

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 979 129**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2017 PCT/US2017/049838**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018 WO18045278**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2017 E 17765041 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3507603**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la fluorescencia mejorada**

(30) Prioridad:

01.09.2016 US 201662382594 P

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

24.09.2024

(73) Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (50.0%)
5823 Newton Drive
Carlsbad, CA 92008, US y
PIERCE BIOTECHNOLOGY, INC. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**DESAI, SURBHI;
NLEND, MARIE;
GEE, KYLE;
BAKER, MATTHEW;
AGGELER, ROBERT;
SWEENEY, SCOTT;
RUKAVISHNIKOV, ALEKSEY y
HUANG, SHIH-JUNG**

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 979 129 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

Composiciones y métodos para la fluorescencia mejorada

5

Campo de la invención

Esta descripción se refiere a una composición que comprende un primer anticuerpo,

10 en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,

en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, y en donde:

15 el espaciador se selecciona de:

un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo ($-C(O)C_nH_m$), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y

20 grupos alquilo, alquenilo o alquinilo ($-C_nH_m$), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OPO₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻);

25 restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o

30 el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.

Antecedentes

35

Las biomoléculas etiquetadas con fluorescencia se utilizan ampliamente en diversos métodos, incluyendo aquellos relacionados con ensayos de cuantificación y formación de imágenes celulares. Las biomoléculas, tales como anticuerpos, antígenos, ADN y ARN, se etiquetan con fluorescencia y se utilizan en aplicaciones tales como inmunofluorescencia (IFC), citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica (IHC), transferencia Western, estudios de unión a fármacos, cinética enzimática, formación de imágenes (inmunocitoquímica ICC), que incluye HCA, obtención de imágenes *in vivo*, así como en hibridaciones de ácido nucleico.

40 Knutson y col. (Development and Evaluation of a fluorescent antibody-drug Conjugate for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer, PLOS ONE, 23 de junio de 2016), describe un método que utiliza reactivos disponibles comercialmente, para sintetizar conjugados de anticuerpo fluorescente-fármaco doblemente etiquetados. Específicamente, se describen anticuerpos etiquetados con fluorescencia que portan al menos dos etiquetas fluorescentes (DyLight™ 680), así como un compuesto adicional unido covalentemente a un grupo reactivo del anticuerpo (es decir, NPIS-PTX).

45

La solicitud de patente WO 03/102585 describe un método para monitorizar las interacciones de unión entre biomoléculas dispuestas en matriz y moléculas diana de muestra. También describe anticuerpos etiquetados con fluorescencia a los que se conjugan hasta once etiquetas fluorescentes.

50 Morales y col. (Biomolecule Labeling and Imaging with a New Fluorenyl Two-Photon Fluorescent Probe, Bioconjug Chem. 21 de octubre de 2009; 20[10]: 1992-2000) describe la síntesis de fluoróforos basados en fluoreno adaptados para la formación de imágenes multifotónica, que incorpora la funcionalidad éster de succinimidilo y tioéster como enlazadores reactivos, para un acoplamiento adicional con una amplia variedad de moléculas biológicamente relevantes. También describe anticuerpos etiquetados con fluorescencia con entre tres a seis etiquetas, sin que ocurra la extinción de la etiqueta fluorescente.

55

La solicitud de patente US-2014/0206099 describe métodos, composiciones y kits para el etiquetado de proteínas diana, tales como anticuerpos. Los métodos, composiciones y kits son adecuados para el etiquetado de tales proteínas que se mezclan con otras moléculas no diana, incluyendo BSA, gelatina y otras moléculas biológicas complejas.

60

Los colorantes fluorescentes se continúan eligiendo para estas aplicaciones porque son fáciles de utilizar, y no solo son específicos y sensibles, sino que también proporcionan opciones de multiplexación. Sin embargo, no todas las aplicaciones han sido susceptibles de etiquetado fluorescente. Por ejemplo, en muchas aplicaciones, la intensidad

de la fluorescencia puede disminuirse a medida que se añaden mayores cantidades de etiqueta fluorescente (relaciones altas de colorante a proteína) a biomoléculas (extinción). Además, la fluorescencia también puede disminuirse a través del impedimento estérico causado por el etiquetado fluorescente de la biomolécula. Existe la necesidad de etiquetas fluorescentes y métodos de conjugación que muestren una mayor fuerza de la señal.

5

Resumen

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Se ha descubierto que la intensidad de la fluorescencia puede aumentarse cuando una biomolécula se etiqueta tanto con un colorante como con una molécula espaciadora, en comparación con el conjugado correspondiente preparado solo con el colorante. Los conjugados preparados con estas moléculas espaciadoras muestran una mejora de la fluorescencia en la transferencia Western, ensayos de transferencia de puntos, ensayos de placas, citometría de flujo e aplicaciones de inmunoensayo (p. ej., aplicaciones de formación imágenes de inmunofluorescencia).

10 15 Además, se observa una fluorescencia mejorada, incluso cuando menos moléculas de colorante están asociadas con (covalente o no covalentemente) cada biomolécula. Se cree que este efecto está asociado con la unión de grupos espaciadores a las biomoléculas que presentan una fluorescencia mejorada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la fluorescencia mejorada resulta de una disminución de la extinción de las emisiones de colorante.

20 25 En algunos aspectos, la invención se dirige a una composición que comprende un primer anticuerpo, en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,

30 35 en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, y en donde el espaciador se selecciona de:

un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo ($-C(O)C_nH_m$), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y

35 40 grupos alquilo, alquenilo o alquinilo ($-C_nH_m$), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OP₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻²⁻);

restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o

45 50 el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína. En algunos casos, el primer anticuerpo presenta niveles más altos de emisión fluorescente que un segundo anticuerpo preparado con una cantidad equivalente de etiqueta fluorescente, pero sin el espaciador. En casos adicionales, el primer anticuerpo presenta niveles de emisión fluorescente más altos que el segundo anticuerpo, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo tienen cada uno el mismo número de etiquetas fluorescentes unidos covalentemente, y en donde el segundo anticuerpo no tiene espaciadores unidos covalentemente. En realizaciones específicas, las moléculas espaciadoras reducen la extinción de las etiquetas fluorescentes, en comparación con la extinción en ausencia de espaciador.

55 60 En la invención, las moléculas espaciadoras se conjugan con el anticuerpo a través de un grupo amina reactivo (p. ej., ésteres NHS, el grupo o grupos amina pueden estar en el extremo amino de una cadena lateral de polipéptido y/o lisina). Además, las etiquetas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo mediante un brazo de conjugación. Estas etiquetas fluorescentes pueden tener carga positiva, neutra y/o carga negativa.

65 70 En algunas realizaciones, las etiquetas fluorescentes utilizadas en la práctica de la invención (ambas composiciones y métodos) pueden ser cianina, benzo-rodamina, bodipy, fluoresceína, derivados de benzopirilio, e incluyen, además, colorante Alexa Fluor® y/o colorantes DyLight™. Dichos colorantes se pueden seleccionar del grupo que consiste en Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 500, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610-X, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, AMCA-X, Bodipy® 630/650, Bodipy® 650/665, Bodipy® FL, Bodipy® TMR, Bodipy® TR, Bodipy® TR-X, Cascade Blue®, Dinitrofenilo, Fluoresceína, HEX, JOE, Marina Blue®, Oregon Green® 488, Oregon Green® 514, Pacific Blue™, Pacífico Orange™, Rhodamine Green™, QSY® 7, QSY® 9, QSY® 21, QSY® 35, ROX, Rhodamine Red™, TET, TAMRA, tetrametilrodamina, FAM, Texas Red®, éster de succinimidilo de 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO-SE), DyLight™ 350, DyLight™ 405, DyLight™ 488, DyLight™ 550, DyLight™ 594,

DyLight™ 633, DyLight™ 650, DyLight™ 680, DyLight™ 755 y DyLight™ 800. Por supuesto, otros colorantes, así como formas modificadas de los colorantes anteriores, pueden utilizarse en la práctica de la invención.

- 5 El espaciador puede seleccionarse de, por ejemplo, acetato y polietilenglicol (PEG). Los espaciadores pueden comprender un grupo acetilo y pueden ser una molécula de acetato (p. ej., sulfo-NHS-acetato). Además, los espaciadores pueden comprender o consistir en (PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, y/o MS-(PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
- 10 Además, los espaciadores utilizados en la práctica de la invención pueden comprender o consistir en uno o más grupos seleccionados de un alcanoílo, alquenoílo e alquinil (-C(O)C_nH_m), en donde n es de 1 a 20 átomos, en donde m > n, en donde los átomos de carbono se pueden conectar entre sí mediante enlaces simples, dobles y/o triples. Los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente con -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en el que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆. Además, los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente con amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆.
- 15 15 Además, en realizaciones específicas de la invención, el colorante fluorescente puede comprender uno o más de Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 500, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610-X, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, AMCA-X, Bodipy® 630/650, Bodipy® 650/665, Bodipy® FL, Bodipy® TMR, Bodipy® TR, Bodipy® TR-X, Cascade Blue®, Dinitrofenilo, Fluoresceína, HEX, JOE, Marina Blue®Oregon Green® 488, Oregon Green® 514, Pacific Blue™, Pacific Orange™, Rhodamine Green™, QSY® 7, QSY® 9, QSY® 21, QSY® 35, ROX, Rhodamine Red™, TET, TAMRA, tetrametilrodamina, FAM, Texas Red®, o éster de succinimidilo de 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO-SE); y el espaciador puede comprender uno o más de sulfo-NHS-acetato; (PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15; MS-(PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15; alcanoílo, alquenoílo o alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en donde n es de 1 a 20 átomos, en donde m > n, en donde los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples; o grupos alquilo, alquenilo o alquinilo que están sustituidos adicionalmente con -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, o en donde los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo están sustituidos adicionalmente con amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆. Además, los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente con grupos fosfonio (-PQ₃⁺) en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆.
- 30 35 Las composiciones y métodos de la invención pueden contener o utilizar anticuerpos etiquetados con fluorescencia, en donde la relación de etiqueta fluorescente al anticuerpo es de 1 a 50, de 5 a 30, o de 1 a 20. Las composiciones y métodos de la invención pueden contener o utilizar anticuerpos etiquetados con fluorescencia, en donde la relación de agente espaciador al anticuerpo es de 1 a 50, de 5 a 30, de 5 a 30, o de 1 a 20.
- 40 45 Además, las composiciones y los métodos de la invención pueden contener o usar anticuerpos etiquetados con fluorescencia, en donde el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 0,1 a 25, de 1 a 15, o de 2,5 a 10 veces; en donde el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 2,5 veces; en donde el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 5 veces; en donde el agente espaciador está en exceso molar con respecto a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 7,5 veces; o en donde el agente espaciador está en exceso molar con respecto a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 10 veces.
- 50 55 Además, las composiciones y los métodos de la invención pueden contener o utilizar anticuerpos etiquetados con fluorescencia, en donde el porcentaje de sitios de unión en el anticuerpo (p. ej., grupos amina accesibles) ocupado por la pluralidad de etiquetas fluorescentes está entre el 1 % y el 99 %.
- 60 65 En algunas realizaciones, la presencia del espaciador aumenta la fluorescencia detectable de la etiqueta fluorescente en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 125 %, al menos un 150 %, al menos un 200 %, al menos un 300 %, al menos un 400 %, o al menos un 500 %.
- La invención se refiere, además, a métodos para determinar la presencia de un objetivo deseado en una muestra biológica, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la muestra biológica con una composición de anticuerpo, en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo, en donde las moléculas fluorescentes y espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, (b) detectar la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes; y (c) determinar la presencia del objetivo deseado en la muestra biológica cuando se detecte la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes, en donde el espaciador se selecciona de:
- un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en

los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y

grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OPO₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻); restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺) en el que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; o

el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.

Las muestras biológicas utilizadas en la práctica de la invención pueden comprender lisados celulares, células intactas (p. ej., células intactas en fluido, tales como fluidos corporales), proteínas aisladas y/o proteínas recombinantes. Además, la muestra biológica puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Además, la muestra biológica incluye animales vivos, tales como mamíferos.

Además, las etiquetas fluorescentes pueden conjugarse con los anticuerpos por uno o más (p. ej., de aproximadamente uno a aproximadamente quince, de aproximadamente dos a aproximadamente diez, de aproximadamente dos a aproximadamente quince, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho, de aproximadamente tres a aproximadamente diez, de aproximadamente tres a aproximadamente seis, etc.) polímeros multi-brazo. Además, la distancia promedio entre los cepillos de etiquetas fluorescentes puede ser de entre 200 y 800 angstroms (p. ej., de aproximadamente 200 a aproximadamente 700, de aproximadamente 300 a aproximadamente 800, de aproximadamente 400 a aproximadamente 800, de aproximadamente 500 a aproximadamente 800, de aproximadamente 200 a aproximadamente 600, de aproximadamente 300 a aproximadamente 700, de aproximadamente 350 a aproximadamente 800, etc.). Además, las etiquetas fluorescentes conjugadas con el anticuerpo pueden separarse del anticuerpo en al menos 16 (p. ej., de aproximadamente 16 a aproximadamente 800, de aproximadamente 25 a aproximadamente 800, de aproximadamente 40 a aproximadamente 800, de aproximadamente 60 a aproximadamente 800, de aproximadamente 100 a aproximadamente 800, de aproximadamente 200 a aproximadamente 800, de aproximadamente 250 a aproximadamente 800, de aproximadamente 150 a aproximadamente 600, etc.) enlaces covalentes. Además, el anticuerpo conjugado puede conjugarse con etiquetas fluorescentes que pueden ser uno o más colorantes seleccionados del grupo que consiste en Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 500, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610-X, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, AMCA-X, Bodipy® 630/650, Bodipy® 650/665, Bodipy® FL, Bodipy® TMR, Bodipy® TR, Bodipy® TR-X, Cascade Blue®, Dinitrofenilo, Fluroesceína, HEX, JOE, Marina Blue®, Oregon Green® 488, Oregon Green® 514, Pacific Blue™, Pacific Orange™, Rhodamine Green™, QSY® 7, QSY® 9, QSY® 21, QSY® 35, ROX, Rodamina Red™, TET, TAMRA, tetrametilrodamina, FAM, Texas Red®, o éster de succinimidilo de 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO-SE); y etiquetas fluorescentes del grupo que consiste en colorantes DyLight™ 350, DyLight™ 405, DyLight™ 488, DyLight™ 550, DyLight™ 594, DyLight™ 633, DyLight™ 650, DyLight™ 680, DyLight™ 755, y DyLight™ 800 y DyLight™ pegilado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una realización de la invención. En esta realización, un anticuerpo se conjuga con colorantes fluorescentes NHS en dos excesos molares de colorante diferentes y un espaciador Sulfo NHS-Acetato en tampón borato 50 mM pH 8,5. La conjugación del colorante y el espaciador dan como resultado una sensibilidad mejorada y una extinción reducida. La Figura 2 muestra una representación esquemática de algunas realizaciones de la invención. En esta realización, un anticuerpo se conjuga con colorantes fluorescentes NHS y un espaciador de metil-PEG-NHS-éster en tampón borato 50 mM pH 8,5. Los espaciadores utilizados en esta realización son MS(PEG)₄, MS(PEG)₈ y MS(PEG)₁₂. La Figura 3 muestra los resultados de un análisis de software de una transferencia de puntos capturada utilizando un instrumento de formación de imágenes. La transferencia de puntos se probó con anticuerpos GAM etiquetados conjuntamente con espaciadores de acetato de NHS o MS(PEG)₄ y colorante fluorescente DyLight™ 488 (abreviado en la Tabla 1 “DyLight™ 488”). Los conjugados DyLight™ 488 preparados con Acetato de NHS o MS(PEG)₄ dieron como resultado una mejora de 1,2 a 1,8 veces en intensidad fluorescente que varía de 1,2 a 1,8 veces sobre el conjugado base, no según la invención, (preparado sin el espaciador). Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 1

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 488-5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 488-10x, 3,75x MS(PEG) ₄
2	DyLight™ 488-5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 488-10x, 5x MS(PEG) ₄

Tabla 1

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
3	DyLight™ 488-5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 488-10x, 10x MS(PEG) ₄
4	Pocillo en blanco	22	DyLight™ 488-15x, Sin espaciador
5	DyLight™ 488-5x, 3,75x MS(PEG) ₄	23	DyLight™ 488-15x, 2,5x Acetato de NHS
10	DyLight™ 488-5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 488-15x, 5x Acetato de NHS
7	DyLight™ 488-5x, 10x MS(PEG) ₄	25	DyLight™ 488-15x, 10x Acetato de NHS
15	DyLight™ 488-7,5x, Sin espaciador	26	DyLight™ 488-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
9	DyLight™ 488-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	27	DyLight™ 488-15x, 5x MS(PEG) ₄
10	DyLight™ 488-7,5x, 5x Acetato de NHS	28	DyLight™ 488-15x, 10x MS(PEG) ₄
11	Pocillo en blanco	29	DyLight™ 488-20x, Sin espaciador
20	DyLight™ 488-7,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	30	DyLight™ 488-20x, 2,5x Acetato de NHS
13	DyLight™ 488-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	31	DyLight™ 488-20x, 5x Acetato de NHS
14	DyLight™ 488-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 488-20x, 10x Acetato de NHS
25	DyLight™ 488-10x, Sin espaciador	33	DyLight™ 488-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
15	DyLight™ 488-10x, 2,5x Acetato de NHS	34	DyLight™ 488-20x, 5x MS(PEG) ₄
17	DyLight™ 488-10x, 5x Acetato de NHS	35	DyLight™ 488-20x, 10x MS(PEG) ₄
30	Pocillo en blanco		

Figura 4: Transferencia de puntos-Detección de IgG de ratón con DyLight™ 488-GAM Mejora de veces a partir de acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (3,75x) sobre los conjugados base en diversos excesos molares de tinte. Esta figura muestra los resultados de un análisis de software de una transferencia de puntos capturada utilizando un instrumento de formación de imágenes. La transferencia de puntos se probó con un ensayo mediante el uso de anticuerpos GAM etiquetados conjuntamente con espaciadores de acetato de NHS o de MS(PEG)₄ y colorante fluorescente DyLight™ 488. Estos datos confirmaron los resultados de la Figura 3, mediante el uso de otra fuente para el anticuerpo. Ambos espaciadores de acetato de NHS y de MS(PEG)₄ proporcionaron una mejora significativa (hasta aproximadamente un aumento de 2,6) en la intensidad de la señal fluorescente, en comparación con los conjugados de anticuerpo-colorante por sí solos. Figura 5: Transferencia de puntos-Detección de IgG de ratón con DyLight™ 550-2xPEG-GAR. Mejora de veces en la señal/fondo a partir de Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (3,75x) sobre los conjugados base en diversos excesos molares. Esto muestra los resultados de un análisis de software de una transferencia de puntos capturada utilizando un instrumento de formación de imágenes. La transferencia de puntos se probó con anticuerpos DyLight™ 550-GAM etiquetados conjuntamente con espaciadores de Acetato de NHS o MS(PEG)₄ y colorante fluorescente DyLight™ 550. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:1 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 550-2xPEG-GAR se diluyeron 1/5000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Acetato de NHS o MS(PEG)₄ añadido a la mezcla de conjugación proporcionó una mejora (hasta aproximadamente un aumento de 1,6) de la intensidad de señal, en comparación con los conjugados base en cada uno de los excesos molares de colorante respectivos. La mejora varió de 1,2 a 1,6 veces; notablemente para los siguientes GAM-DyLight™ 550-2xPEG: 10x Colorante + 5x Acetato, 15x Colorante + 3,75x MS(PEG)₄, 20x Colorante + 5x Acetato, y 20x + 3,75x MS(PEG)₄ que mostró una mejora superior a 1,3 veces respecto a los conjugados base respectivos. Figura 6: Detección de puntos-Detección de IgG de ratón con DyLight™ 650-4xPEG-GAM Mejora en veces de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) respecto a conjugados base en cada exceso molar de colorante. Esta figura muestra los resultados de un análisis de software de una transferencia de puntos capturada utilizando un instrumento de formación de imágenes. La transferencia de puntos se probó con anticuerpos GAM etiquetados conjuntamente con Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) y DyLight™ 650-4xPEG (abreviado en la Tabla 2 “DyLight™ 650”) en (10x-20x). La IgG de ratón se diluyó en serie 1:1 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 650-4xPEG-GAR se diluyeron 1/10.000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Los conjugados con alta sustitución de colorante tienden a rendir mejor en aplicaciones tales como la transferencia de puntos y la transferencia Western. Tanto el Acetato de NHS como el (MS)PEG₄ aportan una mejora significativa en la sensibilidad y en la señal/fondo (hasta aproximadamente un aumento de 2,2) respecto a los conjugados base iniciales. El Acetato de NHS añadido en un exceso molar de 2,5x al GAM-DyLight™ 650-4xPEG-15x mejoró la intensidad 1,7 veces. La mejora proporcionada por el Acetato de NHS mostró un rendimiento 1,3 veces mejor que con el conjugado preparado con el máximo exceso molar (20x). Todo el MS(PEG)₄ agregado a la conjugación GAM-DyLight™ 650-4xPEG-15x, mejoró la intensidad de fluorescencia de 1,8 a 2,2 veces, y rindió mejor que el correspondiente conjugado base de máximo exceso molar GAM-DyLight™ 650-4xPEG-20x. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 2

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 650-5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 650-10x, 3,75x MS(PEG) ₄
2	DyLight™ 650-5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 650-10x, 5x MS(PEG) ₄
3	DyLight™ 650-5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 650-10x, 10x MS(PEG) ₄
4	Pocillo en blanco	22	DyLight™ 650-15x, Sin espaciador
5	DyLight™ 650-5x, 3,75x MS(PEG) ₄	23	DyLight™ 650-15x, 2,5x Acetato de NHS
10	DyLight™ 650-5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 650-15x, 5x Acetato de NHS
15	DyLight™ 650-5x, 10x MS(PEG) ₄	25	DyLight™ 650-15x, 10x Acetato de NHS
20	DyLight™ 650-7,5x, Sin espaciador	26	DyLight™ 650-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
25	DyLight™ 650-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	27	DyLight™ 650-15x, 5x MS(PEG) ₄
30	DyLight™ 650-7,5x, 5x Acetato de NHS	28	DyLight™ 650-15x, 10x MS(PEG) ₄
35	Pocillo en blanco	29	DyLight™ 650-20x, Sin espaciador
40	DyLight™ 650-7,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	30	DyLight™ 650-20x, 2,5x Acetato de NHS
45	DyLight™ 650-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	31	DyLight™ 650-20x, 5x Acetato de NHS
50	DyLight™ 650-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 650-20x, 10x Acetato de NHS
55	DyLight™ 650-10x, Sin espaciador	33	DyLight™ 650-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
60	DyLight™ 650-10x, 2,5x Acetato de NHS	34	DyLight™ 650-20x, 5x MS(PEG) ₄
65	DyLight™ 650-10x, 5x Acetato de NHS	35	DyLight™ 650-20x, 10x MS(PEG) ₄
	Pocillo en blanco		

Figura 7: Transferencia de puntos-Mejora en veces de los conjugados DyLight™ 880-4xPEG a partir de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) respecto a conjugados base en cada exceso molar. Esta figura demuestra el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) en el nivel detectable de fluorescencia de GAM-DyLight™ 800-4xPEG (abreviado en la Tabla 3 “DyLight™ 800”) en un ensayo de transferencia de puntos fluorescentes. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:2 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™800-4xPEG-GAR se diluyeron 1/20.000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Esta aplicación de transferencia de puntos muestra que la adición de MS(PEG)₄ (3,75x y 5x) y Acetato de NHS (5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 800-4xPEG de 1,5 a 6 veces. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 3

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 800-5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 800-10x, 3,75x MS(PEG) ₄
2	DyLight™ 800-5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 800-10x, 5x MS(PEG) ₄
3	DyLight™ 800-5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 800-10x, 10x MS(PEG) ₄
4	Pocillo en blanco	22	DyLight™ 800-15x, Sin espaciador
5	DyLight™ 800-5x, 3,75x MS(PEG) ₄	23	DyLight™ 800-15x, 2,5x Acetato de NHS
6	DyLight™ 800-5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 800-15x, 5x Acetato de NHS
7	DyLight™ 800-5x, 10x MS(PEG) ₄	25	DyLight™ 800-15x, 10x Acetato de NHS
8	DyLight™ 800-5x, Sin espaciador	26	DyLight™ 800-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
9	DyLight™ 800-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	27	DyLight™ 800-15x, 5x MS(PEG) ₄
10	DyLight™ 800-7,5x, 5x Acetato de NHS	28	DyLight™ 800-15x, 10x MS(PEG) ₄
11	Pocillo en blanco	29	DyLight™ 800-20x, Sin espaciador

Tabla 3

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
12	DyLight™ 800-7,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	30	DyLight™ 800-20x, 2,5x Acetato de NHS
13	DyLight™ 800-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	31	DyLight™ 800-20x, 5x Acetato de NHS
14	DyLight™ 800-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 800-20x, 10x Acetato de NHS
15	DyLight™ 800-10x, Sin espaciador	33	DyLight™ 800-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
16	DyLight™ 800-10x, 2,5x Acetato de NHS	34	DyLight™ 800-20x, 5x MS(PEG) ₄
17	DyLight™ 800-10x, 5x Acetato de NHS	35	DyLight™ 800-20x, 10x MS(PEG) ₄
18	Pocillo en blanco		

Figura 8: Ensayo de transferencia Western que demuestra el efecto de la adición de acetato de NHS (en un exceso molar de 2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (en un exceso molar de 3,75x) sobre el nivel de detección de fluorescencia de GAR-DyLight™ 488 conjugado con el anticuerpo en excesos molares que varían de 5x a 20x de colorante. El lisado de células A431 se diluyó 3 veces a partir de 1 µg/pocillo. Los anticuerpos primarios de conejo utilizados fueron anti-Hsp90 diluido 1/5000 a partir de 1 mg/ml, y anti-ciclofilina B diluido 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron 1/5000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Estos resultados muestran que en una aplicación de transferencia Western, existe un aumento notable de la intensidad fluorescente respecto al conjugado base (preparado sin el espaciador) en cada exceso molar de colorante, de 7,5x a 20x para DyLight™ 488-GAR conjugado con la adición de Acetato de NHS o MS(PEG)₄. La Figura 9 muestra el efecto del Acetato de NHS (5x) o el MS(PEG)₄ (5x) en GAM-DyLight™ 650-4xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 7,5x) en una transferencia Western. El lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 µg/pocillo. El anticuerpo primario anti-PDI de ratón se diluyó a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/5000 a partir un stock de 1 mg/ml. Acetato de NHS añadido en un exceso molar de 5x con conjugación GAM-DyLight™ 650-4xPEG-7,5x mejoró la intensidad 1,5 veces. Acetato de NHS añadido en un exceso molar de 3,75x con conjugación GAM-DyLight™ 650-4xPEG-7,5x mejoró la intensidad 1,4 veces. La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de transferencia Western que prueba el efecto del acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS (PEG)₄ sobre el nivel de fluorescencia detectable de GAR-DyLight™ 800-4xPEG (abreviado en la Tabla 4 “DyLight™ 800”). El lisado de células A431 se diluyó en serie 1:1. Los anticuerpos primarios anti-Hsp90 de conejo y anti-ciclofilina B se diluyeron ambos 1/5000. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/20.000 a partir de un stock de 1 mg/ml. La adición de MS(PEG)₄ (3,75x y 5x) y Acetato de NHS (2,5-5x) mejoró significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 800-4xPEG en un 20-100 % en diferentes excesos molares del colorante en esta aplicación de transferencia Western. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 5 y 9 no son según la invención):

Tabla 4

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 800-5x Sin espaciador	9	DyLight™ 800-10x Sin espaciador
2	DyLight™ 800-5x, 2,5x Acetato de NHS	10	DyLight™ 800-10x, 2,5x Acetato de NHS
3	DyLight™ 800-5x, 5x Acetato de NHS	11	DyLight™ 800-10x, 5x Acetato de NHS
4	DyLight™ 800-5x, 5x MS(PEG) ₄	12	DyLight™ 800-10x, 5x MS(PEG) ₄
5	DyLight™ 800-5x Sin espaciador	13	DyLight™ 800-15x Sin espaciador
6	DyLight™ 800-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	14	DyLight™ 800-15x, 2,5x Acetato de NHS
7	DyLight™ 800-7,5x, 5x Acetato de NHS	15	DyLight™ 800-15x, 5x Acetato de NHS
8	DyLight™ 800-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	16	DyLight™ 800-15x, 5x MS(PEG) ₄

La Figura 11 demuestra el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (5x) y MS(PEG)₈ (5x) sobre GAM-DyLight™ 550-2xPEG (en un exceso molar de colorante de 12,5x) en ensayos fluorescentes de transferencia Western y transferencia de puntos. El lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 µg/pocillo y se tñó con anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/5000 a partir un stock de 1 mg/ml. La transferencia Western y los ensayos de transferencia de puntos mostraron que la adición de MS(PEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad de los conjugados base DyLight™550-2xPEG en al menos 2 veces. Los conjugados preparados con MS(PEG)₈ de cadena más larga no mostraron una mejora significativa sobre el conjugado base. La Figura 12 muestra el efecto del Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (5x) sobre GAM-DyLight™ 680-4xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 10x) en ensayos de transferencia Western y

transferencia de puntos. Para la transferencia Western, el lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 µg/pocillo, y el anticuerpo primario anti-PDI se diluyó a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Para la transferencia de puntos, la IgG de ratón se diluyó en serie 1:2 a partir de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™680-4xPEG-GAR se diluyeron a 1/20000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Tanto las transferencias Western como las transferencias de puntos muestran que la adición de MS(1000 ngPEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 680-4xPEG de 3 a 4 veces. La Figura 13A (IFC con DyLight™ 488-GAM 4 µg/ml. Veces de mejora de la señal/fondo a partir de Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (3,75x) respecto a conjugados base en diversos excesos molares) y la Figura 13B (IFC-Detección de PDI con DyLight™ 488-GAR 4 µg/ml. Veces de mejora de la señal/fondo a partir de Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (3,75x) respecto a conjugados base en diversos excesos molares) demuestra el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x y 5x) o MS(PEG)₄ (3,75x) sobre la fluorescencia de GAM-DyLight™ 488 (13A) y GAR-DyLight™ 488 (13B) en un exceso molar de colorante de 7,5x a 20x en ensayos de formación de imágenes celulares. Figura 13A: Las células A549 se tiñeron con un anticuerpo primario pH2Ax diluido a 1/1000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 488 se diluyeron a 1/250 a partir de un stock de 1 mg/ml. Los conjugados modificados con Acetato de NHS proporcionaron una mejora de la señal/fondo, en comparación con los conjugados base en excesos molares de colorante de 15x; variando de 1,4 a 1,5 veces (GAM) y de 1,1 a 1,6 veces (GAR). Para los conjugados GAM, se observó la mejora más significativa con Acetato de NHS a 5x y con MS(PEG)₄ a 3,75x, para los conjugados GAR se observó la mejora más notable con Acetato de NHS a 2,5x y con MS(PEG)₄ a 3,75x. La Figura 13B muestra un experimento similar donde las células A549 se tiñeron con un anticuerpo primario pH2Ax. Figura 14: IFC Detección de PDI con DyLight™ 550-2xPEG (7,5x a 20x) 4 µg/ml. Veces de mejora a partir de la adición de acetato de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) respecto a conjugados base en excesos molares de colorante. Esta figura muestra el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x y 10x) a GAM-DyLight™ 550-2xPEG-GAM (en un exceso molar de colorante de 7,5x a 20x) en ensayos de formación de imágenes celulares de fluorescencia. Las células U2OS se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/100 del stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 550-2xPEG-GAM (abreviado en la Tabla 5 “DyLight™ 550”) se diluyeron a 1/250 del stock de 1 mg/ml. En esta aplicación de formación de imágenes celulares, la adición del Acetato de NHS 5x generó una mejora de aproximadamente el 50 %, en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para el conjugado DyLight™ 550-2xPEG GAM en un exceso molar de colorante de 12,5x, y la adición de 3,75x MS(PEG)₄ dio como resultado una mejora de aproximadamente el 50 % sobre los conjugados base en un exceso molar de colorante de 20x. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 5

35	Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 550-7,5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 550-12,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	
2	DyLight™ 550-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 550-12,5x, 5x MS(PEG) ₄	
40	3	DyLight™ 550-7,5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 550-12,5x, 10x MS(PEG) ₄
45	4	En blanco	22	DyLight™ 550-15x, Sin espaciador
50	5	DyLight™ 550-7,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	23	DyLight™ 550-15x, 2,5x Acetato de NHS
55	6	DyLight™ 550-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 550-15x, 5x Acetato de NHS
60	7	DyLight™ 550-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	25	DyLight™ 550-15x, 10x Acetato de NHS
65	8	DyLight™ 550-10x, Sin espaciador	26	DyLight™ 550-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
	9	DyLight™ 550-10x, 2,5x Acetato de NHS	27	DyLight™ 550-15x, 5x MS(PEG) ₄
	10	DyLight™ 550-10x, 5x Acetato de NHS	28	DyLight™ 550-15x, 10x MS(PEG) ₄
	11	En blanco	29	DyLight™ 550-25x, Sin espaciador
	12	DyLight™ 550-10x, 3,75x MS(PEG) ₄	30	DyLight™ 550-20x, 2,5x Acetato de NHS
	13	DyLight™ 550-10x, 5x MS(PEG) ₄	31	DyLight™ 550-20x, 5x Acetato de NHS
	14	DyLight™ 550-10x, 10x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 550-20x, 10x Acetato de NHS
	15	DyLight™ 550-12,5x, Sin espaciador	33	DyLight™ 550-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
	16	DyLight™ 550-12,5x, 2,5x Acetato de NHS	34	DyLight™ 550-20x, 5x MS(PEG) ₄
	17	DyLight™ 550-12,5x, 5x Acetato de NHS	35	DyLight™ 550-20x, 10x MS(PEG) ₄
	18	En blanco		

Figura 15: IFC Detección de PDI con DyLight™ 650-4xPEG (7,5x a 20x) 4 µg/ml. Veces de mejora a partir de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) respecto a conjugados base en cada exceso molar de colorante. Esta figura muestra el efecto de añadir Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) sobre GAM-DyLight™ 650-4xPEG en un ensayo de formación de imágenes celulares de fluorescencia GAM-DyLight™ 650-4xPEG. Las células U2OS se tiñeron con anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/100 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 650-4xPEG-GAAM (abreviado en la Tabla 6 “DyLight™ 650”) se diluyeron a 1/250 a partir de un stock de 1 mg/ml. En esta solicitud, la adición del Acetato de NHS-5x generó una mejora de aproximadamente el 70 %, en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para el conjugado DyLight™ 650-4xPEG-GAM en un exceso molar de 20x, y MS(PEG)₄-3,75x mostró una mejora de aproximadamente el 90 % respecto a los conjugados base en un exceso molar de 20x. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 6

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 650-5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 650-10x, 3,75x MS(PEG) ₄
2	DyLight™ 650-5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 650-10x, 5x MS(PEG) ₄
3	DyLight™ 650-5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 650-10x, 10x MS(PEG) ₄
4	En blanco	22	DyLight™ 650-15x, Sin espaciador
5	DyLight™ 650-5x, 3,75x MS(PEG) ₄	23	DyLight™ 650-15x, 2,5x Acetato de NHS
6	DyLight™ 650-5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 650-15x, 5x Acetato de NHS
7	DyLight™ 650-5x, 10x MS(PEG) ₄	25	DyLight™ 650-15x, 10x Acetato de NHS
8	DyLight™ 650-7,5x, Sin espaciador	26	DyLight™ 650-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
9	DyLight™ 650-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	27	DyLight™ 650-15x, 5x MS(PEG) ₄
10	DyLight™ 650-7,5x, 5x Acetato de NHS	28	DyLight™ 650-15x, 10x MS(PEG) ₄
11	En blanco	29	DyLight™ 650-20x, Sin espaciador
12	DyLight™ 650-7,5x, 3,75x MS(PEG) ₄	30	DyLight™ 650-20x, 2,5x Acetato de NHS
13	DyLight™ 650-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	31	DyLight™ 650-20x, 5x Acetato de NHS
14	DyLight™ 650-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 650-20x, 10x Acetato de NHS
15	DyLight™ 650-10x, Sin espaciador	33	DyLight™ 650-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
16	DyLight™ 650-10x, 2,5x Acetato de NHS	34	DyLight™ 650-20x, 5x MS(PEG) ₄
17	DyLight™ 650-10x, 5x Acetato de NHS	35	DyLight™ 650-20x, 10x MS(PEG) ₄
18	En blanco		

Figura 16: IFC-Veces de mejora con DyLight™ 680-4xPEG a partir de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) respecto a conjugados base en cada exceso molar. Esta figura muestra el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) sobre GAM-DyLight™ 680-4xPEG en un ensayo de formación de imágenes celulares. Las células U2OS se tiñeron con anticuerpo primario anti-PDI de ratón, diluido a 1/100 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 680-4xPEG-GAM (abreviado en la Tabla 7 “DyLight™ 680”) se diluyeron a 1/250 a partir de un stock de 1 mg/ml: En esta aplicación de formación de imágenes celulares, la adición de Acetato de NHS-5x generó una mejora de aproximadamente el 70 % para los conjugados de colorantes tanto a 7,5x como a 10x, en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para DyLight™ 680-4xPEG. El conjugado GAM en excesos molares de exceso molar de 15x y MS(PEG)₄-3,75x, mostró una mejora de aproximadamente el 80 % respecto a los conjugados base en excesos molares de 15x. Los carriles de estas figuras son los siguientes (carriles 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 29 no son según la invención):

Tabla 7

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
1	DyLight™ 680-5x, Sin espaciador	19	DyLight™ 680-10x, 3,75x MS(PEG) ₄
2	DyLight™ 680-5x, 2,5x Acetato de NHS	20	DyLight™ 680-10x, 5x MS(PEG) ₄

Tabla 7

Carril	Colorante/Espaciador	Carril	Colorante/Espaciador
3	DyLight™ 680-5x, 5x Acetato de NHS	21	DyLight™ 680-10x, 10x MS(PEG) ₄
4	En blanco	22	DyLight™ 680-15x, Sin espaciador
5		23	DyLight™ 680-15x, 2,5x Acetato de NHS
6	DyLight™ 680-5x, 5x MS(PEG) ₄	24	DyLight™ 680-15x, 5x Acetato de NHS
10		25	DyLight™ 680-15x, 10x Acetato de NHS
7	DyLight™ 680-5x, 10x MS(PEG) ₄	26	DyLight™ 680-15x, 3,75x MS(PEG) ₄
15		27	DyLight™ 680-15x, 5x MS(PEG) ₄
8	DyLight™ 680-7,5x, Sin espaciador	28	DyLight™ 680-15x, 10x MS(PEG) ₄
9	DyLight™ 680-7,5x, 2,5x Acetato de NHS	29	DyLight™ 680-20x, Sin espaciador
10		30	DyLight™ 680-20x, 2,5x Acetato de NHS
11	En blanco	31	DyLight™ 680-20x, 5x Acetato de NHS
12	DyLight™ 680-7,5x, 3,75 x MS(PEG) ₄	32	DyLight™ 680-20x, 10x Acetato de NHS
20		33	DyLight™ 680-20x, 3,75x MS(PEG) ₄
13	DyLight™ 680-7,5x, 5x MS(PEG) ₄	34	DyLight™ 680-20x, 5x MS(PEG) ₄
14	DyLight™ 680-7,5x, 10x MS(PEG) ₄	35	DyLight™ 680-20x, 10x MS(PEG) ₄
25			
15	DyLight™ 680-10x, Sin espaciador		
16	DyLight™ 680-10x, 2,5x Acetato de NHS		
17	DyLight™ 680-10x, 5x Acetato de NHS		
30	18 En blanco		

Figura 17: TAMRA-GAM conjuga conjuntamente con o sin betaína. Esta figura ilustra los niveles observados de fluorescencia de los conjugados de anticuerpo anti-ratón de cabra (GAM) con TAMRA, con o sin betaína, a diversas relaciones molares de colorante/proteína. Se probaron los niveles de betaína en un exceso molar de 2,5, 5 y 10x, en comparación con los moles de anticuerpo. Estos anticuerpos etiquetados con Rodamina de NHS (TAMRA) y conjugados con una variedad de concentraciones de Betaína de NHS (Betaína 2,5x, Betaína 5x, Betaína 10x exceso molar de colorante) mostraron un aumento en la fluorescencia total cuando los anticuerpos se conjugaron con betaína como agente espaciador.

La Figura 18 (no según la invención) muestra una representación esquemática de la generación y unión de moléculas de PEG ramificadas que contienen etiquetas fluorescentes a una molécula de anticuerpo. En la etapa 1, un grupo reactivo y etiquetas fluorescentes se unen a grupos NH₂ en moléculas de PEG ramificadas. En la etapa 2, se añaden sitios de unión a la molécula de anticuerpo. En la etapa 3, las moléculas de PEG ramificadas etiquetadas con fluorescencia, están unidas covalentemente a la molécula de anticuerpo.

La Figura 19 (no según la invención) es una ilustración que muestra un ejemplo para un conector de un solo brazo (p. ej., amilosa) y uno para un conector de múltiples brazos (dextrano). BM significa biomolécula, y AP significa punto de unión; lo que quiere decir que un etiqueta fluorescente está unida en ese punto.

La Figura 20 (no según la invención) es una ilustración de diferentes tipos de polímeros estrella y un ejemplo de componentes de algunos polímeros estrella, y un ejemplo de cómo se pueden preparar los polímeros estrella. La Figura 20A es una ilustración de un polímero estrella con un núcleo (el círculo negro) y múltiples brazos (las líneas negras). Las estrellas representan etiquetas fluorescentes unidas covalentemente a los brazos. Algunos de los brazos no se etiquetan con fluorescencia para indicar que el etiquetado no se completó. La Figura 20B es una ilustración de un polímero estrella similar, donde los brazos son de dos tipos diferentes (p. ej., polietilenglicol y alcohol polivinílico), representándose los diferentes tipos de brazos por las líneas sólidas y discontinuas. El lado izquierdo de la Figura 20C muestra una representación parcial de un núcleo (los semicírculos negros) con grupos reactivos (las barras grises) que se pueden utilizar para unir otras entidades químicas, o servir como iniciadores para la polymerización. Un núcleo se representa en el centro que tiene adaptadores (líneas negras sólidas) unidos a grupos reactivos. Los brazos poliméricos se muestran a la derecha (líneas discontinuas negras) unidos a los adaptadores, y etiquetados con moléculas fluorescentes (estrellas)

La Figura 21 (no según la invención) muestra una molécula ilustrativa de polilisina de un tipo que puede utilizarse en la práctica de la invención. Los grupos R₁ y R₂ se muestran como no etiquetados. Estos grupos pueden utilizarse como puntos de unión para etiquetas fluorescentes y para la conjugación con anticuerpos.

La Figura 22 (no según la invención): Anticuerpo anti-CD4 humano SK3 de ratón conjugado con constructos de PEG ramificados AF647. Se modificó el anticuerpo anti-CD4 humano SK3 de ratón (a 5,5 mg/mL) con éster de succinimidilo de

Alexa Fluor® 647 en un exceso molar de 10 veces de éster sobre el anticuerpo (línea discontinua). SK3, que SE marcó con un exceso de 10 veces de Azido-SE sobre el anticuerpo, se conjugó mediante click con 100 μ M de PEG-sDIBO AF647-HG20K8 a partir de 1 mg/mL de anticuerpo azido-SK3 durante 20 horas a 25 °C, se inactivó con 5 mM de NaN₃, y el conjugado se purificó con un filtro centrífugo Millipore Amicon™ Ultra-2 de 100 kDa (línea de puntos). SK3, que se marcó con un exceso de 20 veces de Azido-SE con el anticuerpo, se conjugó mediante click con 600 μ M de PEG-sDIBO AF647-HG20K8 a partir de 3 mg/mL de anticuerpo azido-SK3 durante 3 horas a 37 °C, se inactivó con 5 mM de NaN₃, y el conjugado se purificó con un filtro centrífugo Millipore Amicon™ Ultra-2 de 100 kDa (línea continua). Se tiñeron un millón de PBMC/pocillo aislados con Ficoll en una placa de 96 pocillos con los conjugados SK3, utilizando una titulación de 7 puntos de 1 μ g a 0,015 μ g de anticuerpo. El análisis de las células teñidas se realizó utilizando el citómetro de flujo Attune™ NxT.

Figura 23 (no según la invención): Anticuerpo anti-CD4 humano SK3 de ratón conjugado con constructos de PEG ramificados AF647. Se modificó el anticuerpo anti-CD4 humano SK3 de ratón (a 5,5 mg/mL) con éster de succinimidilo Alexa Fluor® 647 en un exceso molar de 10 veces éster sobre el anticuerpo (AF). SK3, que se marcó con un exceso de 20 veces de Azido-SE con el anticuerpo, se conjugó mediante click con 600 μ M de PEG-sDIBO AF647-HG20K8 a partir de 3 mg/mL de anticuerpo azido-SK3 durante 3 horas a 37 °C, se inactivó con 5 mM de NaN₃, y el conjugado se purificó con un filtro centrífugo Millipore Amicon™ Ultra-2 de 100 kDa (B1). SK3, que se marcó con un exceso de 10 veces de Azido-SE con el anticuerpo, se conjugó con 100 μ M de PEG-sDIBO AF647-HG20K8 a partir de 1 mg/mL de anticuerpo azido-SK3 durante 20 horas a 25 °C, se inactivó con 5 mM de NaN₃, y el conjugado se purificó con un filtro centrífugo Millipore Amicon™ Ultra-2 de 100 kDa (B2). Se tiñeron un millón de PBMC/pocillo aislados con Ficoll en una placa de 96 pocillos con los conjugados SK3, utilizando una titulación de 7 puntos de 1 μ g a 0,015 μ g de anticuerpo. El análisis de las células teñidas se realizó utilizando el citómetro de flujo Attune™ NxT, y se comparó con aloficiocianina (APC) (Thermo Fisher Scientific, cat. no. MHCD0405).

Descripción detallada

Las etiquetas fluorescentes se utilizan ampliamente para la formación de imágenes porque proporcionan una detección directa, cuantitativa, específica y sensible de las biomoléculas, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos. Las etiquetas fluorescentes modificadas que están sulfonadas y/o modificadas con PEG, ofrecen una mayor sensibilidad en comparación con los colorantes básicos no modificados. Sin embargo, incluso estas etiquetas fluorescentes modificadas presentan una extinción de fluorescencia en ciertas relaciones de colorante a proteína (D/P).

El aumento de la fluorescencia se observa con el aumento de los excesos molares del colorante de etiquetado, sin embargo, los excesos molares que dan como resultado una superación de las relaciones óptimas de colorante a proteína (D/P), típicamente dan como resultado la extinción y/o precipitación de la biomolécula, especialmente en la aplicación de formación de imágenes fluorescentes, donde la conformación espacial de las interacciones antígeno/anticuerpo o ADN/ARN puede causar una extinción estática.

En algunas realizaciones, la invención comprende una composición que comprende un primer anticuerpo, en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,

en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, y en donde el espaciador se selecciona de:

un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y

grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OPO₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻);

restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o

el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.

Las composiciones de la presente invención presentan una fluorescencia mejorada por cada etiqueta fluorescente. A modo ilustrativo, supóngase que una única etiqueta fluorescente unida a una biomolécula establece una línea base de emisión fluorescente al 100 %. Adicionalmente, supóngase que cuando dos etiquetas fluorescentes están unidas a la misma biomolécula, cada una de las dos etiquetas fluorescentes tiene un promedio del 80 % de la

emisión fluorescente inicial. La invención se orienta, en parte, a las composiciones de la presente invención, que aumentan la emisión fluorescente promedio por encima del 80 % de la línea base.

En algunos casos, las composiciones de la invención, así como las composiciones utilizadas en los métodos de la invención, pueden definirse por una o más propiedades funcionales. Los ejemplos de tales propiedades son los números de etiquetas fluorescentes asociadas con una molécula etiquetada (p. ej., una biomolécula), la distancia promedio (medida en cualquiera de una serie de diferentes formas) entre etiquetas fluorescentes en la molécula etiquetada, y/o el rendimiento cuántico de las etiquetas fluorescentes en la molécula etiquetada.

Una manera de medir la intensidad fluorescente es mediante la medición de Rendimiento cuántico. El Rendimiento cuántico (Φ) para los sistemas fluorescentes es esencialmente la eficiencia de emisión de un fluoróforo dado, y puede determinarse mediante la ecuación:

$$\Phi = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{Número de fotones absorbidos}}$$

El rendimiento cuántico también se puede utilizar para medir los efectos de la extinción, como se establece a continuación en el Ejemplo 8. Además, los instrumentos, tales como el Espectrómetro de Rendimiento cuántico absoluto PL de Hamamatsu (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ 08807, C 11347-11Quantaurus-QY Absolute PL Quantum Yield Spectrometer), que puede utilizarse para medir el rendimiento cuántico, están disponibles comercialmente.

Como se expone en el Ejemplo 8 (no según la invención) y la Tabla 25, el rendimiento cuántico de una molécula etiquetada con fluorescencia, puede compararse con el de la etiqueta fluorescente libre. Si el rendimiento cuántico de una sola unidad de la etiqueta fluorescente libre en condiciones donde no se produzca de manera efectiva ninguna extinción, se establece como uno, entonces esto puede utilizarse como punto de referencia para la comparación de la fluorescencia generada por cada etiqueta fluorescente unida a la molécula etiquetada. En muchos casos, las composiciones de la invención incluyen moléculas etiquetadas con fluorescencia, que se etiquetan con múltiples etiquetas fluorescentes, donde la cantidad promedio de emisión fluorescente por cada etiqueta fluorescente es al menos el 70 % (relación de fluorescencia 0,7) (p. ej., de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 87 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 96 %, etc.) de la emisión fluorescente de la etiqueta fluorescente libre.

Como se expone en el Ejemplo 8 (no según la invención) y la Tabla 25, la intensidad fluorescente puede determinarse mediante la medición de la fluorescencia total de una molécula etiquetada con fluorescencia, en comparación con la fluorescencia de la etiqueta libre. Si la fluorescencia de una sola unidad de la etiqueta fluorescente libre en condiciones donde no se produzca de manera efectiva ninguna extinción, se establece como uno, entonces esto puede utilizarse como punto de referencia para la comparación de la fluorescencia generada por cada etiqueta fluorescente unida a la molécula etiquetada. En muchos casos, las composiciones de la invención incluyen moléculas etiquetadas con fluorescencia, que se etiquetan con múltiples etiquetadores fluorescentes, donde la cantidad promedio de emisión fluorescente por cada etiqueta fluorescente es al menos el 70 % (relación de fluorescencia 0,7) (p. ej., de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 87 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 96 %, etc.) de la emisión fluorescente de la etiqueta fluorescente libre.

Como se expone en la Tabla 25, se puede determinar el brillo de una molécula etiquetada con fluorescencia en comparación con la etiqueta fluorescente libre. El brillo es proporcional al producto del rendimiento cuántico (Φ), el coeficiente de extinción (ϵ) y el número de colorantes por molécula (N), como se indica en la ecuación:

$$B = \Phi \times \epsilon \times N$$

Por lo tanto, la relación del brillo de la etiqueta fluorescente libre con respecto a la de la molécula etiquetada, puede utilizarse para describir la mejora total de la fluorescencia.

Definiciones

Esta descripción y realizaciones ilustrativas no deben tomarse como limitantes. Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, en la medida en que ya no están tan modificados. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en las siguientes memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenda obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la

doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

- 5 Se observa que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la”, y cualquier uso singular de cualquier palabra, incluyen referentes plurales, a menos que se limite de manera expresa e inequívoca a un referencia. Como se usa en la presente memoria, el término “incluir” y sus variantes gramaticales, pretenden ser no limitantes, de modo que la mención de elementos en una lista no es la exclusión de otros elementos similares que pueden sustituirse o añadirse a los elementos de la lista.
- 10 Como se usa en la presente memoria, una “biomolécula” se refiere a cualquier molécula que pueda incluirse en un sistema biológico, incluyendo, pero sin limitarse a, una proteína sintética o natural, o fragmento de la misma, glicoproteína, lipoproteína, aminoácido, nucleósido, nucleótido, ácido nucleico, oligonucleótido, ADN, ARN, carbohidrato, azúcar, lípido, ácido graso, hapteno, anticuerpo y similares.
- 15 Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan en la presente documento en sentido genérico, para incluir polímeros de restos de aminoácidos de cualquier longitud. El término “péptido”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces amida, denominado alternativamente polipéptido. Cuando los aminoácidos son α-aminoácidos, se puede utilizar tanto el isómero óptico L como el isómero óptico D. Adicionalmente, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β-alanina, 20 fenilglicina y homarginina. Los aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados por genes, también pueden utilizarse en la presente invención. Todos los aminoácidos utilizados en la presente invención pueden ser tanto el isómero D como el L. Generalmente, se utilizan los isómeros L. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).
- 25 El término “anticuerpo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig), que se une no covalentemente a ciertas sustancias (p. ej., antígenos e inmunógenos) para formar un complejo anticuerpo-antígeno, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos producidos por líneas celulares de hibridoma, mediante inmunización para provocar una respuesta de anticuerpos policlonales, mediante síntesis química, y mediante 30 células huésped recombinantes que se han transformado con un vector de expresión que codifica el anticuerpo. En los seres humanos, los anticuerpos de inmunoglobulina se clasifican como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y se dice que los elementos de cada clase tienen el mismo isotipo. Los isotipos de IgA e IgG humanos se subdividen, además, en subtipos IgA₁ e IgA₂, e IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Los ratones generalmente tienen los mismos isotipos que los seres humanos, pero el isotipo IgG se subdivide en los subtipos IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃. Por lo tanto, se entenderá que el término “anticuerpo”, como se usa en la presente memoria, incluye dentro de su alcance (a) cualquiera de las diversas clases o subclases de inmunoglobulina (p. ej., IgA, IgD, IgG, IgM e IgE, derivadas de cualquier animal que produjo anticuerpos) y (b) anticuerpos policlonales y monoclonales, tales como anticuerpos murinos, químicos o humanizados. Las moléculas de anticuerpo tienen regiones de secuencias de aminoácidos que pueden actuar como un determinante antigenético (p. ej., la región Fc, la cadena ligera kappa, la cadena ligera lambda, la región bisagra, etc.). Un anticuerpo que se genera contra una región seleccionada se 40 designa anti-[región] (p. ej., anti-Fc, cadena ligera anti-kappa, cadena ligera anti-lambda, etc.). Típicamente, un anticuerpo se genera contra un antígeno mediante la inmunización de un organismo con una macromolécula, para iniciar la activación de los linfocitos para expresar la proteína de inmunoglobulina. El término anticuerpo, como se usa en la presente memoria, también cubre cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión a anticuerpos, incluyendo, sin limitación, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col., *Science* 242:423 [1988] y Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 [1988]). Estos pueden 45 derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial o totalmente sintéticamente.
- 50 Además, los anticuerpos VHH pueden utilizarse tanto como obtenidos de células estimuladas con antígeno o como proteínas de unión a antígenos diseñadas.
- 55 El término “fragmentos de anticuerpos”, como se usa en la presente memoria, se refiere a fragmentos de anticuerpos que retienen las principales características de unión selectiva del anticuerpo completo. Los fragmentos particulares son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, que se obtienen mediante digestión con diversas proteasas, y que carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, o los denominados fragmentos “semimoléculas” obtenidos por escisión reductora de los enlaces disulfuro que conectan los componentes de la cadena pesada en el anticuerpo intacto. Dichos fragmentos también incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de cadena ligera, fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena sencilla, en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un conector peptídico. Otros ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) el fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (ii) el fragmento dAb (Ward y col., *Nature* 341:544 [1989]), que consiste en un dominio VH; (iii) regiones CDR aisladas; y (iv) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) descritas anteriormente. Además, pueden prepararse fragmentos arbitrarios utilizando tecnología recombinante, que conserva las características de reconocimiento de antígeno.
- 60 65 Los anticuerpos VHH ilustrativos que pueden utilizarse son un anticuerpo de dominio único que son fragmentos de anticuerpos compuestos por un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Tales fragmentos de anticuerpo

tienen típicamente un peso molecular de solo 12-25 kDa y, por lo tanto, son más pequeños que muchos otros anticuerpos (150-160 kDa), que se componen de dos cadenas de proteínas pesadas y dos cadenas ligeras.

- Como se usa en la presente memoria, un “antígeno” se refiere a una molécula que induce, o es capaz de inducir, la formación de un anticuerpo, o a la que un anticuerpo se une selectivamente, incluyendo, pero sin limitarse a, material biológico. El antígeno también se refiere a “inmunógeno”. Un anticuerpo se une selectivamente a un antígeno cuando hay una falta relativa de reactividad cruzada con o interferencia por otras sustancias presentes.
- El término “grupo reactivo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo que sea capaz de reaccionar con otro grupo químico para formar un enlace covalente, es decir, es reactivo covalentemente en condiciones de reacción adecuadas, y generalmente representa un punto de unión para otra sustancia. Los grupos reactivos generalmente incluyen grupos nucleófilos, electrófilos y fotoactivables. Los grupos reactivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfénicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, isoonitrilos sulfobénicos, amidinas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximinas, ácidos hidroxámicos, alquinos y azidas.
- Como se usa en la presente memoria, un “espaciador”, “molécula espaciadora” o “agente espaciador”, se refiere a un compuesto (p. ej., un compuesto orgánico) que cuando se conjuga con una biomolécula, directa o indirectamente, es capaz de mejorar la fluorescencia emitida desde la biomolécula. Se cree que esto es el resultado de la reducción de la extinción fluorescente de un etiqueta fluorescente. Cualquier número de compuestos puede actuar como espaciadores, los compuestos ilustrativos incluyen Acetato de NHS y diversas formas de polietilenglicol (PEG). Como se usa en el presente documento, el término “polietilenglicol” o “PEG”, se refiere a un oligómero o polímero de óxido de etileno. Las longitudes de las cadenas poliméricas de PEG pueden variar mucho, pero tienden a tener una masa molecular de hasta 10.000.000 g/mol. Los PEG también están disponibles con diferentes geometrías. Por ejemplo, los PEG ramificados tienen típicamente de tres a diez cadenas de PEG que emanan de un grupo de núcleo central. Los PEG estrella tienen de 3 a 100 cadenas de PEG que emanan de un grupo de núcleo central. Los PEG peine tienen múltiples cadenas de PEG normalmente injertadas sobre una cadena principal de polímero. La mayoría de los PEG incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares (es decir, son polidispersos). La distribución de tamaños se puede caracterizar estadísticamente por su peso molecular promedio en peso y su peso molecular promedio en número, cuya relación se denomina índice de polidispersidad. Los compuestos de PEG ilustrativos que pueden utilizarse en la práctica de la invención, incluyen MS(PEG)₄, MS(PEG)₈ y MS(PEG)₁₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, n.º de cat. 22341, 22509B y 22686, respectivamente), así como compuestos de PEG de cadena ramificada, tales como éster de (metil-PEG₁₂)₃-PEG₄-NHS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, n.º de cat. 22421).
- Como se usa en la presente memoria, el término “espaciador directo” se refiere a una molécula que tenga al menos una etiqueta fluorescente unida a la misma, y que se une directamente a una biomolécula. Los espaciadores directos pueden ser (1) un solo polímero o (2) múltiples polímeros unidos a un núcleo. Los ejemplos de espaciadores directos incluyen polímeros de un solo brazo y polímeros multi-brazo.
- Como se usa en la presente memoria, un “polímero” es una molécula compuesta por subunidades de repetición (típicamente, al menos 4 subunidades de repetición). Los polímeros pueden ser sintéticos o de origen natural. Las unidades de repetición de un polímero no necesitan ser idénticas. Por ejemplo, las proteínas son polímeros que están compuestos por diferentes subunidades de aminoácidos. Además, los polímeros no necesitan ser moléculas totalmente lineales y, por lo tanto, pueden ser dextranos ramificados.
- Como se usa en la presente memoria, el término “polímero de un solo brazo” se refiere a una molécula no ramificada a la que se une al menos una etiqueta fluorescente, y que tiene una estructura no ramificada (véase la Figura 19, no según la invención). Ejemplos de polímeros de un solo brazo que pueden utilizarse en la práctica de la invención, son polisacáridos “lineales” (p. ej., amilosa), polietilenglicoles, moléculas de carbono de cadena larga (p. ej., Ahx) y polipéptidos. En algunos casos, los polisacáridos no ramificados/lineales están compuestos por monómeros conectados entre sí por enlaces α1,4.
- Como se usa en la presente memoria, el término “polímero multi-brazo” se refiere a una molécula ramificada a la que se une al menos una etiqueta fluorescente, y que tiene una estructura no ramificada (véase la Figura 19, no según la invención). Los ejemplos de polímeros multi-brazo que pueden utilizarse en la práctica de la invención, son polisacáridos ramificados (p. ej., dextranos, glucógeno), polietilenglicoles, moléculas de carbono de cadena larga ramificada (p. ej., Ahx) y polipéptidos ramificados.
- Como se usa en la presente memoria, el término “molécula de conjugación” o “brazo de conjugación”, se refiere a los enlazadores a través de los cuales los colorantes están conectados (p. ej., conectados covalentemente) a moléculas (p. ej., biomoléculas). La molécula de conjugación puede unirse a una sola molécula de colorante o múltiples moléculas de colorante (el mismo colorante o diferentes colorantes).

Como se usa en la presente memoria, el término “fluorescencia” se refiere a un fenómeno óptico en el que una molécula absorbe un fotón de alta energía, y vuelve a emitir como un fotón de menor energía (longitud de onda más larga), con la diferencia de energía entre los fotones absorbidos y emitidos que terminan como vibraciones moleculares o calor.

- 5 El término “etiqueta fluorescente”, “colorante fluorescente”, “fluoróforo” o “resto fluorescente”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto, grupo químico, o composición, que es inherentemente fluorescente. Los fluoróforos pueden contener sustituyentes que alteran la solubilidad, las propiedades espectrales o las propiedades físicas del fluoróforo. Numerosos fluoróforos son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, cumarina, cianina, benzofurano, una quinolina, una quinazolinona, un indol, un furano, un benzazol, un borapolizaindaceno y xantenos, 10 incluyendo fluoresceína, rodamina y rodol, así como otros fluoróforos descritos en RICHARD P. HAUGLAND, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (9^a edición, CD-ROM, septiembre de 2002). Las químicas reactivas, tales como N-hidroxisuccinimida (NHS), maleimida e hidrazidas, así como química click (p. ej. SiteClick™) se utilizan actualmente para la conjugación de etiquetas fluorescentes con biomoléculas.
- 15 Como se usa en la presente memoria, el término “conjugado” se refiere a una molécula unida a otra molécula, ya sea directa o indirectamente, ya sea por enlace covalente o no covalente.

El término “conjugado de colorante”, se refiere a una molécula de colorante unida covalentemente o no covalentemente a otra molécula portadora, tal como un anticuerpo y, en muchos casos, los colorantes se unen covalentemente. El conjugado de colorante puede unirse directamente a través de un enlace covalente sencillo, reticulado, o unido a través de un enlazador, tal como una serie de enlaces covalentes estables que incorporen 1-20 átomos no de hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en C, N, O, S y P, que unen covalentemente el colorante fluorescente al anticuerpo u otro resto, tal como un grupo químicamente reactivo o un componente biológico y no biológico. La conjugación o el enlazador pueden implicar un motivo de unión al receptor, tal como biotina/avidina.

25 20 25 30 35 El término “colorante de IR cercano” o “molécula indicadora de IR cercano” o “colorante NIR” o “molécula indicadora NIR”, como se usa en la presente memoria, indica una molécula o indicador de colorante con una longitud de onda de excitación de aproximadamente 580 nm a aproximadamente 800 nm. En muchos casos, los colorantes NIR emiten en el rango de aproximadamente 590 nm a aproximadamente 860 nm. En muchos casos, los colorantes NIR se excitan desde aproximadamente 680 hasta aproximadamente 790 nm. En muchos casos, los colorantes incluyen colorante Alexa Fluor® 660, colorante Alexa Fluor® 680, colorante Alexa Fluor® 700, colorante Alexa Fluor® 750, y colorante Alexa Fluor® 790. Los colorantes NIR son particularmente ventajosos para la formación de imágenes *in vivo*, porque pueden visualizarse selectivamente sin excitar los materiales endógenos presentes en el cuerpo vivo. Algunos de los colorantes NIR tienen un gran desplazamiento de Stokes, de modo que las longitudes de onda de excitación y emisión estén separadas por al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 nm.

40 45 50 55 “Soporte sólido” significa un material de sustrato que tenga una superficie rígida o semirrígida. Típicamente, al menos una superficie del sustrato será sustancialmente plana, aunque puede ser deseable separar físicamente determinadas regiones con, por ejemplo, pozos, regiones elevadas, trincheras grabadas u otra topología de este tipo. Los materiales de soporte sólidos también incluyen esferas (incluidas microesferas), varillas (tales como fibras ópticas) y artículos fabricados y con forma irregular.

Los materiales de soporte sólido incluyen cualesquiera materiales que se utilicen como matrices de afinidad o soportes para síntesis y análisis de moléculas químicas y biológicas, tales como, pero sin limitarse a: poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), poliestireno, policarbonato, polipropileno, nailon, vidrio, dextrano, quitina, arena, piedra pómez, politetrafluoroelíleno, agarosa, polisacáridos, dendrímeros, fulerenos, poliacrilamida, material compuesto no covalente de Kieselguhr-poliacrilamida, compuesto covalente de poliestireno-poliacrilamida, poliestireno-PEG [polietilenglicol] compuesto, silicio, caucho y otros materiales utilizados como soportes para síntesis en fase sólida, separaciones y purificaciones de afinidad, reacciones de hibridación, inmunoensayos y otras de tales aplicaciones. El soporte sólido puede ser particulado o puede estar en forma de una superficie continua, tal como una placa o pocillo de microtitulación, un portaobjetos de vidrio, un chip de silicio, una lámina de nitrocelulosa, malla de nailon, u otros materiales de este tipo.

“Kit” significa un conjunto empaquetado de componentes relacionados, típicamente uno o más compuestos o composiciones.

55 Biomoléculas detectables

En la presente memoria se describen composiciones según las reivindicaciones adjuntas.

60 a. Espaciadores

En algunas realizaciones, el espaciador comprende un grupo acetilo (-C(O)CH₃). En algunas realizaciones, el espaciador es una molécula de acetato. En algunas realizaciones, la molécula de acetato es sulfo-NHS-acetato.

En algunas realizaciones, el agente espaciador comprende polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el agente espaciador comprende (PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas realizaciones, el agente espaciador comprende MS-(PEG)n.

- 5 En algunas realizaciones, el espaciador se selecciona de un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente. En algunas realizaciones, las sustituciones específicas incluyen restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, las sustituciones específicas incluyen amonio (-NH₃₊), grupos amonio cuaternario (-NR₃₊), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃₊), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆.

10 En algunas realizaciones, el espaciador se selecciona de grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente. En algunas realizaciones, las sustituciones específicas incluyen grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃₋), grupos carboxilato (-CO₂₋), grupos fosfato (-OPO₃₋₂), y/o grupos fosfonato (-PO₃₋₂). En algunas realizaciones, otras sustituciones incluyen restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en el que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, otras sustituciones específicas incluyen amonio (-NH₃₊), grupos amonio cuaternario (-NR₃₊), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃₊), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆.

15 En algunas realizaciones, el agente espaciador comprende betaína (es decir, trimetilglicina).

- 20 b. Etiqueta fluorescente
25 Los colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria funcionan como moléculas indicadoras para conferir una señal detectable, directa o indirectamente, a la muestra, como resultado de la conjugación con un grupo funcional en la proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, grupos amina o grupos tiol. Esto da como resultado la capacidad de detectar la proteína total en una muestra generalmente en combinación con la detección de un subconjunto de la proteína total de la muestra. En tales casos, las etiquetas de proteínas totales son distinguibles de manera detectable del colorante que etiqueta un subconjunto de la proteína total en la muestra.

25 Cuando la respuesta detectable es una respuesta de fluorescencia, normalmente es un cambio en la fluorescencia, tal como un cambio en la intensidad, excitación o longitud de onda de emisión, distribución de la fluorescencia, vida útil de la fluorescencia, polarización de la fluorescencia, o una combinación de los mismos.

30 Los colorantes fluorescentes pueden ser cualquier fluoróforo conocido por un experto en la técnica. Típicamente, el colorante contiene uno o más anillos aromáticos o heteroaromáticos, que están opcionalmente sustituidos una o más veces por una variedad de sustituyentes, incluyendo, sin limitación, halógeno, nitrógeno, sulfo, ciano, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilalquilo, acilo, arilo o sistema de anillos de heteroarilo, benzo u otros sustituyentes típicamente presentes en cromóforos o fluoróforos conocidos en la técnica.

35 Una amplia variedad de fluoróforos que pueden ser adecuados para el etiquetado total de proteínas como se describe en la presente memoria, ya se conocen en la técnica (RICHARD P. HAUGLAND, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH PRODUCTS [2002]). Un colorante fluorescente utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, es cualquier resto químico que muestre un máximo de absorción más allá de 280 nm. Tales restos químicos incluyen, pero no se limitan a, un pireno, pirenolas sulfonadas, cumarinas sulfonadas, carbocianinas sulfonadas, xantenos sulfonados, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un isoindol de indol, una indolizina, un benzindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una carbocianina, un carbostirilo, una porfirina, un salicilato, una antranilato, un carboestireno, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinoléina, una isoquinolina, un cromeno, un borapoliazaindaceno, un xanteno, una fluoresceína, una rosamina, una rodamina, una rodamina, benzo- o dibenzofluoresceína, seminaftofluoresceína, una naftofluoresceína, un bimano, una oxazolina o una benzoxazina, una carbazina, un fenalenona, una cumarina, un benzofurano, un benzfenalenona y derivados de los mismos. Como se usa en la presente memoria, las oxazinas incluyen resorufinas, aminooxazinonas, diaminoxazinas, y sus análogos benzosustituidos.

40 En un aspecto, los colorantes fluorescentes contienen uno o más anillos aromáticos o heteroaromáticos, que están opcionalmente sustituidos una o más veces por una variedad de sustituyentes, incluyendo, sin limitación, halógeno, nitrógeno, sulfo, ciano, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilalquilo, acilo, arilo o sistema de anillos heteroarilo, benzo, u otros sustituyentes típicamente presentes en cromóforos o fluoróforos conocidos en la técnica. En un aspecto, el fluoróforo es un xanteno que comprende uno o más anillos de jerolidina.

45 En una realización ilustrativa, los colorantes se sustituyen independientemente por sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, amino, amino sustituido, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, sulfo, grupo reactivo, soporte sólido y molécula portadora. En otra

realización, los colorantes de xanteno de esta invención comprenden ambos compuestos sustituidos y no sustituidos en el átomo de carbono del anillo central del xanteno, por sustituyentes que se encuentran típicamente en los colorantes basados en xanteno, tales como fenilo y restos fenilo sustituidos. En muchos casos, los colorantes son rodamina, fluoresceína, borapoliazindona, indol y derivados de los mismos.

- 5 La elección del grupo reactivo utilizado para unir las etiquetas de proteínas totales o las etiquetas de marcador de expresión a la proteína a conjugar, típicamente depende del grupo reactivo o funcional de la sustancia a conjugar y el tipo o longitud de enlace covalente deseado. Los tipos de grupos funcionales típicamente presentes en las sustancias orgánicas o inorgánicas (biomolécula o no biomolécula) incluyen, pero no se limitan a, aminas, amidas, tioles, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, fosfatos, imidazoles, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas disustituidas, haluros, epóxidos, haluros de sililo, ésteres de carboxilato, ésteres de sulfonato, purinas, pirimidinas, ácidos carboxílicos, enlaces olefínicos, o una combinación de estos grupos. En proteínas, puede producirse una variedad de sitios que incluyen, pero no se limitan a, aminas, tioles, alcoholes y fenoles.
- 10 15 Los colorantes fluorescentes reactivos con amina que pueden utilizarse en los métodos de etiquetado de proteínas descritos en la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 500, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610-X, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, AMCA-X, Bodipy® 630/650, Bodipy® 650/665, Bodipy® FL, Bodipy® TMR, Bodipy® TR, Bodipy® TR-X, Cascade Blue®, Dinitrofenilo, Fluoresceína, HEX, JOE, Marina Blue®Oregon Green® 488, Oregon Green® 514, Pacific Blue™, Pacific Orange™, Rhodamine Green™, QSY® 7, QSY® 9, QSY® 21, QSY® 35, ROX, Rhodamine Red™, TET, TAMRA, tetrametilrodamina, FAM, Texas Red®, y éster de succinimídilo de 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO-SE).
- 20 25 En algunas realizaciones, los reactivos/colorantes fluorogénicos que se unen a las etiquetas unidas a los anticuerpos utilizados en los métodos de etiquetado de proteínas descritos en la presente memoria, son fluoróforo arsenical, que incluyen, un derivado biarsenical de fluoresceína, tal como, solo a modo ilustrativo, FlAsH-EDT2 (4'-5'-bis(1,3,2-ditioarosolan-2-il)fluoresceína-(2,2-etanoditiol)2) (LUMIO™ Green, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), o un derivado biarsénico de resorufina, tal como, solo a modo ilustrativo, ReAsH-EDT2 (LUMIO™ Red, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), o en su lugar puede ser un derivado oxidado, tal como ChoXAsH-EDT2 o HoXAsH-EDT2. Además, el fluoróforo biarsénico puede ser un derivado biarsénico de otros fluoróforos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, la serie Alexa Fluor® descrita en la presente memoria, tal como, solo a modo ilustrativo, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 663 y Alexa Fluor® 660, disponible comercialmente de Molecular Probes (Eugene, Oregon).
- 30 35 En algunas realizaciones, el fluoróforo biarsénico puede estar presente a una concentración de al menos aproximadamente 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM o más, y a una concentración de no más de aproximadamente 500 µM, 400 µM, 300 µM, 200 µM, 100 µM, 90 µM, 80 µM, 70 µM, 60 µM, 50 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM o 1 µM.
- 40 45 En algunas realizaciones, el marcador unido a un anticuerpo al que se une dichos colorantes fluorogénicos es un motivo peptídico de tetracisteína, cys-cys-Xn-cys-cys (SEQ ID NO: 1), en donde cada X es cualquier aminoácido natural, aminoácido no natural, o combinación de los mismos, y n es un número entero de 2-100. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-90, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-80. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-70, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-60. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-50, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-40. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-30, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-20. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-10, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-5. Los aminoácidos naturales si tales motivos incluyen, pero no se limitan a, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En determinadas realizaciones, el marcador de tetracisteína tiene la secuencia CCPGCC (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, se utiliza un péptido de 12 aminoácidos que contiene el motivo de tetracisteína, que incluye, pero no se limita a, la secuencia de aminoácidos, AGGCCPGCCGGG (SEQ ID NO: 3). Además, la proteína puede etiquetarse con un único marcador de tetracisteína, o la proteína puede etiquetarse con una pluralidad de marcadores de tetracisteína, que incluyen, pero no se limitan a, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 marcadores de tetracisteína. Dichos marcadores pueden estar separados entre sí dentro de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína, o directamente multimerizados en tandem como concatámeros.
- 50 55 En determinadas realizaciones, el péptido de tetracisteína tiene la secuencia cys-cys-Xn-cys-X-cys-X (SEQ ID NO: 1), en donde cada X es cualquier aminoácido natural, aminoácido no natural, o combinación de los mismos, y n es un número entero de 2-100. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-90, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-80. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-70, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-60. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-50, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-40. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-30, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-20. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-10.
- 60 65 En determinadas realizaciones, el péptido de tetracisteína tiene la secuencia cys-cys-Xn-cys-X-cys-X (SEQ ID NO: 1), en donde cada X es cualquier aminoácido natural, aminoácido no natural, o combinación de los mismos, y n es un número entero de 2-100. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-90, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-80. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-70, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-60. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-50, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-40. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-30, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-20. En determinadas realizaciones, n es un número entero de 2-10.

entero de 2-10, mientras que en otras realizaciones n es un número entero de 2-5. Los aminoácidos naturales si tales motivos incluyen, pero no se limitan a, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En determinadas realizaciones, el marcador de tetracisteína tiene la secuencia CCGGKGNGGC (SEQ ID NO: 4).

5 El marcador o marcadores de péptido de tetracisteína puede fusionarse de forma recombinante al anticuerpo que se desea marcar, ya sea en el extremo N, el extremo C, o en el marco dentro de la secuencia de proteína; los vectores de expresión para crear proteínas recombinantes fusionadas con tetracisteína se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas por un experto en la técnica. En determinadas realizaciones, la proteína marcada con tetracisteína se expresa de forma recombinante en células huésped, que incluyen, pero no se limitan a, en células huésped bacterianas, en células huésped fúngicas, en células de insecto, en células vegetales o en células de mamífero. Dichas células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, bacterias gramnegativas y grampositivas de cualquier género, incluyendo, solo a modo ilustrativo, Escherichia sp. (p. ej., *E. coli*), Klebsiella sp., Streptomyces sp., Streptococcus sp., Shigella sp., Staphylococcus sp., Erwinia sp., Klebsiella sp., Bacillus sp. (p. ej., *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. megaterium*), Serratia sp., Pseudomonas sp. (p. ej., *P.aeruginosa* y *P. syringae*) y Salmonella sp. (p. ej., *S. typhi* y *S. typhimurium*). Las cepas y serotipos bacterianos adecuados para la invención pueden incluir serotipos *E. coli* K, B, C y W. Un típico huésped bacteriano es *E. coli* cepa K-12. Las células huésped fúngicas incluyen, solo a modo ilustrativo, células *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que las células de mamífero incluyen, solo a modo ilustrativo, incluyendo las células humanas. En tales realizaciones, la muestra de proteína que contiene la proteína de interés es un lisado de las células huésped, que puede ser no purificado, purificado parcialmente o purificado sustancialmente antes del etiquetado y el análisis, mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

25 En otras realizaciones, la proteína marcada con tetracisteína se expresa *in vitro*, en donde la muestra de proteína que contiene la proteína de interés es el extracto libre de células en el que se realiza la traducción (y, opcionalmente, la transcripción), o una fracción parcialmente purificada o purificada de la misma. En las realizaciones en las que el extracto permite la transcripción y traducción acopladas en un solo extracto libre de células, tal como los sistemas basados en *E. coli* Expressway™ o Expressway™ Plus (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), la muestra es el extracto libre de células en el que se produce comúnmente la transcripción y traducción, o una fracción de los mismos.

30 Alternativamente, Gateway® Technology (Life technologies Corp., Carlsbad, CA) es una tecnología de clonación universal que puede utilizarse para expresar un gen de interés en *E.coli*.

35 El anticuerpo a etiquetar utilizando los colorantes biarsénicos descritos en la presente memoria, puede ser cualquier anticuerpo que tenga un motivo de tetracisteína. Además del marcador de tetracisteína, otras secuencias de proteínas pueden de manera útil unirse de forma recombinante a los anticuerpos que se desean etiquetar. Entre dichas secuencias de proteínas adicionales hay enlazadores y/o marcadores cortos, marcadores de epítopos útiles, tales como unmarcador FLAG, o un marcador myc, u otras secuencias útiles para la purificación, tales como un marcador de polihistidina (p. ej., 6xhis). Alternativamente, el marcador o marcadores de tetracisteína se puede conjugar químicamente con proteínas que a etiquetar, utilizando químicas de conjugación rutinarias en la técnica.

40 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente está cargada positivamente. En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente está cargada negativamente.

45 En algunas realizaciones, la longitud de onda de excitación de la etiqueta fluorescente es de entre 350 y 850 nm. En algunas realizaciones, la longitud de onda de excitación de la etiqueta fluorescente está en el rojo lejano. En algunas realizaciones, la longitud de onda de excitación de la etiqueta fluorescente es cercana a infrarroja. En algunas realizaciones, la longitud de onda de excitación de la etiqueta fluorescente es ultravioleta (UV).

50 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende un flúor DyLight™. En algunas realizaciones, el flúor DyLight™ se selecciona de DyLight™ 350, DyLight™ 405, DyLight™ 488, DyLight™ 550, DyLight™ 594, DyLight™ 633, DyLight™ 650, DyLight™ 680, DyLight™ 755 y DyLight™ 800. En algunas realizaciones, el flúor DyLight™ se conjuga con una molécula de PEG (p. ej., 2x PEG, 4x PEG, 8x PEG o 12x PEG).

55 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende un Alexa Fluor®. En algunas realizaciones, el Alexa Fluor® se selecciona de Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 635, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750 y Alexa Fluor® 790.

60 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende un resto seleccionado de xanteno; cumarina; cianina; pireno; oxazina; borapoliazindaceno; benzopirilico; y carbopironina.

65 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende fluoresceína (p. ej., Cy2 o FITC). En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende rodamina (p. ej., TRITC o Cy3). En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente comprende MCA, cumarina, Rhodamine Red, Texas Red, Cascade Blue, Cy5, Cy5.5, IR680, IR800 y Cy7.

En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente es un etiqueta fluorescente modificada (p. ej., la etiqueta fluorescente se ha sulfonado o conjugado con PEG).

5 En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente es una proteína fluorescente. En algunas realizaciones, la proteína fluorescente es una ficobiliproteína. Los ejemplos de fitobilirruproteínas útiles en la presente invención son aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina B, B-ficoeritrina, ficoeritrocianina y b-ficoeritrina. Las estructuras de las ficobiliproteínas se han estudiado y se conocen sus propiedades espectrales fluorescentes. Véase A. N. Glatzer, "Photosynthetic Accessory Proteins with Bilin Prosthetic Groups", Biochemistry of Plants, Volumen 8, M. D. Hatch y N. K. Boardman, EDS., Academic Press, págs. 51-96 (1981), y A. N. Glazer, "Structure and Evolution of Photosynthetic Accessory Pigment Systems with Special Reference to Phycobiliproteins", The Evolution of Protein Structure and Function, B. S. Sigman y M. A. Brazier, EDS., Academic Press, págs. 221-244 (1980). En algunas realizaciones, la proteína fluorescente tiene máximos de absorción de al menos aproximadamente 450 nm, a menudo al menos aproximadamente 500 nm, con desplazamientos de Stokes de al menos 15 nm, a menudo al menos aproximadamente 25 nm, y tiene máximos de emisión de fluorescencia de al menos aproximadamente 500 nm, a menudo al menos aproximadamente 550 nm.

10 En algunas realizaciones, el etiqueta fluorescente es un colorante difluoruro de dipirrometeno boro, como se describe en el documento US-2014/0349,893.

15 20 Los reactivos fluorogénicos reactivos con amina utilizados en los métodos de etiquetado de proteínas descritos en la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a, reactivos de tipo aroil-2-quinolina-carboxaldehído. Dichos reactivos se han descrito en la patente US-5.459.272 y en la patente US-5.631.374. En algunas realizaciones, el reactivo aroil-2-quinolina-carboxaldehído utilizado es 3-(4-carboxibenzoil)quinolina-2-carboxaldehído o 3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído). En determinadas realizaciones, el reactivo fluorogénico reactivo con amina es 3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído), mientras que en otras realizaciones, el reactivo fluorogénico reactivo con amina es 3-(4 carboxibenzoil)-quinolina-2-carboxaldehído.

25 c. Biomoléculas

30 Una biomolécula que puede utilizarse en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, incluye un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo primario o un anticuerpo secundario). En algunas realizaciones, la biomolécula es un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos utilizados en la práctica de la invención pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales o diseñados, y pueden ser de cualquier fuente (p. ej., tiburón, pollo o mamífero, tal como una llama, ratón, humano, conejo, cabra, rata, etc.). Además, pueden utilizarse anticuerpos humanizados.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico.

40 d. Conjugación de colorantes fluorescentes en biomoléculas

45 Despues de la selección de un colorante apropiado con las características espectrales deseadas, normalmente donde la longitud de onda de excitación sea al menos 580 nm, los colorantes pueden conjugarse con una molécula portadora diana, utilizando métodos bien conocidos en la técnica (Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK, *supra*, [2002]). En muchos casos, la conjugación para formar un enlace covalente consiste en simplemente mezclar los compuestos reactivos utilizados en la presente invención en un disolvente adecuado en el que tanto el compuesto reactivo como la molécula espaciadora a conjugar sean solubles. La reacción, en muchos casos, transcurre espontáneamente sin reactivos añadidos a temperatura ambiente o inferior. Para aquellos compuestos reactivos que se fotoactiven, la conjugación se facilita mediante la iluminación de la mezcla de reacción, para activar el compuesto reactivo. La modificación química de sustancias insolubles en agua, de modo que se pueda preparar un conjugado compuesto deseado, es, en muchos casos, se realiza en un disolvente aprotólico, tal como dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetona, acetato de etilo, tolueno o cloroformo. La modificación similar de los materiales solubles en agua se logra fácilmente mediante el uso de los compuestos reactivos instantáneos, para hacerlas más fácilmente solubles en disolventes orgánicos.

55 La preparación de conjugados de anticuerpo típicamente comprende la disolución primero del anticuerpo a conjugar en tampón acuoso aproximadamente. 1-10 mg/mL a temperatura ambiente o inferior. Por ejemplo, los tampones de bicarbonato (pH de aproximadamente 8,3), los tampones de carbonato y borato (pH de aproximadamente 9) son especialmente adecuados para la reacción con ésteres de succinimidilo, tampones de fosfato (pH de aproximadamente 7,2-8) para la reacción con grupos funcionales reactivos con tiol, y tampones de carbonato o borato (pH de aproximadamente 9) para la reacción con isotiocianatos y diclorotriazinas. El compuesto reactivo apropiado se disuelve luego en un disolvente no hidroxílico (generalmente, DMSO o DMF) en una cantidad suficiente para dotar un grado adecuado de conjugación cuando se añada a una solución del anticuerpo a conjugar. La cantidad apropiada de compuesto para cualquier anticuerpo u otro componente, se predetermina convenientemente mediante experimentación en la que se añaden cantidades variables del compuesto al anticuerpo, el conjugado se purifica cromatográficamente para separar el compuesto no conjugado y el conjugado compuesto-anticuerpo se prueba en su aplicación deseada.

60 65 Puede utilizarse cualquier número de tampones para las reacciones de conjugación, así como también para otros establecidos en la presente memoria. Usando los Ejemplos 1 y 5 con fines ilustrativos, la solución salina tamponada con fosfato y el tampón borato pueden ser, y se utilizan, en las reacciones de conjugación. También se cree que se puede

utilizar tampón de carbonato a pH 9,5. En estas líneas, se cree que las conjugaciones de pH más altos requieren un exceso molar inferior de moléculas de colorante y espaciadoras. El pH puede ser de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10,0 (p. ej., de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10,0, etc.). Las reacciones de conjugación

5 pueden realizarse en tampón de borato 50 mM, pH 8,5, con un colorante fluorescente, o una mezcla tanto de colorante fluorescente como de un espaciador seleccionado de Acetato de NHS, NHS-MS(PEG)₄, NHS-MS(PEG)₈ o NHS-MS(PEG)₁₂ en diversos excesos molares. Las reacciones de etiquetado pueden incubarse durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (TA). El colorante activado con NHS y los agentes espaciadores activados con NHS se 10 pueden combinar antes de la adición al anticuerpo, de modo que ambas reacciones sean concurrentes, lo que permite una espaciado aleatorio de la sustitución de colorante y de los espaciadores.

Los tampones que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), fosfato, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), borato, ácido 15 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanatosulfónico (HEPES), y tampones de carbonato, como ejemplos.

La concentración de los reactivos fluorogénicos utilizados en los métodos de etiquetados de anticuerpos descritos en la 20 presente memoria están en el rango de 50 nM a 100 mM (p. ej., de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 µM, de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 100 µM, etc.). En determinadas realizaciones, tales concentraciones se obtienen mediante dilución de una solución madre de los reactivos fluorogénicos que tengan una concentración en el 25 rango de 100 nM a 200 mM (p. ej., de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 500 µM, de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 100 µM, de aproximadamente 100 µM a aproximadamente 200 µM, etc.). En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 100 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 50 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 20 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 1 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 500 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 µM.

30 En algunas realizaciones, la concentración de los colorantes fluorescentes reactivos a amina utilizados en los métodos de etiquetado de anticuerpos descritos en la presente memoria están en el rango de 50 nM a aproximadamente 100 mM (p. ej., de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 5 pM, de aproximadamente 50 nM a 100 pM, de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 5 mM, etc.). En determinadas realizaciones, tales concentraciones se obtienen por dilución de una solución madre de los reactivos fluorogénicos que tengan una concentración en el rango de 100 nM a 200 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 100 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 50 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 20 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 1 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es 45 500 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 µM a 500 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 1 µM a 100 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 10 µM. En determinadas realizaciones, la concentración de la solución madre es de 100 µM a 200 µM.

55 En algunas realizaciones, la concentración de los anticuerpos etiquetados mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria, está en el rango de 0,01 mg/mL a 200 mg/mL (p. ej., de aproximadamente 0,1 mg/mL a 100 mg/mL, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,3 mg/mL a 10 mg/mL, de aproximadamente 0,4 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, etc.).

60 65 En algunos casos, se puede unir más de una molécula de colorante en cada ubicación en un anticuerpo. Una forma de unir más de una molécula de colorante en una sola ubicación en un anticuerpo, es a través del uso de moléculas de conjugación que se unan a más de una molécula de colorante. Estas moléculas de conjugación se conectan luego al anticuerpo, y llevan consigo múltiples moléculas de colorante. Como ejemplo, los dendrímeros poliméricos, tales como los expuestos en la publicación de patente de EE. UU. US-2012/0256102, pueden utilizarse múltiples moléculas de colorante fluorescente conjugadas con una única cadena principal polimérica o núcleo (denominado “dendrímeros” en la misma) para la unión de estas moléculas de colorante a un anticuerpo. Estos dendrímeros pueden tener estructuras de red poliméricas ramificadas regulares o irregulares que permiten la unión química de múltiples moléculas de colorante, múltiples colorantes de color y/o múltiples grupos funcionales, de manera combinatoria.

Por lo tanto, la invención contempla el uso de moléculas de conjugación que tienen cada una, en promedio, de aproximadamente dos a aproximadamente cincuenta (p. ej., de aproximadamente dos a aproximadamente cuarenta y cinco, de aproximadamente dos a aproximadamente cuarenta, de aproximadamente dos a aproximadamente treinta y cinco, de aproximadamente dos a aproximadamente treinta, de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, de aproximadamente cinco a aproximadamente cuarenta y cinco, de aproximadamente diez a aproximadamente cuarenta y cinco, etc.) moléculas de colorante asociadas. En muchos casos, la desviación estándar en el número promedio de moléculas de colorante unidas a moléculas de conjugación será inferior al 10 %, 15 % y/o 20 %.

El grado de etiquetado puede ser medido para anticuerpos etiquetados. El grado de etiquetado se puede calcular de la siguiente manera. En primer lugar, la molaridad del anticuerpo etiquetado se calcula utilizando, por ejemplo, la fórmula:

$$\text{Concentración de proteína (M)} = \frac{A_{280} - (A_{\text{máx}} \times CF)}{\epsilon} \times \text{factor de dilución}$$

ϵ = coeficiente de extinción molar de la proteína (p. ej., el coeficiente de extinción molar de IgG es $\sim 210.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$A_{\text{máx}}$ = Absorbancia (a) de una solución de colorante medida en el máximo de longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) para la molécula de colorante

CF = Factor de corrección; ajusta la cantidad de absorbancia a 280 nm causada por el colorante (véase la Tabla 8)

Factor de dilución = el grado (si lo hay) en que se diluyó la muestra de proteína:colorante para la medición de absorbancia

El grado de etiquetado se calcula entonces utilizando la fórmula:

$$\text{Moles de colorante por mol de proteína} = \frac{A_{\text{máx}} \text{ de la proteína etiquetada}}{\epsilon' \times \text{Concentración de proteína (M)}} \times \text{factor de dilución}$$

ϵ' = coeficiente de extinción molar del colorante fluorescente

Tabla 8: Características del colorante ilustrativo

Fluoróforo	Máximo de longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$)	Coeficiente de extinción (ϵ')	Factor de corrección (CF)
DyLight® 350	353 nm	15.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1440
DyLight® 405	405 nm	30.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,5640
DyLight® 488	493 nm	70.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1470
DyLight® 550	562 nm	150.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,0806
DyLight® 594	595 nm	80.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,5850
DyLight® 633	627 nm	170.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1100
DyLight® 650	652 nm	250.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,0371
DyLight® 680	684 nm	140.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1280
DyLight® 755	754 nm	220.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,0300
DyLight® 800	777 nm	270.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,0452
Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Fluoresceína de NHS, 5-IAF	494 nm	68.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,3000
Tetrametil-rodamina-5-(y 6)-isotiocianato (TRITC)	555 nm	65.600 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,3400
Rodamina de NHS	570 nm	60.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,3400
Texas Red® Cloruro de sulfonilo	595 nm	80.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1800
R-ficoeritrina	566 nm	1.863.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1700
AMCA-NHS, AMCA-Sulfo-NHS o AMCA-Hidrazida	346 nm	19.000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	0,1900

- En algunas realizaciones de la invención, se observa una fluorescencia mejorada para anticuerpos que comprenden espaciadores con menor grado de etiquetado (DOL) que los anticuerpos sin espaciadores. Como ejemplo, supóngase que hay un anticuerpo que se ha etiquetado con un colorante fluorescente por separado, con y sin un espaciador. A una base de DOL equivalente, el anticuerpo etiquetado con el colorante que también tiene espaciadores unidos al mismo, puede presentar una mejora en la fluorescencia de entre 1,5 y 3,5 veces, donde 1 tendría el mismo nivel de fluorescencia para ambos anticuerpos. La cuestión es que la cantidad de señal fluorescente por cada molécula de colorante aumenta para los anticuerpos unidos tanto a colorante como a espaciador.
- Después de la adición del compuesto reactivo a la solución de componente, la mezcla se incuba durante un período adecuado (típicamente, aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente a varias horas en hielo), el compuesto en exceso se elimina mediante filtración en gel, diálisis, HPLC, adsorción en un intercambio iónico o polímero hidrófobo u otros medios adecuados. El conjugado compuesto se utiliza en solución o liofilizado. De esta manera, los conjugados adecuados pueden prepararse a partir de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.
- Las temperaturas de incubación utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser temperatura ambiente, temperatura ambiental o temperaturas por encima de la temperatura ambiente, tal como, solo a modo ilustrativo, al menos aproximadamente 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, incluso hasta 90 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C o 100 °C. La primera temperatura de incubación y la segunda temperatura de incubación utilizadas en los métodos descritos en la presente descripción, pueden ser iguales o distintas. En algunas realizaciones, la primera temperatura de incubación se encuentra entre 20 °C y 80 °C, entre 25 °C y 30 °C, y/o a temperatura ambiente o ambiental. En algunas realizaciones, la segunda temperatura de incubación se encuentra entre 20 °C y 80 °C, entre 65 °C y 75 °C, y/o aproximadamente 70 °C. En otras realizaciones, la segunda temperatura de incubación se encuentra a temperatura ambiente o ambiental.
- Los tiempos de incubación utilizados en los métodos descritos en la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a, durante al menos 30 segundos, al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, al menos 1 hora, o cualquier rango en la presente memoria. El primer tiempo de incubación y el segundo tiempo de incubación utilizados en los métodos descritos en la presente memoria, pueden ser iguales o distintos. En una realización, el primer tiempo de incubación es de 0 a 60 minutos, de 5 a 10 minutos, y/o de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el segundo tiempo de incubación es de 0 a 20 minutos y/o aproximadamente 10 minutos. En casos específicos, el segundo tiempo de incubación es de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 70 °C. En otras realizaciones, el primer tiempo de incubación es de 1 a 3 horas a 25 °C, el segundo tiempo de incubación es durante la noche a 25 °C, y el tercer tiempo de incubación es de 2 a 3 horas a 37 °C.
- En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, se puede etiquetar una proteína o proteínas de control para monitorizar la efectividad del etiquetado, ya sea en una reacción paralela o, si es fácilmente soluble a partir de la proteína que se desea etiquetar, mediante inclusión en la misma reacción.
- En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, las proteínas de la muestra etiquetada pueden resolverse de manera útil en paralelo, con una serie de estándares de peso molecular fluorescente. De manera útil, las normas se hacen coincidir espectralmente con al menos un fluoróforo utilizado para etiquetar las proteínas. Dicha coincidencia espectral se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de estándares de proteínas marcadas con tetracisteína que se etiquetan en paralelo con el mismo fluoróforo biarsénico utilizado para etiquetar la muestra de proteína, o mediante el uso de estándares que tengan un resto fluorescente que se corresponda espectralmente con el fluoróforo biarsénico u otro fluoróforo utilizado para etiquetar las proteínas de la muestra. Los ejemplos de estándares útiles en la práctica de la presente invención, incluyen la familia de estándares de proteínas BenchMark™ (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) y el estándar sin teñir MARKL2™ (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA).
- Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de proteína etiquetada con fluorescencia presente en una muestra. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, cuantificar la cantidad de fluorescencia del fluoróforo biológico. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, cuantificar la cantidad de fluorescencia del colorante fluorescente reactivo a amina. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, cuantificar la cantidad de fluorescencia del resto fluorescente del reactivo fluorogénico reactivo a amina. La cuantificación se puede realizar sin resolución de las proteínas presentes en la muestra de proteína, o después de que las proteínas se hayan resuelto parcial o totalmente, como mediante electroforesis, tal como PAGE, 2D-PAGE o IEF, o cromatografía o combinaciones de las mismas.
- e. Conjugación de moléculas espaciadoras a biomolécula
- En algunas realizaciones, la molécula espaciadora se conjuga con el anticuerpo utilizando químicas de éster de NHS se describen en los ejemplos de la presente memoria, otras sustancias químicas, tales como maleimida, disulfuro de piridilo e hirazidas, así como también la tecnología SiteClick™, que implica azida/alquino, también puede utilizarse para esta estrategia de conjugación.

En algunas realizaciones, la molécula espaciadora se conjuga con un anticuerpo en cadenas laterales de lisina primaria presentes en un anticuerpo.

5 En algunas realizaciones, la concentración del anticuerpo etiquetado mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción está en el rango de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL (p. ej., de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,3 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, etc.).

10 En algunas realizaciones, la relación colorante a proteína de la etiqueta fluorescente con respecto al anticuerpo está entre 1 y 50. En algunas realizaciones, la relación colorante a proteína de la etiqueta fluorescente con respecto al anticuerpo está entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la relación colorante a proteína de la etiqueta fluorescente con respecto al anticuerpo está entre 1 y 20.

15 En algunas realizaciones, la relación espaciador a proteína está entre 1 y 50. En algunas realizaciones, la relación de agente espaciador a proteína está entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la relación de agente espaciador a proteína está entre 1 y 20.

20 En algunas realizaciones, el agente espaciador se añade en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad entre 0,1 y 25, entre 1 y 15, o entre 2,5 y 10 veces. En algunas realizaciones, el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 2,5 veces. En algunas realizaciones, el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 5 veces. En algunas realizaciones, el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 7,5 veces. En algunas realizaciones, el agente espaciador está en exceso molar a la pluralidad de etiquetas fluorescentes en una cantidad de 10 veces.

25 En algunas realizaciones, la maximización de la fluorescencia del anticuerpo puede ser parcialmente independiente del número de etiquetas fluorescentes en el anticuerpo. Supongamos, por ejemplo, que hay siete etiquetas fluorescentes en un anticuerpo concreto, cuando se etiqueta bajo un primer conjunto de condiciones, y diez etiquetas fluorescentes en el mismo anticuerpo, cuando se etiqueta bajo el segundo conjunto de condiciones. Además, supongamos que la cantidad de fluorescencia total del anticuerpo etiquetado bajo el primer conjunto de condiciones es mayor que la cantidad de fluorescencia total del anticuerpo etiquetado bajo el segundo conjunto de condiciones. En este caso, menos etiquetas fluorescentes dieron como resultado más fluorescencia. Por lo tanto, son iguales otros factores (p. ej., la actividad funcional del anticuerpo), el primer conjunto de condiciones se preferiría sobre el segundo conjunto de condiciones.

30 Puede utilizarse cualquier número de grupos de enlace para unir etiquetas fluorescentes a anticuerpos. Estas uniones son covalentes.

35 Un área de anticuerpos que es particularmente útil para la unión de etiquetas fluorescentes, cuando está presente, es la región Fc (fragmento cristalizable). La región Fc está en el extremo final de los anticuerpos con respecto al sitio o sitios de unión al antígeno. Esta región del anticuerpo interactúa con los receptores de la superficie celular denominados receptores Fc y proteínas del sistema del complemento. Típicamente, la unión de entidades químicas en o cerca de la región Fc tiene poco impacto sobre la unión al antígeno por el anticuerpo. Sin embargo, la interferencia con los eventos de unión a antígeno tiende a aumentar con el tamaño de las entidades químicas unidas al anticuerpo. Además, las grandes entidades químicas unidas tienden a interferir entre sí, debido al impedimento estérico, con respecto a la capacidad de unirse a una biomolécula. Por lo tanto, puede ser necesario equilibrar una serie de factores a fin de producir un anticuerpo tanto con un alto nivel de fluorescencia como con un alto nivel de actividad funcional (p. ej., capacidad de unión a antígeno). Algunos de estos factores son los siguientes: (1) Tamaño del anticuerpo, (2) ubicación de puntos de unión en el anticuerpo para el etiquetado fluorescente, y (3) el tamaño o tamaños y estructuras tridimensionales de las moléculas fluorescentes etiquetadas que se unen al anticuerpo.

40 Con respecto a los anticuerpos, la invención incluye anticuerpos que contienen una o más de las siguientes características:

- 45
- Un promedio de desde 3 hasta 80 etiquetas fluorescentes unidas a cada una de las moléculas de anticuerpo.
 - La afinidad de unión al antígeno (K_D) de la molécula de anticuerpo etiquetada con fluorescencia se reduce en no más de dos (p. ej., de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,5, etc.) órdenes de magnitud, en comparación con la forma no etiquetada del anticuerpo.
 - La cantidad promedio de emisión fluorescente por cada etiqueta fluorescente unida a las moléculas de anticuerpo es al menos el 60 % (p. ej., de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 98 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 98 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 98 %,

de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 98 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 93 %, etc.) que la de la etiqueta fluorescente libre.

5 f. Combinaciones de etiquetas/espaciadores biomoleculares/fluorescentes

La invención se basa, en parte, en combinaciones de tres componentes: anticuerpos, etiquetas fluorescentes y espaciadores. Con respecto a los anticuerpos, los grupos que pueden utilizarse como sitios de unión para etiquetas fluorescentes y espaciadores, pueden no ser siempre accesibles para la unión, especialmente cuando la proteína no se ha desnaturalizado. Además, en muchos casos, será deseable mantener proteínas en forma no desnaturalizada.

10 Se ha descubierto que la mejora en la emisión fluorescente se relaciona con varias relaciones de etiquetas fluorescentes y espaciadores utilizados para etiquetar anticuerpos. Además, cada anticuerpo tiene el potencial de requerir diferentes relaciones de componentes en el proceso de conjugación, para producir niveles de fluorescencia mejorados específicos. Esto puede deberse a una estructura diferente (p. ej., estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) de anticuerpos, así como características de la etiqueta fluorescente concreta y el espaciador concreto.

15 En algunos casos, las relaciones pueden basarse en los pesos respectivos de componentes. En otros casos, las relaciones pueden basarse en relaciones molares. Varias de las figuras y el ejemplo de esta solicitud se refieren a relaciones molares. En algunos casos (p. ej., donde el anticuerpo sea grande y con un gran número de sitios de conjugación), el uso de pesos componentes puede ser más adecuado.

20 Para los anticuerpos, las siguientes relaciones de anticuerpo a etiqueta fluorescente con el espaciador utilizado en el proceso de conjugación pueden variar mucho, pero, en la mayoría de los casos, la cantidad de anticuerpo será inferior a la cantidad tanto de etiqueta fluorescente como de espaciador.

25 Además, la densidad y/o espaciado de los sitios de conjugación en un anticuerpo es un factor que a menudo determinará la relación óptima de etiqueta fluorescente con espaciador. Esto es así porque, suponiendo que una fluorescencia mejorada se deba a una reducción de la extinción, cuanto menor es la densidad total o regional de los sitios de conjugaciones, menor sería la cantidad de extinción esperada. En cualquier caso, las relaciones de anticuerpo a etiqueta fluorescente con el espaciador que pueden utilizarse, pueden describirse como sigue: Bi: FL₂₋₃₀: S₂₋₂₀, donde B es un anticuerpo, FL es la etiqueta fluorescente, y S es un espaciador. Los rangos específicos de relaciones que pueden utilizarse en la práctica de la invención, incluyen relaciones comprendidas entre 1:2-25:2-20 (p. ej., de aproximadamente 1:2:2 a aproximadamente 1:25: 20, de aproximadamente 1:5:2 a aproximadamente 1:25:5, de aproximadamente 1:10:2 a aproximadamente 1:25:5, de aproximadamente 1:5:2 a aproximadamente 1:15:10, de aproximadamente 1:10:5 a aproximadamente 1:25:20, de aproximadamente 1:10:5 a aproximadamente 1:15:20, de aproximadamente 1:10:5 a aproximadamente 1:20:20, etc.), en donde el primer número es la cantidad (p. ej., moles) de anticuerpo, el segundo número es la cantidad de etiqueta fluorescente, y el tercer número es la cantidad de espaciador.

40 En algunos casos, la etiqueta fluorescente y las concentraciones espaciadoras utilizadas para la conjugación serán tales que los sitios de unión disponibles en los anticuerpos se saturen eficazmente (p. ej., al menos el 95 % de los sitios de unión disponibles habrá unido a la misma, o bien a una etiqueta fluorescente o a un espaciador). En tales casos, la etiqueta fluorescente y la relación espaciadora pueden ser un factor determinante en el nivel de mejora fluorescente. En muchos casos, la relación de etiqueta fluorescente con espaciador estará entre 10:1 y 10:50 (p. ej., de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:25, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:10, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:5, de aproximadamente 10:5 a aproximadamente 10:50, de aproximadamente 10:5 a aproximadamente 10:20, de aproximadamente 10:3 a aproximadamente 10:30, de aproximadamente 10:5 a aproximadamente 10:30, de aproximadamente 10:10 a aproximadamente 10:25, etc.).

50 Los espaciadores y colorantes pueden conjugarse con un anticuerpo al mismo tiempo o secuencialmente, ya sea con el espaciador o con el colorante que se conjuga con el anticuerpo primero. En muchos casos, cuando el espaciador y el colorante se conectan al anticuerpo en los mismos *loci*, se conjugarán al anticuerpo al mismo tiempo. Sin embargo, la conjugación secuencial podría utilizarse cuando la primera reacción de conjugación (p. ej., del espaciador) se realice en condiciones donde los sitios de unión del anticuerpo no estén saturados, dejando así sitios de unión disponibles para una segunda reacción de conjugación (p. ej., del colorante).

55 g. Tampones

60 En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más espaciadores, una o más etiquetas fluorescentes, en un tampón. Cualquiera de las moléculas fluorescentes y espaciadoras descritas en la presente memoria puede utilizarse junto con cualquier tampón conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden cualquier tampón adecuado para una aplicación de biología molecular.

65 En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de almacenamiento adecuado (p. ej., tampón borato, tampón fosfato o tampón carbonato).

En algunas realizaciones, el tampón es adecuado para tamponar un anticuerpo detectable, como se describe en la presente memoria, durante el uso en un ensayo de detección.

5 Métodos

La presente invención tiene aplicaciones útiles en investigación básica, cribado de alto rendimiento, inmunohistoquímica, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), tecnología de micromatrizes, diagnóstico, y agentes terapéuticos médicos. La invención puede utilizarse en una variedad de formatos de ensayo para aplicaciones de diagnóstico en las disciplinas de microbiología, inmunología, hematología y transfusión de sangre, patología tisular, patología forense y patología veterinaria.

10 En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier aplicación de biología molecular en donde se detecten moléculas etiquetadas con fluorescencia. Por ejemplo, los anticuerpos detectables, como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse en transferencia Western, 15 ELISA, citometría de flujo, citometría de flujo y aplicaciones que implican FRET. Los anticuerpos detectables, como se describe en la presente memoria, también pueden utilizarse en inmunohistoquímica fluorescente (IHC), inmunocitoquímica fluorescente (ICC), y aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*.

20 En algunas realizaciones, se abarca un método para determinar la presencia de un objetivo deseado en una muestra biológica, comprendiendo el método: a) poner en contacto la muestra biológica con una composición de anticuerpo en donde dos o más etiquetas fluorescentes, y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo, en donde las moléculas fluorescentes y espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, b) detectar la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes; y c) determinar la presencia del objetivo deseado en la muestra 25 biológica cuando se detecte la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes, en donde:

el espaciador se selecciona de:

30 un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenoílo y/o alquinoílo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y

35 grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OP₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻²); restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺) en el que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; o

40 el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betáina.

45 En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende lisado celular. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células intactas. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende una muestra de tejidos. Además, tales muestras de tejido pueden fijarse. Además, las composiciones de la invención pueden utilizarse para aplicaciones tales como inmunohistoquímica. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende proteína aislada. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende proteína recombinante. En algunas realizaciones, la muestra biológica se inmoviliza sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células intactas en fluido. 50 En algunas realizaciones, la muestra biológica es un animal vivo. En algunas realizaciones, el animal vivo es un mamífero. En algunos casos, la muestra comprende tejidos tales como hígado, pulmón, músculo y piel.

h. Kits

55 Las composiciones de la invención pueden incorporarse a kits que faciliten la práctica de diversos ensayos. Los kits pueden envasarse con la composición en forma seca o con la composición en solución. Los kits pueden incluir opcionalmente, además, uno o más agentes tamponantes, típicamente presentes como una solución acuosa, reactivos de preparación de muestras, reactivos de detección adicionales, disolvente orgánico, otras sondas de detección fluorescentes, estándares, microesferas, líneas celulares específicas, anticuerpos y/o instrucciones para realizar un ensayo. Los agentes opcionales adicionales incluyen componentes para la prueba de otras funciones celulares junto con el compuesto.

60 En algunas realizaciones se describe el uso de un kit en la preparación de biomoléculas etiquetadas con fluorescencia, en donde

la biomolécula es un primer anticuerpo en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,

- 5 en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, y en donde:
el espaciador se selecciona de:
- 10 un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo ($-C(O)C_nH_m$), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenoílo y/o alquinoílo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio ($-NH_3^+$), grupos amonio cuaternario ($-NR_3^+$), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio ($-PQ_3^+$), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y
- 15 grupos alquilo, alquenoílo o alquinoílo ($-C_nH_m$), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenoílo y/o alquinoílo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente ($-OSO_3^-$), grupos carboxilato ($-CO_2^-$), grupos fosfato ($-OPO_3^-$) y/o grupos fosfonato ($-PO_3^-$); restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio ($-NH_3^+$), grupos amonio cuaternario ($-NR_3^+$), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio ($-PQ_3^+$) en el que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; o
- 20 el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína; dicho kit comprende una biomolécula, una molécula espaciadora y un etiqueta fluorescente, y en donde la biomolécula es un anticuerpo y la molécula espaciadora comprende un grupo seleccionado de:
- 25 un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo ($-C(O)C_nH_m$), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden conectarse entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y/o los grupos alquilo, alquenoílo y/o alquinoílo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio ($-NH_3^+$), grupos amonio cuaternario ($-NR_3^+$), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio ($-PQ_3^+$), en los que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; y
- 30 grupos alquilo, alquenoílo o alquinoílo ($-C_nH_m$), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenoílo y/o alquinoílo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente ($-OSO_3^-$), grupos carboxilato ($-CO_2^-$), grupos fosfato ($-OPO_3^-$) y/o grupos fosfonato ($-PO_3^-$); restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$, en los que x es 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio ($-NH_3^+$), grupos amonio cuaternario ($-NR_3^+$), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio ($-PQ_3^+$) en el que Q es arilo, arilo sustituido, o alquilo C₁₋₆; o el agente espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.
- 35
- 40 En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un tampón. En algunas realizaciones, la biomolécula ya está conjugada con el agente espaciador y la etiqueta fluorescente. Esta descripción y realizaciones ilustrativas no deben tomarse como limitantes. Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, en la medida en que ya no están tan modificados. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en las siguientes memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenda obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.
- 45
- 50

Ejemplos

- 55 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones descritas, y no deben interpretarse de manera alguna, como limitantes del alcance de esta descripción.

Ejemplo 1: Métodos fluorescentes de transferencia Western

- 60 a.) Etiquetado de anticuerpos mediante el uso de colorantes fluorescentes activados con NHS y sulfo Acetato de NHS/Acetato de NHS, y NHS-MS(PEG)₄, NHS-MS(PEG)₈ y NHS-MS(PEG)₁₂

65 Los colorantes fluorescentes activados con NHS, tales como DyLight™ 650-4xPEG, se reconstituyeron en dimetilformamida (DMF) a 10 mg/ml. Se preparó Acetato de NHS fresco en dimetilformamida (DMF) a 1 mg/ml. NHS-MS(PEG)₄ (n.º de cat. 22341 (Thermo Fisher Scientific), NHS-MS(PEG)₈ (n.º de cat. 22509 (Thermo Fisher Scientific), NHS-MS(PEG)₁₂ (n.º de cat. 22686 (Thermo Fisher Scientific), se reconstituyeron en DMF a 100 mg/ml. Los reactivos de PEG se diluyeron adicionalmente a 1 mg/ml en DMF, justo antes de su uso. 1 mg de anticuerpo

anti-ratón de cabra (GAM) y de cabra anti-conejo (GAR) a 7-10 mg/ml en tampón de borato 50 mM (n.º de cat. 28384 (Thermo Fisher Scientific), pH 8,5, se etiquetaron con cada colorante fluorescente, o una mezcla de cada colorante fluorescente y un espaciador seleccionado de Acetato de NHS, NHS-MS(PEG)₄, NHS-MS(PEG)₈ o NHS-MS(PEG)₁₂ en diversos excesos molares. Las reacciones de etiquetado se incubaron durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (TA). El colorante activado con NHS y los agentes espaciadores activados con NHS se combinaron antes de la adición al anticuerpo, de modo que ambas reacciones fueran concurrentes, lo que permitió una espaciado aleatorio de la sustitución de colorante y de los espaciadores. Se añadió a cada muestra tampón MES 100 mM a pH 4,7, para reducir el pH de 8,5 a aproximadamente 7,2. En este punto, la concentración de los conjugados se ajustó a aproximadamente 6 mg/ml para acomodar la dilución final en el tampón de almacenamiento. El colorante libre se retiró mediante el uso de la Resina de eliminación de colorante (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. 22858) y columnas Harvard de 5 µm (Harvard Apparatus, n.º de cat. 74-3820). Se utilizaron 0,2 ml de la suspensión de resina de purificación al 50 % por mg de proteína. Los conjugados se diluyeron 1:50 con tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2 (PBS), y se escanearon utilizando el espectrofotómetro UV Cary. Se utilizaron escaneos de DO (25 nm a 900 nm) para determinar las concentraciones de conjugados y calcular las relaciones mol de colorante/mol de proteína (D/P). Finalmente, los conjugados se diluyeron a 1 mg/ml en tampón de almacenamiento Stabilzyme® Noble (Surmodics, n.º de cat. SZ04) para el almacenamiento a largo plazo.

Los lisados celulares diluidos en serie (500 ng a 2 ng) se combinaron con tampón de muestra SDS-PAGE. Las muestras se calentaron durante cinco minutos a 95 °C y se cargaron en geles Thermo Fisher Scientific Tris Glycine-PAGE (Novex Gels, 4-20 %, 10 pocillos, n.º cat. WT4202BX10). Los geles se sometieron a electroforesis según las instrucciones del fabricante, y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el uso de un método de transferencia semiseca. Las membranas se bloquearon durante treinta minutos con tampón de bloqueo Sea Block (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. 0037527). Los anticuerpos primarios se prepararon hasta una concentración final de 0,1 a 2,5 µg/ml en tampón de bloqueo Sea Block. Las transferencias se incubaron con el anticuerpo preparado en el tampón de bloqueo de Sea Block durante una hora con agitación a temperatura ambiente (TA). La solución de anticuerpo se decantó y las membranas se lavaron dos veces durante diez minutos en Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %, pH 7,2 (TBST). Los conjugados de anticuerpo secundario etiquetados con fluorescencia se diluyeron hasta una concentración final de 20 a 1000 ng/mL en tampón de bloqueo Sea Block. La membrana lavada se incubó con el conjugado de anticuerpo secundario relevante con agitación durante 30 a 60 minutos. El tampón se decantó y las membranas se lavaron seis veces durante cinco minutos con TBST. Se formaron imágenes de las membranas utilizando un formador de imágenes fluorescentes compatible.

Los resultados se muestran en la Figura 8 para un experimento que prueba el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (3,75x) a un anticuerpo secundario con GAM conjugado con DyLight™ 488 5x-20x en exceso molar en un ensayo de transferencia Western. El lisado de células A431 se diluyó 3 veces a partir de 1 µg/pocillo. El anticuerpo primario de conejo utilizado fue anti-Hsp90 diluido 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron 1/5000 a partir de un stock de 1 mg/ml. En una aplicación de transferencia Western, existe un aumento notable de la intensidad fluorescente respecto al conjugado base (preparado sin el espaciador) en cada exceso molar de colorante de 7,5x a 20x para DyLight™ 488-GAR conjugado con la adición de acetato de NHS o MS(PEG)₄.

En la Figura 9 se muestran resultados que demuestran el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (5x) o de MS(PEG)₄ (5x) a un anticuerpo secundario con GAM conjugado con DyLight™ 650-4xPEG (a 7,5x de colorante) en un ensayo de Transferencia Western. El lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 µg/pocillo. El anticuerpo primario anti-PDI de ratón se diluyó a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/5000 a partir un stock de 1 mg/ml. Acetato de NHS añadido en un exceso molar de 5x con conjugación GAM-DyLight™ 650-4xPEG-7,5x mejoró la intensidad 1,5 veces. El Acetato de NHS añadido en 3,75x de exceso molar con conjugación GAM-DyLight™650-4xPEG-7,5x mejoró la intensidad en 1,4 veces.

En la Figura 10 y en la Tabla 10 se muestran resultados que demuestran el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x) y de MS(PEG)₄ a un anticuerpo secundario GAR-DyLight™ 800-4xPEG en un ensayo de transferencia Western. El lisado de células A431 se diluyó en serie 1:1. Los anticuerpos primarios de conejo anti-Hsp90 y anti-ciclofilina B se diluyeron 1/5000. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/20.000 a partir de un stock de 1 mg/ml. La adición de MS(PEG)₄ (3,75x y 5x) y Acetato de NHS (2,5-5x) mejoró significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 800-4xPEG en un 20-100 % en diferentes excesos molares del colorante en esta aplicación de transferencia Western.

Tabla 10. Efecto de ± Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (5x) en GAR-DyLight™ 800-4xPEG en ensayos de transferencia Western.

Veces de mejora (WB)	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 5x MS(PEG) ₄
GAR-DyLight™ 800-4xPEG_5x	1,0	1,4	1,2	1,8
GAR-DyLight™ 800-4xPEG_7,5x	1,0	1,5	1,2	1,7
GAR-DyLight™ 800-4xPEG_10x	1,0	1,7	1,5	1,9
GAR-DyLight™ 800-4xPEG_15x	1,0	1,9	1,5	2,0

Tabla 10. Efecto de \pm Acetato de NHS (2,5x, 5x) o MS(PEG)₄ (5x) en GAR-DyLight™ 800-4xPEG en ensayos de transferencia Western.

Veces de mejora (WB)	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 5x MS(PEG) ₄
NA = Sin adición				

En la Figura 11 se muestran resultados que demuestran el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (5x) y de MS(PEG)₈ (5x) a un conjugado GAM-DyLight™ 550-2xPEG (en un exceso molar de colorante de 12,5x) en un ensayo de transferencia Western. El lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 μ g/pocillo y se tiñó con anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/5000 a partir un stock de 1 mg/ml. Este experimento mostró que la adición de MS(PEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad de los conjugados base DyLight™550-2xPEG en al menos 2 veces en un ensayo de transferencia Western. Los conjugados preparados con MS(PEG)₈ de cadena más larga no mostraron una mejora significativa respecto al conjugado base en este experimento.

En la Figura 12 se muestran resultados que demuestran el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x) y de MS(PEG)₄ (5x) a GAM-DyLight™ 680-4xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 10x). El lisado de células HeLa se diluyó 4 veces a partir de 0,5 μ g/pocillo, y el anticuerpo primario anti-PDI se diluyó a 1/5000 a partir de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™680-4xPEG-GAR se diluyeron a 1/20000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Este experimento muestra que la adición de MS(PEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™680-4xPEG de 3 a 4 veces en un ensayo de transferencia Western.

Ejemplo 2: Ensayos de transferencia de puntos

Se prepararon diluciones en serie (1:1) de IgG de ratón o conejo a partir de la concentración de stock elegida. Las diluciones se colocaron en una placa de 96 pocillos de mayor a menor utilizando una pipeta múltiple de 12 canales de 20 μ l. Se aplicaron cuidadosamente 1 o 2 μ l de las 11 diluciones en serie sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se dejaron secar durante la noche, y después se bloquearon con tampón de bloqueo BSA al 2 % en TBST. Las membranas se incubaron con agitación durante una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se decantó del recipiente. Los conjugados de anticuerpo secundario se diluyeron en TBS o tampón de bloqueo. Las diluciones de conjugado de anticuerpo secundario variaron dependiendo de la etiqueta conjugada: 1:5.000 (conjugados DyLight™ 488 y 550-2xPEG); 1:10.000 (conjugados DyLight™ 650-4xPEG); y 1:20.000 (conjugados DyLight™ 680-4xPEG y DyLight™ 800-4xPEG). Las membranas se incubaron con los conjugados de anticuerpo secundario relevantes con agitación durante 30 a 60 minutos. Las membranas se lavaron cinco veces durante cinco minutos con tampón TBST. Se formaron imágenes de las membranas con un formador de imágenes adecuado, por ejemplo, ChemiDoc MP (488, 550, 650, 680 nm) y LiCOR Odyssey CLx (650, 680, 800 nm).

Los resultados representados en la Figura 3 y la Tabla 11 muestran el efecto del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (3,75x) a GAM-DyLight™ 488 (en un exceso molar de colorante de 5x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos. En aplicaciones de transferencia de puntos, los conjugados DyLight™488-GAM preparados con la adición de Acetato de NHS y MS(PEG)₄ dieron como resultado una mejora significativa en la intensidad fluorescente que varía de 1,2 a 1,8 veces respecto al conjugado base (preparado sin el espaciador) en los diversos excesos molares de colorante de 7,5x a 20x.

Tabla 11. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x a 10x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 488 en exceso molar 5x-20x en una transferencia de puntos.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
DyLight™ 488_5x	1,0	1,5	1,1		0,3	1,0	0,6
DyLight™ 488_7,5x	1,0	1,2	1,6		1,8	1,0	1,3
DyLight™ 488_10x	1,0	1,6	1,3		1,3	1,3	0,8
DyLight™ 488_15x	1,0	1,4	1,0	0,8	1,6	1,2	1,1
DyLight™ 488_20x	1,0	1,0	0,7	0,6	1,5	1,3	1,0
NA = Sin adición							

Los resultados mostrados en la Figura 4 y la Tabla 12 demuestran el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x y 5x) y MS(PEG)₄ (3,75x) a GAM-DyLight™ 488 (en un exceso molar de colorante de 7,5x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos. En este experimento, se utilizó una fuente de anticuerpos secundaria diferente. El Acetato de NHS y

MS(PEG)₄ añadido a la mezcla de conjugación proporcionó una mejora significativa de la intensidad de señal, en comparación con los conjugados base en excesos molares de colorantes de 5x, 15x y 20x; que varía de 1,2 a 2,6 veces.

Tabla 12. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 488 en exceso molar de 5x-20x en un ensayo de transferencia de puntos.

Veces de mejora	Sin adición	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄
DyLight™ 488_5x	1,0	1,8	2,1	2,1
DyLight™ 488_10x	1,0	1,2	1,0	1,2
DyLight™ 488_15x	1,0	1,5	1,9	2,0
DyLight™ 488_20x	1,0	2,0	2,6	1,3

Los resultados mostrados en la Figura 5 y la Tabla 13 demuestran el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y MS(PEG)₄ (3,75x) a GAM-DyLight™ 550-2xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 10x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:1 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 550-2xPEG-GAR se diluyeron a 1/5000 de un stock de 1 mg/ml. El Acetato de NHS y MS(PEG)₄ añadido a la mezcla de conjugación proporcionó una mejora de la intensidad de señal, en comparación con los conjugados de base en cada uno de los excesos molares de colorante respectivos. La mejora varió de 1,2 a 1,6 veces.

Tabla 13. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 550-2xPEG-GAR en un exceso molar de 10x-20x en un ensayo de transferencia de puntos

Veces de mejora	Sin adición	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄
GAR-DyLight™ 550-2xPEG_10x	1,0	1,23	1,35	1,32
GAR-DyLight™ 550-2xPEG_12,5x	1,0	0,77	0,98	0,93
GAR-DyLight™ 550-2xPEG_15x	1,0	1,12	1,1	1,52
GAR-DyLight™ 550-2xPEG_20x	1,0	0,9	1,51	1,63

Los resultados que se muestran en la Figura 6 y la Tabla 14 demuestran el efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y MS(PEG)₄ (3,75x) a GAM-DyLight™ 650-4xPEG-GAM (en un exceso molar de 10x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:1 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 650-4xPEG-GAR se diluyeron a 1/10000 de un stock de 1 mg/ml. Tanto el Acetato de NHS como el (MS)PEG₄ aportaron una mejora significativa en la sensibilidad y la señal/fondo respecto a los conjugados base iniciales. El Acetato de NHS añadido en un exceso molar de 2,5x al GAM-DyLight™ 650-4xPEG-15x mejoró la intensidad 1,7 veces. La mejora proporcionada por el Acetato de NHS mostró un rendimiento 1,3 veces mejor que con el conjugado preparado con el más alto exceso molar de colorante (20x). Todo el MS(PEG)₄ agregado a la conjugación GAM-DyLight™ 650-4xPEG-15x, mejoró la intensidad de fluorescencia de 1,8 a 2,2 veces, y rindió mejor que el correspondiente conjugado base de máximo exceso molar GAM-DyLight™ 650-4xPEG-20x.

Tabla 14. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 650-4xPEG-GAM en (10x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_5x	1,0	1,0	1,2		1,1	1,9	1,1
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_7,5x	1,0	1,7	1,5		1,8	1,2	1,6
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_10x	1,0	1,2	2,9		1,8	1,3	1,5
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_15x	1,0	1,6	1,5	1,0	2,2	1,0	2,2

Tabla 14. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 650-4xPEG-GAM en (10x-20x) en un ensayo de transferencia de puntos.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_20x	1,0	1,0	0,8	0,8	1,6	0,9	1,3
NA = Sin adición							

Los resultados mostrados en la Figura 7 y la Tabla 15 demuestran el efecto de la adición de espaciadores de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) con GAM-DyLight™ 800-4xPEG- en un ensayo de transferencia de puntos. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:2 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios 800-4xPEG-GAR se diluyeron a 1/20.000 de un stock de 1 mg/ml. Estos experimentos muestran que la adición de MS(PEG)₄ (3,75x y 5x) y Acetato de NHS (5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 800-4xPEG de 1,5 a 6 veces en una aplicación de transferencia de puntos.

Tabla 15. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) GAM-DyLight™ 800-4xPEG- en un ensayo de transferencia de puntos.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 800-4xPEG_5x	1,0	1,7	0,2		3,1	5,5	1,8
GAM-DyLight™ 800-4xPEG_7,5x	1,0	0,6	1,4		1,8	2,9	1,3
GAM-DyLight™ 800-4xPEG_10x	1,0	1,7	1,3		2,1	0,7	1,0
GAM-DyLight™ 800-4xPEG_15x	1,0	1,3	1,6	1,2	3,1	1,3	1,9
GAM-DyLight™ 800-4xPEG_20x	1,0	1,3	1,8	1,5	3,2	1,3	1,6
NA = Sin adición							

Los resultados mostrados en la Figura 11 demuestran el efecto de la adición de los espaciadores de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (5x) y de MS(PEG)₈ (5x) a GAM-DyLight™ 550-2xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 12,5x) en un ensayo de transferencia de puntos. La IgG de ratón se diluyó 3 veces de 0,5 µg/pocillo. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ se diluyeron a 1/5000 a partir un stock de 1 mg/ml. Estos ensayos de transferencia de puntos mostraron que la adición de MS(PEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad de conjugados base DyLight™ 550-2xPEG en al menos 2 veces. Los conjugados preparados con MS(PEG)₈ de cadena más larga no mostraron una mejora significativa respecto al conjugado base.

Los resultados mostrados en la Figura 12 demuestran el efecto de la adición de los espaciadores de Acetato de NHS (2,5x, 5x) y de MS(PEG)₄ (5x) con GAM-DyLight™ 680-4xPEG-GAR (en un exceso molar de colorante de 10x) en un ensayo de transferencia de puntos. La IgG de ratón se diluyó en serie 1:2 de 1000 ng/punto. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 680-4xPEG-GAR se diluyeron a 1/20000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Estos ensayos de transferencia de puntos muestran que la adición de MS(PEG)₄ (5x) y Acetato de NHS (2,5x y 5x) mejoraron significativamente la intensidad de la fluorescencia y la sensibilidad del conjugado base DyLight™ 680-4xPEG.

Ejemplo 3: Métodos de ensayo de placa

Para preparar las placas, se prepararon once diluciones en serie (1:1) de IgG de ratón o conejo a partir de 10/µg/ml. Se colocaron 100 µL de cada dilución en placas de 96 pocillos en el pocillo correspondiente de 1-11 de mayor a menor utilizando una pipeta múltiple de 12 canales; Se añadió PBS a la última columna (#12; control negativo). Esto se repitió de la fila A a la H. Las placas se incubaron durante la noche, y después se bloquearon e incubaron con el tampón de bloqueo SuperBlock™ (Thermo Fisher, n.º de cat. 37515) de la siguiente manera: dos veces dos cientos µL durante 5 minutos, seguido de una vez 200 µL durante diez minutos. Las placas se dejaron secar, y después se almacenaron desecadas a 4 °C.

Las placas recubiertas con IgG de ratón o de conejo se lavaron dos veces 200 µL con PBST 20, después una vez con PBS. Los conjugados de anticuerpo secundario se diluyeron en TBS o PBS. Los conjugados de anticuerpos

secundarios se diluyeron 1:100 (conjugados DyLight™ 488 y 550-2xPEG, DyLight™650-4xPEG, DyLight™ 680-4xPEG y DyLight™ 800-4xPEG). Se añadieron 100 µl a la placa de pocillos de los conjugados relevantes GAM en la placa recubierta con IgG de ratón, y de GAR en la placa recubierta con IgG de conejo. Cada dilución se añadió a diferentes filas para cada conjugado a ensayar. Todas las comparaciones se realizaron en la misma placa. Las placas se incubaron durante sesenta minutos. Las placas se lavaron tres veces 200 µL con tampón TBST o PBST. Se añadieron 100 µl de PBS a cada fila en cada pocillo. La intensidad de fluorescencia se midió utilizando el instrumento VariosKan o formar la imagen de la señal fluorescente con un formador de imágenes adecuado, tal como ChemiDoc MP (488, 550, 650, 680 nm) y LiCOR Odyssey CLx (650, 680, 800 nm).

10 Ejemplo 4: Métodos de inmunofluorescencia (IFC) (es decir, Métodos de formación de imágenes celulares)

Método #1: Las placas de células U20S congeladas almacenadas a -80 °C se descongelaron durante treinta minutos a 50 °C. Se retiró el tampón de almacenamiento (PBS) y las células se permeabilizaron durante quince minutos (100 µl/pocillo) con Triton-X100 al 0,1 % en tampón PBS 1x. Las placas se bloquearon durante treinta minutos en los bloqueadores de BSA/PBS al 2 %-Tritón-X100 al 0,1 %. El anticuerpo primario anti-PDI de ratón o anti-HDAC2 de conejo (10 µg/ml) (n.º de cat. PA 1-861, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), se diluyó en BSA/PBS al 2 %-Tritón-X100 al 0,1 % se añadió a la placa y se incubó durante una hora a TA. Los controles negativos contienen solo bloqueador de BSA/PBS al 2 %-Tritón-X100 al 0,1 %. Después de la incubación, la solución de anticuerpo primario se retiró de la placa, y la placa se lavó tres veces 100 µl/pocillo de PBST, y una vez 100 µl/pocillo de PBS. A continuación, los anticuerpos secundarios GAM o GAR etiquetados con diversos excesos molares de colorantes se diluyeron a 4 µg/ml en PBS, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces 100 µl/pocillo de PBST y 1x 100 µl/pocillo de PBS, y se añadió Hoechst 33342 (n.º de cat. 62249, Thermo Scientific, Waltham, MA), (diluido a 0,1 µg/ml en PBS) a cada pocillo (100 µl/pocillo). Las placas se escanearon en el lector de placas ArrayScan™ VTI3, objetivo 20x.

25 Método #2: Determinados experimentos se realizaron en células A549 en placas de 384 pocillos. El anticuerpo primario se utilizó a la misma concentración (1 µg/ml) con diluciones variables de secundario. Las mediciones de pH2AX en células tratadas con etopósido (50 µM durante 3 horas, Tocris Bioscience, n.º de cat. 12-261-00) se utilizaron para medir la Señal/Ruido B (S/N, también denominado Señal a fondo), y el brillo se usó para comparar diferentes anticuerpos. Los conjugados de anticuerpo secundario se probaron en 4 diluciones diferentes (0,5, 1, 2 y 4 mg/ml). Se utilizaron procedimientos estándar para la tinción de anticuerpos: fijación de formaldehído al 4 % durante quince minutos. La permeabilización se realizó en Triton x-100 al 0,5 % durante diez minutos. El bloqueo se realizó con BSA al 3 % durante treinta minutos. La incubación de anticuerpos primarios se llevó a cabo a TA durante una hora. Esto fue seguido por tres lavados con PBS. Los conjugados de anticuerpos secundarios se incubaron a TA durante una hora seguido de tres lavados con PBS. Las células se analizaron en ArrayScan™ VTI (Thermo Fisher).

35 Los resultados mostrados en la Figura 13 y las Tablas 16 y 17, demuestran el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x y 5x) y de MS(PEG)₄ (3,75x) a GAM-DyLight™ 488 ((13A) y GAR-DyLight™ 488 ((13B) en un exceso molar de colorante de 7,5 x a 20x) en una aplicación de formación de imágenes celulares. DyLight™ 488-GAM y DyLight™ 488-GAR. Las células A549 se tiñeron con un anticuerpo primario pH2Ax diluido a 1/1000 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 488 se diluyeron a 1/250 a partir de un stock de 1 mg/ml. El Acetato de NHS añadido a la mezcla de conjugación proporcionó una mejora de la señal/fondo, en comparación con los conjugados base en tiempos molares de colorante de 15x; variando de 1,4 a 1,5 veces (GAM) y de 1,1 a 1,6 veces (GAR). Para los conjugados GAM, se observó la mejora más significativa con el Acetato de NHS a 5x y con MS(PEG)₄ a 3,75x, y para los conjugados GAR, se observó la mejora más notable con Acetato de NHS a 2,5x y con MS(PEG)₄ a 3,75x.

45 **Tabla 16.** Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAM-DyLight™ 488 en exceso molar 5x-20x en una aplicación de formación de imágenes celulares-DyLight™ 488-GAM

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄
DyLight™ 488_5x	1,00	1,07	1,14	1,23
DyLight™ 488_10x	1,00	1,04	1,13	1,17
DyLight™ 488_15x	1,00	1,11	1,48	1,53
DyLight™ 488_20x	1,00	0,72	1,09	1,07

NA = Sin adición

60 **Tabla 17.** Efecto de añadir Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAR-DyLight™ 488 en exceso molar 5x-20x en una aplicación de formación de imágenes celular-DyLight™ 488-GAR

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄
DyLight™ 488_5x	1,00	1,13	1,07	1,13
DyLight™ 488_10x	1,00	1,20	1,21	1,02

Tabla 17. Efecto de añadir Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x) en la conjugación de GAR-DyLight™ 488 en exceso molar 5x-20x en una aplicación de formación de imágenes celulares-DyLight™ 488-GAR

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄
DyLight™ 488_15x	1,00	1,60	1,31	1,67
DyLight™ 488_20x	1,00	1,23	1,14	1,11
NA - Sin adición				

Los resultados mostrados en la Figura 14 y la Tabla 18 demuestran el efecto del Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) en GAM-DyLight™ 550-2xPEG-GAM (en un exceso molar de colorante de 7,5x a 20x) en una aplicación celular de fluorescencia celular. Las células U2OS se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/100 del stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 550-2xPEG-GAM se diluyeron a 1/250 del stock de 1 mg/ml. En esta aplicación de formación de imágenes celulares, la adición del Acetato de NHS 5x generó una mejora de aproximadamente el 50 %, en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para el conjugado DyLight™ 550-2xPEG GAM en un exceso molar de colorante de 12,5x, y la adición de 3,75x MS(PEG)₄ dio como resultado una mejora de aproximadamente el 50 % sobre los conjugados base en un exceso molar de colorante de 20x.

Tabla 18. Efecto de 2,5x a 10x Acetato de NHS y MS(PEG)₄ 3,75x a 10x en la intensidad de la fluorescencia de GAM-DyLight™ 550-2xPEG) en una aplicación de formación de imágenes celulares

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 550-2xPEG_7,5x	1,0	0,5	0,7		0,5	0,9	0,7
GAM-DyLight™ 550-2xPEG_10x	1,0	1,7	1,7		0,9	1,4	1,5
GAM-DyLight™ 550-2xPEG_12,5x	1,0	1,8	2,0		0,9	1,1	1,2
GAM-DyLight™ 550-2xPEG_15x	1,0	2,2	2,2	1,9	1,3	1,9	1,1
GAM-DyLight™ 550-2xPEG_20x	1,0	1,7	1,3	1,0	1,2	1,2	1,0
NA = Sin adición							

Los resultados se muestran en la Figura 15 y la Tabla 19 para un experimento que prueba el efecto de un espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) a GAM-DyLight™ 650-4xPEG) en una aplicación de formación de imágenes celulares. Las células U2OS se tiñeron con anticuerpo primario anti-PDI diluido a 1/100 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 650-4xPEG-GAM se diluyeron a 1/250 de stock de 1 mg/ml. En esta aplicación de formación de imágenes celulares, la adición de Acetato de NHS 5x generó una mejora de aproximadamente el 70 % en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para el conjugado DyLight™ 650-4xPEG-GAM en un exceso molar de 20x, y MS(PEG)₄-3,75x mostró una mejora de aproximadamente el 90 % respecto a los conjugados base en un exceso molar de 20x.

Tabla 19. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) a GAM-DyLight™ 650-4xPEG)-Aplicación de formación de imágenes celulares.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_5x	1,0	1,0	1,0		0,9	1,2	1,1
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_7,5x	1,0	0,5	0,5		0,5	0,4	1,6
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_10x	1,0	1,3	1,7		0,9	1,0	1,5
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_15x	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	2,2

Tabla 19. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) a GAM-DyLight™ 650-4xPEG)-Aplicación de formación de imágenes celulares.

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 650-4xPEG_20x	1,0	1,0	0,9	1,1	1,9	1,1	1,3
NA = Sin adición							

Los resultados se muestran en la Figura 16 y la Tabla 20 para un experimento que prueba el efecto de la adición del espaciador de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) y de MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) al nivel de fluorescencia detectable de GAM-DyLight™ 680-4xPEG en una aplicación de formación de imágenes celulares. Las células U2OS se tiñeron con anticuerpo primario anti-PDI de ratón, diluido a 1/100 a partir de un stock de 1 mg/ml. Todos los anticuerpos secundarios DyLight™ 680-4xPEG-GAM se diluyeron a 1/250 de un stock de 1 mg/ml: En esta aplicación de formación de imágenes celulares, la adición de Acetato de NHS-5x generó una mejora de aproximadamente el 70 % para los conjugados de colorantes tanto a 7,5x como a 10x, en comparación con el conjugado base (preparado sin los aditivos) para DyLight™ 680-4xPEG. El conjugado GAM en excesos molares de exceso molar de 15x y MS(PEG)₄-3,75x, mostró una mejora de aproximadamente el 80 % respecto a los conjugados base en excesos molares de 15x.

Tabla 20. Efecto de la adición de Acetato de NHS (2,5x, 5x y 10x) o MS(PEG)₄ (3,75x, 5x, 10x) a GAM-DyLight™ 680-4xPEG)-Aplicación de formación de imágenes celulares

Veces de mejora	NA	+ 2,5x Acetato de NHS	+ 5x Acetato de NHS	+ 10x Acetato de NHS	+ 3,75x MS(PEG) ₄	+ 5x MS(PEG) ₄	+ 10x MS(PEG) ₄
GAM-DyLight™ 680-4xPEG_5x	1,0	0,8	0,7		0,7	1,0	0,8
GAM-DyLight™ 680-4xPEG_7,5x	1,0	1,2	1,7		1,1	1,1	1,1
GAM-DyLight™ 680-4xPEG_10x	1,0	1,7	1,7		1,1	1,5	1,5
GAM-DyLight™ 680-4xPEG_15x	1,0	1,4	1,2	1,1	1,8	1,3	1,4
GAM-DyLight™ 680-4xPEG_20x	1,0	0,8	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
NA = Sin adición							

Resultados

El uso de agentes espaciadores tales como Acetato de NHS, NHS-MS(PEG) y Betaína de NHS, aumentó la sensibilidad e intensidad de la señal fluorescente por encima de los niveles óptimos de D/P que típicamente dan como resultado la extinción. Esto se demostró etiquetando anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra (GAM) y anti-conejo de cabra (GAR) con NHS-DyLight™ 488, NHS-DyLight™ 550 2xPEG, NHS-DyLight™ 650 4xPEG, NHS-DyLight™ 680 4xPEG, NHS-DyLight™ 800 4xPEG en combinación con agentes espaciadores que incluyen, pero no se limitan a, Acetato de NHS y NHS-MS(PEG)₄, NHS-MS(PEG)₈ y NHS-MS(PEG)₁₂. Nuestros cálculos de valor D/P después de la conjugación y purificación de colorante demostraron que la adición de los agentes espaciadores no resultó en diferencias significativas con las relaciones D/P, lo que indica que estos reactivos y los fluoróforos etiquetaron diferentes aminas primarias en el anticuerpo (es decir, no compiten por las mismas aminas primarias).

Los conjugados preparados con diferentes agentes de colorante y espaciadores se probaron en una variedad de aplicaciones que incluyen IFC, transferencia Western, transferencia de puntos o ensayos basados en placas de unión de IgG. En cada caso, con determinados agentes espaciadores en determinados valores en exceso molar del agente espaciador al colorante, se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia cuando se utilizaron agentes espaciadores, en comparación con los controles que carecen de agentes espaciadores.

Además de los experimentos descritos anteriormente, los anticuerpos etiquetados con Rodamina de NHS y conjugados con una variedad de concentraciones de Betaína de NHS (relaciones molares de Betaína 2,5, Betaína 5, Betaína 10) mostraron un aumento en la fluorescencia total cuando los anticuerpos se conjugaron con betaína como reactivo de modificación espaciador. Véase a continuación la Figura 17 y la Tablas 21 y 22. Entre las diferentes longitudes de la cadena de betaína, la betaína 10 tuvo un efecto positivo en TAMRA en todos los excesos molares de los colorantes y en el Alexa Fluor® 555 por encima de una relación D/P de 12 (datos no mostrados).

Tabla 21. Efecto de 2,5x a 10x betaína sobre la fluorescencia de conjugados TAMRA-GAM.

MR de NHS-Betaína	MR de NHS-TAMRA	DOL de TAMRA/IgG	Rendimiento cuántico relativo	Fluorescencia total
2,5	5	NA	NA	NA
2,5	10	6,3	0,4	2,52
2,5	20	8,6	0,3	2,58
5	5	5,9	0,56	3,3
5	10	7,1	0,34	2,41
5	20	6,4	0,18	1,15
10	5	5,4	0,56	3,02
10	10	8,4	0,5	4,2
10	20	15,7	0,34	5,34
0	5	4,2	0,54	2,27
0	10	6,7	0,42	2,81
0	20	11,4	0,38	4,33

MR = Relación Molar
DOL = Grado de Etiquetado

Ejemplo 5: Reacción de IgG anti-ratón de cabra (GAM) y éster de succinimidilo de 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina (5(6)-TAMRA-SE) con y sin bromuro de N,N,N-trimetilglicina-N-hidroxisuccinimida (Betaína-SE)

TAMRA-SE se pesó y se preparó como una solución madre a 10 mg/mL en DMSO anhidro y Betaína-SE se pesó y se preparó en un stock de 4 mg/mL en DMSO anhidro. Las soluciones de DMSO se transfirieron luego a viales de reacción con la TAMRA-SE +/- Betaína-SE medida en los viales en base a una relación molar de 5, 10 o 20 veces de colorante a IgG, y el equivalente de relación molar 0 o 10 Betaína-SE a IgG también se añadió a los viales.

Por separado, se midieron 0,417 mL (3,5 mg) de una solución de 8,4 mg/mL de GAM en fosfato de potasio 10 mM, tampón de cloruro de sodio 150 mM (PBS), en un tubo de plástico, y el pH aumentó a > 8,0 con 42 µL de bicarbonato sódico 1 M, pH 9,0. Se añadieron 0,5 mg de la solución de GAM a los viales de reacción que contenían SE, y se hicieron reaccionar durante 1 hora a TA. Los conjugados de colorante-proteína se separaron del colorante libre y la betaína mediante cromatografía de exclusión por tamaño, mediante el uso de columnas de 5-0,75 x 20 cm empaquetadas con Biorad™ BIO-GEL® P-30 fino en PBS, y eluido con el mismo. Se recogió la banda inicial que contenía proteínas de cada columna.

Se obtuvieron espectros de absorbancia en un espectrómetro UV/Vis de Perkin-Elmer Lambda 35, y se determinó para cada muestra el grado de sustitución (DOS) o moles de colorante/mol de GAM. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55, utilizando muestras con densidad óptica coincidente a 545 nm y se excitaron a 545 nm. Datos de emisión recogidos de 550-750 nm. El Rendimiento cuántico relativo (RQY) se midió como el área del espectro de muestra/área del espectro estándar de colorante. A continuación, la fluorescencia total se calculó como el producto del RQY * DOS.

Tabla 22: Emisión fluorescente total de diferentes relaciones molares de TAMRA/GAM

TAMRA/GAM (Relaciones molares)	5	10	20
TAMRA-GAM y Betaína-SE añadida a MR = 10	3,02	4,2	5,34
TAMRA-GAM (Sin betaína-SE)	2,27	2,81	4,33

Ejemplo 6: Reacción de IgG anti-ratón de cabra (GAM) y ácido carboxílico de Alexa Fluor® 488, éster de succinimidilo, sal de dilitio (AF488-SE) con y sin sulfato de 1,3-propano (γ -sulfato de ácido 3-hidroxi-1-propanosulfónico)

Se pesó AF488-SE y se preparó como una solución madre a 10 mg/mL en DMSO anhidro, y se pesó sulfato de propano y se preparó a un stock de 1 mg/mL en E-Pure H₂O.

Se midió en un tubo de plástico 0,357 mL (4,0 mg) de una solución de 11,2 mg/mL de GAM en fosfato de potasio 10 mM, tampón de cloruro de sodio 150 mM (PBS), y el pH se elevó a > 8,0 con 36 µL de bicarbonato sódico 1 M, pH 9,0. Se transfirieron 0,5 mg de la solución de GAM a viales de reacción y se hicieron reaccionar con un exceso molar de 0, 2, 5 o 10 veces de propano de sultona durante 2 minutos, y luego se añadió stock de AF488 a las mezclas en un exceso molar de 8 o 15 veces sobre el GAM, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los conjugados de colorante-proteína se separaron del colorante libre y la sultona de propano mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de columnas de 5-0,75 x 20 cm empaquetadas con Biorad™ BIO-GEL® P-30 fino en PBS, y eluido con el mismo. Se recogió la banda inicial que contenía proteínas de cada columna.

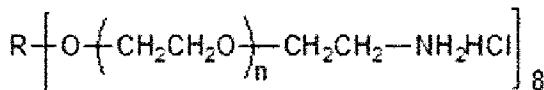
- 5 Se obtuvieron espectros de absorbancia en un espectrómetro UV/Vis de Perkin-Elmer Lambda 35, y se determinó para cada muestra el grado de sustitución (DOS) o moles de colorante/mol de GAM. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55, utilizando muestras con densidad óptica coincidente a 475 nm, y se excitaron a 475 nm. Datos de emisión recogidos de 480-800 nm. El Rendimiento cuántico relativo (RQY) se midió como el área del espectro de muestra/área del espectro estándar de colorante. A continuación, la fluorescencia total se calculó como el producto del RQY * DOS.
- 10
- 15

Tabla 23: Emisión fluorescente total de diferentes relaciones molares de AF 488/GAM

AF488/GAM (Relaciones molares)	8	15
AF488-GAM + propanosultona/GAM MR = 2	2,52	3,67
AF488-GAM + propanosultona/GAM MR = 5	2,62	3,73
AF488-GAM + propanosultona/GAM MR = 10	2,69	3,86
Control AF488-GAM (sin propanosultona)		3,56

Ejemplo 7 (no según la invención): Etiquetado de azida de anti-CD4 humano SK3 de ratón con Amina de PEG de 8 brazos de 20 kDa (PEG 20K8) modificado con éster de NHS de Alexa Fluor® 647, tris(sal de trietilamonio) (AF647-SE)

20 NHS/Éster Succinimidilo de Alexa Fluor® 647 (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. A37573), abreviado como “AF647-SE”, se pesó y se preparó como una solución madre a 32 mM en DMSO anhidro (Thermo Fisher Scientific, D12345). Alquino sDIBO Éster SDP Click-It™ (sDIBO) (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. C20025) se preparó como una solución madre a 9 mg/mL en DMSO anhidro. Amina (hexollicerol) de PEG de 8 brazos, sal de HCl (JenKem, Plano, TX 75024, n.º de cat. 8ARM-NH2HCl), abreviado como “20K8 PEG”, con la siguiente estructura:



30 **R = Estructura del núcleo de hexollicerol**

35 se pesó y se preparó como una solución madre a 40 mg/mL en DMSO anhidro.

40 A un tubo de plástico se le añadieron 300 µL de solución madre de 20K8 PEG, 176 µL de solución madre de sDIBO (exceso molar de 2,4 veces/20K8 PEG) y 6 µL de trietilamina pura (TEA), y se dejó reaccionar durante 3 horas a 25 °C. Despues de la reacción, se añadieron 300 µL de la solución madre de AF647-SE (exceso molar 2 veces/PEG-amina) al tubo, y la reacción continuó durante la noche a 25 °C. Las construcciones AF647-20K8 PEG-sDIBO se purificaron a partir de colorante libre y sDIBO, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando una columna de 1 x 30 cm empaquetada con BioRad BIO-GEL-GEL® P-10F en PBS, y eluida en la misma. Las fracciones iniciales que contenían colorante se recogieron y concentraron mediante el uso de filtros centrífugos EMD Millipore Amicon™ de Ultra-4 10 kDa.

45 Ácido propiónicode Azido (PEO)₄, éster succinimidilo (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. A10280), abreviado como “Azida-SE”, se pesó y preparó como una solución madre a 10 mM en DMSO anhidro (Thermo Fisher Scientific, D12345). Se añadieron 266 µL de anticuerpo anti-CD4 humano SK3 de ratón (2,5 mg) y 134 µL de PBS, a un tubo de plástico, y el pH se elevó a > 8,0 con 50 µL de bicarbonato sódico 1 M, pH 9,0. 8,3 µL de solución madre de Azide-SE (exceso molar de 5 veces/anticuerpo) y 42 µL de DMSO se añadieron a la solución de anticuerpo. La reacción se dejó proceder durante 2 horas a 25 °C. Se purificó el anticuerpo Azido-SK3 utilizando columnas de centrifugación de 2 mL de BioRad BIO-GEL® P-30M. Se preparó el anticuerpo Azido-SK3 con un exceso de 5 veces a 20 veces de Azide-SE al anticuerpo.

50 Se combinaron en un tubo de plástico 24,2 µL de una solución 2 mM de AF 647-20K8 PEG-sDIBO (concentración de DIBO) y 116 µL de una azido-SK3 a 4,3 mg/mL. Se añadieron 360 µL de PBS para llevar la concentración final de la solución a AF647-20K8 PEG-sDIBO 100 µM (concentración de DIBO) y anticuerpo azido-SK3 1 mg/mL. La reacción Click se dejó proceder durante 2 horas a 37 °C, seguido de extinción con 5 mM NaN₃ durante 1 hora a temperatura ambiente. Los conjugados AF647-20K8 PEG-SK3 se diluyeron a 0,5 mg/mL en PBS. Las reacciones

55

60

65

de conjugación se realizaron en concentraciones finales de DIBO entre 100 y 600 pM, con anticuerpo azido-SK3 a 1-3 mg/mL, a temperaturas de reacción entre 25 °C y 37 °C, durante de 2 horas a 20 horas. Las condiciones específicas por ensayo experimental se exponen en la Tabla 24.

- 5 Se combinaron en un tubo de plástico 24,2 µL de una solución 2 mM de AF 647-20K8 PEG-sDIBO (concentración de DIBO) y 116 µL de una azido-SK3 a 4,3 mg/mL. Se añadieron 360 µL de PBS para llevar la concentración final de la solución a AF647-20K8 PEG-sDIBO 100 µM (concentración de DIBO) y anticuerpo azido-SK3 1 mg/mL. La reacción Click se dejó proceder durante 2 horas a 37 °C, seguido de extinción con 5 mM NaN₃ durante 1 hora a temperatura ambiente. Los conjugados se purificaron y se concentraron utilizando filtros centrífugos EMD Millipore Amicon™ Ultra-4 100 kDa. Los conjugados AF647-20K8 PEG-SK3 se diluyeron a 0,5 mg/mL en PBS. Las reacciones de conjugación se realizaron en concentraciones finales de DIBO entre 100 y 600 pM, con anticuerpo azido-SK3 a 1-3 mg/mL, a temperaturas de reacción entre 25 °C y 37 °C, durante de 2 horas a 20 horas. Las condiciones específicas por ensayo experimental se exponen en la Tabla 24.
- 10
- 15

Tabla 24: Condiciones de conjugación

Ejemplo	SK3-N ₃		starPEG ³	Condición de incubación de Click		
	MR ¹	DOS ²		SK3 mg/mL ⁴	starPEG DIBO µM ⁵	Tiempo/temperatura ⁶
sa1	5	3	HG 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa2	10	6,1	HG 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa3	20	12	HG 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa4	5	3	HG 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa5	10	6,1	HG 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa6	20	12	HG 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa2*	10	6,1	HG 20kD	1	100	20 h/25 °C
sa7	5	3	TP 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa8	10	6,1	TP 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa9	20	12	TP 20kD	1	100	2 h/37 °C
sa10	5	3	TP 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa11	10	6,1	TP 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa12	20	12	TP 20kD	1	200	2 h/37 °C
sa8*	10	6,1	TP 20kD	1	100	20 h/25 °C
sa13	10	6,1	HG 20kD	3	600	3 h/37 °C
sa14	20	12	HG 20kD	3	600	3 h/37 °C

¹ MR: Relación Molar; exceso de x veces utilizado para marcar el anticuerpo SK3 con Azida-SE:anticuerpo (mol/mol).

² DOS: grado de sustitución, número de grupos azida incorporados por molécula de anticuerpo.

³ starPEG: indica PM (Peso molecular) de starPEG (20 kD) y núcleo. HG: hexaglicerol, TP: tripentaeritritol.

⁴ En la incubación de Click, la SK3 estaba presente en las concentraciones indicadas en mg/mL (especificado para cada ejemplo).

⁵ El DIBO de starPEG durante la conjugación Click estaba presente en las concentraciones indicadas en µM.

⁶ Las reacciones Click se realizaron durante los tiempos indicados a las temperaturas indicadas.

Ejemplo 8 (no según la invención): Caracterización del rendimiento cuántico de constructos de AF647 de PEG ramificado

Para preparar muestras para la medición del rendimiento cuántico, se diluyeron las soluciones de constructos de PEG ramificados AF647 (AF647-2K4, AF647-10K4, AF647-10K8 y AF647-20K8) a una concentración final de colorante de 0,16 µM en agua desionizada. El rendimiento cuántico (Φ) se midió mediante el uso de un espectrómetro de rendimiento cuántico de Hamamatsu Absolute PL. Los rendimientos cuánticos para los constructos de PEG ramificados se compararon con el del colorante libre, para determinar el grado de extinción en los constructos finales. Además, se determinó el brillo para determinar la mejora fluorescente lograda mediante el uso de los espaciadores de PEG

ramificados. El constructo más pequeño, AF 647-2K4 (PEG ramificado de peso molecular 2.000 con cuatro brazos) mostró la mayor extinción (20 % de QY del colorante libre, Relación fluorescente de 0,2), y tuvo la menor mejora general en la fluorescencia total. Se observó la mayor mejora de la fluorescencia para los constructos de mayor peso molecular, o con 4 u 8 brazos (AF647-10K4 y AF647-20K8), donde hasta el 89 % del rendimiento cuántico de fluorescencia se retuvo del colorante libre (Relación fluorescente de 0,9), y se observó una mejora de hasta 5,8 veces en el brillo.

Tabla 25. Efecto de los espaciadores de PEG ramificados con el porcentaje de rendimiento cuántico (QY) y el brillo (B) de Alexa Fluor® 647

Muestra	Colorante/Molécula (N)	Rendimiento cuántico (QY)	% QY de colorante libre (Relación fluorescente)	Brillo, B (QY x ε x N) AU	Relación de brillo a colorante libre
AF647	1	0,404	100 % (1,0)	1,09E+05	1,0
AF647-2K4	4	0,087	22 % (0,2)	9,40E+04	0,9
AF647-10K4	4	0,359	89 % (0,9)	3,88E+05	3,6
AF647-10K8	8	0,145	36 % (0,4)	3,13E+05	2,9
AF647-20K8	8	0,295	73 % (0,7)	6,37E+05	5,8

Se asume que, de manera efectiva, una etiqueta fluorescente se une al extremo de cada brazo. En otras palabras, se asume que las moléculas de PEG se etiquetaron a saturación, por lo tanto, N = número de brazos / polímero. $\epsilon = 270.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para Alexa Fluor® 647

Ejemplo 9 (no según la invención): Evaluación de citometría de flujo de constructos AF647-20K8 PEG-SK3

Se lisó sangre (humana) completa anticoagulada recién extraída, utilizando un tampón de lisis ACK, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los glóbulos blancos se aislaron mediante centrifugación (400 x g, 5 min) y se lavaron al 1 % dos veces en albúmina de suero bovino/PBS (BSA/PBS al 1 %). Despues del aislamiento, se determinó el número total de leucocitos utilizando el contador celular automatizado Countess®, y luego se diluyeron hasta 10 millones de células por mL. Se tiñeron un millón de células/pocillo en una placa de 96 pocillos con los conjugados AF647-20K8 PEG-SK3 mediante el uso de una titulación de 7 puntos de 1 µg a 0,015 µg de anticuerpo. Las células teñidas se lavaron dos veces con BSA/PBS al 1 %. El análisis de las células teñidas se realizó utilizando el citómetro de flujo Attune™ NxT, y se comparó con los conjugados de CD4 APC (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. MHCD0405), Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, n.º de cat. MHCD0420), FITC (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. MA 1-81103) y Brilliant Violet™ 605 (BioLegend, San Diego, CA, n.º de cat. 300555).

La Figura 22 muestra un gráfico de histograma de células de linfocitos positivos para CD4, en función de la intensidad de fluorescencia en el canal RL1 del citómetro de flujo Attune™ NxT. Se muestra mediante línea discontinua Alexa Fluor® 647 conjugado con CD4, y los conjugados AF647-20K8 PEG-SK3 se muestran mediante líneas punteadas o continuas. En comparación con el conjugado AF647 por sí solo, los conjugados de StarPEG muestran en el brillo un aumento mayor de aproximadamente 0,5 log. La Figura 23 muestra representada la señal a ruido (S/N) y el porcentaje positivo (% positivo) en función de la concentración de conjugado en el experimento de citometría de flujo. Se muestra que los constructos de StarPEG (aquí B1 y B2) tienen un aumento de hasta 2,5 veces en S/N frente al conjugado CD4 de referencia de APC, y un aumento de hasta 2 veces en S/N frente al conjugado CD4 de referencia de AF647, mientras conserva la capacidad de evaluar con precisión el número de células positivas para CD4 en la muestra.

Ejemplo 10 (no según la invención): Conjugación de Alexa Fluor® 488 a un andamio de dextrano de amino

Preparación de andamio de dextrano de amino AF488 de 70 kD: Se disolvieron 10 mg de dextrano de amino (PM 70.000, 20 grupos amino; Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. D1862) en 1,2 ml de DMSO seco que contenía 1,0 µl de DIEA. Se añadieron 0,9 mg de éster de succinimidilo Alexa Fluor® sal de litio (643 MF; Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. No. A20000) a la solución, y la mezcla se agitó durante 3,5 horas a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 12 mL de acetato de etilo, y la suspensión resultante se centrifugó. El sobrenadante se desechará, y el material sólido se agitó con 10 mL de acetato de etilo fresco, y se centrifugó. Este lavado se repitió 3 veces más con 10 mL de acetato de etilo fresco y el precipitado resultante se secó al vacío. El sólido se volvió a disolver en 0,5 ml de agua, y la solución se colocó en una membrana de diálsis Spectra/Por de 10 cm (Spectrum Labs, MWCO 12-14.000, anchura plana 10 mm) sujetada con clips por ambos lados. La membrana de diálsis se agitó lentamente en 1 L de agua durante 1 semana. El agua se reemplazó dos veces al día. La membrana de diálsis se abrió por un extremo, y la solución se liofilizó, para dar el andamio de dextrano de amino Alexa Fluor®. El DOL medido es de 9,7, y el QY relativo es de 0,6 (en referencia a QY de Alexa Fluor® 488).

Unir el enlazador de tiol a un andamio de dextrano de amino AF488 de 70 kD: El andamio de dextrano de amino AF488 (4,5 mg) se disolvió en 0,5 mL de DMSO que contenía 0,055 µL de N,N-Diisopropiletilamina (DIEA). Se añadió 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP) (20 µg) a la solución, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche, y después se tapó con éster de succimidilo de ácido acético (1,0 mg, 3 h). La solución se diluyó con 10 mL de acetato de etilo. La suspensión resultante se centrifugó, y el sobrenadante se desechará. El sólido se agitó

con 10 mL de acetato de etilo fresco, y se centrifugó. El lavado se repitió 5 veces más. El sólido resultante se secó al vacío. La DOL medida es de 0,74. Este material se volvió a disolver en 2 mL de agua, y se añadieron a la solución 16 mg de DTT. La mezcla se agitó durante 5 min, y se cargó en una columna Sephadex G15®, el producto se eluyó con agua DE como solución fluorescente verde, que se utilizó para la conjugación con estreptavidina modificada con SMCC. La concentración determinada fue de 48 μ M (mediante adsorción de colorante).

Conjugación del andamio de dextrano de amino AF488 modificado con un enlazador de tiol con estreptavidina modificada con SMCC: La estreptavidina modificada con SMCC (35 μ L de solución en agua) se trató con 1, 2, 3 y 4 equivalentes de andamio de dextrano de amino AF488 modificado con tiol (solución 48 μ M en agua). La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas, y después de esa mezcla de reacción se mantuvo durante la noche a 4 °C. Los conjugados se purifican en una columna de exclusión por tamaño P100 con tampón PBS 10 nM.

Tabla 26: Estreptavidina etiquetada con andamio de dextrano de amino AF488 de 70 kD (promedio de 9,7 moléculas de colorante por andamio)

DOL por andamio (promedio)	DOL por colorante (promedio)	QY	Brillo
0,9	9,2	0,52	4,8
1,1	10,2	0,50	5,1
1,8	18	0,53	9,5
2,6	25,5	0,54	13,7

Tabla 27: Estreptavidina etiquetada con colorante AF488

DOL (promedio)	QY	Brillo
1,5	0,70	1,0
3,0	0,60	1,8
4,0	0,55	2,1
4,5	0,40	1,8
5,0	0,34	1,7

Resultados: Como se muestra en las Tablas 26 y 27, los conjugados preparados a partir del andamio, son más brillantes en comparación con los preparados a partir de un solo colorante AF488. Además, el QY de fluoróforo AF488 baja de 0,70 a 0,34 para la conjugación de un solo colorante, en contraste con el QY casi constante para el etiquetado con el andamio de dextrano de amino.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un primer anticuerpo,
 en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,
 en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí, y en donde:
 el espaciador se selecciona de:
 un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo ($-C(O)C_nH_m$), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; y grupos alquilo, alquenilo o alquinilo ($-C_nH_m$), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OPO₃²⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃²⁻); restos de poli(etilen)glicol, tales como $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)y-OR$, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo presenta niveles de emisión fluorescente más altos que un segundo anticuerpo preparado con una cantidad equivalente de etiqueta fluorescente, pero sin la molécula espaciadora; o
 en donde el primer anticuerpo presenta niveles de emisión fluorescente más altos que un segundo anticuerpo, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo tienen cada uno el mismo número de etiquetas fluorescentes unidas covalentemente, y en donde el segundo anticuerpo no tiene una molécula espaciadora unida covalentemente; o
 en donde la molécula espaciadora reduce la extinción de las etiquetas fluorescentes, en comparación con la extinción en ausencia de la molécula espaciadora.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el grupo amina está en un residuo de lisina.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la etiqueta fluorescente es un colorante seleccionado del grupo que consiste en Dinitrofenilo, Fluoresceína, tetrametilrodamina, o éster de succinimidilo de 7-hidroxí-9-(1, 3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona) (DDAO-SE).
5. La composición de la reivindicación 1, en donde la etiqueta fluorescente es un resto químico que presenta un máximo de absorción mayor de 280 nm, e incluye pireno, pirenos sulfonados, cumarinas sulfonadas, carbocianinas sulfonadas, xantenos sulfonados, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un indol, un isoindol, una indolizina, un benzindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una carbocianina, una carbazina, un carbostirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinoleína, una isoquinolina, un cromeno, un borapoliazindaceno, un xanten, una fluoresceína, una rosamina, una rodamina, una benzo- o dibenzofluoresceína, una seminaftofluoresceína, una naftofluoresceína, un bimano, una oxazina o una benzoxazina, una carbazina, un fenalenona, una cumarina, un benzofurano, o un benzfenaleno; o comprende un resto seleccionado de xanten; cumarina; cianina; pireno; oxazina; borapoliazindaceno; benzopirilio; o carbopironina.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la etiqueta fluorescente se ha sulfonado o conjugado con PEG.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula espaciadora se selecciona de acetato y polietilenglicol (PEG).
8. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula espaciadora comprende un grupo acetilo; o una molécula de acetato.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula de acetato es sulfo-NHS-acetato.

10. La composición de la reivindicación 1, en donde la molécula espaciadora comprende o consiste en (PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15; o en donde la molécula espaciadora comprende MS-(PEG)_n, en donde n se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
- 5 11. La composición de la reivindicación 1, en donde la relación de etiqueta fluorescente con respecto a anticuerpo es de 5 a 50; de 5 a 30; o de 1 a 20.
- 10 12. Un método para determinar la presencia de un objetivo deseado en una muestra biológica, comprendiendo el método:
- 15 (a)poner en contacto la muestra biológica con una composición de anticuerpo, en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo, en donde las moléculas fluorescentes y espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí,
- 20 (b)detectar la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes; y
- 25 (c)determinar la presencia del objetivo deseado en la muestra biológica cuando se detecte la fluorescencia emitida por la pluralidad de etiquetas fluorescentes, en donde: el espaciador se selecciona de:
- 30 un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; y
- 35 grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OP₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻); restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o
- 40 el espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaína.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en donde la muestra biológica comprende lisado celular, células intactas, proteína aislada, proteína recombinante, o células intactas en fluido; o en donde la muestra biológica se inmoviliza sobre un soporte sólido.
- 50 14. Uso de un kit en la preparación de una biomolécula etiquetada con fluorescencia,
- 55 en donde la biomolécula etiquetada con fluorescencia es un primer anticuerpo, en donde dos o más etiquetas fluorescentes y dos o más moléculas espaciadoras se unen covalentemente al primer anticuerpo, en donde la molécula espaciadora se conjuga con un grupo amina reactivo del anticuerpo,
- 60 en donde la etiqueta fluorescente y las moléculas espaciadoras no están unidas covalentemente entre sí;
- 65 comprendiendo dicho kit una biomolécula, un agente espaciador y una etiqueta fluorescente, en donde la biomolécula es un anticuerpo y el agente espaciador comprende un grupo seleccionado de:
- un alcanoílo, alquenoílo y alquinoílo (-C(O)C_nH_m), en el que n es de 1 a 20 átomos, m > n, en donde los átomos de carbono pueden estar conectados entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es de 1 a 6, y R es H, o alquilo C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; y
- grupos alquilo, alquenilo o alquinilo (-C_nH_m), en los que n es de 1 a 20 átomos, m > n, los átomos de carbono se pueden conectar entre sí por enlaces simples, dobles y/o triples, y los grupos alquilo, alquenilo y/o alquinilo pueden sustituirse adicionalmente por grupos sulfonato cargados negativamente (-OSO₃⁻), grupos carboxilato (-CO₂⁻), grupos fosfato (-OP₃⁻) y/o grupos fosfonato (-PO₃⁻); restos de poli(etilen)glicol, tales como -(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR, en los que x es de 1 a 20, y es 1-6, y R es H, o alquilo

ES 2 979 129 T3

5

C₁₋₆, amonio (-NH₃⁺), grupos amonio cuaternario (-NR₃⁺), en los que R es alquilo C₁₋₆, o grupos fosfonio (-PQ₃⁺), en los que Q es arilo, arilo sustituido o alquilo C₁₋₆; o

el agente espaciador comprende un grupo acetilo, una molécula acetato, polietilenglicol (PEG) o betaina.

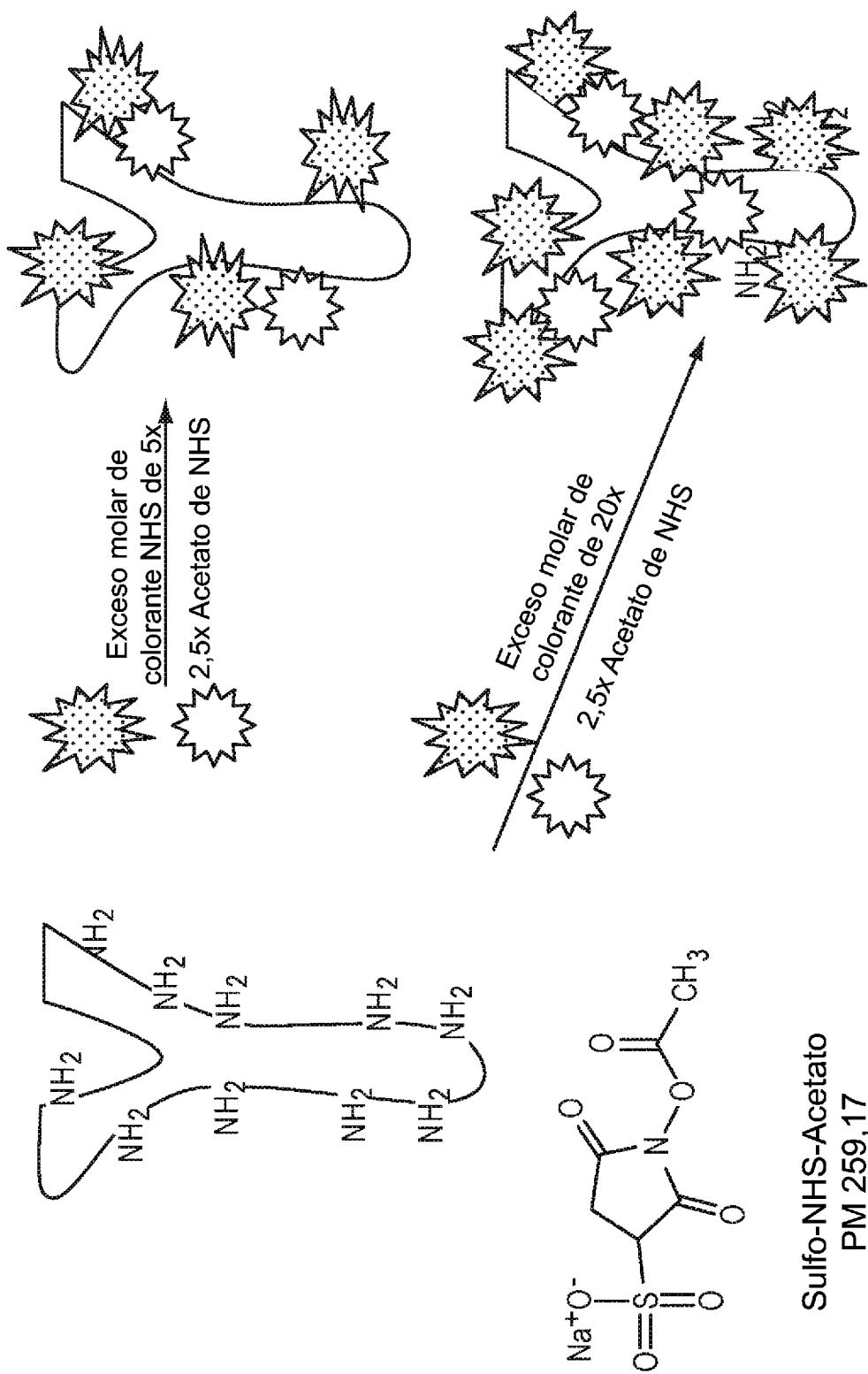
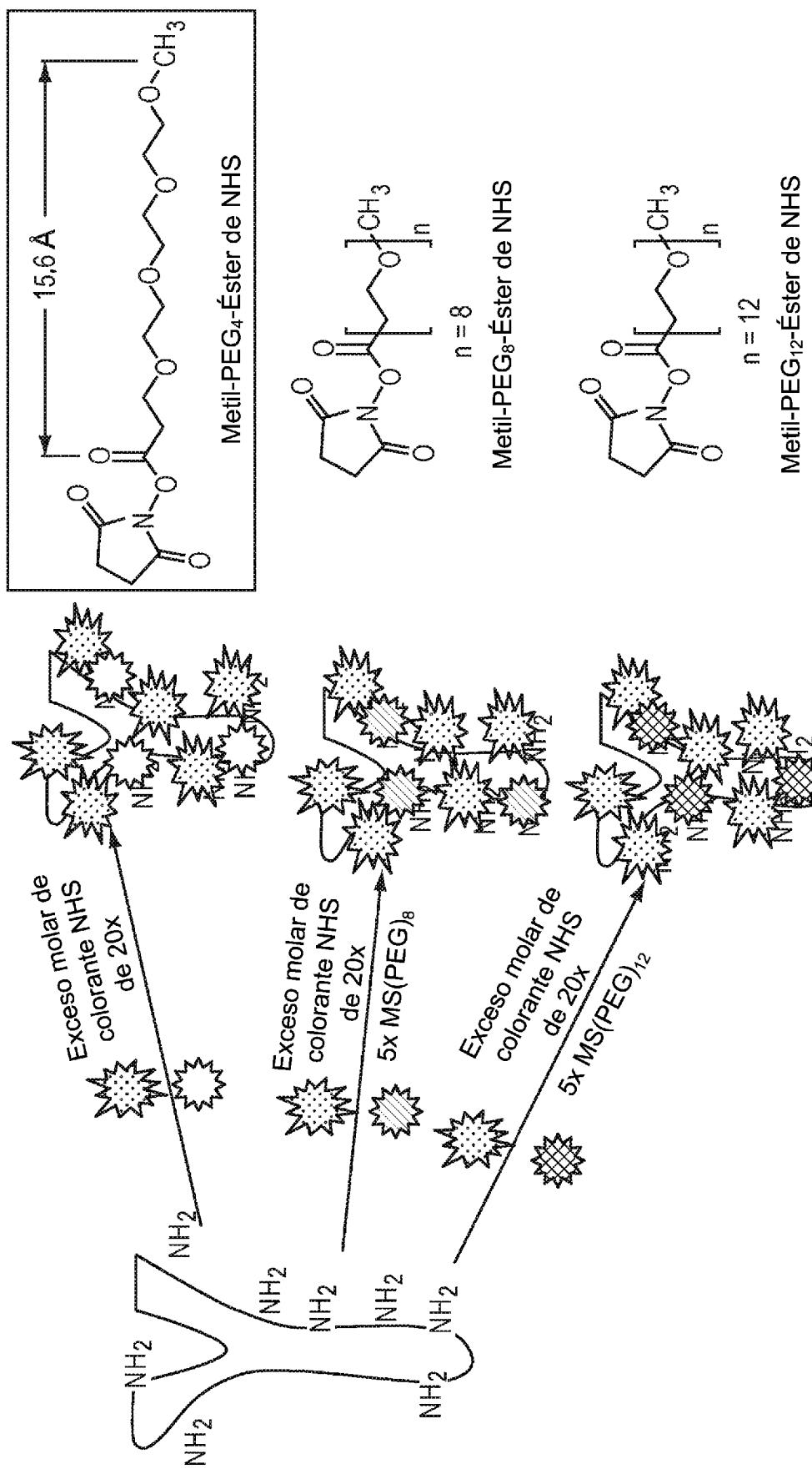
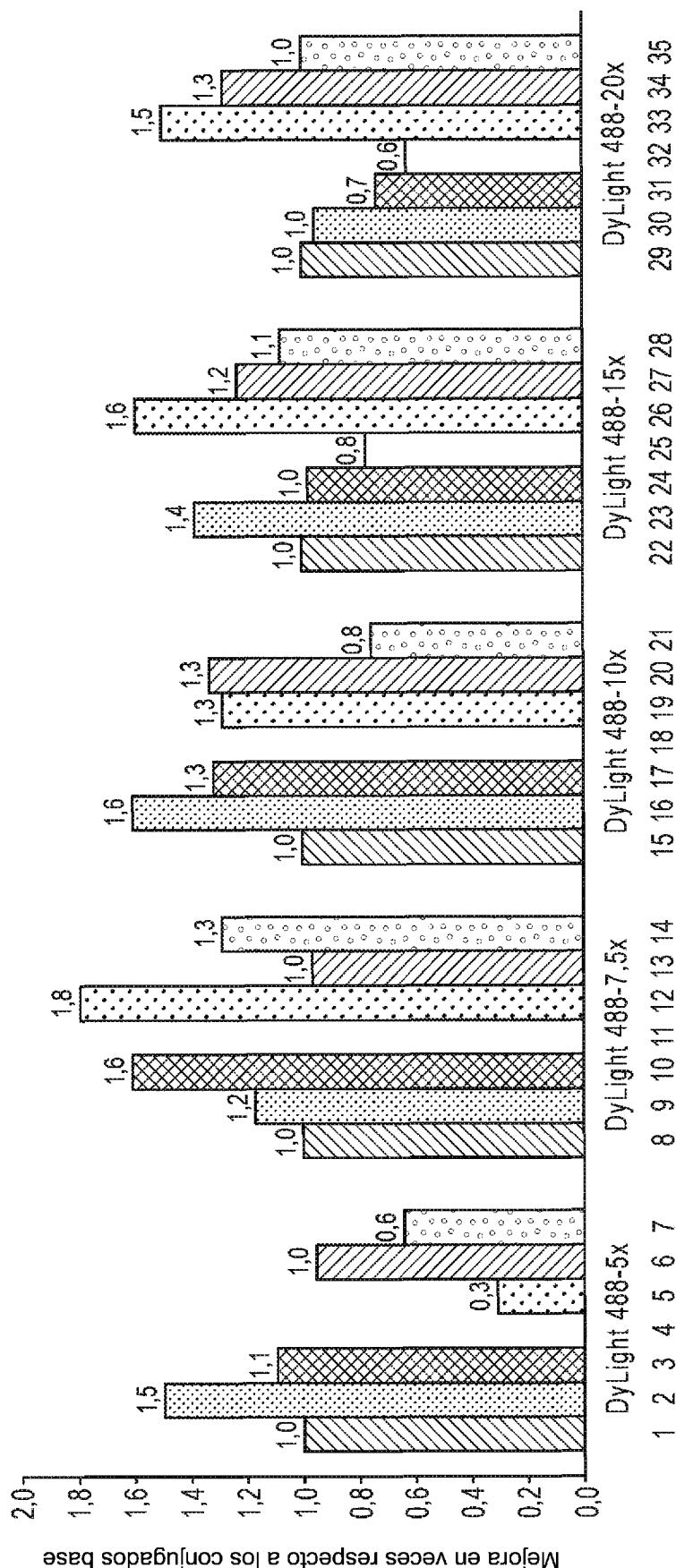


Figura 1

**Figura 2**

**Figura 3**

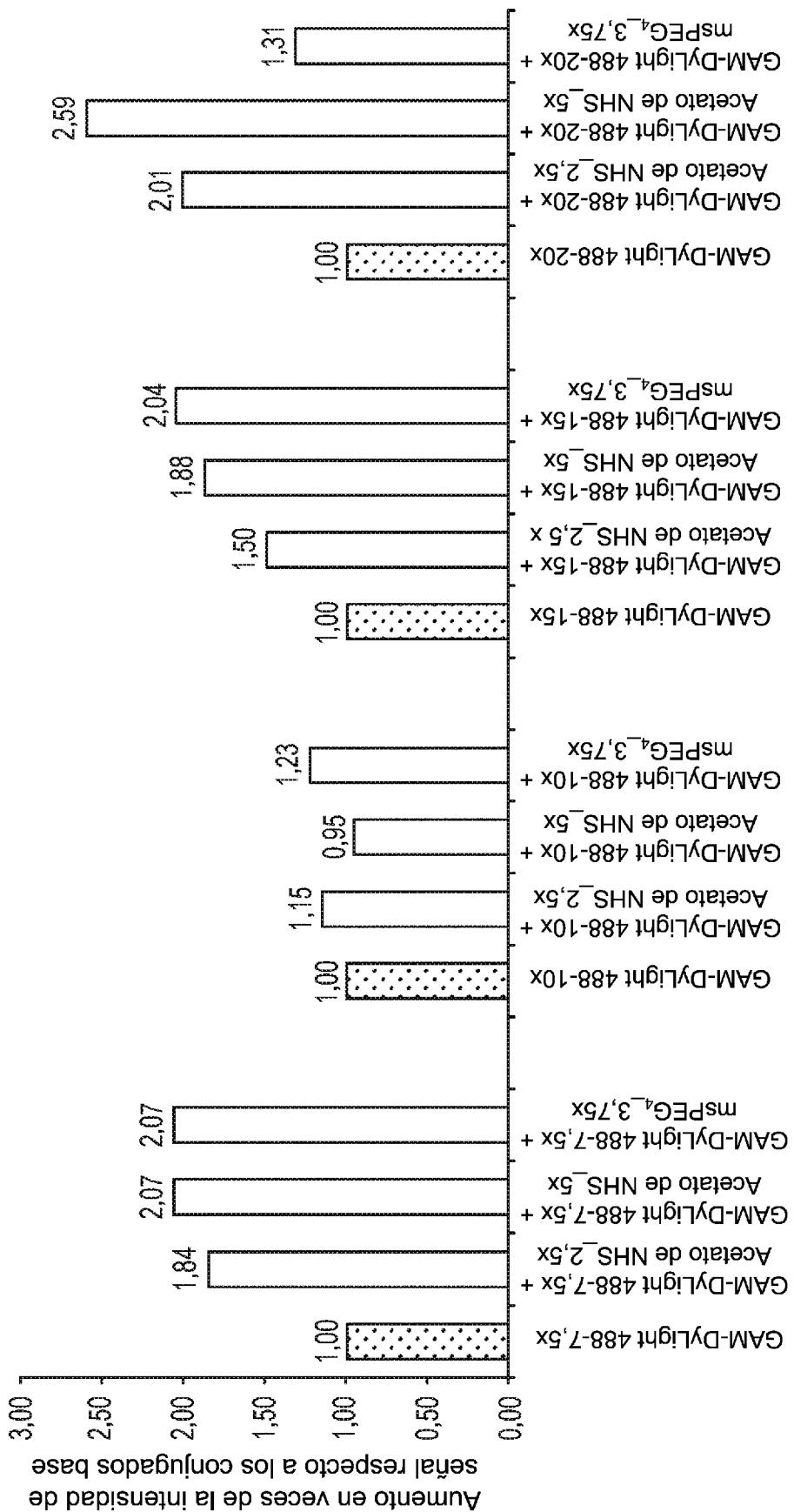
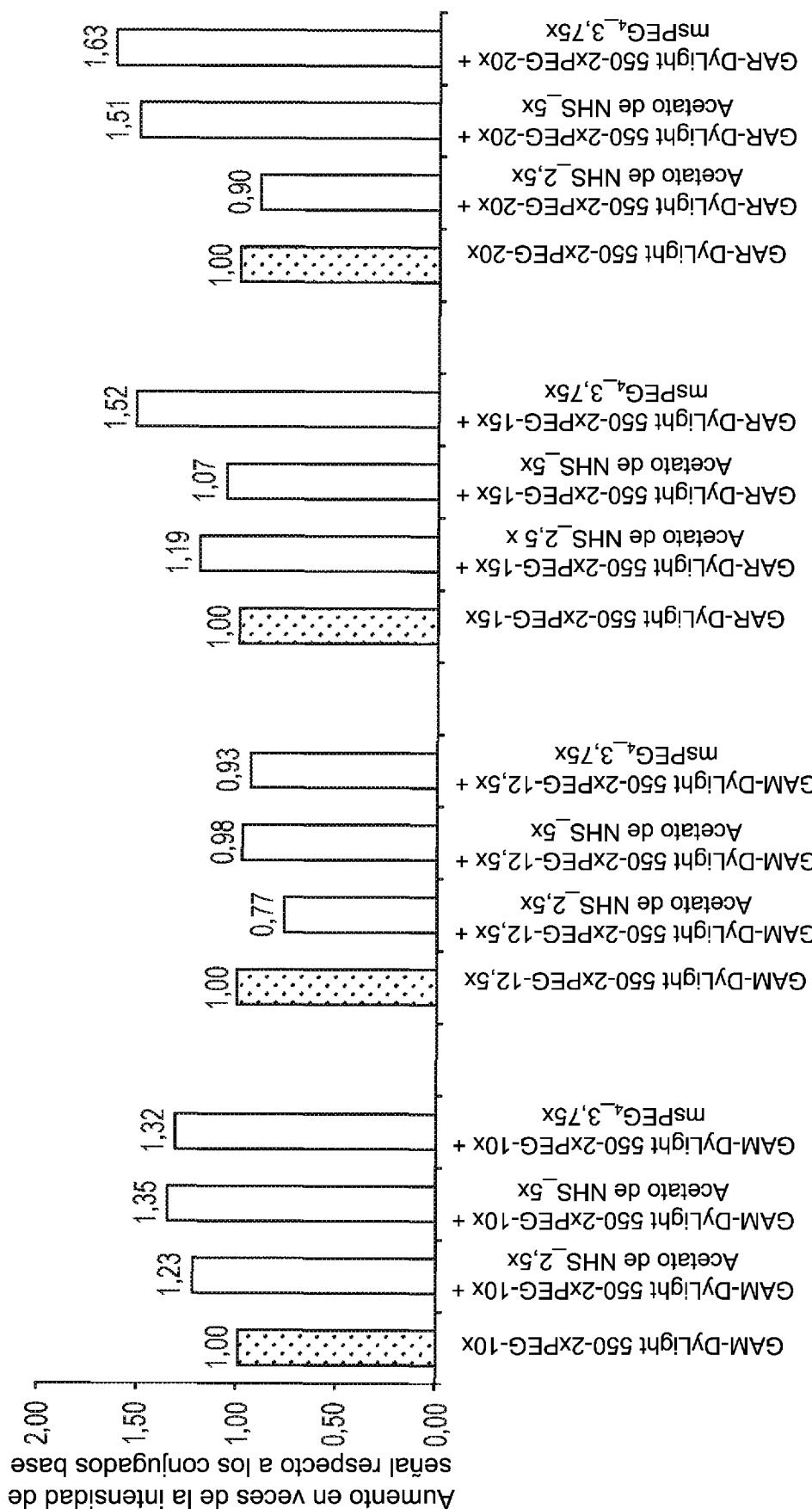


Figura 4

**Figura 5**

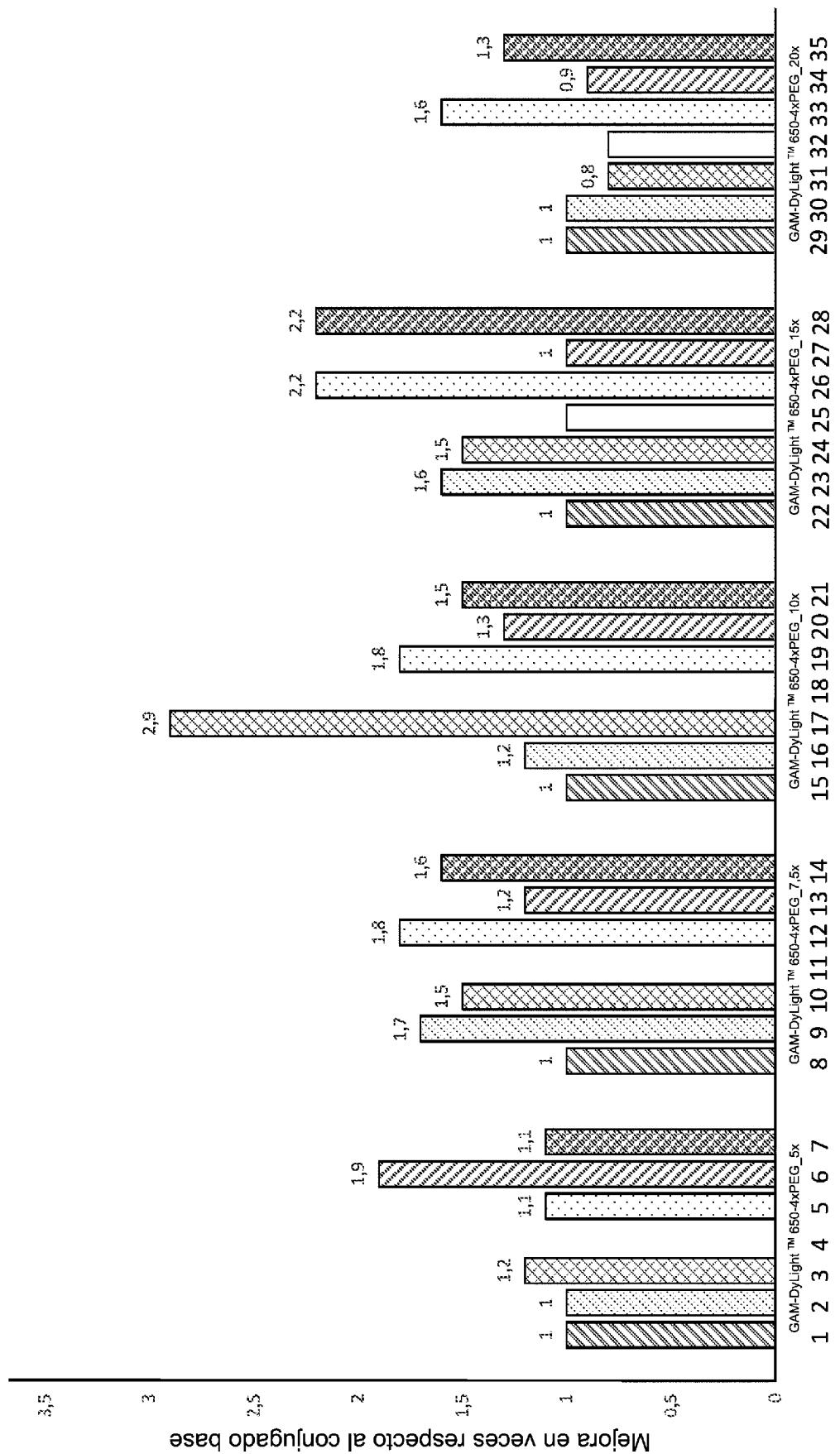
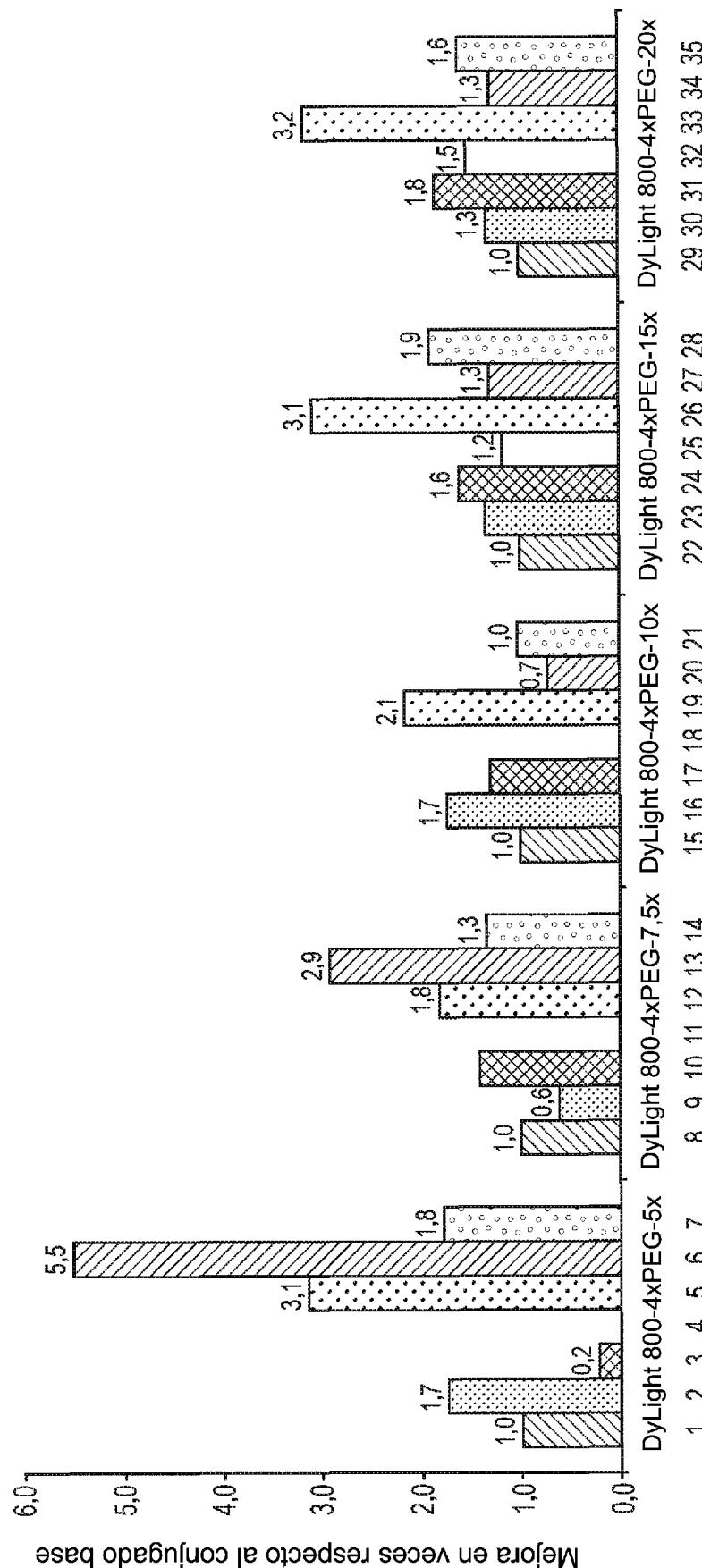
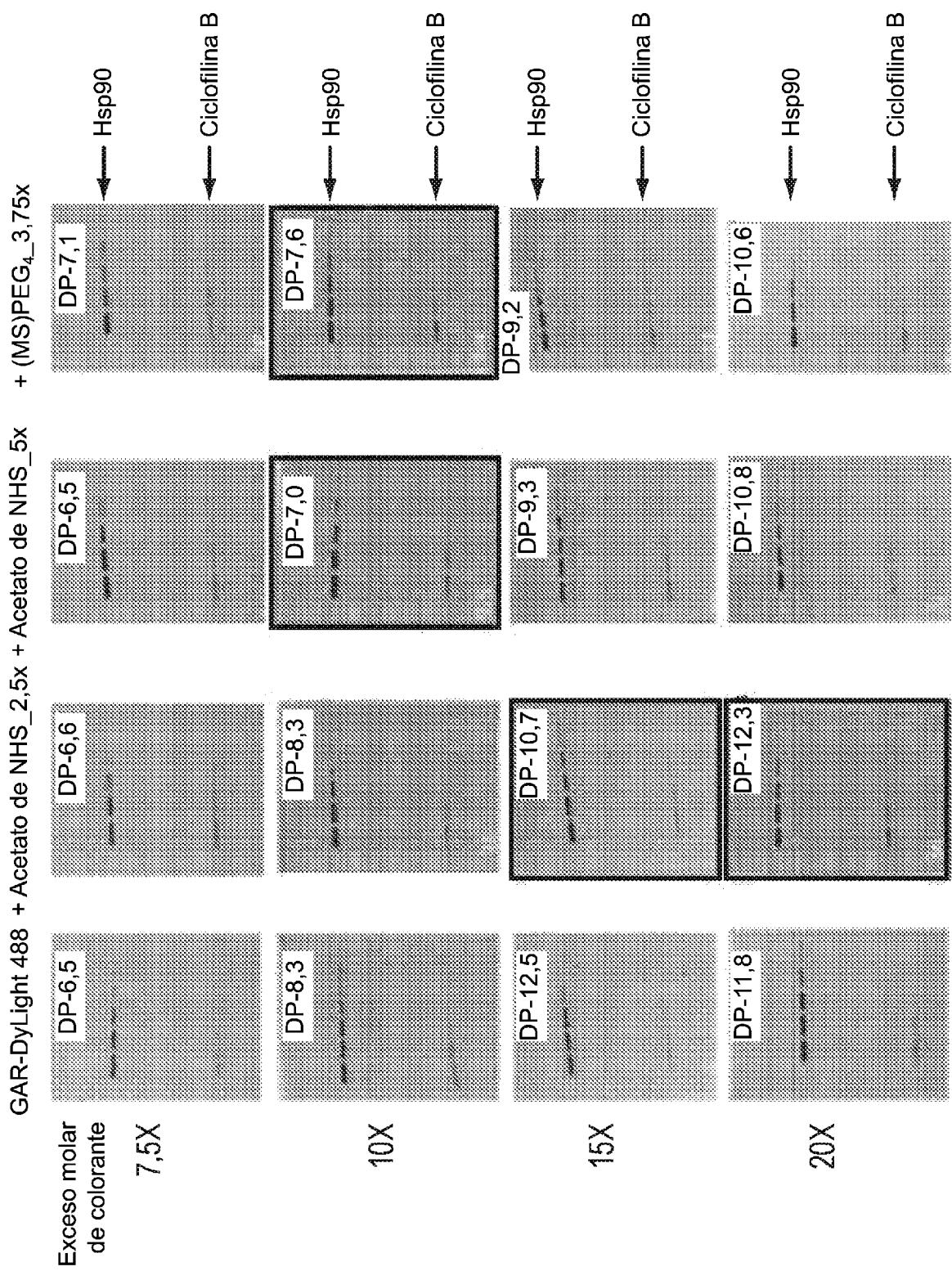
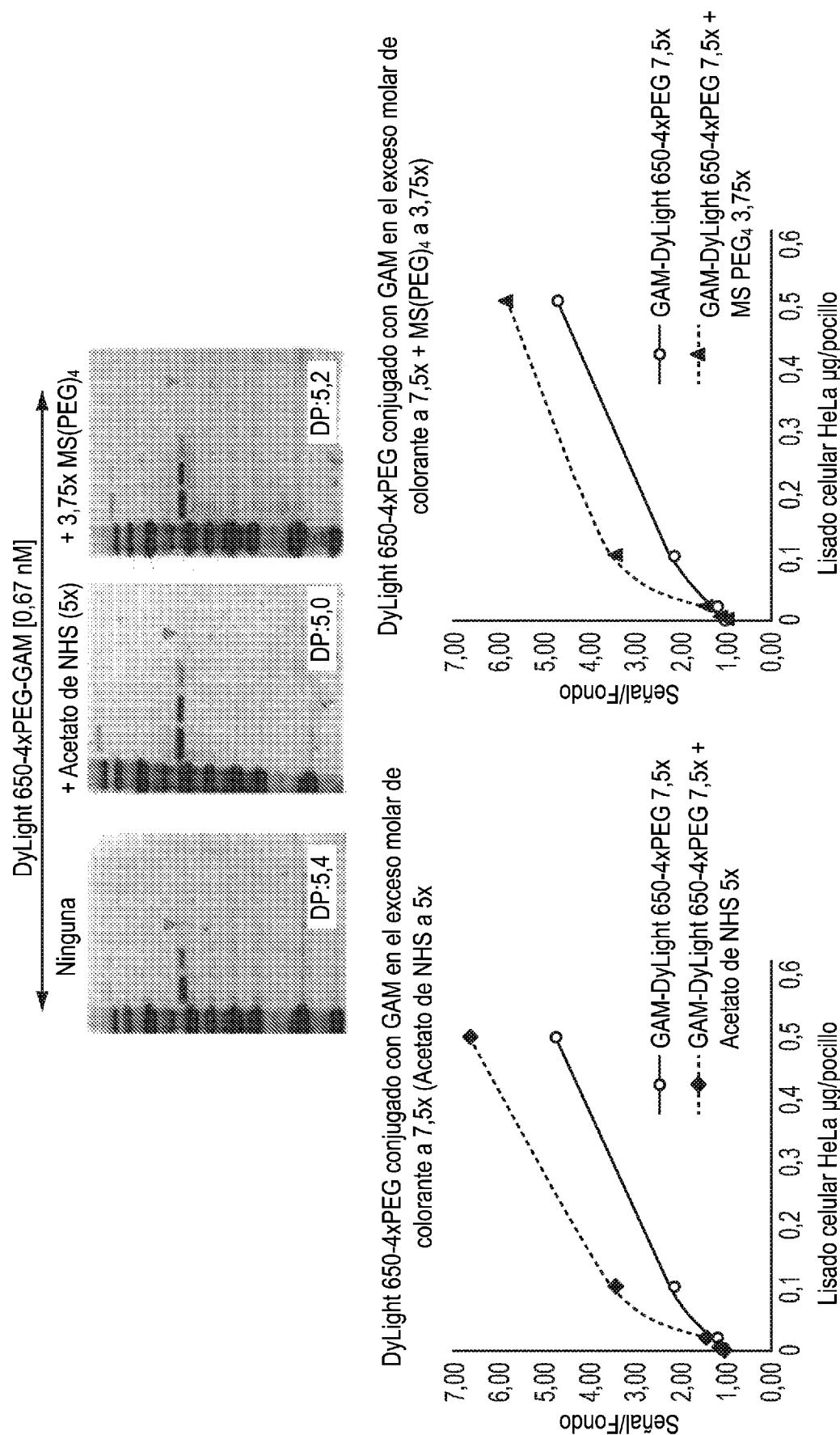
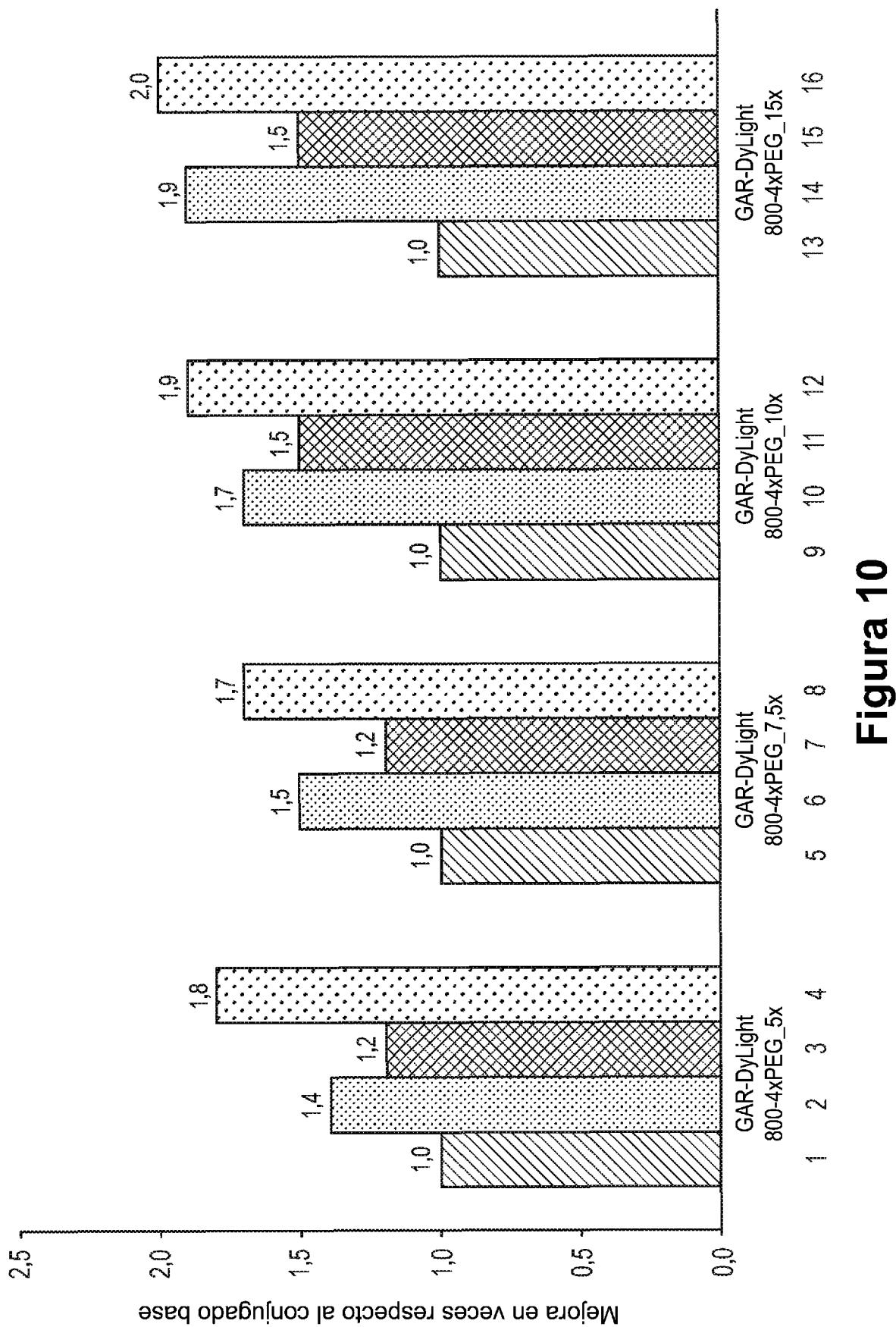


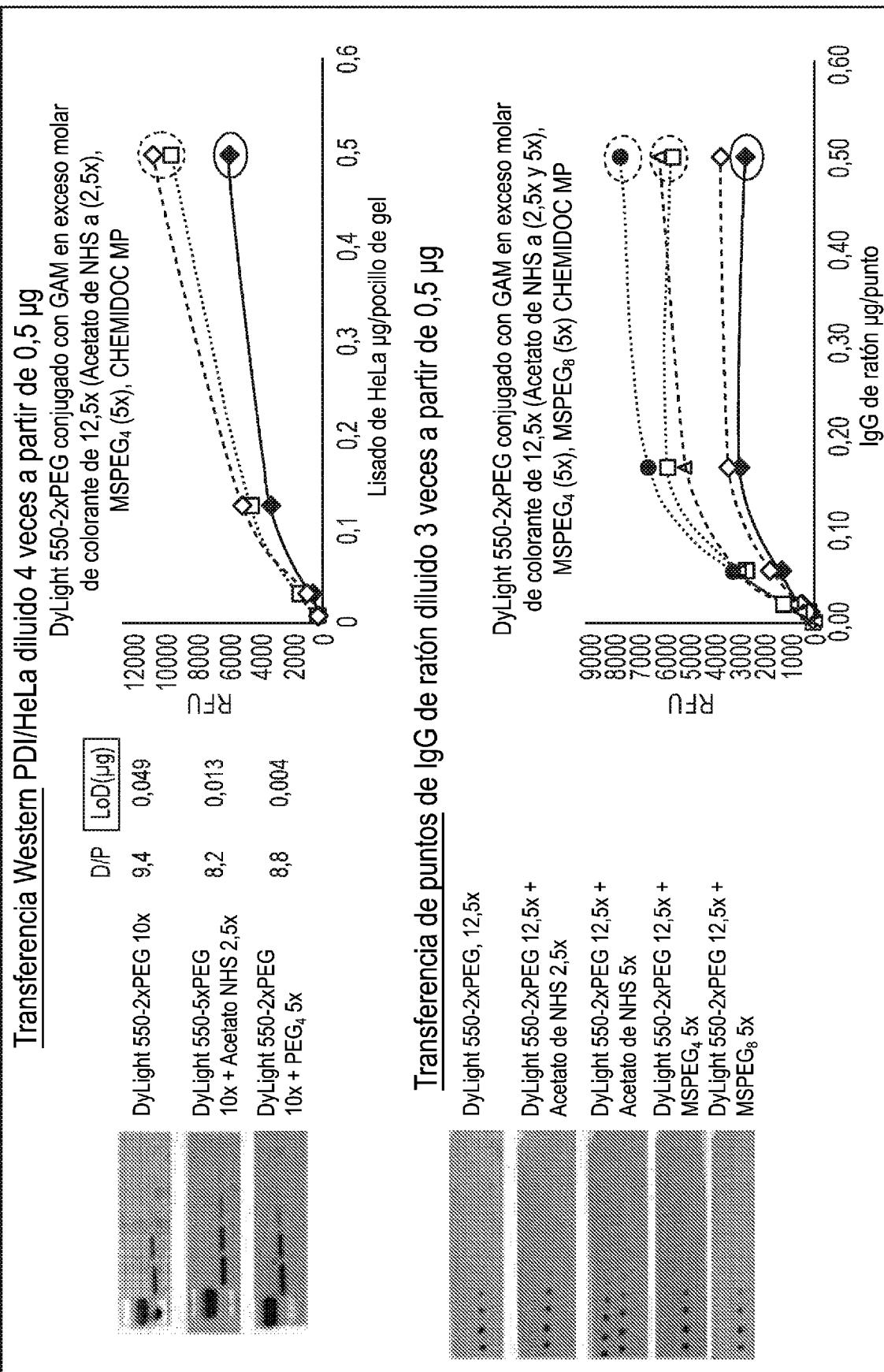
Figura 6

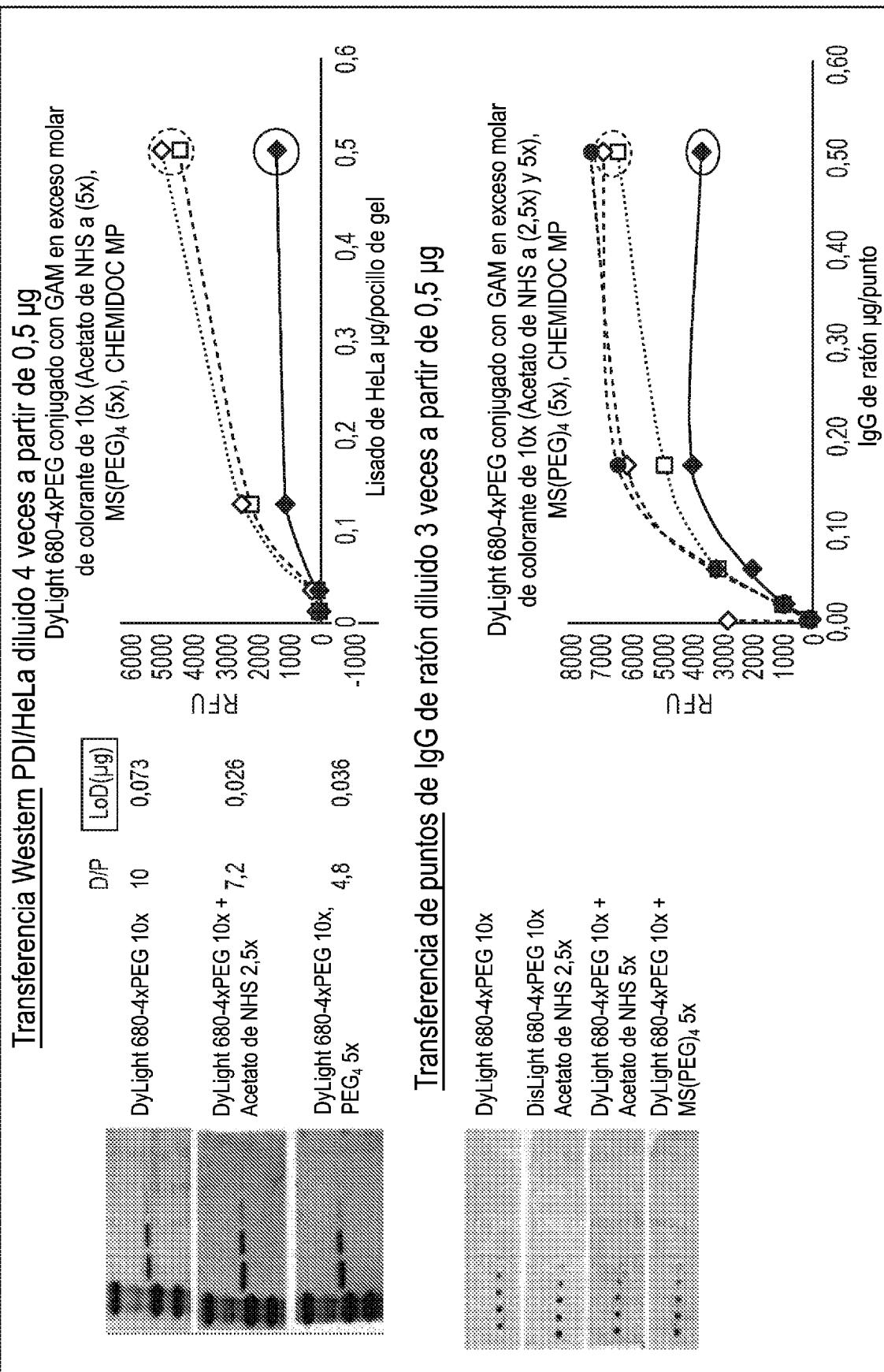
**Figura 7**

**Figura 8**

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**



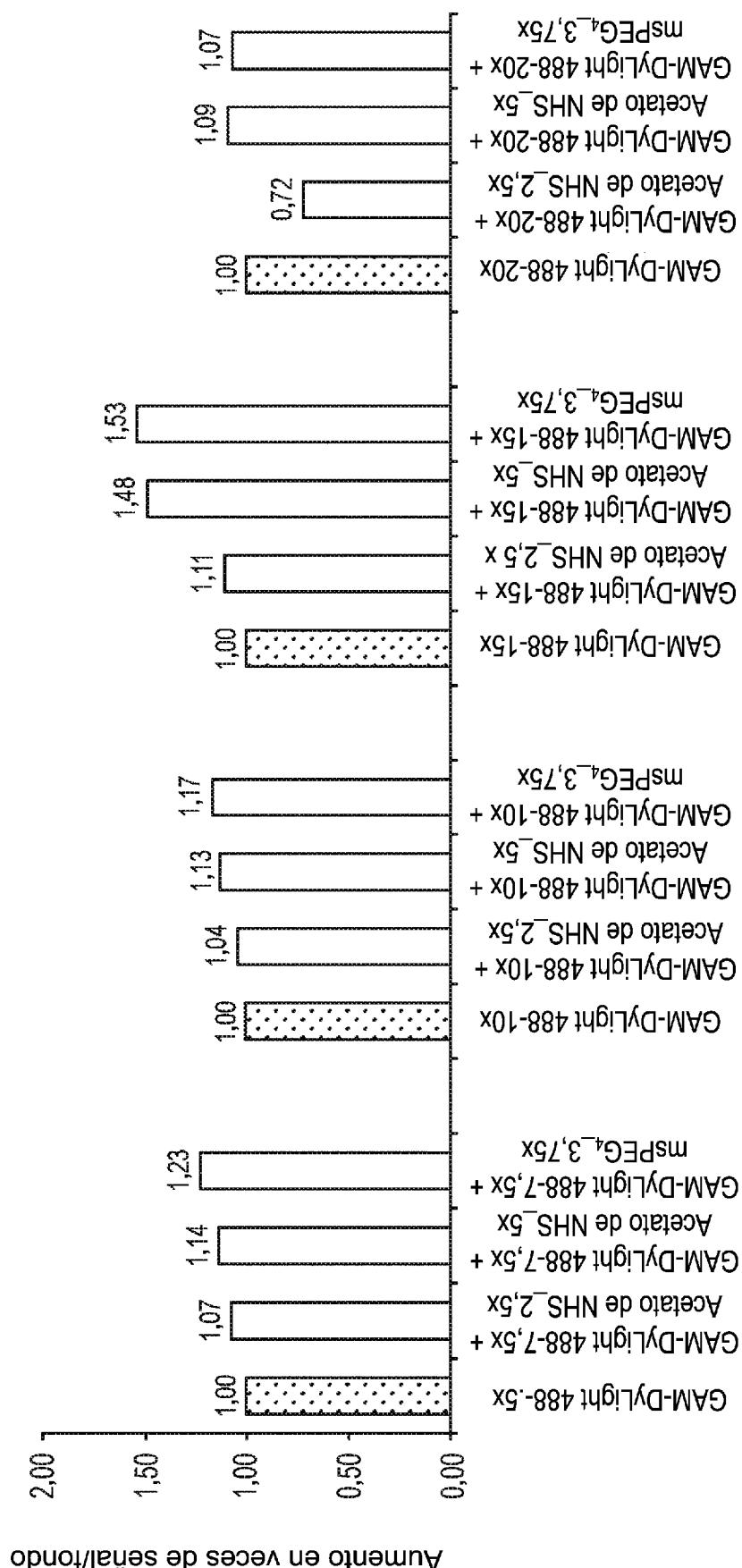
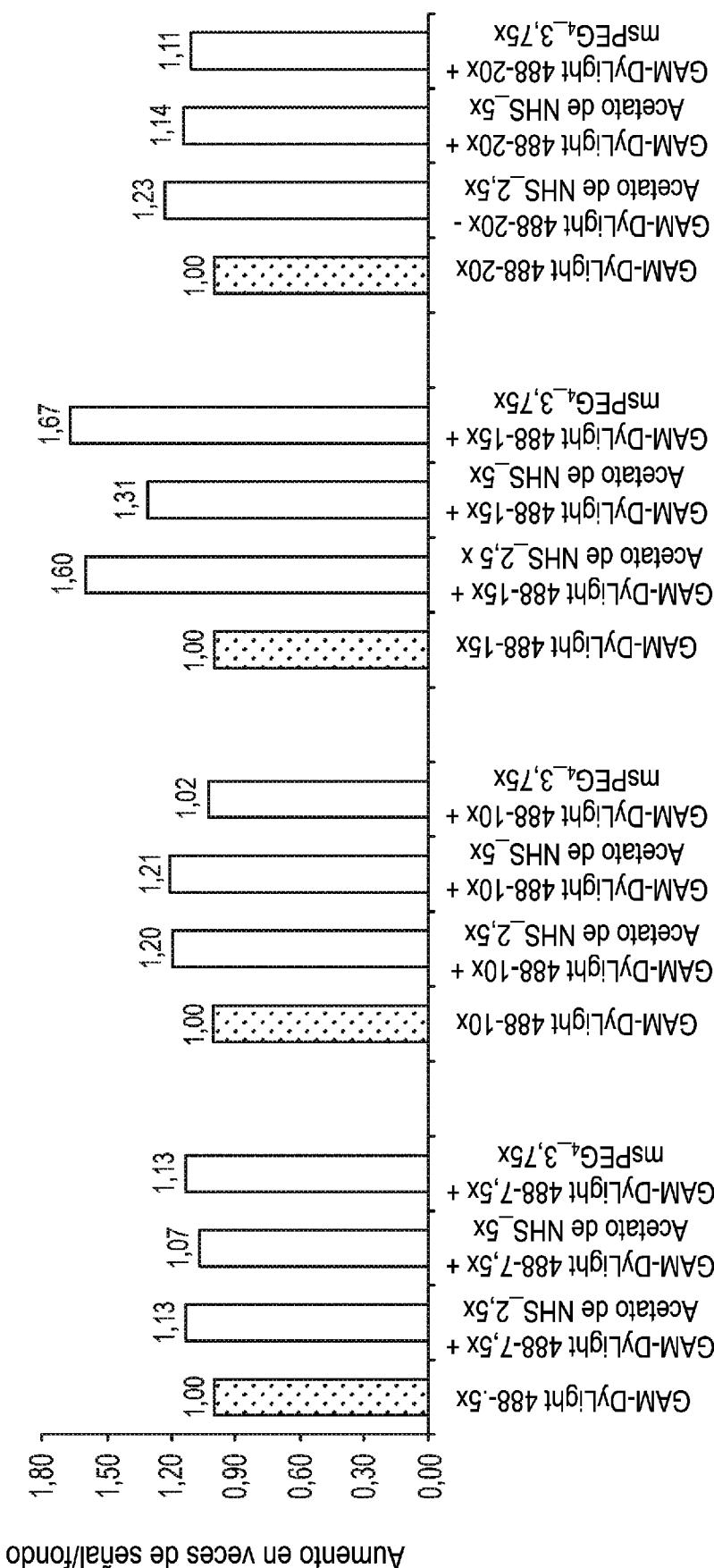
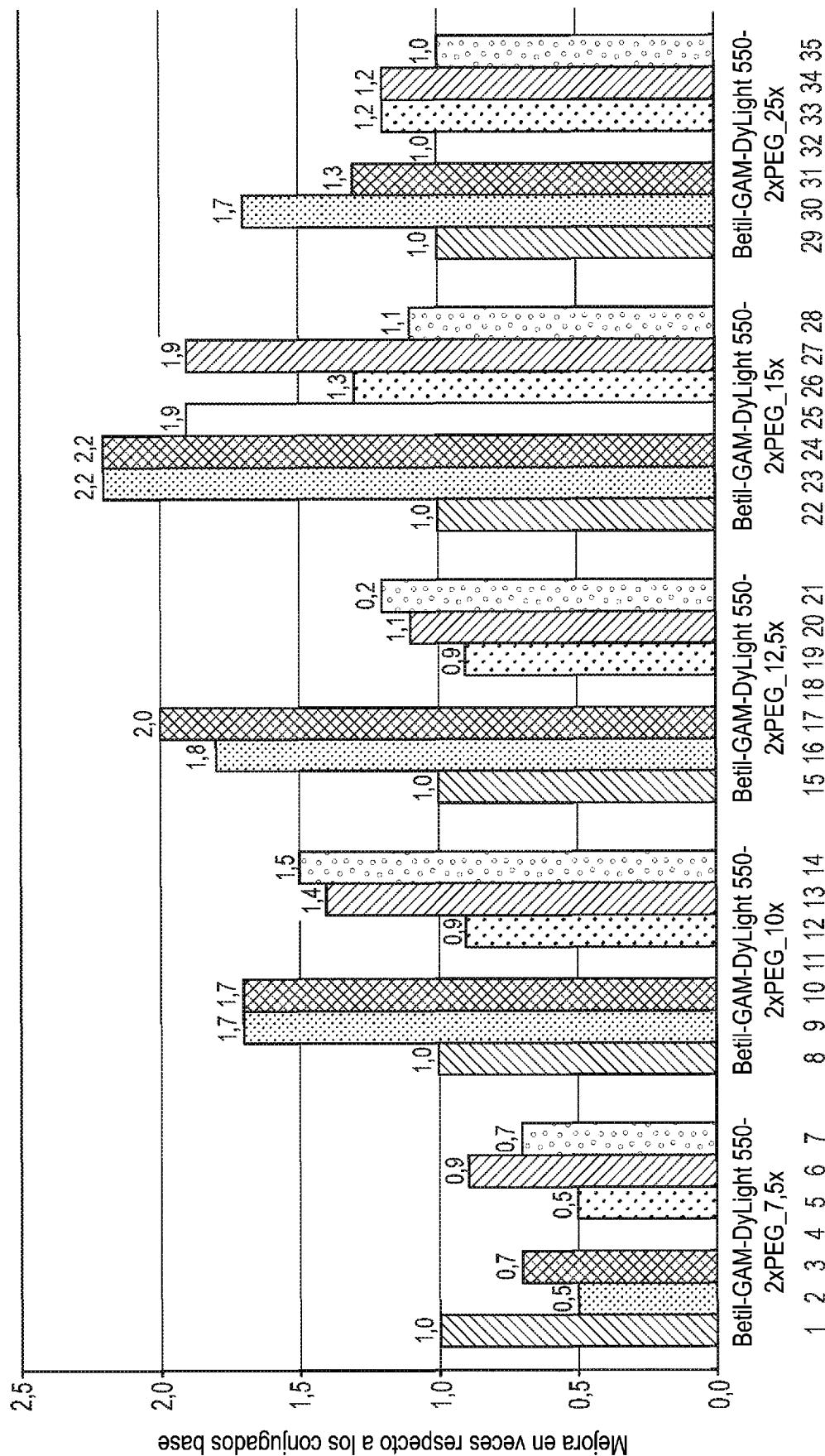
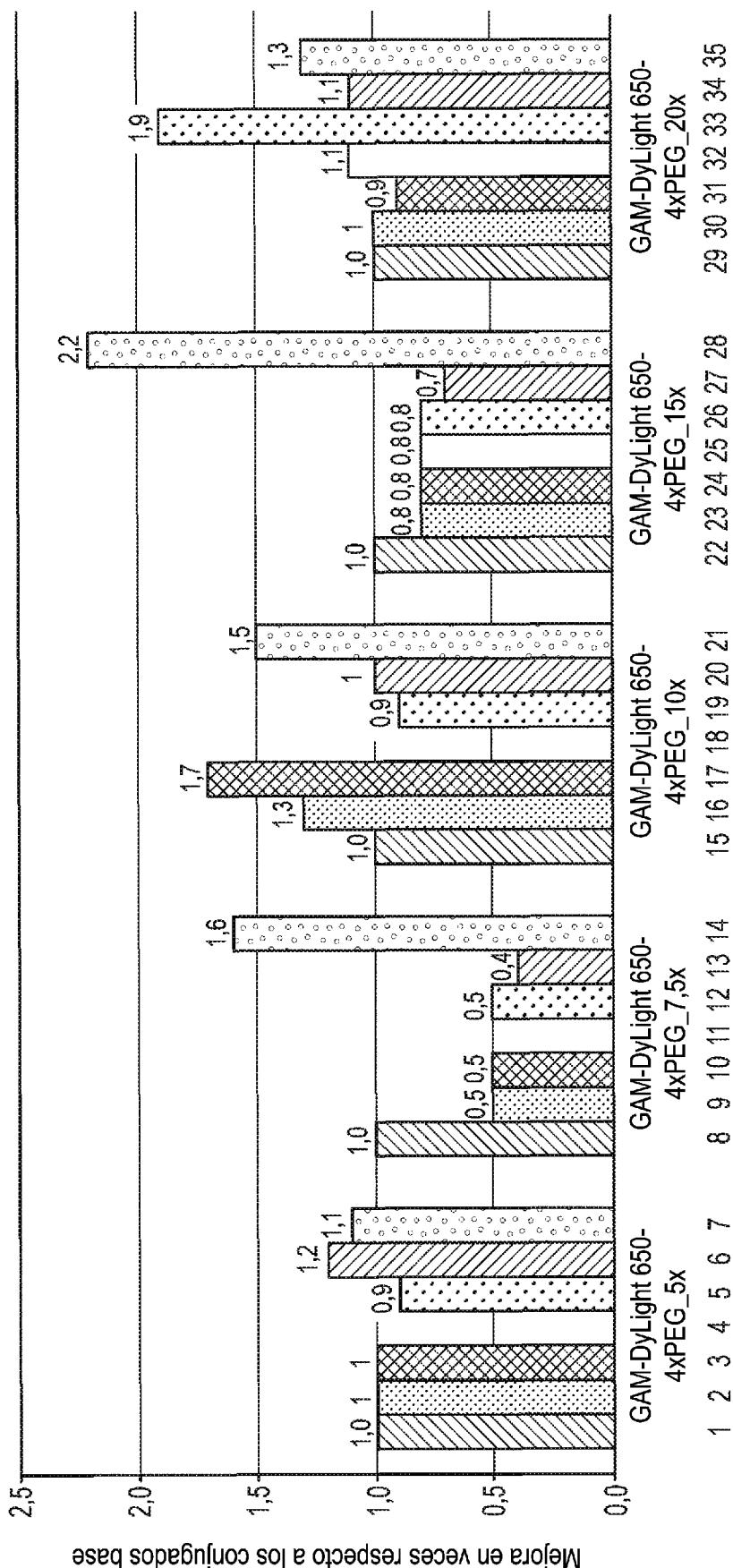
**Figura 13A**

Figura 13B

**Figura 14**

**Figura 15**

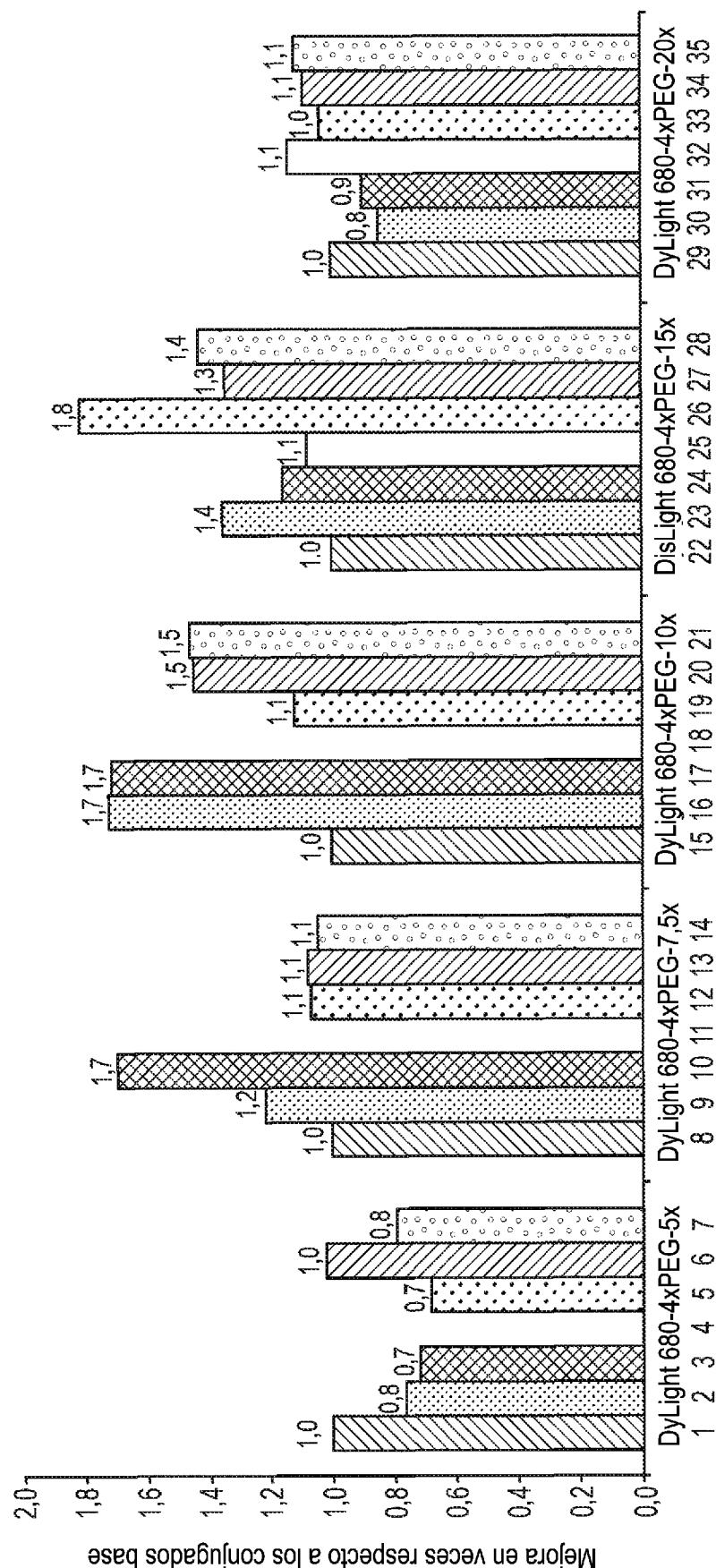


Figura 16

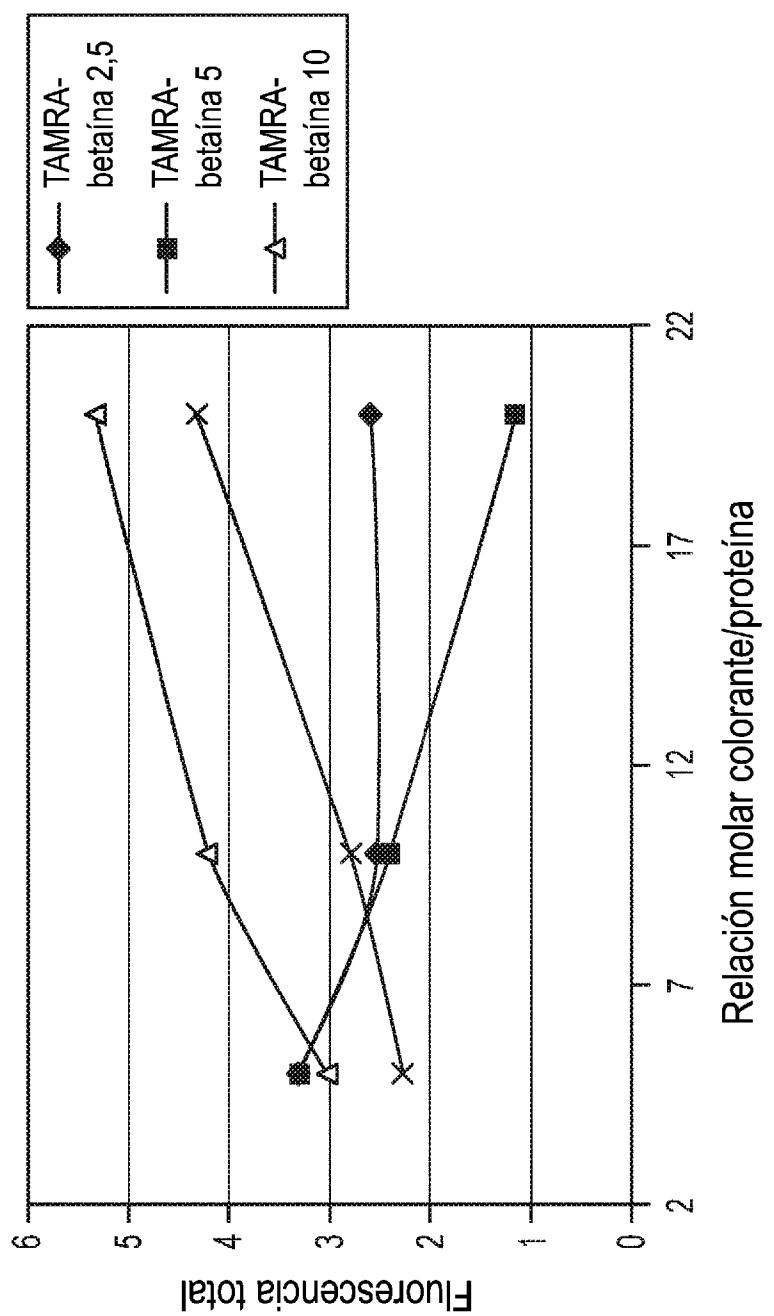
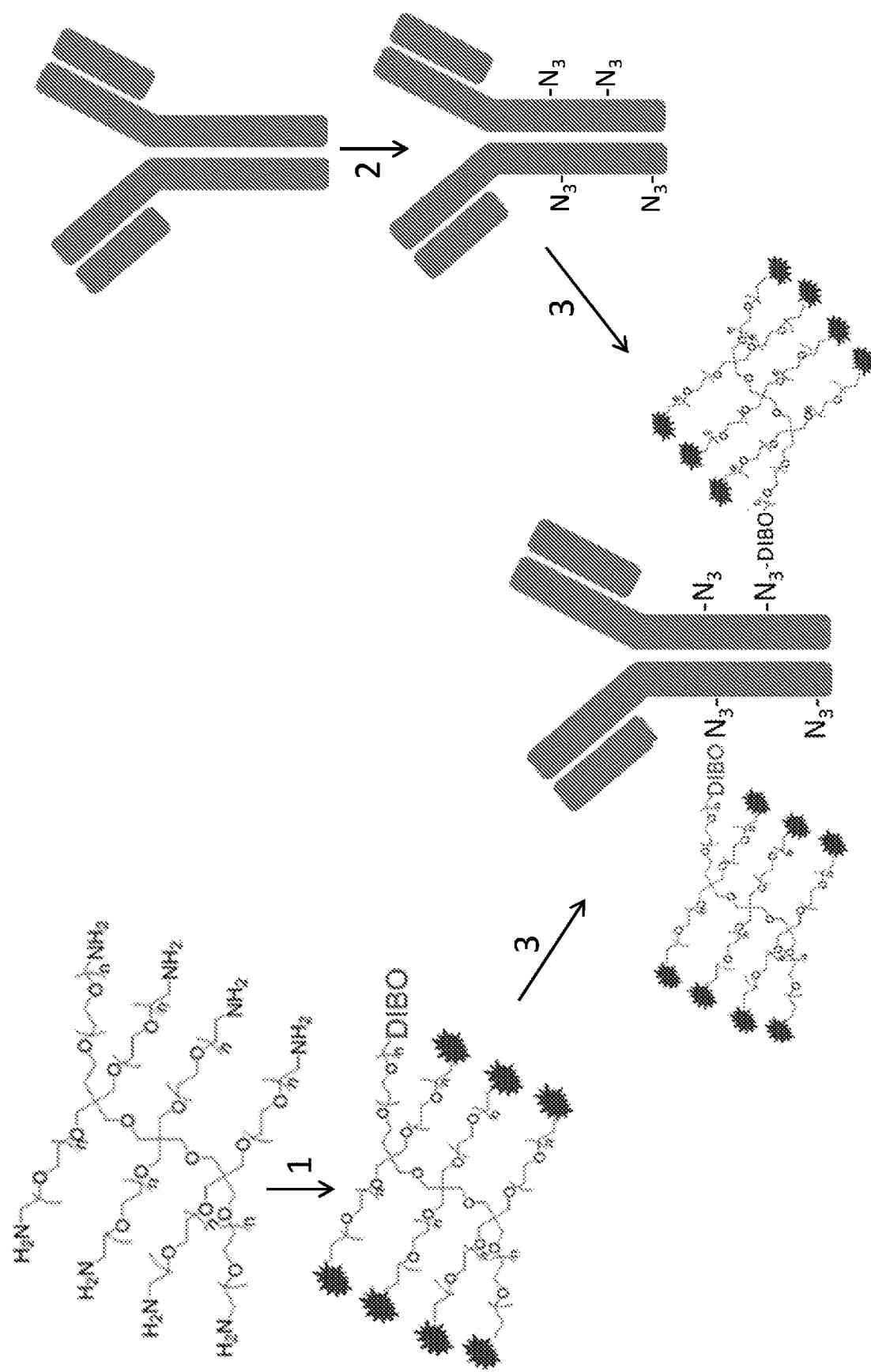


Figura 17

**Figura 18**

Conector de un solo brazo



Conector de múltiples brazos

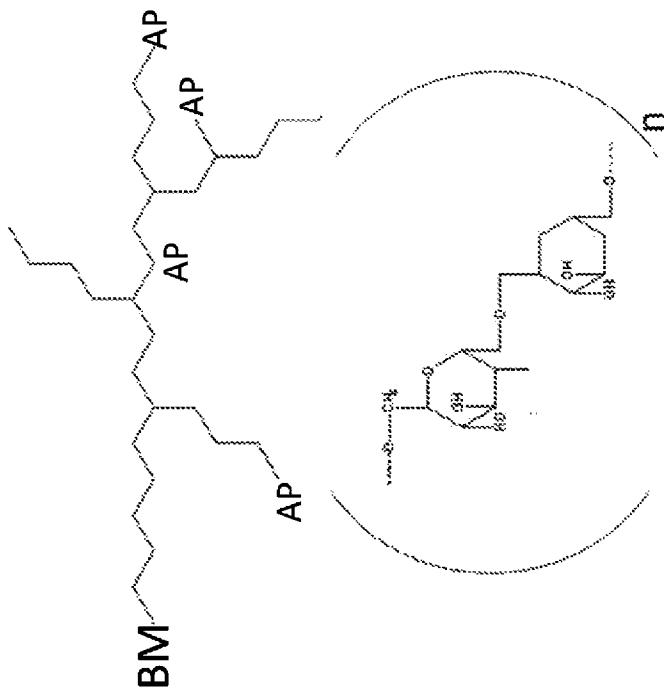


Figura 19

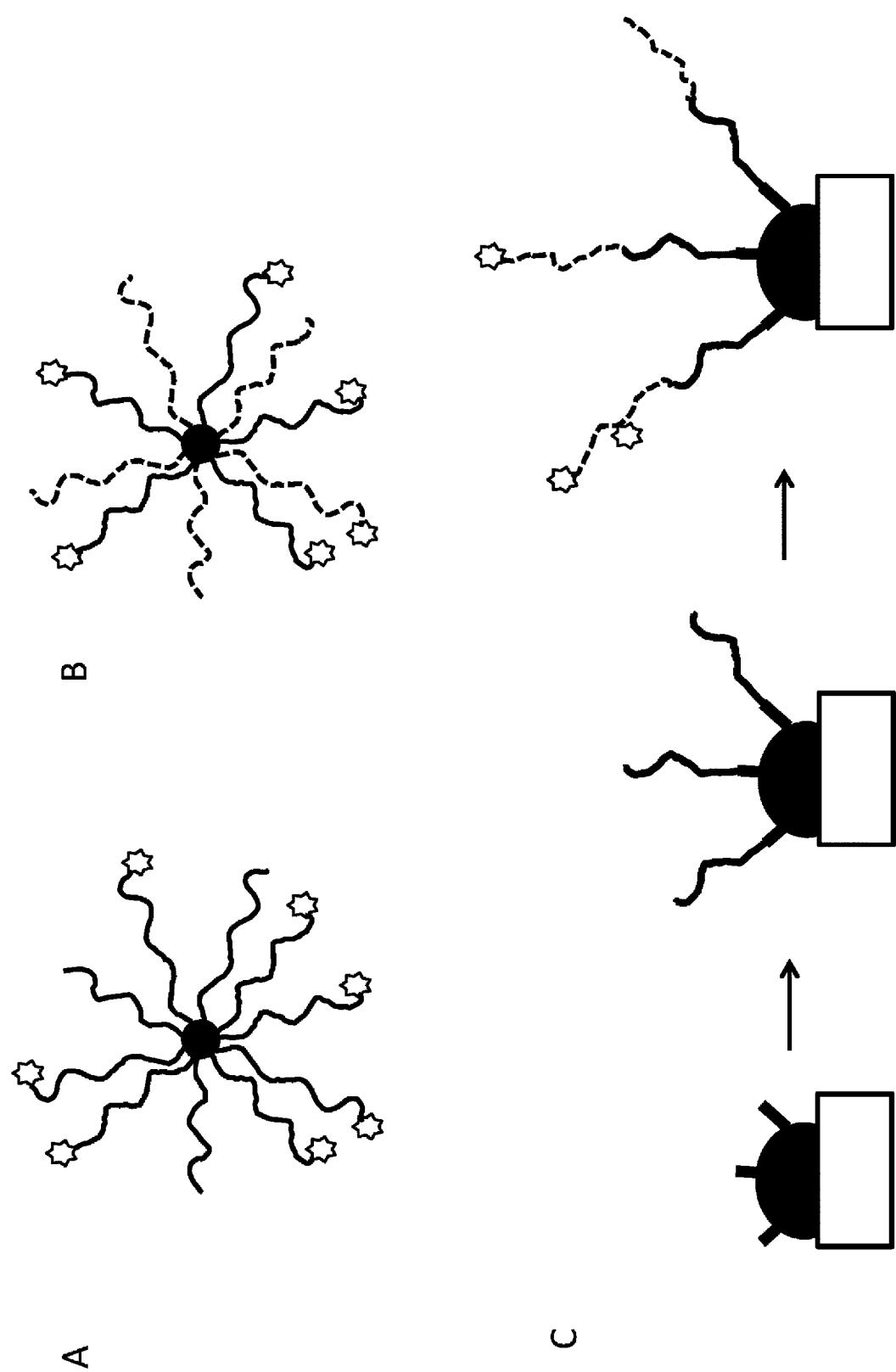


Figura 20

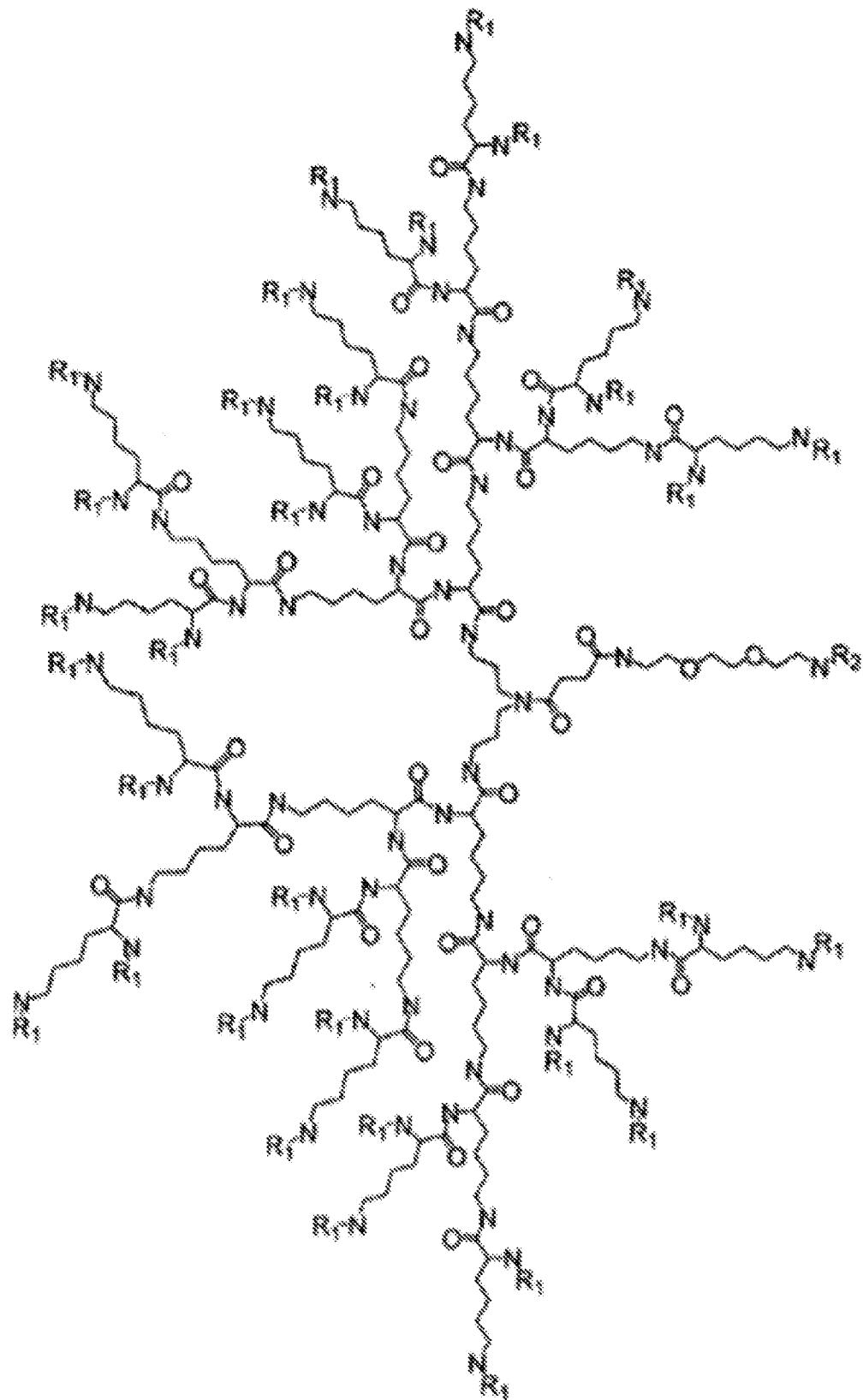
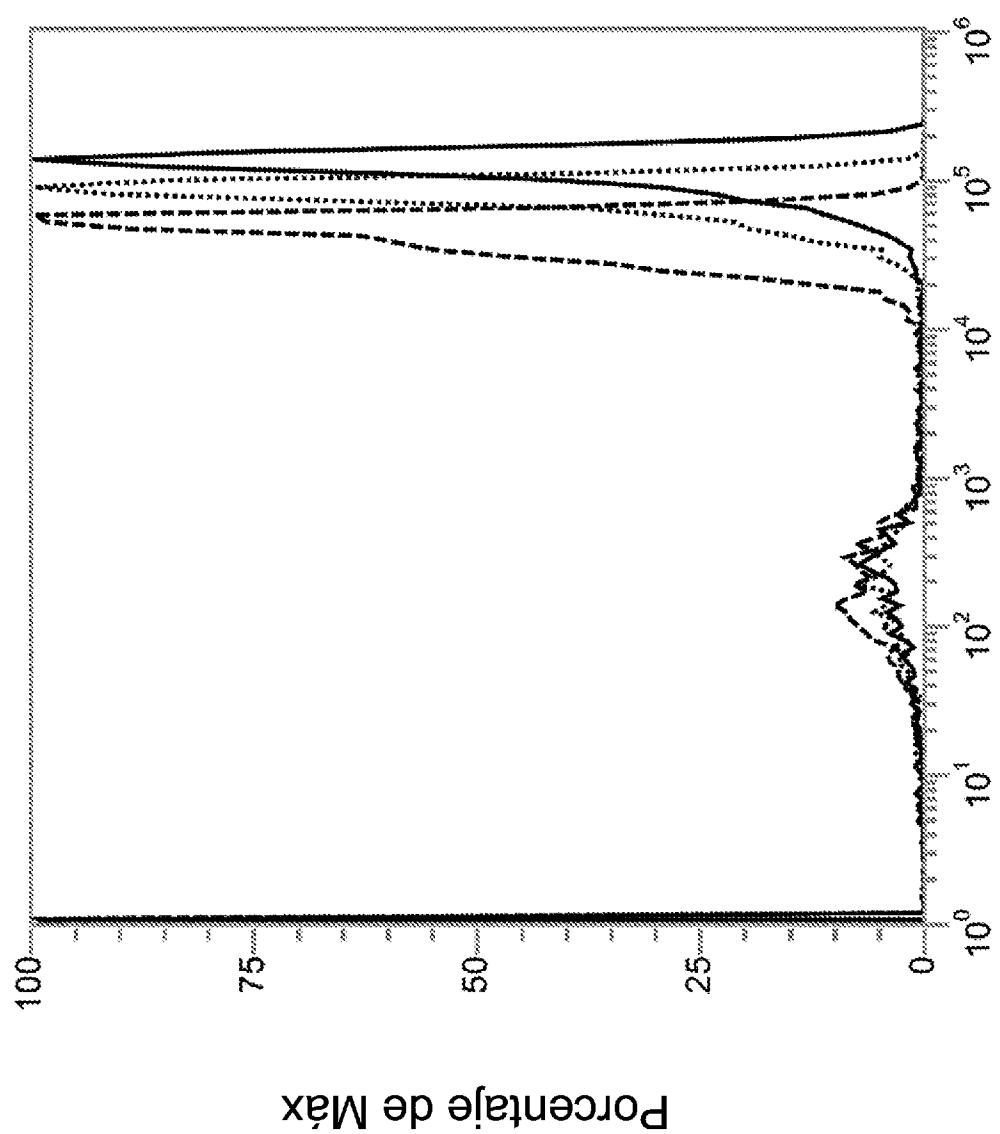
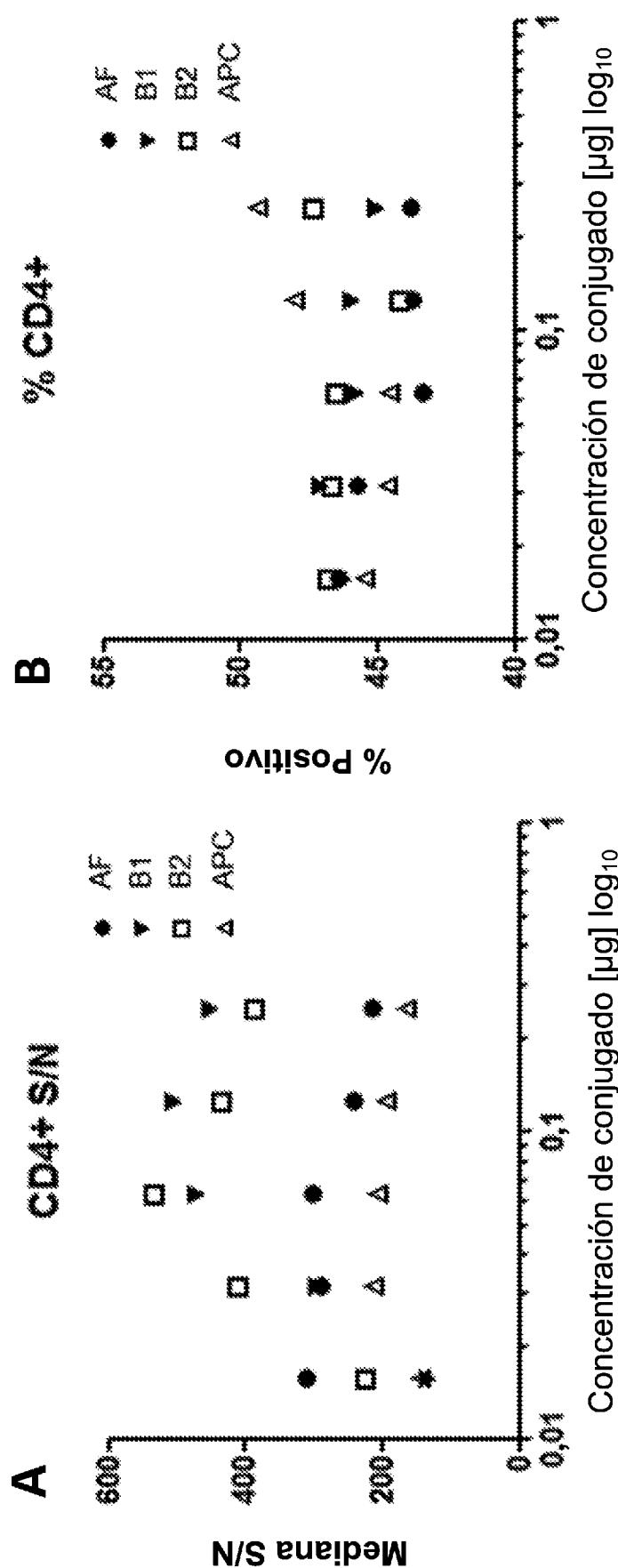


Figura 21



RL1-H

Figura 22

**Figura 23**