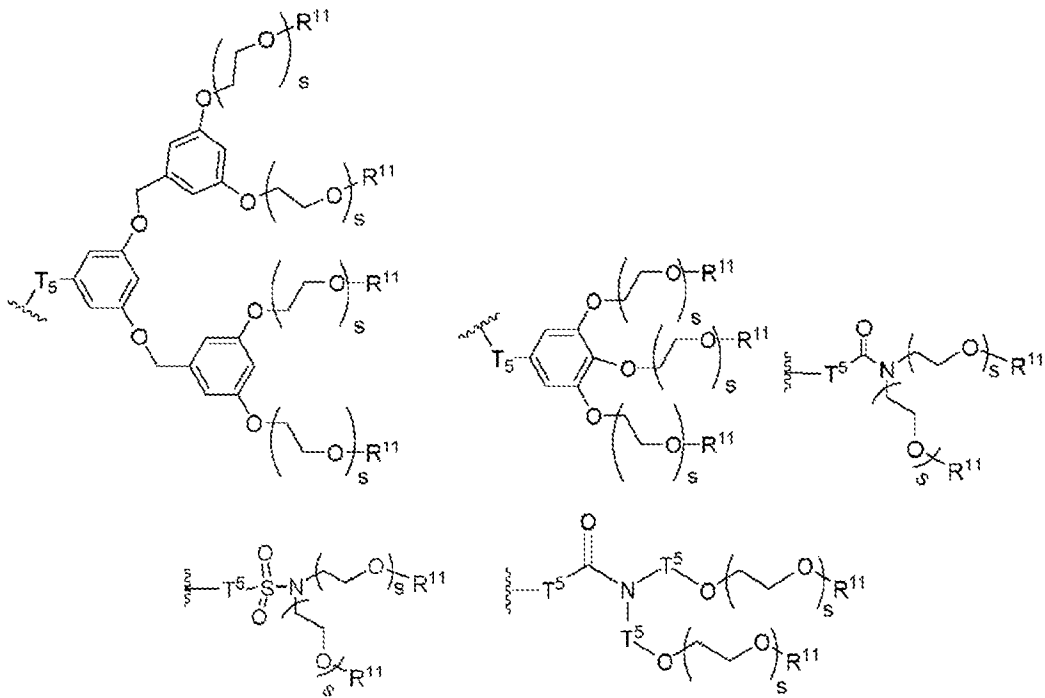
sustituido y un grupo heteroarilo tri-sustituido. En algunos ejemplos del WSG no iónico ramificado, cada p es 0. En algunos ejemplos del WSG no iónico ramificado, p es 1, y cada T¹ se selecciona de -(CH₂)_n-O-, -O-(CH₂)_n-, -(CH₂)_n- y -O-, en donde n es de 1 a 12, por ejemplo, de 1 a 6. En algunos ejemplos del WSG no iónico ramificado, cada T² y/o T³ es independientemente un enlazador de alquilo C1-C12, por ejemplo, un enlazador de alquilo C1-C6, en donde uno o más átomos de la cadena principal están opcionalmente sustituidos con un heteroátomo.

5

En algunos ejemplos de los multicromóforos objeto, los grupos cromóforos donadores colgantes se sustituyen con uno o más grupos solubilizantes en agua (WSG) seleccionados independientemente de las siguientes fórmulas:



10



en donde:

T⁵ es un enlazador opcional;

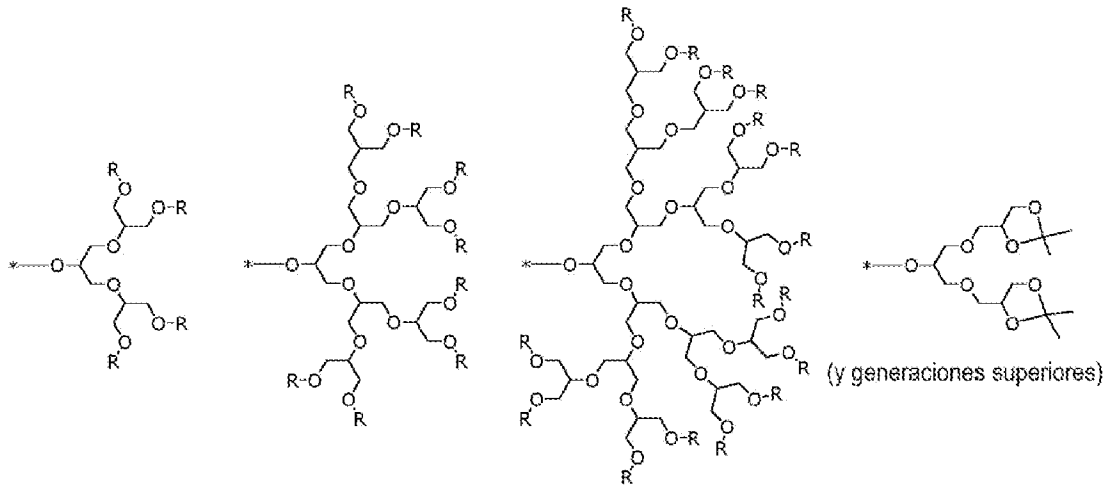
5 cada T⁶ es un enlazador;

R¹¹ y R son independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y

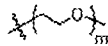
cada s es un número entero de 1 a 100 (por ejemplo, 6 a 100 o 6 a 50).

En ciertos casos, cada s es independientemente de 6 a 30, tal como de 6 a 24, de 6 a 20, de 11 a 20, de 12 a 20, de 12 a 18 o de 12 a 16. En ciertos casos, cada s es independientemente de 6 a 30, tal como de 6 a 24, de 8 a 24, de 10 a 24, de 12 a 24, de 13 a 24, de 14 a 24, de 15 a 22 o de 16 a 20. En algunos casos, cada s es independientemente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24. En algunos ejemplos, cada s es independientemente 7 o más, tal como 8, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, o incluso más, y en algunos casos, tiene hasta 50 unidades monoméricas, tal como hasta 40, hasta 30 o hasta 24 unidades monoméricas. En algunos casos, cada s es independientemente 6-30 unidades monoméricas, tal como 6-24 o 10-30, 10-24 o 10-20, 12-24, 12-20, 12-16 o 16-20 unidades monoméricas. En algunos casos, cada s es el mismo. En algunos ejemplos del WSG, T⁵ y/o T⁶ es un enlazador de alquilo C1-C12, por ejemplo, un enlazador de alquilo C1-C6, en donde uno o más átomos de la cadena principal están opcionalmente sustituidos con un heteroátomo (por ejemplo, un -O-). En algunos ejemplos del WSG, cada R¹¹ es H. En algunos ejemplos del WSG, cada R¹¹ es metilo.

Se entiende que pueden utilizarse cadenas de PEG terminadas en hidroxilo en lugar de cadenas de PEG terminadas en metoxi en cualquiera de los grupos WSG descritos anteriormente. En ciertos casos de una cualquiera de las fórmulas descritas en el presente documento, una o más de las unidades de repetición o grupos colgantes está sustituida con un WSG que es un dendrón seleccionado de una de las siguientes estructuras:

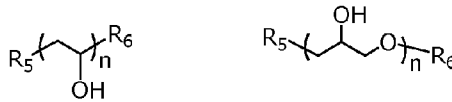


en donde R = H, CH₃



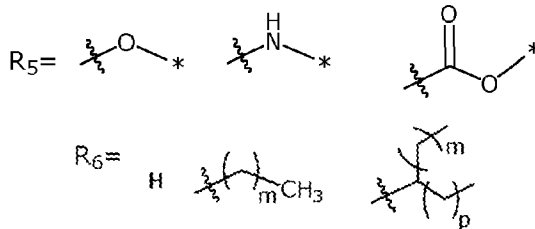
m = 1-16

- 5 En ciertos casos de una cualquiera de las fórmulas descritas en el presente documento, una o más de las unidades de repetición o grupos colgantes está sustituido con un WSG que es un polioli seleccionado de una de las siguientes estructuras:



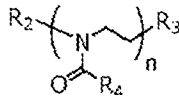
n = 1-50

10



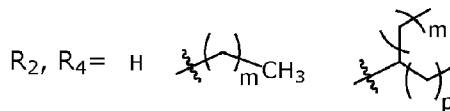
m, p = 0-10

En ciertos casos de una cualquiera de las fórmulas descritas en el presente documento, una o más de las unidades de repetición o grupos colgantes está sustituido con WSG que es una oxazolona de la siguiente estructura:

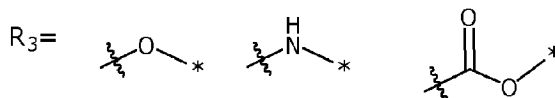


15

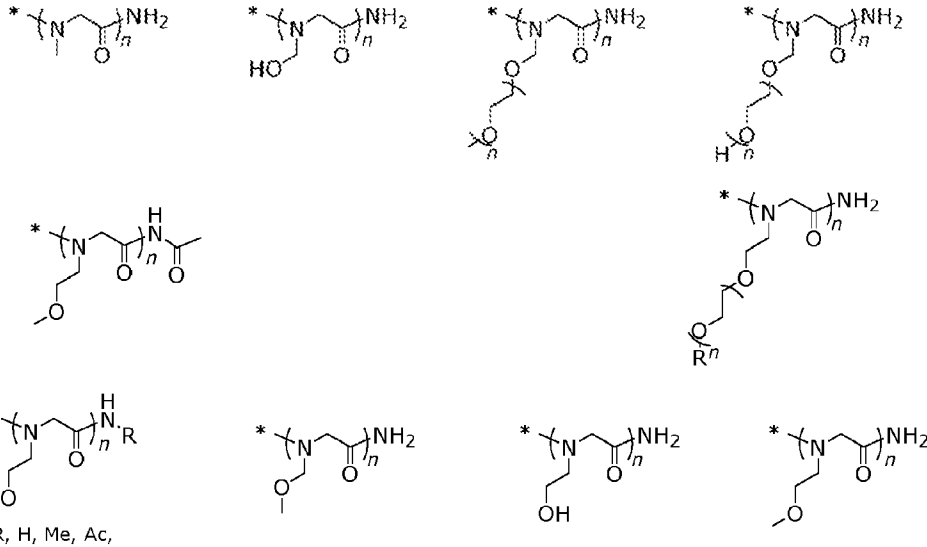
n = 1-50



m, p = 0-10



En ciertos casos de una cualquiera de las fórmulas descritas en el presente documento, una o más de las unidades de repetición o grupos colgantes está sustituido con un WSG que es un peptoide seleccionado de una de las siguientes estructuras:



5

10

15

El grupo soluble en agua (WSG) puede ser capaz de conferir solubilidad en agua en exceso de 10 mg/ml al multicromóforo o colorante polimérico en tándem, tal como en exceso de 20 mg/ml, en exceso de 30 mg/ml, en exceso de 40 mg/ml, en exceso de 50 mg/ml, en exceso de 60 mg/ml, en exceso de 70 mg/ml, en exceso de 80 mg/ml, en exceso de 90 mg/ml o en exceso de 100 mg/ml. En ciertos casos, el grupo soluble en agua (WSG) no iónico ramificado es capaz de conferir solubilidad en agua (por ejemplo, un tampón acuoso) de 20 mg/ml o más al multicromóforo o colorante polimérico en tándem, tal como 30 mg/ml o más, 40 mg/ml o más, 50 mg/ml o más, 60 mg/ml o más, 70 mg/ml o más, 80 mg/ml o más, 90 mg/ml o más, 100 mg/ml o más, o incluso más. Se entiende que los multicromóforos solubles en agua pueden, en ciertas condiciones, formar nanopartículas solvatadas en agua discretas en sistemas acuosos. En ciertos casos, las nanopartículas solvatadas en agua son resistentes a la agregación y encuentran uso en una variedad de ensayos biológicos.

20

La cadena principal polimérica del multicromóforo puede tener cualquier longitud conveniente. En algunos casos, el número particular de unidades de repetición monoméricas del multicromóforo puede estar dentro del intervalo de 2 a 500.000, tal como de 2 a 100.000, de 2 a 30.000, de 2 a 10.000, de 2 a 3.000 o de 2 a 1.000 unidades o segmentos, o tal como de 5 a 100.000, de 10 a 100.000, de 100 a 100.000, de 200 a 100.000 o de 500 a 50.000 unidades o segmentos. En algunos casos, el número particular de unidades o segmentos de repetición monoméricos de la cadena principal polimérica del multicromóforo puede estar dentro del intervalo de 2 a 1.000, tal como de 2 a 500, de 2 a 500, de 3 a 500, de 4 a 500, de 5 a 500, de 6 a 500, de 7 a 500, de 8 a 500, de 9 a 500, de 10 a 500, de 10 a 400, de 10 a 300, de 10 a 200, de 10 a 100, o de 20 a 100 unidades o segmentos.

25

El multicromóforo puede ser de cualquier peso molecular (PM) conveniente. En algunos casos, el PM del multicromóforo puede expresarse como un peso molecular promedio. En algunos casos, el colorante polimérico tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 500 a 500.000, tal como de 1.000 a 100.000, de 2.000 a 100.000 (por ejemplo, de 2.000 a 10.000 o de 10.000 a 100.000) o incluso un peso molecular promedio en el intervalo de 50.000 a 100.000. En algunos casos, la cadena principal polimérica del multicromóforo se prepara con una secuencia particular y diferenciada de monómeros de manera que el PM del multicromóforo pueda expresarse como un peso molecular exacto. En algunos casos, el colorante polimérico tiene un peso molecular exacto en el intervalo de 500 a 500.000, tal como de 1.000 a 100.000, de 1.000 a 50.000, de 2.000 a 50.000 (por ejemplo, de 2.000 a 10.000 o de 10.000 a 50.000) o incluso un peso molecular promedio en el intervalo de 50.000 a 100.000.

30

COLORANTES POLIMÉRICOS EN TÁNDEM

35

Como se ha resumido anteriormente, el multicromóforo de recolección de luz objeto puede incluir una cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas que incluyen una pluralidad de grupos cromóforos donadores colgantes, grupos que pueden estar unidos cada uno a una de las unidades de repetición. Como se ha descrito anteriormente, los multicromóforos de recolección de luz solubles en agua objeto son capaces de una transferencia de energía homogénea entre cromóforos donadores colgantes que puede conducir a una transferencia de energía reversible continua entre cromóforos iguales en lugar de la emisión desde un único cromóforo. Como tal, aunque el sistema de multicromóforo puede ser fluorescente por sí mismo, a través del proceso de autoextinción ilustrado en la figura 6A, el sistema de multicromóforo puede tener rendimientos cuánticos que son significativamente menores que los observados para un único cromóforo aislado.

40

El multicromóforo de recolección de luz soluble en agua es capaz de transferir energía a un fluoróforo aceptor unido. Véase, por ejemplo, la figura 6B. Como tal, los colorantes poliméricos en tándem objeto incluyen además un fluoróforo de señalización aceptor unido covalentemente en proximidad receptora de energía al sistema de multicromóforo de recolección de luz solvatado con agua donador, es decir, en proximidad receptora de energía a al menos un grupo cromóforo donador colgante. Los términos “fluoróforo aceptor” y “cromóforo aceptor” se usan indistintamente en el presente documento.

El fluoróforo de señalización aceptor puede estar unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica como grupo colgante. La excitación del donador multicromóforo puede conducir a la transferencia de energía a, y la emisión de, el fluoróforo de señalización aceptor unido covalentemente. El número de unidades de repetición del multicromóforo de recolección de luz solvatado con agua donador que tiene grupos fluoróforos de señalización aceptores unidos puede variar, donde, en algunos casos, el número varía del 1 % en moles al 50 % en moles de las unidades de repetición, tal como del 1 % en moles al 25 % en moles, del 2 % en moles al 25 % en moles, del 3 % en moles al 25 % en moles, del 4 % en moles al 25 % en moles, del 5 % en moles al 25 % en moles o del 10 % en moles al 25 % en moles.

Los mecanismos para la transferencia de energía entre los cromóforos de recolección de luz del multicromóforo y de estos cromóforos donadores a un fluoróforo de señalización aceptor unido incluyen, por ejemplo, transferencia de energía resonante (por ejemplo, transferencia de energía de resonancia de Förster (o fluorescencia), FRET), intercambio de carga cuántica (transferencia de energía de Dexter) y similares. Estos mecanismos de transferencia de energía pueden ser de alcance relativamente corto; es decir, la estrecha proximidad de los cromóforos del sistema de multicromóforo de recolección de luz entre sí y/o a un fluoróforo aceptor proporciona una transferencia de energía eficaz.

En condiciones para una transferencia de energía eficiente, puede producirse la amplificación de la emisión del fluoróforo aceptor cuando la emisión del fluoróforo aceptor luminiscente es más intensa cuando la luz incidente (la “luz de bombeo”) está a una longitud de onda que se absorbe por, y se transfiere desde, los cromóforos del multicromóforo de recolección de luz que cuando el fluoróforo aceptor luminiscente se excita directamente por la luz de bombeo.

Por transferencia de energía “eficiente” se entiende el 10 % o más, tal como el 20 % o más o el 30 % o más, el 40 % o más, el 50 % o más, de la energía recolectada por los cromóforos donadores que se transfiere al aceptor. Por “amplificación” quiere decirse que la señal del fluoróforo aceptor es 1,5x o mayor cuando se excita por transferencia de energía del sistema de multicromóforo de recolección de luz donador en comparación con la excitación directa del fluoróforo aceptor con luz incidente de una intensidad equivalente. La señal puede medirse usando cualquier método conveniente. En algunos casos, la señal 1,5x o mayor se refiere a una intensidad de luz emitida. En ciertos casos, la señal 1,5x o mayor se refiere a una razón de señal con respecto a ruido aumentada. En ciertos ejemplos del colorante polimérico en tándem, la emisión del fluoróforo aceptor es 1,5 veces mayor o más cuando se excita por el multicromóforo en comparación con la excitación directa del fluoróforo aceptor con luz incidente, tal como 2 veces o mayor, 3 veces o mayor, 4 veces o mayor, 5 veces o mayor, 6 veces o mayor, 8 veces o mayor, 10 veces o mayor, 20 veces o mayor, 50 veces o mayor, 100 veces o mayor, o incluso mayor en comparación con la excitación directa del fluoróforo aceptor con la luz incidente.

Puede utilizarse cualquier colorante fluorescente conveniente en los colorantes poliméricos en tándem como fluoróforo aceptor. Los términos “colorante fluorescente” y “fluoróforo” se usan indistintamente en el presente documento. El fluoróforo aceptor (por ejemplo, cada A¹) puede ser un fluoróforo de molécula pequeña. El fluoróforo aceptor (por ejemplo, cada A¹) puede ser una molécula de colorante seleccionada de una rodamina, una cumarina, un xanteno, una cianina, una polimetina, un pireno, una tiazina, una acridina, un borodifluoruro de dipirrometeno, una naftalimida, una ficobiliproteína, una proteína clorofila peridinio, conjugados de los mismos y combinaciones de los mismos. En ciertos ejemplos, el fluoróforo aceptor (A¹) es un colorante de cianina, un colorante de xanteno, un colorante de cumarina, un colorante de tiazina o un colorante de acridina. En algunos casos, el fluoróforo aceptor (A¹) se selecciona entre DY 431, DY 485XL, DY 500XL, DY 610, DY 640, DY 654, DY 682, DY 700, DY 701, DY 704, DY 730, DY 731, DY 732, DY 734, DY 752, DY 778, DY 782, DY 800, DY 831, Biotium CF 555, Cy 3.5 y dietilaminocumarina. Los colorantes fluorescentes de interés incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, 6-FAM, rodamina, rojo Texas, tetrametilrodamina, carboxirodamina, carboxirodamina 6G, carboxirodol, carboxirodamina 110, azul cascada, amarillo cascada, cumarina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-cromo, ficoeritrina, PerCP (proteína clorofila a peridina), PerCP-Cy5.5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y-6)-carboxi-X-rodamina), HEX, amarillo lucifer, azul marina, verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 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, Alexa Fluor 700, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético, BODIPY FL, BODIPY FL-Br.sub.2, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, conjugados de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los quelatos de lantánidos de interés incluyen, pero no se limitan a, quelatos de europio, quelatos de terbio y quelatos de samario. En algunos ejemplos, el colorante polimérico en tándem incluye un multicromóforo unido a un fluoróforo aceptor seleccionado de Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Alexa 488, Alexa 647 y Alexa 700. En ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem incluye un multicromóforo unido a un fluoróforo aceptor seleccionado de colorantes Dyomics (tales como DY 431, DY 485XL, DY 500XL, DY 530, DY 610, DY 633, DY 640, DY 651, DY 654, DY 682, DY 700, DY 701, DY 704, DY 731, DY 732, DY 734, DY 752, DY 754, DY 778, DY 782, DY 800 o DY 831), Biotium CF 555, Cy 3.5 y dietilaminocumarina.

En algunos casos, el fluoróforo aceptor es un grupo BODIPY, por ejemplo, un grupo BODIPY de cualquiera de las fórmulas (XI)-(XIXa) o cualquier ejemplo de los mismos descritos en el presente documento. Se entiende que cualquier grupo BODIPY conveniente descrito en el presente documento que tenga un perfil de absorción y emisión adecuado puede configurarse como fluoróforo aceptor en proximidad receptora de energía al sistema de multicromóforo de recolección de luz solvatado con agua donador, es decir, en proximidad receptora de energía a al menos un grupo cromóforo donador colgante compatible.

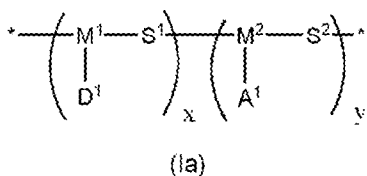
En algunos ejemplos, el fluoróforo aceptor que se selecciona tiene una longitud de onda máxima de emisión en el intervalo de 300 a 900 nm, tal como de 350 a 850 nm, de 350 a 600 nm, de 360 a 500 nm, de 370 a 500 nm, de 380 a 500 nm, de 390 a 500 nm o de 400 a 500 nm, donde los ejemplos específicos de máximos de emisión del cromóforo de señalización de interés incluyen, pero no se limitan a: 395 nm ± 5 nm, 420 nm ± 5 nm, 430 nm ± 5 nm, 440 nm ± 5 nm, 450 nm ± 5 nm, 460 nm ± 5 nm, 470 nm ± 5 nm, 480 nm ± 5 nm, 490 nm ± 5 nm, 500 nm ± 5 nm, 510 nm ± 5 nm, 520 nm ± 5 nm, 530 nm ± 5 nm, 540 nm ± 5 nm, 550 nm ± 5 nm, 560 nm ± 5 nm, 570 nm ± 5 nm, 580 nm ± 5 nm, 590 nm ± 5 nm, 605 nm ± 5 nm, 650 nm ± 5 nm, 680 nm ± 5 nm, 700 nm ± 5 nm, 805 nm ± 5 nm.

La emisión de fluoróforo aceptor luminiscente unido del colorante polimérico en tándem puede tener un rendimiento cuántico de 0,03 o más, tal como un rendimiento cuántico de 0,04 o más, 0,05 o más, 0,06 o más, 0,07 o más, 0,08 o más, 0,09 o más, 0,1 o más, 0,15 o más, 0,2 o más, 0,3 o más o incluso más. En algunos casos, el colorante polimérico en tándem tiene un coeficiente de extinción de $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, tal como $6 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $7 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $8 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $9 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, tal como $1 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $1,5 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $2 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $2,5 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $3 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $4 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $5 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $6 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, $7 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más, u $8 \times 10^6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ o más. En algunos ejemplos, el colorante polimérico en tándem tiene un coeficiente de extinción molar de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más. En ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem tiene un coeficiente de extinción molar de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más.

Los colorantes poliméricos en tándem objeto pueden proporcionar emisiones de fluorescencia de colorantes cromóforos de señalización luminiscentes que son más brillantes que las emisiones que son posibles a partir de tales colorantes luminiscentes de forma aislada. La emisión del cromóforo de señalización luminiscente unido del colorante polimérico en tándem puede tener un brillo de $50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, tal como $60 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $70 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $80 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $90 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $100 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $150 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $200 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $250 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, $300 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o más, o incluso más. En ciertos casos, la emisión del cromóforo de señalización unido del colorante polimérico en tándem tiene un brillo que es al menos 5 veces mayor que el brillo de un colorante luminiscente excitado directamente, tal como al menos 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 300 veces mayor, o incluso mayor que el brillo de un colorante luminiscente excitado directamente.

Los colorantes poliméricos en tándem objeto pueden proporcionar emisiones de fluorescencia que tienen un desplazamiento de Stokes de 100 nm o más, tal como 110 nm o más, 120 nm o más, 130 nm o más, 140 nm o más, o 150 nm o más. En algunos casos, el desplazamiento de Stokes es de 300 nm o menos, tal como de 200 nm o menos.

En algunos ejemplos, un colorante polimérico en tándem incluye un multicromóforo de recolección de luz soluble en agua de una cualquiera de las fórmulas (I)-(IX), donde la etiqueta quimioselectiva Z¹ se reemplaza con un grupo fluoróforo aceptor (A¹). Se entiende que cualquiera de los ejemplos de los multicromóforos objeto de fórmulas (I)-(IX) también puede ponerse en práctica para un colorante polimérico en tándem de la presente divulgación. En ciertos casos de las fórmulas (I)-(IX), uno o más de los grupos Z¹ pueden conjugarse con un precursor fluoróforo aceptor para proporcionar un grupo fluoróforo aceptor (A¹). Como tal, el colorante polimérico en tándem puede incluir un segmento de fórmula (Ia):



en donde:

cada M¹ y M² es independientemente un comonomero insaturado (por ejemplo, un comonomero de arilo o heteroarilo);

cada S¹ y S² es independientemente una unidad espaciadora no conjugada;

cada D¹ es independientemente un cromóforo donador colgante (por ejemplo, como se describe en el presente documento) unido a M¹;

cada A¹ es independientemente un fluoróforo aceptor unido a M²;

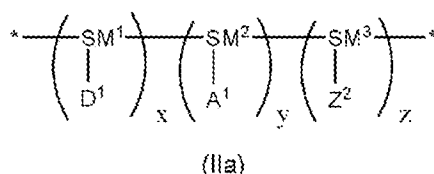
x es el 75 % en moles o más; y

y es el 25 % en moles o menos.

5 Las unidades de repetición primera (M^1-S^1) y segunda (M^2-S^2) puede disponerse en una configuración aleatoria o de bloques conjuntos. En ciertos casos de fórmula (Ia), los grupos colgantes D^1 de las primeras unidades de repetición incluyen dos o más (por ejemplo, dos o tres) tipos distintos de cromóforos absorbentes de luz colgantes que juntos proporcionan un sistema de multicromóforo de recolección de luz. En ciertos casos de fórmula (Ia), los grupos colgantes D^1 de las primeras unidades de repetición son todos los mismos.

10 En algunos casos de fórmula (Ia), x es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (Ia), y es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos.

En algunos casos, el colorante polimérico en tándem incluye un segmento de fórmula (IIa):



en donde:

15 la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonómeros SM^1 , SM^2 y SM^3 que son cada uno independientemente un comonómero no conjugado;

cada D^1 es independientemente un cromóforo donador colgante unido a SM^1 ;

cada A^1 es independientemente un fluoróforo aceptor unido a SM^2 ;

cada Z^2 es un grupo de cadena lateral opcional unido a SM^3 ;

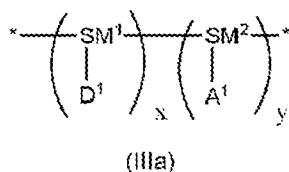
20 x es el 50 % en moles o más; y

y+z es el 50 % en moles o menos.

25 Z^2 puede estar ausente o ser cualquier grupo de cadena lateral conveniente, tal como un cromóforo absorbente de luz, una etiqueta quimioselectiva, un enlazador, una biomolécula unida, un fluoróforo aceptor, un WSG, etc. En ciertos casos de fórmula (IIa), SM^3 es un comonómero espaciador en donde Z^2 está ausente. En ciertos casos de fórmula (IIa), SM^3 es un comonómero que incluye un grupo Z^2 que es un segundo cromóforo colgante absorbente de luz, donde cada D^1 y cada Z^2 proporcionan juntos un sistema de multicromóforo de recolección de luz. En algunos casos, SM^3 es un comonómero que incluye una segunda etiqueta quimioselectiva (Z^2), por ejemplo, un grupo funcional protegido o una etiqueta que es ortogonal a Z^1 que proporciona la instalación selectiva de un resto de interés.

30 En ciertos casos de fórmula (IIa), x es el 60 % en moles o más, tal como el 65 % en moles o más, el 70 % en moles o más, el 75 % en moles o más, el 80 % en moles o más, el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, o incluso más. En ciertos casos de fórmula (IIa), y+z es el 40 % en moles o menos, tal como el 30 % en moles o menos, el 25 % en moles o menos, el 20 % en moles o menos, el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, o incluso menos. En ciertos casos de fórmula (IIa), y es al menos el 1 % en moles y el 25 % en moles o menos, tal como el 20 % en moles o menos, el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, o incluso menos. En ciertos casos de fórmula (IIa), z es al menos el 1 % en moles y el 10 % en moles o menos, tal como el 5 % en moles o menos, o incluso menos.

En algunos casos, el colorante polimérico en tándem incluye un segmento de fórmula (IIIa):



en donde:

40 la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonómeros SM^1 y SM^2 que son cada uno independientemente un comonómero no conjugado;

cada D¹ es independientemente un cromóforo donador colgante unido a SM¹;

cada A¹ es independientemente un fluoróforo aceptor unido a SM²;

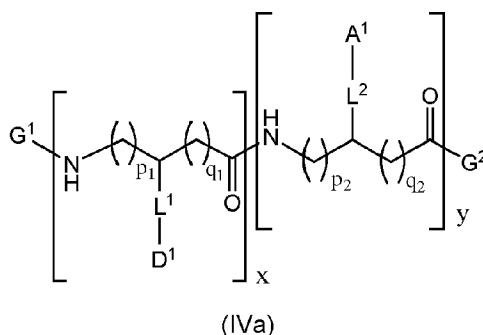
x es el 75 % en moles o más; y

y es el 25 % en moles o menos.

5 En ciertos ejemplos de fórmula (IIIa), SM¹ y SM² son cada uno independientemente un comonomero no conjugado saturado, por ejemplo, un comonomero que proporciona solo enlaces C-C covalentes sencillos. En algunos ejemplos de fórmula (IIIa), SM¹ y SM² son cada uno independientemente un comonomero no conjugado parcialmente saturado, por ejemplo, un comonomero que proporciona un doble enlace covalente C=C aislado en una cadena principal de enlaces covalentes saturados. Las unidades de repetición primera y segunda (SM¹ y SM²) de fórmula (IIIa) pueden estar dispuestas en una configuración aleatoria, una configuración de bloque o bloque conjunto, o en una secuencia particular. En ciertos casos de fórmula (IIIa), los grupos colgantes D¹ del SM¹ incluyen dos o más (por ejemplo, dos o tres) tipos distintos de cromóforos absorbentes de luz colgantes que juntos proporcionan un sistema de multicromóforo de recolección de luz. En ciertos casos de fórmula (IIIa), los grupos colgantes D¹ de las primeras unidades de repetición son todos los mismos.

15 En algunos casos de fórmula (IIIa), x es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (IIIa), y es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos.

20 En ciertos casos, el colorante polimérico en tándem es de fórmula (IVa):



en donde:

cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada A¹ es independientemente un fluoróforo aceptor;

25 cada L¹ y L² son independientemente un enlazador;

p₁ y q₁ son independientemente 0 o 1, en donde p₁ + q₁ ≤ 1;

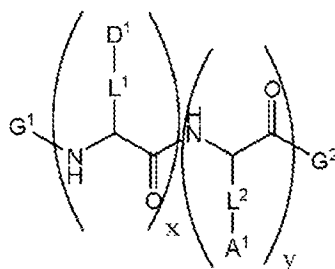
p₂ y q₂ son independientemente 0 o 1, en donde p₂ + q₂ ≤ 1;

x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

30 G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo absorbente de luz (por ejemplo, donador), un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

35 En algunos ejemplos de fórmula (IVa), p₁ y p₂ son cada uno 0 y q₁ y q₂ son cada uno 1 (por ejemplo, residuos de β3-aminoácidos). En algunos ejemplos de fórmula (IVa), p₁ y p₂ son cada uno 1 y q₁ y q₂ son cada uno 0 (por ejemplo, residuos de β2-aminoácidos). En algunos casos, p₁, p₂, q₁ y q₂ son cada uno 0 y el colorante polimérico en tándem es de fórmula (Va):



en donde:

cada D^1 es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada A^1 es independientemente un fluoróforo aceptor;

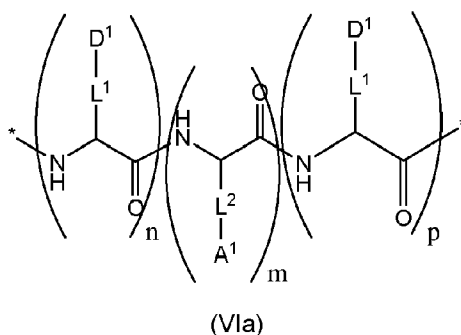
5 L^1 y L^2 son cada uno independientemente un enlazador;

x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

10 G^1 y G^2 se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo absorbente de luz (por ejemplo, donador), un enlazador y un miembro de unión específica unido. Se entiende que los multicromóforos descritos por la fórmula (Va) incluyen cualquier disposición conveniente de comonómeros en una secuencia lineal definida, que tienen en total las razones en % en moles definidas de x e y . En algunos casos, los comonómeros que contienen A^1 están espaciados por toda la secuencia de la cadena principal polimérica y como tales están siempre flanqueados en ambos lados por uno o más comonómeros que contienen D^1 .

15 En ciertos casos de fórmula (Va), el colorante polimérico en tándem incluye un segmento de fórmula (VIa):



en donde:

cada D^1 es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada A^1 es independientemente un cromóforo aceptor;

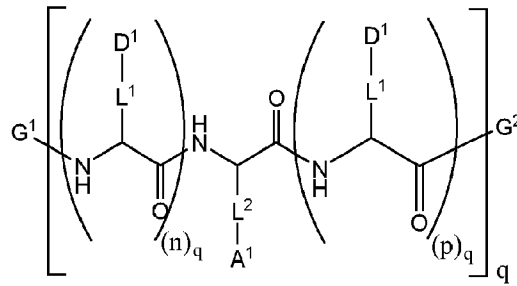
20 cada L^1 y L^2 son independientemente un enlazador;

n y p son cada uno independientemente un número entero de 1 a 20 en donde $n+p \geq 2$; y

m es 1 o 2.

25 En algunos casos de fórmula (VIa), n y p son cada uno independientemente de 1 a 10, tal como de 2 a 20, de 3 a 10 o de 3 a 6. En algunos casos de fórmula (VIa), $n+p$ es un número entero de 2 a 20, tal como de 3 a 20, de 4 a 20, de 5 a 20, de 5 a 15 o de 5 a 12. En ciertos ejemplos de fórmula (VIa), m es 1.

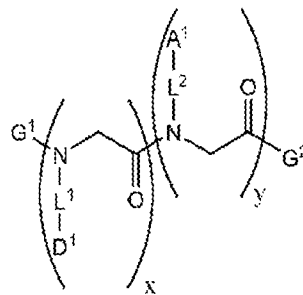
30 Los colorantes poliméricos en tándem objeto pueden incluir múltiples segmentos de fórmula (VIa) donde cada segmento incluye un comonómero que contiene A^1 aislado flanqueado por bloques de comonómeros que contienen D^1 . En algunos casos, el multicromóforo incluye dos o más segmentos de fórmula (VIa) ubicados dirigidos adyacentes entre sí para proporcionar dos comonómeros que contienen A^1 aislados separados por un bloque de 2-20 comonómeros que contienen D^1 , tales como un bloque de 3 a 20, de 4 a 20, de 5 a 20, de 5 a 15 o de 5 a 12 comonómeros que contienen D^1 . Como tal, en ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem incluye q segmentos de un copolímero de bloque y es de fórmula (VIIa):



(VIIa)

en donde: cada $(n)_q$ y cada $(p)_q$ es independientemente un número entero de 1 a 20, en donde para cada uno de los q segmentos $(n)_q + (p)_q \geq 3$; y q es un número entero de 1 a 100.

En ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem tiene la fórmula (VIIIa):



(VIIIa)

5

en donde

cada D^1 es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada A^1 es independientemente un cromóforo aceptor;

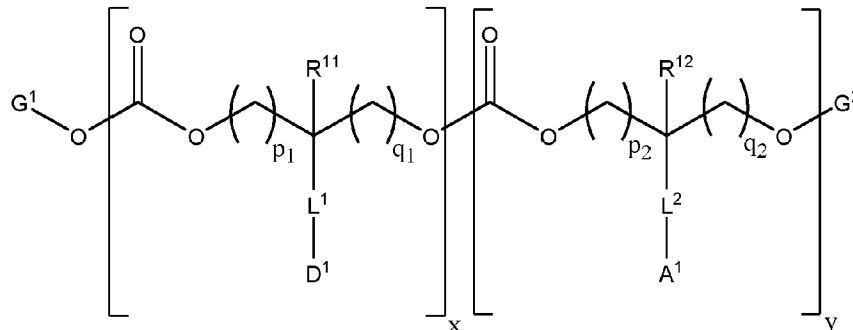
cada L^1 y L^2 es independientemente un enlazador;

10 x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

G^1 y G^2 se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

En ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem tiene la fórmula (IXa):



(IXa)

15

en donde:

cada D^1 es independientemente un cromóforo donador BODIPY colgante;

cada A^1 es independientemente un fluoróforo aceptor;

cada L¹ y L² es independientemente un enlazador;

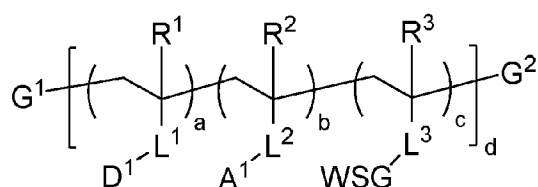
x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

5 G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

10 En algunos casos de fórmulas (IVa), (Va), (XIIIa) y (IXa), x es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (IV), (V), (XIII) y (IX), y es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5% en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos.

En ciertos ejemplos, el colorante polimérico en tándem tiene la fórmula (Xa):



en donde:

15 cada D¹ es independientemente un cromóforo donador colgante;

cada A¹ es independientemente un fluoróforo aceptor;

cada L¹, L² y L³ es independientemente un enlazador;

a, b y c son valores de % en moles para cada comonomero;

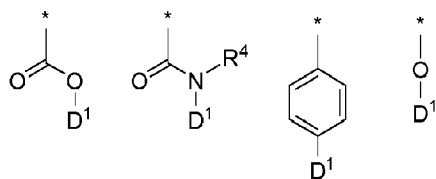
20 d representa la polimerización total o la longitud promedio del polímero (por ejemplo, d es 2-1000, tal como 2-500, 2-200, 2-100 o 2-50);

WSG es un grupo solubilizante en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento); y

G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

25 En algunos casos de fórmula (Xa), c = 0. En algunos casos de fórmula (Xa), a > 0 y b > 0. En algunos casos de fórmula (Xa), a es el 80 % en moles o más, tal como el 85 % en moles o más, el 90 % en moles o más, el 95 % en moles o más, el 96 % en moles o más, el 97 % en moles o más, el 98 % en moles o más, o el 99 % en moles o más. En algunos casos de fórmula (Xa), b es el 20 % en moles o menos, tal como el 15 % en moles o menos, el 10 % en moles o menos, el 5 % en moles o menos, el 4 % en moles o menos, el 3 % en moles o menos, el 2 % en moles o menos, el 1 % en moles o menos. En algunos casos de fórmula (Xa), a es el 65-95 % en moles, b es el 5-35 % en moles y c es el 0-30 % en moles, donde a+b+c=100 %.

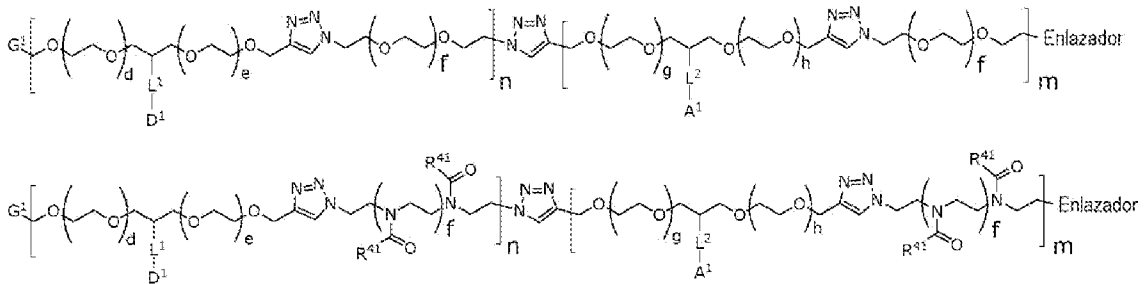
35 En ciertos casos de fórmula (Xa), cada D¹ es un grupo BODIPY unido (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos, cada colorante aceptor A¹ se elige de DY 431, DY 485XL, DY 500XL, DY 610, DY 640, DY 654, DY 682, DY 700, DY 701, DY 704, DY 730, DY 731, DY 732, DY 734, DY 752, DY 778, DY 782, DY 800, DY 831, colorantes iFluor 350, 405, 488, 514, 532, 594, 660, 680, 700, 710, 790, colorantes Tide Fluor 5WS, 7WS, 8ws, ICG, colorantes basados en BODIPY, Biotium CF 555, Cy 3.5 y dietilaminocumarina. En ciertos casos de fórmula (Xa), L¹-D¹ se selecciona de los siguientes:



en donde R⁴ es H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido y WSG.

Alternativamente, en algunos casos de fórmula (Xa), pueden elegirse pares de colorantes donadores y aceptores D¹ y A¹ entre los siguientes: colorantes Dyomics DY 431, DY 485XL, DY 500XL, DY 610, DY 640, DY 654, DY 682, DY 700, DY 701, DY 704, DY 730, DY 731, DY 732, DY 734, DY 752, DY 778, DY 782, DY 800, DY 831, colorantes iFluor 350, 405, 488, 514, 532, 594, 660, 680, 700, 710, 790, colorantes Tide Fluor 5WS, 7WS, 8ws, ICG, colorantes basados en BODIPY, Biotium CF 555, Cy 3.5 y dietilaminocumarina. En ciertos casos de fórmula (Xa), el WSG es un grupo solubilizante en agua como se describe en uno cualquiera de los ejemplos y estructuras de tales grupos descritos en el presente documento.

En ciertos casos, el colorante polimérico en tándem se deriva de un multicromóforo de fórmula (XXI), en donde la etiqueta quimioselectiva Z¹ de SM² se conjuga con un fluoróforo aceptor. Como tales, se muestran estructuras de colorante polimérico en tándem a modo de ejemplo en el ejemplo 3 de la sección experimental y en las siguientes estructuras:



en donde:

G¹ es un grupo terminal (por ejemplo, como se describe en el presente documento);

L¹ y L² son independientemente un enlazador;

D¹ es un cromóforo colgante (por ejemplo, como se describe en este documento);

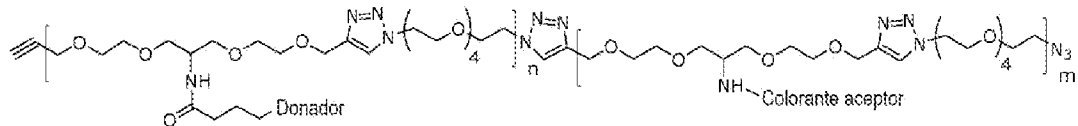
A¹ es un fluoróforo aceptor;

cada d, e, f, g y h son independientemente 1-6;

cada n y m es independientemente 1-1000 (por ejemplo, 2-1000, 2-500, 2-100 o 2-50);

cada R⁴¹ se selecciona de alquilo, alquilo sustituido y WSG; y

“Enlazador” es un enlazador que incluye un grupo funcional quimioselectivo opcional, por ejemplo, para la conjugación con un comonomero o una biomolécula. En cierto caso, cada D¹ es un grupo cromóforo BODIPY (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos, el colorante polimérico en tándem derivado de la fórmula (XXI) se describe por la siguiente estructura general:



donde cada n y m es independientemente 1-1000 (por ejemplo, 2-1000, 2-500, 2-100 o 2-50). En algunos casos, el cromóforo donador es un cromóforo BODIPY (por ejemplo, como se describe en el presente documento), y el colorante aceptor se selecciona de DY 431, DY 485XL, DY 500XL, DY 610, DY 640, DY 654, DY 682, DY 700, DY 701, DY 704, DY 730, DY 731, DY 732, DY 734, DY 752, DY 778, DY 782, DY 800, DY 831, colorantes iFluor 350, 405, 488, 514, 532, 594, 660, 680, 700, 710, 790, colorantes Tide Fluor 5WS, 7WS, 8ws, ICG, colorantes basados en BODIPY, Biotium CF 555, Cy 3.5 y dietilaminocumarina.

Miembros de unión específica marcados

Los aspectos de la presente divulgación incluyen miembros de unión específica marcados. Un miembro de unión específica marcado es un conjugado de un colorante polimérico objeto (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y un miembro de unión específica. Cualquiera de los colorantes poliméricos o colorantes poliméricos en tándem descritos en el presente documento puede conjugarse con un miembro de unión específica. El miembro de unión específica y el colorante polimérico pueden conjugarse (por ejemplo, unirse covalentemente) entre sí en cualquier ubicación conveniente de las dos moléculas, a través de un enlazador opcional. En algunos ejemplos, el

miembro de unión específica marcado es resistente a la agregación. Como se usa en el presente documento, por "resistente a la agregación" quiere decirse un miembro de unión específica marcado capaz de formar una composición acuosa homogénea sin precipitado agregado a una concentración de 1 mg/ml o más en un tampón acuoso de interés, tal como 2 mg/ml o más, 3 mg/ml o más, 4 mg/ml o más, 5 mg/ml o más, 6 mg/ml o más, 7 mg/ml o más, 8 mg/ml o más, 9 mg/ml o más, 10 mg/ml o más o incluso más del miembro de unión específica marcado.

En ciertos ejemplos, el miembro de unión específica marcado comprende: un colorante polimérico solvatado en agua que tiene un espectro de excitación ultravioleta profundo y que comprende un segmento de comonomeros conjugados en π y una unidad de repetición modificadora de la conjugación; y un miembro de unión específica unido covalentemente al multicromóforo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "miembro de unión específica" se refiere a un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Un miembro del par de moléculas puede tener un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente a un área en la superficie de, o una cavidad en, el otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí para producir un complejo de unión. En algunos ejemplos, la afinidad entre miembros de unión específica en un complejo de unión se caracteriza por una K_d (constante de disociación) de 10^{-6} M o menos, tal como 10^{-7} M o menos, incluyendo 10^{-8} M o menos, por ejemplo, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, incluyendo 10^{-15} M o menos. En algunos ejemplos, los miembros de unión específica se unen específicamente con alta avidez. Por alta avidez quiere decirse que el miembro de unión se une específicamente con una afinidad aparente caracterizada por una K_d aparente de 10×10^{-9} M o menos, tal como 1×10^{-9} M o menos, 3×10^{-10} M o menos, 1×10^{-10} M o menos, 3×10^{-11} M o menos, 1×10^{-11} M o menos, 3×10^{-12} M o menos o 1×10^{-12} M o menos.

El miembro de unión específica puede ser proteínico. Como se usa en el presente documento, el término "proteínico" se refiere a un resto que está compuesto por residuos de aminoácidos. Un resto proteínico puede ser un polipéptido. En ciertos casos, el miembro de unión específica proteínico es un anticuerpo. En ciertos ejemplos, el miembro de unión específica proteínico es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de unión de un anticuerpo que se une específicamente a un colorante polimérico. Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "molécula de anticuerpo" se usan indistintamente y se refieren a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo, en seres humanos, incluyen los loci genéticos de cadena kappa (κ), lambda (λ) y pesada, que juntos comprenden la miríada de genes de región variable, y los genes de región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ) y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, respectivamente. Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "marco" (FR) interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de la región marco y las CDR se ha definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1991)). La numeración de todas las secuencias de aminoácidos de anticuerpos analizadas en el presente documento se ajusta al sistema de Kabat. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. El término anticuerpo pretende incluir anticuerpos de longitud completa y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un anticuerpo generado de manera recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros fines como se define adicionalmente a continuación.

Los fragmentos de anticuerpos de interés incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos, producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden tener otras actividades específicas sobre las células (por ejemplo, anticuerpos antagonistas, agonistas, neutralizantes, inhibidores o estimuladores). Se entiende que los anticuerpos pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones del anticuerpo.

En ciertos ejemplos, el miembro de unión específica es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un diacuerpo o un triacuerpo. En ciertos ejemplos, el miembro de unión específica es un anticuerpo. En algunos casos, el miembro de unión específica es un anticuerpo murino o fragmento de unión del mismo. En ciertos casos, el miembro de unión específica es un anticuerpo recombinante o fragmento de unión del mismo.

En algunos ejemplos, el miembro de unión específica marcado incluye: un multicromóforo de recolección de luz solvatado en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento); y un cromóforo de señalización unido covalentemente al multicromóforo en proximidad receptora de energía con el mismo (por ejemplo, como se describe en el presente documento); y un miembro de unión específica unido covalentemente al multicromóforo. En algunos casos del miembro de unión específica marcado, el multicromóforo de cualquiera de la fórmula descrita en el presente documento, en donde G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal (por ejemplo, grupo de extremo), un enlazador y un miembro de unión específica unido, en donde al menos uno de G¹ y G² es un miembro de unión específica unido.

En ciertos ejemplos de las fórmulas descritas en el presente documento, G^1 y/o G^2 es un enlazador, tal como un enlazador que incluye un grupo funcional adecuado para la conjugación a un resto de unión específica. Se entiende que los enlazadores ubicados en las posiciones G^1 y/o G^2 del multicromóforo pueden seleccionarse para que sean ortogonales a cualquier otro enlazador, incluyendo etiquetas quimioselectivas (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que pueden estar presentes en una cadena lateral del multicromóforo (por ejemplo, en Z^2). En ciertos ejemplos, se incluye un grupo funcional amino o derivado del mismo en G^1 y/o G^2 y se incluye un grupo funcional ácido carboxílico o derivado del mismo en Z^2 . En ciertos ejemplos, se incluye un grupo funcional ácido carboxílico o derivado del mismo en G^1 y/o G^2 y se incluye un grupo funcional amino o derivado del mismo en Z^2 .

En algunos ejemplos de las fórmulas descritas en el presente documento, al menos uno de G^1 y G^2 es $-L^3-Z^4$ en donde L^3 es un enlazador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y Z^4 es un miembro de unión específica (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos ejemplos de fórmulas descritas en el presente documento, al menos uno de G^1 y G^2 es $-L^3-Z^3$ en donde L^3 es un enlazador (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y Z^3 es una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Cualquier marcador quimioselectivo conveniente y química de conjugación pueden adaptarse para su uso en los multicromóforos objeto. Las etiquetas quimioselectivas de interés incluyen, pero no se limitan a, amina, éster activo, maleimida, tiol, química de intercambio de fluoruro de azufre(VI) (SuFEX), fluoruro de sulfonilo, reactivos click de cicloadición de Diers Alder y química click, tetrazina, transcicloocteno, aldehído, alcoxilamina, alquinos, ciclooctinos, azida y similares. En algunos casos, Z^3 se selecciona del grupo que consiste en ácido carboxílico, éster activo (por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) o sulfo-NHS), amino, maleimida, yodoacetilo y tiol.

Las biomoléculas de interés incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos, hidratos de carbono, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales de los mismos y combinaciones de los mismos. En ciertos casos, Z^4 es un anticuerpo. En algunos casos, Z^4 es un fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo. En algunos casos, el fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un scFv, un diacuerpo y un triacuerpo.

MÉTODOS DE USO

Como se resumió anteriormente, los aspectos de la presente divulgación incluyen métodos para evaluar una muestra para detectar la presencia de un analito diana. Los aspectos del método incluyen poner en contacto la muestra con un conjugado de colorante polimérico que se une específicamente al analito diana para producir una muestra en contacto con la composición de marcaje. Como se usa en el presente documento, los términos "conjugado de colorante polimérico" y "miembro de unión específica marcado" se usan indistintamente. Como tal, el conjugado de colorante polimérico puede incluir: (i) un colorante polimérico solvatado en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento); y (ii) un miembro de unión específica (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos, el conjugado de colorante polimérico comprende además un cromóforo de señalización unido covalentemente a un multicromóforo del colorante polimérico en proximidad receptora de energía con el mismo.

Puede usarse cualquier método conveniente para poner en contacto la muestra con un conjugado de colorante polimérico que se une específicamente al analito diana para producir la muestra en contacto con la composición de marcaje. En algunos casos, la muestra se pone en contacto con el conjugado de colorante polimérico en condiciones en las que el miembro de unión específica se une específicamente al analito diana, si está presente. Para la unión específica del miembro de unión específica del conjugado con el analito diana, puede usarse una solución apropiada que mantenga la actividad biológica de los componentes de la muestra y el miembro de unión específica. La solución puede ser una solución salina equilibrada, por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc., convenientemente complementada con suero de ternero fetal, lisado plaquetario humano u otros factores, junto con un tampón aceptable a baja concentración, tal como de 5-25 mM. Los tampones convenientes incluyen HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc. Diversos medios están disponibles comercialmente y pueden usarse según la naturaleza del analito diana, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., en algunos casos complementados con suero de ternero fetal o lisado plaquetario humano. Los componentes finales de la solución pueden seleccionarse dependiendo de los componentes de la muestra que se incluyen.

La temperatura a la que tiene lugar la unión específica del miembro de unión específica del conjugado al analito diana puede variar, y en algunos casos puede variar de 5 °C a 50 °C, tal como de 10 °C a 40 °C, de 15 °C a 40 °C, de 20 °C a 40 °C, por ejemplo, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C o 37 °C (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente). En algunos casos, la temperatura a la que tiene lugar la unión específica se selecciona para que sea compatible con la actividad biológica del miembro de unión específica y/o el analito diana. En ciertos casos, la temperatura es 25 °C, 30 °C, 35 °C o 37 °C. En ciertos casos, el miembro de unión específica es un anticuerpo o fragmento del mismo y la temperatura a la que tiene lugar la unión específica es temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C), 30 °C, 35 °C o 37 °C. Puede seleccionarse cualquier tiempo de incubación conveniente para la unión específica para permitir la formación de una cantidad deseable de complejo de unión y, en algunos casos, puede ser de 1 minuto (min) o más, tal como 2 min o más, 10 min o más, 30 min o más, 1 hora o más, 2 horas o más, o incluso 6 horas o más.

En el conjugado puede utilizarse cualquier miembro de unión específica conveniente. Los miembros de unión específica de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes que se unen específicamente a proteínas de la superficie celular de una variedad de tipos celulares, incluyendo pero sin limitarse a, células madre, por ejemplo,

células madre pluripotentes, células madre hematopoyéticas, células T, células T reguladoras, células dendríticas, células B, por ejemplo, células B de memoria, células B específicas de antígeno, granulocitos, células de leucemia, células de linfoma, células víricas (por ejemplo, células de VIH), células NK, macrófagos, monocitos, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y células eritroides. Las células diana de interés incluyen células que tienen un marcador o antígeno de superficie celular conveniente que puede capturarse mediante un conjugado de miembro de unión específica conveniente. En algunos ejemplos, la célula diana se selecciona de célula que contiene VIH, una célula Treg, una población de células T específicas de antígeno, células tumorales o células progenitoras hematopoyéticas (CD34+) de sangre completa, médula ósea o sangre de cordón umbilical. Cualquier proteína de la superficie celular conveniente o marcador celular puede ser diana para la unión específica a conjugados de colorantes poliméricos en los métodos objeto. En algunos ejemplos, la célula diana incluye un marcador de superficie celular seleccionado de un receptor celular y un antígeno de superficie celular. En algunos casos, la célula diana puede incluir un antígeno de superficie celular tal como CD11b, CD123, CD14, CD15, CD16, CD19, CD193, CD2, CD25, CD27, CD3, CD335, CD36, CD4, CD43, CD45RO, CD56, CD61, CD7, CD8, CD34, CD1c, CD23, CD304, CD235a, receptor alfa/beta de células T, receptor gamma/delta de células T, CD253, CD95, CD20, CD105, CD117, CD120b, Notch4, Lgr5 (N-terminal), SSEA-3, antígeno TRA-1-60, disialogangliósido GD2 y CD71.

Puede seleccionarse cualquier diana conveniente para la evaluación utilizando los métodos objeto. Las dianas de interés incluyen, pero no se limitan a, un ácido nucleico, tal como una molécula de ARN, ADN, PNA, CNA, HNA, LNA o ANA, una proteína, tal como una proteína de fusión, una proteína modificada, tal como una proteína fosforilada, glicosilada, ubiquitinada, SUMOilada o acetilada, o un anticuerpo, un péptido, una biomolécula agregada, una célula, una molécula pequeña, una vitamina y una molécula de fármaco. Como se usa en el presente documento, el término "una proteína diana" se refiere a todos los miembros de la familia diana, y fragmentos de los mismos. La proteína diana puede ser cualquier proteína de interés, tal como una diana terapéutica o diagnóstica, incluyendo, pero sin limitarse a: hormonas, factores de crecimiento, receptores, enzimas, citocinas, factores osteoinductivos, factores estimulantes de colonias e inmunoglobulinas. El término "proteína diana" pretende incluir moléculas recombinantes y sintéticas, que pueden prepararse usando cualquier método de expresión recombinante conveniente o usando cualquier método de síntesis conveniente, o adquirirse comercialmente. En algunos ejemplos, los conjugados de colorante polimérico incluyen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Cualquier analito diana conveniente que se una específicamente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de interés puede seleccionarse como diana en los métodos objeto.

En algunos ejemplos, el analito diana está asociado con una célula. En ciertos casos, el analito diana es un marcador de superficie celular de la célula. En ciertos casos, el marcador de superficie celular se selecciona del grupo que consiste en un receptor celular y un antígeno de superficie celular. En algunos casos, el analito diana es una diana intracelular, y el método incluye además lisar la célula.

En algunos ejemplos, la muestra puede incluir una población celular heterogénea a partir de la cual se aíslan células diana. En algunos casos, la muestra incluye sangre completa periférica, sangre completa periférica en la que se han lisado eritrocitos antes del aislamiento celular, sangre de cordón umbilical, médula ósea, células mononucleares de sangre periférica purificadas por gradiente de densidad u tejido homogeneizado. En algunos casos, la muestra incluye células progenitoras hematopoyéticas (por ejemplo, células CD34+) en sangre completa, médula ósea o sangre de cordón umbilical. En ciertos ejemplos, la muestra incluye células tumorales en sangre periférica. En ciertos casos, la muestra es una muestra que incluye (o se sospecha que incluye) células víricas (por ejemplo, VIH).

Los miembros de unión específica marcados encuentran uso en los métodos objeto, por ejemplo, para marcar una célula diana, partícula, diana o analito con un colorante polimérico o colorante polimérico en tándem. Por ejemplo, los miembros de unión específica marcados encuentran uso en el marcaje de células que van a procesarse (por ejemplo, detectarse, analizarse y/o clasificarse) en un citómetro de flujo. Los miembros de unión específica marcados pueden incluir anticuerpos que se unen específicamente a, por ejemplo, proteínas de superficie celular de una variedad de tipos celulares (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Los miembros de unión específica marcados pueden usarse para investigar una variedad de propiedades o procesos biológicos (por ejemplo, celulares) tales como el ciclo celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la reparación del ADN, la señalización de células T, la apoptosis, la expresión y/o presentación de proteínas de superficie celular, y así sucesivamente. Los miembros de unión específica marcados pueden usarse en cualquier aplicación que incluya (o pueda incluir) marcaje mediado por anticuerpos de una célula, partícula o analito.

En algunos casos del método, el miembro de unión específica marcado incluye un multicromóforo como se describe en el presente documento (por ejemplo, según una cualquiera de las fórmulas (I)-(IX)). En ciertos casos, G^1 y G^2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal, un segmento de polímero, un enlazador, una etiqueta quimioselectiva y un miembro de unión específica unido, en donde al menos uno de G^1 y G^2 es un miembro de unión específica unido.

Los aspectos del método incluyen someter a ensayo la muestra en contacto con la composición de marcaje para determinar la presencia de un complejo de unión de conjugado de colorante polimérico-analito diana para evaluar si el analito diana está presente en la muestra. Una vez que la muestra se ha puesto en contacto con el conjugado de colorante polimérico, puede utilizarse cualquier método conveniente para someter a ensayo la muestra en contacto con la composición de marcaje que se produce para determinar la presencia de un complejo de unión de conjugado

de colorante polimérico-analito diana. El complejo de unión de conjugado de colorante polimérico-analito diana es el complejo de unión que se produce tras la unión específica del miembro de unión específica del conjugado al analito diana, si está presente. Someter a ensayo la muestra en contacto con la composición de marcaje puede incluir detectar una señal fluorescente del complejo de unión, si está presente. En algunos casos, el ensayo incluye una etapa de separación en donde el analito diana, si está presente, se separa de la muestra. Puede utilizarse una variedad de métodos para separar un analito diana de una muestra, por ejemplo, mediante inmovilización sobre un soporte. Los métodos de ensayo de interés incluyen, pero no se limitan a, cualquier método conveniente y formato de ensayo en donde se utilicen pares de miembros de unión específica tales como avidina-biotina o hapteno-anticuerpos anti-hapteno. Los métodos y formatos de ensayo de interés que pueden adaptarse para su uso con las composiciones objeto incluyen, pero no se limitan a, métodos de citometría de flujo, métodos de hibridación *in situ*, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ensayos de separación celular magnética y cromatografía de purificación de fluorocromos.

En ciertos ejemplos, el método incluye además poner en contacto la muestra con un segundo miembro de unión específica que se une específicamente al analito diana. En ciertos casos, el segundo miembro de unión específica está unido al soporte. Puede utilizarse cualquier soporte conveniente para inmovilizar un componente de los métodos objeto (por ejemplo, un segundo miembro de unión específica). En ciertos casos, el soporte es una partícula, tal como una partícula magnética. En algunos casos, el segundo miembro de unión específica y el conjugado de colorante polimérico producen un complejo de tipo sándwich que puede aislarse y detectarse, si está presente, usando cualquier método conveniente. En algunos ejemplos, el método incluye además analizar mediante citometría de flujo el complejo de unión de conjugado de colorante polimérico-analito diana, es decir, un analito diana marcado fluorescentemente. El ensayo para determinar la presencia de un complejo de unión de conjugado de colorante polimérico-analito diana puede proporcionar resultados de ensayo (por ejemplo, datos de ensayo cualitativos o cuantitativos) que pueden usarse para evaluar si el analito diana está presente en la muestra.

Puede utilizarse cualquier soporte conveniente en los métodos objeto para inmovilizar cualquier componente conveniente de los métodos, por ejemplo, miembro de unión específica marcado, diana, miembro de unión específica secundario, etc. Los soportes de interés incluyen, pero no se limitan a: sustratos sólidos, donde el sustrato puede tener una variedad de configuraciones, por ejemplo, una lámina, perla u otra estructura, tal como una placa con pocillos; perlas, polímeros, partícula, una malla fibrosa, hidrogeles, matriz porosa, un pasador, una superficie de micromatriz, un soporte de cromatografía y similares. En algunos casos, el soporte se selecciona del grupo que consiste en una partícula, un sustrato sólido plano, una malla fibrosa, un hidrogel, una matriz porosa, un pasador, una superficie de micromatriz y un soporte de cromatografía. El soporte puede incorporarse en un sistema que proporciona aislamiento celular asistido por cualquier método conveniente, tal como una jeringa operada manualmente, una centrífuga o un sistema automatizado de manipulación de líquidos. En algunos casos, el soporte encuentra uso en un sistema automatizado de manipulación de líquidos para el aislamiento de alto rendimiento de células, tal como un citómetro de flujo.

En algunos ejemplos del método, la etapa de separación incluye aplicar un campo magnético externo para inmovilizar una partícula magnética. Puede usarse cualquier imán conveniente como fuente del campo magnético externo (por ejemplo, gradiente de campo magnético). En algunos casos, el campo magnético externo se genera por una fuente magnética, por ejemplo, por un imán permanente o electroimán. En algunos casos, inmovilizar las partículas magnéticas significa que las partículas magnéticas se acumulan cerca de la superficie más cercana a la fuente de gradiente de campo magnético, es decir, el imán.

La separación puede incluir además una o más etapas de lavado opcionales para eliminar el material no unido de la muestra del soporte. Puede usarse cualquier método de lavado conveniente, por ejemplo, lavar el soporte inmovilizado con un tampón biocompatible que conserve la interacción de unión específica del colorante polimérico y el miembro de unión específica. La separación y el lavado opcional del material no unido de la muestra del soporte proporciona una población enriquecida de células diana donde pueden eliminarse las células y el material no deseados.

En ciertos ejemplos, el método incluye además detectar la diana marcada. La detección de la diana marcada puede incluir excitar el multicromóforo con uno o más láseres y posteriormente detectar la emisión de fluorescencia del colorante polimérico en tándem usando uno o más detectores ópticos. La detección de la diana marcada puede realizarse usando cualquier instrumento y método conveniente, incluyendo, pero sin limitación, citometría de flujo, sistemas FACS, microscopía de fluorescencia; detección de fluorescencia, luminiscencia, luz ultravioleta y/o visible usando un lector de placas; cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC); y espectrometría de masas. Cuando se usan componentes marcados fluorescentemente en los métodos y las composiciones de la presente divulgación, se reconoce que pueden usarse diferentes tipos de sistemas de detección de fluorescencia para poner en práctica los métodos objeto. En algunos casos, puede realizarse una exploración de alto rendimiento, por ejemplo, sistemas que usan placas de microtitulación de 96 pocillos o más. Puede utilizarse una variedad de métodos para realizar ensayos sobre materiales fluorescentes, tales como los métodos descritos en, por ejemplo, Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Nueva York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance energy transfer microscopy, en: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, ed. Chem. Taylor, D. L. & Wang, Y. L., San Diego: Academic Press (1989), págs. 219-243; Turro, N.J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc. (1978), págs. 296-361.

La fluorescencia en una muestra puede medirse usando un fluorímetro. En algunos casos, la radiación de excitación, de una fuente de excitación que tiene una primera longitud de onda, pasa a través de la óptica de excitación. La óptica de excitación hace que la radiación de excitación excite la muestra. En respuesta, las dianas marcadas fluorescentemente en la muestra emiten radiación que tiene una longitud de onda que es diferente de la longitud de onda de excitación. La óptica de recogida recoge entonces la emisión de la muestra. El dispositivo puede incluir un controlador de temperatura para mantener la muestra a una temperatura específica mientras está explorándose. En ciertos casos, una fase de traslación multieje mueve una placa de microtitulación que contiene una pluralidad de muestras para colocar diferentes pocillos que van a exponerse. La fase de traslación multieje, el controlador de temperatura, la característica de autoenfoco y la electrónica asociada con la obtención de imágenes y la recogida de datos pueden gestionarse mediante un ordenador digital programado de manera apropiada. El ordenador también puede transformar los datos recogidos durante el ensayo en otro formato para la presentación.

En algunos ejemplos, el método de evaluación de una muestra para determinar la presencia de un analito diana incluye además detectar fluorescencia en un citómetro de flujo. En algunos ejemplos, el método de evaluación de una muestra para determinar la presencia de un analito diana incluye además la obtención de imágenes de la muestra en contacto con la composición de marcaje usando microscopía de fluorescencia. Puede usarse obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia para identificar un complejo de unión de conjugado de colorante polimérico-analito diana en la muestra en contacto para evaluar si el analito diana está presente. Los métodos de microscopía de interés que encuentran uso en los métodos objeto incluyen microscopía confocal de barrido láser.

También se proporcionan métodos para marcar una molécula diana. Los colorantes poliméricos objeto encuentran uso en una variedad de métodos de marcaje, separación, detección y/o análisis. En algunos ejemplos, el método incluye: poner en contacto la molécula diana con un colorante polimérico (por ejemplo, como se describe en el presente documento) para producir una molécula diana marcada, en donde el colorante polimérico incluye una etiqueta de conjugación que se une covalentemente a la molécula diana. En algunos casos, el colorante polimérico incluye además un cromóforo de señalización unido covalentemente al multicromóforo del colorante polimérico en proximidad receptora de energía con el mismo. En algunos casos del método, el miembro de colorante polimérico incluye un multicromóforo según una cualquiera de las fórmulas (I)-(IX) (por ejemplo, como se describe en el presente documento), donde uno de G^1 y G^2 es un grupo terminal y el otro de G^1 y G^2 es la etiqueta de conjugación.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador de conjugación" se refiere a un grupo que incluye un grupo funcional quimioselectivo (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que puede unirse covalentemente con un grupo funcional compatible de una molécula diana, después de la activación y/o desprotección opcionales. Puede utilizarse cualquier etiqueta de conjugación conveniente en los colorantes poliméricos objeto para conjugar el colorante a una molécula diana de interés. En algunos ejemplos, la etiqueta de conjugación incluye un grupo funcional terminal seleccionado de un amino, un ácido carboxílico o un derivado del mismo, un tiol, un hidroxilo, una hidrazina, una hidrazida, una azida, un alquino y un grupo reactivo con proteína (por ejemplo, reactivo con amino, reactivo con tiol, reactivo con hidroxilo, reactivo con imidazolilo o reactivo con guanidinilo).

Cualquier método y reactivo convenientes pueden adaptarse para su uso en los métodos de marcaje objeto con el fin de unir covalentemente la etiqueta de conjugación a la molécula diana. Los métodos de interés para marcar una diana incluyen, pero no se limitan a, los métodos y reactivos descritos por Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, tercera edición, Academic Press, 2013. La etapa de puesta en contacto puede realizarse en una solución acuosa. En algunos casos, la etiqueta de conjugación incluye un grupo funcional amino y la molécula diana incluye un grupo funcional éster activado, tal como un éster de NHS o éster de sulfo-NHS, o viceversa. En ciertos casos, la etiqueta de conjugación incluye un grupo funcional maleimida y la molécula diana incluye un grupo funcional tiol, o viceversa. En ciertos casos, la etiqueta de conjugación incluye un grupo funcional alquino (por ejemplo, un grupo ciclooctino) y la molécula diana incluye un grupo funcional azida, o viceversa, que puede conjugarse mediante química click.

Puede seleccionarse cualquier molécula diana conveniente para el marcaje utilizando los métodos objeto. Las moléculas diana de interés incluyen, pero no se limitan a, un ácido nucleico, tal como una molécula de ARN, ADN, PNA, CNA, HNA, LNA o ANA, una proteína, tal como una proteína de fusión, una proteína modificada, tal como una proteína fosforilada, glicosilada, ubiquitinada, SUMOilada o acetilada, o un anticuerpo, un péptido, una biomolécula agregada, una célula, una molécula pequeña, una vitamina y una molécula de fármaco. Como se usa en el presente documento, el término "una proteína diana" se refiere a todos los miembros de la familia diana, y fragmentos de los mismos. La proteína diana puede ser cualquier proteína de interés, tal como una diana terapéutica o diagnóstica, incluyendo, pero sin limitarse a: hormonas, factores de crecimiento, receptores, enzimas, citocinas, factores osteoinductivos, factores estimulantes de colonias e inmunoglobulinas. El término "proteína diana" pretende incluir moléculas recombinantes y sintéticas, que pueden prepararse usando cualquier método de expresión recombinante conveniente o usando cualquier procedimiento de síntesis conveniente, o adquirirse comercialmente. En algunos ejemplos, la molécula diana es un miembro de unión específica (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En ciertos casos, el miembro de unión específica es un anticuerpo. En algunos casos, el miembro de unión específica es un fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo. En algún caso, el fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un scFv, un diacuerpo y un triacuerpo.

En algunos casos, el método incluye una etapa de separación en donde la molécula diana marcada se separa de la mezcla de reacción, por ejemplo, reactivos en exceso o diana no marcada. Pueden utilizarse una variedad de métodos para separar una diana de una muestra, por ejemplo, mediante inmovilización sobre un soporte, precipitación, cromatografía y similares.

- 5 En algunos casos, el método incluye además detectar y/o analizar la molécula diana marcada. En algunos casos, el método incluye además detectar fluorescentemente la molécula diana marcada. Puede utilizarse cualquier método conveniente para detectar y/o analizar la molécula diana marcada junto con los métodos y composiciones objeto. Los métodos para analizar una diana de interés que encuentran uso en los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, hibridación *in situ*, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ensayos de separación celular magnética y cromatografía de purificación de fluorocromos. Los métodos de detección de interés incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de fluorescencia, microscopía de fluorescencia, secuenciación de ácidos nucleicos, hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), espectroscopía de masas de proteínas, citometría de flujo y similares.

- 15 La detección puede lograrse directamente a través del colorante polimérico o colorante polimérico en tándem, o indirectamente mediante un sistema de detección secundario. Este último puede basarse en uno cualquiera o una combinación de varios principios diferentes incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpo anti-especie marcado con anticuerpo y otras formas de sistemas de amplificación de señal y puente inmunológicos o no inmunológicos (por ejemplo, tecnología de biotina-estreptavidina, tecnología mediada por proteína A y proteína G, o sonda de ácido nucleico/sondas anti-ácido nucleico, y similares). Moléculas indicadoras adecuadas pueden ser las conocidas en el campo de la inmunocitoquímica, biología molecular, microscopía óptica, de fluorescencia y electrónica, inmunofenotipificación celular, clasificación celular, citometría de flujo, visualización celular, detección, enumeración y/o cuantificación de la salida de señal. Más de un anticuerpo de naturaleza específica y/o no específica podría marcarse y usarse simultánea o secuencialmente para potenciar la detección, identificación y/o análisis de dianas.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

- 25 Los aspectos de la presente divulgación incluyen métodos para preparar los multicromóforos y colorantes poliméricos en tándem objeto. Una ventaja de los multicromóforos objeto es la modularidad del armazón subyacente. En algunos casos, el armazón modular es un polímero lineal que tiene una secuencia definida de unidades de repetición. Los cromóforos colgantes usados pueden elegirse de una amplia gama de colorantes que pueden unirse covalentemente a la cadena principal polimérica, o bien antes o bien después de la síntesis del polímero.

- 30 En algunos ejemplos, las cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto (véase, por ejemplo, la fórmula (IX) como se describe en el presente documento) pueden prepararse usando monómeros de carbonato cíclico o carbonato protegido. Los métodos y comonomeros de interés incluyen, pero no se limitan a, los descritos por Barnes *et al.* en el documento WO2013036532, Cooley *et al.* (J. Am. Chem. 131, 45, 1640-3, 2009) y Rothbard *et al.* en la patente estadounidense 7.169.814. Tales monómeros pueden utilizarse en una reacción de polimerización usando un iniciador y una razón de alimentación adecuada de monómeros de carbonato cíclico para proporcionar una cadena principal polimérica. Como alternativa, los monómeros de carbonato protegidos pueden ensamblarse en una síntesis por etapas para proporcionar una secuencia definida.

- 35 Pueden unirse comonomeros de interés usando químicas y grupos funcionales quimioselectivos compatibles. En algunos casos, los comonomeros se unen mediante química click, tal como cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre, cicloadición de azida-alquino promovida por tensión, cicloadición de alqueno azida [3+2], demanda inversa de alqueno y tetrazina Diers-Alder, ligación de Staudinger y similares (véase, por ejemplo, Kolb *et al.*, Angew Chem Int Ed Engl. 40:2004-2021, 2001). Como tal, la unión del comonomero puede lograrse mediante conjugaciones de pares de grupos funcionales quimioselectivos compatibles tales como alquino/azida, tetrazina/alqueno, azida/alqueno, fosfina/azida y similares. Los ejemplos no limitantes de reacciones de cicloadición de azida-alquino incluyen reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas por cobre (CuAAC) y reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas por rutenio (RuAAC). CuAAC funciona en un amplio intervalo de temperatura, es insensible a las condiciones acuosas y un intervalo de pH de más de 4 a 12, y tolera un amplio intervalo de grupos funcionales (véase Himo *et al.*, J Am Chem Soc. 127: 210-216, 2005). El catalizador de Cu(I) activo puede generarse, por ejemplo, a partir de sales de Cu(I) o sales de Cu(II) usando ascorbato de sodio como agente reductor. Esta reacción forma productos 1,4-sustituidos. RuAAC utiliza complejos de pentametilciclopentadienilo-cloruro de rutenio [Cp*RuCl] que son capaces de catalizar la cicloadición de azidas a alquinos terminales, conduciendo regioselectivamente a 1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos (véase Rasmussen *et al.*, Org. Lett. 9:5337-5339, 2007). Además, y en contraste con CuAAC, RuAAC también puede usarse con alquinos internos para proporcionar 1,2,3-triazoles completamente sustituidos.

- 40 En algunos ejemplos, las cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto son polipéptidos. Puede utilizarse cualquier método de síntesis de péptidos conveniente en la preparación de tales cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto. En algunos casos, se utilizan métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) para preparar cadenas principales poliméricas de los multicromóforos objeto mediante una síntesis por etapas definida. Las estrategias de grupos protectores convencionales proporcionan desprotección y acoplamiento de residuos de aminoácidos de interés en una secuencia definida, mientras que los grupos funcionales de cadena lateral de interés pueden protegerse ortogonalmente. En algunos casos, se utiliza una metodología de Fmoc/terc-butilo. En

algunos casos, se utiliza una metodología de Boc/bencilo. Tales estrategias de grupos protectores también pueden adaptarse para su uso en la instalación de grupos colgantes de interés en las cadenas laterales de restos de aminoácidos particulares y/o en terminales polipeptídicos. En ciertos casos, uno o más de los grupos colgantes pueden instalarse en los materiales de partida de monómero de aminoácido protegido. En algunos casos, los grupos colgantes se instalan en el multicromóforo después de que se haya realizado la SPPS de la cadena principal polimérica. Mediante el uso de grupos protectores ortogonales, pueden instalarse independientemente diferentes grupos de interés en la cadena principal polipeptídica, por ejemplo, en los terminales N y C, y/o en cada tipo distinto de residuo de aminoácido. El polipéptido puede incluir residuos de β2-aminoácidos, residuos de β3-aminoácidos, residuos de α-aminoácidos, o mezclas de los mismos.

5 En algunos ejemplos, el método de preparación de un multicromóforo de recolección de luz (por ejemplo, como se describe en el presente documento) incluye sintetizar un polipéptido protegido que tiene una secuencia de aminoácidos definida que consiste en bloques de primeros residuos de aminoácidos separados por apariciones individuales de segundos residuos de aminoácidos. Como se describe en el presente documento, la preparación de una secuencia definida de residuos de aminoácidos puede proporcionar una configuración deseada de cromóforos donadores colgantes y fluoróforos aceptores a lo largo del polipéptido. Cuando la instalación de los grupos colgantes se logra después de la síntesis de polipéptidos, los grupos funcionales quimioselectivos de las cadenas laterales de aminoácidos a lo largo de la cadena principal del polipéptido se conjugan selectivamente con grupos colgantes. En ciertos casos, el multicromóforo de recolección de luz es un polipéptido que tiene una secuencia definida en donde: cada bloque de primeros residuos de aminoácidos comprende al menos dos restos; los primeros residuos de aminoácidos comprenden cada uno un primer grupo de cadena lateral quimioselectivo protegido; y los segundos residuos de aminoácidos comprenden cada uno un segundo grupo de cadena lateral quimioselectivo protegido.

10 Alternativamente, la instalación de los grupos cromóforos donadores colgantes puede conseguirse utilizando bloques de construcción de aminoácidos protegidos que ya incluyen el grupo cromóforo como parte de la cadena lateral. Se entiende que los grupos cromóforos colgantes pueden instalarse en primer lugar en al menos las cadenas laterales de una secuencia polipeptídica definida para producir un multicromóforo de recolección de luz. Una variedad de grupos colgantes adicionales incluyendo fluoróforos aceptores pueden instalarse entonces secuencialmente mediante conjugación selectiva con etiqueta(s) quimioselectiva(s) unida(s) a residuos particulares de la secuencia.

15 En algunos casos, el método incluye además acoplar restos de fluoróforos aceptores reactivos a segundos grupos de cadena lateral quimioselectivos desprotegidos de los segundos residuos de aminoácidos para producir fluoróforos aceptores colgantes.

20 En ciertos casos del método, la secuencia de aminoácidos definida comprende uno o más segmentos de secuencia de aminoácidos seleccionados de los siguientes:

- XYXX
- XXYXX
- 35 XXXYXXX
- XXXXYXXX
- XXXXXYXXX
- XXXXXYXXXX
- XXXXXYXXXXX
- 40 XXXXYXXXXXX
- XXXXXXXXYXXXXXXXX
- XXXXXXXXYXXXXXXXX
- XXXXXXXXYXXXXXXXX
- Y(X)_nY
- 45 XY(X)_nYX
- XXY(X)_nYXX
- XXXY(X)_nYXXX
- XXXXY(X)_nYXXXX
- XXXXXY(X)_nYXXXXX

en donde cada X es un primer residuo de aminoácido que tiene un primer grupo funcional quimioselectivo, o versión protegida del mismo, y cada Y es un segundo residuo de aminoácido que tiene un segundo grupo funcional quimioselectivo, o versión protegida del mismo.

5 En ciertos ejemplos de las secuencias anteriores, cada X es un residuo de lisina u ornitina, o una versión protegida del mismo, que tiene un grupo amino de cadena lateral que puede estar unido covalentemente en N de manera selectiva a un grupo cromóforo donador colgante; y cada Y es un residuo de cisteína o un residuo de cisteína protegido que tiene un grupo tiol de cadena lateral que puede estar unido covalentemente de manera selectiva a un fluoróforo aceptor colgante.

10 Pueden prepararse secuencias de polipéptidos que comprenden dos o más de los segmentos de secuencia descritos anteriormente, opcionalmente separados por terceros residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, (segmento 1)-Z-(segmento 2) donde Z es el tercer residuo). Este tercer residuo de aminoácido puede ser un residuo espaciador (por ejemplo, que no tiene una cadena lateral o una etiqueta), o un residuo que tiene un grupo funcional quimioselectivo adecuado para la instalación selectiva de un resto adicional de interés, tal como un segundo cromóforo absorbente de luz colgante, una etiqueta quimioselectiva (por ejemplo, una etiqueta de química click bioortogonal), un enlazador, una biomolécula unida, un fluoróforo aceptor, un WSG, etc. En ciertos casos, el resto adicional de interés se incorpora en el tercer residuo de aminoácido antes de la síntesis del polipéptido.

20 De manera similar, puede instalarse una variedad de restos en el extremo N y/o C-terminal del polipéptido durante o después de la síntesis del péptido. En ciertos casos, el método incluye además desproteger el extremo N-terminal del polipéptido protegido y acoplar un grupo G1 (por ejemplo, como se describe en el presente documento) al extremo N-terminal del polipéptido desprotegido N-terminal. G1 puede ser cualquier grupo terminal conveniente (por ejemplo, un grupo de ocupación de extremos tal como un alcanóilo, por ejemplo, acetilo), un grupo cromóforo donador, un enlazador que tiene una etiqueta quimioselectiva particular o una biomolécula de interés.

25 En algunos casos, el método incluye además instalar un grupo G2 en el extremo C-terminal del polipéptido. Esto puede lograrse de diversas maneras: por ejemplo, durante la SPPS donde el grupo G2 C-terminal se instala entre el soporte sólido y el primer residuo de aminoácido de la secuencia; durante la escisión del polipéptido del soporte sólido; o después de la síntesis donde un resto de interés (por ejemplo, un miembro de unión específica) o una etiqueta quimioselectiva particular dirigida al mismo, puede acoplarse al extremo C-terminal del polipéptido. En algunos casos, pueden utilizarse métodos de ligación química nativa para preparar un polipéptido de tioéster C-terminal adecuado para acoplarse a un fragmento polipeptídico o un resto de interés.

30 Cualquiera de los multicromóforos polipeptídicos descritos en el presente documento puede prepararse según los métodos objeto, por ejemplo, polipéptidos de fórmulas (IV)-(VII), y precursores sintéticos de los mismos, como se describe en el presente documento.

35 Puede encontrarse un resumen de algunos de los diversos métodos disponibles para sintetizar los multicromóforos polipeptídicos objeto en Steward *et al.*, en "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky *et al.*, en "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, segunda edición, 1976 y Meienhofer, en "Hormonal Proteins and Peptides", vol. 2, p. 46, Academic Press (Nueva York), 1983; y Kent, Ann. Biochem., 57, 957, 1988, para la síntesis de péptidos en fase sólida, y Schroder *et al.*, en "The Peptides", vol. 1, Academic Press (Nueva York), 1965 para la síntesis en solución. Puede usarse cualquier estrategia de grupos protectores conveniente tal como, pero sin limitación, síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc y estrategias de síntesis de péptidos en fase sólida Boc. En la síntesis de péptidos en fase sólida Boc, se usa un grupo protector Boc-amino en el extremo amino y pueden usarse grupos protectores basados en bencilo o bencilo u otros grupos protectores convenientes para la protección de grupos funcionales de cadena lateral. En la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, se usa un grupo protector Fmoc-amino en el extremo amino y pueden usarse grupos protectores basados en terc-butilo o bencilo u otros grupos protectores convenientes para la protección de grupos funcionales de cadena lateral. Se describen grupos protectores convenientes que pueden usarse en tales métodos de síntesis en las referencias anteriores y por McOmic en "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nueva York, 1973; y Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 4ª edición, 2006.

SISTEMAS

50 Los aspectos de la invención incluyen además sistemas para su uso en la práctica de los métodos y composiciones objeto. Un sistema de análisis de muestras puede incluir un campo de visión de la muestra o un canal de flujo cargado con una muestra y un miembro de unión específica marcado. En algunos ejemplos, el sistema es un sistema de citometría de flujo que incluye: un citómetro de flujo que incluye una trayectoria de flujo; una composición en la trayectoria de flujo, en donde la composición incluye: una muestra; y un miembro de unión específica marcado (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos ejemplos, el sistema para analizar una muestra es un sistema de microscopía de fluorescencia, que incluye: un microscopio de fluorescencia que comprende un campo de visión de muestra; y una composición dispuesta en el campo de visión de muestra, en donde la composición comprende una muestra; y un miembro de unión específica marcado (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

En algunos casos de los sistemas, el miembro de unión específica marcado incluye: un multicromóforo de recolección de luz solvatado en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y un miembro de unión específica que se une específicamente a un analito diana unido covalentemente al multicromóforo. En algunos casos, el miembro de unión específica marcado comprende además un cromóforo de señalización unido covalentemente al multicromóforo del colorante polimérico en proximidad receptora de energía con el mismo. En algunos casos de los sistemas objeto, el miembro de unión específica marcado, el multicromóforo se describe por una cualquiera de las fórmulas (I)-(IX) (por ejemplo, como se describe en el presente documento), en donde: G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un grupo terminal, un segmento conjugado polimérico, un enlazador y un miembro de unión específica unido, en donde al menos uno de G¹ y G² es un miembro de unión específica unido.

En ciertos ejemplos de los sistemas, la composición incluye además un segundo miembro de unión específica que está unido al soporte y se une específicamente al analito diana. En algunos casos, el soporte incluye una partícula magnética. Como tal, en ciertos casos, el sistema también puede incluir un campo paramagnético externo controlable configurado para su aplicación a una región de ensayo del canal de flujo.

La muestra puede incluir una célula. En algunos casos, la muestra es una muestra biológica que contiene células. En algunos casos, la muestra incluye un miembro de unión específica marcado unido específicamente a una célula diana. En ciertos casos, el analito diana al que se une específicamente el miembro de unión específica es un marcador de superficie celular de la célula. En ciertos casos, el marcador de superficie celular se selecciona del grupo que consiste en un receptor celular y un antígeno de superficie celular.

En ciertos aspectos, el sistema también puede incluir una fuente de luz configurada para dirigir la luz a una región de ensayo del canal de flujo o campo de visión de la muestra. El sistema puede incluir un detector configurado para recibir una señal de una región de ensayo del canal de flujo o un campo de visión de muestra, en donde la señal se proporciona por la composición fluorescente. Opcionalmente, además, el sistema de análisis de muestras puede incluir uno o más detectores y/o fuentes de luz adicionales para la detección de una o más señales adicionales.

En ciertos aspectos, el sistema puede incluir además sistemas basados en ordenador configurados para detectar la presencia de la señal fluorescente. Un "sistema basado en ordenador" se refiere a los medios de hardware, medios de software y medios de almacenamiento de datos usados para analizar la información de la presente invención. El hardware mínimo de los sistemas basados en ordenador de la presente invención incluye una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos. Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que uno cualquiera de los sistemas basados en ordenador disponibles actualmente es adecuado para su uso en los sistemas objeto. Los medios de almacenamiento de datos pueden incluir cualquier producto fabricado que incluya una grabación de la presente información como se ha descrito anteriormente, o un medio de acceso a memoria al que puede acceder tal producto fabricado.

"Grabar" datos, programación u otra información en un medio legible por ordenador se refiere a un proceso para almacenar información, usando cualquiera de tales métodos conocidos en la técnica. Puede elegirse cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, basándose en los medios usados para acceder a la información almacenada. Puede usarse una variedad de programas y formatos de procesador de datos para el almacenamiento, por ejemplo, archivo de texto de procesamiento de texto, formato de base de datos, etc.

Un "procesador" hace referencia a cualquier combinación de hardware y/o software que realice las funciones requeridas del mismo. Por ejemplo, cualquier procesador en el presente documento puede ser un microprocesador digital programable tal como el disponible en forma de un controlador electrónico, ordenador central, servidor u ordenador personal (de escritorio o portátil). Cuando el procesador es programable, la programación adecuada puede comunicarse desde una ubicación remota al procesador, o guardarse previamente en un producto de programa informático (tal como un medio de almacenamiento legible por ordenador portátil o fijo, ya se base en un dispositivo magnético, óptico o de estado sólido). Por ejemplo, un medio magnético o disco óptico puede llevar la programación, y puede leerse mediante un lector adecuado que se comunica con cada procesador en su estación correspondiente.

Además del dispositivo sensor y el módulo de procesamiento de señales, por ejemplo, como se describió anteriormente, los sistemas de la invención pueden incluir varios componentes adicionales, tales como dispositivos de salida de datos, por ejemplo, monitores y/o altavoces, dispositivos de entrada de datos, por ejemplo, puertos de interfaz, teclados, etc., componentes de manipulación de fluidos, fuentes de alimentación, etc.

En ciertos aspectos, el sistema incluye un citómetro de flujo. Los sistemas y métodos de citómetro de flujo adecuados para analizar muestras incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski *et al.* (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* No. 91, Humana Press (1997); *Practical Flow Cytometry*, 3^a ed., Wiley-Liss (1995); Virgo, *et al.* (2012) *Ann Clin Biochem.* Enero; 49(pt 1):17-28; Linden *et al.*, *Semin Throm Hemost.* Octubre de 2004; 30(5):502-11; Alison, *et al.* *J Pathol*, diciembre de 2010; 222(4):335-344; y Herbig, *et al.* (2007) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 24(3):203-255. En ciertos casos, los sistemas de citometría de flujo de interés incluyen el citómetro de flujo FACSCanto™ de BD Biosciences, los sistemas FACSVantage™ de BD Biosciences, FACSort™ de BD Biosciences, FACSCount™ de BD Biosciences, FACScan™ de BD Biosciences y FACSCalibur™ de BD Biosciences, sistemas Accuri™ de BD Biosciences,

5 sistemas FACSCanto™ de BD Biosciences, sistemas FACSCelesta™ de BD Biosciences, sistemas FACSLytic™ de BD Biosciences, sistemas FACSVerse™ de BD Biosciences, sistemas FACSsymphony™ de BD Biosciences, sistemas LSRFortessa™ de BD Biosciences, clasificador de células Influx™ de BD Biosciences, clasificador de células FACSJazz™ de BD Biosciences y clasificador de células FACSAria™ de BD Biosciences, clasificador de células FACSMelody™ de BD Biosciences, y similares.

10 En ciertos ejemplos, los sistemas objeto son sistemas de citómetro de flujo que incorporan uno o más componentes de los citómetros de flujo descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 3.960.449; 4.347.935; 4.667.830; 4.704.891; 4.770.992; 5.030.002; 5.040.890; 5.047.321; 5.245.318; 5.317.162; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.620.842; 5.627.040; 5.643.796; 5.700.692; 6.372.506; 6.809.804; 6.813.017; 6.821.740; 7.129.505; 7.201.875; 7.544.326; 8.140.300; 8.233.146; 8.753.573; 8.975.595; 9.092.034; 9.095.494 y 9.097.640.

15 Otros sistemas pueden encontrar uso en la práctica de los métodos objeto. En ciertos aspectos, el sistema puede ser un fluorímetro o microscopio cargado con una muestra que tiene una composición fluorescente de cualquiera de los ejemplos analizados en el presente documento. El fluorímetro o microscopio puede incluir una fuente de luz configurada para dirigir la luz a la región de ensayo del canal de flujo o campo de visión de muestra. El fluorímetro o microscopio también puede incluir un detector configurado para recibir una señal de una región de ensayo del canal de flujo o campo de visión, en donde la señal se proporciona por la composición fluorescente.

KITS

20 Los aspectos de la invención incluyen además kits para su uso en la práctica de los presentes métodos y composiciones. Las composiciones de la invención pueden incluirse como reactivos en kits o bien como materiales de partida o bien proporcionados para su uso en, por ejemplo, las metodologías descritas anteriormente.

25 Un kit puede incluir un colorante polimérico que incluye un multicromóforo de recolección de luz solvatado en agua (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y un recipiente. Puede utilizarse cualquier recipiente conveniente, tal como tubos, botellas o pocillos en una tira o placa de múltiples pocillos, una caja, una bolsa, un recipiente aislado y similares. Los kits objeto pueden incluir además uno o más componentes seleccionados de un colorante polimérico en tándem, un fluoróforo, un miembro de unión específica, un conjugado de miembro de unión específica, un miembro de unión específica unido a soporte, una célula, un soporte, un tampón de elución acuoso biocompatible e instrucciones de uso. En algunos ejemplos del kit, el multicromóforo está unido covalentemente a un miembro de unión específica. En algunos casos, el miembro de unión específica es un anticuerpo. En ciertos casos, el miembro de unión específica es un fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo. En ciertos casos, el fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un diacuerpo y un triacuerpo.

35 En ciertos ejemplos, el kit encuentra uso en la evaluación de una muestra para determinar la presencia de un analito diana, tal como una diana intracelular. Como tal, en algunos casos, el kit incluye uno o más componentes adecuados para lisar células. El uno o más componentes adicionales del kit pueden proporcionarse en recipientes separados (por ejemplo, tubos, botellas o pocillos separados en una tira o placa de múltiples pocillos).

40 En ciertos aspectos, el kit incluye además reactivos para realizar un ensayo de citometría de flujo. Los reactivos de interés incluyen, pero no se limitan a, tampones para reconstitución y dilución, tampones para poner en contacto una muestra celular con el multicromóforo, tampones de lavado, células de control, perlas de control, perlas fluorescentes para la calibración del citómetro de flujo y combinaciones de los mismos. El kit también puede incluir uno o más reactivos de fijación celular tales como paraformaldehído, glutaraldehído, metanol, acetona, formalina o cualquier combinación o tampón de los mismos. Además, el kit puede incluir un reactivo permeabilizante de células, tal como metanol, acetona o un detergente (por ejemplo, tritón, NP-40, saponina, tween 20, digitonina, leucoperm, o cualquier combinación o tampón de los mismos. Otros inhibidores del transporte de proteínas, reactivos de fijación celular y reactivos permeabilizantes celulares familiares para el experto en la técnica están dentro del alcance de los kits objeto.

45 Las composiciones del kit pueden proporcionarse en una composición líquida, tal como cualquier tampón adecuado. Alternativamente, las composiciones del kit pueden proporcionarse en una composición seca (por ejemplo, pueden liofilizarse), y el kit puede incluir opcionalmente uno o más tampones para reconstituir la composición seca. En ciertos aspectos, el kit puede incluir alícuotas de las composiciones proporcionadas en recipientes separados (por ejemplo, tubos, botellas o pocillos separados en una tira o placa de múltiples pocillos).

50 Además, uno o más componentes pueden combinarse en un único recipiente, por ejemplo, un vial, tubo o botella de vidrio o plástico. En ciertos casos, el kit puede incluir además un recipiente (por ejemplo, tal como una caja, una bolsa, un recipiente aislado, una botella, tubo, etc.) en el que están presentes todos los componentes (y sus recipientes separados). El kit puede incluir además un envase que está separado o unido al recipiente del kit y sobre el que se imprime información sobre el kit, los componentes y/o instrucciones para el uso del kit.

55 Además de los componentes anteriores, los kits objeto pueden incluir además instrucciones para poner en práctica los métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits objeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en donde estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel en donde

se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Todavía otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, DVD, unidad flash portátil, etc., en donde se ha grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

5 UTILIDAD

Los colorantes, composiciones, métodos y sistemas poliméricos como se describen en el presente documento pueden encontrar uso en una variedad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones de diagnóstico e investigación, en donde es deseable el marcaje, la detección y/o el análisis de una diana de interés. Tales aplicaciones incluyen metodologías tales como citometría, microscopía, inmunoensayos (por ejemplo competitivos o no competitivos), evaluación de un analito libre, evaluación de ligando unido a receptor, etc. Las composiciones, los sistemas y los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en el análisis de cualquiera de varias muestras, incluyendo, pero sin limitarse a, fluidos biológicos, muestras de cultivo celular y muestras de tejido. En ciertos aspectos, las composiciones, el sistema y los métodos descritos en el presente documento pueden encontrar uso en métodos en donde se detectan analitos en una muestra, si están presentes, usando marcadores fluorescentes, tales como en clasificación o análisis de células activadas fluorescentes, inmunoensayos, inmunotinción y similares. En ciertos casos, las composiciones y los métodos encuentran uso en aplicaciones en donde es de interés la evaluación de una muestra para determinar la presencia de un analito diana.

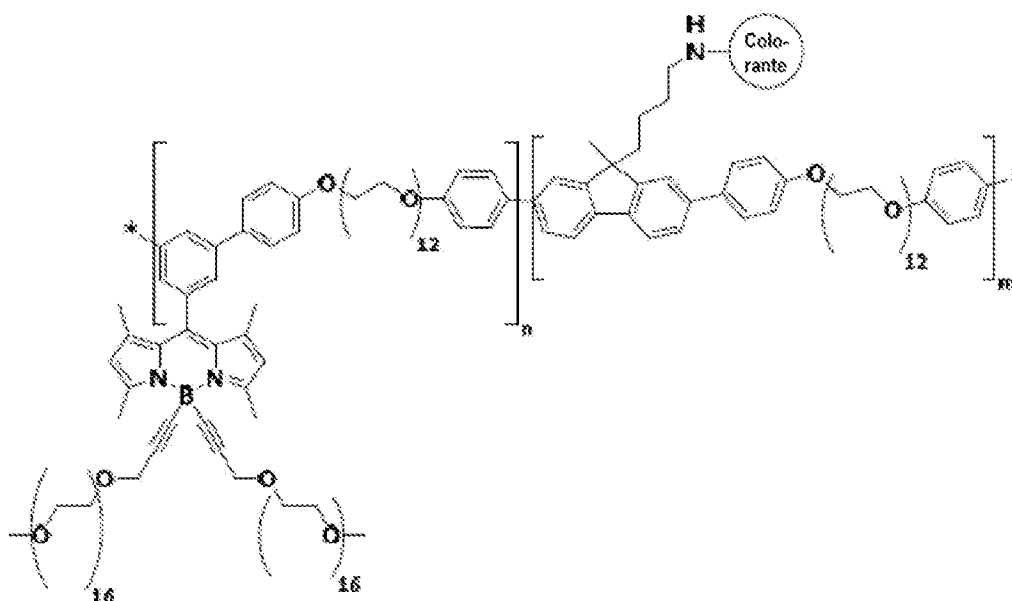
En algunos casos, los métodos y las composiciones encuentran uso en cualquier formato de ensayo donde la detección y/o el análisis de una diana a partir de una muestra es de interés, incluyendo pero sin limitarse a, citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, hibridación *in situ*, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, ensayos de separación celular magnética y cromatografía de purificación de fluorocromos. En ciertos casos, los métodos y las composiciones encuentran uso en cualquier aplicación donde el marcaje fluorescente de una molécula diana es de interés. Las composiciones objeto pueden adaptarse para su uso en cualquier aplicación conveniente en donde se utilicen pares de miembros de unión específica, tales como biotina-estreptavidina y hapteno-anticuerpo anti-hapteno.

Ejemplos

Ejemplo 1

La síntesis de los colorantes poliméricos objeto puede lograrse mediante un método de acoplamiento de Suzuki. También pueden utilizarse otros métodos tales como una arilación de enlace C-H o un método de acoplamiento de Stille para construir y polimerizar una unidad de repetición que incluye un comonomero de arilo o heteroarilo con un comonomero de PEG saturado.

La fórmula de un colorante en tándem basado en multicromóforo A (MC) se representa en la figura 1. Se preparó una serie de colorantes en tándem que tenían la siguiente estructura central con diferentes fluoróforos aceptores ("Colorante"):



Se evaluaron las propiedades espectroscópicas de los colorantes poliméricos en tándem a modo de ejemplo, como se muestra en la figura 2 y la figura 3.

Tabla 1: Datos espectroscópicos para un multicromóforo colgante y los colorantes en tándem correspondientes

Emisor	$\lambda_{\text{máx. (em)}}$ (nm)	D/A	Rendimiento cuántico (%)	Factor de amplificación
MC	523	N/A	9	N/A
MC-colorante 1	649	0,09	12	5,1
MC-colorante 2	661	0,06	23	2,1
MC-colorante 3	682	0,06	33	1,8
MC-colorante 4	717	0,08	27	2,2
MC-colorante 5	740	0,12	16	2,3
MC-colorante 6	786	0,16	14	2,1

Ejemplo 2

Se usaron métodos de síntesis de péptidos en fase sólida para preparar una secuencia de residuos de aminoácidos de lisina y cisteína KCKK, como se muestra en la figura 4. Se conjugaron grupos BODIPY sustituidos con ácido carboxílico a los grupos amino N-terminales y de cadena lateral de los residuos de lisina del péptido mediante acoplamiento de enlace amida. Se conjugó un fluoróforo aceptor sustituido con maleimida (Colorante 7) al residuo de cisteína utilizando química de acoplamiento de maleimida-tiol. El péptido se preparó con un enlazador C-terminal adecuado para la conjugación con una biomolécula, por ejemplo, proteína.

Se caracterizaron las propiedades espectroscópicas del colorante en tándem basado en BODIPY de la figura 4. La figura 5A muestra los espectros de absorción y emisión para el grupo colgante donador BODIPY. La figura 5B muestra los espectros de absorción y emisión para el colorante aceptor (Colorante 7). La figura 5C muestra los espectros de absorción y emisión para el colorante polimérico en tándem a modo de ejemplo de la figura 4. Para el espectro de emisión del cromóforo con armazón, el cromóforo primario está excitándose. Para este sistema, la emisión del donador está casi completamente extinguida y la mayor parte de la emisión es la del fluoróforo aceptor. El rendimiento cuántico del colorante polimérico en tándem es comparable al fluoróforo aceptor (Colorante 7), lo que sugiere que el colorante en tándem presenta un proceso eficiente de transferencia de energía. La fluorescencia de este colorante en tándem a modo de ejemplo se amplificó aproximadamente 2 veces con respecto a la del fluoróforo aceptor solo (Colorante 7).

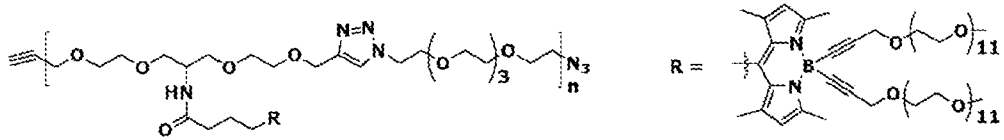
Se preparan polipéptidos que proporcionan una razón de donador con respecto a aceptor de 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 20:2 y se caracterizan usando los métodos descritos anteriormente.

Ejemplo 3

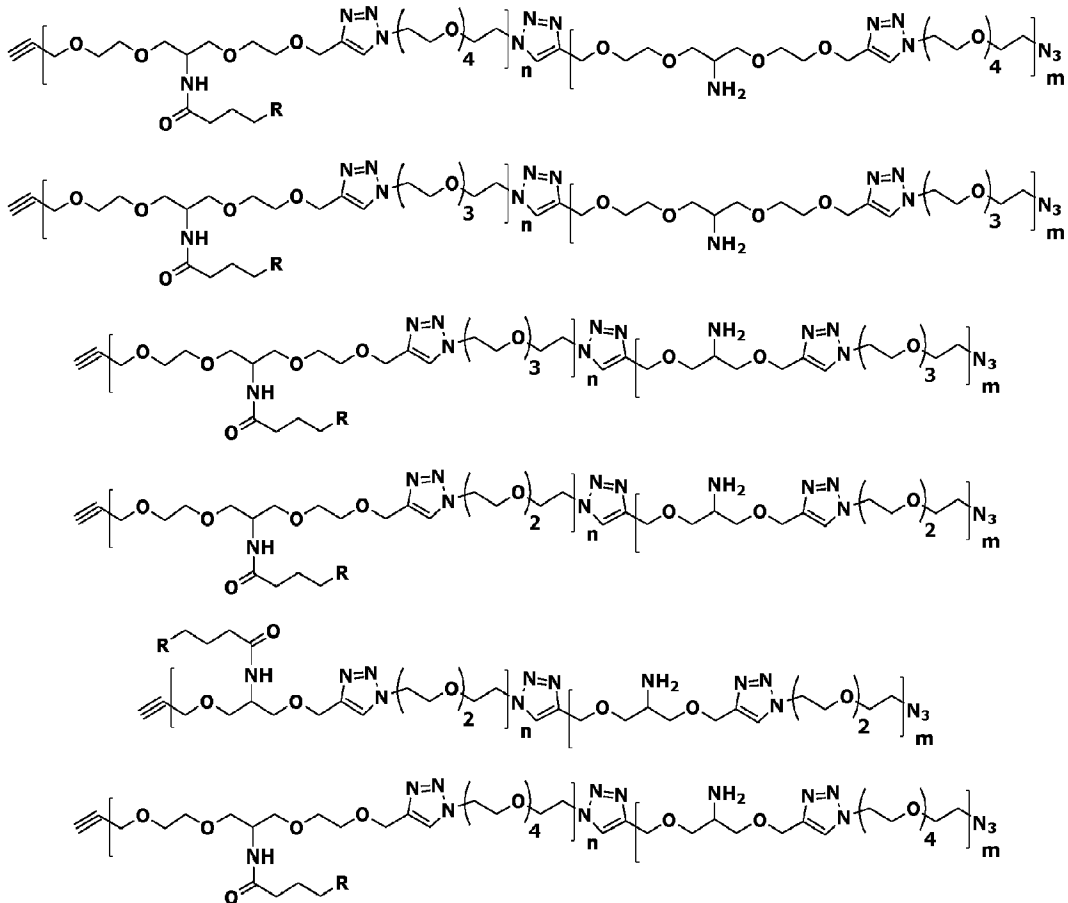
Pueden prepararse colorantes poliméricos fluorescentes solubles en agua mediante polimerización click en condiciones suaves. Estos colorantes poliméricos pueden estar unidos covalentemente a una unidad de biorreconocimiento (biomolécula) y sirven como sondas fluorescentes para una diana. Cuando se incorporan colorantes secundarios como aceptores, se forman colorantes poliméricos en tándem. Ajustando el color de los colorantes aceptores, pueden prepararse colorantes poliméricos en tándem que tienen la misma longitud de onda de excitación (véase la figura 9A) pero un intervalo de diferentes longitudes de onda de emisión alternativas (véase la figura 9B).

Como colorantes colgantes fluoróforos, se seleccionan colorantes BODIPY PEGilados con absorción estrecha deseada. El fluoróforo colgante está unido químicamente a monómeros de éter de etilenglicol solubles en agua terminados con diazida, dialquino o azida/alquino. La cadena de polímero de PEG con colorantes BODIPY unidos puede prepararse usando cicloadiciones 1,3-dipolares catalizadas por Cu(I) de alquino a azida con buen PM (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Cuando sólo un tipo de colorante fluoróforo está unido como grupo colgante, el polímero resultante presenta fluorescencia como colorante polimérico fluorescente simple (véase la figura 8). Cuando se une un segundo fluoróforo aceptor, se logra una cadena polimérica con dos fluoróforos colgantes. Un fluoróforo a nivel de energía más alto puede servir como donador de energía y el 2º fluoróforo a nivel de energía bajo como aceptor de energía. Mezclando el par y la razón de donador/aceptor adecuados, pueden obtenerse los colorantes poliméricos en tándem con la longitud de onda de emisión deseada.

Los siguientes colorantes poliméricos se preparan mediante métodos de polimerización click, usando comonómeros y métodos como se describe en los esquemas de síntesis de las figuras 7A y 7B, donde se entiende que n y m juntos pueden representar la longitud promedio del polímero y las razones relativas de comonómeros, y que n y m pueden seleccionarse según se desee controlando los parámetros de la reacción de polimerización usando cualquier método conveniente. Se entiende que, dependiendo del método de polimerización, las n y m unidades de repetición pueden estar presentes en una configuración aleatoria o en una configuración de bloque. Además, las siguientes estructuras poliméricas pueden conjugarse adicionalmente a cualquier molécula conveniente de interés, por ejemplo, una biomolécula, usando química click mediante un grupo azida o alquino terminal. En algunos casos, n y m se seleccionan cada uno independientemente de 1 a 1000, tal como de 1 a 500, de 1 a 200, de 1 a 100, de 2 a 100 o de 5 a 100.



5 La figura 8 muestra los espectros de absorción y emisión de un colorante polimérico base que incluye un colorante BODIPY colgante de la estructura general mostrada anteriormente. Otros colorantes poliméricos a modo de ejemplo en donde R es un colorante donador unido (por ejemplo, un colorante BODIPY como se ha descrito anteriormente), e incluyendo un grupo -NH₂ de cadena lateral adecuado para la conjugación (por ejemplo, a través de un enlace amida y enlazador a un colorante aceptor) son:

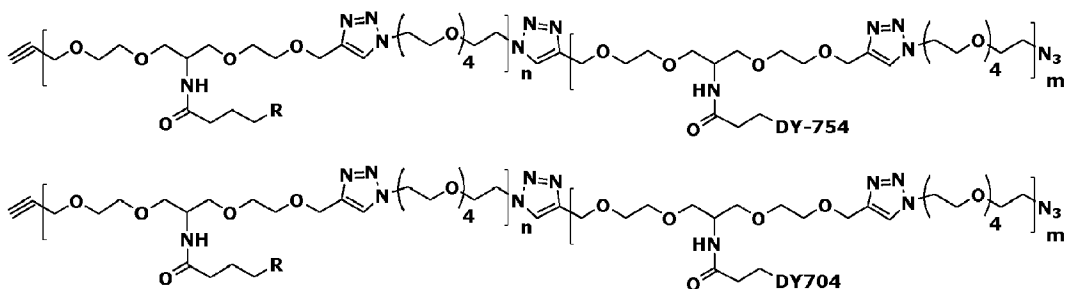


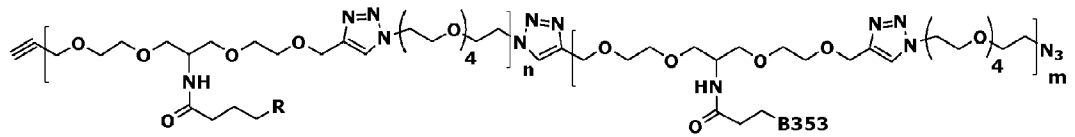
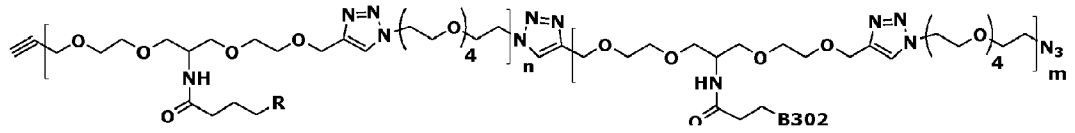
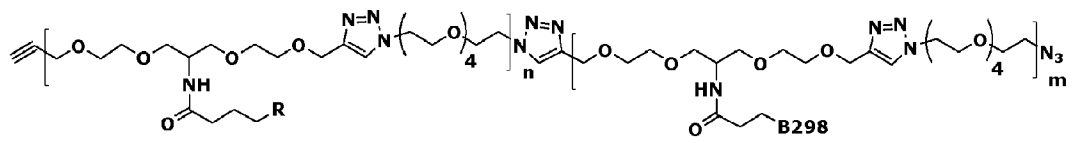
10

15

20

A continuación se muestran estructuras de colorantes poliméricos en tándem a modo de ejemplo en donde R es un colorante donador unido (por ejemplo, un colorante BODIPY como se ha descrito anteriormente), e incluyendo un colorante aceptor unido de interés (por ejemplo, adecuado para la conjugación (por ejemplo, a un colorante aceptor) tal como DY-754 o DY-704, donde DY se refiere a colorantes Dyomics que tienen, por ejemplo, longitudes de onda máximas de emisión de 754 nm o 704 nm, respectivamente. Seleccionando un colorante aceptor de interés que se superpone al menos parcialmente con el espectro de emisión del polímero base (véase la figura 8), pueden producirse colorantes poliméricos en tándem que tienen una variedad de longitudes de onda de emisión. Véanse, por ejemplo, las figuras 9A-9B.





REIVINDICACIONES

1. Un colorante polimérico en tándem que comprende:

un multicromóforo de recolección de luz soluble en agua que comprende:

una cadena principal polimérica que comprende unidades de repetición no conjugadas; y

5 una pluralidad de grupos cromóforos donadores colgantes, cada uno unido independientemente a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica; y

un fluoróforo aceptor unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica y configurado en proximidad receptora de energía a al menos un grupo cromóforo donador colgante del multicromóforo de recolección de luz.

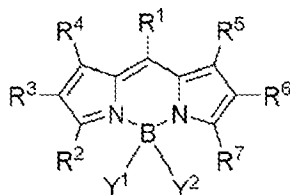
10 2. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1, en donde:

los grupos cromóforos donadores colgantes están sustituidos cada uno con un grupo soluble en agua;

los grupos cromóforos donadores colgantes están configurados en proximidad de transferencia de energía entre sí; y/o

15 los grupos cromóforos donadores colgantes se seleccionan entre un grupo arilo tricíclico condensado, un grupo heteroarilo tricíclico condensado y un grupo BODIPY.

3. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1 o 2, en donde los grupos cromóforos donadores colgantes son grupos BODIPY descritos por la fórmula:



en donde:

20 R¹-R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, grupo solubilizante en agua (WSG) y -L¹-Z¹, o

25 opcionalmente uno cualquiera o más pares de sustituyentes seleccionados de R⁶ y R⁷, R² y R³, R⁵ y R⁶, R³ y R⁴, R⁴ y R¹ y R⁵ y R¹ forman juntos un radical divalente y están unidos cíclicamente y junto con los átomos de carbono a los que están unidos proporcionan un anillo heterociclo, carbociclo, arilo o heteroarilo condensado de 5 o 6 miembros, anillo que puede estar sin sustituir o sustituido adicionalmente con un sustituyente seleccionado independientemente de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, grupo solubilizante en agua (WSG) y -L¹-Z¹;

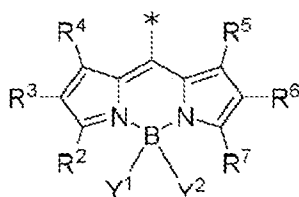
L¹ es un enlazador;

30 Z¹ es una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica; y

Y¹ e Y² se seleccionan independientemente de F, OH, H, ciano, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido y WSG;

en donde uno de Y¹, Y² y R¹-R⁷ está unido a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica.

35 4. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 3, en donde los grupos cromóforos donadores colgantes se describen por la siguiente estructura:

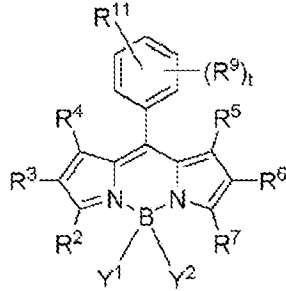


en donde:

* es un punto de unión a una unidad de repetición no conjugada de la cadena principal polimérica;

Y¹ e Y² son cada uno alquínilo sustituido con un WSG.

5. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 4, en donde los grupos cromóforos donadores colgantes se describen por la siguiente estructura:

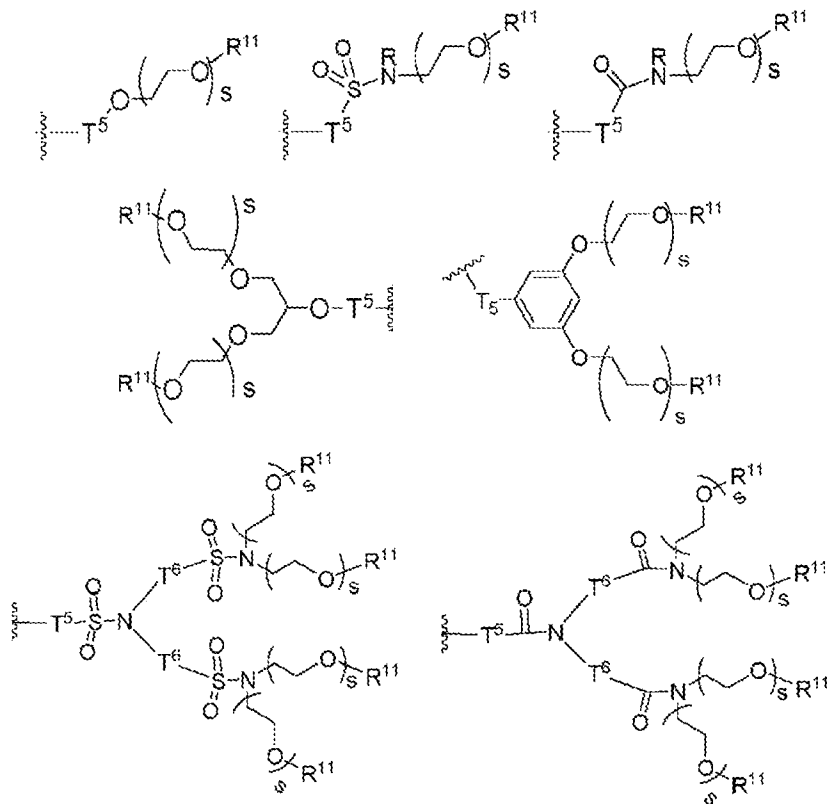


en donde:

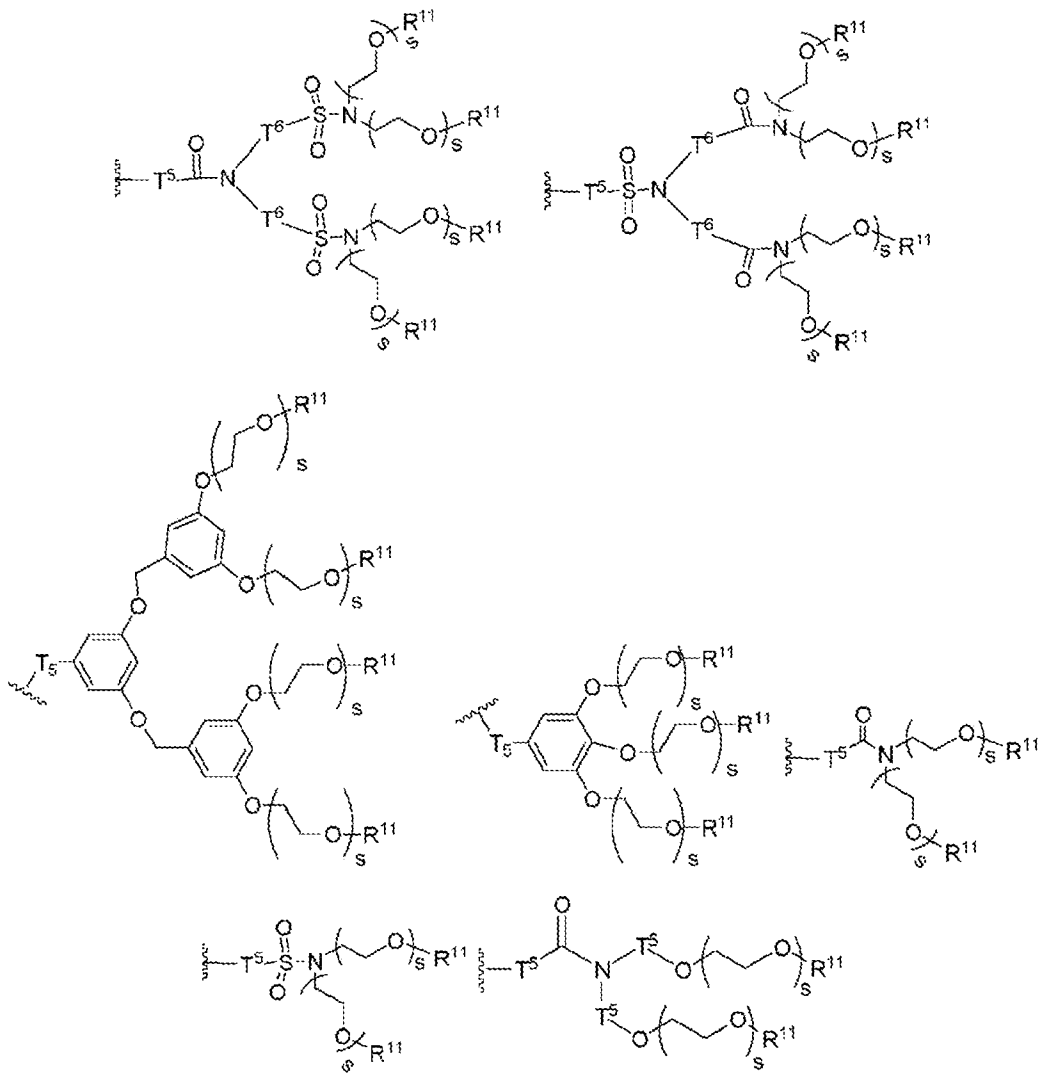
R¹¹ es L¹-Z¹;

- 10 cada R⁹ es un sustituyente opcional seleccionado de halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; y t es 0-4.

6. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1, en donde los grupos cromóforos donadores colgantes están sustituidos con uno o más grupos solubilizantes en agua (WSG) seleccionados independientemente de la siguiente fórmula:



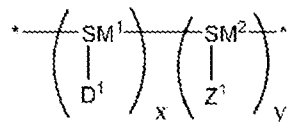
15



en donde:

- 5 T⁵ es un enlazador opcional;
- cada T⁶ es un enlazador;
- R¹¹ y R son independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y
- cada s es un número entero de 1 a 50.

- 10 7. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1, en donde el multicromóforo comprende un segmento de fórmula:



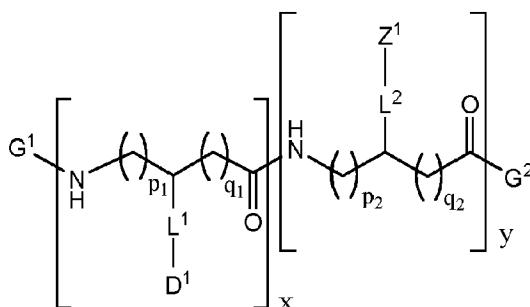
en donde:

la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonómeros SM¹ y SM² que son cada uno independientemente un comonómero no conjugado saturado;

- 15 cada D¹ es independientemente un cromóforo donador colgante unido a SM¹;
- cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva unida a SM²;
- x es el 75 % en moles o más; y

y es el 25 % en moles o menos.

8. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 7, en donde el multicromóforo es de fórmula:



en donde:

5 cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva;

cada L¹ y L² son independientemente un enlazador;

p₁ y q₁ son independientemente 0 o 1, en donde p₁ + q₁ ≤ 1;

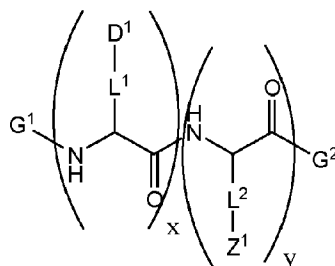
p₂ y q₂ son independientemente 0 o 1, en donde p₂ + q₂ ≤ 1;

10 x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un grupo fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

15 9. El colorante polimérico en tándem de la reivindicación 8, en donde p₁, p₂, q₁ y q₂ son cada uno 0 y el multicromóforo es de fórmula:



en donde:

cada D¹ es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

cada Z¹ es independientemente una etiqueta quimioselectiva;

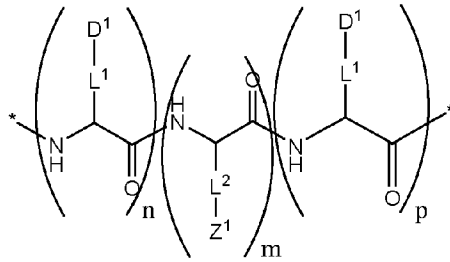
20 L¹ y L² son cada uno independientemente un enlazador;

x es el 75 % en moles o más;

y es el 25 % en moles o menos; y

G¹ y G² se seleccionan cada uno independientemente de un grupo terminal, un segmento de polímero, un grupo cromóforo donador, un grupo fluoróforo aceptor, un enlazador y un miembro de unión específica unido.

25 10. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 9, que comprende un segmento de fórmula:



en donde:

cada D^1 es independientemente un grupo cromóforo donador colgante;

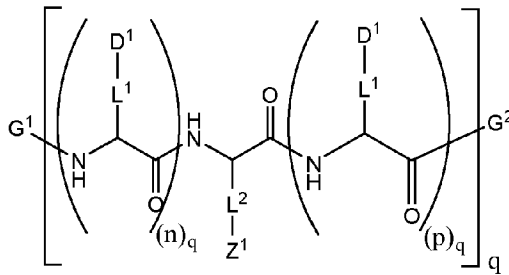
cada Z^1 es independientemente una etiqueta quimioselectiva;

5 cada L^1 y L^2 son independientemente un enlazador;

n y p son cada uno independientemente un número entero de 1 a 20 en donde $n+p \geq 2$; y

m es 1 o 2.

11. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 10, en donde el multicromóforo comprende q segmentos de copolímero y es de fórmula:



10

en donde:

cada $(n)_q$ y cada $(p)_q$ es independientemente un número entero de 1 a 20, en donde para cada uno de los q segmentos $(n)_q + (p)_q \geq 3$; y

q es un número entero de 1 a 100.

15 12. El colorante polimérico en tándem según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en donde la cadena principal polimérica comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas de las siguientes:

XYXX

XXYXX

XXXYXXX

20

XXXYXXXX

XXXXYXXX

XXXXYXXXX

XXXXXYXXXX

XXXXYXXXXXX

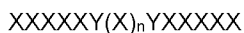
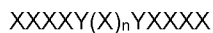
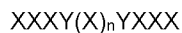
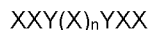
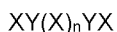
25

XXXXXXXXYXXXXXXXX

XXXXXXXXXYXXXXXXXX

XXXXXXXXXYXXXXXXXX

$Y(X)_nY$



5

en donde:

cada X es un residuo de lisina u ornitina unido covalentemente en N a un grupo cromóforo donador colgante; y

cada Y es un residuo de cisteína o un residuo de cisteína protegido.

13. Un miembro de unión específica marcado, que comprende:

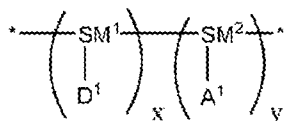
10 un colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1; y

un miembro de unión específica unido al colorante polimérico en tándem.

14. El miembro de unión específica marcado según la reivindicación 14, en donde el miembro de unión específica es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de unión del mismo.

15. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1, en donde la cadena principal polimérica comprende unidades de repetición no conjugadas derivadas de aminoácidos, un monómero de carbonato protegido o un monómero de carbonato cíclico.

16. El colorante polimérico en tándem según la reivindicación 1, que comprende un segmento de fórmula:



en donde:

20 la cadena principal polimérica de unidades de repetición no conjugadas comprende comonómeros SM1 y SM2 que son cada uno independientemente un comonómero no conjugado;

cada D1 es independientemente un cromóforo donador colgante unido a SM1;

cada A1 es independientemente un fluoróforo aceptor unido a SM2;

x es el 75 % en moles o más; y

25 y es el 25% en moles o menos; y

además en donde:

las unidades de repetición de la cadena principal polimérica tienen una secuencia lineal definida y SM1 y SM2 son comonómeros derivados de aminoácidos, monómeros peptoides, un monómero de carbonato protegido o un monómero de carbonato cíclico.

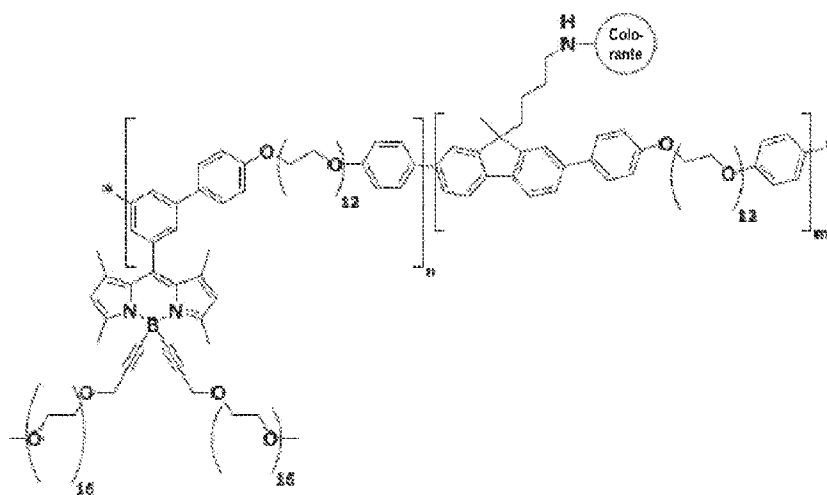


FIG. 1

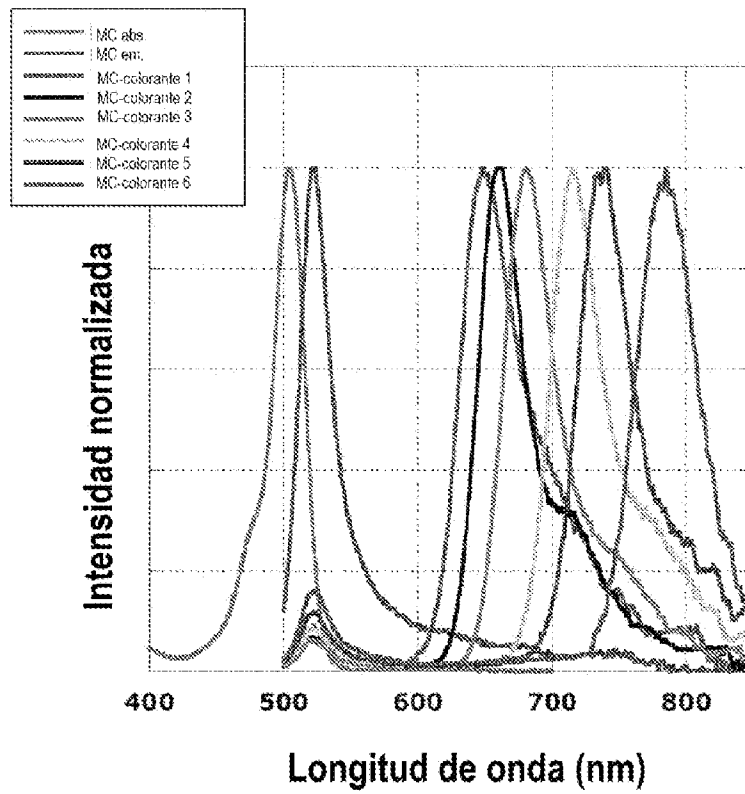


FIG. 2

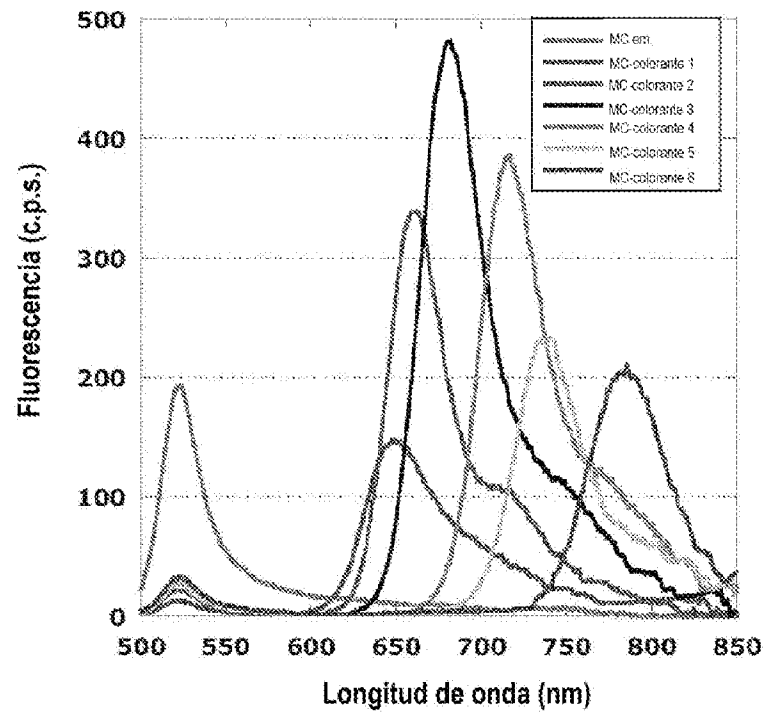


FIG. 3

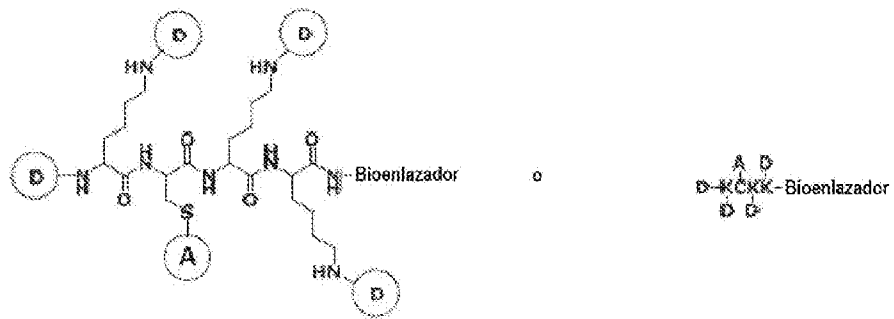


FIG. 4

FIG. 5A

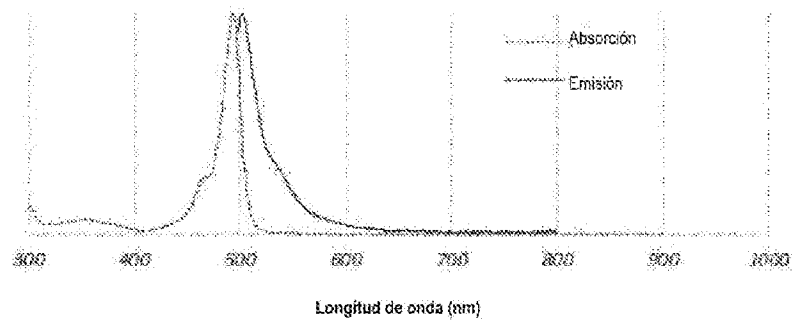


FIG. 5B

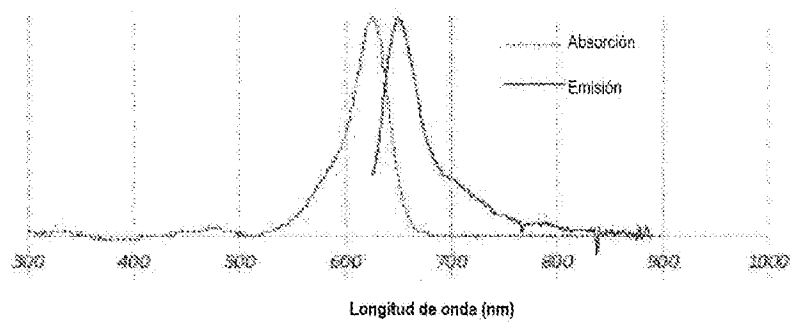


FIG. 5C

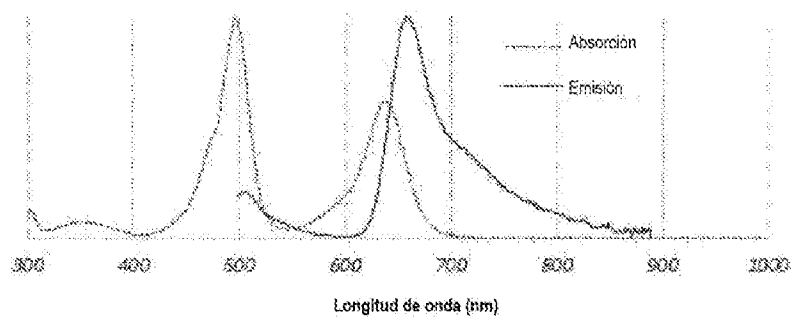


FIG. 6A

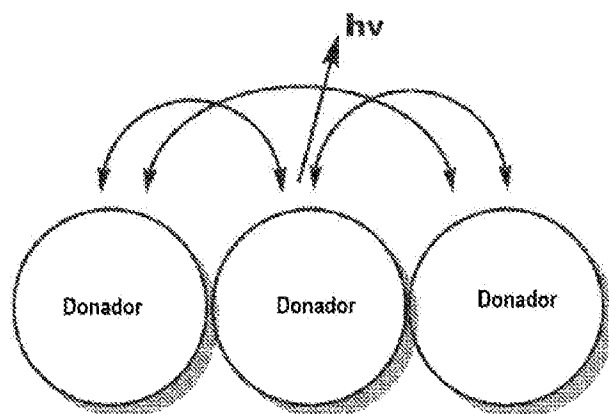


FIG. 6B

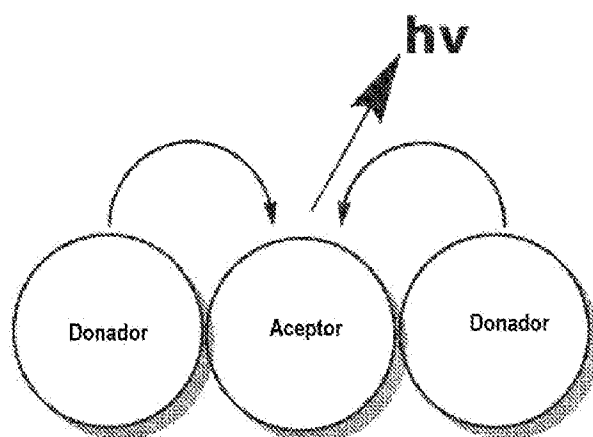


FIG. 7A

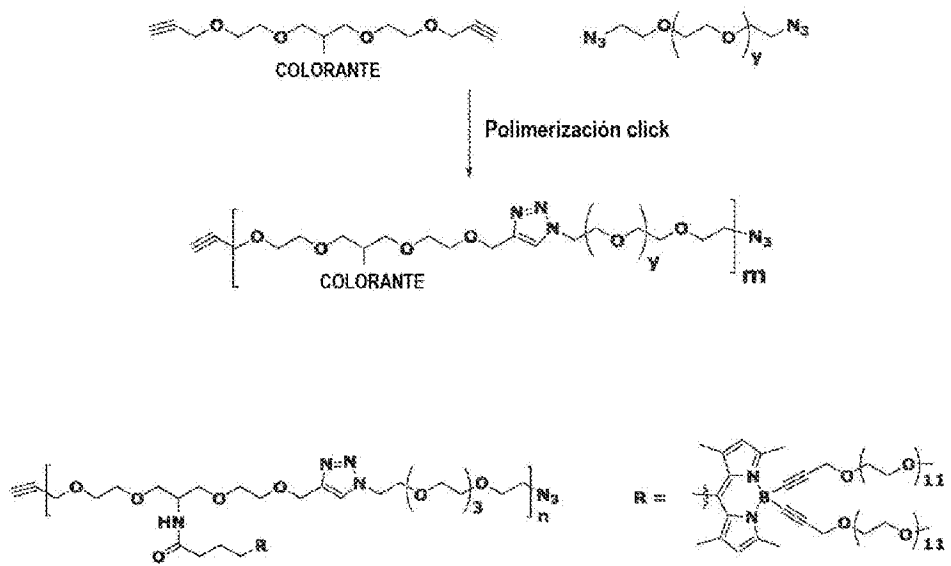


FIG. 7B

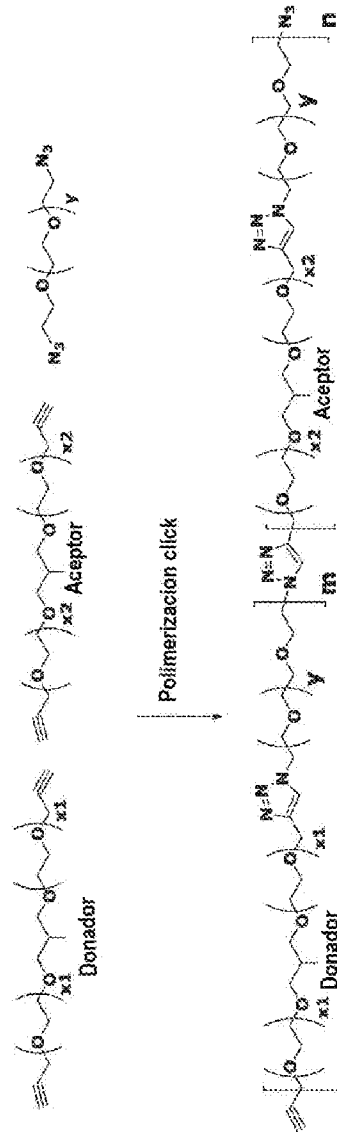


FIG. 8

Colorante polimérico base

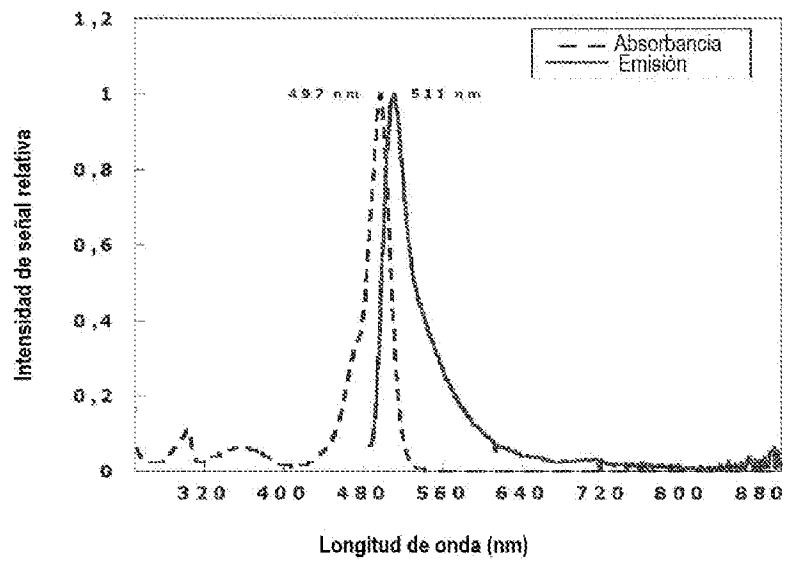


FIG. 9A

Absorción de colorantes poliméricos en tándem

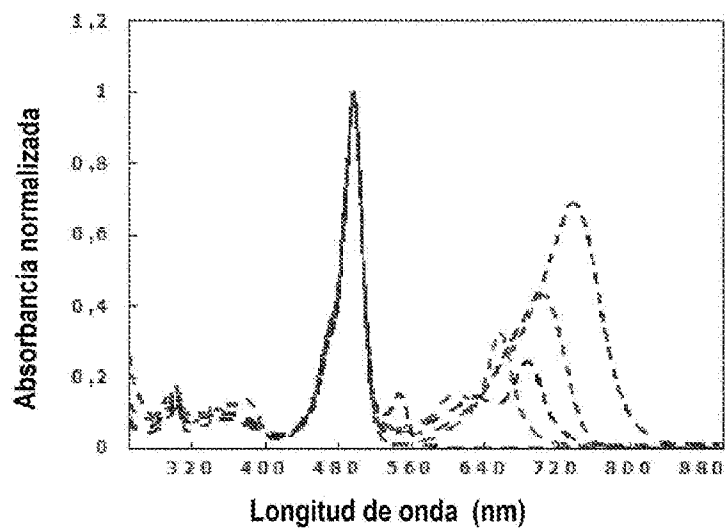


FIG. 9B

Emisión de colorantes poliméricos en tándem

