

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530885

(P2004-530885A)

(43) 公表日 平成16年10月7日(2004.10.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/58	GO 1 N 33/58	Z 2GO45
GO 1 N 21/76	GO 1 N 21/76	2GO54
GO 1 N 33/533	GO 1 N 33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2003-500567 (P2003-500567)	(71) 出願人	500267642 クレアテック バイオテクノロジー ベー . ファウ. Kreatech Biotechnol ogy B. V. オランダ国 アムステルダム フリーヤウ ェフ 20 Vlierweg 20, Amsterd am NETHERLANDS
(86) (22) 出願日	平成14年5月24日 (2002. 5. 24)	(74) 代理人	100075557 弁理士 西教 圭一郎
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月28日 (2003. 11. 28)	(74) 代理人	100072235 弁理士 杉山 毅至
(86) 国際出願番号	PCT/NL2002/000334	(74) 代理人	100101638 弁理士 廣瀬 峰太郎
(87) 国際公開番号	W02002/097439		
(87) 国際公開日	平成14年12月5日 (2002. 12. 5)		
(31) 優先権主張番号	01202007.9		
(32) 優先日	平成13年5月28日 (2001. 5. 28)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的標識化方法

(57) 【要約】

本発明は、異なった反応性部位を共に含んでいる1種またはそれ以上の物質を特異的に標識化する方法に関する。さらに本発明は、本発明の方法に従って標識化された物質、標識化された物質を含む診断キット、および、本発明の方法を利用するための診断キットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

白金 - リンカーを介して 1 種またはそれ以上の物質を特異的に標識化する方法であって、該物質は共に 1 つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位と 1 つまたはそれ以上の窒素反応性部位を含み、白金化合物と標識との複合体を形成し、そして、実質的に硫黄含有反応性部位のみまたは実質的に窒素含有反応性部位のみが該白金化合物に結合するように該白金化合物を前記の 1 種またはそれ以上の物質と反応させることを特徴とする、物質を特異的に標識化する方法。

【請求項 2】

硫黄含有反応性部位と窒素含有反応性部位の標識化を区別するために pH を使用することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

硫黄含有反応性部位と窒素含有反応性部位の標識化を区別するためにイオン強度を使用することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

塩化物、 Cl^- 、 NO_3^- 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_3^- 、 I^- 、 Br^- 、アセタート、カルボキシラート、ホスファート、スルファート、エチルニトラート、オキサラート、シトラート、ホスホナートまたはこれらの混合物を含む 1 つもしくはそれ以上の塩によってイオン強度を実現することを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

硫黄含有反応性部位と窒素含有反応性部位の標識化を区別するために白金化合物の立体化学構造を使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 6】

硫黄含有部位またはこの複数部位を最初に遮蔽部分で特異的に遮蔽し、その後に白金化合物を窒素含有反応性部位に特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

窒素含有部位またはこの複数部位を最初に遮蔽部分で特異的に遮蔽し、その後に白金化合物を硫黄含有反応性部位に特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 8】

遮蔽部分がトランス - 白金化合物であることを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

白金化合物が特異的に物質に結合するように白金化合物を反応させた後に、遮蔽部分を遮蔽された反応性部位から選択的に除去することを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

窒素含有反応性部位に白金化合物を選択的に標識付けするように選択した濃度で 1 種またはそれ以上の遷移金属イオンを使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 11】

遷移金属を $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Zn}(\text{II})$ の群から選ぶことを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

窒素含有反応性部位の少なくとも 1 つがヒスチジン残基であり、白金化合物と標識の複合体を生成し、実質的にヒスチジン残基のみまたは実質的に非ヒスチジン反応性部位のみが該白金化合物に結合するように該白金化合物を 1 種またはそれ以上の物質と反応させることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

白金 - リンカーを介して 1 種またはそれ以上の物質を特異的に標識化する方法であって、該物質は共に 1 つまたはそれ以上のヒスチジン残基と 1 つまたはそれ以上の他の窒素含有反応性部位を含んでおり、白金化合物と標識との複合体を形成し、そして、実質的にヒスチジン残基のみまたは実質的に非ヒスチジン反応性部位のみが該白金化合物に結合するように該白金化合物を 1 種またはそれ以上の物質と反応させることを特徴とする、物質を特異的に標識化する方法。

【請求項 1 4】

窒素含有反応性部位と硫黄含有反応性部位を異なる標識で標識化することを特徴とする、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

白金化合物が以下の式のうちの 1 つで表される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

10

【化 1】



20



30



ここで、Pt は白金 (Pt)、A および D は、Cl⁻、NO₃⁻、アセタート、HCO₃⁻、CO₃²⁻、ZSO₃⁻、SO₃²⁻、I⁻、Br⁻、F⁻、アセタート、カルボキシラート、ホスファート、エチルニトラート、オキサラート、シトラート、ホスホナート、ZO⁻ および水によって作られる反応部分の群から独立して選ばれ、Z は、水素、または 1 ~ 10 の炭素原子を有するアルキルまたはアリール基であり、

40

X1 と X2 は、NH₃、NH₂R、NHR R'、NRR' R'' 基によって作られる不活性部分の群から独立して選ばれ、R、R' および R'' は 1 ~ 6 の炭素原子を有するアルキル基を表し、そして

X3 は、アルキル基が好ましくは 2 ~ 6 の炭素原子を有している、アルキルジアミンのような安定化架橋を表す。

【請求項 1 6】

50

標識および/または物質の反応性部位がスパーサーを通して白金化合物の白金部分に結合していることを特徴とする、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

標識が、蛍光色素、リン光標識、化学発光標識、特異結合する一対の成分、UV または可視光線吸収標識、放射活性標識、コロイド染料物質、還元剤、微粒子ゾルまたは金属であることを特徴とする、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

標識が、ジニトロフェノール(DNP)、テトラメチルローダミン、ジゴキシゲニン、シアニン色素、ビオチン、アビジンまたはストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

物質が 1 級アミン、2 級アミン、3 級アミン、芳香族アミン、チオール、チオエーテル、スルフィド、ジスルフィド、チオアミド、チオン、アミド、イミド、イミン、イミノエーテルまたはアジドを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

1 種またはそれ以上の物質が、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質、免疫グロブリン、酵素、人工酵素、リン脂質、糖蛋白質、核酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸、ペプチド核酸オリゴマー、ペプチド核酸ポリマー、アミン、アミノ配糖体の群から選ばれる物質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 21】

1 種またはそれ以上の物質が、免疫グロブリン、酵素、抗体-抗原複合体の群から選ばれることを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

標識化された物質を、液状分析物の分析システムを使用して引き続き分析することを特徴とする、請求項 1 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

1 つまたはそれ以上の窒素含有反応性部位および/または 1 つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位で白金化合物に特異的に結合された物質。

【請求項 24】

白金化合物に結合された標識をさらに含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の物質。

30

【請求項 25】

それぞれ窒素含有反応性部位と硫黄含有反応性部位とで、異なる標識で標識化された物質。

【請求項 26】

1 つまたはそれ以上の窒素含有反応性部位および/または 1 つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位で白金化合物に特異的に結合された物質、白金リンカー調製物、緩衝液、標識調整物、遷移金属イオン調整物、イオン強度調節用の調整物および遮蔽部分を含む調製物からなる群から選ばれる 1 種またはそれ以上の調製物を含むことを特徴とする、診断キット。

40

【請求項 27】

請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載の方法を利用するための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、異なった反応性部位を共に含んでいる 1 種またはそれ以上の物質を特異的に標識化する方法、本発明の方法に従って標識化された物質、および本発明の方法を利用するための診断キットに関する。

【0002】

たとえば、化学的、生物学的もしくは医学的な研究または診断において物質を検出、可視化、定量化または観察するために、物質は検出可能な標識で標識化される。標識化方法の

50

広範な多様性は文献で知られている（総説については、Hermanson, 1996, Bioconjugate techniques, Academic Press, ISBN 0-12-34-2335-X）。

【0003】

独特の検出可能な標識と独特な標識化の方法を選定するには、多数の要素がその役目を果たすかもしれない。そのような要素には物質の性質、反応条件、標識された物質の検出限界、標識化反応中の感度および物質に対する特異性が含まれる。

【0004】

生物有機分子を標識化するために白金化合物を使用する方法が非常に長期にわたり興味深いと考えられてきた。検出可能な種々のタイプの標識部分を、イオン性白金に付着することができる。白金化合物は、物質上の種々の反応部分と反応することができる。

10

【0005】

シス - 白金化合物の使用がヨーロッパ特許出願番号 9 5 2 0 1 1 9 7 . 1 に記載されている。ここでは、白金化合物を介して生物有機分子と標識とを結合するための方法が開示されており、その2つの配位部位は、エチレンジアミン基のような安定化架橋の2つの端部で占められている。この既知のシス白金化合物は、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質および核酸のような数種の生物有機化合物に標識を連結するのに好適である。トランス - 白金化合物を使用する方法もまた、種々の生物有機分子を標識化するのに適していると報告されている（EP出願 9 7 2 0 1 0 6 6 . 4 ）。

【0006】

種々の反応性部位に対する白金化合物の反応性は、迅速な標識化反応と広範な種々の物質に対する優れた感度を可能にするので、多数の応用に有益である。

20

【0007】

しかしながら、たとえば、標識化の選択性を改良するために、物質の特異な反応性部位へ標識を導くことが望まれるだろう。また、予め選択した部位は、種々の形の生物有機化合物を含んでいる検体のような複雑な検体中で標識化されるかもしれない。特異的なまたは選択的な標識化は、しばしば検体精製の必要性を回避し、そして標的とされる物質がその本来の性質、たとえば、3次元構造、活性、親和性などを失わないような方法で管理され得る。

【0008】

さらに、制御された多くの反応性部位で物質を標識化することは有益であろう。このことは定量の精度を向上させそして標識化された物質の同定を容易にすることができる。そのような改善は有機化学、生物学および医学領域のような種々の応用に極めて価値があるだろう。

30

【0009】

さらに、たとえば、酵素、免疫グロブリン、またはDNA - プローブのような物質の構造または活性に影響を与えない標識化方法を発見することは、標識化化学において、しばしば高度な課題である。

【0010】

本発明の目的は、異なる反応性部位を含む1種またはそれ以上の物質を共に特異的に標的とする反応性部位で標識化する方法を提供することである。

40

【0011】

本発明によって、驚くべきことに、1種またはそれ以上の物質が白金 - リンカーを介して標識化できることが見出された。好ましい実施形態では、該リンカーは白金 - リンカーであり、該物質は1つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位および/または1つまたはそれ以上の窒素含有反応性部位を合わせもち、そして白金化合物と標識の複合体が形成され、該白金化合物は1種またはそれ以上の物質と反応される。本発明の好ましい実施形態では、実質的に硫黄を含有する反応性部位または実質的に窒素を含有する反応性部位のみが該白金化合物と結合される。

【0012】

ここで使用される物質は、1つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位および/または1つ

50

またはそれ以上の窒素含有反応性部位を含むある種のものとして解釈される。特に、物質は、生物有機化合物を含め、無機または有機化合物に関する。ここで使用される生物有機化合物は、生物学的炭素を含有する化合物を意味する。また、生物有機化合物は、たとえば、治療もしくは予防効果、免疫応答、代謝経路などを誘導またはこれに作用することによって、生物学的システムにおける反応を誘導するかまたはこれに影響を与える能力のある化合物を意味する。「物質」は、さらに、微生物、ウイルスもしくはプリオン、または、1つまたはそれ以上の上記の硫黄または窒素反応型の反応性部位を含む材料、または、微配列(micro-array)、微量力価測定板(microtitre plate)、試験ストリップ(test strip)もしくは試験管のようなそれらから作られた製品、を意味する。特異的に標識化されるべき別個の反応性部位は、1つの物質内に、または、1つまたはいくつかの標識化される部位を有しているが該別個の反応性部位も含んでいる多くの物質の組み合わせ(混合物、溶液、分散物など)内に、共存する。そのような、組み合わせは、たとえば、窒素含有反応性部位のみを有する物質と硫黄含有反応性部位のみを有する物質の組み合わせである。

10

【0013】

原理的に、どのようなタイプの窒素含有反応性部位または硫黄含有反応部も、本発明の方法を使用して標識化することができる。好ましい反応性部位には、一級アミン、二級アミン、三級アミン、芳香族アミン、チオール、チオエーテル、スルフィド、ジスルフィド、チオアミド、チオン、アミド、イミド、イミン、イミノエーテル、またはアジドを含有する反応性部位が含まれる。標識化され得る物質の例は、アミノ酸(好ましくは、メチオニン、システイン、ヒスチジン、リジンおよびトリプトファン)、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質、免疫グロブリン、酵素、人工酵素、リン脂質、糖蛋白質、核酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸、ペプチド核酸オリゴマー、ペプチド核酸ポリマー、アミン、アミノ配糖体、核ペプチドおよび糖ペプチドの群から選ばれる物質である。本発明に従い、物質は、好ましくはアミノ酸、ペプチド、オリゴペプチドおよびポリペプチドの群から選ばれる。

20

【0014】

白金化合物に結合された物質は、Pt-S付加物(硫黄含有反応性部位に結合したとき)、Pt-N付加物(窒素含有反応性部位に結合したとき)または一般に白金-付加物と称することができる。

【0015】

硫黄含有反応性部位は以後、S-反応性部位とよび、窒素含有反応性部位は、以後、N-反応性部位とよぶことができる。

30

【0016】

白金リンカーについては、物質に標識を結合するために使用できる白金部分を意味する。本発明で使用される好ましいリンカー化合物は配位子が結合される白金化合物である。

【0017】

本発明の方法は、物質の標識化を、種々の反応性部位を合わせ持っている物質または物質のグループ内の特異的反応性部位に導くのに極めて適していることが見つけ出された。さらに本発明の方法は標的とされる物質(の反応性部位)に対して、たとえ複雑なマトリックス内でも優れた感度を有していることが見つけ出された。本発明の方法の、標識が標識化される反応性部位を識別するための優れた能力は、なかでも、分析目的に極めて有用である。優れた感度は、精度と定量化の機能上の範囲に貢献できるばかりでなく、標識化された物質の均質性を向上することができる。改良された均一性は、一般に、たとえばクロマトグラフィーまたは電気泳動の方法による分析検体の分離または精製中の分析帯を広げるのに有用な効果を有している。

40

【0018】

さらに、たとえ、標識化される物質が壊れやすいかまたは不安定な部分を含んでいても、標識化された物質の構造または活性に著しく影響を与えることなく物質を選択的に標識化できることが見つけ出された。物質がインビボまたはインビトロでの活性、好ましくは実質的にその全ての活性保持している間、標識化された物質の検出または追跡を容易になる

50

ので、これは本発明の非常に有利な特徴である。活性保持の利点のために、本質的に該物質の機能性部分の1つまたはそれ以上のN - またはS - 反応性部位で標識が付かないように、免疫グロブリン、酵素、ホルモン、核酸のような物質を直接標識化できることが見つけ出された。

【0019】

さらに、物質が標識化された後で、物質の立体配座が大きな影響を受けてない状態にいるように、本発明が物質を標識化するのに使用できることが見つけ出された。本発明のこの実施態様は、たとえば、抗体 - 抗原複合体または二重鎖になったオリゴ - またはポリヌクレオチドをその複合体を乱すことなく標識化するのに適している。本発明のこの態様は、また、物質または / およびある種の化学的または生化学的過程のインビトロまたはインビボでの可視化に極めて有用である。

10

【0020】

好ましい白金化合物の例は、式 $[Pt(II)(X_1)(X_2)(A)(D)]$ のシス - もしくはトランス白金化合物、または、式 $[Pt(II)(X_3)(A)(D)]$ のシス - 白金化合物である。

【0021】

ここで、Pt は白金 (Pt) を表し、A および D は同一または異なる反応性部分を表し、白金化合物の標識との錯体形成と白金化合物の物質への結合にそれぞれ関与する。物質、X₁ および X₂ は同一または異なる不活性部分、X₃ は、たとえば2配位性の配位子のような安定化の架橋として作用する不活性部分を表す。

20

そのような白金化合物のいくつかの例の構造表示が、以下に示されている。

【0022】

【化2】



30



40



【0023】

本発明の方法で使用する白金 (II) 化合物は、公知技術のいずれかの方法を経て調整す

50

ることができる。文献は、たとえば、リーディーク等(Redijk et al., Structure and Bonding, 67, pp. 53-89, 1987)で見ることができる。いくつかのトランス - 白金化合物の調製は、EP-A97201066.4に開示されている。その他の調整方法は、EP-A 96202792.6およびEP-A 95201197.1で見ることができる。これらいずれかの文献に記載された方法をここに引用し包含する。本発明の好ましい実施態様において、白金化合物はスパーサー - tert-ブトキシカルボニル / NHS - 標識経路に従って調製される。

【0024】

白金化合物の反応性部分(A, D)は、好ましくは、良好な脱離配位子である。Aおよび/またはDが、 Cl^- 、 NO_3^- 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_3^{2-} 、 ZSO_3^- 、 I^- 、 Br^- 、 F^- 、アセタート、カルボキシラート、ホスファート、エチルニトラート、オキサラート、シトラート、ホスホナート、 ZO^- および水の群から独立して選ばれる白金化合物が、本発明の方法で使用するのに特に適していることが見つけ出された。Zはここで、水素部分、または、1~10の炭素原子を有するアルキルもしくはアリール基と定義される。これらの配位子の中で、 Cl^- と NO_3^- が特に好ましい。

10

【0025】

いずれの形の不活性部分を選択することができる。ここで使用される不活性とは、その部分が標識化過程およびその後において物質と化学的に反応することなく白金化合物に結合したままになっていることを意味する。 NH_3 、 NH_2R 、 $NHRR'$ 、 $NRR'R''$ 基の群から選ばれる1つまたは2つの不活性部を含んでいる白金化合物は、発明の方法で使用される特に好ましい不活性部分であることが見つけ出され、ここでR、R'およびR''は、好ましくは、1~6の炭素原子を有するアルキル基を表す。 H_2NCH_3 は、本発明の方法で使用される特に好ましい不活性部分である。アルキル基が2~6の炭素原子を有するアルキルジアミンは、シス-白金化合物(たとえば、式1cでX3)における好ましい2配位性の不活性部分である。特に好ましい実施態様で、X3はエチレンジアミンである。

20

【0026】

本発明の方法で使用される好ましい白金化合物には、シス[Pt(en)Cl₂]、シス[Pt(en)Cl(NO₃)]、シス[Pt(en)(NO₃)₂]、トランス[Pt(NH₃)₂Cl₂]、トランス[Pt(NH₃)₂Cl(NO₃)]およびトランス[Pt(NH₃)₂(NO₃)₂]が含まれる。

30

【0027】

ここで標識化の用語は、標識を物質と、好ましくは白金リンカーを経て結合することを示すために使用される。ここで使用される標識は、白金化合物または物質に結合させることができ、そして、物質を検出、追跡または可視化するために使用可能ないずれの部分(moiety)であってもよい。標識はいつでも白金化合物と反応させることができる。したがって、本発明に従って、リンカー - 標識複合体を得るために白金リンカーを標識と最初に反応させ、それから物質と反応させることが可能であり、または、この順序が逆でも可能である。好ましい実施態様では、白金リンカーを最初に標識と反応させる。

【0028】

白金化合物に結合させることができる限りにおいて、いずれの型の標識も使用可能である。そのような標識は、放射活性標識、酵素、アビジン、ストレプトアビジンもしくはピオチンのような特異結合する一対の成分、ピオシチン、イミノピオチン、コロイド染料物質、りん光標識(たとえば、ユーロピウムキレート、白金ポルフィリン)、化学発光標識(たとえばルミノール)、蛍光色素、シアニン色素を含めて、アレクサダイ(Alexa dye, (Molecular Probe))またはボディピーカララント(Bodipy-colorant, (Molecular Probe))、ローダミン、ジニトロフェノール(DNP)、カルボキシローダミン、tert-ブトキシカルボニル、還元剤(エオシン、エリスロシン等)、(着色された)ラテックスゾル、ジゴキシゲニン、金属(ルテニウム)、金属ゾルまたはその他の特殊ゾル(セレニウム、炭素およびこの類)、ダンシルリジン、UV染料、VIS染料、インフラレッドダイ(Infra Red Dye)、クマリン(たとえばアミノメチルクマリン)、抗体、プロテインA、プロテインGな

40

50

ど、であり得る。

【0029】

なかでも、どのような物質に結合した白金とも安定な複合体を作ることができそして優れた検出限界を生み出すことができるので、DNP、フルオロレセイン、シアニン-着色剤、およびテトラメチルローダミンが特に好ましい。これらの標識は、多色標識と呼ばれる技術に極めて好適に使用することができる。すなわち、異なった色を有している一方、類似の化学構造を任意に有しているこの種のいくつかの着色剤が使用可能である。他の好ましい標識には、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンおよびジゴキシゲニンが含まれる。

【0030】

本発明の実施態様で、標識および/または物質の反応性部位は、スペーサーを通して白金化合物に結合することができる。そのようなスペーサーには、好ましくは、少なくとも4つの炭素原子、そして好ましくは20以下の炭素原子を有する鎖であり、一方の端に電子供与部分と他の端に標識または物質と反応するための部分を含み、そして電子供与部分を通して白金に結合している鎖が含まれる。もちろん、スペーサー、標識、物質および白金リンカーは、いずれの順序にでも互いに結合させることができる。たとえば、スペーサーをまずリンカーに結合し、次いで得られた化合物を標識と物質に結合することができる。また、リンカーと反応させる前に、最初にスペーサーを標識に結合することも可能である。スペーサーの電子供与部分は、たとえば、アミン基およびチオラートアニオンであり得る。好ましくは、鎖にはさらに少なくとも1つのヘテロ原子がふくまれている。非常に好ましいスペーサーは、1,6-ジアミノヘキサンおよび1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンである。本発明の好ましい実施態様では、マーカ-および/または物質への結合に先立つ中間体リンカー-スペイサー複合体として、1,6-ジアミノヘキサン *tert*-ブトキシカルボニルが使用される。言うまでもなく、標識化用の複合体には、1つ以上の白金、たとえばヨーロッパ特許出願97201066.4に記載されているような2つの白金原子を含むことができる。

10

20

30

【0031】

本発明の方法で物質が特異的に標識化されるように選択するのに特に有用であると発見されたパラメーターの1つは、pH値である。ここで使用されるpHは、本発明による組成または産物の20での水中におけるpHとして解されるべきである。本発明の実施態様が、変更された溶媒陽子移動定数(pKw)(すなわち変更された温度で、有機溶媒中で)を導く環境下で実施される場合には、ここでいうpHは、水中20のpH範囲に基づくものであると解すべきである。

【0032】

一般に、Pt-S付加体の生成はpH非依存性であって、一方、Pt-N付加体の生成はpH依存性である。好ましい実施態様で、1つまたはそれ以上のS-反応性部位は、pHを使用することにより1つまたはそれ以上の窒素原子反応性部位に優先して選択的に標識化される。

【0033】

指針として、好ましい実施態様では、標識化されるべきでない物質のいずれのN-反応性部位の最低pKaよりも低いpHで本発明のpHを選択することができ、これで1つまたはそれ以上のS-反応性部位の特異的な標識化が可能となる。熟練の専門家が理解するように、pKaに加え、標識化される物質の近傍における微細な環境の影響を含め、他の因子もその役割を果たす。

40

【0034】

好ましい実施態様で、そのS-反応性部位または複数部位は、中性または酸性pHで選択的に標識化される。さらに好ましい実施態様では、そのS-反応性部位または複数部位は、5またはそれ以下のpHで、N-反応性部位に優先して特異的に標識化される。

【0035】

また、約pH6と8の間で、他のN-反応性部位に明確に優先してヒスチジン残基を標識

50

化することが可能であると見つけ出された。ここで使用されるように化合物の残基は、化合物それ自体、またはたとえばタンパク質中のアミノ酸残基のようにより大きい物質の部分として解釈されるべきである。

【0036】

種々 pH における Pt - S および Pt - N 付加体の生成についての総覧が表 1 に示されている。

【0037】

【表 1】

タンパク質中における Pt - S および Pt - N 付加体の pH 依存的生成

	pH > 10	pH = 7	pH < 5
S 供与体	全て	全て	全て
N 供与体	全て	ヒスチジンだけ	無し

10

論理的に Pt - S 付加体生成は 1 段階のプロセスである。S が電子対を白金に供与したときに、反応性基が白金から脱離する。Pt - X から Pt - S への直接変換であるこのプロセスは、pH 非依存性であると信じられている。一方、N 供与体は、N 置換に先立って酸素による白金化合物の反応性基の置換を必要とする。まず、Pt - X は Pt - O になり、最後に Pt - N となる。これは 2 段階反応で最初の段階は pH を変えることによって制御

20

【0038】

また、N - 反応性部位に関する白金化合物の選択性を制御するのにイオンの存在が利用できる。1 つの実施態様において、S - 反応性部位の特異的標識化を高めるために、N - 反応性部位への白金化合物が付くのを阻害するのに、1 種またはそれ以上の脱離配位子、好ましくはアニオン部分が使用される。そのような脱離配位子の例には、Cl⁻、NO₃⁻、HCO₃⁻、CO₃²⁻、ZSO₃⁻、SO₃⁻、I⁻、Br⁻、F⁻、アセタート、カルボキシラート、ホスファート、エチルニトラート、オキサラート、シトラート、ホスホナート、Z O⁻ および水が含まれる。Z はここで、水素部分、または 1 ~ 10 の炭素原子を有するアルキルまたはアリール基と定義される。特に好ましい結果が陰イオン部分を含んでいる塩

30

【0039】

たとえば遷移金属のような金属イオンの存在もまた、標識化される反応性部位の選択に使用される。特に、S - 反応性部位に優先して 1 つまたはそれ以上の N - 反応性部位が効果的に特異的に標識化されるように、そのようなイオンが、S - 反応性部位の標識化を防止するかまたは標識化された Pt - S 付加体を不安定にするために適していることが見つけ

40

【0040】

白金化合物の嵩高い不活性部分もまた、たとえば、物質の反応性部位における標識化の防止に使用でき、特異的な立体化学的構造を有する白金化合物から反応性部位が物質の構造によって部分的に遮蔽される。これは、たとえば、もし物質が蛋白質、分子の集合体などのような複雑な三次元構造を有しているなら、可能である。

【0041】

50

本発明によると、1つまたはそれ以上の標識化されるべきでない反応性部位を遮蔽部分で最初に遮蔽し、その後、標識もまた結合されるところの白金化合物と物質の目的の反応性部位とを反応させることによって、物質を特異的に標識化することも可能である。

【0042】

ここで使用する遮蔽とは、反応性部位と、標識の反応性部位への直接的な結合を防ぐ部分または標識と反応性部位に結合した白金との複合体形成を防ぐ部分との反応によって、標識のための反応性部位の親和性の不活性化であると、解釈されるべきである。好ましくは、遮蔽部分は、遮蔽されるべき反応性部位の数によりも過剰に存在する。遮蔽過程の好ましい反応時間はその適用性に依存し、そして如何に反応条件を選択するかは、知識を有する当業者には明瞭であろう。

10

【0043】

もう1つの好ましい実施態様では、白金化合物が特異的に該物質に結合するように白金化合物を反応した後に、遮蔽部分は遮蔽された反応性部位から除去される。

【0044】

好ましい実施態様では、1種またはそれ以上の物質のN-反応性部位への選択的標識化に先立ち、1つまたはそれ以上のS-反応性部位は、たとえば、上述した条件でトランス-白金化合物によって遮蔽することができる。特に良好な結果が、遮蔽部分としてローダミントランス-Pt(トランス[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-ローダミン)Cl](NO₃))で達成された。遮蔽をさらに改善するために、反応は2と5の間で選択されたpHで実施され、そののちpHは、N-反応性部位を標識化するためにアルカリ性pHに上昇された。他の好ましい遮蔽用化合物はカドミウム、水銀または亜鉛複合体である。

20

【0045】

Cu(II)、Zn(II)またはこれらの混合物のような遷移金属イオンの添加が、白金付加体の標識化されたN-反応性部位は実質的に安定な状態を保ちながら、S-反応性部位からトランス-白金化合物を選択的に除去するのに特に優れていることが見つけ出された。

【0046】

標識化を特異的にするために特定の種類の溶媒が使用され得る。特に、N-反応性部位への反応性は、溶媒に依存して変えることができる。白金化合物へ配位子として働くことのできる溶媒は、N-反応性部位への反応性を減少させることができ、したがってそのような溶媒はS-反応性部位の標識化に好ましい。

30

【0047】

上述のパラメーターに加え、本発明の方法は、好ましくは0と120の範囲、さらに好ましくは20と70の範囲で変化される温度；通常1分と48時間の範囲、好ましくは10分と24時間の範囲、さらに好ましくは15時間の範囲内の反応時間；試薬濃度、試薬モル比、白金標識複体の実質的な全荷電など、のようなパラメーターで、さらに精巧に調節することができる。これらのパラメーターは、特別な応用に応じ、技術的に既知のいずれかの方法において調節することができる。たとえば、白金標識複体の実質的な全荷電は、中性pHでのヒスチジンのPt-N付加生成の特異性に影響を与える。フルオロレsein-およびシアニンPt複体のような中性のPt複合体はPt-N付加体を生成するが、陽性荷電された白金標識複合体、たとえば、ローダミン-およびジニトロフェノールPt複合体は、Pt-N付加体を生成しない。陽性荷電された白金標識複合体は、ペプチドおよびそのようなものの等電点以上でN-付加体に対し特異的な標識化を示す。S-反応性部位に優先するN-反応性部位の、またはその逆の優先順位の選択的標識化を可能にすることは別に、本発明の方法は、ここに記載された方法を正しく選択することによってN-反応性部位またはS-反応性部位を区別することもできる。

40

【0048】

たとえば、ヒスチジン残基の1つまたはそれ以上のN-反応性部位は、白金化合物を標識と結合することにより、そして白金化合物が特異的に物質のヒスチジン残基に特異的に結

50

合するような反応条件を選択することによって、選択的に標識化することができる。そのような方法は、ヒスチジンの標識化をしている間は遮蔽できるS - 反応性部位の存在下に、またその非存在下にも、実施することができる。

【0049】

したがって、ペプチドまたは蛋白質のような物質は、アミノ酸または他のN - 反応性部位を有する物質の混合物中の1つまたはそれ以上のヒスチジン残基を、選択的に標識化することができる。好ましい実施態様では、ヒスチジンの選択的標識化は、約7のpH7と全体として中性の電荷を有するPt標識化複合体を選択することによって遂行される。

【0050】

特殊な型のS - 反応性部位または特殊な型のN - 反応性部位の選択的標識化は種々の応用分野で解決策を提供する。たとえば、それは未知組成物の物質中の特殊な型の反応性部位または検体中の特殊な物質の存在（たとえばアミノ酸混合物中のヒスチジンの存在）をスクリーニングするために使用することができる。したがって、特異的標識化過程の繰り返して、いくつかの物質を異なった標識で次から次へと標識化することができ、これはたとえば、クロマトグラフィー、電気泳動および/またはマススペクトメトリーで検体を分離する必要がなく、いくつかの成分のスクリーニングに有用である。

10

【0051】

望まない反応性部位（たとえば、物質の機能性部位）での標識化を避けるために、さらに標識化に特異性を賦与することも可能である。

【0052】

さらに、別個のN - 反応性部位または別個のS反応性部位間の区別によって、多数の異なった標識を有する物質を作り出すことが可能である。

20

【0053】

本発明の方法で、1種またはそれ以上の標識化された物質を調製することが可能である。本発明は、また、N - 反応性部位またはS - 反応性部位において白金化合物で特異的に結合された物質にも関する。本発明はさらに、物質の特異な反応性部位に結合された白金化合物を通して標識が物質に結合している、標識化された物質に関する。

【0054】

本発明の特異な実施態様では、物質または物質混合物の第1の反応性部位の選択的標識化の後に、少なくとも1つの他の反応性物質が特異的にまたは非特異的に標識化される。そのような後の標識化は、本発明に従って、白金化合物と反応させられるのとは異なった標識を使用して実施され得るが、当該技術分野で既知の異なる型の標識化反応を使用することも可能である。たとえば、S - 反応性部位を特異的に標識化した後に、それに続く標識化はアミンに反応性のある標識を使用して行なうことができる。

30

【0055】

好ましい実施態様で、後に続く標識化は、また、特異的標識化をも含む。したがって、別個の反応性部位で種々の標識で標識化された1つの物質を調製することが可能である。

【0056】

このように、1種の物質または物質の混合物を種々の標識で標識化することが可能であることが見いだされた。したがって、本発明は2または複数の標識さえをも有する物質に関する。1種以上の標識で標識化することは、種々の応用に極めて有用であり得る。たとえば、分析分離を必要とせずに混合物中の特定の物質をスクリーニング、たとえばアミノ酸混合物中のメチオニンとヒスチジンの存在をスクリーニングするのに極めて有用である。もう1つの実施態様では、標識化された物質が関与するプロセス、たとえば、物質がいくつかの物質に分裂しそれぞれが異なる標識を有しているプロセスまたはその逆のプロセスを追跡するのに使用できる。言うまでもなく、本発明は定性分析に限定されず、特異的に標識化された物質の定量分析も包含する。原則として、標識化された物質は、続いて、いずれの液体分析物の分析システムでも分析することができる。本発明の特に好ましい実施態様では、標識化された物質の分析を含み、標識化された物質は、たとえばフローサイトメトリーシステムのような、ハイスル - プット液体多重分析物分析システムを使用して分

40

50

析される。

【0057】

本発明はさらに、本発明の物質を含む診断キットに関する。本発明の診断キットは、好ましくは、1つまたはそれ以上の窒素含有反応性部位および/または1つまたはそれ以上の硫黄含有反応性部位で白金化合物に特異的に結合された物質、白金リンカー調製物、緩衝液、標識調整物、遷移金属イオン調整物、イオン強度調節用の調整物および遮蔽部分を含む調製物からなる群から選ばれる1種またはそれ以上の調製物、を含有する。

【0058】

もう1つの本発明の実施態様は、本発明の方法を利用するための診断キットに関する。そのようなキットは、たとえば、反応説明書、物質を標識化するための1種またはそれ以上の白金化合物、1種またはそれ以上の標識、本発明の1種またはそれ以上の物質、1種またはそれ以上の試験検体、1種またはそれ以上の他の試薬、1つまたはそれ以上の試験管またはストリップなどを含むことができる。

10

本発明はさらに以下の非限定的な実施例によって説明される。

【0059】

実施例 1

2つのアミノ酸（ヒスチジンとメチオニン、各0.1ミリモル）が500 μ l重水素化リン酸ナトリウム緩衝液（50mM、pD=7.00）に溶解され、少量の過剰（0.44ミリモル）の[Pt(en)(NH₂-NH-Boc)Cl](NO₃) (=PtN₃-Cl)、とともにインキュベートされた。ここでBocは((en)=エチレンジアミン、Boc=tert-ブトキシカルボニル)マーカである。反応過程は、¹Hと¹⁹⁵Pt核を可視化する高分解能NMR（ブルカー(Bruker)DPX300）で追跡された。結果を図1および2に示す。データは、S-反応性部位（メチオニン、図1）の反応が120分以内にほとんど完結したことを示し、PtN₃-ClからPtN₃-S-付加体への信号の変化によって証明され、一方、N-反応性部位と白金化合物間の反応は緩やかに進行（図2）したことを示した。24時間の後、ヒスチジン分子の4分の1のみが標識化された。

20

【0060】

実施例 2

ウシ血清アルブミン(BSA)が0.5 \times PBS（リン酸塩緩衝化食塩水、pH7.4）中に1mg/ml溶液になるよう溶解された。1mlのBSA検体に、0.5mgのローダミンシス-Pt(シス[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-ローダミン)Cl](NO₃))が加えられた。もう1つの1mlのBSA検体に、0.5mgのローダミントランス-Pt(トランス[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-ローダミン)Cl](NO₃))が加えられた。両方の検体が37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させられた。その後、非結合発蛍光団（非結合ローダミンおよび非結合ローダミン-Pt化合物）が、1 \times PBSを溶出液として使用してゲル濾過（10mlセファデックスG50カラム、10cm長、1ml直径）で除去された。次いで、蛋白質あたりに結合した発蛍光団の比率（F/P比率）が以下の式を使用して決定された。

30

【0061】

【数1】

$$F/P \text{ 比率} = \frac{112.4 \times A_{521}}{95.0 \times [BSA]}$$

40

【0062】

ここで、A₅₂₁（521nmにおける吸光度）はウルトロスペック4000(Ultrospec 4000)分光光度計(APS)を使用して測定され、そして[BSA]（単位 μ g/ μ lでの蛋白質濃度）はBCA試薬（BCA蛋白質測定キットnr.23225、ピース(Pierce)）で測定

50

された。

蛋白質に対する白金化合物の比率 (Pt / P比率) は、以下の式を使用して決定された。

【0063】

【数2】

$$Pt/P比率 = \frac{68,000 \times [Pt]}{195.0 \times [BSA]}$$

【0064】

ここで、[Pt] (単位 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ での白金濃度) は自動吸収光度法で測定された。要するに、白金 - 蛋白質結合の延長は、265.9 nmでのPt線を追跡するためにスリット帯を0.70 nmに定めたパーキンエルマー原子吸光度測定器3100 (Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer3000)で測定された。定量のための直線領域は100 ~ 1500 ng/mLであった。重水素バックグラウンドの補正は分析中の間中なされ、検体容量は0.020 ~ 0.060 mLの間にあった。炉パラメーターは、乾燥120 / 90秒、灰化1300 / 60秒、フラッシング20 / 15秒そして2650 / 5秒のアトマイゼーションである。アルゴンガスが炉を浄化するために使用された。結果は以下のとおりである。

【0065】

白金化合物	F/P比率	Pt/P比率
シス	4.1	4.0
トランス	0.9	3.6

【0066】

BSAはメチオニンとシステイン残基 (S - 反応性部位) に富んでおり、そして上記条件でN - 反応性部位への反応は遅い。Pt / P比率は、シスおよびトランス - 白金化合物の両者ともがうまく蛋白質と反応することを示している。しかしながら、F / P比率は、この実験条件下でマーカー (ローダミン) は、トランス - 白金化合物から遊離され、一方、シス - 白金化合物は蛋白質への結合を留めていることを示している。このことは、トランス - 白金結合反応性部位への標識の結合から反応性部位を遮蔽するために、トランス - 白金化合物が使用できることを示している。

【0067】

実施例3

ウシ血清アルブミン (BSA、シグマ (Sigma); A - 9647)、アビジン - D (ベクター (Vector); A - 2000) そしてヤギ IgG抗 - マウス IgG (全 IgG分画、腎臓学部、ライデン大学 メディカルセンター) を、ビオチン - Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₂ - CO - (CH₂)₂ - CO - (CH₂)₂ - NH - ビオチン) CL] (NO₃)) (KREATECH, ULK001)、DNP - Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₆ - NH - DNP) CL] (NO₃)) (KREATECH, ULK003)、ローダミン - Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₆ - NH - ローダミン) CL] (NO₃)) (KREATECH, ULK101) および d グリーン - Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₆ - NH - d グリーン) CL] (NO₃)) (KREATECH, ULK301) で標識化するために使用した。BSAとIgGの各標識化のために、250 μl PBS中の250 μg の蛋白質が125 μg の標識化試薬を含有する250 μl の水と混合された (標識に対する蛋白質比率 = 1 : 0.5)。必要なときには、容量は蒸留水で0.5 mLに調節された

10

20

30

40

50

。反応は37 で16時間実施された。非結合の標識化試薬が、TBS / 0.05% Tween 20を溶出液として使用して、ゲル濾過(セファデックスG25、PD10; APB)で除去された。アビジン-DのDNP-Pt標識化は、システインを有さないかまたは反応し得ないシステインを有しそしてメチオニンアミノ酸を有する蛋白質の標識化を最適にするために選ばれた。アビジン-Dは、種々の蛋白質:標識比率と固定された比率で、75mMと500mMのNa-リン酸塩-、トリスHCl-またはNa-炭酸塩緩衝液中、7から10で変化するpHで標識化された。標識化期間中の蛋白質濃度は0.5mg/mlに保たれたが、標識-白金試薬濃度は、0.25から0.75mg/mlの間で変化した。

【0068】

蛋白質に対する蛍光色素比率(F/P比率)も蛋白質に対するDNP比率(D/P比率)も蛍光色吸光極大(DNP:363nm、dグリーン:597nmそしてローダミン:521nm)における吸光度を測定することによって計算された。特別な波長におけるシス-白金寄与に関して測定を調節する補正ファクターが導入され、蛋白質濃度はBCA試薬(Piece; 23225)を使用して測定された。280nmでの蛋白質濃度の計算は、Pt試薬のA250nm寄与で疑いがあり使用することができなかった。F/P比率の式はUV/VIS分光法と白金無炎原子吸光分析法(Pt-FAAS)を使用してそれから得られた。Pt-FAASは、蛋白結合白金化合物の数を測定するために使用され、それにより結合した蛍光色素またはDNP-分子の正確な測定ができた。F/PおよびD/P-比率を計算するために使用された式は表2に掲げられている。

【0069】

【表2】

蛍光色素の蛋白質に対する比率およびDNPの
蛋白質に対する比率の計算に使用された式

BSA-DNP	$\frac{3.78 \times A363}{[BSA]}$	IgG-DNP	$\frac{11.67 \times A363}{[IgG]}$	Av-DNP	$\frac{5.5 \times A363}{[Avidin]}$
BSA-Rhod	$\frac{1.29 \times A521}{[BSA]}$	IgG-Rhod	$\frac{3.63 \times A521}{[IgG]}$	Av-Rhod	$\frac{1.95 \times A521}{[Avidin]}$
BSA-dGreen	$\frac{1.66 \times A507}{[BSA]}$	IgG-dGreen	$\frac{3.85 \times A507}{[IgG]}$	Av-dGreen	$\frac{2.37 \times A507}{[Avidin]}$

表3はBSAとIgGがアビジン-Dに比較して多くの白金に結合した蛍光色素を含んでいることを示している。ローダミン-Ptの場合:BSAは1蛍光色素/16.6kDを含み、IgGは1蛍光色素/19.5kDそしてアビジンは1蛍光色素/82.5kDを有している。さらに、DNP-Ptとローダミン-Ptは、匹敵する反応性を有し両者はdグリーン-Ptよりも反応性が高い。

【0070】

【表3】

10

20

30

40

標識化実験から得られたF/P-およびD/P-比率

蛋白質	標識	蛋白質：標識比率 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$)	標識化緩衝液	F/P比率 または D/P比率
BSA	ローダミン	1:0.5	0.25x PBS	4.0
			pH7.4	4.1
	DNP dグリーン	1:0.5 1:0.5	0.5 x PBS	3.6
			1 x PBS	6.1
ヤギIgG	DNP ローダミン dグリーン	1:0.5 1:0.5 1:0.5	0.5 x PBS	8.4
			0.5 x PBS	7.7
			0.5 x PBS	3.9
アビジン-D	DNP ローダミン dグリーン	1:0.5 1:0.5 1:0.5	0.5 x PBS	1.6
			0.5 x PBS	0.8
			0.5 x PBS	0.3
アビジン-D	DNP	1:0.5	トリスHC1	
			500 mM; pH7	0.2
			75 mM; pH7	1.6
			75 mM; pH8	1.4
アビジン-D	DNP	1:0.5 1:1.0 1:1.25	75 mM; pH9	1.6
			Na 炭酸塩	
			500 mM; pH8	0.8
			500 mM; pH9	1.2
			500 mM; pH10	1.9
			75 mM; pH8	1.6
			75 mM; pH9	1.5
			75 mM; pH10	2.0
75 mM; pH10	2.4			
75 mM; pH10	2.9			

10

20

30

アビジン標識化についてD/P-比率を増加させるために実施された実験もまた表3に掲げられている。標識化溶液のpH7からpH10へのpH増加は、低い塩条件ではほとんどD/P-比率を増加させない。高い塩条件で同様の同じ実験を行った時には、顕著な増加が見られたが、最大2のD/P-比率が観察され、塩またはpHを変えてもこれ以上には上昇できなかった。標識化の間中に標識-Pt濃度を上昇すると、さらにD/P-比率が増加することが見いだされた。

【0071】

実施例4

通常ヤギ血清とマウスIgGで免疫化されたヤギの血清が、DNP-Pt(シス[Pt(I)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-DNP)CL](NO₃))で、2:1(w/w)のDNP-Ptに対する全蛋白比率で37において16時間標識化された。マウスIgGが、マイクロタイタープレート上にウエル当たりコーティング濃度0、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300および1000ng/mlの希釈シリーズで固定された。このコーティング段階の後、プレートはPBS-0.05%ツイーン20で3回連続して濯がれ、最後に125 μ l PBS/2%カゼイン/3%BSAで、37において30時間ポストコーティングされた。次に、血清がマレイン酸緩衝液(ロッシュダイアグノステックス)で0.5ng/ μ lの蛋白質濃度溶液になるように希釈された。次いで、標識化された血清の100 μ lが、固定されたマウスIgGに加えられ37で60分間反応された。マイクロタイタープレートが1xPBS-0.05%ツイーン20で洗浄され、マレイン酸緩衝液で希釈されたHRP標識化抗-DNP抗体(#NEN7

40

50

- 1 - 99) と 37 で 1 時間 インキュベートされた。非結合の抗 D N P - H R P がそれぞれ 1 m l の 1 × P B S - 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 で 3 回 洗 浄 され て 除 去 され た。次 に、p H 5 . 3 の クエン酸 - リン酸 緩衝液 に 希 釈 され た 1 0 0 μ l の T M B 基 質 が ウエル に 加 え ら れ、室 温 (2 2 ~ 2 2) で 3 0 分 間、暗 所 で 反 応 され た。反 応 を 停 止 す る た め に 1 0 0 μ l の 1 N H₂S O₄ が 加 え ら れ た。マウ ス I g G に 結 合 し た 本 発 明 の 標 識 化 され た 抗 マウ ス I g G の 尺 度 と し て、4 5 0 n m で の 吸 光 度 が 測 定 され た。結 果 は、図 3 に 示 され て い る。非 免 疫 化 ヤギ 血 清 と 対 照 的 に、免 疫 化 され た ヤギ 血 清 を 使 用 し た 試 験 は、結 合 され た 抗 N D P の シグナル を 示 し、抗 マウ ス I g G が マウ ス I g G に 選 択 的 に 結 合 し た こ と を 示 し た。こ の 実 験 は 標 識 と し て D N P の 替 わ り に ビオチン そ し て 抗 - D N P の 代 わ り に 替 わ り に 抗 - ビオチン を 使 用 し て 反 復 し て 行 わ れ た。同 様 の 結 果 が 観 察 され た。

10

【 0 0 7 2 】

実施例 5

マイクロタイタープレート (M B , 7 6 2 0 7 0、グリーナー (Griener)) が、ウサギ 抗 - ヒト I g G (ダコ (DAKO)、A 0 4 2 4)、ウサギ 抗 - ヒト I g A (ダコ (DAKO)、A 0 0 9 2)、ウサギ 抗 - ヒト I g M (ダコ (DAKO)、A 0 4 2 6)、ウサギ 抗 - ヒト I g D (ダコ (DAKO)、A 0 0 9 3) または ウサギ 抗 - ヒト I g E (ダコ (DAKO)、A 0 0 9 4) の い ず れ か で コーティング され た。各 抗 体 が 1 0 μ g / m l の 濃 度 で 1 × P B S に 溶 解 され た。マ イク ロタイタープレート が 1 0 0 μ l で、室 温 で 1 晩 コーティング され た。次 に、プレート が 洗 浄 用 緩 衝 液 (0 . 1 5 M N a C l、4 . 9 m M N a₂H P O₄ · 2 H₂O、1 . 2 m M K H₂P O₄、0 . 0 0 5 % ツイーン 8 0、0 . 0 0 5 % チメラソール (thimerasol)) で 濯 が れ そ し て、1 5 0 μ l の 1 × P B S、2 % カゼイン、3 % B S A) で ポ ス ト コーティング され た (3 7 で 3 0 分)。1 : 2 5 0 から 1 : 9 . 1 0⁵ ま で の 範 囲 の 種 々 希 釈 比 (血 清 希 釈 緩 衝 液 : 0 . 1 M トリ ス p H 7、0 . 1 5 M N a C l、1 % B S A、2 % カゼイン、0 . 0 5 % ツイーン 8 0、0 . 0 2 5 % チメラソール (thimerasol)) で 未 処 理 の 全 ヒト 血 清 (1 0 0 μ l) が、抗 - ヒト I g G と 抗 - ヒト I g A で コーティング され た プレート に 加 え ら れ、3 7 で 1 時間 インキュベート され た。ウエル が 完 全 に 濯 が れ、抗 - ヒト I g G - H R P (ダコ (DAKO) P - 2 1 4 / 保 存 溶 液 : ス タビ ル ザ イ ム セ レ ク ト (サ ー モ デ ィ ッ ク ス) (Stabilzyme Select (Surmodics)) で の 1 : 2 0 希 釈、最 後 に 血 清 希 釈 緩 衝 液 で 1 : 1 0 0 に 希 釈 され た) と 抗 - ヒト I g A - H R P (ダコ (DAKO) P - 2 1 6 / 保 存 溶 液 : ス タビ ル ザ イ ム セ レ ク ト (サ ー モ デ ィ ッ ク ス) (Stabilzyme Select (Surmodics)) で の 1 : 3 5 希 釈、最 後 に 血 清 希 釈 緩 衝 液 で 1 : 1 0 0 に 希 釈 され た) コ ン ジ ュ ゲ ー ト お よ び 標 準 操 作 に 従 う T B S 基 質 を 使 用 す る こ と に よ り、検 出 限 界 が 確 立 され た。

20

30

【 0 0 7 3 】

4 : 1 の D N P - P t に 対 す る 全 蛋 白 比 率 で D N P - P t (シ ス [P t (I I) (e n) (N H₂ - (C H₂)₆ - N H - D N P) C L] (N O₃)) を 加 え、混 合 物 を 1 晩 反 応 さ せ る こ と に よ り 同 一 の 未 処 理 の 全 ヒト 血 清 が 標 識 化 され た。次 に、検 体 が 希 釈 され、プレート に 加 え ら れ (1 0 0 μ l / ウエル)、上 記 と 同 様 に インキュベート され た。検 出 限 界 が、抗 - D N P - H R P コ ン ジ ュ ゲ ー ト (# N E N 7 - 1 - 9 9、血 清 希 釈 緩 衝 液 で 1 : 1 0 0 0 希 釈 ; 1 0 0 μ l / ウエル、3 7 で 1 時間) と T B S 基 質 (室 温 で 3 0 分 間) を 使 用 す る こ と に よ り 決 定 され た。結 果 は 以 下 の と お り で あ る。

40

【 0 0 7 4 】

物質	古典的なサンドイッチ エライザ (ELISA)	DNP-Pt 構成
IgG	1 : 3. 10 ⁵	1 : 2. 10 ⁵
IgA	1 : 8. 10 ⁴	1 : 4. 10 ⁴
IgM	n. a.	1 : 2. 10 ⁴
IgD	n. a.	1 : 2. 10 ³
IgE	n. a.	1 : 2. 10 ³

10

全てのサブクラスはその抗体結合能力を維持していることが示された。

【0075】

実施例 6

硫酸アンモニウムの効果が評価された。最初に蛋白質が飽和 (NH₄)₂SO₄ 溶液の 50、100、200 または 400 μl のいずれかで沈殿させられた (30 分間氷上 - 30 分間室温 - 遠心分離)。上澄み液は沈殿物から分離された。沈殿物は、0.5 mg/ml の濃度になるように 0.5 × PBS に溶解された (透析なしに)。蛋白質濃度は、BCA 試薬 (ピース (Pierce)、上記参照) で測定された。次に、最溶解された沈殿物は、4 : 1 比率 (w/w) で DNP-Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₆ - NH - DNP) CL] (NO₃)] で 50 において 4 時間標識化された。結果は、図 4 に示されている。

20

【0076】

また、新しい試験管に移された上澄み液が DNT-PT で標識化された。0.5 mg の蛋白質 (上澄み液中) に、DNP-Pt (シス [Pt (II) (en) (NH₂ - (CH₂)₆ - NH - DNP) CL] (NO₃)) の 0.125 が加えられた。混合物は 50 で 4 時間反応させられた。結果は図 5 に示されている。

【0077】

結果は、本発明の方法は、硫酸アンモニウムで沈殿された物質または硫酸アンモニウム溶液に溶解されている物質のいずれをも、過剰の硫酸アンモニウムを全く除去する必要なしに標識化するのに使用できることを明示している。後者は、たとえば NHS-エステルのような標準の標識化部分では、不可能である。

30

【0078】

実施例 7

この実施例で、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を使用して特異的標識化が実証される。選択された生物有機分子は、マイクロパーオキシダーゼである。マイクロパーオキシダーゼ mp-11 (シグマ M6765) は、2つの N 反応性部位 (リジンとヒスチジン) と 2つの S-反応性部位 (システイン) を有する 11 アミノ酸から構成されている。mp-11 の全長の配列は、バリン - グルタミン - リジン (N) - システイン (S) - アラニン - グルタミン - システイン (S) - ヒスチジン (N) - スレオニン - バリン - グルタミン、である。mp-11 が 0.5 × PBS (pH 7.2) に 1 mg/ml の濃度で溶解された。この溶液の 1 部分 (0.25 mg) が Flu-ULS で、1 : 0.25 の比率で 0.5 × PBS (最終容量 4999.5 μl) 中、50 で 4 時間標識化された。フルオロレセイン標識 mp-11 溶液は pD-10 カラム (APB nr.17-0851-01) で精製された。溶液の精製に先立ち、カラムは 5 ml の 0.5 × PBS で 3 回濯がれた。フルオロレセイン標識 mp-11 溶液は、ウルトロスペック (Ultrospec) 4000 分光光度計 (APB) で分析された。続いて、フルオロレセイン標識 mp-11 は ローダミン - ULS (比率 1 : 0.25) で標識化された。標識化は、4 で 1 晩、実施された。次いで、溶液は上記のように精製され、分析された。

40

【0079】

結果は、図 6 に示されている。データは、mp-11 はフルオロレセイン (A470 F 50

AM50)とローダミン(A510 FAM50 Ro4)とで標識化されていることを示す。高いローダミンの特異的発光は、二重標識化されたmp-11が470nm(これはフルオロレセインの励起波長である)で照射されたときに、明瞭である。励起の後に、フルオロレセインは十分なエネルギーを近くのローダミンに移動し、510nmにおけるローダミンの直接的励起なしに、570nmにおけるローダミンの蛍光を導く。これがFRETである。

【0080】

実施例8

pH4または4でシスまたはトランスローダミン-Ptでウシ血清アルブミン(BSA)が標識化された。BSAが1xPBS(リン酸塩緩衝化食塩水、pH=7.4)中に3%の量で溶解された。この溶液の少量(3.3μl)が以下の計画に従って標識化された:(a)0.0075M NaAc/クエン酸緩衝液pH4(最終容量1ml)中の1mg/ml保存溶液の25μlローダミン シス-Pt(シス[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-ローダミン)Cl](NO₃))を加える;(b)0.0075M NaAc/クエン酸緩衝液pH4(最終容量1ml)中の2mg/ml保存溶液の12.5μlローダミン トランス-Pt(トランス[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-ローダミン)Cl](NO₃))を加える;(c)0.5xPBS pH7中である以外は(a)に同じ;(d)0.5xPBS pH7中である以外は(b)に同じ。すべての場合において、標識に対する蛋白質比率は1:0.25である。標識化は、50で4時間実施された。その後、標識化されたBSAはカラムで精製された。検体の目視での評価によると、(b)および(d)には明瞭な着色された溶液を認めなかったが、(a)および(c)では着色されていた(cがaよりも強い)。

【0081】

実施例9

ソフト遷移金属の効果が、特異的標識化条件をさらに制御するために評価された。10mM リン酸ナトリウムpH8と20mM NaCl中にDNP-Pt(最終濃度、0.2mM)またはRh-Pt(最終濃度、0.2mM)のいずれかを含んでいる溶液に、N-アセチルメチオニン(最終濃度、2mM)またはN-アセチルヒスチジン(最終濃度、2mM)の10倍過剰量を加えられた。標識-白金化合物とS-反応性部位およびN-反応性部位を含むアミノ酸との反応速度に及ぼすソフト遷移金属の存在の影響を研究するために、各溶液にCdCl₂またはK₂PdCl₄の0、1、2、または5当量を加えられた。反応は37で実施された。遷移金属を添加したときにpHが低下したことは注目すべきである。このことはこの実験で使用された全ての遷移金属について観察された。pHの低下は、パラジウムについて最も顕著であり、カドミウムについて最も少なかった。標識-Ptの消失が尺度として選択され、ソフト遷移金属(すなわち、Pd, Cd等)の添加がない検体が対照となった。そのような添加ソフト遷移金属を含有する検体中の測定された相対的变化は、NまたはS-反応性部位を有するアミノ酸の標識化特性に及ぼすそのような化合物の存在と濃度の効果に関する尺度である。結果は表4に示されている。結果は、メチオニンの標識化が極めて速いことを示している。この発見は、上に示されたデータと一致する。相当量のカドミウムの添加は、かすかに反応速度を低下させるだけである。しかしながらパラジウムの添加は、濃度依存的に顕著に反応を阻害する。ヒスチジンの標識化はきわめて遅く、カドミウムが添加されたときに減少する。ヒスチジンに対して5倍の過剰量のカドミウムは、最初の場所で標識化が起こることを妨害した。パラジウムは低濃度で存在するときにはヒスチジンとの反応を加速するように見え、高濃度では反応は低下する。しかしながらこの反応速度の変化は、ソフト遷移金属の存在、またはその混合物によるのではなく、部分的にはpHの変化にもよるだろう。パラジウムはまた、S-反応性部位(たとえばメチオニン)およびN-反応性部位(たとえばヒスチジン)を含有する両方のアミノ酸の標識化に効果があるが、メチオニンに対する効果が大きい。このことは硫黄の標識化を選択的に減少させるための優れた機会を提供する。

【0082】

実施例 10

牛血清アルブミン (BSA、シグマ; A-9647) が 20 mM リン酸塩緩衝液 pH 8 または 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4 中に、濃度 5 mg/ml で溶解された。この溶液の 1 部分に、Flu-Pt、Rho-Pt、Flu-NHS (モレキュラープローブズ (Molecular Probes)、C-6164、10 mg/ml の濃度で DMSO 中に溶解されている) または Rho-NHS (モレキュラープローブズ (Molecular Probes)、C-6123、5 mg/ml の濃度で DMSO 中に溶解されている) が 10 倍の過剰量で添加された。標識化反応は、37 °C で 1 晩実施された。全ての検体がカラム精製 (PD10) で精製され、分光光度計で標準の手順に従って分析された。NHS 標識に関する標識化は低 pH でほとんど起こらないという結果であったが、Flu-Pt 標識は顕著に高い F/P 比率を示した。ベースライン Flu-NHS 値は、標識 (陰性荷電) の蛋白質 (陽性荷電) への非特異的結合に主として起因していることに注意すべきである。標識両者は、低 pH での Flu-Pt 値と相応して、中性 pH で匹敵する F/P 比率を生成した。低 pH で Rho-NHS 値に比べて Rho-Pt 値が低かったことを除いて、ローダミンについて同様の結果が得られた。この場合、低 pH 実験に対応するデータは、実際のベースライン値であり標識化されないかまたはほとんど標識化されないことを示している。この発見は、蛋白質の荷電の観点で標識化合物の総合的な実質的荷電の結果として少なくとも部分的に説明できるかもしれない。この例は、種々の標識化技術の成功的な使用と本発明の範囲に寄与する強い静電的相互作用を実証している。

10

【0083】

20

実施例 11

上皮細胞成長因子 (EGF、シグマ; E9644) が濃度 1 mg/ml で 50 mM リン酸塩緩衝液 pH 8 に溶解された。EGF 溶液の 1 部分に、10 倍過剰量の Flu-NHS (モレキュラープローブズ (Molecular Probes)、C-6164、10 mg/ml の濃度で DMSO 中に溶解されている) または Flu-Pt (クレアテック (KREATECH)、ULK004) が添加された。標識化反応は、1 晩、30 °C と 37 °C でそれぞれ Flu-NHS と Flu-Pt 標識について実施された。次いで、検体はカラム精製 (PD10) で精製され、分光光度計で標準の手順に従って分析された。結果は、Flu-NHS と Flu-Pt 標識についてそれぞれ 0.07 と 0.28 の F/P 比率を示した。EGF はリジンを含含有していない、したがって、NHS 標識化のための好ましい標的ではない。NHS 複合体にとっては末端のアミノ基がただ潜在的な標識化部位として働くだけである。同様の反応条件で顕著に高い F/P 比率が Flu-Pt 複合体について達成された。

30

【0084】

【表 4】

ソフト遷移金属を含む標識化反応からの t₁/2 値

	DNP-Pt	Rho-Pt
メチオニン		
ソフト遷移金属不存在	15 分	15 分
CdCl ₂ 1 当量	60 分 (pH 7)	60 分 (pH 7)
2	60 分 (pH 6)	60 分 (pH 6)
5	60 分 (pH 4.5)	60 分 (pH 4.5)
K ₂ PdCl ₄ 1 当量	≈ 100 時間 (pH 7)	
2	∞ (pH 5)	
5	∞ (pH 3)	
ヒスチジン		
ソフト遷移金属不存在	3 時間	3 時間
CdCl ₂ 1 当量	15 時間 (pH 7)	15 時間 (pH 7)
2	50 時間 (pH 6)	25 時間 (pH 6)
5	∞ (pH 4.5)	∞ (pH 4.5)
K ₂ PdCl ₄ 1 当量	2 時間 (pH 7)	
2	∞ (pH 6)	
5	∞ (pH 3)	

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】室温でのPtとN-Ac-メチオニン間の付加体生成を示す図である。

【図2】室温でのPtとヒスチジン間の付加体生成を示す図である。

【図3】マウスIgGに結合した本発明の標識化された抗マウスIgGの吸光度を測定した結果を示す図である。

【図4】硫酸アンモニウムで沈殿されたIgG血清蛋白質を標識化した結果を示す図である。

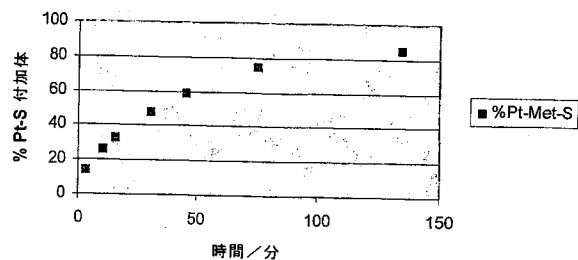
【図5】硫酸アンモニウムで沈殿されたIgG血清蛋白質を標識化した結果を示す図である。

【図6】マイクロパーオキシダーゼmp-11を標識した結果を示す図である。

40

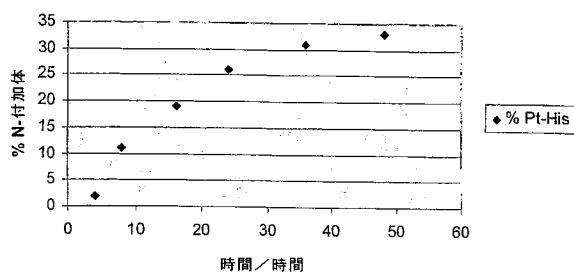
【 図 1 】

Fig. 1: 室温での Pt と N-Ac-Met 間の付加体生成



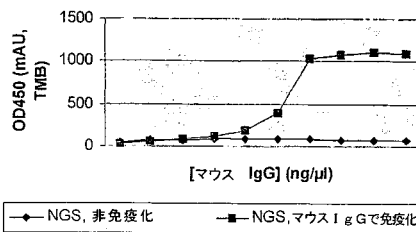
【 図 2 】

Fig. 2: 室温での Pt と ヒスチジン 間の付加体生成



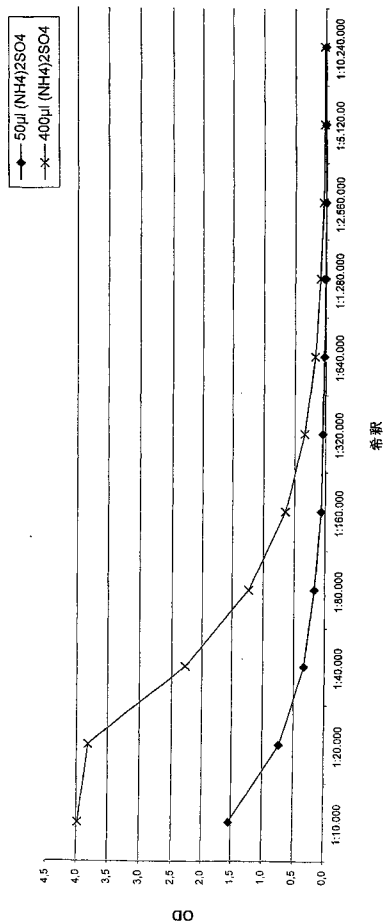
【 図 3 】

Fig. 3: 非免疫化ヤギ血清とマウス IgG で免疫化されたヤギ血清の標識化コートされたマウス IgG/DNP-ULS 標識化全血清 / 抗 DNP-HRP 検出



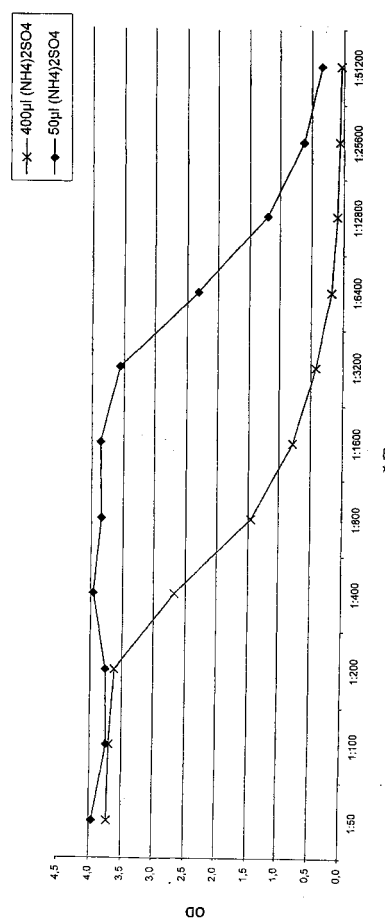
【 図 4 】

Fig. 4: 硫酸アンモニウム沈殿後の IgG 血清蛋白質の標識化と検出 : ペレット



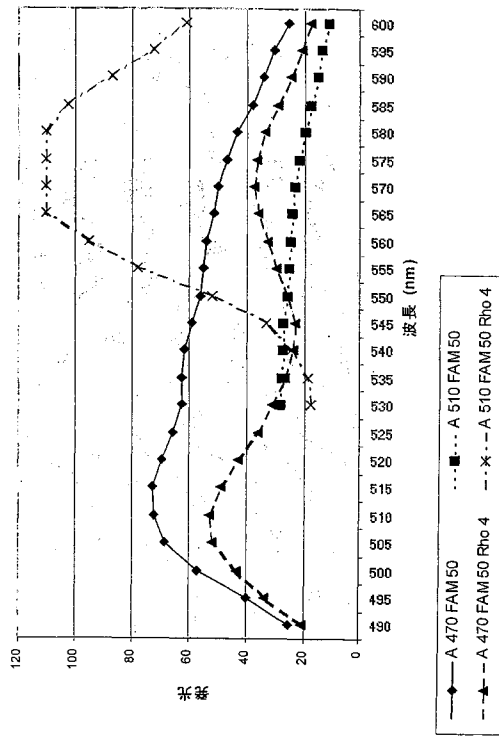
【 図 5 】

Fig. 5: 硫酸アンモニウム沈殿後の IgG 血清蛋白質の標識化と検出 : 上澄み液



【 図 6 】

Fig. 6: mp-11 二重標識



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097439 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/58
- (21) International Application Number: PCT/NL02/00334
- (22) International Filing Date: 24 May 2002 (24.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01202007.9 28 May 2001 (28.05.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): KREATECH BIOTECHNOLOGY B.V. [NL/NL]; Keienbergweg 3, NL-1101 EZ Amsterdam (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TALMAN, Eduard, Gerhard [NL/NL]; Havikskruiddzoom 16, NL-2353 RV Leidschendam (NL); VAN GILSWIJK, Robertus, Petrus, Maria [NL/NL]; Klapperman 12, NL-2401 GJ Alphen aan den Rijn (NL); HEETEBRIJ, Robert, Jochem [NL/NL]; Stieljesstraat 61, NL-2312 SJ Leiden (NL); VEUSKENS, Jacky, Theo, Maria [BE/NL]; Elf Novemberlaan 16, NL-3500 Hasselt (BE).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(74) Agent: PRINS, A. W.; Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).

WO 02/097439 A2

(54) Title: A DIFFERENTIAL LABELLING METHOD

(57) Abstract: The invention relates to a method for differentially labelling one or more entities, together comprising distinct reactive sites. The invention further relates to an entity that has been labelled by a method according to the invention and to a diagnostic kit comprising a labelled entity and to a diagnostic kit to employ a method according to the invention.

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

Title: A differential labelling method

The invention relates to a method for differentially labelling one or more entities, together comprising distinct reactive sites, to an entity that has been
5 labelled by a method according to the invention and to a diagnostic kit for employing a method according to the invention.

An entity may be labelled with a detectable marker to detect, visualise, quantify or monitor the entity *e.g.* in chemical, biological or medical research or diagnosis. A wide variety of labelling methods are known from the art (for a
10 review see Hermanson, 1996, Bioconjugate techniques, Academic Press, ISBN 0-12-342835-X).

Many factors may play a role in choosing a particular detectable marker and a particular method of labelling. Such factors include the nature of the entity, reaction conditions, detection limits of the labelled entity, sensitivity
15 during the labelling reaction and specificity towards the entity.

Methods using platinum compounds to label bio-organic molecules have been considered interesting for a very long time. Various types of detectable marker moieties can be adhered to ionic platinum. Platinum compounds may react with a variety of reactive moieties on an entity.

20 The use of a *cis*-platinum compound has been described in European patent application no. 95201197.1. Herein a method is disclosed for linking bio-organic molecules and markers through *cis*-platinum compounds, of which two co-ordination sites are occupied by two ends of a stabilising bridge, such as an ethylene diamine group. These known *cis*-platinum compounds are suitable
25 for linking labels to several kinds of bio-organic molecules, such as peptides, polypeptides, proteins, and nucleic acids. Methods using *trans*-platinum compounds have also been reported (EP application 97201066.4) to be suitable to label a variety of bio-organic molecules.

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

2

The reactivity of platinum compounds towards a variety of reactive sites is a benefit in many applications, since it may allow fast labelling reactions and an excellent sensitivity towards a wide variety of entities.

It may however be desired to direct the label to a specific reactive site of an entity, *e.g.* to improve the selectivity of the labelling. Also, pre-selected sites may be labelled in complex samples such as those samples comprising various types of bio-organic compounds. Differential or selective labelling often circumvents the need of sample purification and may be directed in such a way that targeted entities do not lose their native characteristics, *e.g.* 3D structure, activity, avidity, *etc.*

Furthermore it may be advantageous to label an entity at a controlled number of reactive sites. This may improve accuracy of the quantification and facilitate identification of a labelled entity. Such an improvement would be very valuable for various applications such as in the organochemical, biological or medical fields.

Moreover it is often a challenge in labelling chemistry to find a labelling method that does not affect the structure or the activity of an entity, *e.g.* of an enzyme, an immunoglobulin or a DNA-probe, to a high extent.

It is an objective of the present invention to provide a method to differentially label one or more entities together comprising distinct reactive sites, at a targeted reactive site.

Surprisingly it has been found that according to the invention one or more entities can be labelled through a platinum-linker. In a preferred embodiment said linker is a platinum-linker, and said entities together comprise one or more sulphur containing reactive sites and/or one or more nitrogen containing reactive sites, wherein a complex of a platinum compound and a marker is formed, and wherein said platinum compound is reacted with said one or more entities. In a preferred embodiment of the invention

substantially only sulphur containing reactive sites or substantially only nitrogen containing reactive sites are linked to said platinum compound.

Entity as used herein is to be interpreted as something that comprises one or more sulphur containing reactive sites and/or one or more nitrogen
5 containing reactive sites. In particular an entity relates to an inorganic or organic compound, including a bio-organic compound. A bio-organic compound as used herein refers to a biological carbon containing compound. Also, a bio-organic compound refers to a compound capable of inducing or affecting an action in a biological system, e.g. by inducing or affecting a therapeutic or
10 prophylactic effect, an immune response, a metabolic process etc. "Entity" further relates to a micro-organism, a virus or a prion, or to a material comprising one or more of said sulphur reactive or nitrogen reactive types of reactive sites, or a product made thereof, such as a micro-array, a microtitre plate, a test strip or a test tube. Distinct reactive sites -which are to be labelled
15 differentially - may be present together in one entity or in a combination (a mixture, a solution, a dispersion etc.) of more entities having only one or some of the to be labelled reactive sites, but together comprising said distinct reactive sites. Such a combination is for example a combination of an entity with only a nitrogen containing reactive site and an entity with only a sulphur
20 containing reactive site.

In principle, any type of nitrogen containing reactive site or sulphur containing reactive site may be labelled using a method according to the invention. Preferred reactive sites include reactive sites comprising a primary
amine, a secondary amine, a tertiary amine, an aromatic amine, a thiol, a
25 thioether, a sulfide, a disulfide, a thioamide, a thion, an amide, an imide, an imine, an iminoether, or an azide. Examples of entities that can be labelled are entities chosen from the group of amino acids (preferably methionine, cysteine, histidine, lysine, and tryptophan), peptides, oligopeptides, polypeptides, proteins, immunoglobulins, enzymes, synzymes, phospholipides, glycoproteins,

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

4

nucleic acids, nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, polynucleotides, peptide nucleic acids, peptide nucleic acid oligomers, peptide nucleic acid polymers, amines, aminoglycosides, nucleopeptides, and glycopeptides.

5 Preferably in accordance with the invention, the entity is chosen from the group of amino acids, peptides, oligopeptides and polypeptides.

An entity linked to a platinum compound may be referred to as a Pt-S adduct (when attached to a sulphur containing reactive site), to a Pt-N adduct (when attached to a nitrogen containing reactive site), or in general to a Pt-adduct.

10 A sulphur containing reactive site may hereafter be referred to as a S-reactive site, and a nitrogen containing reactive site may hereafter be referred to as N-reactive site.

With a platinum linker, a platinum moiety is meant that can be used to couple a marker to an entity. A preferred linker compound as used in this
15 invention is a platinum compound to which ligands are bound.

It has been found that a method according to the invention is highly suitable to direct the labelling of an entity towards a specified reactive site within an entity or a group of entities that together comprise a variety of reactive sites. Furthermore a method according to the invention has been
20 found to have an excellent sensitivity towards the targeted (reactive site of the) entity, even in complex matrices. The prowess of a method according to the invention to distinguish to which reactive site a marker is labelled is *inter alia* extremely beneficial for analytical purposes. Not only may the excellent selectivity contribute to the accuracy and the dynamic range of quantification,
25 but it also may improve the homogeneity of the labelled entity. The improved homogeneity generally has a beneficial effect upon band broadening during separation of a sample for analysis or for purification, *e.g.* by a chromatographic or electrophoretic method.

Furthermore it has been found possible to selectively label an entity without significantly affecting the structure or activity of a labelled entity, even if such an entity contains a fragile or labile part. This is a highly advantageous feature of the invention since it facilitates the detection or
5 monitoring of a labelled entity while the entity retains activity - preferably substantially all of its activity - *in vivo* or *in vitro*. To the benefit of retaining activity, it has been found possible to direct labelling of an entity, like an immunoglobulin, an enzyme, a hormone, a nucleic acid in such a way that essentially no marker is labelled at one or more N- or S-reactive sites at a
10 functional part of said entity.

Furthermore it was found that the present invention can be used to label an entity in such a way that the configuration of the entity largely remains unaffected after the entity has been labelled. This embodiment of the invention is for example particularly suitable for labelling an antibody-antigen
15 complex or a double stranded oligo- or polynucleotide without disturbing the complex. This aspect of the invention may also be very useful for visualisation of the entity and/or certain chemical or biochemical processes *in vivo* or *in vitro*.

Examples of preferred platinum compounds are *cis*- or *trans*-platinum
20 compounds of the formula $[\text{Pt}(\text{II})(\text{X1})(\text{X2})(\text{A})(\text{D})]$ or a *cis*-platinum compound of the formula $[\text{Pt}(\text{II})(\text{X3})(\text{A})(\text{D})]$.

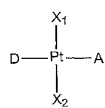
Herein, Pt represents platinum (Pt), A and D represent the same or different reactive moieties, respectively involved in the complexation of the platinum compound to a marker and the linking of the platinum compound to
25 the entity. The entities, X1 and X2 represent the same or different inert moieties, and X3 represents an inert moiety that may act as a stabilising bridge, *e.g.* a bidentate ligand.

A structural representation of some examples of such platinum compounds is shown below:

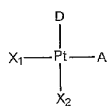
WO 02/097439

PCT/NL02/00334

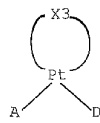
6



formula 1a



formula 1b



formula 1c

5 A platinum(II) compound, for use in a method of the invention can be prepared via any method known in the art. References can for example be found in Reedijk *et al.* (Structure and Bonding, 67, pp. 53-89, 1987). The preparation of some *trans*- platinum compounds is disclosed in EP-A 97201066.4. Further preparation methods can be found in EP-A 96202792.6 and EP-A 95201197.1. Methods described in any of these publications are
10 incorporated herein by reference. In a preferred embodiment of the invention platinum compounds are prepared according to the spacer - *tert* butoxycarbonyl / NHS - label pathway.

The reactive moieties (A, D) of a platinum compound are preferably good leaving ligands. A platinum compound, wherein A and/or D are independently
15 chosen from the group of Cl⁻, NO₃⁻, HCO₃⁻, CO₃²⁻, SO₃²⁻, ZSO₃⁻; I⁻, Br⁻, F⁻, acetate, carboxylate, phosphate, ethylnitrate, oxalate, citrate, a phosphonate, ZO⁻, and water has been found to be particularly suitable for use in a method according to the invention. Z is defined herein as a hydrogen moiety or an alkyl or aryl group having from 1 to 10 carbon atoms. Of these ligands, Cl⁻ and
20 NO₃⁻ are most preferred.

Any type of inert moiety may be chosen. Inert as used herein indicates that the moiety remains attached to the platinum compound during the labelling process and thereafter without chemically reacting with an entity. A platinum compound comprising one or two inert moieties chosen from the
25 group of NH₃, NH₂R, NHRR', NRRR'' groups, wherein R, R' and R'' preferably represent an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms have been found to

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

7

be particularly suitable for use in a method of the present invention. H_2NCH_3 is a particularly preferred inert moiety for use in a method according to the invention. An alkyl diamine, wherein the alkyl group has 2 to 6 carbon atoms is a preferred bidentate inert moiety in a *cis*-platinum compound (e.g. X3 in formula 1c). In a particularly preferred embodiment X3 represents ethylene diamine.

Preferred platinum compounds for use in a method according to the invention include $cis[Pt(en)Cl_2]$, $cis[Pt(en)Cl(NO_3)]$, $cis[Pt(en)(NO_2)_2]$, $trans[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, $trans[Pt(NH_3)_2Cl(NO_2)]$, and $trans[Pt(NH_3)_2(NO_2)_2]$.

The term labelling is used herein to refer to connecting a marker with an entity, possibly via a platinum linker. A marker as used herein may be any moiety that can be attached to the platinum compound or the entity, and that can be used to detect, monitor or visualise the entity. A marker may be reacted with the platinum compound at any time. Hence, in accordance with the invention it is possible that a platinum linker is first reacted with a marker to obtain a linker-marker complex, which is then reacted with the entity, or that the order is reversed. In a preferred embodiment, the platinum linker is first reacted with the marker.

Any type of marker may be used as long as it can be attached to the platinum compound. Such a marker may be a radioactive marker, an enzyme, a specific binding pair component such as avidin, streptavidin or biotin, biocytin, iminobiotin, a colloidal dye substance, a phosphorescent marker (e.g. an Europium chelate, a platinum porphyrine), a chemiluminescent marker (e.g. luminol), a fluorochrome, including a cyanine, a Alexa dye (Molecular Probes), or Bodipy-colourant (Molecular Probes), a rhodamine, dinitrophenol (DNP), carboxyrhodamine, *tert*-butoxycarbonyl, a reducing substance (eosin, erythrosin, etc.), a (coloured) latex sol, digoxigenin, a metal (ruthenium), a metal sol or another particulate sol (selenium, carbon and the like), dansyl

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

8

lysin, a UV dye, a VIS dye, Infra Red Dye, coumarine (e.g. amino methyl coumarine), an antibody, protein A, protein G, etc.

Particular preferred are DNP, fluorescein, cyanine-colorants and tetramethylrhodamine, *inter alia* because they can form stable complexes with platinum linked to an entity and they may give rise to excellent limits of
5 detection. These markers can very suitably be used for a technique referred to as multi-colour labelling. Thus several colorants of this kind, optionally having similar chemical structures while having different colours, may be used. Other preferred markers include biotin, avidin, streptavidin and digoxigenin.

10 In an embodiment of the invention the marker and/or a reactive site of the entity may be connected to platinum through a spacer. Preferably such a spacer comprises a chain having at least four atoms, and preferably not more than 20 atoms, which chain comprises an electron donating moiety on one end and a moiety for reacting with a marker or an entity on the other end, wherein
15 the chain is attached to platinum through the electron donating moiety. Of course, the spacer(s), the marker, the entity and the platinum linker may be attached to each other in any order. For instance, the spacer(s) may first be attached to the linker followed by reacting the obtained compound with a marker and the entity. It is also possible first to attach the spacer(s) to the
20 marker before the reaction with the linker. The electron donating moiety of the spacer may for example be an amine group or a thiolate anion. Preferably the chain further comprises at least one hetero-atom. Highly preferred spacers are 1,6-diaminohexane and 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane. In a preferred
embodiment of the invention use is made of 1,6-diaminohexane *tert*-
25 butoxycarbonyl, as an intermediate linker-spacer complex, prior to attaching to a marker and/or entity. It goes without saying that the labelling complex may contain more than one platinum, e.g. two platinum atoms, such as for example described in European Patent Application 97201066.4.

One of the reaction parameters that have been found particularly useful to choose such that an entity is differentially labelled in a method according to the invention, is the pH value. The pH as used herein should be interpreted as the pH value of a composition or product according to the invention in water at
5 20 °C. In case an embodiment of the invention is employed in an environment leading to an altered solvent autoprotolytic constant (pK_w), (e.g. presence of organic solvents, altered temperature) a pH mentioned herein should be interpreted based upon the pH range at 20 °C in water.

In general, the formation of Pt-S adducts is pH independent whereas
10 formation of Pt-N adducts is pH dependent. In a preferred embodiment one or more S-reactive sites are selectively labelled over one or more nitrogen containing sites by making use of the pH.

As a guideline, in a preferred embodiment, one may choose the pH of the invention at a pH below the lowest pK_a of any of an entity's N-reactive sites
15 that should not be labelled, allowing differential labelling of one or more S-reactive sites. As the skilled professional will understand, besides pK_a , other factors may play a role, including the influence of the micro-environment in the vicinity of an entity that is to be labelled.

In a preferred embodiment the S-reactive site or sites are selectively
20 labelled at a neutral or acidic pH. In a more preferred embodiment the S-reactive site or sites are differentially labelled over N-reactive sites at a pH of 5 or less.

It has also been found possible to label histidine residues distinctively
over other N-reactive sites at a pH between about 6 and 8. A residue of a
25 compound as used herein should be interpreted as the compound itself or as part of a larger entity, e.g. an amino acid residue in a protein.

An overview on the formation of Pt-S and Pt-N adducts at various pH values is given in Table 1.

Table 1: pH dependent formation of Pt-S and Pt-N adducts in proteins

	pH>10	pH=7	pH<5
S donor(s)	all	all	all
N donor(s)	all	Histidine only	none

In theory, the formation of a Pt-S adducts is an one step process. A reactive group leaves the platinum compound upon S donating an electron pair to platinum. This process, the direct conversion Pt-X into Pt-S, is believed to be pH independent. On the other hand, N donors require replacement of a reactive group of the platinum compound by oxygen prior to N substitution. First, Pt-X becomes Pt-O and eventual Pt-N. This is a two step scheme in which the first step can be controlled by changing pH. Factors influencing pH of a solution might interfere with Pt-N adduct formation.

The presence of ions may also be used to control the selectivity of the platinum compound for N-reactive sites. In an embodiment one or more leaving ligands, preferably anionic moieties, are used in the inhibition of labelling a platinum compound to a N-reactive site, in order to enhance differentiated labelling of a S-reactive site. Examples of such leaving ligands include Cl⁻, NO₃⁻, HCO₃⁻, CO₃²⁻, ZSO₃⁻, SO₃⁻, I⁻, Br⁻, F⁻, acetate, carboxylate, phosphate, ethylnitrate, oxalate, citrate, a phosphonate, ZO⁻, and water. Z is defined herein as a hydrogen moiety or an alkyl or aryl group having from 1 to 10 carbon atoms. Particularly good results have been achieved by using salts comprising an anionic moiety, of which chloride is particularly preferred. The counter ions are preferably alkali cations, alkali earth cations or cations also used to direct the labelling. In a preferred embodiment the total ionic strength of said anionic moieties used in the inhibition of labelling to a N-reactive site is at least 0.1 mol/l. More preferably the total ionic strength is in the range of 0.1 to 0.5 mol/l.

The presence of metal ions, such as transition metal ions, may also be used for selection of the reactive site to be labelled. In particular such ions have been found suitable to prevent or slow down labelling of an S-reactive site or to make a labelled Pt-S adduct labile, so that effectively one or more N-
5 reactive sites are differentially labelled over said S-reactive site. Within a method according to the invention it is also possible to direct the labelling by making use of geometrical isomers of a platinum compound - *e.g.* a *cis*-platinum compound and a *trans*-platinum compound, - such that the platinum compound is specifically labelled to either a sulphur containing reactive site or
10 to a nitrogen containing reactive site

The presence of a bulky inert moiety at the platinum compound may for example be used to prevent labelling at a reactive site of an entity, wherein said reactive site is partially shielded from a platinum compound with a particular stereochemical structure by the structure of the entity. This may for
15 example be the case if the entity has a complex 3D structure, *e.g.* a protein, a conglomerate of molecules, *etc.*

It is also possible to differentially label an entity according to the invention by first shielding one or more reactive sites that should not be labelled with a shielding moiety and thereafter react a targeted reactive site of
20 the entity with the platinum compound to which also a marker is attached.

Shielding as used herein is to be interpreted as deactivation of the affinity of a reactive site for a marker, by reaction of the reactive site with a moiety that prevents attachment of a marker directly to said reactive site or complexation of a marker with platinum linked with the reactive site.

25 Preferably the shielding moiety is present in excess over the number of reactive sites that are to be shielded. The preferred reaction time for the shielding process will depend upon the application, and it will be clear to the skilled professional how to choose the reaction conditions.

In another preferred embodiment the shielding moiety is selectively removed from the shielded reactive site, after the platinum compound has been reacted such that said platinum compound is differentially linked to said entity.

5 In a preferred embodiment one or more S-reactive sites may be shielded, e.g. by a *trans*-platinum compound under conditions as described above, prior to selectively labelling one or more N-reactive sites of one or more entities. Particularly good results have been achieved with Rhodamine *trans*-Pt
10 (trans[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)Cl](NO₃)) as the shielding moiety. To improve shielding even further the reaction was performed at a pH chosen between 2 and 5, after which the pH was increased to an alkaline pH for labelling N-reactive sites. Other preferred shielding compounds are cadmium, mercury, or zinc complexes.

15 The addition of transition metal ions, such as Cu(II), Zn(II) or a mixture thereof has been found to be particularly suitable to selectively remove a *trans*-platinum compound from an S-reactive site, whilst a labelled N-reactive site of a Pt-adduct substantially remains stable.

20 The type of solvent may also be used to differentiate the labelling. In particular the reactivity towards N-reactive sites can vary depending upon the solvent. In particular solvents that may act as a ligand to the platinum compound may decrease the reactivity towards N-reactive sites, and thus such a solvent may favour the labelling of S-reactive sites.

In addition to the parameters as mentioned above a method according to the invention may further be fine tuned by parameters such as temperature,
25 preferably varied in the range between 0 °C and 120 °C, more preferably in the range between 20 °C and 70 °C; reaction time, commonly in the range between 1 min and 48 hours, preferably in the range between 10 min and 24 hours, more preferably in the range between 25 min and 15 hours; concentration of the reagents, molar ratio of the reagents, overall net charge of the platinum

labelling complex, and the like. These parameters may be adjusted depending upon the particular application in any way known in the art. The overall net charge of the platinum labelling complex, for example, affects the specificity of Pt-N adduct formation in histidine at neutral pH. Neutral Pt-complexes, such as fluorescein- and cyanine Pt complexes, form Pt-N adducts whereas positively charged platinum labelling complexes, *e.g.* rhodamine- and dinitrophenol Pt complexes, do not. Positively charged Pt labelling complexes display differential labelling towards N adducts above the isoelectric point of the peptide, protein, and the like. Apart from allowing the selective labelling of N-reactive sites over S-reactive sites or vice versa, a method according to the present invention also makes it possible to differentiate between distinct N-reactive sites or distinct S-reactive sites, by choosing the correct conditions, such as described herein.

For example, one or more N-reactive sites of histidine residues may be labelled differentially over one or more other N-reactive sites by linking a platinum compound with a marker, and choosing the reaction conditions such that said platinum compound is differentially linked to a histidine residue of said entity. Such a method can be employed in the presence of S-reactive sites which may be shielded during the labelling of histidine - but also in the absence thereof.

Thus an entity, such as a peptide or a protein, can be selectively labelled at one or more histidine residues in a mixture of amino acids or other N-reactive site containing entities. In a preferred embodiment differentially labelling of histidine is accomplished by choosing a pH of about 7 and a Pt labelling complex, with an overall neutral charge.

The selective labelling of a particular type of S-reactive sites or a particular type of N reactive site offers a solution in several application areas. It may for example be used to screen for a particular type of reactive site in an entity of unknown composition or the presence of a particular entity in a

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

14

sample. (e.g. the presence of histidine in an amino acid mixture). Thus in a repeated differential labelling process, several entities can one after another be labelled with a different marker, which may be useful for screening of several components without requiring separation of a sample, e.g. by
5 chromatography, electrophoresis and/or mass spectrometry.

It may also add further specificity towards the labelling in order to avoid labelling at an undesired reactive site (e.g. at a functional part of an entity).

Furthermore discrimination between distinct N-reactive site or distinct
10 S reactive sites, allows the creation of an entity with a multitude of different markers.

With a method according to the invention one or more labelled entities can be prepared. The invention also relates to such entities, differentially linked with a platinum compound at a N-reactive site or a S-reactive site. The
15 invention further relates to a labelled entity wherein a marker is attached to the entity via a platinum compound linked to a specific reactive site of the entity.

In a particular embodiment according to the invention, at least one other reactive entity is differentially or non-differentially labelled, after
20 selective labelling of a first reactive site of an entity or a mixture of entities. Such subsequent labelling may take place with a different marker that is reacted with a platinum compound according to the invention, but it is also possible to use another type of labelling reaction known in the art. For example, after differentially labelling an S-reactive site a subsequent labelling
25 may take place with a label that is reactive towards amines.

In a preferred embodiment subsequent labelling also involves differential labelling. Thus it is possible to prepare an entity to which different markers are labelled at distinct reactive sites.

Thus it has been found possible to label an entity or a mixture of entities with several of different markers. Accordingly, the invention relates to entities having two or even a plurality of markers. Labelling with more than one marker can be very useful in various applications. It may for example be used to screen for particular entities in a mixture, without needing an analytical separation, *e.g.* screening for the presence of methionine and histidine in an amino acid mixture. In another embodiment it may be used to monitor a process in which a labelled entity is involved, *e.g.* a process in which an entity is split into several entities, each having a different label or *vice versa*. It goes without saying that the invention is not restricted to qualitative analyses but also includes quantitative analyses of differential labelled entities. In principle, a labelled entity may be subsequently analysed using any liquid based analyte analysis system. In a particularly suitable method according to the invention, comprising the analysis of a labelled entity, the labelled entity is analysed using a high throughput screening liquid based multiple analyte analysis system, *e.g.* a flow cytometry-system.

The present invention further relates to a diagnostic kit comprising an entity according to the invention. A diagnostic kit according to the invention preferably comprises one or more preparations selected from the group formed by entities differentially linked to a platinum compound at one or more nitrogen containing reactive sites and/or one or more sulphur containing reactive sites, platinum-linker preparations, buffers, marker preparations, transition metal ion preparations, preparations for adjusting the ionic strength and preparations comprising a shielding moiety.

Another embodiment of the invention relates to a diagnostic kit, for employing a method according to the invention. Such a kit may for example comprise reaction instructions, one or more platinum compounds for labelling the entity, one or more markers, one or more entities according to the

invention, one or more test samples, one or more other reagents, one or more test tubes or strips and the like.

The invention will now further be illustrated by the following non-limiting examples.

5

Example 1

Two amino acids (histidine and methionine, 0.1 mmol each) were dissolved in 500 μ l deuterated sodium phosphate buffer (50 mM, pD = 7.00) and incubated at room temperature with a slight excess (0.44 mmol) of [Pt(en)(NH₂-NH-Boc)Cl](NO₃)₃ (=PtN₃-Cl), wherein Boc is a marker ((en)= ethylenediamine, Boc= *tert*-butoxycarbonyl). The reaction process was monitored using high-resolution NMR (Bruker DPX-300) visualising ¹H and ¹⁹⁵Pt nuclei. The results are shown in Figures 1 and 2. The data showed almost completion of the reaction for the S-reactive sites (methionine, Figure 1) within 120 min, demonstrated by change in signal from PtN₃-Cl to Pt N₃-S-adduct whereas the reaction between the N-reactive sites and the platinum compound proceeded slow (Figure 2). After 24 hours only a quarter of the histidine molecules had been labelled.

10
15

20

Example 2

Bovine serum albumin (BSA) was dissolved in 0.5 x PBS (phosphate buffered saline, pH = 7.4) to a 1 mg/ml solution. To 1 ml sample of the BSA solution, 0.5 mg Rhodamine *cis*-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)Cl](NO₃)) was added. To another 1 ml sample of BSA solution, 0.5 mg Rhodamine *trans*-Pt (trans[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)-Cl](NO₃)) was added. Both samples were allowed to react for 16 hrs at 37 °C. Thereafter unbound fluorophores (unbound Rhodamine and unbound Rhodamine-Pt compound) were removed by gel filtration (10 ml Sephadex G50 column, 10 cm length, 1 cm diameter) using 1x PBS as an eluent. Next, the

25

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

17

ratios of bound fluorophore per protein (F/P ratio) were determined using the following formula:

$$F/P \text{ ratio} = \frac{112.4 \times A521}{95.0 \times [BSA]}$$

5 wherein A521 (absorbance at 521 nm) was determined using a Ultrospec 4000 spectrophotometer (APB), and [BSA] (protein concentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was determined with BCA reagent (BCA protein assay kit nr. 23225, Pierce)

10 Platinum compound to protein ratios (Pt/P ratio) was determined using the following formula:

$$Pt/P \text{ ratio} = \frac{68,000 \times [Pt]}{195.0 \times [BSA]}$$

15 wherein [Pt] (platinum concentration in $\mu\text{g}/\text{l}$) was determined by atomic absorption spectroscopy. Briefly, the extend of platinum-protein binding was determined by a Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer 3100 set to a slitband of 0.70 nm to monitor the Pt line at 265.9 nm. The linear range for quantification was 100-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Deuterium background correction was used throughout analysis and the sample volume was between 0.020-0.060mL. Furnace parameters were: drying 120°C/90 sec., ashing 1300°C/60 sec.,
20 flushing 20°C/15 sec. and atomization at 2650°C/5 sec. Argon gas was used to purge the furnace.

The results were as follows:

Platinum compound	F/P ratio	Pt/P ratio
<i>Cis</i>	4.1	4.0
<i>Trans</i>	0.9	3.6

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

18

BSA is rich in methionine and cysteine residues (S-reactive sites), at the above conditions reaction to N-reactive sites is slow. The Pt/P ratio shows that both the *cis* and the *trans*-Platinum compound successfully react with the protein. The F/P ratio shows however that under the conditions of this experiment only the marker (rhodamine) is released from the *trans*-platinum compound, while the *cis*-platinum compound remains bound to the protein. This illustrates that a *trans*-platinum compound may be used to shield a reactive site from attachment of a marker to the *trans*-platinum bound reactive site.

10

Example 3

Bovine serum albumin (BSA, Sigma; A-9647), Avidin-D (Vector; A-2000) and Goat IgG anti-mouse IgG (total IgG fraction; Dept. Nephrology, Leiden University Medical Centre) were used to be labelled with biotin-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₂-CO-(CH₂)₂-CO-(CH₂)₂-NH-biotin)Cl](NO₃)) (KREATECH, ULK001), DNP-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-DNP)Cl](NO₃)) (KREATECH, ULK003), Rhodamine-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)Cl](NO₃)) (KREATECH, ULK101) and dGreen-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-dGreen)Cl](NO₃)) (KREATECH, ULK301).

For each labelling of BSA and IgG, 250 µg protein in 250 µl PBS was mixed with 250 µl water containing 125 µg labelling reagent (protein to label ratio = 1:0.5). When needed the volume was adjusted to 0.5 ml with distilled water. The reaction was allowed to proceed for 16 hrs at 37°C. Unbound labelling reagents were removed by gel filtration (SephadexG25, PD10; APB) with TBS/0.05% Tween 20 as eluent. DNP-Pt labelling of avidin-D was chosen to optimise labelling of proteins with none or non-accessible cysteine and methionine amino acids. Avidin-D was labelled at different protein:label ratios and at fixed ratios in 75 mM and 500 mM Na-phosphate-, TrisHCl- or Na-carbonate buffers with pH varying from 7 to 10. Protein concentrations during

25

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

19

labelling remained 0.5 mg/ml, whereas label-Pt reagent concentrations varied between 0.25 to 0.75 mg/ml.

Fluorochrome to protein ratios (F/P ratio) as well as DNP to protein ratios (D/P ratio) were calculated by measuring the absorption at the fluorochrome absorption maximum (DNP: 363 nm, dGreen: 507 nm and rhodamine: 521 nm). A correction factor is introduced which adjusts the measurement for *cis*-platinum contributions at a particular wavelength and protein concentrations are determined using BCA reagent (Pierce; 23225). Calculating protein concentrations at 280 nm is disrupted by A280 nm contributions of the Pt reagent and can not be used. F/P-ratio formulas were then extracted using UV/VIS spectroscopy and Platinum flameless atomic absorbance spectroscopy (Pt-FAAS). Pt-FAAS was used to determine the number of protein-bound platinum compounds, which provided an accurate measurement of bound fluorochromes or DNP-molecules. The formulas used to calculate F/P and D/P-ratios are listed in Table 2.

Table 2: Formulas used to calculate fluorochrome to protein and DNP to protein ratios

20	BSA-DNP	$\frac{3.78 \times A_{363}}{[BSA]}$	IgG-DNP	$\frac{11.67 \times A_{363}}{[IgG]}$	Av-DNP	$\frac{5.5 \times A_{363}}{[Avidin]}$
	BSA-Rhod	$\frac{1.29 \times A_{521}}{[BSA]}$	IgG-Rhod	$\frac{3.63 \times A_{521}}{[IgG]}$	Av-Rhod	$\frac{1.95 \times A_{521}}{[Avidin]}$
25	BSA-dGreen	$\frac{1.66 \times A_{507}}{[BSA]}$	IgG-dGreen	$\frac{3.85 \times A_{507}}{[IgG]}$	Av-dGreen	$\frac{2.37 \times A_{507}}{[Avidin]}$

30

Table 3 shows that BSA and IgG contain more platinum bound fluorochromes compared to avidin-D. In case of Rhodamine-Pt: BSA contains 1 fluorochrome/16.6 kD, IgG has 1 fluorochrome/19.5 kD and avidin 1

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

20

fluorochrome/82.5 kD. Furthermore, DNP-Pt and Rhodamine-Pt have comparable reactivity and both are more reactive than dGreen-Pt.

Table 3: F/P- and D/P-ratios obtained from labelling experiments

5

protein	label	protein:label ratio ($\mu\text{g} : \mu\text{g}$)	labeling buffer	F/P ratio or D/P ratio
BSA	Rhodamine	1 : 0.5	0.25x PBS	4.0
			pH7.4	4.1
	DNP dGreen	1 : 0.5 1 : 0.5	0.5 x PBS	3.6
			1 x PBS	6.1
Goat IgG	DNP Rhodamine dGreen	1 : 0.5 1 : 0.5 1 : 0.5	0.5 x PBS	8.4
			0.5 x PBS	7.7
			0.5 x PBS	3.9
Avidin-D	DNP Rhodamine dGreen	1 : 0.5 1 : 0.5 1 : 0.5	0.5 x PBS	1.6
			0.5 x PBS	0.8
			0.5 x PBS	0.3
Avidin-D	DNP	1 : 0.5	TrisHCl	
			500 mM; pH7	0.2
			75 mM; pH7	1.6
			75 mM; pH8	1.4
Avidin-D	DNP	1 : 0.5 1 : 1.0 1 : 1.25	75 mM; pH9	1.6
			Na carbonate	
			500 mM; pH8	0.8
			500 mM; pH9	1.2
			500 mM; pH10	1.9
			75 mM; pH8	1.6
			75 mM; pH9	1.5
			75 mM; pH10	2.0
			75 mM; pH10	2.4
75 mM; pH10	2.9			

Experiments performed to increase D/P-ratios for avidin labelling are also listed in Table 3. It is shown that increase in pH of the labelling solution from pH 7 to pH 10 hardly increases the D/P-ratio at low salt conditions. A significant increase is found when the same experiment is performed at high salt conditions, however, a maximum D/P-ratio of 2 was found that could not

10

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

21

be raised by varying salt or pH conditions. Increase of the label-Pt concentration during labelling was found to increase D/P-ratios further.

Example 4

5 Normal goat serum and serum of a goat immunised with mouse IgG, were labelled with DNP-Pt ($\text{cis}[\text{Pt}(\text{II})(\text{en})(\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{DNP})\text{Cl}](\text{NO}_3)$) at a total protein to DNP-Pt ratio of 2:1 (w/w) for 16 hrs at 37 °C. Mouse IgG was immobilised on a micro titre plate in a dilution series of coating concentrations of 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 ng/ml per well. After this coating
10 step the plates were rinsed with PBS-0.05% Tween 20 for three successive times and finally post-coated with 125 μl PBS/2% casein/3% BSA for 30 minutes at 37 °C.

Next serum was diluted in maleic acid buffer (Roche Diagnostics) to a solution with a protein concentration of 0.5 ng/ μl . Next 100 μl of labelled
15 serum was added to the immobilised mouse IgG and was allowed to react for 60 min at 37 °C. The micro titre plate was washed with 1xPBS-0.05% Tween 20 followed by an 1 hour incubation at 37°C with an HRP labelled anti-DNP antibody (#NEN 7-1-99) diluted in maleic buffer. Unbound anti DNP-HRP was removed by 3 washes with 1xPBS-0.05% Tween 20, 1min. each. Next, 100 μl
20 TMB substrate, diluted in a citrate-phosphate buffer pH 5.3, was added to the wells and allowed to react in the dark for 30 min at room temperature (20-22°C). To stop the reaction 100 μl of 1N H_2SO_4 was added. Absorption at 450 nm was determined as a measure for the anti Mouse IgG - labelled according to the invention - bound to Mouse IgG. The results are shown in Figure 3. In
25 contrast to the non-immunised goat serum the experiment with the immunised goat serum showed a signal of bound anti DNP, indicating that anti-mouse IgG has specifically bound to mouse IgG.

This experiment was repeated with biotin as the marker instead of DNP and anti-biotin instead of anti-DNP. Similar results were observed.

Example 5

Micro titre plates (MB, 762070, Griener) were coated with either Rabbit anti-humane IgG (DAKO, A0424), Rabbit anti-humane IgA (DAKO, A0092), Rabbit anti-humane IgM (DAKO, A0426), Rabbit anti-humane IgD (DAKO, A0093), or Rabbit anti-humane IgE (DAKO, A0094). Each antibody was dissolved in 1xPBS at a concentration of 10 µg/ml. The micro titre plates were coated with 100 µl overnight at room temperature. Next, the plates were rinsed with rinsing buffer (0.15 M NaCl, 4.9 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1.2 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween 80, 0.005% thimerasol) and post coated with 150 µl 1xPBS, 2% casein, 3% BSA (30 min at 37 °C). Untreated whole human serum, at various dilution rates ranging from 1:250 up to 1:9.10⁵ (in serum dilution buffer: 0.1 M Tris pH 7, 0.15 M NaCl, 1% BSA, 2% casein, 0.05% Tween 80, 0.025% thimerasol), was added (100 µl) to the anti-humane IgG and anti-humane IgA coated plates and incubated for one hour at 37 °C. The wells were rinsed thoroughly and the detection limit established by using anti-humane IgG-HRP (DAKO, P-214 / stock solution: 1:20 dilution in Stabilzyme Select (Surmodics), finally 1:100 diluted in serum dilution buffer) and anti-humane IgA-HRP (DAKO, P-216 / 1:35 dilution in Stabilzyme Select (Surmodics), finally 1:100 diluted in serum dilution buffer) conjugates and TMB substrate according to standard procedures.

The same untreated whole humane serum sample was labelled by adding DNP-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-DNP)CL](NO₃)) in a total protein to DNP-Pt ratio of 4:1 (w/w) and allowing the mixture to react overnight at room temperature. Next, the sample was diluted, added to the plates (100 µl/well), and incubated as above. Detection limit was determined by using anti-DNP-HRP conjugate (#NEN 7-1-99, 1:1000 dilution in serum dilution buffer; 100 µl/well; 1 hour at 37 °C) and TMB substrate (30 min. at room temperature).

The results were as follows:

Entity	Classical sandwich ELISA	DNP-Pt format
IgG	1:3.10 ⁵	1:2.10 ⁵
IgA	1: 8.10 ⁴	1:4.10 ⁴
IgM	n.a.	1:2.10 ⁴
IgD	n.a.	1:2.10 ³
IgE	n.a.	1:2.10 ³

All subclasses were shown to maintain their antigen binding capacity.

5 Example 6

The effect of ammonium sulphate was evaluated. First proteins were precipitated with either 50, 100, 200 or 400 μ l of a saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (30 min on ice - 30 min room temperature - centrifugation). The supernatant was separated from the precipitate. The precipitates were dissolved to a 0.5 mg/ml concentration in 0.5 x PBS (without dialysis). The protein concentration was determined with BCA reagents (Pierce, see above). Next, the re-dissolved precipitate was labelled with DNP-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-DNP)Cl](NO₃)) at a 4:1 ratio (w/w) for 4 hrs at 50 °C. The results are shown in Figure 4.

15 Also, the supernatants, transferred to new tubes, were labelled with DNP-Pt. To 0.5 mg protein (in the supernatant) 0.125 of DNP-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-DNP)Cl](NO₃)) was added. The mixture was allowed to react for 4 hrs at 50 °C. The results are shown in Figure 5.

20 The results demonstrate that a method according to the invention can be used to label either a entity that has been precipitated in ammonium sulphate or an entity that is dissolved in an ammonium sulphate solution without need for remove any excess ammonium sulphate. The latter is not possible with standard labelling moieties, e.g. HNS-esters.

Example 7

In this example differential labelling is demonstrated by making use of fluorescence resonance energy transfer (FRET). The bio-organic molecule of choice is microperoxidase. Microperoxidase mp-11 (Sigma M6765) consists of
5 11 amino acids with two N reactive sites (lysine and histidine) and two S-reactive sites (cysteine). The full length sequence of mp-11 is: valine – glutamine – lysine (N) - cysteine (S) – alanine – glutamine – cysteine (S) – histidine (N) – threonine – valine – glutamine. Mp-11 was dissolved in 0.5 x PBS (pH 7.2) at a concentration of 1 mg/ml. A aliquot of this solution (0.25 mg)
10 was labelled with Flu-ULS at a 1:0.25 ratio in 0.5 x PBS (final volume 499.5 µl) at 50 °C for 4 hours. The fluorescein labelled mp-11 solution was purified over a PD-10 column (APB, nr. 17-0851-01). Prior to the purification of the solution the column was rinsed three times with 5 ml 0.5 x PBS. The fluorescein labelled mp-11 solution was analysed on a Ultrospec 4000
15 spectrophotometer (APB) Subsequent, fluorescein labelled mp-11 was labelled with rhodamine-ULS (ratio 1:0.25). Labelling was allowed to take place overnight at 4 °C. Next, the solution was purified and analysed as described above.

The results are presented in Figure 6. The data show that mp-11 is
20 labelled with fluorescein (A470 FAM 50) and rhodamine (A510 FAM 50 Rho 4). An elevated rhodamine specific emission was obvious when the double labelled mp-11 was illuminated at 470 nm (this is the excitation wavelength of fluorescein) (A470 FAM 50 Rho 4). After excitation fluorescein transfers sufficient energy to the nearby rhodamine leading to fluorescence of
25 rhodamine at 570 nm without direct excitation of rhodamine at 510 nm, this is FRET.

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

25

Example 8

Bovine serum albumin (BSA) was labelled with *cis* or *trans* rhodamine-Pt at pH 4 or 7. BSA was dissolved in 1 x PBS (phosphate buffered saline, pH = 7.4) at an amount of 3%. Small aliquots of this solution (3.3 µl) were labelled according the following scheme: (a) plus 25 µl rhodamine *cis*-Pt (cis[Pt(II)(en)(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)Cl₂](NO₃)) of a 1mg/ml stock solution in 0.075 M NaAC/citrate buffer pH 4 (final volume 1ml); (b) plus 12.5 µl Rhodamine *trans*-Pt (trans[Pt(II)(NH₃)₂(NH₂-(CH₂)₆-NH-rhodamine)Cl₂](NO₃)) of a 2 mg/ml stock solution in 0.075 M NaAC/citrate buffer pH 4 (final volume 1ml); (c) same as (a) but in 0.5 x PBS pH 7; (d) same as (b) but in 0.5 x PBS pH 7. In all cases the protein to label ratio is 1:0.25. Labelling took place at 50 °C for 4 hours. Thereafter the labelled BSAs were column purified. Visual evaluation of the samples clearly showed no coloured solution in (b) and (d) whereas (a) and (c) were coloured (c stronger than a).

Example 9

The effect of soft transition metals was evaluated in order to control further the differential labelling conditions. A ten fold excess of N-acetyl methionine (final conc. 2 mM) or N-acetyl histidine (final conc. 2 mM) was added to a solution containing either DNP-Pt (final conc. 0.2 mM) or Rho-Pt (final conc. 0.2 mM) in 10 mM sodiumphosphate pH 8 and 20 mM NaCl. To each solution either 0, 1, 2, or 5 equivalents of CdCl₂ or K₂PdCl₄ was added to study the influence of the presence of soft transition metals on reaction rates of marker-Pt compounds with S-reactive sites and N-reactive sites containing amino acids, respectively. The reactions were performed at 37 °C. It should be noted that the pH dropped upon addition of the soft transition metal. This was observed for all soft transition metals used in this experiment. The drop in pH was the most pronounced for palladium and the least for cadmium. The disappearance of label-Pt was chosen as a measure and the samples lacking an

additional soft transition metal (e.g. Pd, Cd, ...) served as controls. The relative changes measured in samples containing such additional soft transition metal(s) is a measure for the effect on the presence and concentration of such compound(s) on the labelling characteristics of N or S-reactive site containing amino acids. The results are presented in Table 4. The results show that labelling of methionine is very fast. This finding is in agreement with data presented above. Addition of considerable amounts of cadmium diminishes the reaction rate only slightly. However addition of palladium significantly inhibits the reaction in a concentration dependent manner. Labelling of histidine is quite slow, and decreases when cadmium is added. A 5 fold excess of cadmium with respect to histidine, prevented labelling to occur in the first place. Palladium seems to speed up the reaction with histidine when present at low concentration, at higher concentrations the reaction is slowed down. However these changes in reaction rate might not solely be due to the presence of a soft transition metal, or mixtures thereof, but also in part be due to changes in pH. Palladium has also an effect on labelling of both S-reactive site (e.g. methionine) and N-reactive site (e.g. histidine) containing amino acids, but more so on methionine. This offers an excellent opportunity to selectively diminish sulfur labelling.

20

Example 10

Bovine serum albumin (BSA, Sigma; A-9647) was dissolved in either 20 mM phosphatebuffer pH 8 or 20 mM sodium acetate buffer pH 4 at a concentration of 5 mg/ml. To aliquots of these solutions was added Flu-Pt, Rho-Pt, Flu-NHS (Molecular Probes, C-6164, dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml) or Rho-NHS (Molecular Probes, C-6123, dissolved in DMSO at a concentration of 5 mg/ml) at a ten fold excess. The labelling reaction was allowed to take place over night at 37 °C. All samples were purified by column purification (PD10) and analysed spectrophotometrically according to standard

25

procedures. The results showed hardly any labelling at low pH for the Flu-NHS label whereas the Flu-Pt label displayed a significant higher F/P ratio. Note that the baseline Flu-NHS value is mainly attributable to non specific binding of the label (negative charge) to the protein (positive charge). Both labels yielded comparable F/P ratios at neutral pH matching the Flu-Pt value at low pH. Similar results were obtained with rhodamine with the exception that the Rho-Pt value was lower compared to the Rho-NHS value at low pH. In this case the data corresponding to the low pH experiment are actual baseline values representing no or very little labelling. This finding might at least in part be explained as a result of the overall net charge of the labelling compound in view of the charge of the protein.

This example demonstrates the successful use of different labelling technologies and potential electrostatic interactions contributing to the scope of the present invention.

Example 11

Epidermal Growth Factor (EGF, Sigma; E9644) was dissolved in 50 mM phosphate buffer pH 8 at a concentration of 1 mg/ml. Ten fold excess of Flu-NHS (Molecular Probes, C6164; dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml) or Flu-Pt (KREATECH, ULK004) was added to aliquots of the EGF solution. The labelling reaction was allowed to take place overnight at 30 °C and 37 °C for the Flu-NHS and Flu-Pt markers, respectively. Next, the samples were purified by column purification (PD10) and analysed spectrophotometrically according to standard procedures. The results showed a F/P ratio of 0.07 and 0.28 for the Flu-NHS and Flu-Pt markers, respectively. EGF does not contain lysine and therefor is not a preferred target for NHS labelling. The terminal amino group serves as the only potential labelling site for a NHS complex. A significant higher F/P ratio was achieved for the Flu-Pt complex under similar conditions.

Table 4: $t_{1/2}$ values from labelling reactions containing soft transition metals

		DNP-Pt	Rho-Pt
Methionine			
No soft transition metal		15 min	15 min
CdCl ₂	1 equivalent	60 min (pH 7)	60 min (pH 7)
	2	60 min (pH 6)	60 min (pH 6)
	5	60 min (pH 4.5)	60 min (pH 4.5)
K ₂ PdCl ₄	1 equivalent	≈ 100 hours (pH 7)	
	2	∞ (pH 5)	
	5	∞ (pH 3)	
Histidine			
No soft transition metal		3 hours	3 hours
CdCl ₂	1 equivalent	15 hours (pH 7)	15 hours (pH 7)
	2	50 hours (pH 6)	25 hours (pH 6)
	5	∞ (pH 4.5)	∞ (pH 4.5)
K ₂ PdCl ₄	1 equivalent	2 hour (pH 7)	
	2	∞ (pH 6)	
	5	∞ (pH 3)	

Claims

1. A method for differentially labelling one or more entities through a platinum-linker, said entities together comprising one or more sulphur containing reactive sites and one or more nitrogen containing reactive sites, wherein a complex of a platinum compound and a marker is formed, and wherein said platinum compound is reacted with said one or more entities such that substantially only sulphur containing reactive sites or substantially only nitrogen containing reactive sites are linked to said platinum compound.
2. A method according to claim 1 wherein the pH is used to discriminate between labelling of sulphur containing reactive sites and nitrogen containing reactive sites.
3. A method according to any of the preceding claims wherein the ionic strength is used to discriminate between labelling of sulphur containing reactive sites and nitrogen containing reactive sites.
4. A method according to claim 3, wherein said ionic strength is realised by one or more salts comprising chloride, Cl^- , NO_3^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_3^- , I⁻, Br⁻, acetate, carboxylate, phosphate, sulphate, ethylnitrate, oxalate, citrate, a phosphonate or a mixture thereof.
5. A method according to any of the preceding claims wherein the stereochemical structure of platinum compound is used to discriminate between labelling of sulphur containing reactive sites and nitrogen containing reactive sites.
6. A method according to any of the preceding claims wherein said sulphur containing site or sites are first differentially shielded by a shielding moiety and thereafter said platinum compound is differentially linked to the nitrogen containing reactive site.

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

30

7. A method according to any of the claims 1-5, wherein said nitrogen containing site or sites are first differentially shielded by a shielding moiety and thereafter said platinum compound is differentially linked to the sulphur containing reactive site.
- 5 8. A method according to claim 6 or 7, wherein said shielding moiety is a *trans*-platinum compound.
9. A method to any of the claims 6-8 wherein the shielding moiety is selectively removed from the shielded reactive site, after the platinum compound has been reacted such that said platinum is differentially linked to
- 10 said entity.
10. A method according to any of the preceding claims wherein one or more transition metal ions are used in a concentration chosen such that said platinum compound is differentially labelled to a nitrogen containing reactive site.
- 15 11. A method according to claim 10, wherein said one or more transition metal ions are chosen from the group of Cu(II), Zn(II).
12. A method according to any of the preceding claims, wherein at least one of the nitrogen containing reactive sites is a histidine residue, wherein a complex of a platinum compound and a marker is formed, and wherein said
- 20 platinum compound is reacted with said one or more entities such that substantially only histidine residues or only non-histidine reactive sites are linked to said platinum compound.
13. A method for labelling one or more entities through a platinum-linker, said entities together comprising one or more histidine residues and
- 25 one or more other nitrogen containing reactive sites, wherein a complex of a platinum compound and a marker is formed, and wherein said platinum compound is reacted with said one or more entities such that substantially only histidine residues or only non-histidine reactive sites are linked to said platinum compound.

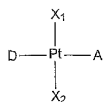
WO 02/097439

PCT/NL02/00334

31

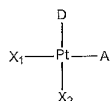
14. A method according to any of the preceding claims wherein nitrogen containing reacting sites and sulphur containing reactive sites are labelled with different markers.

15. A method according to any of the preceding claims wherein, said platinum compound is represented by one of the following formulas:



formula 1a

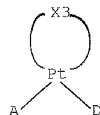
or



formula 1b

10

or



formula 1c

wherein Pt represents the platinum atom, A and D are independently chosen from the group of reactive moieties formed by Cl⁻, NO₃⁻, acetate, HCO₃⁻, CO₃²⁻, ZSO₃⁻, SO₃²⁻, I⁻, Br⁻, F⁻, acetate, carboxylate, phosphate, ethylnitrate, oxalate, citrate, a phosphonate, ZO⁻, and water, Z being hydrogen or an alkyl or aryl group having from 1 to 10 carbon atoms;

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

32

wherein X1 and X2 are independently chosen from the group of inert moieties formed by NH₃, NH₂R, NHR'R', NRR'R'' groups, wherein R, R' and R'' represent an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms;

and wherein X3 represents a stabilising bridge, such as an alkyl diamine, said
5 alkyl preferably having 2 to 6 carbon atoms.

16. A method according to any of the preceding claims, wherein the marker and/or a reactive site of the entity are connected to the platinum moiety of the platinum compound through a spacer.

17. A method according to any of the preceding claims wherein said
10 marker is a fluorochrome, a phosphorescent marker, chemiluminescent marker, a specific binding pair component, a UV or visual light absorbing marker, a radioactive marker, a colloidal dye substance, a reducing substance, a particulate sol or a metal.

18. A method according to claim 17 wherein said marker is
15 dinitrophenol (DNP) tetramethylrhodamine, digoxigenin, a cyanine-colorant, biotin, avidin or streptavidin.

19. A method according to any of the preceding claims wherein said
entity comprises a primary amine, a secondary amine, a tertiary amine, an aromatic amine, a thiol, a thioether, a sulfide, a disulfide, a thioamide, a thion,
20 an amide, an imide, an imine, an iminoether, or an azide.

20. A method according to any of the preceding claims wherein one or
more entities are chosen from the group of amino acids, peptides, oligopeptide, polypeptides, proteins, immunoglobulins, enzymes, synzyms, phospholipides, glycoproteins, nucleic acids, nucleosides, nucleotides, oligonucleotides,
25 polynucleotides, peptide nucleic acids, peptide nucleic acid oligomers, peptide nucleic acid polymers, amines, aminoglycosides.

21. A method according to claim 20 wherein one or more entities are chosen from the group of immunoglobulins, enzymes, antibody-antigen complexes.

WO 02/097439

PCT/NL02/00334

33

22. A method according to any of the preceding claims, wherein the labelled entity is subsequently analysed using a liquid based analyte analysis system.
23. An entity differentially linked to a platinum compound at one or
5 more nitrogen containing reactive sites and/or one or more sulphur containing reactive.
24. An entity according to claim 23 further comprising a marker attached to said platinum compound.
25. An entity labelled with different markers at respectively nitrogen
10 containing reactive sites and sulphur containing reactive sites.
26. A diagnostic kit comprising one or more preparations selected from the group formed by entities differentially linked to a platinum compound at one or more nitrogen containing reactive sites and/or one or more sulphur containing reactive sites, platinum-linker preparations, buffers, marker
15 preparations, transition metal ion preparations, preparations for adjusting the ionic strength and preparations comprising a shielding moiety.
27. A diagnostic kit for employing a method according to any of the claims 1-22.

Fig. 1: Adduct formation between Pt and N-Ac-Methionine at RT

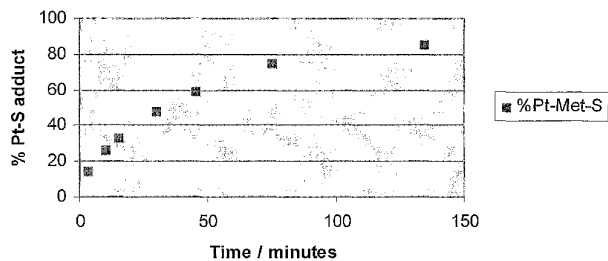
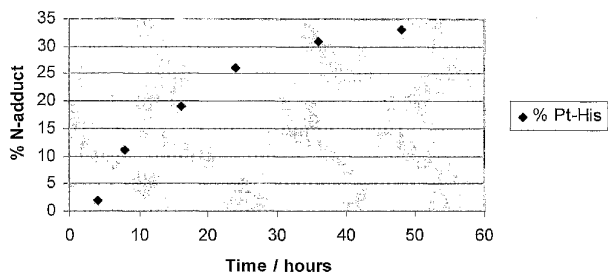
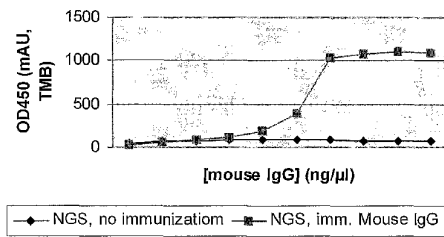


Fig. 2: Adduct formation between Pt and Histidine at RT



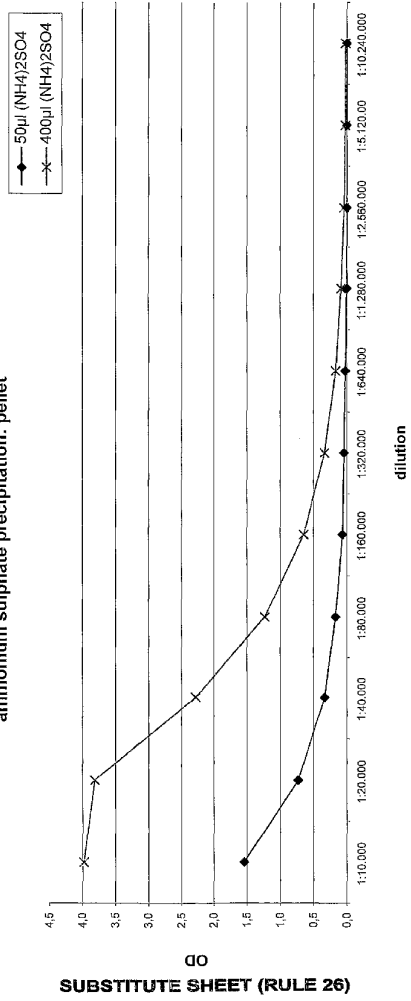
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3: Labeling of goat sera, non-immunized and immunized with mouse IgG. Mouse IgG coated/DNP-ULS labelled whole serum/anti-DNP-HRP detection



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 4: labelling and detection of IgG serum proteins after ammonium sulphate precipitation: pellet



DO
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

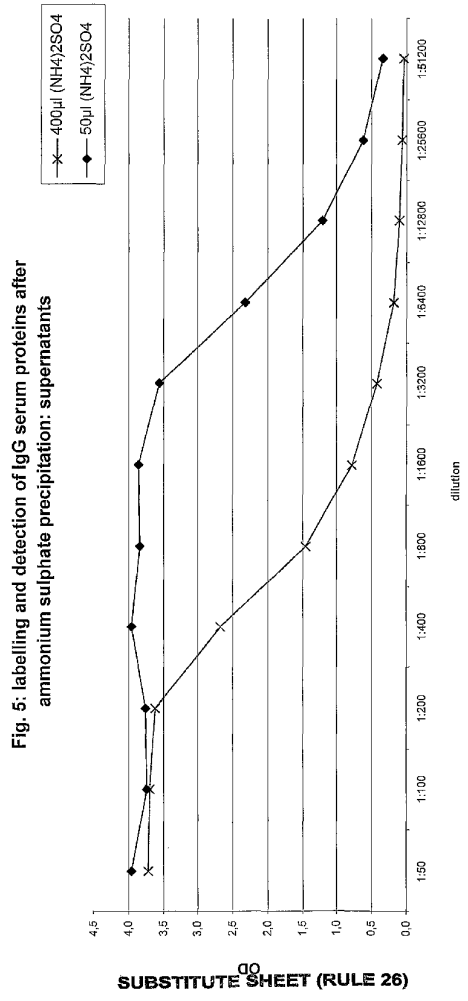
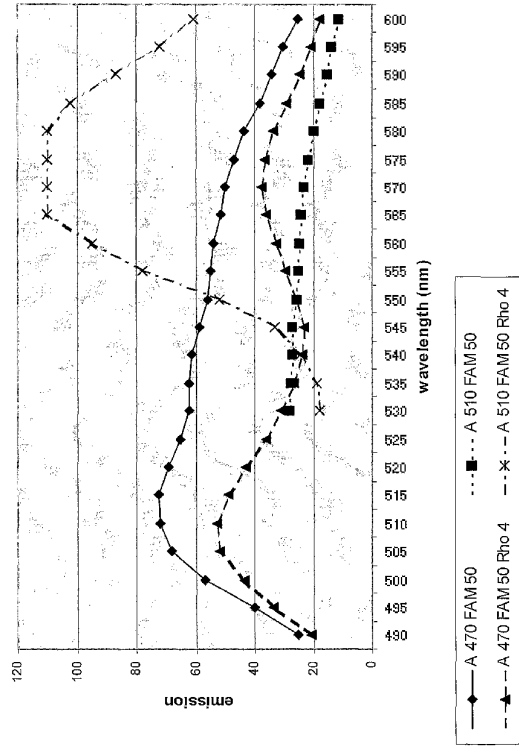


Fig. 6: mp-11 double labelling



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097439 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/58**, 33/84
- (21) International Application Number: PCT/NL02/00334
- (22) International Filing Date: 24 May 2002 (24.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01202007.9 28 May 2001 (28.05.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **KREAT-
ECH BIOTECHNOLOGY B.V.** [NL/NL]; Keienbergweg
3, NL-1101 EZ Amsterdam (NL).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EG, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **TALMAN, Ednard, Gerhard** [NL/NL]; Havikskruiszoom 16, NL-2353 RV Leiderdorp; **VAN GILSWIJK, Robertus, Petrus, Maria** [NL/NL]; Klepperman 12, NL-2401 GJ Alphen aan den Rijn (NL); **HEETEBRIJ, Robert, Jochem** [NL/NL]; Stieljesstraat 61, NL-2312 SJ Leiden (NL); **VEUSKENS, Jacky, Theo, Maria** [BE/NL]; Elf Novemberlaan 16, NL-3500 Hasselt (BE).

(74) Agent: **PRINS, A., W.**; Verenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).

Published:

with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
23 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/097439 A3

(54) Title: A DIFFERENTIAL LABELLING METHOD

(57) Abstract: The invention relates to a method for differentially labelling one or more entities, together comprising distinct reactive sites. The invention further relates to an entity that has been labelled by a method according to the invention and to a diagnostic kit comprising a labelled entity and to a diagnostic kit to employ a method according to the invention.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/NL 02/00334
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/58 G01N33/84		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) PAJ, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 35696 A (KREATECH BIOTECH BV; HOUTHOFF HENDRIK JAN (NL); REEDIJK JAN (NL)); 14 November 1996 (1996-11-14) the whole document	1-27
Y	REEDIJK J: "Why does Cisplatin reach Guanine-m7 with competing s-donor ligands available in the cell?" CHEMICAL REVIEWS, vol. 99, no. 9, 8 September 1999 (1999-09-08), pages 2499-2510, XP001064672 page 2501, column 2 page 2508, column 1, line 50 -column 2, line 45	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but, published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2002		Date of mailing of the international search report 25/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2000, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/NL 02/00334

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 15564 A (HEETEBRIJ ROBERT JOCHEM ;KREATECH BIOTECH BV (NL); REEDIJK JAN (NL) 16 April 1998 (1998-04-16) the whole document ---	1-27
A	WO 00 27847 A (ARCTIC DIAGNOSTICS OY ;MELTOLA NIKO JARMO JUHANI (FI); SOINI ALEKS) 18 May 2000 (2000-05-18) the whole document ---	1-27
A	LOWE GORDON ET AL: "The design and synthesis of bis-(4'-Azido-2,2':6',2"-terpyridine platinum(II)) complexes with rigid and extended linkers for studying the topology of DNA by photoaffinity labeling." BIOORGANIC CHEMISTRY, vol. 27, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 477-486, XP002195196 ISSN: 0045-2068 the whole document ---	1-27
A	WO 98 45304 A (HEETEBRIJ ROBERT JOCHEM ;KREATECH BIOTECH BV (NL); REEDIJK JAN (NL) 15 October 1998 (1998-10-15) the whole document ---	1-27
A	US 5 714 327 A (LEMPERS EDWIN LEO MARLO ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) the whole document ---	1-27
A	US 5 580 990 A (LEMPERS EDWIN L M ET AL) 3 December 1996 (1996-12-03) the whole document ---	1-27
A	EL-KHATEEB MAHMOUD ET AL: "Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques." JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY, vol. 77, no. 1-2, October 1999 (1999-10), pages 13-21, XP002195197 ISSN: 0162-0134 abstract ---	1-27
A	MARCHÁN V, ET AL: "Towards a Better Understanding of the Cisplatin Mode of Action" CHEMISTRY, vol. 7, no. 4, 16 February 2001 (2001-02-16), pages 808-815, XP002195198 page 812, column 2 ---	1-27
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 02/00334

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KUNG ANGELIKA ET AL: "Comparison of the binding behavior of oxaliplatin, cisplatin and analogues to 5'-GMP in the presence of sulfur-containing molecules by means of capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry." JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY, vol. 86, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 691-698, XP002195199 ISSN: 0162-0134 abstract</p>	1-27
A	<p>HAHN M, ET AL: "Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage" JOURNAL OF BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY, vol. 6, 28 April 2001 (2001-04-28), pages 556-566, XP002195200 the whole document</p>	1-27
A	<p>IVANOV ANDREI I ET AL: "Cisplatin binding sites on human albumin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 24, 12 June 1998 (1998-06-12), pages 14721-14730, XP002195201 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International Application No. PCT/NL 02/00334			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9635696	A	14-11-1996	AU 724320 B2	14-09-2000		
			AU 5704096 A	29-11-1996		
			CA 2218815 A1	14-11-1996		
			EP 1019420 A1	19-07-2000		
			JP 11505533 T	21-05-1999		
			WO 9635696 A1	14-11-1996		
			NZ 307633 A	28-01-2000		
WO 9815564	A	16-04-1998	AT 221894 T	15-08-2002		
			AU 726692 B2	16-11-2000		
			AU 4474697 A	05-05-1998		
			DE 69714600 D1	12-09-2002		
			EP 0937090 A1	25-08-1999		
			JP 2001503742 T	21-03-2001		
			WO 9815564 A1	16-04-1998		
			NZ 334803 A	26-05-2000		
			US 2002160396 A1	31-10-2002		
			US 6338943 B1	15-01-2002		
WO 0027847	A	18-05-2000	EP 1129092 A1	05-09-2001		
			WO 0027847 A1	18-05-2000		
			JP 2002529466 T	10-09-2002		
WO 9845304	A	15-10-1998	EP 0870770 A1	14-10-1998		
			WO 9845304 A1	15-10-1998		
			AU 737441 B2	16-08-2001		
			AU 6751798 A	30-10-1998		
			EP 0973785 A1	26-01-2000		
			JP 2001521511 T	06-11-2001		
			NZ 500184 A	31-08-2001		
			US 6248531 B1	19-06-2001		
US 5714327	A	03-02-1998	NL 9001639 A	17-02-1992		
			US 6133038 A	17-10-2000		
			US 5985566 A	16-11-1999		
			AT 145403 T	15-12-1996		
			AU 8286391 A	18-02-1992		
			DE 69123251 D1	02-01-1997		
			DE 69123251 T2	28-05-1997		
			DK 539466 T3	05-05-1997		
			EP 0539466 A1	05-05-1993		
			ES 2097213 T3	01-04-1997		
			GR 3022581 T3	31-05-1997		
			WO 9201699 A1	06-02-1992		
			US 5580990 A	03-12-1996		
US 5580990	A	03-12-1996	NL 9001639 A	17-02-1992		
			AT 145403 T	15-12-1996		
			AU 8286391 A	18-02-1992		
			DE 69123251 D1	02-01-1997		
			DE 69123251 T2	28-05-1997		
			DK 539466 T3	05-05-1997		
			EP 0539466 A1	05-05-1993		
			ES 2097213 T3	01-04-1997		
			GR 3022581 T3	31-05-1997		
			WO 9201699 A1	06-02-1992		
			US 6133038 A	17-10-2000		
			US 5714327 A	03-02-1998		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Title of patent family members

International Application No
PCT/NL 02/00334

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5580990	A	US 5985566 A	16-11-1999

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 タルマン, エドゥアルト ヘラルト
オランダ国 レイデルドルプ ハフィクスクライドゾーム 16
- (72) 発明者 ファン ヘイスウェイク, ロベルトゥス ペトルス マリア
オランダ国 アルペン アーン デン ライン クレップelman 12
- (72) 発明者 ヘーテブライ, ロベルト ヨヘム
オランダ国 ライデン スティールチェスストラート 61
- (72) 発明者 フェースケンズ, ジャッキー テオ マリア
ベルギー国 ハッセルト エルフ ノフェンベルラン 16
- Fターム(参考) 2G045 FB01 FB03 FB07 FB12 FB13
2G054 AB03 AB04 CE02 EA01 EA03

专利名称(译)	特异的标识化方法		
公开(公告)号	JP2004530885A	公开(公告)日	2004-10-07
申请号	JP2003500567	申请日	2002-05-24
申请(专利权)人(译)	克莱尔高生物技术为主. 结垢.		
[标]发明人	タルマンエドゥアルトヘラルト ファンハイスウェイクロベルトウスペトルスマリア ヘーテブライロベルトヨヘム フースケンスジャッキーテオマリア		
发明人	タルマン,エドゥアルトヘラルト ファンハイスウェイクロベルトウスペトルスマリア ヘーテブライ,ロベルトヨヘム フースケンス,ジャッキーテオマリア		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/533 G01N33/58 G01N33/84		
CPC分类号	G01N33/84 G01N33/58		
FI分类号	G01N33/58.Z G01N21/76 G01N33/533		
F-TERM分类号	2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03		
代理人(译)	广瀬MineTaro		
优先权	2001202007 2001-05-28 EP		
其他公开文献	JP4213029B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种特异性标记含有不同反应位点的一种或多种物质的方法。本发明还涉及根据本发明方法标记的物质，包含标记物质的诊断试剂盒，以及利用本发明方法的诊断试剂盒。

(19) 日本国特許庁 (JP) (12) 公表特許公報 (A) (11) 特許出願公表番号
特表2004-53088
(P2004-53088A)
(43) 公表日 平成16年10月7日 (2004.10.7)

(51) Int. Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
G01N 33/58 GOIN 33/58 Z 2G045
G01N 21/76 GOIN 21/76 2G054
G01N 33/533 GOIN 33/533

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

(21) 出願番号 特願2003-500567 (P2003-500567)	(71) 出願人 500267642
(66) (22) 出願日 平成14年5月24日 (2002.5.24)	クレアテック バイオテクノロジー ベー
(65) 翻訳文提出日 平成15年11月28日 (2003.11.28)	. ファウ.
(68) 国際出願番号 PCT/NL2002/003334	Kreatech Biotechnol
(67) 国際公開番号 W02002/097439	ogy B. V.
(69) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)	オランダ国 アムステルダム フリーヤウ
(31) 優先権主張番号 01202007.9	エフ 20
(32) 優先日 平成13年5月28日 (2001.5.28)	Vlietweg 20, Amsterd
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	am NETHERLANDS
	(74) 代理人 100075557
	弁理士 西教 圭一郎
	(74) 代理人 100072235
	弁理士 杉山 賢至
	(74) 代理人 100101638
	弁理士 廣瀬 峰太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特异的標識化方法