

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-197071
(P2019-197071A)

(43) 公開日 令和1年11月14日(2019.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	GO 1 N 33/53	U 4 H O 4 5
C O 7 K 16/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/00	

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-138486 (P2019-138486)
 (22) 出願日 令和1年7月29日 (2019.7.29)
 (62) 分割の表示 特願2017-129850 (P2017-129850)
 の分割
 原出願日 平成20年5月22日 (2008.5.22)
 (31) 優先権主張番号 60/931,546
 (32) 優先日 平成19年5月23日 (2007.5.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 599075070
 ベンタナ・メデイカル・システムズ・イン
 コーポレーテッド
 アメリカ合衆国アリゾナ州 85737 ト
 ウーソン イー イノベーション パーク
 ドライブ 1910
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (72) 発明者 ジェリー ダブリュー コスミーダー
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 85750
 トゥーソン エヌ モッカシン トレイ
 ル 5530

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫組織化学および *in situ* ハイブリダーゼーションのためのポリマー担体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料における標的に対して分析を行うための方法を提供する。

【解決手段】 試料を、標的に特異的に結合する特異的結合分子と接触させるステップであって、前記特異的結合分子は、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、多糖類から選択されるポリマー部分を含み、かつ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基をさらに含むポリマーリンカーを介して、検出可能な標識に共役されるステップと、前記検出可能な標識を使用する前記標識に結合される前記特異的結合分子を検出するステップと、を含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

分子共役体を作製するための方法であって、ポリマー担体によって提供される反応性官能基を介して、特異的結合分子を検出可能な標識に連結するステップを含み、前記反応性官能基は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される、方法。

【請求項 2】

前記ポリマー担体は、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン - a l t - マレイン酸、ポリアミノ酸またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記ポリマー担体は、ポリアクリルアミドヒドラジドまたはポリビニルピロリドンヒドラジドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリマー担体は、平均分子量 10,000 以下のポリアクリルアミドヒドラジドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポリアクリルアミドヒドラジドは、非チオール化される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記特異的結合分子は、アビジン、抗体、核酸、ペプチド核酸 (P N A)、またはアプタマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記特異的結合分子は抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記特異的結合分子を前記反応性官能基の少なくとも一部に連結することによって、第 1 の化合物を作製するステップと、

前記第 1 の化合物の残りの反応性官能基の少なくとも一部を前記検出可能な標識に連結するステップと、を含む、

30

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出可能な標識を前記反応性官能基の少なくとも一部に連結することによって、第 1 の化合物を作製するステップと、

前記第 1 の化合物の残りの反応性官能基の少なくとも一部を前記特異的結合分子に連結するステップと、を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

反応性ヒドラジド官能基を介して、前記ポリマー担体を前記抗体の F c 部分に連結するステップを含む、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 11】

反応性官能基との反応のために、前記抗体を活性化するステップをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体のグリコシル化部分を化学的に修飾するステップを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出可能な標識は、酵素、フルオロフォア、ルミノフォア、ハプテン、蛍光ナノ粒子、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ハブテンは、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、プロモデオキシウリジン、マウス免疫グロブリン、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ハブテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ジニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロビアリアル、アゾアリアル、またはベンゾジアゼピン、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ハブテンは、NHS - PEG リンカーを使用して、前記反応性官能基を介して、前記特異的結合分子に連結される、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記検出可能な標識はハブテンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

複数の異なるハブテンは、前記ポリマー担体に連結される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

第 3 の分子を前記反応性官能基のうちの少なくとも 1 つと反応させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

抗体の Fc 部分を酸化して、酸化 Fc 部分を作製するステップと、
少なくとも 1 つの反応性ヒドラジド官能基を介して、前記ポリマー担体を前記抗体の前記酸化 Fc 部分に連結して、第 1 の化合物を作製するステップと、
反応性ヒドラジド官能基を介して、前記第 1 の化合物を少なくとも 1 つのハブテンに連結して、第 2 の化合物を作製するステップと、を含む、
請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

前記ハブテンは、NHS - PEG リンカーを使用して、反応性ヒドラジド官能基を介して前記特異的結合分子に連結される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 の化合物を複数のハブテンに連結するステップを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 3】

前記第 1 の化合物を複数の異なるハブテンに連結するステップを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記多糖類は、糖質、セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、アミドデキストラン、ヒドラジドデキストラン、ヒドラジンデキストラン、グリコーゲン、ポリヒアルロン酸、およびデンプンから選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ポリアミノ酸は、ポリ(アスパラギン)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(リシン)、ポリ(グアニジン)、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 2 に記載の共役体。

40

【請求項 2 6】

前記分子共役体は、ポリハブテニル化共役体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載の方法に従って産生される共役体。

【請求項 2 8】

ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される、少なくとも 1 つの反応性官能基を含む、ポリマーリンカーによって提供される、反応性官能基を介

50

して検出可能な標識に共有結合された特異的結合分子を含む、共役体。

【請求項 29】

前記ポリマーリンカーは、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン - a l t - マレイン酸、ポリアミノ酸またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含み、前記ポリマー部分は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基を含む、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 30】

前記ポリマーリンカーは、ポリアクリルアミドまたはポリビニルピロリドン部分を含む、請求項 28 に記載の共役体。

10

【請求項 31】

前記特異的結合分子は、アビジン、抗体、核酸、ペプチド核酸 (P N A)、またはアプタマーである、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 32】

前記特異的結合分子は抗体である、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 33】

前記ポリマーリンカーは、 P E G ベースのヒドラジドリンカーである、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 34】

前記検出可能な標識は、酵素、フルオロフォア、ルミノホル、ハプテン、蛍光ナノ粒子、またはそれらの組み合わせである、請求項 28 に記載の共役体。

20

【請求項 35】

前記検出可能な標識は、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、プロモデオキシウリジン、マウス免疫グロブリン、またはそれらの組み合わせから選択されるハプテンである、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 36】

前記検出可能な標識は、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ジニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、またはそれらの組み合わせから選択されるハプテンである、請求項 28 に記載の共役体。

30

【請求項 37】

前記ポリマーリンカーは、複数のヒドラジド官能基を有する、すなわち、ヒドラジド基を介して、抗体の酸化 F c 部分および少なくとも 1 つの検出可能な標識に連結される、ポリアクリルアミドヒドラジドである、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 38】

ポリハプテニル化共役体を含む、請求項 28 に記載の共役体。

【請求項 39】

前記多糖類は、糖質、セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、アミドデキストラン、ヒドラジドデキストラン、ヒドラジンデキストラン、グリコーゲン、ポリヒアルロン酸およびデンブunから選択される、請求項 29 に記載の共役体。

40

【請求項 40】

前記ポリアミノ酸は、ポリ (アスパラギン)、ポリ (アスパラギン酸)、ポリ (グルタミン酸)、ポリ (グルタミン)、ポリ (リシン)、ポリ (グアニジン)、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 29 に記載の共役体。

【請求項 41】

前記分子共役体は、ポリハプテニル化共役体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 42】

試料における標的に対して診断分析を行うための方法であって、

前記試料を、標的に特異的に結合する特異的結合分子と接触させるステップであって、

50

前記特異的結合分子は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基を含むポリマーリンカーを介して、検出可能な標識に共役されるステップと、

前記検出可能な標識を使用する前記標識に結合される前記特異的結合分子を検出するステップと、

を含む、方法。

【請求項 4 3】

前記ポリマーリンカーは、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン - a l t - マレイン酸、ポリアミノ酸、またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

前記ポリマーリンカーは、ポリアクリルアミドヒドラジドまたはポリビニルピロリドンヒドラジドである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記特異的結合分子は、アビジン、抗体、核酸、ペプチド核酸 (P N A)、またはアプタマーである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記特異的結合分子は抗体である、請求項 4 2 に記載の方法。

20

【請求項 4 7】

前記検出可能な標識は、酵素、フルオロフォア、ルミノホル、ハプテン、蛍光ナノ粒子、またはそれらの組み合わせである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記検出可能な標識はハプテンであり、前記方法は、前記試料を抗ハプテンと接触させるステップをさらに含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記ハプテンは、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、プロモデオキシウリジン、マウス免疫グロブリン、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

30

【請求項 5 0】

前記ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ジニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記特異的結合分子は、分子量 1 0 , 0 0 0 以下であって、複数の反応性ヒドラジド官能基を含む非チオール化ポリアクリルアミドヒドラジド担体によって、検出可能な標識に共役される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記分析は、試料における 2 つ以上の異なる標的に対する多重診断分析であって、前記試料を、 2 つ以上の異なる標的に特異的に結合する 2 つ以上の特異的結合分子と接触させるステップであって、前記 2 つ以上の特異的結合分子は、前記ポリマーリンカーの反応性官能基を介して、異なるハプテンに共役されるステップと、

40

前記試料を、個別に検出され得る 2 つ以上の異なる抗ハプテンと接触させるステップと、を含む、

請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記試料を抗抗体抗体と接触させるステップをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

50

前記多糖類は、糖質、セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、アミドデキストラン、ヒドラジドデキストラン、ヒドラジンデキストラン、グリコーゲン、ポリヒアルロン酸およびデンプンから選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記ポリアミノ酸は、ポリ(アルギニン)、ポリ(アスパラギン)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(グルタミン)、およびポリ(リシン)、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記特異的結合分子は、酸化Fc部分を含む抗体であり、前記ポリマーリンカーは、反応性官能基を介して、前記酸化Fc部分に連結される、請求項 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

前記ハプテンは、NHS-PEGリンカーを使用して、前記ポリマー担体の反応性官能基を介して、前記特異的結合分子に連結される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 8】

複数の異なるハプテンは、前記ポリマーリンカーに連結される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記特異的結合分子は抗体であり、前記方法は、

前記試料を、2つ以上の一次抗体と接触させるステップであって、前記一次抗体のそれぞれは、異なるハプテンに共役されるステップと、

20

前記試料を、2つ以上の二次抗ハプテン抗体と接触させるステップであって、前記二次抗ハプテン抗体のそれぞれは、異なる量子ドットに共役されるステップと、を含む、

請求項 4 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

本出願は、2007年5月23日に出願された米国仮出願第60/931,546号の先の出願日の利益を請求するものであり、参照することによって本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

本発明は、分子共役体、特に、複数の反応性官能基を有するポリマー担体を含むFc特異的共役体、開示される例示的な共役体を作製するための方法の実施形態、および該共役体を使用するための方法の実施形態に関する。

【背景技術】

【0003】

生物分子共役体は、試料において特定の標的分子を検出するための免疫測定に使用することができる。抗体検出可能な標識共役体および抗体酵素共役体を含む種々の共役体が知られており、これらの共役体を作製するための多くの方法が開発されている。例えば、抗体共役体は、少なくとも2つの反応基を有するカップリング試薬を使用して調製される場合が多い。該基のうちの1つを使用して抗体に連結し、別の官能基を検出可能な標識に連結する。これらの連結反応は、所望の目的に対する共役体の性能を妨げる。例えば、連結は、立体効果、適切な機能に重要な反応性官能基の不活性化、溶解性の変化等により、抗体酵素共役体を不活性化し得る。その結果、先の努力にもかかわらず、依然として、分子共役体、およびより優れた分析感度を提供する、それらを産生および使用するための方法が必要とされる。

40

【0004】

Ventana Medicalは、この一般的領域におけるいくつかの特許および出願の譲受人であり、2005年7月21日、米国特許公開第2005/0158770号

50

として公開された米国特許出願第 11 / 018 , 897 号、名称「Microwave Mediated Synthesis of Nucleic Acid Probes (核酸プローブのマイクロ波媒介合成)」、2005 年 11 月 23 日出願の米国仮出願第 60 / 739 , 794 号および対応する実用新案第 11 / 603 , 425 号、名称「Molecular Conjugate (分子共役体)」、米国仮出願第 60 / 856 , 133 号および対応する実用新案第 11 / 982 , 627 号、名称「Haptens, Hapten Conjugates, Compositions Thereof and Method for their Preparation and Use (ハプテン、ハプテン共役体、その組成物およびそれらの調製および使用方法)」を含む。これらの先行出願のそれぞれは、参照することによって本明細書に組み込まれる。'897 特許の実施例 12 は、ポリアクリルアミドヒドラジドを作製するための一方法を開示している。'897 特許出願は、米国特許公報第 2005 / 0158770 号、第 0044 段落で「本発明は、標識シトシン、標識シチジン、またはオリゴヌクレオチド、DNA 分子、RNA 分子、タンパク質、ペプチド、または他の生体分子等の標識シチジン含有生体分子、を調製するための方法を提供する」と記載している。さらに、該出願は、「フルオロフォアおよび求核基で官能化される線状ポリマーは、有用なレポーター含有部分としても機能し得る。」と述べている。また米国特許公報第 2005 / 0158770 号、第 0068 段落では、「好適な官能化ポリマーは、フルオロフォアで官能化されたポリアクリルアミドヒドラジド、特に、ポリマー鎖ごとに 10 ~ 40 のヒドラジド基を担持する分子量 10 , 000 ~ 20 , 000 の PAH である。」と記載している。米国特許公報第 2005 / 0158770 号、第 0053 段落は、レポーター基は、ハプテンおよびタンパク質を含む、「プローブを標識するために一般に使用される任意の検出可能部分」を含むと定義される。

【0005】

'425 出願のスキーム 11 に従って、抗体の Fc 部分は、酸化されてアルデヒドを作製し、次いで、チオール化ヒドラジドは、ヒドラジド窒素とカルボニルとの反応によって抗体の Fc 部分に結合される。'425 出願のスキーム 13 に従って、抗体の酸化 Fc 部分に結合されるチオール化ヒドラジドは、チオール反応性官能基を有するアルカリホスファターゼと反応して、共役体を作製する。またスキーム 19 に従って、ポリアクリルアミドヒドラジドを最初に合成し、次いで、実施例 22 に記載されているように、

適切な溶媒において、結果として得られた PAH を、チオール - dPEG - NHS エステル (Quanta Biodesign, Powell, OH) または Traut 試薬等のチオール化剤と反応させて、使用可能なヒドラジド (z = 5 ~ 40) の一部 (例えば、約 50 ~ 75%) をチオール化し、開示される方法において使用できるポリマー多機能ヒドラジドチオールリンカーを提供する。

【0006】

¹ 出願人は、試薬は S - アセチル - dPEG - NHS エステルと称されなければならないことを記載している。

【0007】

現在理解されているように、'897 出願において開示される PAH 共役体のすべての実施形態は、実施例 22 において開示されるようにチオール化される、反応性ヒドラジド官能基の少なくとも一部を有する。さらに、ヒドラジドのチオール化によってもたらされるチオール基は、共役体を作製するために使用される反応性部分である。

【発明の概要】

【0008】

所定の開示される本発明の実施形態は、免疫グロブリンへの合成、誘導體化、共役、および複数の対象分子と反応する複数の反応性官能基を有する離散的な比較的短いポリマーに基づく信号増幅に関する。開示される実施形態の多くは、実質的に水溶性または完全に水溶性のポリマーに関する。例示的な PAH を参照して、かかるポリマーは完全に水溶性であり、ゼロを上回るヒドラジド官能基、より典型的には約 5 から少なくとも 100 まで

のヒドラジド基等の多数の反応性ヒドラジドを表示し得る。反応性官能基は、ヒドラジド等の関連官能基によって占められる潜在的な位置のパーセンテージを参照して定量することができる。本実施形態の場合、反応性官能基は、より典型的には、少なくとも10%、および少なくとも50%までの反応性官能基となり得る潜在的な位置を含む。ヒドラジド等の反応性官能基は、種々のハプテンで誘導体化され得る。担体上の残りのヒドラジドは、抗体のFc領域の酸化糖質に直接共役され得る。ヒドラジドの低pKaは、抗体の糖質酸化によって生成されるアルデヒド基のプロトン化が、ポリマーハプテン担体の共役を促進することにおいて、特定の利点を提供する。さらに、担体は、抗体のFc領域において、IgGの結合部位から離れて導入される。結果として生じた共役体は、単一ハプテンで誘導体化されたFcに基づくものと比較して、非常に大きな信号増幅を示した。

10

【0009】

開示される方法の一実施形態は、ポリアクリルアミドヒドラジド担体によって提供される反応性ヒドラジド官能基を介して、特異的結合分子を検出可能な標識に結合することによって、分子共役体を作製するステップに関する。ポリアクリルアミドヒドラジドは、好ましくは、水溶性である。ポリマー部分の平均分子量は異なり得、典型的には、わずか50~少なくとも約100,000、より典型的には約1,000~約50,000、さらにより典型的には約5,000~約40,000である。所定の開示される実施形態は、約10,000以下の平均分子量を有するポリアクリルアミドヒドラジドを使用する。また特定の実施形態の場合、ポリアクリルアミドヒドラジドのヒドラジド官能基は、非チオール化される。

20

【0010】

特定の開示される実施形態は、特異的結合分子を反応性官能基の少なくとも一部に結合することによって、第1の化合物を作製するステップを含む。第1の化合物の残りの反応性官能基の少なくとも一部は、次いで、ハプテン等の検出可能な標識に連結され得る。代替えとして、複数の反応性官能基を含むポリマー担体は、ハプテン等の検出可能な標識に結合することができる。第1の化合物の残りの反応性官能基の少なくとも一部は、次いで、特異的結合分子に結合され得る。

【0011】

特定の実施形態は、特異的結合分子としての抗体に関する。例えば、ポリマー担体は、反応性ヒドラジド官能基を介して、抗体のFc部分に結合することができる。抗体は、例えば、抗体のグリコシル化部分を化学的に修飾することによって、反応性官能基との反応のために活性化することができる。所定の実際の実施形態において、抗体は、酸化によって化学的に活性化され、アルデヒド等のカルボニル担持化合物を作製する。

30

【0012】

開示される実施形態の多くは、検出可能な標識としてのハプテンの使用に関する。ハプテンは、現在知られている、または今後発見または開発される、任意のハプテンであり得、該方法の開示される実施形態を実施するために適している。多くのハプテンが知られており、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、またはそれらの組み合わせの分析手順に頻繁に使用される。他のハプテンは、具体的には、Ventana Medical Systemによって開発され、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリゲナン、およびそれらの組み合わせから選択されるハプテンを含む。複数の異なるハプテンは、ポリマー担体に結合され得る。さらに、ハプテン等の化合物は、NHS-PEGリンカー等のリンカーを使用して、ポリマー担体に結合することができる。

40

【0013】

特定の開示される一実施形態は、分子共役体を作製するための方法に関し、ポリアクリルアミドヒドラジド担体によって、特異的結合分子を検出可能な標識に結合するステップを含む。担体は、平均分子量10,000以下であり、複数の反応性非チオール化ヒドラジド官能基を有する。

50

【0014】

ポリアクリルアミドヒドラジド担体を使用する現在好適な実施形態は、典型的には、平均分子量が約10,000以下のポリアクリルアミドポリマー担体を提供するステップを含み、複数の反応性非チオール化ヒドラジド官能基を含む。抗体のFc部分は、酸化されてアルデヒドを作製する。ポリマー担体は、少なくとも1つの反応性ヒドラジド官能基を介して、抗体の酸化Fc部分に結合され、第1の化合物を作製する。第1の化合物は、次いで、反応性ヒドラジド官能基を介して、少なくとも1つのハプテンに結合され、第2の化合物を作製する。

【0015】

本発明は、ポリアクリルアミドヒドラジドを含む共役体にも関する。例えば、開示される共役体の一実施形態は、ポリアクリルアミドヒドラジドリンカーによって提供される、反応性ヒドラジド官能基を介して検出可能な標識に共有結合される、特異的結合分子を含む。共役体は、官能化末端を有する化合物等のPEGベースのヒドラジドリンカー、およびヒドラジドまたはヒドラジド誘導体官能基を含む遠位端も含み得る。検出可能な標識は、典型的には、酵素、フルオロフォア、ルミノフォロセメント分子、ハプテン、蛍光ナノ粒子、またはそれらの組み合わせから選択される。例示的な酵素は、アルカリンホスファターゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。例示的な周知のハプテンは、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、またはそれらの組み合わせを含む。Ventana Medicalによって開発された追加の例示的なハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラン、トリ
10
20
テルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、またはそれらの組み合わせを含む。特異的結合分子は、抗体である場合が多く、抗ハプテン抗体および抗抗体抗体を含む。

【0016】

ポリアクリルアミドヒドラジド担体は、診断分析プロセスにおいて使用することもできる。かかるプロセスの開示される一実施形態は、特異的に標的に結合する特異的結合分子と試料を接触させるステップを含む。特異的結合分子は、ポリアクリルアミドヒドラジド担体を介して、検出可能な標識に共役される。特異的結合分子は、次いで、検出可能な標識を使用して検出される。開示される共役体は、多重分析に使用することもできる。例えば、開示される実施形態は、試料中の2つ以上の異なる標的に対する多重診断分析を含み、該方法は、特異的に2つ以上の異なる標的に結合する2つ以上の特異的結合分子と試料
30
を接触させるステップを含む。2つ以上の特異的結合分子は、ポリアクリルアミドハプテン担体の反応性ヒドラジド官能基を介して、異なるハプテンに共役される。試料は、次いで、個別に検出できる2つ以上の異なる抗ハプテン抗体と接触する。

【0017】

所定の開示される実施形態は、特にポリアクリルアミドヒドラジド担体の使用を対象とするが、他のポリマー担体も考慮される。これらの実施形態の場合、分子共役体を作製するための開示される一方法は、ポリマー担体によって提供される反応性官能基を介して、特異的結合分子を検出可能な標識に結合するステップを含む。ポリマー担体は、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン-alt-マレイン酸、またはポリ
40
ビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含む。ポリマー部分は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される、複数の反応性官能基も含む。例示的な多糖類種は、糖質、セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、グリコーゲン、ポリヒアルロン酸、およびデンプンから選択され得る。例示的なポリアミノ酸は、ポリ(アルギニン)、ポリ(アスパラギン)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(グルタミン)、ポリ(リシン)、またはそれらの組み合わせから選択され得る。

【0018】

特定の実施形態の場合、該方法は、特異的結合分子を反応性官能基の少なくとも一部に
50

結合することによって、第1の化合物を作製するステップを含む。第1の化合物の任意の残りの非反応性官能基の少なくとも一部は、検出可能な標識に結合される。代替えとして、該方法は、検出可能な標識を反応性官能基の少なくとも一部に連結することによって、第1の化合物を作製するステップと、次いで、第1の化合物の残りの反応性官能基の少なくとも一部を特異的結合分子に結合するステップと、を含み得る。

【0019】

特異的結合分子のクラスは抗体である。該方法は、反応性官能基を介して、ポリマー担体を抗体のFc部分に結合するステップを含む。さらに、反応性官能基と反応させるために、例えば、抗体のグリコシル化部分を化学的に修飾することによって、抗体を活性化してもよい。

【0020】

特異的結合分子は抗体であり、検出可能な標識は、ポリアクリルアミドヒドラジド担体を参照して説明されるように、ハプテンであり得る。複数の異なるハプテンは、ポリマー担体に結合され得、任意の1つ以上のかかるハプテンは、PEGベースのリンカー等のリンカーを使用して、担体に結合され得る。

【0021】

共役体を作製するための該方法の特定の実施形態は、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン-alt-マレイン酸、ポリアミノ酸またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含むポリマー担体を提供するステップを含む。ポリマー部分は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基を含む。抗体のFc部分は、酸化されてアルデヒドを作製する。ポリマー担体は、反応性官能基を介して、抗体の酸化Fc部分および少なくとも1つのハプテン、および潜在的に複数の異なるハプテンに連結される。

【0022】

該方法の開示される一実施形態は、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン-alt-マレイン酸、ポリアミノ酸、またはポリビニルピロリドンから選択される、ポリマー部分を含むポリマー担体を提供することによって、分子共役体を作製するステップを含む。ポリマー部分は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基も含む。特定の結合分子は、反応性官能基を介してポリマー担体に結合される。ハプテンは、反応性官能基を介してポリマー担体にも結合され、該ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、およびそれらの組み合わせから選択される。

【0023】

ポリアクリルアミドヒドラジド以外のポリマー担体を含む分子共役体についても説明される。例示的な共役体は、ポリアクリルアミド-N-ヒドロキシスクシニミド、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン-alt-マレイン酸、ポリアミノ酸、またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含む、ポリマー担体を介して、検出可能な標識に結合される特異的結合分子を含む。ポリアクリルアミド-N-ヒドロキシスクシニミドポリマー材料に関する追加情報は、Pollackらの「Enzyme Immobilization by Condensation Copolymerization into Cross-Linked Polyacrylamide Gels」JACS, Vol. 102, P. 6324-6336において見出すことができ、参照することによって本明細書に組み込まれる。担体は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基も含む。例示的な多糖類種は、糖質、セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、グリコーゲン、ポリヒアルロン酸、およびデンプンを含む。所定の実施形態は、酸化種、特

10

20

30

40

50

に酸化多糖類も使用する。例えば、デキストランは、臭素等の過ヨードまたはハロゲンを含む、適切な酸化剤を使用して酸化して、カルボニル担持種、典型的にはアルデヒドであるが、潜在的にはケトン等の他のカルボニル担持種を産生することができる。例示的なポリアミノ酸は、ポリ(アルギニン)、ポリ(アスパラギン)、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(グルタミン酸)、ポリ(グルタミン)、およびポリ(リシン)を含む。担体は、ポリ(グアニジン)またはポリ(アミノグアニジン)でもあり得る。

【0024】

ポリアクリルアミドヒドラジドと同様に、他の開示されるポリマー担体は、試料中の標的に対して診断分析を行うために使用することができる。所定の開示される実施形態は、特異的に標的に結合する特異的結合分子と試料を接触させるステップを含み、該特異的結合分子は、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン - a l t - マレイン酸、ポリアミノ酸、またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を含むポリマー担体を介して、検出可能な標識に結合される。ポリマー担体は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基を含む。特異的結合分子は、検出可能な標識を使用して検出される。試料中の2つ以上の異なる標的に対する多重診断分析の一実施形態は、特異的に2つ以上の異なる標的を結合する2つ以上の特異的結合分子と試料を接触させるステップを含む。2つ以上の特異的結合分子は、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、多糖類、ポリエチレン - a l t - マレイン酸、ポリアミノ酸、またはポリビニルピロリドンから選択されるポリマー部分を有するポリマーハブテン担体を介して、異なるハブテンに共役される。他の開示される実施形態と同様に、ポリマー担体は、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基も含む。次いで、個別に検出できる2つ以上の異なる抗ハブテン抗体と試料を接触させる。

【0025】

例示的なPAHの開示される実施形態を使用して確立されている単一の遺伝子検出を用いて、染色結果の比較も提供される。同様に、ストレプトアビジン官能化量子ドットの信号は、FcでのFc誘導ポリマービオチン担体において著しく強化される。HER2DNA遺伝子プローブのin situハイブリダーゼーション下で、Fcでのポリマービオチン担体は、非ポリマービオチンリンクと比較して、量子ドット信号の検出を強化する。所定の開示される実施形態は、特定の一ポリマーハブテン担体、つまりPAHに関するが、しかしながら、本明細書で開示されるように、多くの異なる担体を合成および使用してもよい。これらは一例として含まれ、限定なしに、ハブテンで好適に誘導体化されたポリアクリル、ポリグルコシド、ポリグルタミン酸、ポリリシン、ポリアスパラギン酸をすべて使用してもよい。同様に、本発明の範囲は、ビオチン - ストレプトアビジンベースの系に限定されない。むしろ、多種のハブテンおよび信号生成体に共役される対応する抗体、例えば酵素、ナノ粒子、量子ドット、フルオロフォア、化学ルミノホルを開示される実施形態に使用してもよい。

【0026】

本発明の前述のおよび他の目的、特徴、および利点は、以下の発明を実施するための形態からより明らかになり、付随の図面を参照して進める。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】Fc特異的ハブテニル化抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する図である。

【図2】Fc特異的Abヒドラジド官能化ポリマー - ポリハブテン共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する図である。

【図3】Fc特異的ビオチニル化抗体とのストレプトアビジン量子ドット655共役体を使用する、扁桃腺上のKi - 67の染色を説明する写真である(655nmフィルタ、倍

10

20

30

40

50

率 20x)。

【図4】ビオチニル化ポリアクリルアミドヒドラジド抗体とのストレプトアビジン量子ドット655共役体を使用する、扁桃腺上のKi-67の染色を説明する写真である(655nmフィルタ、倍率20x)。

【図5】Fc特異的ビオチニル化抗体とのストレプトアビジン量子ドット655共役体を使用する、扁桃腺上の1:10希釈のKi-67の染色を説明する写真である(655nmフィルタ、倍率20x)。

【図6】ビオチニル化ポリアクリルアミドヒドラジド抗体とのストレプトアビジン量子ドット655共役体を使用する、扁桃腺上の1:10希釈のKi-67の染色を説明する写真である(ロングパスフィルタ、Omega Optical XFO5-2、倍率20x)。

【図7】QDot IHC検出のための染色プロトコルの一実施形態を説明する。

【図8】抗ポリアクリルアミドヒドラジドニトロピラゾール共役体との抗ニトロピラゾール量子ドット655共役体を使用する、扁桃腺組織の染色を説明する写真である(ロングパスフィルタ、Omega Optical XFO5-2、倍率20x)。

【図9】抗ポリアクリルアミドヒドラジドベンゾフラザン共役体との抗ベンゾフラザン量子ドット585共役体を使用する、扁桃腺組織の染色を説明する写真である(ロングパスフィルタ、Omega Optical XFO5-2、倍率20x)。

【図10】抗ポリアクリルアミドヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル量子ドット605共役体を使用する、扁桃腺組織の染色を説明する写真である(ロングパスフィルタ、Omega Optical XFO5-2、倍率20x)。

【図11】抗ポリアクリルアミドヒドラジドチアゾールスルホンアミド共役体との抗チアゾールスルホンアミド量子ドット565共役体を使用する、扁桃腺組織の染色を説明する写真である(ロングパスフィルタ、Omega Optical XFO5-2、倍率20x)。

【図12】HPV AP-ISH検出のための染色プロトコルの一実施形態を説明する。

【図13】HPV SISH検出のための染色プロトコルの一実施形態を説明する。

【図14】CaSki細胞(400~600コピー)上でFc特異的ビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図15】HeLa細胞(10~50コピー)上でFc特異的ビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図16】SiHa細胞(1~2コピー)上での異種移植組織(倍率40x)ビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体、Fc特異的ビオチニル化抗体のHPVの染色を説明する写真である。

【図17】C33細胞(0コピー、負の対照)上でFc特異的ビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図18】CaSki細胞(400~600コピー)上でポリアクリルアミドヒドラジドビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図19】HeLa細胞(10~50コピー)上でポリアクリルアミドヒドラジドビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図20】SiHa細胞(1~2コピー)上でポリアクリルアミドヒドラジドビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のHPVの染色を説明する写真である。

【図21】C33細胞上で(0コピー、負の対照)ポリアクリルアミドヒドラジドビオチニル化ヤギ抗ウサギ抗体を使用する、銀検出(倍率40x)による、異種移植組織上のH

10

20

30

40

50

P V の染色を説明する写真である。

【図 2 2】量子ドットを用いた多重 I H C 検出のための染色プロトコルの一実施形態を説明する。

【図 2 3】抗 C D 3 4 ポリアクリルアミドヒドラジドニトロピラゾール共役体との抗ニトロピラゾール量子ドット 6 5 5 共役体を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 4】抗体 K i 6 7 ポリアクリルアミドヒドラジドベンゾフラザン共役体との抗ベンゾフラザン量子ドット 5 8 5 共役体を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 5】抗 ポリアクリルアミドヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル量子ドット 6 0 5 共役体を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 6】抗 C D 4 5 ポリアクリルアミドヒドラジドチアゾールスルホンアミド共役体との抗チアゾールスルホンアミド量子ドット 5 6 5 共役体を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 7】抗 ポリビニルピロリドンヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル - H R P 共役体 / D A B を使用する、扁桃腺組織の染色（O l y m p u s D P 7 1、U P l a n S A p o、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 8】抗 ポリビニルピロリドンヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル量子ドット 6 5 5 を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 2 9】抗 ポリイソブチレン共マレイン酸ヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル - H R P 共役体 / D A B を使用する、扁桃腺組織の染色（O l y m p u s D P 7 1、U P l a n S A p o、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 3 0】抗 ポリイソブチレン共マレイン酸ヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル量子ドット 6 5 5 共役体を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 3 1】ポリアクリル酸ヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル - H R P 共役体 / D A B を使用する、扁桃腺組織の染色（O l y m p u s D P 7 1、U P l a n S A p o、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【図 3 2】抗 ポリアクリル酸ヒドラジドジニトロフェニル共役体との抗ジニトロフェニル量子ドット 6 5 5 を使用する、扁桃腺組織の染色（ロングパスフィルタフィルタ、O m e g a O p t i c a l X F O 5 - 2、倍率 4 0 x）を説明する写真である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

I . 省略形

A b - 抗体

(A b - A P) - 抗体 - アルカリホスファターゼ共役体

A B S - 緩衝酢酸生理食塩水

A P - アルカリホスファターゼ

B S A - ウシ血清アルブミン

C M V - サイトメガロウイルス

d P E G - 4 つのエーテル酸素原子を有する離散的サイズの P E G 化合物を示す d

P E G ₄ 等の離散的なポリエチレングリコール

E B E R - エプスタイン - バーウイルス早期 R N A

D L - 検出可能な標識

F c - 結晶化可能フラグメント

H R P - 西洋ワサビペルオキシダーゼ

10

20

30

40

50

I H C - 免疫組織化学
 I S H - i n s i t u ハイブリダイゼーション
 M A L - マレイミド
 M B C H - メルカプトブチル酸カルボヒドラジド
 M B H - メルカプトブチル酸ヒドラジド
 N H S - N - ヒドロキシスクシニミド
 S B M - 特異的結合分子
 S E C - サイズ排除クロマトグラフィー
 S I S H - 銀 i n s i t u ハイブリダイゼーション

【0029】

10

I I . 用語

特に断りのない限り、専門用語は、従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Oxford University Press 発行の Benjamin Lewin, Genes VII, 2000 (ISBN 019879276X)、Blackwell Publishers 発行、Kendrew et al. (編)の The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0632021829)、および Wiley, John & Sons, Inc. 発行、Robert A. Meyers (編)の Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN 0471186341)、および他の類似参考文献において見出され得る。

20

【0030】

本明細書で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、特に明確な指示がない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「または」という用語は、特に明確な指示がない限り、「および」を含むことを意図する。また本明細書で使用されるように、「備える」という用語は、「含む」を意味する。従って、「AまたはBを備える」とは、A、B、またはAおよびBを含むことを意味する。さらに、ポリペプチドまたは他の化合物に対して与えられるすべてのアミノ酸のサイズ、およびすべての分子量または分子質量値は、概算であって、説明のために提供されることを理解されたい。本明細書に記載されるものに類似または同等の方法および材料は、本開示の実践または試験に使用することができるが、適切な方法および材料は以下で説明される。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照することによって全体として組み込まれる。対立する場合は、用語の説明を含む本明細書に従う。加えて、材料、方法、および実施例は、一例にすぎず、限定することを意図しない。

30

【0031】

本開示の種々の実施例の検討を容易にするために、特定の用語に関する以下の説明を提供する。

【0032】

増幅：所定の本発明の実施形態によって、複数の可視化複合体を使用して、単一標的を検出することができ、該複合体は、特定の標的の同定および/または定量を容易にするために同一であるか、または異なり得る。

40

【0033】

アナログ、誘導体、または模倣体：アナログは、親化合物とは化学構造、例えばホモログ（化学構造における増分、例えば、アルキル鎖の長さの差だけ異なる）、分子フラグメント、1つ以上の官能基が異なる構造、イオン化の変化が異なる分子である。構造アナログは、Remington (The Science and Practice of Pharmacology, 19th Edition (1995), chapter 28) において開示されるような技術を用いて、定量的構造活性相関 (QSAR) を使用して見出される場合が多い。誘導体は、塩基構造に由来する生物活性分子である。模倣体は、生物活性分子等の別の分子の活性を模倣する分子である。生物活性分子は、化合物

50

の生物活性を模倣する化学構造を含み得る。

【0034】

動物：生多細胞脊椎生物、例えば、哺乳類および鳥類を含むカテゴリー。哺乳類という用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳類の両方を含む。同様に、「対象」という用語は、ヒトおよび動物対象の両方、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含む。

【0035】

抗体：「抗体」は、まとめて、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子（一例として、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、それらの組み合わせ、および任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウス等の哺乳類における免疫応答中に産生される同様の分子を含むが、それらに限定されない）、ならびに、サメ免疫グロブリン等の非哺乳類種を指す。「抗体」は、具体的には、他の分子（例えば、対象の分子の結合定数、すなわち、生物試料における他の分子の結合定数よりも少なくとも $10^3 M^{-1}$ より大、少なくとも $10^4 M^{-1}$ より大、または少なくとも $10^5 M^{-1}$ より大である結合定数を有する抗体および抗体フラグメント）への結合を除いて、対象の分子（または対象の極めて類似する分子の群）に結合する、抗体フラグメントも含む。

【0036】

より具体的には、「抗体」は、特異的に抗原のエピトープを認識および結合する、少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。抗体は、重鎖および軽鎖から成り、それぞれ可変重（ V_H ）領域および可変軽（ V_L ）領域と呼ばれる可変領域を有する。 V_H 領域および V_L 領域はともに、抗体によって認識される抗原の結合に関与する。

【0037】

これは、正常な免疫グロブリンおよび当該技術分野でよく知られるそれらの変異体と部分を含む。抗体フラグメントは、タンパク質分解抗体フラグメント[例えば、当該技術分野において知られるような $F(ab')_2$ フラグメント、 Fab' フラグメント、 $Fab'-SH$ フラグメント、および Fab フラグメント]、組み換え抗体フラグメント（例えば、 sFv フラグメント、 $dsFv$ フラグメント、二重特異性 sFv フラグメント、二重特異性 $dsFv$ フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、単鎖 Fv タンパク質（「 $scFv$ 」）、ジスルフィド安定化 Fv タンパク質（「 $dsFv$ 」）、二機能性抗体および三機能性抗体（当該技術分野において知られるような）、およびラクダ科抗体を含む（例えば、米国特許第6,015,695号、第6,005,079号、第5,874,541号、第5,840,526号、第5,800,988号、および第5,759,808号を参照されたい）。 $scFv$ タンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖領域が、リンカーによって結合される融合タンパク質であるが、 $dsFvs$ において、鎖は突然変異してジスルフィド結合を導入し、鎖の関連を安定化している。該用語は、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロ共役体（例えば、二重特異性抗体）等の遺伝子組み換え形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0038】

典型的には、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続される重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。軽鎖にはラムダ（ λ ）およびカッパ（ κ ）の2種類がある。主な重鎖クラス（またはイソタイプ）は5つあり、抗体分子：IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEの機能活性を決定する。

【0039】

重鎖および軽鎖はそれぞれ、定数領域および可変領域を含有する（領域は「ドメイン」としても知られる）。組み合わせると、重鎖および軽鎖可変領域は、特異的に抗原を結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3

10

20

30

40

50

つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、定義されている（参照することによって本明細書に組み込まれる、Kabat et al.のSequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい）。Kabatデータベースは、現在オンラインで維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、比較的種内で保存される。抗体のフレームワーク領域、つまり構成軽鎖および重鎖の複合フレームワーク領域は、CDRを三次元空間に配置および整列する役割を果たす。

【0040】

CDRは、主として抗原のエピトープへの結合に関与する。各鎖のCDRは、典型的には、CDR1、CDR2、およびCDR3と称され、N末端から連続して付番され、また典型的には、特定のCDRが位置付けられる鎖によって同定される。したがって、 V_H CDR3は、それが検出される抗体の重鎖の可変領域に位置付けられるが、 V_L CDR1は、それが検出される抗体の軽鎖の可変領域からのCDR1である。RETを結合する抗体は、特定の V_H 領域および V_L 領域配列、したがって特異的CDR配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原の異なる結合部位）を持つ抗体は、異なるCDRを有する。CDRは抗体によって異なるが、CDR内で限られた数のアミノ酸位置のみが、抗原結合に直接関与する。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。

10

20

【0041】

抗原：具体的には、抗体分子またはT細胞受容体等の特定の体液性または細胞性免疫の産生物によって結合され得る化合物、組成物、または物質。抗原は、任意の種類の子を含み得、例えば、ハプテン、単純中間代謝産物、糖（例えば、オリゴ糖）、脂質、およびホルモンならびに複合糖質（例えば、多糖類）、リン脂質、およびタンパク質等の高い分子を含む。抗原の共通カテゴリーは、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫および他の寄生虫抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギー、および移植の拒絶反応に関与する抗原、毒素、および他の種々の抗原を含むが、それらに限定されない。一実施例において、抗原は、PGA等のBacillus（バシラス）抗原である。

【0042】

アビジン：生物試料中に存在し得る他の小分子を実質的に除いて、特異的にビオチンに結合する任意の種類の子タンパク質。アビジンの例は、卵白、油料種子タンパク質（例えば、大豆ミール）、および穀物（例えば、トウモロコシ（corn/maize））中に自然に存在するアビジン、および細菌起源の子タンパク質であるストレプトアビジンを含む。

30

【0043】

結合親和性：ある分子が別の分子と（典型的には非共役的に）結合する傾向であって、例えば、特異的結合対の別の部材に対する特異的結合対の一部材の傾向。結合親和性は、結合定数として測定することができ、特異的結合対（例えば、抗体/抗原対）の結合親和性は、少なくとも $1 \times 10^5 M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $1 \times 10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ または少なくとも $1 \times 10^8 M^{-1}$ であり得る。一実施形態では、結合親和性は、Frankel et al.のMol. Immunol, 16:101-106, 1979に記載されるScatchard方法の修正によって計算される。別の実施形態では、結合親和性は抗原/抗体解離速度によって測定される。さらに別の実施形態では、高結合親和性は、競争放射免疫測定によって測定される。いくつかの実施例では、抗体/抗原対の高結合親和性は、少なくとも約 $1 \times 10^8 M^{-1}$ である。他の実施形態では、高結合親和性は、少なくとも約 $1.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $2.0 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $3.0 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $3.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $4.0 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも約 $4.5 \times 10^8 M^{-1}$ 、または少なくとも約 $5.0 \times 10^8 M^{-1}$ である。

40

【0044】

50

担体：ハプテンまたは抗原が結合できる分子。担体分子は、免疫原性担体および特異的結合担体を含む。免疫原性担体に結合されると、結合分子は、免疫原性となり得る。免疫原性担体は、結合分子の免疫原性を高める、および/または担体に対する抗体を惹起するように選択され得、診断上、分析上、および/または治療上有益である。担体に対する分子の共有結合は、強化された免疫原性およびT細胞依存をもたらし得る (Pozsgay et al. , PNAS 96 : 5194 - 97 , 1999、Lee et al. , J. Immunol . 116 : 1711 - 18 , 1976、Dintzis et al. , PNAS 73 : 3671 - 75 , 1976)。有用な担体は、ポリマー担体を含み、自然 (例えば、細菌またはウイルスからのタンパク質)、反応体部分が付着可能な1つ以上の官能基を含有する半合成または合成材料であり得る。特異的結合担体は、抗体、アビジン等を含む任意の種類の特異的結合部分であり得る。

10

【0045】

キメラ抗体：ヒト等の一種からのフレームワーク残基、および特異的にRETを結合するネズミ抗体等の、別の種からのCDR (概して抗原結合をもたらす)を有する抗体。

【0046】

共役体：「共役体」は、より大きい組成物に共有結合される、2つ以上の分子 (および/またはナノ粒子等の材料)を指す。いくつかの実施形態では、共役体は、1つ以上の他の生分子等の1つ以上の他の分子に共有結合される1つ以上の生分子 (例えば、ペプチド、タンパク質、酵素、糖、多糖類、脂質、糖タンパク質、およびリポタンパク質)を含む。他の実施形態では、共役体は、1つ以上の検出可能な標識 (例えば、フルオロフォア、ルミノホル、蛍光ナノ粒子、ハプテン、酵素、およびそれらの組み合わせ)に共有結合される1つ以上の特異的結合分子 (例えば、抗体)を含む。

20

【0047】

共役する (Conjugating)、結合する (Coupling、Joining、BondingまたはLinking)：1つの分子を別の分子に共有結合して、より大きい分子を作製すること。例えば、2つのポリペプチドを1つの隣接ポリペプチド分子にすること、またはハプテンまたは他の分子をscFv抗体等のポリペプチドに共有結合すること。特定の文脈では、該用語は、抗体部分等のリガンドをエフェクタ分子 (「EM」)に結合することへの言及を含む。結合は、化学的または組み換え手段のいずれかによって行われ得る。

30

【0048】

反応性ヒドラジド官能基を通じた検出可能な標識への特異的結合分子の結合：ヒドラジド官能基の窒素原子に対する直接共有結合によって、別の分子に特異的結合分子を共有結合することを指す。

【0049】

検出可能な標識：試料中の標識の存在および/または濃度を示す、(例えば、視覚的、電子的、またはその他で)検出可能な信号を産生できる分子または材料。特異的結合分子に共役されると、検出可能な標識を使用して、特異的結合分子が配向される標的を位置付けおよび/または定量することができる。したがって、試料中の標的の存在および/または濃度は、検出可能な標識によって産生される信号を検出することによって、検出することができる。検出可能な標識は、直接的または間接的に検出することができ、異なる特異的結合分子に結合されるいくつかの異なる検出可能な標識は、組み合わせて使用して、1つ以上の標的を検出することができる。例えば、標的に特異的な抗体に結合されるハプテン等の第1の検出可能な標識は、特異的に第1の検出可能な標識を結合する分子に共役される第2の検出可能な標識の使用によって、間接的に検出することができる。個別に検出できる複数の検出可能な標識は、特異的に、異なる標識を結合する異なる特異的結合分子に共役して、試料中の複数の標的の同時検出を提供できる多重アッセイを提供することができる。検出可能な信号は、任意の知られている機構または未だ発見されていない機構によって生成することができ、光子 (無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数、および紫外線周波数光子)の吸収、放射、および/または分散を含む。検出可能

40

50

な標識は、着色、蛍光、リン光、および発光性分子および材料、1つの物質を別の物質に変換して、（例えば、無色の物質を着色物質に変換するか、またはその逆によって、あるいは沈殿物を産生するか、または試料の濁度を増化することによって）検出可能な相違をもたらす触媒（例えば、酵素）、追加の検出可能な標識化抗体共役体を使用し、抗体-ハプテン結合相互作用によって検出できるハプテン、および常磁性および磁気性分子または材料を含む。検出可能な標識の特定の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、またはグルクロニダーゼ等の酵素、フルオロセイン、ルミノホル、クマリン、BODIPY染料、レソルフィン、およびローダミン等のフルオロフォア（蛍光分子の多くの追加例は、The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, ORにおいて見出すことができる）、量子ドット等のナノ粒子（例えば、Quantum Dot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Hayward, CAから取得、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる米国特許第6,815,064号、第6,682,596号および第6,649,138号も参照されたい。）、 Gd^{3+} のような放射性または常磁性金属イオンのDOTAおよびDPTAキレート等の金属キレート、および例えば、捕捉蛍光分子を含有するリポソーム等のリポソームを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色原体等の検出可能な基質、蛍光性化合物、または発光性化合物を該酵素と組み合わせて使用し、検出可能な信号を生成することができる（多種多様なかかる化合物は、例えば、Invitrogen Corporation, Eugene ORから商業的に入手できる）。発色性化合物の特定の例は、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニルリン酸（pNPP）、ファストレッド、プロモクロロインドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸]（ABTS）、o-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド（ONPG）、o-フェニレンジアミン（OPD）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、p-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド（PNP）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド（X-Gluc）、3-アミノ-9-エチルカルバゾル（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルーおよびテトラゾリウムバイオレットを含む。あるいは、酵素を金属組織検出スキームで使用することができる。金属組織検出方法は、アルカリホスファターゼ等の酵素を水溶性金属イオンおよび該酵素の酸化還元不活性な基質と組み合わせて使用するステップを含む。該基質は、酵素によって酸化還元活性な薬剤に変換され、酸化還元活性な薬剤は、金属イオンを還元し、検出可能な沈殿物を形成する（それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる、例えば、2004年12月20日に出願された同時係属中の米国特許出願第11/015,646号、PCT公開番号第2005/003777号、および米国特許出願公開第2004/0265922号を参照されたい）。金属組織検出方法は、水溶性金属イオン、酸化剤、および還元剤と併せて、酸化還元酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）を使用して、再度検出可能な沈殿物を作製するステップを含む（例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,670,113号を参照されたい）。ハプテンは、特異的に抗体によって結合される小分子であるが、それら自体は動物において免疫応答を惹起せず、免疫応答を生成するには、最初にタンパク質等のより大きい担体分子に付着されなければならない。ハプテンの例は、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、およびフルオレセインを含む。オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラン、トリベルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリンおよびシクロリグナンハプテンの追加の例は、参照することによって本明細書に組み込まれる、2006年11月1日

に出願された同時係属中の米国仮特許出願第 60 / 856133 号において開示されている。

【0050】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性、すなわち特異的免疫応答を惹起する分子上の特定化学基または隣接あるいは非隣接ペプチド配列である。抗体は、特定の抗原性エピトープを結合する。

【0051】

Fc 特異的共役体：第 2 の分子（例えば、検出可能な標識）が免疫グロブリン（またはグリコシル化部分を維持する免疫グロブリンのフラグメント）のグリコシル化部分に共有結合される免疫グロブリン（またはそのフラグメント）の共役体。免疫グロブリンのグリコシル化部分は、Fc 領域において見出され、免疫グロブリンの特異的結合活性に關与する免疫グロブリンの部分の外側の位置において免疫グロブリンの重鎖上に位置付けられる免疫グロブリンの領域である。

10

【0052】

ハプテン：分子、典型的には、具体的に抗体と結合可能であるが、典型的には担体分子との組み合わせの場合を除いて実質的に免疫原性であり得ない小分子。

【0053】

ホモポリマー：この用語は、単一モノマー（例えば、アミノ酸）等の単一の分子種の複数の単位を併せて結合することによって作製されるポリマーを指す。

20

【0054】

ヒト化抗体：ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体。ヒト化抗体は、CDR を提供するドナー抗体として同一抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体のアクセプタフレームワークは、ドナーフレームワークから得られるアミノ酸による限定数の置換を有する。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に実質的に影響しない追加の保存アミノ酸置換を有し得る。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学によって構成することができる（例えば、米国特許第 5,585,089 号を参照されたい）。

【0055】

ヒト化免疫グロブリン：ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリンからの 1 つ以上の CDR を含む免疫グロブリン。CDR を提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と称され、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプタ」と称される。一実施形態では、すべての CDR は、ヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンに由来する。定数領域は、存在する必要はないが、存在する場合は、ヒト免疫グロブリン定数領域に実質的に同一、すなわち、少なくとも約 85 ~ 90 %、例えば、約 95 % 以上同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、場合によっては CDR を除いて、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。

30

【0056】

ヒドラジドまたはヒドラジド基：ヒドラジド基（ $-CO-NH-NH_2$ ）、カルボヒドラジド基（ $-NH-NH-CO-NH-NH_2$ ）、セミカルバジド基（ $-NH-CO-NH-NH_2$ ）、チオセミカルバジド基（ $-NH-CS-NH-NH_2$ ）、チオカルバジド基（ $-NH-NH-CS-NH-NH_2$ ）、カルボン酸ジヒドラジド基（ $-NH-CO-NH-NH-CO-NH-NH_2$ ）またはその硫黄含有誘導体、またはヒドラジンカルボキシレート基（ $-O-CO-NH-NH_2$ ）またはその硫黄含有誘導体。

40

【0057】

ヒドラジド反応性基：ヒドラジド基と反応し、共有結合を作製できる原子の基。アルデヒドおよびケトン基は、ヒドラジド反応性基の例である。ヒドラジド反応性基は、分子の不可欠な要素であり得るか、または分子に導入され得る。アルデヒド基（ヒドラジド反応性基）を多糖類および糖タンパク質（抗体を含む）に導入するための一方法は、隣接ジオールの過ヨード酸媒介酸化等の酸化による。加えて、不飽和脂肪酸およびセラミドにおけ

50

る二重結合は、四酸化オスミウムによってジオールに変換され得、次いで、過ヨード酸によってアルデヒドに酸化される。さらに、ペプチドおよびタンパク質のN末端セリンおよびトレオニン残基は、過ヨード酸によって選択的にアルデヒド基に酸化され得、コルチコトロフィンおよびラクタマーゼ等の所定のタンパク質の選択的修正を可能にする。過ヨード酸酸化抗体の修正は、典型的には抗体を不活性化しない。酸化反応中の過ヨウ素酸ナトリウムの濃度を変えることで、修正される糖残基の種類に関していくつかの特異性を付与する。例えば、0.1の1mM過ヨウ素酸ナトリウムは、典型的には、シアル酸残基の炭素原子7、8、および9の間の隣接するヒドロキシルにおいてのみ開裂する。10mM以上の濃度の過ヨウ素酸ナトリウムを使用する酸化多糖類は、シアル酸以外の糖残基の酸化をもたらす、それによって、所定の多糖類上に多くのアルデヒドを作製する。適切な一般的プロトコルは、Hermansonの「Bioconjugate Techniques」Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8によって説明されており、参照することによって本明細書に組み込まれる。アルデヒドを生分子に導入するための別の方法は、特定の糖オキシダーゼ、例えば、特に糖タンパク質において、アルデヒドに対する末端ガラクトース残基を酸化する酵素である、ガラクトースオキシダーゼの使用による。ガラクトース残基がシアル酸残基に対して最後から2番目である場合、ノイラミニダーゼを使用して、シアル酸残基を除去し、ガラクトースを末端残基として曝露する。ノイラミニダーゼおよびガラクトースオキシダーゼの組み合わせを使用して、ガラクトース残基を酸化し、反応性アルデヒド基を提供するためのプロトコルは、Hermansonの「Bioconjugate Techniques」Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8において提供され、参照することによって本明細書に組み込まれる。アルデヒドは、分子のアミン基をスクシニミジルp-ホルミルベンゾエート(SFB)またはスクシニミジルp-ホルミルフェノキシアセテート(SFPA)(Invitrogen Corp., Eugene, OR)等のNHSアルデヒドと反応させることによって、分子に導入することもできる。あるいは、グルタルアルデヒド等のビス-アルデヒド化合物を使用して、アミン基を修正し、アルデヒド基を提供することができる。再度、適切なプロトコルは、Hermansonの「Bioconjugate Techniques」Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-342336-8において提供され、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0058】

ヒドラジン、ヒドラジン誘導体：典型的には化学式 N_2H_4 を有する化学化合物または部分。ヒドラジン誘導体は、化合物。ヒドラジンの少なくとも1つ、および潜在的に複数のヒドロゲン原子が、脂肪族基、特にアルキル基、およびさらに典型的には低分子アルキル基等の他の基と置換される化合物または部分である。

【0059】

免疫応答：刺激に対するB-細胞、T-細胞、マクロファージまたはポリモルフォヌクレオサイト等の免疫系の細胞の応答。免疫応答は、宿主防御応答に關与する体の任意の細胞、例えばインターフェロンまたはサイトカインを分泌する上皮細胞。免疫応答は、先天性免疫応答または炎症を含むが、それらに限定されない。

【0060】

免疫共役体または組成物：脊椎動物において特異的免疫応答（または免疫原性応答）を刺激または誘発するために有用な組成物という意味で本明細書で使用される用語。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物が配向される有機体からの感染または疾患の進行に対して、脊椎動物がより良好に抵抗できるようにするという点において、免疫原性応答は保護的であるか、または保護免疫を提供する。免疫原性組成物の種類の特定の一例はワクチンである。

【0061】

免疫原：適切な条件下で、動物における抗体またはT細胞応答の産生物を刺激できる化

10

20

30

40

50

合物、組成物、または物質であって、動物に注入または吸収される組成物を含む。

【0062】

免疫学的に有効な用量：本開示の開示共役体の免疫学的に有効な用量は、治療上有効であって、疾患または状態の重篤度、程度、または期間を予防、治療、軽減、または減衰する。

【0063】

免疫学的に反応性の状態：特定のエピトープに対して上昇する抗体が、実質的にすべての他のエピトープに対する結合よりも検出可能に高い程度、および/または実質的にそれ以外の該エピトープに結合できるようにする状態への言及を含む。免疫学的に反応性の状態は、抗体結合反応の形式に依存し、典型的には免疫アッセイプロトコルにおいて利用されるもの、または体内で遭遇するそれらの状態である。免疫アッセイの形式および状態に関する説明は、Harlow & Lane (上記)を参照されたい。該方法において採用される免疫学的に反応性の状態は、典型的に生きた哺乳類または哺乳類細胞の内部の状態(例えば、温度、オスモル濃度、pH)への言及を含む「生理的状态」である。一部の器官は、極端な状態の影響を受けやすいと認識されるが、生物内および細胞内環境は、通常、約pH 7(すなわち、pH 6.0 ~ pH 8.0、より典型的にはpH 6.5 ~ pH 7.5)であり、主要な溶媒として水を含み、0以上および50以下で存在する。オスモル濃度は、細胞の生存および増殖を支持する範囲内である。

10

【0064】

単離された：「単離された」微生物(例えば、ウイルス、細菌、真菌、または原生動物)は、異なる種類、株、または種の微生物から実質的に分離または精製されている。微生物は、連続希釈および培養を含む種々の技術によって単離することができる。

20

【0065】

「単離された」生物学的要素(例えば、タンパク質または細胞小器官)は、該要素が天然に存在する有機体の細胞、例えば他のクロモソームおよびクロモソーム外DNAおよびRNA、タンパク質、および細胞小器官において、他の生物学的要素から実質的に単離または精製されている。「単離された」タンパク質は、標準的な精製方法で精製されるタンパク質を含む。該用語は、宿主細胞における組み換え発現によって調整されるタンパク質、ならびに化学的合成されるタンパク質、またはそれらのフラグメントも包含する。

【0066】

Ki-67: G0(休止期)を除く細胞サイクルのすべての段階において発現されるため、癌診断に有用な細胞増殖に關与する核抗原(タンパク質)。

30

【0067】

リンカーペプチド：可変重鎖を可変軽鎖に間接的に結合する役割を果たす抗体結合フラグメント(例えば、Fvフラグメント)内のペプチド抗体。「リンカー」は、scFv等の標的部分を、細胞毒素または検出可能な標識等のエフェクタ分子に結合する役割を果たすペプチドも指し得る。

【0068】

哺乳類：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳類の両方を含む。同様に、「対象」という用語は、ヒトおよび動物対象の両方を含む。

40

【0069】

対象の分子または標的：存在、位置、および/または濃度が決定される分子。対象の分子の例は、ハプテンでタグ付けされるタンパク質を含む。

【0070】

モノクローナル抗体：リンフォサイトの単クローン、または単一抗体の軽鎖および重鎖遺伝子が形質転換される細胞によって産生される抗体。モノクローナル抗体は、例えば、骨髄腫細胞と免疫脾細胞との融合からハイブリッド抗体作製細胞を作製することによって、当業者に知られる方法によって産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0071】

50

多重、多重化される、多重化する：本発明の実施形態によって、試料中の複数の標的を、複数の異なる共役体を使用して、必要に応じて、実質的に同時または連続的に検出することができる。多重化するとは、ペプチド、タンパク質を個別および任意のあらゆる組み合わせで同定および/または定量するステップを含み得る。多重化するとは、その解剖学的文脈において、細胞中で2つ以上のメッセンジャーおよびタンパク質を検出するステップも含み得る。

【0072】

ナノ粒子：ナノメータで測定されるサイズのナノスケール粒子、例えば、約100nm未満の寸法を少なくとも1つ有するナノスケール粒子。ナノ粒子の例は、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（例えば、共有結合された金属キレートを持つ）、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノローブ、および量子ドットを含む。ナノ粒子は、例えば、光子（無線周波数および可視光子を含む）の吸収および/または放射およびプラズモン共鳴によって、検出可能な信号を産生し得る。

10

【0073】

新生組織作製および腫瘍：細胞の異常および無制御成長のプロセス。新生組織作製は、増殖性疾患の一例である。

【0074】

新生組織作製の産生物は、新生物（腫瘍）であり、過剰な細胞分割に起因する組織の異常成長である。転移しない腫瘍は、「良性」と称される。周囲組織に侵入し、および/または転移し得る腫瘍は、「悪性」と称される。血液系腫瘍の例は、急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病および骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）を含む白血病、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球）白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病）、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ種（無痛性および高悪性度形態）、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、骨髄異作製症候群、毛様細胞白血病および骨髄異作製を含む。

20

【0075】

肉腫および癌腫等の固体腫瘍の例は、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、および他の肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膀胱癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌腫、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、およびCNS腫瘍（例えば、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、希突起グリオーマ、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫）を含む。

30

【0076】

非チオール化：担体のポリマー骨格と特異的結合分子との間に硫黄原子を含まない共役体。

【0077】

ペプチド核酸：ペプチド核酸は、擬ペプチド骨格を含む核酸模倣体である。ペプチド核酸オリゴマーは、相補DNA、RNA（またはPNA）オリゴマーとの安定した二本鎖構造を作製し、それらは、螺旋進入によって二本鎖DNAにおける標的にも結合し得る。薬物発見およびDNA検出におけるペプチド核酸の履歴、特性、および適用は、「Peptide Nucleic Acids（ペプチド核酸）」という書籍に提示されている。ペプチド核酸は、本来、二本鎖DNAを認識するためのリガンドとして設計された。DNAの核酸塩基は維持されるが、DNAのデオキシリボースホスホジエステル骨格は、擬ペプチド骨格によって置換した。例示的なペプチド核酸は、ホモチミンペプチド核酸を含む。

40

【0078】

50

ポリペプチド：モノマーが、アミド結合によって一緒に結合されるアミノ酸残基である、ポリマー。アミノ酸は、アミノ酸であり、L-光学異性体またはD-光学異性体のいずれかを使用することができる。本明細書で使用されるような「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、任意のアミノ酸配列を包含し、糖タンパク質等の修飾配列を含むことが意図される。「ポリペプチド」という用語は、具体的には、天然に存在するタンパク質、ならびに組み換えのまたは合成的に産生されるタンパク質を含むことが意図される。

【0079】

「残基」または「アミノ酸残基」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに組み込まれるアミノ酸への言及を含む。

10

【0080】

タンパク質：分子、特にアミノ酸から成るポリペプチド。

【0081】

精製された：「精製された」という用語は、絶対的な精度を必要とせず、むしろ相対的な用語として意図される。したがって、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、共役体、または他の活性化化合物は、タンパク質または他の汚染物質から全体または一部が単離されるものである。概して、本開示内で使用するための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、共役体、または他の活性化化合物は、治療投与のための完全な医薬製剤において、ペプチド、タンパク質、共役体、または他の活性化化合物を医薬的担体、賦形剤、緩衝剤、吸収促進剤、安定剤、保存剤、アジュバントまたは他の共材料との混合または製剤前に、調製物中に存在する全高分子種の80%以上を含む。より典型的には、ペプチド、タンパク質、共役体、または他の活性化化合物は、他の製剤材料と混合する前に、精製された調製物中に存在する全高分子種の90%より大、多くの場合は95%より大を示すまで精製される。他の場合において、精製された調製物は、本質的に同質的であり得、他の高分子種は、従来技術によって検出可能でない。

20

【0082】

量子ドット：量子閉じ込めのために、サイズ依存性電子および光学特性を呈するナノスケール粒子。量子ドットは、例えば、半導体材料（例えば、カドミウムセレニドおよび硫化鉛）および（分子ビームエピタキシーを介して成長した）微結晶等で構成されている。種々の界面化学および蛍光特徴を有する種々の量子ドットは、Invitrogen Corporation, Eugene, ORから市販されている（例えば、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,815,064号、第6,682,596号および第6,649,138号を参照されたい。量子ドットは、Evident Technologies（ニューヨーク州トロイ）からも市販されている。他の量子ドットは、ZnSSe、ZnSeTe、ZnSTe、CdSSe、CdSeTe、ScSTe、HgSSe、HgSeTe、HgSTe、ZnCdS、ZnCdSe、ZnCdTe、ZnHgS、ZnHgSe、ZnHgTe、CdHgS、CdHgSe、CdHgTe、ZnCdSSe、ZnHgSSe、ZnCdSeTe、ZnHgSeTe、CdHgSSe、CdHgSeTe、InGaAs、GaAlAs、およびInGaN量子ドット等の合金量子ドットを含む（合金量子ドットおよび同一物を作製するための方法は、例えば、米国特許出願公開第2005/0012182号およびPCT国際出願公開第WO2005/001889号において開示される）。

30

40

【0083】

反応基：本出願全体を介しての化学式は、「反応基」を指し、本明細書に記載されるような第1の単位を第2の単位に連結するために適した種々の基のいずれかであり得る。例えば、反応基は、イソチオシアネート等のアミン反応基、イソシアネート、アシルアジド、NHSEステル、塩化スルホニル等の酸塩化物、アルデヒドおよびグリオキサール、エポキシドおよびオキシラン、炭酸、アリアル化剤、イミドエステル、カルボジイミド、無水物、およびそれらの組み合わせであり得る。適切なチオール反応性官能基は、ハロアセチルおよびハロゲン化アルキル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリアル

50

化剤、ピリジルジスルフィド等のチオールジスルフィド交換試薬、TNBチオール、およびジスルフィド還元剤、およびそれらの組み合わせを含む。適切なカルボン酸反応性官能基は、ジアゾアルカン、ジアゾアセチル化合物、カルボニルジイミダゾール化合物、およびカルボンジイミドを含む。適切なヒドロキシル反応性官能基は、エポキシドおよびオキシラン、カルボニルジイミダゾール、N, N' - 炭酸ジスクシニミジルまたはN - クロロギ酸ヒドロキシスクシニミジル、過ヨード酸化化合物、酵素酸化、アルキルハロゲン、およびイソシアネートを含む。アルデヒドおよびケトン反応性官能基は、ヒドラジン、シッフ塩基、還元活性産生物、マンニヒ縮合生成物、およびそれらの組み合わせを含む。活性ヒドロゲン反応性化合物は、ジアゾニウム誘導体、マンニヒ縮合生成物、ヨード化反応産生物、およびそれらの組み合わせを含む。光反応性の化学官能基は、アリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフォノン、ジアゾ化合物、ジアジリン誘導体、およびそれらの組み合わせを含む。

【0084】

試料：「試料」という用語は、内部または上部に標的が存在し得る任意の液体、半固体、または固体物質（または材料）を指す。特に、試料は、生物試料または生物材料から得られた試料であり得る。生物試料の例は、組織試料および細胞診試料を含み、より特定の例では、末梢血、尿、唾液、組織生検、外科標本、羊水穿刺試料、および剖検材料を含む。

【0085】

S I S H色原体 A：銀酢酸溶液

S I S H色原体 B：ヒドロキノン溶液

S I S H色原体 C：過酸化水素溶液

【0086】

特異的結合部分：特異的結合対の一要素。特異的結合対は、他の分子への結合を除いて、互いに結合することを特徴とする分子の対である（例えば、特異的結合対は、生物試料における他の分子との結合対の2つの要素のいずれかの結合定数より少なくとも 10^3 M^{-1} より大、 10^4 M^{-1} より大、または 10^5 M^{-1} より大である結合定数を有し得る）。特異的結合部分の特定例は、特異的結合タンパク質（例えば、抗体、レクチン、ストレプトアビジン等のアビジン、およびタンパク質A）を含む。特異的結合部分は、かかる特異的結合タンパク質によって特異的に結合される分子（またはその部分）も含み得る。

【0087】

標的：存在、位置、および/または濃度が決定されるか、または決定できる任意の分子。標的分子の例は、タンパク質、およびタンパク質に共有結合されるハプテン等のハプテンを含む。標的分子は、典型的には、特異的結合分子および検出可能な標識の1つ以上の共役体を使用して検出される。

【0088】

治療上有効な量：薬剤で治療されている対象において、所望の効果を得るために十分な該特定薬剤の量。例えば、これは、感染および疾患に対する抵抗を高める、回避する、減衰する、および/または治療する際に有用な共役体の量であり得る。理想的には、薬剤の治療上有効な量は、感染に対する抵抗を高める、回避する、減衰する、および/または治療するために十分であって、対象において実質的な細胞毒性をもたらさない量である。対象において感染および疾患に対する抵抗を高める、回避する、減衰する、および/または治療するために有用な薬剤の有効量は、治療されている対象、苦痛の重度、および治療組成物の投与の方法に依存する。

【0089】

ワクチン：ワクチンは、対象において予防または治療免疫応答を引き起こす医薬組成物である。ある場合には、免疫応答は保護応答である。典型的には、ワクチンは、例えば、細菌性またはウイルス性病原体等の病原体の抗原に対する、または病状に相関する細胞成分に対する抗原特異的免疫応答を惹起する。ワクチンは、ポリヌクレオチド、ペプチドまたはポリペプチド、多糖類、ウイルス、細菌、細胞または1つ以上の細胞成分を含み得る

。ある場合には、ウイルス、細菌、または細胞は、不活性化または減衰されて、感染の可能性を回避または低減する一方で、ワクチン成分の免疫原性を維持し得る。

【0090】

III. 序論

所定の開示される実施形態は、2つ以上の分子の共役体を作製するための方法、および該方法によって作製される共役体に関する。当業者は、開示される方法が、ヒドラジド官能基等のポリマー担体上の反応性官能基と反応し得る官能基を有する分子の任意の組み合わせを作製するために有用であることを認識するであろう。本発明を例証するために開示される特定の共役体は、本発明の範囲を制限するものではない。例えば、所定の開示される共役体は、抗体-ポリマーハプテン担体共役体であるが、他の生分子と他の検出可能な標識との間の共役体（例えば、ハプテン、フルオロフォア、ルミノホル、蛍光標識、蛍光ナノ粒子、および緑色蛍光タンパク質等の蛍光タンパク質）も開示の範囲内である。

10

【0091】

開示される方法の一実施形態は、複数の反応性ヒドラジド基等の複数の反応性官能基（ポリマー担体）、または複数の異なる官能基の組み合わせを有するポリマーを、ポリマー担体によって提供される反応性官能基と反応し得る基を有する第1の分子（例えば、抗体）と反応させるステップを含む。例えば、反応性官能基がヒドラジドである場合、次いで、官能基は、アルデヒド等のカルボニル官能基であり得る。第1の分子は、次いで、直接、ハプテン等の第2の分子、リンカーを有するハプテン、またはその両方と反応し得るポリマー担体によって提供される少なくとも1つの残りの反応性官能基を含む。あるいは、共役体は、ポリマー担体およびハプテンおよび/またはハプテンリンカーを含んで作製され得、次いで、第2の分子と反応する。この例では、第2の分子は抗体であり得る。さらに別の代替例として、ハプテンの担体等の複数の異なるポリマー担体は、抗体等の第2の分子に結合され得る。特定の実施形態では、ポリマー担体は、好ましくは、抗体のFc領域において単独で抗体に結合されるポリアクリルヒドラジドであり、複数のハプテンおよび/またはPEG-ビオチン、PEG-DNP、フルオレセイン等のハプテン-リンカー化合物は、ポリマーハプテン担体に結合される。

20

【0092】

さらに開示される態様は、開示されるリンカーおよび共役体を作製するための開示される方法を実行するための説明書を含むキットである。開示される共役体を使用して試料中の標的を検出するための方法も開示される。

30

【0093】

IV. ポリマー担体

開示される発明の実施形態は、ポリマー材料をハプテン担体等の担体として使用することに関する。本発明に概して最も有用であると考えられるポリマー材料は、2つの特徴：特定のポリマーに特徴的な1つまたは複数の反復モノマー単位、および複数の反応性官能基を有し、反応性官能基は、反復性ポリマー単位と関連して同一または異なり得る。

【0094】

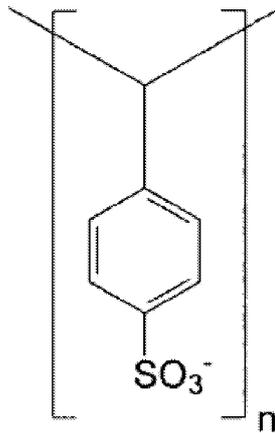
A. ポリマー材料

当業者は、ポリアクリルアミド以外のポリマー材料を使用して、開示される本発明の実施形態を実施できることを理解するであろう。単なる一例として、これらの追加ポリマー骨格材料は、以下を含むが、これらに限定されない。

40

1. ポリアクリル酸 [例えば $(\text{CH}_2\text{CHCO}_2\text{H})_n$]、
2. ポリエチレンイミン [例えば $\text{H}(\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$]、
3. 典型的には以下の化学式を有するポリスチレンスルホン酸、

【化 1】



10

4. 単糖類が水の排出によってグリコシド結合される、高分子量糖質のクラスである多糖類。多糖類は、典型的には、10以上の単糖類残基を含有するそれらのポリマーを指す。デンプン、グリコーゲン、デキストラン、およびポリグルコシド等の多糖類は、数千単位を含み得る。2～9の単糖類残基から成る比較的低分子量のポリマーは、オリゴ糖と称される。特に指定のない限り、または文脈上明確な指示がない限り、本明細書で使用されるような「多糖類」は、オリゴ糖および9以上の単糖類残基を有するポリマーの両方を含む。セルロースまたはデンプン等の多糖類は、完全な加水分解によって単糖類型（Dグルコース）を1つのみ産生し、したがって、ホモ多糖類と称される。ヒアルロン酸等のヘテロ多糖類は、加水分解によって2つ以上の単糖類型を産生する。特にヒアルロン酸に関連して、モノマーはNアセチルグルコサミンおよびDグルクロン酸である。例示的な多糖類は、デンプン、グリコーゲン、デキストラン、カルボキシメチルセルロース等を含む。

20

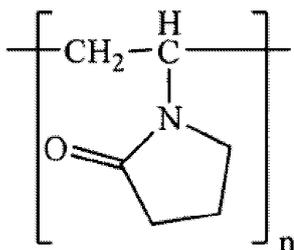
5. ポリエチレン - a l t - マレイン酸、

6. ポリ（アルギニン）、ポリ（アスパラギン）、ポリ（アスパラギン酸）、ポリ（グルタミン酸）、ポリ（グルタミン）、およびポリ（リシン）、および

7. 典型的には以下の化学式を有するポリビニルピロリドン（PVP）、

30

【化 2】



40

【0095】

当業者は、これらの例示的なポリマー材料の誘導体は、開示される本発明の実施形態との使用に適していること、さらにポリマー材料に加え、本発明を例証するために本明細書で開示されるものは、担体としても使用できることを理解するであろう。

【0096】

本発明の開示内の所定のポリマー材料は、商業的に取得することができる。例えば、開示されるポリマーの多くは、A l d r i c h から種々の分子量で市販されている。あるいは、ポリマー材料は、購入または調製することができ、次いで、その後所望の官能基を含むように誘導体化する。このプロセスは、ポリアクリルアミドヒドラジドを参照することによって例証することができ、それによって、ヒドラジンとのマイクロ波媒介反応によって、複数のヒドラジド官能基を含むようにポリアクリルアミドを誘導体化する。同様に、ポリアクリルアミド等のポリマーは、アミノグアニジン等の任意の置換化合物と反応し得

50

る。さらに別の代替手法として、所望のポリマー骨格の作製に適し、所望の官能基を含むモノマー単位をポリマー化し、開示される本発明の実施形態に従って、所望のポリマー担体を作製することができる。このプロセスは、標準の交互 A および B 単位、反復配列で配列された A および B 単位を持つ周期的コポリマー、例えば (A - B - A - B - B - A - A - A - A - B - B - B)_n、モノマー A および B のランダム配列を持つランダムコポリマー、ポリマー配列内の個別モノマーの順序は、周知の統計学的ルールに従う統計的コポリマー、共有結合によって結合される 2 つ以上のホモポリマーサブユニット、接合ブロックとして知られる中間非反復サブユニットを有するホモポリマー単位、ジブロックまたはトリブロックコポリマー等の 2 つまたは 3 つの個別のブロックを持つブロックコポリマー、単一の主鎖を有する線形コポリマー、1 つ以上のポリマー側鎖を持つ単一の主鎖を有する分岐コポリマー、主鎖とは構造的に異なる側鎖を有するグラフトコポリマー、星形コポリマー、ブラシ形コポリマー、くし形コポリマー、デンドリマー等で構成されるブロックコポリマーを含む、代替コポリマーの使用を可能にする。

10

20

30

40

50

【0097】

ポリマー材料のサイズは、本出願の所定の実施形態に対する重要な考慮事項であり得る。例えば、現在、ポリマー担体の平均分子量は、約 50 ~ 約 100,000、より典型的には、約 1,000 ~ 約 50,000、さらに典型的には約 5,000 ~ 約 40,000、さらに一層典型的には約 10,000 ~ 約 30,000 である必要があると考えられている。所定の開示されるポリアクリルアミドヒドラジド実施形態は、平均分子量 10,000 以下を有するポリマー材料の使用を考慮するが、実質的により大きい平均分子量を有するポリアクリルアミドを使用することもできる。ポリマーの特定分子量または分子量分散を選択するための追加ガイダンスは、ポリマー産生物の物理的特性を考慮することによって提供することができる。例えば、ポリマー担体の分子量は、ポリマー担体の溶解性、特に水溶解度、または共役体が適用され得る試料にポリマー担体共役体が侵入し、したがって所望されるように機能する能力を決定する場合等に重要な考慮事項であり得る。最適な平均分子量は、特定のポリマー材料、1 つまたは複数の反応性官能基、および材料の意図される使用に大いに依存し得ることも当業者は理解するであろう。

【0098】

開示される実施形態の多くは、主に水性適用に有用である。その結果、ポリマー担体は、好ましくは、実質的に水に溶解可能である必要がある。

【0099】

開示される本発明の実施形態と使用されるポリマー骨格は、実質的に非架橋構造であり得る。あるいは、ポリマー部分は、実質的に架橋であり得る。

【0100】

B. 反応性官能基

本明細書で開示される構成要素を結合するために使用できる任意の反応性官能基は、本発明を実施するために有用であり得る。所定の実施形態は、少なくとも 2 つの隣接するヘテロ原子が存在する場合の反応性官能基に関する。かかる官能基を選択するための 1 つの目的は、それらの高い求核性を利用することであり、例えば、本発明を動作の理論に限定することなく、1 つ以上のヘテロ原子を含むが、2 つの隣接するヘテロ原子を有しない官能基を有し得る化合物に関連して、効果をもたらし得る。所定のかかる例示的な官能基は、譲受人の先行出願「Molecular Conjugate」、米国特許出願第 11/603,425 号に開示されるように、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン(-RNOH)、ヒドラジドチオールである。

【0101】

具体的にヒドラジドを参照して、かかる官能基は、典型的には化学式 -NR-NR₁R₂ を有し、式中 R-R₂ は水素である。ヒドラジドは、置換ヒドラジドであり得、すなわち R-R₂ の少なくとも 1 つは、R-R₂ が独立して、低分子(典型的には 20 以下、およびより典型的には 10 以下の炭素原子)アルキル基、ヘテロ脂肪族、芳香族、および/またはヘテロ芳香族等の水素、脂肪族化合物であるように、水素以外である。別の例とし

て、窒素等の攻撃ヘテロ原子の求核性がさらに高まるように、電子供与基である官能基を使用することも可能である。適切な官能基は、ヒドラジドの誘導体でもあり得る。かかる例示的な官能基は、ジヒドラジド [- (R N) - N R ₁ C O - N R ₂ - N R ₃ R ₄] ₁、セミカルバジド [- N R C O - N R ₁ - N R ₂ R ₃]、チオセミカルバジド [- N R - C S - N R ₁ - N R ₂ R ₃]、チオカルバジド [- N R - N R ₁ - C S - N R ₂ - N R ₃ R ₄]、カルボン酸ジヒドラジン [- N R - C O - N R ₁ - N R ₂ - C O - N R ₂ - N R ₄ R ₅]、カルボン酸ジヒドラジンの硫黄含有誘導体、カルボン酸ヒドラジン [- O - C O - N R - N R ₁ R ₂]、またはカルボン酸ヒドラジンの硫黄含有誘導体、アミノグアニジン等を含む。これらの例示的な基に関連して、R - R ₅ は、典型的には水素であるが、独立して水素、脂肪族、ヘテロ脂肪族、芳香族、ヘテロ芳香族等でもあり得る。

10

【 0 1 0 2 】

C . ポリマー担体の取得

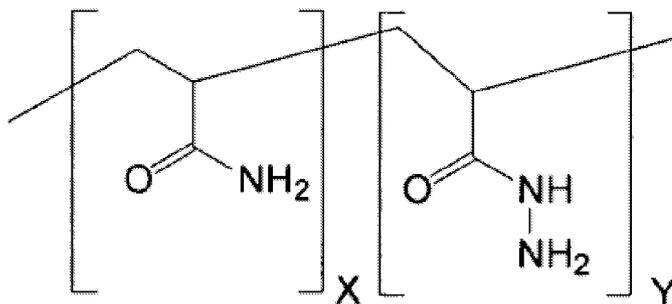
ポリマー担体の開示される実施形態は、概して購入することができるか、または当該技術分野において知られる方法を使用して作製することができる。いくつかの実際の実施形態は、ポリアクリルアミドヒドラジドに関連して、ポリマー骨格がアクリルアミドに基づく場合のポリマー担体について説明し、該担体は、複数の反応性ヒドラジド官能基をさらに含み得る。ポリアクリルアミドは、実施例 1 に開示されるように作製することができる。

【 0 1 0 3 】

ポリアクリルアミドヒドラジドの一般式を以下に提供する。

20

【 化 3 】



30

この一般式に関連して、XおよびYは異なり得るが、典型的にはXは、約100～約500、より典型的には約300～約400であり、Yは典型的には約5～約100、より典型的には約10～約50である。

【 0 1 0 4 】

本発明の出願に先行して産生された多くのポリマーヒドラジドは、比較的大きいポリマーであって、約5ミリグラム/ミリリットル以下と、溶解性に限界があった。所定の本発明の実施形態は、主に、約5ミリグラム/ミリリットルより高く、水性飽和まで、典型的には約10ミリグラム/ミリリットルより高く、少なくとも約500ミリグラム/ミリリットル、および好ましくは、少なくとも100ミリグラム/ミリリットル、およびより好ましくは、少なくとも約250ミリグラム/ミリリットル、およびさらにより好ましくは、少なくとも約300ミリグラム/ミリリットルまでの実質的に高い水溶解性を有するポリアクリルアミドヒドラジドに関する。

40

【 0 1 0 5 】

別の重要な特徴は、約4のヒドラジド官能基のpKaである。ポリマーヒドラジドを使用して実行され得る反応のpHが約5である場合、次いで、ヒドラジド窒素はプロトン化されず、したがって求核基として作用することができる。該pH値において、ヒドラジドは、超求核基として作用する。所定の開示される実施形態の場合、ポリマー担体に関連する官能基は、求核基として作用し、抗体のFc部分に関連する糖質の酸化によって産生されるカルボニル化合物と結合する。求核性ヒドラジドは、この反応に良好な官能基である

50

。反対に、アミンは、9より高いpKaを有し、典型的には10より大であって、したがって約5pHにおいて、アミン官能基は完全にプロトン化されるため、求核性ではない。ヒドラジドは、カルボニル化合物、例えば、アルデヒドと反応し得る。ヒドラジドのアルデヒドとの反応は、酸触媒され得る。この相違は、化学選択的反応を可能にする。例えば、試料中に存在し得る生物学的アミンは、約5以下のpHで完全にプロトン化され、したがって求核性ではないが、本発明のヒドラジド、ヒドラジン、ヒドラジド誘導体、ヒドラジン誘導体等は、プロトン化されないため、化学選択的に反応に使用できる。

【0106】

D. ハプテン

開示される実施形態の主な使用の1つは、ハプテンのポリマー担体である。ハプテンは、免疫応答を惹起することができる小分子であるが、典型的には、タンパク質等の大きい担体に結合される場合に限られる。現在知られているか、または今後発見される可能性のある任意のハプテンは、本発明と使用することができる。周知の例示的なハプテンは、ジニトロフェノール、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、プロモデオキシウリジン、およびマウス免疫グロブリンを含む。

10

【0107】

Ventana Medical Systems, Inc. は、参照することによって本明細書に組み込まれる、2006年11月1日出願の米国特許出願第60/856,133号、名称「Haptens, Hapten Conjugates, Compositions Thereof and Method for Their Preparation and Use」、および対応する実用新案第11/982,627号の譲受人でもある。これらの出願は、本発明の実施形態を実施するために有用であるいくつかの新しいクラスのハプテン、特にそれらの種を開示する。これらのハプテンは、ピラゾール、特にニトロピラゾール、ニトロフェニル化合物、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素およびチオ尿素、特にフェニル尿素およびさらにより具体的にはフェニルチオ尿素、本明細書においてロテノイドとも称されるロテノンおよびロテノン誘導体、オキサゾールおよびチアゾール、特にオキサゾールおよびチアゾールスルホンアミド、クマリンおよびクマリン誘導体、ポドフィロトキシンおよびポドフィロトキシン誘導体によって例証されるシクロリグナン、およびそれらの組み合わせを含む。

20

【0108】

以下に提供される一般式の場合、置換基が示されていないならば、当業者は該置換基が水素であることを理解するであろう。原子に接続されないが示されている結合、例えば環系の内部に延在する結合は、かかる置換基の位置が異なり得ることを示す。結合によって引かれた曲線は、一部の追加構造が該位置、典型的には、ハプテンを担体に結合するために使用されるリンカーまたは官能基あるいは部分に結合されることを示す。さらに、1つ以上のキラル中心を有する化合物の立体化学が示されていない場合、すべてのエナンチオマーおよびジアステレオマーが含まれる。同様に、脂肪族またはアルキル基の列挙のために、すべての構造異性体も含まれる。

30

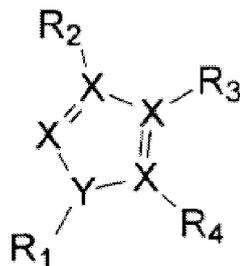
【0109】

1. アゾール

本発明のハプテンの第1の一般的なクラスはアゾールであり、典型的にはオキサゾールおよびピラゾール、より典型的には、以下の一般式を有するニトロオキサゾールおよびニトロピラゾールである。

40

【化4】



【0110】

10

この一般式に関連して、 n は0～2、最も典型的には0または1である。 $R_1 - R_4$ は、干渉しない任意の有機基であり得、潜在的にハブテンとしての機能を促進する。より具体的には、 $R_1 - R_4$ は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特に低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の炭素原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中 X は、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3-O-N=$ ）アルコール（すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはカルボン酸アンモニウムイオン等のそれらの塩を含む）、環状、シアノ（ $-CN$ ）、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $HO-N=$ ）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフィドリル、スルフォキシド、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。これらの $R_1 - R_4$ 置換基の2つ以上は原子、典型的には、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における炭素原子でもあり得る。 $R_1 - R_4$ 置換基の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、またはリンカーまたは担体分子に結合するために適した官能基である。 $R_1 - R_4$ は、最も典型的には脂肪族化合物、水素基または窒素、さらにより典型的にはアルキル、水素または窒素、およびさらにより典型的には低分子（10以下の炭素原子）アルキル、水素、窒素、またはそれらの組み合わせである。窒素基の数は異なり得るが、最も典型的には1つまたは2つの窒素基が存在する。 X は独立して窒素または炭素である。 Y は酸素、硫黄または窒素である。 Y が酸素または硫黄である場合、次いで、 R_1 基はなく、 $n=0$ である。 Y が窒素である場合、次いで、少なくとも1つの R_1 基がある。

20

30

【0111】

当業者は、2つ以上の W 基を有する化合物の場合、その相対位置は異なり得ることを理解するであろう。例えば、ジアゾールは、1および2位または1および3位に窒素原子を有し得る。さらに、同一のトリアジン等の2つ以上のヘテロ原子も可能である。

40

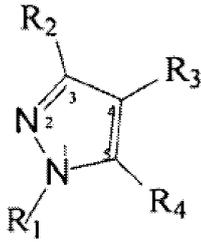
【0112】

これらのアゾール化合物の $R_1 - R_4$ の少なくとも1つは、一部の他の基に結合されるか、または可変官能基である。例えば、説明される化合物は、担体に直接結合されるか、またはアゾール環の周囲の適切な位置のいずれかにおいてリンカーに結合され得る。

【0113】

実際の実施形態は、典型的にはモノ-またはジ-ニトロピラゾール誘導体であって、 $R_1 - R_4$ の少なくとも1つは窒素基、場合によっては、 $R_1 - R_4$ の2つが窒素基であり、残りの $R_1 - R_4$ は、ハブテンをリンカーまたは担体に結合するために使用される。

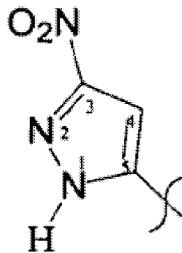
【化5】



【0114】

1つの特定化合物は以下の構造を有した。

【化6】



10

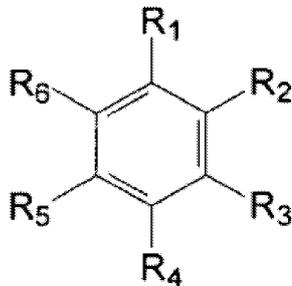
20

【0115】

2. ニトロアリール

本発明のハプテンの第2の一般的なクラスは、ニトロアリール化合物である。例示的なニトロアリール化合物は、ニトロフェニル、ニトロビフェニル、ニトロトリフェニル等、および以下の一般式を有する任意およびすべてのヘテロアリール対照物を含むが、それらに限定されない。

【化7】



30

【0116】

この一般式に関連して、かかる化合物は、少なくとも1つ、および随意に複数の窒素基を有する。したがって、 $R_1 - R_6$ の少なくとも1つは窒素である。 $R_1 - R_6$ の2つ以上が窒素である場合、複数の窒素置換基、または他の環状置換基に対する窒素置換基の相対環位置のすべての組み合わせは、開示されるハプテンのこのクラス内に含まれる。ジニトロアリール化合物は、最も典型的である。当業者は、窒素基の数が増加するにつれて、一般式における残りの環状置換基の数が減少することを理解するであろう。これらの置換基は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特に低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の炭素原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3 - O - N =$ ）アルコール（

40

50

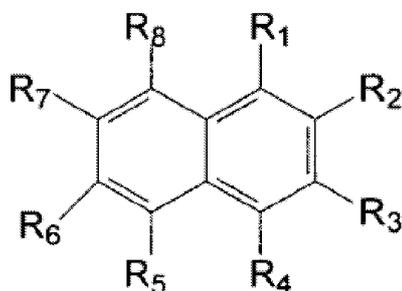
すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル)アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸 (I 族金属またはカルボン酸アンモニウムイオン等のそれらの塩を含む)、環状、複素環、シアノ (-CN)、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム (HO-N=)、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。R₁ - R₆ 置換基の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、またはリンカーまたは担体分子に結合するために適した官能基である。

10

【0117】

R₁ - R₆ 置換基の2つ以上は原子、典型的には、ナフタレン (以下に示す) またはアントラセン型誘導体等の環状系における炭素原子でもあり得る。6員環系以外の環状系、融合6-5環系等が作製され得る。

【化8】



20

【0118】

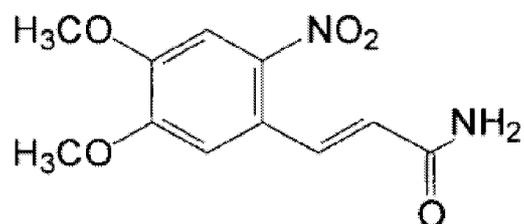
再度、R₁ - R₈ によって占められる環状位置の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、または共有結合等による担体分子への結合に適した可変官能基である。例えば、本発明のニトロアリール化合物は、種々の任意の環位置において担体またはリンカーに結合するための官能基を含み得る。

【0119】

実際の実施形態は、ニトロフェニル化合物によって例証される。単なる一例として、モノニトロアリール化合物は、ニトロシナミド化合物によって例証される。ニトロシナミドベースの化合物の一実施形態は、以下に示されるように、4,5-ジメトキシ-2-ニトロシナミドによって例証される。

30

【化9】

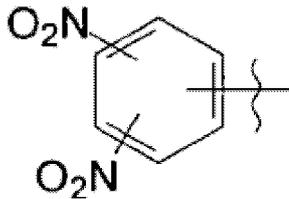


40

【0120】

ニトロフェニルクラスの化合物もジニトロフェニル化合物によって表される。窒素基を有しない環位置の残りの炭素原子の少なくとも1つは、官能基、リンカーに結合されるか、または担体に直接結合される。これらの基の相対位置の任意およびすべての組み合わせは、開示されるハプテンのクラス内に含まれる。

【化 1 0】

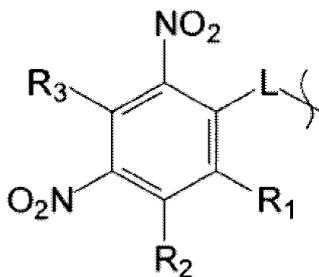


【 0 1 2 1】

実際の実施形態は、より具体的には、以下に示されるように、リンカーに結合された 2, 4 - ジニトロフェニル化合物によって例証される。

10

【化 1 1】



20

【 0 1 2 2】

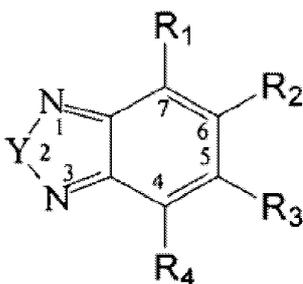
R₁ - R₃ は上述のとおりである。「L」は以下に詳述されるようなリンカーである。

【 0 1 2 3】

3. ベンゾフラザン

ベンゾフラザンおよびそれらの誘導体は、本発明の範囲内のハプテンの別のクラスである。ベンゾフラザン型化合物の一般式は、以下に提供される。

【化 1 2】



30

【 0 1 2 4】

R₁ - R₄ 置換基は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に 20 以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の 10 以下の炭素原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば - C X₃、式中 X は、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、C H₃ - O - N =）アルコール（すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I 族金属またはカルボン酸アンモニウムイオン等のそれらの塩を含む）、環状、複素環、シア

40

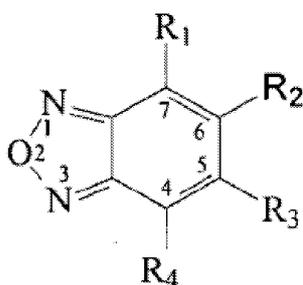
50

ノ(-CN)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム(HO-N=)、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。これらのR₁-R₄置換基の2つ以上は原子、典型的には、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における炭素原子でもあり得る。R₁-R₄置換基の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、または担体に直接結合される。Yは、R₅およびR₆置換基を有する炭素原子であって、式中、R₅およびR₆はR₁-R₄に関して記載されるように、酸素または硫黄、典型的には酸素である。

【0125】

Yが酸素である化合物は、より具体的には以下の構造を有する化合物によって例証され、式中、R₁-R₄は上述のとおりであり、最も典型的には独立して水素および低分子アルキルである。

【化13】



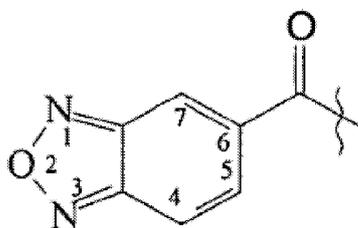
10

20

【0126】

このクラスのハブテンに従う化合物の実際の一実施形態は、以下の化学構造を有した。

【化14】



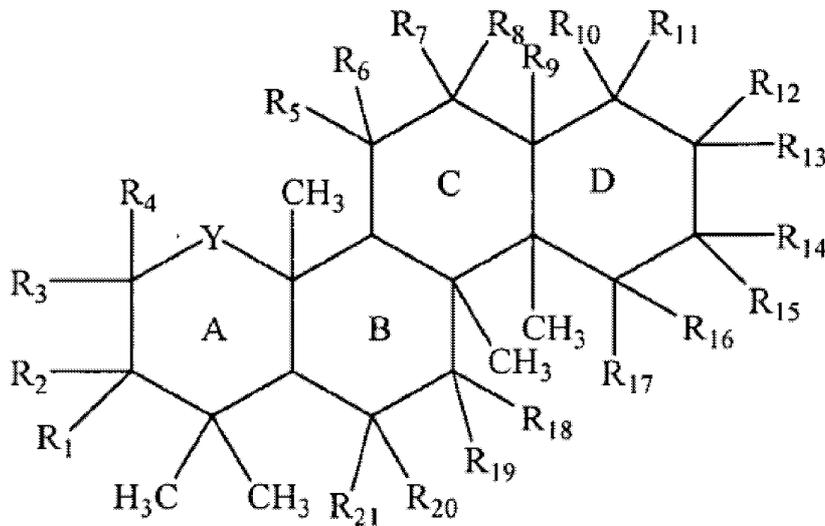
30

【0127】

4. トリテルペン

トリテルペンは、本発明の範囲内の別のクラスのハブテンである。環状トリテルペンに共通する塩基環構造は、以下に示すように、A~Dの4つの6員融合環を有する。

【化 15】



10

【0128】

多くの刊行物は、本発明を実施するために有用なトリテルペンの属内の天然、半合成、および合成トリテルペン種について論じており、J. C. Connolly and R. A. Hill, *Triterpenoids*, *Nat. Prod. Rep.*, 19, 494-513 (2002)、Baglin et al., *A Review of Natural and Modified Beculinic, Ursolic and Echinocystic Acid Derivatives as Potential Antitumor and Anti-HIV Agents*, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 525-539、W. N. and M. C. Setzer, *Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents*, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 540-556 (2003)、and Baltina, *Chemical Modification of Glycyrrhizic Acid as a Route to New Bioactive Compounds for Medicine*, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 155-171 (2003) を含み、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる。本開示および実際のその実施形態、ならびにこれらの先行刊行物によって提供される開示に基づいて、かつこの第1の一般的化学式に関連して、 $R_1 - R_{21}$ は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3-O-N=$ ）アルコール（すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはカルボン酸アンモニウムイオン等のそれらの塩を含む）、環状、シアノ（ $-CN$ ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $HO-N=$ ）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルフォキシド、エキソメチレン、およ

20

30

40

50

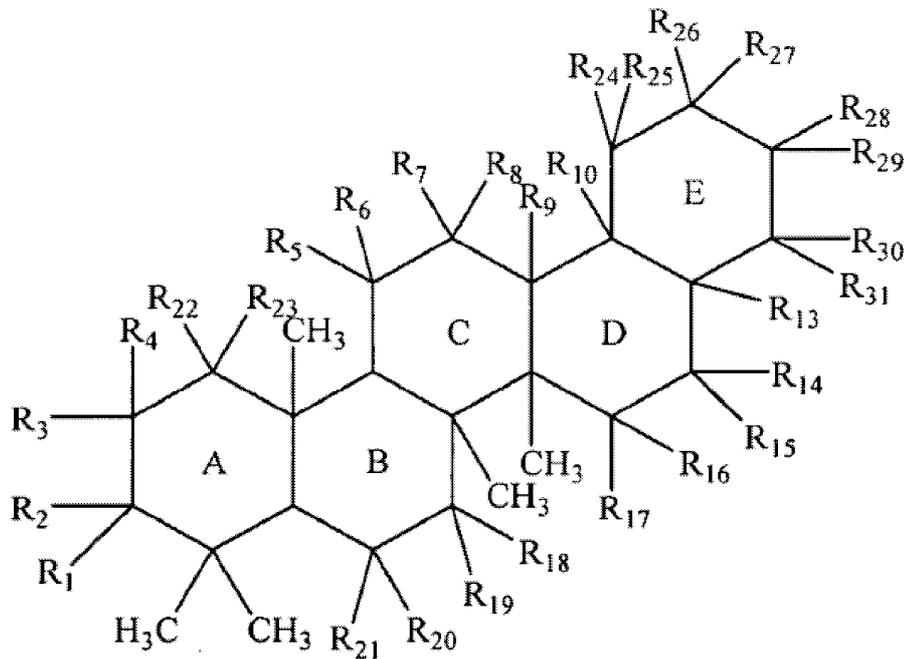
びそれらの組み合わせから独立して選択される。これらの $R_1 - R_{21}$ 置換基の2つ以上は、原子、典型的には、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における炭素原子でもあり得る。 $R_1 - R_{21}$ 置換基の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、またはリンカーまたは担体分子に結合するために適した官能基である。Yは、これによって5員環を画定する結合であるか、または R_{22} および R_{23} 置換基を担持する炭素原子であって、これらのR基は上述のとおりである。

【0129】

このクラスのハプテンを例証するトリテルペンの開示される実施形態は、E環も含み得、このE環は、種々の環サイズであり得、特に5-7原子を有する環、典型的には環状の炭素原子であり得る。例えば、E環は、以下の一般式によって示されるように、6員環であり、式中、 $R_1 - R_{31}$ は $R_1 - R_{21}$ に関して上述のとおりである。

10

【化16】



20

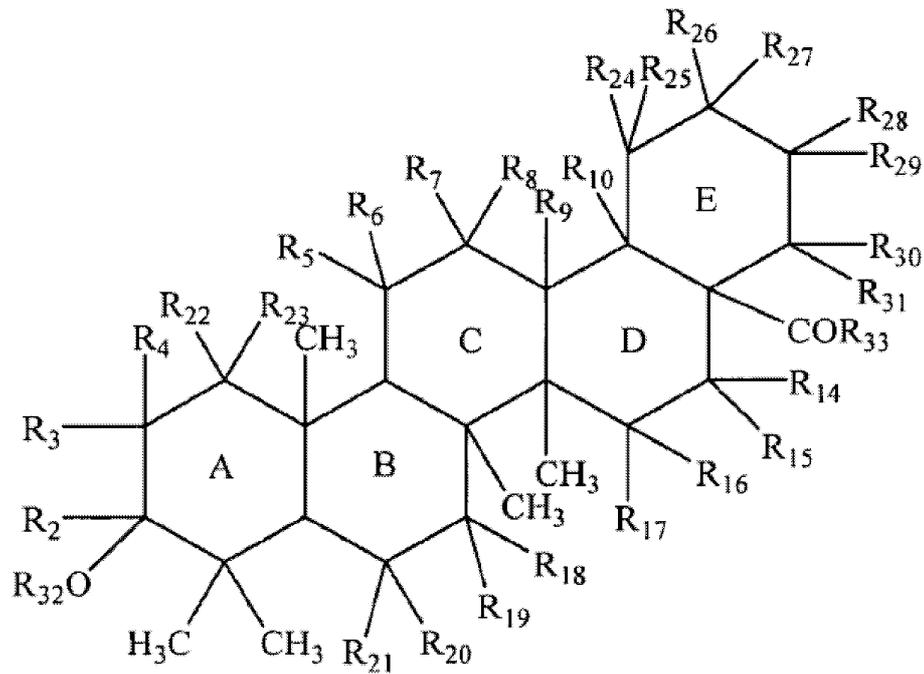
30

【0130】

以下の一般式は、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち $-OR_{34}$ から選択される R_{33} 置換基を担持する R_{13} 置換基がアシル基であり得ることを示し、 R_{34} は脂肪族化合物、典型的には、アルキルまたは置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキル、一次アミド ($-NH_2$)、二次アミド ($-NHR_{35}$)、および三次アミド ($-NR_{35}R_{36}$) を含むアミドであって、 R_{35} および R_{36} は脂肪族化合物、典型的には低分子脂肪族化合物、より典型的にはアルキル、置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキルまたは置換低分子アルキルである。この一般式は、 R_1 置換基が OR_{32} 置換基である場合が多いことも示し、 R_{32} は水素または脂肪族化合物、より典型的にはアルキルまたは置換アルキル、さらに典型的には低分子アルキルである。残りのR基は、第1の一般式に関連して上述のとおりである。

40

【化 17】



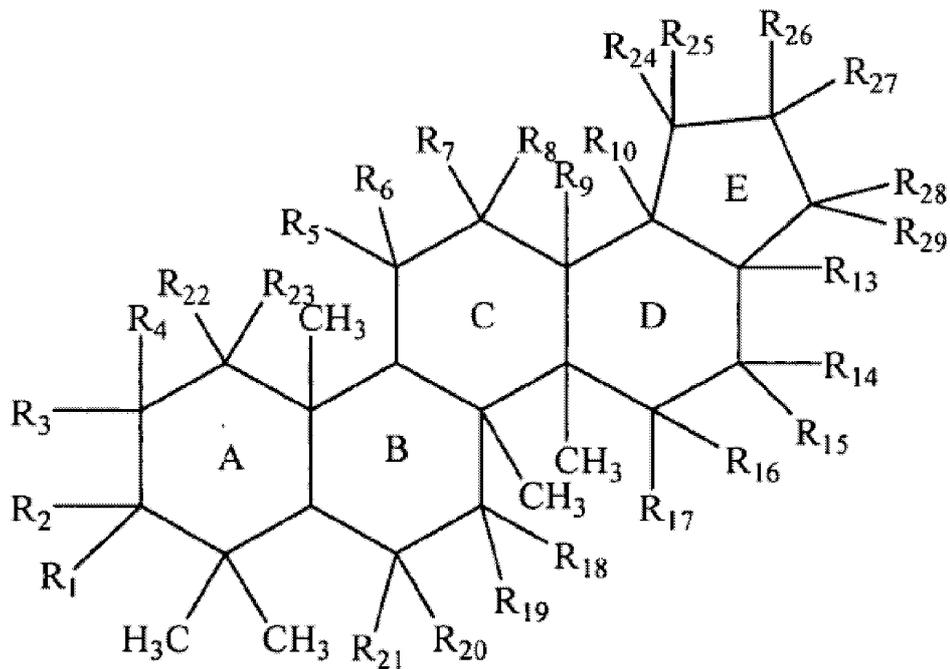
10

20

【0131】

E環は、以下の化学式によって示されるように、5員環でもあり得、式中、 $R_1 - R_{29}$ 基は $R_1 - R_{21}$ に関して上述のとおりである。

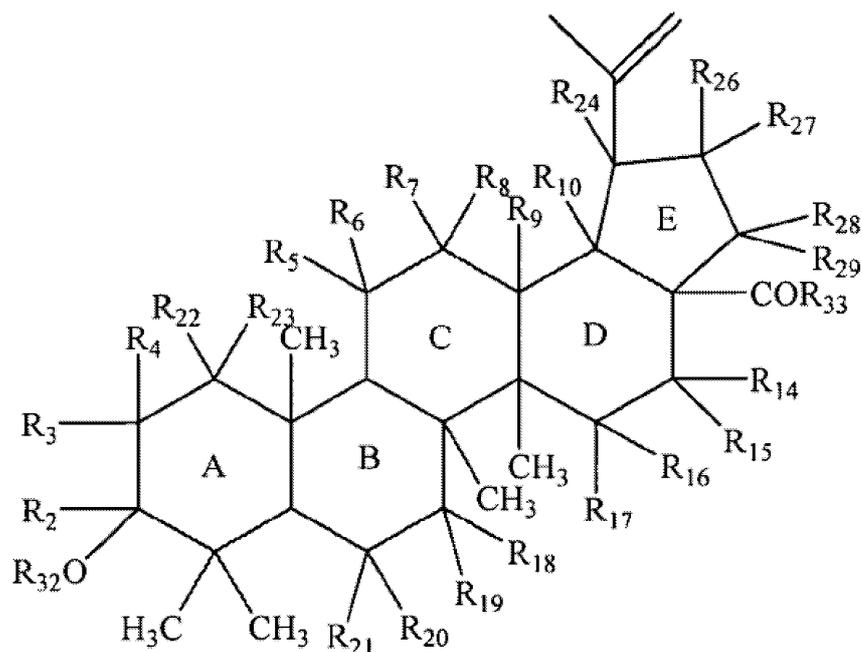
【化 18】



30

40

【化 19】



10

20

【0132】

これらの一般式に関連して、 $R_1 - R_{29}$ 置換基は、 $R_1 - R_{21}$ に関して上述のとおりである。

【0133】

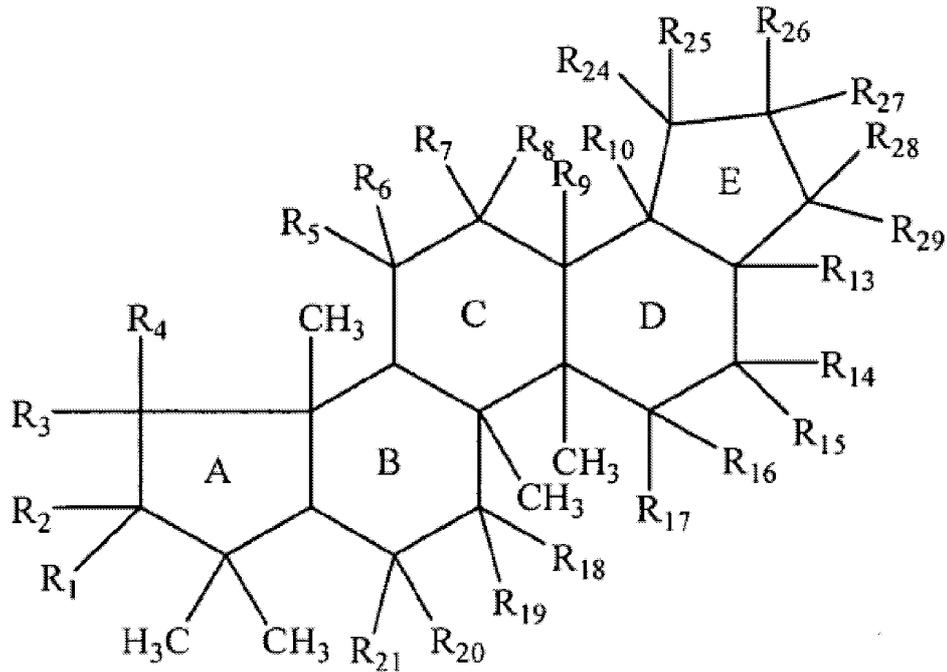
E環が6員環である例示的な化合物と同様に、E環が5員環である化合物は、前述のように、 R_1 および R_{13} においても置換基を含み得る。具体的には、この一般式は、 R_{13} 置換基が水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち $-OR_{34}$ から選択される R_{33} 置換基を担持するアシル基であり得ることを示し、 R_{34} は脂肪族化合物、典型的には、アルキルまたは置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキル、一次アミド ($-NH_2$)、二次アミド ($-NHR_{35}$)、および三次アミド ($-NR_{35}R_{36}$) を含むアミドであって、 R_{35} および R_{36} は脂肪族化合物、典型的には低分子脂肪族化合物、より典型的にはアルキル、置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキルまたは置換低分子アルキルである。この一般式は、 R_1 置換基が OR_{32} 置換基である場合が多いことも示し、 R_{32} は水素または脂肪族化合物、より典型的にはアルキルまたは置換アルキル、さらに典型的には低分子アルキルである。

30

【0134】

例示的な化合物は、AおよびE環の両方として5員環も含む。かかる例示的な化合物の一般的な化合物は以下に提供され、式中、 $R_1 - R_{29}$ 置換基は上述のとおりである。

【化20】



10

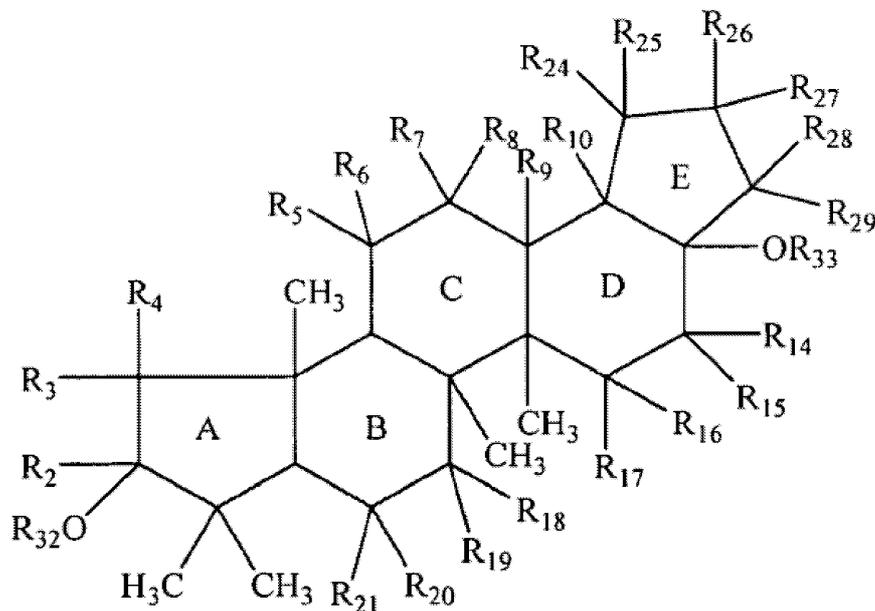
20

【0135】

再度、 R_1 および R_{13} 置換基は、酸素ベースの官能基であり得る。 R_{13} 置換基は、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち $-OR_{34}$ から選択される R_{33} 置換基を担持するアシル基であり得ることを示し、 R_{34} は脂肪族化合物、典型的には、アルキルまたは置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキル、一次アミド ($-NH_2$)、二次アミド ($-NHR_{35}$)、および三次アミド ($-NR_{35}R_{36}$) を含むアミドであって、 R_{35} および R_{36} は脂肪族化合物、典型的には低分子脂肪族化合物、より典型的にはアルキル、置換アルキル、およびさらに典型的には低分子アルキルまたは置換低分子アルキルである。この一般式は、 R_1 置換基が OR_{32} 置換基である場合が多いことも示し、式中、 R_{32} は水素または脂肪族化合物、より典型的にはアルキルまたは置換アルキル、さらに典型的には低分子アルキルである。

30

【化21】



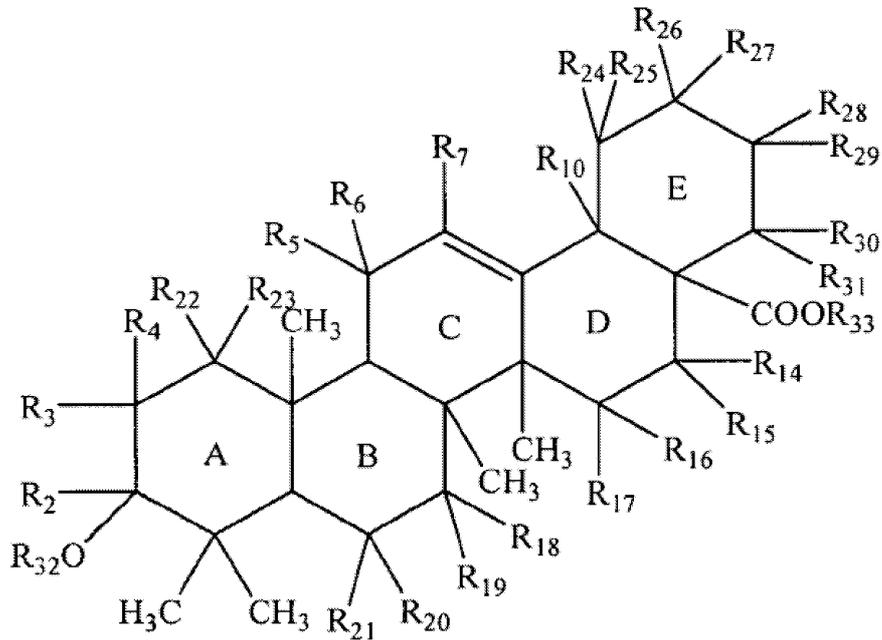
40

50

【0136】

本発明の例示的なトリテルペンは、A - E 環の1つ以上において1つ以上の不飽和部位も含み得る。例示的な化合物は、以下に示されるようなC環における二重結合等の、少なくとも1つの不飽和部位をC環に有する場合が多い。

【化22】



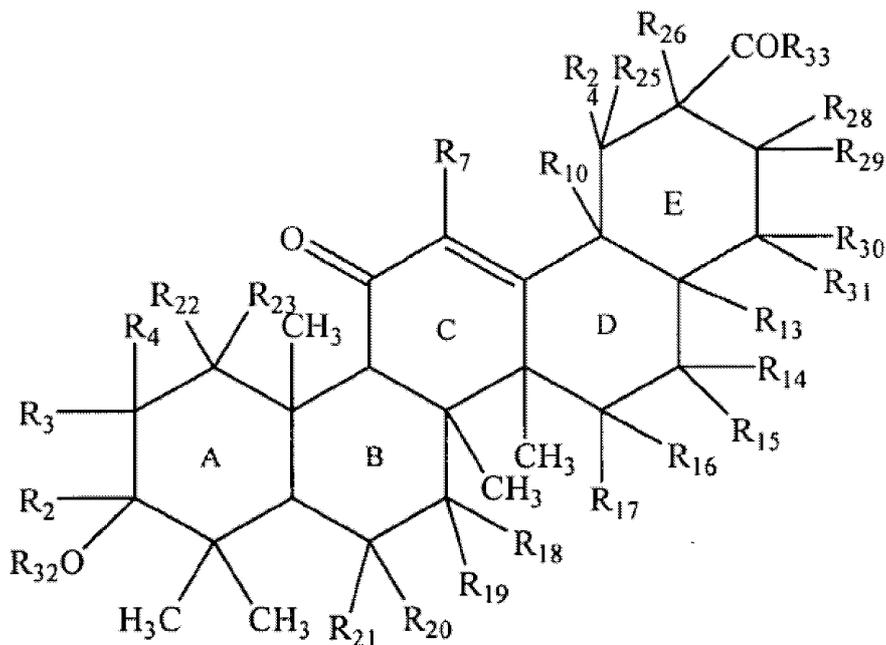
10

20

【0137】

不飽和部位は、C環に関して以下に例証されるような、不飽和ケトンであり得る。

【化23】



30

40

【0138】

トリテルペンは、いくつかの立体炭素原子も有する。当業者は、特定のエナンチオマーが最も天然に存在する可能性が高いことを理解するであろう。天然に存在するエナンチオマーは最も使用可能および/または有効であり得るが、開示される実施形態を実施するた

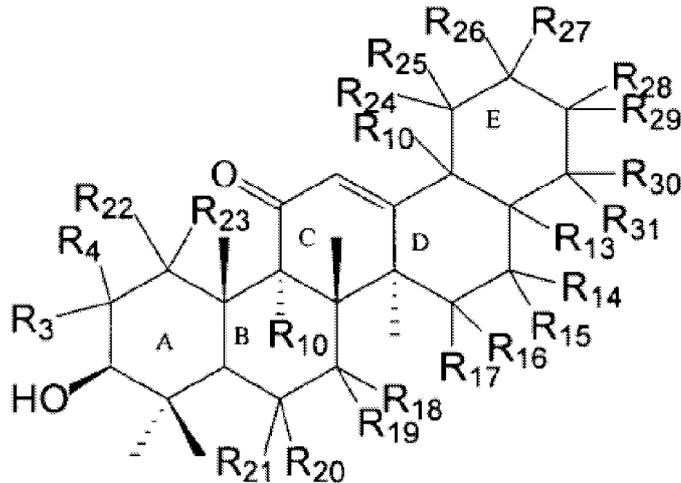
50

めに、すべての他の可能な立体異性体が本発明の範囲内である。さらに、他の天然に存在するトリテルペン、またはそれらの合成誘導体、または完全合成化合物は、(1)異なる立体化学、(2)異なる置換基を有し得、さらに天然に存在する化合物では置換されない位置で置換され得る。上で提供される一般式は、キラル中心において立体化学を示さない。これは、各キラル中心における両方のエナンチオマーを表わし、すべてのそれらのジアステレオマー異性体の組み合わせは、本発明の範囲内である。

【0139】

特定の実際の本発明の実施形態は、以下の一般式によって例証され、置換基は上述のとおりである。

【化24】



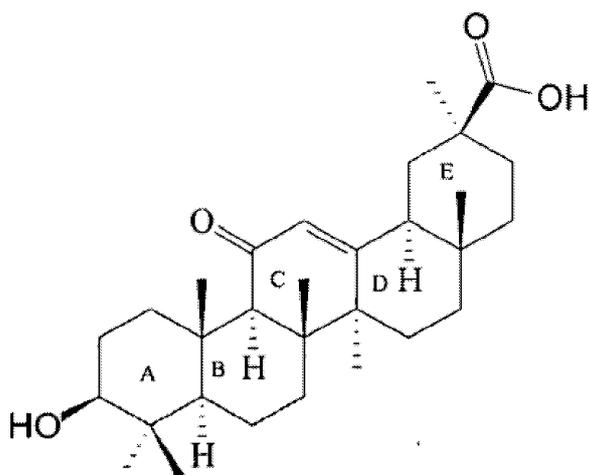
10

20

【0140】

本発明を実施するためのハプテンとして有用な天然に存在するトリテルペンの立体化学および置換基を以下に示す。

【化25】



30

40

【0141】

A環におけるヒドロキシル基は、典型的には、実際の実施形態においてカルボニル官能基に酸化される。その結果、カルボニル基を担持する炭素原子はキラル中心ではなくなる。

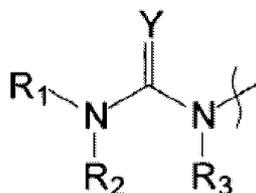
【0142】

50

5. 尿素およびチオ尿素

尿素およびチオ尿素、特にアリールおよびヘテロアリール尿素およびチオ尿素は、本発明の範囲内の別のクラスのハブテンである。本発明の尿素ベースのハブテンの一般式は、以下に提供される。

【化26】



10

【0143】

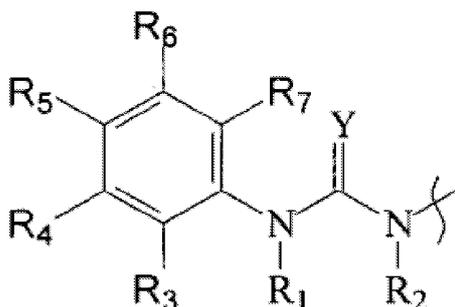
この一般式に関連して、 $R_1 - R_3$ は、独立して水素、脂肪族化合物、置換脂肪族化合物であり、典型的にはアルキル、置換アルキル、およびより典型的には低分子アルキルおよび置換低分子アルキル、環状、ヘテロ環状アリールおよびヘテロアリールである。より具体的には、 R_1 は、典型的にはアリールまたは脂肪族化合物であり、色素体検出を促進するように少なくとも1つの不飽和部位を有する場合が多い。 R_2 および R_3 は、最も典型的には、独立して水素および低分子アルキルである。 Y は、酸素（尿素誘導体）または硫黄（チオ尿素）である。

20

【0144】

アリール誘導体は、典型的には以下の化学式を有する。

【化27】



30

【0145】

$R_1 - R_7$ は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソブレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば - CX_3 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3 - O - N =$ ）アルコール（すなわち、脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはカルボン酸アンモニウムイオン等のそれらの塩を含む）、環状、複素環、シアノ（- CN ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $HO - N =$ ）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルフォキシド、スルホニル、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。 $R_3 - R_7$ 置換基の少なくとも1つは、リンカーまたは担体分子

40

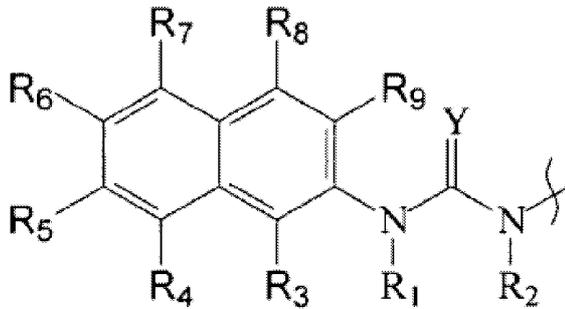
50

にも結合される。かかる結合に使用可能なこれらの $R_3 - R_7$ 置換基の2つ以上は、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系において、原子、典型的には炭素原子でもあり得る。

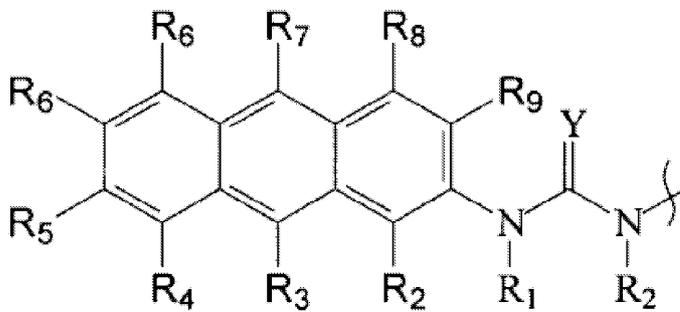
【0146】

以下に提供される例示的な構造によって示されるように、追加の環も存在し得る。R基は、 $R_1 - R_7$ に関して上述のとおりであり、Yは酸素または硫黄である。

【化28】



10

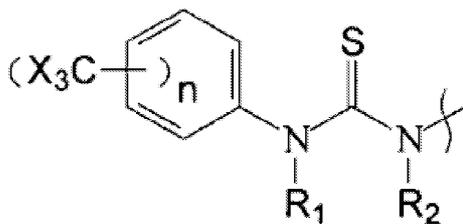


20

【0147】

チオ尿素の特定のサブクラスは、以下に表わされる。

【化29】



30

【0148】

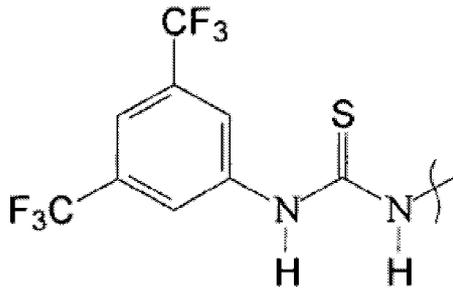
この一般式に関連して、nは1~5、典型的には1-2、 R_1 および R_2 は独立して水素または低分子アルキルであり、Xは独立してハロゲン化物または異なるハロゲン化物の組み合わせである。

40

【0149】

フェニルチオ尿素の実施形態の一例は、以下に提供される。

【化 3 0】

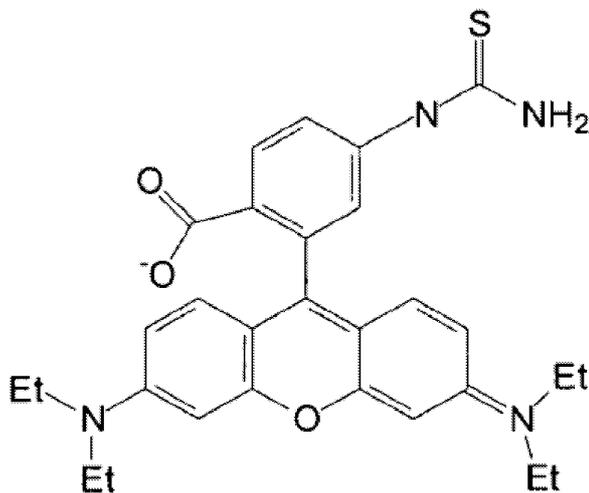


10

【 0 1 5 0】

トリフルオロメチル基は、チオ尿素部分に関連して、3および5位において示される。当業者は、かかる複数のトリハロアルキル置換基のすべての可能な相対位置において、2, 4 - および2つ以上のトリハロアルキル置換基を有する化合物等の二置換化合物のすべての相対位置を有する化合物も本発明の範囲内であることを理解するであろう。ローダミンチオ尿素ハプテンの特定の例は、以下の化学式を有する。

【化 3 1】



20

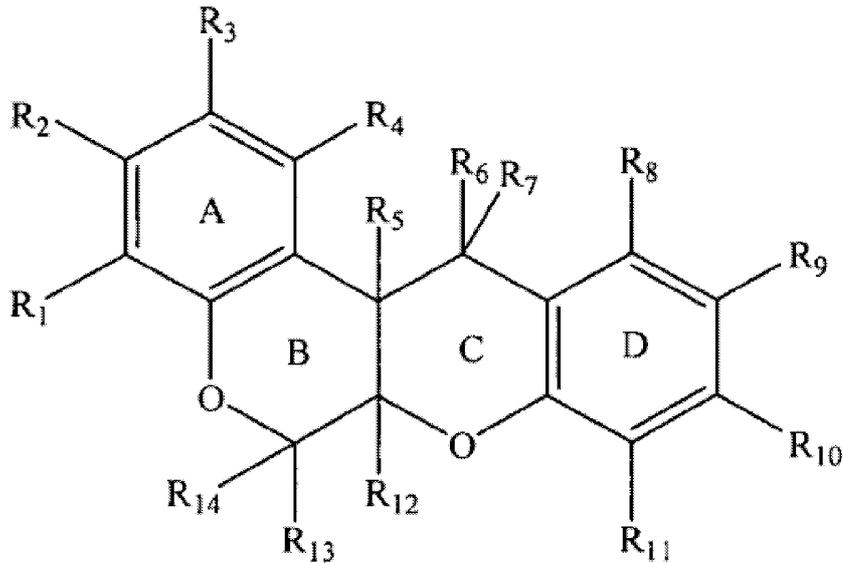
30

【 0 1 5 1】

6. ロテノン

まとめてロテノイドと称されるロテノンおよびロテノンベースのハプテンは、本発明の範囲内の別のクラスのハプテンを提供する。ロテノンの第1の一般式およびロテノンベースのハプテンは、以下に提供される。

【化 3 2】



10

【0152】

多くの刊行物は、本発明を実施するために有用なトリテルペンの属内の天然に存在、半合成、および合成トリテルペン種について論じており、Leslie Crombie and Donald Whiting, *Biosynthesis in the Rotenoids Group of Natural Products: Application of Isotope Methodology*, *Phytochemistry*, 49, 1479-1507 (1998) および Nianbai Fang, and John Casida, *Cube Resin Insecticide: Identification and Biological Activity of 29 Rotenoid Constituents* を含み、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる。本開示および実際のその実施形態、ならびにこれらの先行刊行物によって提供される開示に基づいて、かつこの第1の一般的化学式に関連して、 $R_1 - R_{14}$ は、水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（ $-CN$ ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $HO-N=$ ）、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3-O-N=$ ）アルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、カルボキシル、カルボン酸（およびI族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環状、ヘテロ環状アリール、ベンジル等のアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖類、糖質、およびグルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。これらの $R_1 - R_{14}$ 置換基の2つ以上は、原子、典型的には、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における炭素原子でもあり得る。 $R_1 - R_{14}$ 置換基の少なくとも1つは、リンカーまたは担体分子にも結合される。

20

30

40

【0153】

R_6 および R_7 は上述されるとおりであり得、かかる置換基は、より典型的には独立して水素、 OR_{15} であり、 R_{15} は水素、脂肪族化合物、置換脂肪族化合物であり、典型

50

的にはアルキル、置換アルキルである、およびより典型的には、低分子ハロゲン化アルキル、環状、ヘテロ環状アリールおよびヘテロアリール等の低分子アルキルおよび置換低分子アルキル、または $-NR_{21}$ であって、 R_{21} は水素、脂肪族化合物、置換脂肪族化合物であり、典型的にはアルキル、置換アルキル、より典型的には低分子ハロゲン化アルキル、環状、ヘテロ環状、アリールおよびヘテロアリール等の低分子アルキルおよび置換低分子アルキル、または $N-L-RG$ であって、 L は本明細書において詳述されるように、アミン等のリンカーまたは反応性基である。

【0154】

R_6 および R_7 は、カルボニルを作製するような酸素に対する二重結合等の二重結合を作製することもできる。 R_6 および / または R_7 が $-L-RG$ でない場合は、次いで、 R 置換基の少なくとも1つは、リンカーまたは担体分子に結合される。

10

【0155】

B 環は、少なくとも1つの追加の不飽和部位も含み得る。例えば、 R_5 および R_{12} は二重結合を作製し得る。

【0156】

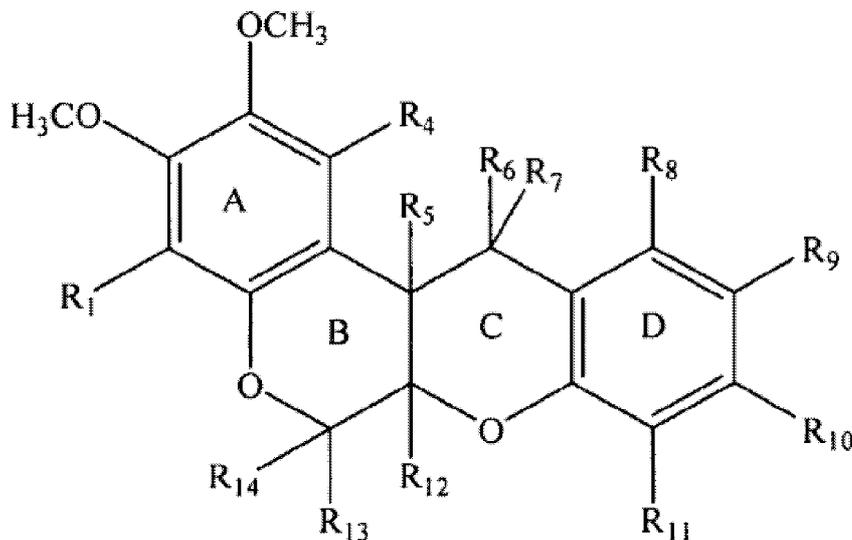
R_{10} および R_{11} は、5または6員環において結合され得る。例えば、 R_{10} および R_{11} は、ピランまたはフラン環を画定し得、より具体的には、置換および / または不飽和ピランまたはフラン環である。

【0157】

本発明の所定の例示的なロテノンベースのハプテンは、典型的には以下の第2の一般式を満たす。

20

【化33】



30

【0158】

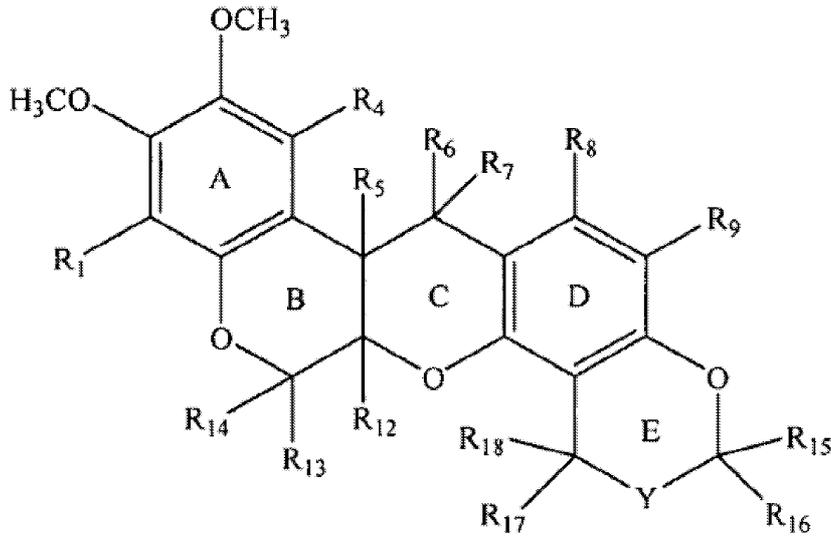
この第2の一般式に関連して、 R 置換基は上述のとおりである。 R_6 または R_7 が $-L-RG$ でない場合、次いで、残りの R 基の少なくとも1つは、リンカーまたは担体に結合される。

40

【0159】

R_{10} および R_{11} は、ピランまたはフラン等の5または6員環に結合され得、より具体的には、置換および / または不飽和ピランまたはフラン環に結合され得る。したがって、本発明の所定のロテノンベースのハプテンを説明するために有用な第3の一般式は、以下に提供され、式中、 R 置換基は上述のとおりである。

【化34】



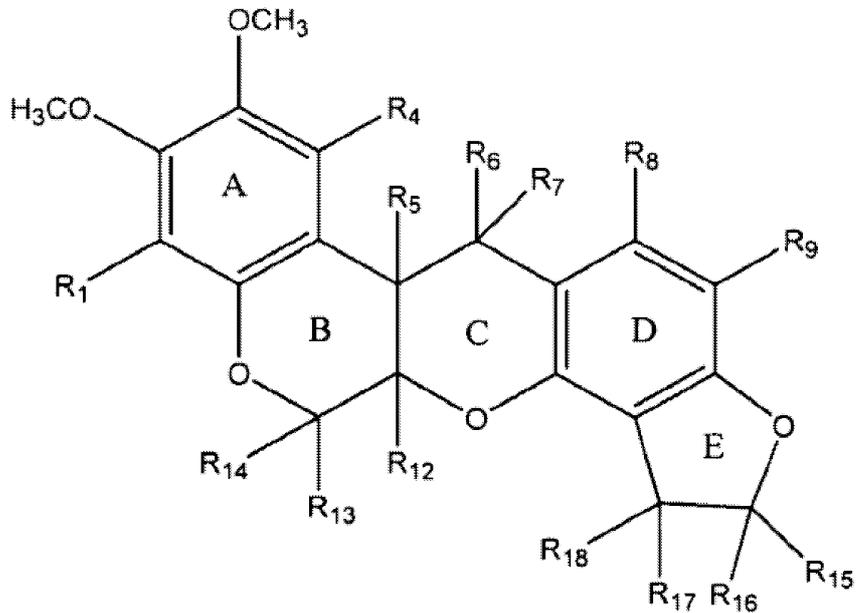
10

【0160】

Yは、これによって5員環を画定する結合であるか、または以下に示されるように、R₁₉およびR₂₀置換基を担持する6員環における炭素原子であって、式中、R置換基は上述のとおりである。

20

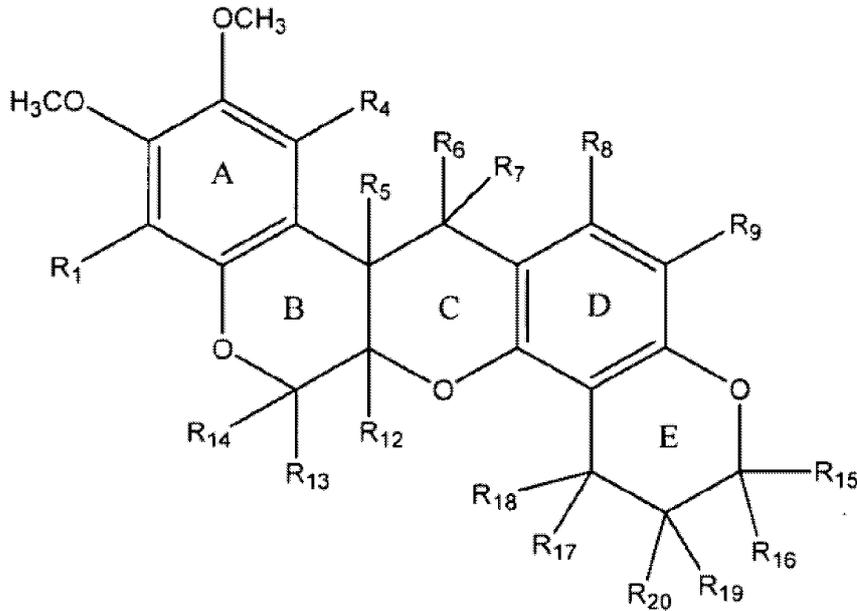
【化35】



30

40

【化 3 6】



10

【 0 1 6 1】

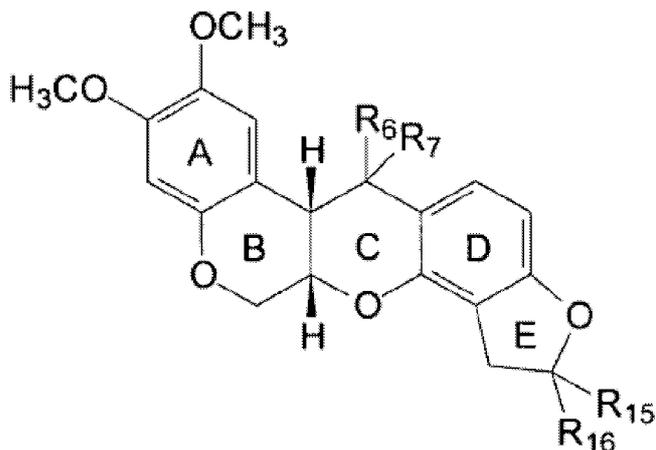
20

環接合における R_5 および R_{12} は、特定の立体化学を示すことなく示される。天然に存在する化合物は、シス環接合を有するが、ラセミ混合物も本発明を実施するために有用である。またトランス立体異性体は、迅速に平衡化してラセミ混合物を作製する。

【 0 1 6 2】

このクラスの化合物の実際の実施形態は、より典型的には、以下の第 3 の一般式を満たす。

【化 3 7】



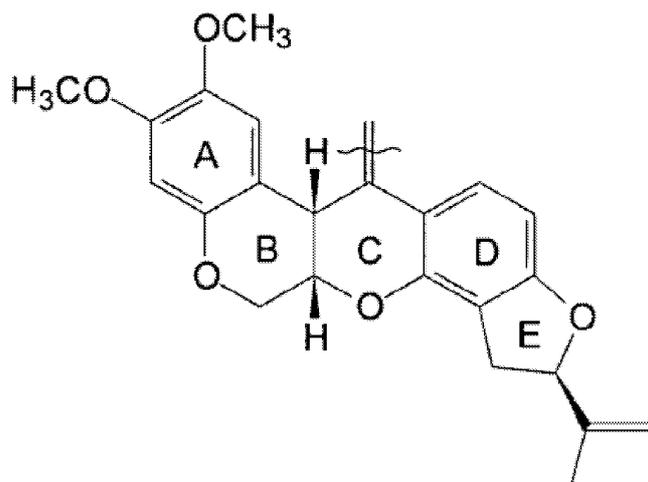
30

40

【 0 1 6 3】

この一般式に関連して、 R_6 および R_7 は、水素、アルキルであるか、または例えばカルボニルを作製する酸素への二重結合を画定する。 R_{15} および R_{16} は、独立して水素および脂肪族化合物であり、典型的には、アルケニル等の低分子脂肪族化合物であって、その一例は、以下に示されるようなイソプレレンである。

【化 3 8】



10

【 0 1 6 4】

再度、特定のエナンチオマーは、上記化学式に示されるが、当業者は、本発明の範囲が示される特定のエナンチオマーに限定されないことを理解するであろう。代わりに、ハプテンとして作用するすべての立体異性体も開示の範囲内である。このクラスの化合物に関して上述されるすべての置換は、この特定の化合物に適用する。他の置換基も当業者には容易に明らかとなる。例えば、A環状のメトキシ基は、任意のアルコキシ化合物、特に低分子アルコキシ基であり得る。イソプレレン単位は、合成的に修飾され、場合によっては、ハプテンをリンカーまたは担体分子に結合するための代替位置または少なくとも第2の位置を提供できるオレフィンも提供する。例えば、オレフィンは、ヒドロホウ素化によってアルコールに変換され得る。またハプテンとして、またはさらなる形質転換に有用な中間物として使用するためのハロゲン化物またはエポキシドにも変換され得る。

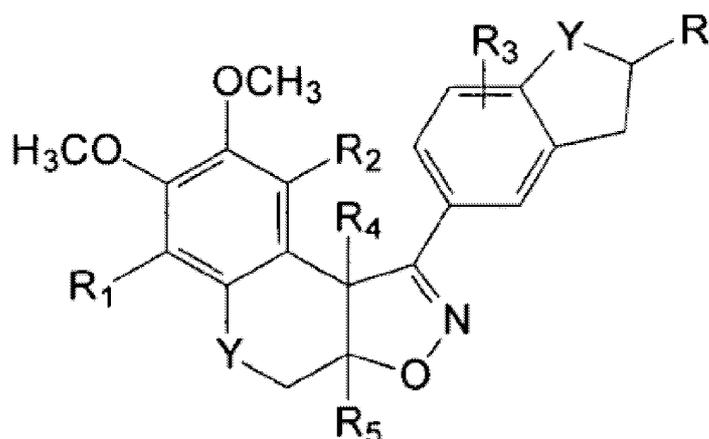
20

【 0 1 6 5】

本発明のロテノンベースのハプテンを説明するための第4の一般式は、以下に提供されるように、特にロテノンイソキサゾリンを対象にする。

30

【化 3 9】



40

【 0 1 6 6】

R - R₅ は、独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特に低分子脂肪族化合物であり、イソプレレン等のすべての分岐鎖異性体、およびすべての立体異性体、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を

50

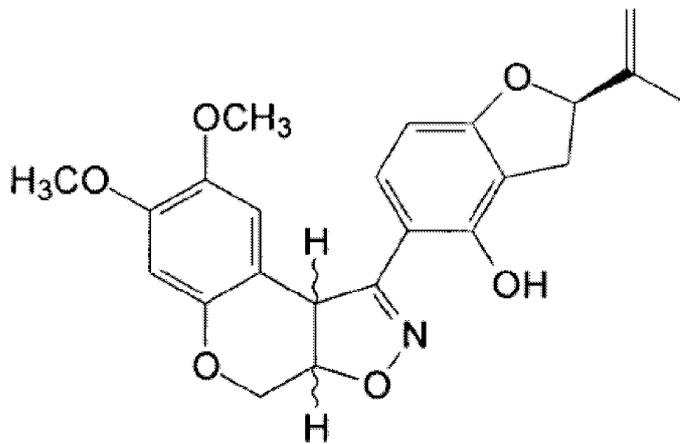
有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば - C X₃、式中 X は、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ（ - C N ）、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ H O - N = ）、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 C H₃ - O - N = ）アルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、カルボキシル、カルボン酸（および I 族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環状、ヘテロ環状アリール、ベンジル等のアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖類、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、およびそれらの組み合わせである。 R - R₅ 置換基の少なくとも 1 つは、リンカーまたは担体分子にも結合される。 Y は酸素、窒素、または硫黄である。

10

【 0 1 6 7 】

この第 4 の一般式を満たすロテノンベースのハプテンの特定の実際の実施形態は、以下に提供される。

【 化 4 0 】



20

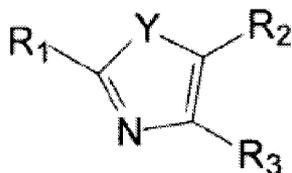
30

【 0 1 6 8 】

7. オキサゾールおよびチアゾール

オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドは、本発明の範囲内の別のクラスのハプテンを提供する。オキサゾールおよびチアゾールスルホンアミドの一般式は、以下に提供される。

【 化 4 1 】



40

【 0 1 6 9 】

この第 1 の一般式に関連して、 R₁ - R₃ は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に 20 以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の 10 以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば - C X₃、式中 X は、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物

50

、およびそれらの組み合わせ)等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル(例えば、メトキシミン、 $\text{CH}_3 - \text{O} - \text{N} =$)アルコール(すなわち脂肪族化合物またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル)アミド、アミノ、アミノ酸、アリーール、ベンジル等のアルキルアリーール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸(およびI族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩)エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環状、ヘテロ環状、シアノ($-\text{CN}$)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリーール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム($\text{HO} - \text{N} =$)、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。これらの $\text{R}_1 - \text{R}_3$ 置換基の2つ以上は、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における原子、典型的には炭素原子でもあり得る。 $\text{R}_1 - \text{R}_3$ 置換基の少なくとも1つは、リンカーまたは担体分子に結合するために適したリンカーまたは官能基に結合される。 Y は酸素または硫黄、典型的には硫黄である。

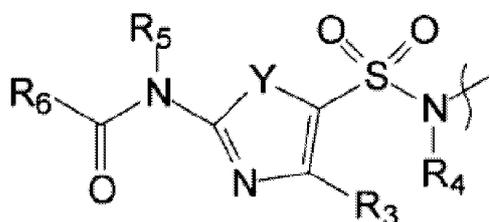
10

【0170】

所定の例示的な実際の実施形態の場合、 R_1 は、以下に示されるアミド誘導体等のアミドである。 R_2 は、リンカーまたは担体分子に結合するための位置を提供するが、 R_1 および R_2 によって示される該位置は、リンカーおよび/または担体分子に結合するための代替または追加位置も提供する。所定の例示的な実際の実施形態の場合、 R_2 は、 $-\text{SO}_2$ であって、スルホンアミドを作製することによってリンカーを結合するために使用されている。したがって、このクラスのアブテンを例証するアブテンの実際の実施形態に対する第2の一般式が以下に示され、式中、 $\text{R}_3 - \text{R}_6$ 置換基および Y は上述のとおりである。

20

【化42】



30

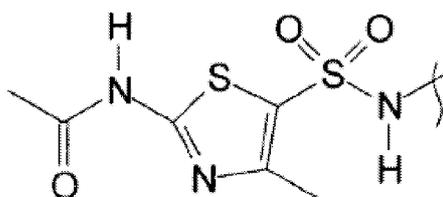
【0171】

所定の実際の実施形態の場合、 R_6 はアルキル、特にメチル等の低分子アルキルであって、 Y は硫黄であった。

【0172】

このクラスのアブテンに従う化合物の実際の一実施形態は、以下の化学構造を有した。

【化43】

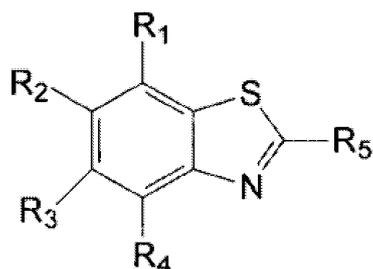


40

【0173】

チアゾールまたはオキサゾールは、より大きい環状系の一部でもあり得る。例えば、5員オキサゾールまたはチアゾールは、以下に示されるようなフェニル環等の少なくとも1つの追加環に結合され得る。

【化 4 4】

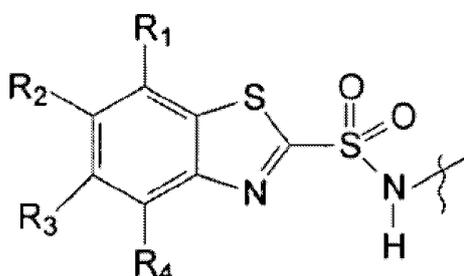


10

【 0 1 7 4】

R₁ - R₅ 基は、概して上述のとおりであり得るが、かかる化合物は、R₅ 等のリンカーおよび/または担体に結合するための位置も提供する。1つの考えられるスルホンアミド誘導体は以下に提供される。

【化 4 5】



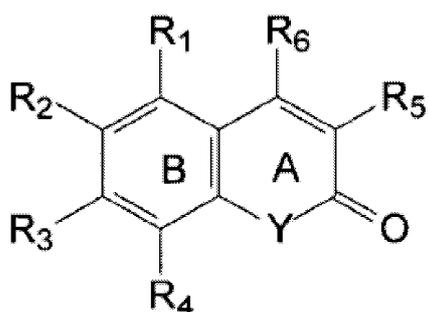
20

【 0 1 7 5】

8. クマリン

クマリンおよびクマリン誘導体は、本発明の範囲内の別のクラスのハプテンを提供する。クマリンおよびクマリン誘導体の一般式は、以下に提供される。

【化 4 6】



30

【 0 1 7 6】

この一般式に関連して、R₁ - R₆ は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル(例えば -CX₃、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ)等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル(例えば、メトキシイミン、CH₃-O-N=)アルコール(すなわち脂肪族化合物またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル)アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロ

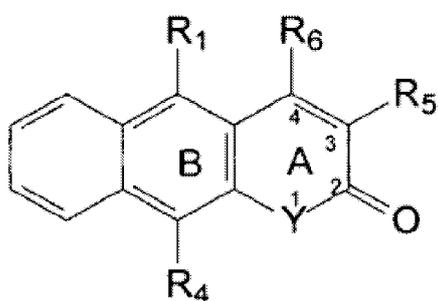
40

50

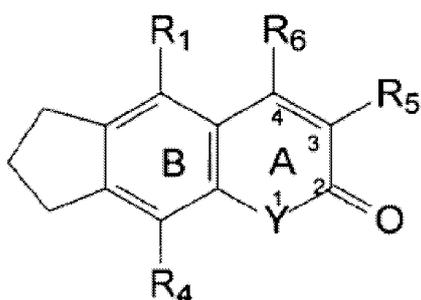
ースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（およびⅠ族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）、環状、ヘテロ環状、シアノ（-CN）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（HO-N=）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルフォキシド、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。R₁ - R₆置換基の少なくとも1つも、典型的にはリンカーまたは担体分子に結合される。所定の実際の実施形態は、リンカーまたは担体分子に結合するためのR₅置換基を有すると示される位置を使用した。4位は、蛍光を使用してこれらの化合物を検出する場合に重要となり得る。4位におけるヒドロゲン以外の置換基は、蛍光を消すと考えられるが、かかる誘導体は、依然として発色団であり得る。Yは酸素、窒素または硫黄である。かかる化合物の作製に使用可能なR₁ - R₆置換基の2つ以上は、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における原子、典型的には炭素原子でもあり得る。これらの種類の化合物の例示的な実施形態は、以下に提供される。

10

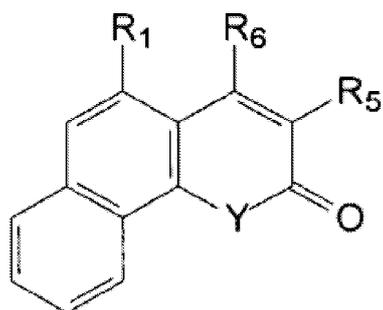
【化47】



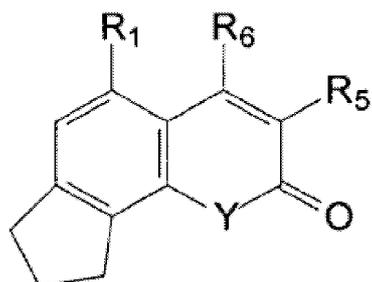
20



30



40



50

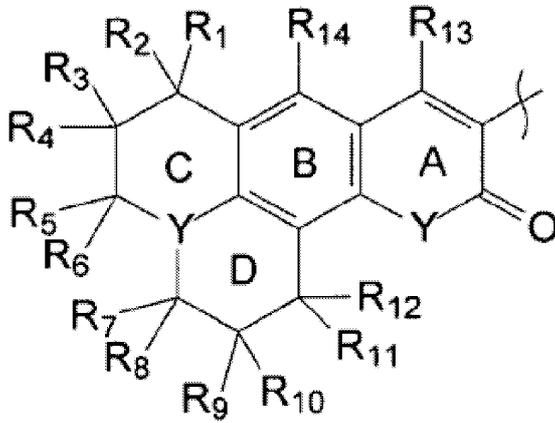
【 0 1 7 7 】

当業者は、環がヘテロ環および/またはヘテロアリアルでもあり得ることを理解するであらう。

【 0 1 7 8 】

実際の実施形態は、典型的には、以下に示される1つの考えられる結合位置ともに、少なくとも1つの担体分子連結位置を有する融合A - D環系であった。

【 化 4 8 】



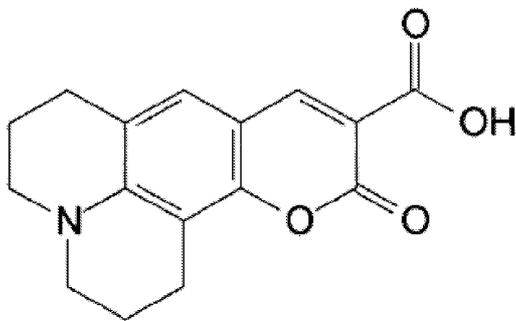
10

20

【 0 1 7 9 】

この一般式に関連して、RおよびY可変基は、上述のとおりである。最も典型的には、 $R_1 - R_{14}$ は、独立して水素または低分子アルキルである。クマリンベースのハプテンの特定の実施形態は、2, 3, 6, 7 - テトラヒドロ - 11 - オキソ - 1H, 5H, 11H - [I] ベンゾピラノ [6, 7, 8 - ij] キノリジン - 10 - カルボン酸

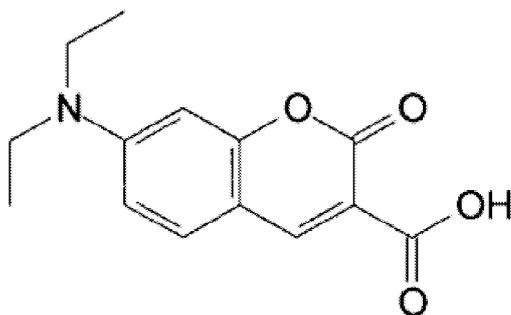
【 化 4 9 】



30

およびジエチルクマリン

【 化 5 0 】



40

を含む。

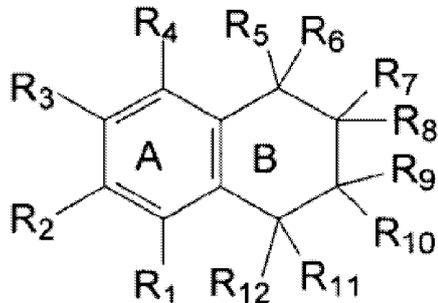
【 0 1 8 0 】

50

9. シクロリグナン

リグニンベースの化合物、特にポドフィロトキシンおよびその誘導体等のシクロリグナンは、本発明の範囲内の別のクラスのハプテンを提供する。これらのシクロリグニンベースの誘導体の第1の一般式は、以下に提供される。

【化51】



10

【0181】

いくつかの刊行物は、本発明を実施するために有用なシクロリグナンの属を説明するために有用な自然発生、半合成、および合成シクロリグナンについて論じており、Stephanie Desbene and Sylviane Giorgi-Renault, *Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The Particular Case of Podophyllotoxin and Analogues*, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2, 71-90 (2002); M. Gordaliza et al., *Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications and New Cytotoxic Derivatives*, *Toxicol.*, 44, 441-459 (2004)、Phillipe Meresse et al., *Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry*, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2443-2466 (2004)、M. Pujol et al., *Synthesis and Biological Activity of New Class of Dioxygenated Anticancer Agents*, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 5, 215-237 (2005)、および Youngjae You, *Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents*, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1695-1717 (2005) を含み、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる。本開示および実際の実施形態、ならびにこれらの先行刊行物によって提供される開示に基づいて、かつこの第1の一般的化学式に関連して、R₁ - R₁₂ は、典型的には、水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば -CX₃、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、アミノ、アミノ酸、アミド。シアノ(-CN)、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH₃-O-N=）アルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル、カルボニル、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、カルボキシル、カルボン酸（およびI族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメ

20

30

40

50

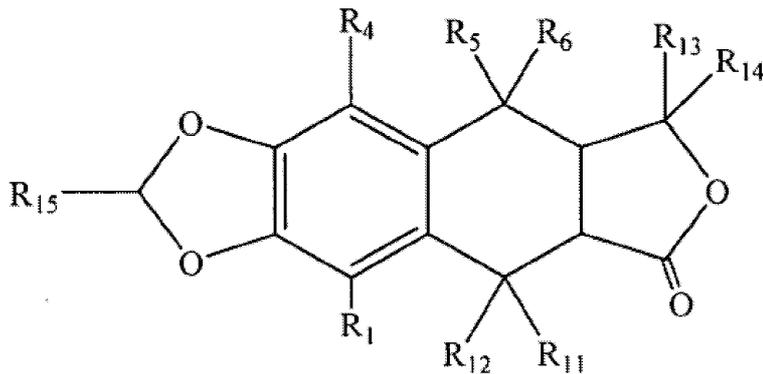
チレン、エーテル、環状、ヘテロ環状、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、ヘテロアリール、多糖類、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。R₁ - R₁₂の少なくとも1つは、化合物をリンカーまたは担体分子に結合するための位置を提供する。さらに、所定のR基は、環状系における原子であり得る。例えば、R₂およびR₃ならびにR₇ - R₁₀の2つを環状系においてともに結合することができる。R₁₂およびR₁₁の少なくとも1つも、ベンゼン環または置換ベンゼン環等のアリール基である場合が多い。

【0182】

所定の実際の実施形態も、以下の第2の一般式を満たし、式中、R置換基は上述のとおりである。

10

【化52】

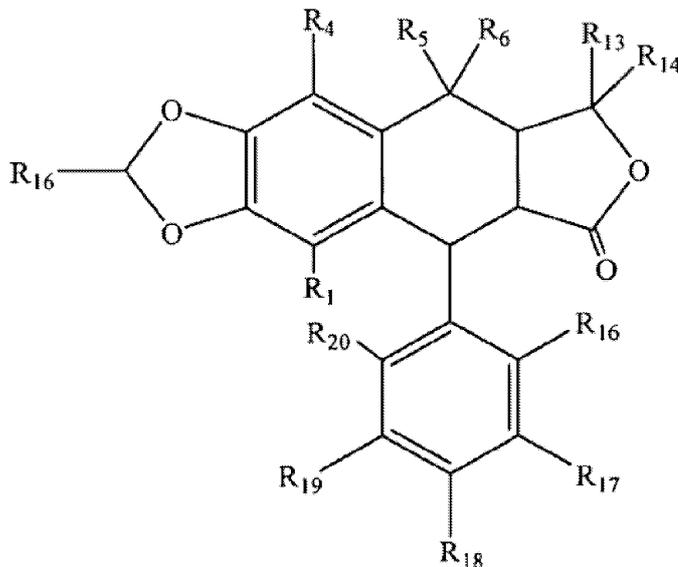


20

【0183】

R₁₁およびR₁₂の少なくとも1つがアリール基である例示的な化合物は、以下の一般式を有し、式中、R置換基は上述のとおりである。

【化53】



30

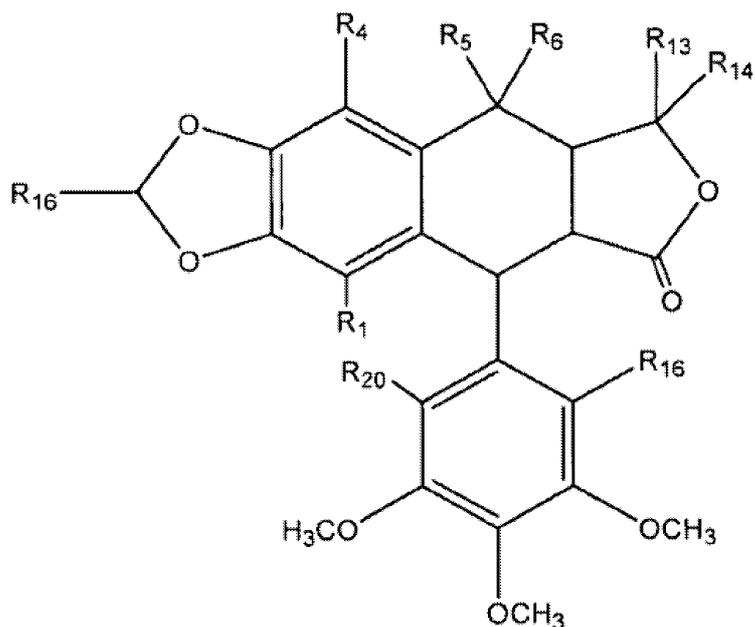
40

【0184】

R₁₆ - R₂₀は、概して上述のとおりであるが、より典型的には、独立して水素またはアルコキシ、典型的には以下に示されるように、メトキシ等の低分子アルコキシである。

。

【化 5 4】



10

【 0 1 8 5】

20

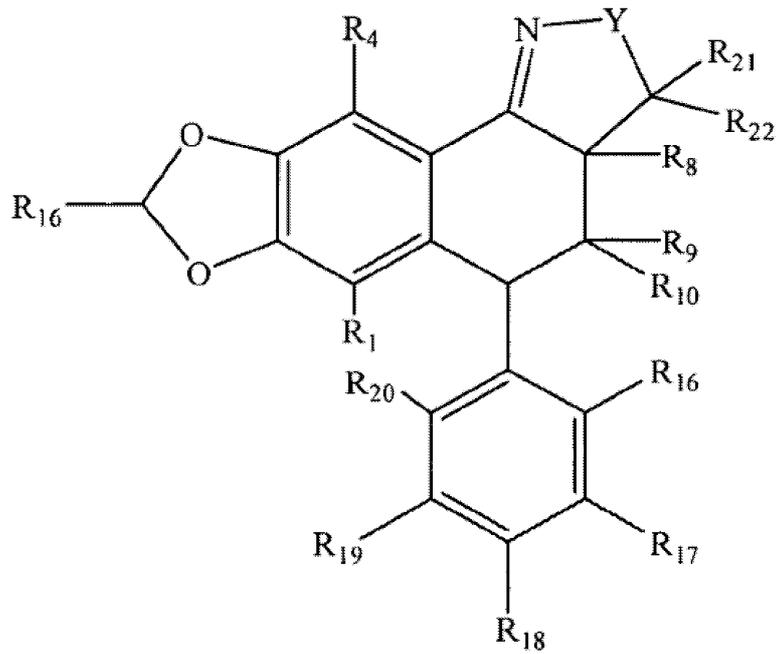
R置換基の少なくとも1つは、典型的には、リンカーに結合されるか、リンカーと反応可能な反応性官能基であるか、または - L - R Gである。例えば、R₅は、- L - R Gである場合が多い。

【 0 1 8 6】

R₅およびR₆は、カルボニル官能基を作製するための酸素への二重結合、またはイミンを作製するための窒素原子への二重結合等の二重結合も作製し得る。R₅およびR₆が二重結合を作製する所定の例示的な化合物は、以下の一般式を有し、残りのR置換基は上述のとおりである。Yは、窒素、酸素、または硫黄から選択される。Yが窒素である場合は、次いで、窒素原子は、水素または一部の原子、官能基または水素以外の化学部分に対してさらに結合し得る。例えば、窒素は、アルキル基、アリールまたはヘテロアリール置換基等の脂肪族置換基、またはアルキルおよび/またはアルコキシ置換アリールまたはヘテロアリール置換基等の置換アリールまたはヘテロアリール置換基を有し得る。

30

【化55】



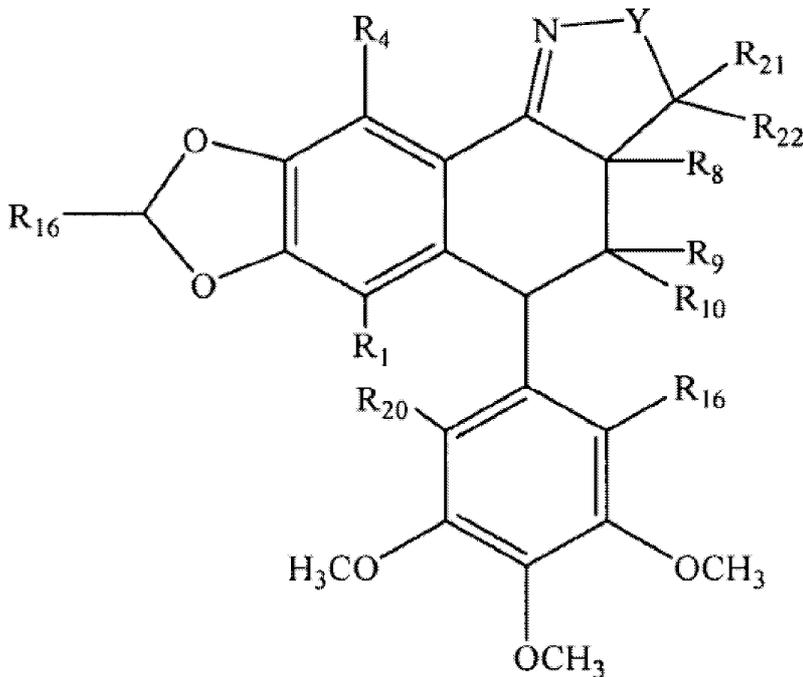
10

20

【0187】

R₁₆ - R₂₀ は、水素およびアルコキシ、より典型的には以下に示されるような低分子アルコキシから独立して選択される。

【化56】



30

40

【0188】

本発明のすべてのハブテン共役体と同様に、R置換基の少なくとも1つは、典型的には、リンカーに結合されるか、リンカーと反応可能な反応性官能基であるか、-L-RGであるか、または担体に直接結合される。例えば、R₉は-L-RGである場合が多い。

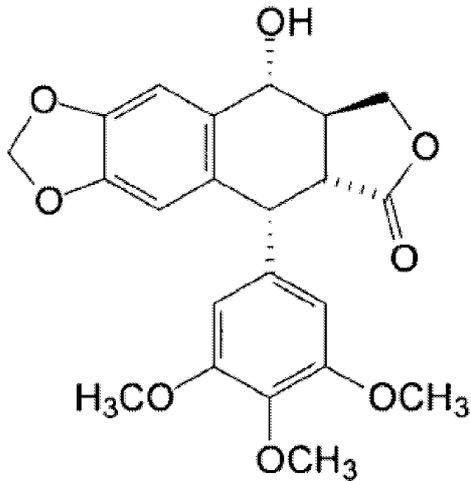
【0189】

ポドフィロトキシンの化学構造、このシクロリグナンクラススのハブテンを例証する化合

50

物は、以下に提供される。

【化 5 7】



10

【 0 1 9 0 】

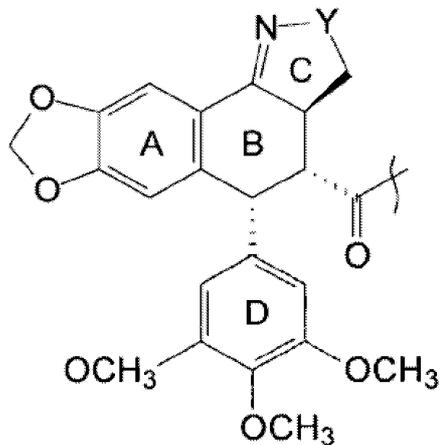
ポドフィロックスとも称されるポドフィロトキシンは、分子量 414.40 および組成化学式 $C_{22}H_{22}O_8$ の非アルカロイド毒素である。ポドフィロトキシンは、アメリカハッカクレンポドフィルムのライゾーム中、0.3 ~ 1.0% の質量濃度で存在する。ポドフィロトキシンの溶解点は、183.3 ~ 184.0 である。

20

【 0 1 9 1 】

したがって、実質的にポドフィロトキシン構造に基づく本発明に従うシクロリグナンは、以下の一般式を有し、式中、Y は窒素、酸素、または硫黄から選択される。

【化 5 8】



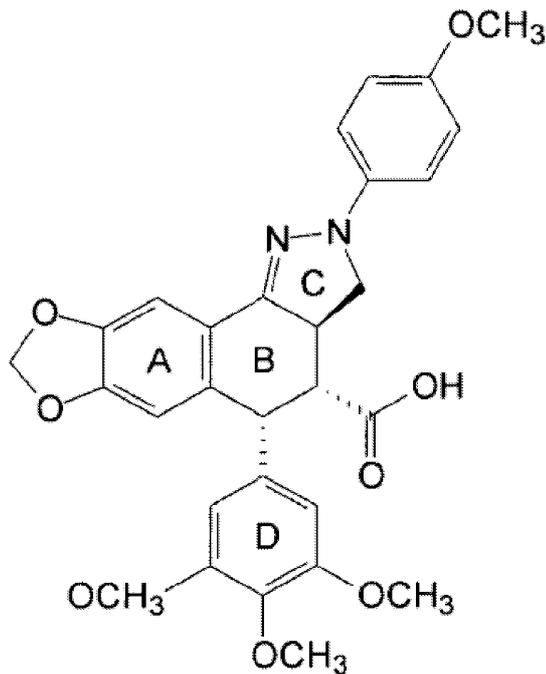
30

【 0 1 9 2 】

本発明に基づくシクロリグナンハプテンの特定の例は、以下に示される。

40

【化59】



10

20

【0193】

この化合物は、ポドフィロトキシンから作製した。ポドフィロトキシンのヒドロキシル基は、ケトンに酸化した。次いで、ケトン置換ヒドラジンと反応させて、上記の化合物を生成した。必要に応じて、脂肪族およびアリアル置換基を含む、ヒドラジン試薬を置換することができる。

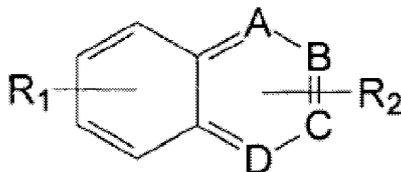
【0194】

10. ヘテロビアリール

本発明の別の一般的なクラスのハブテンは、ヘテロビアリール化合物、典型的にはフェニルキノリンおよびキノキサリンである。開示されるヘテロビアリール化合物は、以下のような第1の一般式を有する。

30

【化60】



【0195】

この一般式に関連して、A - Dは、炭素、窒素、酸素、および硫黄、ならびにそれらの任意およびすべての組み合わせから選択される。最も典型的には、A - Dは、炭素または窒素である。R₁ - R₂置換基は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特にイソプレン等の低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば -CX₃、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、CH₃-O-N=）アルコール（すなわち脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリアル、ベンジル等のア

40

50

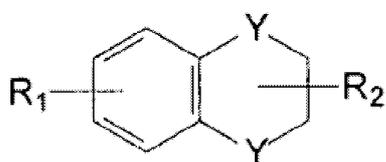
ルキルアリール、メトキシおよびエトキシ等のアルコキシアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）、環状、ヘテロ環状、シアノ（-CN）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（HO-N=）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。R₁ - R₂ 置換基の2つ以上、最も典型的には複数のR₁ 置換基も、例示される一般式を有する化合物に結合または融合される環状系における原子、典型的には炭素原子であり得る。R₁ - R₂ 置換基の少なくとも1つは、典型的には、リンカーに結合されるか、または担体に直接結合される。

10

【0196】

ヘテロビアリール化合物の特定の実施形態は、以下の化学式を有する。

【化61】



20

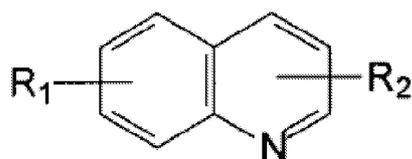
【0197】

R₁ および R₂ は、第1の一般式に関して上述のとおりである。Y は酸素、窒素または硫黄であり、典型的には窒素である。Y が窒素である場合、次いで、該化学式は、1つ以上の窒素原子に対する二重結合も含み得る。

【0198】

単一のヘテロ原子を有する化合物は、以下のようなフェニルキノリンによって例証される。

【化62】

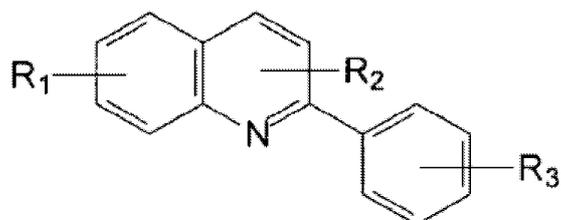


30

【0199】

より特定の実施形態は、以下の一般的化学式によって例証されるアリール置換ハブテンを含む。

【化63】



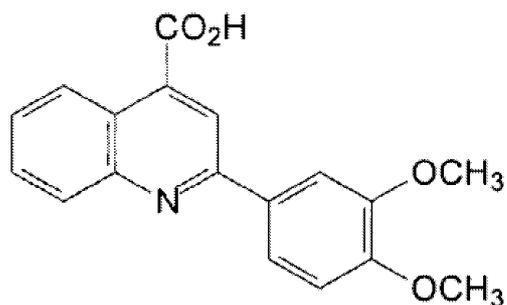
40

【0200】

この一般式に関連して、R₁ - R₃ は上述のとおりである。より典型的には、R₁ は水素であり、R₂ はアシルであって、R₃ はアルコキシである。特定の例、2-(3,4-ジメトキシフェニル)キノリン-4-カルボン酸は、以下に提供される。

50

【化 6 4】

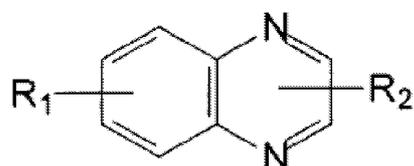


10

【 0 2 0 1】

2つのヘテロ原子を有する化合物は、以下の一般式によって示されるように、キノキサリンによって表わされる。

【化 6 5】

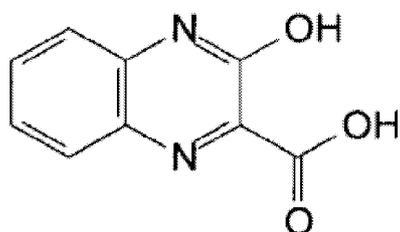


20

【 0 2 0 2】

本発明のピアリール - ジヘテロ原子ハプテンの特定の例は、以下の3 - ヒドロキシ - 2 - キノキサリンカルバミドによって例証される。再度、 R_1 および R_2 置換基は、このクラスのハプテンに関して上述のとおりである。

【化 6 6】



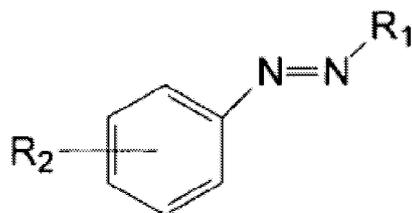
30

【 0 2 0 3】

1 1 . アゾアリール

本発明の別の一般的なクラスのハプテンは、以下のような第 1 の一般式を有するアゾベンゼン等のアゾアリール化合物である。

【化 6 7】



40

【 0 2 0 4】

R_1 - R_2 置換基は、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特に低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄

50

等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オキシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $CH_3-O-N=$ ）アルコール（すなわち脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、メトキシおよびエトキシ等のアルコキシアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）、環状、ヘテロ環状、シアノ（ $-CN$ ）、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $HO-N=$ ）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、スルホニル、エキソメチレン、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。2つ以上の R_2 置換基は、例示される一般的化学式を有する化合物に結合または融合される環状系における原子、典型的には炭素原子でもあり得る。例えば、2 R_2 置換基は、融合フェニル環または融合ヘテロ環、またはヘテロアリール構造を作製し得る。

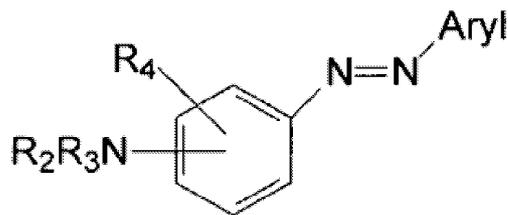
10

【0205】

所定の開示されるアゾアリール化合物は、第1のアミン置換基および第2のアリール置換基を有する。これらの化合物は、典型的には以下の化学式を有する。

20

【化68】



【0206】

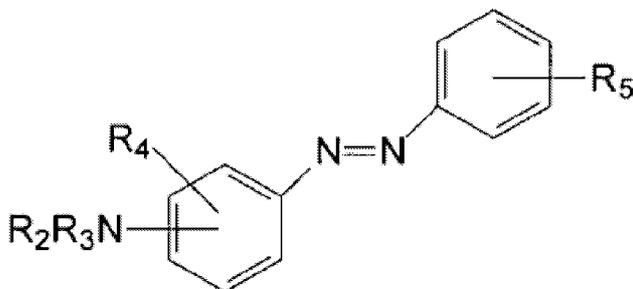
30

この一般式に関連して、 $R_2 - R_4$ は、このクラスのハブテンに関して上述のとおりであり、特定の実施形態では、 $R_2 - R_3$ 脂肪族化合物、特にアルキル、より具的には低分子アルキルを有し、 R_4 は水素である。

【0207】

アゾアリール化合物を説明するための第3の一般式は、以下に提供される。

【化69】



40

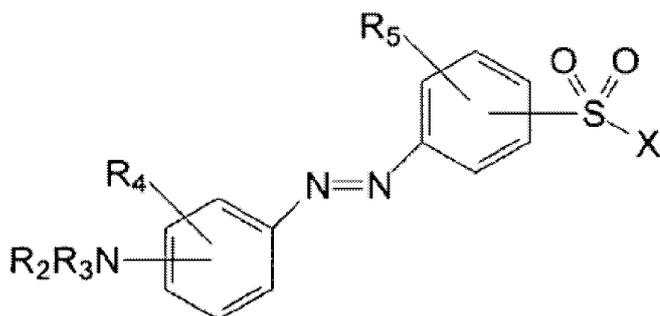
【0208】

$R_2 - R_5$ は、この特定のクラスのハブテンに関して上述のとおりである。 $R_2 - R_5$ の少なくとも1つは、共役体を作製するためのアゾアリールハブテンに対してリンカーまたは担体を結合するための位置を画定する。例えば、 R_5 は、ハロゲン化スルホニル官能

50

基でもあり得る。以下に示されるようなハロゲン化スルホニルは、リンカーをアゾアリアルハプテンに結合するために有用な官能基である。

【化70】

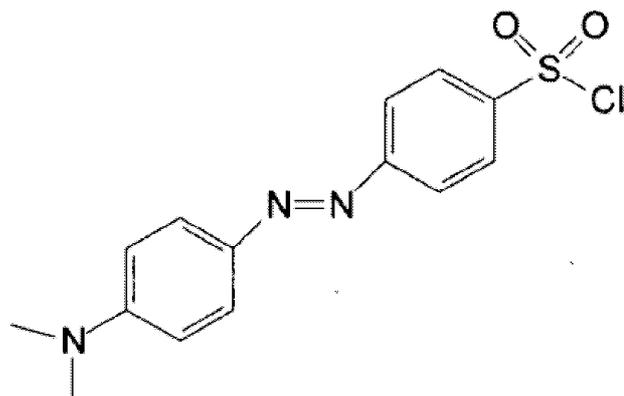


10

【0209】

この化学式に関連して、 $R_2 - R_5$ は上述のとおりである。X はハロゲン化物である。これらのアゾアリアルハプテンの特定の実施形態、4 - (ジメチルアミノ)アゾベンゼン - 4' - 塩化スルホニルは、以下に提供される化学式を有する。

【化71】



20

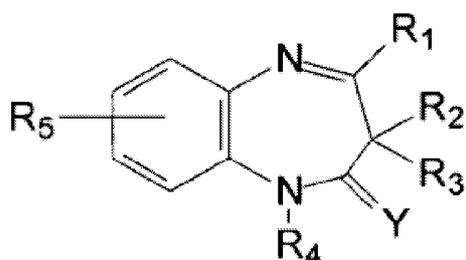
30

【0210】

12. ベンゾジアゼピン

本発明に従う別のクラスのハプテンは、以下に示されるような第1の一般式を有する、ベンゾジアゼピンハプテンである。

【化72】



40

【0211】

$R_1 - R_5$ は、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族化合物、特に低分子脂肪族化合物、置換脂肪族化合物、ヘテロ脂肪族化合物、例えば、酸素、窒素、硫黄等のヘテロ原子を有する有機鎖、アルキル、特に20以下の炭素原子を有するアルキル、およびさらにより典型的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル等の10以下の原子を有する低分子アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば $-CX_3$ 、式中Xは、鎖またはそこに結合されるハロゲン化物、およびそれらの組み合わせ）等の置換アルキル、オ

50

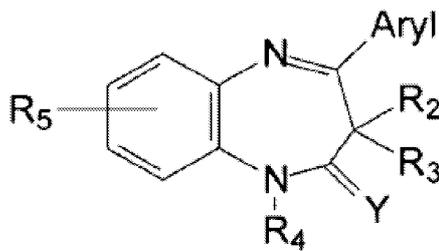
キシム、オキシムエーテル（例えば、メトキシイミン、 $\text{CH}_3 - \text{O} - \text{N} =$ ）アルコール（すなわち脂肪族またはアルキルヒドロキシル、特に低分子アルキルヒドロキシル）アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、ベンジル等のアルキルアリール、メトキシおよびエトキシ等のアルコキシアリール、糖質、グルコースおよびフラクトース等の単糖類、スクロースおよびラクトース等の二糖類、オリゴ糖および多糖類、カルボニル、カルボキシル、カルボン酸（I族金属またはアンモニウムイオンカルボン酸等のその塩）、環状、シアノ（ $-\text{CN}$ ）、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、ヘテロ環、水素、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム（ $\text{HO} - \text{N} =$ ）、脂肪族ケトン等のケト、窒素、スルフヒドリル、スルホニル、スルフォキシド、およびそれらの組み合わせから独立して選択される。2つ以上の R_5 置換基は、例示される一般的化学式を有する化合物に結合または融合される環状系における原子、典型的には炭素原子でもあり得る。 $\text{R}_1 - \text{R}_5$ 位置の少なくとも1つは、リンカーに結合されるか、またはリンカーまたは担体分子に結合するために適した官能基によって占められる。 $\text{R}_1 - \text{R}_5$ は、最も典型的には、脂肪族化合物、アリール、水素、またはヒドロキシル、さらにより典型的にはアルキル、水素、またはフェニルである。 Y は酸素または硫黄、最も典型的には酸素である。

10

【0212】

ベンゾジアゼピンハブテンの特定の実施形態は、以下に示されるように、 R_1 アリールを有する。

【化73】



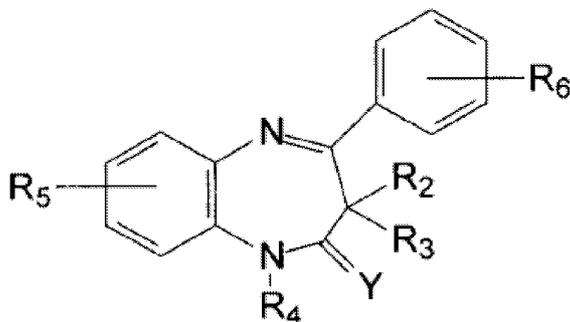
20

【0213】

これらの実施形態の場合、 $\text{R}_2 - \text{R}_5$ は、このクラスの本ハブテンに関して上述のとおりであり、より典型的には、かかる置換基は、脂肪族化合物、特定のアルキル、水素およびヒドロキシルから独立して選択される。所定の開示される実施形態は、以下に示されるようにフェニル化合物である。

30

【化74】

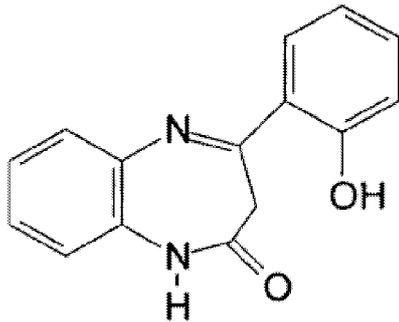


40

【0214】

再度、 $\text{R}_2 - \text{R}_6$ は上述のとおりであるが、より典型的には、かかる置換基は、脂肪族化合物、特にアルキル、水素、およびヒドロキシルから独立して選択される。所定の開示される実施形態は、以下に示されるように、フェニル化合物である。特定の実施形態、4-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-2(3H)-oneは、以下に提供される。

【化 7 5】



10

【0215】

E. リンカー

1. 一般

一般式によって示されるように、本出願のハプテン - 任意のリンカー - 担体共役体は、リンカーを含み得る。この目的で現在知られている、または今後開発される任意のリンカーは、本明細書に開示されるハプテンに結合することによって、本発明の共役体を作製するために使用できる。有用なリンカーは、ホモ - またはヘテロ二官能性のいずれかであり得るが、より典型的にはヘテロ二官能基である。

【0216】

2. 脂肪族

単なる一例として、開示されるハプテン共役体を作製するために適したリンカーの第1のクラスは、1つ以上の不飽和部位またはアルキル鎖を有する脂肪族炭化水素鎖等の脂肪族化合物であるが、それらに限定されない。脂肪族鎖は、典型的には末端官能基を含み、一例としてカルボニル反応基、アミン反応基、チオール反応基、またはハプテンおよび他の所望の化合物に対する結合を促進する、特定の結合部分等の光反応基を含むが、それらに限定されない。鎖の長さは異なり得るが、典型的には、約30炭素原子という実際の上限がある。約30炭素原子を超える鎖結合は、より小さい鎖結合を有する化合物よりも効果的でないことが分かっている。したがって、脂肪族鎖リンカーは、典型的には、約1炭素原子～約30炭素原子の鎖長を有する。しかしながら、当業者は、特定のリンカーが30を超える原子を有し、依然として効率的に作動してハプテンを担体分子結合単位に結合しても依然として共役体が所望されるように機能する場合は、次いで、かかる鎖結合は依然として本発明の範囲である。

20

30

【0217】

3. アルキレンオキシド

本発明を実施するために有用な第2のクラスのリンカーは、アルキレンオキシドである。アルキレンオキシドは、本明細書において、エチレングリコール等のグリコールを参照することによって表わされる。本発明のハプテン共役体は、リンカーの親水性がそれらの炭化水素鎖に関連して増加する場合に特に有用であることが分かっている。その結果、グリコール等のアルキレンオキシドは、本発明を実施するために有用であることが分かった。当業者は、酸素原子の数が増加するにつれて、化合物の親水性も増加し得ることを理解するであろう。したがって、本発明のリンカーは、概して $(-OCH_2CH_2O-)_n$ という化学式を有し、式中、 n は約2～約25であるが、より典型的には n は約2～約12である。

40

【0218】

所定の開示される本発明の実施形態を実施するために有用なヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、譲受人の同時係属中の出願、2006年4月28日出願の米国特許出願第11/413,778号、名称「Nanoparticle Conjugates」、2006年4月27日出願の米国特許出願第11/413,415号、名称「Antibody Conjugates」、および2005年11月23日出願の米

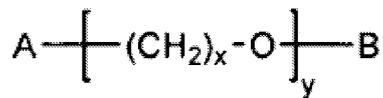
50

国暫定特許出願第60/739,794号、名称「Molecular Conjugate」において説明されており、これら出願のすべては、参照することによって本明細書に組み込まれる。当業者は、これらの出願において開示されるリンカーを使用して、特異的結合部分、信号生成部分、およびハプテンを任意およびすべての所望の組み合わせで結合できることを理解するであろう。ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、以下に開示され、それらの使用は、ハプテンおよび検出可能な標識に対する抗体等の特異的結合部分の結合を参照することによって例証される。特に、抗ハプテン抗体および検出可能な標識の共役体、およびハプテンとの一次抗体の共役体は、本明細書に例証される。

【0219】

開示される共役体と使用するためのリンカーの特定の一実施形態は、以下に示される一般的な構造を有する、ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーである。

【化76】



式中、AおよびBは異なる反応基を含み、xは2~10（例えば、2、3または4）の整数であり、yは1~50、例えば、2~30、3~20または4~12等の整数である。1つ以上の水素原子は、ヒドロキシル基、アルコキシ基（例えば、メトキシおよびエトキシ）、ハロゲン原子（F、Cl、Br、I）、スルファト基およびアミノ基（一およびジアルキルアミノ基等の二置換アミノ基を含む）等の追加官能基と置換することができる。

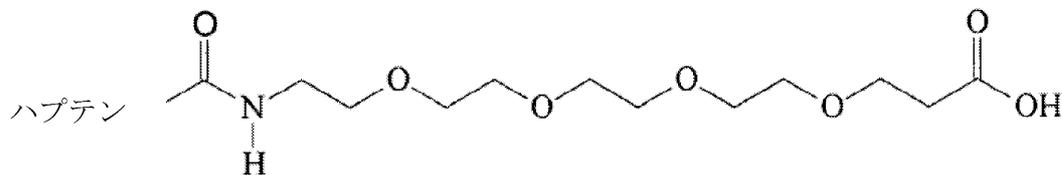
【0220】

リンカーのAおよびBは、カルボニル反応基、アミン反応基、ヒドラジン反応基、ヒドラジド反応基、チオール反応基、または光反応基を独立して含み得る。AおよびBは、同一基であり得るか、または異なる基であり得る。カルボニル反応基の例は、ヒドラジン誘導体およびアミン等のアルデヒドおよびケトン反応基を含む。アミン反応基の例は、NHSまたはスルホ-NHS、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、塩化スルホニル、アルデヒド、グリコキサル、エポキシド、オキシラン、炭酸、ハロゲン化アリール、イミドエステル、無水物等の活性エステルを含む。

【0221】

ハプテン-リンカー共役体は、PEGベースのリンカーを使用して作製されている。かかる化合物の一例を、以下に示す。

【化77】



【0222】

この例は、したがって、ハプテン-L-RGの化学式を満たし、式中、LはdPEG₄（4エーテル酸素）であり、反応基はカルボン酸官能基である。カルボン酸官能基は、実際の実施形態において他の反応性官能基に変換されている。例えば、カルボン酸官能基は、以下に示されるように、NHSエステル等の活性化エステルに変換され得る。

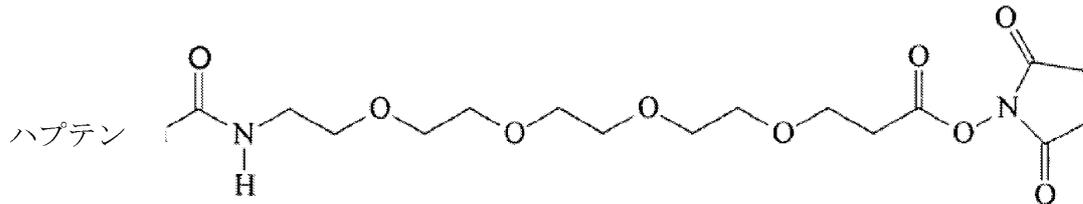
10

20

30

40

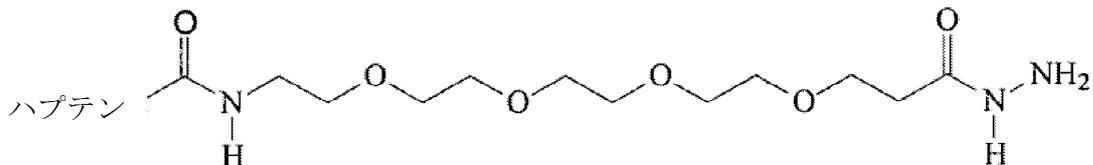
【化 7 8】



【 0 2 2 3】

また活性化エステルは、以下に示されるように、ヒドラジド等の他の有用な反応性官能基に変換され得る。 10

【化 7 9】



【 0 2 2 4】

F. ポリマー担体に結合するための種々の材料 20

ポリマー担体は、所望の化合物または官能基が共役体に組み込まれ得る複数の官能基を有する。例えば、所定の開示される実施形態は共役体に関し、これによって、一部の反応性官能基、例えば、隣接するヘテロ原子を有する窒素担持官能基は1つまたは複数のハブテン、またはハブテンリンカーに結合するために使用可能となり、反応性官能基の残りの部分は、第2のクラスの所望の分子との反応に使用できる。一例として、第2のクラスの化合物は、生体分子（ペプチド、タンパク質、酵素、砂糖、多糖類、脂質、糖タンパク質、および脂肪タンパク質を含む）、検出可能な標識（ポリマー材料に結合される第1の末端および所望の分子に結合される、または結合するために使用可能な第2の末端を有するリンカー）を含むが、これらに限定されない。

【 0 2 2 5】

V. 合成 30

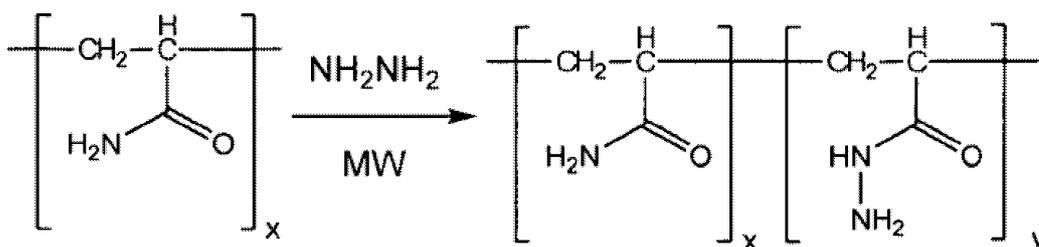
A. 一般

ポリアクリルアミドヒドラジドの詳細な合成は、米国特許出願第 11 / 0 1 8 , 8 9 7 号に記載されており、参照することによって本明細書に組み込まれ、実施例 1 において以下に提供される。簡潔に述べると、Sigma Aldrich から市販のポリアクリルアミドの水性混合物、およびヒドラジン-水和物 (Sigma Aldrich) は、マイクロ波加熱の影響を受けやすい。この合成は、概して、以下のスキーム 1 に示される。

【化 8 0】

スキーム 1

ポリアクリルアミドヒドラジド合成 40



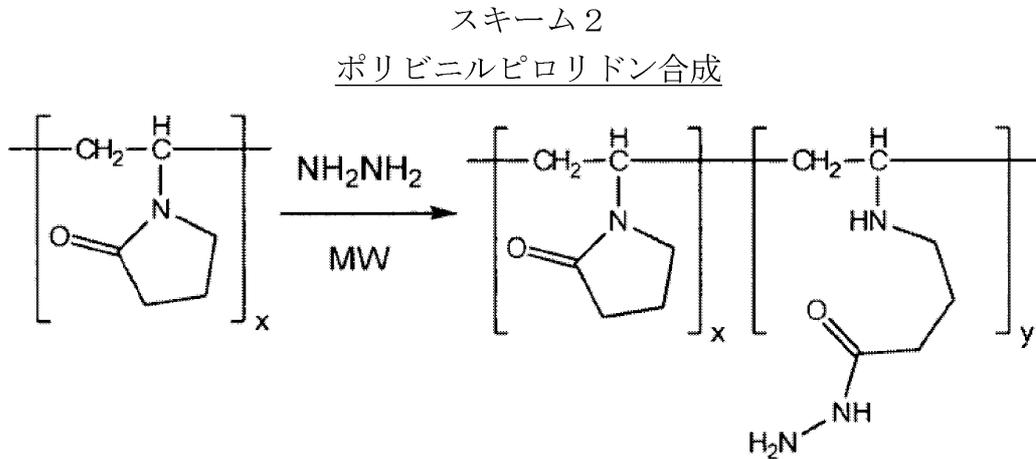
【 0 2 2 6】

反応混合物は、所望のポリアクリルアミドヒドラジドの沈殿および分離によって精製される。

【0227】

スキーム2は、ポリビニルピロリドンヒドラジドのマイクロ波媒介合成の一実施形態を説明する。

【化81】



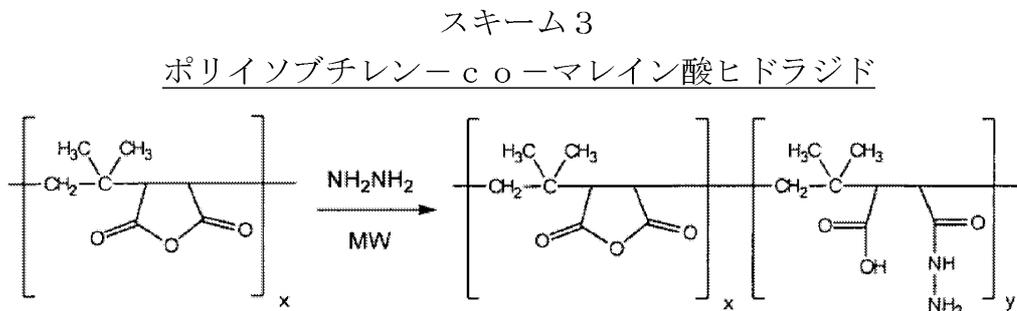
10

20

【0228】

スキーム3は、ポリイソブチレン-c o -マレイン酸ヒドラジド (PIBMH) のマイクロ波媒介合成の一実施形態を説明する。

【化82】



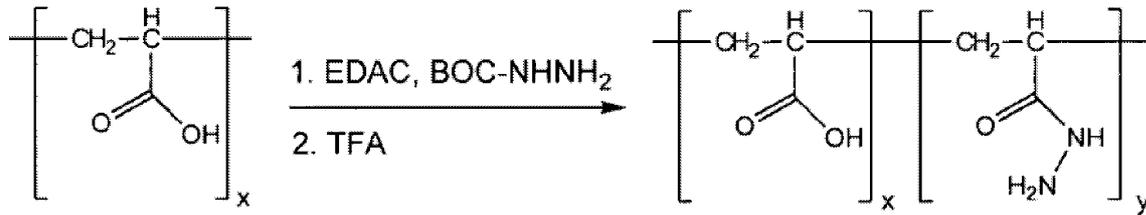
30

40

【0229】

スキーム4は、ポリアクリル酸ヒドラジドの合成の一実施形態を説明する。ポリアクリル酸ヒドラジドポリマーのマイクロ波媒介合成は、産生物をほとんどまたは全く生じない。動作の理論に縛られることなく、ヒドラジンがポリアクリル酸の遊離酸官能基と反応しないこと、または十分に反応しないことがあり得る一方、ヒドラジンは、上述されるように、アミドおよび酸無水物官能基と反応する。その結果、良好な合成の一実施形態は、カルボン酸官能基を活性化した後に、BOC保護ヒドラジン等の保護ヒドラジンと反応させることである。当業者は、酸官能基が、種々の方法で、ヒドラジンまたは他の反応性官能基等の求核基との反応のために活性化され得ることを理解するであろう。しかしながら、説明される実際の実施形態は、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド (EDAC) を使用して、BOC保護ヒドラジンとの置換のためにカルボン酸官能基を活性化した。BOC保護基は、トリフルオロ酢酸 (TFA) で除去され、ポリアクリル酸ヒドラジドポリマーを産生した。

【化 8 3】

スキーム 4
ポリアクリル酸合成

10

【0230】

B. 例示的な合成としてポリマーヒドラジドを使用する共役合成

本発明は、種々のポリマー担体を使用して実施できるが、以下の議論は、ポリアクリルアミドヒドラジドをポリマー担体として参照する本発明を例証する。ポリアクリルアミドヒドラジドは、図2に示されるように、抗体等の特異的結合分子に結合される。ヒドラジド反応部分を含む化合物の場合、次いで、化合物の活性化は必要ない。あるいは、必要または所望される場合は、ポリマー担体を結合するために抗体を活性化することができる。例えば、1つの活性化技術は、抗体上でヒドラジド反応性官能基を提供または産生することを伴う。特に有用な本発明の実施形態は、ポリマーハプテン担体等のポリマー担体を抗体のFc部分に結合することである。この反応が生じたことを保証するため、実際の実施形態は、典型的には抗体のFc部分に関連する酸化糖質部分を有して、ヒドラジド反応性官能基、典型的には、アルデヒド、または反応性ケトン、酸またはエステル等のカルボニルを担持する化合物、最も典型的には過ヨウ素酸等の適切な酸化剤を使用して、アルデヒドを作製する。実際の実施形態の場合、過剰な過ヨウ素酸ナトリウムを使用してタンパク質を酸化した。

20

【0231】

図2に示される実施形態の場合、中間ヒドラゾン、ポリマー担体を抗体のFc部分において作製されたアルデヒドに結合することによって作製される。実際の実施形態は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の適切な試薬を使用して、この中間ヒドラゾンを還元した。しかしながら、中間ヒドラゾンの還元は、必要でない場合がある。実際の実施形態は、マンニヒ塩基の逆マンニヒ反応の可能性を排除することによって、中間ヒドラゾンを還元し、高い安定性を提供した。別の例として、中間ヒドラゾンは、分子内または分子間的に他の成分と反応し、安定ヘテロ環等の所望されない化合物を産生し得る。

30

【0232】

図2は、結果として生じた化合物が、別の所望の化合物を用いた反応に使用可能な複数のすなわち「y」ヒドラジド官能基を有することを示す。所定の開示される実施形態のこの態様は、図2において示され、ポリマー担体に対するハプテンの結合を特定参照して原理を説明する。抗体と同様に、抗体と直接反応できるハプテンは、かかる結合に先立って活性化される必要がない場合がある。あるいは、活性化が所望されるまたは必要な場合、および/または、一部の他の理由からリンカーを使用すること、例えば立体的理由またはペンダントハプテンの認識を容易にするために抗体とハプテンとの間隔を開けることが好ましい場合、リンカーを使用して、ポリマー担体-抗体共役体を1つまたは複数のハプテンと結合し、ポリマーハプテン担体-抗体共役体を作製することができる。リンカーの組成物および使用に関する追加情報は、譲受人の特許および/または出願において見出すことができ、本明細書に組み込まれる。

40

【0233】

図2は、種々のリンカー、例えば、dPEG₄~dPEG₂₄リンカー、および-C₅H₁₁等のアルキルリンカーを使用して、DNP、ビオチンおよびフルオレセインを、それぞれポリマー担体-抗体共役体のヒドラジド官能基に結合することを説明する。リンカ

50

ハブテンに対するポリマー担体 - 抗体共役体の結合を促進するために、リンカーは、図 1 に示されている N - ヒドロキシスクシニミド (N H S) エステルで活性化されたエステルを含む。ポリマー担体 - 抗体共役体は、ハブテンに結合されて、ポリマー - ハブテン担体共役体を作製する。

【 0 2 3 4 】

図 2 は、すべての使用可能な「 y 」基、つまり遊離ヒドラジド官能基を含む官能基のすべてが、活性化ハブテンリンカーと反応することを説明する。当業者は、使用可能な反応性官能基の一部のみが、化学量論的に限定された量のリンカー - ハブテンを使用する等によって、反応し得ることを理解するであろう。これらの化合物は、例えば、異なるハブテンまたはハブテン - リンカーとの反応に使用可能な追加反応性官能基を有し得る。

10

【 0 2 3 5 】

図 2 は、最初にポリマー担体を抗体と反応させて、ポリマー担体 - 抗体共役体を作製し、次いで、1つまたは複数のハブテン、ハブテン - リンカー、複数のハブテン - リンカー、ハブテン - 複数のリンカー、および/または複数のハブテン - 複数のリンカー（まとめてハブテン/ハブテン - リンカーと称される）をポリマー担体 - 抗体共役体に結合することを説明する。当業者は、同一化合物が、最初にポリマー担体をハブテン/ハブテン - リンカーに結合してポリマーハブテン担体を作製することによって随意に作製され得ることを理解するであろう。残りの使用可能な反応性官能基を有するポリマーハブテン担体は、次いで、好ましくは、抗体の F c 部分のみにおいて抗体と連結され、ポリマーハブテン担体 - 抗体共役体を作製する。

20

【 0 2 3 6 】

V I . 開示されるポリマーハブテン担体共役体、およびその組成物を使用するための方法の例示的な開示実施形態

所定の例示的な本発明の実施形態は、開示されるポリマーハブテン担体共役体の種々の実施形態で実施され得る *in situ* のハイブリダイゼーション技術に関する。タンパク質等の標的を有する試料を選択する。抗体等の標的を検出するために有用なプローブも選択される。少なくとも1つのポリマーハブテン担体は、プローブに共役される。標的は、ポリマーハブテン担体に結合されるプローブを用いて、プローブ - ポリマーハブテン担体共役体で複合化された標的を、結果として生じた複合体を可視化するために適した酵素等の検出可能な標識、フルオロフォア等の有機クロモフォル、蛍光量子ドット等のクロモフォルナノ粒子、を有する抗ハブテン抗体で処理する等によって、任意の適切な手段を使用して可視化され得る複合体の作製に有効な方法で処理する。例えば、検出可能な標識が酵素である場合、酵素の置換基が提供され、それによって着色された沈殿物等の固有に同定可能な沈殿物を産生する。

30

【 0 2 3 7 】

抗体は、酵素等の検出可能な標識に結合され得る。酵素置換基を追加して、検出可能な酵素産生物を産生する。このプロセスの特定の一実施形態は、銀 *in situ* ハイブリダイゼーション (S I S H) である。S I S H のための1つの適切な酵素は、西洋ワサビペルオキシドであり、ヒドロキノン、銀イオン (例えば、 $A g^{+1}$) および過酸化水素と組み合わせて使用できる。検出可能な産生物は、元素銀粒子である。かかるプロセスに関する追加情報は、H a i n f e l d の米国特許第 6 , 6 7 0 , 1 1 3 号において見出すことができ、参照することによって本明細書に組み込まれる。

40

【 0 2 3 8 】

別の例として、酵素はアルカリホスファターゼであり得る。アルカリホスファターゼは、還元剤リン酸、すなわちアスコルビン酸リン酸の触媒加水分解を誘発し、還元剤、すなわちアスコルビン酸を生成し、次いで、それを使用して銀プラス 1 ($A g^{+1}$) を金属ナノスケール銀に還元し得る。したがって、視覚的に検出可能な産生物は、元素銀である。銀は、明視野顕微鏡を含む任意の適切な手段によって検出できる。ホスファターゼ酵素の使用に関する追加情報は、B i e n i a r z e t a l . の米国特許出願第 2 0 0 4 / 0 2 6 5 9 2 2 号、名称「 E n z y m e - c a t a l y z e d M e t a l D e p o s

50

ition for the Enhanced in Situ Detection of Immunohistochemical Epitopes and Nucleic Acid Sequences」において見出すことができ、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0239】

本明細書に開示される実施形態は、発色 In situ ハイブリダイゼーションを実施するために使用することもできる。このプロセスにおいて、酵素は、本明細書に開示される例または当業者に知られる他の例を含む、適切な例を用いて選択され、特定の実施形態を例証するために、西洋ワサビペルオキシドおよびアルカリホスファターゼが使用されている。次いで、明視野顕微鏡を含む、当該技術分野において知られる技術を使用して検出

10

【0240】

開示される方法の追加実施形態は、直接検出プロセスに関する。このプロセスの場合、マウスモノクローナル IgG 抗体等のモノクローナル抗体を含む一次抗体が、特定の標的に対して選択される。一次抗体は、典型的には、前述のように検出可能な標識も含む。

【0241】

あるいは、増幅プロセスを使用できる。本実施形態は、診断的試験に使用することもできる。標的を選択する。標的および一次抗体の複合化を可能にする方法で、一次抗体を試料に添加する。一次抗体に対する二次抗体を試料に添加する。該抗体は、特に可視的に、または顕微鏡等の可視的手段によって同定に使用できる検出可能な標識、本明細書で論じられるような基質を使用する複合化標的を含む。抗体は、任意の適切な抗体であり得、一例として、標識化ウサギ抗マウス IgG 抗体を含むが、それに限定されない。一次抗体に対する異なる種から抗体を含む二次抗体を試料に添加することができる。例えば、抗体は、マウス IgG 抗体等の一次抗体に対して高められたヤギ抗体であってもよい。

20

【0242】

検出可能な標識を有する少なくとも1つの追加抗体を試料に添加して、検出された標的によって産生される信号を増幅してもよい。この例示的なプロセスでは、抗体は、標識化ウサギ抗ヤギ IgG 抗体であり得る。抗体は、標識化抗体として、同時にまたは後に添加され得る。

30

【0243】

所定の本発明の実施形態は、ハイブリドーマスクリーニング用等の抗ハプテンモノクローナル抗体を使用することによって促進される。組織に位置する標的等の特定の標的を選択する。抗体が標的を認識するために有効な方法で、標的に配向された一次抗体を投与する。抗体は、本発明のポリマーハプテン担体共役体を使用してそこに共役される少なくとも1つの、場合によっては複数のハプテンを有する。一次抗体に共役されるハプテンは、同一または異なり得る。組織試料は、抗ハプテン抗体で処理される。この例示的な実施形態において、一次抗体は、効果的に抗ハプテン抗体に結合され、例えば、ハイブリドーマウスモノクローナル抗体から提供され得る。したがって、一次抗体に結合される各ハプテンには、二次抗体が存在する。

40

【0244】

マウスモノクローナル抗体等の抗ハプテン抗体によって作製される複合体が、次いで、同定される。1つの方法は、ここで、ヤギ抗体等のマウス抗体を認識する抗体で組成物を処理することである。この例示的な実施形態では、ヤギ抗体は、酵素等の検出可能な標識に共役され、一例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 酵素である。次いで、この複合体を HRP 基質を用いて、当業者に既知のとおりインキュベートし、検出可能な、例えば着色された沈殿物を作製する。このプロセスは、ハイブリドーマスクリーニング等の

50

スクリーニングに使用できる。

【0245】

抗ハプテンモノクローナル抗体をスクリーニングするために、正常なヒト扁桃腺組織等の組織試料を取得する。試料は、パラフィンに埋め込んでもよく、その場合は、VMSI EZ Prep 溶液を使用する等によって、組織試料を脱パラフィン化する。次いで、VMSI CC1 を使用して、細胞の調整および抗原の抽出を行う。ヒト抗 (Dako から入手可能) 等の一次ポリクローナル抗体は、本出願において開示されるポリマーハプテン担体の実施形態に共役される。共役は、好ましくは、抗体のFc領域において生じ、結合が抗体の特異性に影響する可能性を低減する。有効量の一次抗体を含む溶液を、有効な期間組織に適用する。実際の実施形態の場合、有効な濃度は一次抗体の約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、有効な期間は約60分であった。次いで、組織試料を洗浄する。その後、考えられる抗ハプテン抗体 (例えば、KLH-CGT1-1.1+5-27F09-02E01) を、有効な期間、例えば約60分間組織試料に適用する。次いで、VMSI Omni Map DAB 染色等の任意の適切な手段を使用して、抗体を検出する。

10

【0246】

考えられる抗ハプテン抗体の自動免疫組織化学 (IHC) スクリーニングは、VMSI Discovery XT およびホルマリン固定され、パラフィンに埋め込まれたヒト扁桃腺組織をガラススライド上で使用して行うことができる。組織試料は、最初に脱パラフィン化、抗原抽出した後、ポリマーハプテン担体、考えられる抗ハプテン抗体、および検出抗体を使用して、対象のハプテンに結合された一次抗体を添加する。検出抗体は、VMSI から発色検出試薬を使用して可視化される。染色スライドは、顕微鏡下、手動でスクリーニングする。正しい一次抗体染色パターンを有する試料は、考えられる抗ハプテン候補として選択される。選択性および特異性を試験するために、候補の抗ハプテン細胞の融合産物を、異なる化学クラスのハプテンに共役される一次抗体を使用してさらにスクリーニングする。

20

【0247】

開示される実施形態は、複数の異なるハプテン、およびそれに対する抗体を使用して、検出可能な標的を可視化することも意図する。例えば、ビオチンおよびDNAハプテン、およびそれに対する抗体、抗ビオチンおよび抗DNP等は、試料中の標的、例えば、組織中のタンパク質の検出に使用することができる。

30

【0248】

本発明の実施形態は、試料中のタンパク質標的等の複数の異なる種類の標的の同時検出に有用でもある。例えば、HER2 (ヒト上皮成長因子受容体2) に関連して、ポリマーハプテン担体標識化HER2プローブは、プローブをHER2遺伝子と複合化するために有効な方法で試料に添加される。次いで、複合化遺伝子は、Qドット等の検出可能な標識206を有する抗ハプテン抗体で処理する。抗HER2 4B5ウサギ抗体等の抗HER2タンパク質抗体を、HER2タンパク質の認識を可能にするために有効な方法で試料に添加する。抗HER2抗体は、少なくとも1つのポリマーハプテン担体、および同一または異なり得る、考えられる複数のハプテンを含み得る。実施形態を例証するためのビオチンの使用に関連して、次いで、抗ハプテン二次抗体を、二次抗体およびハプテンの複合化を可能にするために有効な方法で、試料に添加する。抗ハプテン二次抗体は、Qドット655等の検出可能な標識を含む。したがって、本実施形態は、遺伝子および遺伝子産物の多重検出を可能にする。

40

【0249】

VII. 試験キット

開示される本発明の実施形態は、一部分において、本発明の方法の種々の実施形態を実行するためのキットを提供する。かかるキットの例は、コレステロール解析に有用なキット、妊娠キット、癌診断キット等を含む。本発明の試験キットは、典型的には、少なくとも1つのポリマーハプテン担体 - 特異的結合分子共役体等の本発明に従うポリマーハプテン担体共役体を有し、ポリマーハプテン担体 - 抗体共役体および抗ハプテン抗体、特に検

50

出可能な標識に共役される抗ハプテン抗体を含む。

【0250】

所定のキットの実施形態は、ポリマーハプテン担体 - 共役抗体、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリアル、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、シクロリグナン、およびそれらの組み合わせから選択されるハプテンを含む。かかるキットは、典型的には、検出可能な標識に共役される抗ハプテン抗体も含む。

【0251】

さらに、開示されるキットの実施形態は、追加の成分を含み得、複数の追加抗体を含むがそれらに限定されない。かかるキットは、例えば、臨床医または医師によって使用され得る。

10

【0252】

VIIII. 自動化実施形態

当業者は、ハプテン共役体を使用するために本明細書で開示される方法の実施形態は、自動化できることを理解するであろう。Ventana Medical System, Inc. は、自動解析を行うためのシステムおよび方法を開示するいくつかの米国特許の譲受人であり、米国特許第5,650,327号、第5,654,200号、第6,296,809号、第6,352,861号、第6,827,901号、および第6,943,029号、および米国公開出願第20030211630号および第20040052685号を含み、それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる。ポリマーハプテン染色手順の特定の実施形態は、種々の自動化プロセスを使用して実行することができる。

20

【0253】

例示的な実際の実施形態に関する追加の詳細を、実際の実施例において提供する。

【0254】

IX. 実施例

以下の実施例は、実際の実施形態の所定の特徴を説明するために提供する。当業者は、本発明の範囲がこれらの実施例によって例証される特定の特徴に限定されないことを理解するであろう。

【0255】

すべての開示される実際の実施例に関して、すべての化学物質は、商業的サプライヤから購入し、受領したとおりに使用した。ポリクローマル抗体（ヤギ抗マウスおよびヤギ抗ウサギ）の溶液は、Bethyl Labsから購入し、受領したとおりに使用した。ポリアクリルアミドヒドラジドおよびNHS-PEG₄-DNPは、前述のとおり合成した。タンパク質濃度は、抗体の₂₈₀値1.4 ml mg⁻¹ cm⁻¹を使用して計算した。内部脱イオン化源から得られた水は、Milli-Q Biocelシステムを介して不純物を除去した。緩衝液交換は、PD-10カラム（GE Biosciences）を使用して行った。SECは、Aktapurifier（GE Biosciences）を使用して行い、分子量は、タンパク質標準を参照した。流量は、Superdex 200 GL 10/300カラムを通して1ミリリットル/分であった（GE Biosciences）。

30

40

【0256】

実施例 1

この実施例は、本来米国特許出願第11/018,897号に開示されるように、ポリアクリルアミドヒドラジドを作製するための方法の一実施形態を説明し、参照することによって本明細書に組み込まれる、ポリアクリルアミド（1 mmol、20 mL、50重量%溶液、Sigma-Aldrich）は、コンデンサに取り付けられた100 mL丸底フラスコ中の蒸留水（10 mL）およびヒドラジン-水和物（20 mL、420 mmol、Sigma-Aldrich）と混合した。反応混合物は、CEM Discover yユニットにおいて、60分間レンジ加熱した。室温に冷却した後、等容積のメタノール

50

を反応混合物に添加して沈殿物を誘導した。結果として生じた混合物を遠心分離にかけ、上澄み液を移した。残渣を脱イオン化水(50 mL)中で取り込み、沈殿プロセスを合計3回繰り返した。最終残渣を脱イオン化水に溶解および凍結乾燥して、細かい白色吸湿性の粉末を得た。

【0257】

実施例 2

この実施例は、図1に示されるように、Fc特異的ハプテン化抗体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ポリクローナル抗体の溶液(1.5 mL、3.0 mg/mL)に、最終過ヨウ素酸濃度が11.7 mMとなるよう過ヨウ素酸ナトリウム(0.5 mL、脱イオン化水中10 mg/mL)を添加した。PD-10カラム(0.1 M 酢酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH = 5.5)で脱塩する前に、反応溶液を2時間回転させて、未反応の過ヨウ素酸を除去した。500倍モル過剰のハプテン-dPEG_x-ヒドラジドを酸化抗体、次にシアノ水素化ホウ素ナトリウム(3.14 mg、50 μmol)に添加し、反応物を18時間インキュベートした。サイズ排除クロマトグラフィー(0.1 M Na₃PO₄、0.15 M NaCl、pH = 7.5)は、精製されたハプテニル化抗体を得た。抗体当たりのDNPの数($\epsilon_{360} = 18, 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{280} = 6, 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)は、UV-Vis測定値を使用して計算し、抗体当たりのアクセス可能なビオチンの数は、Sigma-Aldrichから入手可能なHABAアッセイを使用して測定した。

10

20

【0258】

実施例 3

図2に示されるように、実施例は、ポリハプテニル化IgG共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。

【0259】

A. Fc特異的PAHAbの合成

ポリクローナル抗体の溶液(1.5 mL、3.0 mg/mL)に、最終過ヨウ素酸濃度が11.7 mMとなるよう過ヨウ素酸ナトリウム(0.5 mL、脱イオン化水中10 mg/mL)を添加した。PD-10カラム(0.1 M 酢酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH = 7.5)で脱塩する前に、反応溶液を2時間回転させて、未反応の過ヨウ素酸を除去した。50倍モル過剰のポリアクリルアミドヒドラジドリンカーを、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(3.14 mg、50 μmol)に沿って抗体に添加し、反応物を18時間インキュベートした。SEC(0.1 M 酢酸ナトリウム、pH 5.0)は、精製された抗体-PAH共役体を得た。

30

【0260】

B. ポリハプテニル化抗体の合成

PAH-IgGの溶液(2.0 mL、0.53 mg/mL)に、NHS-dPEG_x-ハプテン(50倍過剰)を添加し、反応物を18時間インキュベートした。SEC(0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH = 7.5)は、精製されたポリハプテニル化抗体を得た。抗体当たりのハプテンの数は、UV-Vis測定値を使用して計算し、抗体当たりのアクセス可能なビオチンの数は、Sigma-Aldrichから入手可能なHABAアッセイを使用して測定した。

40

【0261】

実施例 4

この実施例は、概して図2に示されるように、化学選択的Fc特異的ポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ポリクローナル抗体の溶液(0.8 mL、1.0 mg/mL)を、過ヨウ素酸ナトリウム(0.2 mL)の100 mM水溶液を用いて、室温で2時間インキュベートした。ABS(0.10 M 酢酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH 5.5)を使用し、G-25(GE Lifesciences、PD-10カラム)のカラムを通して、溶液を緩衝液交換した。PAHを50倍モル過剰で酸化Abに添加し、室温で1時間インキュベートした。シア

50

ノ水素化ホウ素ナトリウム(50モル過剰)を添加し、室温で18時間インキュベートした。ABS(0.10M酢酸、0.15M NaCl、pH5.5)を使用し、サイズ排除カラム上でPAH-Abを精製した。NHS-dPEG_x-ハプテン(10-100×モル過剰)を添加し、反応物を18時間インキュベートした。SEC(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH=7.5)は、精製したポリハプテニル抗体を得た。抗体当たりのハプテンの数は、UV-Vis測定値を使用して計算し、抗体当たりのアクセス可能なビオチンの数は、Sigma-Aldrichから入手可能なHABAアッセイを使用して測定した。ハプテンの数は、実施例3における共役体よりも少なかったが、実施例2よりも多かった。

【0262】

10

実施例5

この実施例は、概して図2に示されるように、ニトロピラゾール標識化ポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ABS(0.10M酢酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH5.5)中の精製したポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を、20倍モル過剰のニトロピラゾール-dPEG₈-NHSで18時間インキュベートした。混合物は、PBS(0.10Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2)を使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、ポリ-ニトロピラゾール-PAH-Abを得た。PAH-Ab当たりのニトロピラゾールの数は、UV-Vis測定値によって決定した。

【0263】

20

実施例6

この実施例は、概して図2に示されるように、ベンゾフラザン標識化ポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ABS(0.10M酢酸、0.15M NaCl、pH5.5)中の精製されたポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を、20倍モル過剰のベンゾフラザン-dPEG₈-NHSで18時間インキュベートした。混合物は、PBS(0.10Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2)を使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、ポリ-ベンゾフラザン-PAH-Abを得た。PAH-Ab当たりのベンゾフラザンの数は、UV-Vis測定値によって決定した。

【0264】

30

実施例7

この実施例は、概して図2に示されるように、ジニトロフェニル標識化ポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ABS(0.10M酢酸、0.15M NaCl、pH5.5)中の精製されたポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を、100倍モル過剰のジニトロフェニル-dPEG₈-NHSで18時間インキュベートした。混合物は、PBS(0.10Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2)を使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、ポリ-ジニトロフェニル-PAH-Abを得た。PAH-Ab当たりのベンゾフラザンの数は、UV-Vis測定値によって決定した。

【0265】

40

実施例8

この実施例は、概して図2に示されるように、チアゾールスルホンアミド標識化ポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ABS(0.10M酢酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH5.5)中の精製されたポリアクリルアミドヒドラジド-抗体共役体を、20倍モル過剰のチアゾールスルホンアミド-dPEG₈-NHSで18時間インキュベートした。混合物は、PBS(0.10Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2)を使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、ポリ-チアゾールスルホンアミド-PAH-Abを得た。PAH-Ab当たりのベンゾフラザンの数は、UV-Vis測定値によって決定した。

50

【0266】

実施例 9

この実施例は、量子ドットを使用して組織エピトープ、特に扁桃腺上の Ki-67 を検出して、ポリハプテニル化ポリマーと共役される二次抗体を認識することに関する。以下は、Ventana Benchmark Instrument からの適応手順である。EZ Prep 容積調整剤とともに液体カバースリップ (VMSI) を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を 75 °C まで 4 分間加熱し、EZ Prep 容積調整剤 (VMSI) により 75 °C で 2 回処理した。75 °C で 4 分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともに EZ Prep 容積調整剤を添加して、76 °C で 4 分間組織を脱パラフィン化した。スライドを 40 °C まで冷却し、3 回洗浄した後、マウス抗 Ki67 (100 μL、VMSI) 抗体、次に液体カバースリップを添加し、40 °C で 16 分間インキュベートした。スライドを洗浄した後、ヤギ抗マウス PAH ビオチニル化抗体 (100 μL)、次に液体カバースリップで処理し、40 °C で 8 分間インキュベートした。スライドを緩衝液で 2 回洗浄した後、液体カバースリップを適用し、655 nm QDot-SA 共役体 (100 μL、20 nmol) を添加し、37 °C で 16 分間インキュベートした。スライドを緩衝液で 3 回洗浄し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動でスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。図 3-6 は、この実施例に従って得られる染色結果を示し、図 5 および 6 は、一次抗体の 10 倍希釈を使用して得られる染色結果を示す。

10

【0267】

実施例 10

この実施例は、概して図 7 に示されるように、二次抗ハプテン抗体に直接共役される量子ドットを使用する扁桃腺上の抗 Ki-67 の評価を説明する。手順は、Ventana Benchmark Instrument からの自動染色プロトコルの適応である。液体カバースリップ (VMSI) を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を 75 °C まで 8 分間加熱し、EZ Prep 容積調整剤 (VMSI) により 75 °C で 2 回処理した。75 °C で 8 分間 2 回インキュベートした後、スライドを洗浄し、EZ Prep 容積調整剤、次に液体カバースリップを添加して、組織を脱パラフィン化した。スライドを 37 °C に冷却し、2 分間インキュベートして、反応緩衝液で 1 回洗浄した。次いで、スライドを細胞調整剤で 2 回、次いで液体カバースリップで処理した。スライド、次にカバースリップを 95 °C まで 8 分間加熱し、次いで、スライド、カバースリップを 100 °C まで 4 分間加熱した。「細胞調整剤を適用し、4 分間インキュベートして、カバースリップを適用する」という、細胞調整剤を用いるこのインキュベートプロセスを 9 回 100 °C で繰り返した。スライドを 8 分間冷却し、反応緩衝液、容積調整剤、次に液体カバースリップと反応させた。スライドを 37 °C まで 2 分間加熱し、2 回洗浄した後、一次共役体 (抗 PAH-dPEG₈-ハプテン、100 μL、VMSI) を添加し、次に液体カバースリップを適用して、37 °C で 32 分間インキュベートした。スライドを反応緩衝液で 2 回洗浄した後、液体カバースリップを適用し、適切な抗ハプテン Ab 量子ドット共役体 (100 μL、20-50 nmol) を添加して、37 °C で 32 分間インキュベートした。スライドを緩衝液、次に液体カバースリップで 2 回洗浄した。スライドを装置から取り外し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動で適用した。スライドイメージは、蛍光顕微鏡上でロングパスフィルタおよびイメージ強化ソフトウェア (Acquity) を用いて、CRI イメージングカメラを使用することによって撮影した。図 8~11 は、この実施例に従って得られた染色結果を示す。

20

30

40

【0268】

実施例 11

この実施例は、図 12 に示されるように、Fc-ヒドラジド-dPEG_x-ハプテン共役体、次に AP-IgG 検出を使用する、アルカリホスファターゼ-抗体多重体共役、特に異なる組織における HPV の評価に関する。以下は、Ventana Benchmark Instrument からの自動染色プロトコルの適応である。EZ Prep 容積

50

調整剤とともに液体カバースリップ (VMSI) を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を 75 °C まで 4 分間加熱し、EZ Prep 容積調整剤 (VMSI) により 75 °C で 2 回処理した。75 °C で 4 分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともに EZ Prep 容積調整剤を添加して、76 °C で 4 分間組織を脱パラフィン化した。細胞調整剤 # 2 (VMSI) を添加し、スライドを 90 °C まで加温して、8 分間インキュベートした。この後に細胞調整剤 # 2 を再度適用し、90 °C で 12 分間インキュベートした。スライドを反応緩衝液 (VMSI) で洗浄し、37 °C に冷却して、ISH プロテアーゼ 3 (100 µL、VMSI) を添加した。4 分間インキュベートした後、スライドを 3 回洗浄し、iView + HybReady (200 µL、VMSI) を適用して、4 分間インキュベートした。HPV HR プローブ (200 µL、VMSI) を添加した後、37 °C で 4 分間、95 °C で 12 分間、および 52 °C で 124 分間インキュベートした。次いで、スライドを 2 回洗浄し、72 °C まで加熱した。この最終ステップを 2 回繰り返した後、スライドを 37 °C に冷却し、iView + 抗 DNP (100 µL、VMSI) を添加した。一次抗体を 20 分間インキュベートし、次いで、スライドを 2 回洗浄した後、ポリアクリルアミドヒドラジドピオチニル化二次物 (ヤギ抗ウサギ、100 µL、10 µg/ml) を手動で添加した。2 次的インキュベートを 20 分間行い、スライドを 2 回洗浄した。次いで、抗ハプテン抗体を適用し (100 µL)、さらに 20 分間インキュベートを行った。さらに 2 回の洗浄ステップの後、ヤギ抗ウサギ AP 共役体を適用し (100 µL、6 µg/ml)、8 分間インキュベートした。さらに 4 回の洗浄ステップに続いて、iView + Enhancer (100 µL、VMSI) を適用し、4 分間インキュベートし、iView + NBT (100 µL、VMSI) および iView + BCIP (100 µL、VMSI) の両方を適用した。次いで、スライドを 24 分間インキュベートし、3 回洗浄して、対比染色 NFR (100 µL、VMSI) を添加した。対比染色を用いた 4 分間のインキュベート後、スライドを 3 回以上洗浄し、装置から取り外した。スライドを洗剤洗浄で処理した後、エタノール、アセトン、およびキシレンで脱水し、続いてカバースリップをスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。

【0269】

実施例 12

この実施例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体多重体共役体の評価、特に図 13 に示されるように、ISH 検出のために Fc 共役ピオチンヒドラジドまたはピオチニル化ポリアクリルアミドヒドラジドを使用する異なる組織における HPV の評価に関する。以下は、Ventana Benchmark Instrument からの適応手順である。EZ Prep 容積調整剤とともに液体カバースリップ (VMSI) を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を 75 °C まで 4 分間加熱し、EZ Prep 容積調整剤 (VMSI) により 75 °C で 2 回処理した。75 °C で 4 分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともに EZ Prep 容積調整剤を添加して、76 °C で 4 分間組織を脱パラフィン化した。細胞調整剤 # 2 (VMSI) を添加し、スライドを 90 °C まで加温して、8 分間インキュベートした。この後に細胞調整剤 # 2 を再度適用し、90 °C で 12 分間インキュベートした。スライドを反応緩衝液 (VMSI) で洗浄し、37 °C に冷却して、ISH プロテアーゼ 3 (100 µL、VMSI) を添加した。4 分間インキュベートした後、スライドを 3 回洗浄し、iView + HybReady (100 µL、VMSI) を適用して、4 分間インキュベートした。HPV HR プローブ (200 µL、VMSI) を添加した後、37 °C で 4 分間、95 °C で 12 分間、および 52 °C で 124 分間インキュベートした。次いで、スライドを 2 回洗浄し、72 °C まで加熱した。この最終ステップをさらに 2 回繰り返した後、スライドを 37 °C に冷却し、iView + 抗 DNP (100 µL、VMSI) を添加した。一次抗体を 20 分間インキュベートし、次いで、スライドを 2 回洗浄した後、ポリアクリルアミドヒドラジドピオチニル化二次物 (ヤギ抗ウサギ、100 µL、10 µg/ml) を手動で添加した。2 次的インキュベートを 8 分間行い、スライドを 2 回洗浄した。次いで、ウサギ抗ピオチン抗体を適用し (100 µL)、さらに 20 分間インキュベートを行った。さらに 2 回の洗浄ステップの後、HRP 多重体

を適用し(100 μ L、10 μ g/ml)、8分間インキュベートした。さらに4回の洗浄ステップの後、S I S H Chromagen A (100 μ L V M S I)を適用して4分間インキュベートし、S I S H Chromagen B (100 μ L、V M S I)を適用して4分間インキュベートし、S I S H Chromagen C (100 μ L、V M S I)を適用して4分間インキュベートした。スライドを3回洗浄し、ヘマトキシリンI I (100 μ L、V M S I)を添加した。対比染色で4分間インキュベートした後、スライドを洗浄し、青味試薬(100 μ L、V M S I)を適用し、4分間インキュベートした。次いで、スライドをさらに3回洗浄し、装置から取り外した。スライドを洗剤洗浄で処理した後、エタノールアセトン、およびキシレンで脱水し、続いてカバースリップをスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。図14~21は、この実施例に従って得られる染色結果を示す。

10

【0270】

実施例13

この実施例は、概して図22に示されるような、量子ドットを用いた扁桃腺上の抗、CD34、CD45、およびKi-67の多重検出を説明する。手順は、Ventana Benchmark Instrumentからの自動染色プロトコルの適用である。EZ Prep容積調整剤を用いて液体カバースリップ(VMSI)を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を75 $^{\circ}$ Cまで8分間加熱し、EZ Prep(VMSI)で2回処理して、75 $^{\circ}$ Cで容積調整した。75 $^{\circ}$ Cで2回8分間インキュベートした後、スライドを洗浄し、EZ Prep容積調整、次に液体カバースリップを適用して組織を脱パラフィン化した。スライドを37 $^{\circ}$ Cに冷却し、2分間インキュベートして、反応緩衝液で1回洗浄した。次いで、スライドを細胞調整剤で2回処理した後、液体カバースリップを適用した。スライドを95 $^{\circ}$ Cまで8分間加熱し、カバースリップを適用し、次いで、100 $^{\circ}$ Cまで4分間加熱した後、カバースリップを適用した。「細胞調整剤の適用、4分間インキュベート、カバースリップの適用」という、細胞調整剤を用いるこのインキュベートプロセスは、100 $^{\circ}$ Cで9回繰り返した。スライドを8分間冷却し、反応鑑賞剤で洗浄し、容積調整した後、液体カバースリップを適用した。スライドを37 $^{\circ}$ Cに2分間加熱し、2回洗浄した後、一次共役体(抗-PAH-dPEG₈-ジニトロフェニル、-CD34-PAH-dPEG₈-ニトロピラゾール、-CD45-PAH-dPEG₈-チオスルホンアミドおよびKi-67-PAH-dPEG₈-ベンゾフラン、それぞれ100 μ L、VMSI)を添加し、液体カバースリップを適用して、37 $^{\circ}$ Cで32分間インキュベートした。スライドを反応緩衝液で2回洗浄し、抗ハブテンAb-量子ドット共役体の適切な混合物(それぞれ100 μ L、20-50 nmol)、続いて液体カバースリップを適用して、37 $^{\circ}$ Cで32分間インキュベートする。スライドを緩衝液で2回洗浄した後、液体カバースリップを適用した。スライドを装置から取り外し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動で適用した。スライドイメージは、蛍光顕微鏡上でロングパスフィルタおよびイメージ強化ソフトウェア(Acquity)を用いて、CRIイメージングカメラを使用することによって撮影した。図23~26は、この実施例に従って得られた染色結果を示す。

20

30

【0271】

実施例14

この実施例は、デキストランヒドラジド、デキストランヒドラジン、デキストランアミン、およびデキストラングアニジンに関する。10~200アルデヒドを含有するデキストランアルデヒド(Pierce)平均分子量10,000、20,000または40,000をpH7.0のリン酸緩衝液に溶解する。

40

【0272】

対応するbis-PEG_x-アミン、ビス-ヒドラジドPEG_x-ヒドラジド、ビス-PEG_x-ヒドラジンまたはグアニジン含有リンカー、例えばアミノグアニジン(Alдрич)を、緩衝化pH7.0溶液として、極めて大きいモル過剰(デキストラン担体上の限定試薬中のアルデヒドコンテンツの100x)で添加する。

50

【0273】

反応物を室温で1～3時間攪拌する。大過剰（還元剤の300×、例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム、Aldrich）を、追加漏斗から水溶液として、2時間添加する。

【0274】

反応溶液を一晩攪拌し、次いで、より小さい分子量の分子の拡散を可能にしながら大きい誘導体化担体を保持する適切な透析チューブを利用して、水に対して数回透析する。

【0275】

担体の透析溶液を凍結乾燥し、2～8 で乾燥粉末として保管する。アミン、ヒドラジン、グアニジン、またはヒドラジドの数は、文献に記載される方法に従って定量され得る。

10

【0276】

開示される発明の原理が適用され得る多くの可能な実施形態に照らして、例示される実施形態は、本発明の好適な実施例にすぎず、本発明の範囲を認定するものでないことを認識されたい。むしろ本発明の範囲は、以下の請求項によって定義される。したがって、我々は、本発明をこれらの請求項の範囲および精神に含まれるものとして請求する。

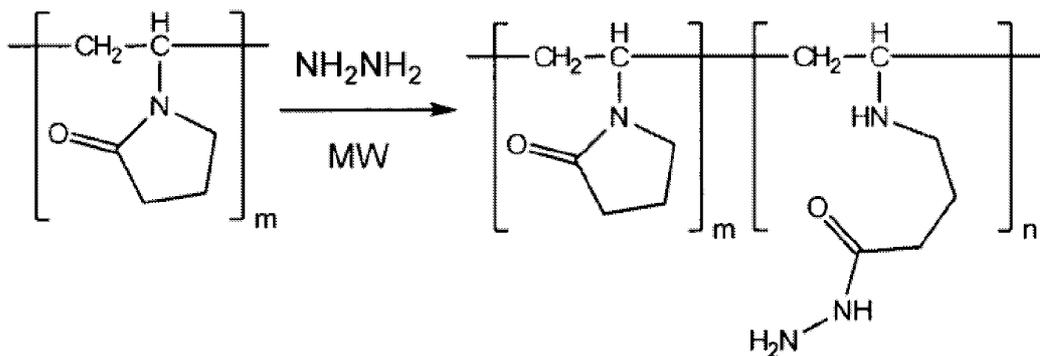
【0277】

実施例15

この実施例は、ポリビニルピロリドンヒドラジド（PVPH）を作製するための方法の一実施形態を説明する。ポリビニルピロリドン（1mmol、20mL、50重量%溶液、Sigma-Aldrich）を、コンデンサに取り付けられた100mLの丸底フラスコ中でヒドラジノー水和物（50mL、1.0mol、Sigma-Aldrich）と混合する。反応混合物は、CEM Discoveryユニットにおいて、種々の電力（100W、200W、300W）で60分間、120 でレンジ加熱した。反応物を真空中でオフホワイトの泡になるまで減容した。残渣を最小量のDI水中に取り込み、大容量のテトラヒドロフラン（THF）と混合して沈殿を誘発した。結果として生じた混合物を遠心分離し、上澄みを移した。残渣を最小量の脱イオン水中に取り込み、THFを用いた沈殿プロセスを合計3回繰り返した。最終残渣を脱イオン水に溶解し、凍結乾燥させて、細かいオフホワイトの吸湿性粉末を得た。

20

【化84】



30

40

【0278】

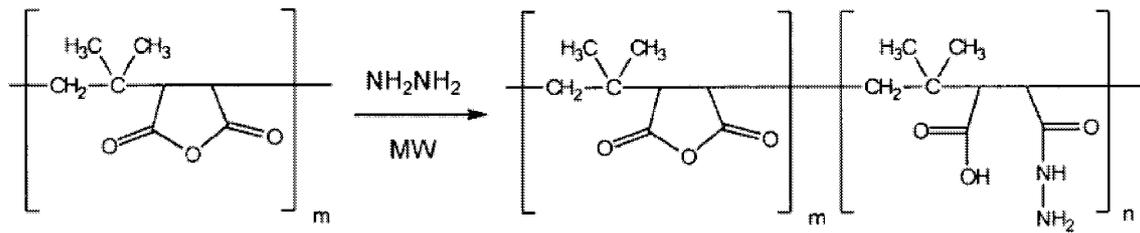
実施例16

この実施例は、ポリイソブチレン-co-マレイン酸ヒドラジド（PIBMH）を作製するための方法の一実施形態を説明する。ポリイソブチレン-co-マレイン酸無水物（7.1mmol、1.09g、Sigma-Aldrich）は、10mL CEMマイクロ波チューブにおいてヒドラジノー水和物と混合した（7.0mL、144mmol、Sigma-Aldrich）。反応混合物は、CEM Discoveryユニットにおいて、300Wで60分間、120 でレンジ加熱した。反応物を真空中でオフホワイトの泡になるまで減容した。残渣を最小量のDI水中に取り込み、大容量のエタノールと混合して沈殿を誘発した。結果として生じた混合物を遠心分離し、上澄みを移した。残渣を

50

最小量の脱イオン水中に取り込み、エタノールを用いた沈殿プロセスを合計3回繰り返した。最終残渣を脱イオン水に溶解し、凍結乾燥させて、細かいオフホワイトの吸湿性粉末を得た。

【化85】



10

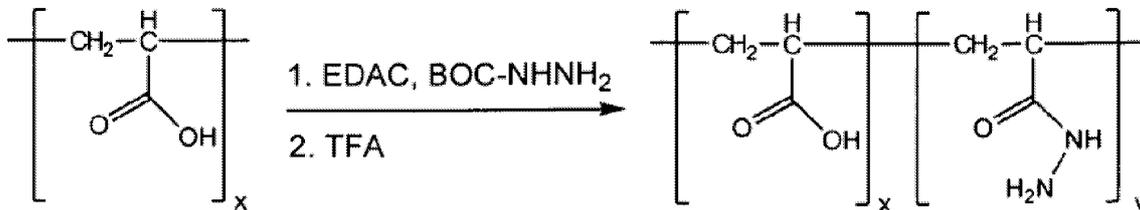
【0279】

実施例17

この実施例は、ポリアクリル酸ヒドラジド (PAAH) を作製するための方法の一実施形態を説明する。ポリアクリル酸 (水中 9.57 mmol、2.00 g、45 重量% 溶液、Sigma-Aldrich) を 40 mL DI 水で希釈し、t-ブチルカルバミン酸 (9.57 mmol、1.24 g、Sigma-Aldrich) および EDAC (19.1 mmol、3.66 g) を室温で 14 時間反応させた。反応混合物 pH は、IM HCl の滴下添加によって 3 未満に下げ、ポリマーの沈殿を誘発した。ポリマー沈殿物をろ過し、DI 水で洗浄し、真空乾燥させて 846 mg の材料を産生した。BOC 保護ポリマーを、トリフルオロ酢酸 (8 mL) で、完全に溶解するまで 1 時間以上攪拌し、TFA を真空で除去した。残渣 TFA は、トルエン、次に塩化メチレンを用いた共沸蒸留によって除去し、低圧力下でさらに乾燥させて 720 mg の白色固体を得た。

20

【化86】



30

【0280】

実施例18

この実施例は、蛍光によって、ポリマー当たりの反応性ヒドラジド基のモル当量を決定するための方法の一実施形態を説明する。標準曲線は、6つの濃度 (0.1 ~ 0.8 mM) のアセチルヒドラジドを pH 7.5 の PBS 中のフルオレスカミンと反応させて、蛍光 (A360/E460) 対濃度をプロットすることによって生成した。R² 値は、標準曲線の場合 0.994 である。

40

【0281】

ポリアクリルアミド、ポリイソブチレン-co-マレイン酸無水物、ポリビニルピロリドン、およびポリアクリル酸を、それぞれ実施例 1、15、16 および 17 から合成されるようなポリアクリルアミドヒドラジド、ポリビニルピロリドンヒドラジド、ポリイソブチレン-co-マレイン酸ヒドラジド、およびポリアクリル酸ヒドラジドにおけるヒドラジドの取り込みの負の対照として使用した。各ポリマーは、pH 7.5 の PBS 中周知の濃度で溶解し、フルオレスカミンと反応させて、蛍光を 460 nm で測定した。反応性ヒドラジドの数は、標準曲線と比較して計算し、個々のポリマーの平均分子量に対して調整した。

【0282】

50

ヒドラジンの取り込みは、ポリアクリルアミドの場合に最高であったが、ポリイソブチレン - c o - マレイン無水物およびポリビニルピロリドンは、官能化ポリマーを生成した。追加のマイクロ波を使用しても、表 2 に示されるように、エネルギーが有意にヒドラジドの官能化を高めたとは思われなかった。ポリアクリル酸におけるヒドラジンの非マイクロ波媒介による取り込みは、ポリイソブチレン - c o - マレイン酸無水物またはポリビニルピロリドンのいずれかよりも高いヒドラジドの取り込みをもたらしたが、ポリアクリルアミドよりも低い取り込みであった。

【 0 2 8 3 】

【表 1】

ポリマーヒドラジドの取り込み

ポリマー	ヒドラジドのモル当量
ポリアクリルアミド	0.0
ポリアクリルアミドヒドラジド	76
ポリイソブチレン - c o - マレイン酸 無水物	0.0
ポリイソブチレン - c o - マレイン酸 ヒドラジド	38
ポリビニルピロリドン	4.7
ポリビニルピロリドンヒドラジド	30
ポリアクリル酸	0.0
ポリアクリル酸ヒドラジド	53

10

20

【 0 2 8 4 】

【表 2】

マイクロ波電力別ポリマーヒドラジドの取り込み

ポリマー	ヒドラジドのモル当量
ポリビニルピロリドン	4.7
ポリビニルピロリドンヒドラジド (100W)	33
ポリビニルピロリドンヒドラジド (200W)	34
ポリビニルピロリドンヒドラジド (300W)	30

30

【 0 2 8 5 】

実施例 19

この実施例は、概して図 2 に示されるような化学選択的 F c 特異的ポリビニルピロリドンヒドラジド - 抗体 (P V P H - A b) 共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ポリクロナル抗体の溶液 (1 . 0 m g / m L の 0 . 8 m L) を、過ヨウ素酸ナトリウム (0 . 2 m L) の 1 0 0 m M 水溶液と、2 時間室温でインキュベートした。溶液は、A B S (0 . 1 0 M 酢酸、0 . 1 5 M N a C l、p H 5 . 5) を使用して、G - 2 5 (G E L i f e s c i e n c e s、P D - 1 0 カラム) のカラムを通すことによって緩衝液交換した。A b に対して 5 0 倍モル過剰を使用して P V P H を酸化 A b に添加し、室温で一晩インキュベートした。A B S (0 . 1 0 M 酢酸、0 . 1 5 M N a C l、p H 5 . 5) を使用し、サイズ排除カラム上で P V P H - A b を精製した。N H S - d P E G ₈ - D N P (5 0 x モル過剰) を添加し、反応物を 1 8 時間インキュベートした。S E C (0 . 1 M リン酸、0 . 1 5 M N a C l、p H = 7 . 5) は、精製されたポリハブ

40

50

テニル化抗体を得た。抗体当たりのハプテンの数は、UV - Vis測定値を使用して計算した。

【0286】

実施例20

この実施例は、概して図2に示されるような化学選択的Fc特異的イソブチレン - co - マレイン酸ヒドラジド - 抗体 (PIBM - Ab) 共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ポリクローナル抗体の溶液 (1.0 mg/mLの0.8 mL) を、過ヨウ素酸ナトリウム (0.2 mL) の100 mM水溶液と、2時間室温でインキュベートした。溶液は、ABS (0.10 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.5) を使用して、G - 25 (GE Lifesciences、PD - 10カラム) のカラムを通すことによつて緩衝液交換した。Abに対して50倍モル過剰を使用してPVPHを酸化Abに添加し、室温で一晩インキュベートした。ABS (0.10 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.5) を使用し、サイズ排除カラム上でPIBMH - Abを精製した。NHS - dPEG₈ - DNP (50×モル過剰) を添加し、反応物を18時間インキュベートした。SEC (0.1 M リン酸、0.15 M NaCl、pH = 7.5) は、精製されたポリハプテニル化抗体を得た。抗体当たりのハプテンの数は、UV - Vis測定値を使用して計算した。

10

【0287】

実施例21

この実施例は、概して図2に示されるような化学選択的Fc特異的ポリアクリル酸ヒドラジド - 抗体 (PAAH - Ab) 共役体を合成するための方法の一実施形態を説明する。ポリクローナル抗体の溶液 (1.0 mg/mLの0.8 mL) を、過ヨウ素酸ナトリウム (0.2 mL) の100 mM水溶液と、2時間室温でインキュベートした。溶液は、ABS (0.10 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.5) を使用して、G - 25 (GE Lifesciences、PD - 10カラム) のカラムを通すことによつて緩衝液交換した。Abに対して50倍モル過剰を使用してPAAHを酸化Abに添加し、室温で一晩インキュベートした。ABS (0.10 M 酢酸、0.15 M NaCl、pH 5.5) を使用し、サイズ排除カラム上でPAAH - Abを精製した。NHS - dPEG₈ - DNP (50×モル過剰) を添加し、反応物を18時間インキュベートした。SEC (0.1 M リン酸、0.15 M NaCl、pH = 7.5) は、精製されたポリハプテニル化抗体を得た。抗体当たりのハプテンの数は、UV - Vis測定値を使用して計算した。

20

30

【0288】

実施例22

この実施例は、発色染色 (すなわちDABのHRP媒介沈着) または量子ドットのいずれかを使用して、扁桃腺上の組織エピトープ、特にKi - 67を検出して、ポリハプテニル化ポリマーと共役された抗体を認識することに関する。以下は、Ventana Benchmark Instrumentからの適応手順である。EZ Prep容積調整剤とともに液体カバースリップ (VMSI) を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を75℃まで4分間加熱し、EZ Prep容積調整剤 (VMSI) により75℃で2回処理した。75℃で4分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともにEZ Prep容積調整剤を添加して、76℃で4分間組織を脱パラフィン化した。スライドを40℃まで冷却し、3回洗浄した後、マウス抗Ki67 (100 μL、VMSI) 抗体を添加し、次に液体カバースリップを適用して、40℃で16分間インキュベートした。スライドを洗浄した後、ヤギ抗マウスPVPH - DNP抗体 (100 μL)、次に液体カバースリップで処理し、40℃で8分間インキュベートした。スライドを緩衝液で2回洗浄した後、液体カバースリップを適用し、655 nm QDot: 抗DNP MA b共役体 (100 μL、20 nmol) を添加し、37℃で16分間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動でスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。図27および28は、この実施例に従って得られる染色結果を示す。

40

50

【0289】

実施例 23

この実施例は、発色染色（すなわちDABのHRP媒介沈着）または量子ドットのいずれかを使用して、扁桃腺上の組織エpitep、特にKi-67を検出して、ポリハプテニル化ポリマーと共役された抗体を認識することに関する。以下は、Ventana Benchmark Instrumentからの適応手順である。EZPrep容積調整剤とともに液体カバースリップ（VMSI）を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を75℃まで4分間加熱し、EZPrep容積調整剤（VMSI）により75℃で2回処理した。75℃で4分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともにEZPrep容積調整剤を添加して、76℃で4分間組織を脱パラフィン化した。スライドを40℃まで冷却し、3回洗浄した後、マウス抗Ki67（100μL、VMSI）抗体、次に液体カバースリップを添加し、40℃で16分間インキュベートした。スライドを洗浄した後、ヤギ抗マウスPIBMH-DNP抗体（100μL）、次に液体カバースリップで処理し、40℃で8分間インキュベートした。スライドを緩衝液で2回洗浄した後、液体カバースリップを適用し、655nm QDot：抗DNP MA b共役体（100μL、20nmol）を添加し、37℃で16分間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動でスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。図29および30は、この実施例に従って得られる染色結果を示す。

10

【0290】

実施例 24

この実施例は、発色染色（すなわちDABのHRP媒介沈着）または量子ドットのいずれかを使用して、扁桃腺上の組織エpitep、特にKi-67を検出して、ポリハプテニル化ポリマーと共役された抗体を認識することに関する。以下は、Ventana Benchmark Instrumentからの適応手順である。EZPrep容積調整剤とともに液体カバースリップ（VMSI）を適用する前に、スライド上のパラフィンコーティングした組織を75℃まで4分間加熱し、EZPrep容積調整剤（VMSI）により75℃で2回処理した。75℃で4分後、スライドを洗浄し、液体カバースリップとともにEZPrep容積調整剤を添加して、76℃で4分間組織を脱パラフィン化した。スライドを40℃まで冷却し、3回洗浄した後、マウス抗Ki67（100μL、VMSI）抗体、次に液体カバースリップを添加し、40℃で16分間インキュベートした。スライドを洗浄した後、ヤギ抗マウスPAAH-DNP抗体（100μL）、次に液体カバースリップで処理し、40℃で8分間インキュベートした。スライドを緩衝液で2回洗浄した後、液体カバースリップを適用し、655nm QDot：抗DNP MA b共役体（100μL、20nmol）を添加し、37℃で16分間インキュベートした。スライドを緩衝液で3回洗浄し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動でスライドに適用し、その後、顕微鏡を通してスライドを見た。図31および32は、この実施例に従って得られる染色結果を示す。

20

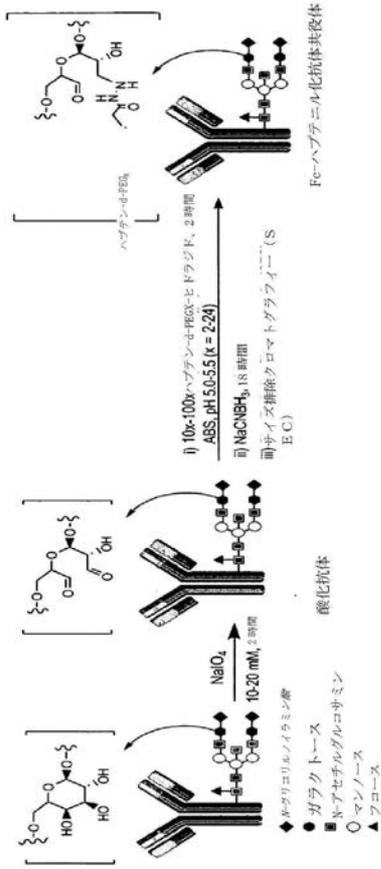
30

【0291】

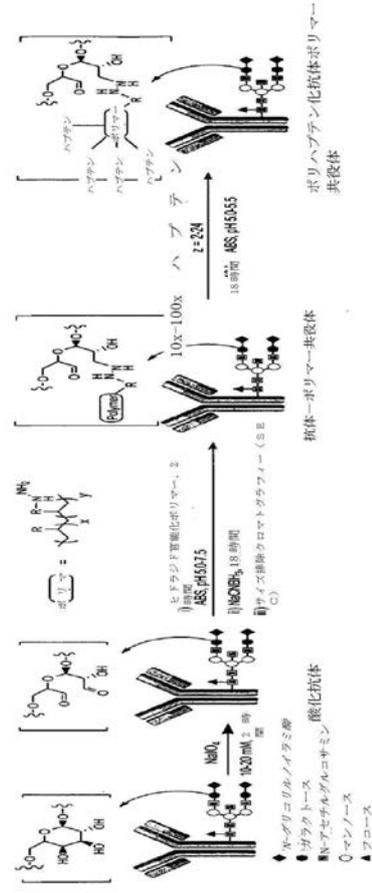
本出願は、所定の特定実施形態に関連して説明された。当業者は、本発明の範囲がこれらの特定実施形態に限定されないことを理解するであろう。

40

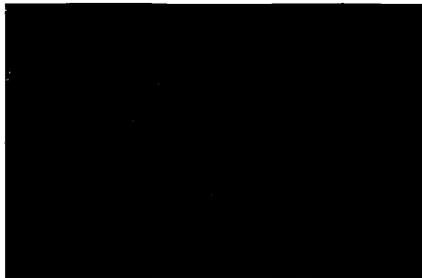
【 図 1 】



【 図 2 】



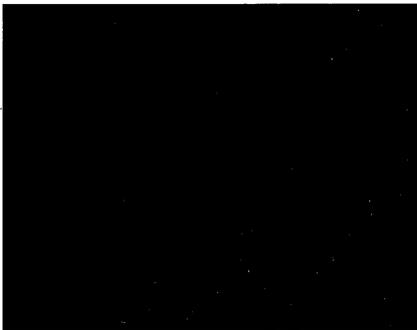
【 図 3 】



【 図 5 】



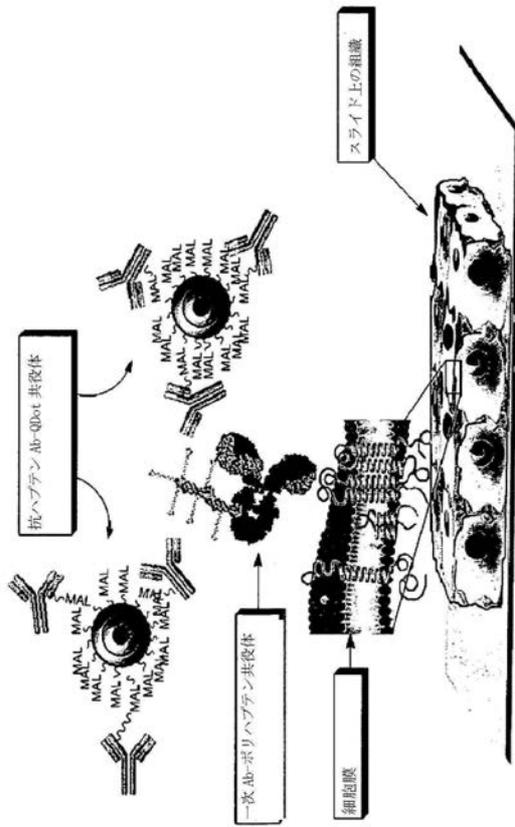
【 図 4 】



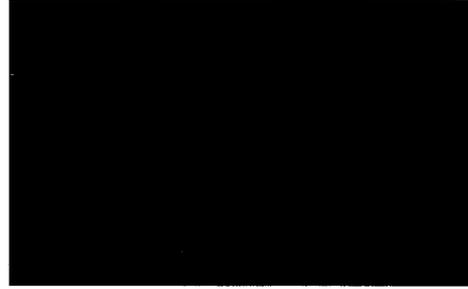
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



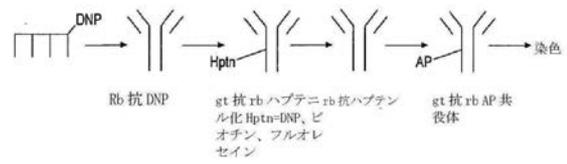
【 図 1 0 】



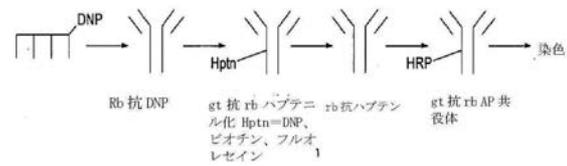
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



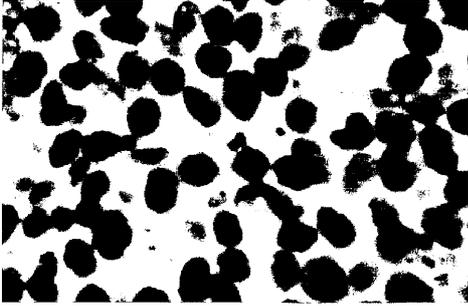
【 図 1 3 】



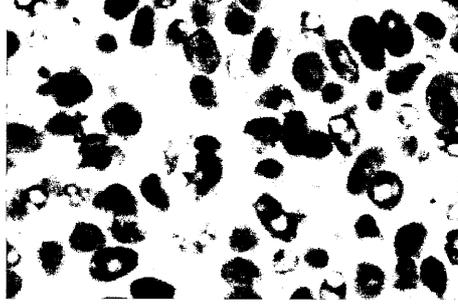
【 図 1 4 】



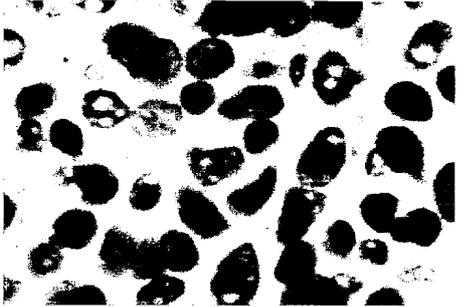
【 図 1 5 】



【 図 1 7 】



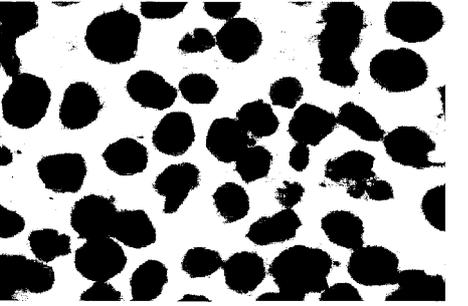
【 図 1 6 】



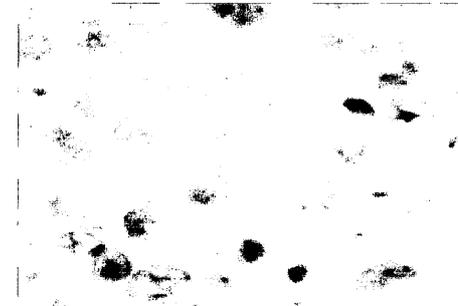
【 図 1 8 】



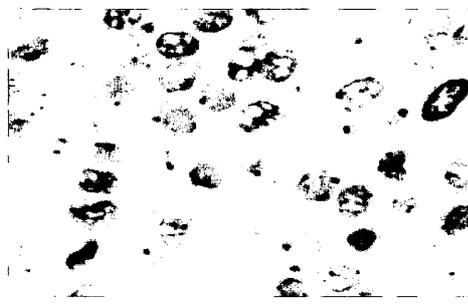
【 図 1 9 】



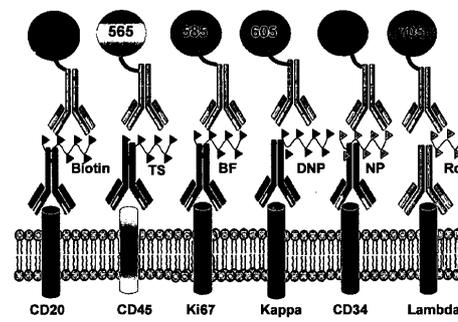
【 図 2 1 】



【 図 2 0 】



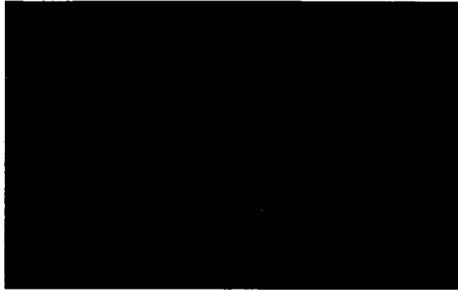
【 図 2 2 】



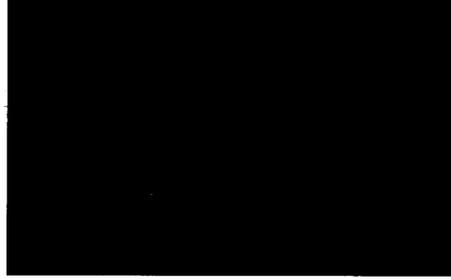
【 図 2 3 】



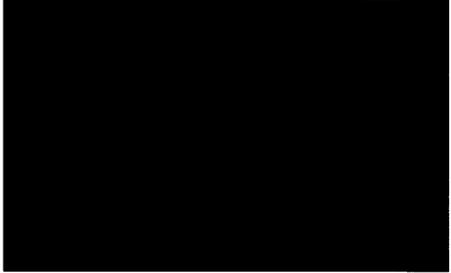
【 図 2 4 】



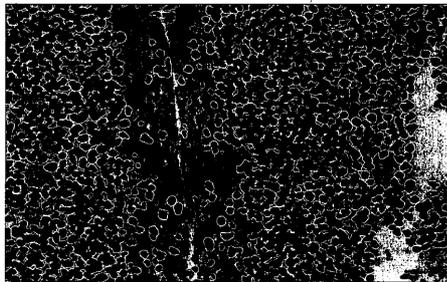
【 図 2 5 】



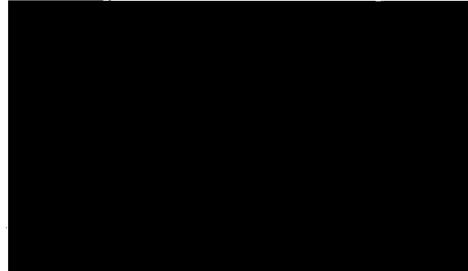
【 図 2 6 】



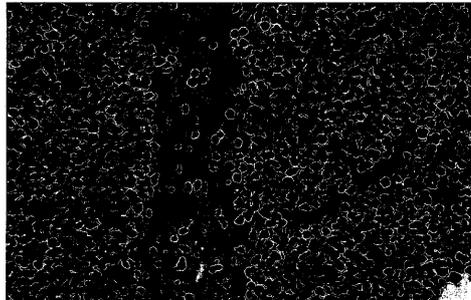
【 図 2 7 】



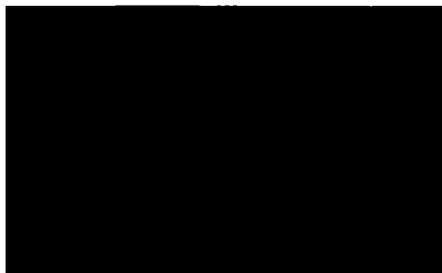
【 図 2 8 】



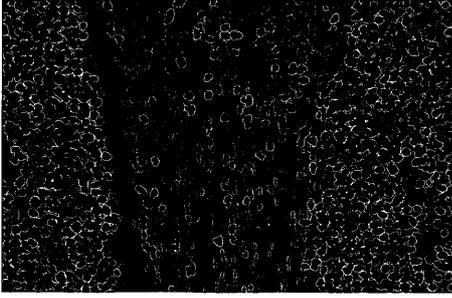
【 図 2 9 】



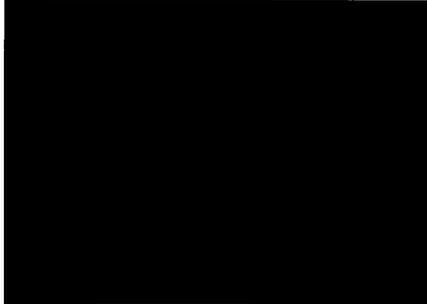
【 図 3 0 】



【図 3 1】



【図 3 2】



【手続補正書】

【提出日】令和1年7月29日(2019.7.29)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料における標的に対して分析を行うための方法であって、

前記試料を、標的に特異的に結合する特異的結合分子と接触させるステップであって、前記特異的結合分子は、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド - N - ヒドロキシスクシニミド、多糖類から選択されるポリマー部分を含み、かつ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドラジン誘導体、ヒドラジド誘導体、グアニジン、アミノグアニジン、ヒドロキシルアミン、またはそれらの組み合わせから選択される複数の反応性官能基をさらに含むポリマーリンカーを介して、検出可能な標識に共役されるステップと、

前記検出可能な標識を使用する前記標識に結合される前記特異的結合分子を検出するステップと、

を含む、方法であって、

前記分析は、試料における 2 つ以上の異なる標的に対する多重分析であって、

前記試料を、2 つ以上の異なる標的に特異的に結合する 2 つ以上の特異的結合分子と接触させるステップであって、前記 2 つ以上の特異的結合分子は、前記ポリマーリンカーの反応性官能基を介して、異なるハプテンに共役されるステップと、

前記試料を、個別に検出され得る 2 つ以上の異なる抗ハプテンと接触させるステップと

、

を含む、方法。

【請求項 2】

前記ポリマーリンカーは、ポリアクリルアミドヒドラジドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記特異的結合分子は、アビジン、抗体、核酸、ペプチド核酸 (PNA)、またはアプタマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記特異的結合分子は抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出可能な標識は、酵素、フルオロフォア、ルミノホル、ハプテン、蛍光ナノ粒子、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ハプテンは、ジニトロフェニル、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、ローダミン、プロモデオキシウリジン、マウス免疫グロブリン、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ジニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、クマリン、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出可能な標識はハプテンであり、前記方法は、前記試料を抗-ハプテンの抗体と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料を抗-抗体の抗体と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記特異的結合分子は、酸化Fc部分を含む抗体であり、前記ポリマーリンカーは、反応性官能基を介して、前記酸化Fc部分に連結される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

複数の異なるハプテンは、前記ポリマーリンカーに連結される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記特異的結合分子は抗体であり、前記方法は、
前記試料を、2つ以上の一次抗体と接触させるステップであって、前記一次抗体のそれぞれは、異なるハプテンに共役されるステップと、
前記試料を、2つ以上の二次抗ハプテン抗体と接触させるステップであって、前記二次抗ハプテン抗体のそれぞれは、異なる量子ドットに共役されるステップと、を含む、
請求項 1 に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/115 Z
 C 0 7 K 16/44

(72)発明者 ケイシー エイ ケルナグ
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 8 5 7 5 5 トゥーソン イー イノベーション パーク ドラ
 イブ 1 9 1 0

(72)発明者 ドナルド ジョンソン
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 8 5 7 5 5 トゥーソン ダブリュー ブルー クレスト ドライ
 ブ 1 0 0 4

(72)発明者 クリストファー ピアニアルズ
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 8 5 7 1 8 トゥーソン イー クワイエット キャニオン ドラ
 イブ 2 2 6 3

F ターム(参考) 4B063 QA13 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48
 QR56 QR63 QR72 QR77 QS34 QS36 QX01
 4H045 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 EA50

【外国語明細書】

2019197071000001.pdf

专利名称(译)	聚合物载体，用于免疫成分化学和原位杂交		
公开(公告)号	JP2019197071A	公开(公告)日	2019-11-14
申请号	JP2019138486	申请日	2019-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	每次塔纳Medeikaru系统公司的Rete		
[标]发明人	ジェリーダブリューコスミーダー ケイシーエイケルナグ ドナルドジョンソン クリストファーピアナルズ		
发明人	ジェリー ダブリュー コスミーダー ケイシー エイ ケルナグ ドナルド ジョンソン クリストファー ピアナルズ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/6841 C07K16/00 C12N15/115 C07K16/44		
CPC分类号	A61K47/6883 A61K49/0058 A61K49/0067 G01N33/532 G01N33/54353 C07K17/08 G01N33/544 G01N33/545 G01N33/56983 G01N33/57492 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/587 G01N33/588		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/53.M C12Q1/6841.Z C07K16/00 C12N15/115.Z C07K16/44		
F-TERM分类号	4B063/QA13 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063 /QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR63 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /EA50		
代理人(译)	杉村健二		
优先权	60/931546 2007-05-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种用于分析样品中靶标的方法。解决方案：该方法包括：使样品与特异性偶联至靶标的特异性偶联分子接触的步骤，其中该特异性偶联分子与标记物偶联。可以通过聚合物接头检测，该聚合物接头包括选自聚丙烯酰胺，聚丙烯酰胺-N-羧基琥珀酰亚胺，多糖的聚合物部分，并且还包括选自胍，酰胍，胍衍生物，酰胍衍生物，胍，氨基胍的多个反应性官能团，羧胺或其组合；以及使用可检测的标记物检测与标记物偶联的特异性偶联分子的步骤。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-197071 (P2019-197071A) (43) 公開日 令和1年11月14日 (2019.11.14)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D 4B063
C12Q 1/6841 (2018.01)	G01N 33/53	U 4H045
C07K 16/00 (2006.01)	G01N 33/53	M
C12N 15/115 (2010.01)	C12Q 1/6841	Z
C07K 16/44 (2006.01)	C07K 16/00	
審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 92 頁) 最終頁に続く		
(2) 出願番号	特願2019-138486 (P2019-138486)	(7) 出願人
(2) 出願日	令和1年7月29日 (2019.7.29)	ベンタナ・メデイカル・システムズ・イン コーポレーション
(6) 分割の表示	特願2017-129850 (P2017-129850) の分割	アメリカ合衆国アリゾナ州 85737 ト ウソン イー イノベーション パーク ドライブ 1910
原出願日	平成20年5月22日 (2008.5.22)	(7) 代理人
(3) 優先権主張番号	60/931,546	弁理士 杉村 憲司
(3) 優先日	平成19年5月23日 (2007.5.23)	(7) 発明者
(3) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	ジェリー ダブリュー コスミーダー アメリカ合衆国 アリゾナ州 85750 トゥーソン エヌ モッカシン トレイ ル 5530
最終頁に続く		
(5) 【発明の名称】 免疫組織化学および in situ ハイブリダーゼーションのためのポリマー担体		