

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680043958.2

[51] Int. Cl.
C07C 319/02 (2006.01)
C07C 327/28 (2006.01)
C01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 16 日

[11] 公开号 CN 101535244A

[22] 申请日 2006.11.21
[21] 申请号 200680043958.2
[30] 优先权
[32] 2005.11.23 [33] US [31] 60/739,794
[86] 国际申请 PCT/US2006/045302 2006.11.21
[87] 国际公布 WO2007/062177 英 2007.5.31
[85] 进入国家阶段日期 2008.5.23
[71] 申请人 文塔纳医疗系统公司
地址 美国亚利桑那州
[72] 发明人 C·比尼尔兹 J·阿什沃思-夏普
C·A·凯纳 J·W·科斯梅德
M·勒菲弗

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 关立新 李平英

权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 11 页

[54] 发明名称
分子缀合物

[57] 摘要

公开了一种利用酰肼硫醇连接剂制备两种分子的缀合物的方法。在一项具体的工作实施方案中,利用该方法制备了一种 Fc-特异性抗体-酶缀合物,它在免疫组织化学分析和原位杂交分析中显示出优越的染色灵敏度和特异性。

1. 一种形成两个或多个分子的缀合物的方法，包括：

使酰肼硫醇连接剂与有酰肼活性基团的第一分子反应，形成硫醇化的第一分子，其中酰肼硫醇连接剂与第一分子在该酰肼硫醇连接剂的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件下反应；和

使硫醇化的第一分子与具有硫醇活性基团的第二分子反应，形成缀合物。

2. 权利要求1的方法，其中第一分子含有一种特异结合分子，第二分子含有一种可检测的标记物。

3. 权利要求1的方法，其中在酰肼硫醇连接剂化合物的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件下反应包括在小于约7的pH下反应。

4. 权利要求1的方法，其中在酰肼硫醇连接剂化合物的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件下反应包括在约为3-7的pH下反应。

5. 权利要求1的方法，其中在酰肼硫醇连接剂化合物的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件下反应包括在约为4-6的pH下反应。

6. 权利要求1的方法，其中第一分子的酰肼活性基团包括醛基。

7. 权利要求6的方法，其中第一分子包括糖基化分子，醛基是通过第一分子的糖基化部分的氧化被引入到第一分子中。

8. 权利要求7的方法，其中糖基化分子包括一种抗体，醛基被引入到抗体的Fc部分。

9. 权利要求1的方法，其中第二分子的硫醇活性基团包括被引入到第二分子中的马来酰亚胺基团。

10. 权利要求9的方法，其中被引入到第二分子中的马来酰亚胺基团是用NHS-PEG-马来酰亚胺连接剂引入的。

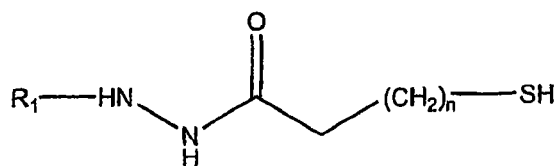
11. 权利要求9的方法，其中第二分子包含一种可检测标记物。

12. 权利要求1的方法，其中酰肼硫醇连接剂化合物是以下化合物中的一种或多种：MBH，MBCH，MAMBH，THMBH，BTAL，BTHL，TAGD，THGD，PEG-基的酰肼硫醇连接剂，多官能酰肼硫醇连接剂，PEG基的多官能酰肼硫醇连接剂，和聚丙烯酰胺酰肼连接剂。

13. 权利要求12的方法，其中该酰肼硫醇连接剂化合物是MBH、MBCH或巯基-dPEG-酰肼连接剂中的一种或多种。

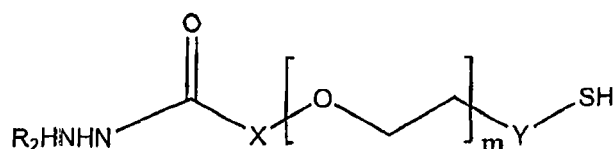
14. 权利要求1的方法，其中酰肼硫醇连接剂化合物具有以下化学

式:



其中 $n=1$ 、 2 或 3 ; R_1 是 H 、 $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{CO-A-CONHNH}_2$, 其中 A 是一个有 1 - 100 个碳原子的二价基团。

15. 权利要求 1 的方法, 其中该酰肼硫醇连接剂化合物具有以下化学式:



其中 $m=2$ - 50 , R_2 是 H 、 $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{CO-A-CONHNH}_2$, 其中 A 是一个有 1 - 100 个碳原子的二价基团, X 和 Y 独立地是一个键或有 1 - 20 个碳原子的二价基团。

16. 按照权利要求 1 的方法制备的缀合物。

17. 一种缀合物, 其中含有经由一种酰肼硫醇连接剂与可检测标记物共价结合的抗体, 其中该酰肼硫醇连接剂是以下化合物中的一种或多种: MBH、MBCH、MAMBH、THMBH、BTAL、BTHL、TAGD、THGD、PEG 基的酰肼硫醇连接剂、多官能酰肼硫醇连接剂、PEG 基多官能酰肼硫醇连接剂和聚丙烯酰胺酰肼连接剂; 其中该连接剂的一个酰肼基团与抗体的 Fc 部分共价结合。

18. 权利要求 17 的缀合物, 其中该酰肼硫醇连接剂包括 PEG 基的酰肼硫醇连接剂。

19. 权利要求 18 的缀合物, 其中该 PEG 基酰肼硫醇连接剂包括巯基-dPEG-酰肼连接剂。

20. 权利要求 17 的缀合物, 其中该酰肼硫醇连接剂包括 MBH 或 MBCH。

21. 权利要求 17 的缀合物, 其中可检测标记物包括酶、荧光分子、

半抗原或荧光纳米粒子。

22. 权利要求 21 的缀合物，其中可检测标记物包括酶。

23. 权利要求 22 的缀合物，其中可检测标记物包括选自碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶的一种酶。

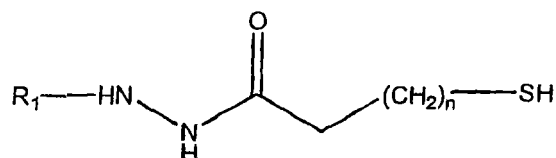
24. 权利要求 23 的缀合物，其中的可检测标记物包括碱性磷酸酶。

25. 权利要求 24 的缀合物，其中该碱性磷酸酶包括交联的碱性磷酸酶。

26. 权利要求 17 的方法，其中抗体包括抗半抗原抗体。

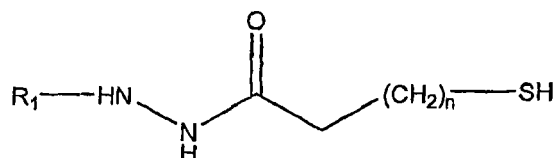
27. 权利要求 17 的缀合物，其中抗体包括一种抗抗体抗体。

28. 具有以下化学式的一种酰肼硫醇连接剂：



其中 R_1 是 H 或 —CONHNH_2 ， $n=1$ 、2 或 3。

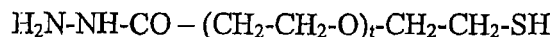
29. 一种试剂盒，其中含有化学式如下的一种酰肼硫醇连接剂：



其中 R_1 是 H 或 —CONHNH_2 ， $n=1$ 、2 或 3；和

用来实施权利要求 1 的方法的使用说明。

30. 一种试剂盒，其中含有化学式如下的一种酰肼硫醇连接剂：



其中 $t=2$ 至 50；和

用来实施权利要求 1 的方法的使用说明。

分子缀合物

相关申请资料

本申请要求 2005 年 11 月 23 日提交的美国临时专利申请 No.60/739,794 的利益，该申请并入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及分子缀合物，用于制备这些缀合物的连接剂，制备该缀合物和连接剂的方法，和使用该缀合物的方法。更具体地说，本发明涉及 Fc-特异性抗体缀合物，用于制备 Fc-特异性抗体缀合物的酰肼硫醇连接剂，制备 Fc-特异性缀合物的方法，以及使用 Fc-特异性抗体缀合物的方法。

背景技术

已经发展了各式各样用来将分子连接在一起形成缀合物的方法。特别重要的是生物分子缀合物，它们通常被制备成将参与分子的官能团结合成一个构筑物。一类生物分子缀合物将一个与另一种分子（例如核酸、抗体、凝集素或亲和素）特异结合的生物分子与一种可检测的标记物（例如荧光标记物、荧光纳米粒子或酶）结合。

抗体和可检测标记物的缀合物（抗体缀合物）可用于检测生物样品中特定的靶分子的免疫分析。这种缀合物的抗体部分与样品中的靶物特异结合，而可检测标记物则被用来提供指示该靶物的存在和/或定位的可测信号。一类已被广泛使用的，尤其是用于免疫组织化学分析的缀合物是抗体和酶的缀合物（抗体-酶缀合物）。通过向样品中加入底物产生可检测的信号，加入的条件应使抗体-酶缀合物的酶部分在抗体部分与其靶物的结合部位将底物转化成可检测的产物（例如有色的、不同颜色的或荧光产物）。

抗体缀合物通常利用偶联剂制备，偶联剂的特点是至少有两个活性基团，其中之一与抗体上的官能基反应，另一个与可检测的标记物上的官能基反应。但是，偶联会导致抗体和可检测标记物之一或二者失活。特别是，偶联可能通过空间位阻作用或者因为偶联剂与位于抗体和/或酶

部分上的对其特异性和/或催化活性起关键作用的官能团反应，使抗体-酶缀合物失活。另外，一些偶联方案会导致缀合物的水溶性减小。

希望偶联方案能提供抗体特异性和/或酶活性受损较小的抗体-酶缀合物，并且能在免疫化学分析例如免疫组织化学分析中达到更高的灵敏度。高灵敏度对于不希望有额外的扩增步骤的自动化方法特别重要。

发明概要

公开了一种包含酰肼硫醇连接体的分子缀合物。在一项实施方案中，提供了一种抗体-可检测标记物缀合物，其中包含一个与该抗体的Fc部分共价键合的酰肼硫醇连接体。该实施方案的Fc-特异性缀合物具有改进的检测灵敏度，从而使靶分子的免疫组织化学检测更适合自动化和高流动量应用。

还公开了一种使用酰肼硫醇连接剂制备缀合物的方法。在一项实施方案中，该连接剂的一个硫醇基不需要保护基团，因为该连接剂是在硫醇基基本上以其中性酸的形式存在、从而基本上无反应活性的条件下与第一种分子反应。在这样的条件下，连接剂化合物的酰肼基团与第一种分子之间可以形成共价键，同时基本上保留了硫醇基团用于第二种分子的硫醇活性基团进行后继反应。

还公开了酰肼硫醇连接剂和制备酰肼硫醇连接剂的方法。此外，还描述了使用所公开的缀合物检测诸如组织切片或细胞学样品等样本中的靶分子的方法。由于所公开的缀合物显示出提高的灵敏度，检测靶分子的方法容易实现自动化。在某些实施方案中，提供了使用所公开的缀合物的多重分析法，例如，使用所公开的具有荧光分子或荧光纳米粒子作为检测标记物的抗体缀合物的多重分析。

附图简述

图1是显示使用所公开的Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测扁桃体组织内的κ链的染色图案的一系列图像。

图2是显示使用所公开的Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测扁桃体组织内λ链的染色图案的一系列图像。

图 3 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测肺组织内 CMV 的染色图案的一系列图像。

图 4 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测脾组织内 EBER 的染色图案的一系列图像。

图 5 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测 CaSki 异种移植组织内 HPV（人乳头瘤病毒）的染色图案的一系列图像。

图 6 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测 HeLa 异种移植组织内 HPV 的染色图案的一系列图像。

图 7 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测 SiHa 异种移植组织内 HPV 的染色图案的一对图像。

图 8 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测细胞学样品中 HPV 的染色图案的一系列图像。

图 9 是显示使用所公开的 Fc-特异性抗体-碱性磷酸酶缀合物和使用链霉亲和素-碱性磷酸酶缀合物检测肌肉组织中肌动蛋白的染色图案的一对图像。

图 10 是显示所公开的抗体-酶缀合物彼此间和与用其它方法制备的抗体-酶缀合物之间灵敏度比较的一系列图像。

几个示例性实施方案的详述

本发明的其它方面通过以下非限制性的说明和实施例进行示例说明，从以下的缩写和术语着手。

I. 缩写

Ab - 抗体

(Ab-Ap) - 抗体-碱性磷酸酶缀合物

Ap - 碱性磷酸酶

BSA - 牛血清白蛋白

CMV - 巨细胞病毒
EBER - 爱-巴病毒早期 RNA
DL - 可检测标记物
Fc - 可结晶段
HRP - 辣根过氧化物酶
IHC - 免疫组织化学
ISH - 原位杂交
MAL - 马来酰亚胺
MBCH - 巯基丁酰卡巴肼
MBH - 巯基丁酰肼
NHS - N-羟基丁二酰亚胺
PEG - 聚乙二醇
SBM - 特异结合分子

II. 术语

术语“一”和“该”，除非上下文另外清楚地表明，包括单个和多个所述对象。

术语“氨基化”在本文中是指醛或酮的羰基与胺基的反应，其中一个含胺的化合物，例如胺或酰肼，与醛或酮反应，先形成一个席夫碱，它随后能可逆地重排成更稳定的形式，或是任选地被还原以防止反应逆转。“还原性氨基化”条件包括加入还原剂，更常见的是加入一种温和的还原剂例如氰基硼氢化钠或其同类物之一，例如三乙酰氧基硼氢化钠。可以使用的其它温和的还原剂包括各种胺合硼烷络合物。

术语“抗体”统指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子（包括 IgA、IgD、IgE 和 IgM，以及在任何有机体例如哺乳动物（如人、山羊、兔和小鼠）中的免疫响应期间产生的类似分子），或其片段，它与一种靶物（或一组高度相似的靶物）特异结合到基本上排除与其它分子结合的程度。在一些实施方案中，抗体与靶物特异结合，结合常数比对样品中其它分子的结合常数至少高 10^3 M^{-1} ， 10^4 M^{-1} 或 10^5 M^{-1} 。在其它实施方案中，抗体与抗原决定簇（例如半抗原或抗原表位）结合的 K_d 值处在 10^{-6} M 数量级或更低，例如 10^{-9} M 或更低，甚至 10^{-12} M 或更低。 K_d 值可以用例如竞争性 ELISA（酶联免疫吸附测定法）或者用表面等离子体共振装置，例如可由 Biacore, Inc., Piscataway, NJ 得到的 Biacore T100，测定得

到。抗体片段包括蛋白酶解抗体片断[例如本领域已知的 $F(ab')_2$ 片段, Fab' 片段, Fab'-SH 片段和 Fab 片段], 重组抗体片段(例如本领域已知的 sFv 片段, dsFv 片段, 双特异性 sFv 片段, 双特异性 dsFv 片段, 双链抗体和三链抗体), 和骆驼抗体(例如见, 美国专利 No.6,015,695; 6,005,079; 5,874,541; 5,840,526; 5,800,988 和 5,759,808)。抗体包括单克隆和多克隆抗体制品。虽然所公开的缀合物的抗体能与任何特定分子或高度类似分子的任何特定基团特异结合, 但在特定的实施方案中, 该抗体包含一个抗半抗原抗体(例如, 它能用来检测一个以所关心的核酸序列为目标的半抗原标记的探针序列)。在特定的实施方案中, 抗体中包含一个能用来在免疫分析中作为第二抗体的抗抗体抗体。例如, 该抗体可以含一个抗-IgG 抗体, 例如抗鼠 IgG 抗体, 抗兔 IgG 抗体或抗山羊 IgG 抗体。

短语“酰肼硫醇连接剂的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件”是指这样的条件, 例如 pH 条件, 其中该连接剂的硫醇基团(-SH, 质子化的中性酸形式)以其共轭碱形式(S^- ; 非质子化的带负电形式)存在的少于约 1%。例如, 在这样的条件下, 少于约 0.1%, 少于约 0.01%, 甚至少于约 0.001%的连接剂能处在共轭碱形式。酰肼硫醇连接剂化合物的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在的条件包括 pH 小于约 7, 例如 pH 小于约 6, 例如 pH 小于约 5.5。在特定的实施方案中, 这些条件包括一个 pH 范围, 例如 pH 从约 3 至约 7, pH 从约 4 到约 7, pH 从约 4 到约 6, pH 从约 4.5 到约 5.5, 或上述各范围的任何子范围。在另一些实施方案中, 特定连接剂的硫醇基团基本上以其中性酸形式存在(少于 1%的硫醇基团以共轭碱形式存在)的 pH 范围的上限可以超过 7, 例如 pH 8。本领域普通技术人员利用 Hender son-Hasselbach 公式和该连接剂的硫醇基团的 pKa 值容易确定给定的硫醇基团基本上以中性酸形式存在的 pH 范围的上限。在另一些实施方案中, 特定的连接剂的硫醇基团在溶剂体系中能基本上以其中性酸形式存在的准确的 pH 值不能测定, 本领域普通技术人员会认识到, 极性比水小的溶剂体系会有利于硫醇基团在较高的表观 pH 下保持其中性酸形式。或者是, 在特定条件下, 连接剂的硫醇基团是否基本上以其中性酸形式存在可以通过测定该硫醇是否会将另一分子中的二硫键还原来实验确定。例如, 通过在特定的 pH(对于非水体系为估计的 pH)条件下接触该连接剂可以测定被引入到有二硫

键的分子（如免疫球蛋白）中的自由硫醇基团的数目（例如，用 Ellman 试剂）。在一段时间内（例如一小时或更长）加入过量的酰肼硫醇连接剂（例如 50 倍超量或更多），然后可测定引入到分子中的自由硫醇的平均数。如果生成的自由硫醇很多（例如每个免疫球蛋白分子引入的硫醇平均数超过 2），则表明该连接体的硫醇在所试验的条件下不是基本上以中性酸的形式存在。例如，在 pH 约为 7 时，相对于免疫球蛋白过量 100 倍的连接剂 MBH 将产生每个免疫球蛋白分子平均约 2 个硫醇。在较低的 pH 5，1000 倍过量的 MBK 连接剂在 24 小时内产生平均大大少于每个免疫球蛋白分子 1 个硫醇。这些结果证实，对于连接剂 MBH，硫醇基团在 pH 约为 7 或更低的条件下基本上以其中性酸形式存在，因为随着 pH 降低，中性酸形式和其共轭碱之间的平衡更朝向中性酸形式移动。

“缀合物”是指共价连接成一个更大构筑物的两个或多个分子（和/或材料，如纳米粒子）。在一些实施方案中，缀合物包含一个或多个生物分子（例如肽，核酸，蛋白质，酶，糖，多糖，脂质，糖蛋白和脂蛋白），它们与一个或多个其它分子，例如一个或多个其它的生物分子，共价连接。在另一些实施方案中，缀合物包含与一个或多个可检测的标记物（例如荧光分子，荧光纳米粒子，半抗原，酶及其组合物）共价连接的一个或多个特异结合分子（例如抗体和核酸序列）。

“可检测标记物”是一种能产生指示该标记物在样品中的存在和/或浓度的可检测（例如可目测或电子学方法测定）信号的分子或材料。当与特异结合分子缀合时，可检测标记物可以用来对特异结合分子指向的靶物定位和/或定量测定。藉此，靶物在样品中的存在和/或浓度可以通过检测该可检测标记物产生的信号来测定。可检测标记物可以直接或间接检测，而且几个与不同的特异结合分子缀合的不同的可检测标记物可以组合使用以便检测一个或多个靶物。例如，第一种可检测标记物，例如与对靶物特异的核酸探针或抗体缀合的半抗原，可以通过使用与和第一种可检测标记物特异结合的分子缀合的第二种可检测标记物间接检测。能够被分别检测的多重可检测标记物可以与不同的特异结合分子缀合，它们与不同的靶物特异结合，提供了能够同时检测一个样品内的多个靶物的多重测定法。可检测信号可以用任何已知的或尚待发现的机制产生，包括光子（包括射频、微波频率、红外频率、可见频率和紫外

频率的光子)的吸收、发射和/或散射。可检测标记物包括彩色、荧光、磷光和发光分子及材料,将一种物质转化成另一物质以提供可检测的差别(例如将无色物质转化成有色物质或者反过来,或产生沉淀或提高样品浊度)的催化剂(例如酶),能利用另外的以可检测方式标记的抗体缀合物通过抗体-半抗原键合相互作用检测的半抗原,以及顺磁和磁性分子或材料。可检测标记物的具体实例包括酶,例如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,酸性磷酸酶,葡糖氧化酶, β -半乳糖苷酶, β -葡糖醛酸酶或 β -内酰胺酯;荧光分子,例如荧光素、香豆素、BODIPY染料、试卤灵和罗丹明(在The Hand book-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probe, Eugene, OR 中可以找到很多其它的荧光分子的实例);纳米粒子,例如量子点(例如由Quantum Dot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, CA 得到的;还参见美国专利 No.6,815,064, 6,682,596 和 6,649,138,各专利均并入本文作为参考);金属螯合物,例如放射性或顺磁金属离子如 Gd^{3+} 的DOTA和DPTA螯合物;以及脂质体,例如含有包藏的荧光分子的脂质体。在可检测标记物包括酶的情形,可以与该酶组合使用一种可检测的底物,例如色原、荧光化合物或发光化合物,以便产生可检测的信号(各式各样的此类化合物可由市场购得,例如由Invitrogen Corporation, Eugene OR 得到)。生色化合物的具体实例包括二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯磷酸(pNPP)、固红、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)、氮蓝四唑(NBT)、BCIP/NBT、固红、AP 橙、AP 蓝、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氮基二[3-乙基苯并噻唑啉硫酸盐](ABTS)、邻联茴香胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -吡喃半乳糖苷(X-Gal)、甲基伞形酮- β -D 吡喃半乳糖苷(MU-Gal)、对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-葡萄糖醛酸苷(X-Gluc)、3-氨基-9-乙基吡唑(AEC)、碱性品红、碘硝基四唑鎓(INT)、四唑蓝和四唑紫。或者是,在金相学检测方案中可以使用酶。金相学检测方法包括将一种酶,例如碱性磷酸酶,与一种水溶性金属离子和一种无氧化还原活性的该酶的底物组合使用。该底物被酶转化成氧化-还原活性剂,该氧化-还原活性剂将金属离子还原,使其形成可检测的沉淀(例如见,2004年12月20日提交的共同未决的美国专利申请 No.11/015,646, PCT 公开号 No.2005/003777 和美国

专利申请公开号 2004/0265922; 它们均并入本文作为参考)。金相检测方法包括与一种水溶性金属离子、一种氧化剂和一种还原剂一起使用一种氧化还原酶(例如辣根过氧化物酶), 同样是形成可检测的沉淀(例如见, 美国专利 No.6,670,113, 其被并入本文作为参考)。半抗原是被抗体特异结合的小分子, 但它们本身不会在动物中产生免疫响应, 必须首先附着在更大的载体分子例如蛋白质或者聚核酸上以产生免疫响应。半抗原的实例包括二硝基苯酚、生物素、洋地黄毒苷和荧光素。噁唑、吡唑、噻唑、硝基芳基、苯并呋喃、三萜、尿素、硫脲、鱼藤酮类生物碱、香豆素和环木脂体半抗原公开在共同未决的美国临时专利申请 No.60/856133 (2006 年 11 月 1 日提交) 中, 该申请并入本文作为参考。

这里使用的术语“Fc-特异性缀合物”是指一种免疫球蛋白(或其片段)的缀合物, 其中第二分子(例如可检测标记物)与该免疫球蛋白的糖基化部分(或免疫球蛋白的保留糖基化部分的片段)共价结合。免疫球蛋白的糖基化部分在 Fc 区域被发现, 该区域位于免疫球蛋白的重链上, 处在免疫球蛋白中决定该免疫球蛋白的特异结合活性的那部分的外面。

术语“酰肼基团”指酰肼基($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$), 卡巴肼基($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$), 氨基脲基($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$), 氨基硫脲基($-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-\text{NH}_2$), 硫代卡巴肼基($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-\text{NH}_2$), 碳酰二肼($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$)或其含硫的衍生物, 或者羧酸肼基团($-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$)或其含硫的衍生物。

术语“酰肼活性基团”是指能与酰肼基团反应并形成共价键的原子团。醛基和酮基是酰肼活性基团的实例。酰肼活性基团可以是分子的固有部分, 或者被引入到分子中。将醛基(一种酰肼活性基团)引入到多糖和糖蛋白(包括抗体)中的一种方法是利用氧化, 例如高碘酸盐介导的连位二醇的氧化。此外, 不饱和脂肪酸和神经酰胺中的双键可以用四氧化钼转化成二醇, 然后用高碘酸盐氧化成醛。再者, 肽和蛋白质的 N-端丝氨酸和苏氨酸残基可以被高碘酸盐选择性氧化成醛基, 从而可以对某些蛋白例如促肾上腺皮质激素和 β -内酰胺酶进行选择性的改性。高碘酸盐氧化的抗体的改性通常不使抗体失活。在氧化反应期间改变高碘酸钠的浓度产生对所改性的糖基类型的某些特异性。例如, 1 mM 浓度的高碘酸钠在 0°C 通常只在唾液酸残基的第 7、8 和 9 个碳原子之间的相邻羟

基处裂解。用 10 mM 或更高浓度的高碘酸钠氧化多糖造成糖基而非唾液酸的氧化，从而在给定的多糖上形成很多醛。Hermanson，

“Bioconjugate Techniques”，Academic Press，San Diego，1996，ISBN 0-12-342336-8 中描述了一种合适的通用方案，该文献并入本文作为参考。向生物分子中引入醛的另一方法是通过使用特异性糖氧化酶，例如，半乳糖氧化酶，该酶将末端的半乳糖基氧化成醛，特别是在糖蛋白中。当半乳糖基是唾液酸在后的倒数第二位时，可以用神经酰胺酶除去唾液酸基，使半乳糖基暴露成端基。一种使用神经酰胺酶和半乳糖氧化酶的组合物氧化半乳糖基以得到活性醛基的方案描述在 Hermanson，

“Bioconjugate Techniques”，Academic Press，San Diego，1996，ISBN 0-12-342336-8，该文并入本申请作为参考。还可以通过分子的氨基与 NHS-醛（例如丁二酰亚胺基对甲酰苯甲酸酯（SFB）或丁二酰亚胺基对甲酰苯氧基乙酸酯（SFPA）（Invitrogen Corp.，Eugene，OR）反应，将醛引入到分子中。或者是，可以使用二醛化合物，例如戊二醛，将胺基改性以得到醛基。同样，在 Hermanson，“Bioconjugate Techniques”，Academic Press，San Diego，1996，ISBN 0-12-342336-8 中提供了合适的方案，该文献并入本申请作为参考。

术语“酰肼硫醇连接剂”是指含有通过一个或多个连接原子共价结合的一个或多个酰肼基团和一个或多个硫醇基团（-SH）的分子。酰肼硫醇连接剂的酰肼基团和硫醇基团可以通过一个或多个各种原子团连接，包括亚甲基（-CH₂-）、支化的亚烷基、另外的酰肼基团、芳族基团、杂芳族基团、脂环基团、聚亚烷基二醇基团（例如氧乙烯基团 -O-CH₂-CH₂-）、酰胺基团（-CONH）、胺基（-NH-）、醚基（-O-），及它们的组合。“基于 PEG 的酰肼硫醇连接剂”指包含一个或多个乙二醇基团作为其结构的一部分的一种连接。“多官能酰肼硫醇连接剂”是指一种支化的连接剂，它含有至少一个酰肼基，至少一个硫醇基，和至少另一个活性基团，例如另外一个酰肼基、另一个硫醇基，或可用于制备分子缀合物的任何其它基团。在某些实施方案中，基于 PEG 的酰肼硫醇连接剂含有一个分离的 PEG（dPEG）连接剂，它可以由 dPEG 起始物（如美国专利申请公布号 No.20060020134 中所公开的）制备，并可由 Quanta Biodesign（Powell，OH）购得。可以包括在多官能酰肼-硫醇连接剂中的另外的活性基团的实例包括马来酰亚胺基团和活性酯类，例如

N-羟基丁二酰亚胺酯和羟基（-OH）。另外的活性基团的实例可以在 Hermanson, “Bioconjugate Techniques”, Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8 中找到。

“样品”一词是指靶物能在其中或其上存在的任何液体、半固体或固体物质（或材料）。特别是，样品可以是生物样品或是从生物材料中得到的样品。生物样品的实例包括组织样品和细胞学样品。

术语“特异结合分子”指与第二种分子特异结合的一种分子。“特异结合”意味着该特异结合分子与第二分子结合到基本上排除样品中存在的其它分子的程度（例如，特异结合分子的结合常数比对样品中其它分子的结合常数至少大 10^2 M^{-1} ，大 10^3 M^{-1} ，大 10^4 M^{-1} 或者 10^5 M ）。特异结合分子的实例包括核酸、受体、抗体、酶、凝集素和亲和素。特异结合分子能参与其中的特异结合相互作用的实例包括核酸序列双链体和三链体的形成，受体-配体相互作用（例如叶酸-叶酸受体相互作用）、抗体-抗原相互作用，酶-底物相互作用，凝集素-糖反应和亲和素-生物素相互作用（例如链霉亲和素-生物素相互作用）。

术语“靶物”指其存在、位置和/或浓度被测定或能被测定的任何分子。靶分子的实例包括蛋白质、核酸序列，以及半抗原，例如与核酸序列或蛋白质共价结合的半抗原。靶分子通常用一种或多种由特异结合分子和可检测的标记物构成的缀合物检测。

术语“硫醇活性基团”指能与硫醇基团反应并形成共价键的一个或多个原子。硫醇活性基团可以是分子的固有部分，或者是通过与一个或多个其它分子反应而被引入到该分子中。硫醇活性基团的实例包括不可聚合的 Michael 受体。卤乙酰基（例如溴乙酰和碘乙酰基团），烷基卤化物，马来酰亚胺，氮杂环丙烷，丙烯酰基团，乙烯基砜，苯醌，能进行亲核取代反应的芳族基团，例如氟苯基（例如四氟和五氟苯基），以及二硫基团，例如二吡啶基二硫基团和用 Ellman 试剂活化的硫醇。这些类型的各个基团的其它实例对于本领域技术人员将是显而易见的。在 Hermanson, “Bioconjugate Techniques”, Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8 中提供了关于用来将一类活性基团与另一类交换以便加入硫醇活性基团的反应条件和方法的进一步实例和信息，该文献被并入本文作为参考。在一项特定的实施方案中，一个杂双官能连接剂分子被连接在一个分子上以引入硫醇活性基团。例如，可以将具有

马来酰亚胺基团和 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 基团的连接剂通过该 NHS 基团连接在分子上的胺基上, 从而形成具有硫醇活性马来酰亚胺基团的分子, 它能与另一分子上的硫醇基团 (例如通过酰肼硫醇连接剂和所公开的方法引入的) 反应, 形成缀合物。

III. 概述

本领域普通技术人员会认识到, 所公开的方法能被用来连接具有能与酰肼硫醇连接剂反应的官能基的任何分子组合。下面的非限制性说明将集中描述抗体缀合物, 更具体地说, 抗体-酶缀合物, 但不应认为是对本发明的范围的限制。虽然具体公开的缀合物是抗体-酶缀合物, 但在其它生物分子 (例如核酸序列) 和其它可检测标记物 (例如半抗原、荧光标记物、荧光纳米粒子和荧光蛋白质, 例如绿色荧光蛋白) 之间的缀合物都被考虑并属于本发明的范围。

因此, 一方面, 公开了一种形成两种或多种分子的缀合物的方法。该方法包括酰肼硫醇连接剂与有酰肼活性基团 (例如醛) 的第一分子 (例如抗体) 反应, 形成硫醇化的第一分子。该反应在酰肼硫醇连接剂的硫醇基团基本上以其中性酸 (质子化的) 形式存在的条件下进行。该硫醇化的第一分子随后可以与有硫醇活性基团 (例如引入到第二分子中的马来酰亚胺基团) 的第二分子反应, 形成缀合物。在一项具体的实施方案中, 第一分子与连接剂的反应在 pH 从约 4 至约 7 的条件下进行。在其它的具体实施方案中, 酰肼硫醇连接剂可以是基于 PEG 的酰肼硫醇连接剂, 多官能的酰肼硫醇连接剂, 或基于 PEG 的多官能酰肼硫醇连接剂。

在另一实施方案中, 此方法可用于将特异结合分子连接到可检测标记物上。在更具体的实施方案中, 此方法可用于将有糖基化部分的第一分子连接到另一分子上。在此实施方案中, 糖基化部分先被氧化, 形成可以与酰肼硫醇连接剂反应的醛基。在一项更具体的实施方案中, 糖基化的第一分子可以是具有糖基化 Fc 区域的抗体。Fc 特异性硫醇化抗体是通过与酰肼硫醇连接剂反应来形成, 该 Fc-特异性硫醇化抗体可以与具有硫醇活性基团的可检测标记物反应。

在另一方面, 提供了各式各样的酰肼硫醇连接剂及其制备方法, 如后面的“合成概述”和具体的“实施例”中所述。再一方面是用所公开的连接剂制备的缀合物。在又一方面, 公开了一种试剂盒, 其中包含所公开的连接剂和关于进行所公开的制备缀合物的方法的说明。还公开了

使用所公开的缀合物检测样品中的靶物的方法。

IV. 合成概述

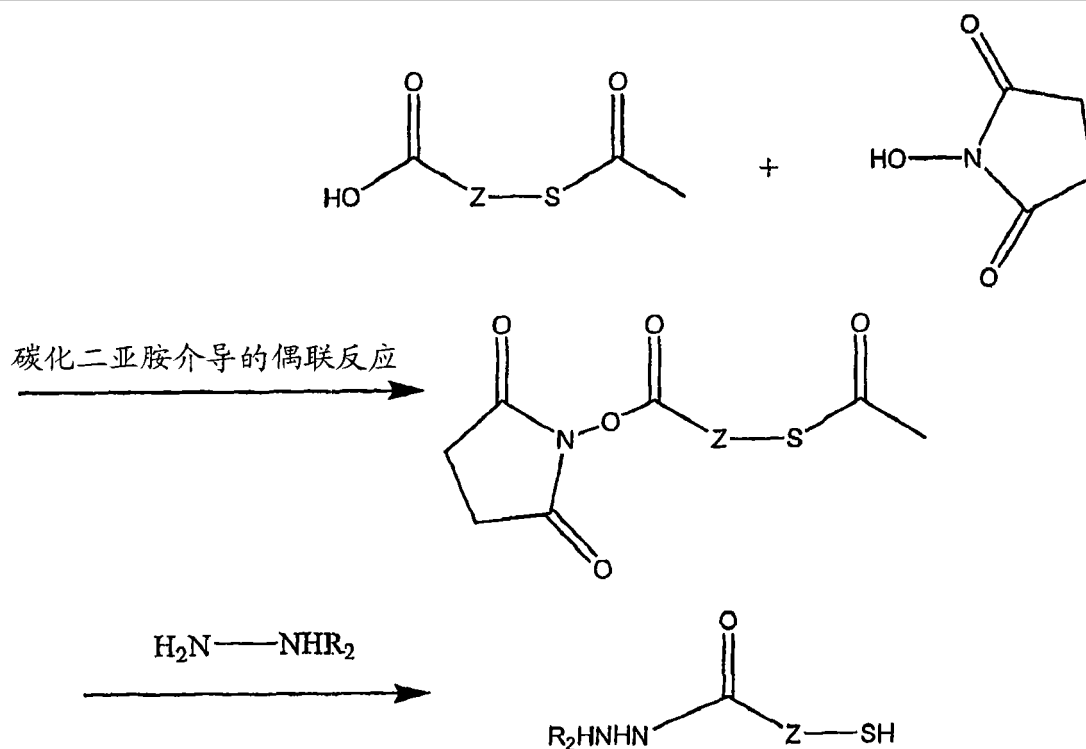
A. 酰肼硫醇连接剂的制备

虽然在所公开的制备缀合物的方法中可以使用任何酰肼硫醇连接剂，但在一项实施方案中，酰肼硫醇连接剂可以通过硫代内酯与酰肼、卡巴肼或二酰肼按照下面的方案 1 反应来形成，方案 1 中 $n=1, 2$ 或 3 ， R_1 是 H 、 $-CONHNH_2$ 或 $-CO-A-CONHNH_2$ ，其中 A 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，它可以被一个或多个杂原子间断（例如 O 、 N 或 S ），并可被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧基、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中， A 是一个由 1-10 个亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）和/或 1-24 个氧乙烯基（ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）组成的二价基团。在更为具体的实施方案中， A 是一个由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基组成的二价基团。



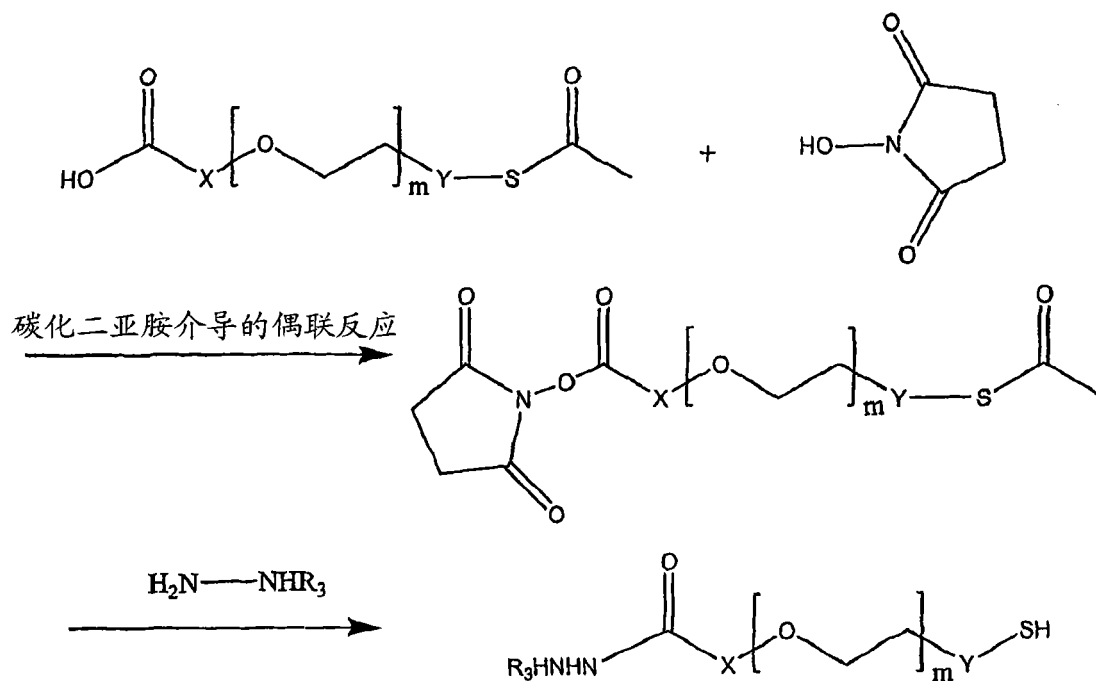
方案 1

可用于所公开的方法中的各式各样的酰肼硫醇连接剂还可以按照下面的方案 2 形成。在该方案中， Z 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，该二价基团可以被一个或多个杂原子（例如 O 、 N 或 S ）间断，并可被例如一个或多个羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧基、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中， Z 是一个由 0-10 个亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）和/或 1-24 个氧乙烯基（ $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）基团组成的二价基团。在更为具体的实施方案中， Z 是一个由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基组成的二价基团。 R_2 是 H ， $-CONHNH_2$ 或 $-CO-A-CONHNH_2$ ，其中 A 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，它可以被一个或多个杂原子（例如 O 、 N 或 S ）间断，并可以被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代。



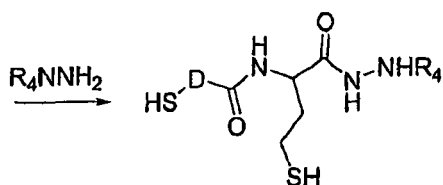
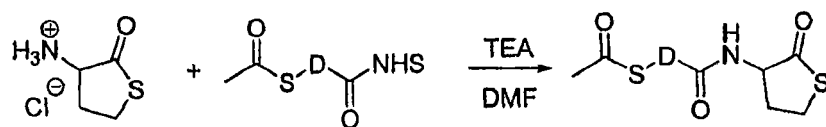
在一些实施方案中,可用于所公开的方法中的基于 PEG 的酰肼硫醇连接按照方案 3 制备和提供。在方案 3 中, $m=2$ 至 50; R_3 是 H, $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{CO}-\text{A}-\text{CONHNH}_2$, 其中 A 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团, 它可以被一个或多个杂原子 (例如 O、N 或 S) 间断, 并可以被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代; X 和 Y 独立地是一个键或是 1-20 个碳原子的二价基团。在更具体的实施方案中, A 是一个由 1-10 个亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 和/或 1-24 个氧乙烯 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$) 基团组成的二价基团。在更为具体的实施方案中, A 是由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基团组成的二价基团。X 和 Y 二价基团可以被一个或多个杂原子 (例如 O, N 或 S) 间断, 并可被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中, X 和 Y 独立地是一个键或是 $-(\text{CH}_2)_p-$, 其中 $p=1$ 至 3。在偶联反应中使用的碳化二亚胺可以是能按照方案提供所希望的偶联反应的任何碳化二亚胺。合适的碳化二亚胺的实例包括 DCC ($\text{N}_2\text{N}'$ -二环己基碳化二亚胺) 和 DIC ($\text{N}_2\text{N}'$ -二异丙基碳化二亚胺)。在下面讨论的一项工作实施方案中, 使用 DCC

实现偶联。

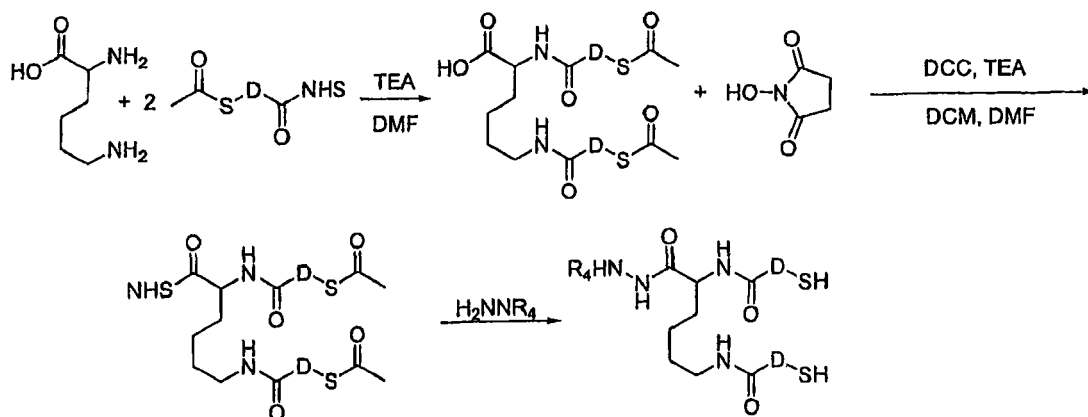


方案 3

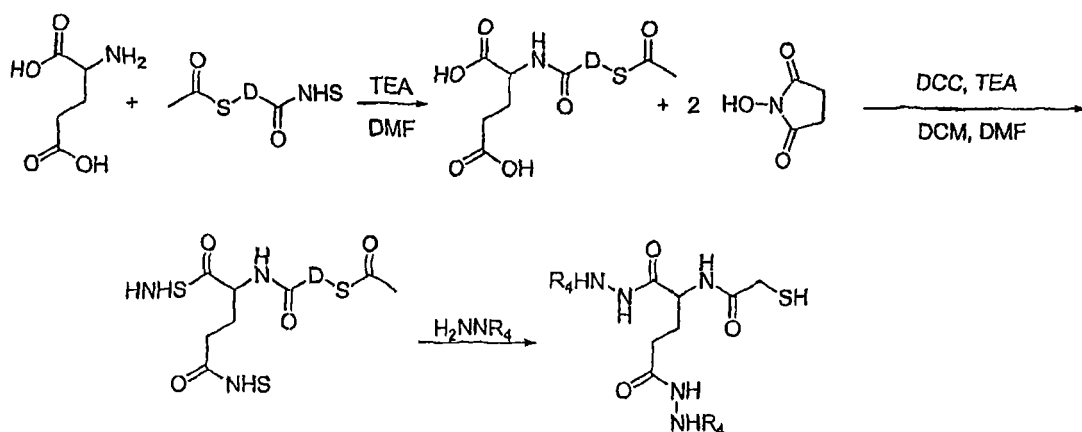
在其它实施方案中，提供了可用于所公开的方法中的多官能酰肼硫醇连接剂。下面的方案 4a、4b、4c 和 4d 说明了分别从高半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和高丝氨酸制备多官能连接剂的通用方法。在方案 4a、4b、4c 和 4d 中，D 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，它可以被一个或多个杂原子（例如 O、N 或 S）间断，并可以被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中，D 是一个由 1-10 个亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）和/或 1-24 个氧乙烯（ $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）基团组成的二价基团。在更为具体的实施方案中，D 是由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基团组成的二价基团。另外，在方案 4a、4b、4c 和 4d 中， R_4 是 H、 $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{CO}-\text{A}-\text{CONHNH}_2$ ，其中 A 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，它可以被一个或多个杂原子（例如 O、N 或 S）间断，并可以被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中，A 是一个由 1-10 个亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）和/或 1-24 个氧乙烯（ $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）基团组成的二价基团。在更为具体的实施方案中，A 是由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基团组成的二价基团。



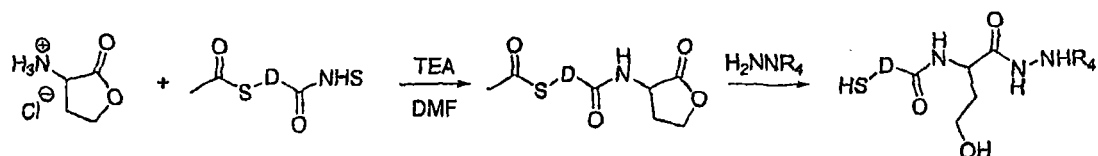
方案 4a



方案 4b

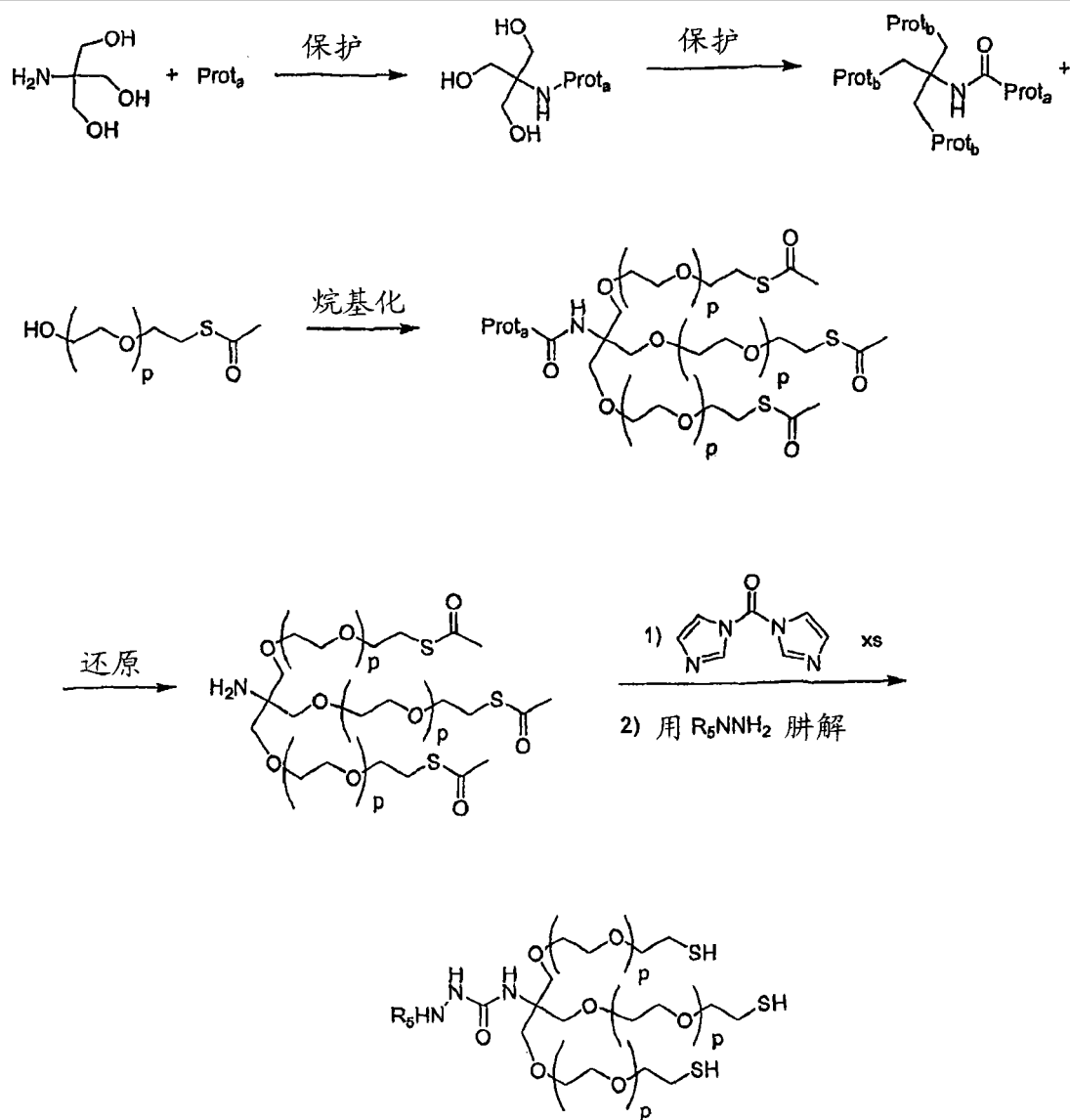


方案 4c

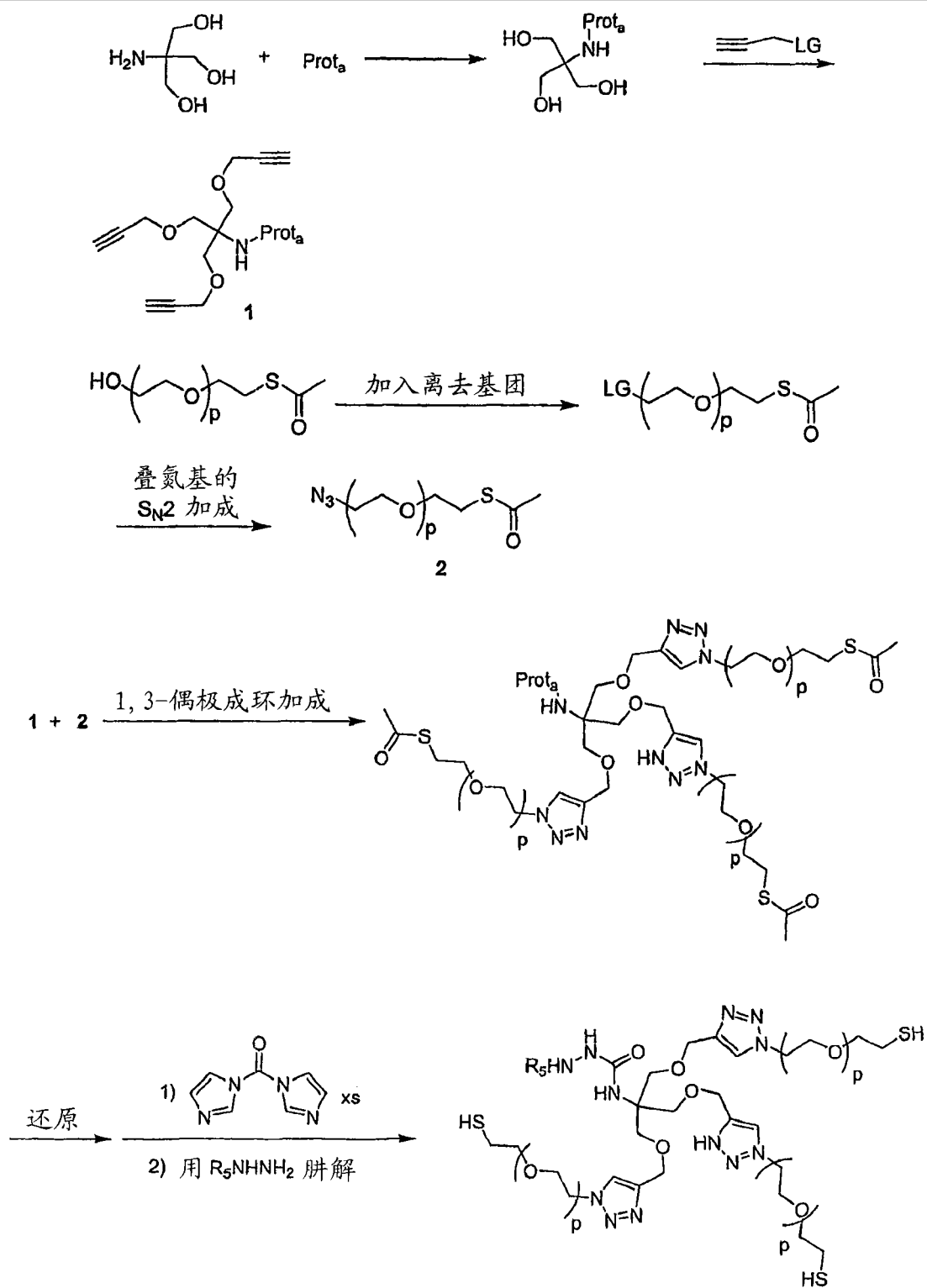


方案 4d

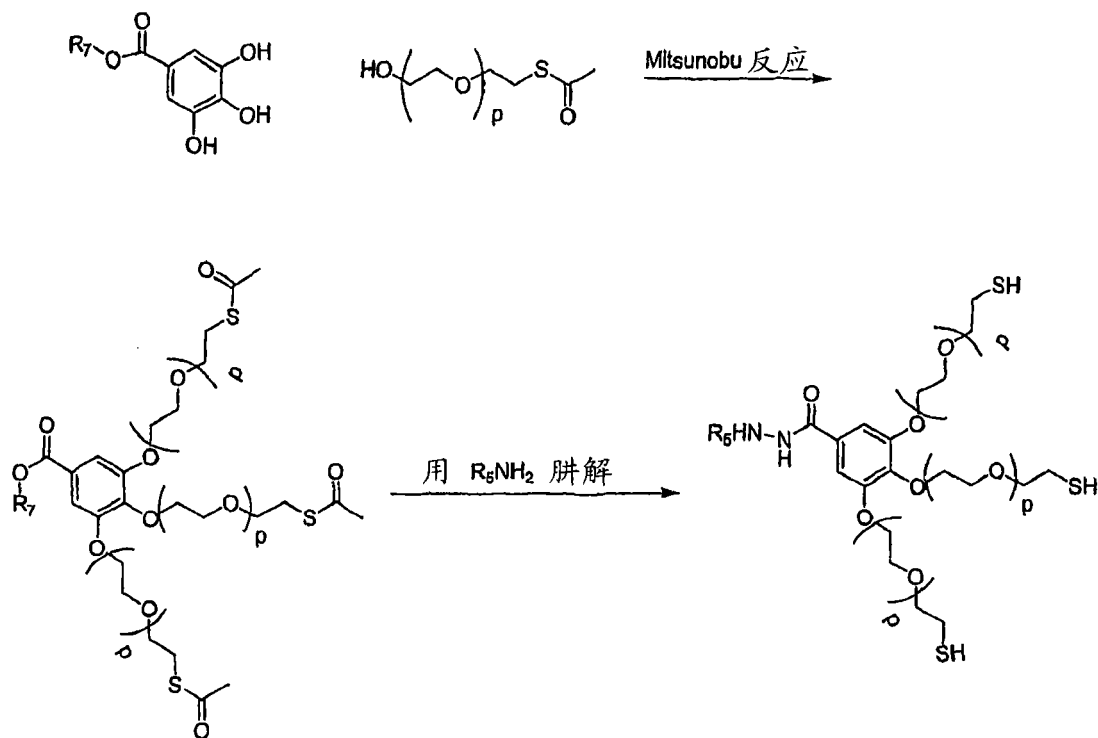
在其它具体实施方案中，提供了可用于所公开的方法的基于 PEG 的多官能酰肼硫醇连接剂。方案 5a、5b 和 5c 示例说明了能用来形成这些连接剂的通用合成方案。在这些方案中， $p=2$ 至 50， R_5 是 H、 $-\text{CONHNH}_2$ 或 $-\text{CO}-\text{A}-\text{CONHNH}_2$ ，其中 A 是一个有 1-100 个碳原子的二价基团，它可以被一个或多个杂原子（例如 O、N 或 S）间断，并可以被例如一个或多个烷基、羟基、烷氧基、酰基、羧基、卤素、磺酸基、氧、磷酸基和/或胺基取代。在更具体的实施方案中，A 是一个由 1-10 个亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）和/或 1-24 个氧乙烯（ $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）基团组成的二价基团。在更为具体的实施方案中，A 是由 1-6 个亚甲基或 4-12 个氧乙烯基团组成的二价基团。 R_7 可以是 H、烷基或一个保护基团。



方案 5a



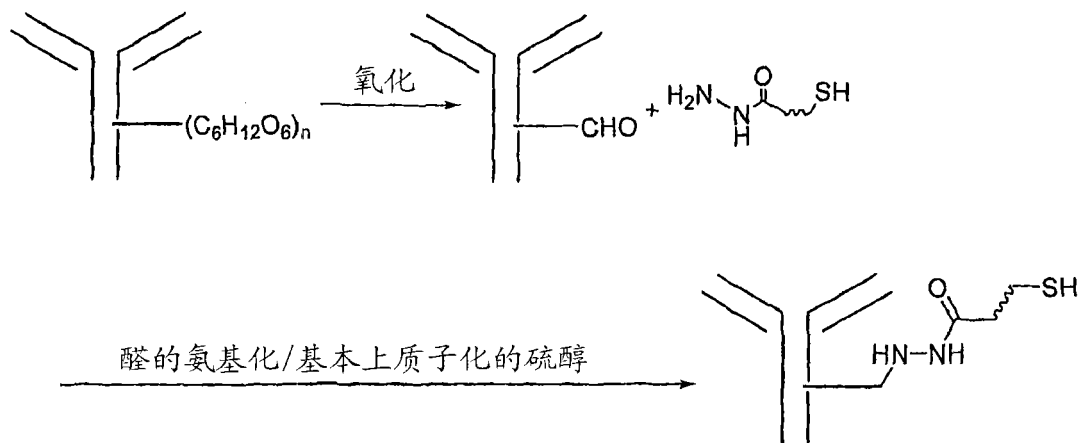
方案 5b



方案 5c

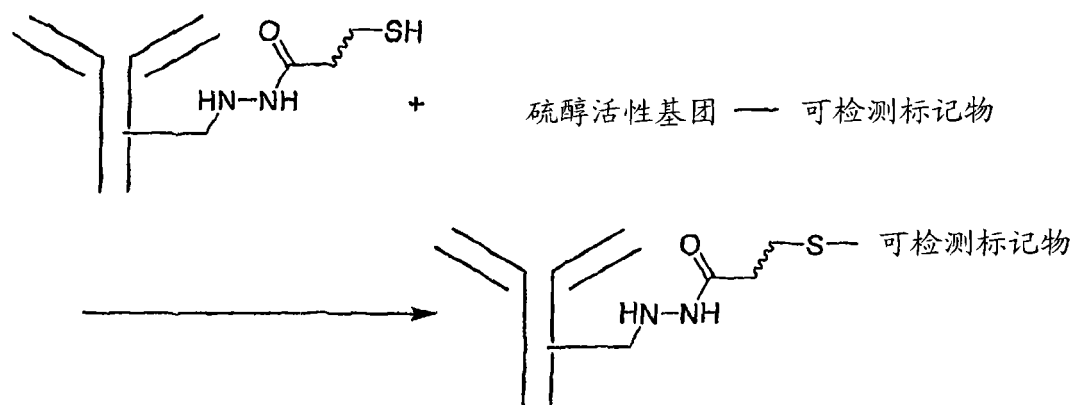
B. Fc-特异性抗体缀合物的制备

在一项实施方案中，含酰肼硫醇连接体的缀合物包括一种由抗体和可检测标记物构成的缀合物。在更具体的实施方案中，该缀合物包括一种由抗体和可检测标记物构成的 Fc 特异性缀合物。在更为具体的实施方案中，该缀合物包括抗体和酶（例如碱性磷酸酶）的 Fc-特异性缀合物。方案 6 示例说明了将酰肼硫醇连接剂以 Fc-特异性方式加到一种抗体上的方法。



方案 6

在方案 6 中，具有糖基化的 Fc 部分的抗体被位点特异性地氧化，在该糖基化的 Fc 部分的糖部分形成一个或多个醛基。该醛基随后与酰肼硫醇连接剂在该酰肼硫醇连接剂的硫醇基团基本上被质子化的条件下（基本上处于其中性酸形式）反应。在这样的条件下，连接剂的酰肼基团与抗体的 Fc 部分共价连接，留下硫醇基团基本上不反应（例如基本上不与抗体中的二硫键反应），从而保留下来用于后面与具有硫醇活性基团的第二分子，例如具有硫醇活性基团的可检测标记物，进行反应。此反应最好包括进一步与温和的还原剂反应（还原性氨基化的一个实例），形成更稳定的脎。硫醇化抗体与具有硫醇活性基团（例如马来酰亚胺基团）的可检测标记物的偶联反应示例说明在方案 7 中。

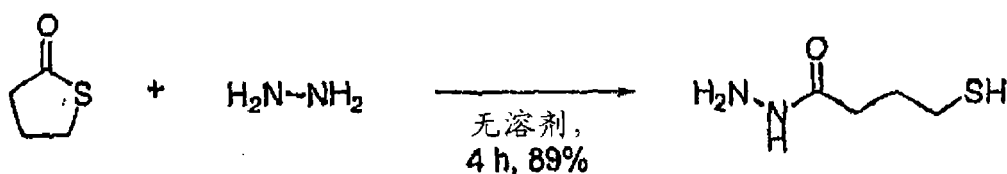


V. 实施例

提供以下的关于工作实施方案的非限制性实施例以便进一步说明本发明的某些方面。

实施例 1-巯基丁酰肼（MBH）的合成

在一项具体的工作实施方案中，按照方案 8 从 γ -硫代丁内酯制备酰肼硫醇连接剂。



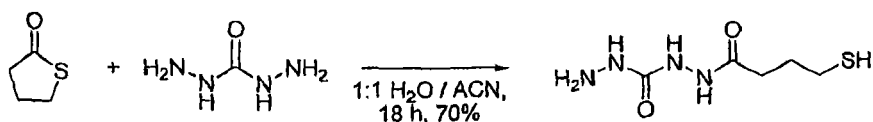
方案 8

具体地说，在搅拌下向一水合肼溶液（2.43 ml，50 mmol）中慢慢加入 γ -硫代丁内酯（0.43 ml，5 mmol）。4 小时后减压除去多余的肼。粗产物用快速色谱法（ SiO_2 ，1:19 MeOH/MeCN）纯化，得到无色油状的目标产物。产率：599 mg（89%）：

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (s, 1 H), 3.89 (s, 2 H), 2.56-2.47 (q, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 2.28-2.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 1.94-1.83 (p, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 1.35-1.29 (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (62.9 MHz, CDCl_3) δ 173.02, 32.38, 29.16, 23.94; ESI-HRMS m/z 135.05955 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$ 计算值 135.05921).

实施例 2-巯基丁酰卡巴肼（MBCH）的合成

在另一个具体的工作实施方案中，由 γ -硫代丁内酯按照方案 9 制备卡巴肼硫醇连接剂。



方案 9

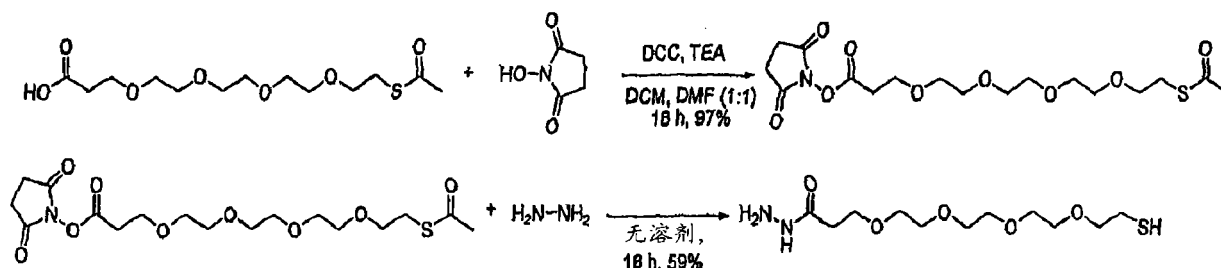
具体地说，将 γ -硫代丁内酯（0.43 ml，5 mmol）在乙腈（5 ml）中稀释，然后慢慢加到卡巴肼（2.25 g，25 mmol）在去离子水（5 ml）中的溶液中。将反应混合物在 40°C 搅拌 18 小时，然后减压浓缩。用过滤法得到含乙腈的粗产物，经快速层析法（ SiO_2 ，1:19 MeCN/MeOH）纯化，得到白色固体产物。产率：672 mg（70%）：

^1H NMR (250 MHz, D_2O) δ 2.62-2.56 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 2.47-2.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 1.98-1.87 (m, 2 H); ^{13}C NMR (62.9 MHz, D_2O) δ 179.14, 163.94, 34.86,

31.74, 25.91; ESI-HRMS m/z 215.05818 ($M + Na^+$, $C_5H_{12}N_4NaO_2S$ 计算值 215.25787).

实施例 3-巯基-dPEG₄-酰肼的合成

在另一项具体的工作实施方案中, 根据方案 10 制备基于 PEG 的酰肼硫醇连接剂, 得到巯基-dPEG 酰肼。



方案 10

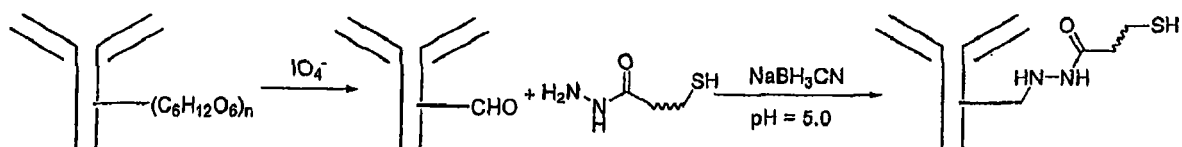
向无水肼 (10 ml) 中慢慢加入乙酰基-S-dPEG₄TM-NHS 酯 (Quanta Biodesign, Powell, OH; 580 mg, 1.38 mmol), 在环境温度下搅拌 18 小时。将反应混合物减压浓缩, 得到粗产物。快速层析法 (SiO_2 , 199:1 MeCN/AcOH) 得到无色油状产物。产率: 240 mg (59%) :

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (s, 1 H), 3.88 (s, 2 H), 3.68-3.52 (m, 17 H), 2.65-2.60 (t, $J = 6.3$ Hz, 2 H), 2.43-2.39 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H); ^{13}C NMR (62.9 MHz, $CDCl_3$) δ 171.94, 72.74, 70.52, 70.49, 70.38, 70.15, 70.09, 66.72, 35.17, 24.12; ESI-HRMS m/z 319.13073 ($M + Na^+$, $C_{11}H_{24}N_2NaO_5S$ 计算值 319.13036).

一种乙酰基-S-dPEG₈TM-NHS 酯也是可由 Quanta Biodesign (Powell, OH) 得到的商品。通常, 巯基-dPEG-酰肼具有化学式 $H_2N-NH-CO-(CH_2-CH_2-O)_t-CH_2-CH_2-SH$, 其中 $t=2-50$ 。

实施例 4-IgG 和碱性磷酸酶的缀合物的合成

一种 Fc-特异硫醇化的免疫球蛋白按照方案 11 制备。

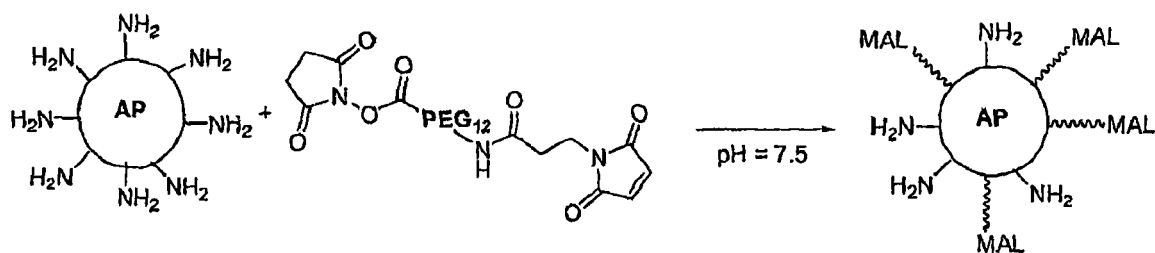


方案 11

具体地说，向多克隆抗体的溶液（1.5 ml，3.0 mg/ml）加入高碘酸钠（0.5 ml，10 mg/ml 去离子水溶液），使高碘酸盐最终浓度为 11.7 mM。将反应液转动 2 小时，然后流过一只 PD-10 脱盐柱（0.1 M NaOAc，1 mM EDTA，pH=5.0），除去多余的高碘酸盐。以相对于抗体 1000 倍摩尔过量加入酰肼硫醇连接剂（MBH，AMBH，MBCH 或巯基-dPEG₄-酰肼），随后加入氰基硼氢化钠（3.14 mg，50 μmol），将反应混合物转动 18 小时，然后浓缩至最终体积 1 ml。利用尺寸排阻层析（Superdex 200；0.1 M NaOAc，pH=5.0）得到纯化的硫醇化抗体。硫醇的数目用改良的 Ellman 法定量测定（例如参见，Hermanson，“Bioconjugate Techniques”，Academic Press，San Diego，1996，ISBN 0-12-342336-8，该文献并入本文作为参考）。这一方面在每个抗体上产生平均 3-5 个硫醇基团。

酰肼硫醇连接剂与引入到免疫球蛋白的 Fc 区域中的醛基的反应最好是在温和的酸性 pH，例如 pH 4-6，如 pH 接近 5 的条件下进行。不希望受理论的约束，很可能在这样的温和 pH 下醛基由于醛氧原子的质子化而被亲电子活化，同时，酰肼基团（pKa 约为 4）基本上不被质子化，保持高度的亲核性，因此促进了醛基和酰肼基团之间的反应。因为这样的温和 pH 条件还代表了硫醇基团的硫基本上被质子化（基本上以其中性酸形式存在），从而不能与免疫球蛋白的重链和轻链以二硫键连接的方式反应，所以反应很顺利，而且不大会破坏免疫球蛋白结构。另外，自由硫醇基团被保留下来用于进一步反应形成缀合物。

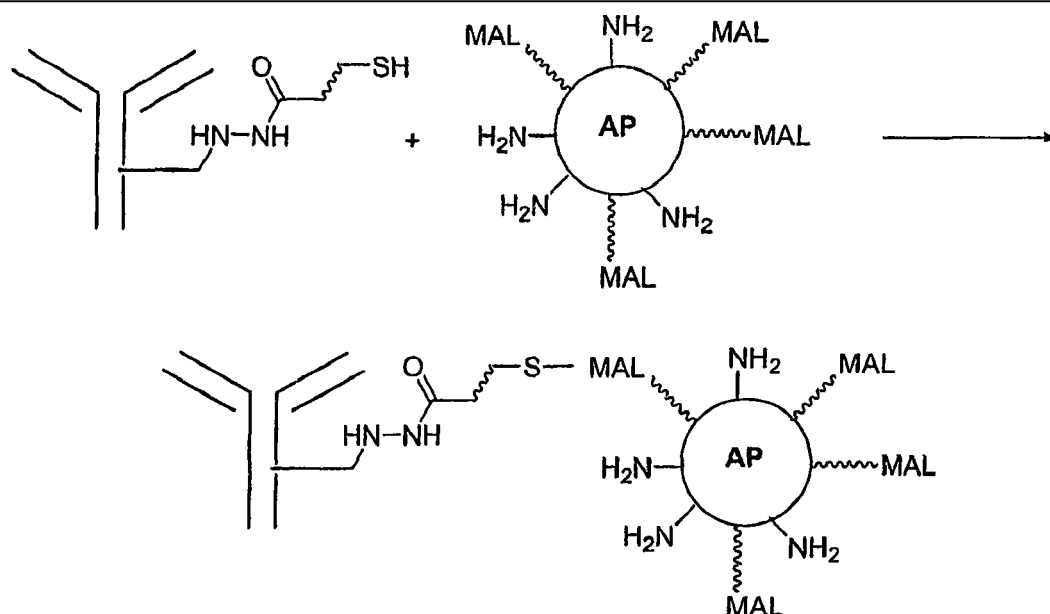
按照方案 12 将硫醇活性的马来酰亚胺基团引入到碱性磷酸酶上。



方案 12

具体地说，以含有 Tris 的活性缓冲液的形式收到的碱性磷酸酶（Biozyme, San Diego, CA）流过一只 PD-10 柱，以便将 AP 交换到非活性缓冲液（0.1 M 磷酸钠、0.1 M 氯化钠、1 mM 氯化镁，0.1 mM 氯化锌，pH=7.5）中。然后向碱性磷酸酶溶液（0.8 ml，17.5 mg/ml）中加入 100 倍过量的 NES-dPEG₁₂-MAL（Quanta Biodesign, Powell, OH），将反应混合物旋转 1 小时。尺寸排除层析（Superdex 200; 0.1 M Tris, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, pH=7.5）产生纯化过的马来酰亚胺碱性磷酸酶。马来酰亚胺的数目用改良的 Ellman 分析法（见，例如，Hermanson, “Bioconjugate Techniques”，Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8，该文献并入本申请作为参考）确定，平均每个碱性磷酸酶引入 17-25 个马来酰亚胺基团。

硫醇化的 Ab 和活性 AP 的最终缀合随后在 7 以上的 pH 下进行，这样的条件使得能够通过 Ab 上的硫醇（在较高的 pH 下会更大程度地在缀合物中以碱性硫醇化物形式存在）和引入到碱性磷酸酶中的硫醇活性马来酰亚胺基团反应，快速地形成缀合物。下面的方案 13 说明了硫醇化 Ab 和硫醇活性 AP 的最终缀合。



方案 13

具体地说，纯化的马来酰亚胺碱性磷酸酶与纯化的硫醇化抗体以 1:1 的摩尔比混合，旋转 18 小时。尺寸排斥层析法 (Superdex 200; 0.1 M Tris, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, pH=7.5) 得到纯化的缀合物，将其用 1:1 稀释的 StabilzymeTM AP 酶-稳定稀释剂 (Sur Modics, Eden Prairie, MN) 稀释至 A₂₈₀=0.0087，按后面的实施例中所述在组织上分析。所形成的缀合物在各式各样的组织上显示出从未有过的染色灵敏度，如后面的实施例中所示。

按照这一程序合成 Ab-AP 缀合物产生中值分子量约为 270 kDa 的 1:1 缀合物。不管用来制备缀合物的抗体如何 (例如山羊抗鼠 IgG, 山羊抗兔 IgG 和兔抗-DNP 抗体)，情形都是如此。缀合后得到的粗品层析谱显示出产物和起始物 (中值分子量 145 kDa) 的重叠，这在纯化过程中会加以考虑。

实施例 5-扁桃体组织中的κ链检测

在此实施例中，评价按照实施例 4 的步骤用 MBH 制备的 Ab-AP 缀合物在原位杂交 (ISH) 试验中的检测灵敏度。所使用的步骤改编自 BenchMark[®] 自动化载片染色仪 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 配备的标准 ISH 方案。该自动化染色方案如下：

将载片上的石蜡包埋的扁桃体组织在 75℃ 加热 4 分钟，用 EZPrepTM

体积调节剂 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 在 75℃ 下 4 分钟后, 冲洗载片, 与 Liquid Coverslip™ 一起加入 EZPrep™ 体积调节剂以便在 76℃ 将组织脱蜡 4 分钟。施加液体盖玻片以盖住 EZPrep。然后将载片在 90℃ 加热 4 分钟, 冲洗, 然后冷却至 37℃。加入 ISH-蛋白酶 1 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 温育 2 分钟, 冲洗, 随后加入荧光素标记的 κ 核酸探针 (100 µl, INFORM® Kappa, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。温育 4 小时后, 将载片在 85℃ 加热 12 分钟, 然后冷却至 47℃, 再温育 64 分钟。将载片冲洗 4 次, 然后加入鼠抗荧光素第一抗体 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 将其温育 20 分钟后冲洗 2 次。这时或是自动加入第二抗体 (用于进一步扩增), 或是人工加入或者从分配器中自动加入 Ab-AP 缀合物。对于被扩增的载片, 加入免抗鼠抗体 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 温育 8 分钟, 然后将载片冲洗 2 次。在每种情形, 一旦将 AP-Ab 缀合物 (山羊抗鼠或兔抗鼠 IgG 缀合物, 例如分别有或没有第二抗体; 100 µl) 施加到载片上, 立即将载片温育 16 分钟并冲洗 2 次。施加 iView™ Blue Enhance 增强剂 (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 随后温育 4 分钟, 施加 iView™ Blue NBT (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 和 iView™ Blue BCIP (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。BCIP 是碱性磷酸酶的底物, 它产生不溶的深蓝/紫色沉淀, NBT 则增强 BCIP 的颜色。然后将载片温热 32 分钟, 冲洗 2 次, 加入对染剂 NFR (100 µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。在用对染剂温育 6 分钟后, 再次冲洗载片, 从仪器上取下。将载片用洗涤剂洗, 然后用乙醇、丙酮和二甲苯系列脱水。在载片上加上盖玻片, 用显微镜观看载片并拍照。还用类似方式制备一个不用 κ 探针处理的负对照载片。

为了比较, 一个参考的扁桃体组织样品用类似的步骤染色, 对于 κ 探针的检测使用 SA-AP 缀合物 (该步骤包括加入与上相同的第二抗体, 随后是附加的扩增步骤, 其中自动加入生物素化的抗-IgG 抗体代替了施加 Ab-AP 缀合物, 然后加入 SA-AP 缀合物)。生物素标记的抗体和 SA-AP 缀合物的使用是自动化 ISH 染色法中用于检测的工业标准, 在确定 Ab-AP 缀合物的相对性能方面起参照作用。还按照使用 SA-AP 检测的类似方式制备了一个未用 κ 探针处理的负对照载片。向该载片上加盖片,

通过明场显微镜以 40 倍放大观察该载片并拍照。

图 1 是一组显微照片，它们比较了使用抗体-碱性磷酸酶缀合物和 SA-AP 缀合物对于扁桃体组织内的 κ ISH 检测观察到的所要的染色和背景染色。在图 1A 中显示了使用所公开的抗体缀合物，但未经第二抗体提供的扩增得到的 κ 染色。图 1B 表示用该缀合物处理的负对照载片。图 1C 表示使用 SA-AP 的 κ 的染色，图 1D 则表示同一样品的负对照。图 1A 和 1C 的比较显示出使用抗体缀合物（即使采用较少的扩增步骤）得到更清楚的染色，图 1B 和 1D 的比较证实，抗体缀合物形成的背景较弱。这些结果说明了由于抗体缀合物而变得可行的非生物素检测方案的优越性。

实施例 6-扁桃体组织内 λ 链的检测

使用实施例 5 中描述的自动化染色法（不同之处是，使用的荧光素标记的核酸探针是对于 λ 链特异的；INFORM[®] Lambda, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ；并且 ISH 蛋白酶温育 4 小时），测定用来检测扁桃体组织中的 λ 的 Ab-AP 缀合物的性能。该 Ab-AP 缀合物使用时没有第二抗体扩增步骤，并如实施例 4 中所述用 MBH 制备。为了比较，使用实施例 4 中所述的 SA-AP 缀合物检测方案制备一个参照载片。

结果示于表 2 中。具体地说，图 2A 和 2B 分别表示用加或不加（负对照） λ 特异性核酸探针的 Ab-AP 缀合物得到的染色图案。图 2C 和 2D 分别表示用加或不加（负对照） λ 探针的 SA-AP 缀合物得到的染色图案。图 2A 和 2C 的比较表明，用 Ab-AP 缀合物得到的染色图案至少像用 SA-AP 缀合物看到的那样强，尽管对于 Ab-AP 所用的方法少了一个扩增步骤。图 2B 和 2D 的比较表明，使用 Ab-AP 缀合物时背景染色弱得多（由组织的整体染色更深证明）。同样，这些结果证实使用所公开的 Ab-AP 缀合物时看到的背景有利地减弱。

实施例 7-肺组织中 CMV 的检测

使用实施例 5 中所述的自动染色法（不同之处在于使用的荧光素标记的核酸探针是对 CMV 特异性的；INFORM[®] CMV, Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ；并且 ISH 蛋白酶 I 被温育 4 分钟），测定 Ab-AP 缀合物对于肺组织中 CMV 检测的性能。使用该 Ab-AP 缀合物时没有第

二抗体扩增步骤，并且如实施例 4 中所述，用 MBH 制备。为了比较，使用实施例 4 中所述的 SA-AP 缀合物检测方案制备一个参照的载片。

结果示于图 3 中。具体地说，图 3A 表示用 Ab-AP 缀合物在该探针存在下得到的染色图案，图 3B 表示在无探针存在下用 Ab-AP 缀合物得到的染色图案，图 3C 表示在探针存在下用 SA-AP 缀合物得到的染色图案，图 3D 表示在无探针存在下用 SA-AP 缀合物得到的染色图案。图 3A 和 3C 的比较表明，用 Ab-AP 缀合物染色比用 SA-AP 缀合物得到的染色更清楚，并且强度至少相同（尽管少一个扩增步骤）。另外，对于 Ab-AP 染色体，背景染色较浅。由图 3B 和 3D 的比较也显然可见用 Ab-AP 缀合物形成的背景减弱。

实施例 8-脾组织中 EBER 的检测

使用实施例 5 中所述的自动染色法（不同之处在于，所用的荧光标记核酸探针是对 EBER 特异的；INFORM[®] EBER, Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ；并且 ISH 蛋白酶 1 被温育 4 分钟）测定 Ab-AP 缀合物时，没有第二抗体扩增步骤，并且是如实施例 4 中所述用 MBH 制备。为了比较，利用实施例 4 中所述的 SA-AP 缀合物检测方案制备一个参照载片。

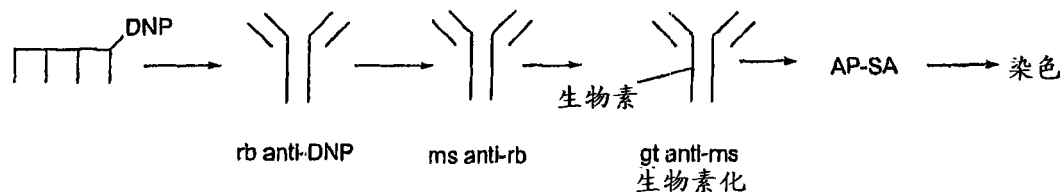
结果示于图 4。具体地说，图 4A 表示在探针存在下使用 Ab-AP 缀合物得到的染色图案，图 4B 表示在没有探针的情况下使用 Ab-AP 缀合物得到的染色图案，图 4C 表示在探针存在下用 SA-AP 缀合物得到的染色图案，图 4D 表示在没有探针的情况下用 SA-AP 缀合物得到的染色图案。图 4A 和 4C 的比较表明，用 Ab-AP 缀合物染色比用 SA-AP 缀合物得到的染色更清楚，并且强度至少相同（尽管少一个扩增步骤）。另外，对于 Ab-AP 缀合物，背景染色较弱。比较图 3B 和 3D 也显然可见，Ab-AP 缀合物形成的背景减弱。

实施例 9-组织异种移植物中 HPV 的检测

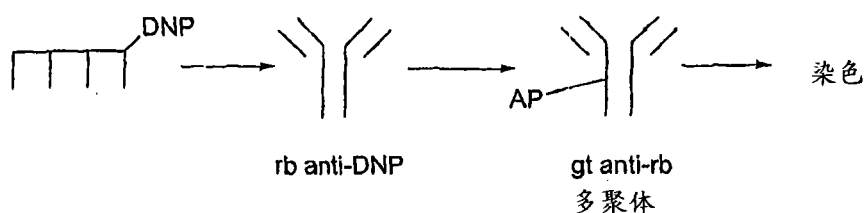
在此实施例中，部分评价了根据实施例 4 的步骤用 MBH 制备的 Ab-AP 缀合物的性能，以确定它是否具有足够的灵敏度，以便能进一步减少用 ISH 检测 HPV 序列所需的步骤数目。结果表明，可以实现检测所需步骤数目的减少，从而使得所公开的 Ab-AP 缀合物很适用于通过减

少步骤数目显著减少操作时间并同时降低试验成本的一种自动方法。

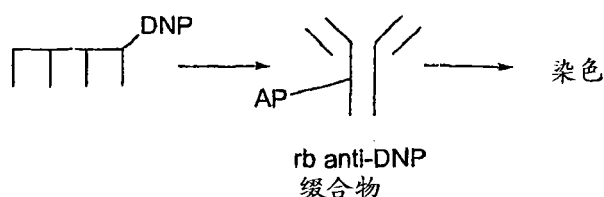
下面作为方案 14-16 列出的三种检测方案是以自动化或半自动化方式进行。在每种方案中，先向样品中加入与至少一部分 HPV 核酸序列特异结合的一种 DNP 标记的核酸探针。这些方案中叙述的后继步骤是用来检测与 HPV 核酸结合的探针的存在的步骤。



方案 14



方案 15



方案 16

在方案 14 中，一种抗 DNP 抗体先与探针结合。然后加入抗-IgG 抗体（第一扩增步骤）。在第二扩增步骤中，加入一种生物素化的抗-IgG 抗体。加入 SA-AP 缀合物，它与该生物素化抗体结合，通过加入一种与 AP 起作用的生色底物完成染色。在方案 15 中，去掉了第二扩增步骤，在染色之前加入一种与 AP 缀合的抗-IgG 抗体，而不是 SA-AP 缀合物。在方案 16 中，两个扩增步骤均被去掉，DNP 标记的探针直接用与 AP

缀合的抗-DNP 抗体检测。

按照改编自 BenchMark[®]自动染色仪 (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) 的标准 ISH 方案的以下程序, 对于在 SCID 小鼠中异种移植植物内生长的多种细胞系进行 HPV 检测。将载片上的石蜡包埋的组织在 75℃ 加热 4 分钟, 用 EZP_{rep}TM 体积调节剂 (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) 在 75℃ 处理 2 次, 然后施加含 EZP_{rep}TM 体积调节剂的 Liquid CoverslipTM (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ)。在 75℃ 下 4 分钟后, 冲洗载片, 加入 EZP_{rep}TM 体积调节剂, 在 76℃ 将组织脱蜡 4 分钟。施用 Liquid Coverslip 将 EZP_{rep}TM 盖住。加入细胞调节溶液 Cell Conditioner #2 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 将载片温热至 90℃ 并温育 8 分钟。随后再施加 Cell Conditioner #2, 在 90℃ 温育 12 分钟。用反应缓冲液 (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) 冲洗载片, 冷却至 37℃, 加入 ISH-蛋白酶 3 (100μl, Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ)。温育 4 分钟后, 将载片冲洗 3 次, 然后加入杂交缓冲液 (iViewTM Plus HybReadyTM 溶液, 100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ), 温育 4 分钟。加入 DNP 标记的 HPV 核酸探针 (HPV HR probe, 200μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ), 随后在 37℃ 温育 4 分钟, 95℃ 温育 12 分钟, 52℃ 下 124 分钟。然后将载片冲洗 2 次, 温热至 72℃。最后这一步骤再重复 2 次, 然后将载片冷却至 37℃, 根据所遵循的检测方案, 将载片按 3 种方式之一以自动或半自动方式处理。

在一种情形, 如方案 14 中所示, 施加 iViewTM + 抗-DNP (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ) 第一抗体, 温育 20 分钟。然后将载片冲洗 2 次, 接着加入 iViewTM + Amp (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ) 第二抗体。温育该缀合物 8 分钟, 然后冲洗载片。加入 iViewTM + Biotin-Ig (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ), 随后温育 12 分钟, 加入 iViewTM + SA-AP (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。将载片冲洗 3 次, 然后施加 iViewTM + 增强剂 (100μl, VMSI), 接着温育 4 分钟, 加入 iViewTM + 增强剂 (100μl, VMSI), 接着温育 4 分钟, 加入 iViewTM + NBT (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ) 和 iViewTM + BCIP (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。将载片温育 24 分钟, 冲洗 3 次, 加入对染

剂 NFR (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。在用对染剂温育 4 分钟后, 将载片再冲洗 3 次, 从仪器中取出。将载片用洗涤剂洗, 然后用乙醇、丙酮和二甲苯系列脱水。在载片上加上盖片, 然后通过明场显微镜观看载片和拍照。

在另一情形, 如方案 15 中所述, 加入免抗 DNP 第一抗体 (iView™ + 抗 DNP 第一抗体, 100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。将该第一抗体温育 20 分, 然后冲洗载片 2 次, 接着手工加入 (此步骤也可以自动化以使程序全部自动化) 与碱性磷酸酶缀合的抗免 IgG 抗体 (100µl)。将该缀合物温育 16 分, 然后冲洗载片 4 次。施加 iView™ + 增强剂 (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ), 温育 4 分钟, 加入 NBT 和 BCIP 以便显色 (iView™ + NBT 和 iView™ + BCIT, 100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。将载片温育 24 分钟, 冲洗 3 次, 加入对染剂 NFR (100µl, Ventana Medical System, Inc., Tucson AZ)。在用对染剂温育 4 分钟后, 将载片冲洗 3 次, 从仪器中取出。用洗涤剂处理载片, 然后用乙醇、丙酮和二甲苯脱水。加上盖片后, 使用明场显微镜在 40 倍放大下观看载片并拍照。

在又一情形, 如方案 16 中所述, 载片直接用碱性磷酸酶免抗 DNP 缀合物 (100µl) 处理。将载片温育 20 分钟, 冲洗 2 次, 然后施加 iView™ + 增强剂 (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。随后温育 4 分钟, 同时加入 iView™ + NBT (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ) 和 iView™ + BCIP (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。然后将载片温育 24 分钟, 冲洗 3 次, 加入对染剂 NFR (100µl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。在用对染剂温育 4 分钟后, 将载片再冲洗 3 次, 自仪器中取出。用洗涤剂处理载片, 然后用乙醇、丙酮和二甲苯系列脱水, 加上盖片, 用明场显微镜在 40 倍放大下观看载片并拍照。

图 5-7 显示了在三种不同类型异种移植物组织内的 HPV 检测结果。在图 5A、5B 和 5C 中, 分别显示了按照方案 14、15 和 16 检测 CaSKi 异种移植物组织中 HPV 的染色图案。在图 6A、6B 和 6C 中, 分别显示了按照方案 14、15 和 16 检测 HeLa 异种移植物组织中 HPV 的染色图案。在图 7A 和 7B 中, 分别显示了按照方案 14 和 15 检测 SiHa 异种移植物组织中单拷贝 HPV (箭头指示) 的染色图案。

图 5A 和 5B 的比较表明, 按照方案 15 检测得到的染色强度比按照方案 14 的大, 即使方案 15 少 2 个扩增步骤。图 5C 表明, HPV 检测可以利用按照实施例 4 制备的 Ab-AP 缀合物不经扩增而直接完成(方案 16)。图 6A 和 6B 的比较也证实, 按照方案 15 检测得到的染色强度大于按照方案 14 得到的, 虽然方案 15 包含的扩增步骤少 2 个。图 6C 表明, HPV 的检测可以利用按照实施例 4 制备的 Ab-AP 缀合物不经扩增而直接完成(方案 16)。图 7A 和 7B 的比较表明, 即使单拷贝的 HPV 核酸序列也可以用方案 15 的检测方法检测。总之, 这些结果证实, 所公开的 Fc 特异性 Ab-AP 缀合物显示的优越的灵敏度, 通过减少了为检测组织样品中 HPV 所需的步骤数目, 便利了自动化检测。方案 14 和 15 之间步骤数目的减少, 可以将总的自动化染色操作时间减少 15%(从 6.5 小时至 5.5 小时)。通过使用方案 16 可以实现操作时间的进一步减少。

虽然在此实施例中描述的是一种 DNP 标记探针和特殊类型的抗体, 但本领域普通技术人员会理解到, 可以使用很多其它的半抗原(例如荧光素、洋地黄毒苷和生物素)来标记核酸序列, 并且可以使用针对不对靶物、各具不同的半抗原标记物的多个核酸探针以实现多重检测(例如使用与发射各种不同波长光的不同荧光纳米粒子缀合的不同的检测抗体)。另外, 本领域普通技术人员会认识到, 在类似的测定中可以使用与所述抗体不同类型和来自不同物种的其它抗体、其它的可检测标记物和用来产生可检测信号的其它试剂, 来检测其它的靶物。

实施例 10-液体基制剂中的 HPV 的检测

供液体基制剂 HPV 测定用的载片使用 ThinPrep[®] 2000 System 载片制备系统(Cytoc Corporation, Marlborough, MA)制备。将通过阴道刮擦得到的细胞置于甲醇基的缓冲保存液(ThinPrep[®] Preserv Cyt Solution, Cytoc Corporation, Marlborough, MA)中, 然后用仪器铺放在玻璃载片上。

以下是改编自 Ventana BenchMarx[®] 仪器的步骤: 将液体基制剂载片在 65℃加热 12 分钟, 然后在 75℃再加热 4 分钟, 用反应缓冲液(Ventana Medical Systems, Inc., Tuscon, AZ; 1.2ml)在 75℃冲洗 2 次, 然后施加液体盖片(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)。将载片用 0.9ml 冲洗缓冲液(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)冲洗, 随后施加细胞调节液 Cell Conditioner #2(Ventana Medical Systems,

Inc., Tucson, AZ), 将载片温热至 90℃, 温育 16 分钟。将载片用反应缓冲液冲洗, 冷却至 37℃, 加入 ISH-蛋白酶 3 (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。温育 4 分钟后, 冲洗载片 3 次, 然后施加 iView™+HybReady(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 温育 4 分钟。加入 HPV HR 探针 (200μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 在 37℃温育 4 分钟, 95℃ 12 分钟, 52℃ 124 分钟。然后冲洗载片 2 次, 温热至 72℃。最后这一步再重复二次, 然后将载片冷却至 37℃, 加入 iView™+Anti-DNP(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。

对于标准的 SA-AP 检测 (按照以上方案 14), 将第一抗体温育 20 分钟, 将载片冲洗 2 次, 然后加入 iView™+Amp 第二抗体 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, 100μl), 将抗体温育 8 分钟后, 冲洗, 加入 iView™+生物素-IgG 抗体缀合物 (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, 100μl), 随后温育 12 分钟, 冲洗。最后, 加入 iView™+SA-AP 缀合物 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, 100μl), 温育 8 分钟后, 用反应缓冲液冲洗载片 3 次。对于用 Ab-AP 缀合物作为第二抗体检测 (按照以上方案 15), 将第一抗体温育 20 分钟, 冲洗载片 2 次, 然后加入 AP-IgG 缀合物 (100μl)。将其温育 8 分钟, 然后用反应缓冲液冲洗 3 次。对于用 Ab-AP 缀合物直接检测标记的探针, 将缀合物温育 20 分钟, 然后用反应缓冲液冲洗载片 3 次。

在所有三种情形中, 在以上步骤后均加入 iView+增强剂 (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), 随后温热 4 分钟, 加入 iView™+NBT (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 和 iView+BCIP (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。然后将载片温能 24 分钟, 冲洗 3 次, 加入对染剂 NFR (100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。用对染剂温育 4 分钟后, 再冲洗载片 3 次, 自仪器中取出。将载片用洗涤剂处理, 然后用乙醇、丙酮和二甲苯脱水, 随后向载片上加盖片, 用显微镜观察。

图 8A 和 8B 的比较表明, 按照方案 15 (见实施例 9) 使用按实施例 4 的步骤用 MBH 制备的 Ab-AP 缀合物, 得到的染色比按照方案 14 (见实施例 9) 用 SA-AP 检测得到的染色强度大。图 8B 和 8C 的比较证实, 按照方案 16 (见实施例 9) 使用抗 DNP Ab-AP 缀合物直接检测, 得到

的信号与按照方案 14 用 SA-AP 缀合物得到的信号相近。这些结果再次证实,由按照实施例 4 的 Fc 特异的 Ab-AP 缀合物所提供的检测灵敏度,能减少为提供适当的信号所需的步骤数,从而便利了自动化。

实施例 11-肌组织中肌动蛋白的检测

在此实施例中,使用按实施例 4 中所述用 MBH 连接剂制备的 Ab-AP 缀合物对蛋白质靶物(肌动蛋白)进行免疫组织化学检测,并与 SA-AP 缀合物的性能比较。

以下是改编自 Ventana BenchMark[®] 仪器的程序:将石蜡涂覆的组织载片在 75℃ 加热 4 分钟,用 EZP_{rep}TM 体积调节剂(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)在 75℃ 处理 2 次,然后施加含 EZP_{rep}TM 体积调节剂的液体盖片(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)。在 76℃ 下 4 分钟后,冲洗载片,与液体盖片一起加入 Depar 体积调节剂(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ),将组织脱蜡。然后将载片冷却至 42℃ 2 分钟,再达到最终温度 37℃。加入第一抗体(100μl,抗肌动蛋白, Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ),将载片在 37℃ 温育 16 分钟。随后冲洗载片 2 次,加入碱性磷酸酶缀合的山羊抗鼠材料(100μl),在 37℃ 温育 16 分钟。将载片冲洗 1 次,然后同时加入增强的 V-Red 增强剂(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)和 Enhance Naphthol(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ),将载片在 37℃ 再温育 4 分钟,接着加入 Enhance Fast Red A(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ),温育 8 分钟,加入入 Enhance Fast Red B(100μl, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ),最后温育 8 分钟。显色后,将载片用洗涤剂处理,然后用乙醇、丙酮和二甲苯脱水,随即在载片上加盖片,然后用显微镜观看载片。

结果示于图 9。具体地说,图 9A 表明,用 Ab-AP 缀合物和单独一个扩增步骤检测,优于用 SA-AP 缀合物和两个扩增步骤检测(图 9B)。这些结果再次证实了根据本发明的 Fc-特异性抗体所提供的优越的检测灵敏度。

实施例 12-抗体连接剂长度和类型的变化

在此实施例中,测定了连接剂长度和类型对缀合物成分和染色特性

的影响。按照实施例 4 的方法,但是使用各种不同的酰肼硫醇连接剂,制备了几种缀合物,特别是,用硫代-PEG₄-酰肼连接剂、巯基丁酰肼(MBH)连接剂和巯基丁酰卡巴肼(MBCH)连接剂制备的缀合物。将这些缀合物彼此比较,并与通过免疫球蛋白二硫化物的还原产生硫醇制备的缀合物,特别是用共同未决的美国临时专利申请 NO. 60/675759 中所述方法制备的 Ab-AP 缀合物进行比较,上述申请涉及 DTT 还原产生硫醇,然后用基于 PEG 的马来酰亚胺-NHS 双功能连接剂进行缀合。为了比较,还将一种市售的乙酰氨基巯基丁酰肼(AMBH, Invitrogen, Eugene, OR)连接剂用于实施例 4 的方法中,以生成 Ab-AP 缀合物。此外,还制备了一种按照制造商的说明用马来酰亚胺基酰肼(EMCH; N[ε-马来酰亚胺基己酸]酰肼, Pierce Biotechnology, Rockford, IL)制备的 Ab-AP 缀合物,并在染色方案中使用以供比较。另外,还使用在美国专利 No. 5,191,066 中所述的使用肼胺的 Fc-特异性缀合方法,以得到 Fc-特异性 Ab-AP 缀合物用于比较。

Ellman 测定结果表明,通过与 MBH 和基于 PEG 的酰肼硫醇连接剂加成,每个免疫球蛋白分子上加上 3-5 个硫醇/Ab,对于 AMBH 和 MBCH 连接剂为 5-7 硫醇/Ab,对于 DTT 还原方法为 8-12 个硫醇/Ab。在将免疫球蛋白中引入或产生的硫醇与马来酰亚胺衍生的 AP 偶联后,得到尺寸排阻层析图。

尺寸排阻层析图是用 AKTA Purifier LC(GE Biosciences, Uppsala, Sweden)得到的,使用 Superdex 10/300 200GL 柱和 0.1M Tris, 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, pH=7.5 作为流动相。在所述情形流速均保持在 1ml/min。由尺寸排阻层析图确定,缀合物的最佳产率是用 AMBH 得到的。然而,当在 2-8℃下贮存 48 小时时它开始从溶液中沉淀出来。其它的连接剂都产生具有类似的尺寸排阻图型的缀合物。

图 10 比较了实施例 6 中所述的使用缀合物作为第二抗体的扁桃体组织上κ链的染色。图 10A 表示对于用 EMCH 制备的 Ab-AP 缀合物所看到的染色图案。图 10B 表示对于美国专利 5,191,066 的 Fc-特异性肼氨酸法所看到的染色图案。图 10C 表示对于按照 2006 年 4 月 27 日提交的美国专利申请 No.11/413,418 的 DTT 还原法,使用 dPEG 基双功能连接剂制备的 Ab-AP 缀合物看到染色图案。图 10D 表示对于用市售的 AMBH 连接剂,使用所公开的 Fc 特异性缀合法制备的 Ab-AP 缀合物看到的染

色图案。图 10E 表示对于根据所公开的 Fc-特异性缀合法，利用实施例 1 中公开的 MBH 连接剂制备的 Ab-AP 缀合物所看到的染色图案。图 10F 表示对于根据所公开的 Fc 特异性缀合法，用实施例 3 中公开的 dPGE₄ 酰肼连接剂制备的 Ab-AP 缀合物看到的染色图案。图 10G 表示对于按照所公开的 Fc-特异性缀合法，使用实施例 2 中公开的 MBCH 酰肼硫醇连接剂制备的 Ab-AP 缀合物看到的染色图案。将这些染色图案相比较，揭示了由缀合物产生的染色强度的以下趋势：

EMCH<胱氨酸<AMBH<MBCH<PEG₄=DTT<MBH。

这些图像表明了利用本发明公开的方法和各种所公开的以及市售的酰肼硫醇连接剂，通过 Fc 特异性缀合能够获得的优越的灵敏度。所公开的方法还产生比胱氨酸 Fc-特异性方法和用 EMCH 偶联的方法更优越的缀合物。只有 DTT 介导的缀合法得到的缀合物在特异性和灵敏度方面相近。

实施例 13-MBH 连接剂过量的变化

在此实施例中，测定了缀合物成分和染色特性对酰肼硫醇连接剂的过量的依赖性。用 MBH 连接剂按照实施例 4 的步骤合成 AP-IgG 缀合物，但是 MBH 连接剂的摩尔过量从 5000 倍过量到 50 倍过量变化。Ellman 分析得到的结果显示以下的硫醇/Ab 数：5000 倍，9-15；1000 倍，7-10；500 倍，3-5；100 倍，2-4；50 倍，1-3。与马来酰亚胺衍生的抗体反应后，对缀合物（5000×，1000×，500×，100×和 50×）进行尺寸排阻层析，结果表明，用过量较大的连接剂合成的缀合物的总产率较高。但是，这些缀合物的组织染色（抗鼠-肌，肌动蛋白；抗兔-皮肤，S100）表明，500 倍过量时染色强度最大，而背景最弱。

实施例 14-碱性磷酸酶连接剂长度/类型的变化

在此实施例中，测定了缀合物成分和染色特点对用来将硫醇活性基团加到碱性磷酸酶上的连接剂的长度和类型的依赖性。用 MBH 连接剂合成 AP-IgG 缀合物是按照实施例 4 的步骤进行，但是使用以下连接剂来活化碱性磷酸酶与硫醇化抗体的反应：LC-SMCC（Pierce, Rockford, IL），MAL-dPEG₈-NHS 酯（Quanta Biodesign, Powell, OH），MAL-dPEG₄-NHS 酯（Quanta Biodesign, powell, OH）和 MAL-dPEG₁₂-NHS

酯 (Quanta Biodesign, powell, OH)。这些连接剂均按照 100 倍过量在缓冲体系 (0.1M 磷酸钠, 0.1M NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂, pH=7.5) 中与 AP 反应 1 小时。LC-SMCC 必须溶在二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 加到 AP 上, 但 DMF 在缓冲液中的总体积不超过 10%。Ellman 分析表明, 对于 PEG₁₂ 和 LC-SMCC 连接剂, 马来酰亚胺的结合数为 20/AP, 对于 PEG₈ 连接剂为 27/AP, 对于 PEG₄ 连接剂为 30/AP。在偶联在 Fc-硫醇化抗体 (用 MBH 制成) 之后, 纯化时得到尺寸排阻层析谱。PEG₁₂ 连接剂得到最高的缀合物产率, 随后是 PEG₈、LC-SMCC 和 PEG₄ 连接剂。组织染色 (抗鼠-肌肉, 肌动蛋白; 抗鼠-皮肤, S100) 反映了缀合物产率, PEG₁₂ 缀合物产生最强的染色。

实施例 15-NHS-PEG₁₂-MAL 连接剂过量的变化

在此实施例中, 测定了缀合物成分和染色特点对用来将硫醇活性基团加到碱性磷酸酶上的 NHS-PEG₁₂-MAL 连接剂的过量程度的依赖性。AP-IgG 缀合物按照实施例 4 的方法合成, 其中 MAL-dPEG₁₂-NHS 酯连接剂的摩尔过量从 500 倍到 25 倍过量变化。

Ellman 分析结果表明, 马来酰亚胺的结合数为: 500 倍时 34, 250 倍时 29, 100 倍时 18-20, 50 倍时 17, 25 倍时 15。在与 Fc-硫醇化的 Ab 反应后用尺寸排阻层析法对缀合物 (500×, 250×, 100×, 50×和 25×) 的分析表明, 使用过量较多的连接剂合成的缀合物具有较高的产率, 并且马来酰亚胺的结合百分数较高。对于各个缀合物, 组织染色 (抗鼠-肌肉, 肌动蛋白; 抗兔-皮肤, S100) 表明, 使用 100 倍过量的马来酰亚胺得到最尖锐和最强的染色。

实施例 16-AP/Ab 摩尔比的变化

在此实施例中, 测定了缀合物成分和染色特点对最终反应中硫醇化抗体 (用 MBH 连接剂制备) 与马来酰亚胺衍生的 AP (NHS-PEG₁₂-MAL 连接剂) 之比的依赖性。采用以下的比例 (抗体/AP): 2:1, 1:1, 1:2 和 1:3。尺寸排阻层析谱的图案表明, 在摩尔比为 2AP:1Ab 时得到最大产率。但是, 缀合物的组织染色 (抗鼠-肌肉, 肌动蛋白; 抗兔-皮肤, S100) 表明, 图 1:1 缀合物观察到最佳信噪比。

实施例 17-交联的 AP 的合成

碱性磷酸酶是一种二聚蛋白质，通过将该酶交联可以提高其稳定性，以有助于防止二聚体解离。碱性磷酸酶是用以下步骤交联的。将碱性磷酸酶（Biozyme, San Diego, CA; 17.5mg, 0.125 μ mol）交换到与其原装不同的缓冲液（0.1M 磷酸钠、0.1M 氯化钠、1.0mM 氯化镁、0.1mM 氯化锌，pH=7.5）中，并在氰基硼氢化钠（1.6mg, 25 μ mol）存在下加到重组、预氧化、醛活化的葡聚糖（平均分子量 40,000; Pierce Biotechnologies, Rockford, IL; 5mg, 0.125 μ mol）中。将反应混合物在室温下转动 1 小时。用乙醇胺（151 μ l, 2.5mmol）猝灭过量的醛，然后加入更多的氰基硼氢化钠（157.1mg, 2.5mmol）。将反应混合物再转动 1 小时。使用一台装有 Superdex 200GL 10/300 柱（GE Biosciences, Uppsala, Sweden）的 AKta Purifier（GE Biosciences, Uppsala, Sweden），利用尺寸排阻层析法，分离出交联的 AP。流速是 1ml/min，流动的水相是 0.1M 磷酸钠、0.1M 氯化钠、1.0mM 氯化镁、0.1mM 氯化锌，pH=7.5。反应后保留的胺的数目用氰醛分析法（Protein Assay Technical Handbook, Pierce Biotechnology, Rockford, IL）定量测定，交联后平均保留 8-12 个胺。将交联的 AP 连接在 MAL-dPEG₁₂-NHS 酯（它与保留的胺反应）上，并按实施例 4 中所述与 Fc-硫醇化的抗体缀合，得到包含交联的 AP 酶的缀合物。稳定性研究表明，交联提高了缀合物在含亲和素稀释剂（Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; P/H 95/30）中的稳定性。具体地说，在 45℃，对于含交联的 AP 的缀合物，在第 3 天的染色强度总损失为 50%，而在同一稀释剂和同一温度，用未交联的 AP 制备的缀合物在第一天就损失其染色强度的 95%。

用于交联 AP 以增强其稳定性的其它方法提供在 Bieniarz et al., Bioconj, Chem., 9:390-398, 1998, Bieniarz et al., Bioconj, Chem, 9:399-402, 1998, 和美国专利 No. 5,789,219 中。这些方法也能用来交联碱性磷酸酶以供在本发明公开的缀合物中使用。

实施例 18-碱性磷酸酶缀合物的分析 SDS PAGE

在此实施例中，实施例 4 的缀合方法的 Fc 特异性由变性条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳得到证实。分析了 6 个不同的缀合物制品，3 个用抗鼠 IgG 抗体制备，3 个用抗兔 IgG 抗体制备。简言之，将各缀合物的

100-200ng/ μ l 溶液取 5-20 μ l 与 4 $\times$ LDS 凝胶负载缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 混合, 加入 2-巯基乙醇至最终浓度为 1mM。将样品混合物在 48-50 $^{\circ}$ C 温和地加热 5 分钟。选择此温度是为了将酶和抗体之间的共价连接的破坏降至最小, 同时仍能通过 2-巯基乙醇将缀合物的抗体部分的轻链和重链解离。然后将各样品冷却, 加到聚丙烯酰胺凝胶 (或是 1.0mm 厚、预成型的 NuPAGETM 4-20%聚丙烯酰胺 Bis Tris 凝胶, 或是 NuPAGETM 3-8%聚丙烯酰胺 Tris 乙酸盐凝胶, Invitrogen, Carlsbad, CA) 的不同孔中。使用的分子量标准是预染色的 MultimarkTM 和 Mark 12 宽范围标准, 它们均购自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。电泳在室温下使用一台 Novex XCell II 盒式系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 在 70mA 下进行 60-90 分钟。操作缓冲液是 MES-SDS 或 Tris 乙酸盐-SDS 缓冲液, 分别用于 3-8%凝胶和 4-20%凝胶。从盒中取出凝胶, 在去离子水中洗 2 次, 每次 5 分钟, 以便去除 SDS 和缓冲剂。然后将 SDS-PAGE 凝胶在室温下于乙醇/水/乙酸[40:50:10 (v:v:v)] 中固定 1 小时, 用溶于甲醇/水/乙酸[50:40:10 (v:v:v)], Sigma - Aldrich, St Louis, MO] 中的考马斯蓝 R-250 染色。将凝胶在室温下温和地摇动染色, 最短 2 小时, 最长过夜。脱色按照与染色相同的方式进行。脱色液与去掉染料的染色液相同。将凝胶用 Invitrogen 凝胶干燥器 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 干燥。凝胶的分析清楚地表明, 对各缀合物均存在一个分子量与抗体的轻链对应的谱带。另外, 对于各缀合物, 基本上不存在与碱性磷酸酶的重链分子量对应的带。相反, 一系列更高分子量的带表明, 对于各缀合物, 碱性磷酸酶选择性地与 IgG 的重链结合。因为免疫球蛋白的重链包括 Fc 区, 结果表明了缀合物的 Fc 位点特异性本质。

实施例 19-Fc 特异性抗体-HRP 缀合物的合成

在此实施例中, 描述了一种包含一个基于 PEG 的酰肼硫醇连接体的 Fc 特异性抗体缀合物的制备方法。硫醇活性马来酰亚胺基团如下所述地加到辣根过氧化物酶上。向一只 4ml 的琥珀色小瓶中加入 7.8mg (15.2 μ mol, 100 当量) MAL-dPEG₄TMNHS 酯 (Quanta Biodesign, Powell, OH), 随后加辣根过氧化物酶 (HRP; Pierce Biotechnology, Rockford, IL; 0.25mL, 25mg/ml 在 0.1M Na₃PO₄, 0.15M NaCl 中, pH=7.5)。将小瓶在室温下于暗处旋转 1 小时, 然后用装有 Superdex 200 柱 (GE

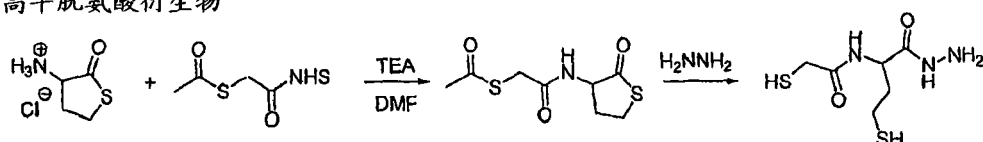
Biosciences, Uppsala, Sweden) 的 AKta Purifier, 利用尺寸排阻层析法纯化, 采用缓冲剂水溶液 (0.1M Na_3PO_4 , 0.15M NaCl , $\text{pH}=7.5$)。收集含 HRP 的级分, 得到 HRP-PEG₄-马来酰亚胺溶液。HRP 浓度由溶液的 A_{280} 测定 ($\epsilon_{280}=0.652\text{mlcm}^{-1}\text{mg}^{-1}$), 利用改良的 Ellman 分析法定量测定马来酰亚胺的数目为每个酶 6-8 个马来酰亚胺。

纯化的马来酰亚胺-辣根过氧化物酶与纯化的巯醇化抗体(根据实施例 4 用 MBH 连接剂制备)按 3:1 摩尔比混合并转动 18 小时。尺寸排阻层析法 (Superdex 200; 0.1M Na_3PO_4 , 0.15M NaCl , $\text{pH}=7.5$) 得到纯化的缀合物, 将其稀释到含 B5 封阻剂的亲和素稀释剂 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) 中, 并在组织上分析。将利用本实施例的 HRP 缀合物对在前列腺组织上的前列腺特异性抗原的染色, 与如美国临时专利申请 No. 60/675,579 中所述通过免疫球蛋白的 DTT 还原制备的 HRP 缀合物比较, 表明本实施例的 HRP 缀合物比 DTT-制备的 HRP 缀合物的背景稍浅, 但染色强度也稍弱。

实施例 20-衍生自氨基酸的多官能酰肼硫醇连接体

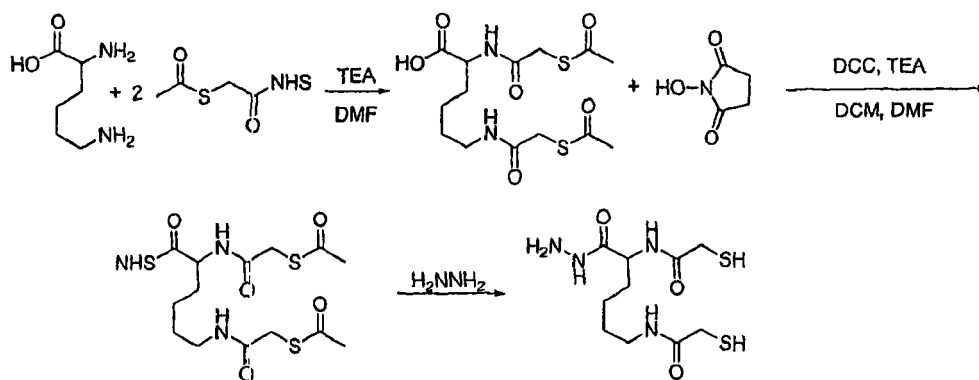
在一些实施方案中, 可用在所公开的方法中的多官能酰肼硫醇连接剂按照以上的方案 4a、4b、4c 和 4d 由氨基酸和氨基酸类似物制备。在本实施例中, 特异性连接剂的合成路径概述于以下方案中。在具体方案 17a、17b、17c 和 17d 中, 氨基酸或氨基酸类似物 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 首先在三乙胺 (TEA) 存在下与 N-丁二酰亚胺基 S-乙酰硫代乙酸酯 (SATA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 反应。在方案 17a 中, 该第一反应的产物与肼反应, 得到具有一个酰肼基和两个硫醇基的多官能酰肼硫醇连接剂。在方案 17b 中, 利用碳化二亚胺介导的与 DCC 的偶联, 与第一反应产物的羧酸官能基形成一个 NHS 活性酯, 随后与肼反应形成另一种有一个酰肼基团和两个硫醇基的多官能酰肼硫醇连接剂。在方案 17c 中, 与 17b 中一样, 使用第一反应产物形成 NHS 酯, 然后与肼反应生成有两个酰肼基团和一个硫醇基团的多官能酰肼硫醇连接剂。在方案 17d 中, 与肼的反应产生有一个酰肼基、一个硫醇基和一个羟基基团的多官能酰肼硫醇连接剂。

高半胱氨酸衍生物



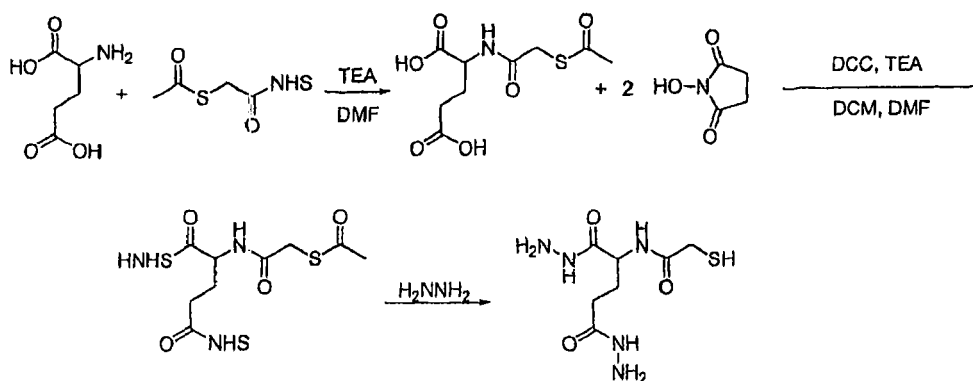
方案 17a

赖氨酸衍生的



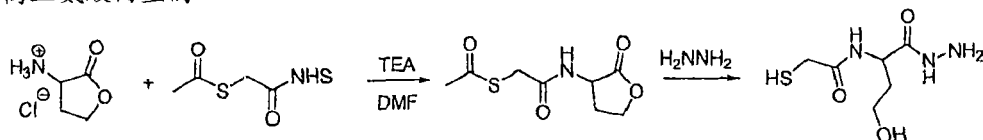
方案 17b

谷氨酸衍生的



方案 17c

高丝氨酸衍生的



方案 17d

方案 17a、17b、17c 和 17d 的产物分别是 2-巯基乙酰氨基巯基丁酰肼 (MAMBH)，N,N'-(6-胍基-6-氧己烷-1,5-二基)二(2-巯基乙酰胺)

(BTAL), N-(1,5-二胍基-1,5-二氧戊-2-基)-2-巯基乙酰胺 (TAGD) 和 N-(1-胍基-4-羟基-1-氧丁-2-基)-2-巯基乙酰胺。

在一项具体的实施方案中, MAMBH 合成如下。首先, 通过配制三乙胺 (0.15ml, 1.1mmol) 在乙腈 (10ml) 中的溶液并向其中加入高半胱氨酸盐酸盐 (150mg, 1.0mmol), 制备乙酰硫代乙酰胺高半胱氨酸。将所形成的浆体搅拌 5 分钟, 然后加入 S-乙酰基硫代乙酸酯 (250mg, 1.1mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 16 小时, 然后减压浓缩。柱层析 (SiO_2 , 9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$) 分离出无色粉状产物。产率: 174mg (75%):

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (bs, 1 H), 4.51-4.41 (p, $J=$

6.7 Hz, 1 H), 3.63-3.50 (m, 2 H), 3.36-3.18 (m, 2 H), 2.88-2.80 (m, 1 H), 2.38 (s, 3 H),

2.01-1.88 (m, 1 H); $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3) δ 204.37, 195.38, 168.59, 59.51,

32.74, 31.43, 30.18, 27.43; ESI-HRMS m/z 256.00693 ($\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NNaO}_3\text{S}_2$ 计算值

256.00780).

2-巯基乙酰胺氨基巯基丁酰肼 (MAMBH) 然后制备如下: 向一水合胍 (10ml) 中加入 S-乙酰硫代乙酰胺高半胱氨酸 (300mg, 1.3mmol)。将形成的浆体在室温下搅拌 16 小时, 此时溶液变均匀。减压除去胍, 粗产物用反相快速层析法 (15% C_8 SiO_2 , 160:39:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{AcOH}$) 纯化, 得到所要的产物, 为无色油状物。产率: 207mg (72%)。

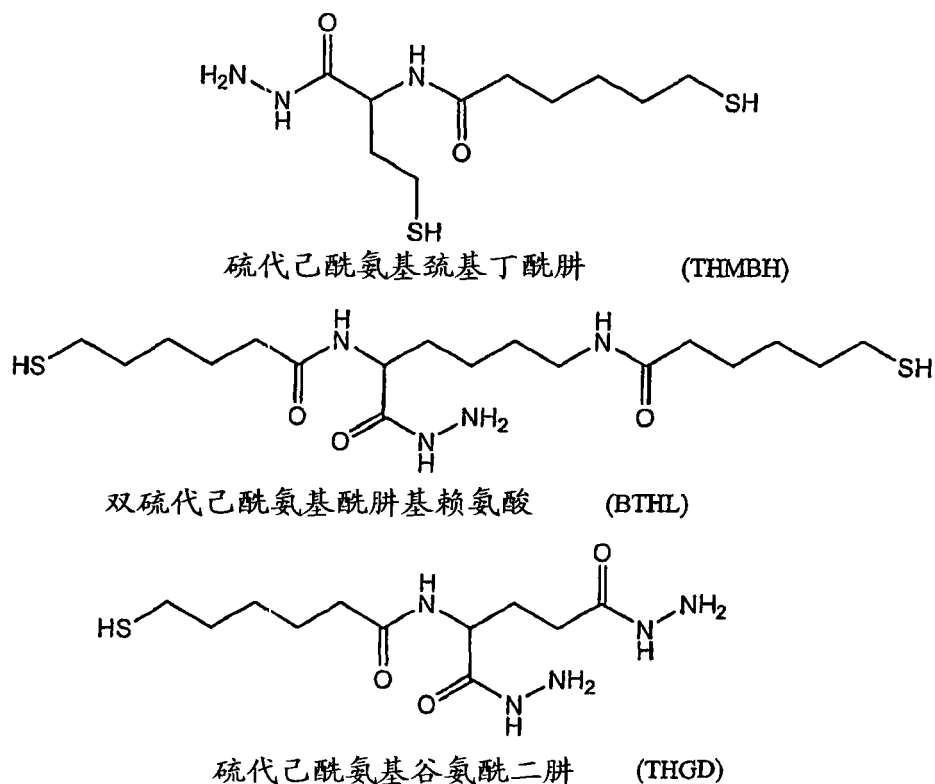
$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ

4.52-4.46 (m, 1 H), 3.23-3.21 (m, 2 H), 2.59-2.52 (m, 2 H), 2.10-2.01 (m, 2 H); ^{13}C

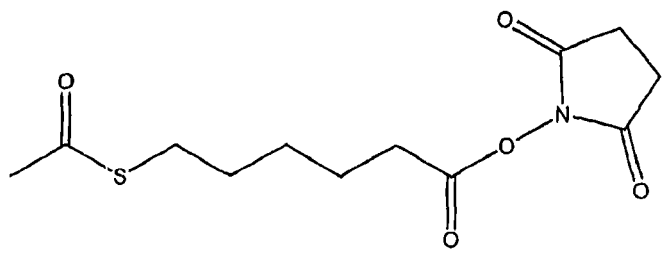
NMR (62.9 MHz, CD_3OD) δ 172.82, 172.43, 52.49, 37.72, 21.42, 20.49; ESI-HRMS

m/z 246.03251 ($\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{NaO}_2\text{S}_2$ 计算值 246.03469).

用 6-乙酰基硫代己酸 NHS 酯代替方案 17a、17b 和 17c 中的 SATA, 得到以下示出的相应化合物 TMBH、BTHL 和 THGD。6-乙酰基硫代己酸 NHS 酯具有以下结构。6-乙酰基硫代己酸 NHS 酯能够利用碳化二亚胺介导的 6-乙酰基硫代己酸与 N-羟基丁二酰亚胺的偶联反应制备。

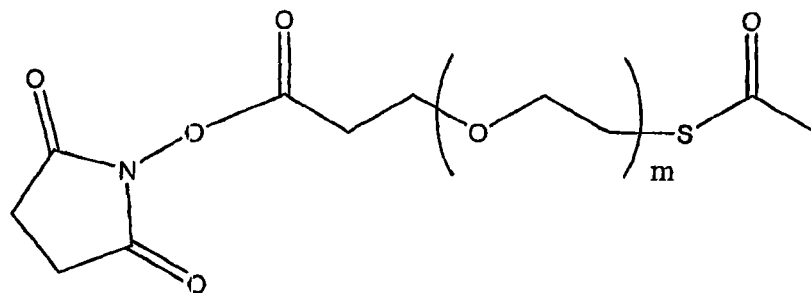


6-乙酰硫代己酸 NHS 酯具有以下结构：



它通过碳化二亚胺介导的 6-乙酰基硫代己酸与 N-羟基丁二酰亚胺(二者均可自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 得到)的偶联反应制备。

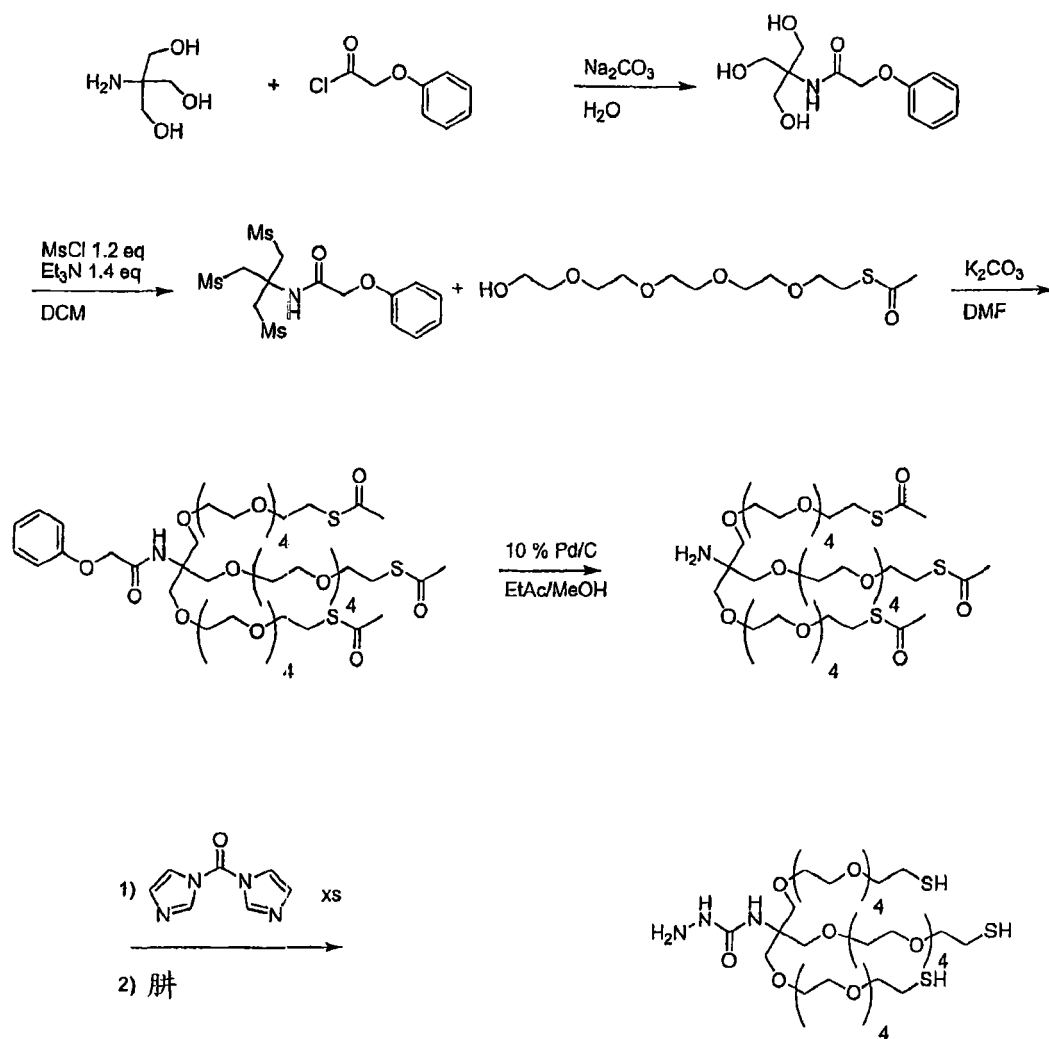
本领域普通技术人员还会认识到,在以上实施方案中可以用基于 PEG 的 S-乙酰基硫代羧酸衍生物代替 SATA,以得到在所公开的缀合方法中使用的多官能 PEG 基连接剂。例如,基于 PEG 的多官能酰肼硫醇连接剂可以通过在以上的方案 17a-d 中用具有下式结构的分子代替 ASTA 来制备:



其中 $m=2-50$ 。此式化合物是可由 Quanta Biodesign (Powell, OH) 得到的商品，或是能够由相应的羧酸制备。

实施例 21-多官能的 PEG 基酰肼硫醇连接剂

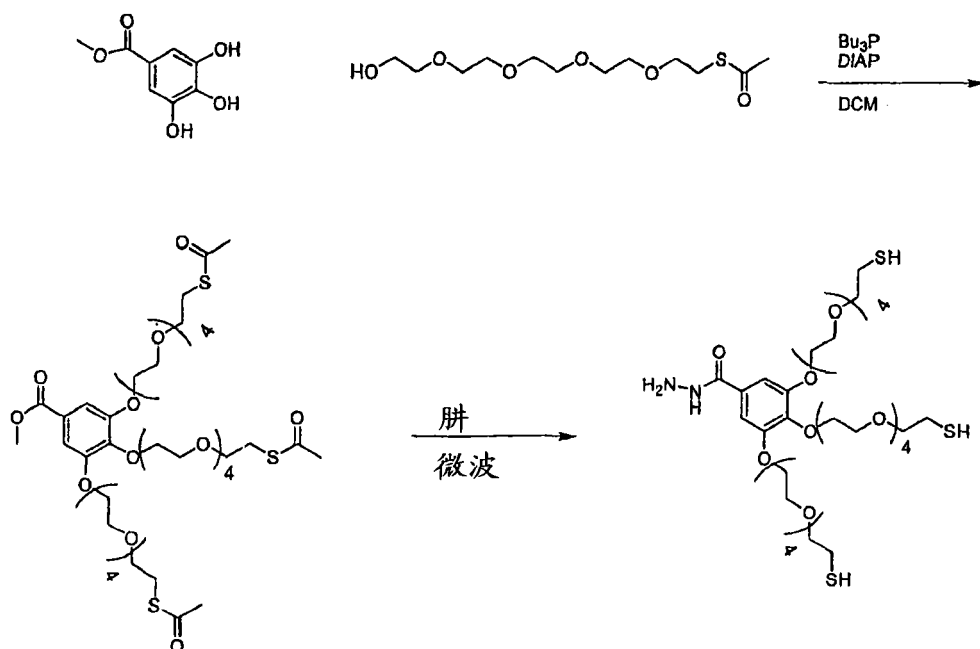
在一些实施方案中，可以用在所公开的方法中的多官能的 PEG 基酰肼硫醇连接剂按照以上的方案 5a、5b 和 5c 制备。在此实施例中，合成特定连接剂的路径概述于以下方案 18a、18b 和 18c 中。还展示了具体的反应方案。除非另外说明，试剂和溶剂都是常规的，可以从例如 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 得到。



方案 18a

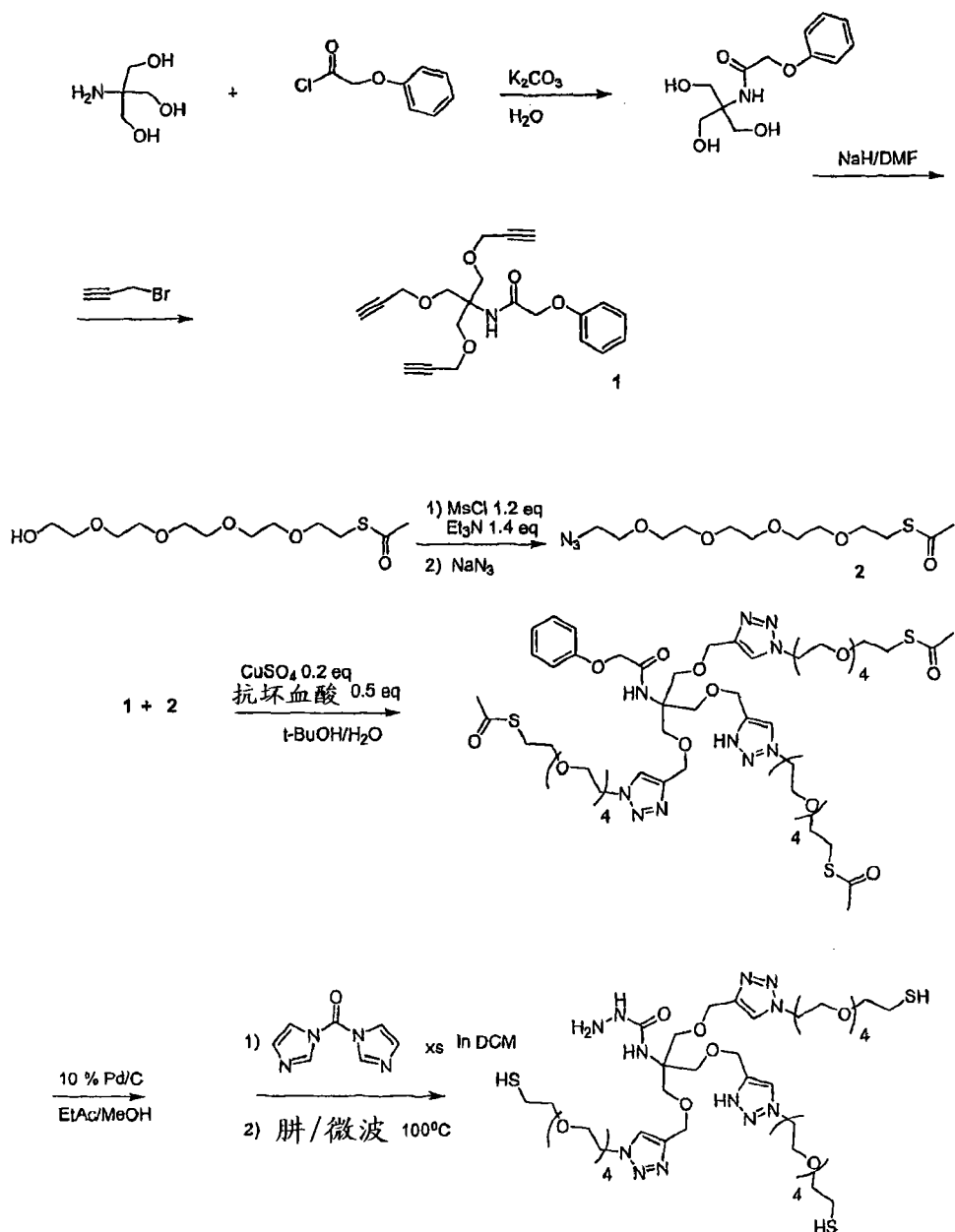
按照方案 18a，向 5.0g Tris 在 10ml 水中的溶液加入碳酸钠（1.3 当量），接着加入苯氧基乙酰氯（1.2 当量），将反应混合物在冰上于氮气下搅拌 16 小时。沉淀出的氨基被保护的产物用水洗 3 次，真空干燥。通过在 C18 硅胶柱上层析，用乙腈/水（5-100% 乙腈，30 分钟）洗脱，得到该第一反应产生的纯化合物。然后通过 DMF 中用三乙胺（4.0 当量）和甲磺酰氯（5.0 当量）处理，引入甲磺酸基。减压除去 DMF，残留物置于无水 DMF 中，过滤除去盐。减压除去 DMF，得到粗制的甲磺酸酯 2，它在用前不作进一步纯化。向该甲磺酸酯（0.3 当量）在无水 DMF 中的溶液加入 HO-dPEG₄TM-SATA（1.0 当量；Qanta Biodesign, Powell, OH）和 K₂CO₃（1.5 当量），将反应混合物于氮气下搅拌 16 小时。减压除去 DMF，残留物溶在无水 DCM 中，过滤去除盐。减压除去 DMF，随后进行硅胶层析，得到 PEG 化的中间体。然后通过

EtAc/MeOH 混合物中用 Pd/C 处理，除去 Pac 保护基。将形成的中间体先用羰基二咪唑（10 当量），再用胍（100 当量）处理，得到氨基甲酰胍。



方案 18b

按照方案 18b，向醇（HO-PEG4-SATA，Quanta Biodesign, Powell, OH, 1.3 当量）在 DCM 中的溶液加入 1.5 当量重氮二异丙基二羧酸酯，随后加入 1.8 当量三丁磷，将反应混合物于干燥的氮气下搅拌 30 分钟。然后向形成的悬浮液中加入 1.0 当量的酚/DCM 溶液，在干燥的氮气下搅拌 16 小时。将硅胶层析后得到的酚醚置于纯净的胍中，将溶液微波加热，得到多官能的 PEG 基酰胍硫醇连接剂。



方案 18c

按照方案 18c, 向 5.0g Tris 在 10ml 水中的溶液依次加入碳酸钾(1.3 当量)和苯氧基乙酰氯(1.2 当量), 将反应混合物在氮气下于冰上搅拌 16 小时。沉淀出的氨基被保护的产物用水洗 3 次, 真空干燥。然后通过用氢化钠(3.0 当量)和丙炔溴(10 当量)在 DMF 中处理引入炔基, 经硅胶层析后得到炔类中间体 1。向 HO-PEG₄-SATA (Quanta Biodesign, Powell, OH) 在 DCM 中的溶液依次加入甲磺酰氯(1.2 当量)和三乙胺(1.4 当量), 在氮气下于冰上搅拌 16 小时。然后过滤除去该三乙胺盐, 将甲磺酸酯产物真空干燥。向该甲磺酸酯化的醇在 DCM 中的溶液加入

叠氮化钠 (1.2 当量), 在氮气下搅拌 16 小时, 经硅胶层析后得到叠氮化物中间体 2。向含有硫酸铜 (0.2 当量) 和抗坏血酸钠 (0.5 当量) 的叔丁醇/水 (1:1) 溶液中加入各 1 当量的中间体炔 1 和中间体叠氮化物 2。然后将反应混合物在氮气下搅拌 16 小时, 经硅胶层析后得到具有被保护的氮的中间体。随后通过用 10% Pd/C 在 1:1 的乙酸乙酯/甲醇混合物中处理, 除去氮保护基, 利用酸-碱后处理得到游离胺。向该游离胺在 DCM 中的溶液加入羰基二咪唑 (10 当量), 在氮气下搅拌 4 小时。然后将反应混合物减压浓缩, 残留物溶于纯净的胍中。将该溶液在 100℃ 微波加热 1 小时, 得到多官能 PEG 基酰肼硫醇连接剂。

本领域技术人员容易看出, 在这些实施方案中可以用其它的 SATA 醇代替 PEG 基的分子, 以得到其它多官能 PEG 基酰肼硫醇连接剂, 而且还可以代之以不同长度的 PEG SATA 醇。

实施例 22-聚丙烯酰胺酰肼硫醇连接剂的合成

在此实施例中, 提供了一种聚合的多价酰肼硫醇连接剂, 该连接剂可以按照以下的方案 19 制备。



方案 19

在方案 19 中, X 可以是例如 100-500, Y 可以是例如 10-50。L 代表用来将该酰肼基团的一部分转化成硫醇基团的硫醇化试剂。聚丙烯酰胺酰肼 (PAH) 可以利用已公布的美国专利申请 No. 2005158770 中提供的方法合成。简言之, 在一只装有冷凝器的 100ml 圆底烧瓶中将 20ml 聚丙烯酰胺 (1mmol, 50%wt 水溶液, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis) 与 10ml 蒸馏 (DI) 水和 20ml-水合胍 (420mmol, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wis) 混合。将反应混合物微波加热 60 分钟。冷却至室温后, 用等体积的甲醇使反应混合物沉淀, 离心并倾析。残留物置于 50ml DI 水中, 重复沉淀总计 3 次。将最终的残留物溶于 DI 水中, 冷冻干燥成白色吸湿

的细粉。在适当的溶剂中使所形成的 PAH 与硫醇化试剂，例如硫醇-dPEG-NHS 酯 (Quanta Biodesign, Powell, OH) 或者 Traut 试剂，进行反应，使可利用的酰肼 (Z=5-40) 的一部分 (例如约 50-75%) 硫醇化，得到能用于所公开方法中的聚合的多官能酰肼硫醇连接剂。其它的硫醇化试剂可以在例如 Hermanson, "Bioconjugate Technology", Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8 中找到，该文献并入本申请作为参考。

可以用两种方式之一使用/制备该聚丙烯酰胺酰肼硫醇连接剂：先合成它并使用所公开的缀合方法，或者先使 PAH 与一种分子反应以使该 PAH 硫醇化，然后使已经硫醇化的第一分子与第二分子反应。

虽然已经参照几个示例性实施方案对本发明的原理作了描述，但是对于本领域普通技术人员，显而易见的是可以在不偏离这些原理的情况下对实施方案的细节进行修改。例如，虽然详细的说明是集中于抗体-酶缀合物，但是连接剂和方法可以用来制备任何类型的缀合物，包括抗体和其它可检测标记物，例如和纳米粒子 (如，金属和半导体纳米粒子，例如金纳米粒子和量子点)、荧光分子、生荧光分子、有色分子、生色分子和顺磁性构建物 (例如顺磁离子的螯合物) 的缀合物。用于所针对的治疗的抗体缀合物 (例如抗体与药物分子、毒素和放射性构建物如放射性金属离子的螯合物的缀合物) 也在考虑之内，虽然提供的具体实例显示的是具有酰肼和卡巴肼基团的酰肼硫醇连接剂的应用，但是可以用任何“酰肼基团”代替在所公开的方法和缀合物中到出的酰肼或卡巴肼基团。另外，应该清楚，虽然可以用一个或多个单一的酰肼硫醇连接剂形成缀合物，但也可以使用多种不同的酰肼连接剂形成缀合物。所公开的缀合物可以用在与可检测标记物连接的特异性结合分子能够使用的任何类型的测定中，例如，除示例说明的免疫组织化学分析之处，还可用于任何类型的免疫分析，或任何类型的杂交分析。检测方案可以用手工方式或自动化方式完成。另外，所公开的连接剂也可以用来修饰用于将分子与底物结合的表面，而且这样的表面修饰反应可以用本发明公开的方法进行。本发明包括属于以下权利要求的范围和精神之内的所有修改、变动和等价物。

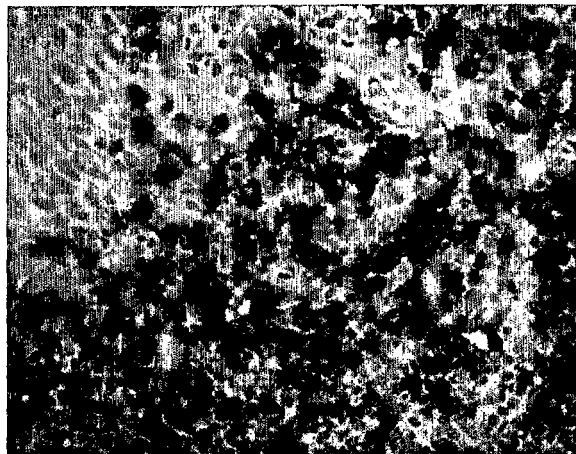


图 1A

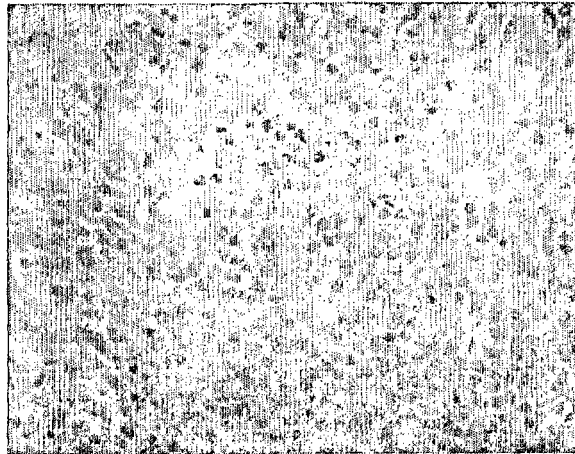


图 1B

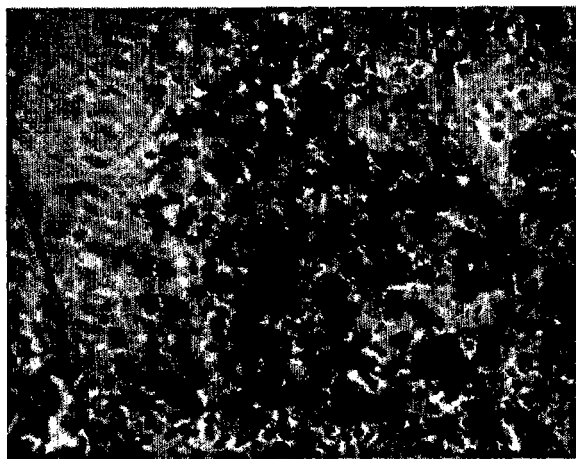


图 1C

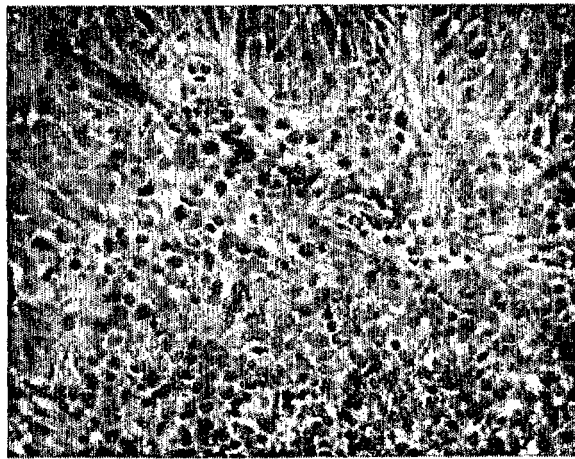


图 1D

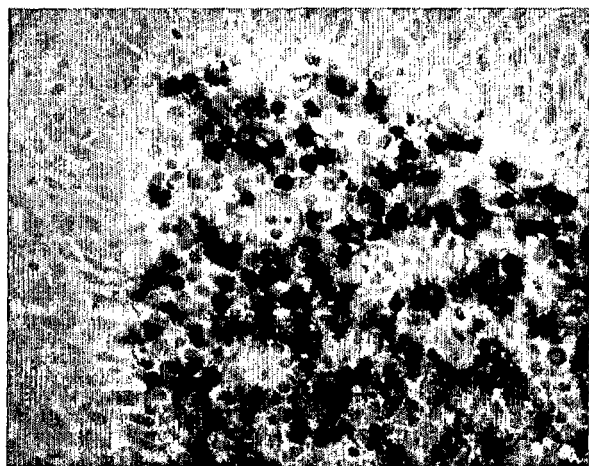


图 2A

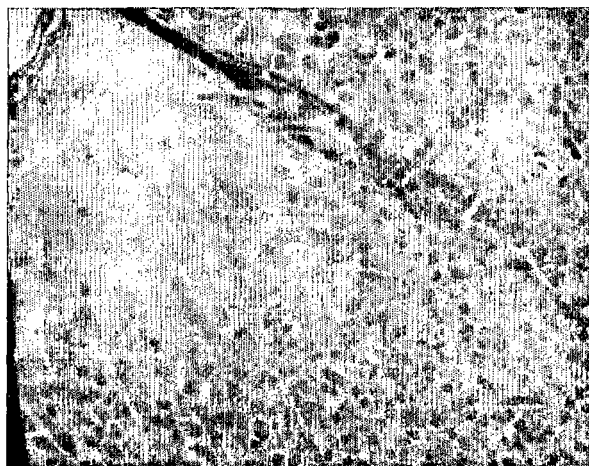


图 2B

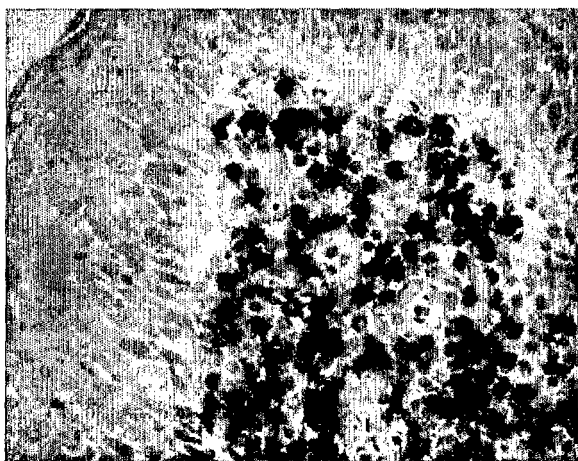


图 2C

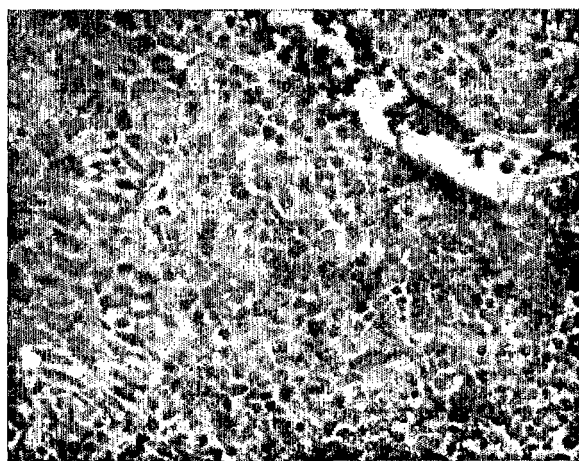


图 2D



图 3A

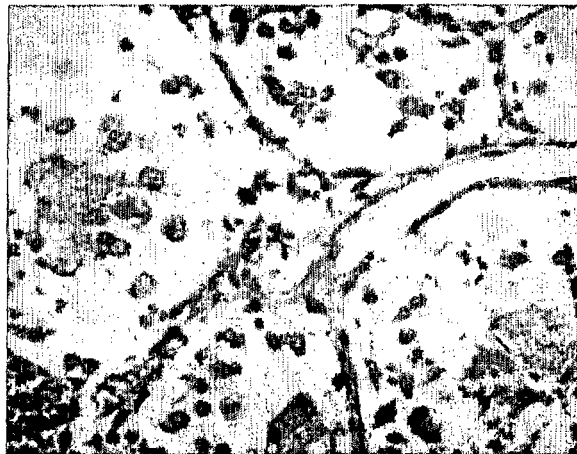


图 3B



图 3C

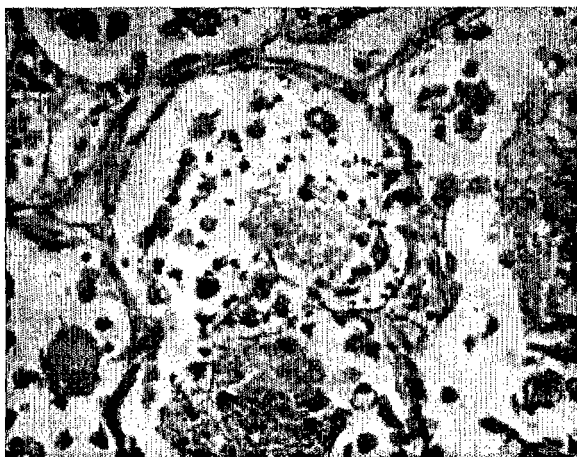


图 3D

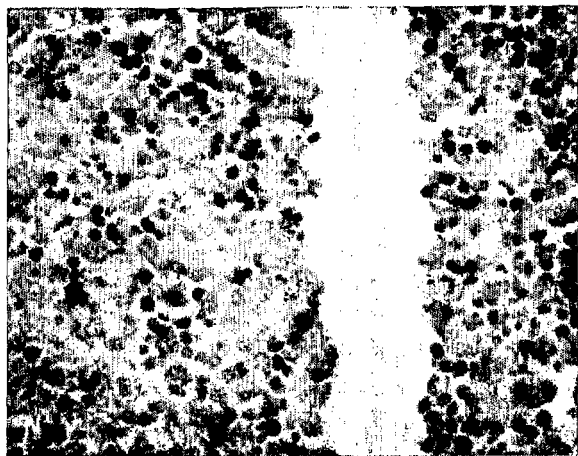


图 4A

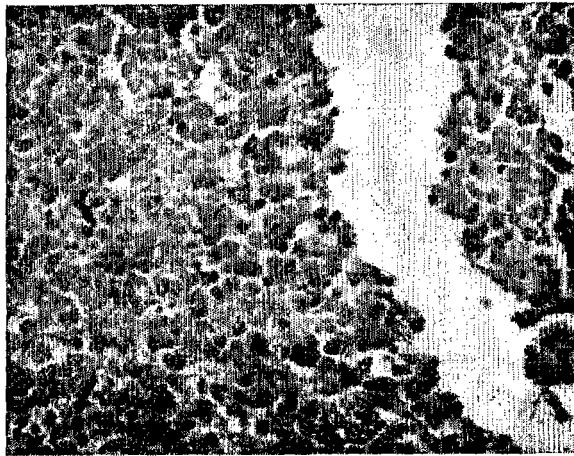


图 4B

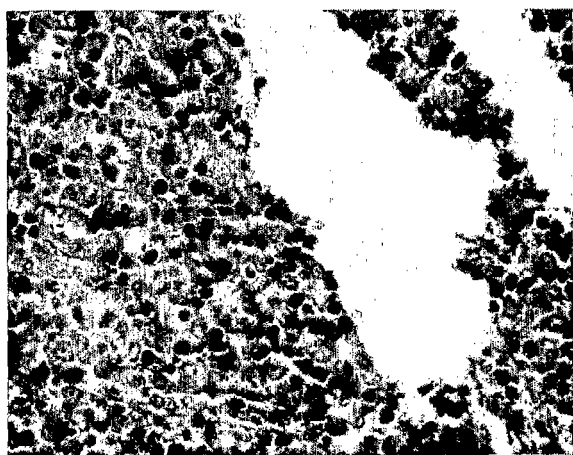


图 4C

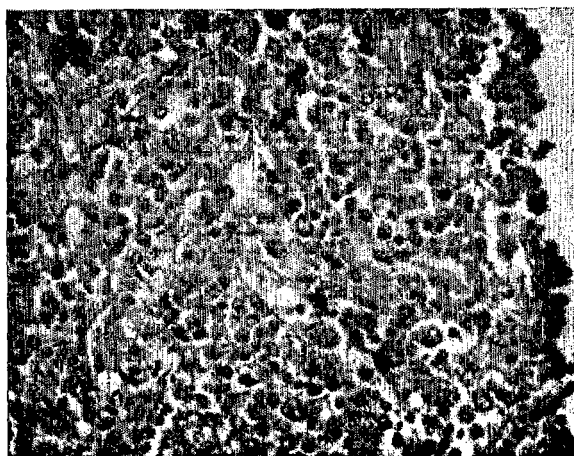


图 4D

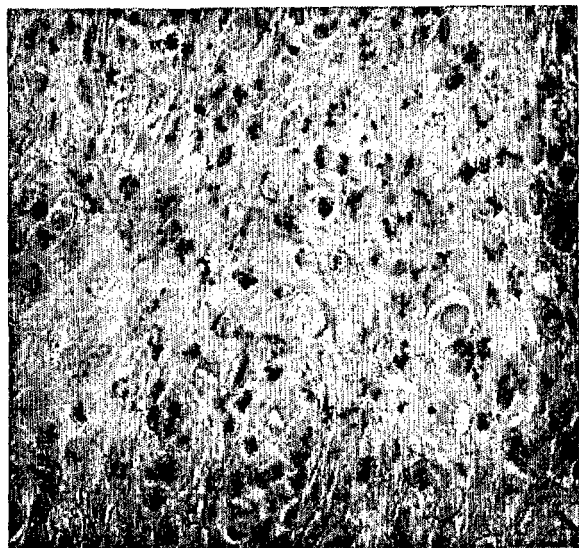


图 5A

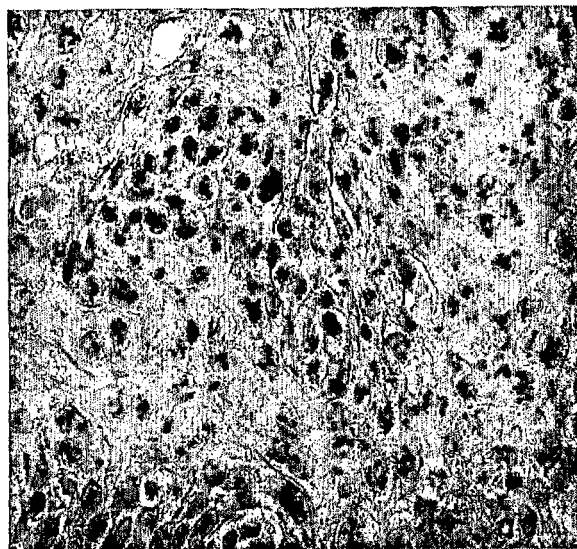


图 5B

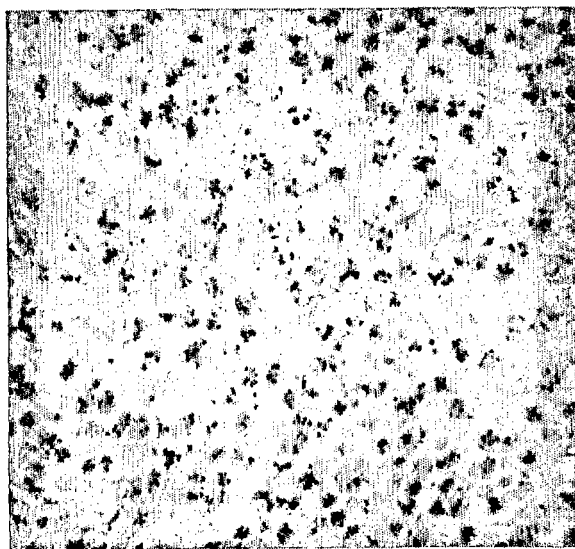


图 5C

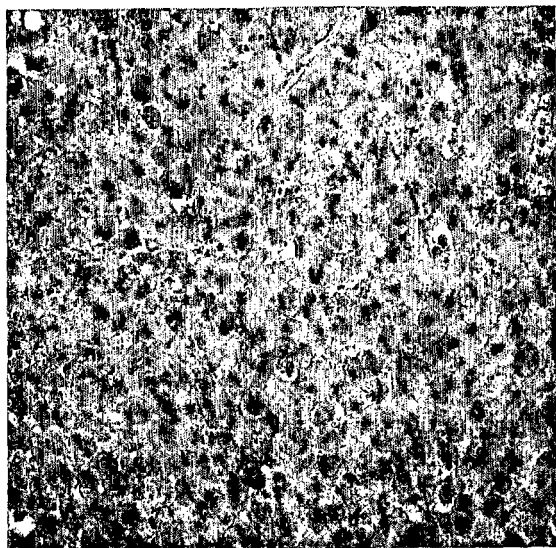


图 6A

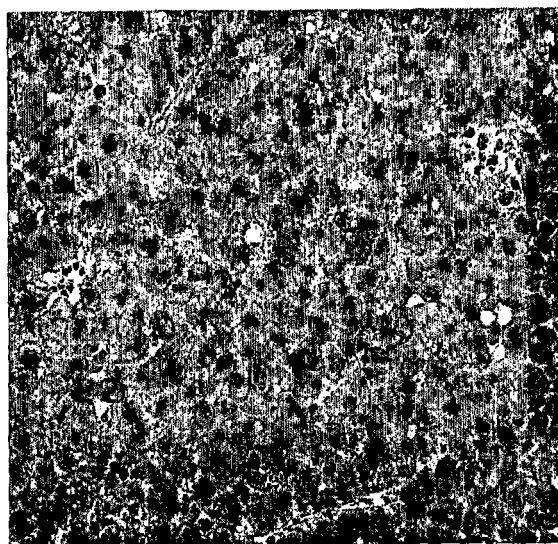


图 6B

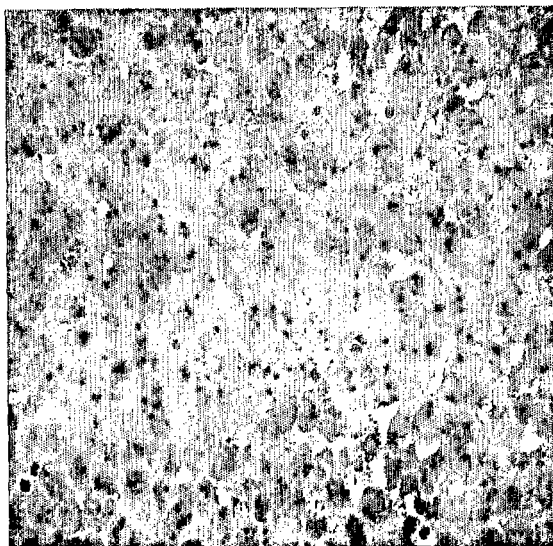


图 6C

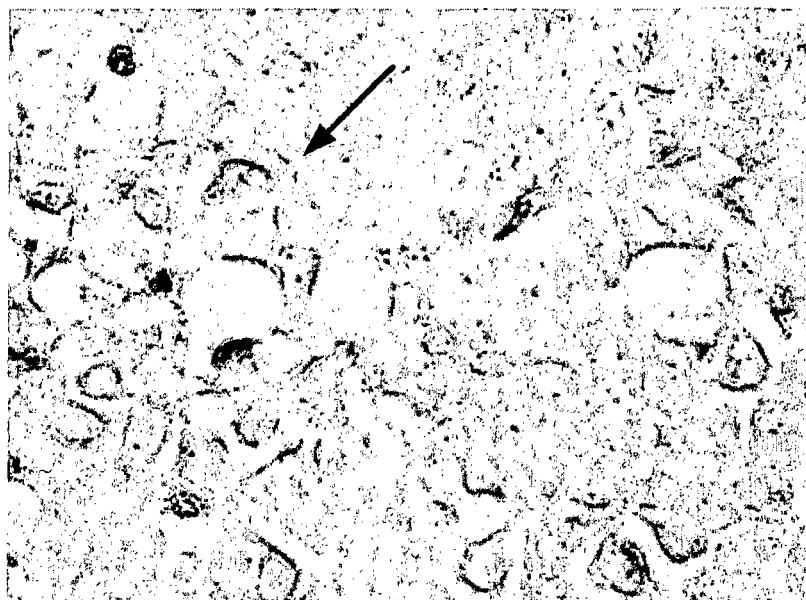


图 7A

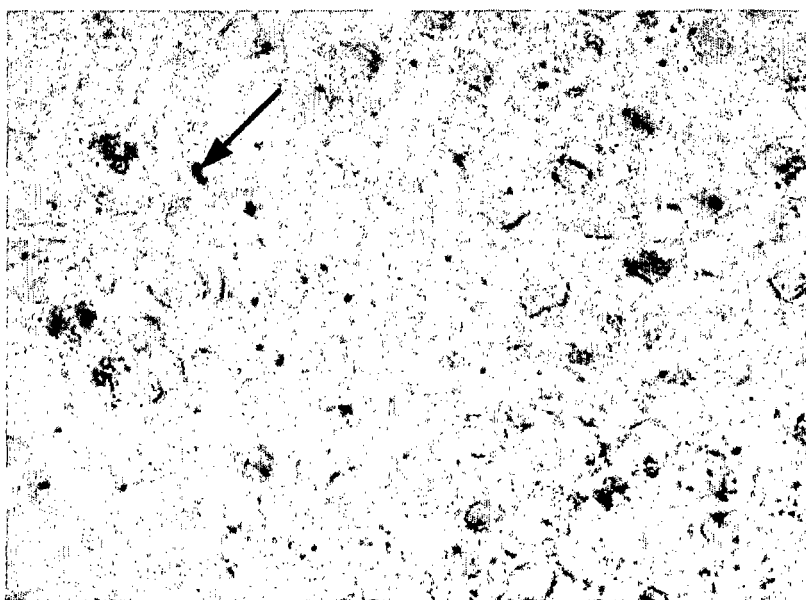


图 7B



图 8A



图 8B



图 8C

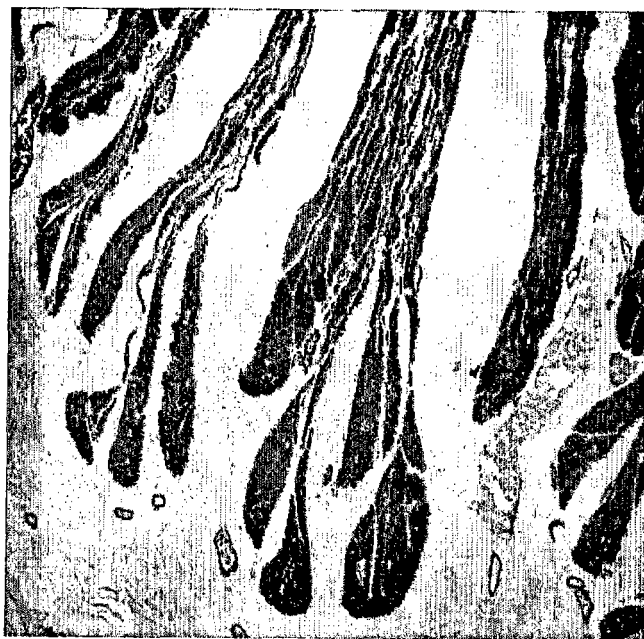


图 9A



图 9B

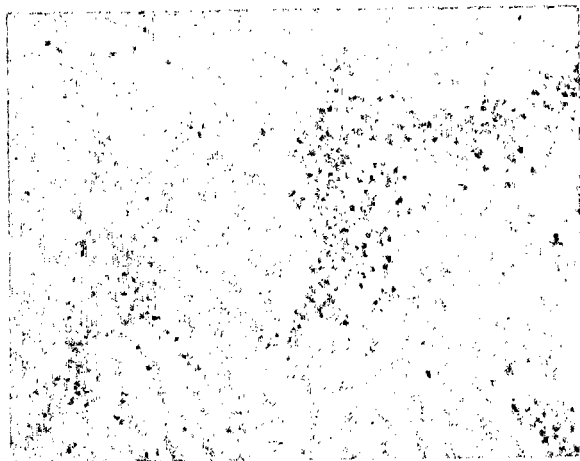


图 10A

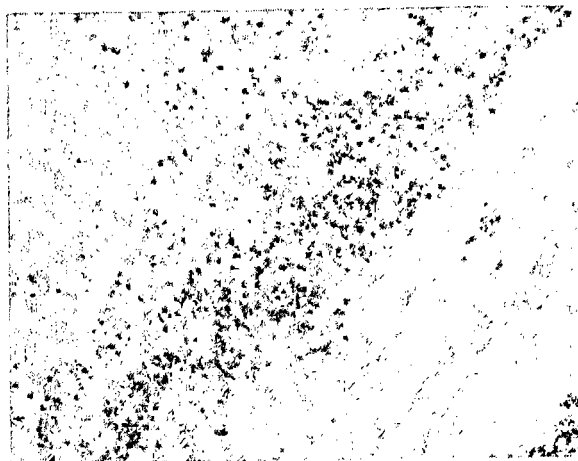


图 10B

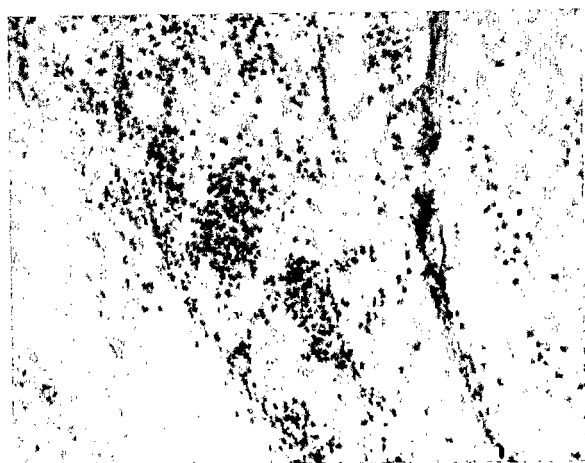


图 10C

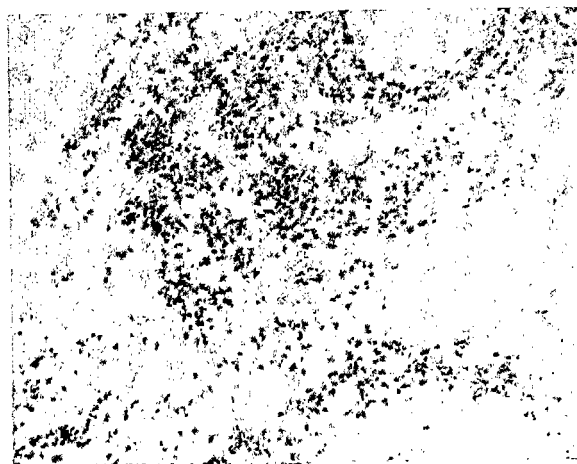


图 10D

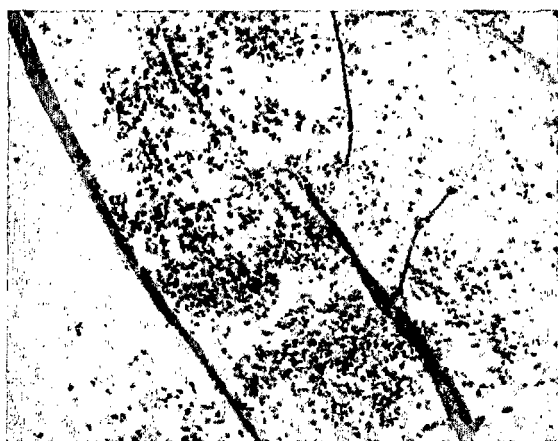


图 10E

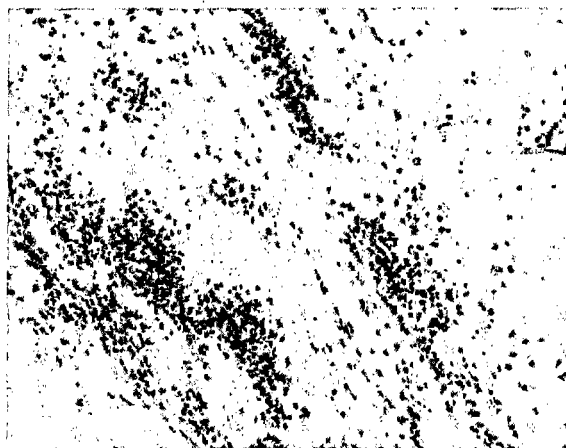


图 10F

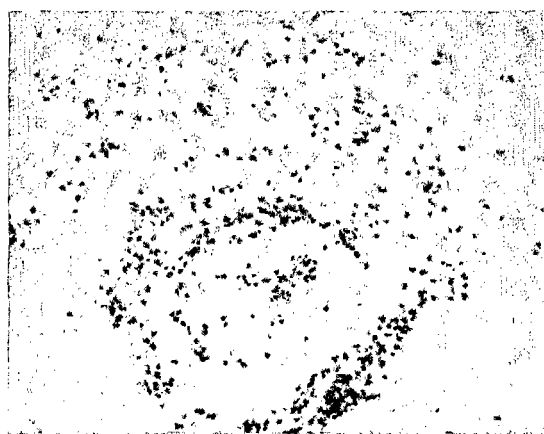


图 10G

专利名称(译)	分子缀合物		
公开(公告)号	CN101535244A	公开(公告)日	2009-09-16
申请号	CN200680043958.2	申请日	2006-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
[标]发明人	C比尼尔兹 J阿什沃思 夏普 CA凯纳 JW科斯梅德 M勒菲弗		
发明人	C·比尼尔兹 J·阿什沃思-夏普 C·A·凯纳 J·W·科斯梅德 M·勒菲弗		
IPC分类号	C07C319/02 C07C327/28 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/581 C07C327/28 C07C319/02 C07C323/60 G01N33/53 A61K47/6801 A61K47/6803 A61K47/6815 C12N9/16 C12N9/96 C12Y301/03001 C07C323/12 A61K39/44 C07C323/22 C07K16/00 G01N33/535		
代理人(译)	关立新 李平英		
优先权	60/739794 2005-11-23 US		
其他公开文献	CN101535244B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种利用酰肼硫醇连接剂制备两种分子的缀合物的方法。在一项具体的工作实施方案中，利用该方法制备了一种Fc - 特异性抗体 - 酶缀合物，它在免疫组织化学分析和原位杂交分析中显示出优越的染色灵敏度和特异性。