



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103201627 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201180053856.X

(22)申请日 2011.11.08

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103201627 A

(43)申请公布日 2013.07.10

(30)优先权数据  
61/411,050 2010.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/DK2011/000131 2011.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/062318 EN 2012.05.18

(73)专利权人 丹麦达科有限公司  
地址 丹麦,格洛斯楚普

(72)发明人 J.洛泽 G.斯克拉蒂奇克瓦

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳 顾小曼

(51)Int.Cl.  
*G01N 33/53*(2006.01)  
*G01N 33/58*(2006.01)

(56)对比文件  
WO 2011/047680 A1,2011.04.28,  
CN 102713626 A,2012.10.03,  
WO 2010/094284 A1,2010.08.26,  
WO 2010/094283 A1,2010.08.26,  
WO 2009/036760 A2,2009.03.26,  
WO 2006/116628 A2,2006.11.02,  
WO 02/088376 A2,2002.11.07,

审查员 苗君叶

权利要求书4页 说明书56页 附图6页

### (54)发明名称

组织学样品中单个靶标分子的定量

### (57)摘要

本发明属于使用免疫化学手段对样品中固定靶标进行可视化和定量的领域。本发明的方法利用允许使样品中的单个靶标单元可视化为明显的点的免疫染色体系。具体地,本发明涉及用于对组织学样品中免疫染色的分子靶标进行可视化和定量的方法和试剂以及所述方法和试剂在医学诊断中的用途。然而本发明的可视化和定量方法可以应用于不同样品中的多种靶标,并且允许对其相对和绝对量进行精确定量。

1. 一种用于非医学诊断目的的对样品中存在的靶标进行定量的方法,其中所述靶标是固定的,包括

- (a) 将包括所述靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,其中
  - (i) 至少一种所述结合剂能够与所述靶标的单个单独单元特异结合;并且
  - (ii) 至少一种所述结合剂包括酶,

从而形成具有所述靶标的单个单独单元的预定部分分子群的一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个离散的单个靶标部位包括所述靶标的一个单独单元与一种或多种结合剂的复合物,其中至少一种结合剂包括所述酶;

- (b) 使包括所述酶的所述离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;
  - (c) 对所述视觉上明显的点进行定量;
  - (d) 评估所述样品中靶标的量,
- 其中步骤(a)包括以下处理之一:

(1) 将所述样品与第一结合剂孵育,其中所述第一结合剂能够与所述靶标的单个单独单元特异结合并使所述样品中所有结合位点基本上饱和,并且一部分所述第一结合剂包括酶并且所述一部分是预定的;或

(2) 将所述样品与第一和第二结合剂孵育,其中第一结合剂能够与所述靶标的单个单独单元特异结合并使所述样品中所有结合位点基本上饱和,且第二结合剂能够与所述第一结合剂特异结合,且一部分所述第二结合剂包括酶并且所述一部分是预定的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述结合剂是特异结合对的成员。

3. 根据权利要求1~2中任一项所述的方法,其中所述酶是具有氧化还原酶活性的酶。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述酶具有过氧化物酶活性或酚氧化酶活性。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述酶是辣根过氧化物酶、大豆过氧化物酶或漆酶。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中使所述离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点的步骤包括:

(1) 在水溶液(A)中孵育包括一个或多个离散的单个靶标部位的样品,所述水溶液(A)包括

小于2mM的量的过氧化物,

与所述离散的单个靶标部位相关的酶的第一底物,以及

所述酶的第二底物,

其中所述第一底物是水溶性富电子化合物,其

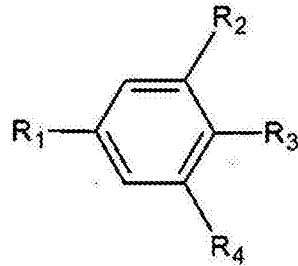
(i) 能够在与所述酶反应时生成自由基;并且

(ii) 能够在所述酶与过氧化物的存在下使所述第二底物的分子交联,从而生成所述第二底物的水不溶性聚合产物,

且其中所述第二底物是包括能够用作为所述酶的底物的至少两个化合物以及可检测的标记物的结合物分子,其中所述可检测的标记物选自发光的、放射性的或发色的物质或特异结合对的成员,

(2) 从而在所述离散的单个靶标部位处形成所述第二底物的离散沉积,并使所述离散的单个靶标部位可视化。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述发光的物质是荧光的物质。  
 8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述酶的第一底物是包括式(I)结构的化合物:



式 (I)

其中, R1是芳基或乙烯基,  
 R2、R3和R4独立地为H、N-(X)<sub>2</sub>、O-(X)<sub>2</sub>, 其中X是烷基、乙烯基或芳基、或H, 且其中R2、R3和R4不同时为H,

其中

H是氢;

O是氧。

9. 根据权利要求6~8中任一项所述的方法, 其中所述化合物是3,3'-二氨基联苯胺或其衍生物。

10. 根据权利要求6~8中任一项所述的方法, 其中所述化合物是阿魏酸或其衍生物。

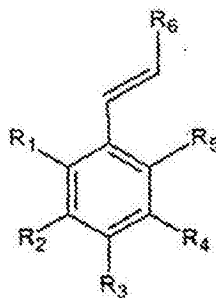
11. 根据权利要求6~8中任一项所述的方法, 其中所述化合物是 $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸。

12. 根据权利要求9所述的方法, 其中3,3'-二氨基联苯胺或其衍生物的量是0.1至小于1mM。

13. 根据权利要求10所述的方法, 其中阿魏酸或其衍生物的量是0.5mM至5mM。

14. 根据权利要求11所述的方法, 其中 $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸的量是1.5mM至15mM。

15. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述结合物分子包括至少一个作为所述酶的底物且由式(II)限定的化合物:



式 (II)

其中

R1是-H、-O-X、N(X)<sub>2</sub>或-S-X;

R2是-H、-O-X、-N(X)<sub>2</sub>或-S-X,

R3是-H、-OH、-NH<sub>2</sub>或-SH;

R4是-H、-O-X、-N(X)<sub>2</sub>或-S-X,

R5是-H、-O-X、N(X)<sub>2</sub>或-S-X,

R6是-CON(X)<sub>2</sub>或CO-X,

其中

H是氢;

O是氧,

S是硫,

N是氮,且

X是H、烷基或芳基。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中至少两个化合物由式(II)限定。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中由式(II)限定的至少两个化合物是相同的化合物。

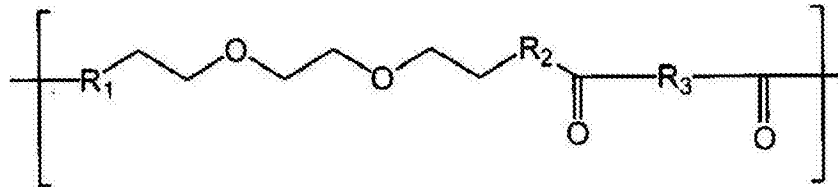
18. 根据权利要求15所述的方法,其中由式(II)限定的至少两个化合物是不同的化合物。

19. 根据权利要求15~18中任一项所述的方法,其中所述化合物选自肉桂酸、阿魏酸、咖啡酸、氨基肉桂酸或芥子酸、或其衍生物。

20. 根据前述权利要求15~18中任一项所述的方法,其中所述结合物分子包括至少一个酪氨酸残基作为所述酶的底物。

21. 根据前述权利要求15~18中任一项所述的方法,其中在所述结合物分子中,能够用作与单个靶标部位相关的所述酶的底物的所述至少两个化合物中的每个在所述结合物分子中相互隔开30个或少于30个连续连接的原子,并且所述可检测的标记物与任意所述底物隔开30个或多于30个连续连接的原子。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中在所述结合物分子中将所述标记物与所述酶的任意底物隔开的所述至少30个连续连接的原子包括下式(III)的2~10个重复:



式 (III)

其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>选自NH和O,且R<sub>3</sub>选自甲基、乙基、丙基、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>和(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,且其中不多于三个连续重复的乙氧基。

23. 根据权利要求6~8中任一项所述的方法,其中由相同结合物分子的群体或不同结合物分子的群体表示所述第二底物,其中所述结合物分子是权利要求13~21中任一项限定的任意一种。

24. 根据权利要求6~8中任一项所述的方法,其中所述方法包括步骤(1)之前的步骤(1'),其中在水溶液(B)中孵育所述样品,所述水溶液(B)除不包括第二底物之外具有与水溶液(A)相同的组成。

25. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述明显的点是具有大约或大于0.4微米的视直径的点。

26. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法在根据权利要求2所述的步骤(a)、

(b)和/或(c)之间包括至少一个洗涤步骤。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶标选自生物或化学的靶标分子、颗粒、分子或细胞结构、或微生物、或所述靶标分子、颗粒、结构或微生物的片段。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述结构是复合物。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述微生物是病毒。

30. 根据权利要求1所述的方法,其中靶标的所述单独单元选自单独单个生物或化学分子、单独单个颗粒、单独单个分子或细胞结构、或单独单个微生物、或所述分子、颗粒、结构或微生物的单独单个片段。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述结构是复合物。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述微生物是病毒。

33. 根据权利要求27~32中任一项所述的方法,其中所述靶标是蛋白或核酸分子、或其片段或衍生物。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述蛋白是胞内蛋白,或细胞核或胞质蛋白,或细胞核或胞质核酸。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述胞内蛋白是胞浆或核膜蛋白。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述胞质蛋白是细胞器蛋白。

37. 根据权利要求34所述的方法,其中所述胞质核酸是细胞器核酸。

38. 根据权利要求27~32中任一项所述的方法,其中所述靶标是生物标记物。

39. 根据权利要求27~32中任一项所述的方法,其中所述靶标是HER2或其产物。

40. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述样品是生物、化学或环境样品。

41. 根据权利要求1或2所述的方法,其中手动、半手动或自动执行对离散的视觉上明显的点的定量。

42. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法用于对样品中靶标的绝对量进行定量。

43. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法用于对样品中靶标的相对量进行定量。

44. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述样品是组织学样品。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中相对于所述样品的单位面积或单位体积、或包括在所述样品中的单位对象或单位参考标记物而评估所述靶标的量。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述对象是细胞结构。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述细胞结构是细胞器。

48. 根据权利要求46或47所述的方法,其中所述对象是细胞核。

49. 根据权利要求45所述的方法,其中所述参考标记物是蛋白或核酸序列。

50. 一种试剂盒,包括用于执行权利要求1~49中任一项所述的方法的试剂,所述试剂包括:作为特异结合对成员的结合剂;作为样品中的靶标的结合配偶体;作为能够与样品中靶标结合的另一结合剂的结合配偶体,

其中一部分所述结合剂包括酶并且所述一部分是预定的。

## 组织学样品中单个靶标分子的定量

### 技术领域

[0001] 本发明属于使用免疫化学手段来对样品中的固定靶标进行可视化和定量的领域。具体而言,本发明涉及对免疫染色的组织学样品中的分子靶标进行定量的方法和试剂,以及所述方法和试剂在医学诊断中的用途。

### 背景技术

[0002] 在免疫组织化学即IHC的领域中,通常使用酶法产生的染料对感兴趣的生物靶标进行染色。然而,大多数现今的IHC酶体系由于受限的灵敏度而对靶标可视化具有有限可用性:如果靶标具有很低的丰度,则无法检测出沉积的染料的量。同样地,存在检测上限,在该检测上限之上时,进一步的染料沉积不会引起可检测的更强烈的染色。使用较低浓度的试剂,检测上限可以折衷以允许高丰度靶标与很高丰度靶标之间的区别;然而,这也会引起检测下限的增加,即检测灵敏度的丧失。因此,大多数现今的体系具有有限的检测动态范围。此外,来自相同或不同供应商的不同可视化体系之间的灵敏度差异使得难以比较染色结果。

[0003] 由于染料沉积不是靶标浓度的线性函数,因此对免疫化学染色的靶标的定量是另一挑战。在检测限的基线附近,强度作为靶标浓度的直接函数迅速增加(从没有可检测的信号变化到信号,甚至具有低强度的信号,表示无限的增加)。相反,接近检测上限时,甚至靶标浓度的大量增加也几乎不引起已经很强的信号的可察觉的增加。

[0004] 另一困难来自于以下事实,即没有国际公认的标准品存在,并且难以制备不变的参考样品。即使同一组织样品的连续切片也通常表现出生物变异。永生细胞系原则上可以提供无限的参考材料,然而在这种情况下培养条件、细胞循环周期和生物变异的不同也将引起靶标表达的某些批次间差异。用肽或蛋白质化学修饰的载玻片可以用作替代靶标,然而与组织样品的比较不直接。

[0005] 因此,需要生物样品中固定靶标的标准化定量检测。

[0006] 近来描述的一种对生物样品(包括组织学样品)中单个单元的固定靶标进行免疫化学染色的方法(PCT/DK2010/000137)提供了一种可视化体系,特征在于极度的灵敏度(即,可以使单个分子可视化并对其进行检测)以及靶标表达的整个动态范围内的沉积染料量与靶标表达的线性相关。

[0007] 本发明利用PCT/DK2010/000137体系的可视化潜力,并提供用于精确定量样品(具体是生物样品)中固定靶标的方法,包括对特定靶标分子的绝对数量的评估。

### 发明内容

[0008] 本发明涉及对其中靶标固定的样品(例如,组织学样品)中的靶标(例如,分子靶标)进行定量的方法,执行该方法的试剂,利用该方法和试剂的检定,以及该方法和检定在医学诊断和治疗中的应用。

[0009] 本发明的一个方面涉及用于对样品中存在的靶标进行定量的方法,其中所述靶标

是固定的,该方法包括

[0010] (a)将包括靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,其中

[0011] (i)至少一种结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合,且

[0012] (ii)至少一种结合剂包括酶,且

[0013] (iii)(i)或(ii)的至少一种结合剂对其在样品中的结合配偶体的结合亲和性是已知的,

[0014] 从而形成具有靶标的单独单元的部分子群(sub-population)的一个或多个离散的单个靶标部位(target site),其中各个离散的单个靶标部位包括单独单元的所述部分子群的一个单独单元以及一种或多种结合剂的复合物,其中至少一种结合剂包括酶;

[0015] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;

[0016] (c)对视觉上明显的点进行定量,

[0017] 评估样品中靶标的量。

[0018] 在不同的实施方式中,可以由样品中存在的靶标的单个单独单元的大部分或小部分形成靶标部位。

[0019] 本发明的另一个方面涉及一种用于对样品中存在的靶标进行定量的方法,其中所述靶标是固定的,包括

[0020] (a)将包括靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,

[0021] 其中

[0022] (i)至少一种结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合,且

[0023] (ii)至少一种结合剂包括酶,

[0024] 从而形成具有靶标的单独单元的预定部分子群的一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个离散的单个靶标部位包括包括单独单元的所述部分子群的一个单独单元以及一种或多种结合剂的复合物,其中至少一种结合剂包括酶;

[0025] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;

[0026] (c)对视觉上明显的点进行定量,

[0027] (d)评估样品中靶标的量。

[0028] 在一些实施方式中,后一方法可以包括以下步骤:

[0029] (a)将样品与第一结合剂孵育,

[0030] 其中

[0031] (i)所述第一结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合并使样品中的所有结合位点(binding site)基本上饱和;且

[0032] (ii)预定部分的所述第一结合剂包括酶,

[0033] 从而形成离散的单个靶标部位,各个靶标部位包括靶标的单个单独单元和结合剂,其中一部分的所述离散的单个靶标部位包括含有酶的第一结合剂;

[0034] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;

[0035] (c)对视觉上明显的点进行定量,

[0036] (d)评估样品中靶标的含量。

[0037] 在其它实施方式中,方法可以包括以下步骤:

- [0038] (a)将样品与第一和第二结合剂孵育，
- [0039] 其中
- [0040] (i)第一结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合并使样品中的所有结合位点基本上饱和；且
- [0041] (ii)第二结合剂能够与第一结合剂特异结合且预定部分的所述第二结合剂包括酶，
- [0042] 从而形成离散的单个靶标部位，各个靶标部位包括靶标的单个单独单元、第一结合剂和第二结合剂，其中一部分所述离散的单个靶标部位包括含有酶的结合剂；
- [0043] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点；
- [0044] (c)对视觉上明显的点进行定量，
- [0045] (d)评估样品中靶标的量。
- [0046] 可以根据近来描述的对样品中固定靶标的单个单独单元进行可视化的方法(参见PCT/DK2010/000137)或如本文中所述地进行对本发明的离散靶标部位的可视化。
- [0047] 本发明的可视化方法允许识别靶标的基本上每个单独单元，并由此可以确定靶标在样品中的绝对或相对量。靶标的绝对和相对量可以确定为样品中单个靶标单元的总数量或相对于一些标记物的数量。
- [0048] 这些方法可以适用于任何包括靶标的样品，该靶标可由对该靶标具有亲和性的结合剂检测出，其中靶标是固定在固体支承物中/上。因此，通过本发明的方法能够检测并精确定量几乎任何固定的靶标，例如分子、颗粒或微生物。
- [0049] 通过使用特定的靶标可视化技术并使用限定明确的用于靶标检测的结合剂(两者的具体信息在下文中说明)来在本发明方法中保证靶标的精确定量。
- [0050] 本发明的方法特别有利于复杂组织学样品中靶标的精确定量，例如，用于诊断或治疗靶标例如生长因子受体例如Her2等的定量，因此，它们在诊断和治疗应用中的效用不能被过高估计。这些方法对手动和自动评估样品中靶标的精确量的适用性可以作为这些方法的额外有价值的特征进行描述。
- [0051] 用于本发明中的可视化体系还允许使同一样品中两种或更多种不同靶标可视化(详情参见W02011047680)，因此，可以使用本发明的方法来进行一个样品中两种或更多种靶标的绝对或相对定量。
- [0052] 此外，本发明的方法可用于允许使组织学和其它样品中固定靶标的单个单元可视化的任何体系，其中所述体系包括使用对样品中结合配偶体具有特异亲和性的结合剂的步骤。
- [0053] 在本发明的方法中，可有利的是使用由可用于样品中固定靶标单元的可视化的试剂构成的试剂盒，具体地本发明涉及包括能够与结合配偶体特异结合的结合剂的试剂盒，其中预定部分的所述结合剂包括酶。本发明试剂盒的一些非限制性实施方式包括作为特异结合对成员的结合剂，例如，抗体或核酸；结合配偶体，其为样品中的靶标；结合配偶体，其为另一结合剂，例如，其中另一结合剂为能够与样品中靶标结合的结合剂；靶标，其为生物或化学靶标分子、颗粒、分子或细胞复合物、分子或细胞结构、病毒或微生物、或所述靶标分子、颗粒、复合物、结构、病毒或微生物的片段；酶，其为具有氧化还原酶活性的酶，例如具有过氧化物酶或酚氧化酶活性的酶，例如辣根过氧化物酶(HRP)等。在一个实施方式中，本发

明的试剂盒可以包括参考样品,其中靶标的单个单元的量是预定的,例如,表达特定蛋白的参考细胞系,其中蛋白分子的数量是预定的。

[0054] 在一个方面,本发明涉及一种用于在个体中诊断或预测疾病、或用于预测治疗处理的效力的方法,包括根据本发明方法在从所述个体得到的样品中对与所述疾病或所述治疗处理相关的生物标记物的量进行评估的步骤。

[0055] 诊断和治疗应用可以包括,但不限于,对作为疾病生物标记物的分子靶标进行检测和定量,例如,得知不同生长因子受体例如Her2FGFR等的水平已经显示出对癌症的诊断和治疗是重要的,且对治疗处理的特定疗程进行确定在如今越来越基于疾病生物标记物定量的结果。

### 附图说明

[0056] 图1示出根据传统HRP-DAB法(B)和根据本发明(A)的组织学片子的示例性染色。

[0057] 图2示出在靶标部位处形成视觉上明显的点的示意图。

[0058] 图3示出根据本发明可视化方法的Her阳性细胞的免疫染色结果:a.0+Herceptest对照细胞系的10×图像的单色分割,每个图像识别21个点(黑色);b.1+Herceptest对照细胞系的10×图像的单色分割,每个图像识别36个点(黑色);c.3+Herceptest对照细胞系的10×图像的单色分割,每个图像识别2567个点(黑色);d.乳房癌的10×图像的双色分割,点为白,核为黑,背景为灰;e.3+Herceptest对照细胞系的10×图像的双色分割,点为黑,核为白,背景为灰(与c相同的样品)。

[0059] 图4~7是相应于实验12.1、12.3a、12.3b和12.3c的表1~4的结果的图示(详情参见相应描述)。

### 具体实施方式

[0060] 基本而言,本发明涉及包括对样品中存在的靶标进行检测、可视化和定量的方法,其中靶标是固定的。具体而言,本发明涉及在生物样品中对单个分子靶标进行可视化及其定量的方法,然而,本发明的方法并不限于生物样品或分子靶标,其可从以下讨论中明显得出。

[0061] 本发明的一个方面涉及一种用于对样品中存在的靶标进行定量的方法,其中所述靶标是固定的,包括

[0062] (a)将包括靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,其中

[0063] (i)至少一种结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合,并且

[0064] (ii)至少一种结合剂包括酶,并且

[0065] (iii)(i)或(ii)的至少一种结合剂对其在样品中的结合配偶体的结合亲和性是已知的,

[0066] 从而形成具有靶标的单独单元的部分子群的一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个离散的单个靶标部位包括靶标的一个单独单元以及一种或多种结合剂的复合物,其中至少一种结合剂包括酶;

[0067] (b)使离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;

[0068] (c)对视觉上明显的点进行定量,

- [0069] (d)评估靶标的量。
- [0070] 在不同的实施方式中,靶标部位可以形成为具有样品中存在的靶标的单个单独单元的大部分或小部分。
- [0071] 本发明的另一个方面涉及一种用于对样品中存在的靶标进行定量的方法,其中所述靶标是固定的,包括
- [0072] (a)将包括靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,
- [0073] 其中
- [0074] (i)至少一种结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合,且
- [0075] (ii)至少一种结合剂包括酶,
- [0076] 从而形成具有靶标的单个单独单元的预定部分分子群的一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个离散的单个靶标部位包括单个单独单元的所述部分分子群的一个单独单元以及一种或多种结合剂的复合物,其中至少一种结合剂包括酶;
- [0077] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;
- [0078] (c)对视觉上明显的点进行定量,
- [0079] (d)评估样品中靶标的量。
- [0080] 在一些实施方式中,后一方法可以包括以下步骤:
- [0081] (a)将样品与第一结合剂孵育,
- [0082] 其中
- [0083] (i)所述第一结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合并使样品中的所有结合位点基本上饱和;且
- [0084] (ii)预定部分的所述第一结合剂包括酶,
- [0085] 从而形成离散的单个靶标部位,各个靶标部位包括靶标的单个单独单元和结合剂,其中一部分所述离散的单个靶标部位包括含有酶的第一结合剂;
- [0086] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;
- [0087] (c)对视觉上明显的点进行定量,
- [0088] (d)评估样品中靶标的量。
- [0089] 在其它实施方式中,方法可以包括以下步骤:
- [0090] (a)将样品与第一和第二结合剂孵育,
- [0091] 其中
- [0092] (i)第一结合剂能够与靶标的单个单独单元特异结合并使样品中的所有结合位点基本上饱和;且
- [0093] (ii)第二结合剂能够与第一结合剂特异结合且预定部分的所述第二结合剂包括酶,
- [0094] 从而形成离散的单个靶标部位,各个靶标部位包括靶标的单个单独单元、第一结合剂和第二结合剂,其中一部分所述离散的单个靶标部位包括含有酶的结合剂;
- [0095] (b)使包括酶的离散的单个靶标部位可视化为视觉上明显的点;
- [0096] (c)对视觉上明显的点进行定量,
- [0097] (d)评估样品中靶标的含量。
- [0098] 使用本发明的任何方法,在不同的优选实施方式中,靶标的量可以评估为样品中

靶标的部分量(与样品中单独单个靶标单元的部分子群相应);评估为样品中靶标的总量(或单独单个靶标单元的总量)(在本文中也称为“绝对量”);评估为靶标的相对量(靶标或靶标的单个单元相对于另一靶标、参考标记物等的相对量)。

[0099] 根据本发明,可以手动评估根据本发明染色的样品中的靶标的量,即,可以通过观测者使用可得的显微镜来对点进行计数。在其它实施方式中,可以使用可得的本领域软件来自动采集和处理染色样品的图像。在实施例部分中描述染色样品的处理的一些非限制性实例。

[0100] 在一个实施方式中,可以使用本发明的试剂盒对样品中的靶标进行可视化并对靶标量进行评估。

[0101] 包括对样品中固定靶标进行定量的部件的试剂盒是本发明的另一方面。具体而言,在一个实施方式中,本发明的试剂盒可以包括作为结合分子混合物的结合剂,其中预定部分的所述结合分子标记有酶。在其它实施方式中,本发明的试剂盒可以包括权利要求中包括的任何试剂且任选地包括使用说明。在一个实施方式中,本发明的试剂盒可以包括参考样品,其中靶标的单个单元的量是预定的,例如,表达特定蛋白质的参考细胞系,其中蛋白分子的数量是预定的。

[0102] 本发明的一个方面是用于诊断或预测疾病、或用于预测治疗处理在个体中的效力的方法,其中所述方法包括根据本发明的方法在从所述个体得到的样品中对与所述疾病或所述治疗处理相关的生物标记物的量进行评估的步骤。因此,本发明的试剂盒可以用作为诊断试剂盒的一部分。

[0103] 诊断和治疗应用可以包括但不限于对作为疾病的生物标记物的分子靶标进行检测和定量,例如,得知不同生长因子受体例如Her2FGFR等的水平已经显示出对于癌症的诊断和治疗是重要的,并且现在对治疗处理的特定疗程的确定越来越基于疾病生物标记物定量的结果。因此,本发明的试剂盒可以包括说明,其教导使用者如何将根据本发明的方法在样品中确定的生物标记物的量与相关疾病的诊断、预测或治疗相关联。

[0104] 在以下以及实施例部分中详细讨论本发明的以上和其它方面以及非限制性实施方式。

#### [0105] 样品

[0106] 术语“样品”是指来自较大的整体或群组的代表性部分或单一项、推测含有将要检测的靶标的物质或对象的量或部分,例如,包括将要分析的靶标分子、颗粒、结构的生物、化学、环境材料的部分或量,例如活检样品、食物样品、土壤样品等。典型的样品显示出物质或对象的剩余部分是什么或应该是什么等。在一个实施方式中,本发明的样品可以是环境样品,例如土壤样品或泄漏物(spillage)样品。在另一实施方式中,样品可以是食物样品。在另一实施方式中,样品可以是有机分子库的一部分。在另一实施方式中,样品可以是战争样品。在一个优选的实施方式中,本发明的样品是生物样品。

[0107] 生物样品可以是:

[0108] 1. 包括悬浮细胞和/或细胞碎片的样品,例如,血液样品、克隆细胞的悬浮液、身体组织匀浆等;

[0109] 2. 包括完整或损坏的动物体细胞、体组织、涂片或流体的样品,或肿瘤样品,例如活检样品;其可以是新鲜的组织样品或保藏的组织样品,例如福尔马林固定石蜡包埋的组

织样品；

[0110] 3. 包括活有机体的样品，例如包括动物、植物、细菌、真菌等的介质的样品；

[0111] 4. 包括病毒颗粒、其碎片、或病毒产物的样品，例如包括病毒核酸、蛋白质、肽等的体涂片；

[0112] 5. 包括细胞器的样品；

[0113] 6. 包括天然或重组生物分子的样品，例如血浆样品、条件细胞培养介质等；

[0114] 7. 包括植物细胞或其碎片的样品。

[0115] 生物样品的上述实施方式是示例性的且用于说明的目的，但不是本发明的限制。

[0116] 化学样品的实例可以通过化学化合物库(例如，肽库)的样品来示例说明，但是不限制于这些样品。环境样品的实例可以通过土壤、水或空气样品和食物样品来示例说明，但是不限制于这些样品。

[0117] 本发明涉及包括固定靶标的样品(例如，上述中的任何一个)，即涉及在本发明的检测过程中不能自由移动的靶标的样品，例如，经机械或化学手段基本上降低或消除靶标移动的样品，例如在样品或靶标附着某些支承物或介质或在某些支承物或介质内的情况下。因此，在一个实施方式中包括感兴趣靶标的单个单独单元的样品可以在检测过程之前固定到固体支承物上，例如，固定到载玻片上的固体组织样品。本发明的包括固定靶标的样品实例包括但不限于固定在玻璃片或塑料片上的体组织样品、或包括固定到膜或ELISA板等上的生物或化学分子的样品。这些实施方式中的样品靶标可以固定在样品内，例如固定在组织样品内的蛋白质，或可以固定在某些材料表面上或某些材料内，例如固体材料或凝胶的一部分，例如硝化纤维膜等。在一个实施方式中，固体支承物可以是三维结构，例如胶原或琼脂块。在该实施方式中，靶标，例如分子或颗粒，可以固定在该结构内。

[0118] 在一个实施方式中，本发明涉及不包括靶标的样品，例如，对照样品。在另一实施方式中，本发明涉及推定包括靶标的样品，例如具有未知内容物的样品。

[0119] 上述的术语“固体支承物”是指一片任意材料，其在根据本发明的过程条件下不溶，例如，其可以是硝化纤维膜、载玻片等。适用于固定样品和/或靶标的支承物的实例包括但不限于合成的聚合物支承物，例如聚苯乙烯、聚丙烯、取代的聚苯乙烯，例如胺化或羧化的聚苯乙烯；聚丙烯酰胺；聚酰胺；聚氯乙烯；玻璃；琼脂糖；硝化纤维；尼龙；聚偏氟乙烯；表面改性的尼龙等。本发明涉及在本文描述的条件为化学惰性的固体支承物，即所选的支承物可对该方法的检测结果不具有任何主要影响。相应地，可以选择配合所选的检定形式例如IHC、ELISA、印迹等的适用于固定样品或靶标的任何惰性支承物。

[0120] 靶标

[0121] 术语“靶标”在本文中是指推定存在于样品中且特征可在于特定物理和/或功能特征的感兴趣对象。应该理解，在本发明的上下文中，术语“靶标”涉及该对象的基本上相同实体的整个池，而不是样品中该对象的单个实体；在通过仅有的单个单元表示靶标的样品中，该仅有的单个靶标单元将被理解为整个靶标和样品中靶标的量。本文的术语“基本上相同”是指样品中靶标的总池的所有或几乎所有单个实体具有一个或多个使得它们被识别为靶标的特征。例如，靶标可以是特定的蛋白质，包括样品中该特定蛋白质的所有分子；本发明靶标的另一实例可以是特定的分子复合物或结构，包括含有该特定的分子复合物或分子结构的样品的基本上所有对象；本发明靶标的另一个实例可以是病毒颗粒或细菌，其中样品

中该病毒颗粒或该细菌的总群是靶标。

[0122] 与作为特定细胞类型、组织、细胞结构、生理条件等的特征的特点相关的生物对象,例如分子、分子复合物、结构、颗粒或有机体经常被称为该特定细胞类型、组织、细胞结构或生理条件的“生物标记物”。这些生物标记物的非限制性实例包括但不限于特定的核苷酸序列、蛋白质或其它生物分子,例如碳水化合物或脂质、染色体或膜结构、病毒、细菌、微生物等。在本发明的一些实施方式中,术语“靶标”与术语“生物标记物”互换使用,并涉及作为特定细胞类型、组织、生理条件等的特征的分子、分子复合物、结构或颗粒,其中测试样品中的任何在后生物标记物的总群被认为是靶标。

[0123] 在一个实施方式中,靶标可以是蛋白质,例如细胞膜受体或细胞质蛋白质,在另一实施方式中,靶标可以是核酸,例如细胞质核酸。在本发明一些实施方式中,任何在后提及的靶标的衍生物,例如靶标蛋白或核酸的片段、前体、突变体等也可以是的靶标。

[0124] 因此,在本发明的不同实施方式中,靶标可以是生物或化学靶标分子、或颗粒、或分子或细胞复合物、或分子或细胞结构、或病毒、或微生物、或所述靶标分子、颗粒、复合物、结构、病毒或微生物的片段。在化学和环境样品中包含的靶标中,样品可以是不同的污染物、毒素、战争物质、分子库成员、工业无毒废化合物等。

[0125] 具体地,本发明涉及可以在样品中通过多个独立的基本上相同的单元表示的靶标,具体地,本发明涉及靶标的单个单独单元。

[0126] 术语“单元”是指在计算中视为整体的单个量的靶标,并用于执行一个特定的功能。术语“单独”是指单元可与相同种类的其它单元或环境中的其它组分(通过功能的物理特征)分开,并且可以单独考虑和计数。术语“单独单元”与术语“单个单元”互换使用。本文中的术语“单个”是指由单独的整体构成的、由数量上仅一个构成的、由与很多相对或相反的一个构成的靶标单元。例如,靶标蛋白的单个/单独单元是指靶标蛋白的单个单独蛋白分子,即多个相同种类分子中的一个分子。术语“基本上相同的单元”是指,靶标的多个单个单元具有一个或多个使这些单元被认为是靶标的特征。术语“独立的”是指靶标的单个单元以明显的实体存在,并不依赖于样品中相同种类的其它明显实体的存在。

[0127] 在一些实施方式中,本发明涉及作为分子的单个部分的单个单元。术语“分子的单个部分”是指分子的一部分,其具有使得分子的该部分被认为是与相同分子的其它部分分开的特定特性,例如靶标蛋白的蛋白水解部分、融合蛋白的一部分、靶标蛋白的特定结构域、核酸的特定结构、表位等。

[0128] 因此,在一个实施方式中,本发明可以涉及作为单个单独靶标分子的靶标的单个/单独单元,即涉及存在于样品中的多个单个单独靶标分子,在另一个实施方式中,本发明可以涉及作为分子的单个单独部分的靶标的单个/单独单元,例如,存在于样品的多个靶标分子中的特定分子结构,例如,表位。在另一实施方式中,本发明可以涉及构成样品中存在的病毒颗粒池的多个单个单独病毒颗粒。

[0129] 在不同的实施方式中,可以通过单个单独生物或化学分子、单个单独单个颗粒、单个单独分子或细胞复合物、单个单独分子或细胞结构、或单个单独病毒或单个单独微生物、或所述分子、颗粒、复合物、结构、病毒或微生物的单个单独片段来表示靶标的多个单个单元。

[0130] 在一个优选的实施方式中,靶标是与癌症相关的生物标记物,例如核酸、激素的多

肽、生长因子及其受体、细胞粘合分子、信号转导分子、细胞周期调控分子等,例如包括生长因子PDGF、VEGF、TGF、HGF或EGF、其受体和通路相关的分子的群组的基因、RNA和蛋白质,与信号转导通路例如JAK/STAT通路或Akt1/PKB细胞存活通路或5-FU通路相关的基因及其产物,雌激素受体ER及其基因(ERS1)等。本发明的方法允许对所述生物标记物进行简单且快速的可视化和定量。

[0131] 本发明的方法允许对以较宽动态范围存在于样品中的靶标的单个单独单元进行可视化和定量。很高量和很低量的靶标均能在同一个样品中进行可视化和定量,或者它们可以在单独的样品中进行评估。两种或更多种不同靶标可以在一个或同一样品中进行可视化,例如,蛋白靶标和核酸靶标,或两种或更多种不同的蛋白靶标,或两种或更多种不同的核酸靶标等。

[0132] 在一个实施方式中,靶标的单个单元可以基本上均匀地分布在样品中,在其它实施方式中,靶标的单个单元可以在样品的一个部分中更大量地存在而在其其它部分中少量地存在。在所有在后实施方式中,可以使用本发明的方法在同一个样品中对靶标的单个单元进行可视化和定量。在一些实施方式中,其中单个靶标单元与感兴趣的另一靶标相关,例如,以特定的分子缔合或结构存在,其中所述特定分子缔合或结构是病理条件的生物标记物。也可以通过对样品中的单个靶标单元进行可视化和定量来对所述感兴趣的另一靶标进行可视化和定量。

[0133] 在一个实施方式中,本发明涉及存在于样品中的单个靶标单元的部分子群,例如,存在于样品中的单个单独靶标单元的总数的大部分或小部分。本文中的术语“部分子群”是指单个靶标单元总群的一部分,其等于或少于样品中靶标单个单元的总量的99.9%,例如,等于或少于98%、97%、95%、94%、93%、92%、91%或90%,例如在90%与85%之间,少于85%,例如样品中靶标单元的总量的85%~80%、80%~75%,例如少于75%,例如为样品中靶标单个单元总量的1%~74%,例如为样品中靶标单元的总量的1%~60%、1%~50%、1%~40%、1%~30%或25%,等等。根据本发明将由总群的50%~99.9%表示的单个靶标单元的部分子群限定为存在于样品中的单个靶标单元的大部分。根据本发明将由少于样品中单个靶标单元的总群的50%表示的部分子群限定为存在于样品中的单个靶标单元的小部分。

[0134] 在一个实施方式中,单独单个靶标单元的大部分可以涉及本发明的离散的单个靶标部位的形成;在另一实施方式中,单独单个靶标单元的小部分可以涉及本发明的离散的单个靶标部位的形成。在一个实施方式中,优选基本上靶标的所有单独单个单元涉及与一种或多种结合剂形成复合物,其中仅所述复合物的部分子群涉及本发明的离散的单个结合位点的形成。

[0135] 结合剂

[0136] 本发明的方法包括如下步骤,其中假定包括靶标的样品与一种或多种结合剂孵育。

[0137] 术语“结合剂”是指能够与靶标单个单元例如靶标蛋白的单独分子直接或间接特异结合的分子。术语“特异”是指,结合剂对靶标具有特定的亲和性,例如对靶标分子的亲和性,或对结合到靶标的试剂的特定亲和性,例如,对结合到靶标蛋白的一抗的亲和性、对与一抗结合的半抗原的亲和性等。术语“直接”是指对靶标的单个单独单元具有特异亲和性的结合剂与该单个单独单元相互作用并在相互作用时形成立即的结合,例如,一抗与用作用

于提升所述一抗的抗原的单个单独靶标分子直接结合。本文中使用的术语“间接”是指结合剂,其中所述结合剂对靶标的单个单独单元没有特异亲和性,但是其中所述结合剂对能够与该单个单独单元特异结合的另一物质例如一抗具有特异亲和性,或其中所述结合剂对与所述单个单独单元相关或连接的物质(例如,对半抗原)具有特异亲和性;所述结合剂直接与在后物质相互作用,并与所述物质形成结合,从而结合剂变成与靶标的单个单元间接结合。

[0138] 在本文中通常由第一结合剂表示能够与靶标单个单元直接特异结合的结合剂。通常由第二结合剂表示能够与靶标单个单元间接特异结合的结合剂。然而,根据本发明的检测体系可以包括能够与靶标单个单元间接结合的其它结合剂,例如第三、第四和其它结合剂。

[0139] 通常而言,使用第一结合剂或,在一些实施方式中,第二或第三结合剂,来与样品接触以识别靶标,与其结合并与其形成复合物。第二、第三和其它结合剂可以用于根据本发明的方法的其它步骤中,例如用于识别下述靶标部位处可检测分子的沉积。在一些实施方式中,使用第二、第三和其它结合剂来放大与靶标相关的信号。这些结合剂还可用于对检测体系增加灵活度,例如用于改变与靶标相关的原始信号,例如将红色荧光信号变为绿色等。

[0140] 本发明的结合剂可以是不同特异结合对的成员。

[0141] 领域内已知很多不同的特异结合对,这些是能够特异地相互结合的两个不同分子的配对。适用于实施本发明的特异结合对的成员可以是免疫或非免疫型。

[0142] 非免疫特异结合对包括其中两个组分分享对相互的天然亲和性而不是抗体的体系。示例性的非免疫结合对是生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素、叶酸-叶酸结合蛋白、互补核酸、受体-配体等。本发明还包括相互形成共价键的非免疫结合对。示例性的共价结合对包括巯基反应基团例如马来酰亚胺和卤代乙酰基衍生物,以及胺反应基团例如异硫氰酸盐(酯)、琥珀酰亚胺酯、磺酰卤化物,以及耦合染料例如3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脲(MBTH)和3-(二甲基-氨基)苯甲酸(DMAB)等。

[0143] 免疫特异结合对可以示例为抗体-抗体体系或半抗原-抗半抗原体系。在一个实施方式中,本发明的免疫特异结合对可以是包括两种或更多种相互有亲和性的抗体分子的抗体-抗体结合对,例如一抗和二抗对,其中一抗代表第一结合剂,并且二抗代表第二结合剂;包括3种或4种或更多种抗体成员的抗体体系可以用于另一个实施方式中。在本发明的其它实施方式中,可以由半抗原-抗半抗原体系表示免疫结合对。在这些实施方式中,可以由包括对靶标具有亲和性的分子和半抗原的结合物表示第一结合剂,例如与半抗原连接的一抗或核酸序列,且可以由抗半抗原抗体表示第二结合剂。

[0144] 术语“半抗原”是指能够被认为是分离的表位的小分子,对该表位可以制备抗体,尽管半抗原独自在注射到动物中时不引发免疫应答,其必须与载体(通常为蛋白)结合。因为半抗原是小分子,多个拷贝的半抗原可以连接到大分子,例如聚合物分子,例如蛋白、核苷酸序列、葡聚糖等。半抗原可以用作为用于其中放大信号是必须或有利的检定形式的便利标记分子。因此,结合的多个拷贝的半抗原提供增强的灵敏度,例如,增加的信号强度。合适半抗原的非限制性实例包括荧光素(FITC)、2,4-二硝基酚(DNP)、myc地高辛(DIG)、酪氨酸、硝基酪氨酸生物素和染料,例如四甲基罗丹明、德克萨斯红、丹酰、Alexa Fluor 488、BODIPY FL、荧光黄和Alexa Fluor 405/Cascade蓝色荧光团,US20080305497中描述的半抗

原也可以用于本发明的目的。

[0145] 本文中使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白或其一部分,并包括含有抗原结合位点的任何多肽,而不管来源、制造方法和其它特征。该术语包括,例如,多克隆的、单克隆的、单一特异性的、多特异性的、人化的、单链、嵌合的、合成的、重组的、杂交的、突变的和CDR接枝的抗体。抗体的一部分可以包括仍然能够结合抗原的任何片段,例如,Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv。通过与制造方法无关的基因序列来限定抗体的来源。

[0146] 本发明上下文中的一抗是指抗体结合剂,例如,整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其与靶标特异结合,更具体地与样品中靶标的单个单元结合,例如,与单个靶标分子结合。在一些实施方式中,一抗可以是能够与不同靶标的两个(或更多)单个单独单元结合的二价抗体,例如能够结合到受体二聚体(例如Her2/Her3二聚体)的抗体。在该实施方式中,根据本发明的靶标的单个单元是单个的Her2/Her3二聚体,并且靶标是样品中Her2/Her3二聚体的群体,包括样品的所有所述二聚体。一抗可以源自任何热血种属例如哺乳类、鸟类。

[0147] 本发明上下文中的二抗是指抗体结合剂,例如,整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其具有与一抗、或沉积在靶标部位处的半抗原、或直接或间接连接至一抗或另一结合剂的半抗原特异结合的抗原结合域。

[0148] 本发明上下文中的三抗是指抗体结合剂,例如整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其包括与二抗或连接至二抗的半抗原或连接至结合二抗的聚合物的半抗原或沉积在靶标部位处的半抗原特异结合的抗原结合域。

[0149] 有时候抗体可以同时起到二抗和三抗的作用。

[0150] 本发明中使用的抗体,包括一抗、二抗和三抗,可以源自任何哺乳动物种属,例如大鼠、小鼠、山羊、豚鼠、驴、兔、马、美洲驼、骆驼、或任何鸟类种属,例如鸡、鸭。如本文中使用的源自任何哺乳动物或鸟类种属是指编码特定抗体的核酸序列的至少一部分源自特定哺乳动物例如大鼠、小鼠、山羊或兔,或特定的鸟例如鸡、鸭的基因组序列。抗体可以是任何同种型,例如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE或任何亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

[0151] 在某些实施方式中,一抗含有抗原结合区,其能够与生物标记物特异结合,具体是与由生物样品的细胞表达的所述生物标记物的单个单独单元结合。标记物可以表达在细胞表面上或细胞膜内即细胞的内部,例如细胞质内、内质网内等。在一些实施方式中,可以从细胞中提取生物标记物,因此其存在于无细胞的介质中,例如水溶液中,或者其是存在于细胞培养介质、血浆、脑脊液等中的可溶分子。上面描述相应样品的实例。

[0152] 在某些实施方式中,二抗含有与一抗例如与一抗的恒定区特异结合的抗原结合区。在某些实施方式中,二抗可以与聚合物结合。在一些实施方式中,2~20个二抗例如5~15个二抗可以与聚合物结合。在其它实施方式中,聚合物可以与1~10个二抗例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个二抗结合。

[0153] 在某些实施方式中,三抗可以含有与二抗例如与二抗的恒定区、或与连接至二抗的半抗原、或与结合有二抗的聚合物特异结合的抗原结合区。在某些实施方式中,三抗与聚合物结合。在一些实施方式中,1~20个三抗可以与聚合物结合。在其它实施方式中,1~5个三抗例如1、2、3、4或5个三抗可以与聚合物结合。

[0154] 在一些实施方式中,可以优选包括单个结合单元的结合剂的聚合物,例如与一个

分子的一抗、二抗或三抗结合的聚合物。

[0155] 可用于本发明目的的抗体包括单克隆和多克隆抗体,使用噬菌体展示或可选技术制造的含有嵌合的、CDR接枝和人工选择抗体的工程抗体。

[0156] 可以通过本领域熟知的多种方法中的任何一种来制造本发明的抗体结合剂,例如根据Harlow和Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。用于制备重组抗体分子的技术在上述文献和多个其它文献例如EP0623679、EP0368684和EP0436597中有过描述。可以从cDNA库中分离编码抗体的核酸。可以从噬菌体库中分离编码抗体的核酸(参见例如McCafferty等人1990, *Nature* 348: 552, Kang等人1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4363; EP0589877B1)。可以通过已知序列的基因改组而获得编码抗体的核酸(Mark等人1992, *Bio/Technol.* 10: 779)。可以通过体内重组而分离编码抗体的核酸(Waterhouse等人1993, *Nucl. Acid Res.* 21: 2265)。用于本发明方法中的抗体包括人化的免疫球蛋白(参见US5585089, Jones等人1986, *Nature* 332: 323)。可以以任何可能的方式改变本发明的抗体,假定它们保持它们的结合亲和性,例如它们可以与效应蛋白、毒素、标记物等融合。抗体与不同试剂结合的方法也在领域内熟知并在本发明以下的示例性实施方式中描述。

[0157] 在本发明的一个实施方式中,由Fab区域表示抗体结合剂。

[0158] 在一个实施方式中,抗体结合剂可以是包括两种或更多种不同抗体结合剂的组合物,例如包括第一抗体结合剂和第二抗体结合剂的组合物,其中该两种或更多种不同抗体结合剂具有不同的免疫结合对。在一个实施方式中,在组合物中,两种或更多种不同抗体结合剂中的至少一种是能够与靶标特异结合的抗体,且至少一种其它结合剂是包括酶的抗体。

[0159] 在另一个实施方式中,本发明涉及作为非免疫特异结合对的成员的结合剂,例如互补的核苷酸序列或核酸类似分子。

[0160] 包括核酸或核酸类似分子例如DNA分子、RNA分子、PNA分子的结合剂可以用于核酸靶标的单个单独单元的可视化和定量。

[0161] 用作本发明目的用结合剂的核酸序列可以化学合成或在重组细胞中产生。两种产生模式在领域内均公知(参见,例如Sambrook等人(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press)。在一些实施方式中,核酸结合剂可以包括肽核酸(PNA)。肽核酸是其中通常存在于DNA和RNA中的脱氧核酸或核酸糖骨架(backbone)被肽骨架替换的核酸分子。制作PNA的方法在领域内已知(参见,例如Nielson, 2001, *Current Opinion in Biotechnology* 12: 16)(并入本文以供参考)。在其它实施方式中,结合剂可以包括锁核酸(LNA)(Sorenson等人2003, *Chem. Commun.* 7(17): 2130)。

[0162] 在一些实施方式中,核酸结合剂可以包括至少一个寡核苷酸序列或至少一个聚核苷酸序列,其在特定的严格条件下与生物样品中靶标序列的单个单元(例如,单个mRNA序列)特异杂交。本文中使用术语“在严格条件下的杂交”来描述杂交的条件,在该条件下,显著地相互互补例如至少70%、至少80%、至少85~90%互补的核苷酸序列保持相互结合。如Altschul等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402(并入本文以供参考)中所述地确定互补百分比。

[0163] 规定的严格条件在领域内已知,并可以在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ausubel等人1995eds.), 第2、4和6节(并入本文以供参

考)中找到。此外,在Sambrook等人(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.Cold Spring Harbor Press,第7、9和11章(并入本文以供参考)中描述了规定的严格条件。在一些实施方式中,杂交条件为高度严格的条件。高度严格的杂交条件的实例是在65~70℃下在4×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中的杂交或是在42~50℃下在4×SSC加50%甲酰胺中的杂交,之后在65~70℃下在1×SSC中洗涤一次或多次。应理解的是,其它的试剂可以添加到杂交和/或洗涤缓冲液中,例如,封闭剂(BSA或鲑鱼精子DNA)、洗涤剂(SDS)、螯合剂(EDTA)、聚蔗糖、PVP等。

[0164] 在一些实施方式中,结合剂可以在中等严格的条件下与样品中的靶标序列杂交。本文中使用的中等严格包括能够由本领域普通技术人员基于例如DNA的长度而容易确定的条件。例示的条件在Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2d ed.Vol.1,pp.1.101-104,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)(并入本文以供参考)中提出,并包括使用5×SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH8.0)的预洗液,42℃下50%甲酰胺、6×SSC的杂交条件(或其它类似的杂交液,例如Stark溶液,在50%甲酰胺中,42℃),以及60℃、0.5×SSC、0.1%SDS的洗涤条件。

[0165] 在一些实施方式中,结合剂在低严格条件下与样品中靶标序列杂交。本文中使用的低严格条件可以包括能够由本领域普通技术人员基于例如DNA的长度而容易确定的条件。例如,低严格可以包括在含有35%甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、0.1%PVP、0.1%聚蔗糖、1%BSA和500μg/ml变性的鲑鱼精子DNA的溶液中于40℃对DNA预处理6小时。在具有以下改变的相同溶液中进行杂交:使用0.02%PVP、0.02%聚蔗糖、0.2%BSA、100μg/ml鲑鱼精子DNA、10%(wt/vol)硫酸葡聚糖和5~20×10<sup>6</sup>CPM结合剂。在杂交混合物中于40℃孵育样品18~20小时,之后在含有2×SSC、25mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM EDTA和0.1%SDS的溶液中于55℃洗涤样品1.5h。使用新鲜溶液替换洗涤液并再使其于60℃孵育1.5h。

[0166] 在其它实施方式中,本发明可以涉及结合剂,其为源自非抗体蛋白的肽序列或包括该肽序列,例如源自不同蛋白的核酸结合域、不同细胞和核受体的配体及其衍生物的肽序列。这些结合剂的一些非限制性实例可以是能够与抗体恒定区结合的补体级联的经典通路的c1q蛋白,MHC分子例如I类MHC和II类MHC和非常规MHC,具有特异结合配偶体的分子例如涉及细胞信号通路的分子例如具有亮氨酸拉链结构域分子,例如fos/jun、myc、GCN4,具有SH1或SH2结构域分子,例如Src或Grb-2;免疫球蛋白受体,例如Fc受体;嵌合蛋白,即工程制备为将两种或更多种特异结合配偶体的特征结合的蛋白,例如亮氨酸拉链可以被工程制备成抗体的Fc区,SH2结构域可以被工程制备成在抗体的Fc区中表达。在其它实施方式中,融合蛋白可以被工程制备成包括具有取代的可变结构域的抗体的Fc部。

[0167] 结合剂也可以是能够与生物大分子的某些结构单元特异结合的小分子。

[0168] 在一些实施方式中,结合剂可以包括可检测的标记物,例如,荧光物质、半抗原、酶等。在一个实施方式中,本发明涉及标记的结合剂,即能够与样品中结合配偶体(例如,靶标单元、其它结合剂、沉积的可检测分子)特异结合的标记的第一、第二、第三或其它结合剂。这些结合剂可以用于本发明样品中靶标单元或靶标部位的可视化。在一个实施方式中,本发明涉及包括作为酶的标记物的结合剂。合适的酶标记物的非限制性实例可以是辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、β-半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶、葡糖氧化酶(GO)。

在一个优选实施方式中,结合剂可以包括HRP作为标记物。在另一优选实施方式中,结合剂可以包括AP作为标记物。在以下讨论其它优选的酶实施方式。

[0169] 形成本发明靶标部位所需的结合剂的量可以根据不同因素例如样品种类、靶标种类、结合剂种类、结合剂的结合亲和性等而变化。使用一般常识,本领域技术人员可以选择合适的结合剂并确定每个特定实施方式所需的量。在一些实施方式中,优选调整用于形成靶标部位的结合剂的量,使得并非样品中存在的靶标的所有单个单元、而是其部分分子群涉及靶标部位的形成,例如这些实施方式可以涉及包括大量靶标、或以较宽动态浓度范围存在的靶标的样品。在其它实施方式中,例如在靶标或靶标的单个单元的靶标表达非常低的样品的情况下,可以优选靶标的所有或基本上所有单个单元涉及本发明靶标部位的形成。在后实施方式中,可以优选以如下量使用结合剂,该量保证结合剂与样品的单独单个单元的大部分形成结合位点,即,存在靶标的单个单元的大部分会涉及靶标部位的形成。

[0170] 在一个实施方式中,结合剂可以是未标记和标记的相同种类的结合分子的混合物,其对相同的结合配偶体具有亲和性,例如,对特定靶标蛋白的标记和未标记的一抗的混合物,或针对特定种类的一抗的标记和未标记的二抗的混合物等等。根据本发明,使用在后结合分子混合物,其中一部分标记的结合分子是预定的,使用通过该部分标记的结合剂预定的单个靶标单元的某个部分分子群形成靶标部位(之后可视化为视觉上明显的点)。这允许确定样品中单个靶标单元的精确量,并由此确定靶标的量,包括样品中靶标的相对量和总量。在实施例部分中详细讨论对组织学样品中靶标进行定量的该方法和其它方法。

[0171] 在一些实施方式中,本发明涉及结合剂,例如特异结合对的成员,其对于其特异结合配偶体的结合亲和性是已知的,例如,对样品中的结合配偶体例如对靶标或另一结合剂的的预定的结合亲和性。

[0172] 通常通过解离常数来描述特异结合对的成员之间的亲和性,例如,配体与受体、抗体和抗原等,即,配对中的一个结合配偶体(BP1)多紧密地与另一结合配偶体(BP2)结合。

[0173] 可以通过双态过程来描述结合配偶体之间的复合物(BP1:BP2)的形成:

[0174]  $BP1:BP2 \rightleftharpoons BP1+BP2;$

[0175] 相应的解离常数限定为

$$[0176] \quad K_d = \frac{[BP1][BP2]}{[BP1:BP2]}$$

[0177] 其中[BP1]、[BP2]和[BP1:BP2]分别表示BP1、BP1以及BP1与BP2的复合物的摩尔浓度。

[0178] 解离常数具有摩尔单位(M),其相应于BP2的结合位点被占据一半的BP1的浓度,即BP2结合为[BP1:BP2]的BP2浓度等于没有配体结合[BP2]的BP2浓度的BP1的浓度。解离常数越小,结合BP1越紧密,或者BP1与BP2之间的亲和性越高。例如,具有纳摩尔(nM)解离常数的BP1比具有微摩尔( $\mu$ M)解离常数的BP1更紧密地结合BP2。

[0179] 用于特定BP1与BP2相互作用的解离常数可以随着溶液条件(例如,温度、pH和盐浓度)而显著变化。不同溶液条件的作用是有效地改变将特定BP1:BP2复合物保持在一起的任何分子间相互作用的强度。在以下的其它部分中将讨论用于本发明目的的与BP1:BP2复合物形成相关的介质条件。

[0180] 在抗体(Ab)与抗原(Ag)结合的具体情况中,通常使用亲和常数( $K_a$ )。这是解离常数的倒数。

[0181]  $Ab+Ag \rightleftharpoons Ab:Ag;$

$$[0182] \quad K_a = \frac{[Ab:Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

[0183] 该化学平衡也是发生率(on-rate,  $K_{forward}$ )和离脱率(off-rate,  $K_{back}$ )常数的比率。两种抗体可以具有相同的亲和性,但是一种可以同时具有较高的发生率和离脱率常数,而另一种可以同时具有较低的发生和离脱率常数。

$$[0184] \quad K_a = \frac{K_{forward}}{K_{back}} = \frac{\text{on-rate}}{\text{off-rate}}$$

[0185] 可以从商业提供者得到具有已知 $K_d$ 或 $K_a$ 的结合剂,或可以通过任何本领域技术人员已知的技术预先确定 $K_d$ 和/或 $K_a$ 。在实施例部分中描述使用本发明的可视化体系对组织学样品中第一和第二结合剂的 $K_d$ 进行确定的方法,以及使用该确定来对组织学样品中的靶标进行定量。

[0186] 酶

[0187] 根据本发明,样品包括靶标的一个或多个单独单元。根据本发明,包括酶的至少一个结合剂与靶标的单个单元直接或间接结合并与所述单元形成复合物。

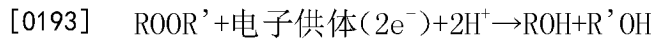
[0188] 根据本发明的优选酶是具有氧化还原酶活性的酶(在本文中,互换地被称作“氧化还原酶”或“本发明的酶”)。

[0189] 术语“具有氧化还原酶活性的酶”是指在酶的EC编号分类中被分类为EC1的酶,其催化电子从一个分子(还原剂,也称为氢或电子供体)转移到另一个分子(氧化剂,也称为氢或电子受体)。在一些优选实施方式中,本发明涉及被分类为E1.10.(酚氧化酶)和E1.11.(过氧化物酶)的氧化还原酶。

[0190] 在一个优选实施方式中,本发明涉及酚氧化酶,特别是含铜氧化酶家族,漆酶(E1.10.3.2)。漆酶作用在酚和相似分子上,进行单电子氧化。漆酶通过促进木质醇(天然出现的酚的家族)的氧化耦合而在木质素形成中发挥作用。适用于本发明目的的漆酶可以是例如由Phillips LE和Leonard TJ(Benzidine as a Substrate for Measuring Phenoloxidase Activity in Crude Cell-Free Extracts of Schizophyllum commune. Mycological 1976, 68:277-285)、或Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. (Laccases and their applications: a patent review. Recent Pat Biotechnol. 2008, 2(1):10-24)、或Rodriguez Couto S, Toca Herrera JL (Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv. 2006, 24(5):500-13)描述的酶。

[0191] 在本文中使用术语“漆酶”来指代本发明的具有酚氧化酶活性的酶,然而应该理解的是,漆酶是适用于本发明目的的酚氧化酶的很多实施方式中的一个。

[0192] 在另一优选实施方式中,本发明涉及对以下形式反应进行催化的过氧化物酶活性:



[0194] 在本发明的一个优选实施方式中,具有过氧化物酶活性的酶是辣根过氧化物酶(HRP)。在本发明的另一实施方式中,具有过氧化物酶活性的酶是大豆过氧化物酶(SP)。

[0195] 对于一些过氧化物酶,最佳的底物是过氧化氢,一些其它的过氧化物酶对有机氢过氧化物例如有机过氧化物更有活性。电子供体的性质非常依赖于酶的结构,例如辣根过氧化物酶(HRP)可以使用多种有机化合物同时作为电子供体和受体。HRP具有可接近的活性位点,并且很多化合物可以达到反应位点。

[0196] 通过与结合剂分子直接或间接连接的酶的全长分子,或混有酶活性的酶的片段,例如酶分子整个大小的51%~99.9%,或少于51%,例如40%、30%或更低,可以表示酶活性,即氧化还原酶活性,例如酚氧化酶或过氧化物酶活性。

[0197] 本发明的结合剂可以与一个或多个酶部分直接或间接结合,(本文中的术语“部分”是指具有氧化还原酶活性的酶分子的一部分,其包括整个或基本上整个酶分子以及具有氧化还原酶活性的所述分子的一部分)。第一和第二结合剂两者或其中之一的分子可以与氧化还原酶的一个或数个官能活性部分结合。在一个实施方式中,第一结合剂的至少一个分子可以与具有氧化还原酶活性的一个或多个酶部分结合;在另一个实施方式中,第二结合剂的至少一个分子可以与一个或多个这样的部分结合。第三和其它结合剂的分子也可以与氧化还原酶结合。术语“直接结合”是指酶部分经由化学键与结合剂的分子连接。术语“间接结合”是指酶的部分经由连接分子与结合剂的分子连接,该连接分子具有与结合剂的一个化学键和与酶的另一个化学键。将生物分子与连接分子结合的方法在领域内熟知并在以下进行例示。

[0198] 在一个实施方式中,氧化还原酶的部分是HRP的部分,例如,整个HRP分子或其具有HRP酶活性的片段,其也可以是包括具有酶活性的部分HRP的重组蛋白,等等。在另一个实施方式中,氧化还原酶的部分可以是大豆过氧化物酶(SP)的部分。在另一实施方式中,氧化还原酶的部分可以是漆酶的部分。

[0199] 包括具有氧化还原酶活性的酶的结合剂的非限制性实例可以是抗体分子或其衍生物,例如与HRP的一个或多个部分结合的Fab,和与HRP结合的核酸结合剂。这样的结合剂可以与单个靶标单元例如单个靶标分子直接或间接地结合,并从而形成复合物,其中单个这样的复合物包括靶标的单个单独单元和一种或多种结合剂,其中一种或多种结合剂包括具有氧化还原酶活性的酶。

[0200] 在一个实施方式中,结合剂是包括过氧化物酶的一个、或两个或更多个部分的结合物,其中所述部分与结合剂直接连接,例如与HRP的一个或多个部分直接结合的抗体分子。在另一个实施方式中,结合剂可以是包括两个或更多个具有过氧化物酶活性的酶(例如,与结合剂间接地连接的HRP的两个或更多个部分)的结合物,例如,其中一个或多个分子的抗体和一个或多个HRP部分与骨架聚合物独立地连接(即,具有过氧化物酶活性的酶与结合剂即与抗体间接连接)的结合物。

[0201] 每一分子结合剂的HRP数量可以变化,从每一结合剂1个酶部分到每一结合剂20~50酶部分或甚至更高。在一些实施方式中,可以优选使用HRP部分的数量至少为两个的结合

剂,优选从每一结合剂两到二十五个酶部分,例如,在三和二十之间,例如4、5、6、7、8、9、10等。令人惊讶地发现,使用结合剂,其中每一结合剂的酶部分数量为多于一个,优选每一结合剂多于两个,优选每一结合剂多于三个。在一些实施方式中,可以优选使用每一结合剂包括多于四个酶部分的结合剂,优选在5与20之间,例如5~15。具有多于四个酶部分的结合剂可有利地用于靶标部位的形成,该靶标部位可以被可视化为大小基本上相同的点。在一些实施方式中,甚至可以优选的是,包括这些结合分子池(pool)的酶的各个结合剂分子包括近相同数量的酶部分,例如池中每一结合剂4~6个酶部分、每一结合剂分子5~7、6~8、7~9、8~10个等酶部分,例如每一抗体分子(例如,每一一抗分子或每一二抗分子)5~6个或6~7个HRP部分。在后提到的包括HRP的多个部分的结合剂构成物是示例性的。为达到所述的效果,结合剂可以包括具有本发明上述的氧化还原酶活性的任何酶的多个部分。结合剂还可以包括不同氧化还原酶的多个部分的组合。

[0202] 在一些其它实施方式中,可以优选结合剂的较小结合物分子,例如与酶例如HRP的一个、或两个、或多个部分结合的单个抗体分子或抗体中分离的Fab区。这样的结合剂是较紧凑的分子,且其可以有利于检测“隐藏”或掩盖在靶标或样品中的靶标的单独单元,例如单独单个靶标分子可以被周围的其它分子掩盖,单个靶标结构可以隐藏在靶标分子中,或单个病毒颗粒可能难以到达包括细胞的复杂生物样品。

[0203] 在一些其它实施方式中,可以优选包括结合剂和数十到数百的酶部分的较大结合物。例如,在关心非常快的靶标检测或需要在每个单独靶标部位获得较大沉积的情况下,这样的结合剂可以是有利的。

[0204] 与包括具有氧化还原酶活性(例如,过氧化物酶活性)的酶的结合剂(直接或间接地)结合的靶标的单个单元构成本发明的单个靶标部位。

[0205] 在一个实施方式中,本发明的单个靶标部位包括靶标的单个靶标单元,至少一个一抗或其衍生物,以及与一个、两个或更多个具有过氧化物酶活性的酶(例如HRP)结合的至少一个二抗或其衍生物。

[0206] 在另一个实施方式中,单个靶标部位可以包括靶标的单个单元,至少一个与半抗原结合的一抗分子,以及与一个、两个、或更多个具有过氧化物酶活性的酶(例如HRP)结合的针对半抗原的抗体。

[0207] 在另一个实施方式中,靶标部位可以包括靶标的单个单元、对靶标特异的一个或多个第一核酸/核酸类似结合剂、和对第一核酸/核酸类似结合剂特异的第二核酸/核酸类似结合剂。

[0208] 以上的实施方式并非限制性的。本发明在其它实施方式中可以涉及上述任何靶标的单个单元与上述任何结合剂的任何组合,构成本发明的靶标部位。

[0209] 在一个实施方式中,本发明的单个靶标部位可以是固体支承物的单个位点,该固体支承物包括本发明的标记有酶活性(即与具有氧化还原酶活性的酶直接或间接结合)的靶标的单个单元,或重组融合分子的单个单元,该重组融合分子包括具有氧化还原酶活性的酶。在一个实施方式中,氧化还原酶可以是靶标本身。相应地,在该实施方式中的靶标部位可以仅包括氧化还原酶的单个单元,例如氧化还原酶的固定部分,例如固定在固体支承物上或固体支承物内的HRP或漆酶。

[0210] 酶底物

[0211] 在与一个或多个结合剂孵育并形成本发明上述的靶标部位后,在水溶液(i)中孵育根据本发明的包括一个或多个单个靶标部位的样品。根据本发明的水溶液(i)包括与本发明单个靶标部位相关的酶的第一底物,其中所述第一底物是水溶性富电子有机化合物,其(1)能够在与酶反应时产生稳定的自由基,并且(2)能够在酶与过氧化物两者的存在下使所述酶的第二底物分子交联,从而产生所述第二底物的水不溶性聚合产物。根据本发明的水溶液(i)还包括与本发明的单个靶标部位相关的酶的第二底物,其中所述第二底物是包括至少两个能够用作为所述酶底物的化合物以及可检测标记物的结合物分子,其中可检测标记物选自荧光的、发光的、放射性的或发色的物质或特异结合对的成员。

[0212] 第一底物

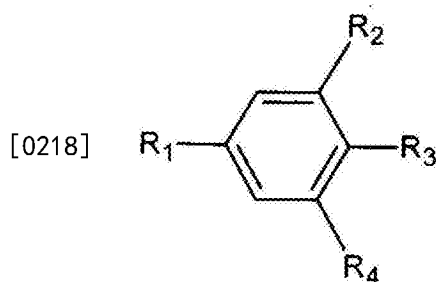
[0213] 与本发明单个靶标部位相关的酶的第一底物(在下文中也称为“第一底物”)是具有氧化还原酶活性的酶的底物。该底物(1)是水溶性富电子有机化合物,(2)能够在与所述酶反应时产生自由基,并且(3)能够在(在所述酶和过氧化物的存在下)使所述酶的第二底物的水溶性分子交联,从而生成所述第二底物的水不溶性聚合产物。

[0214] 术语“水溶性”是指第一底物分子在水和含水溶液中可溶。本文中的术语“富电子化合物”是指包括连接的p-轨道的共轭体系,包括具有交替的单键和多键的化合物。孤对电子和自由基可以是该体系的一部分。化合物可以是环状、无环或两者。“共轭”是指一个p-轨道与另一个p-轨道跨越介于其间的 $\delta$ 键存在重叠(在较大的原子中,可涉及d-轨道)。共轭体系具有重叠p-轨道的区域,其桥连居间的单键。它们使得pi电子跨越所有相邻排列的p-轨道离域,其通常可以降低分子的总体能量并增加稳定性。共轭体系的pi电子不属于单个键或原子,而是属于一群原子。

[0215] 本发明的具有氧化还原酶活性的酶群包括能够利用大量底物的不同酶。在这些底物中,本发明的底物是含有共轭pi体系的水溶性有机富电子有机化合物,其能够在与本发明中具有氧化还原酶活性的酶反应时产生自由基,优选为稳定的自由基。本文中的术语“稳定的自由基”是指在本发明的条件下,例如在(下述)水溶液(A)中,第一底物的自由基具有至少20秒的寿命,优选约1分钟至约15分钟,或更长,例如2、3、4或5分钟,在5和10分钟之间等。此外,构成本发明第一底物组的化合物的自由基能够使本发明的第二底物的水溶性分子交联,从而将所述水溶性分子转化为水不溶性聚合产物。

[0216] 具体而言,在一个实施方式中,本发明涉及由一组水溶性有机富电子化合物表示的第一底物,该水溶性有机富电子化合物包括一组互连的碳原子,其中每个第二键为双键,优选为包括至少三个(C=C)重复的链的化合物、或包括芳香环结构的化合物。

[0217] 在一个实施方式中,第一底物可以由包括式(1)结构的化合物表示:



[0219] 其中

[0220] R1是芳基或乙烯基,

[0221] R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>独立地为H、N-(X)<sub>2</sub>、O-(X)<sub>2</sub>,其中X是烷基、乙烯基或芳基、或H,并且其中R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>不同时为H,

[0222] 其中

[0223] N是氮,

[0224] H是氢;

[0225] O是氧。

[0226] 具有作为本发明中具有氧化还原酶活性的酶的第一底物的能力的上式的化合物的非限制性实例可以是3',3'-二氨基联苯胺、阿魏酸、羟基肉桂酸及其衍生物。

[0227] 在一个优选的实施方式中,本发明涉及作为第一底物的3',3'-二氨基联苯胺(DAB)。

[0228] 本发明利用DAB的能力,从而在具有氧化还原酶活性的酶(即,辣根过氧化物酶(HRP))和过氧化物(即,过氧化氢)的存在下,形成能够使第二底物的分子交联的稳定自由基,并将第二底物的交联分子离散地沉积在单个靶标部位。

[0229] 在另一个优选实施方式中,本发明涉及作为第一底物的阿魏酸。

[0230] 阿魏酸能够在具有氧化还原酶活性的酶(即,辣根过氧化物酶(HRP))和过氧化物(即,过氧化氢)的存在下,使第二底物的分子交联,并将所述第二底物离散地沉积在本发明的单个靶标部位处。作为第一底物的阿魏酸在靶标部位处需要第二底物的较大沉积(例如,直径大于2微米的点)的实施方式中特别有用。

[0231] 在一些其它优选实施方式中,本发明可以涉及3',3'-二氨基联苯胺或阿魏酸的衍生物。本文中的术语“衍生物”是指源自3',3'-二氨基联苯胺、阿魏酸的化合物或能够想象产生自3',3'-二氨基联苯胺、阿魏酸的化合物(如果在后分子中的一个原子用另一个原子或原子团替换)。本发明涉及满足上述本发明第一底物要求的3',3'-二氨基联苯胺和阿魏酸的衍生物,例如,作为阿魏酸衍生物的 $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸。

[0232] 在另一个优选实施方式中,本发明涉及作为第一底物的4-羟基-肉桂酸及其衍生物,例如 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸。作为第一底物的 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸在需要小且紧凑地沉积第二底物(例如,约2微米和更小的点)的实施方式中特别有用。

[0233] 出于本发明的目的,即为了在本发明的条件下生成直径大于0.4微米的第二底物的沉积,例如约1微米、1.5微米、2微米、3微米或4微米,第一底物在水性介质(A)和/或水性介质(B)中的量可以根据表示第一底物的化合物的结构而从约0.05mM变化到约15mM。

[0234] 例如,作为第一底物的阿魏酸或其衍生物在水性介质(A)中的量可以在0.5mM至5mM之间变化,例如约0.5mM、约1mM、约1.5mM、约2mM、约2.5mM、约3mM。术语“约”表示所述值的1~25%的偏差。

[0235] 优选以约1.5mM至约15mM的范围使用作为第一底物的羟基肉桂酸的衍生物例如 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸,例如约1.5mM、约1.75mM、约2mM、约2.5mM、约3mM、3mM至4mM、4mM至5mM、5mM至6mM、6mM至7mM、7mM至8mM、8mM至9mM、9mM至10mM、10mM至11mM、11mM至12mM、12mM至13mM、13mM至14mM、14mM至15mM(包括所有所述区间的两个端点以及所有区间内的值)。

[0236] 当使用DAB作为第一底物时,其在水溶液(A)中的量优选少于1mM,优选在0.05mM至1mM的范围内,例如0.05mM至0.08mM,例如约0.07mM,即0.066mM至0.074mM,或0.08mM至0.1mM,例如约0.09mM,或0.1mM至0.3mM,例如约0.15mM、约0.2mM、约0.25mM、或0.3mM至

0.6mM, 例如约0.35mM、约0.4mM、约0.45mM、约0.5mM、约0.55mM, 或0.6mM至1mM, 例如约0.7mM、约0.75mM、约0.8mM、0.8mM至1mM。

### [0237] 第二底物

[0238] 根据本发明, 本发明的酶的第二底物(在本文中也称为“第二底物”)是包括至少两个能够用作为所述酶底物的化合物以及可检测标记物的结合物分子, 其中可检测标记物选自荧光的、发光的、放射性的或发色的物质或特异结合对的成员。

[0239] 在一些优选实施方式中, 本发明涉及很多作为第二底物的结合物分子, 其共享以下特征:

[0240] 1. 结合物分子是水溶性分子, 包括两个或更多个能够用作为本发明酶底物的物质, 优选为HRP的底物, 以及一个或更多个标记物, 其中底物和标记物经由水溶性连接化合物(在下文中称为“连接物”)而连接;

[0241] 2. 酶底物部分在结合物分子中“集中”于所述分子的一部分, 而标记物“集中”于所述分子的另一部分, 其中标记物距离底物约30个连续互连的原子或更多, 即, 隔开约2.5nm或更远, 优选多于3nm;

[0242] 3. 酶底物相互隔开少于2.5nm的距离, 例如在结合物分子内隔开少于30个互连的碳或杂原子或更少, 例如碳、氮、硫和/或氧原子, 优选不多于5~20个原子;

[0243] 4. 连接物是包括至少30个连续连接的原子的化合物;

[0244] 5. 在环境中没有具有氧化还原酶活性的酶的情况下, 结合物并不从含有过氧化物和本发明第一底物的水溶液(ii)中沉淀出;

[0245] 6. 在环境中存在具有氧化还原酶活性的酶而没有所述酶的第一底物的情况下, 结合物并不从含有过氧化物的水溶液(ii)中沉淀出;

[0246] 7. 在环境中存在所述酶的情况下, 结合物从含有过氧化物和本发明具有氧化还原酶活性的酶的第一底物的水溶液(ii)中沉淀出。

[0247] 第二底物的沉积可以通过视觉手段而直接可检测, 因为它们在一些实施方式中可以包括发色的、荧光的或发光的标记物。在其它实施方式中, 沉淀的第二底物可以在沉积之后的步骤中被“染色”以可见。在两种情况下, 第二底物的沉积将对观测者“报道”本发明单个靶标部位在周围环境中的存在。本发明的第二底物分子因此在本文中互换地被称为“报道物”分子。

[0248] 在以下及实施例部分中详细说明适用于本发明目的的第二底物分子的非限制性实施方式。

[0249] 在一个实施方式中, 本发明涉及作为水溶性结合物分子的第二底物, 其包括

[0250] (i) 一个或多个可检测物质(可互换地称为“标记物”),

[0251] (ii) 至少两个能够用作为本发明酶底物的物质, 以及

[0252] (iii) 连接物,

[0253] 其中,

[0254] 所述连接物是包括至少一个由至少30个连续连接的原子构成且含有至少两个分支点的直链的化合物, 其中所述分支点被隔开至少30个连续连接的原子的分子距离;

[0255] 其中,

[0256] 标记物(i)和氧化还原酶底物部分(ii)在两个分支点与连接物连接, 其中该两个

分支点被隔开至少30个连续连接的原子的分子距离，

[0257] 其中，

[0258] 任何两个相邻的酶底物相互隔开少于30个连续连接的原子的分子距离。

[0259] 术语“可检测物质”是指物质可以发出可检测的发色、荧光、发光或放射性信号，其通过视觉手段检测，或者可以使用其特异结合配偶体例如抗体、核酸序列、核酸序列类似序列、半抗原、抗原、受体、受体配体、酶等来检测。

[0260] 在一些实施方式中，本发明的水溶性结合物分子还可以包括可以增强其特征(例如改善其作为标记物或酶底物的能力或增加/减少其水溶性)的部分。

[0261] 在一个实施方式中，本发明的结合物分子可以选自式(11)的化合物：

[0262]  $(Y)_n-L-(Z)_m$ ，

[0263] 其中，

[0264] Y是能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的部分；

[0265] Z是可检测的标记物；

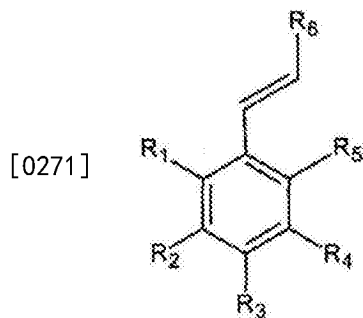
[0266] L是连接化合物，

[0267] 其中

[0268] N是2~150之间的整数，且

[0269] M是1~150之间的整数。

[0270] 在一个优选实施方式中，Y选自下式(11)的化合物：



[0272] 其中

[0273] R1是-H、-O-X、N(X)<sub>2</sub>或-S-X；

[0274] R2是-H、-O-X、-N(X)<sub>2</sub>或-S-X，

[0275] R3是-H、-OH、-NH<sub>2</sub>或-SH；

[0276] R4是-H、-O-X、-N(X)<sub>2</sub>或-S-X，

[0277] R5是-H、-O-X、N(X)<sub>2</sub>或-S-X，

[0278] R6是-CON(X)<sub>2</sub>或CO-X，

[0279] 其中

[0280] H是氢；

[0281] O是氧，

[0282] S是硫，

[0283] N是氮，且

[0284] X是H、烷基或芳基。

[0285] 在一个实施方式中，至少一个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合

物是式(ii)的化合物。

[0286] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的化合物。

[0287] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的相同化合物。

[0288] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的不同化合物。

[0289] 在一个实施方式中,结合物分子中的所有能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物由式(11)限定。在一个实施方式中,这些化合物是相同的化合物,在另一个实施方式中结合物分子包括由式(11)限定的不同化合物的任意组合。

[0290] 在一个优选实施方式中,Y可以是肉桂酸的残基;在另一个优选实施方式中,Y可以是阿魏酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y可以是咖啡酸的残基;在另一个优选实施方式中,Y可以是氨基肉桂酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y可以是芥子酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y可以是阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸或芥子酸的衍生物。

[0291] 优选地,由式(11)限定的残基Y经由基团R6与连接物L连接。

[0292] 在一个优选实施方式中,结合物包括两到四个相同的残基Y。在另一个优选实施方式中,结合物包括两到四个不同残基Y的组合。在一个优选实施方式中,两到四个残基Y是式(11)限定的化合物。

[0293] 在一个优选实施方式中,结合物可以包括两到四个阿魏酸的残基或其衍生物的残基,在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个肉桂酸的残基或其衍生物的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个咖啡酸的残基或其衍生物的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个氨基肉桂酸的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个芥子酸的残基或其衍生物的残基。在后化合物的两到四个衍生物可以是相同的化合物或可以是不同的化合物。

[0294] 在一个优选的实施方式中,结合物分子可以包括式(11)的两个Y化合物,或其两个衍生物,例如两个阿魏酸残基,或两个肉桂酸残基,或两个氨基肉桂酸残基,或两个咖啡酸残基,或两个芥子酸残基等,以及一个或多个可检测的标记物;在另一个实施方式中,结合物可以包括式(11)的三个分子或其三个衍生物,例如三个阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸、芥子酸等,以及一个或多个可检测的标记物;在另一个实施方式中,结合物可以包括式(11)的四个化合物或其四个衍生物,例如四个阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸、芥子酸或四个衍生物,以及一个或多个可检测的标记物。

[0295] 在一些实施方式中,Y化合物的数量可以高于4,例如5~10、10~15、15~20、20~50、50~100或100~150个化合物。在实施例部分中描述这样的结合物分子的非限制性实例。在一些优选的实施方式中,这样的结合物可以包括多于一条至少30个连续连接的原子的直链,例如30~150个原子,其中两到四个Y化合物在链的第一且相同的分支点与各条直链直接,并且数条这样的直链经由所述直链的第二(另一)分支点与另一水溶性连接分子例如葡聚糖连接。

[0296] 在一个优选实施方式中,结合物分子可以包括两个或四个式(11)的不同化合物的组合,或者两个或四个其衍生物的组合,例如两个阿魏酸残基和一个肉桂酸残基、两个芥子

酸残基和两个咖啡酸残基等。

[0297] 在一个优选实施方式中，Y可以是氨基酸酪氨酸的残基或其衍生物的残基。结合物可以包括2~4或更多个这样的残基。

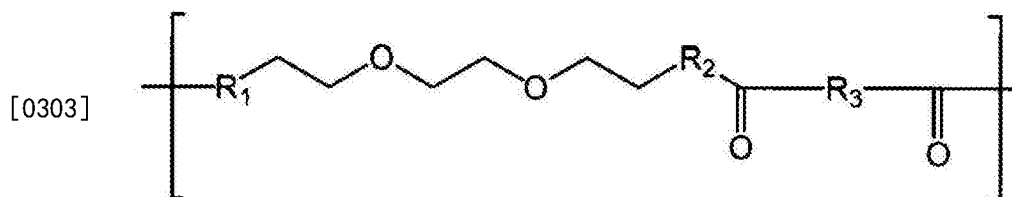
[0298] 在一个实施方式中，结合物分子可以包括具有氧化还原酶活性的酶的底物的组合，其中至少一个所述底物是酪氨酸。在一个实施方式中，结合物分子包括至少一个酪氨酸残基和至少一个式(11)的化合物或其衍生物，以及至少一个另外的化合物是式(11)的化合物或其衍生物，例如，一个酪氨酸残基和两个芥子酸残基或其衍生物。

[0299] 在一些实施方式中，可以优选结合物包括4~6个残基Y，其中由上述任何化合物或任何化合物的组合表示Y。

[0300] 根据本发明，Y化合物作为组位于结合物分子中，优选分组为每组中两到四个Y化合物，(即，包括多于四个Y化合物的结合物可以包括数组两到四个Y化合物，其中在结合物分子中通过一群原子例如以与30个或更多连接原子相应的分子距离隔开所述组)。优选地，这些组中的两到四个Y化合物经由在两个相邻Y残基之间提供距离的间隔化合物而连接在一起，该距离不长于5~15个互连的原子，例如5~10、6~12、7~13、8~14、9~15等。例如，2~4个Y化合物可以与氨基酸连接，该氨基酸构成含有2~4个氨基酸残基例如赖氨酸、丝氨酸、半胱氨酸等的残基的肽链，其中Y化合物与肽的氨基酸残基的反应基团连接，例如与赖氨酸残基的ε氨基连接。两到四个化合物Y也可以经由包括多个分支点的其它短聚合物来相互连接，其中这些分支点之间的分子距离相应于不多于3~7个原子的链，优选3~5个原子，其中Y化合物可以与所述分支点直接或间接地连接。还可以把两到四个与非聚合分子结合的化合物Y分组到一起，该非聚合分子具有允许连接任何两到四个Y化合物的两到四个反应基团。Y化合物的这种分组位置(grouped location)在之后被称为结合物分子的“Y-头”。

[0301] 在一个优选实施方式中，Y-头包括经由短聚合物(例如，短PNA分子或短肽，其中肽优选包括赖氨酸、丝氨酸、谷氨酸盐和/或半胱氨酸残基)连接的两到四个Y残基。然而，包括15个或更少原子且可以与至少两个Y残基和连接物L结合的任何其它聚合或非聚合水溶性分子可以是合适的。

[0302] 在一个实施方式中，包括两到四个化合物Y的一个Y-头可以与包括下式(111)的两个或更多重复的聚合物连接：



[0304] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>选自NH和O，且R<sub>3</sub>选自甲基、乙基、丙基、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>和(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>，且其中不多于三个连续重复的乙氧基。所得结合物还可以与一个(或多个)可检测标记物结合，或其可以与另一个水溶性分子结合，该另一个水溶性分子包括一个或多个允许连接一个或数个这样的结合物的反应基团。这样的水溶性分子的一个非限制性实例可以是葡聚糖聚合物。

[0305] Y化合物在结合物分子中的紧密间隔对作为本发明第二底物的结合物的功能有影响，即在环境中没有酶的情况下，结合物在含有过氧化物和具有氧化还原酶活性的酶的第一底物的水溶液中保持可溶(如上所述)，但是当在环境中存在具有氧化还原酶活性的酶时

快速并有效地从该溶液中沉淀出(与包括仅一个Y化合物或包括数个Y化合物的结合物相比,该数个Y化合物不以Y-头的形式“集中”于结合物分子中,即,两个相邻Y残基之间的分子间隔大于上述距离。这样的化合物不能有效地在本发明的单个靶标部位处形成离散的沉积)。

[0306] 结合物分子的可检测标记物可以是视觉上可检测的任何物质,例如荧光或发光的物质,或可通过使用一些检测手段检测出的任何物质,例如放射性标记物,特异结合对的成员,例如核酸序列、半抗原等。

[0307] 可以使用任何荧光的、发光的、生物发光的或放射性分子作为标记物。很多是市售的,例如荧光染料Alexa Fluors(分子探针)和DyLight Fluors(Thermo Fisher Scientific)。荧光标记物的其它非限制性实例可以是以下分子:5-(和6-)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6-)-甲酰氨基己酸、异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、Cy2、Cy3、Cy5、AMCA、PerCP、R-藻红蛋白(RPE)、别藻红蛋白(allophycocyanin, APC)、德克萨斯红、Princeton Red、绿色荧光蛋白(GFP)涂覆的CdSe纳米晶、钆衍生物、氨基苯二酰肼、异氨基苯二酰肼、吡啶酯、1,2-二氧杂环丁烷(1,2-dioxetane)和吡啶并咪唑,氢、碳、硫、碘、钴、硒、氙或磷的放射性同位素。

[0308] 在一些实施方式中,可检测的标记物可以是酶。合适的酶标记物的非限制性实例可以是碱性磷酸酶(AP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶、葡糖氧化酶(GO)。

[0309] 在其它实施方式中,可检测标记物可以是特异结合对的成员,例如半抗原。作为合适半抗原的非限制性实例,可以是提到的2,4-二硝基酚(DNP)、地高辛(digoxigenin)、荧光素、德克萨斯红、四甲基罗丹明、硝基酪氨酸、乙酰氨基苄、三硝基苯酚汞(mercury trinitrophenol)、雌二醇、溴脱氧尿苷、二甲基氨基萘磺酸酯(丹酰)、氨基酸酪氨酸、丝氨酸等。作为合适的特异结合对的实例,还可以是提到的生物素、链霉亲和素、互补的天然和非天然寡聚核苷酸序列、锌指结合结构域对等。其它实例在以上讨论。

[0310] 在一个优选实施方式中,标记物是半抗原。在另一个优选实施方式中,标记物是荧光物质。在另一个优选实施方式中,标记物是特异结合对的成员。在其它实施方式中,可以优选其它标记物。

[0311] 每个结合物分子(上述中的任意一个)中的可检测标记物的数量可以变化。在一些实施方式中,相对于每个结合物分子标记物的数量可以是1~3,例如1、2或3个标记物。在一些其它实施方式中,结合物相对于每个结合物分子可以包括更多的4~150个标记物。

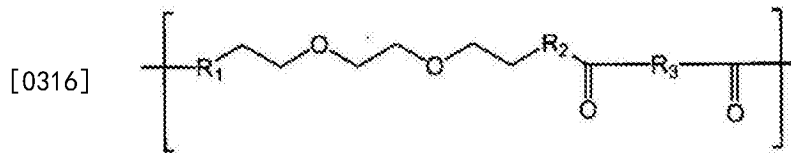
[0312] 在一个优选实施方式中,结合物(上述中任意一个)包括一个可检测标记物。在一个优选实施方式中,结合物分子可以包括一个Y-头(上述中的任意一个)和一个标记物。

[0313] 根据本发明,在结合物分子中,可检测物质(单个标记物或多个)与作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物(例如与Y-头)隔开多于2.5nm的分子距离,例如隔开至少30个连续原子(例如30~150或更多连续原子)的链。在结合物在Y-头与1个(或多个)标记物之间包括一个连接原子链作为L连接物的实施方式中,Y-头和标记物在相互隔开至少30个原子的分支点处例如在30个连接原子链的相反两端与所述链连接。

[0314] 在一些实施方式中,当结合物包括多于1个标记物时,优选对标记物分组使得标记物之间的分子距离相应于至少30个连接原子的链(称为“间隔物”),优选60个连续原子或更

多,例如90个连续互连的原子。优选标记物之间的间隔物是亲水化合物。在后组的标记物之后以上述方式与在结合物分子中连接所述标记物和酶底物部分的连接化合物连接,即,位置最靠近Y-头的组的标记物距离任何Y-头的酶底物至少30个互连原子,即,至少2.5nm距离。多个标记物在结合物分子中的这种排布在之后被称为“Z-尾”。

[0315] 优选地,在Z-尾的标记物之间的至少30个连续原子的间隔物是包括下式(111)的两个或更多重复的聚合化合物:



[0317] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>选自NH和O,且R<sub>3</sub>选自甲基、乙基、丙基、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>和(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,且其中不多于三个连续重复的乙氧基。

[0318] 连接上述间隔物并经其隔开的多个标记物可以经由任何合适的连接物例如允许多处连接的水溶性聚合物例如葡聚糖而与一个Y-头或数个Y-头结合。在一些实施方式中,数个Y-头可以经由这些聚合物与数个Z-尾结合。

[0319] 在一个实施方式中,本发明结合物分子的多个标记物可以是相同的可检测物质,在另一个实施方式中,标记物可以是不同的可检测物质。

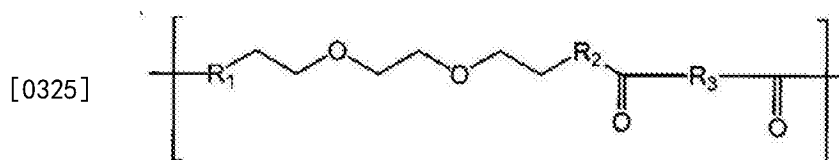
[0320] 标记物的Z-尾排布具有的优势是(1)包括多个疏水标记物的结合物在水溶液中保持良好的溶解性,以及(2)当使用结合剂来检测沉积结合物时,标记物对结合剂而更容易接近。

[0321] 氧化还原酶底物与标记物之间(例如Y头与Z尾之间)的连接物L根据本发明是包括至少30个连续原子的链的分子,例如30~150个原子或更多,例如30、45、60、90、150、300、500个原子或更多。在一个优选实施方式中,优选地,L包括150个连续的原子。在一些实施方式中,连接分子包括原子直链,其中每两个连接碳原子之后是氧或氮原子。

[0322] 在一个优选实施方式中,L可以是单个直链聚合物分子;在另一个优选实施方式中,L可以是可包括结合在一起的数个不同聚合物的结合物分子。

[0323] 在一个优选实施方式中,L是包括原子链的直链聚合物,其中两个连续碳原子之后是选自氧或氮的杂原子,例如,包括下述的连接物或聚乙二醇等。

[0324] 在另一个优选实施方式中,连接物是包括下式(111)的两个或更多个重复的化合物:



[0326] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>选自NH和O,且R<sub>3</sub>选自甲基、乙基、丙基、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>和(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,且其中不多于三个连续重复的乙氧基。

[0327] 优选地,L包括上式的至少两个重复,其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>均为NH且R<sub>3</sub>为CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>。优选地,L包括下式(1V)的一个或多个重复



W02007/015168中详细描述,其并入本文以供参考。

[0336] 在实施例部分描述包括连接物的示例性的结合物,该连接物是包括多个式(111)的重复的聚合物,例如包括两个L30重复的聚合物(称为L60),例如包括三个L30重复的聚合物(称为L90),例如包括五个L30重复的聚合物(称为L150)。

[0337] 第二底物在水性介质(ii)中的量可以在约 $10^{-10}$ M至约 $10^{-4}$ M范围内变化,例如,在结合物(上述中的任意一个)包括放射性标记物的情况下,适用的量可以是约 $10^{-10}$ M至约 $10^{-6}$ M,并且在结合物包括荧光标记物或作为特异结合对成员的标记物的情况下,适用的量可以是约 $10^{-9}$ M至约 $10^{-4}$ M。

#### [0338] 孵育介质

[0339] 在一个实施方式中,根据本发明,在可视化过程中在不同的水性介质(本文中统称为“孵育介质”)中孵育包括靶标的单个单元的样品。

[0340] 术语“孵育介质”在本文中是指在某个时间段(在本文中称为“孵育时间”)中保持样品以达到所需反应结果的水溶液。

[0341] 将样品保持/孵育在孵育介质中的时间,即孵育时间,可以根据孵育之后想要达到的技术效果而变化。在不同的实施方式中,孵育可以持续约3秒至约3分钟,例如约10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、5分钟、10分钟或更长,例如1~2小时、过夜。在一个实施方式中,方法所有步骤中的孵育时间可以具有相同的持续时间,即,各个孵育可以持续5~10分钟等。另一个样品可以在包括结合剂的水溶液(在下文中称为“结合剂溶液/介质”或“BAM”)中持续1~3分钟,水性介质(i)和/或水溶液(ii)介质中的孵育可以持续10分钟。

[0342] 根据靶标、结合剂类型等,可以在不同温度进行孵育。根据本发明的过程基本上不依赖温度且可以在约+4°C至约+40°C的温度下进行。然而,如果需要的话,温度可以用于延长或减短孵育的持续时间,例如可以使用较低的温度来延长孵育时间,相反亦然,可以使用较高的温度来缩短孵育时间。

[0343] 在下面讨论孵育介质的组成的非限制性实施方式。

#### [0344] 结合剂介质

[0345] 在本发明方法的步骤(a)中,样品与一种或多种结合剂一起孵育(例如上述)。因此,在一个实施方式中,本发明涉及包括结合剂(例如含有具有氧化还原酶活性的酶的结合剂)的水溶液。该介质在本文中称为“结合剂介质”。

[0346] 根据本发明,因样品在这样的介质中孵育而将要达到的一个期望的技术效果是形成靶标部位。因而,结合剂介质是水性介质,其中所选的结合剂是可溶的且能够与单个靶标单元结合。基本上,结合剂介质是pH在4~9范围内的一种或多种结合剂的缓冲水溶液。在一些实施方式中,结合剂介质可以包括有机或无机盐。无机盐可以选自例如氯化钠、氯化镁、氯化钾、氯化钙、磷酸钠或硫酸铵。有机盐可以选自例如醋酸钠、醋酸铵或咪唑盐,例如咪唑盐酸盐等。

[0347] 盐在结合剂介质中的量可以从约 $10^{-3}$ M变动到饱和,例如约20mM至约200mM,或约50mM至约500mM。在一个优选实施方式中,介质可以包括约10mM至500mM量的盐。在另一个优选实施方式中,介质可以没有盐。

[0348] 如上所述,通常,结合剂介质的pH值可以从约4变化到约9,例如在pH3.5与pH9.5之间,例如在pH5与pH7之间,在pH5.5与pH6.5之间或在pH6.5与pH7.5之间,或在pH7与pH8之

间,或在pH7.5与pH8.5之间,或在pH8与pH9之间。可以使用任何具有合适缓冲能力的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐(PBS)和咪唑缓冲液。其它合适的缓冲液可以在Good,NE.,等人(1966)Hydrogen ion buffers for biological research.Biochem.5(2),467-477中找到。介质的pH值对于结合剂与靶标的结合可以是重要的;可以根据结合剂和靶标的性质来使其最佳化。

[0349] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括有机改性剂(术语“有机改性剂”是指任何非水溶剂),例如N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇和二甘醇、环丁砜、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、聚乙二醇(PEG)、丙二醇等。有机改性剂的量可以在约1%至约20%(v/v或w/v)的范围内变化,或者在一些实施方式中可高于20%。

[0350] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括洗涤剂,例如聚乙二醇对异辛基苯基醚(NP-40)或表面活性剂(例如,选自基于聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温)的表面活性剂、或基于嵌段聚合物(pluronic等)的表面活性剂等。洗涤剂的量可以在约0.001%至约5%(v/v或w/v)的范围内变化。

[0351] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括结合剂稳定剂,例如牛血清白蛋白或葡聚糖。稳定剂的量可以在0.01~20%(w/v)的范围内变化。

[0352] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括离子螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二胺羟基苯乙酸型螯合剂(EDHPA)等)。螯合剂的量可以在约 $10^{-9}$ M至约 $10^{-6}$ M的范围内变化。

[0353] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括一种或多种封闭剂以使非特异结合位点即不包括靶标的固体支承物的位点饱和。适用于不同实施方式的封闭剂的一些非限制性实例可以是Denhard溶液、牛血清白蛋白、脱脂奶等。

[0354] 如上所述,本发明涉及多种种类的靶标、结合剂和检定形式,因此,结合剂介质的组成可以变化并应该使用本领域知识来针对每个特定实施方式作出调整。在实施例部分描述结合剂介质的一些非限制实例。

[0355] 结合剂在结合剂介质中的量可以根据结合剂、样品、靶标的种类,介质组成等而变化。例如,在一个实施方式中,当样品包括以较低浓度范围存在的靶标时,可以优选在结合剂介质中使用较高量的结合剂,该结合剂介质的组成(例如,pH、盐浓度等)和孵育条件(例如,与样品孵育的持续时间、温度)被最佳化以促进结合剂与靶标(或其它结合配偶体)之间的相互作用。特异结合对的配偶体之间的结合的优化是对于用于本发明目的的大部分结合剂的常规操作,使得本领域技术人员能够通过遵循本领域的指南来实施。有时候需要这样的优化,以保证结合剂与样品中最大可能数量的靶标单个单元或与另一结合剂(例如,结合到靶标的结合剂)结合。

[0356] 在一个优选实施方式中,可以调整结合剂在结合介质中的量,以结合样品中存在的所有单个靶标单元或其部分子群。在另一个实施方式中,调整结合剂的量,以结合样品中单个靶标单元与另一结合剂的所有复合物或其部分子群。在一个实施方式中,部分子群相应于样品中单个靶标单元的大部分。在另一个实施方式中,部分子群相应于样品中小部分的单个靶标单元。在这样的实施方式中,可以调整结合剂介质的组成例如pH、盐含量等,或孵育条件例如温度、持续时间等,使得结合剂与其在样品中的配偶体的亲和性被减弱或增强,因此结合剂会与样品中存在的靶标的单个单元的较大或较小部分子群形成结合复合

物。在一个优选实施方式中,能够与其在样品中的配偶体特异结合的结合剂例如第一结合剂、第二结合剂的量,和/或在第一或第二结合剂混合物(参见以下)中的结合分子的量,即使在不利于配偶体结合的条件下对于使样品中所有可得的结合位点饱和而言是相对高的。

[0357] 本文中的术语“部分子群”是指样品中结合剂配偶体单元的总群的一部分,即等于或小于99.9%,例如等于或小于99%、98%、97%等,例如75~80%,小于75%,小于60%等,例如1%至50%,例如1%至25%等。在一些实施方式中,部分子群可以小于样品中存在的结合剂配偶体单元总量的1%。

[0358] 在一些优选实施方式中,样品中结合剂的结合配偶体的可检测的部分子群可以是预定的。这可以通过使用结合剂的结合分子的混合物来完成,其中混合物的结合分子全都是相同种类并对样品中的(对所有的所述结合分子是共同的)结合配偶体基本上具有相同的亲和性(本文中的“基本上”是指亲和性包括+/-10%的差异),并且其中一部分所述结合分子被可检测地标记且一部分所述结合分子未标记,且两个部分都是预定的。术语“标记的结合分子”是指所述结合分子与可检测标记物例如荧光标记物或酶相关/连接。在一个优选实施方式中,标记物是酶;在一个优选实施方式中,酶是氧化还原酶(例如,如上所述的那些,例如HRP)。未标记的结合分子不包括任何可检测的标记物。

[0359] 在一个这样的实施方式中,结合剂可以是能够与靶标的单个单元结合并与所述单个单元形成复合物的第一结合剂。在另一个这样的实施方式中,结合剂可以是对与样品中单个靶标单元结合的第一结合剂具有亲和性的第二结合剂。在一些实施方式中,结合剂可以是能够与第二结合剂、或者与连接至第二结合剂的标记物、或靶标部位处的报道物沉积结合的第三结合剂。

[0360] 使用包括预定比例的标记和未标记结合分子的结合剂(上述的任意一种),可以通过对由标记的结合剂形成的靶标部位(可视化为点)进行定量而精确定量样品中靶标的量。在实施例部分详细说明使用标记和未标记结合分子的混合物来对组织学样品中靶标进行定量的方法。

[0361] 水溶液(A)

[0362] 在结合剂介质中孵育之后,在包括具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、具有氧化还原酶活性的酶的第二底物和过氧化物的水溶液(A)(在本文中也称为“报道物沉积介质”或“RDM”)中孵育样品。

[0363] 任选地,在水溶液(A)中孵育之前,可以在水溶液(B)中孵育样品,该水溶液(B)的组成与没有第二底物的水溶液(A)相同。

[0364] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及的孵育介质是水溶液(A),且在另一个实施方式中,本发明涉及的孵育介质是水溶液(B)。

[0365] 水溶液(A)和水溶液(B)均可以是具有合适缓冲能力的水性缓冲溶液,例如,磷酸盐缓冲盐(PBS)和咪唑缓冲液。其它合适的缓冲液可以在Good, NE., 等人(1966)Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5(2), 467-477中找到。可以调整溶液的pH值以达到孵育的技术效果,即在本发明的离散的单个靶标部位处形成具有氧化还原酶活性的酶的第二底物的离散沉积,例如调整成约4至约9的pH范围。然而,水溶液(A)和(B)的pH对于孵育的技术效果具有较小的重要性。

[0366] 水溶液(A)和水溶液(B)两者还可以包括有机或无机盐。

[0367] 无机盐可以选自例如氯化钠、氯化镁、氯化钾、氯化钙、磷酸钠或硫酸铵等。

[0368] 有机盐可以选自醋酸钠、醋酸铵或咪唑盐,例如咪唑盐酸盐等。

[0369] 盐在水溶液(A)和水溶液(B)中的量可以从约 $10^{-3}$ M变化到饱和,例如约20mM至约200mM,或约50mM至约500mM。在一个优选实施方式中,介质可以包括约10mM至500mM量的盐。在另一个优选实施方式中,介质可以没有盐。

[0370] 水溶液(A)和水溶液(B)两者在不同实施方式中还可以包括:

[0371] (i)有机改性剂和/或

[0372] (ii)酶增强剂,和/或

[0373] (iii)铁螯合剂,和/或

[0374] (iv)洗涤剂,和/或

[0375] (v)抗菌剂。

[0376] 有机改性剂可以以约1%至约20%(v/v或w/v)的量存在于介质中,然而,在一些实施方式中,可能需要更高浓度的有机改性剂。有机改性剂可以例如是聚乙二醇(PEG)。其它实例包括但不限于选自C1~C4即低级醇、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇和二甘醇、环丁砜、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的有机改性剂。在一些实施方式中,可有利的是使用聚乙二醇(PEG)例如PEG2000,或丙二醇。在这些情况下,聚乙二醇在介质中的量可以在约0.1%(v/v)至约20%(v/v)的范围内变化,例如约1%(v/v)至约15%,例如5~10%(v/v)。

[0377] 术语“酶增强剂”是指增强过氧化物酶催化活性的任何化合物。这样的酶增强剂可以选自苯基硼酸衍生物和二价金属离子例如镍或钙。酶增强剂的量可以在约 $10^{-7}$ 至约 $10^{-3}$ M的范围内变化。

[0378] 铁螯合剂可以是乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二胺羟基苯乙酸型螯合剂(EDHPA)。铁螯合剂的浓度可以在约 $10^{-9}$ 至约 $10^{-6}$ M的范围内变化。

[0379] 洗涤剂可以选自聚乙二醇对异辛基苯基醚(NP-40),选自基于聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温)的表面活性剂、或基于嵌段共聚物(pluronic等)的表面活性剂的表面活性剂。洗涤剂的浓度可以在约0.001%至约5%的范围内变化。

[0380] 水溶液(A)的基本组分是具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、所述酶的第二底物和过氧化物。

[0381] 在以上详细讨论了第一底物和第二底物的实施方式。

[0382] 在一个优选实施方式中,第一底物可以是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)或其衍生物。在另一个优选实施方式中,第一底物可以是阿魏酸或其衍生物。

[0383] 第一底物在水溶液(A)中的量可以根据选为第一底物的化合物而变化(参见以上的讨论)。例如,在实施方式中,当DAB被选为第一底物时,DAB在水溶液(A)和水溶液(B)中的量小于1.4mM,优选小于1.2mM,优选小于1mM,例如约0.005mM至约0.5mM,例如约0.3mM,或约0.2mM,例如约0.15mM等。在阿魏酸用作第一底物的实施方式中,所述化合物的量小于2.5mM,优选小于2mM,例如约1.5mM。该上下文中的术语“约”是指 $\pm 0.05\sim 0.5$ mM。

[0384] 本发明中其它第一底物在水溶液(A)或(B)中的量在之前的章节中有过讨论。

[0385] 水溶液(i)可以包括多种量的酶的第二底物,例如约 $10^{-10}$ M至约 $10^{-4}$ M。例如,在第二底物(上述的任意一种)包括放射性标记物的实施方式中,适用的量可以在 $10^{-10}$ M至约 $10^{-6}$ M的范围内。在其它实施方式中,例如,当第二底物包括荧光标记物或作为特异结合对成员的

标记物时,量可以在约 $10^{-9}$ M至约 $10^{-4}$ M的范围内。

[0386] 在一个实施方式中,水溶液(A)可以包括第二底物的相同结合物分子的群体。在另一个实施方式中,水溶液(i)可以包括第二底物的不同结合物分子的群体。

[0387] 本发明的优选过氧化物是过氧化氢,然而,其它过氧化物也可以用于不同的实施方式中,例如,在一些实施方式中,其可以优选为有机过氧化物,例如叔丁基过氧化物、二叔丁基-过氧化物、过醋酸等,或者在一些实施方式中,其可以是过氧化氢的加合物,例如过氧化氢尿素加合物。

[0388] 过氧化物在水溶液(i)和水溶液(ii)中的量可以不高高于5mM,优选小于5mM,优选在0.1mM至5mM的范围内,例如0.1mM至1mM、1mM至2mM、2mM至3mM、或3mM至4mM,优选在约1mM至约2mM的范围内,例如约1.5mM。术语“约”在该上下文中是指 $\pm 0.05\sim 0.5$ M。

[0389] 包括具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、所述酶的第二底物和过氧化物的水溶液(A)在本文中称为“沉积介质”。

[0390] 水溶液(B)可以以与水溶液(A)中相同的量包括相同的化合物,不同之处在于水溶液(ii)不包括具有氧化还原酶活性的酶的第二底物。

[0391] 在一些实施方式中,可以初始在水溶液(B)中继而在水性介质(A)中孵育包括单个靶标部位的样品。

[0392] 在另一个实施方式中,在水溶液(A)中孵育包括单个靶标部位的样品,而不在水溶液(B)中预孵育。

[0393] 根据本发明,沉积介质是稳定的溶液,即在较长的时间(例如至少5小时)内不出现溶解化合物的沉积。为延长介质的保存期限,可有用的是在 $+20^{\circ}\text{C}$ 之下的温度例如在 $+4\sim +10^{\circ}\text{C}$ 储存介质,并且/或者向介质中添加抗菌化合物。抗菌化合物可以是任何常用于该目的的抗菌化合物,例如,叠氮化钠、Proclin<sup>™</sup>或 Bronidox<sup>®</sup>。

[0394] 检测介质

[0395] 在一个实施方式中,本发明涉及一种方法,在步骤(b)之后包括一个或多个步骤,包括检测在单个靶标部位处的第二底物的离散的单个沉积,例如,可以在包括能够与第二底物的沉积分子的可检测标记物特异结合的结合剂的孵育介质中孵育包括第二底物的离散沉积的样品。

[0396] 包括能够与第二底物的沉积分子的可检测标记物特异结合的结合剂的孵育介质通常具有与上述结合剂介质相似或相同的组成。

[0397] 在一个实施方式中,与沉积的第二底物的可检测标记物结合的结合剂可以包括酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)。可以使用标准的可视化体系来检测这些结合剂,该标准的可视化体系采用酶的发色底物,例如酶底物溶液或显色液。这种介质可以是领域内已知的任何合适介质,其根据可得的可视化手段并遵循关于沉积的可检测标记物的性质的普通常识而进行选择。

[0398] 或者,在结合剂包括HRP的情况下,本发明的可视化方法可以包括在上述沉积介质中孵育含有与所述结合剂结合的第二底物的离散沉积的样品的更进一步的步骤。在一些实施方式中,当与沉积的第二底物相关的信号可能较弱,或初始沉积的尺寸较小时,该更进一步的步骤可以是有利的。额外的沉积步骤允许与沉积相关的信号进一步放大,并且还可以增加可检测沉积在单个靶标部位的尺寸。此外,该步骤还允许对可检测信号的特性进行改

变,例如改变信号的光谱特征,例如,通过使用包括用于该额外沉积的绿色标记物的结合物分子来替代包括用于初始沉积的红色标记物的结合物分子(在方法的步骤(b)中),可检测为红色信号的初始标记物可以被取代为可检测为绿色信号的标记物。然而,本发明方法的这种灵活性不对检测步骤中使用的试剂增加额外的复杂度,因为可以成功地使用本发明步骤(a)和(b)(以上讨论的)的孵育介质的所有实施方式而无需在这些额外步骤中作出重大改变。

[0399] 在一个实施方式中,本发明涉及洗涤介质,即在孵育的技术效果发生之后用于从样品中去除(孵育介质中)剩余化合物的介质。本发明的方法通常可以在于上述介质中孵育样品的步骤之后例如在步骤(a)与(b)之间等包括一个或多个洗涤步骤。通常,洗涤介质可以是与洗涤步骤之前的步骤中孵育样品使用的相同介质,而没有孵育介质的基本化合物,即,没有结合剂、酶的底物等。

[0400] 在一个实施方式中,本发明涉及用于使内源性氧化还原酶活性终止的介质。这类介质可以是通常用于本领域目的的任何此类介质,例如过氧化氢溶液。可以在方法的步骤(a)之前使用该介质。也可以在步骤(b)之后且在沉积的第二底物的额外检测步骤之前使用该介质。该介质在过程的该阶段中的应用可以用于使样品中残余的氧化还原酶活性终止。

[0401] 第二底物的离散沉积和视觉上明显的点

[0402] 令人惊讶地发现,使用特定条件的沉积介质(其包括具有氧化还原酶活性的酶的第二底物的特定结合物分子以及较低量的具有氧化还原酶活性的酶的第一底物,过氧化物例如DAB和过氧化氢),可以在本发明的单个靶标部位处形成所述结合物分子的离散沉积,其具有明显的物理特征,即直径大于0.4微米的圆形沉积,其能够使用普通的显微镜而被直接观察或能够可视化为明显的点。使用相似的放大体系(采用可检测结合物分子的HRP-DAB介导的沉积,详情参见W02009036760、W02010094283和W02010094284),可以改善传统的HRP-DAB IHC染色,即靶标染色的均匀颜色图形变得更为清脆(crisp),从而改善细胞结构例如膜、细胞质和核的细胞内分辨率。相反,本发明的可视化体系提供靶标染色的点状图,其中一个单个点对应于一个单独的靶标单元例如一个单独的靶标分子,从而允许单独单个靶标单元例如单个靶标分子的细胞内分辨率。

[0403] 由本发明方法制备的本发明可检测结合物分子的沉积是三维的并具有大致的球形,其在二维视野例如显微视野下被观察为明显的大致圆点。因此,术语“圆点”(在本文中术语“点”和“明显的点”互换使用)在本文中是指,在二维视野中观察为明显的大致圆点的本发明可检测结合物分子的球形沉积。本文中的术语“明显”是指本发明的点是眼睛可区分的或认为是离散的。术语“大致圆”是指本发明的明显点具有约或小于0.65的偏心率。根据本发明的点具有约或大于0.4微米的直径。该上下文中的术语“约”是指 $\pm 0.05 \sim 0.5$ 微米。相比之下,通过传统DAB-HRP方法得到的DAB染色沉积的“点”、或由W02009036760、W02010094283和W02010094284的方法获得的在靶标部位处的染色的单个沉积、或通过CARD法得到的生物素基-和荧光基-酪胺(fluorescyl-tyramide)沉积,具有在普通显微镜(例如 $4\times$ 或 $10\times$ 放大明视野或荧光镜)的分辨极限之下的尺寸,即小于0.1微米。因此,不可以在低倍显微视野(例如 $4\times$ 或 $10\times$ )下直接观察由在后方法可视化的单独单个靶标单元。在本文中描述的方法允许检测单个靶标部位处本发明可检测结合物分子的单个沉积并使其可视化,从而使用低倍镜片来观察样品中靶标的固定单个单元。

[0404] 术语(具有氧化还原酶活性的酶的)“第二底物的一个单个沉积”或(本发明的)“可检测结合物分子的一个单个沉积”涉及第二底物的多个结合物分子的单个积聚。根据本发明,本发明中第二底物的一个明显沉积可以包括约1000至高达1000000个结合物分子或更多。

[0405] 如上所述,单个靶标部位处沉积的第二底物可以包括视觉上可识别的分子,例如包括视觉上可检测的标记物例如荧光标记物的分子。因此,在一个实施方式中,可以直接在形成沉积之后通过使用常规荧光显微镜经显微镜人员检测这些第二底物的沉积点。根据本发明使用至少一个额外检测步骤例如上述的额外步骤(c)来使包括不能经标准显微镜直接观察的标记物(例如,特异结合对的成员)的报道物分子的沉积可视化。

[0406] 可以控制点的数量、其大小和视觉外观。例如,在不同的实施方式中,可以产生具有特定大小和特定外观(例如,特定颜色)的点。

[0407] 在一个实施方式中,通过使用涉及本发明靶标部位形成且包括不同数量的酶部分(例如每一结合剂的HRP数量)的结合剂(本文中的术语“酶部分”或“酶”是指具有氧化还原酶活性的酶),沉积尺寸和点尺寸可以变化。在另一个实施方式中,可以通过沉积过程的持续时间来控制点尺寸。在另一个实施方式中,可以通过沉积介质的内容物例如第一和/或第二底物或过氧化物在沉积介质中的量来调节点尺寸。

[0408] 因此,在一个实施方式中,相对于用于形成靶标部位的结合剂的每一分子的酶数量可以影响点的尺寸。发现,点尺寸可以与每一包括一种或更多结合剂和靶标的一个单个单元的复合物的酶部分的数量直接相关。相比于使用相同结合剂但相对于每一分子包括较少酶部分而获得的点,当用于形成靶标部位的结合剂相对于每一分子包括大量的酶部分时,观察到更大的点(在其它方面相同的沉积条件,即相同的孵育时间、相同组成的沉积介质)。

[0409] 为在本发明的条件下制备与一个单个沉积对应的可见点时,靶标部位包括单个即一个酶部分是足够的,例如涉及靶标部位形成的结合剂包括单个HRP部分;然而,在两个或更多酶部分存在于同一靶标部位的实施方式中,与该靶标部位相关的点大于第一种情况下的点。因此,在一个实施方式中,与一个单个靶标部位相关的结合剂可以包括HRP的一个单个部分,在另一个实施方式中,结合剂可以包括HRP的两个或更多个部分,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方式中,相对于每一结合剂的酶部分的数量至少为2,优选为3~10,例如4~8个部分。

[0410] 令人惊讶地发现,使用涉及本发明靶标部位形成的结合剂(其中相对于每一结合剂分子的酶部分的数量至少为2),可以在其它方面相同的条件下(即,可视化过程的相同条件)产生近似相等尺寸的点。因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种方法,其中包括固定靶标的样品与一种或多种结合剂孵育,其中至少一种结合剂包括至少两个具有氧化还原酶活性的酶。因此,该实施方式中的靶标的单独单元被可视化为单独的基本上相同的点,即相同大小的点。在一个实施方式中,包括具有氧化还原酶活性的酶的结合剂的分子池可以异质的(heterogeneous),即所述分子相对于每一分子包括不同数量的酶部分,例如2~10个分子,11~20个分子等。在另一个实施方式中,本发明涉及一种方法,其中包括具有氧化还原酶活性的酶的结合剂分子池的每个分子,相对于每一结合剂分子包括基本上相同数量的酶部分,例如相对于每一结合剂分子包括1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9

~11、10~12等的酶部分。

[0411] 在另一个实施方式中,通过第一底物在沉积介质中的量例如通过DAB的量来调节点尺寸。当DAB在沉积介质中的量(其它方面可视化过程的条件,即相同的结合剂、相同的报道物、相同量的报道物、相同浓度的过氧化物、相同的孵育时间等)为约0.01mM至约1mM时,例如0.05mM至0.75mM,例如约0.075mM至约0.5mM,例如约0.1mM,例如0.15mM或,约0.3mM,例如0.28mM等时,可以形成其中(相对于每一点)沉积的报道物的量不少于1000分子的较大的点,即直径等于或大于0.4微米、或等于或大于1微米、或等于或大于2或3微米例如4或5微米的点。当在沉积介质中同时使用较多和较少量的DAB时,可以观察到尺寸更小即小于0.4微米的点。

[0412] 本发明结合物分子的组成和结构影响所述分子沉积为本发明第二底物(上述)的能力,因而它们影响沉积的尺寸和点的明显尺寸。此外,结合物的标记物可以影响点的外观。例如,在结合物分子包括荧光标记物的实施方式中,标记物的荧光基团的性质会影响点的外观,例如在相同的条件下,包括丽丝胺(Lissamine,红色荧光基团)的结合物比包括荧光素(绿色荧光基团)的相似结合物产生更强烈的点。此外,在其它方面相同的条件下,沉积介质中较高量的第二底物可以导致形成较大的沉积。

[0413] 还可以通过第二底物沉积所使用的时间来调节点的尺寸。在沉积介质中较长的孵育时间允许在单个靶标部位处沉积较多的结合物分子,从而增加单个沉积的尺寸继而增加单个点的尺寸。在其它方面相同的条件下,即相同的结合剂、相同的介质等,将孵育时间从30秒增加到10分钟可以使得酶产生能够被观察为直径约5微米的单个点的沉积。然而,孵育持续时间的进一步增加并不增加单个沉积的尺寸。然而,在沉积介质中较长的孵育时间不减小单个沉积的尺寸,而且如果需要的话,可以使用较长的孵育时间,例如高达20或30分钟或更长。因此,在不同的实施方式中,方法的沉积步骤的持续时间可以在约30秒至约20分钟的范围变化,例如1、2、3、4、5、10或15分钟,例如在一个实施方式中,孵育时间可以是约30秒,在另一个实施方式中,时间可以是约2分钟。在一个实施方式中,优选结合物分子在5~10分钟的过程中沉积。

[0414] 过氧化物在沉积介质中的量也可以用作调节报道物沉积尺寸以及点尺寸的因素。为获得直径高达5微米的单个点,过氧化物例如过氧化氢在沉积介质中的量应该少于2mM,优选量不超过1.5mM。较高量的过氧化物导致形成尺寸较小的点。

[0415] 所有以上讨论的因素在本文中称为“初始因素”,因为它们影响第二底物的初始(initial或primary)沉积的形成。如上所述,例如在第二底物的结合物分子包括荧光标记物的情况下,可以在发生沉积之后即刻观察到这样的初始沉积。在其它实施方式中,例如在结合物包括作为特异结合对的成员(例如半抗原)的标记物的情况下,初始沉积不是可直接观察的,然而,它们可以在沉积步骤之后的一个或多个检测步骤(在本文中称为“二次可视化过程”)中被可视化。二次可视化过程的数个因素也可以影响作为点的沉积的视觉尺寸和外观,从而增加本发明可视化体系的灵活性。因此,这些因素被称为“二次因素”。

[0416] 可以通过执行直接或间接跟随沉积步骤的检测步骤(c')和(c'')来使包括作为特异结合对的成员的报道物分子的沉积可视化:

[0417] (c'')把在单个靶标部位处包括第二底物的离散沉积的样品与能够与沉积的第二底物的可检测标记物直接或间接结合的一种或多种结合剂一起孵育,其中至少一种结合剂

包括一个或多个选自放射性的、荧光的或发光的物质,特异结合对的成员或酶的可检测标记物,从而形成包括沉积的报道物和所述至少一种结合剂的复合物,

[0418] (c'')在样品中检测包括可检测标记物的结合剂,从而使在一个或多个单独靶标部位处的一个或多个报道物沉积可视化,并从而使样品中靶标的一个或多个单独单元可视化。

[0419] 本文中的术语“间接”是指,其可以是步骤(b)与(c')之间的一个或多个任选步骤,例如洗涤步骤。

[0420] 通过使用识别包括多个酶部分(其可以利用发色或荧光底物,例如HRP或碱性磷酸酶(AP))的结合剂的报道物(作为可检测标记物),可以对沉积“染色”并产生明显的视觉上可检测的点。在这种情况下,通过产生某个尺寸的明显的视觉上可检测点,可以“增加”或“减小”单个沉积的原始尺寸。在一个实施方式中,使用标记有HRP或另一个氧化还原酶的结合剂,以及沉积的最佳条件(如上所讨论),沉积步骤可以重复一次或多次,从而在每个重复之后增加单个靶标部位处的可检测沉积的尺寸。在另一个实施方式中,使用标记有HRP或另一种氧化还原酶的结合剂,以及沉积的次佳条件(如上所讨论),可以重复沉积步骤,从而产出较小尺寸的沉积以及较小尺寸的相应可检测点。在一个实施方式中,可以使用结合物分子作为第二底物来重复沉积步骤,该结合物分子不同于用于初始沉积的结合物分子,例如包括另一标记物,例如丽丝胺标记物而非荧光素标记物。在其它实施方式中,可以使沉积时间或沉积介质条件最佳化,从而在初始单个靶标部位产生较小或较大的二次沉积。

[0421] 因此,用于本发明中的可视化体系是灵活且有效的放大体系。双重调节体系提供额外的灵活性,其在一些实施方式中特别有利,例如在希望将较大的初始沉积可视化为较小尺寸的点的实施方式中。较小尺寸的点可以使靶标单元更精确地定位在样品中,且还可以允许检测较大动态范围的靶标。

[0422] 在将要检测两种或更多种不同靶标的实施方式中或在靶标以较宽的动态浓度范围存在于样品中的实施方式中或在初始沉积提供较弱的可检测信号的实施方式等中,也可期望上述的双重调节。对以较宽动态浓度范围存在于样品中的靶标(即样品中存在靶标浓度的梯度)的可视化和定量可能是有挑战的。在该范围的最低端,与靶标部位相关的点的数量可能不足以提供关于靶标在整个样品中的存在的统计上有效的信息,而在动态范围的最高端,大量不能在视觉上相互单独区分开的重叠点的存在可能会使靶标单个单元的可视化有挑战性。使用上述的初始和/或二次因素来减少与较大的初始沉积对应的点的明显尺寸可以允许克服这些问题,并对以较大动态范围存在于样品中的靶标进行可视化和定量。

[0423] 第二底物的初始沉积的检测方法根据样品类型、沉积分子的特征等而可以不同。可以使用本领域中任何合适的方法,例如,在组织学样品中,可以通过使用任何标准IHC染色例如HRP-DAB染色来检测沉积,ELISA可视化或免疫印迹染色可以用于其它实施方式中等。

[0424] 实施例

[0425] 以下是对示例说明所公开的发明的非限制性工作实施例的描述,具体而言,是对根据本发明在组织学样品中定量可视化靶标的两个可选方法(1)和(11)的描述。理论考虑是说明书的一部分但不是限制性的。所描述的实施方式是示例性的而不具有限制性。

[0426] 实施例1.组织学样品中靶标的定量(方法1)

[0427] 理论考虑:确定Kd1、Kd2和Pr(方法1)

[0428] 为限定样品中靶标单个实体的数量,具体是所述单元例如单个靶标蛋白分子的总数,可以进行一些复合平衡实验,采用:

[0429] 1.测试材料的一些参考样品,具有相同但是未知水平的的固定蛋白分子Pr.(例如,同源Her2参考细胞系的单个区块(block)的连续切片);

[0430] 2.与所述蛋白结合的一抗Ab1(例如具有高亲和性的单克隆兔抗HER2),具有未知的解离常数Kd1;

[0431] 3.与所述一抗结合的酶标记二抗Ab2,具有未知的解离常数Kd2;

[0432] 4.使所述二抗的几乎每个单个分子可视化为离散的视觉上可区分点(在本文中称为“单个分子点”或“SDM”)的技术(例如,如PCT/DK2010/000137或本文中描述的)。

[0433] 根据本发明,样品中固定靶标(例如,蛋白)的水平可以表达为组织样品的每一细胞核(例如,在参考细胞系样品中)、或单位面积或单位体积等中的计数的SMD;分子的数量可以经由阿伏伽德罗数转化为所述分子在样品中的浓度。

[0434] 通常认为,用于抗体蛋白相互作用的理论框架是复合平衡。抗体与靶标蛋白会达到平衡。

[0435]  $Ab1 + Pr \leftrightarrow Ab1:Pr$  F1

[0436] 由抗体的解离常数Kd1控制:

$$[Ab1] \times [Pr]$$

[0437]  $\frac{[Ab1:Pr]}{[Ab1] \times [Pr]} = Kd1$  F2

$$[Ab1:Pr]$$

[0438] 在这样的平衡条件下,总蛋白(PrTotal)和总抗体(Ab1Total)将分布在游离蛋白与复合物以及游离抗体与复合物之间:

[0439]  $PrTotal = Pr + Ab1:Pr$  F3

[0440]  $Ab1Total = Ab1 + Ab1:Pr$  F4

[0441] 由F2得出:

$$[Ab1:Pr] \times Kd1$$

[0442]  $[Pr] = \frac{[Ab1:Pr] \times Kd1}{[Ab1]}$  F5

$$[Ab1]$$

[0443] 将F5代入F3,得出:

$$[Ab1:Pr] \times Kd1$$

[0444]  $PrTotal = \frac{[Ab1:Pr] \times Kd1}{[Ab1]} + [Ab1:Pr]$  F6

$$[Ab1]$$

[0445] 然后可以将F6重新整理为如下:

$$Kd1 + [Ab1]$$

$$[0446] \quad PrTotal = [Ab1:Pr] \times \frac{Kd1 + [Ab1]}{[Ab1]} \quad F7$$

[0447] 第一个实验挑战在于确定该第一个平衡何时达到。可以通过使用酶标记Ab2的随后的第二个平衡实验以及之后的SMD可视化来检测并确定[Ab1:Pr]。第一系列的实验Exp1可以用于建立,对具有恒定量固定蛋白的样品相继施用恒定浓度的Ab1将最终导致在使用酶标记的Ab2的随后的第二可视化步骤和SMD检测中检测到的恒定量的Ab1:Pr。

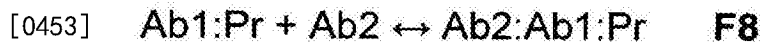
[0448] 基于对具有固定蛋白的样品单次添加Ab1将引起Ab1:Pr复合物形成并由此引起Ab1和Pr浓度均下降的事实,需要使用Ab1的多次相继添加。可以明显地达到第一次平衡,但是须使用对相同参考样品相继添加Ab1直至检测到恒定水平的Ab1:Pr,来得知反映出Ab1浓度的真实平衡何时达到,即何时进一步的Ab1添加将不再引起检测到的Ab1:Pr的增加。Ab1的单次或几次添加引起反映出蛋白在固定样品中的总量而非Ab1的浓度的平衡。Ab1将由于复合物的形成而耗尽,并且平衡中的有效浓度将显著低于所施用的Ab1的浓度。

[0449] 如果抗体的多次添加证实不存在耗尽或缓慢的动力学,则可以忽略反映出降低的浓度的游离抗体的效果的式4。

[0450] 证实以上理论的实验安排可设计如下:将恒定浓度的Ab1相继施用到具有恒定浓度的固定蛋白的样品中。之后,使用酶标记的二抗和SMD可视化来检测形成的Ab1:Pr复合物。因此,可以建立反映出Ab1浓度而非固定蛋白的量的真实平衡。(在以下实验3a中描述证实该理论的实验,实验3a示出,在参考样品与Ab1进行4到5次相继的10分钟孵育之后,检测到Ab1:Pr复合物没有进一步增加)。

[0451] 第二个复合平衡步骤背后的理论与关于第一个的理论(如上讨论)相同。

[0452] 在酶标记的二抗与固定的一抗蛋白复合物之间建立第二个平衡:



[0454] 由标记二抗的解离常数Kd2控制:

$$[0455] \quad \frac{[Ab2] \times [Ab1:Pr]}{[Ab2:Ab1:Pr]} = Kd2 \quad F9$$

$$[0456] \quad Ab1:PrTotal = Ab1:Pr + Ab2:Ab1:Pr \quad F10$$

$$[0457] \quad Ab2Total = Ab2 + Ab2:Ab1:Pr \quad F11$$

[0458] 从F9得出:

$$[0459] \quad [Ab1Pr] = \frac{[Ab2:Ab1:Pr] \times Kd2}{[Ab2]} \quad F12$$

[0460] 将F12代入F10中,得出:

$$[\text{Ab2:Ab1:Pr}] \times \text{Kd2}$$

$$[0461] \quad \text{Ab1:PrTotal} = \frac{[\text{Ab2:Ab1:Pr}] \times \text{Kd2}}{[\text{Ab2}]} + [\text{Ab2:Ab1:Pr}] \quad \text{F13}$$

[0462] 然后将F13重新整理为F14:

$$[0463] \quad \text{Ab1:PrTotal} = [\text{Ab2:Ab1:Pr}] \times \frac{\text{Kd2} + [\text{Ab2}]}{[\text{Ab2}]} \quad \text{F14}$$

[0464] 仅当Ab1:Pr的浓度在第二个平衡实验中保持基本恒定时,即在洗涤步骤和与酶标记的二抗孵育的过程中在蛋白和一抗之间没有显著的解离发生,才能建立该第二个平衡。如果观察到该条件,可以用式14的Ab1:PrTotal替换式7的[Ab1:Pr]。

[0465] 这给出下一等式(式15):

$$[0466] \quad \text{PrTotal} = [\text{Ab2:Ab1:Pr}] \times \frac{\text{Kd1} + [\text{Ab1}]}{[\text{Ab1}]} \times \frac{\text{Kd2} + [\text{Ab2}]}{[\text{Ab2}]} \quad \text{F15}$$

[0467] 式15可以被认为是绝对计数实验(即确定样品中靶标分子的总数的实验)的理论基础,因为其描述了Kd1与Kd2之间的关系(其能够在与抗体滴定相关的平衡实验中确定)、以及总蛋白浓度与蛋白和抗体的复合物(可视化为点)之间的关系。

[0468] 这些实验可以如下进行:将恒定浓度的Ab1相继施用到具有恒定浓度的固定蛋白的样品中。之后,使用酶标记的二抗和SMD可视化来检测形成的Ab1:Pr复合物。同样地,相继地多次施用酶标记的二抗(其恒定量)。证实该理论的实验(在实验3b中描述)已示出,在酶标记Ab2与之前用一抗平衡的参考样品进行四到五次相继的10分钟孵育之后,检测到Ab2:Ab1:Pr复合物的形成没有进一步增加,也没有检测到降低(可能是因为在洗涤步骤和第二个平衡的建立过程中显著的蛋白-Ab1解离)。因此,可以建立反映出固定蛋白、[Ab1]和酶标记[Ab2]的浓度的真实平衡,从而证实式15的等式。

[0469] 出于与针对式4讨论的相同的原因,可以忽略新式11。如果游离酶标记二抗的多次添加证实耗尽或缓慢的动力学不是问题,可以忽略降低浓度的该抗体的效果。

[0470] 具有未知的蛋白浓度水平的组织样品可以与一抗常规地孵育,以确定所述未知蛋白浓度。这个步骤之后可以是与酶标记的二抗孵育的步骤,之后为可视化的额外步骤。

[0471] 通常,在常规的IHC染色过程中,仅使用与一抗和二抗的单次孵育,并且物理搅动是常规,该物理搅动不管是不受控的(由于重力、蒸发或芯吸(wicking))或因在片子上主动搅拌试剂而受控的。然而,使用混合和/或较高浓度的一抗与二抗,可以通过单次试剂施用而达到假平衡条件,引起可再现的结果(这就是现今熟知的组织学染色体系如何工作的,例如Envision体系)。抗体试剂(一抗或酶标记的二抗)的连续添加引起相对稳定的平衡,因此也能够起到针对抗体耗尽的保护作用,并且与传统IHC染色相反,允许精确评估靶标在IHC样品中的量。

[0472] 如以下实验中所述,需使用低量的高亲和性一抗是因为所测试的Her2克隆的较低Kd1值以及需要使用低于Kd1的浓度以测量Kd1。针对常规用途,可以使用远高于Kd1的浓度,

从而降低对多次添加的需求。在二抗的情况下,需要降低点重叠,其避免使用较高浓度。在较高浓度时,至少在手动进行计数时,重叠点可能防止精确的点计数。

[0473] 当观察到引起非重叠SMD形成的染色条件时,SMD可以被计数为Pr,且如果PrTotal可以保持恒定(例如,在使用相同参考材料的连续切片的情况下),具有变动的[Ab1]和恒定的[Ab2]的实验允许确定Kd1;PrTotal和Kd2仍然保持未知,但是是恒定的。这允许将式15重新整理为式16:

$$[0474] \quad \text{点} = \text{常数} \times \frac{[\text{Ab1}]}{\text{Kd1} + [\text{Ab1}]} \quad \text{F16}$$

[0475] 常数(C)反映样品的PrTotal值以及在具有常数[Ab2]的第二平衡反应中检测的Ab1:Pr复合物的分数。其为可以在这些条件下检测的点的绝对数量。F16的等式表明,当[Ab1]高且增加时,点的数量将接近常数水平但不会达到常数水平。当[Ab1]低且降低时,作为[Ab1]的双曲线函数的点的数量将接近[Ab1]的线性函数。

[0476] 在具有恒定参考材料和常数[Kd2]的实验中,作为[Ab1]函数的点数量是双曲线函数,并且通过配合使点与[Ab1]相关的实验数据,使用式16来确定Kd1。然而,使用在接近Kd1的浓度的Ab1的相继添加,可再现性地允许经由对式16的优异配合而精确确定Kd1。

[0477] 允许确定Kd2的实验安排稍稍更复杂些。挑战是,酶标记的二抗的浓度(不变地接近Kd2)引起点形成,由于重叠问题,点的数量太多以至于无法计数。使用非常低浓度的一抗和/或使用具有低蛋白浓度的参考材料不是解决方案,因为来自高浓度二抗的背景由于二抗的非特异结合将给出非常高的背景噪音,从而不能准确地反映蛋白浓度。在非常低一抗浓度下建立平衡的困难使这进一步复杂。克服这些挑战的方法是,在二抗具有约Kd2的浓度的情况下,以相对高的浓度使用一抗和二抗两者,并通过常规IHC来对结合的二抗进行可视化。常规IHC是指使用酶标记的二抗例如通过使用Envision体系而非SMD可视化来产生3,3'-二氨基联苯胺(DAB)的棕色沉积。这种常规DAB沉积的强度不是线性的,且不正确地反应样品中靶标分子的量,然而两种沉积的强度可以在视觉上比较并确定为大约是相同强度。确实,这是当前IHC染色结果如何解读的情况:通过比较测试样品和参考样品中棕色沉积的强度来对它们进行评价并遵循图表或说明性指南来对它们进行解读。

[0478] 使用相同的参考材料,(F15)的PrTotal可以保持恒定。如果[Ab1]和[Ab2]也恒定,且Ab2:Ab1:Pr通过常规IHC而被可视化为棕色沉积,则染色会具有恒定强度。明显地,强度必须在常规IHC的动态范围内,使得以棕色沉淀的可变强度反应Ab2:Ab1:Pr的变化。IHC片通常以+0(完全没有颜色)、+1(微弱强度)、+2(中等强度)、和+3(最高强度/棕黑色)的等级来进行评分。为准确反映[Ab1:Ab2:Pr],分数应该在+0.5至+2.5的范围内,以使向上或向下的变化得到检测,且优选在+1至+2的范围内,在该范围内作为[Ab1:Ab2:Pr]函数的强度变化是最明显的且背景噪音最小。

[0479] 当在期望的动态范围内(即,在+1至+2的范围内,且[Ab2]为约[Kd2])建立参考体系之后,相对于初始参照实验使用较低恒定浓度的Ab1、变化的[Ab1]<sub>2</sub>以及不断增加浓度的Ab2来进行实验3d(在以下描述)。

[0480] 通过增加[Ab2],[Ab2:Ab1:Pr]在一些点将达到与先前建立的参考水平相同的水

平,引起相同强度的棕色沉积。当棕色DAB沉积的强度具有与使用 $[Ab1]_1$ 和 $[Ab2]_1$ 形成的沉积的相同的强度时,得出结论:

$$[0481] \quad [Ab2:Ab1:Pr]_1 = [Ab2:Ab1:Pr]_2$$

[0482] 因此,通过两种不同的 $[Ab1]$ 和 $[Ab2]$ 的组合以及恒定的PrTotal,达到相同的染色水平。其遵循以下等式:

$$[0483] \quad \frac{Kd1 + [Ab1]_1}{[Ab1]_1} \times \frac{Kd2 + [Ab2]_1}{[Ab2]_1} = \frac{Kd1 + [Ab1]_2}{[Ab1]_2} \times \frac{Kd2 + [Ab2]_2}{[Ab2]_2}$$

[0484] 因为Kd1已知,且根据实验条件已知 $[Ab1]_1$ 和 $[Ab1]_2$ ,等式可以简化成式17( $C_1$ 和 $C_2$ 是常数):

$$[0485] \quad C_1 \times \frac{Kd2 + [Ab2]_1}{[Ab2]_1} = C_2 \times \frac{Kd2 + [Ab2]_2}{[Ab2]_2} \quad F17$$

[0486] 除以 $C_1$ 得到:

$$[0487] \quad \frac{Kd2 + [Ab2]_1}{[Ab2]_1} = C_3 \times \frac{Kd2 + [Ab2]_2}{[Ab2]_2} \quad F18$$

[0488] 可以将式18重新整理以允许分离出Kd2:

$$[0489] \quad (Kd2 \times [Ab2]_2) + ([Ab2]_1 \times [Ab2]_2) = (C_3 \times Kd2 \times [Ab2]_1) + (C_3 \times [Ab2]_1 \times [Ab2]_2)$$

[0490] 其可以简化成:

$$[0491] \quad Kd2 = \frac{(1-C_3) \times ([Ab2]_1 \times [Ab2]_2)}{(C_3 \times [Ab2]_1) - [Ab2]_2} \quad F19$$

[0492] 其中 $C_3$ (等于 $C_2/C_1$ ,参见以上)限定为:

$$[0493] \quad C_3 = \frac{(Kd1 + [Ab1]_2) \times [Ab1]_1}{[Ab1]_2 \times (Kd1 + [Ab1]_1)} \quad F20$$

[0494]  $C_3$ 涉及两个双曲线函数,在相互的顶点反映出棕色染色的恒定水平,其源自于两组不同的实验条件:首先,通过达到反映 $[Ab1]_1$ 和 $[Ab2]_1$ 的第一平衡来建立参考水平;之后,通过使用 $[Ab1]_2$ 和 $[Ab2]_2$ 来达到相同的参考水平。Kd1已知,因此可以确定Kd2。

[0495] 可以使用 $[Ab1]_1$ 和 $[Ab2]_1$ 来产生常规染色强度的参考水平。使用不同浓度的Ab1, $[Ab1]_2$ 允许 $[Ab2]$ 的滴定直至 $[Ab2]_2$ 达到相同染色强度水平。这允许根据式19确定Kd2。

[0496] 返回到原始式15,在已经确定Kd1和Kd2之后,满足在两个步骤中均达到平衡的条件并允许精确的SMD点计数的任何SMD染色实验将允许在所使用的参考样品中确定PrTotal。

- [0497] 其中以该方式确定的PrTotal的任何参考样品得到“绝对参考”的状态。
- [0498] 对蛋白(或任何其它固定靶标化合物)在固定样品中的绝对数量进行计数并且可以根据固定样品的性质将其表达为绝对项,例如单位面积/体积/细胞的分子等。
- [0499] 实验
- [0500] 缩写
- [0501] MBHA 4-甲基二苯甲胺
- [0502] NMP N-甲基吡咯烷酮
- [0503] HATU 2-(1h-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3四甲基脒六氟磷酸 酯;亚甲铵(methenaminium)
- [0504] DIPEA 二异丙基乙胺
- [0505] DCM 二氯甲烷
- [0506] TFA 三氟乙酸
- [0507] TFMSA 三氟甲基磺酸
- [0508] Flu 荧光素
- [0509] Dex 葡聚糖
- [0510] HPLC 高效液相色谱
- [0511] equi. 当量
- [0512] L30 1,10,16,25-四氮杂-4,7,13,19,22,28-六氧杂-11,15,26,30-四氧-三十烷
- [0513] L60、L90、L120、L150
- [0514] L30的不同聚合物,包括2、3、4或5个L30重复
- [0515] ClZ 2-氯Z=2氯苯甲基氧羰基
- [0516] FITC 异硫氰酸荧光素
- [0517] HRP 辣根过氧化物酶
- [0518] GaM 山羊抗小鼠抗体
- [0519] DNP 2,4二硝基-氟代苯(二硝基苯基)
- [0520] ACim 4-氨基-肉桂酸
- [0521] LPR 液体永久红(Dako K0540)
- [0522] Sin 芥子酸(4-羟基-3,5-二甲氧基肉桂酸)
- [0523] Caf 咖啡酸(3,4-二羟基肉桂酸)
- [0524]  $\alpha$ -CHC  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸
- [0525] PNA-X 肽核酸寡聚体(N-(2-氨基乙基)-甘氨酸),包括与中心氮结合
- [0526] 的不同取代基
- [0527] A 腺嘌呤-9-乙酸
- [0528] C 胞嘧啶-1-乙酸
- [0529] D 2,6-二氨基嘌呤-9-乙酸
- [0530] G 鸟嘌呤-9-乙酸
- [0531] Gs 6-硫代鸟嘌呤-9-乙酸
- [0532] P 2-嘧啶酮-1乙酸

[0533]	T	胸腺嘧啶-1-乙酸
[0534]	Us	2-硫尿嘧啶-1-乙酸
[0535]	Dpr	2,3-二氨基-丙酸
[0536]	Phe	苯丙氨酸
[0537]	Tyr	酪氨酸
[0538]	Trp	色氨酸
[0539]	Lys	赖氨酸
[0540]	Cys	半胱氨酸
[0541]	betaala	$\beta$ 丙氨酸、N,N二乙酸
[0542]	FFPE	甲醛固定石蜡包埋
[0543]	SMD	单个分子检测
[0544]	交联剂	具有氧化还原酶活性的酶的第一底物
[0545]	报道物	具有氧化还原酶活性的酶的第二底物
[0546]	RDM	报道物沉积介质
[0547]	BAM	结合剂介质

[0548] 材料和方案

[0549] 1. 第二底物(报道物)

[0550] Sin-Lys(Sin)-Lys(Sin)-L150-Lys(Flu)(0328-018/D21047/D21067)

[0551] 在固相合成含有游离N端氨基和游离赖氨酸侧链氨基的中间体后,进行液相合成。使用 $\alpha$ -N-Boc-( $\epsilon$ -N-2-Cl-Z)-赖氨酸来引入赖氨酸残基,其在树脂开裂之后提供游离的 $\epsilon$ -N-氨基。液相标记基本上是固相技术的延伸,利用的是,相对高分子量的中间体几乎能够与乙醚从TFA或NMP溶液中定量地沉淀出。

[0552] 在固相上制备Boc-(Lys(2-Cl-Z))<sub>3</sub>-L150-Lys(Fmoc)。除去Fmoc基团,之后如上所述进行荧光素标记。中间体NH<sub>2</sub>-((Lys(NH<sub>2</sub>))<sub>3</sub>-L150-Lys(Flu)得自树脂的开裂。其与乙醚一起沉淀,溶解在TFA中,沉淀然后溶解在NMP中,并用DIPEA制成碱性。该溶液与由HATU和DIPEA活化的等体积0.2M的芥子酸(4-羟基-3,5-二甲氧基肉桂酸)在NMP中的溶液混合。10分钟后,完成标记,并通过添加乙二胺到10%浓度持续5分钟,来“擦洗”粗产物。在用乙醚沉淀后,在TFA中进一步溶解产物并用乙醚将其沉淀三次以除去低分子量碎片。在使用乙二胺“擦洗”之前,质谱分析显示出两种加合物(及其组合):+(176)<sub>n</sub>,表明额外的阿魏酸(在其它阿魏酸和荧光素上的酚酯),以及+98(N,N'-四甲基脲加合物,同样地在未受保护的酚基上)。通过乙二胺处理完全除去这些物质,并且同样地,活性酯和阿魏酸寡聚体也被分解。

[0553] 适用于本发明目的的作为第二底物/报道物的其它分子在PCT/DK2010/000137中有过描述,其并入本文以供参考,即在W02011047680(PCT/DK2010/000137)的第86~100页中描述的报道物结合物分子。

[0554] 2. 结合剂:

[0555] 2.1与结合有HRP的Dex70结合的山羊抗兔抗体(L348.111,10~11部分)

[0556] 在40℃下,在316微升的缓冲液A(100mM NaCl、25mM NaHCO<sub>3</sub>, pH9.5)中使11nmol170kDA MW的葡聚糖与484nmol HRP反应3h。之后,将44nmol的山羊抗兔在196毫升水中的溶液添加到葡聚糖-HRP结合物中并使其在40℃另外反应1h。通过添加70毫升0.165M孕

尿翳30分钟来淬灭反应混合物,并在缓冲液B(100mM NaCl,10mMHEPES pH7.2)中在Sephacryl300(GE Medical)上纯化产物。洗脱的产物是包括山羊抗兔(GaR)和HRP的葡聚糖结合物。产物基于结合物大小分为4个部分:含有产物的前两个部分(8~9部分)洗脱为第一个峰,推测含有一些交联的结合物,之后是较宽的肩部,其被分为10~11部分(均质的大结合物)和12~21部分(较小的可变结合物),且最后是在22~42部分的未结合的酶和抗体。对单独产物部分、以及含有未结合抗体和HRP的部分的测量,显示出87%的总结合物回收率。假设引入的HRP与葡聚糖之间直接成比例,显示出10~11部分相对于每一葡聚糖含有10.9个HRP和0.96个抗体。仅这两个部分被用于实验。

[0557] 2.2与结合有HRP的Dex70结合的抗HER2抗体(D21100,9~10部分)

[0558] 在30℃下,在125微升的缓冲液A(100mM NaCl、25mM NaHCO<sub>3</sub>,pH9.5)中使4.6nmol170kDA MW的葡聚糖与202nmol HRP反应3h。之后,将在489毫升水中的18nmol Her2抗体添加到葡聚糖-HRP结合物中并使得混合物在30℃下另外反应21h。通过添加70毫升0.165M孕尿翳30分钟来淬灭反应混合物,并在缓冲液B(100mM NaCl、10mM HEPES pH7.2)中在Sephacryl300(GE Medical)上纯化产物。洗脱的产物是包括Her2抗体和HRP的葡聚糖结合物。产物基于结合物大小分为4个部分:含有产物的前两个部分(7~8部分)被洗脱为第一个峰,推测含有一些交联的结合物,之后是较宽的肩部,其被分为9~10部分(均质的较大结合物)和11~19部分(较小的可变结合物),最后是在20~41部分的未结合的酶和抗体。对单独产物部分、以及含有未结合抗体和HRP的部分的测量,显示出68%的总结合物回收率。假设引入的HRP与葡聚糖之间直接成比例,显示出9~10部分相对于每一葡聚糖含有9.1个HRP和0.6个抗体。仅这两个部分被用于实验。

[0559] 2.3与结合有HRP的Dex70结合的FITC抗体(AMM353-022,8~11部分)

[0560] 在40℃下,在316微升的缓冲液A(100mM NaCl、25mM NaHCO<sub>3</sub>,pH9.5)中使11nmol170kDA MW的葡聚糖与484nmol HRP反应3h。之后,将66nmol FITC抗体在196毫升水中的溶液添加到葡聚糖-HRP结合物中并使其在40℃下另外反应1h。通过添加70毫升0.165M孕尿翳30分钟来淬灭反应混合物,并在缓冲液B(100mM NaCl,10mM HEPES pH7.2)中在Sephacryl300(GE Medical)上纯化产物。洗脱的产物是包括FITC抗体和HRP的葡聚糖结合物。产物基于结合物大小分为3个部分:含有产物的首先的部分(8~11)洗脱为第一个峰,之后是较宽的肩部(较小的可变结合物,12~27部分),最后是在28~45部分的未结合的酶和抗体。对单独产物部分、以及含有未结合抗体和HRP的部分的测量,显示出90%的总结合物回收率。假设引入的HRP与葡聚糖之间直接成比例,显示出10~11部分相对于每一葡聚糖含有11.7个HRP和0.80个抗体。仅这两个部分被用于实验。

[0561] 2.4适用于本发明目的的其它结合剂在PCT/DK2010/000137中有过描述,并引入本文以供参考,即在W02011047680(PCT/DK2010/000137)第100~106页中描述的结合剂分子。

[0562] 3. 第一底物

[0563] 在以下条件下,使用DAB、阿魏酸和 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -CHC)作为第一底物:

[0564]

	DAB	阿魏酸	$\alpha$ -CHC
最佳量 (范围)	0.14 mM (0.1 mM 至小于 1 mM)	1.5 mM (0.5 mM 至 5 mM)	5 mM (1.5 mM 至 15 mM)
最佳 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 量	1.5 mM	0.9 mM	0.6 mM
最佳沉积时间	5~10 分钟	10~15 分钟	10~15 分钟
最佳第二底物	含有 Fer 或 Sin	含有 Sin	含有 Fer
点直径	3~4 微米	3~4 微米	2~3 微米

[0565] 与DAB相比,使用阿魏酸,当孵育时间加倍时得到相似直径的点;使用 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸,孵育时间与DAB相同,然而点更小(与DAB的3~4微米相比,直径为2~3微米)。

[0566] 4. 其它试剂

[0567] DAB显色液(Dako K3465)

[0568] LPR显色液(Dako K0640)

[0569] 苏木精复染(Dako S3301)

[0570] 洗涤缓冲液(Dako S3306)

[0571] 靶标修复液(Dako S1699)

[0572] 封片介质Dako Fairmount(S3205)

[0573] 5. 测试材料

[0574] 作为测试材料,使用福尔马林固定石蜡包埋的表达Her2的细胞系sk45、df45和df23的球粒连续切片(这些细胞系还将被对应地称为0+、1+和3+细胞系)。这些细胞系是FDA认证的用于乳腺癌的Dako Hercep Test的0+、1+和3+对照材料。细胞系的球粒被包埋在单块石蜡中,以提供每个细胞系均存在的切片。测试材料的选择反映出材料的可得性(例如,各个单块提供上百个连续切片,各个测试片上的三种不同细胞样品的存在允许三种不同测试样品的一个染色过程的结果之间的互相关)。

[0575] 6. 测试材料的预处理

[0576] 含有三个细胞系块的FFPE切片的片子(进一步被称为“片子”)通过沉浸在二甲苯(2×5min)、之后96%乙醇(2×2min)和70%乙醇(2×2min)中而被脱石蜡化。之后,用去离子水洗涤片子并将其转移到靶标修复液中,稀释10×的高pH溶液(Dako S2375)(使用细胞角蛋白抗体的实施例1和2)或者低pH溶液(Dako S1700)(参见以下的实施例10.3~10.8)。之后在微波炉中加热片子至沸腾(约5min)并温和地沸腾10分钟。之后,使片子冷却20min并在之后将其转移到稀释10×的洗涤缓冲液(Dako S3006)中。

[0577] 7. 一抗:

[0578] 将特异的抗细胞角蛋白抗体(Dako M3515,小鼠单克隆)作为浓缩物和稀释溶液进行使用。基于总蛋白浓度(在各个瓶上标示)并考虑抗体的分子量(150kDa/mol)制备抗体稀释液。抗体还被称为“细胞角蛋白抗体”。

[0579] 抗Her2抗体是兔单克隆抗体(Dako克隆25-11-3)。基于所计算的浓缩液中总蛋白浓度以及抗体的分子量(150kDa/mol)来制备稀释液。抗体在本文中被称为“HER2抗体”。

[0580] 8. 介质

[0581] 结合剂介质(BAM)

[0582] 0.1%的4-氨基安替比林、0.2%Procline、2%BSA、0.2%酪蛋白、2%PEG、0.1%吐温20、0.1M NaCl、10mM HEPES,pH7.2(ABCPT缓冲液)

[0583] 报道物沉积介质(RDM)

[0584] 50mM咪唑HCl pH7.5、0.1%Nonidet P40、0.1%苯扎氯铵、0.005%(1.5mM)过氧化氢。

[0585] 9. 仪器

[0586] Dako Autostainer Classic。该仪器是全开放且可自由编程的自动IHC仪,其中可以使用并随意设置试剂和孵育时间。仪器执行四个基本动作:

[0587] 1.吸入试剂;

[0588] 2.将洗涤缓冲液吹离水平放置的片子;

[0589] 3.将试剂分配到片子上(被称为吹(sip)和吐(spit));

[0590] 4.通过用洗涤缓冲液冲洗来洗涤片子

[0591] 在以下方案1中描述用于单个片子的典型程序。对于所有的SMD实验,初始的过氧化物酶封闭和点形成步骤保持不变。

[0592] 10. 染色方案1

[0593] 过氧化物酶封闭,5min,在Dako S2023中

[0594] 洗涤

[0595] (a)靶标部位的形成:

[0596] 一抗,

[0597] 洗涤

[0598] HRP标记的二抗,

[0599] 洗涤。

[0600] (b)靶标部位处报道物沉积的形成

[0601] 样品(a)在RDM中与0.28mM DAB和5 $\mu$ M报道物(D21047)孵育10分钟。

[0602] 洗涤

[0603] c)检测单个靶标部位处的报道物沉积

[0604] FITC-AP抗体,10min,BAM中的20nM D20036

[0605] 洗涤

[0606] LPR,10min,Dako K0640

[0607] 洗涤

[0608] d)苏木精复染

[0609] 苏木精,5min

[0610] 用去离子水洗涤

[0611] f)封片

[0612] 可以在自动的方案中引入额外的洗涤。自动调度器通过将洗涤步骤的持续时间降至最低来将整个方案时间保持在最小量;然而,洗涤步骤的持续时间取决于仪器的负荷。如果编程单个片子被染色,单个洗涤步骤可减至20秒,而48张片子的满负荷显著增加洗涤时间。为保持该时间变化最小,每次运行平均染色10张片子。因此,洗涤步骤持续时间相对于每一步骤保持约2min。报道物沉积之后以及沉积与FITC-AP抗体孵育之后的多次洗涤保证

最小的LPR背景染色。尽管具有大量的放大(估计源自与靶标结合的单个抗体-葡聚糖-HRP分子的每个红点包括平均1000亿LPR分子),几乎没有背景被检测出。

[0613] 可能会建议进行额外的洗涤,以达到最高水平的放大和最低的背景染色,但报道物和报道物结合剂以相对高的量进行使用。

[0614] 11. 染色评估

[0615] 通过视觉观察SMD染色片及其图像,初始手动进行点计数。使用免费软件JMicrovision1.27版本来进行自动图像分析。在示例性实施方式中,对如上所述产生的LPR红点以及苏木精染色的细胞核自动计数。通过视觉观察和手动计数来验证自动计数。分割(segmentation)和对象提取可以仅基于色调、饱和度、强度、(HSI)色空间中的色调,即强度和饱和度都设置为全0~255范围。点色调设定为188(紫)至255以及0~16(橙),核色调设定为76(绿色)至163(蓝)。通过在装配有DP505.5Mpixel相机和Cell1D图像采集软件的Olympus BX51显微镜上执行的图像采集的过程中使过度曝光红(1.2)、中性绿(1.0)且曝光于蓝(0.56)下,来增强点-核对比。图3示出细胞的处理图像和点计数的结果。

[0616] 12. 实验

[0617] 12.1 抗细胞角蛋白抗体的Kd的确定

[0618] 如上所述对8张具有+0、+1和+3细胞系的FFPE切片的片子进行预处理和染色(参见预处理和方案1)。

[0619] 以在表格中示出的变化的浓度施用一抗(细胞角蛋白抗体)20min:

[0620]

片号	BAM中M3115的浓度
1	40nM
2	33nM
3	25nM
4	20nM
5	13nM
6	10nM
7	5nM
8	2.5nM

[0621] 之后,片子用水性Faramount来封片。采集各张片子上的各个细胞系球粒的3张图像,在各张图像中对红色点进行手动计数,并将所计数的点数量与样品中理论计算的点数量进行比较。

[0622] 假设一个细胞角蛋白抗体分子(cAb)与一个点相关,可以使用下式计算点的理论数量(Ndot):

$$[cAb_c] \times Ndot_{max}$$

[0623]  $Nd = \frac{[cAb_c] \times Ndot_{max}}{Kd + [cAb_c]}$  (式1)

$$Kd + [cAb_c]$$

[0624] 其中[cAb]是抗细胞角蛋白抗体的浓度,且Kd是抗细胞角蛋白抗体即cAb的解离常数,且Ndot<sub>max</sub>是常数。

[0625] 名为 $N_{dot_{max}}$ 的常数是指点的最大数量,并且在本文中是指,当抗体的使用浓度显著高于其 $K_d$ 值时(即当抗细胞角蛋白抗体以远超过 $K_d$ 值的浓度使用时),点的数量接近最大值。

[0626] 该式源自与用于一抗和二抗的解离常数的式,条件是蛋白在每个测试样品(即细胞+0、+1、和+3的样品,具有不同浓度(如下表所示)抗体的各个细胞系的8张图片)中的绝对浓度是恒定的且二抗的浓度在片子间保持不变。

[0627] 表(1)示出对于所有三个细胞系的每个样品1~8的实验所得以及理论计算的点数量:

[0628]

片	一抗的浓度, nM	计数的和计算的点, +0 细胞系中 3 张图片的总和		计数的和计算的点, +1 细胞系中 3 张图片的总和		计数的和计算的点, +3 细胞系中 3 张图片的总和	
		计数的	计算的	计数的	计算的	计数的	计算的
1	2.25	165	170	318	316	376	389
2	5	293	292	445	542	627	667
3	10	384	411	731	765	879	941
4	13.3	487	458	920	851	1043	1048
5	20	502	518	968	962	1140	1185
6	25	581	547	1026	1015	1333	1250
7	30	669	567	1159	1054	1546	1297
8	40	629	595	1269	1106	1663	1361

[0629] 表1中给出的SMD可视化实验的结果也以图表形式在图4中示出,其中系列1、2、和3的曲线相应于+0、+1和+3细胞样品的点的实验计数结果,且系列4、5和6相应于+0、+1和+3细胞样品的点的理论计算结果。

[0630] 通过将由式生成的曲线配合到由实验数据生成的曲线,可以确定 $K_d$ 和 $N_{dot_{max}}$ 的大概值。因此,对于所有三个计算系列,将 $K_d$ 设定为7nM, $N_{dot_{max}}$ 设定为700(+0)、1300(+1)和1600(+3)。

[0631] 7nM的 $K_d$ 值与所有三个细胞系的实验计数较好地一致。在+1和+3细胞系的情况中,对于高浓度的抗体,计算值稍稍低于测量值。抗细胞角蛋白抗体M3515具有较宽的特异性,且其识别出数种不同的细胞角蛋白亚型。理论上说,对于各个细胞角蛋白亚型,抗体可以具有稍稍不同的 $K_d$ ,因为抗原的环境可能不同且其可能影响抗体结合。这解释了双曲线的“非完美配合”。此外,一些非特异结合可能在远高于 $K_d$ 值的浓度发生。

[0632] 结论

[0633] 所进行的定量可以被认为是精确的,因为可以直接比较使用不同片子和不同细胞系的实验的结果,即点染色图形对样品提供简单快速数字化的定量评估,即通过对视觉上明显的点进行计数,例如600个点可以与另一样品中的300个点容易地区分开。

[0634] 使用的二抗(D20168)的 $K_d$ 值是未知的,且没有示出在亲和性结合的步骤中达到平衡,然而,对照试验确实示出与一抗的进一步孵育(延长的孵育时间和额外部分的抗体)不

引起信号的显著增加。因此,如果恒定部分的一抗在实验过程中被二抗识别,后者对Kd测量没有影响。使用多次施用二抗,可以产生两倍多的点。在这些施用中,每一片子的最大点数( $N_{dot_{max}}$ )也加倍,但是这些并不影响Kd的测量。

[0635] 12.2第二结合剂(山羊抗小鼠-葡聚糖-HRP结合物(D20168))Kd的确定

[0636] 使用常规的IHC染色(Dako Envision体系)来进行该实验。

[0637] 如所述对片子进行预处理,并使其进行以下染色方案2:

[0638] 1.过氧化物酶,5min

[0639] 洗涤

[0640] 2.细胞角蛋白抗体,在孵育介质1中20min

[0641] 洗涤

[0642] 3.HRP标记的二抗(D20168),在孵育介质1中20min

[0643] 洗涤

[0644] 4.DAB显色液,10min

[0645] 洗涤

[0646] 5.苏木精染色,5min

[0647] 用水洗涤

[0648] 洗涤

[0649] 用去离子水洗涤。

[0650] 三个细胞系(+0,+1和+3)中各个的12个样品被分为两个系列,其中第一系列的六张片子与2.5nM抗细胞角蛋白抗体孵育并进一步与6个不同浓度的D20168(100nM、50nM、25nM、15nM、10nM和5nM)孵育,且第二系列的六张片子与10nM抗细胞角蛋白抗体孵育并进一步与6个不同浓度的D20168(100nM、50nM、25nM、15nM、10nM和5nM)孵育。之后,根据以上方案用DAB(作为显色剂)和苏木精对两个系列的片子进行染色。

[0651] 对于所有三个细胞系,染色强度随浓度增加而增加,但是稳定在IHC染色的动态范围内(在+2.5的分数之下)。

[0652] 如预期的,使用较高浓度的一抗,引起较高的染色强度。将使用2.5nM细胞角蛋白抗体和100nM D20168处理的(各个细胞系的)片子(还称为片子A)的染色与使用10nM细胞角蛋白抗体的片子的染色进行比较(在各个细胞系内)。使用两个独立的模拟观测者来估计染色的强度。他们发现,对于所有三个细胞系,片子A的染色强度与使用10nM细胞角蛋白抗体和15nM D20168处理的片子(片子B)的染色强度相同。因为参考材料是恒定的(相同细胞系对照片),且在用不同量的一抗和二抗处理的片子中观察到近相同的染色强度,因此得出的结论是,片子A和片子B中(在一个细胞系内)存在的细胞角蛋白-细胞角蛋白抗体-D20168复合物的数量是相同的。因此,可以使用以下等式来计算二抗D20168的Kd(即Kd2):

$$(1-C_3) \times ([Ab2]_1 \times [Ab2]_2)$$

[0653]  $Kd2 = \frac{(1-C_3) \times ([Ab2]_1 \times [Ab2]_2)}{(C_3 \times [Ab2]_1) - [Ab2]_2}$

$$(C_3 \times [Ab2]_1) - [Ab2]_2$$

[0654] 其中 $C_1$ 、 $C_2$ 和 $C_3$ ;  $[Ab1]_1=2.5nM$ ,  $[Ab1]_2=10nM$ ,  $[Ab2]_1=100nM$ ,  $[Ab2]_2=15nM$ ,且其中由以下等式限定 $C_3$ :

$$[0655] \quad C_2 = \frac{(Kd1 + [Ab1]_2) \times [Ab1]_1}{[Ab1]_2 \times (Kd1 + [Ab1]_1)}$$

[0656] 因此,D20168的Kd2被计算为25nM。

[0657] 12.3a. 对于HER2一抗的平衡条件的建立

[0658] 由于所测试的HER2抗体克隆的Kd值低(即,高亲和性),通过与实施例1相似的手段来确定Kd值的初始尝试可能给出不是特别配合平衡条件的结果:非常低浓度(100pM)的一抗的单次施用可能引起未完成平衡的形成。因此,为限定并确保HER2抗体的平衡条件,一抗的相继添加被应用于所有三个细胞系的样品中。用最低浓度(100pM)的抗体处理的片子(其中抗体耗尽和未完成平衡问题被预期为是最严重的)也用高浓度二抗的两次相继添加进行处理,以补偿一抗步骤中的耗尽。

[0659] 根据方案1,对一抗和二抗使用特定的浓度、孵育时间和相继添加次数来完成染色,如下所示。

[0660] -100pM HER2抗体,1~6次相继孵育,每次10分钟:

[0661]

片号	添加次数
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6

[0662] 每次添加之后,洗涤一次(在下次添加之前);

[0663] -5pM HRP标记的山羊抗兔(L348-111,9~10部分),两次相继孵育,每次10min。

[0664] 采集各个+0和+1细胞系样品的三个图像(10×放大),并对每一细胞核的SMD点数量进行计数。+3细胞系样品不被考虑,因为染色非常强而不允许对点进行准确计数。结果呈现在以下表2中(以图表形式示出在图5中):

[0665]

HER2抗体的添加	点/核(0+)(图5的系列1)	点/核(1+)(图5的系列2)
1	0.158	0.407
2	0.258	0.665
3	0.305	1.031
4	0.42	1.309
5	0.532	1.536
6	0.532	1.513

[0666] 从实验的结果可以得出,需要至少5次添加HER2一抗溶液(其中抗体的量是100pM)来避免耗尽并在测试样品中建立真实的平衡条件。

[0667] 12.3b. 对于二抗的平衡条件的建立

[0668] 为限定对于二抗的平衡条件,在过程的第一步骤中使用高浓度的HER2一抗,预期

其提供高水平的一抗与靶标的结合,且在过程的第二步骤中进行低浓度二抗(L348-111,9~10部分)的一系列施用(其中抗体的耗尽被预期为是最严重的)。

[0669] 根据方案1,对一抗和二抗使用以下描述的特定的浓度、孵育时间和添加次数来完成染色:

[0670] -500pM HER2抗体,2次相继添加,每次10min;

[0671] 洗涤

[0672] -5pM L348-111,1~5次相继添加,每次10min:

[0673]

片号	添加次数
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

[0674] 在每次添加之后,在下一次添加之前,应用一次洗涤。

[0675] 采集各个+0和+1细胞样品的三个图像(10×放大),并对每一细胞核的SMD点数量进行计数。+3细胞系样品不被考虑,因为染色非常强而不允许对点进行准确计数。

[0676] 结果呈现在表3中(以图表的形式显示在图6中):

[0677]

二抗的添加	点/核(0+)(图6中的系列1)	点/核(1+)(图6中的系列2)
1	0.077	0.327
2	0.083	0.609
3	0.195	0.889
4	0.318	1.216
5	0.364	1.31

[0678] 从实验的结果可以得出,需要添加至少5次1.5pM L348-1119~10部分来达到平衡。

[0679] 12.3c HER2抗体的Kd值的确定

[0680] 从实施例3a和3b可以知道,需要相继添加6次100pM HER2抗体和随后添加5次5pM L348-111,以达到平衡条件并测量Kd值。因此,根据方案1,对一抗和二抗使用以下描述的特定的浓度、孵育时间和添加次数来进行三个细胞系样品的12张片子的SMD染色:

[0681] -6种浓度的HER2抗体,6次相继添加,每次10分钟:

[0682]

片号	HER2浓度
----	--------

[0683]

1和2	100pM
3和4	200pM
5和6	300pM
7和8	400pM

9和10	500pM
11和12	1nM

[0684] 在每次添加之后且在下一次添加之前,应用一个洗涤步骤;

[0685] -5pM L348-111,5次相继添加,每次10min。

[0686] 采集各个+0和+1细胞系样品的三个图像(10×放大),并对每一细胞核的SMD点数量进行计数。+3不被考虑,因为染色非常强,同样地,用最高浓度一抗(1nM)孵育的片子也不被考虑。

[0687] +0细胞系样品的实验结果呈现在以下表4中(并以图表形式在图7中示出):

[0688]

HER2 抗体的浓度	理论计算的点数量, Kd 280, 最大为 0.7 点/核 (图 7 中的系列 1)	+0 细胞系中实验计数的点/核 (图 7 中的系列 2)
100	0.183246	0.186
200	0.290456	0.305
300	0.360825	0.358
400	0.410557	0.416
500	0.44757	0.451
1000	0.546022	0.69

[0689] 非常低浓度的一抗和二抗(相应地,100~500pM和5pM)的使用并结合多次相继添加,对于达到如实验3a和3b中示出的平衡条件是必须的。远高于Kd之上(1nM)的浓度的一抗的6次添加应该会引起一些背景,这是预期到的,然而,从5次在Kd附近的双重确定得出的配合是非常好的。使用调整式1中Kd和 $N_{dot_{max}}$ 的迭代步骤(参见实验10.1)是可选的方式:将数据配合到282pM的Kd值和(假设的)靶标饱和时的0.70点/核的最大点计数。

[0690] 12.3d.L348-111(山羊抗兔-葡聚糖-HRP结合物)的Kd的确定

[0691] 使用常规IHC染色来进行实验。如所述对片子进行预处理,并将其进行以下染色方案3:

[0692] 1.过氧化物酶封闭,5min

[0693] 洗涤

[0694] 2.孵育介质1中的HER2抗体,6次添加,每次10min;

[0695] 洗涤

[0696] 3.孵育介质1中的L348-111,3次添加,每次10min;

[0697] 洗涤

[0698] 4.DAB染色,10min

[0699] 洗涤

[0700] 5.苏木精染色,5min

[0701] 用水洗涤

[0702] 洗涤

[0703] 用去离子水洗涤。

[0704] 对于三个细胞系中的各个,用100pM HER2抗体和50nML348-111对三个片子进行染色(一式三份)。用500pM HER2抗体和浓度降低的L348-111(相应地,50nM、25nM、17nM、11nM、7.5nM和5nM)对其它六个片子进行染色。染色结果的两个独立观察发现,对于所有三个细胞系,三份染色(100pM HER2抗体和50nML348-111)的强度与使用500pM HER2抗体和11nML348-111处理的片子相同。因为参考材料是恒定的(相同的细胞系对照片)且观察到恒定的染色强度,可以得出,存在相同数量的HER2-HER2抗体-L348-111复合物。因此,使用下式来计算二抗的Kd:

$$[0705] \quad Kd2 = \frac{(1-C_3) \times ([Ab2]_1 \times [Ab2]_2)}{(C_3 \times [Ab2]_1) - [Ab2]_2}$$

[0706] 其中 $[Ab1]_1$ 和 $[Ab1]_2$ 是两个不同的一抗浓度,且 $[Ab2]_1$ 和 $[Ab2]_2$ 是不同的二抗浓度。

[0707] 根据下式计算 $C_3$ :

$$[0708] \quad C_3 = \frac{C_2 \times (Kd1 + [Ab1]_2) \times [Ab1]_1}{C_1 \times [Ab1]_2 \times (Kd1 + [Ab1]_1)}$$

[0709] 使用以下值, $[Ab1]_1=100pM$ 、 $[Ab1]_2=500pM$ 、 $[Ab2]_1=50nM$ 、 $[Ab2]_2=11nM$ ,发现L348-111的Kd2等于28nM。

[0710] 在实施例3c的平衡滴定中,将结果配合到0.70点/核(在用一抗饱和且使用1.5pM浓度的L348-111的条件下)。因此,使用下式,可以计算+0细胞中存在的HER2的总量(PrTotal):

$$[0711] \quad PrTotal = [Ab2:Ab1:Pr] \times \frac{Kd1 + [Ab1]}{[Ab1]} \times \frac{Kd2 + [Ab2]}{[Ab2]}$$

[0712] 其中 $[Ab2:Ab1:Pr]$ 是复合物HER2-HER2抗体-L348-111的浓度,Kd1是HER2抗体的解离常数,且Kd2是L348-111的解离常数, $[Ab1]_1$ 和 $[Ab1]_2$ 是两个不同的HER2抗体浓度, $[Ab2]_1$ 和 $[Ab2]_2$ 是两个不同的L348-111浓度。

[0713] 将 $[Ab2:Ab1:Pr]$ 设定在0.70SMD点/核,第一分数设定为1,Kd2设定为28nM,且 $[Ab2]$ 设定为1.5pM,PrTotal的值被计算为13.000分子/核。

[0714] 这个值与本领域的数据较好地一致(参见,例如,David G.Hicks,D.G.和Schiffhauer,L.Assessment of HER2Status by Immunohistochemistry:Routine Use of Controls for IHC Testing-Laboratory Medicine.2011;42(8):459-467),即0+细胞系在这些细胞的表面上表达 $21,600 \pm 6700$ 拷贝的Her2受体。

[0715] 实施例2.对组织学样品中靶标的定量(方法11)

[0716] 1.理论考虑

[0717] 用于估计细胞中靶标分子的总(绝对)数的方法(11)与方法(1)相比具有很多相似的手段,然而也具有一些不同。

[0718] 与上述方法相关的问题中的一个应该是应该对一抗和标记的二抗两者建立平衡条件。在高靶标浓度的情况下,这可能是问题,因为在孵育过程中会出现结合剂的耗尽,因此需要与结合剂的多次且延长的孵育。本方法利用的是,使用非常高浓度的结合剂,可以建立“顶峰”水平的结合(这表明,样品中基本上所有的结合位点被相应的结合剂饱和)而没有耗尽问题。明显地,没有100%,但是可以达到蛋白靶标与高亲和性一抗的90~99%结合,以及一抗与标记的二抗的50~75%的结合。在这些范围内,可以使用具有变化但是较高的浓度的试剂的实验来建立更加精确的结合水平。

[0719] 此外,使用含有高浓度未标记二抗和低浓度标记(同一)二抗的混合物,可以达到平衡条件,而仅小部分的与靶标结合的一抗将会被标记。

[0720] 本方法还利用由本发明可视化方法提供的可能性,在该可视化方法中,标记的二抗可以根据放大程度而以多种方式可视化。在低量的结合靶标的一抗情况下,标记的二抗(或标记和未标记的二抗的混合物)可以用来产生可计数的点。在高量的靶标结合的一抗的情况下,相同的试剂(或混合物)可以用来产生常规的染色。因此,实验可以包括数个步骤:

[0721] 1. 使用与高浓度结合剂的孵育来建立平衡条件,引起对较高且已知分数(fraction)的靶标的识别。使用一抗和标记的二抗两者来执行这样的实验。这些条件还将被称为“顶峰水平”条件。

[0722] 2. 之后,制备对未知分数的一抗进行识别的标记的二抗和未标记的二抗的混合物,并将其用于具有高靶标表达且已经在顶峰水平条件下经一抗处理过的组织样品的孵育。孵育之后,使用常规的染色来对结合且标记的二抗进行可视化。

[0723] 3. 使用常规染色,在顶峰水平条件下通过标记的二抗对结合靶标的一抗进行滴定。要点在于,不需要在靶标与一抗之间建立平衡条件。足够的是,使用恒定的测试材料(恒定的测试材料是指靶标量恒定的测试材料),识别出可再现量的靶标。在一些低浓度的一抗下,得到与步骤2中观察到的染色水平相同的染色强度。

[0724] 4. 使用使单个分子可视化为点的方法(如本发明中描述的),相对于由顶峰水平条件的一抗识别出的靶标分数,使用标记和未标记的二抗的混合物来获得与步骤3中相同低浓度的一抗识别出的靶标分数。

[0725] 5. 使用如步骤3中的低水平的一抗,以及步骤2中的标记和未标记二抗的混合物,单个分子被染色为点,且评估相对于每一细胞核的点数。

[0726] 从这些实验,可以确定靶标的绝对数量。从步骤1和4的实验,可知多少分数的靶标由低浓度的一抗所识别。从步骤1和3的实验,可以推出多少分数的一抗由实验2中使用的标记和未标记二抗的混合物所识别。我们使用如下事实,即在步骤2和3的实验中得到相同的常规染色水平(这表明,在样品中存在相同数量的结合且标记的二抗)。因此,现在我们知道由低浓度一抗识别出的靶标分子分数,以及由步骤5的实验中标记和未标记的二抗的混合物识别的一抗分数。将这两个因子相乘,可以得到被可视化为点的靶标分子的分数(参见以下实验1c的描述)。因为我们进一步对每一细胞核的点数量进行了计数,我们知道存在于每一细胞核的靶标分子数量。因此,可以进行绝对计数。

[0727] 2. 实验

[0728] 用于以下实验中的材料和方法,如果没有具体公开,则如上所述。

[0729] 已建立Her2一抗的Kd是280pM(参见实验3c)。使用平衡条件下(多次添加直至观察

到信号没有进一步增加)13.3nM浓度的抗体将引起13.3nM/(13.3nM+0.28nM)的标记,其等于约97.9%的初始靶标分子。

[0730] 同样地,已建立标记的二抗的Kd是28nM(参见实验3d)。使用平衡条件下(多次添加直至观察到信号没有进一步增加)25nM浓度的标记的二抗将引起25nM/(25nM+28nM)的标记,其等于约47.1%的已结合一抗。

[0731] 实验2.1a

[0732] 因为使用恒定的测试材料,福尔马林固定石蜡包埋的细胞系的球粒的连续切片。使用的细胞系是来自Dako HercepTest的3+对照材料。

[0733] 具有区块(含有细胞系)的FFPE切片的片子(从现在开始称为“片子”)通过沉浸在二甲苯(2×5min)、之后96%乙醇(2×2min)和70%乙醇(2×2min)中而被脱石蜡化。用去离子水洗涤这些片子,并将其转移到低pH靶标修复液(Dako S1700)中。之后,在微波炉中将片子加热至沸腾(约5min),然后温和地沸腾10分钟。在转移到洗涤缓冲液Dako S2343中之前,使片子冷却20分钟。

[0734] 之后,使用以下方案将片子在Autostainer上染色:

[0735] 过氧化物酶封闭,Dako S2023,5min

[0736] 洗涤

[0737] 13.3nM HER2一抗的相继数次10分钟添加

[0738] 洗涤

[0739] 混合有5nM未标记的山羊抗兔的100pM山羊抗兔-葡聚糖-HRP(L348.111)的相继数次10分钟添加

[0740] 洗涤

[0741] DAB(Dako K5007),10分钟

[0742] 洗涤

[0743] 苏木精(Dako S3301),5min

[0744] 用水洗涤

[0745] 洗涤

[0746] 结果

[0747] 13.3nM HER2抗体的三次10分钟添加足以达到平衡条件。第四次添加不引起染色水平的增加。混合有5nM未标记的山羊抗兔的100pM山羊抗兔-葡聚糖-HRP(L348.111)的两次10分钟添加足以达到平衡条件。第三次添加不引起染色水平的增加。所达到的最大染色水平相应于约+1。(尽管该细胞系被称为+3,混合有高浓度未标记二抗的低浓度标记二抗的使用引起小部分一抗的染色)。

[0748] 实验2.1b

[0749] 如实验1a对片子进行预处理,并使其进行以下方案(常规DAB染色):

[0750] 过氧化物酶封闭,Dako S2023,5min

[0751] 洗涤

[0752] 浓度在30~50pM范围内变化的HER2一抗,10分钟

[0753] 洗涤

[0754] 25nM山羊抗兔-葡聚糖-HRP(L348.111)的相继两次10分钟添加。对照片子示出第

三次添加不引起信号的增加。

[0755] 洗涤

[0756] DAB(Dako K5007),10min

[0757] 洗涤

[0758] 苏木精(Dako S3301),5min

[0759] 用水洗涤

[0760] 洗涤

[0761] 结果:

[0762] 与40pM HER2抗体孵育10分钟引起与实验1a中达到的最大染色水平相同的染色强度(+1)。43pM的孵育引起明显更高的染色强度,而37pM的孵育给出明显更低的染色强度。

[0763] 实验2.1c

[0764] 如实验1a对片子进行预处理,并使其进行以下方案(SMD染色):

[0765] 过氧化物酶封闭,使用Dako S20235min

[0766] 洗涤

[0767] HER2一抗。13.3nM的相继3次10分钟添加(片1)或40pM的一次10分钟添加(片2~5)

[0768] 洗涤

[0769] 混合有5nM未标记山羊抗兔的500fM(femtoM,毫微微M)山羊抗兔-葡聚糖-HRP(L348.111)的相继两次10分钟添加(片1~3),或者混合有5nM未标记山羊抗兔的100pM山羊抗兔-葡聚糖-HRP(L348.111)的相继两次10分钟添加(片4~5)

[0770] 洗涤

[0771] FITC-报道物沉积:10min,使用具有0.28mM DAB和10mM D21067的孵育介质2

[0772] 三次洗涤

[0773] FITC-AP抗体:10min孵育,BAM中的20nM D20036

[0774] 三次洗涤

[0775] 具有Dako K0640的LPR10min

[0776] 洗涤

[0777] 苏木精(Dako S3301),5min

[0778] 用水洗涤

[0779] 洗涤

[0780] 将片子进行图像分析。使用ScanScope(Aperio)片子扫描器来采集20×(约300×300nm像素)的整个细胞球粒的图像。使用JMicrovision1.27版本来分析图像。红点的强度、色调、饱和度色空间识别为(I=0~234、H=187~37、S=52~255),蓝色的细胞核识别为(I=0~201、H=148~221、S=0~190)。尺寸阈值进一步被施用到点,大于30像素的对象计数为两个点,大于45像素的对象计数为三个点。较低的100像素的阈值施用到细胞核以过滤碎片和较小的细胞核片段。

[0781] 注意,部分重叠的色空间允许将单独的像素识别为红点的一部分和细胞核的一部分,与在细胞核顶上的深紫色点外观一致。

[0782] 结果和结论:

[0783] 片子SMD染色和点计算的结果显示在下表中:

[0784]

片	点	核	点/核
1	56918	12388	4.59
2	151	13817	0.0109
3	177	13925	0.0127
4	52011	13618	3.82
5	61040	12939	4.72

[0785] 将片1与片2和3的平均相比,显示出少388倍的结合一抗。因为片1表示出约97.9%的结合靶标分子(该值源自Her2抗体的Kd1),40pM一抗在相同测试材料(片2和3)上施用10分钟增加1/396的与一抗结合的靶标分子(或0.252%)。

[0786] 现在可以使用该数据来分析实验1a和1b的结果。

[0787] 如上所述,40pM一抗施用10分钟引起0.252%的初始靶标的标记。接着,结合至靶标的一抗与二抗47.1%(该数值源自二抗的Kd)的结合引起0.119%的靶标与二抗(间接)结合。这相应于实验1c,即使用40pM一抗10min。这也必然是实验1b的情况(因为染色水平相同),其中13.3nM一抗孵育(97.9%的初始结合靶标)之后,与100pM标记二抗和5nM未标记二抗的混合物孵育。因此,可以得出结论,该混合物的使用引起0.119%/0.979=0.121%的一抗与标记二抗的结合;靶标的0.252%的0.121%等于3.06ppm(百万分率)。因此,在片4和5中观察到的每一细胞核4.27个点(平均)计数为每个细胞核1,395,000个靶标分子(这是从以下计算中得出的:4.27/0.00000306=1,395,000)。

[0788] 可以通过将片2和3与片4~5进行比较而得出该评估的准确性。使用具有100pM标记二抗(片2~3)的混合物比使用具有500fM标记二抗(片4~5)的混合物,观察到多362倍的点(平均)。因为具有100pM的混合物引起0.121%的一抗被标记,具有500fM的混合物必然引起低362倍的靶标与抗体的标记,即0.121%/362=3.34ppm。使用该数字来分析片1,可以计算出在这个片子中的靶标分子的标记水平:3.34ppm的97.9%得到3.27ppm,且每一细胞核观察到4.59个点与每一细胞核1,402,000的靶标分子对应(4.59/0.00000327=1,402,000)。

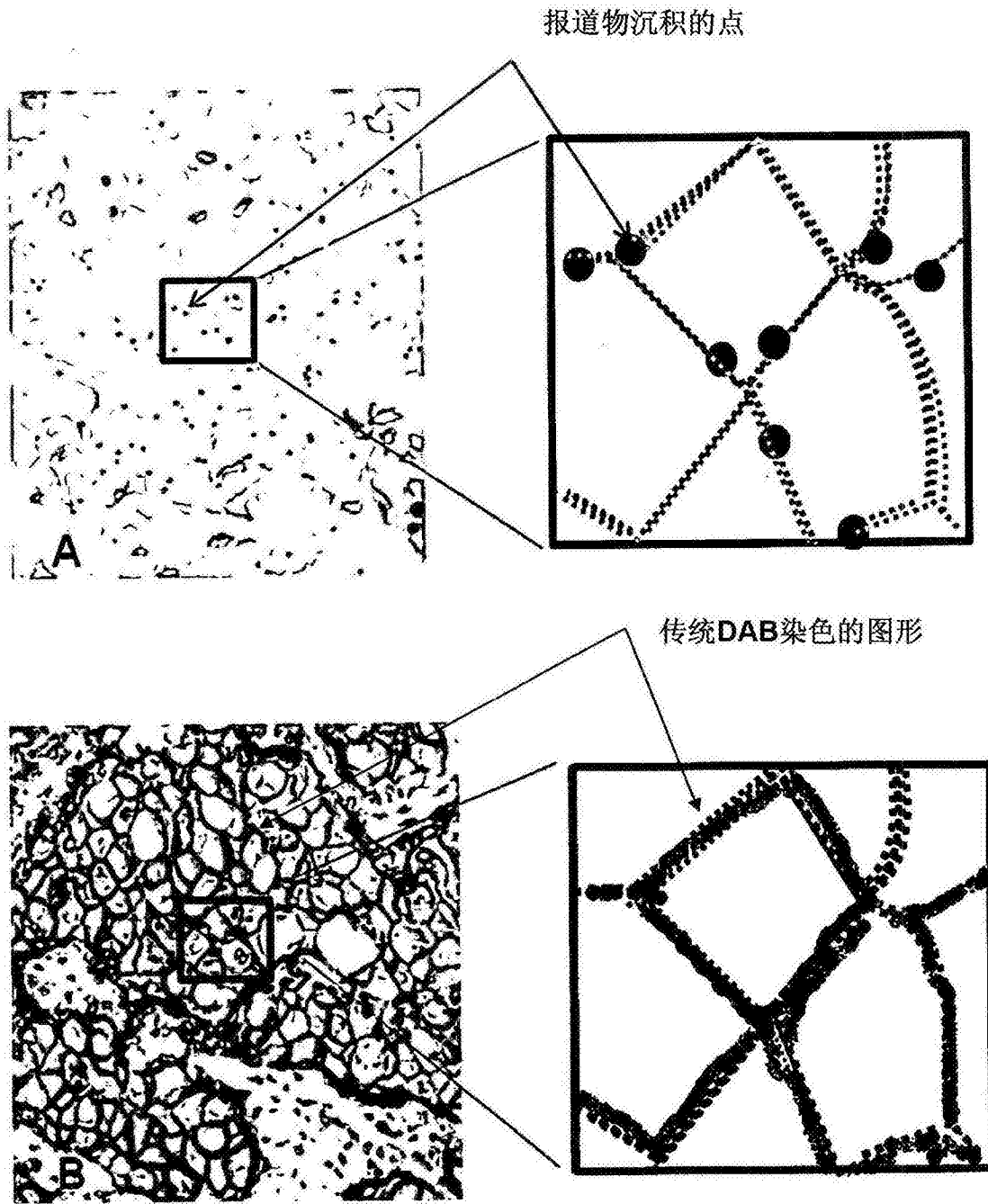


图1

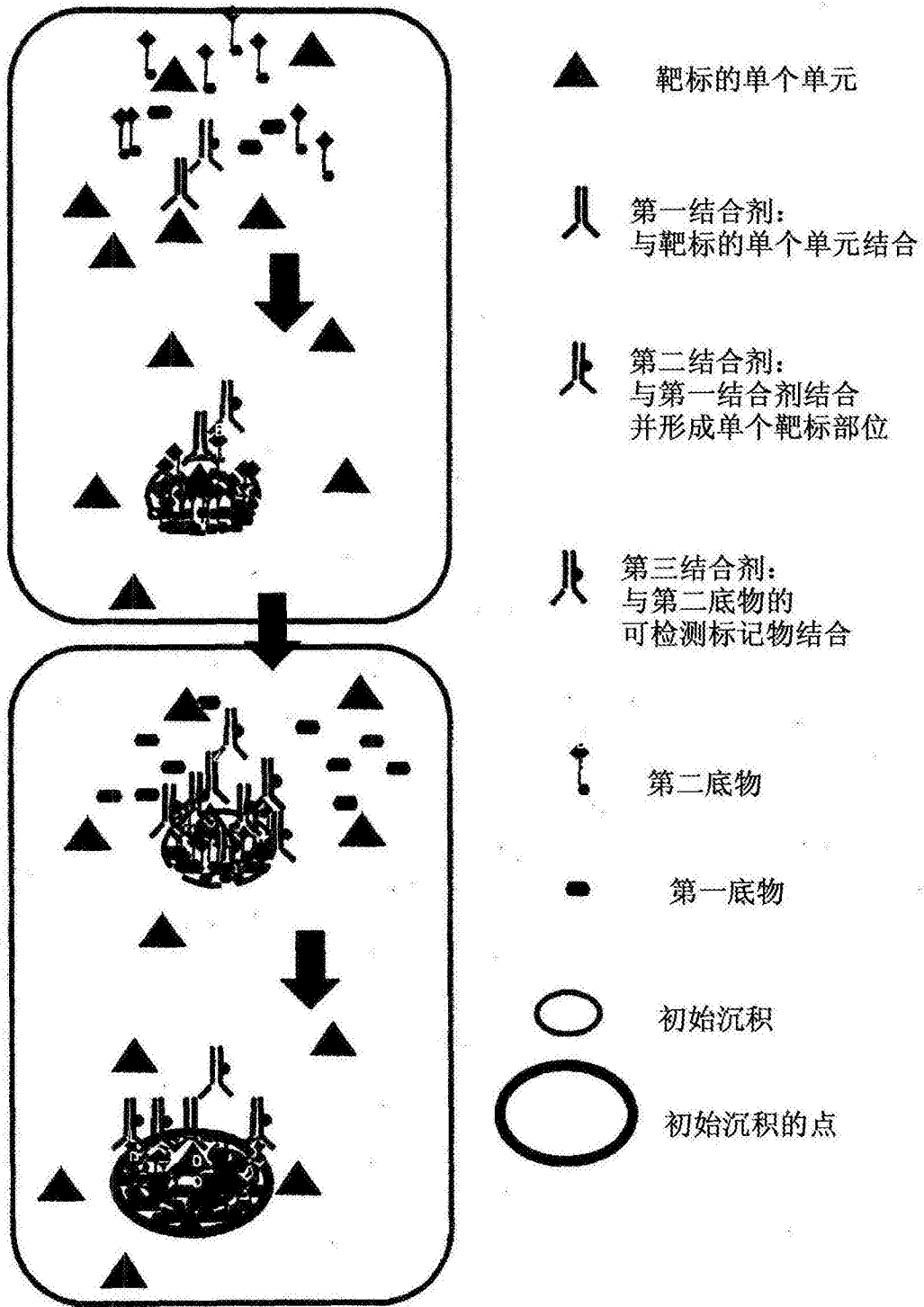


图2

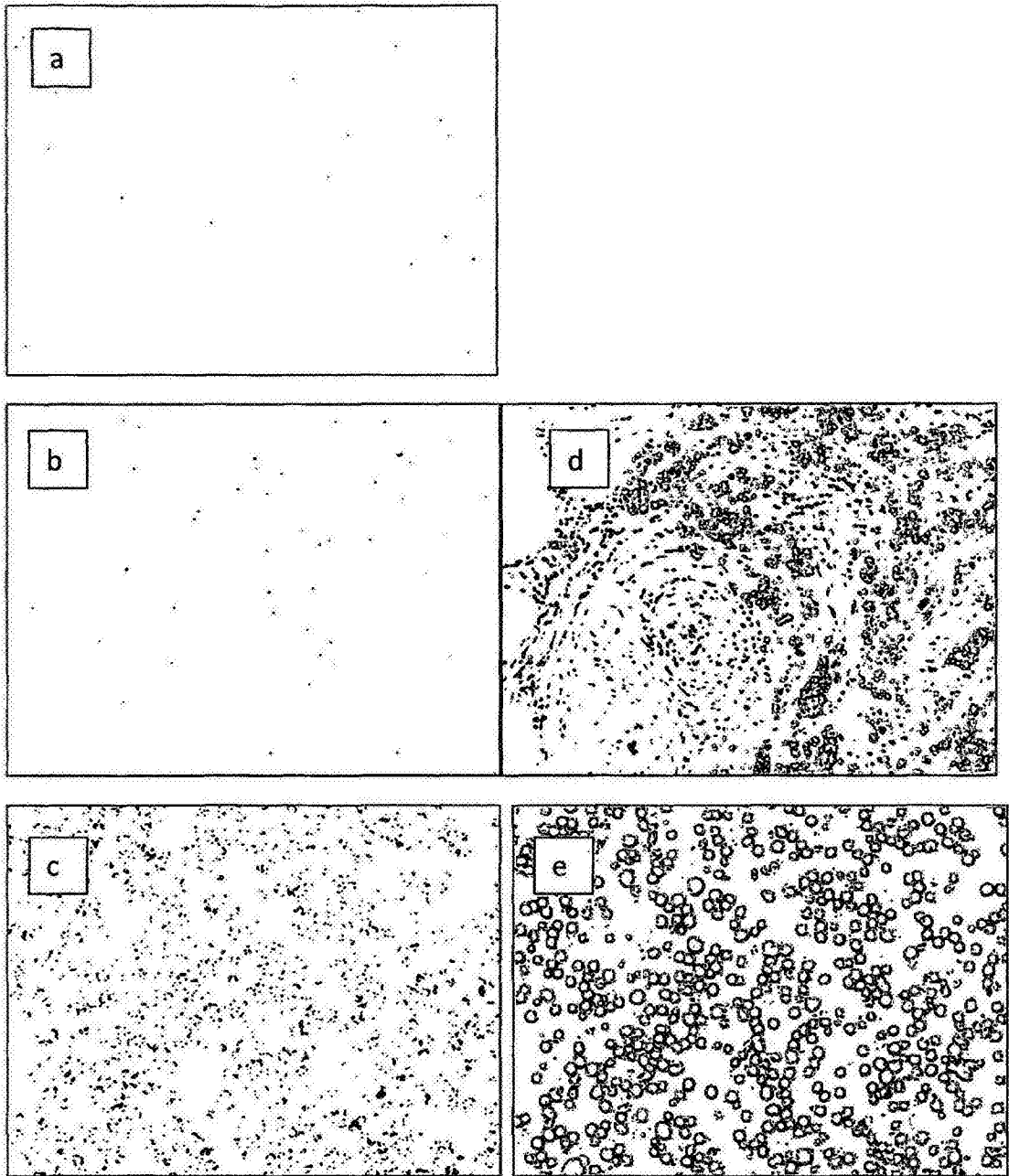


图3

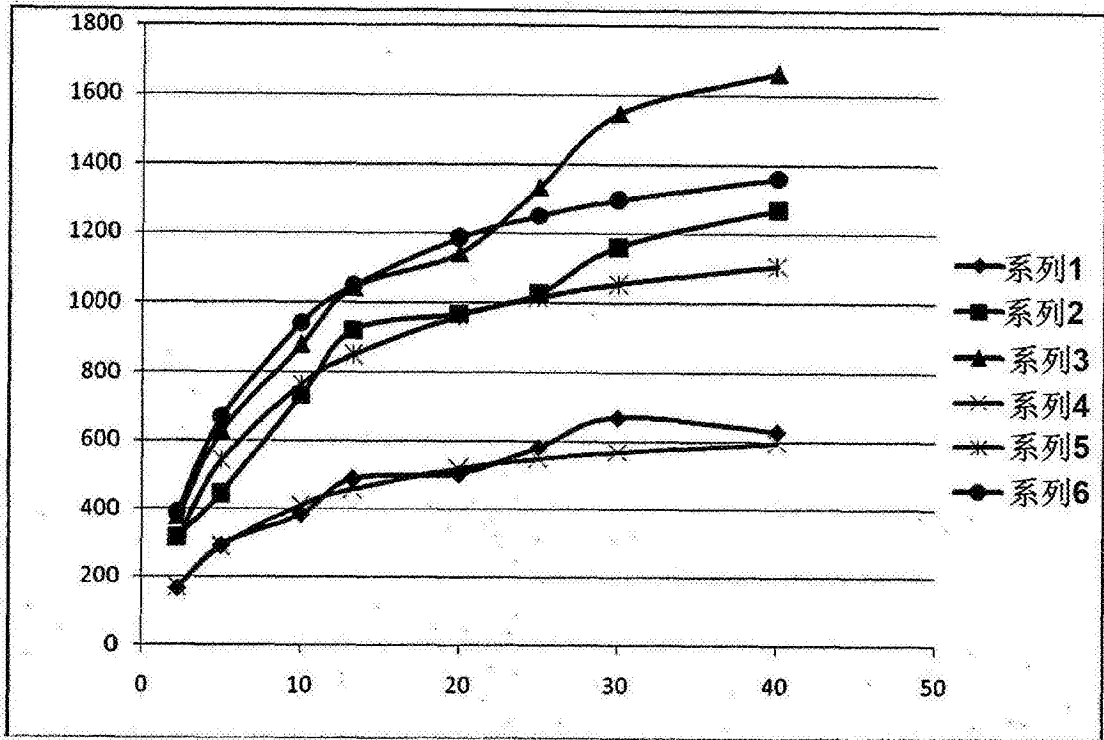


图4

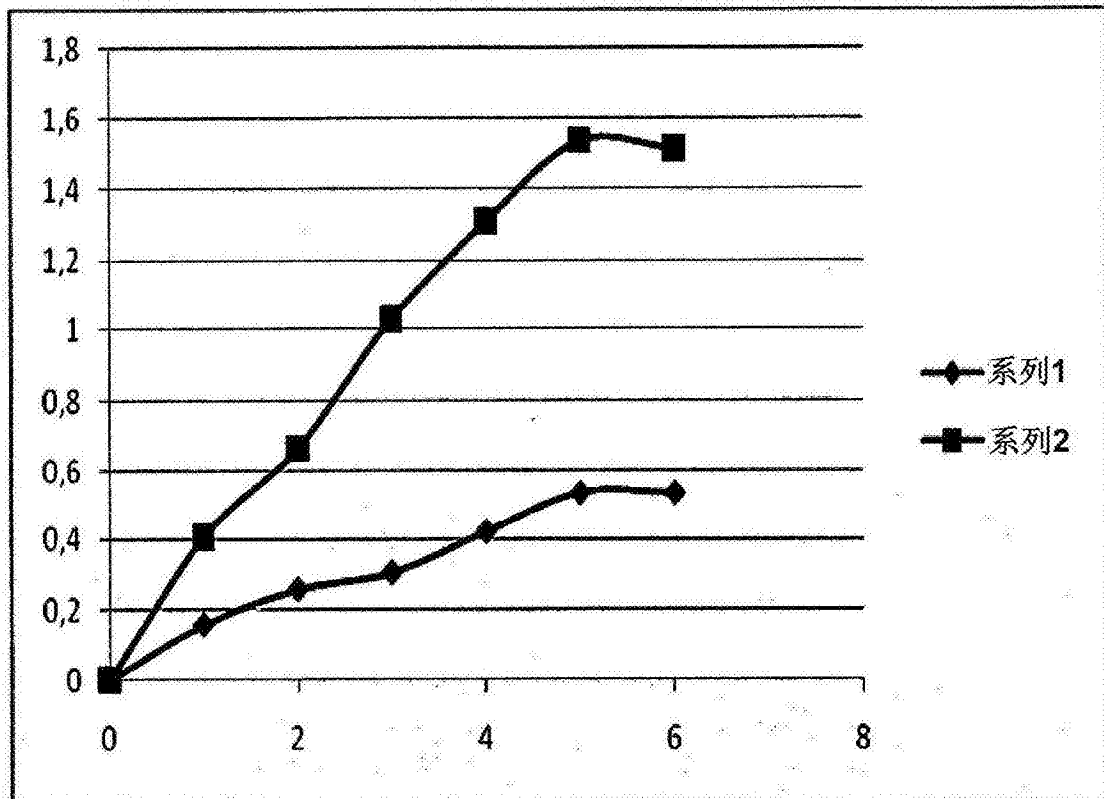


图5

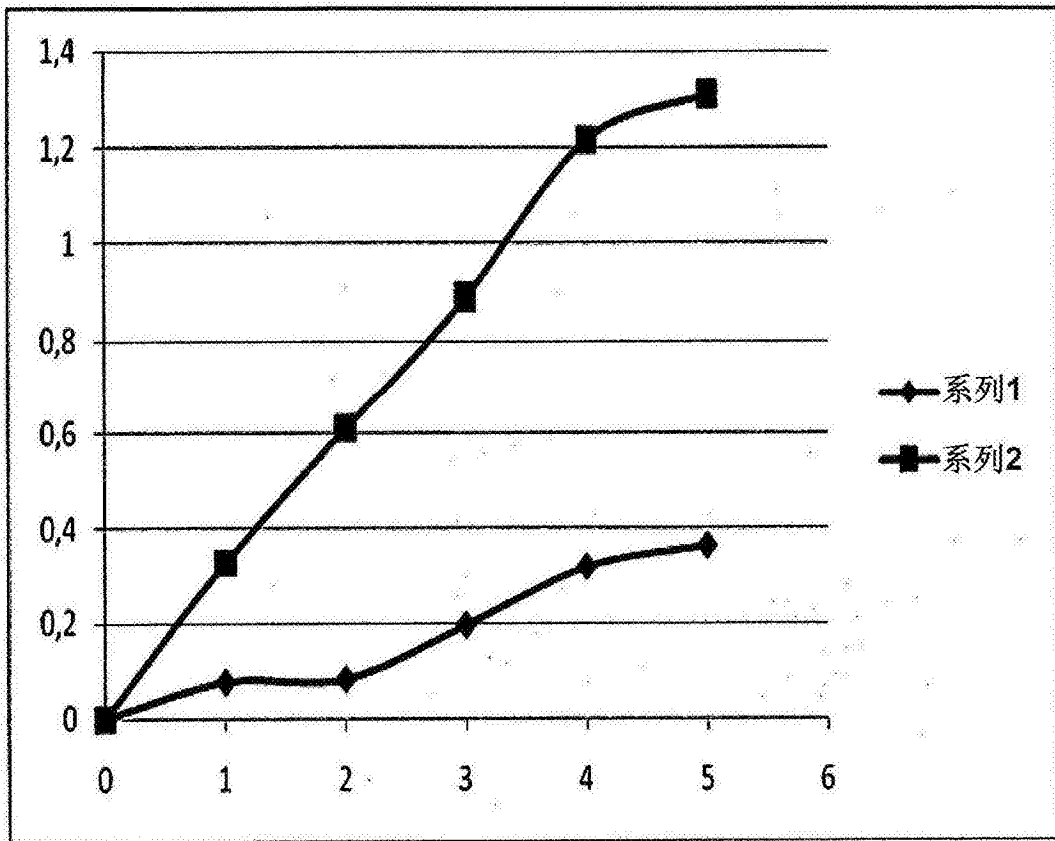


图6

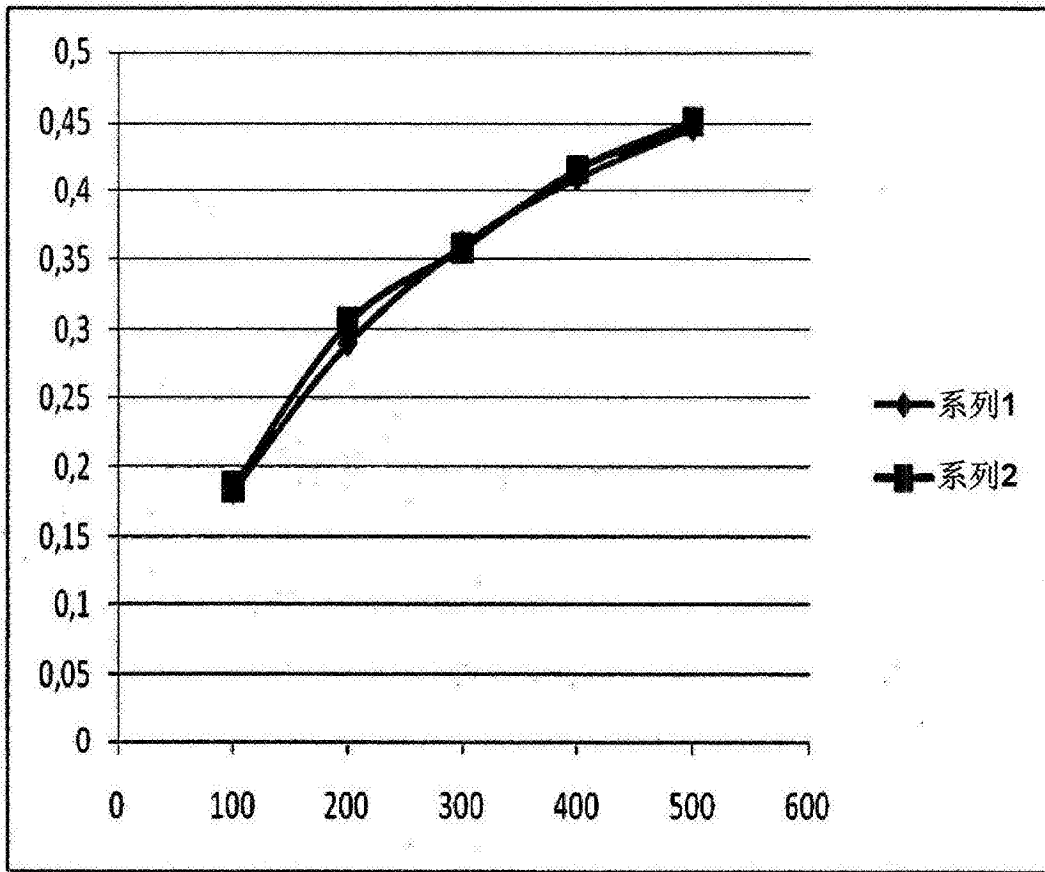


图7

专利名称(译)	组织学样品中单个靶标分子的定量		
公开(公告)号	<a href="#">CN103201627B</a>	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201180053856.X	申请日	2011-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
[标]发明人	J 洛泽 G 斯科拉蒂奇克瓦		
发明人	J.洛泽 G.斯科拉蒂奇克瓦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/5088 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/6893 G01N2800/50		
优先权	61/411050 2010-11-08 US		
其他公开文献	CN103201627A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于使用免疫化学手段对样品中固定靶标进行可视化和定量的领域。本发明的方法利用允许使样品中的单个靶标单元可视化为明显的点的免疫染色体系。具体地，本发明涉及用于对组织学样品中免疫染色的分子靶标进行可视化和定量的方法和试剂以及所述方法和试剂在医学诊断中的用途。然而本发明的可视化和定量方法可以应用于不同样品中的多种靶标，并且允许对其相对和绝对量进行精确定量。

[BP1][BP2]

$K_d = \dots$

[BP1:BP2]