(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2008-539270

(P2008-539270A)

(43)公表日　平成20年11月13日(2008.11.13)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 16/00	(2006.01)	C07K 16/00		4B050
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00		4H045
C12N 9/08	(2006.01)	C12N 9/08		
C12N 9/16	(2006.01)	C12N 9/16	B	
C07K 1/08	(2006.01)	C07K 1/08		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 45 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-509141 (P2008-509141)
(86)(22)出願日　平成18年4月27日 (2006.4.27)
(85)翻訳文提出日　平成19年12月6日 (2007.12.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/016087
(87)国際公開番号　WO2006/116628
(87)国際公開日　平成18年11月2日 (2006.11.2)
(31)優先権主張番号　60/675,759
(32)優先日　平成17年4月28日 (2005.4.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

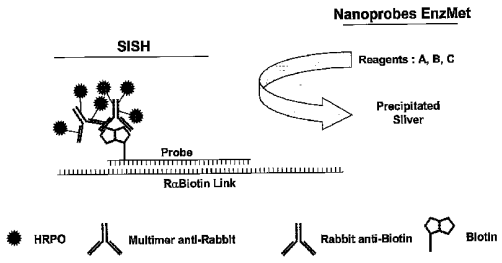
(71)出願人　599075070
ベンタナ・メデイカル・システムズ・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７３７トウーソン・イノベーションパークドライブ１９１０
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　ビーニアーツ，クリストフアー
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１８トウーソン・イーストクワイエトキヤニオンドライブ２２６３

最終頁に続く

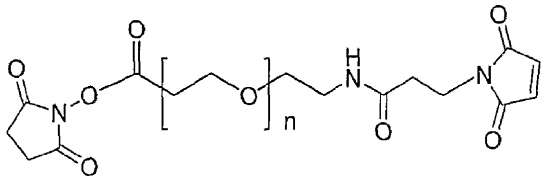
(54)【発明の名称】抗体コンジュゲート

(57)【要約】

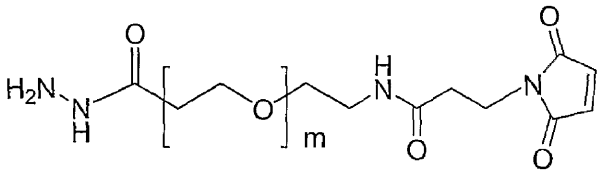
ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーを介してシグナル発生部分に共有結合された抗体を含む抗体／シグナル発生部分コンジュゲートが開示される。開示されるコンジュゲートは、組織切片および細胞学的サンプルの免疫組織化学およびｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイに抜群のシグナル発生を表す。１つの態様では、ハプテン標識プローブを持つ核酸配列の酵素－金属組織学的検出が、増幅せずに１次抗体として開示するコンジュゲートを使用して達成できる。



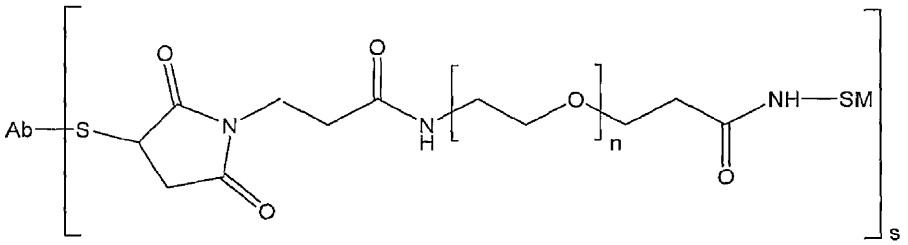
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介してシグナル発生部分と共有結合された抗体を含んでなる抗体－シグナル発生部分コンジュゲート。
【請求項２】
リンカーのチオール－反応性基が抗体に共有結合され、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基がシグナル発生部分と共有結合されている、請求項１に記載のコンジュゲート。
【請求項３】
リンカーのチオール－反応性基が抗体のシステイン残基に共有結合されている、請求項２に記載のコンジュゲート。
【請求項４】
リンカーのチオール－反応性基が、抗体に導入されたチオール基に共有結合されている、請求項２に記載のコンジュゲート。
【請求項５】
リンカーのアルデヒド－反応性基が抗体に共有結合され、そしてリンカーのチオール反応性基がシグナル発生部分に共有結合されている、請求項１に記載のコンジュゲート。
【請求項６】
リンカーのアルデヒド－反応性基が、抗体のグリコシル化部分上に形成されたアルデヒドに共有結合されている、請求項５に記載のコンジュゲート。
【請求項７】
リンカーが式：
【化１】



式中、ｎ＝１～５０；あるいは
【化２】

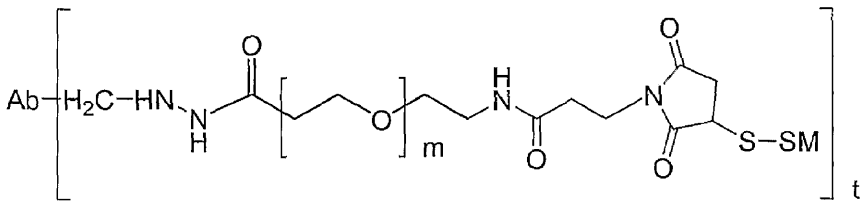


式中、ｍは１～５０である、
を有する請求項１に記載のコンジュゲート。
【請求項８】
コンジュゲートが式：
【化３】

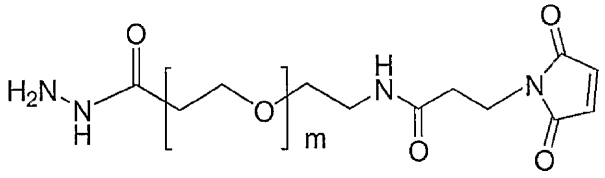


式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり、ｎ＝１～５０、そしてｓ＝１～１０である、

を有する請求項７に記載のコンジュゲート。
【請求項９】
シグナル発生部分が酵素を含んでなる請求項８に記載のコンジュゲート。
【請求項１０】
酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含んでなる請求項９に記載のコンジュゲート。
【請求項１１】
ｓ＝２～６の請求項８に記載のコンジュゲート。
【請求項１２】
ｎ＝４～１２の請求項８に記載のコンジュゲート。
【請求項１３】
コンジュゲートが式：
【化４】

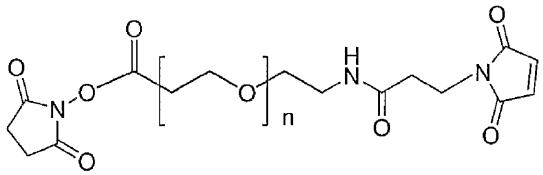


式中、Ａｂは抗体、ＳＭはシグナル発生部分、ｍ＝１～５０、そしてｔ＝１～１０である、
を有する請求項７に記載のコンジュゲート。
【請求項１４】
シグナル発生部分が酵素を含んでなる請求項１３に記載のコンジュゲート。
【請求項１５】
酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含んでなる請求項１４に記載のコンジュゲート。
【請求項１６】
ｔ＝２～６の請求項１３に記載のコンジュゲート。
【請求項１７】
ｍ＝４～１２の請求項１３に記載のコンジュゲート。
【請求項１８】
式：
【化５】



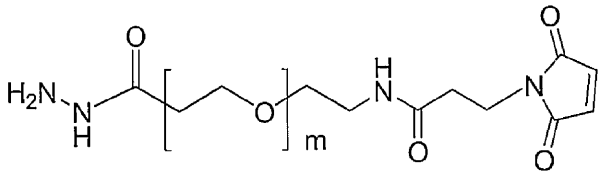
式中、ｍ＝１～５０である、
を有するヘテロ二官能性リンカー。
【請求項１９】
ｍ＝２～３０の請求項１８に記載のリンカー。
【請求項２０】
ｍ＝３～２０の請求項１８に記載のリンカー。
【請求項２１】
ｍ＝４～１２の請求項１８に記載のリンカー。
【請求項２２】
抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを調製する方法であって：
抗体からチオール化抗体を形成し；

アミン基を有するシグナル発生部分をＰＥＧマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて、活性化シグナル発生部分を形成し；そして
チオール抗体を活性化シグナル発生部分と反応させて、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを形成する、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項２３】
チオール化抗体を形成することが、抗体と還元剤を反応させてチオール化抗体を形成することを含んでなる、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
抗体と還元剤を反応させてチオール化抗体を形成することが、抗体あたり約１から約１０の間の平均チオール数をもつ抗体を形成することを含んでなる、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
抗体を還元剤と反応させることが、抗体を２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤と反応させることを含んでなる、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
抗体を還元剤と反応させることが、抗体をＤＴＴおよびＤＴＥおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤と反応させることを含んでなる、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
抗体を還元剤と反応させることが、抗体を約１ｍＭから約４０ｍＭの間の濃度の還元剤と反応させることを含んでなる、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
チオール化抗体を形成することが、チオール基を抗体に導入することを含んでなる、請求項２２に記載の方法。
【請求項２９】
チオール基を抗体に導入することが、抗体を２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬と反応させることを含んでなる、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
チオール基を抗体に導入することが、抗体をオキシダントと反応させて抗体の糖部分をアルデヒド基に変換し、そしてアルデヒド基をシスタミンと反応させることを含んでなる、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
オキシダントが過ヨウ素酸塩イオン、I_2、Br_2またはそれらの組み合わせを含んでなる、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
シグナル発生部分をＰＥＧマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて活性化シグナル発生部分を形成することが、シグナル発生部分と式：
【化６】



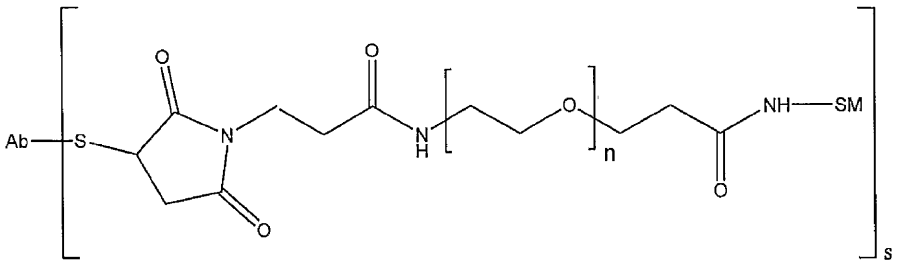
式中、ｎ＝１～５０である、
を有するＰＥＧマレイミド／活性エステルとを反応させることを含んでなる、請求項２２に記載の方法。

【請求項３３】
シグナル発生部分が酵素を含んでなる請求項２２に記載の方法。
【請求項３４】
酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含んでなる請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを調製する方法であって：
抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成し；
アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させて、チオール－反応性抗体を形成し；そして
チオール－反応性抗体を、チオール化シグナル発生部分を反応させて、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを形成する、
ことを含んでなる、上記方法。
【請求項３６】
抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成することが、抗体のグリコシル化領域を酸化してアルデヒドを持つ抗体を形成することを含んでなる、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
抗体のグリコシル化領域を酸化することが、抗体を過ヨウ素酸塩、I_2、Br_2またはそれらの組み合わせで処理することを含んでなる請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
さらにチオール化シグナル発生部分をシグナル発生部分から形成することを含んでなる、請求項３５に記載の方法。
【請求項３９】
チオール化シグナル発生部分を形成することが、シグナル発生部分を還元剤と反応させてチオール化シグナル発生部分を形成することを含んでなる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
還元剤が２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
チオール化シグナル発生部分を形成することが、チオール基をシグナル発生部分に導入することを含んでなる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
チオール基をシグナル発生部分に導入することが、シグナル発生部分を２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬と反応させることを含んでなる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４３】
アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させて、チオール－反応性抗体を形成することが、アルデヒドを持つ抗体を式：
【化７】

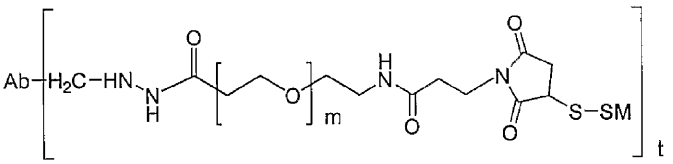


式中、ｍ＝１～５０である、
を有するリンカーを持つアルデヒドを持つ抗体と反応させることを含んでなる、請求項５７に記載の方法。

【請求項４４】
チオール化シグナル発生部分が酵素を含んでなる請求項３５に記載の方法。
【請求項４５】
酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含んでなる請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
生物学的サンプル中の目的分子の検出方法であって：
生物学的サンプルを、ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介してシグナル発生部分に共有結合された抗体を含んでなる抗体－シグナル発生部分コンジュゲートと接触させ；そして
サンプル中の目的分子の存在を示す抗体－シグナル発生部分コンジュゲートにより生成されるシグナルを検出する、
ことを含んでなる、上記検出方法。
【請求項４７】
生物学的サンプルが組織切片または細胞学サンプルを含んでなる、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
コンジュゲートが酵素に共有結合した抗体を含んでなる請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】
酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含んでなる請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
コンジュゲートが式：
【化８】



式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり、ｎ＝１～５０、そしてｓ＝１～１０である、
を有する請求項４６に記載の方法。
【請求項５１】
コンジュゲートが式：
【化９】



式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり、ｍ＝１～５０、そしてｔ＝１～１０である、
を有する請求項４６に記載の方法。
【請求項５２】
方法がさらに、生物学的サンプルを水溶性金属イオン、および酵素によりレドックス－活性剤に転換される酵素のレドックス－不活性基質と接触させることを含んでなり、このレドックス－活性剤は金属イオンを還元してその沈殿を生じる、請求項４８に記載の方法。

【請求項５３】
酵素がアルカリホスファターゼを含んでなる請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
シグナル発生部分がオキシドーレダクターゼ酵素を含んでなり、そして方法がさらに生物学的サンプルを水溶性金属イオン、酸化剤および還元剤と接触させることを含んでなる、請求項４８に記載の方法。
【請求項５５】
オキシドーレダクターゼ酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼを含んでなる、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
抗体が抗－抗体抗体を含んでなる、請求項４６に記載の方法。
【請求項５７】
抗体が抗－ハプテン抗体を含んでなり、そして方法がさらにサンプルをハプテン－標識化抗体またはハプテン－標識化核酸配列と接触させることを含んでなる請求項４６に記載の方法。
【請求項５７】
シグナル発生部分が酵素を含んでなり、そして方法がさらに生物学的サンプルを発色性、蛍光性および／または発光性化合物と接触させることを含んでなる、請求項４６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願データ
本出願は２００５年４月２８日に出願された特許文献１の利益を主張し、この出願は引用により本明細書に編入する。
【発明の背景】
【０００２】
発明の背景
１．分野
本発明は、生物学的サンプル中の目的分子を検出するための試薬および方法に関する。より詳細には、本発明は抗体コンジュゲートおよび組織切片のような生物学的サンプル中の目的分子を検出するためのそのようなコンジュゲートの使用法に関する。
２．背景
抗体およびシグナル発生部分の共有コンジュゲートは、生物学的サンプル中の特異的な標的分子を検出するためのイムノアッセイに使用することができる。そのようなコンジュゲートの抗体部分は、サンプル中の標的に特異的に結合し、そしてシグナル発生部分を利用して標的の存在／およびまたは場所を示す検出可能なシグナルを提供する。広く使用されるようになったコンジュゲートの１つの型、特に免疫組織化学的分析用のコンジュゲートは、抗体と酵素とのコンジュゲートである（抗体－酵素コンジュゲート）。検出可能なシグナルは、基質をサンプルに加え、そしてコンジュゲートの酵素部分が基質を、抗体部分がその標的に結合した部位で例えば着色、蛍光または発光生成物に転換することにより生成される。
【０００３】
抗体－酵素コンジュゲートは、典型的には少なくとも２つの反応性基を有することを特徴とする多官能性（多くは二官能性）カップリング試薬を使用して調製され、その１つは抗体上の官能基と反応し、そしてもう１つは酵素上の官能基と反応する。しかし立体的効果により、あるいはカップリング試薬が抗体および酵素の機能または特異性に重要な酵素または抗体の一部に位置する官能基と反応するので、カップリングは抗体および酵素のいずれかまたは両方の不活性化を導く恐れがある。
【０００４】

抗体の特異性および酵素活性の損失を最少にするための取り組みは、それらの機能とは関係しない抗体および酵素のいずれか、もしくは両方の特定のアミノ酸残基に対して特異的なカップリングスキームを使用することである。この取り組みは、引用により本明細書に編入する特許文献２に記載されたＦｃ－特異的結合に関する方法により例示される。この方法では、スルフヒドリル基（チオール基）が抗体のＦｃ部分のグリコシル化領域に特異的に導入され、そしてリンカー分子と一緒に使用されて酵素を抗体に共有的に結合する。Ｆｃ部分は抗体の特異的結合特性に関与しないので、そのようなコンジュゲートはより大きな特異性を保持し、これが目的の特定の標的分子に関する検出可能なシグナルを増し、そして非特異的結合によるバックグラウンドを下げる。

【０００５】

部位特異的結合は、重要な官能基の損失による抗体の特異性および酵素活性の損失を最少にするための手助けとして使用することができるが、そのような方法は、多数のコンジュゲートの凝集により、およびコンジュゲート中の抗体と酵素（１もしくは複数）との間の相互作用からのような立体効果から生じる抗体の特異性および酵素活性の損失に取り組んではいない。有害な立体効果は、コンジュゲート組成物の調製中に起こる複数の酵素、抗体および／またはコンジュゲート間の意図せぬ架橋結合から生じる可能性もある。

【０００６】

立体効果による抗体の特異性および酵素活性の損失を最少にする１つの取り組みは、抗体と酵素をより長い距離で分けるために、カップリング試薬の長さを増すことである。この取り組みは特許文献３に開示された方法および結合試薬により例示される。この方法では、抗体を酵素（１もしくは複数）にカップリングするために延長されたアルキル、シクロアルキル、アルキル－シクロアルキルおよび芳香族部分を有するヘテロ官能性リンカーが使用される。そのようなリンカーはより多くの原子を含み、そして抗体と酵素（１もしくは複数）との間により大きな分離を提供するはずであるが、そのようなリンカーの疎水的性質が疎水的効果により水溶液中でコンジュゲートの有害な凝集を上昇させると考えられる。さらにそのようなリンカーは、コンジュゲートが疎水的効果によりそれ自体で内外から崩壊してそのサイズが最小になる時、抗体と酵素（１もしくは複数）との間の有害なコンジュゲート内相互作用が可能になるほど十分に柔軟である。

【０００７】

コンジュゲート間の有害な凝集を最少とする試みは特許文献４に記載され、これは抗体－酵素コンジュゲートを調製するためにホモ－二官能性、ビス－マレイミドポリアルキレングリコールリンカーの使用を記載する。しかしそのようなホモ－二官能性リンカーの使用は、コンジュゲートの調製中に抗体、酵素および／またはコンジュゲートの架橋結合を導くことができる。架橋結合は平均サイズを上げ、そしてグリコールリンカーを使用することにより付与される水溶性の上昇をある程度、中和する。さらに架橋結合はコンジュゲート組成における単分散性を下げることを導き、これは特にコンジュゲートを用いた標的の検出が細胞膜を介する拡散に限定され得る組織および細胞サンプルにおいて、結果の一貫性に有害な効果を有する恐れがある。

【０００８】

いくつかのヘテロ二官能性ポリエチレングリコールリンカーが知られているが、それらを抗体－酵素コンジュゲートを形成するためのカップリング試薬として使用するための試みは知られていない。むしろＣｈｅｎ ｅｔ ａｌ（非特許文献１：タンパク質のカップリングおよびコラーゲンマトリックスの架橋結合のための二官能性ポリエチレングリコール誘導体の使用：Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｆｏｒ ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｔｏ ａｎｄ ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｉｎｇ ｏｆ ｃｏｌｌａｇｅｎ ｍａｔｒｉｃｅｓ）に開示されているように、そのような試薬は、活性なタンパク質が組織工学の目的で連結される分解性マトリックスを調製するために使用されてきた。

【０００９】

所定の抗体コンジュゲートにより生成されるシグナル増加の観点から、多数の酵素を単

一抗体に結合することが望ましい。しかし単一の抗体に連結する酵素の数が上がると、単一抗体の回りに多数の酵素が込み合うことによる立体的理由によりコンジュゲートの機能が損なわれる見込みも上昇する。込み合う酵素を最少にする１つの取り組みは、酵素間および酵素と抗体または抗体フラグメントとの間の分離を提供するためのスカフォールドを使用することである。例えば特許文献５および特許文献６は、酵素間の分離を増すと同時に、特異的結合成分［特異的なＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント］あたりの酵素分子の数も効果的に上げるためのポリリシンまたはデキストランスカフォールドの使用を記載する。これらの特許では、この取り組みが特異的結合成分あたりのシグナル発生部分の平均数を上げるが、ポリマー性スカフォールド（典型的には低い単分散性の）の使用がバックグラウンドを上げ、そして再現性を下げることを記載する。そのような構築物の高分子量（典型的には＞１ＭＤａより大きい）が、拡散を妨害し、そして組織／細胞透過性を減らし、これによりシグナルが低下する。

【００１０】

したがって必要とされているのは、少なくとも記載されている従来技術の限定された取り組みを克服する抗体／シグナル発生コンジュゲート組成物である。特に小さいながらも、より大きなスカフォールドコンジュゲートの高いシグナル発生能を保持する酵素の抗体コンジュゲート（およびその作成法）が望まれている。

【参考文献】

【００１１】

【特許文献１】米国特許仮出願第６０／６７５，７５９号明細書
【特許文献２】米国特許第５，１９１，０６６号明細書
【特許文献３】米国特許第５，０５３，５２０号明細書
【特許文献４】米国特許第４，８１０，６３８号明細書
【特許文献５】米国特許第６，２５２，０５３号明細書
【特許文献６】米国特許第６，６１３，５６４号明細書
【非特許文献１】Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｓｃｉ．Ｍａｔｅｒ．Ｍｅｄ．，１３：１０２９－１０３５，２００２

【発明の開示】

【００１２】

発明の要約

シグナル発生部分を持つ抗体コンジュゲートが開示され、このコンジュゲートの作成および使用法も開示される。開示する抗体コンジュゲートは、生物学的サンプル中の目的分子の検出、特に組織切片および細胞学サンプル中のそのような分子の検出に優れた性能を現す。特に開示する抗体－酵素コンジュゲートは、高量の抗体特異性および酵素活性を保持し、そしてこれにより生物学的サンプル中の抗原の検出に現在使用されているコンジュゲートよりも強力な染色を低いバックグラウンドで提供する。

【００１３】

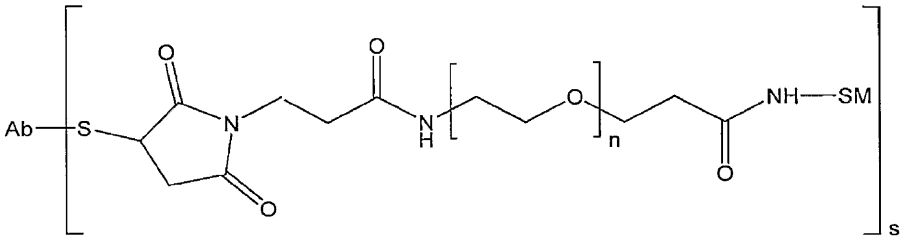
１つの観点では、ヘテロ二官能性ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーのようなヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーを介してシグナル発生部分と共有結合された抗体を含むコンジュゲートが開示される。１つの態様では、開示されるコンジュゲートは、抗体、およびカルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基および光反応性基から選択される２つの異なる反応性基の組み合わせを含むヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーにより共有結合されたシグナル発生部分を含む。特定の態様では、ＰＥＧリンカーはチオール反応性基およびアミン反応性基の組み合わせ、またはカルボニル反応性基およびチオール反応性基の組み合わせを含む。より詳細な態様では、チオール反応性基はマレイミド基を含み、アミン反応性基は活性エステルを含み、そしてカルボニル反応性基はヒドラジン誘導体を含む。

【００１４】

さらに一層詳細な態様では、開示するコンジュゲートは、一般式：

【００１５】

【化１】



【００１６】

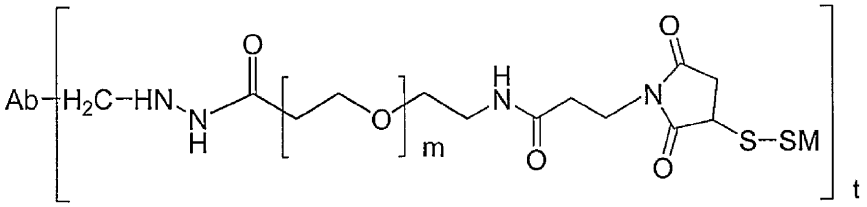
式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり（例えば酵素）、そしてｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝２～２０またはｎ＝４～１２のような）、そしてｓ＝１～１０（ｓ＝２～６またはｓ＝３～４のような）である、
を有する。

【００１７】

さらに別の一層詳細な態様では、開示するコンジュゲートは式：

【００１８】

【化２】



【００１９】

式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり（酵素のような）、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝２～２０またはｍ＝４～１２のような）、そしてｔ＝１～１０（ｔ＝２～６またはｔ＝３～４のような）である、
を有する。場合によりＰＥＧリンカーのヒドラジド基は抗体のグリコシル化部分に形成されたアルデヒド基の炭素に酸化により結合される。

【００２０】

別の観点では、開示するコンジュゲートの作成法が提供される。１つの態様では、抗体コンジュゲートの作成法は抗体からチオール化抗体を形成し；アミン基を有するシグナル発生部分をＰＥＧマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて、活性化シグナル発生部分を形成し；そしてチオール化抗体を活性化シグナル発生部分と反応させて、抗体およびシグナル発生部分のコンジュゲートを形成することを含む。チオール化抗体は、抗体に固有のシステイン架橋の還元剤による還元により形成され得るか、または抗体を、チオールを抗体に導入する試薬と反応させることにより形成され得る。

【００２１】

別の態様では、開示する抗体コンジュゲートの作成法には、抗体をオキシダントと反応させて、アルデヒドを持つ抗体を形成し；アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させてチオール反応性抗体を形成し；そしてチオール反応性抗体をチオール化シグナル発生部分と反応させて抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを形成することを含む。特定の態様では、抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成することは、抗体のグリコシル化領域を酸化して（過ヨウ素酸塩、臭素またはヨウ素を用いるような）、アルデヒドを持つ抗体を形成することを含む。

【００２２】

別の観点では、開示する方法に使用して、開示するコンジュゲートを提供することができるＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーが開示される。さらに別の観点では、開示するコンジュゲートを使用して生物学的サンプル中の分子を検出するための方法が開示される。開示のこれらのおよびさらなる観点、態様および特徴は、以下の詳細な説明

および実施例から明らかとなるだろう。

【００２３】

幾つかの具体的態様の詳細な説明

本発明のさらなる観点は、以下の非限定的例により具体的に説明され、これは以下に定義する略号および用語について始める。

Ｉ．略号

２－ＭＥ	２－メルカプトエタノール
２－ＭＥＡ	２－メルカプトエチルアミン
Ａｂ	抗体
ＡＬＰ	アルカリホスファターゼ
ＢＳＡ	ウシ血清アルブミン
ＤＴＥ	ジチオエリスリトール（シス－２，３－ジヒドロキシ－１，４－ジチオールブタン）
ＤＴＴ	ジチオスレイトール（トランス－２，３－ジヒドロキシ－１，４－ジチオールブタン）
ＥＧＦＲ	上皮増殖因子受容体
ＥＲ	エストロゲン受容体
ＨＲＰ	西洋ワサビペルオキシダーゼ
ＩＨＣ	免疫組織化学
ＩＳＨ	ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション
ＭＡＬ	マレイミド
ＮＨＳ	Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド
ＰＥＧ	ポリエチレングリコール
ＰＲ	プロゲステロン受容体
ＳＡＭＳＡ	Ｓ－アセチルメルカプトコハク酸
ＳＡＴＡ	Ｎ－スクシンイミジルＳ－アセチルチオアセテート
ＳＡＴＰ	スクシンイミジル　アセチル－チオプロピオネート
ＳＭ	シグナル発生部分
ＳＭＰＴ	スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン
ＳＰＤＰ	Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート
ＴＣＥＰ	トリス（カルボキシエチル）ホスフィン

【００２４】

ＩＩ．用語

用語「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、内容が明確に他を示さない限り、単数および複数の両方の指示対称を含む。

【００２５】

用語「抗体」は、集合的に免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ、その組み合わせ、および任意の脊椎動物例えばヒト、ヤギ、ラット、ウサギおよびマウスのような哺乳動物における免疫応答中に生産される類似分子を含む）、および目的分子（または目的分子に高度に類似性の群）に、他の分子（例えば生物学的サンプル中の他の分子の結合定数よりも少なくとも$10^3 M^{-1}$より大きい、$10^4 M^{-1}$より大きく、または$10^5 M^{-1}$より大きい目的分子への結合定数を有する抗体および抗体フラグメント）の結合を実質的に排除する程度まで、特異的に結合する抗体フラグメントを含む。抗体フラグメントにはタンパク質分解抗体フラグメント［当該技術分野で知られているＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントおよびＦａｂフラグメントのような］、組換え抗体フラグメント（当該技術分野で知られているｓＦｖフラグメント、ｄｓＦｖフラグメント、二重特異性ｓＦｖフラグメント、二重特異性ｄｓＦｖフラグメント、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）およびトリアボディ（ｔｒｉａｂｏｄｉｅｓ）のような）、および特許請求されてい

る抗体（例えば米国特許第６，０１５，６９５号；同第６，００５，０７９号；同第５，８７４，５４１号；同第５，８４０，５２６号；同第５，８００，９８８号；および同第５，７５９，８０８号明細書を参照にされたい）を含む。

【００２６】

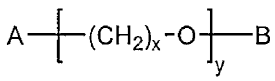
「目的分子」という句は、存在、場所および／または濃度が測定される分子を指す。目的分子の例には、ハプテンで標識されたタンパク質および核酸配列を含む。

ＩＩＩ．概説

１つの観点では、以下に表す一般構造

【００２７】

【化３】



【００２８】

式中、ＡおよびＢは異なる反応性基を含み、ｘは２～１０の整数であり（２、３もしくは４のような）、そしてｙは３～２０または４～１２のような１～５０の整数、例えば２～３０である、

を有するヘテロ二官能ポリアルキレングリコールリンカーを介してシグナル発生部分に共有結合された抗体を含む抗体／シグナル発生部分コンジュゲートが開示される。１または複数の水素原子は、ヒドロキシル基、アルコキシ基（メトキシおよびエトキシのような）、ハロゲン原子（Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ）、スルファト基およびアミノ基（ジアルキルアミノ基のようなモノ－およびジ－置換アミノ基を含む）のようなさらなる官能基に置換され得る。

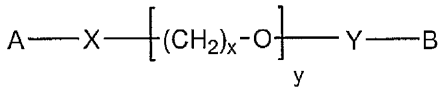
【００２９】

リンカーのＡおよびＢは、独立してカルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基、または光反応性基を含むことができるが、同じではない。カルボニル反応性基の例にはヒドラジン誘導体およびアミンのようなアルデヒドおよびケトン反応性基を含む。アミン反応性基の例には、ＮＨＳまたはスルホ－ＮＨＳ、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、スルホニルクロライド、アルデヒド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、カーボネート、アリールハライド、イミドエステル、無水物等のような活性エステルを含む。チオール反応性基の例には、非重合性ミハエル受容体、ハロアセチル基（ヨードアセチルのような）、アルキルハライド、マレイミド、アジリジン、アクリロイル基、ビニルスルホン、ベンゾキノン、フルオロベンゼン基（テトラおよびペンタフルオロベンゼン基のような）のような求核性置換を受けることができる芳香族基、およびピリジルジスルフィド基のようなジスルフィド基およびエルマン試薬で活性化されるチオールがある。光活性基の例には、アリールアジドおよびハロゲン化アリールアジドを含む。このような各種類の基のさらなる例は、当業者には明らかである。反応条件および１つの種類の反応性基の別の反応性基への交換法に関するさらなる例および情報は、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、「生物コンジュゲート技術（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）」、アカデミックプレス（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）、サンディエゴ、１９９６に提供されており、これは引用により本明細書に編入する。特定の態様では、チオール反応性基はビニルスルホン以外である。

【００３０】

幾つかの態様では、ヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は、抗体に共有結合され、そしてヘテロ二官能性リンカーのアミン反応性基がシグナル発生部分に共有結合されているか、またはその逆である。例えばヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は、抗体のシステイン残基（システイン架橋の還元により形成されるような）に共有結合されることができ、あるいはヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基は、抗体に導入されたチオール基に共有結合されることができ、そしてアミン反応性基はシグナル発生部分に共有結合される。

【００３１】
あるいはヘテロ官能性リンカーのアルデヒド反応性基は、抗体に共有結合されることができ、そしてヘテロ官能性リンカーのアミン反応性基は、シグナル発生部分に共有結合されることができ、あるいはその逆であることもできる。特定の態様では、ヘテロ官能性リンカーのアルデヒド反応性基は、抗体のグリコシル化部分上に形成されたアルデヒドに共有結合されることができ、そしてアミン反応性基はシグナル発生部分に共有結合される。
【００３２】
さらに別の態様では、ヘテロ二官能性リンカーのアルデヒド反応性基は抗体に共有結合され、そしてヘテロ官能性リンカーのチオール反応性基は、シグナル発生部分に共有結合されるか、あるいはその逆である。
【００３３】
シグナル発生部分の例には酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼまたはβ－ラクタマーゼのような）、蛍光分子（フルオレセイン、クマリン、ＢＯＤＩＰＹ色素、レゾルフィンおよびローダミン：さらなる例は、ハンドブック－蛍光プローブおよび標識化技術のガイド（Ｈａｎｄｂｏｏｋ－Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、インビトロジェン コーポレーション（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、ユージーン、オレゴン州に見いだすことができる）、検出可能な構築物（量子ドットのような蛍光構築物、これは例えばインビトロジェンコーポレーション、ユージーン、オレゴン州から得ることができる；例えば米国特許第６，８１５，０６４号、同第６，６８２，５９６号および同第６，６４９，１３８号明細書を参照にされたい。これら特許のそれぞれは、引用により本明細書に編入する）、金属キレート（Gd^{3+}のような放射活性または常磁性金属イオンのＤＯＴＡおよびＤＰＴＡキレートのような）、およびリポソーム（蛍光分子を封鎖するリポソームのような）を含む。
【００３４】
シグナル発生部分が酵素を含む場合、発色化合物、蛍光化合物または発光化合物を酵素と組み合わせて使用して、検出可能なシグナルを生成する（広い様々な種類のそのような化合物が、例えばモレキュラープローブ社（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．）、ユージーン、オレゴン州から入手可能である）。発色化合物の特定の例には、ジ－アミノベンジジン（ＤＡＢ）、４－ニトロフェニルホスフェート（ｐＮＰＰ）、ファーストレッド、ブロモクロロインドリルホスフェート（ＢＣＩＰ）、ニトロブルーテトラゾリウム（ＮＢＴ）、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ、ファーストレッド、ＡＰオレンジ、ＡＰブルー、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、２，２’－アジノ－ジ－［３－エチルベンゾチアゾリンスルホネート］（ＡＢＴＳ）、ｏ－ジアニシジン、４－クロロナフトール（４－ＣＮ）、ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＯＮＰＧ）、ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－ガラクトピラノシド（Ｘ－Ｇａｌ）、メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＭＵ－Ｇａｌ）、ｐ－ニトロフェニル－α－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＰＮＰ）、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルクロニド（Ｘ－Ｇｌｕｃ）、３－アミノ－９－エチルカルバゾール（ＡＥＣ）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（ＩＮＴ）、テトラゾリウムブルーおよびテトラゾリウムバイオレットがある。
【００３５】
特定の態様では、コンジュゲートのヘテロ二官能性リンカーは式：
【００３６】
【化４】



【００３７】

を有し、

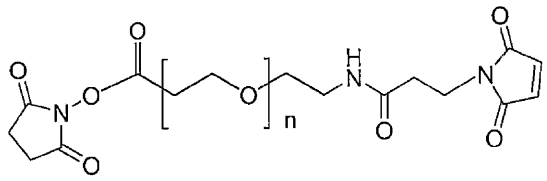
式中、ＡおよびＢは前のような異なる反応性基を含み、ｘおよびｙは前の通りであり、そしてＸおよびＹはスペーサー基、例えば１と６との間の炭素、または１と４との間の炭素のような１と１０との間の炭素を有するスペーサー基であり、そして場合により１もしくは複数のアミド連結、エーテル連結、エステル連結等を含んでよい。スペーサーＸおよびＹは同じか、または異なることができ、そして直鎖、分岐または環式（例えば脂肪族もしくは芳香族環式構造）であることができ、そして非置換または置換されることができる。スペーサー上の置換基であることができる官能基には、カルボニル基、ヒドロキシル基、ハロゲン（Ｆ、Ｃｌ、ＢｒおよびＩ）原子、アルコキシ基（メトキシおよびエトキシのような）、ニトロ基およびスルファト基がある。

【００３８】

別の特定の態様では、ヘテロ二官能性リンカーは式：

【００３９】

【化５】



【００４０】

式中、ｎ＝１～５０、例えばｎ＝３～２０またはｎ＝４～１２のようなｎ＝２～３０である、

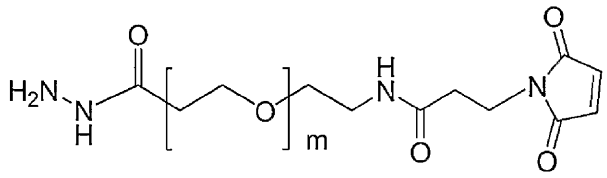
を有するヘテロ二官能性ポリエチレングリコールリンカーである。さらに詳細な態様では、このリンカーのスクシンイミド基のカルボニルはシグナル発生部分のアミン基に共有結合され、そしてリンカーのマレイミド基は抗体のチオール基に共有結合されるか、あるいはその逆である。さらに他の特定の態様では、平均約１から約１０の間のシグナル部分が抗体に共有結合している。

【００４１】

幾つかの特定の態様では、ヘテロ二官能性リンカーは式：

【００４２】

【化６】



【００４３】

式中、ｍ＝１～５０、例えばｍ＝３～２０または４～１２のようなｍ＝２～３０である、

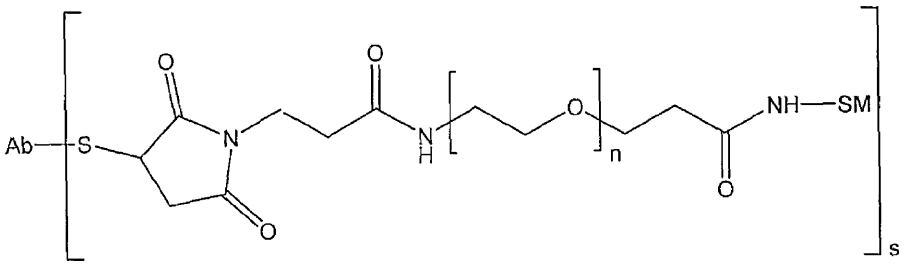
を有する。幾つかのさらに詳細な態様では、このリンカーのヒドラジド基は抗体のアルデヒド基に共有結合され、そしてリンカーのマレイミド基はシグナル発生部分のチオール基に共有結合されるか、あるいはその逆である。さらに一層詳細な態様では、抗体のアルデヒド基は、抗体のＦｃ部分のグリコシル化領域の酸化により抗体のＦｃ部分に形成されたアルデヒド基である。さらに別の詳細な態様では、平均約１から約１０の間のシグナル発生部分が抗体に共有結合されており、そのようなシグナル発生部分は、酵素、量子ドットおよびリポソームを含む。

【００４４】

他の特定の態様では、ヘテロ二官能性ＰＥＧ－連結抗体－シグナル発生部分コンジュゲートは、式：

【００４５】

【化７】



【００４６】

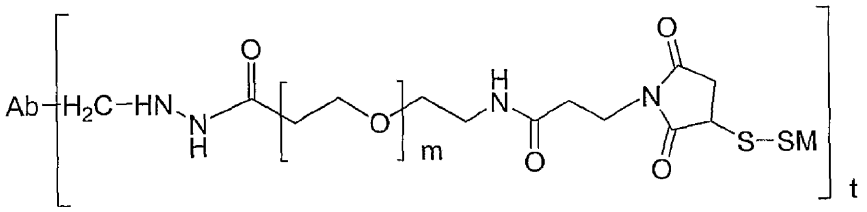
式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり、そしてｎ＝１～５０（ｎ＝２～３０、ｎ＝２～２０またはｎ＝４～１２のような）、そしてｓ＝１～１０（ｓ＝２～６またはｓ＝３～４のような）である、
を有するコンジュゲートを含んでなる。

【００４７】

さらに別の態様では、ヘテロ二官能性ＰＥＧ－連結抗体－シグナル発生部分コンジュゲートは、式：

【００４８】

【化８】



【００４９】

式中、Ａｂは抗体であり、ＳＭはシグナル発生部分であり、ｍ＝１～５０（ｍ＝２～３０、ｍ＝２～２０またはｍ＝４～１２のような）、そしてｔ＝１～１０（ｔ＝２～６またはｔ＝３～４のような）である、
を有するコンジュゲートを含んでなる。

【００５０】

開示されるコンジュゲートに使用する抗体は、任意の特定の分子または高度に類似の分子の特定の基に特異的に結合することができるが、特定の態様では、抗体は抗－ハプテン抗体（これは目的の核酸配列に向けられたハプテン－標識化プローブ配列を検出するために使用され得る）、またはサンプル中に存在し得る特定のタンパク質または特定のタンパク質の形態（タンパク質のリン酸化形態のような）に特異的に結合する抗体を含んでなる。ハプテンは、抗体により特異的に結合される低有機分子であるが、それら自体では動物に免疫応答を誘導せず、そして免疫応答を生じるためには最初にタンパク質またはポリ－核酸のような大きいキャリアー分子に連結されなければならない。ハプテンの例には、ジ－ニトロフェノール、ビオチンおよびジゴキシゲニンがある。さらに別の特定の態様では、抗体はイムノアッセイで２次抗体として使用することができる抗－抗体抗体を含んでなる。例えば抗体は、抗－マウスＩｇＧ抗体、抗－ウサギＩｇＧ抗体または抗－ヤギＩｇＧ抗体のような抗－ＩｇＧ抗体を含んでなることができる。

【００５１】

開示する抗体コンジュゲートは、免疫組織化学的結合アッセイを含め任意の種類の結合イムノアッセイで目的分子を検出するために利用することができる。１つの態様では、開示するコンジュゲートはイムノアッセイにおける標識化１次抗体、例えば特定分子またはハプテン標識化分子に向けられた１次抗体として使用される。あるいは目的分子がマルチエピトープ性である場合、複数のエピトープに向けられたコンジュゲートの混合物を使用

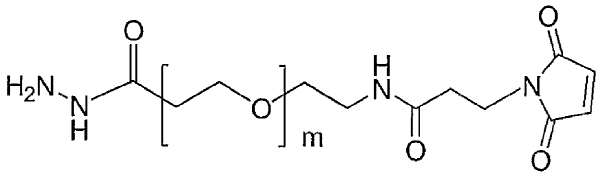
することができる。別の態様では、開示するコンジュゲートはイムノアッセイにおける２次抗体として使用される（例えば目的の分子に結合する１次抗体に向けられる；目的分子はマルチエピトープ性である場合、サンドイッチ型のアッセイにおいて２つの１次抗体により結合され得る）。さらに別の態様では、１次抗体により結合された目的分子によるシグナルのさらなる増幅を提供するために、開示するコンジュゲートの混合物が使用される（目的分子はサンドイッチ型のアッセイでは２つの１次抗体により結合され得る）。例えば混合物中の第１コンジュゲートは、目的分子に結合する１次抗体に向けられ、そして第２コンジュゲートは第１コンジュゲートの抗体部分に向けられ、これにより目的分子の部位により多くのシグナル発生部分が局在する。開示するコンジュゲートを使用することができる他の型のアッセイは、当業者には直ちに明白である。

【００５２】

別の観点では、式：

【００５３】

【化９】



【００５４】

式中、ｍ＝１～５０、例えばｍ＝３～２０またはｍ＝４～１２のようなｍ＝２～３０である、

を有するヘテロ二官能性リンカーが開示される。

【００５５】

さらに別の観点では、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを調製する方法が開示され、この方法は抗体からチオール化抗体を形成し；アミン基を有するシグナル発生部分をＰＥＧマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて、活性化シグナル発生部分を形成し；そしてチオール化抗体を活性化シグナル発生部分と反応させて、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを形成することを含む。チオール化抗体は、抗体を還元剤と反応させてチオール化抗体を形成することにより形成することができ、例えば抗体を還元剤と反応させて、抗体あたり約１から約１０の間の平均チオール数を有するチオール化抗体を形成する。抗体あたりのチオールの平均数は滴定により決定することができる。還元剤の例には２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤を含む。特定の態様では、還元剤はＤＴＴおよびＤＴＥおよびそれらの組み合わせからなる群から選択され、そして約１ｍＭから約４０ｍＭの間の濃度で使用される。

【００５６】

あるいはチオール化抗体を形成することは、チオール基を抗体に導入することを含む。例えばチオール基は、２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬を用いた反応により抗体に導入することができる（例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、「生物コンジュゲート技術（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）」、アカデミックプレス、サンディエゴ、１９９６を参照にされたい。これは引用により本明細書に編入する）。さらに詳細な態様では、チオール基を抗体に導入することは、抗体をオキシダント（過ヨウ素酸塩、I_2、Br_2またはそれらの組み合わせ）と反応させて抗体の糖部分をアルデヒド基に変換し、そして次にアルデヒド基をシスタミンと反応させることを含む。

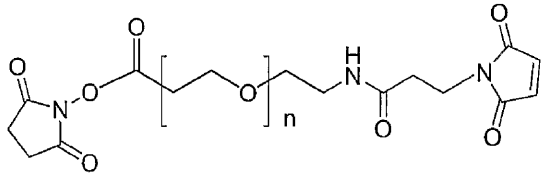
【００５７】

別の詳細な態様では、シグナル発生部分をＰＥＧマレイミド／活性エステル二官能性リンカーと反応させて、活性化シグナル発生部分を形成することは、シグナル発生部分を式

：

【００５８】

【化１０】



【００５９】

式中、ｎ＝１～５０、例えばｎ＝３～２０またはｎ＝４～１２のようなｎ＝２～３０である、

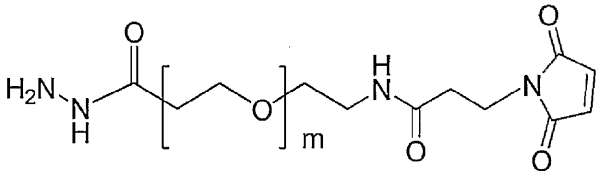
を有するＰＥＧマレイミド／活性エステルと反応させることを含む。シグナル発生部分は、例えば酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような）であることができる。

【００６０】

さらなる観点では、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを調製する方法が開示され、この方法は抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成し；アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーとを反応させて、チオール反応性抗体を形成し；そしてチオール反応性抗体を、チオール化シグナル発生部分を反応させて、抗体－シグナル発生部分コンジュゲートを形成することを含む。特定の態様では、抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成することは、抗体のグリコシル化領域を酸化して（例えば過ヨウ素酸塩を用いるような）アルデヒドを持つ抗体を形成することを含む。さらに詳細な態様では、抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成することは、抗体あたり平均約１から約１０の間のアルデヒド基を導入することを含む。別のより詳細な態様では、この方法に使用されるＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーは、式：

【００６１】

【化１１】



【００６２】

式中、ｍ＝１～５０、例えばｍ＝３～２０またはｍ＝４～１２のようなｍ＝２～３０である、

を有する。

【００６３】

チオール化シグナル発生部分は、シグナル発生部分（酵素のような）を還元剤（２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤のような）と反応させてチオール化シグナル発生部分を形成するか、あるいはチオール基を導入すること（例えばシグナル発生部分を、２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬と反応させることによる）により形成することができる。

【００６４】

さらに別の観点では、生物学的サンプル中の目的分子を検出する方法が開示され、この方法は生物学的サンプルを、ヘテロ二官能性ＰＥＧ連結抗体－シグナル発生部分コンジュゲートと接触させ；そして抗体－シグナル発生部分コンジュゲートにより生成されるシグナルを検出することを含む。生物学的サンプルは生体分子（タンパク質、核酸、脂質、ホ

ルモン等）を含有する任意のサンプルであることができるが、特定の態様では、生物学的サンプルは組織切片（生検から得られるような）、または細胞学サンプル（Ｐａｐスミアまたは血液スミアのような）を含む。特定の態様では、ヘテロ二官能性ＰＥＧ連結抗体－シグナル発生部分コンジュゲートは、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素に共有結合した抗体を含む。別の特定の態様では、ヘテロ二官能性ＰＥＧ連結抗体－シグナル発生部分コンジュゲートは、検出可能な構築物またはリポソームに共有結合された抗体を含む。

【００６５】

さらに詳細な方法では、シグナル発生部分はアルカリホスファターゼのような酵素を含んでなり、そして方法はさらに生物学的サンプルを水溶性金属イオン、および酵素によりレドックス－活性剤に転換される酵素のレドックス－不活性基質と接触させることを含んでなり、このレドックス－活性剤は金属イオンを還元してそれを沈殿させる（例えば２００４年１２月２０日に出願された同時継続出願である米国特許出願第１１／０１５，６４６号明細書、国際特許出願公開第２００５／００３７７７号パンフレット、および米国特許出願公開第２００４／０２６５９２２号明細書を参照にされたい：これらの各々は引用により本明細書に編入する）。別の特定の態様では、シグナル発生部分が酸化還元酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼのような）を含んでなり、そして方法がさらに生物学的サンプルを水溶性金属イオン、酸化剤および還元剤と接触させることを含んでなる（例えば引用により本明細書に編入する米国特許第６，６７０，１１３号明細書を参照にされたい）。

【実施例】

【００６６】

ＩＶ．実施例

以下の非限定的な実施例は、本発明の特定の観点をさらに具体的に説明するために提供される。

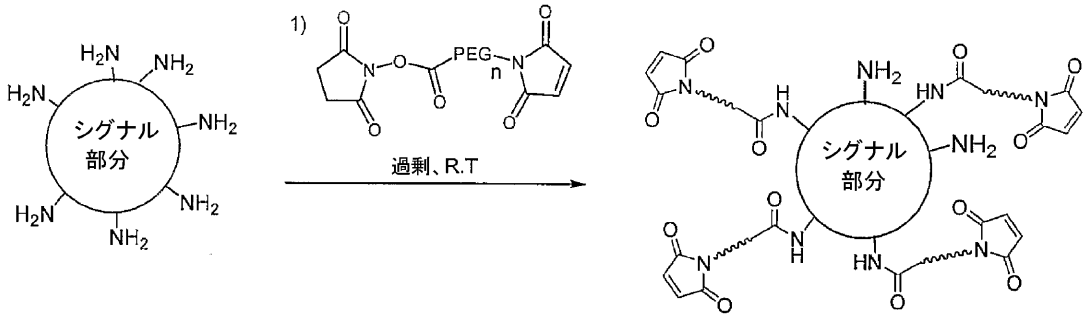
【００６７】

Ａ．マレイミドＰＥＧ活性エステルを使用した抗体－シグナル発生部分コンジュゲートの調製

１つの態様では、開示するシグナル発生部分コンジュゲートは以下のスキーム１～３に記載する方法に従い調製され、ここでヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、アミン－反応性基（活性エステル）およびチオール－反応性基（マレイミド）を有するポリエチレングリコールリンカーである。スキーム１に示すように、１もしくは複数の利用可能なアミン基を有するシグナル発生部分（酵素または量子ドットのような）を、過剰なリンカーと反応させて活性化シグナル発生部分を形成する。

【００６８】

【化１２】



スキーム1

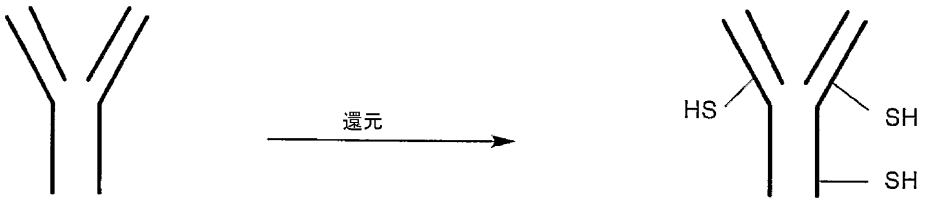
【００６９】

チオール基は、スキーム２に示すように抗体をＤＴＴのような還元剤で処理することにより抗体に導入される。ＤＴＥまたはＤＴＴのような穏やかな還元剤については、限定さ

れた数のチオール（約２から約６の間のような）を抗体に導入すると同時に、抗体を完全なまま維持するために（これはサイズ排除クロマトグラフィーにより測定することができる）、約１ｍＭから約４０ｍＭの間の濃度（例えば約５ｍＭから約３０ｍＭの間、または約１５ｍＭから約２５ｍＭの間の濃度）が使用される。

【００７０】

【化１３】



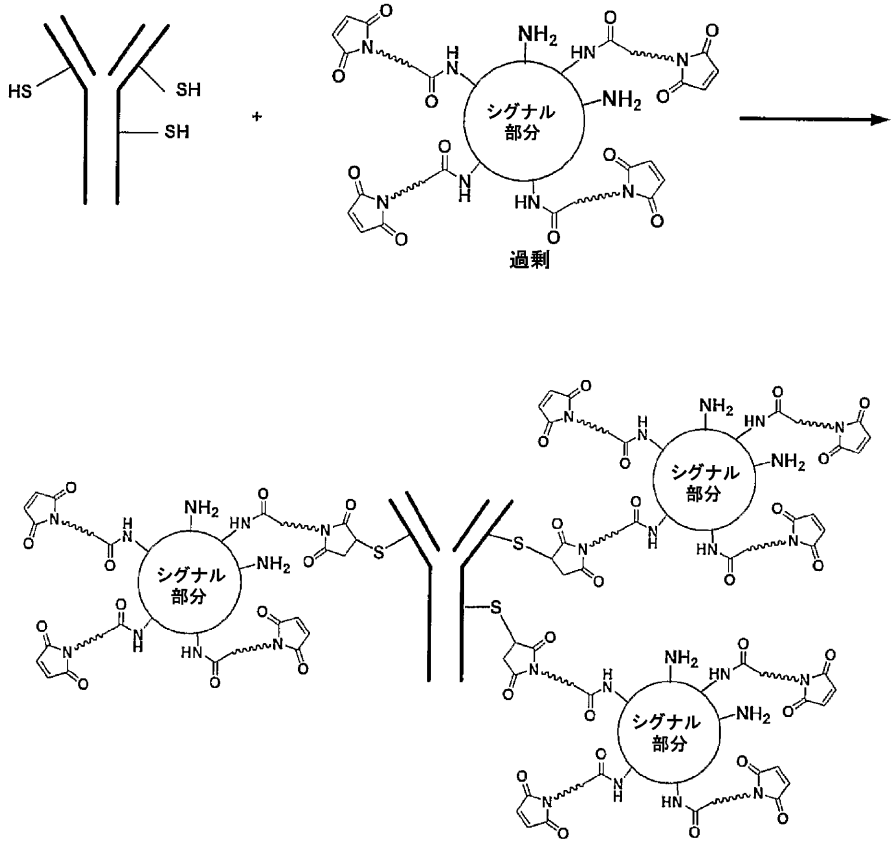
スキーム2

【００７１】

スキーム１および２に従い生成された成分は、次いで合わせてスキーム３に示すコンジュゲートを与える。

【００７２】

【化１４】



スキーム3

【００７３】

スキーム１～３はマレイミドＰＥＧ活性エステルに関する最適な方法を具体的に説明するが（ここでシグナル発生部分は、最初にアミン基をリンカーの活性エステルと反応させて、活性化シグナル発生部分を形成することにより活性化される）、抗体上のアミンもしくはチオールのいずれかをリンカーと反応させることにより最初に抗体を活性化し、次い

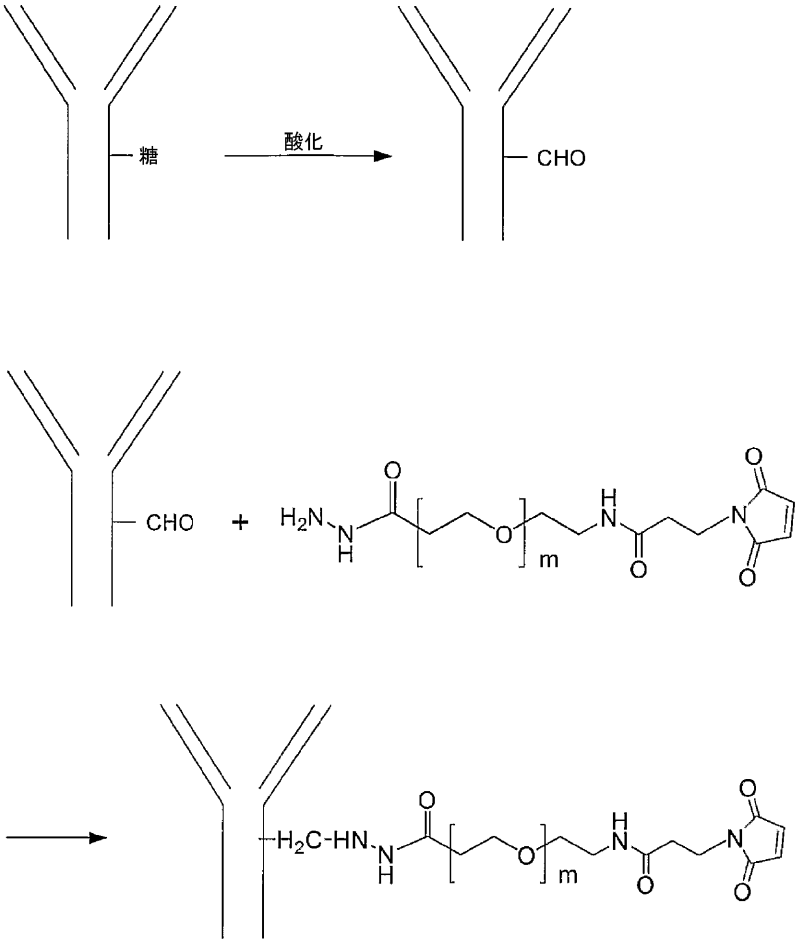
で活性化抗体をシグナル発生部分と反応させることも可能である［チオールもしくはアミンを適切なリンカー上の残る反応性基と反応させる］。さらにスキーム３では３つのシグナル発生部分が示されているが、複数の抗体をシグナル発生部分に、または任意の数のシグナル発生部分を単一の抗体に連結することも可能である。

【００７４】

別の態様では、抗体が結合のために活性化され、次いで以下のスキーム４および５に示すようにシグナル発生部分に結合される。スキーム４では、抗体がスキーム１に示すようなシグナル発生部分の代わりに活性化される。スキーム４の特定の態様では、糖部分（抗体のＦｃ部分のグリコシル化領域に位置するような）が最初に酸化されてアルデヒド基を提供し、次いでこれをリンカーのアルデヒド反応性基（具体的に説明するマレイミド／ヒドラジドＰＥＧリンカーのヒドラジド基のような）と反応させる。

【００７５】

【化１５】

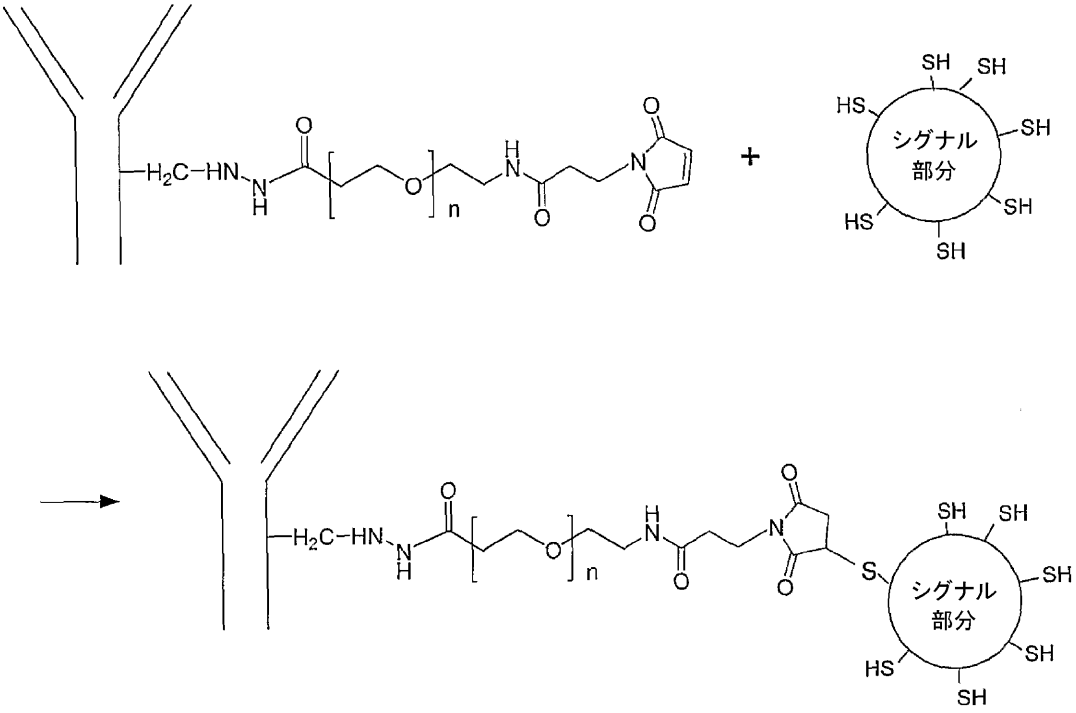


スキーム4

【００７６】

次にスキーム５に示すように、活性化された抗体のリンカー部分のチオール反応性基（具体的に説明するようにマレイミド基のような）を、シグナル発生部分のチオール基と反応させる。ここでも方法を逆転することができ、ここでリンカーは最初にシグナル発生部分上のアルデヒド基（例えば糖部分の酸化により形成された）と反応させて、活性化シグナル発生部分を形成し、次いで活性化シグナル発生部分を抗体上のチオール基と反応させることができる。さらにスキーム４および５は、単一抗体と単一のシグナル発生部分を連結する単一のリンカーのみを示しているが、複数のシグナル発生部分を単一の抗体に連結するか、または幾つかの抗体を単一のシグナル発生部分に連結することも可能であると考えられる。

【００７７】
【化１６】



スキーム5

【００７８】
Ｂ．抗体－西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートの調製
ＨＲＰの活性化
ＨＲＰは、例えばマレイミド基および活性エステル基（例えばクウォンタ　バイオデザイン（Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ）、ポーウェル、オハイオ州から入手可能なＭＡＬ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳ、ＭＡＬ－ＰＥＧ$_8$－ＮＨＳまたはＭＡＬ－ＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳリンカー）を有する１００倍モル過剰の二官能性ＰＥＧリンカーを用いて、周囲温度（２３～２５℃）で６０分間処理することにより結合のために活性化され得る。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００ＧＬカラムを通す精製の後、過剰なリンカーを含まないＨＲＰ（多くは５～７個のマレイミドを有する）を１００倍モル過剰で得る。ＭＡＬ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳリンカーを使用したＨＲＰ抗体コンジュゲートの生産のための例示の手順を以下に概略する。活性化ＨＲＰ上のマレイミド基の数は、実施例Ｄに詳細に記載する方法により測定できる。
【００７９】
ＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミド（１）：４ｍＬの琥珀色のバイアルに、７８．８ｍｇ（１００当量）のＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_4$（商標）ＮＨＳエステル（クウォンタ　バイオデザイン、ポーウェル、オハイオ州、Ｆ．Ｗ．＝５１３．５０）を加え、続いて２．４６ｍＬ（６１．５ｍｇ、１．５３μＭ）のＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、ピアス（Ｐｉｅｒｃｅ）、ロックフォード、イリノイ州、Ｌｏｔ　ＦＪ９２５９０１）を０．１Ｍのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５中の２５ｍｇ／ｍＬとして加えた。次いでバイアルを暗中、周囲温度（２３～２５℃）で自動回転機に置き、そして１時間アミド結合形成反応を進めた。次いで４００μｌのアリコートを精製のために取り出し、そして溶液の残りを４℃に一時的に保管した。次いで純粋なＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミドは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　１０／３００カラム（アマシャム、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）に充填したＡｋｔａ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒでサンプルを分画し、０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５にて１．０ｍＬ／分で溶出することにより得た。ＨＲＰを含有する画分をプールして、１％溶

液（ｐＨ６．５）で６．５２の２８０ｎｍでの吸光係数を使用してＵＶ／ＶＩＳ分光光度計により測定した時、ＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミドの２．０ｍｌの４．５２ｍｇ／ｍＬ溶液を得た（９０％収率）。

【００８０】

チオールの抗体への導入

結合用の抗体、例えば抗－マウスＩｇＧまたは抗－ウサギＩｇＧ抗体を活性化するために、抗体を２５ミリモルのＤＴＴと周囲温度（２３～２５℃）で２５分間インキュベーションした。ＰＤ－１０ＳＥカラムを通す精製後、ＤＴＴを含まない抗体、典型的には２～６個の遊離チオールを持つ抗体を得る（スキーム２）。ヤギ抗－マウスＩｇＧチオールを調製するために概略した例示の手順は、一般に他の抗体にも応用可能である。抗体あたりのチオール数は、実施例Ｄに記載するチオールアッセイにより測定することができる。

【００８１】

ヤギ抗－マウスＩｇＧ－チオール（２）：８ｍＬの琥珀色のバイアルに、４．１１ｍＬのヤギ－抗マウスＩｇＧ（ベチルモンゴメリー（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ）、テキサス州）を０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ　ＥＤＡＴ、ｐＨ６．５中の３．０１ｍｇ／ｍＬ溶液として加えた。この溶液に、２１６μＬの新たに調製した５００ｍＭの還元剤ＤＴＴ（１，４－ジチオスレイトール、シグマ－アルドリッチ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、セントルイス、モンタナ州）溶液を加えた。バイアルを暗中で自動回転台に置き、そしてジスルフィド還元を２５分間進めた。反応溶液を４つの等しい容量に分け（使用する脱塩カラムの能力の限界により）、そして過剰なＤＴＴは各画分をＰＤ－１０脱塩カラムに通し、０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ　ＥＤＡＴ、ｐＨ６．５で溶出することにより除去した。抗体を含有する画分を合わせて、ｐＨ６．５の１％溶液で１４の２８０ｎｍでの吸光係数を使用してＵＶ／分光光度計により測定した時、８．０ｍＬの１．２２ｍｇ／ｍＬのＤＴＴを含まないヤギ－抗－マウスＩｇＧ－ＳＨを得た（７８％収率）。

【００８２】

ＨＲＰ－抗体結合

チオール化抗体（抗－マウスＩｇＧ－チオールまたは抗－ウサギＩｇＧ－チオールのように）に、３倍モル過剰のＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミドを加える。次いで反応物を周囲温度（２３～２５℃）で１６時間インキュベーションする。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００ＧＬ　ＳＥカラムを通す精製後、典型的には抗体あたり平均２もしくは３個のＨＲＰを持つ抗体が得られる。抗体あたりのＨＲＰの数は、コンジュゲートの吸収を２８０／４０３ｎｍの比率で測定し、そして実施例Ｄの章に概略する計算を行うことにより決定する。例示的手順を以下に概略する。

【００８３】

ＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－ヤギ－抗－マウスＩｇＧ（３）：８ｍＬの琥珀色のバイアルに、４．０ｍＬのヤギ－抗マウスＩｇＧ－チオール溶液（１当量、４．８８ｍｇ、０．０３２６マイクロモル）および８６４μＬのＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミド溶液（１）（３当量、３．９１ｍｇ、０．０９７６マイクロモル）を加えた。次いでバイアルを周囲温度（２３～２５℃）で暗中にて自動回転台に置き、そしてミハエル添加を１６時間進めた。次いで遊離抗体および遊離ＨＲＰを含まないＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－ヤギ－抗－マウスＩｇＧコンジュゲートは、サンプルをＳｕｐｅｒｄｅｘ　１０／３００カラム（アマシャム、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）に充填したＡｋｔａ　ｐｕｒｉｆｉｅｒで分画し、０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐ７．５で０．９ｍＬ／分で溶出することにより得た。画分をプールして、コンジュゲートの９．７３ｍＬの１．０４ｍｇ／ｍＬ溶液を、実施例Ｃに記載するピアスのＣｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｐｌｕｓタンパク質アッセイにより測定するように得た。次いでコンジュゲートを使用するまで４℃で冷室に保存した。

【００８４】

Ｃ．抗体／酵素コンジュゲートのＭＷ特性決定

開示したコンジュゲートの優れた単分散性を具体的に説明するために、開示したコンジ

ュゲートの全１２例のＭＷプロファイル（具体的には、８種のＨＲＰ－抗－マウスＩｇＧコンジュゲートおよび４種のＨＲＰ－抗－ウサギＩｇＧコンジュゲート）を、サイズ排除クロマトグラフィーにより、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００ＧＬカラム（アマシャム、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）に充填したＡｋｔａ　ｐｕｒｉｆｉｅｒで、０．１Ｍリン酸ナトリウムバッファーｐＨ７．５で０．５～１．０ｍＬ／分で溶出することにより決定した。分子量のキャリブレーション標準には：アルドラーゼ（１５８ｋＤａ）、カタラーゼ（２３２ｋＤａ）、フェリチン（４４０ｋＤａ）、チログロビン（６６９ｋＤａ）、リボヌクレアーゼＡ（１３．７ｋＤａ）、キモトリプシノーゲン（２５ｋＤａ）、卵白アルブミン（４３ｋＤａ）およびアルブミン（６７ｋＤａ）を含んだ。調査したコンジュゲートは、約２３０から約３３０ｋＤａの間の平均ＭＷを有し、与えられたコンジュゲートのＭＷの全体的範囲は約１９０～５５０ｋＤａであった。精製したコンジュゲートの再注入では、コンジュゲートが非結合化ＨＲＰおよび抗体を含まないことが示された。

【００８５】

Ｄ．コンジュゲートを測定するための分析手順

以下の代表的方法は、マレイミドおよびチオール含量ならびにコンジュゲートあたりのＨＲＰ分子の数を測定するために使用することができる。

全タンパク質マイクロプレート法（ピアス）

【００８６】

装置および材料

ＢＳＡ	ピアス（ロックフォード、イリノイ州）
Ｃｏｏｍａｓｉｅ　Ｐｌｕｓ（商標）試薬	ピアス（ロックフォード、イリノイ州）
マイクロタイタープレート	ＢＩＯ－ＴＥＫ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴ
プレートリーダー	

【００８７】

手順：

１．プレートリーダーをつけ、そして少なくとも３０分間、５９５ｎｍでウォームアップする。

２．脱イオン水中に１組のＢＳＡ標準（１．０、０．５、０．２５および０．１２５ｍｇ／ｍＬ）を調製する。

３．３連で、１５ｍＬのブランク、および各標準または未知を適切なマイクロプレートウェルにピペットで入れる。

４．３００ｍｌのＣｏｏｍａｓｉｅ　Ｐｌｕｓ（商標）試薬を各ウェルに加え、そしてプレートシェーカーで３０秒間、混合する。

５．シェーカーからプレートを取り出す。最高に合致した結果のために、プレートを１０分間、室温でインキュベーションする。

６．プレートリーダーで５９５ｎｍの吸収を測定する。

７．ブランクレプリカに関する５９５ｎｍの平均測定値を、すべての他の個別標準および未知サンプルレプリカの５９５ｎｍの測定から差し引く（プレートリーダーにより自動的に行われた）。

８．各ＢＳＡ標準に関してブランク－補正した５９５ｎｍの測定の平均を、そのμｇ／ｍＬの濃度に対してプロットすることにより標準曲線を準備する。各未知サンプルのタンパク質濃度を決定するために標準曲線を使用する（プレートリーダーにより行なわれる）。

【００８８】

Ａｂ－チオールおよびＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－マレイミド含量の測定

装置および材料：

メルカプトエタノール	Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ，フィリップスバーグ、ニュージャージー州
エルマン試薬	ピアス、ロックフォード、イリノイ州
リン酸ナトリウム	

ＥＤＴＡ
【００８９】
材料の調製：
・反応バッファー：０．１Ｍリン酸ナトリウム；１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０。
・メルカプトエタノール（ＢＭＥ）：Ｍ．Ｗ．＝７８．３、ｄ＝１．１１４ｇ／ｍｌ。
【００９０】
手順：
１．プレートリーダーをつけ、そして少なくとも３０分間、４１２ｎｍでウォームアップする。
２．作業ストックを調製する：７μｌのＢＭＥを５ｍｌの反応バッファーに
３．３連で、以下のような１組のＢＭＥ標準を調製する。
【００９１】
【表１】

標準	反応バッファーの容量		最終濃度
標準ストック	900 μl	100μlの作業ストック	2 mM
標準1	500 μl	500μlの作業ストック	1 mM
標準2	500 μl	500μlの標準1	0.5 mM
標準3	500 μl	500μlの標準2	0.25 mM
標準4	500 μl	500μlの標準3	0.125mM
標準5	500 μl	500μlの標準4	0.0625 mM
標準6	500 μl	500μlの標準5	0.03125 mM
標準7	500 μl	500μlの標準6	0.015625 mM
標準8（ブランク）	1000 μl		0 mM

【００９２】
４．ＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－ＭＡＬをアッセイする場合、１６０μｌのサンプルを１６０μｌの標準１に加え、３０分間インキュベーションする。この混合物をＨＲＰ－ＰＥＧ$_4$－ＭＡＬサンプル用の未知として使用する。１００μｌのこの未知を適切なウェルに工程５に記載するように加える。
５．１００μｌの各標準または未知をマイクロタイタープレートの適切なウェルに加える（鋳型を取り付ける）。
６．エルマン試薬溶液を調製する。
【００９３】
エルマン試薬溶液：８ｍｇのエルマンを２ｍｌの反応バッファーに溶解する。
７．２０μｌのエルマン試薬を、標準または未知を含む各ウェルに加える。
８．混合し、そして室温で１５分間インキュベーションする。
９．プレートリーダーを使用して４１２ｎｍで吸収を測定する。
１０．生データのみを使用する場合、標準について得た値をプロットして標準曲線を作成する。
【００９４】

分析：
実験の濃度（ｍＭチオール）は、標準曲線から決定し、ここで標準曲線は式：Ｙ＝ｍＸ＋ｂ、式中、Ｙ＝ＯＤ$_{412nm}$、Ｘ＝ｍＭチオール、ｍ＝傾斜（標準曲線の式から得た）、およびｂ＝ｘ軸切片（標準曲線の式から得た）を与える。
【００９５】
各サンプルについて、ｍＭでのタンパク質濃度はｍｇ／ｍｌでのタンパク質濃度（全タンパク質アッセイから得た）をサンプルのＦＷで割り、そして１００を掛けることにより決定する。次いで抗体分子あたりのチオール数を、上から得たｍＭチオール実験濃度を、前段階から得たｍＭでのタンパク質濃度で割ることにより得る。西洋ワサビペルオキシダーゼ分子あたりのマレイミド数は、最初に上で得た実験のｍＭチオール濃度を０．５ｍＭから差し引き、次いでこの差異に２を掛け、そしてｍＭでのタンパク質濃度で割ることにより決定する。
【００９６】
抗体のチオール化の典型的範囲は、抗体分子あたり約１から約１０チオールの間であり、例えば約２から約４の間のような約２から約６の間である。ＨＲＰ分子あたりに取り込まれるマレイミド基の数の典型的範囲は、約１から約１０の間であり、例えば約５から約７の間のような約３から約８の間である。
【００９７】
抗体あたりのＨＲＰ数の決定
係数
・ＨＲＰ分子量＝４０，０００Ｄａ
・抗体分子量＝１５０，０００Ｄａ
・１パーセント溶液（１ｍｇ／ｍＬ）のＨＲＰの２８０ｎｍ吸光係数＝６．５２
・１パーセント溶液（１ｍｇ／ｍＬ）の抗体の２８０ｎｍ吸光係数＝１４
・４０３ｎｍでのＨＲＰ吸収／２８０での吸収＝２．９０（この値はＨＲＰの各異なるロットについて測定する）
【００９８】
計算
１）ＨＲＰによるコンジュゲートに起因する２８０ｎｍでの吸収を、４０３ｎｍでのコンジュゲートの吸収を測定し、そして式：４０３ｎｍでのＨＲＰ吸収／２．９０＝２８０ｎｍでのＨＲＰ吸収
に適用することにより決定する。
２）１で得た値から、ＨＲＰの量を式：２８０ｎｍでのＨＲＰ吸収／６．５２＝ｍｇ／ｍｌでの［ＨＲＰ］に適用することにより決定する。
３）ｍＭＨＲＰの数は、ｍｇ／ｍｌでのタンパク質濃度（２から得た）をＦＷ（４０，０００）で割り、そして１０００を掛けることにより決定する。
４）２次抗体によるコンジュゲートに起因する２８０ｎｍの吸収は、２８０ｎｍでのコンジュゲートの吸収を測定し、そして１で決定したＨＲＰによる吸収（ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎ）を差し引くことにより決定する。
５）４で得た値から、ｍｇ／ｍｌでのＨＲＰの量を、式：２８０ｎｍでの抗体の吸収／１４＝ｍｇ／ｍｌでの［抗体］に適用することにより決定する。
６）ｍＭ抗体の数は、ｍｇ／ｍｌでの抗体濃度をＦＷ（１５０，０００）で割り、そして１０００を掛けることにより決定する。
７）２次抗体あたりのＨＲＰの数は、ｍＭｏｌｅのＨＲＰ（３で決定した）を２次抗体のｍＭｏｌｅ数（６で決定した）により割ることにより算出する。
【００９９】
１パーセント溶液のＨＲＰ－抗体コンジュゲートの２８０ｎｍでの吸光係数の決定
１パーセント溶液（１ｍｇ／ｍＬ）のＨＲＰ－抗体コンジュゲートの２８０ｎｍでの吸光係数の決定は、コンジュゲートのタンパク質濃度を確認し、次いで２８０ｎｍでの吸収を測定することにより決定される。タンパク質濃度は、上記のピアスのクーマシーアッセ

イに従い測定することができる。

【０１００】

Ｅ．免疫組織化学的分析におけるコンジュゲートの安定性

ヤギ抗－マウスおよびヤギ抗－ウサギＨＲＰコンジュゲートのＩＨＣ中のカクテルの４５℃での安定性を、Ｂ５ブロッカー（ベンタナ　メディカル　システム（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）社、タゥーソン、アリゾナ州）で希釈したアビジン中で測定し、そして結果を図１Ａ～Ｄに示す。固定したパラフィン包埋ヒト扁桃組織切片を、ＣＤ２０／Ｌ２６（マウス）１次抗体を使用してプローブで釣り、続いてＢｅｎｃｈＭａｒｋ（商標）ＸＴ自動染色機（ベンタナ　メディカル　システム社、タゥーソン、アリゾナ州）の標準自動化プロトコールに従いＨＲＰコンジュゲートのカクテルを用いてＤＡＢ検出を行った。すべてのスライドは３連で行った。図１Ａは試験０日目の典型的な結果を示す；図１Ｂは試験１日目の典型的な結果を示す；図１Ｃは試験３日目の典型的な結果を示す；そして図１Ｄは試験７日目の典型的な結果を示す。たとえ４５℃の高温でも、開示したコンジュゲートは７日までに完全に分解せず（染色強度の３０～４０％の損失）、開示したコンジュゲートが高度に安定であることを示す。

【０１０１】

より長期間にわたる類似試験を２～８℃、２７℃および３７℃（データは示さず）の保存について行い、そしてさらに開示したコンジュゲートの優れた安定性を証明した。まとめると、２～８℃では０日から２週間の間に観察された染色強度に変化は無かった。ＣＤ２０について、２７℃で０日から２週間の間で観察された染色強度の変化はほとんど無かった。ＣＤ２０およびＰＳＡの両方について３７℃で、１週間にわたり染色強度に～約２５％の損失が、そして２週間後に染色強度に３０～５０％の損失が観察された。ＣＤ２０およびＰＳＡの両方について、２週間で染色強度には３０～５０％の損失がある。

【０１０２】

Ｆ．異なる１次抗体に対する２次抗体として、コンジュゲートのＩＨＣ性能の評価

ＭＡＬ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳリンカーで作成されたヤギ抗－マウスＩｇＧコンジュゲート、同じリンカーで作成されたヤギ抗－ウサギＩｇＧコンジュゲート、またはウサギ抗－マウスＩｇＧおよび２つのコンジュゲートの混合物（「増幅」）を、以下に掲げる１次抗体（ベンタナ　メディカル　システム社、タゥーソン、アリゾナ州から入手可能）の組織抗原への結合を検出する２次抗体試薬として使用した。適切な保管組織切片をこれらのコンジュゲートで処理し、そして自動化染色機（ＢｅｎｃｈＭａｒｋ（商標）ＸＴ、ベンタナ　メディカル　システム社、タゥーソン、アリゾナ州）でＨＲＰシグナル発生（ＤＡＢの添加による）に関する標準プロトコールを使用して発色した。典型的な自動化プロトコールには、脱パラフィン化、数回のすすぎ工程、反応バッファーの添加、１次抗体の添加、２次抗体の添加、ＤＡＢおよび過酸化水素の添加、そしてカウンター染色の添加を含む。

【０１０３】

比較可能な（隣接）組織切片は、開示したコンジュゲートおよび２次抗体試薬として使用するポリリシン－スカフォールド化ＨＲＰ／Ｆ（ａｂ’）$_2$コンジュゲート（今後、「スカフォールドコンジュゲート」と呼ぶ）で染色した。スカフォールドコンジュゲートは、第２世代のスカフォールドコンジュゲート（サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される、より小さい、より均一な）、または第１世代（サイズ排除クロマトグラフィーにより測定されるより大きな、より均一性が低い）のいずれかであった。スカフォールドコンジュゲートに関するさらに詳細な説明は、米国特許第６，６１３，５６４号および同第６，２５２，０５３号明細書を参照にされたい。

【０１０４】

抗体

抗－ｂｃｌ－２（クローン１００／Ｄ５）
抗－ＣＤ１５（クローンＭＭＡ）
抗－ＣＤ２０（クローンＬ２６）
抗－ＰＲ（クローン１６）
抗－ＣＤ５７（クローンＮＫ－１）
抗－ＣＤ２３（クローン１Ｂ１２）
抗－ＥＲ（クローン６Ｆ１１）
抗－ｐ５３（クローンＤ０７）

抗－ＥＧＦＲ（クローン３１Ｇ７）　　抗－サイクリン－ｄ１（クローンＰ２Ｄ１１Ｆ１１）
抗－ｃ－ｅｒｂＢ－２（クローンＣＢ１１）　抗－ＰＳＡ
＊注記：ウサギ抗体であるＰＳＡを除き、すべてはマウス抗体であった。

【０１０５】
図２は、開示したコンジュゲート（図２Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図２Ｂ）のｂｃｌ－２検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１０６】
図３は、開示したコンジュゲート（図３Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図３Ｂ）を使用したＣＤ－１５検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１０７】
図４は、開示したコンジュゲート（増幅を使用した、図４Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図４Ｂ）を使用したＣＤ－２０検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１０８】
図５は、開示したコンジュゲート（図５Ａ）、第２世代スカフォールドコンジュゲート（図５Ｂ）、および第１世代スカフォールドコンジュゲート（図５Ｃ）を使用したＣＤ－２３検出に関する染色結果を表す。結果は、両方スカフォールドコンジュゲートよりも高い強度の染色が、比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１０９】
図６は、開示したコンジュゲート（図６Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図６Ｂ）を使用したＣＤ５７検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１０】
図７は、開示したコンジュゲート（図７Ａ）、第２世代スカフォールドコンジュゲート（図７Ｂ）、および第１世代スカフォールドコンジュゲート（図７Ｃ）を使用したｃｅｒｂ－Ｂ２／ＣＢ１１検出に関する染色結果を表す。結果は、両方スカフォールドコンジュゲートで見られるよりも高い強度の染色が、比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１１】
図８は、開示したコンジュゲート（図８Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図８Ｂ）を使用したサイクリンＣＤ１検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１２】
図９は、開示したコンジュゲート（図９Ａ）、第２世代スカフォールドコンジュゲート（図９Ｂ）、および第１世代スカフォールドコンジュゲート（図９Ｃ）を使用したＥＧＦＲ検出に関する染色結果を表す。結果は、両方スカフォールドコンジュゲートで見られるよりも高い強度の染色が、比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１３】
図１０は、開示したコンジュゲート（図１０Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図１０Ｂ）を使用したＥＲ検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１４】
図１１は、開示したコンジュゲート（図１１Ａ）および第２世代スカフォールドコンジ

ュゲート（図１１Ｂ）を使用したｐ５３検出に関する染色結果を表す。結果は、比較可能な染色が比較可能な組織切片中、開示するコンジュゲートおよびスカフォールドコンジュゲートの間で達成されることを示す。

【０１１５】

図１２は、開示したコンジュゲート（図１２Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図１２Ｂ）を使用したＰＲ検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１６】

図１３は、開示したコンジュゲート（図１３Ａ）および第２世代スカフォールドコンジュゲート（図１３Ｂ）を使用したＰＳＡ検出に関する染色結果を表す。結果は、より高い強度の染色が比較できる組織切片中、開示したコンジュゲートで達成されることを示す。

【０１１７】

結論すると、開示するコンジュゲートの検出組成物の組織試験の結果は、開示するコンジュゲートがスカフォールドコンジュゲートよりも有意に良い組織染色を達成することを証明した。

【０１１８】

Ｇ．核酸配列の酵素金属組織学的検出のための３７℃および４５℃でのコンジュゲートの安定性

実験は４５℃および３７℃でヤギ抗－ウザキＩｇＧ抗体－ＨＲＰ（ＰＥＧ４）コンジュゲートの経時的安定性を評価するために行った。この場合、コンジュゲートの安定性は核酸配列の酵素金属組織学的検出（ＥｎｚＭｅｔ、ナノプローブ（Ｎａｎｏｐｒｏｂｅ）社、ヤップハンク、ニューヨーク州）が関与するアッセイで評価した。図１４に具体的に説明するように、ビオチン－標識プローブＤＮＡを抗－ビオチンウサギコンジュゲートおよび抗－ウサギＩｇＧコンジュゲートの組み合わせを用いて検出した。コンジュゲートの混合物は希釈剤としてＳｔａｂｉｌｚｙｍｅ　Ｓｅｌｅｃｔ（スーモディックス（Ｓｕｒｍｏｄｉｃｓ）、エデン　プレーリー、ミネソタ州）で保存した。上記実施例Ｄで検討した第２世代のスカフォールドコンジュゲートの安定性も、同じ期間にわたり調査した。

【０１１９】

図１５Ａは０日に開示したコンジュゲートで染色した組織を示し、これは図１５Ｂで０日目にスカフォールドコンジュゲートで染色した組織と比べることができる。図１５Ｃは、３７℃で７日間保存した後、７日目に開示したコンジュゲートで染色した組織を示し、これは図１５Ｄで３７℃で７日間保存した後、７日目にスカフォールドコンジュゲートで染色した組織と比べることができる。図１５Ｅは、４５℃で７日間保存した後、７日目に開示したコンジュゲートで染色した組織を示し、これは図１５Ｆで４５℃で７日間保存した後、７日目にスカフォールドコンジュゲートで染色した組織と比べることができる。図に示す組織染色強度は、７日間にわたり両温度での開示されたコンジュゲートの優れた安定性を示し、スカフォールドコンジュゲートは、より高温で７日後に染色能力の完全な損失を示した。

【０１２０】

標的ＤＮＡ配列の単一コピーの検出および複数のコピーの検出について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの経時的な相対的安定性を、図１６Ａ（３７℃）および図１６Ｂ（４５℃）でグラフ形で示す。このグラフはスカフォールドコンジュゲートが単一のおよび複数のコピー標的の両方の酵素金属組織学にどれほど効果が無いか、いかにスカフォールドコンジュゲートが単一の検出に完全に効果がないと同時に、開示するコンジュゲートが高温で多くの日数の後でも単一コピーの検出に効果的であったか、ならびにいかに開示したコンジュゲートが両温度で経時的に複数のコピーを検出するその能力を維持すると同時に、スカフォールドコンジュゲートが両温度で遺伝子シグナルを増幅するその能力を急速に失うかを具体的に説明している。

【０１２１】

Ｈ．コンジュゲート組成に及ぼす反応条件の効果

十分に定められた抗体－ＨＲＰコンジュゲートが作成できる再現性は、抗体のＤＴＴ還元時間の効果、リンカーの長さならびに種類、加えたリンカーの立体化学、カップリング反応中のＨＲＰ濃度、および抗体に対するＨＲＰのモル比を見ることにより調査した。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　１０／３００　２００ＧＬカラムに充填したＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒ　ＬＣ（アマシャム、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）でのサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、最初の比較を行った。使用した移動相は、リン酸緩衝化生理食塩水、ｐＨ＝７．５で１ｍｌ／分の流速であった。

【０１２２】

ＤＴＴ還元時間の変化

実施例Ｂですでに概略したコンジュゲートに関する合成プロトコールに続いて、ＤＴＴ（２５ｍＭ）でのインキュベーション時間を変える一連の反応を設定した。以下の時点を試験した：１５分、２５分、３５分および６０分。抗体とマレイミド誘導化ＨＲＰとの間のカップリング反応を行った後、図１７で具体的に説明するサイズ排除クロマトグラフィーを行った。ＤＴＴ処理の時間を変えることにより、コンジュゲートの組成が有意に改変しないことが明らかとなった。これらのコンジュゲートを用いて組織に関して得た染色（扁桃、Ｋｉ－６７）は、染色特異性または強度に有意な変化を示さなかったが、１５分のＤＴＴ処理は残りの処理よりもわずかに良かった。しかし他の３つの時点では組織に関して同一の染色が得られ、この実験が開示した方法による再現性のある活性コンジュゲートの生産に、ＤＴＴ還元の時間感受性がそれほど重要ではないことを示す。

【０１２３】

リンカーの長さ／種類の変化

実施例Ｂの手順に続き、リンカーの種類およびサイズを変えて一連の反応を設定した。以下のリンカーを使用した：ＬＣ－ＳＭＣＣ（１６原子の疎水性リンカー、ピアス、ロックフォード、イリノイ州）、ＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_8$－ＮＨＳエステル（３４原子の親水性リンカー、クウォンタ　バイオデザイン社、ポーウェル、オハイオ州）、ＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳエステル（４６原子の親水性リンカー、クウォンタ　バイオデザイン社、ポーウェル、オハイオ州）、ならびに推薦されるＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（２２原子の親水性リンカー、クウォンタ　バイオデザイン社、ポーウェル、オハイオ州）。これら各リンカーは、バッファー中（０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ＝７．５）にて１００倍過剰で１時間使用した。ＬＣ－ＳＭＣＣはジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に溶解し、そしてＨＲＰに加えたが、バッファー中で全ＤＭＦ容量の１０％を越えなかった。ＤＴＴ処理抗体にカップリングした後、サイズ排除クロマトグム（図１８）を精製で得た。３つの各ＰＥＧリンカーは、保持容量に基づき、比較的良い性能であったが、ＬＣ－ＳＭＣＣリンカーは、ＨＲＰへの少ない結合を示し（～１６分で大きなピーク）、そして全体的に小さいコンジュゲートを示した。

【０１２４】

異なるコンジュゲートにより提供される免疫組織化学的組織染色の強度における差異（扁桃組織についてのＫｉ－６７　１次抗体／コンジュゲート２次抗体、増幅した）は明らかであり、そしてＬＣ－ＳＭＣＣコンジュゲートは最も明るい染色量を与えた。各染色は均等な２８０ｎｍの吸収（A_{280}＝０．０７５）でコンジュゲートを用いて行い、したがってデータを直接的に比較できるようにした。３つのＰＥＧ誘導化コンジュゲートは、ＬＣ－ＳＭＣＣ（図１９Ａ）よりも驚くほど良く機能し、そしてそれらの各々により提供される染色強度に差異があった。図からＰＥＧ$_{12}$（図１９Ｄ）が全体的に最も暗い染色を有し、ＰＥＧ$_8$（図１９Ｃ）そして次にＰＥＧ$_4$（図１９Ｄ）が続いたことは明らかである。ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイに関して以下でさらに検討するように、より長いリンカーで調製されたコンジュゲートで得られる強い染色は、驚くべきことに染色中の増幅工程の必要性を省くことができる。

【０１２５】

リンカーの立体化学の変化

ＨＲＰ－ＩｇＧコンジュゲートの合成は、実施例Ｂの結合手順に従い行ったが、ＨＲＰ

量よりもモル過剰のＭＡＬ－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステルリンカーは、５倍過剰から５００倍過剰まで変動させた。コンジュゲートの分析（５００ｘ、２５０ｘ、１００ｘ、５０ｘ、２５ｘ、１０ｘおよび５ｘ）は、ＤＴＴで還元したＡｂとの反応後、この実施例の直前に記載したようなサイズ排除クロマトグラフィーを介して行い、より過剰なリンカーを使用して合成したコンジュゲートが小さく、狭いサイズ排除範囲を有することが示された（図２０）。しかし５ｘ～１００ｘの範囲のコンジュゲートに関して、全体的なサイズ分布に大きな差異は無いようだった。これら各コンジュゲートに関する組織染色（扁桃、Ｋｉ－６７、示さず）は大体等価であり、５ｘが他の量よりもわずかに暗いだけであった。

【０１２６】

リンカーカップリング反応におけるＨＲＰ濃度の変化

実施例Ｂですでに概略した合成法に従い、初期の誘導化工程中のＨＲＰ濃度の効果を調査した。以下の濃度でＨＲＰのストック溶液：元のプロトコール（２５ｍｇ／ｍｌ）濃度と一緒に５ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌおよび５０ｍｇ／ｍｌを反応に使用した。ＤＴＴで還元した抗体を用いたカップリング工程の後、合成したコンジュゲートに関する全体的なサイズ排除クロマトグラムに差異は無かった（図２１）。組織に関して合成したコンジュゲートの活性をアッセイすると（扁桃、Ｋｉ－６７）、染色特異性および強度は５、１０、１５、２０および２５ｍｇ／ｍｌのＨＲＰ濃度を使用して合成したコンジュゲートについて同一であったことに注目した。しかし染色強度は、開始ＨＲＰ濃度を５０ｍｇ／ｍｌに上げた時、低下した。開始ＨＲＰ濃度は、生産レベルのスケールアップについては１０～２５ｍｇ／ｍｌの間に留めるべきである。

【０１２７】

ＨＲＰ／Ａｂモル比の変化

ＨＲＰ／ＩｇＧコンジュゲートは実施例Ｂに概略したプロトコールを使用して合成したが、マレイミド誘導化ＨＲＰに対してＤＴＴで還元した抗体の比を変動させた。以下の比（抗体／ＨＲＰ）を試験した：３：１、１：３、１：２、１：４、１：５、１：１０，１：２０ならびに推薦される１：３。サイズ排除クロマトグラムのプロファイルは（図２２）、ＨＲＰの相対的量が減少すると、コンジュゲートの全体的サイズが減少し、１：２０（Ａｂ：ＨＲＰ）が最大のコンジュゲートを、そして３：１（Ａｂ／ＨＲＰ）が最小のコンジュゲートを生じたことを示す。これらコンジュゲートの各々が組織（扁桃、Ｋｉ－６７）で十分機能し、３：１（Ａｂ：ＨＲＰ）が最も明るい量の染色を生じた。１：３（Ａｂ：ＨＲＰ）は良好な染色の中間点であり、そしてＨＲＰに関して比較的高い収量を生産する。

【０１２８】

Ｉ．ウサギ抗－ビオチン－ＨＲＰ－ＰＥＧ１２コンジュゲートの調製およびその酵素金属組織学的ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションでの使用

ＨＲＰ－ＰＥＧ$_{12}$－マレイミド（４）：４ｍＬの琥珀色のバイアルに、１８．４ｍｇ（１００当量）のＭＡＬ－ｄＰＥＧ$_{12}$（商標）ＮＨＳエステル（クウォンタ　バイオデザイン、ポーウェル、オハイオ州、Ｆ．Ｗ．＝８６５．９２）を加え、続いて３４１μＬ（８．５２ｍｇ、０．２１３μＭ）のＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、ピアス、ロックフォード、イリノイ州）を０．１Ｍのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５中の２５ｍｇ／ｍＬ溶液として加えた。次いでバイアルを暗中、周囲温度（２３～２５℃）で自動回転機に置き、そして１時間アミド結合形成反応を進めた。次いで３４０μｌのアリコートを精製のために取り出した。（使用したＡｋｔａ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒ注入ループの容量は５００μｌであった）。次いで純粋なＨＲＰ－ＰＥＧ$_{12}$－マレイミドは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ１０／３００カラムに充填したＡｋｔａ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒでサンプルを分画し、０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐ７．５で１．０ｍＬ／分で溶出することにより得た。ＨＲＰを含有する画分（Ｆ１５～１７）をプールして、１％溶液（ｐＨ７．５）で６．５２の２８０ｎｍでの吸光係数を使用してＵＶ／ＶＩＳ分光光度計により測定した時、ＨＲＰ－ＰＥＧ$_{12}$－マレイミドの１．５ｍｌの４．７５ｍｇ／ｍＬ溶液を得た（８３．６％収率）。

【０１２９】

ウサギ抗－ビオチンチオール（５）：４ｍＬの琥珀色のバイアルに、２．０ｍｌのウサギ抗－ビオチン（ベチル　モンゴメリー、テキサス州）を１．０ｍｇ／ｍｌ溶液として加えた。この溶液に、１０５．２μＬの新たに調製した還元剤ＤＴＴ（１，４－ジチオスレイトールの５００ｍＭ）溶液を加えた。バイアルを暗中で自動回転台に置き、そしてジスルフィド還元を２５分間進めた。反応溶液を２つの等しい容量に分け（脱塩カラムの能力の限界により）、そして過剰なＤＴＴは画分をＰＤ－１０脱塩カラムに通し、０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ　ＥＤＡＴ、ｐＨ６．５で溶出することにより除去した。抗体を含有する画分（Ｆ４～５）を合わせて、ｐＨ６．５の１％溶液で１４の２８０ｎｍの吸光係数を使用してＡｇｉｌｅｎｔ８４５３ＵＶ／分光計により測定した時、ＤＴＴを含まないウサギ－抗－ビオチン－ＳＨの４．０ｍＬの０．４３６ｍｇ／ｍＬ溶液（８７．５％収率）を得た。

【０１３０】

ＨＲＰ－抗体結合（６）：ウサギ抗－ビオチン－ＩｇＧ－チオール（５）に、３倍モル過剰のＨＲＰ－ＰＥＧ$_{12}$－マレイミド（４）を加えた。次いで反応物を周囲温度（２３～２５℃）で一晩インキュベーションした。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００ＧＬＳＥカラムを通す精製後、３９５ｋＤの平均Ｍ．Ｗ．を持つ８７５ｍｇのコンジュゲートを得た。

【０１３１】

実施例Ｇに概略した酵素金属組織学的手順を、１次抗体（すなわち増幅なし）としてＰＥＧ$_{12}$抗－ビオチンコンジュゲートを使用して繰り返し、そして増幅無しでも驚くほど強い染色が生じた。これらの結果は、開示したコンジュゲートを調製するために、長いヘテロ二官能性ＰＥＧリンカー（ＰＥＧ$_{12}$以上のようなＰＥＧ$_{8}$以上）の使用が、驚くべきことに組織切片についてのＩＨＣおよびＩＳＨ応用に、増殖スキームの必要性を排除する。

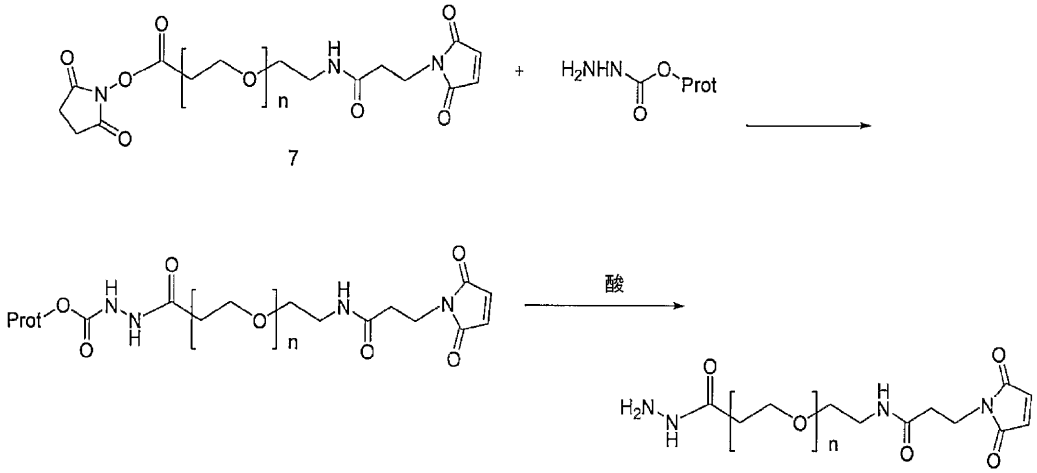
【０１３２】

Ｊ．マレイミド／ヒドラジドＰＥＧ－リンカーの合成

スキーム６はマレイミド／ヒドラジドヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーの一般的調製法を示す。簡単に説明すると、マレイミド／活性エステルＰＥＧリンカー（クウォンタ　バイオデザインから得られるような）を保護されたヒドラジド誘導体と反応させ、次いで酸と反応させてマレイミド／ヒドラジドＰＥＧリンカーを得た。

【０１３３】

【化１７】



7

スキーム6

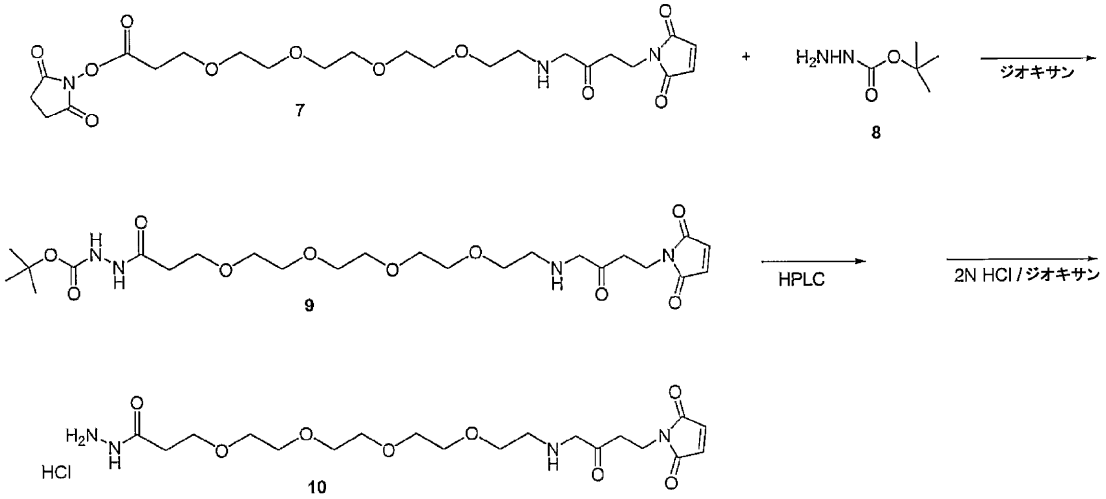
【０１３４】

マレイミド／ヒドラジドＰＥＧ$_{4}$リンカーの具体的合成は、以下のスキーム７に概説する。活性エステル７（１１６ｍｇ、１．０当量）（５ｍｌの乾燥ジオキサン中）に、３０

ｍｇ（１．０当量）のＢｏｃ保護ヒドラジド８（５ｍｌの乾燥ジオキサン中）に１時間にわたって加えた。次いで反応物を周囲温度で乾燥窒素下にて１６時間撹拌した。反応混合物は、２９９６光－ダイオードアレイ検出器およびＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ｌｕｎａ　１０μ、Ｃ１８（２）、１００Ａ、２５０ｘ３０ｍｍカラムを備えたウォーターズ（Ｗａｔｅｒｓ）のＤｅｌｔａ６００ＨＰＬＣを使用してＨＰＬＣにより分画した。カラムは３０～６０％のＡＣＮ／水で３０分間にわたり１２ｍＬ／分の流速で溶出した。所望するＢｏｃ保護－ＰＥＧ$_4$－マレイミド９は３８分に溶出し、５０ｍｇの濃い黄色の油が高真空下で乾燥した後に得られた。最後の脱保護したヒドラジド１０は、次いで残渣を６ｍｌの無水２Ｎ　ＨＣＬ／ジオキサンで乾燥窒素下で４５分間撹拌することにより得た。ロータリーエバポレーションを介した濃縮で、５５ｍｇのヒドラジド－ＰＥＧ$_4$－マレイミドＨＣｌ塩を得た。

【０１３５】

【化１８】



スキーム7

【０１３６】

本発明の原理を幾つかの態様を参考にして記載するが、当業者には態様の詳細がそのような原理から逸脱することなく修飾できることが明らかなはずである。特許請求の範囲および精神に入るので、本発明はすべてのその修飾、変更および等価物を含む。

【図面の簡単な説明】

【０１３７】

【図１】４５℃で７日間保存する前、および後の両方について、スカフォールドコンジュゲートと比較して開示したコンジュゲートを用いたＫｉ６７の免疫組織化学的に染色した組織切片の一連の画像である。

【図２】ｂｃｌ－２の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。

【図３】ＣＤ１５の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。

【図４】ＣＤ２０の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。

【図５】ＣＤ２３の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートと２つスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一連の画像である。

【図６】ＣＤ５７の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとのスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較するの一対の画像である。

【図７】ｃｅｒｂＢ２の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートと２つのスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一連の画像である。

【図８】サイクリンＤ１の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。
【図９】ＥＧＦＲの免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートと２つのスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一連の画像である。
【図１０】ＥＲの免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。
【図１１】ｐ５３の免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。
【図１２】ＰＲの免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。
【図１３】ＰＳＡの免疫組織化学的染色について、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの染色強度を比較する一対の画像である。
【図１４】ハプテン－標識核酸プローブの標的核酸配列への結合の、開示した抗体－酵素コンジュゲートを利用する酵素金属組織学的検出に関するスキームを概略する図解である。
【図１５】３７℃で７日間、および４５℃で７日間の両方で保存する前と後で、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートを使用した核酸配列の酵素金属組織学的ＩＳＨ検出に関して試験した組織切片の一連の画像である。
【図１６】酵素金属組織学的検出スキームにおいて、開示したコンジュゲートとスカフォールドコンジュゲートの安定性を比較する一対のグラフである。
【図１７】開示したコンジュゲートのＭＷプロファイルに及ぼす抗体還元時間の変動効果を比較するサイズ排除クロマトグラムである。
【図１８】開示したコンジュゲートのＭＷプロファイルに及ぼすリンカーのサイズおよび種類の変動効果を比較するサイズ排除クロマトグラムである。
【図１９】延長した長さの非ＰＥＧリンカーを用いて調製したコンジュゲートと比較して、幾つかの開示したコンジュゲートの染色強度の比較する一連の画像である。
【図２０】開示したコンジュゲートのＭＷプロファイルに及ぼす過剰なリンカーの変動効果を比較するサイズ排除クロマトグラムである。
【図２１】開示したコンジュゲートのＭＷプロファイルに及ぼす西洋ワサビペルオキシダーゼ濃度の変動効果を比較するサイズ排除クロマトグラムである。
【図２２】開示したコンジュゲートのＭＷプロファイルに及ぼす西洋ワサビペルオキシダーゼに対する抗体の比の変動効果を比較するサイズ排除クロマトグラムである。

【図１】

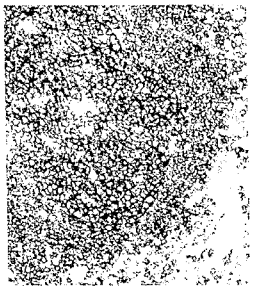


FIG. 1A

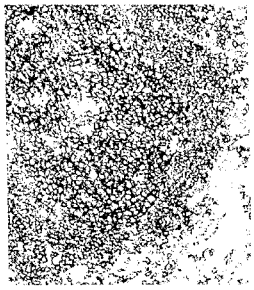


FIG. 1B

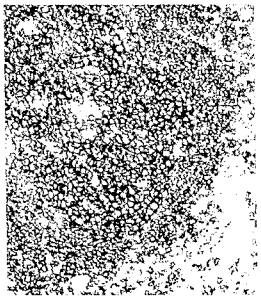


FIG. 1C

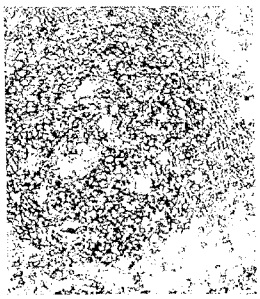


FIG. 1D

【図２】

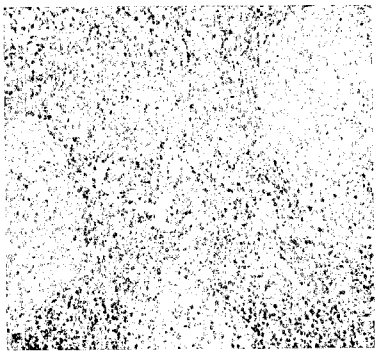


FIG. 2A

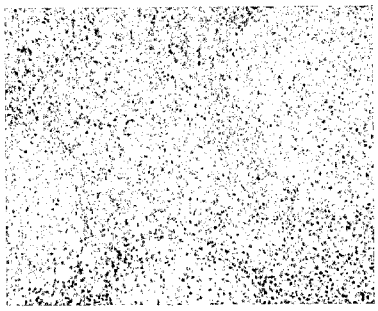


FIG. 2B

【図３】

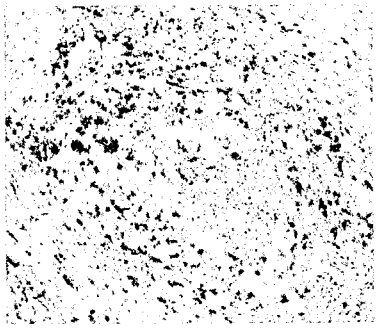


FIG. 3A

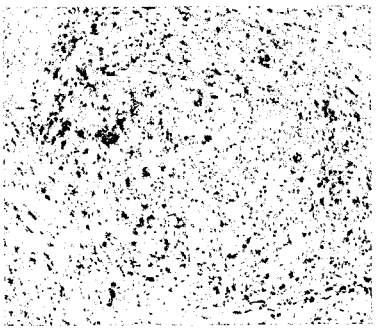


FIG. 3B

【図４】

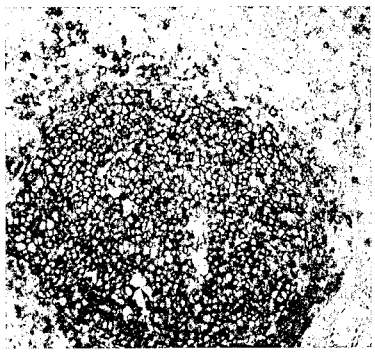


FIG. 4A

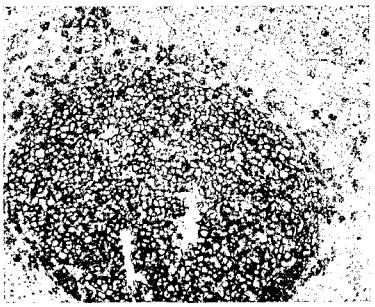


FIG. 4B

【図５】

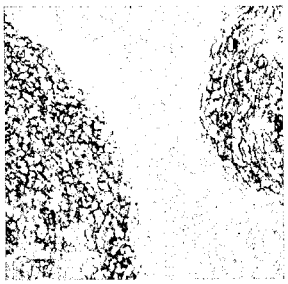


FIG. 5A

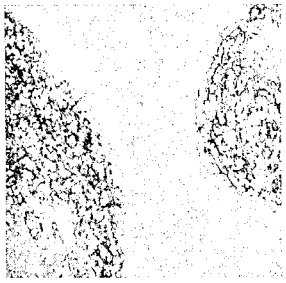


FIG. 5B

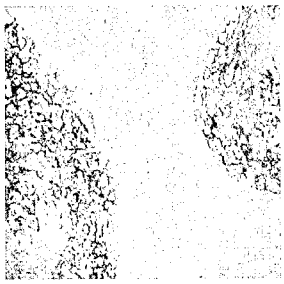


FIG. 5C

【図６】

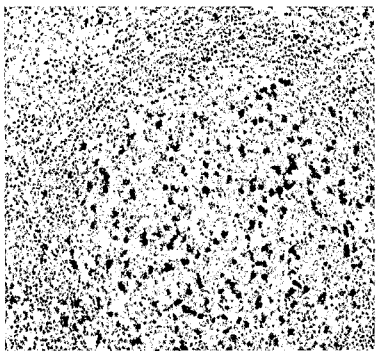


FIG. 6A

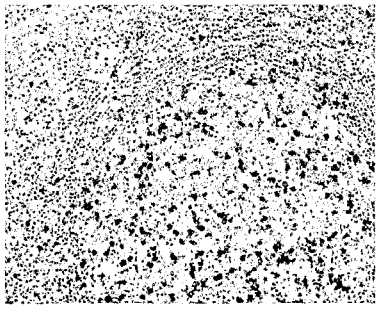


FIG. 6B

【図７】

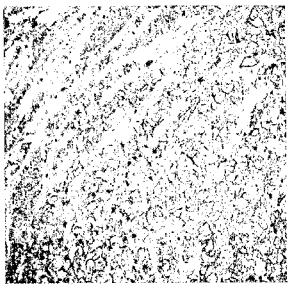


FIG. 7A

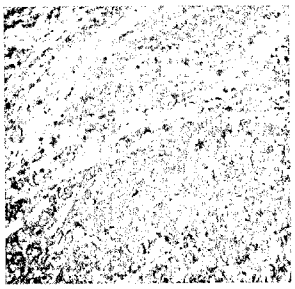


FIG. 7B

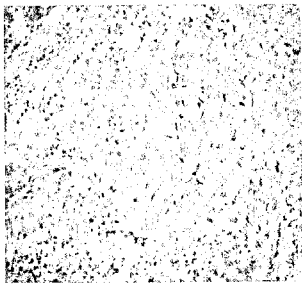


FIG. 7C

【図８】

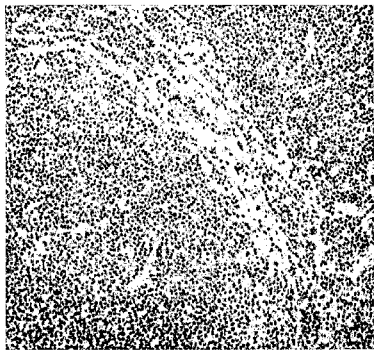


FIG. 8A

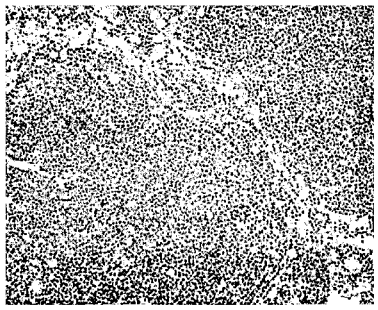


FIG. 8B

【図９】

FIG. 9A

FIG. 9B

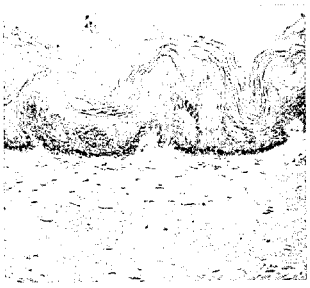


FIG. 9C

【図１０】

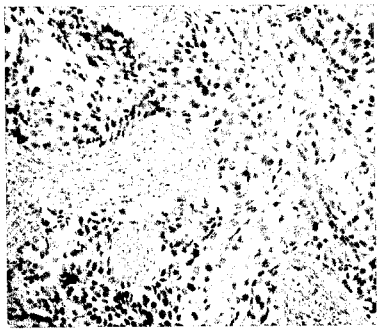


FIG. 10A

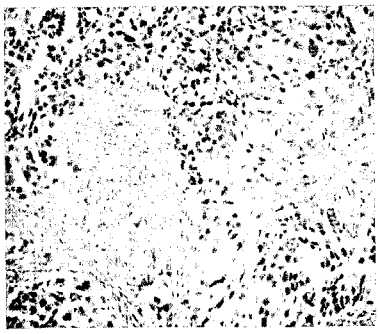


FIG. 10B

【図１１】

FIG. 11A

FIG. 11B

【図１２】

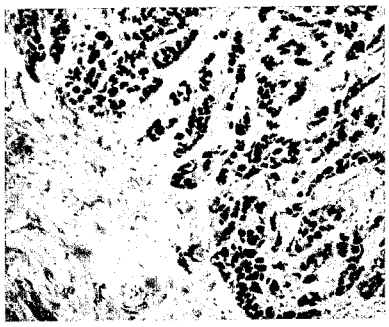


FIG. 12A

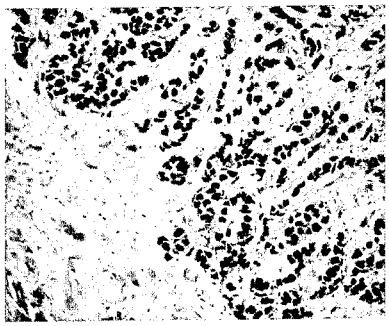


FIG. 12B

【図１３】

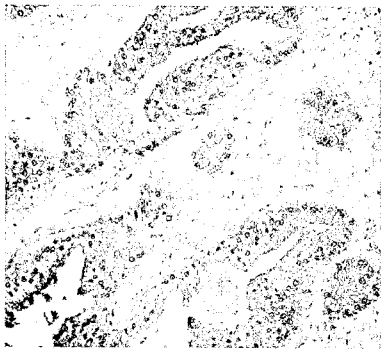


FIG. 13A

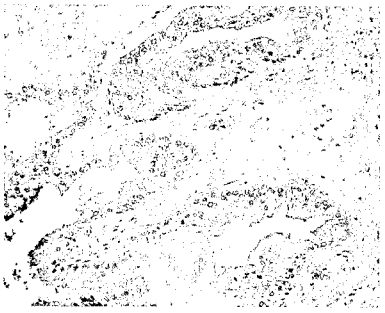


FIG. 13B

【図１４】

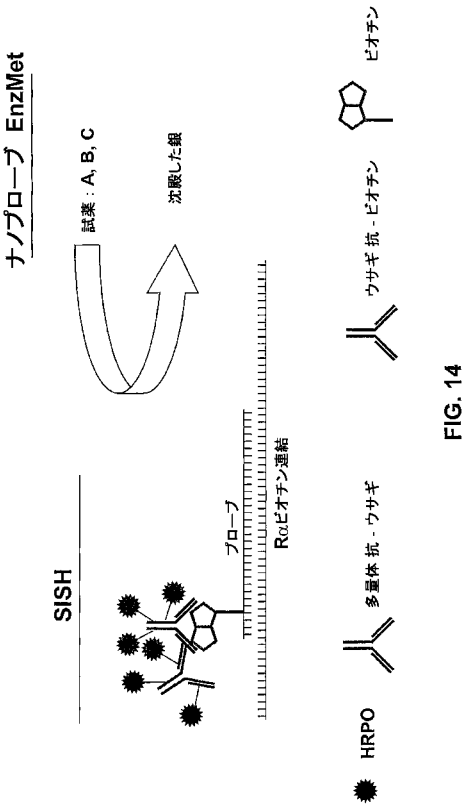


FIG. 14

【図１５】

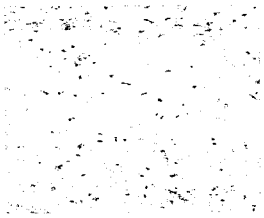


FIG. 15A

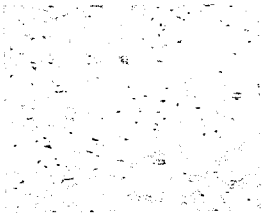


FIG. 15B

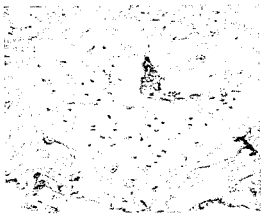


FIG. 15C

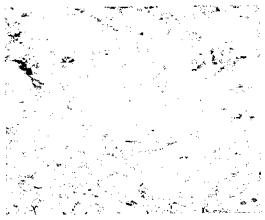


FIG. 15D

FIG. 15E

FIG. 15F

【図１６】

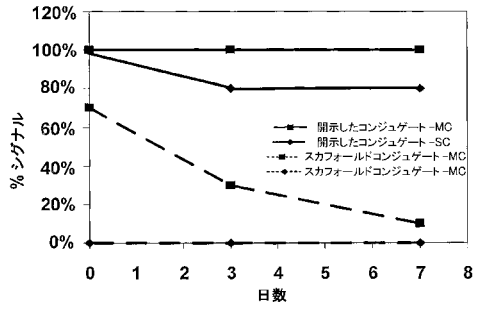


FIG. 16A

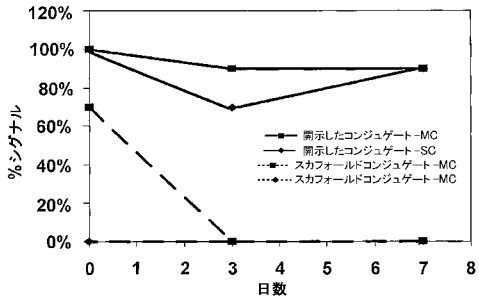


FIG. 16B

【図１７】

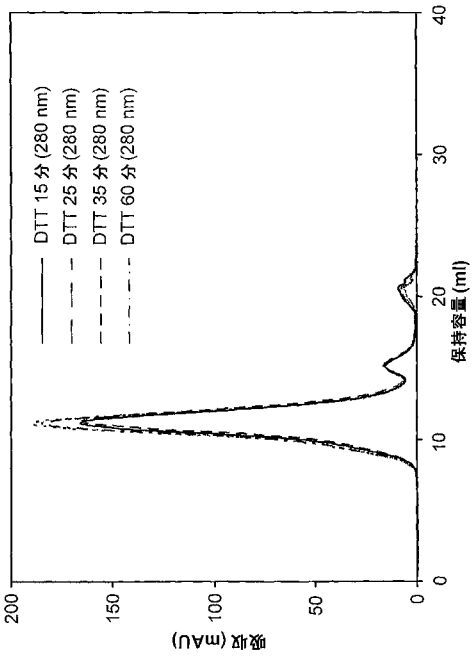


FIG. 17

【図１８】

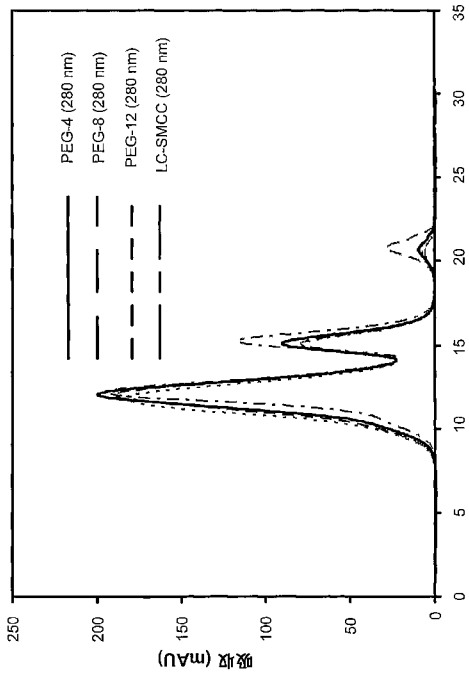


FIG. 18

【図１９】

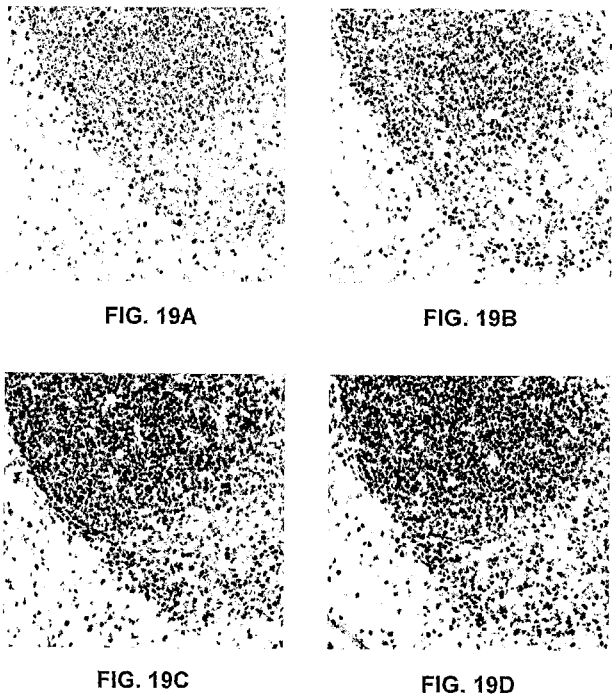


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

FIG. 19D

【図２０】

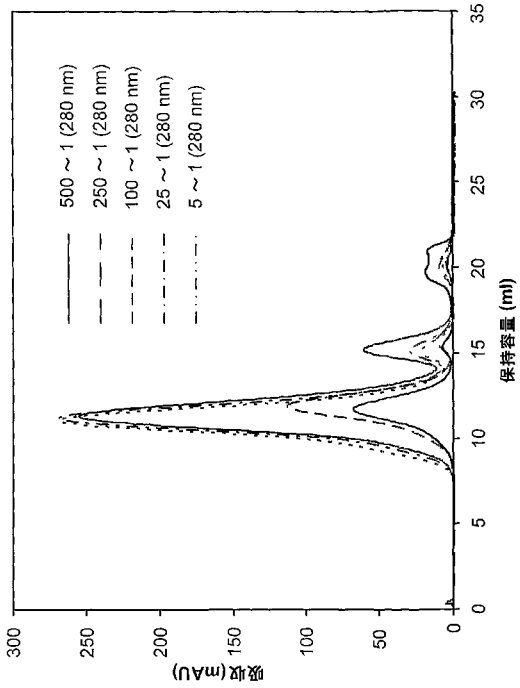


FIG. 20

【図２１】

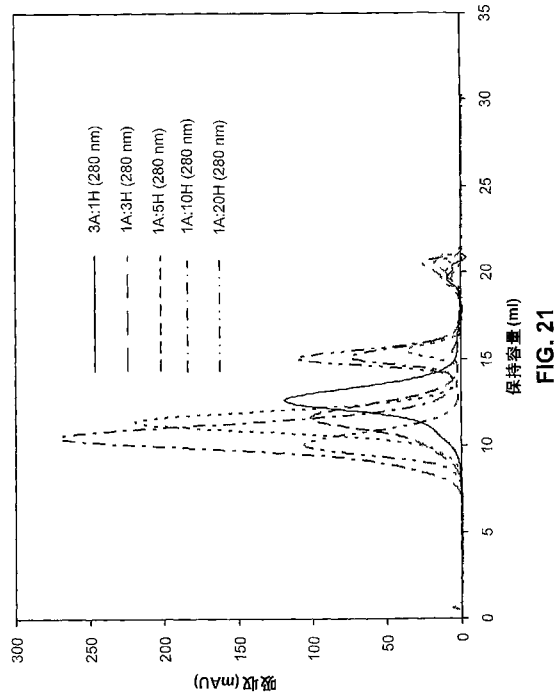


FIG. 21

【図２２】

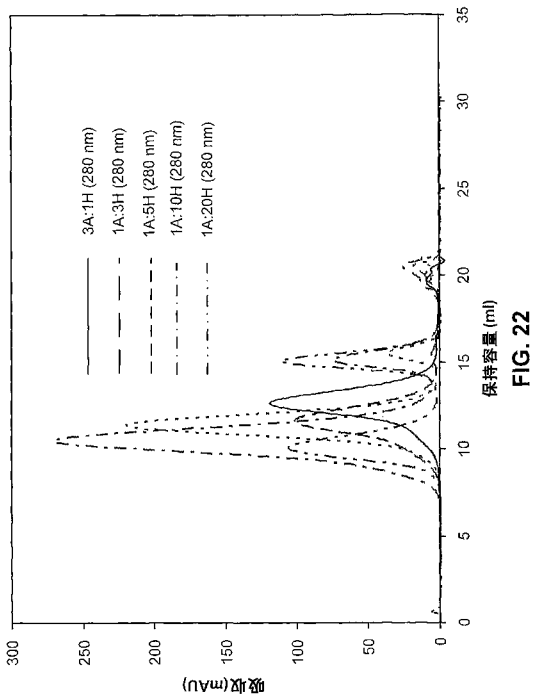


FIG. 22

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/016087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48

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)
A61K

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)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 903 152 A2 (MITSUBISHI CHEM CORP [JP]) 24 March 1999 (1999-03-24) page 2, lines 10-15; claims 1,2,5,6,9,11,16 page 5, lines 15-20 - lines 32-35 page 8, lines 45-55	1-3,46, 48,49, 52-55, 57,58
Y	EP 1 118 335 A (AVENTIS BEHRING GMBH [DE]) 25 July 2001 (2001-07-25) claims 3,11; example 1	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family 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 referring to an 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 October 2007	24/10/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Villard, Anne-Laure

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/016087

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/115165 A1 (ROSEN PERRY [US] ET AL) 17 June 2004 (2004-06-17) page 3, column 2, paragraph 3; claims 25,28,33,38,39,44,59,60,100,101,103,108,111; examples 9-11; compounds ID, IE, IF,IH	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58
Y	WO 2004/024889 A (ELUSYS THERAPEUTICS INC [US]; MOHAMED NEHAL [US]; CASEY LESLIE [US]; P) 25 March 2004 (2004-03-25) page 37, paragraph 2; claims 73-77; examples 6.1-6.7	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58
Y	BIENIARZ C ET AL: "THERMALLY STABILIZED IMMUNOCONJUGATES: CONJUGATION OF ANTIBODIES TO ALKALINE PHOSPHATASE STABILIZED WITH POLYMERIC CROSS-LINKERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 9, no. 3, 1998, pages 399-402, XP008072322 ISSN: 1043-1802 abstract; figure 1	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58
A	WO 03/072017 A (ABBOTT LAB [US]) 4 September 2003 (2003-09-04) page 7, paragraph 3 - page 8, paragraph 2; claim 4; figure 1	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58
P,Y	SIMONS ET AL: "Novel cross-linked enzyme-antibody conjugates for Western blot and ELISA" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 315, no. 1-2, 31 August 2006 (2006-08-31), pages 88-98, XP005664600 ISSN: 0022-1759 page 90, column 2; figure 1 page 98, column 1	1-4, 7-12, 22-34, 46-50, 52-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/016087

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 46-50, 52-58 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /016087

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2-4, 8-12, 22-34, 50 complete; 1, 7, 46-49, 52-58 in part

An antibody-signal generating moiety conjugate as depicted in claims 8, 50 comprising an antibody covalently coupled to a signal-generating moiety through an heterobifunctional PEG. Method of preparation of the same and uses for detection of molecules in a biological sample. Excluding the subject matter of inventions 2,3.

---

2. claims: 5, 6, 13-17, 35-45, 51 complete; 1,7, 46-49, 52-58 in part

An antibody-signal generating moiety conjugate as depicted in claims 13, 51 comprising an antibody covalently coupled to a signal-generating moiety through an heterobifunctional PEG. Method of preparation of the same and uses for detection of molecules in a biological sample Excluding the subject matter of inventions 1, 3.

---

3. claims: 18-21 complete

A heterobifunctional linker having the formula as depicted in claim 18. Excluding the subject matter of inventions 1, 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/016087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0903152 A2	24-03-1999	AT 253942 T	15-11-2003
		CA 2247764 A1	17-03-1999
		CN 1214348 A	21-04-1999
		DE 69819644 D1	18-12-2003
		DE 69819644 T2	07-10-2004
		ES 2210635 T3	01-07-2004
		US 2002025312 A1	28-02-2002
EP 1118335 A	25-07-2001	NONE	
US 2004115165 A1	17-06-2004	NONE	
WO 2004024889 A	25-03-2004	AU 2003270686 A1	30-04-2004
		CA 2499075 A1	25-03-2004
		EP 1539811 A2	15-06-2005
		JP 2005539067 T	22-12-2005
WO 03072017 A	04-09-2003	CA 2475039 A1	04-09-2003
		EP 1478927 A2	24-11-2004
		JP 2005518431 T	23-06-2005
		US 2003149246 A1	07-08-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 33/543	*(2006.01)*	G01N 33/543	545A	
G01N 33/531	*(2006.01)*	G01N 33/531	A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウオング，ジエニフアー
アメリカ合衆国ネバダ州８９４３４スパークス・ライオネルコート９２５
(72)発明者 リフイーバー，マーク
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７４８トウーソン・ソノランハイツプレイス１０２２
(72)発明者 コスメダー，ジエローム・ダブリユー
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７５０トウーソン・ノースモカシントレイル５５３０
(72)発明者 アシユワース－シヤープ，ジユリア
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７３７トウーソン・ノースバルドヘツドプレイス１０３２１
(72)発明者 カーナグ，キヤセイ・エイ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１３トウーソン・ナンバーピー－１０・セントジヨーンズブールバード１７６５

Ｆターム(参考) 4B050 CC05 DD13 LL03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 DA75 DA89 EA50 FA41
GA22

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008539270A5	公开(公告)日	2009-06-25
申请号	JP2008509141	申请日	2006-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	每次塔纳Medeikaru系统公司的Rete		
[标]发明人	ビーニアーツクリストフアー ウオングジエニフアー リフィーバーマーク コスメダージエロームダブリユー アシユワースシヤープジユリア カーナグキヤセイエイ		
发明人	ビーニアーツ,クリストフアー ウオング,ジエニフアー リフィーバー,マーク コスメダー,ジエローム·ダブリユー アシユワース-シヤープ,ジユリア カーナグ,キヤセイ·エイ		
IPC分类号	C07K16/00 C07K19/00 C12N9/08 C12N9/16 C07K1/08 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	C12N9/16 A61K47/65 A61K47/6815 C07K16/42 C07K16/44 C07K2317/76 C12N9/0065 C12N9/96 G01N33/535		
FI分类号	C07K16/00 C07K19/00 C12N9/08 C12N9/16.B C07K1/08 G01N33/543.545.A G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B050/CC05 4B050/DD13 4B050/LL03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA41 4H045/GA22		
优先权	60/675759 2005-04-28 US		
其他公开文献	JP5628476B2 JP2008539270A		

摘要(译)

公开了抗体/信号产生部分缀合物，其包括通过异双功能聚亚烷基二醇接头与信号产生部分共价连接的抗体。所公开的缀合物在组织切片和细胞学样品上的免疫组织化学和原位杂交测定中显示出异常的信号产生。在一个实施方案中，使用所公开的缀合物作为第一抗体而不扩增，可以用半抗原标记的探针进行核酸序列的酶金相检测。