



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106415269 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201580024002.7

(22)申请日 2015.05.07

(30)优先权数据

61/990,111 2014.05.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/029762 2015.05.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/171938 EN 2015.11.12

(71)申请人 诺沃迪亚斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·Q·赵 J·J·王 J·V·吴

Z·张

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

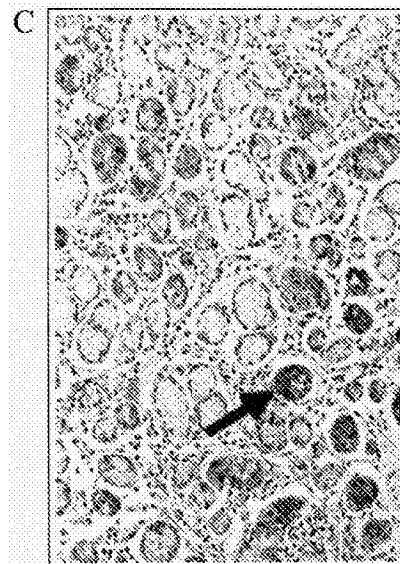
权利要求书2页 说明书36页 附图13页

(54)发明名称

直接免疫组织化学测定

(57)摘要

本申请涉及在组织的直接免疫组织化学测定中使用的抗体,其已经标记有聚酶(多个酶),特别是聚过氧化物酶。在诊断上使用的抗体也可以是在治疗上使用的抗体。



1. 用于检测组织中的目标分析物的方法,其包括:

(a) 使包含所述目标分析物的所述组织与包含含有多个酶分子和识别所述目标分析物的抗体的聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶/抗体缀合物接触以形成包含所述目标分析物和所述聚合的-酶/抗体缀合物的复合体;

(b) 基本上移除不形成所述复合体的所述聚合的-酶/抗体缀合物;

(c) 使所述组织与所述多个酶分子的底物接触,从而检测所述目标分析物。

2. 权利要求1所述的方法,进一步包括在步骤(a)之前的封闭步骤,其中所述封闭步骤包括使所述组织与封闭剂接触。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述组织在包含醛的固定液中固定。

4. 权利要求3所述的方法,其中所述固定液包括福尔马林。

5. 权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述组织被石蜡包埋。

6. 权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述组织是冷冻的组织。

7. 权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述组织是组织切片、临床涂片或培养的细胞或组织。

8. 权利要求7所述的方法,其中所述组织切片选自哺乳动物的如下器官的组织切片:脑、肾上腺、结肠、小肠、胃、心脏、肝脏、皮肤、肾脏、肺、胰腺、睾丸、卵巢、前列腺、子宫、甲状腺和脾脏。

9. 权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述酶分子选自: β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -内酰胺酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、脲酶、尿酸酶、超氧化物歧化酶、荧光素酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、半乳糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶、肠激酶、酪氨酸酶和黄嘌呤氧化酶。

10. 权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述聚合的-酶/抗体缀合物包括每个聚合的-酶/抗体缀合物至少6个酶分子。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述聚合的-酶/抗体缀合物包括每个聚合的-酶/抗体缀合物大约6个和大约80个之间的酶分子。

12. 权利要求1-11中任一项所述的方法,其中步骤(a)在大约15°C和大约37°C之间的孵育温度下进行。

13. 权利要求1-12中任一项所述的方法,其中步骤(a)进行大约3分钟和大约30分钟之间的孵育周期。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述孵育周期在大约5分钟和大约15分钟之间。

15. 权利要求2所述的方法,其中所述封闭剂包括脱脂乳、BSA、冷的鱼皮明胶、酪蛋白或动物血清。

16. 制造聚合的-酶/抗体缀合物的方法,其包括:

(a) 将包含多个酶分子的聚合的-酶缀合至抗体。

17. 权利要求16所述的方法,其中所述抗体是治疗性抗体。

18. 利用试剂治疗患有疾病的个体的方法,其包括a) 使用根据权利要求1-17中任一项所述的方法的包含缀合至识别目标分析物的抗体的多个酶分子的聚合的-酶/抗体缀合物检测所述目标分析物的存在。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述试剂是治疗性抗体。

20. 权利要求19所述的方法,其中特异性地结合所述目标分析物的所述抗体和所述治疗性抗体是相同的。

21. 聚合的-酶/抗体缀合物,其包括多个酶分子和治疗性抗体。

22. 试剂盒,其包括

(a) 权利要求21所述的聚合的-酶/抗体缀合物。

23. 权利要求22所述的试剂盒,进一步包括所述多个酶分子的底物。

24. 权利要求22或23所述的试剂盒,进一步包括根据权利要求1-20中任一项的使用说明书。

直接免疫组织化学测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年5月8日提交的题目为快速免疫组织化学测定(RAPID IMMUNOHISTOCHEMISTRY ASSAY)的美国临时序列号61/990,111的优先权,其在此出于所有目的通过引用以其全部并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于组织的直接免疫组织化学染色的组合物、方法和试剂盒以及其用途。

背景技术

[0004] 在外科手术期间经常地可以将组织活检样本从患者移出并且从手术室送至病理实验室进行分析——例如,通过冷冻组织切片诊断。用于冷冻组织切片诊断的方法学可以由以下步骤组成:在病理实验室中冷冻组织,对冷冻组织进行切片和进行标准苏木精和伊红(H/E)染色。H/E染色是用于帮助医学病理学家诊断组织病理的通用技术。但是,H/E染色具有许多限制,其包括,例如,其非特异性地对组织染色并且也不能识别组织中的特异性蛋白。识别组织中的特异性蛋白——例如,通过使用有时被称为免疫组织化学(IHC)的过程——可以帮助病理学家在术中(intraoperatively)诊断多种组织病理。实例可以包括警戒淋巴结(sentinel lymph node)活检(用于潜在的转移癌和黑素瘤)、未分化的肿瘤(潜在的癌、淋巴瘤和黑素瘤)、和边缘的活检(观察切除组织的边界以确定是否整个肿瘤已被移除)。

[0005] 组织切片的免疫组织化学染色是评估异形组织中蛋白质的存在、或其缺乏和改变的可靠方法。通常地,IHC技术利用抗体来原位探测和显现细胞抗原。由于蛋白质在组织中通常弥散分布,需要信号放大以显现细胞抗原。用于信号放大的技术包括,例如,使用与对细胞抗原特异性的一次抗体结合的二次抗体和生物素-抗生物素蛋白系统。二次抗体或生物素-抗生物素蛋白信号放大系统上的显色或荧光部分用于检测细胞抗原的存在。IHC技术是有优势的,因为它避免了不需要的解聚作用并且使得在形态学的背景下评估单个细胞。而且,目标蛋白不由冷冻过程改变,并且因而IHC具有作为用于对切除组织进行术中病理学分析的工具的潜能。

[0006] 但是,当前的IHC技术可能需要60到120分钟来获得结果。术中指导方针——比如由美国病理学家学会(College of American Pathologists)提供的那些——通常推荐在大约20分钟内向外科医生报告病理数据。因此,当前的IHC技术太耗时了而不能用作术中工具。而且,当前的IHC技术可能隐匿(harbor)由使用的信号放大技术引起的假象,例如,二次抗体的非特异性结合或者存在内源性生物素。因此,存在对于改进的IHC技术的需要。

[0007] IHC技术还用于组织的回顾性分析。大多数病理学样本不被制备为冷冻组织,而是被福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)以允许归档存储并在后来的时间进行组织学分析。由于石蜡包埋的样本广泛地可用于回顾性研究,因此对于来自这样的样本的蛋白质的定量检测

而言,需要快速和可靠的方法。

[0008] 用于对来自冷冻和石蜡包埋的组织的蛋白质进行定量的组合物和方法对于研究肿瘤组织中的蛋白质表达是尤其需要的。例如,某些受体或酶的表达水平可以指示具体处理的成功可能性。因此,在本领域中还存在对能够快速检测抗原比如肿瘤抗原的灵敏的和定量的IHC方法的需要。

发明内容

[0009] 本文提供了用于检测组织样本中目标分析物存在或不存在的方法、组合物和试剂盒。

[0010] 本文提供了用于检测组织中的目标分析物的方法,其包括:

[0011] 使包含目标分析物的组织与包含含有多个酶分子和识别目标分析物的抗体的聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶/抗体缀合物接触,以形成包含目标分析物和聚合的-酶/抗体缀合物的复合物;基本上移除不形成复合体的聚合的-酶/抗体缀合物;并使组织与多个酶分子的底物接触,从而检测目标分析物。在一些实施方式中,组织是冷冻组织。

[0012] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,方法进一步包括封闭步骤,然后进行如下步骤:使包含目标分析物的组织与包含含有多个酶分子和识别目标分析物的抗体的聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶/抗体缀合物接触,以形成包含目标分析物和聚合的-酶/抗体缀合物的复合物;其中封闭步骤包括使组织与封闭剂接触。在一些实施方式中,组织是冷冻组织。在一些实施方式中,封闭剂包括脱脂乳、BSA、冷的鱼皮明胶、酪蛋白或动物血清。

[0013] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,组织在包含醛的固定液中固定。

[0014] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,固定液包括福尔马林。

[0015] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,组织是石蜡包埋的。

[0016] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,组织是组织切片、临床涂片、或培养的细胞或组织。在一些实施方式中,组织切片选自哺乳动物的如下器官的组织切片:脑、肾上腺、结肠、小肠、胃、心脏、肝脏、皮肤、肾脏、肺、胰腺、睾丸、卵巢、前列腺、子宫、甲状腺和脾脏。

[0017] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,酶分子选自: β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -内酰胺酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、脲酶、尿酸酶、超氧化物歧化酶、荧光素酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、半乳糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶、肠激酶、酪氨酸酶和黄嘌呤氧化酶。

[0018] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括每个聚合的-酶/抗体缀合物至少6个酶分子。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括每个聚合的-酶/抗体缀合物大约6个和大约80个之间的酶分子。

[0019] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,使包含目标分析物的组织与包含含有多个酶分子和识别目标分析物的抗体的聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶/抗体缀合物接触以形成包含目标分析物和聚合的-酶/抗体缀合物的复合体的步骤在大

约15°C和大约37°C之间的孵育温度下进行。

[0020] 在根据(或如应用于)上述任何实施方式的一些实施方式中,使包含目标分析物的组织与包含含有多个酶分子和识别目标分析物的抗体的聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶/抗体缀合物接触以形成包含目标分析物和聚合的-酶/抗体缀合物的复合体的步骤进行大约3分钟和大约30分钟之间的孵育周期。在一些实施方式中,孵育周期在大约5分钟和大约15分钟之间。

[0021] 本文提供了制造聚合的-酶/抗体缀合物的方法,其包括:将包含多个酶分子的聚合的-酶缀合至抗体。在一些实施方式中,抗体是治疗性抗体。

[0022] 本文提供了利用试剂治疗患有疾病的个体的方法,其包括使用根据(或如应用于)上述任何实施方式的包含缀合至识别目标分析物的抗体的多个酶分子的聚合的-酶/抗体缀合物检测目标分析物的存在。在一些实施方式中,试剂是治疗性抗体。在一些实施方式中,特异性地结合目标分析物的抗体和治疗性抗体是相同的。

[0023] 本文提供了包含多个酶分子和治疗性抗体的聚合的-酶/抗体缀合物。还提供了包含根据上述任何实施方式的聚合的-酶/抗体缀合物的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒进一步包括多个酶分子的底物。在一些实施方式中,试剂盒进一步包括根据上述任何实施方式的使用说明书。

[0024] 通过引用的并入

[0025] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以及与每个单个出版物、专利或专利申请被具体地或单独地指示为通过引用并入的相同程度通过引用并入本文。

附图说明

[0026] 本发明的新的特征在所附权利要求书中具体地提出。通过参考提出说明性实施方式——在其中利用了本发明的原理——的下述具体实施方式和附图获得将更好地理解本发明的特征和优势,所述附图如下:

[0027] 图1示出了使用聚HRP抗Ck8/18抗体缀合物对冷冻的人淋巴结组织直接IHC染色的代表性图像。图1A描绘了冷冻的人淋巴结组织的直接免疫组织化学染色的结果(100X)。淋巴结包含转移性乳腺导管癌。转移性癌细胞直接地被HRP聚合物标记的小鼠抗人低分子量角蛋白单克隆抗体(CK8/18,克隆C94)染色;并且直接免疫组织化学染色的孵育时间为在室温下3分钟。图1B示出了组织的200X放大倍数。示例性染色的区域由箭头指示。

[0028] 图2示出了使用聚HRP抗Ck8/18抗体缀合物对冷冻的人淋巴结组织直接IHC染色的代表性图像。图2A描绘了冷冻的人淋巴结组织的直接免疫组织化学染色的结果(100X)。淋巴结包含转移性乳腺导管癌。转移性癌细胞直接地被Novodiax HRP聚合物标记的小鼠抗人低分子量角蛋白单克隆抗体(CK8/18,克隆C94)染色;并且直接免疫组织化学染色的孵育时间为在室温下5分钟。图2B示出了组织的200X放大倍数。示例性染色的区域由箭头指示。

[0029] 图3示出了使用聚HRP抗Ck8/18抗体缀合物对冷冻的人淋巴结组织直接IHC染色的代表性图像。图3A描绘了冷冻的人淋巴结组织的直接免疫组织化学染色的结果(100X)。淋巴结包含转移性乳腺导管癌。转移性癌细胞直接地被HRP聚合物标记的小鼠抗人低分子量角蛋白单克隆抗体(CK8/18,克隆C94)染色;并且直接免疫组织化学染色的孵育时间为在室温下8分钟。图3B示出了组织的200X放大倍数。示例性染色的区域由箭头指示。

[0030] 图4示出了H/E染色的代表性图像。图4A描绘了冷冻的切片组织的H/E染色载玻片, 10X放大倍数。组织是包含转移性乳腺导管癌的腋淋巴结。大多数淋巴组织被肿瘤替代。图4B描绘了冷冻的切片组织的H/E染色载玻片, 10X放大倍数。组织是包含转移性乳腺导管癌的腋淋巴结。大多数淋巴组织被肿瘤替代。

[0031] 图5描绘了使用缀合至小鼠抗人细胞角蛋白8/18抗体的NovodiAx聚HRP聚合物对福尔马林固定的组织载玻片直接IHC染色的代表性图像, 用100X显微镜放大倍数数码拍摄。检查的组织是正常前列腺。示例性染色的区域由箭头指示。

[0032] 图6描绘了在正常前列腺组织上使用缀合至小鼠抗人前列腺特异性抗体(PSA)的NovodiAx聚HRP聚合物的直接IHC染色的代表性数字显微照片(100X放大倍数)。示例性染色的区域由箭头指示。

[0033] 图7描绘了在人淋巴组织上使用缀合至小鼠抗人IgG抗体的聚HRP聚合物的直接IHC染色的代表性结果。显微镜放大倍数是400X。示例性染色的区域由箭头指示。

[0034] 图8示出了使用聚HRP抗Ck8/18抗体缀合物对冷冻的人淋巴结组织直接IHC染色的代表性图像。图8A描绘了福尔马林固定的人前列腺组织的直接免疫组织化学染色的结果(20X)。前列腺上皮细胞直接地被NovodiAx HRP聚合物标记的小鼠抗人低分子量角蛋白单克隆抗体(CK8/18, 克隆C94)染色; 并且直接免疫组织化学染色的孵育时间为在37°C下3分钟。图8B描绘了福尔马林固定的人前列腺组织的直接免疫组织化学染色的结果(40X)。前列腺上皮细胞直接地被NovodiAx HRP聚合物标记的小鼠抗人低分子量角蛋白单克隆抗体(CK8/18, 克隆C94)染色; 并且直接免疫组织化学染色的孵育时间为在37°C下3分钟。

[0035] 图9示出了使用聚合的-HRP抗Ck8/18抗体缀合物对组织切片直接IHC染色的代表性图像。图解了FFPE前列腺组织切片(图9A)和冷冻的人淋巴结组织切片(图9B)。示例性染色的区域由箭头指示。

[0036] 图10示出了使用聚合的-HRP抗Ki-67抗体缀合物对人扁桃体组织切片直接IHC染色的代表性图像。示例性染色的区域由箭头指示。

[0037] 图11示出了使用聚合的-HRP抗Ck5抗体缀合物对人冷冻的扁桃体组织切片直接IHC染色的代表性图像。示例性染色的区域由箭头指示。

[0038] 图12示出了使用聚合的-HRP抗Mart-1抗体克隆A103缀合物对黑素瘤组织切片直接IHC染色的代表性图像。示例性染色的区域由箭头指示。

[0039] 图13示出了使用聚合的-HRP抗CD45抗体克隆3A4缀合物对扁桃体组织切片直接IHC染色的代表性图像。示例性染色的区域由箭头指示。

[0040] 图14示出了使用缀合有聚合的-HRP的治疗性抗体对组织切片直接IHC染色的代表性图像。图解了扁桃体(图14A)、前列腺(图14B)、胃(图14C)和肾脏(图14D)组织样本。示例性染色的区域由箭头指示。

[0041] 图15示出了使用聚合的-HRP抗ROR2抗体缀合物对组织样本直接IHC染色的代表性图像。图解了黑素瘤(图15A和15B)、肝细胞癌(图15C和15D)、神经内分泌肿瘤(图15E和15F)、肺癌(图15G)和肾透明细胞癌(图15H)组织切片。示例性染色的区域由箭头指示。

具体实施方式

[0042] 本发明的数个方面参考用于说明的实例应用在下面描述。应当理解, 许多具体细

节、关系和方法被提出以提供对本发明的完整理解。但是具有相关领域的普通技能的技术人员将容易地意识到本发明可以在没有个或多个具体细节的情况下或者利用其它方法实践。本发明不被行动或事件的阐明的顺序所限制,因为一些行动可以以不同的顺序发生和/或与其它行动或事件同时发生。

[0043] 而且,并不需要所有阐明的行动或事件来执行根据本发明的方法。

[0044] 本文使用的术语仅仅出于描述特定实施方式的目的并且不意欲限制本发明。如本文所使用,单数形式“一个(a、an)”和“该”意欲也包括复数形式,除非上下文另外清楚地指示。而且,就在具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包含(including、include)”、“含有(having、has)”、“具有(with)”或其变体来说,这样的术语意欲是以与术语“包括(comprising)”类似的方式为包含性的。

[0045] 术语“大约”或“近似地”意思是在由本领域普通技术人员测定的具体值的可接受误差范围内,其将部分取决于值如何被测量或测定,即,测量系统的限制。例如,“大约”可以意思是本领域的每次实践在1或多于1标准偏差内。可选地,“大约”可以意思是给定值的多达20%、优选地多达10%、更优选地多达5%、并且甚至更优选地仍多达1%的范围。可选地,具体地关于生物学体系或过程,术语“大约”可以意思是在值的数量级内,优选地在5倍内,并且更优选地在2倍内。在具体的值在本申请和权利要求书中描述的地方,除非另有指定,应当假定术语“大约”意思是在具体值的可接受误差范围内。

[0046] I. 免疫组织化学测定

[0047] 一般而言,本发明提供了用于检测组织样本中目标分析物存在或不存在的组合物、方法和试剂盒。通常地,方法包括:(a)使包含目标分析物的组织样本与聚合的-酶/抗体缀合物接触以形成包含目标分析物和至少一种聚合的-酶/抗体缀合物的复合体,在大约15℃和大约45℃之间的孵育温度下,持续大约3分钟至大约1小时之间的孵育周期,其中抗体能够特异性地结合至目标分析物;(b)移除不形成复合体的聚合的-酶/抗体缀合物;(c)使组织样本与酶的底物接触,从而检测目标分析物。

[0048] 在一方面,提供的组合物、方法和试剂盒用于快速地检测组织样本——比如FFPE组织切片或冷冻的组织切片——中的目标分析物,比如抗原。在一方面,提供的组合物、方法和试剂盒用于灵敏地检测组织样本——比如FFPE组织切片或冷冻的组织切片——中的目标分析物,比如抗原。在一些实施方式中,患有疾病的个体被选择进行治疗,其中通过本文公开的方法检测目标分析物被用作选择进行治疗的个体的基础。

[0049] A. 组织样本

[0050] 一般而言,本文提供的组合物和方法用于检测源自组织的组织样本中的目标分析物。在一些实施方式中,本文提供的组合物和方法用于检测源自组织的组织中的目标分析物,其中目标分析物是肿瘤抗原。

[0051] 本文中的“对象”或“患者”意思是治疗期望用于的任何单个对象,包括人、牛、狗、小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、鸡、昆虫等。还意欲包含的对象是参与临床研究试验的不显示疾病的任何临床征兆的任何对象,或者参与流行病学研究的对象,或者用作对照的对象。

[0052] 本文中的“组织样本”意思是从对象或患者的组织获得的类似细胞的集合(collection),优选地含有具有染色体材料的有核细胞。四种主要的人组织是(1)上皮组织;(2)结缔组织,包括血管、骨骼和软骨;(3)肌肉组织;和(4)神经组织。组织样本的来源可

以是实体组织,如来自新鲜的、冷冻的和/或保藏的器官或组织样本,或活检组织,或抽吸物(aspirate),或血液或任何血液成分,或体液,比如脑脊液、羊水、腹膜液或间质液,或来自对象的怀孕或发育中的任何时间的细胞。组织样本还可以是原代或培养的细胞或细胞系,或培养组织。组织样本可以包含实际上不与组织天然混杂的复合物,比如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。在本发明的一些实施方式中,组织样本是“非血液学组织”(即,不是血液或骨髓组织)。

[0053] 本发明的方法可以应用于任何类型的组织,包括,例如,癌组织。虽然冷冻的肿瘤组织不是广泛地可利用的,但是石蜡块常规地在外科手术之后由肿瘤制备,使得,例如,胸苷酸合成酶表达和化疗应答的大规模回顾性调查被执行。而且,该技术可以应用于任何宽范围的肿瘤类型和应用于无限范围的基因产物。本发明的方法可以用于制备个体肿瘤“基因表达模式(profile)”,由此对于一种或多种基因产物——比如已知为影响临床结果和对多种化学治疗剂的响应的一系列基因产物,表达水平可以在个体患者样本中测定。

[0054] 在一些实施方式中,组织包括癌细胞。在一些实施方式中,组织包括在空间上接近癌细胞的细胞。在一些实施方式中,组织包括癌细胞和在空间上接近癌细胞的细胞。在一些实施方式中,组织包括在空间上紧密接近癌细胞的细胞。在一些实施方式中,组织包括在空间上紧密接近癌细胞的正常细胞。在一些实施方式中,组织包括癌细胞和在空间上接近癌细胞的正常细胞的混合物。在一些实施方式中,混合物包括低百分比的癌细胞。在一些实施方式中,混合物包括少于30%、20%、15%、10%或5%的癌细胞。在一些实施方式中,混合物包括在大约5%和大约30%之间的癌细胞。

[0055] 在一些实施方式中,组织样本包括组织切片。

[0056] 本文中的组织样本的“切片”意思是单一部分或块的组织样本,例如,从组织样本切下的组织或细胞的薄切片。应当理解,组织样本的多个切片可以被采用并且经历根据本发明的分析。在一些实施方式中,组织的选定部分或切片包括同质细胞群。在一些实施方式中,组织的选定部分或切片包括异质细胞群。在一些实施方式中,选定部分包括组织的区域例如内腔作为非限制性实例。例如,选定部分可以小至一个细胞或两个细胞,或者可以代表数千细胞。在大多数情况下,细胞的收集是重要的,并且虽然本发明已经被描述用于检测细胞成分,但是本方法还可以用于检测生物体的非细胞成分(例如,作为非限制性实例,血液中的可溶成分)。

[0057] 可以使用来自对象的任何组织样本。可以使用的组织样本的实例包括但不限于乳房、前列腺、卵巢、结肠、肺、子宫内膜、胃、唾腺或胰腺。组织样本可以通过多种过程获得,包括但不限于外科手术切除、吸引术或活检。组织可以是新鲜的或冷冻的。

[0058] 在一些实施方式中,组织是老化的。本文中的“老化”意思是已经储存组织一段时间,例如,冷冻储存或FFPE储存一段时间。在一些实施方式中,组织样本是冷冻的组织样本。在一些实施方式中,组织是冷冻的组织。在一些实施方式中,组织是石蜡包埋的组织。在一些实施方式中,组织是福尔马林固定的石蜡包埋的组织。

[0059] 在一些实施方式中,组织样本是组织切片、临床涂片、或培养的细胞或组织。在一些实施方式中,组织是大于大约5 μ m厚度的组织切片。在一些实施方式中,组织是大约5 μ m厚度的组织切片。在一些实施方式中,组织是小于大约5 μ m厚度的组织切片。在一些实施方式中,组织是大约1.5 μ m厚度至大约5.5 μ m厚度的组织切片。在一些实施方式中,组织是大约

4.5 μ m厚度至大约7.5 μ m厚度的组织切片。

[0060] 在一些实施方式中,组织切片选自哺乳动物的如下器官的组织切片:脑、肾上腺、结肠、小肠、胃、心脏、肝脏、皮肤、肾脏、肺、胰腺、睾丸、卵巢、前列腺、子宫、甲状腺和脾脏。在一些实施方式中,组织切片来自实体瘤。

[0061] 组织样本的制备

[0062] 从这些颗粒试样制备组织块的方法已经在多种预后因素的先前的IHC研究中成功地使用,和/或其对于本领域技术人员而言是熟知的。

[0063] 简单地说,任何完整的器官或组织可以被切成相当小的块并且在多种固定剂(例如,福尔马林、醇等)中孵育不同的时间段直到组织被“固定”。样本可以从身体外科手术移除的几乎任何完整组织。样本可以被切成符合在组织病理学实验室中常规使用的仪器的合理小块(一个或多个)。切块的大小通常在几毫米至几厘米的范围内。

[0064] 在一些实施方式中,冷冻的切片可以通过如下步骤制备:在室温下、在小塑料容器(capsule)中的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中使50mg冷冻的“粉碎的”组织再水化;通过离心使颗粒沉淀;将颗粒重新悬浮在粘性的包埋介质(OCT)中;倒置容器和/或通过离心再次沉淀;在-70 $^{\circ}$ C异戊烷中速冻;切割塑料容器和/或移除冷冻的组织圆柱体;在恒冷箱切片夹头(chuck)上固定组织圆柱体;和/或切割25-50个连续切片。

[0065] 永久切片可以通过包含以下步骤的类似方法制备:在塑料微量离心管中使50mg样本再水化;沉淀;重新悬浮在10%福尔马林中进行4小时固定;洗涤/沉淀;重新悬浮在温的2.5%琼脂中;沉淀;在冰水中冷却以使琼脂硬化;从管中移出组织/琼脂块;在石蜡中浸润和/或包埋块;和/或切割多达50个连续的永久切片。

[0066] 在一些实施方式中,本发明可以利用标准的冷冻样本,比如被包埋在OCT中并且未被粉碎的那些,例如,包括在标准的冷冻切片医院实验室中使用的那些。

[0067] 组织样本通常利用固定剂来固定。通常使用醛固定剂例如福尔马林(甲醛)和戊二醛。使用其它固定技术比如醇浸没固定的组织样本也是适合的。参见Battifora和Kopinski, J., Histochem. Cytochem., 34:1095 (1986)。使用的样本也可以被包埋在石蜡中。

[0068] 在一些实施方式中,组织样本在包含醛的溶液中被固定。

[0069] 在一些实施方式中,组织样本在包含福尔马林的溶液中被固定。

[0070] 在一些实施方式中,组织样本被石蜡包埋。

[0071] 在一些实施方式中,组织样本被固定和包埋在石蜡等中。

[0072] 在一些实施方式中,样本既被福尔马林固定又被石蜡包埋。

[0073] 在一些实施方式中,福尔马林固定的石蜡包埋的组织(FFPET)块被苏木精和伊红染色,然后选择一个或多个部分进行分析,以便为FFPET核心样本选择特定的区域(一个或多个)。

[0074] 组织样本可以通过常规的方法固定(即,保藏)。参见,例如,“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”, 第三版(1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) 编辑, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, 纽约; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994), Ulreka V. MikeI 编辑, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.。本领域

技术人员将理解,固定剂的选择由组织将被组织学染色或者以其他方式分析的目的而确定。本领域技术人员还将理解,固定的长度取决于组织样本的大小和使用的固定剂。举例而言,中性缓冲液福尔马林、布安固定液或低聚甲醛(paraformaldehyde)可以被用于固定组织样本。

[0075] 通常地,组织样本首先被固定,然后通过递增系列的醇脱水,用石蜡或其它切片介质浸润和包埋,使得组织样本可以被切片。可选地,实验者可以对组织切片并且固定获得的切片。举例而言,组织样本可以通过常规的方法在石蜡中包埋和处理。参见,例如,“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”,上文。可以使用的石蜡的实例包括但不限于Paraplast、Broid和Tissuemay。一旦组织样本被包埋,样本可以通过切片机等进行切片。参见,例如,“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”,上文。通过该过程的实例的方式,切片厚度的范围可以在大约3微米至大约5微米。一旦被切片,切片可以通过数个标准方法附着至载玻片。载玻片粘合剂的实例包括但不限于硅烷、明胶、多聚-L-赖氨酸等。举例而言,石蜡包埋的切片可以附着至带正电荷的载玻片和/或包被有多聚-L-赖氨酸的载玻片。

[0076] 样本的脱蜡(deparaffinization)

[0077] 如果石蜡已经被用作包埋材料,则组织切片通常被脱蜡并利用水再水化。在一些实施方式中,组织在IHC之前被脱蜡。

[0078] 脱蜡从石蜡包埋的样本移除大部分的石蜡。许多用于脱蜡的技术是已知的,并且任何适合的技术可以与本发明一起使用。本发明的优选方法利用有机溶剂洗涤来溶解石蜡。这类溶剂能够在没有不利地影响组织中的配体的情况下有效地从组织样本移除石蜡。适合的溶剂可以从示例性溶剂中选择,比如苯、甲苯、乙苯、二甲苯和其混合物。二甲苯是用于本发明的方法的优选溶剂。在本发明的方法中单独的或组合的溶剂优选地是高纯度的,通常大于大约99%。

[0079] 石蜡通常通过在强力混合的情况下利用有机溶剂洗涤然后离心来移除。样本在足以引起组织在管中沉淀的速度下离心,通常在大约10,000至大约20,000x g下离心。在离心之后,丢弃有机溶剂上清液。组织学领域的技术人员将认识到,使用的有机溶剂的体积和必要的洗涤次数将取决于样本的大小和待被移除的石蜡的量。待被移除的石蜡的量越大,将需要越多次的洗涤。通常地,样本将被洗涤1次和大约10次之间,并且优选地,大约2和大约4次之间。对于10 μ m组织试样,有机溶剂的典型体积为大约500 μ L。

[0080] 本领域技术人员已知的其它脱蜡方法也可以用于本发明的方法,例如,包括直接融化。

[0081] 在另外的实施方式中,可以采用柑橘类脂肪族烃(例如,D-柠檬烯类(D-Limonene based)),包括,例如,用于脱蜡的其它示例性的专利制剂(例如,**HEMO-DE**[®] (PMP Medical Industries, Inc., Irving, TX); **CLEAR-RITE**[®] (Microm International; Walldorf, Germany); **EZ-DEWAX**[™] (BioGenex, San Ramon, CA))。EZ-DEWAX[™]已知为去蜡和再水化剂。

[0082] 组织切片可以通过数个常规的标准方法脱蜡。例如,可以使用二甲苯或者逐步递减系列的醇。参见,例如,“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”,上文。可选地,可以使用商业可得的脱蜡非有机试剂,

比如Hemo-De® (CMS, Houston, Texas)。

[0083] 再水化

[0084] 在脱蜡之后可以再水化样本。再水化的优选方法是利用降低浓度的低级醇水溶液逐步洗涤。乙醇是优选的用于再水化的低级醇。其它醇也可以适合用于本发明,包括甲醇、异丙醇和在C1-C5范围内的其它类似的醇。样本可选地与醇溶液强力地混合并被离心。在优选的实施方式中,醇的浓度范围在大约3到5个增量步骤内在水中从大约100%逐步降低至大约70%,其中在每个步骤中溶液浓度的改变通常低于大约10%(例如,示例性顺序100%、95%、90%、80%、70%)。例如,在一些实施方式中,脱蜡和再水化使用试剂比如EZ-DEWAX™ (BioGenex, San Ramon, CA) 同时进行。

[0085] 预处理

[0086] 在本发明的一些实施方式中,样本可以被预处理,比如以直接地或间接地促进本发明的方法。在一些实施方式中,组织的预处理增加了用于抗体结合的目标分析物的可利用性。可以采用使得目标可利用的预处理(热诱导的表位恢复或蛋白水解酶介导的)。柠檬酸盐缓冲液、Tris和EDTA基底可以作为示例性的热诱导试剂采用。在本发明的某些方面中,比如通过利用许多可利用的专利制剂,也可以采用胃蛋白酶、蛋白酶K、胰蛋白酶、蛋白酶和所有的亚型。

[0087] B. 目标分析物

[0088] 提供的组合物和方法用于检测组织样本中的一种或多种目标分析物。

[0089] 本文中的“目标分析物”或“分析物”或“目标”或语法等价物意思是待被检测的任何分子、复合物或颗粒。

[0090] 在一些实施方式中,目标分析物是未分化的赘生物/未知的初生体 (primaries) 的诊断中的生物标记,比如,上皮标记(细胞角蛋白和EMA)、肌上皮标记(p63、S100、钙调理蛋白、SMA、SMMH-1、CK14、乳腺丝抑蛋白)、间充质标记(波形蛋白、SMA、MSA、结蛋白、MyoD1、成肌蛋白、NF、S100、P63、CD10、钙调理蛋白、肌红蛋白、MDM2、CDK4、FLI-1、CD117、DOG1、CD31、CD34、XIIIa因子、CD99)、黑素细胞标记(S100、HMB-45、MART-1、酪氨酸酶、MiTF)、间皮标记(钙网膜蛋白、CK5/6、WT1、D2-40、HBME-1、间皮素、血栓调节蛋白)、神经内分泌标记(嗜铬粒蛋白、突触小泡蛋白、CD56、PGP9.5、NSE、胰岛素、PTH、降钙素、甲状腺球蛋白、催乳素)、生殖细胞肿瘤标记(PLAP、OCT4、CD117或c-kit、SALL4、CD30、甲胎蛋白、β-hCG、磷脂酰肌醇聚糖-3、α-抑制素(inhibin-αIpha)、钙网膜蛋白、EMA、CAM5.2)、B细胞标记(CD79a和PAX5)和造血细胞标记(CD1a、CD2、CD3、CD5、CD10、CD38、CD21、CD35、CD15、CD30、CD79a、CD43、CD138、CD68、BcI-2、BcI-6、细胞周期蛋白D1、MUM1、S100、MPO)。

[0091] 在一些实施方式中,目标分析物是用于识别肿瘤起源的生物标记,比如,用于甲状腺髓样癌的降钙素和CEA;用于胰腺内分泌肿瘤的胰岛素、胰高血糖素和生长抑素;用于梅克尔细胞癌的CK20;用于血管肌脂肪瘤的HMB-45、MART-1和SMA;用于黑素瘤的S100、HMB-45、MART-1、SOX10和波形蛋白;用于GI和外GI间质瘤的CD117和DOG-1;用于胸腺癌的CD5和p63;用于结直肠癌的CK20、CDX-2、β-连环蛋白和绒毛蛋白;用于涎腺导管癌的雄性激素受体和GCDFP-15;用于乳腺癌的GCDFP-15、ER、PR、乳腺珠蛋白(mammaglobin);用于肺腺癌的TTF1、天冬氨酸蛋白酶A(napsinA)和表面活性剂A;用于甲状腺乳头状和滤泡性癌的TTF1、甲状腺球蛋白、PAX8;用于郎格罕细胞组织细胞增生症的CD1a和S100;用于前列腺癌的PSA、

PSAP和P504S;用于脊索瘤的CK、EMA、S100;用于乳头状RCC的P504S/KIM-1/RCCMa;用于透明细胞RCC的RCCMa、KIM-1、PAX8、pVHL;用于甲状腺玻璃样变性梁状腺瘤(hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid)的MIB1(Ki-67);用于精原细胞瘤的OCT4/CD117/PLAP/D2-40;用于促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤(DPSRCT)的CK、结蛋白;用于肝细胞癌的磷脂酰肌醇聚糖-3、Hep Par1;用于卵黄囊癌的甲胎蛋白/磷脂酰肌醇聚糖-3/PLAP/SALL4;用于胚胎性癌的OCT4/CD30/SOX2/SALL4/PLAP;用于脂肪组织/脂肪肉瘤的DM2、CDK4;用于横纹肌肉瘤的成肌蛋白、结蛋白、myoD1;用于平滑肌肉瘤/平滑肌肿瘤的SAM、MSA、结蛋白;用宫颈癌和宫颈内癌(endocervical carcinoma)的p16、原位HPV;用于卵巢浆液性癌的ER、WT1、PAX8;用于子宫内膜间质肉瘤的CD10、ER;用于胰腺导管腺癌(PDA)的乳腺丝抑蛋白、VHL;用于T细胞的CD2、CD3;用于B细胞的CD20、PAX5、CD69a;用于髓样细胞的CD43、CD34、CD33、MPO;用于肥大细胞的CD117、类胰蛋白酶;和用于滤泡树突细胞的CD21、CD35。

[0092] 在一些实施方式中,目标分析物是用于在疾病种类内详细分类的生物标记,比如,用于淋巴瘤/白血病的CD3、CD20、CD79a、PAX5、CD45rb、CD15、CD30、ALK-1、CD138、CD56、免疫球蛋白、HHV8、EMA、TdT、CD34、CD117和MPO。

[0093] 在一些实施方式中,目标分析物是用于伴随诊断的生物标记,比如ER、PR、HER2、EGFR和CD117(c-kit)。

[0094] 在一些实施方式中,目标包括蛋白质、碳水化合物、脂质和/或核酸。在一些实施方式中,目标包括蛋白质和/或其特性部分,比如,肿瘤标记、整联蛋白、细胞表面受体、跨膜蛋白、胞间蛋白、离子通道、膜转运蛋白、酶、抗体、嵌合蛋白、糖蛋白等。在一些实施方式中,目标包括碳水化合物或其特性部分,比如,糖蛋白、糖(例如,单糖、二糖、多糖)、糖萼(即,大多数真核细胞的外表面上的富含碳水化合物的外周区)等。在一些实施方式中,目标包括脂质和/或其特性部分,比如,油、脂肪酸、甘油酯、激素、类固醇(例如,胆固醇、胆汁酸)、维生素(例如,维生素E)、磷脂、鞘脂、脂蛋白等。

[0095] 众多标记在本领域中是已知的。通常的标记包括细胞表面蛋白,例如,受体。示例性的受体包括但不限于转铁蛋白受体;LDL受体;生长因子受体,比如表皮生长因子受体家族成员(例如,EGFR、Her2、Her3、Her4)或血管内皮生长因子受体、细胞因子受体、细胞粘附分子、整联蛋白、选择蛋白和CD分子。标记可以是唯一地或者以较高的量在恶性细胞上存在的分子,例如,肿瘤抗原。在一些实施方式中,标记或目标分析物以比对照中的标记或目标分析物高的量存在。

[0096] 在一些实施方式中,目标分析物选自:用于诊断未分化的赘生物和/或未知的原发性肿瘤的生物标记,其选自上皮标记(细胞角蛋白(cytokeratin)和EMA)、肌上皮标记(p63、S100、钙调理蛋白、SMA、SMMH-1、CK14、乳腺丝抑蛋白)、间充质标记(波形蛋白、SMA、MSA、结蛋白、MyoD1、成肌蛋白、NF、S100、P63、CD10、钙调理蛋白、肌红蛋白、MDM2、CDK4、FLI-1、CD117、DOG1、CD31、CD34、XIIIa因子、CD99)、黑素细胞标记(S100、HMB-45、MART-1、酪氨酸酶、MITF)、间皮标记(钙网膜蛋白、CK5/6、WT1、D2-40、HEME-1、间皮素、血栓调节蛋白)、神经内分泌标记(嗜铬粒蛋白、突触小泡蛋白、CD56、PGP9.5、NSE、胰岛素、PTH、降钙素、甲状腺球蛋白、催乳素)、生殖细胞肿瘤标记(PLAP、OCT4、CD117或c-kit、SALL4、CD30、甲胎蛋白、 β -hCG、磷脂酰肌醇聚糖-3、 α -抑制素、钙网膜蛋白、EMA、CAM5.2)和造血细胞标记(CD1a、CD2、CD3、CD5、CD10、CD38、CD21、CD35、CD15、CD30、CD79a、CD43、CD138、CD68、BcI-2、BcI-6、细胞

周期蛋白D1、MUM1、S100、MPO)；用于识别肿瘤起源的生物标记，其选自：用于甲状腺髓样癌的降钙素和CEA；用于胰腺内分泌肿瘤的胰岛素、胰高血糖素和生长抑素；用于梅克尔细胞癌的CK20；用于血管肌脂肪瘤的HMB-45、MART-1和SMA；用于黑素瘤的S100、HMB-45、MART-1、SOX10和波形蛋白；用于GI和外GI间质瘤的CD117和DOG-1；用于胸腺癌的CD5和p63；用于结肠直肠癌的CK20、CDX-2、β-连环蛋白和绒毛蛋白；用于涎腺导管癌的雄性激素受体和GCDFP-15；用于乳腺癌的GCDFP-15、ER、PR、乳腺珠蛋白；用于肺腺癌的TTF1、天冬氨酸蛋白酶A和表面活性剂A；用于甲状腺乳头状和滤泡性癌的TTF1、甲状腺球蛋白、PAX8；用于郎格罕细胞组织细胞增生症的CD1a和S100；用于前列腺癌的PSA、PSAP和P504S；用于脊索瘤的CK、EMA、S100；用于乳头状RCC的P504S/KIM-1/RCCMa；用于透明细胞RCC的RCCMa、KIM-1、PAX8、pVHL；用于甲状腺玻璃样变性梁状腺瘤的MIB1 (Ki-67)；用于精原细胞癌的OCT4/CD117/PLAP/D2-40；用于促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤 (DPSRCT) 的CK、结蛋白；用于肝细胞癌的磷脂酰肌醇聚糖-3、Hep Par1；用于卵黄囊瘤的甲胎蛋白/磷脂酰肌醇聚糖-3/PLAP/SALL4；用于胚胎性癌的OCT4/CD30/SOX2/SALL4/PLAP；用于脂肪组织/脂肪肉瘤的DM2、CDK4；用于横纹肌肉瘤的成肌蛋白、结蛋白、myoD1；用于平滑肌肉瘤/平滑肌肿瘤的SAM、MSA、结蛋白；用于宫颈癌和宫颈内癌的p16、原位HPV；用于卵巢浆液性癌的ER、WT1、PAX8；用于子宫内膜间质肉瘤的CD10、ER；用于胰腺导管腺癌 (PDA) 的乳腺丝抑蛋白、VHL；用于T细胞的CD2、CD3；用于B细胞的CD20、PAX5、CD69a；用于髓样细胞的CD43、CD34、CD33、MPO；用于肥大细胞的CD117、类胰蛋白酶；或用于滤泡树突细胞的CD21、CD35；用于在疾病种类内详细分类的生物标记，其选自CD3、CD20、CD79a、PAX5、CD45rb、CD15、CD30、ALK-1、CD138、CD56、免疫球蛋白、HHV8、EMA、TdT、CD34、CD117和MPO；或用于伴随诊断的其它生物标记，选自ER、PR、HER2、EGFR和CD117 (c-kit)。

[0097] 肿瘤抗原

[0098] 在某些特定实施方式中，目标是肿瘤标记。在一些实施方式中，肿瘤标记是存在于肿瘤中、不存在于正常器官、组织和/或细胞中的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是与肿瘤相关联并且与正常器官、组织和/或细胞不相关联的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是位于肿瘤的细胞表面上并且不位于正常器官、组织和/或细胞的细胞表面上的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是在肿瘤中比在正常器官、组织和/或细胞中更为普遍的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是与正常器官、组织和/或细胞相比与肿瘤更普遍相关联的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是在恶性肿瘤细胞中比在正常细胞中更为普遍的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记是与正常细胞相比与恶性肿瘤细胞更普遍相关联的抗原。在一些实施方式中，肿瘤标记以比在对照中发现的肿瘤标记更高的水平存在。在一些实施方式中，肿瘤标记比在非肿瘤组织中发现的肿瘤标记更高的水平存在。

[0099] 在一些实施方式中，目标分析物包括肿瘤抗原。

[0100] 本文中的“肿瘤抗原”意思是在肿瘤细胞中产生的抗原性物质，即，其在宿主中引发免疫应答。身体中的正常蛋白由于自身耐受性是非抗原性的，其为如此过程：其中在中枢淋巴组织 (BM) 中“中心地”和在次级淋巴组织中“外周地”，剔除自身反应的细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 和产生自身抗体的B淋巴细胞 (大部分情况是，对于T细胞，胸腺，和对于B细胞，脾脏/淋巴结)。因此，不暴露于免疫系统的任何蛋白质引发免疫应答。这可以包括很好地与免疫系统隔绝的正常蛋白质、以极少的量正常产生的蛋白质、仅在发育的某些阶段正常产生

的蛋白质、或由于突变其结构被修饰的蛋白质。

[0101] 在一些实施方式中,与正常组织和/或细胞相比,目标优先地在肿瘤组织和/或细胞中表达。在一些实施方式中,目标以在肿瘤组织中比在正常组织中高的水平表达。在一些实施方式中,目标以比对照更高的水平表达。

[0102] 在本发明的一些实施方式中,标记是肿瘤标记。标记可以是以在分裂细胞上比在非分裂细胞上高的水平表达的多肽。例如,Her-2/neu(也称为ErbB-2)是EGF受体家族的成员并且在与乳腺癌相关联的肿瘤的细胞表面上表达。另一个实例是称为F3——其是用于引导纳米颗粒至核仁蛋白的适合的靶向剂——的肽。参见Porkka等,Proc Natl Acad Sci, 99:7444(2002);和Christian等,J Cell Biol,163:871(2003)。已经显示了包含纳米颗粒和A10适配体(其特异性地结合至PSMA)的靶向颗粒能够特异性地并有效地递送多西紫杉醇至前列腺癌肿瘤。

[0103] 特异性地靶向这些肿瘤目标的抗体或其它药物特异性地直接干涉和调控肿瘤细胞调控的生物学行为的信号传导通路,或者阻断信号传导通路以抑制肿瘤细胞生长或者诱导细胞凋亡。迄今为止,存在几十种已经被批准用于实体瘤或血液恶性肿瘤临床研究和治疗的目标药物,并且存在用于血液恶性肿瘤的许多靶向药物。

[0104] 在一些实施方式中,肿瘤抗原(或肿瘤目标)选自:CD2、CD19、CD20、CD22、CD27、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79和CD137。

[0105] 在一些实施方式中,肿瘤抗原(或肿瘤目标)选自:4-1BB、5T4、AGS-5、AGS-16、血管生成素2、B7.1、B7.2、B7DC、B7H1、B7H2、B7H3、BT-062、BTLA、CAIX、癌胚抗原、CTLA4、Cripto、ED-B、ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFL7、EpCAM、EphA2、EphA3、EphB2、FAP、纤连蛋白、叶酸盐受体、神经节苷脂GM3、GD2、糖皮质激素-诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)、gp100、gpA33、GPNMB、ICOS、IGF1R、整联蛋白 α v、整联蛋白 α v β 、KIR、LAG-3、路易斯Y抗原、间皮素、c-MET、MN碳酸酐酶IX、MUC1、MUC16、柄蛋白-4(Nectin-4)、NKGD2、NOTCH、OX40、OX40L、PD-1、PDL1、PSCA、PSMA、RANKL、ROR1、ROR2、SLC44A4、黏结蛋白聚糖-1、TACI、TAG-72、生腱蛋白、TIM3、TRAILR1、TRAILR2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3和其变体。肿瘤抗原的变体包含本领域中已知的和/或天然存在的多种突变体或多态型(polymorphism)。

[0106] 在一些实施方式中,目标分析物以低水平表达。在一些实施方式中,目标分析物的拷贝数为每个细胞大约 1×10^3 至 1×10^4 ,比如ROR1和ROR2。参见S.Baskar等,Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia, Clin Cancer Res 2008;14(2)396,V.Walkamm等,Live Imaging of Xwnt5A-ROR2 complexes, PLOS ONE 2014 Vol 9(10)1-9。

[0107] C. 聚合的-酶/抗体缀合物

[0108] 在另一方面,本发明提供了聚合的-酶/抗体缀合物,其中抗体能够特异性地结合至目标分析物。

[0109] 抗体

[0110] 一般而言,缀合物包括抗体或其功能性片段。

[0111] 本文中的“免疫球蛋白”或“抗体”意思是全长(即,天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(例如,IgG抗体)或者免疫球蛋白分子的免疫活性(即,特异性地结合)部分,例如抗体片段。在要求保护的主题的范围内,抗体或抗体

片段可以缀合或以其它方式衍生。这类抗体包括IgG1、IgG2a、IgG3、IgG4 (和IgG4亚型) 以及IgA同种型。

[0112] 本文中的术语“抗体”以最宽泛的意义使用并且包含各种抗体结构,其包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其展示期望的抗原结合活性并且包括免疫球蛋白的Fc区或者与Fc区等价的区。术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换地使用,指的是具有与天然抗体结构基本上类似的结构抗体或者具有包含如本文限定的Fc区的重链的抗体。

[0113] 本文中的“天然抗体”意思是天然存在的具有不同结构的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是大约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由二硫键连接的两个相同的轻链和两个相同的重链组成。从N末端到C末端,每个重链具有可变区(VH)——其也被称为可变的重链结构域或重链可变结构域,然后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)——其也被称为重链恒定区。类似地,从N末端到C末端,每个轻链具有可变区(VL)——其也被称为可变的轻链结构域或轻链可变结构域,然后是三个恒定轻链(CL)结构域——其也被称为轻链恒定区。抗体的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被指定为称为 κ 和 λ 的两种类型中的一种。

[0114] 本文中的“抗体片段”意思是除了完整抗体之外的包括一部分完整抗体的分子,其结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)、单结构域抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)。对于scFv片段的综述,参见,例如,Plückthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315(1994); 还参见W093/16185; 和美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包括补救受体结合表位残基和具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点——其可以为二价的或双特异性的——的抗体片段。参见,例如,EP404,097; W0 1993/01161; Hudson等,Nat Med,9,129-134(2003); 和Hollinger等,Proc Natl Acad Sci,90,6444-6448(1993)。三链抗体和四链抗体(tetrabody)也在Hudson等,Nat Med,9,129-134(2003)中描述。单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的所有或一部分或者轻链可变结构域的所有或一部分的抗体片段。在某些实施方式中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见,例如,美国专利号6,248,516B1)。抗体片段可以通过多种技术制造,其包括但不限于,完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)生产,如本文所描述的。

[0115] 本文的“抗原结合结构域”意思是包括特异性地结合至部分或全部抗原的和与部分或全部抗原互补的区域的抗体的部分。抗原结合结构域可以由例如一个或多个抗体可变结构域(也被称为抗体可变区)提供。具体而言,抗原结合结构域包括抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0116] 本文中的“可变区”或“可变结构域”意思是在参与将抗体结合至抗原的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包括四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见,例如,Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H. Freeman and Co.,第91页(2007)。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。

[0117] 本文中的“高变区”或“HVR”意思是抗体可变结构域的如此区的每个：其是序列高变的和/或形成结构上限定的环——“高变环”。一般而言，天然的四链抗体包括六个HVR，VH中的三个(H1、H2、H3)，和VL中的三个(L1、L2、L3)。HVR通常包括来自高变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基，后者具有最高的序列可变性和/或参与抗原识别。除了VH中的CDR1之外，CDR通常包括形成高变环的氨基酸残基。高变区(HVR)也被称为“互补决定区”(CDR)，并且这些术语在本文中在关于形成抗原结合区的可变区的部分可互换地使用。该特定的区已经由Kabat等，U.S.Dept.of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) 和由Chothia等，J Mol Biol 196:901-917 (1987) 描述，其中定义包括当互相比对时，氨基酸残基的重叠或子集。然而，指抗体的CDR或其变体的任一定义的应用意欲在如本文限定的和使用的术语的范围内。包含特定CDR的精确的残基数目将根据CDR的序列和大小而改变。本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包括给出抗体的可变区氨基酸序列的特定CDR。

[0118] 本发明的抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或抗体融合蛋白。

[0119] 本文中的“嵌合抗体”意思是包含重和轻抗体链二者的可变结构域的重组蛋白，其包括源自一个物种的抗体——优选地啮齿动物抗体、更优选地鼠科动物抗体——的互补决定区(CDR)，同时抗体分子的恒定结构域源自人抗体的恒定结构域。对于兽医应用，嵌合抗体的恒定结构域可以源自其它物种的嵌合抗体的恒定结构域，其它物种比如类人灵长类动物、猫或狗。

[0120] 本文中的“人源化抗体”意思是重组蛋白：在该重组蛋白中来自一个物种的抗体例如啮齿动物抗体的CDR从啮齿动物抗体的重和轻可变链转移至人重和轻可变结构域。抗体分子的恒定结构域源自人抗体的恒定结构域。在一些实施方式中，人源化抗体的框架区的特定残基，特别是正接触或接近CDR序列的那些，可以被修饰，例如利用来自原始啮齿动物、类人灵长类动物或其它抗体的相应残基替换。

[0121] 本文中的“人抗体”意思是例如，从转基因小鼠获得的抗体，该转基因小鼠已经被“工程化”以响应抗原挑战产生特异性人抗体。在该技术中，人重和轻链基因座的元件被引入源自胚胎干细胞系的小鼠品系，其包含内源重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可以合成对人抗原特异性的人抗体，并且小鼠可以用于产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由Green等，Nature Genet 7:13 (1994)、Lonberg等，Nature 368:856 (1994) 和Taylor等，Int Immun. 6:579 (1994) 描述。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法，以及噬菌体展示技术构建，其全部是本领域中已知的。参见，例如，McCafferty等，Nature 348:552-553 (1990)，其用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因所有组成成分(repertoire)在体外生产人抗体和其片段。在该技术中，抗体可变结构域基因被框内克隆成为丝状噬菌体的主要或次要的外壳蛋白基因，并在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。由于丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，因此基于抗体的功能性质的选择还导致选择编码展示那些性质的抗体的基因。以这种方式，噬菌体模仿B细胞的一些性质。噬菌体展示技术可以以多种形式执行，对于其综述，参见，例如，Johnson和Chiswell，Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993)。人抗体还可以由体外激活的B细胞生成。参见，美国专利号5,567,610和5,229,275，其通过引用以其全部并入本文。

[0122] 本文中的“抗体融合蛋白”意思是重组产生的抗原结合分子,在该分子中具有相同或不同特异性的两种或多种相同的或不同的天然抗体、单链抗体或抗体片段区段被连接。融合蛋白包括至少一个特异性结合位点。融合蛋白的价指示融合蛋白具有的对抗原(一种或多种)或表位(一种或多种)的结合臂或位点的总数,即,单价的、二价的、三价的或多价的。抗体融合蛋白的多价意思是其在结合至抗原中可以利用多个相互作用,因而增加结合至抗原或至不同抗原的亲合力。特异性指的是抗体融合蛋白能够结合多少种不同类型的抗原或表位,即,单特异性的、双特异性的、三特异性的、多特异性的。使用这些定义,天然抗体,例如,lgG,是二价的,因为其具有两个结合臂,但是为单特异性的,因为其结合至一种类型的抗原或表位。单特异性的、多价的融合蛋白对于相同的抗原或表位具有多于一个结合位点。例如,单特异性的双抗体是具有与相同抗原反应的两个结合位点的融合蛋白。融合蛋白可以包括不同抗体成分或相同抗体成分的多个拷贝的多价或多特异性组合。融合蛋白可以另外地包括治疗剂。

[0123] 在一些实施方式中,抗体基于其对在组织样本中感兴趣的目标细胞上或目标位点处表达的抗原的特异性进行选择。多种肿瘤特异性的或其它疾病特异性的抗原已经被识别并且针对这些抗原的抗体已经被使用或者被提议使用治疗这样的肿瘤或其它疾病。在本领域中已知的抗体可以在本发明的复合物中使用,具体地用于治疗与目标抗原相关联的疾病。可以靶向本发明的抗体-连接体-药物缀合物的目标抗原(和其相关的疾病)的实例包括:CD2、CD19、CD20、CD22、CD27、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79、CD137、4-1BB、5T4、AGS-5、AGS-16、血管生成素2、B7.1、B7.2、B7DC、B7H1、B7H2、B7H3、BT-062、BTLA、CA1X、癌胚抗原、CTLA4、Cripto、ED-B、ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFL7、EpCAM、EphA2、EphA3、EphB2、FAP、纤连蛋白、叶酸盐受体、神经节苷脂GM3、GD2、糖皮质激素-诱导的肿瘤坏死因子受体(G1TR)、gp100、gpA33、GPNMB、1COS、1GF1R、整联蛋白 α v、整联蛋白 α v β 、K1R、LAG-3、路易斯Y、间皮素、c-MET、MN碳酸酐酶1X、MUC1、MUC16、柄蛋白-4、NKGD2、NOTCH、OX40、OX40L、PD-1、PDL1、PSCA、PSMA、RANKL、ROR1、ROR2、SLC44A4、黏结蛋白聚糖-1、TAC1、TAG-72、生腱蛋白、TIM3、TRAILR1、TRAILR2、VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3。

[0124] 在一些实施方式中,抗体是抗ROR2、抗Ck8/18、抗Ki-67、抗Ck5、抗Mart-1、抗S100或抗CD45抗体。

[0125] 在一些实施方式中,缀合物包括Fab、Fab'、F(ab')₂、单结构域抗体、T和Ab二聚体、Fv、scFv、dsFv、ds-scFv、Fd、线性抗体、微型抗体(minibody)、双抗体、双特异性抗体片段、二抗体(bibody)、三抗体(tribody)、sc-双抗体、 κ (λ)抗体、BiTE、DVD-1g、S1P、SM1P、DART或包含一个或多个CDS的抗体类似物。

[0126] 在一些实施方式中,缀合物包括一次抗体。

[0127] 本文中的“一次抗体”意思是特异性地结合至组织样本中的目标蛋白抗原的抗体。一次抗体通常是免疫组织化学(IHC)过程中使用的第一抗体。在一些实施方式中,一次抗体是在IHC过程中唯一使用的抗体。

[0128] 在一些实施方式中,缀合物包括二次抗体。

[0129] 本文中的“二次抗体”意思是如此抗体:其特异性地结合至一次抗体,从而在一次抗体和后续的试剂——如果有的话——之间形成桥接。二次抗体通常是免疫组织化学过程中使用的第二抗体。

[0130] 在一些实施方式中,抗体识别目标分析物经由直接结合。在一些实施方式中,抗体识别目标分析物经由间接结合。在一些实施方式中,抗体特异性地结合至目标分析物经由直接结合。在一些实施方式中,抗体特异性地结合至目标分析物经由间接结合。

[0131] 在一些实施方式中,抗体的结合亲和力为大约 10^{-7} 至 10^{-13} (Kd)。

[0132] 酶

[0133] 一般而言,抗体缀合物包括多个酶分子。在一些实施方式中,抗体缀合物包括多个酶分子,其中所述多个酶分子包括相同的酶类型(例如,抗体缀合物的所有酶分子是辣根过氧化物酶)。

[0134] 酶通常催化可以使用多种技术测量的显色底物的化学改变。例如,酶可以催化可以分光光度法测量的底物的颜色改变。可选地,酶可以改变底物的荧光或化学发光。化学发光的底物通过化学反应被电子地激发,然后可以发射可以被测量的(例如,使用化学光度计)光或者将能量给出至荧光受体。酶标签的实例包括荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;美国专利号4,737,456)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(比如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于将酶缀合至抗体的技术在O'Sullivan等,Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay,in Methods in Enzym(ed.J.Langone&H.Van Vunakis), Academic press,New York,73:147-166(1981)中描述。酶-底物组合的实例包括,例如:(i)辣根过氧化物酶(HRP)与作为底物的过氧化氢酶,其中过氧化氢酶氧化染料前体[例如,邻苯二胺(OPD)或盐酸3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)];(ii)碱性磷酸酶(AP)与作为显色底物的对硝基苯磷酸酯;和(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)与显色底物(例如,对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物(例如,4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷酶)。

[0135] 在一些实施方式中,酶选自 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -内酰胺酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、脲酶、尿酸酶、超氧化物歧化酶、荧光素酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、半乳糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶、肠激酶、酪氨酸酶和黄嘌呤氧化酶。

[0136] 聚合的-酶

[0137] 一般而言,抗体缀合物包括包含多个酶分子的聚合的-酶。

[0138] 在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子经由交联试剂共价地连接。在一些实施方式中,酶包括蛋白成分。在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子经由蛋白成分共价地连接。在一些实施方式中,酶分子包括多糖成分。在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子经由多糖成分共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子经由多糖和蛋白成分共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的多个酶分子非共价地连接。在一些实施方式中,多个酶分子包括多聚体酶(multimeric enzyme)。在一些实施方式中,多个酶分子包括酶团聚体。

[0139] 一般而言,聚合过程在使得预选大小的聚合的-酶的受控的和可重现的形成的条件下进行。酶的浓度、缓冲液的pH、自由官能团相对于交联试剂的化学计量、温度和反应时间在实现该可控制的过程中都是重要的因素。

[0140] 在一些实施方式中,聚合的-酶包括大约5至大约500个酶分子。在一些实施方式中,聚合的-酶包括至少大约5、10、15、20、25、50、75、100、150、200或250个酶分子。在一些实施方式中,聚合的-酶包括少于大约250、200、150、100、75、50、25、20、15、10或5个酶分子。

[0141] 在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子经由交联试剂共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子经由零长度交联试剂共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子以线性方式共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子以分支方式共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子以混合的线性和分支方式共价地连接。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子共价地连接以形成线性结构。在一些实施方式中,聚合的-酶的酶分子共价地连接以形成球状结构。

[0142] 在一些实施方式中,包含多个聚合的-酶的聚合的-酶的群体包括以每个聚合的-酶的酶分子数目为特征的聚合的-酶的大小分布。在一些实施方式中,包含多个聚合的-酶的聚合的-酶的群体包括以聚合的-酶的结构为特征的聚合的-酶的形状分布。

[0143] 在一些实施方式中,聚合的-酶具有大约500kDa至大约5兆道尔顿(MDa)的分子量。在一些实施方式中,聚合的-酶具有至少大约500kDa的分子量。在一些实施方式中,聚合的-酶具有小于或大约5MDa的分子量。在一些实施方式中,聚合物-酶具有至少大约750kDa的分子量。在一些实施方式中,聚合物-酶具有至少大约1、2、3或4MDa的分子量。

[0144] 在一些实施方式中,聚合的-酶在被缀合至抗体之前首先形成。

[0145] 酶/抗体缀合物

[0146] 一般而言,酶缀合至抗体。在一些实施方式中,多于一个酶分子缀合至抗体。在一些实施方式中,酶分子缀合至多于一个抗体。在一些实施方式中,多于一个抗体缀合至酶分子。在一些实施方式中,多于一个酶分子缀合至多于一个抗体。在一些实施方式中,多于一个抗体缀合至多于一个酶。

[0147] 本文中的“缀合”或“附接”或“连接”意思是结合剂(比如抗体)和聚合物(比如酶聚合物)或酶分子共价的或非共价的、以及直接的或间接的缔合。

[0148] 本发明中考虑的抗体缀合物包括在体外使用的那些,其中抗体连接至二级结合配体和/或连接至酶(酶标志)——其在与显色底物接触之后将生成有色产物。适合的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶和/或葡萄糖氧化酶。优选的二级结合配体是生物素和/或抗生物素蛋白和链霉抗生物素复合物。这些标签的使用对于本领域技术人员而言是熟知的并且例如在美国专利号3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中描述;每篇通过引用并入本文。

[0149] 包含叠氮基团的分子也可用于通过反应性氮烯中间体与蛋白质形成共价键,该反应性氮烯中间体通过低强度紫外光生成(Potter&Haley,1983)。具体而言,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已经被用作位点定向的光探针来在粗细胞提取物中识别核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton等,1985)。2-和8-叠氮基核苷酸也已经被用于映射(map)纯化蛋白的核苷酸结合结构域(Khatoun等,1989;King等,1989;和Dholakia等,1989)并且可以被用作抗体结合剂。

[0150] 用于附接或缀合抗体至其缀合部分的数种方法是已知的。一些附接方法包括使用金属螯合物复合体,例如,采用附接至抗体的有机螯合剂,比如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3

(tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril-3) (美国专利号4,472,509和4,938,948,每篇通过引用并入本文)。单克隆抗体还可以在偶联剂比如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。具有荧光素标记的缀合物在这些偶联剂的存在下或者通过与异硫氰酸酯反应来制备。在美国专利号4,938,948中,例如,乳腺癌的成像使用单克隆抗体实现,并且可检测的成像部分使用连接体结合至抗体,连接体比如对羟苯甲亚胺酸甲酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟苯基)丙酸酯。

[0151] 在其它实施方式中,考虑了通过使用不改变抗体结合位点的反应条件选择性地使巯基引入免疫球蛋白的Fc区来衍生免疫球蛋白。根据该方法生产的抗体缀合物被公开,以展示提高的存活力、特异性和灵敏性(美国专利号5,196,066,通过引用并入本文)。位点特异性衔接效应物或报道分子——其中报道或效应物分子缀合至Fc区中的碳水化合物残基——也已经在文献(O'Shannessy等,1987)中被公开。

[0152] 聚合的-酶/抗体缀合物

[0153] 一般而言,包含多个酶分子的聚合的-酶缀合至抗体。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物根据比如由美国专利号4,657,853公开的方法生成,该专利通过引用以其全部并入。在一些实施方式中,方法包括如下连续步骤:(a)共价地连接至少两个酶分子以产生聚合的-酶;和(b)共价地连接聚合的-酶至抗体或其片段。

[0154] 在一些实施方式中,聚合的-酶缀合至抗体或其片段上的特异性位点。在一些实施方式中,聚合的-酶缀合至抗体或其片段上的一个或多个特异性位点。在一些实施方式中,聚合的-酶缀合至抗体或其片段上的随机位点。在一些实施方式中,聚合的-酶缀合至抗体或其片段上的一个或多个随机位点。在一些实施方式中,聚合的-酶经由氨基酸的固有的或外源的化学特性缀合至抗体或其片段。在一些实施方式中,聚合的-酶经由氨基酸残基的固有的或外源的化学特性缀合至抗体或其片段。

[0155] 在一些实施方式中,抗体缀合物包括一个或多个聚合的-酶。在一些实施方式中,抗体缀合物包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个聚合的-酶。在一些实施方式中,抗体缀合物包括1和20个之间的聚合的-酶。

[0156] 在一些实施方式中,抗体缀合物包括每个缀合物大约6至大约16、18、20、22、24、26、28、30、40、50、60、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200或更多个之间的酶分子。

[0157] 在一些实施方式中,抗体缀合物包括每个缀合物至少6-24个之间、6-26个之间、6-28个之间、6-30个之间、6-40个之间、6-50个之间、6-60个之间、6-70个之间、6-80个之间、6-90个之间或6-100个之间的酶分子。

[0158] 在一些实施方式中,抗体缀合物包括每个缀合物至少6、8、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200,但是不多于250、300、350、400或500个酶分子。

[0159] 在一些实施方式中,抗体缀合物具有在大约400kDa至大约500kDa、600kDa、700kDa、800kDa、900kDa、1000kDa、2000kDa、3000kDa、4000kDa、5000kDa、6000kDa、7000kDa、8000kDa、9000kDa或10000kDa之间的分子量。

[0160] 在一些实施方式中,抗体缀合物具有在大约470kDa至大约4.7兆Da之间的分子量。

[0161] 在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括多于一个抗体。在一些实施方式

中,聚合的-酶/抗体缀合物包括多个聚合的-酶。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括多个聚合的-酶,其中每个聚合的-酶包括大约相同数目的酶分子。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括多个聚合的-酶,其中多个聚合的-酶展示每个聚合的-酶的酶分子数目的分布。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物包括多个聚合的-酶,其中多个聚合的-酶展示聚合的-酶的形状的差异。

[0162] 在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物具有大于1:8的比率(抗体与酶)。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物具有大于1:6的比率(抗体与酶)。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物具有大约1:6、1:8、1:15、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:75、1:100、1:125、1:150、1:200的比率(抗体与酶)。

[0163] 在一些实施方式中,调节缀合至聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶的数目以使得增加的组织穿透力和目标分析物检测。在一些实施方式中,调节聚合的-酶/抗体缀合物的重量比以使得增加的组织穿透力和目标分析物检测。在一些实施方式中,缀合至聚合的-酶/抗体缀合物的每个聚合的-酶的酶数目使得增加的组织穿透力和目标分析物检测。在一些实施方式中,缀合至聚合的-酶/抗体缀合物的聚合的-酶的大小使得增加的组织穿透力和目标分析物检测。

[0164] 在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物是自Novodiox, Inc. (Hayward, CA) 可获得的缀合物,目录号K29301-1/8、Q31001、Q31002、Q31003、Q31004、Q31005、D28001、D28002、D28003、D28004、D28005或D28006。

[0165] 酶底物

[0166] 一般而言,包含酶特异性底物的溶液与聚合的-酶/抗体缀合物一起孵育以使得检测。在一些实施方式中,包含酶特异性底物的溶液由所述酶特异性底物的母液制备。

[0167] 在一些实施方式中,包含酶特异性底物的溶液和/或母液酶特异性底物不含杂质。在一些实施方式中,用于制备包含酶特异性底物的溶液和/或酶特异性底物母液的溶液(例如,缓冲液)不含杂质。在一些实施方式中,杂质将抑制酶的催化反应。

[0168] 在一些实施方式中,酶特异性底物是基本上纯的。在一些实施方式中,酶特异性底物的纯度为80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或99.9%纯的。

[0169] 在一些实施方式中,包含酶特异性底物的溶液被制备,然后立即与聚合的-酶/抗体缀合物一起孵育。

[0170] 在一些实施方式中,聚合物-酶的酶分子催化多于一种底物类型。

[0171] 在一些实施方式中,酶是辣根过氧化物酶并且底物是DAB (3,3'-二氨基联苯胺色原)。在一些实施方式中,酶是辣根过氧化物酶并且底物是AEC (3-氨基-9-乙基咔唑)。在一些实施方式中,酶是辣根过氧化物酶并且底物是AMEC Red。在一些实施方式中,酶是辣根过氧化物酶并且底物是TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)。在一些实施方式中,酶是碱性磷酸酶并且底物是坚牢红 (Fast Red) (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO)。在一些实施方式中,酶是碱性磷酸酶并且底物是BCIP/NBT (5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯/氮蓝四唑)。

[0172] E. 免疫检测方法

[0173] IHC的两种一般方法是可利用的:间接和直接测定。

[0174] 在典型的间接测定中,未缀合的一次抗体结合至抗原,然后标记的二次抗体结合至一次抗体。二次抗体缀合至酶标签——显色的或荧光的底物——以使得抗原可视化。信

号放大发生,这是由于数个二次抗体可以与一次抗体上的不同表位反应。

[0175] 在典型的直接测定中,结合抗体至目标抗原被直接地确定。这种直接测定使用标记的试剂,比如荧光标志或酶标记的一次抗体,其可以在不进行进一步抗体相互作用的情况下可视化。

[0176] 直接测定

[0177] 在一方面,本发明提供了用于直接IHC测定的组合物和方法。在这种直接测定中,使用包含一次抗体的聚合的-酶/抗体缀合物。

[0178] 在一些实施方式中,直接测定用于检测组织中的目标分析物。在一些实施方式中,聚合的-酶/抗体缀合物用于直接检测组织中的目标分析物。在一些实施方式中,直接IHC方法用于检测组织中的目标分析物,其中该方法包括使用聚合的-酶/抗体缀合物。在一些实施方式中,直接IHC方法用于测定组织中目标分析物的水平,其中该方法包括使用聚合的-酶/抗体缀合物。在一些实施方式中,直接IHC方法用于测定组织中目标分析物的存在,其中该方法包括使用聚合的-酶/抗体缀合物。在一些实施方式中,直接IHC方法用于测定组织中可检测的存在的目标分析物的缺乏,其中该方法包括使用聚合的-酶/抗体缀合物。在一些实施方式中,直接测定用于检测组织样本(例如,组织切片),优选地FFPE切片或冷冻的组织切片中的目标分析物。

[0179] 除了上面讨论的样品制备过程之外,在IHC之前、期间或之后可以期望进一步处理组织切片。例如,可以进行表位恢复方法,比如在柠檬酸盐缓冲液中加热组织样本。参见,例如,Leong等,Appl Immunohistochem 4(3):201(1996)。在任意的封闭步骤之后,在适合的条件将组织切片暴露于一次抗体(例如,聚合的-酶/抗体缀合物)持续足够的时间段(“孵育时间”),使得一次抗体结合至组织样本中的目标蛋白抗原。在一些实施方式中,在适合的条件将组织与一次聚合的-酶/抗体缀合物一起孵育持续足够的时间段,使得一次聚合的-酶/抗体缀合物结合至组织中的目标蛋白抗原。在一些实施方式中,在适合的条件将组织与一组一次聚合的-酶/抗体缀合物(例如,多于一个)一起孵育持续足够的时间段,使得一次聚合的-酶/抗体缀合物结合至组织中的目标蛋白抗原,其中该组聚合的-酶/抗体缀合物包括至少一种聚合的-酶/抗体缀合物——其与该组中的另一种聚合的-酶/抗体缀合物相比具有不同的目标分析物结合特异性。用于实现这个目标的适合的条件可以通过常规实验确定。结合抗体至样本的程度通过使用上面讨论的可检测的标签的任何一种来确定。优选地,标签是酶标签(例如,HRP),其催化显色底物比如3,3'-二氨基联苯胺色原的化学改变。更优选地,标签是聚合的-酶(例如,聚HRP或聚合的-HRP),其催化显色底物比如3,3'-二氨基联苯胺色原的化学改变。

[0180] 在一些实施方式中,本文描述的IHC方法以高通量方式进行。在一些实施方式中,本文描述的使用聚合的-酶/抗体缀合物的IHC方法以高通量方式进行。在一些实施方式中,本文描述的直接IHC方法以高通量方式进行。在一些实施方式中,本文描述的使用聚合的-酶/抗体缀合物的直接IHC方法以高通量方式进行。

[0181] 目标分析物/抗体复合体的形成

[0182] 一般而言,包含目标分析物的组织样本(例如,组织切片)与聚合的-酶/抗体缀合物在大约15°C和大约50°C之间的孵育温度下接触大约3分钟至大约1小时之间的孵育周期以形成包含目标分析物和至少一种抗体缀合物的复合体,并且抗体缀合物是能够特异性地

结合至目标分析物的一次抗体。

[0183] 在一些实施方式中,包含一系列目标分析物(例如,分析物A和分析物B)的组织与一组聚合的-酶/抗体缀合物(例如,特异性地结合分析物A的聚合的-酶/抗体复合体和特异性地结合分析物B的聚合的-酶/抗体复合体)在大约15°C和大约50°C之间的孵育温度下接触大约3分钟至大约1小时之间的孵育周期以形成包含目标分析物和至少一种抗体缀合物的一系列复合体,并且抗体缀合物是能够特异性地结合至它们各自的目标分析物的一次抗体。

[0184] 在一些实施方式中,1HC染色利用包含磷酸盐、tris、MOPS、MES、HEPES或碳酸氢盐的缓冲液进行,并且任选地缓冲液包含选自以下的一种或多种成分:乙基汞硫代水杨酸钠、proclin 300、锰、钙、铁、镁、锌、具有400到40,000Da的分子量的聚乙二醇、乙二醇、甘油、牛血清白蛋白、马血清白蛋白、山羊血清白蛋白、兔血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、明胶、吐温20、吐温30、具有300-30,000Da的分子量的硫酸葡聚糖或具有500-25,000Da的分子量的DEAE葡聚糖。每种成分——如果包括的话——的量是本领域中通常使用的量。用于增加抗体结合至目标抗原的缓冲液的优化和其使用方法是本领域中熟知的。

[0185] 在一些实施方式中,1HC染色利用缓冲液比如PBS或TBS缓冲液进行,所述缓冲液任选地具有牛血清白蛋白(BSA)和/或聚乙二醇("PEG"),比如具有200、300、400、600、1000、1500、2000、3000、4000、50000、6000、10000或20000分子量的PEG,优选地PEG 400、1500或6000。在一些实施方式中,缓冲液是来自Novodiag, Inc. (Hayward, CA)的商业化缓冲液,例如产品目录号C30001。

[0186] 在一些实施方式中,孵育温度在大约15°C和大约18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约20°C和大约21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约25°C和大约30°C之间,或在大约25°C和大约37°C之间。

[0187] 在一些实施方式中,孵育温度是大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0188] 在一些实施方式中,孵育温度为小于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0189] 在一些实施方式中,孵育温度为大于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0190] 在一些实施方式中,孵育周期为在大约3分钟至大约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在5分钟至大约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在10分钟至大约15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约15分钟至大约20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约20分钟至大约25、30、35、40、45、50、55或60分钟

之间,在大约25分钟至大约30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约30分钟至大约35、40、45、50、55或60分钟之间。

[0191] 在一些实施方式中,孵育周期为大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0192] 在一些实施方式中,孵育周期小于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0193] 在一些实施方式中,孵育周期大于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0194] 洗涤步骤

[0195] 在孵育之后,组织样本通常利用洗涤缓冲液洗涤,所述洗涤缓冲液比如PBS、TBS、MOPS、MES、HEPES或碳酸氢盐缓冲液,并且任选地包含洗涤剂,比如吐温(例如,0.01-0.2%)。一种示例性的缓冲液是含有0.05%吐温20的10mM PBS。

[0196] 洗涤步骤进行2到6次,优选地3、4或5次,每个洗涤步骤持续1、2、3、4、5、6、7、8、9或10分钟或更多的周期。

[0197] 在一些实施方式中,洗涤温度在大约15°C和大约18、19、20、21、22、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约20°C和大约21、22、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约25°C和大约30°C之间,或在大约25°C和大约37°C之间。

[0198] 在一些实施方式中,洗涤温度为大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0199] 在一些实施方式中,洗涤温度低于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0200] 在一些实施方式中,洗涤温度大于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0201] 在一些实施方式中,洗涤周期在大约3分钟至大约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在5分钟至大约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在10分钟至大约15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约15分钟至大约20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟,在大约20分钟至大约25、30、35、40、45、50、55或60分钟,在大约25分钟至大约30、35、40、45、50、55或60分钟之间,或在大约30分钟至大约35、40、45、50、55或60分钟之间。

[0202] 在一些实施方式中,洗涤周期为大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0203] 在一些实施方式中,洗涤周期小于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0204] 在一些实施方式中,洗涤周期大于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0205] 在一些实施方式中,洗涤步骤进行2至6次,每个洗涤步骤持续1、2、3、4、5、6、7、8、9或10分钟或更多的周期,其中洗涤温度小于大约14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0206] 在一些实施方式中,洗涤步骤进行2至6次,每个洗涤步骤持续大约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10分钟或更多的周期,其中洗涤温度大于大约14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0207] 在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法的洗涤步骤的数目与使用缀合有单个酶分子的抗体的方法相比被减少。在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法的洗涤步骤的长度与使用缀合有单个酶分子的抗体的方法相比被减少。在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法的洗涤步骤的数目和洗涤步骤的长度与使用缀合有单个酶分子的抗体的方法相比被减少。在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法的洗涤溶液的严格性大于在使用缀合有单个酶分子的抗体的方法中使用的洗涤溶液的严格性。在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法的洗涤溶液的严格性小于在使用缀合有单个酶分子的抗体的方法中使用的洗涤溶液的严格性。

[0208] 封闭步骤

[0209] 在一些实施方式中,1HC染色过程进一步包括在将抗体缀合物与组织一起孵育之前的封闭步骤,其中所述封闭步骤包括使所述组织与封闭剂接触。

[0210] 在一些实施方式中,封闭剂包括脱脂乳、BSA、冷的鱼皮明胶、酪蛋白或动物血清。

[0211] 在一些实施方式中,封闭剂包括缓冲液,比如含有BSA的TBS或PBS。

[0212] 在一些实施方式中,封闭剂包括缓冲液体系,其选自PBS、TBS、MOPS、MES、HEPES和碳酸氢盐,任选地具有0.5-6%的牛血清白蛋白、马血清白蛋白、山羊血清白蛋白、兔血清白蛋白或明胶,和0.001-0.05%的吐温20。

[0213] 在一些实施方式中,封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的脱脂乳。

[0214] 在一些实施方式中,封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%的BSA。

[0215] 在一些实施方式中,封闭温度在大约15℃和大约18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50℃之间,在大约20℃和大约21、22、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50℃之间,在大约25℃和大约30℃之间,或在大约25℃和大约37℃之间。

[0216] 在一些实施方式中,封闭温度为大约14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0217] 在一些实施方式中,封闭温度小于大约14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0218] 在一些实施方式中,封闭温度大于大约14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃。

[0219] 在一些实施方式中,封闭周期在大约3分钟至大约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在5分钟至大约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在10分钟至大约15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约15分钟至大约20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约20分钟至大约25、30、35、40、45、50、55或60分钟之间,在大约25分钟至大约30、35、40、45、50、55或60分钟之间,或在大约30分钟至大约35、40、45、50、55或60分钟之间。

[0220] 在一些实施方式中,封闭周期为大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0221] 在一些实施方式中,封闭周期小于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0222] 在一些实施方式中,封闭周期大于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0223] 在一些实施方式中,封闭步骤执行1、2、3、4或5次。

[0224] 在一些实施方式中,封闭步骤执行1、2或3次,其中封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%或7%的脱脂乳,并且其中封闭周期小于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0225] 在一些实施方式中,封闭步骤执行1、2或3次,其中封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%或7%的脱脂乳,并且其中封闭周期大于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0226] 在一些实施方式中,封闭步骤执行1、2或3次,其中封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%或7%的BSA,并且其中封闭周期小于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0227] 在一些实施方式中,封闭步骤执行1、2或3次,其中封闭剂包括大约1%、2%、3%、4%、5%、6%或7%的BSA,并且其中封闭周期大于大约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0228] 在一些实施方式中,组织还可以被形态学染色。在一些实施方式中,组织可以被复染(counterstain)以使得识别细胞或细胞成分。

[0229] 在一些实施方式中,组织样本可以使用本领域中已知的方法利用苏木精复染,并脱水进行长期储存。在一些实施方式中,组织样本可以利用H/E染色。

[0230] 检测步骤

[0231] 在洗涤步骤之后,将包含酶的底物——比如用于HRP的DAB或用于AP的坚牢红——的检测剂添加至组织样本。

[0232] 在一些实施方式中,检测试剂包括缓冲液,比如PBS或TBS缓冲液,任选地具有BSA

和/或聚乙二醇。

[0233] 在一些实施方式中,染色利用缓冲液进行,所述缓冲液包含磷酸盐、tris、MOPS、MES、HEPES或碳酸氢盐,并且任选地包括乙基汞硫代水杨酸钠(hiomersal)、proclin 300、锰、钙、铁、镁、锌、具有400至40,000Da分子量的聚乙二醇、乙二醇、甘油、牛血清白蛋白、马血清白蛋白、山羊血清白蛋白、兔血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、明胶、吐温20、吐温30、具有300-30,000Da分子量的硫酸葡聚糖或具有500-25,000分子量的DEAE葡聚糖。

[0234] 在一些实施方式中,检测温度在大约15°C和大约18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约20°C和大约21、22、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50°C之间,在大约25°C和大约30°C之间,或在大约25°C和大约37°C之间。

[0235] 在一些实施方式中,检测温度为大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0236] 在一些实施方式中,检测温度低于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0237] 在一些实施方式中,检测温度大于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C。

[0238] 在一些实施方式中,孵育周期在大约3分钟至大约30分钟之间、在大约5分钟至大约15分钟之间或在大约3分钟至大约5分钟之间。

[0239] 在一些实施方式中,孵育周期为大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0240] 在一些实施方式中,孵育周期小于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0241] 在一些实施方式中,孵育周期大于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0242] 在一些实施方式中,检测温度为大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C,并且孵育周期为大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0243] 在一些实施方式中,检测温度低于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C,并且孵育周期小于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0244] 在一些实施方式中,检测温度大于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C,并

且孵育周期小于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0245] 在一些实施方式中,检测温度小于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C,并且孵育周期大于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0246] 在一些实施方式中,检测温度大于大约14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C或50°C,并且孵育周期大于大约1、2、3、5、7、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60分钟。

[0247] 在孵育之后,组织样本利用水比如自来水冲洗一次或多次。

[0248] 在一些实施方式中,酶促反应使用分光光度计检测。在一些实施方式中,酶促反应使用化学光度计检测。在一些实施方式中,酶促反应使用荧光检测器检测。在一些实施方式中,酶促反应使用比色(colormetric)信号检测器检测。在一些实施方式中,酶促反应使用光学显微镜或荧光显微镜检测。

[0249] 在一些实施方式中,目标分析物被量化。在一些实施方式中,目标分析物被相对量化。在一些实施方式中,目标分析物相对于标准被量化。在一些实施方式中,目标分析物相对于标准曲线被量化。

[0250] D. 形态学染色

[0251] 在制备组织切片之后,在载玻片上安装的切片可以利用形态学染色剂进行染色以进行评估。一般而言,切片利用一种或多种染料染色,其每一种独特地染色不同的细胞成分。在一些实施方式中,黄嘌呤染料或其功能等价物和/或噻嗪染料或其功能等价物被用于增强和使得在每个组织切片内的细胞核、细胞质和“颗粒状”结构可区分。这类染料是商业可得的并且常常成组出售。举例而言,HEMA 3® (CMS, Houston, Texas) 染色剂组包括黄嘌呤染料和噻嗪染料。在一些实施方式中,还可以使用亚甲基蓝。可以在本发明的方法中使用的其它形态学染色剂的实例包括但不限于在与另一种荧光标签相同的波长下不显著地自发荧光的染料。本领域技术人员将理解,通过增加或减少载玻片在染料中停留的时间长度,可以对给定的组织优化染色。

[0252] 在染色之后,组织切片可以通过标准的显微镜学技术分析。一般而言,病理学家等评估组织中异常或正常细胞或特定细胞类型的存在并且提供感兴趣的细胞类型的位置。因此,例如,在关于乳腺癌中HER2/neu扩增的研究中,病理学家等将检查载玻片并识别正常乳腺细胞与异常乳腺细胞。

[0253] 在一些实施方式中,对组织进行形态学染色和聚合的-酶/抗体缀合物染色。

[0254] 11. 诊断方法

[0255] 在一方面,本申请提供了用于诊断(例如,伴随诊断)的组合物、方法和试剂盒。一般而言,诊断方法包括经由包括使用聚合的-酶/抗体缀合物的方法检测个体中目标分析物的存在或不存在(即,缺乏可测量的水平)。在一些实施方式中,聚合的酶/抗体缀合物包括治疗性抗体。通过检测治疗性抗体对个体中的目标分析物的结合,方法使得技术人员选择特别适合于使用该治疗性抗体治疗的个体。

[0256] 因此,例如,在一些实施方式中,提供了治疗患有以异常水平的目标分析物为特征

的疾病(例如癌症)的个体的方法,其包括:1)使用包含缀合至识别目标分析物的抗体的多个酶分子的聚合的-酶/抗体缀合物检测目标分析物的水平或存在;和2)给个体施用有效量的靶向目标分析物的试剂。在一些实施方式中,试剂是特异性地结合至目标分析物的抗体。在一些实施方式中,试剂是与聚合的-酶抗体缀合物中所包含的相同的抗体。在一些实施方式中,疾病是癌症,并且目标分析物是肿瘤抗原。

[0257] 在一些实施方式中,提供了评估患有以异常水平的目标分析物为特征的疾病(比如癌症)的个体对于利用靶向目标分析物的试剂治疗的适应性,其包括:使用包含缀合至识别目标分析物的抗体的多个酶分子的聚合的-酶/抗体缀合物检测目标分析物的水平或存在,其中目标分析物的水平或存在被用作评估治疗适应性的基础。在一些实施方式中,试剂是特异性地结合至目标分析物的抗体。在一些实施方式中,试剂是与聚合的-酶抗体缀合物中所包含的相同的抗体。在一些实施方式中,方法进一步包括给临床医生推荐治疗。在一些实施方式中,疾病是癌症,并且目标分析物是肿瘤抗原。

[0258] 在一些实施方式中,提供了选择(包括识别)患有以异常水平的目标分析物为特征的疾病(比如癌症)的个体以便利用靶向目标分析物的试剂治疗的方法,其包括,使用包含缀合至识别目标分析物的抗体的多个酶分子的聚合的-酶/抗体缀合物检测目标分析物的水平或存在,其中目标分析物的水平或存在被用作选择(包括识别)治疗个体的基础。在一些实施方式中,试剂是特异性地结合至目标分析物的抗体。在一些实施方式中,试剂是与聚合的-酶抗体缀合物中所包含的相同的抗体。在一些实施方式中,方法进一步包括给临床医生推荐治疗。在一些实施方式中,疾病是癌症,并且目标分析物是肿瘤抗原。

[0259] 在一些实施方式中,目标抗原的检测经由IHC进行。在一些实施方式中,目标抗原的检测经由直接IHC进行。在一些实施方式中,试剂直接地结合至目标分析物。在一些实施方式中,试剂间接地结合至目标分析物。在一些实施方式中,试剂是小分子-、核苷酸-、或氨基酸-基试剂。在一些实施方式中,试剂是抗体或其片段。在一些实施方式中,抗体结合至与用于检测目标分析物的聚合的-酶/抗体缀合物的抗体相同的目标分析物的表位。在一些实施方式中,抗体与用于检测目标分析物的聚合的-酶/抗体缀合物的抗体以相同的结合亲和力结合至目标分析物的相同表位。在一些实施方式中,抗体可以结合与用于检测目标分析物的聚合的-酶/抗体缀合物的抗体不同的表位。在一些实施方式中,对目标组织检测目标分析物的存在。在一些实施方式中,疾病是癌症。在一些实施方式中,个体是人。

[0260] 在一些实施方式中,个体是人。

[0261] 在一些实施方式中,目标分析物是用于伴随诊断的生物标记,比如ER、PR、HER2、EGFR、CD117(c-kit)。

[0262] 在一些实施方式中,治疗性抗体对G蛋白偶联受体或离子通道是特异性的。在一些实施方式中,治疗性抗体对以下是特异性的:1-40- β -淀粉状蛋白、4-1BB、5AC、5T4、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、甲胎蛋白、血管生成素2、血管生成素3、AOC3(VAP-1)、B7-H3、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis anthrax*)、BAFF、 β -淀粉状蛋白、B-淋巴瘤细胞、C242抗原、C5、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、心肌球蛋白、CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147(基础免疫球蛋白(basigin))、CD15、CD152、CD154(CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(1gE受体)、CD25(1L-2受体的 α 链)、CD27、CD28、CD3、CD3 ϵ 、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD37、CD38(环状ADP核糖水解酶)、CD4、CD40、

CD41 (整联蛋白 α -11b)、CD44v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA-相关抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*)、凝聚因子A、CSF2、CTLA-4、DLL4、DR5、EGFL7、EGFR、内毒素、EpCAM、CD3、上皮唾液蛋白、ERBB3、FAP、纤维蛋白11、 β 链、纤连蛋白额外结构域-B (fibronectin extra domain-B)、叶酸盐受体1、卷曲蛋白受体 (Frizzled receptor)、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、GMCSF受体 α -链、GPNMB、血细胞凝集素、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、HNGF、Hsp90、人分散因子受体激酶、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- γ 、1GF-1受体、1GF-1、1GHE、1L 20、1L-1、1L-12、1L-23、1L-17A、1L-1 β 、1L-22、1L23、1L-4、1L-5、1L-6、1L-6受体、1L9、1LGF2、整联蛋白 α 4 β 7、整联蛋白 α 5 β 1、整联蛋白 α 7 β 7、整联蛋白 α 11 β 3、整联蛋白 α v β 3、干扰素受体、干扰素 α / β 受体、干扰素 γ 诱导的蛋白质、1TGA2、1TGB2 (CD18)、K1R2D、路易斯-Y抗原、LFA-1 (CD11a)、脂磷壁酸、LOXL2、L-选择蛋白 (CD62L)、LTA、MCP-1、间皮素、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、肌生成抑制蛋白 (Myostatin)、NARP-1、NCA-90 (粒细胞抗原)、NGF、N-羟乙酰神经氨酸、NOGO-A、Notch受体、NRP1、OX-40、OXLDL、PCSK9、PD-1、PD-L1、PDCD1、PDCD1、PDGF-R α 、磷酸钠协同转运蛋白、磷脂酰丝氨酸、RANKL、RHD、Rh因子、RON、RTN4、骨硬化蛋白 (Sclerostin)、SDC1、选择蛋白P、SLAMF7、SOST、鞘氨醇-1-磷酸酯、TAG-72、T-细胞受体、TEM1、生腱蛋白C、TFP1、TGF β 1、TGF β 2、TGF- β 、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、MUC1的肿瘤特异性糖基化、TWEA受体、TYRP1 (糖蛋白75)、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2、波形蛋白或VWF。

[0263] 本文还提供了评估患有疾病的个体是否将可能响应治疗的方法，其包括使用聚合-酶/抗体缀合物确定目标分析物的存在。

[0264] 此外，本文提供了用于选择 (包括识别) 可能响应治疗的患有疾病的个体的方法，其包括 (a) 使用聚合的-酶/抗体缀合物检测目标分析物的存在；和 (b) 施用有效量的靶向目标分析物的试剂。

[0265] 本文还提供了调节接受有效量的靶向目标分析物的试剂的患有疾病的个体的治疗的方法，该方法包括使用聚合的-酶/抗体缀合物检测从个体分离的样本中目标分析物的存在，和基于评估调节治疗的方法。在一些实施方式中，调节试剂的量。在一些实施方式中，疾病是癌症。

[0266] 在本文中的任何方法的一些实施方式中，方法预测和/或导致肿瘤大小或疾病或疾病进展的迹象的可测量的降低、完全响应、部分响应、疾病稳定、无进展生存期的增加或延长、或总生存期的增加或延长。在上述的任何方法的一些实施方式中，如果个体具有通过聚合的-酶/抗体缀合物测量的可检测的存在的目标分析物，和由肿瘤大小或疾病或疾病进展的迹象的可测量的降低、完全响应、部分响应、疾病稳定、无进展生存期的增加或延长、或总生存期的增加或延长证明的，则个体可能响应靶向目标分析物的试剂。

[0267] 在方法的一些实施方式中，提供了延长个体中癌症的无进展生存期的方法，包括基于通过聚合的-酶/抗体缀合物测量的目标分析物的存在选择治疗个体。在一些实施方式中，方法使疾病进展的时间延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周中的至少一个。

[0268] 在方法的一些实施方式中，提供了延长患有癌症的个体的生存期的方法，包括基于通过聚合的-酶/抗体缀合物测量的目标分析物的存在选择治疗个体。在一些实施方式中，方法使个体的生存期延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24月中的至少一个。

[0269] 在方法的一些实施方式中，提供了降低患有癌症的个体中AE和SAE的方法，包括基

于通过聚合的-酶/抗体缀合物测量的目标分析物的存在选择治疗个体。在本文描述的任何方法的一些实施方式中,方法预测和/或导致客观响应(比如部分响应或完全响应)。

[0270] 在本文描述的任何方法的一些实施方式中,方法预测和/或导致改善的生活质量。

[0271] 在一些实施方式中,提供了使用聚合的-酶/抗体缀合物测定群体中具有可测量存在的目标分析物的个体的百分比。在一些实施方式中,目标分析物的表达使用IHC测定。在一些实施方式中,目标分析物的表达使用直接IHC测定。在一些实施方式中,目标分析物的表达使用聚合的-酶/抗体缀合物测定。在一些实施方式中,目标分析物的表达使用利用聚合的-酶/抗体缀合物的直接IHC测定。在一些实施方式中,目标分析物是肿瘤抗原。在一些实施方式中,个体是人。

[0272] 在一些实施方式中,提供了使用聚合的-酶/抗体缀合物测定个体中目标分析物的组织分布的方法。在一些实施方式中,对个体中多于一种组织类型测定目标分析物的组织分布。在一些实施方式中,对来自一个或多个个体的组织类型测定目标分析物的组织分布。在一些实施方式中,对来自一个或多个个体的多于一种组织类型测定目标分析物的组织分布。在一些实施方式中,目标分析物的组织分布使用IHC测定。在一些实施方式中,目标分析物的组织分布使用直接IHC测定。在一些实施方式中,组织是癌症。在一些实施方式中,个体是人。

[0273] 在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物测定组织上目标分析物的存在的方法还可以使组织上的目标分析物的存在分类(stratify)。在一些实施方式中,组织是目标分析物阳性的。在一些实施方式中,组织是目标分析物弱阳性的。在一些实施方式中,组织是目标分析物阴性的。

[0274] 在一些实施方式中,包括使用聚合的-酶/抗体缀合物测定目标抗原的存在的方法还可以检测目标抗原的水平。在一些实施方式中,将个体中目标分析物的水平——如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的,与对照样本中的目标分析物的水平——也如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的——进行比较。在一些实施方式中,将个体中目标分析物的水平——如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的,与多个对照样本中的目标分析物的水平——每个如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的——进行比较。在一些实施方式中,多个对照样本用于生成统计值,其用于将患有癌症的个体中目标分析物的水平分类。

[0275] 如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的目标分析物的水平还可以用于测定下列的任意:(a)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(b)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(c)对治疗的响应性;(d)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(e)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(f)调节剂量;(g)预测临床益处的可能性。在一些实施方式中,如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的目标分析物的水平还可用于帮助评估下列的任意:(a)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(b)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(c)对治疗的响应性;(d)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(e)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(f)调节剂量;(g)预测临床益处的可能性。

[0276] 如本文所使用,“基于(based upon或based on)”包括评估、测定或测量如本文描述的个体的特性(并且优选地选择适合于接受治疗的个体)。当如使用聚合的-酶/抗体缀合

物测定的目标分析物的存在或水平被用作如本文描述的治疗方法的选择、评估(或帮助评估)、测量或测定的基础时,在治疗之前和/或期间测量目标分析物的水平,并且获得的值可以被临床医生用于评估下列的任意:(a)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(b)个体最初接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(c)对治疗的响应性;(d)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的适应性;(e)个体继续接受治疗(一种或多种)的大概的或可能的不适应性;(f)调节剂量;或(g)预测临床益处的可能性。

[0277] 在一些实施方式中,个体是人。在一些实施方式中,个体是女性。在一些实施方式中,个体是男性。在一些实施方式中,个体为低于大约65岁。在一些实施方式中,个体为至少大约65岁、至少大约70岁或至少大约75岁。在一些实施方式中,个体具有慢性应激的一种或多种症状,包括与癌症相关联的身体和心理应激,比如焦虑、沮丧、头痛、疼痛、疲劳、失眠、厌食、恶心、营养不良或其任意组合。在一些实施方式中,个体患有晚期癌症,比如基于TNM分期体系的T2、T3、T4、N1、N2、N3或M1期癌症中的任一种。在一些实施方式中,个体具有高肿瘤负荷,比如大的肿瘤尺寸和/或肿瘤床中大数目的癌细胞。在一些实施方式中,个体具有可触及的淋巴结,或者具有扩散至附近淋巴结的癌细胞。在一些实施方式中,个体具有远肿瘤转移。

[0278] 在任何方法的一些实施方式中,癌症选自肺癌、子宫癌、肾癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、头颈癌、胰腺癌和黑素瘤。在一些实施方式中,癌症选自乳腺癌、肺癌和胰腺癌。在一些实施方式中,癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施方式中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方式中,癌症是胰腺导管腺癌(PDAC)。在一些实施方式中,癌症选自肾上腺皮质癌、胆管癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌(endometroid cancer)、食管癌、成胶质细胞瘤(glioblasoma)、头颈癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝癌、低级胶质瘤、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、黑素瘤、间皮瘤、眼黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和子宫癌肉瘤。

[0279] 在一些实施方式中,癌症是实体上皮细胞瘤或肉瘤。在一些实施方式中,癌症选自肾上腺皮质癌、卡波西肉瘤、肛门癌、胃肠道类癌肿瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌(比如膀胱移行细胞癌、膀胱鳞状细胞癌和膀胱腺癌)、骨癌(比如尤文氏肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、乳腺癌(比如导管癌、小叶癌、纤维腺瘤)、支气管肿瘤、原发灶不明转移癌、宫颈癌、脊索瘤、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、食道癌(包括食管鳞状细胞癌和食管腺癌)、眼内黑素瘤、卵巢癌(比如卵巢上皮癌、输卵管癌和腹膜癌)、胆囊癌、胃癌、头颈癌(比如下咽癌、喉癌、嘴唇和口腔癌(lip and oral cavity cancer)、利用隐匿性初级治疗的转移性鳞状颈癌(metastatic squamous neck cancer with occult primary treatment)、鼻咽癌、口咽癌、鼻旁窦和鼻腔癌、唾液腺癌以及化学疗法和头/颈辐射的口腔并发症)、心脏肿瘤(比如横纹肌瘤、粘液瘤、纤维瘤、纤维肉瘤和血管肉瘤)、肝细胞(肝)癌、肾癌(比如肾细胞癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌以及维尔姆斯肿瘤)、肺癌(比如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、皮肤癌(比如基底细胞癌、鳞状细胞癌、皮肤神经内分泌癌、黑素瘤和梅克尔细胞癌)、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、子宫肉瘤(比如平滑肌肉瘤和子宫内膜间质肉瘤)、小肠癌(比如小肠腺癌和小肠肉瘤,以及胃肠道间质瘤)、软组织肉瘤(比如成人软组织肉瘤和小儿软组织肉瘤)、甲状腺癌(比如甲状腺乳头状

癌、甲状腺滤泡性癌、甲状腺髓样癌和甲状腺未分化癌)、尿道癌(包括尿道移行细胞癌、尿道鳞状细胞癌和尿道腺瘤)、阴道癌(比如阴道鳞状细胞癌和阴道腺瘤)和外阴癌。

[0280] 在方法的一些实施方式中,该方法是一线疗法。

[0281] 在一些实施方式中,癌症处于晚期(比如III期或IV期)。在一些实施方式中,癌症是转移癌。

[0282] 如使用聚合的-酶/抗体缀合物测定的目标分析物水平(即,高或低)的分类或等级可以相对于对照水平的统计学分布测定。在一些实施方式中,分类或等级相对于对照样本比如正常组织。在一些实施方式中,目标分析物的水平相对于对照水平的统计学分布进行分类或分级。在一些实施方式中,目标分析物的水平相对于从个体获得的对照样本的水平进行分类或分级。

[0283] 对照样本可以使用与非对照样本相同的来源和方法获得。在一些实施方式中,对照样本从不同个体(例如,不患癌症的个体,患有与癌症对应的良性或较早期(less advanced)形式疾病的个体,和/或共享相似的种族、年龄和性别特性的个体)获得。在一些实施方式中,当样本是肿瘤组织样本时,对照样本可以是来自相同个体的非癌样本。在一些实施方式中,多种对照样本(例如来自不同个体的)被用于测定特定组织、器官或细胞群中目标分析物水平的范围。

[0284] 在一些实施方式中,生物信息学方法被用于对目标分析物的水平进行测定和分类。

[0285] 在一些实施方式中,目标分析物水平使用聚合的-酶/抗体缀合物例如通过直接免疫组织化学进行测定。例如,低或高水平的标准可以基于阳性染色细胞的数目和/或染色的强度创建,例如通过使用特异性地识别目标分析物的抗体。在一些实施方式中,如果少于大约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%的细胞含有阳性染色,则水平是低的。在一些实施方式中,如果染色的强度比阳性对照染色小1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%,则水平是低的。在一些实施方式中,如果多于大约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%的细胞具有阳性染色,则水平是高的。

[0286] 在一些实施方式中,如果聚合的-酶/抗体缀合物的染色与阳性对照染色的强度一样,则水平是高的。在一些实施方式中,如果聚合的-酶/抗体缀合物的染色的强度是聚合的-酶/抗体缀合物的阳性对照染色的强度的80%、85%或90%,则水平是高的。

[0287] 在一些实施方式中,强染色、中等染色和弱染色是聚合的-酶/抗体缀合物的染色的校准水平,其中建立范围并且染色的强度置于(bin)该范围内。在一些实施方式中,强染色是高于强度范围的75%的聚合的-酶/抗体缀合物的染色,中等染色是强度范围的25%-75%的聚合的-酶/抗体缀合物的染色,并且弱染色是低于强度范围的25%的聚合的-酶/抗体缀合物的染色。在一些方面,本领域技术人员和熟悉具体染色技术的人员调节面元大小(bin size)并限定染色类别。

[0288] 在一些实施方式中,如样本、患者等中的目标分析物水平——如通过聚合的-酶/抗体缀合物测定的——的评估和评分由一个或多个有经验的临床医生——即在使用聚合的-酶/抗体缀合物的目标分析物表达和目标分析物染色模式方面有经验的那些——执行。例如,在一些实施方式中,临床医生(一个或多个)对正在评估和评分的样本、患者等的临床

特性和结果不知情。

[0289] 在一些实施方式中,本文描述的方法在诊所中执行。在一些实施方式中,本文描述的方法在诊所外执行。在一些实施方式中,本文描述的方法在诊断实验室执行。

[0290] 111. 试剂盒

[0291] 在进一步方面,本发明提供了包含本发明的一种或多种组合物以及使用组合物和/或实行公开的方法的说明书的试剂盒。

[0292] 在一些实施方式中,本发明提供了与上面描述的免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。因为抗体通常被用于检测野生型和/或突变体蛋白质、多肽和/或肽,所以抗体将优选地被包含在试剂盒中。免疫检测试剂盒将因而包括——在适合的容器工具中——结合至野生型和/或突变体蛋白质、多肽和/或肽的一次抗体,和/或任选地免疫检测试剂,和/或进一步任选地,野生型和/或突变体蛋白质、多肽和/或肽。

[0293] 试剂盒的免疫检测试剂可以采取多种形式中的任一种,包括与给定一次抗体相关联的和/或连接的那些可检测的标签——优选地作为聚合的-酶/抗体缀合物。

[0294] 试剂盒可以进一步包括野生型和/或突变体蛋白质、多肽和/或肽的适合的等分组合物,无论是标记的和/或未标记的,其可被用于制备检测测定的标准曲线。试剂盒可以包含抗体-标签缀合物,其以完全缀合形式、中间体形式、和/或作为待被试剂盒的使用者缀合的单独部分。试剂盒的成分可以以水性介质和/或以冻干形式包装。

[0295] 试剂盒的容器工具将通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器和/或其它容器工具,抗体可以放置在其中,和/或优选地,在其中适当地等分。本发明的试剂盒还将通常包括容纳抗体、抗原的工具,和/或用于商业出售的封闭限制的任何其它试剂容器。这类容器可以包括注射和/或吹塑成型的塑料容器,期望的小瓶被保持在其内。

[0296] 本发明的试剂盒处于适合的包装中。适合的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、软包装(例如,聚酯薄膜或塑料袋)等。试剂盒可以任选地提供额外的组件,比如缓冲液和解释信息。本发明因而还提供了制品,其包括小瓶(比如密封的小瓶)、瓶、罐、软包装等。

[0297] 例如,在本发明的一个实施方式中,试剂盒将在宽的临床和研究环境中评估全面范围(panel)的分子(例如,癌症的临床相关预后和预测因子)。

[0298] 在一些实施方式中,试剂盒将进一步包括根据本文描述的任何方法的使用说明书。试剂盒可以包括对适合于治疗的个体的选择的说明。本发明的试剂盒中提供的说明书通常为标签或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸张)上的书面指示,但是机器可读的指示(例如,磁性或光学存储盘上携带的指示)也是可以接受的。

[0299] 例如,在一些实施方式中,试剂盒包括a) 聚合的-酶/抗体缀合物。在一些实施方式中,试剂盒包括a) 聚合的-酶/抗体缀合物,和b) 使用说明书。在一些实施方式中,试剂盒包括a) 聚合的-酶/抗体缀合物,和b) 聚合的-酶的底物。在一些实施方式中,试剂盒包括a) 聚合的-酶/抗体缀合物,b) 聚合的-酶的底物,和c) 使用说明书。在一些实施方式中,聚合的-酶是聚合的-HRP。在一些实施方式中,抗体是治疗性抗体。

[0300] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方式,但是对于本领域技术人员显而易见的是这些实施方式仅通过举例的方式提供。本领域技术人员将在不背离本发明的情况下想到众多变化、改变和替换。应当理解,本文描述的发明的实施方式的各种替代方案可以在实践本发明中采用。目的是所附权利要求书限定本发明的范围并且在这些权利要求范

围内的方法和结构以及其等价物由此被涵盖。

[0301] 实施例

[0302] 阐明本发明的复合物的制备的如下实施例进一步示例本发明但不对其进行限制。

[0303] 实施例1. 在冷冻组织载玻片上直接IHC的方案

[0304] 该实施例展示了用于对从冷冻组织样本获得的组织切片进行直接IHC的方案。

[0305] 组织切片如在下面的示例性方法中描述的进行制备。将新鲜地切开的组织块(<5mm厚)放置在预先标记的组织基底模具上。用冷包埋介质(例如,OCT)覆盖整个组织块。将包含组织块的基底模具缓慢地置于液氮中,将整个组织块浸没在液氮中以确保组织块被完全冷冻。将冷冻的组织块转移至低温切片器(cryotome)恒冷箱(例如,-20°C)。使用低温切片器将冷冻的组织块切片成期望的厚度(通常地5-10µm)。将组织切片放置在适合于免疫组织化学的玻璃载玻片上(例如, **Superfrost®Plus**, VWR)。

[0306] 组织切片如在下面的示例性方法中描述的进行免疫染色。组织切片利用包含75%的甲醇、5%的冰醋酸和20%的37%甲醛的固定剂固定1至2分钟。然后将具有组织切片的载玻片利用封闭缓冲液——例如,5%脱脂乳或2%BSA——封闭2分钟。在封闭之后,载玻片在中性pH下的10mM磷酸盐缓冲盐水(PBS)中清洗10秒;载玻片被清洗3次。将用1%BSA稀释的聚合的-HRP/抗体缀合物施加至载玻片以覆盖组织切片的整个区域并且在室温下孵育3至5分钟。在孵育之后,载玻片用PBS缓冲液洗涤3次,每次10秒。将DAB溶液施加至载玻片以覆盖组织切片的整个区域并且孵育1至3分钟。通过利用自来水洗涤使反应停止。载玻片利用苏木精复染10秒,然后用水洗涤。随后,将载玻片短暂地浸入酸性乙醇(0.25%的酸性乙醇溶液,通过结合11mL浓盐酸和4400mL的80%乙醇);将载玻片浸入1至3次。然后,将载玻片短暂地浸入碳酸锂(碳酸锂溶液,通过结合2.3g碳酸锂和200mL的80%乙醇)15秒,然后在自来水中清洗10秒。然后,将载玻片浸入100%乙醇三次,每次持续10秒,以使组织切片脱水。在脱水之后,通过浸入二甲苯三次每次10秒清洁载玻片。

[0307] 实施例2. 组织载玻片的脱蜡和再水化

[0308] 该实施例展示了在组织切片的脱蜡、再水化和表位恢复之后对组织切片进行直接IHC的方案。

[0309] 将具有组织切片的载玻片浸入二甲苯5分钟。二甲苯浸入利用清洁二甲苯再重复两次,每次5分钟。然后,将载玻片浸入以下系列的乙醇溶液:100%乙醇持续3分钟;100%乙醇持续3分钟;95%乙醇持续3分钟;和75%乙醇持续3分钟。随后通过将载玻片浸入清洁自来水中持续3分钟,在自来水中清洗载玻片;另外重复两次。

[0310] 在组织切片的再水化之后,使用胰蛋白酶暴露蛋白质表位。首先,0.1%胰蛋白酶溶液在0.1%氯化钙中使用蒸馏水制备。使用1M氢氧化钠将胰蛋白酶溶液的pH调节至7.2。将加湿室、0.1%胰蛋白酶溶液和在蒸馏水中的具有组织切片的载玻片在37°C下预热。随后,将具有组织切片的载玻片在0.1%胰蛋白酶溶液中孵育20分钟。然后,使载玻片在室温下冷却10分钟。10分钟后,通过将载玻片浸入清洁自来水中2分钟,在自来水中清洗载玻片;另外重复一次。然后将载玻片在3%过氧化氢溶液中封闭2分钟。然后通过浸入载玻片持续2分钟,将载玻片在具有0.05%的吐温20的PBS中清洗;另外重复一次。随后,将载玻片在1%BSA中封闭30分钟。

[0311] 在封闭之后,组织切片利用聚合的-HRP/抗体缀合物免疫染色。将包含聚合的-

HRP/抗体缀合物的溶液施加至载玻片以覆盖组织切片的整个区域并在室温下孵育5至30分钟。孵育之后,利用PBS吐温20缓冲液洗涤载玻片3次,每次两分钟。

[0312] 将包含30 μ l色原/1mL稀释剂的DAB溶液施加至载玻片以覆盖组织切片的整个区域并在室温下孵育5分钟。通过利用自来水洗涤使反应停止。利用苏木精对载玻片复染10秒,然后利用水洗涤。然后将载玻片浸入pH 8的0.1%碳酸钠(发蓝溶液(bluing solution))中持续15秒。随后,通过将载玻片浸入如下溶液将载玻片上的组织切片脱水:95%乙醇持续3分钟;100%乙醇持续3分钟;和100%乙醇持续3分钟。然后在二甲苯中洗涤2.5分钟。随后,通过将载玻片浸入二甲苯中两次清洁载玻片,每次10秒。

[0313] 实施例3.使用聚合的-HRP抗Ck8/18抗体缀合物的直接IHC

[0314] 该实施例展示了使用利用聚合的-HRP抗Ck8/18抗体缀合物的直接IHC染色检测组织样本中的Ck8/18。

[0315] 使用实施例1和2中描述的技术制备FFPE前列腺组织切片和冷冻的人淋巴结组织切片并免疫染色。使用胰蛋白酶处理FFPE前列腺组织切片以恢复蛋白质表位,并且将聚合的-HRP缀合的抗Ck8/18小鼠单克隆抗体与组织样本在37 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。将冷冻的人淋巴结组织切片与聚合的-HRP缀合的抗Ck8/18小鼠单克隆抗体在室温下一起孵育3分钟。

[0316] 对于FFPE前列腺组织切片(图9A)和冷冻的人淋巴结组织切片(图9B)提供了染色癌组织的代表性图像。

[0317] 实施例4.使用聚合的-HRP抗Ki-67抗体缀合物的直接IHC

[0318] 该实施例展示了使用利用聚合的-HRP抗Ki-67抗体缀合物的直接IHC染色检测组织样本中的Ki-67。

[0319] 使用实施例1和2中描述的技术制备人扁桃体组织切片并免疫染色。另外,组织切片利用Q-染色剂染色。

[0320] 对于人扁桃体组织切片,提供了抗Ki-67染色组织的代表性图像(图10)。

[0321] 实施例5.使用聚合的-HRP抗Ck5抗体缀合物的直接IHC

[0322] 该实施例展示了使用利用聚合的-HRP抗Ck5抗体缀合物的直接IHC染色检测人扁桃体组织样本中的Ck5。

[0323] 使用实施例1和2中描述的技术制备冷冻的人扁桃体组织切片并免疫染色。将冷冻的人扁桃体组织切片与聚合的-HRP抗Ck5抗体缀合物在室温下一起孵育10分钟。

[0324] 对于人扁桃体组织切片提供了抗Ck5染色组织的代表性图像(图11)。

[0325] 实施例6.使用聚合的-HRP抗Mart-1抗体缀合物的直接IHC

[0326] 该实施例展示了使用利用聚合的-HRP抗Mart-1抗体克隆A103缀合物的直接IHC染色检测黑素瘤组织样本中的Mart-1。

[0327] 使用实施例1和2中描述的技术制备黑素瘤组织切片并免疫染色。

[0328] 对于黑素瘤组织切片,提供了抗Mart-1染色组织的代表性图像(图12)。

[0329] 实施例7.使用聚合的-HRP抗CD45抗体缀合物的直接IHC

[0330] 该实施例展示了使用利用聚合的-HRP抗CD45抗体克隆3A4缀合物的直接IHC染色检测扁桃体组织样本中的CD45。

[0331] 使用实施例1和2中描述的技术制备扁桃体组织切片并免疫染色。

[0332] 对于扁桃体组织切片,提供了抗CD45染色组织的代表性图像(图13)。

[0333] 实施例8.使用治疗性抗体的直接IHC的方法和结果

[0334] 该实施例展示了使用缀合有聚合的-HRP的治疗性抗体对多种组织样本直接IHC染色的方法。

[0335] 获得特异性地结合ROR2的人治疗性抗体。用聚合的-HRP标记治疗性抗体以产生治疗性抗体的聚合的-HRP缀合物。

[0336] 使用本文描述的技术,比如实施例1和2中描述的那些技术,制备组织切片并免疫染色。

[0337] 免疫染色的图像被评分为“0-4”,其中4为最强,“3-4”为阳性,“1-2”为弱阳性以及0为阴性。

[0338] 聚合的-HRP抗ROR2抗体缀合物的工作条件基于已知表达或不表达ROR2的组织切片优化。已知的阳性和阴性组织切片的染色分类结果在表1中报告。利用与组织样本中ROR2的已知表达相关的本方法识别表达ROR2的组织。

[0339] 表1.组织样本的染色分类

[0340]

组织样本	染色分类
胃	阳性
肾脏	阳性
扁桃体	阴性
皮肤	阴性
乳房	阴性
肌肉	阴性
粘膜	阴性
结肠	阴性
阑尾	阴性
肺	阴性
肝脏	阴性
肾上腺	阴性
甲状腺	阴性
胰腺	阴性
胎盘	阴性
前列腺	阴性

[0341] 对于下列,提供了染色组织的代表性图像:扁桃体(图14A)、前列腺(图14B)、胃(图14C)和肾脏(图14D)。

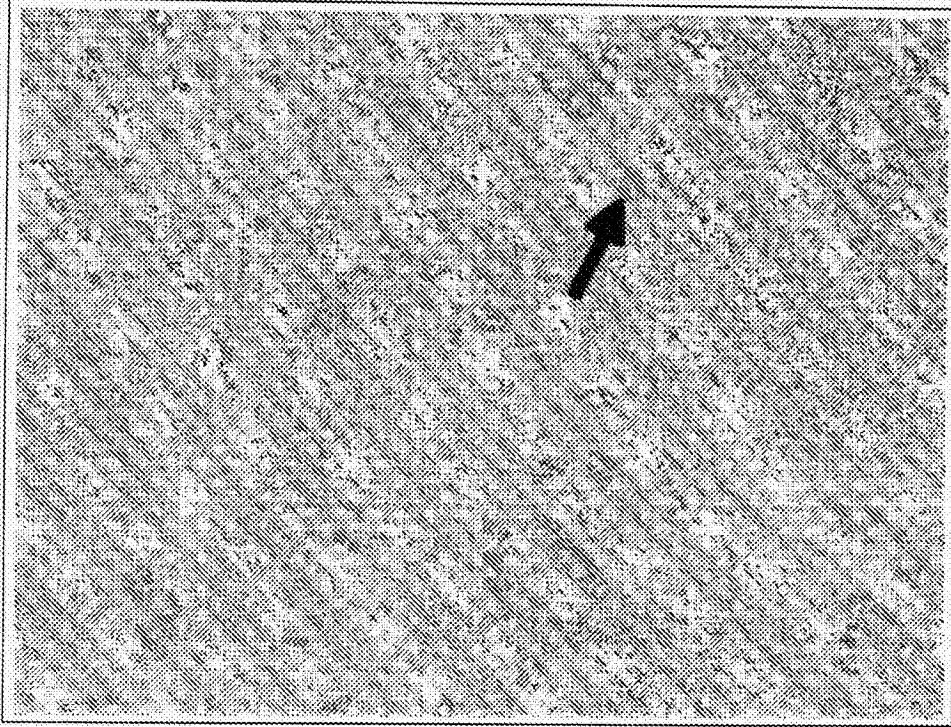
[0342] 随后,使用聚合的-HRP抗ROR2抗体缀合物的优化的直接IHC方法被用于对一系列癌组织样本进行分类。染色分类结果在表2中报告。

[0343] 表2.癌组织样本的ROR2染色分类

癌组织样本	ROR2 染色分类
黑素瘤	阳性
神经内分泌肿瘤	阳性
肝细胞癌	阳性
肾透明细胞癌	阳性
[0344] 肺腺癌	弱阳性
大 B 细胞淋巴瘤	阴性
乳腺癌	阴性
结肠腺癌	阴性
甲状腺癌	阴性
口腔鳞状细胞癌	阴性
[0345] 卵巢浆液性癌	阴性

[0346] 对于下列,提供了直接IHC染色组织的代表性图像:黑素瘤(图15A和15B)、肝细胞癌(图15C和15D)、神经内分泌肿瘤(图15E和15F)、肺癌(图15G)和肾透明细胞癌(图15H)。

A



B



图1

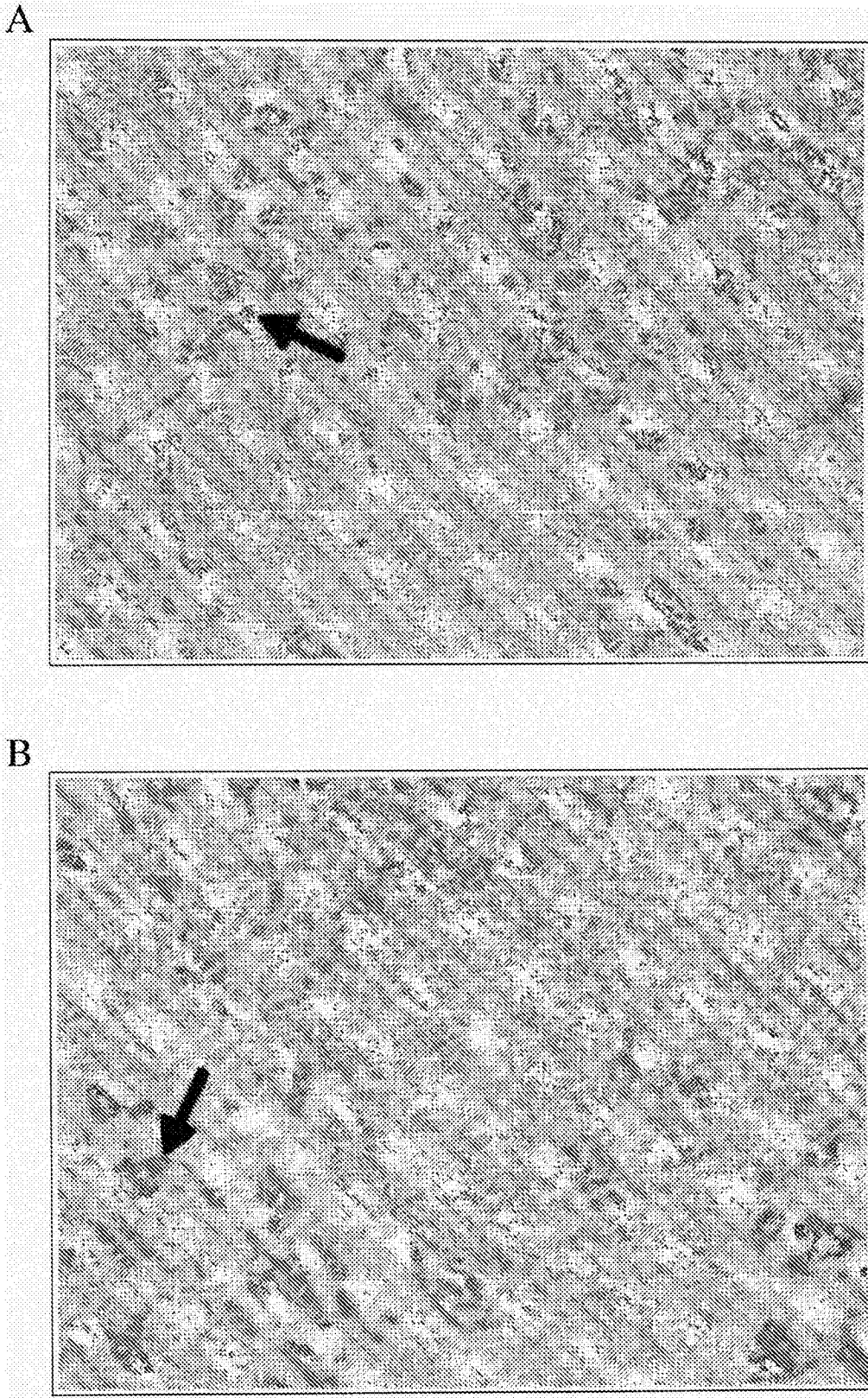
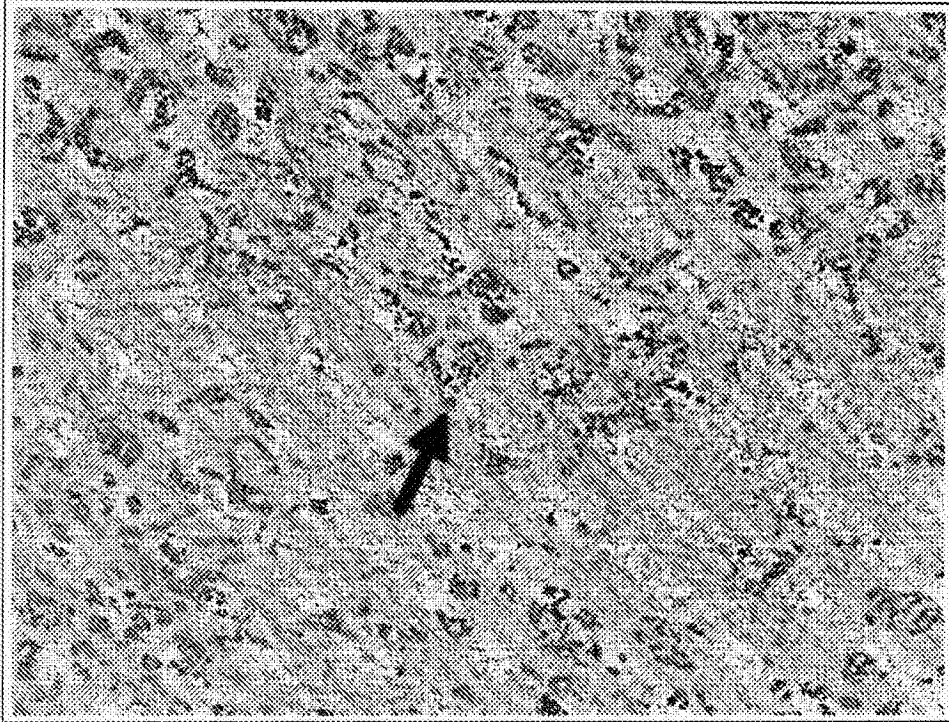


图2

A



B

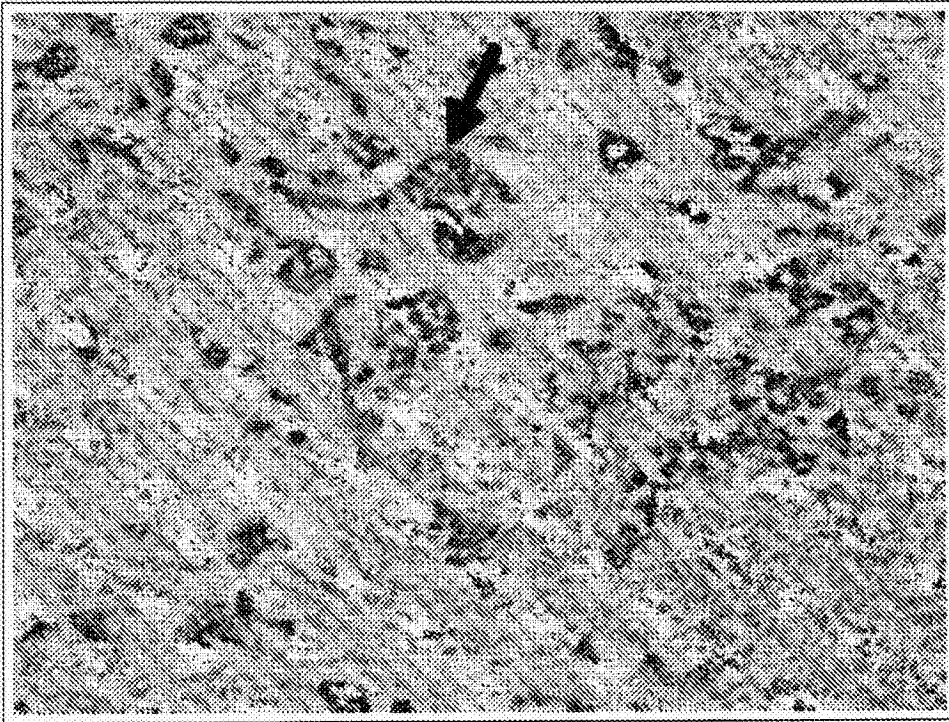
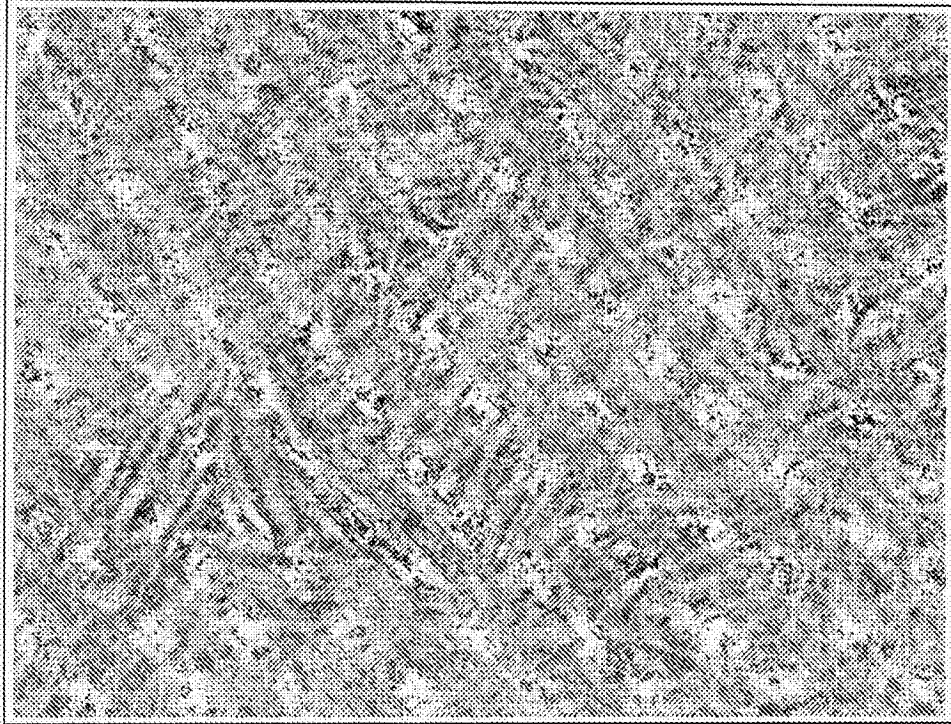


图3

A



B

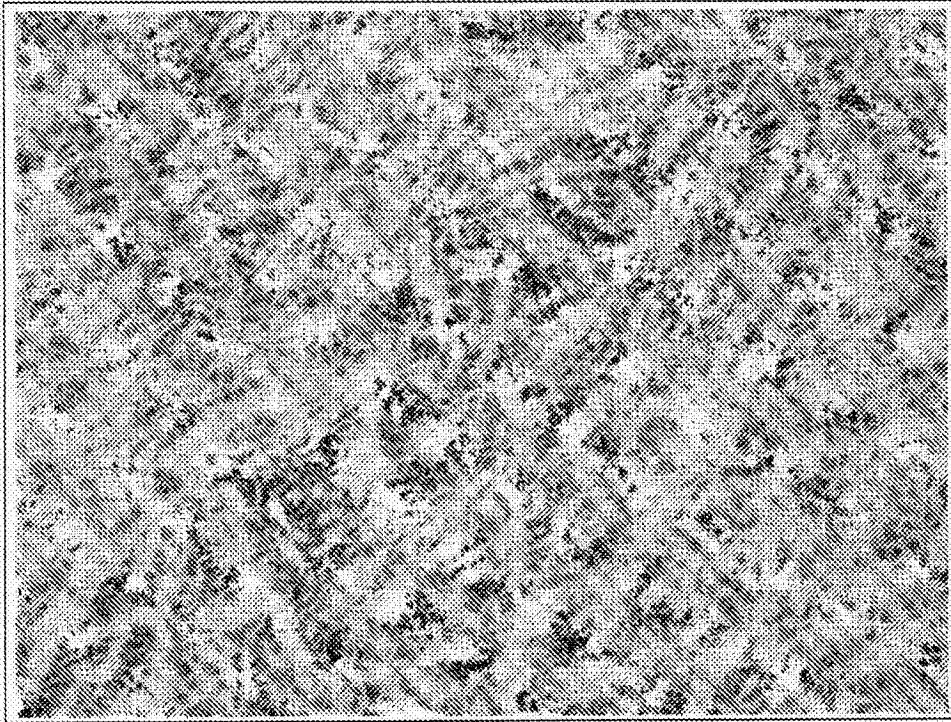


图4



图5



图6

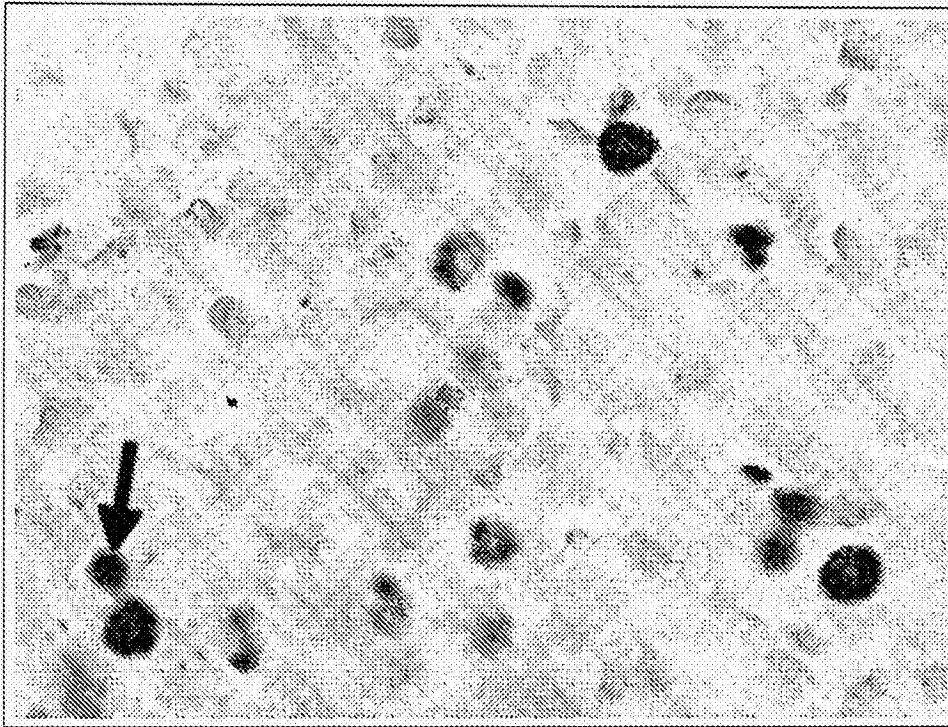
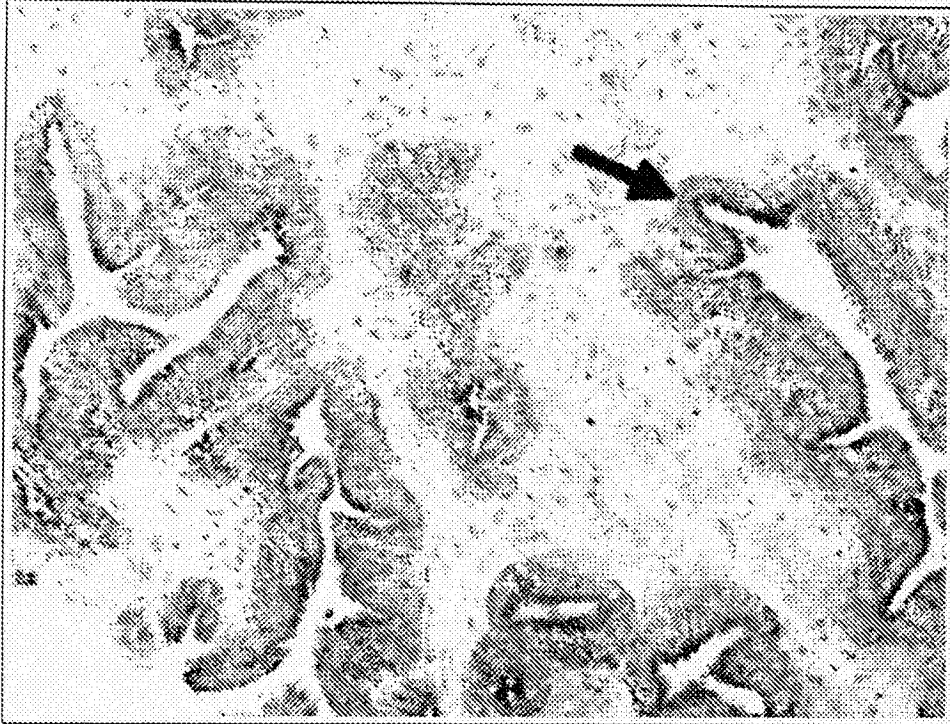


图7

A



B

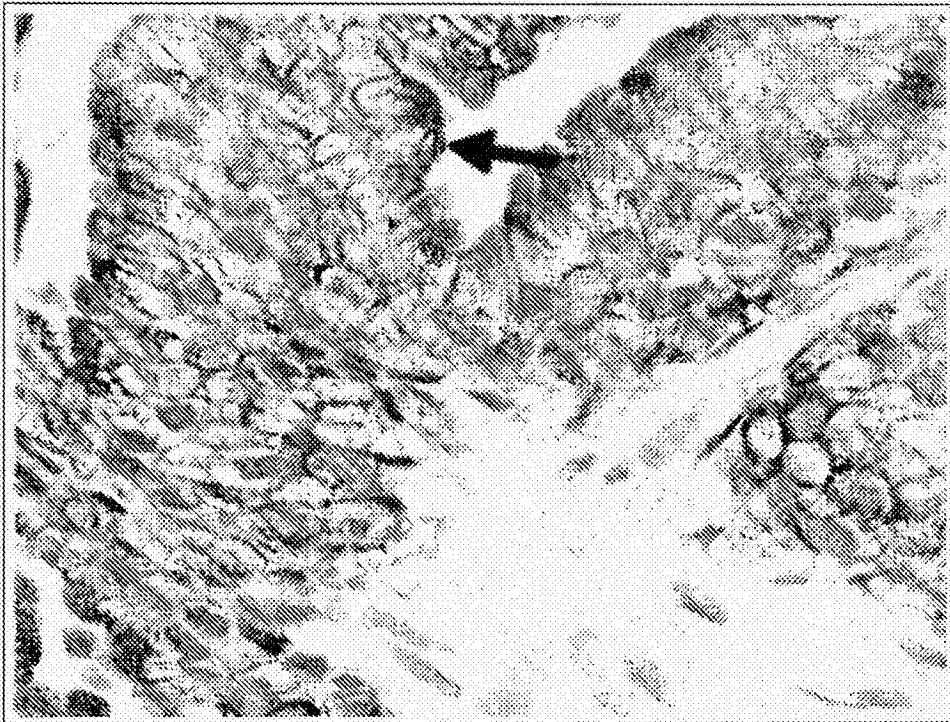
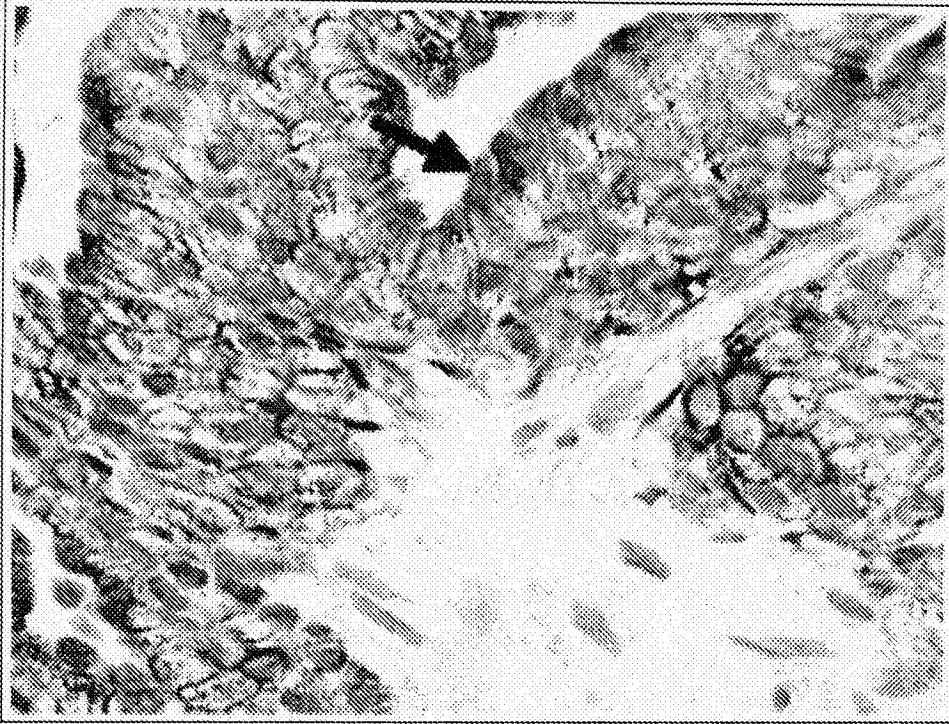


图8

A



B

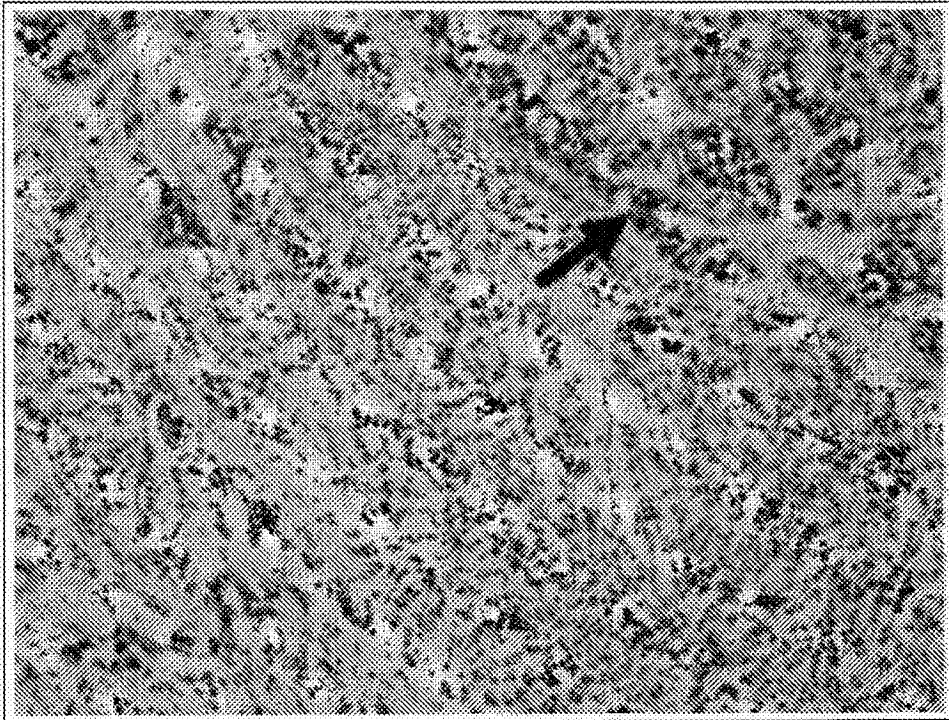


图9

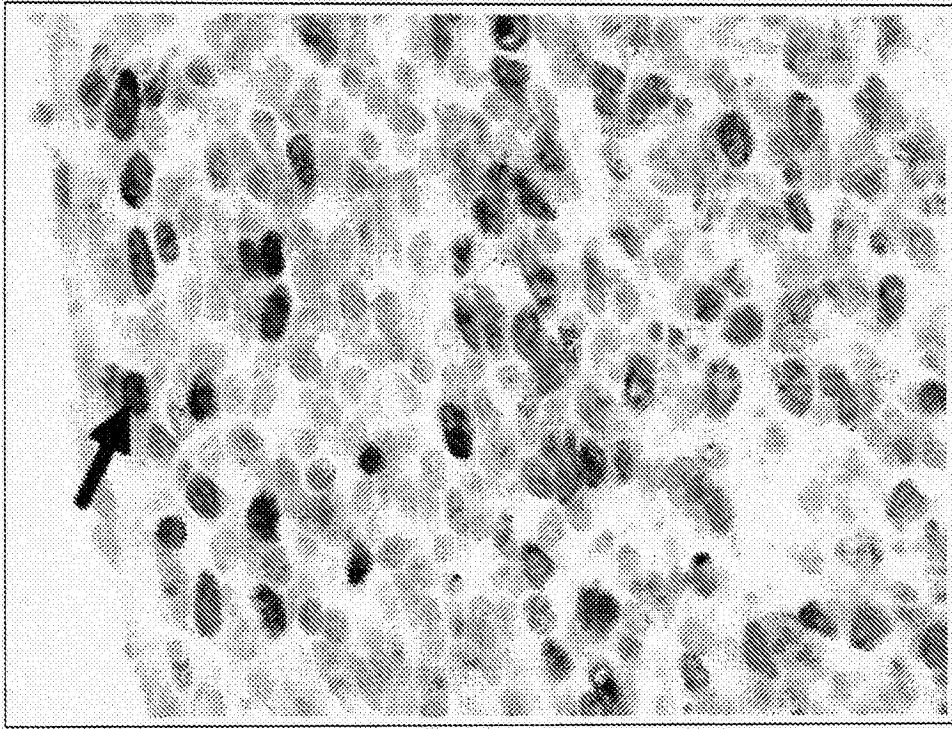


图10

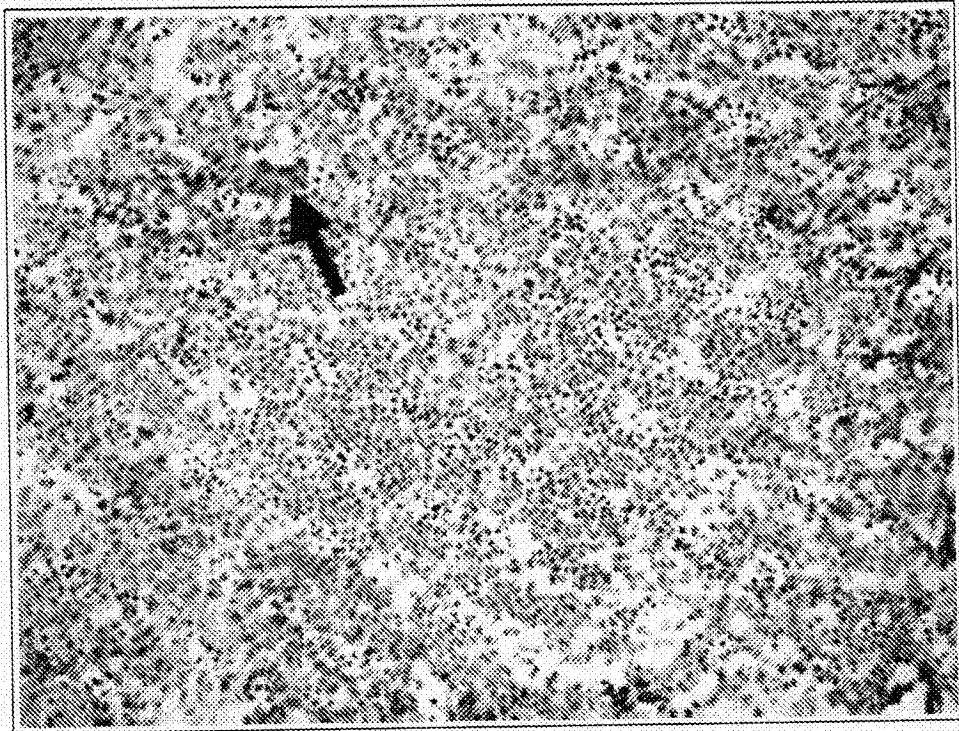


图11

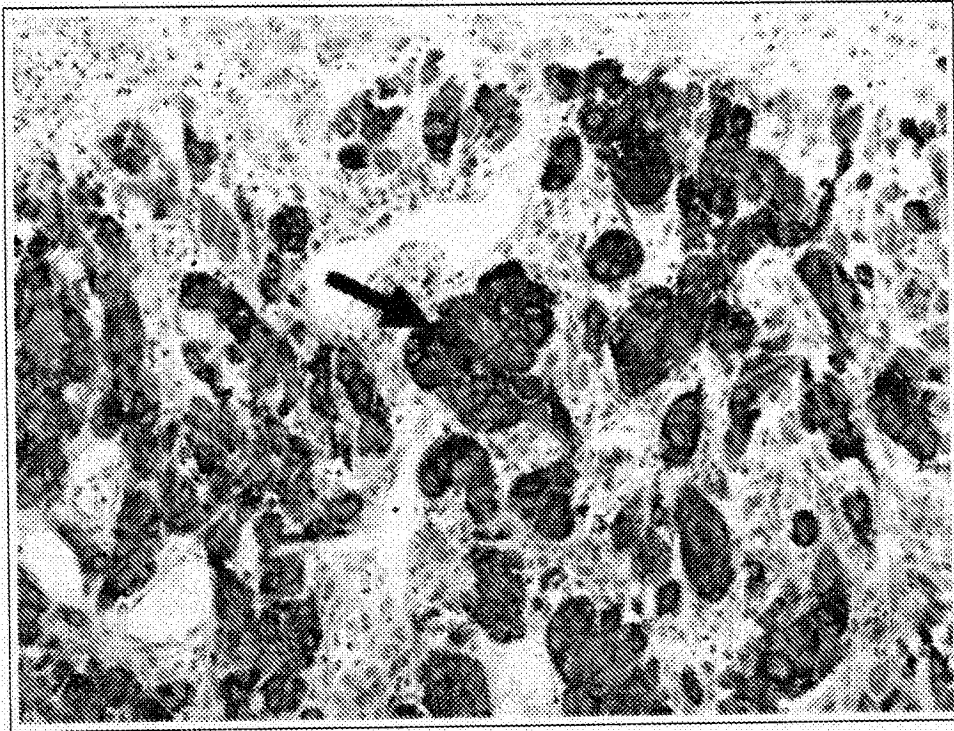


图12

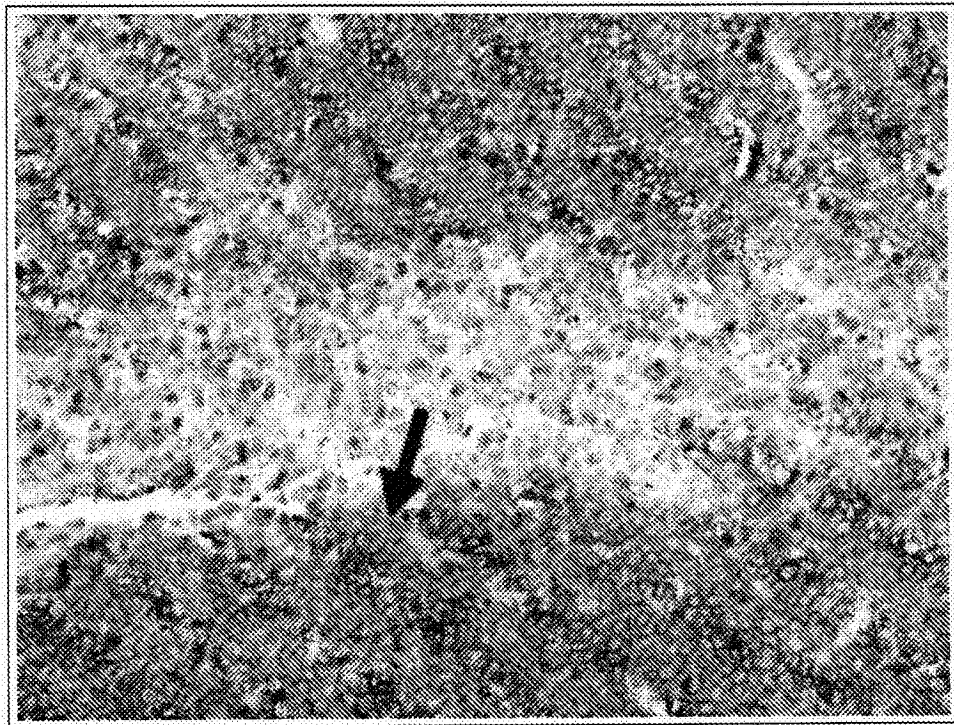


图13

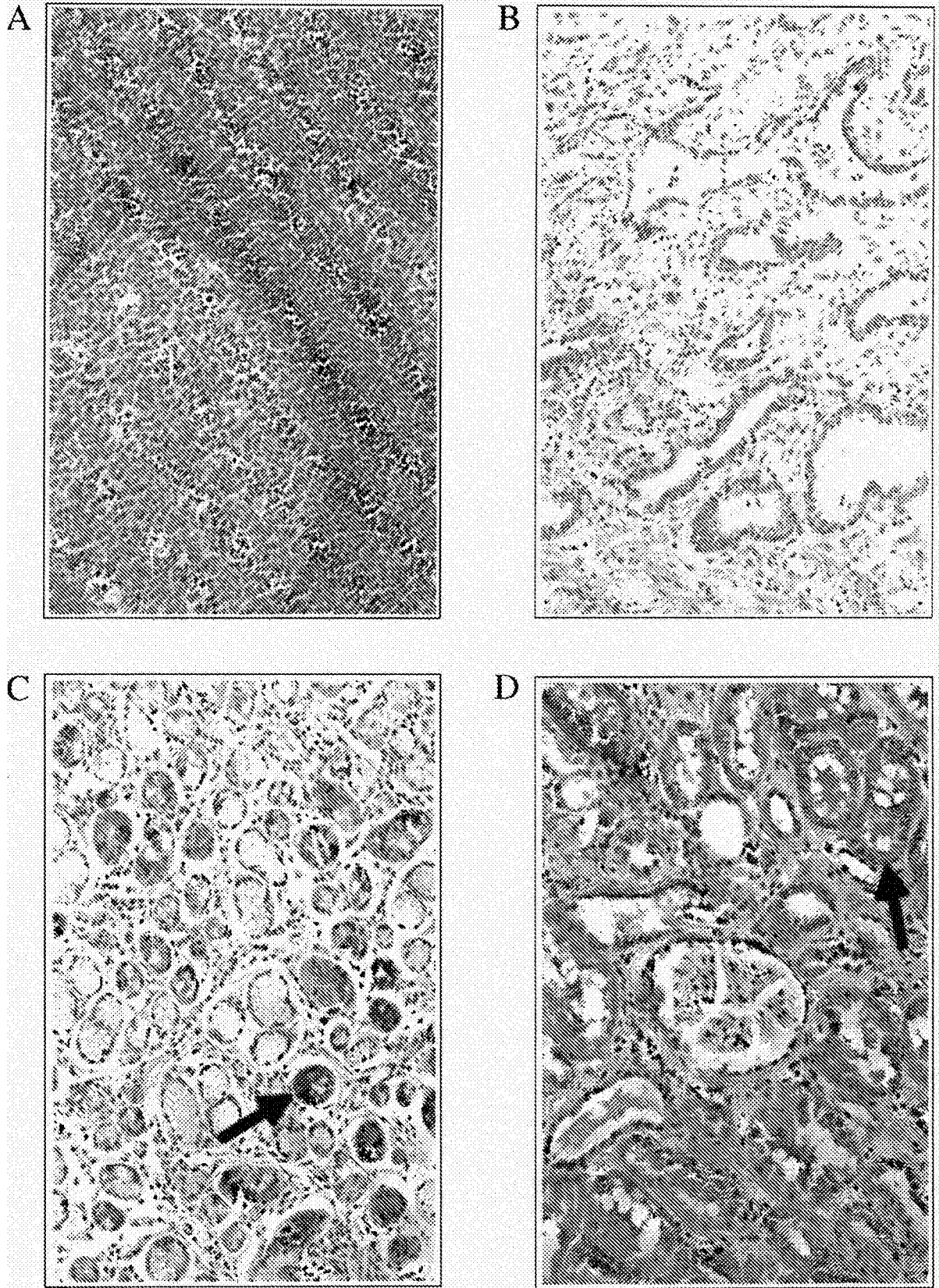
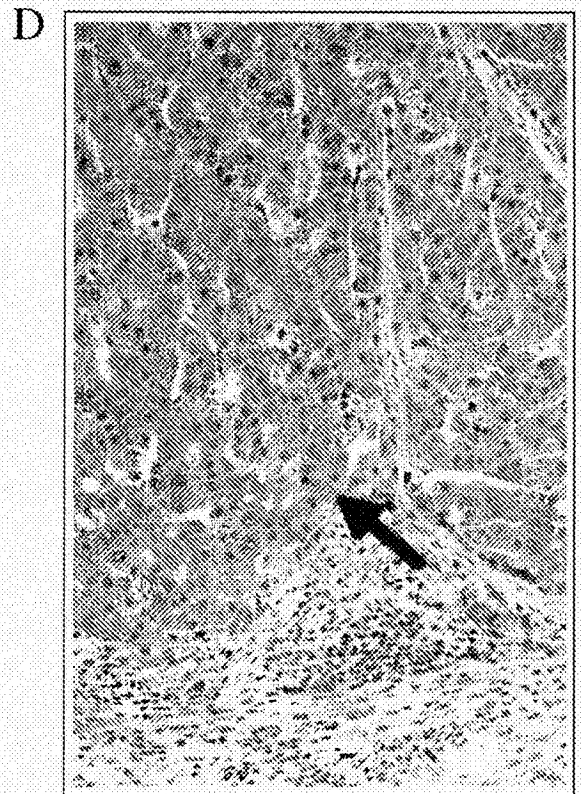
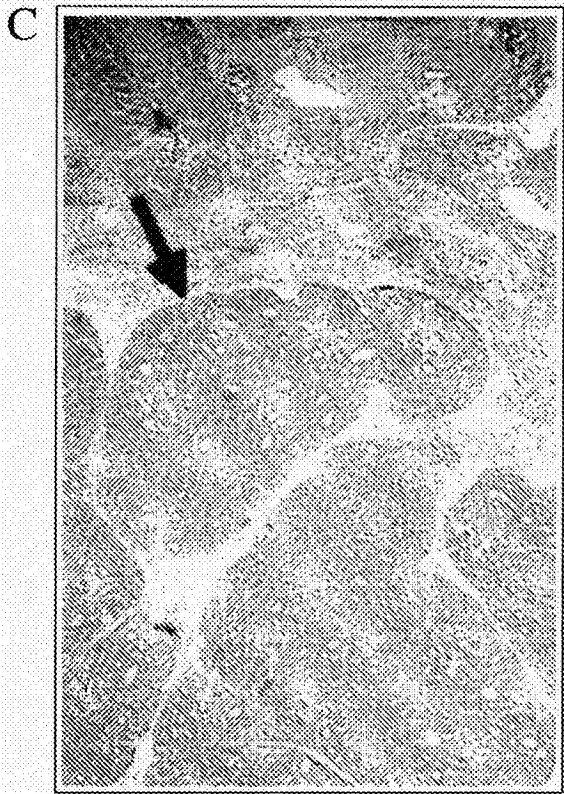
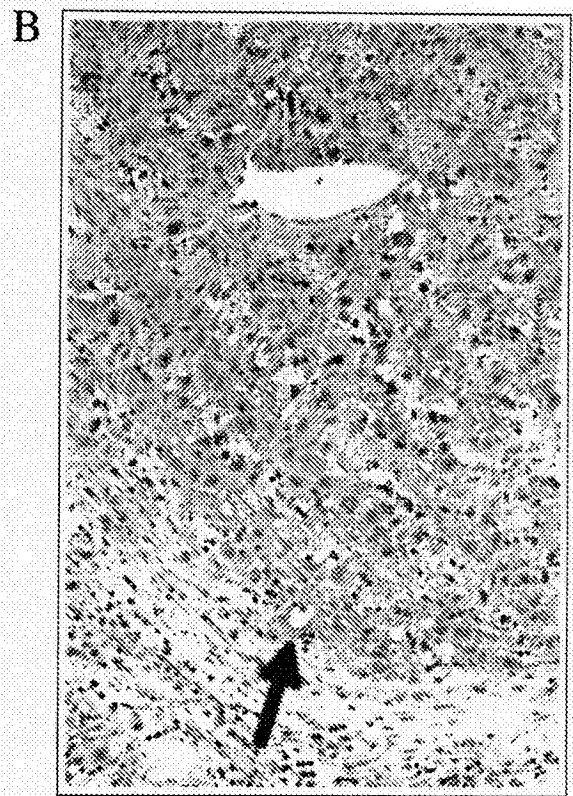
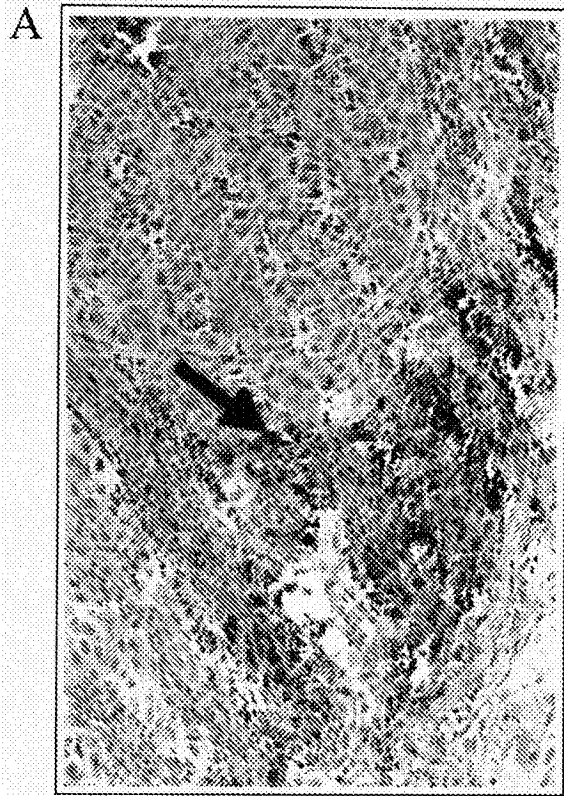


图14



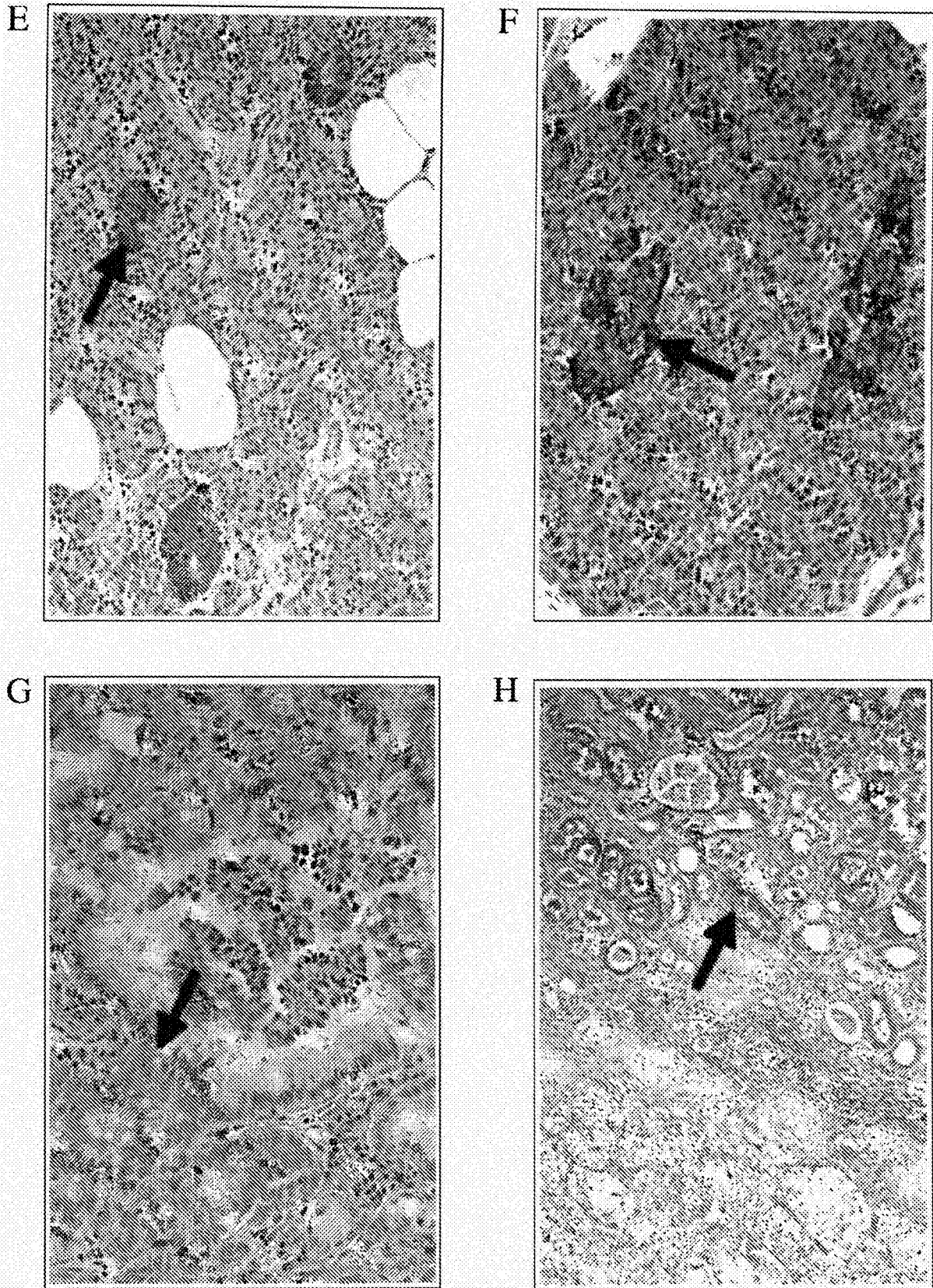


图15

专利名称(译)	直接免疫组织化学测定		
公开(公告)号	CN106415269A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201580024002.7	申请日	2015-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃迪亚斯公司		
申请(专利权)人(译)	诺沃迪亚斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺沃迪亚斯公司		
[标]发明人	S Q 赵 JJ王 J V 吴 Z张		
发明人	S·Q·赵 J·J·王 J·V·吴 Z·张		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 C07K16/18 C07K16/2803 C07K16/289 C07K16/3053 C07K2317/21		
代理人(译)	张全信 董志勇		
优先权	61/990111 2014-05-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及在组织的直接免疫组织化学测定中使用的抗体，其已经标记有聚酶(多个酶)，特别是聚过氧化物酶。在诊断上使用的抗体也可以是在治疗上使用的抗体。

