



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107573445 A

(43)申请公布日 2018.01.12

(21)申请号 201710702403.4

C08F 8/32(2006.01)

(22)申请日 2007.05.28

C08F 8/14(2006.01)

(30)优先权数据

C08F 220/54(2006.01)

60/803,356 2006.05.27 US

C08F 220/36(2006.01)

(62)分案原申请数据

G01N 33/532(2006.01)

200780027791.5 2007.05.28

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 富鲁达加拿大公司

地址 加拿大安大略省

(72)发明人 米切尔·A·温尼克 马克·尼茨

弗拉迪米尔·巴拉诺夫 楼旭东

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 沈敬亭 徐丽华

(51)Int. Cl.

C08F 8/42(2006.01)

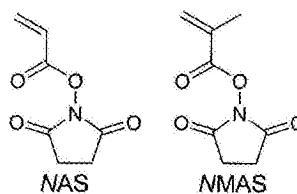
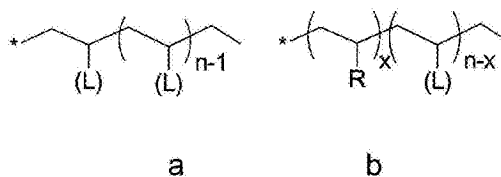
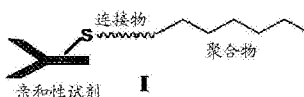
权利要求书2页 说明书22页 附图16页

(54)发明名称

聚合物骨架元素标签

(57)摘要

本发明提供了聚合物骨架元素标签。本发明提供了用于分析物元素分析(包括ICP-MS)的基于新型金属-聚合物结合物的元素标签。聚合物骨架被官能化以不可逆地结合在使用之前由使用者选择的金属。所述聚合物被进一步官能化以附着连接物,该连接物允许附着于抗体或其他亲和性试剂。聚合物形式允许附着给定同位素的多个拷贝,其线性地提高灵敏度。所述金属-聚合物结合物标签能够以两种形式进行多重分析:全分析,其中样品中的平均生物标记物分布是诊断性的,和单细胞形式,以区分复杂样品(例如血液)中的少数(例如患病)细胞。



1. 一种包括聚合物的元素标签,其中,所述聚合物包括至少一个结合金属的侧基,所述结合金属的侧基包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子。

2. 根据权利要求1所述的元素标签,共价附着于生物分子。

3. 一种元素标记的亲合性试剂,其中,所述亲合性试剂利用权利要求1所述的元素标签标记,并且其中所述侧基中的至少之一结合或能够结合至少一个金属原子。

4. 一种制备权利要求1所述的元素标签的方法,包括:

(i) 提供聚合物;以及

(ii) 将包含至少一个金属原子或者能够结合至少一个金属原子的至少一个结合金属的侧基共价附着于所述聚合物。

5. 一种制备权利要求2所述的元素标签的方法,包括:

(i) 提供聚合物,所述聚合物包括至少一个结合金属的侧基、并包括允许所述聚合物共价结合连接物的官能团,其中所述结合金属的侧基包含至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子;

(ii) 将连接物附着于所述聚合物的所述官能团,其中所述连接物能够结合生物分子;

(iii) 将生物分子共价结合于所述连接物;以及

(iv) 将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基。

6. 一种通过权利要求4至5中任一项所述的方法制备的元素标签。

7. 一种用于分析物分析的方法,包括:

(i) 将权利要求3所述的元素标记的亲合性试剂与分析物温育,其中所述亲合性试剂与所述分析物结合;

(ii) 将未结合的标记的亲合性试剂与结合的亲合性试剂分离;以及

(iii) 通过元素分析来分析结合于所述亲合性试剂的元素,所述亲合性试剂附着于所述分析物。

8. 一种用于两个或多个分析物的多重分析的方法,包括:

(i) 将权利要求3所述的两个或多个差异元素标记的亲合性试剂与两个或多个分析物反应以产生两个或多个差异标记的分析物,其中所述亲合性试剂与所述分析物结合;

(ii) 将未结合的亲合性试剂与结合的亲合性试剂分离;以及

(iii) 通过元素分析来分析结合于所述两个或多个分析物的所述差异标签。

9. 一种用于分析物的分析的方法,包括:

(i) 将权利要求1至2中任一项所述的元素标签与分析物反应,以使所述元素标签结合所述分析物;

(ii) 将未结合的标签元素与结合的标签元素分离;以及

(iii) 通过元素分析来分析所述结合的标签元素。

10. 一种用于制备权利要求1至2中任一项所述的元素标签的试剂盒,包括以下中的至少之一:

聚合物,所述聚合物包括至少一个结合金属的侧基,所述结合金属的侧基包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子,并进一步包括允许所述聚合物与连接物、间隔物、或生物分子中之一结合的官能团;金属溶液;用于将所述连接物、间隔物或生物分子附着于所述聚合物的试剂;用于将官能团附着于所述连接物或所述间隔物的试剂;用于将金

属附着于所述聚合物的试剂;包括抗体的亲和性试剂;缓冲剂;用于制备所述元素标签的说明书;用于将所述元素标签附着于亲和性试剂的说明书;以及用于将金属附着于所述元素标签的说明书。

## 聚合物骨架元素标签

[0001] 本申请是申请日为2007年5月28日,申请号为200780027791.5,发明名称为“聚合物骨架元素标签”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请要求于2006年5月27日提交的题目为“聚合物骨架元素标签”的美国临时专利申请序列号60/803,356的权益,其全部内容以引用方式并入。

[0004] 版权和法律公告

[0005] 本专利文件的部分披露内容包括受版权保护的材料。当它出现在专利和商标局专利文件或记录中时,版权所有者不反对任何人复制专利文件或专利披露内容,但是保留其他方面的所有版权。

### 技术领域

[0006] 本发明涉及新类别的标记生物分子,其已经特别地设计成与元素分析相联合的检测操作,以提供高灵敏度的多重生物标记物测定。

### 背景技术

[0007] 引言

[0008] 能够进行精确蛋白质定量的技术在急速发展的蛋白质组学和药物发现领域以及临床和诊断测试领域是希望的。在分子水平上针对分析蛋白质合成、功能和疾病的生物学研究中,它也是重要的。目前,存在多个广泛用于估计蛋白质浓度的现有技术,包括:Bradford和Lowry分析、UV光谱、有机质谱、HPLC、流式细胞仪、配体结合测定、ELISA(酶联免疫吸附分析)、以及RIA(放射免疫分析)。然而,良好建立的分析工具和研究技术的这种泛泛分类对于如今的挑战仍然是不足够的。这些方法的失败涉及灵敏度、选择性、动态范围、以及以精确和绝对方式同时测定多个蛋白质浓度的能力(多重化)的局限。元素分析对蛋白质定量领域提供了显著优点的认识已经经由感应耦合等离子体质谱(ICP-MS)连接的免疫测定(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) linked immunoassays)<sup>1-4</sup>指导开发了若干蛋白质定量的新方法。这个新技术提供了在生物样品分析中用于ICP-MS的创新舞台<sup>5,6</sup>。ICP-MS的独特分析性能允许从在生物样品中不是天然存在的非放射性元素中选择标签。

[0009] 定义

[0010] “元素分析”是一种其中分析样品的元素组成和/或同位素组成的方法。元素分析可以通过许多方法完成,包括,但不限于:

[0011] (i) 光学原子光谱法,如,火焰原子吸收(flame atomic absorption)、石墨炉原子吸收、及感应耦合等离子体原子发射(inductively coupled plasma atomic emission),其探测原子的外部电子结构;

[0012] (ii) 质谱原子光谱法,如感应耦合质谱法,其探测原子的质量;

[0013] (iii) X-射线荧光法、粒子感应的x-射线发射(particle induced x-ray

emission)、x-射线光电电子光谱、以及俄歇电子能谱,其探测原子的内部电子结构。

[0014] “元素分析仪”是采用元素分析的方法之一以用于定量样品的原子组成的仪器。

[0015] “粒子元素分析”是这样一种方法,即其中由分散在液体中的粒子(例如缓冲液中的珠粒,或生长介质或血液中的细胞)构成的样品以对单个粒子(例如,珠粒之间、细胞之间、粒子之间)记录原子组成的方式进行询问。分析仪器的实例是基于流式细胞仪的质谱仪、ICP-TOF、或ICP-MS或构造用于询问单个粒子的任何元素分析仪。

[0016] “容量或体积元素分析”是其中分析样品以原子组成在整个样品体积上进行平均的方式询问的方法。

[0017] “内标物”限定为已知量的化合物,其不同于加入到未知物中的分析物。将来自分析物的信号与来自内标物的信号进行比较,以找出存在多少分析物。当进行质谱定量时,可以使用内标物。内标物也可以通过本领域技术人员已知的其他方式使用。

[0018] “生物样品”指的是需要分析的生物性质的任何样品。例如,该样品可以包括或可以怀疑包括动物、植物、真菌或细菌的生物分子、组织、液体和细胞。它还包括病毒起源的分子。典型的样品包括,但不限于,痰、血液、血细胞(如,白细胞)、组织或细针穿刺活检样品、尿、腹膜液、及胸膜液、或其中的细胞。生物样品还可以包括组织切片,如为了组织学目的采集的冷冻切片。另一生物样品的典型来源为病毒和动物、植物、细菌、真菌的细胞培养物,其中基因表达状态可以被操控以探索基因中的关系。生物样品还可以包括生物分子(纯化或未纯化的)的溶液,所述生物分子如蛋白、肽、抗体、DNA、RNA、适配子、多糖、脂质等。其他实例是本领域技术人员已知的。

[0019] “抗体”是通常在动物血清中发现的免疫球蛋白糖蛋白分子。抗体可以在哺乳动物如兔、小鼠、大鼠、山羊等以及鸡中制备,或可以通过本领域技术人员已知并描述在例如美国专利No.4,816,567中的重组方法制备。用于动物中高抗体产生应答的免疫和引发的过程对于本领域技术人员是熟知的,可以在例如Antibodies, A Laboratory Manual, CoId Spring Harbor Laboratory, 1988, pages92-115中找到。抗体可以作为全分子、称为Fab'和Fab2'片段的分子片段、作为单价抗体(结合轻链和修饰重链)、以及本领域技术人员已知的其他实例使用。

[0020] “初级抗体(或一抗)”为特异性结合于注射入动物中的抗原的抗体。它们可以从动物提取或者可以通过重组方式制备。

[0021] “次级抗体(或二抗)”为特异性结合于初级抗体的那些抗体。例如,初级抗体可以被用作注射入不同物种的动物的抗原,以产生次级抗体。例如,兔次级抗鼠抗体可以通过用鼠抗体免疫兔而制备。

[0022] “抗原”为刺激宿主机体中的免疫应答,尤其是抗体产生的物质。抗原通常为蛋白或多糖,但是可以为任何类型的分子,包括但不限于偶联到载体蛋白的小分子(半抗原)。

[0023] “生物标记物”为分子和构建体,其可以例如为抗原、小分子、核苷酸、寡核苷酸、DNA或RNA,其可以存在于仅一种类型细胞的细胞体积(cell volume)中或细胞表面上,或者其相对丰度对于该类型的细胞是独特的。细胞生物标记物可以用于区别该细胞与其他细胞。例如,仅存在于一种类型细胞的细胞表面上的抗原被称为细胞表面生物标记物,其区别该细胞与其他细胞。

[0024] 本文所用的“免疫分析(免疫测定)”是指这样的分析,其中分析物,如细胞抗原或

生物标记物通过亲和性试剂如初级抗体进行检测。例如，“免疫分析”可以为这样的分析，其中分析物通过标记的亲和性试剂如结合于金属标记的聚合物的初级抗体进行检测。

[0025] 本文所用的“生物分子”是指任何生物学分子，包括小生物分子，例如，但不限于：脂质、磷脂、糖脂、甾醇、维生素、激素、神经递质、碳水化合物、糖、二糖、氨基酸、核苷酸、磷酸酯(盐)、和单糖；以及大生物分子，例如但不限于：肽、寡肽、多肽、蛋白、核酸，即DNA、RNA，寡糖、多糖和朊病毒(Prion)。其他生物分子对于本领域技术人员是已知的，并包括在申请人的教导中。

[0026] “亲和性试剂”是能够紧密结合于靶分子或分析物，例如抗原或生物标记物的生物分子。例如，抗体是识别并以高亲和力结合特定抗原的亲和性试剂。抗生蛋白链菌素(Streptavidin)是特异性结合生物素的蛋白分子，并可以被认为是亲和性试剂的另一实例。其他亲和性试剂对与本领域技术人员是已知的，包括但不限于适配子、寡核苷酸、蛋白分子、凝集素和多糖。

[0027] “标记的亲和性试剂”是通常通过连接基团结合于合成的标签(部分)的亲和性试剂(例如，抗体或适配子或寡核苷酸、多糖、脂质、激素、生长因子)。所述标签可以为，但不限于，具有共价连接的多个螯合基团的聚合物。到较大的程度，螯合基团可以具有连接于它们的元素或多个元素。螯合阶段的顺序和次序取决于标记方案。

[0028] 术语“检测”在最广泛的意义上使用，以包括特定分子的定性和定量测量。例如，在标签(例如，标记的抗体或其他标记的亲和性试剂)的帮助下，特定抗原或生物标记物的定性和定量测量。

[0029] “元素标签”或“标签”是一个化学部分，其包括具有连接到支持分子结构的一个或多个同位素(称为“标签原子”)的元素或多个元素，或者其能够结合所述元素或同位素。元素标签还可以包括将元素标签连接到感兴趣的分子或靶分子(例如，分析物)的工具。不同的元素标签基于标签的元素组成可以加以区别。元素标签可以包括给定同位素的许多拷贝并且每个标签中可以具有每个同位素的可再现的拷贝数量。元素标签在功能上区别于同一样品中的多个其他元素标签，因为它的元素或同位素组成不同于其他标签的元素或同位素组成。

[0030] 术语“标签原子”区份一个元素标签与另一元素标签并通过元素分析检测的元素或同位素的原子。

[0031] “支持物”为已经通过例如吡咯-2,5-二酮(马来酰亚胺基)、磺酸阴离子、或对(氯甲基)苯乙烯官能化的表面。支持物，例如，可以为但不限于，合成膜、珠粒(聚苯乙烯、琼脂糖、硅石等)、塑料微孔内的平坦表面、载玻片、反应管等，如本领域技术人员所已知的。

[0032] “ICP-MS”为感应耦合等离子体质谱仪—一种灵敏的基于质谱的元素分析仪。不同的ICP-MS构造主要通过所采用的质量选择技术而区别，并且可以为，例如四极或飞行时间(ICP-TOF)或扇形磁场(高分辨率ICP-MS)。存在许多商业上可获得的ICP-MS模型，具有广谱的构造、能力和修改。

[0033] “聚合物”为由分子构成的物质，其中的分子特征为互相连接的一个或多个种类的原子或原子群(构成单元)的多个重复，数量足以提供一组性质，其在添加或去除一个或几个结构单元下不会显著发生改变。(IUPAC定义，参见E. S. White, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1997, 37, 171-192)。聚合物分子可以按照其骨架(跨越该分子长

度的原子的连接链接),以及侧基(连接到每个构成单元的骨架部分)来考虑。侧基通常是化学和功能不同于骨架的。对于金属离子具有高亲和力的侧基可用作对于那些离子的螯合基团或配体。

[0034] “共聚物”为由两个或多个化学不同的结构单元组成的聚合物。“线性聚合物”为特征在于线性序列的结构单元的聚合物。“嵌段共聚物”是具有共同类型结构单元的序列(结合于不同类型结构单元的序列)的线性聚合物。“支化聚合物”是其中另外的聚合物链(分支)从聚合物的骨架分出的聚合物。人们通常将最长的线性序列称为“主链”。其中支链的结构单元的化学组成与主链不同的支化聚合物称为“接枝共聚物”。

[0035] “星形聚合物”具有从共同结构单元或核心发出的多个线性聚合物链。“高支化聚合物”为其中骨架原子呈树形状排列的多分支聚合物。这些聚合物涉及“树形化合物”,其具有三个区别性结构特征:起始核心、由径向附着与起始核心的重复单元构成的内层(世代)、以及附着于最外一代的末端官能度的外表面。“树形化合物”不同于高支化聚合物,不同之处在于它们非常对称、高支化、及最大化的(远螯)末端官能度。

[0036] “金属标记的聚合物”(也为“聚合物金属标签载体”、或“金属-聚合物结合物”、或“螯合物衍生的聚合物”)是各种元素标签,其由具有至少一个螯合侧基(附着有金属原子)的聚合物骨架组成。这些金属标记的聚合物可以为,但不限于,线性、星形、支化、或高支化均聚物或共聚物,以及嵌段或接枝共聚物。

[0037] “金属结合侧基”为能够结合金属或金属的同位素的在聚合物上的侧基。它还可以被称为配体。

[0038] “附着(连接)基团”或“连接物”为用于将两个不同的分子或聚合物、分子的两个亚单位、或分子偶联(共轭结合)到底物(例如亲和性试剂)的分子部分。

[0039] 通常使用的简写:NAS为N-丙烯酰氧琥珀酰亚胺(acryloxysuccinimide);NMA为N-甲基丙烯酰氧琥珀酰亚胺;DMA为N,N-二甲基丙烯酰胺;t-BDB为可逆加成-断裂链转移(RAFT)链转移剂,叔丁基二硫代苯甲酸酯(盐);AMBN为2,2-偶氮二(2-甲基丁腈);DMSO为二甲亚砜;DOTA为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸;PMAA为聚(甲基丙烯酸);DTPA为二亚乙基三胺五乙酸(或二乙烯三胺五乙酸);PDMAEMA为聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯);Fmoc为氨基甲酸9-芴基甲酯;DTT为二硫苏糖醇;TMS为三甲代甲硅烷基,TCEP为三(2-羧乙基)膦。

[0040] 术语Mn、Mw和PDI(多分散指数)分别为:Mw/Mn用于分别表示数量和平均分子量,而多分散指数描述分子量分布。

[0041] “螯合”为配体、螯合掩蔽剂、螯合剂或螯合用试剂结合于金属离子,形成金属复合物、螯合物的方法。与简单的单齿配体如H<sub>2</sub>O或NH<sub>3</sub>相反,多齿螯合剂与金属离子形成多重键。

[0042] “过渡元素”是指具有以下原子序数21-30、39-48、57-80和89-92之一的元素。过渡元素包括稀土金属、镧系元素和贵金属。

[0043] “镧系元素”为具有57-71的原子序数的过渡金属,包括La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Lu。

[0044] “金属”是指具有以下原子序数之一的元素:3、4、11-13、19-33、37-52、55-84、87-102。

## 发明内容

[0045] 优化用于包括(但不限于) ICP-MS应用的元素分析的一类标签之前还没有开发。必须利用目前用于完全不同目的的标签进行初步研究<sup>1;3;4;7</sup>。本发明的元素标签不是先前技术中的那些,并特别设计用于元素分析。为了实现最充分的元素标记,需要开发新类别的标签。感应耦合等离子体质谱分析(ICP-MS)具有大量独特性能,其可用来形成理想的元素标签仪器组合。最重要的优点是这个事实:大量重金属和它们的同位素提供了可以同时被检测的特征信号。因此,可以开发许多例如大于50个的元素标签;获得的标签元素的强度用作样品中分析物浓度的信号。其次,ICP-MS的丰度灵敏度(相邻同位素的信号重叠的量度)很大(例如对于四极分析仪大于 $10^6$ ),这确保了检测频道在宽动态范围上的独立性。第三个关键性质是MS非常灵敏;在每个细胞的给定抗原的100个分子级别上的检测可以是可行的,很大程度上独立于多重的级别,对目前的荧光细胞计数仪的实质改进。最后,ICP-MS作为检测仪提供了很大程度上独立于分析物分子形式或样品基质的绝对定量。对于将元素分析的这些关键性质与生物分析方法整合存在明确的需求。这里,我们提供了元素标签的新型设计,其显著地确保了较高的多重能力和生物测定的灵敏度。

[0046] 聚合物基元素标签的新类别适于利用常规ICP-MS仪器在希望在样品群上的平均测定(即全分析)的情况下的测定。例如,当组织足够均一时,或者诊断允许在活组织检查上平均化时,样品可以用金属标记的亲合性试剂染色,并且在冲洗后,可以被酸化以裂解组织的细胞,并提供可以根据长期存在的标准ICP-MS方案进行分析的均一溶液。大量测定方案仍允许大量地多重分析,其中对于每个标记物的检测限与单个放射免疫测定相当。细胞生物学家可以将这个视为蛋白质印迹的定量高通量类似物。

[0047] 聚合物基元素标签的新类别适于利用新型流式细胞仪ICP-MS基仪器的测定,并提供高达50或更多用于能够同时测定(大量地多重化的)许多生物标记物的免疫学分析的可区别报告标签,最终在粒子元素分析中提供患者样品中的患病细胞(或感兴趣的其他细胞)的敏锐区别和鉴定。

[0048] 聚合物基元素标签的新类别适于亲合性试剂的双标记-在相同亲合性试剂上的荧光标记和元素标签。先前,双标记的抗体用于定位组织切片中的特定细胞类型(荧光显微镜检查),然后利用电子显微镜检查鉴定细胞的特定结构。因此,抗体用作为电子致密物质的荧光异硫氰酸酯(isothiocyanate) (FITC) 和铁蛋白加以标记<sup>9</sup>。最近地,组合荧光标记和小金簇的免疫探针已经通过与Fab'片段共价结合进行制备。这些新的免疫结合物允许从单一标记的实验<sup>10</sup>,从荧光和电子显微镜,收集两组互补数据。试剂如镉-荧光素和镉-绿色荧光蛋白荧光共振能量转移对的另一进展被实现以利用时间分辨-荧光共振能量转移(Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) (TR-FRET)<sup>11</sup>研究激酶反应。

[0049] 申请人的教导包括双标记的亲合性试剂以促进通过ICP-MS流式细胞仪在混合样品中稀有细胞的预分类以及随后的元素分析。细胞生物学要求细胞表面上或细胞内的生物标记物的显微镜定位。同时,标记物丰度的定量信息是必需的。通过将荧光标记和元素标签共价附着于相同的亲合性试剂(例如抗体)并利用这个亲合性试剂,以首先经由荧光显微镜将该信号定位到特定亚细胞结构(膜、核、细胞质、细胞骨架等),其次,通过ICP-MS定量结合的亲合性试剂的数量,将显著提高研究下的过程的生物学理解。

[0050] 本发明的一个方面提供了一种包括聚合物的元素标签,其中聚合物包括至少一个结合金属的侧基,该侧基包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子。元素标签可以进一步包括允许聚合物附着于连接物、间隔物、或生物分子之一的官能团。元素标签可以为水溶性的。它还可以带负电荷的。能够结合至少一个金属原子的结合金属的侧基的数量可以为约1到1000之间,最典型地约10到250之间。至少一个金属原子可以结合于结合金属的侧基的至少一个。聚合物可以具有约1到1000之间的聚合度,最典型地10到250之间的聚合度。

[0051] 聚合物可以选自由线性聚合物、共聚物、支化聚合物、接枝共聚物、嵌段聚合物、星形聚合物、和高支化聚合物组成的组。聚合物的骨架可以源自取代的聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、或聚甲基丙烯酰胺,并且可以为丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸或甲基丙烯酸的均聚物或共聚物的取代衍生物。

[0052] 结合金属的侧基可以通过酯或通过酰胺附着于聚合物。官能团可以为硫醇反应性基团。金属原子可以为过渡元素或其同位素,或者镧系元素或镧系元素的同位素。元素标签可以进一步包括附着于聚合物的官能团的连接物,其中连接物能够共价附着于生物分子。元素标签可以进一步包括附着于连接物的间隔物,其中间隔物能够附着于生物分子。间隔物可以为聚乙二醇(PEG)间隔物。间隔物可以包括能够经由聚合物上的间隔物反应性官能团将间隔物结合于聚合物的官能团。而且,间隔物可以包括能够将连接物结合于间隔物的官能团。

[0053] 上述元素标签,可以共价附着于生物分子。生物分子可以为亲和性试剂,并且亲和性试剂可以为抗体。

[0054] 本发明的另一方面提供了一种元素标记的亲和性试剂,其中亲和性试剂用上述元素标签标记,并且其中侧基中的至少一个结合或能够结合至少一个金属原子。

[0055] 本发明的另一方面提供了一种制备上述元素标签的方法,包括:(i)提供聚合物;以及(ii)将包括至少一个金属原子或者能够结合至少一个金属原子的至少一个结合金属的侧基共价附着于该共聚物。提供聚合物的步骤可以包括聚合物的合成,其中合成选自由可逆加成断裂(链转移)聚合(RAFT)、原子转移自由基聚合(ATRP)和阴离子聚合组成的组。提供聚合物的步骤可以包括从选自由以下组成的组中的化合物合成聚合物:N-烷基丙烯酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、N-芳基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、N-芳基甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯及其功能等价物。能够结合至少一个金属原子的结合金属的侧基可以包括二亚乙基三胺五乙酸酯(DTPA)配体或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)配体。所述方法可以进一步包括官能化所述聚合物,其中的官能团能够共价结合生物分子。所述方法可以进一步包括将连接物附着于聚合物的官能团,其中连接物能够结合生物分子。所述方法可以进一步包括将生物分子共价结合于连接物。最后,所述方法可以进一步包括将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基。

[0056] 本发明的另一方面提供了一种制备上述元素标签的方法,包括:(i)提供包括至少一个聚合物,其包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子的结合金属的侧基,并包括允许该聚合物共价结合连接物的官能团;(ii)将连接物附着于所述聚合物的官能团,其中该连接物能够结合生物分子;(iii)将生物分子共价结合于所述连接物;以及(iv)

将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基。将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基的步骤可以在步骤(ii)之前进行。将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基的步骤可以在步骤(iii)之前进行。将至少一个金属原子结合于至少一个结合金属的侧基的步骤可以在步骤(iii)之后进行。所述方法可以进一步包括将间隔物附着于连接物的步骤,其中所述间隔物位于所述连接物和生物分子之间,和/或将间隔物附着于所述聚合物的步骤,其中所述间隔物位于所述聚合物和所述连接物之间。所述间隔物可以在步骤(ii)前加入。所述间隔物可以为聚乙二醇(PEG)间隔物。所述间隔物可以包括能够经由聚合物上的间隔物反应性官能团将间隔物结合于聚合物的官能团。间隔物可以包括能够将间隔物结合于连接物的官能团。所述方法可以包括使硫醇与马来酰亚胺附着基团反应的步骤。

[0057] 本发明的另一方面提供了一种通过上述方法制备的元素标签。

[0058] 本发明的另一方面是一种用于分析物的分析的方法,包括(i)将上述元素标记的亲合性试剂与分析物反应(*incubating*),其中亲合性试剂与分析物结合;(ii)分离未结合的标记亲合性试剂与结合的亲合性试剂;以及(iii)通过元素分析来分析结合于附着于分析物的亲合性试剂的元素。

[0059] 本发明的另一方面提供了一种用于两个或多个分析物的多重分析的方法,包括:(i)将上述两个或多个差别元素标记的亲合性试剂与两个或多个分析物反应,其中所述亲合性试剂与分析物结合,产生两个或多个差异标记的分析物;(ii)分离未结合的亲合性试剂与结合的亲合性试剂;以及(iii)通过元素分析来分析结合于两个或多个分析物的差异标签。

[0060] 本发明的另一方面提供了一种用于分析物的分析的方法,包括:(i)将上述元素标签与分析物反应,以便所述元素标签与分析物结合;(ii)分离未结合的元素标签与结合的元素标签;以及(iii)通过元素分析来分析结合的元素标签。

[0061] 上述方法任何一种中的亲合性试剂可以用荧光标记进一步标记。分析物可以位于细胞内或细胞(例如患病的细胞,以及另外的白血病细胞)上。分析的步骤可以包括全分析,其中原子组成在样品的整个体积上进行平均,和/或单一粒子的分析。所述粒子可以为细胞。

[0062] 上述方法可以通过借助ICP-MS的元素分析或通过基于流式细胞仪的质谱仪进行。

[0063] 本发明的另一方面提供了一种用于上述元素标签的制备的试剂盒,包括下述中的至少一个:聚合物,包括至少一个结合金属的侧基(其包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子)并进一步包括允许聚合物附着于连接物、间隔物、或生物分子之一的官能团;金属溶液;用于将连接物、间隔物或生物分子附着于聚合物的试剂;用于将官能团附着于连接物或间隔物的试剂;用于将金属附着于聚合物的试剂;包括抗体的亲合性试剂;缓冲剂;用于制备元素标签的说明书;用于将元素标签附着于亲合性试剂的说明书;以及用于将金属附着于元素标签的说明书。

[0064] 本发明的另一方面提供了一种用于根据上述方法的分析物分析的试剂盒,包括下述中的至少一个:聚合物,包括至少一个结合金属的侧基(其包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子)并进一步包括允许聚合物附着于连接物、间隔物、或生物分子之一的官能团;金属溶液;用于将连接物、间隔物或生物分子附着于聚合物的试剂;用于将官能

团附着于连接物或间隔物的试剂；用于将金属附着于聚合物的试剂；包括抗体的亲和性试剂；缓冲剂；用于制备元素标签的说明书；用于将元素标签附着于亲和性试剂的说明书；用于将金属附着于元素标签的说明书；以及使用元素标签通过元素分析用于分析物的分析的说明书。

[0065] 上述试剂盒的任何一个中的聚合物可以选自由丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸、和甲基丙烯酸的均聚物或共聚物组成的组。所述试剂可以包括以下中的至少一个：TCEP(三(2-羧乙基)膦)、配体-聚合物-连接物-间隔物结合物、磷酸盐缓冲剂、TBS(tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲盐水)、EDTA(乙二胺四乙酸)、乙酸铵缓冲剂、抗体、金属盐溶液、镧系元素盐溶液、阻断缓冲剂(或封端缓冲剂,blocker buffer)、冲洗缓冲剂、FBS(胎牛血清)、DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基(DuIbacco's Modified Eagle's Medium))、BSA(牛血清白蛋白)、二硫苏糖醇、双马来酰亚胺、以及DMF(二甲基甲酰胺)。所述聚合物可以附着于连接物或者它可以被附着于连接物和间隔物。

[0066] 申请人的教导的这些和其他特征在本文中陈述。

## 附图说明

[0067] 本发明在附图中的图示中举例说明,这些附图是示例性的而非限制性的,并且其中相同的参考符号用于指代相同或相应的部分(部件)。

[0068] 图1:用于检测生物分子的元素标签的示意图,其根据本发明具有通用结构I。提出的聚合物金属螯合物:R=有机基团,L=金属配体。在结构“a”中,聚合物的每个重复单元具有配位的 $Ln^{3+}$ ,以(L)表示。在结构“b”中,这些重复单元的部分具有根据本发明的有机基团R。星号(\*)代表聚合物的起始端。NAS为N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺的示意图。NMAS为N-甲基丙烯酰氧基琥珀酰亚胺的示意图。

[0069] 图2:可以用于将元素/金属“L”附着于聚合物的功能性配体的合成的实例的示意图。

[0070] 图3:将配体(侧基)附着于RAFT聚合物(图解3)和ATRP聚合物(图解4)的示意图。

[0071] 图4:将配体(侧基)附着于通过阴离子聚合(图解5)和PDMAEMA(图解6)产生的聚合物的示意图。

[0072] 图5:将偶联基团(连接物)附着于RAFT聚合物(图解7a)、ATRP聚合物(图解7b)、和通过阴离子聚合产生的聚合物(图解7c)的示意图。

[0073] 图6:根据本发明的偶联化学(反应)的可替换实例的示意图。在图解8b中,术语“端基”用于指偶联基团。

[0074] 图7:单体的结构的示意图。

[0075] 图8:对于二噁烷中的DMA和NAS的无规共聚物在80℃的实验条件和分子量数据。

[0076] 图9:配体-聚合物结合物的制备的示意图。

[0077] 图10:DOTA基配体-聚合物结合物的制备的示意图。

[0078] 图11:元素标签的合成的示意图。

[0079] 图12:产生具有用于附着DTPA配体的氨基侧基的聚合物方法和采用基于脒胺的新型引发剂的方法的示意图。

[0080] 图13为实验6的结果的条形图。生长的K562细胞(非分化的)用携带鉴别性镧系元

素的配体-聚合物结合物(如图解11中所描述的)标记的初级抗体染色:抗-CD38单克隆抗体用La标记;抗-CD110用Eu标记;抗-CD61用Dy标记;抗-CD45用Ho标记;抗-CD54用Nd标记;CD49d用Pr标记。细胞与标记的抗体,单独地与每个抗体,或同时与全部抗体(全部;6-丛)反应。注意高表达的普遍有核血细胞标记物CD45(Ho)平均为细胞粘附标记物(CD54,Cd38,CD49d)的10倍,为巨核细胞(megakaryocyte)分化标记物CD61和CD110(细胞没有被诱导沿着巨核细胞路径分化)的100倍。

[0081] 图14中的a为三维条形图,示出了利用流式细胞仪从用CD33-FITC或双标记的CD33-FITC-Pr染色的细胞获得的荧光的直接比较,图14中的b为三维条形图,示出了利用ICP-MS从用CD33-Pr或双标记的CD33-FITC-Pr染色的细胞获得的标准化应答的直接比较。

[0082] 图15为RAFT聚合过程的流程图I。

[0083] 图16为聚合物-DTPA-连接物附着过程的流程图II。

### 具体实施方式

[0084] 对于元素标签的总要求比对于荧光标签<sup>12</sup>的严格性低,因为元素的化学性质对于其通过元素分析的检测是不重要的。所述标签应当包括可再现的,并且优选大量给定元素或同位素组合物的原子。所述标签可以包括一个元素或同位素,或由超过一个元素或同位素的组合物组成。它还可以包括同位素的天然混合物。而且,有可能该元素标签可以包括一个包括某一金属或同位素的侧基以及包括另一金属或同位素的第二侧基。并入的相同金属的数量的可再现性是定量分析的基础,那些原子的数量的增加线性提高了灵敏度。另一关键特性是对滤去(leaching)的抗性,这将本发明与DELFI A产物区别开。螯合金属的移动性在DELFI A产物(DELFI A<sup>®</sup> Assays and Reagents, PerkinElmer, USA)中是必需的。标签原子可以为区别所述标签与样品中其他原子的元素或同位素的任何原子,包括来自与区别元素标签相关的其他标签原子。典型地,标签原子为金属,尤其是过渡金属,最典型的为镧系元素。

[0085] 用于检测分析物的标签具有图1的通用结构I。

[0086] 聚合物可以为本领域技术人员已知的任何聚合物。聚合物的实例在图1到4中示出。此外,聚合物骨架可以源自取代的聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、或聚甲基丙烯酰胺。此外,聚合物的骨架可以为取代的丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸或甲基丙烯酸的均聚物或共聚物的衍生物。聚合物可以通过本领域技术人员已知的许多方法合成。例如,合成可以借助化合物如N-烷基丙烯酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、N-芳基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、N-芳基甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯及其功能等价物完成。

[0087] 所述配体或侧基可以为本领域技术人员已知的任何配体。配体的在图2到4中示出。

[0088] 连接物可以为本领域技术人员已知的任何连接物。连接物的实例在图5和6中示出。连接物是可选的。

[0089] 间隔物是可选的。间隔物的实例包括PEG嵌段间隔物,以及本领域技术人员已知的其他间隔物。

[0090] 本发明主要但不是排他地涉及以下方面:

[0091] (i) 聚合物金属标签载体合成。功能上,金属标记的聚合物在通常分析条件下是稳定的,其包括结合的金属非常低的动力学不稳定性和聚合物之间的金属交换率;

[0092] (ii) 与聚合物金属标签载体组合的附着(连接物)基团的合成和表征;

[0093] (iii) 标记的亲合性试剂的合成,其功能上包括与聚合物金属标签载体结合的附着(连接物)基团。所述标记的亲合性试剂可以为标记的抗体或其他标记的亲合性试剂;以及

[0094] (iv) 采用亲合性试剂作为多重性工具的方法。

[0095] 更一般地,本发明涉及用于标记生物有机分子(包括亲合性试剂如抗体)的含金属标签的合成和检测。特别设计用于元素分析,这样的标签通常为(i)水溶性的;(ii)非毒性的;(iii)通过已知的层析、离心、过滤、或透析法易于与标记的物质分离;此外,可以具有三或四个部分:附着基团(连接物)、可能的间隔物(例如,PEG间隔物)、聚合物骨架(载体)、以及标签原子(尽可能多的(相同金属或同位素的,或不同金属和/或同位素的)标签原子)。对于不同的元素分析仪,元素标签的特征可以可以是类似的。

[0096] 虽然本发明的实施方式例举了利用抗体作为亲合性试剂,但是可以理解,可以使用其他亲合性试剂,并落入本发明的范围。

[0097] 聚合物载体:本发明的一个重要方面是聚合物的合成,其可附着大量的标签原子。通常标签原子为金属原子。聚合物可以为水溶性的。该部分不受化学含量限制。然而,如果所述骨架具有相对可再现的大小(例如,长度、标签原子的数量、可再现的树形化合物性质等),则简化了分析。还要考虑对于稳定性、可溶性、非毒性的要求。因此,通过合成策略(将许多官能团沿骨架放置),加上在可以用于经由连接物将聚合物附着于生物分子(例如亲合性试剂的一端的不同基团的功能性水溶性聚合物的制备和表征是本发明的一部分。

[0098] 要用于检测分析物的标签具有图1的通用结构。要检测的信号为聚合物的信号,其包括作为其结构的一部分的元素(例如,镧系元素(Ln)原子)的约1到1000个(或更多个)原子。在聚合物一端的柔性连接物/间隔物可以包括硫醇反应性官能团如马来酰亚胺,通过该基团可以连接到用于特异性靶分析物的亲合性试剂(例如抗体)。变形方式包括附着于生物分子的伯胺或本领域技术人员已知的其他附着方法。用于连接臂的官能团的选择的实例可以从关于PEG化抗体(PEGylated antibody)的文献获得,最近由Chapman<sup>13</sup>综述。作为金属原子标签的载体的聚合物具有与PEG聚合物(其在不丧失结合亲合性的情况下附着于各种抗体)类似数量的骨架原子。例如,PEG2000(2KDa)具有对应于140个骨架原子的45的平均聚合度,PEG5000具有340个骨架原子。为了将这些标签正确放置,IgG抗体从Fc端到Fab端的平均大小为约11nm<sup>14</sup>。聚合物构建体的回转半径应当尽可能小,有些情况下在约2nm到11nm之间。

[0099] 在一个实施方式中,本发明涉及包括作为侧基的取代基的Ln<sup>3+</sup>原子的聚合物以及它们的合成。在图1的结构“a”中,聚合物的每个重复单元具有配位的Ln<sup>3+</sup>,用(L)指示。每个侧基具有(L)取代基既不可能也不必要。在图1的结构b中,重复单元的一部分具有有机基团R。在这些结构中,星号(\*)代表聚合物的起始端。考虑下面的因素:1)聚合物可以为水溶性的。因为水解稳定性,所以可以使用N-烷基丙烯酰胺、N-烷基甲基丙烯酰胺、以及甲基丙烯酸酯或功能等价物。2)包括约1到1000(1到2000骨架原子)的聚合度(DP)涵盖大多数感兴趣的聚合物。具有相同功能性的较大的聚合物在本发明的范围内并且本领域技术人员理解是可能的。通常聚合程度在10到250之间。3)聚合物可以通过导致相对狭窄的多分散性的途径

合成。聚合物可以通过原子转移自由基聚合 (ATRP) 或可逆加成-断裂 (RAFT) 聚合来合成, 其应当导致  $M_w/M_n$  的值在 1.1 到 1.2 的范围内。可替换的策略涉及阴离子聚合, 其中可获得具有约 1.02 到 1.05 的  $M_w/M_n$  的聚合物。通过选择起始剂或终止剂, 两种方法允许控制端基。这允许合成可以附着连接物的聚合物。4) 可以采用制备重复单元中包括功能性侧基的聚合物的策略, 其中配位的过渡金属单元 (例如  $L_n$  单元) 可以附着于所述重复单元。这个实施方式具有多个优点。它避免了可能源自进行包括配体的单体聚合的复杂化。此外, 该聚合物骨架已知是可以适于大多数 (如果不是全部) 的含  $L_n$  聚合物的骨架。因此, 所述聚合物可以具有共同的平均链长和链长分布。5) 类型 “a” 的靶聚合物可以为带负电荷的聚合电解质或具有两性离子侧基。为了最小化侧基之间的电荷排斥, 对于 ( $L_n3+$ ) 的靶配体应当在螯合物上提供为 -1 的净电荷。对于类型 “b” 的聚合物, R 基大部分是不带电的, 虽然在一个实施例中, 发明人教导了其中 R 基的小部分 x 具有正电荷的聚合物。最后, 能够使具有硫醇反应性基团的连接物基团附着于聚合物的各种化学是熟知的。大量侧基可以加入到聚合物。实践上, 所述数量可以为 1 到 1000, 更典型地为 10 到 250。结合金属的侧基可以通过本领域技术人员已知的方法附着于聚合物, 例如, 所述侧基可以通过酯或通过酰胺附着。

[0100] 用于将 (L) 附着于聚合物的功能性配体的合成实例在图 2 中示出 (图解 1 和 2)。这些实例是示例性的而不用来限制本发明的范围。

[0101] 螯合物 (标签原子) 选择和合成: 镧系元素的使用在这里可行地建立, 然而, 对于不同的元素可以实现类似的结果。系列镧系元素观察到非常类似的配位化学。所有镧系元素有利于 +3 氧化态, 并优先与硬氧 (hard oxygen) 配体配位。镧系元素没有表现出限定的配位几何结构并且在该系列上配位数在 7 到 10 之间变化。因此, 相同螯合-衍生的聚合物可以用于所有的  $L_n$  金属, 这有利于在多重试验<sup>15</sup>中所用的包括不同镧系元素的标签生产。利用不同金属的不同实施方式可以利用与它们的化学性质相关的类似考虑获得。已经开发了用作放射性药物和成像剂的大量  $L_n$  复合物<sup>16</sup>。但是本领域没有披露附着于聚合物骨架的侧基上的金属原子。开发用于这些应用的多齿螯合物形成热力学稳定的和动力学惰性的  $L_n$  复合物, 这对于最小化游离镧系元素在体内的毒性是重要的。并入这些最优化的镧系元素螯合物, 作为聚合结构上的侧基, 似乎是首次在这里进行描述。

[0102] 作为实例, 描述了作为聚合骨架上共价链接的螯合物的功能性实例的两个配体框架。对于这个实施方式的选择标准包括已知的合成、七齿或八齿配位以促进针对金属离子解离的动力学稳定性、用于将螯合物附着于聚合物的伯胺侧官能团、用于配位的螯合物的 -1 净电荷。二亚乙基三胺五乙酸酯 (DTPA) (无环螯合剂) 可以容易地衍生作为胺官能化配体 (图解 1, 图 2)。偶联单保护的二胺与商业上可获得的 DTPA 酐, 随后脱保护, 提供了待偶联到聚合物活性酯的候选配体。所述化合物一旦复合到镧系元素, 其净电荷为 -1。这个螯合剂的容易合成使得它成为用于最优化具有附着螯合剂的聚合骨架的有吸引力的起始点。

[0103] DTPA 配体比基于环烯框架 (cyclen framework) 的大环配体本身动力学更不稳定。环烯基配体的大环性质预先建立了金属结合位点, 导致更大的热力学和动力学稳定性。已知这些螯合物在体内数天内是稳定的<sup>17</sup>。商业上可获得的三叔丁基甲基环烯 (大环配体 (Macrocyclics)) 与容易获得的高丝氨酸衍生物的反应提供了正交保护的 DOTA 衍生物 (图解 2, 图 2)<sup>18</sup>。Fmoc 保护基可以被去除以接近胺并使它可用于偶联聚合物骨架。在一些情况下, 在 DOTA 螯合物和聚合物之间采用间隔物可能是必需的。各种选择性地保护的不同长度氨基

酸在商业上可获得并可以容易地偶联和脱保护以形成连接物。这种螯合物的镧系元素复合物带有-1的净电荷。基于功能性,这些具有反应性-NH<sub>2</sub>基团的Ln螯合物被称为(L)-NH<sub>2</sub>。

[0104] 聚合物合成和螯合物附着:下文中,将描述候选聚合物的合成、功能性螯合物附着于聚合物骨架、以及包括金属的聚合物的表征。这些用于举例,并不限制权利要求的范围。可以利用本领域技术人员已知的其他实例。

[0105] 无规共聚物聚(DMA-共-NAS):一篇最近的报道<sup>19</sup>描述了N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS)与N,N-二甲基丙烯酰胺(DMA)的75/25摩尔比无规共聚物(3,图3)通过RAFT的合成,具有高转化率,在5000到130000范围内的优异摩尔质量控制,并且M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>≈1.1。在这个实施方式(图解3,图3)中,图3的图解3的活性NHS酯与具有反应性氨基的配位镧系元素(L)反应,产生图3的共聚物4。图15为示出了RAFT聚合中涉及的步骤的流程图。

[0106] 聚(NMAS):另一方法已经由Müller<sup>20</sup>报道,用于将药物结合物附着于聚合物骨架。在这种方法中,Müller通过ATRP聚合NMAS(图解4,图3),获得的聚合物具有范围在12到40Kda的平均摩尔质量,M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>为约1.1。在他们的实验中,限制量的具有间隔物和伯胺的各种药物或药物-模拟物与图3的图解5的NHS酯基反应,随后残余位点与过量Me<sub>2</sub>NH反应。它们的引发剂为溴代异丁酸的羟乙基酯;因此,所有聚合物链均具有作为端基的伯醇。这里,图3的图解5的样品与过量(L)-NH<sub>2</sub>反应,最大化可以被附着于聚合物的(L)基团的数量。

[0107] 聚(MAA):申请人的教导的另一方面涉及具有非常狭窄的摩尔质量分布的聚合物标签的特定功能性优点。聚甲基丙烯酸(PMAA)可以通过其叔丁基或三甲基甲硅烷基(TMS)酯的阴离子聚合制备。如果该反应在酯水解前用环氧乙烷终止(图4),那么聚合物将具有-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH作为功能性端基。将(L)附着于聚合物的一种途径涉及聚合物的四丁基铵羧酸盐与(L)-NH<sub>2</sub>的溴代乙酰胺衍生物的反应(图解5,图4)。

[0108] 聚(DMAEMA):最近,聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)的样品<sup>21</sup>通过ATRP制备。这是一种熟知的方便地制备的聚合物,具有2到35Kda范围的平均M<sub>n</sub>值,M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>为约1.2。这个聚合物也可以通过具有较窄大小分布的阴离子聚合合成<sup>22</sup>。这个聚合物可以与(L)-NH<sub>2</sub>的溴代乙酰胺衍生物反应。这产生了两性离子聚合物8(图解6,图4),其具有合适的水溶性。未反应二甲氨基乙基基团在中性pH下被质子化,并对聚合物贡献小的正电荷。

[0109] 间隔物:具有金属的聚合物标签和亲和性试剂活性之间的干扰的潜在来源是在附着于亲和性试剂时大量聚合物的紧密接近。间隔物,例如,PEG间隔物,可以位于连接物和聚合物之间或聚合物和连接物之间。用于加入间隔物的方法是本领域技术人员已知的。

[0110] 间隔物也可以为聚合物骨架的组成部分以帮助减轻这个问题。在申请人的教导中,合成(例如参见图解4-6,图3和4)可以被改良以形成PEG嵌段共聚物。该嵌段共聚物的PEG部分用作PEG间隔物,并且该合成策略可以如在响应于表明具有结合效率或灵敏度问题的生物测定结构中需要时而改变PEG间隔物长度,。间隔物可以为本领域技术人员已知的任何间隔物。例如,它可以为图解12中示出的最小间隔物和化合物12。这个特定设定似乎是新颖的,因为我们没有看到其在先申请。

[0111] 端基控制和偶联化学:根据Chapman对PEG化抗体<sup>13</sup>的综述,经由与赖氨酸的自由氨基反应的PEG附着的方法是成功的,但是获得的PEG化抗体表现出降低的抗原结合效率。似乎与抗体中各种赖氨酸基团化学反应的随机性质导致在干扰结合的位点的PEG附着。对于其中PEG链特异性地附着于FC片段(其通过位点-特异性突变被引入抗体)中的单一半胱氨

酸的情况,获得更良性的结果,这里描述了抗体的FC片段内的二硫键的还原,随后聚合物共价附着于形成的-SH基团的一个或两个。因此,可以在聚合物的一个末端使用硫醇反应基。

[0112] RAFT聚合物:RAFT聚合物的硫代苯甲酸酯(盐)端基方便地转变为末端-SH基团。这个化学反应在图5的图解7a中示出,用于图3的聚合物4。对于本领域技术人员,用于交联硫醇是多种方法是已知的,类似于对于-SH封端聚乙二醇(PEG-SH)<sup>23</sup>描述的反应,并允许聚合物经由混合的二硫化物附着于抗体或其他亲和性试剂的自由-SH(表示为“蛋白-SH”)。可替换地,双马来酰亚胺衍生物是商业上可获得的,并且聚合物用这些试剂的烷基化,随后通过GPC(凝胶渗透色谱, Gel Permeation Chromatography)纯化和与抗体或其他亲和性试剂的自由硫醇反应,提供了希望的结合物<sup>24</sup>。

[0113] ATRP聚合物:由Müller团队<sup>25</sup>报道的图3中结构5的聚合物具有末端-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH基团。在这里描述了用于聚合反应的不同引发剂。2,6-亚萘基(naphthalene)衍生物是容易获得的,并提供正交保护的胺。在脱保护后,胺与双官能NHS-马来酰亚胺(硫醇-胺交联剂)的反应,将提供用于抗体结合的聚合物标记试剂。这种引发剂还提供了用于聚合物定量的方便生色团。这也在图5的图解7b中示出。

[0114] 阴离子聚合(图解5,图4):阴离子聚合通常可以通过与功能性亲电试剂反应而终止,以对聚合物引入端基<sup>26</sup>。烯醇化物有效地与烯丙基和苯甲基卤化物反应。利用表氯醇猝灭苯乙烯的聚合已经表明是有问题的<sup>28</sup>。用于猝灭活性聚(甲基丙烯酸叔丁酯)的烯醇化物端以产生末端环氧化物的条件描述在这里。虽然甲基丙烯酸缩水甘油酯可以在低温下在LiCl存在下进行阴离子聚合,其使得扩散阴离子亲核性较低,但是预期甲基丙烯酸叔丁酯的烯醇化物应当在较高温度下使环氧基开环<sup>30</sup>。环氧化物借助叠氮化物的打开提供了在酯水解条件下稳定的邻位(或正交,orthogonal)官能团。在Cu(I)盐存在下用炔处理叠氮化物高产率地产生三唑<sup>31</sup>。通过利用这个偶联反应,硫醇反应性马来酰亚胺装配到聚合物的末端。这也在图5的图解7c中示出。

[0115] 附着(连接物)基团:附着基团提供了生物有机(蛋白、肽、寡核苷酸)分子如亲和性试剂与元素标签之间的共价键。例如,该链接可以利用马来酰亚胺附着基团经由硫醇实现;通过N-末端或碱性侧链(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)(参见图解8c,图6),利用p-(氯甲基)苯乙烯(参见图解8c,图6)通过C-末端或酸性侧链(天冬氨酸、谷氨酸),或经由抗体或其他亲和性试剂上的糖部分的氧化和经由胍基团的偶联。人们可以利用通过抗体FC片段中的二硫键的还原所形成的硫醇基团。这个组合“生物有机分子-附着基团-元素标签”被认为在这里是首次描述。

[0116] 偶联化学的功能性实例:存在四个通常用于将聚合物(如PEG)附着于蛋白的自由硫醇的主要偶联化学。最近已经综述了这些反应的优点和缺点<sup>32</sup>。一个方法涉及图5的图解7a中的二硫化物交换。三个其他的常见反应涉及-SH加成到马来酰亚胺或乙烯基砷以及从碘乙酰胺置换碘化物(图解8a-c,图6)。为了避免在水中的缓慢水解(其对于马来酰亚胺和碘乙酰胺基团是典型的),其中硫醇反应试剂在标记亲和性试剂前加入到具有(L)的聚合物的末端的策略是可能的。这个策略利用最近由Sharpless<sup>33</sup>开发的“点击(链接,click)”化学(图解8b,图6),涉及叠氮化物1,3-二极加成到乙炔,Sharpless已经证实在温和条件下具有定量产率的反应。为了在具有末端-NH<sub>2</sub>基团的聚合物的末端引入乙炔单元,它们与4-戊酸的活性酯衍生物反应。然后聚合物设置用于与X-R-N<sub>3</sub>形式的衍生物的反应,其中R为间隔

物,X代表硫醇反应基。

[0117] 聚合物偶联到抗体或其他亲和性试剂:作为实例,抗体或其他亲和性试剂中的二硫键的还原可以利用共价连接到珠形琼脂糖支持物(Pierce)的固定三烷基膦TCEP(三[2-羧乙基]膦酸盐)进行。已知TCEP为宽pH范围上烷基二硫化物的有效还原剂,并且不干扰通常使用的巯基反应试剂如马来酰亚胺交联剂。使用珠粒允许通过从还原性试剂的简单离心以及随后从珠的分离而回收还原的抗体或其他亲和性试剂。

[0118] 聚合物修饰的抗体的纯化:由于IgG抗体的大尺寸(150KDa),一种选择是利用凝胶过滤色谱从抗体分离过量金属化的标记聚合物(20-40KDa)。可替换地,蛋白A和蛋白G已经用于纯化抗体。

[0119] 如本领域技术人员已知的,元素或金属原子可以在标记的生物分子产生期间的不同步骤加入到聚合物。有利的是,在抗体或其他亲和性试剂与配体-聚合物结合后加入标签的元素(金属)。这个策略具有多个优点:i)抗体-配体-聚合物结合物转化为抗体-金属-聚合物结合物可以在生物测定前直接进行;ii)在相同的条件下,大量亲和性分子可以用相同的配体-聚合物结合物标记。使用的金属(或同位素)的选择可以在多重试验前由试剂使用者直接确定,显著提高实验灵活性;iii)两个标记阶段的脱偶联允许系列重要的独立控制实验,其中相同的抗体可以用不同的金属标记;iv)内标物的选择不受阻碍,并且元素分析仪的相对灵敏度可以有效地控制。

[0120] 可以采用许多形式的用于合成标记的生物分子的步骤的顺序。下面提供了三个实例,但是应当理解,其他的步骤顺序也是可以的:

[0121]

A	B	C
合成聚合物	合成聚合物	合成聚合物
金属结合于聚合物	连接物结合于聚合物	连接物结合于聚合物
连接物结合于聚合物	金属结合于聚合物	连接物结合于抗体
连接物结合于抗体	连接物结合于抗体	金属结合于聚合物

[0122] 此外,连接物可以在连接物附着于聚合物之前附着于生物分子。最常见地,金属在标记的亲和性试剂结合于分析物前的任何时间附着。可以在将亲和性试剂附着于分析物后加入金属,但是背景预期是提高的,因为许多分析物,尤其是细胞,将非特异性结合金属。因此,较不可能在亲和性试剂结合于分析物后成功地进行。

[0123] 此外,聚合物元素标签可以附着于不同于亲和性试剂的生物分子。例如,聚合物元素标签可以直接附着于分析物,例如但不限于生长因子、细胞因子或趋化因子,用于研究配体-受体相互作用的动力学。特别地,具有聚合物元素标签的EGF(表皮生长因子)可以用作探针,以研究细胞表面上的EGFR(表皮生长因子受体)的丰度、受体二聚化和内在化。这个方面也在申请人教导的范围内。两个或多个分析物也可以在多重反应中分析。

[0124] 申请人的教导的多个方面根据下面的实施例进一步理解,其不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

[0125] 实施例

[0126] 实施例1:N,N-二甲基丙烯酰胺和N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺的共聚物通过RAFT聚合的合成。

[0127] N,N-二甲基丙烯酰胺 (DMA) 和N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺 (NAS) 通过可逆加成-断裂链转移 (RAFT) 聚合技术进行共聚,以获得具有经由反应性NAS单元统计地接枝的侧基的无规共聚物前体<sup>19</sup>。DMA和NAS的无规共聚物、聚 (DMA-共-NAS) 利用二硫代苯甲酸叔丁酯 (t-BDB) 作为链转移剂 (CTA) 来进行制备 (图解9,图7)。

[0128] 二硫代苯甲酸叔丁酯 (t-BDB) 的制备<sup>34</sup>。在装备有磁搅拌器的500mL圆底烧瓶中,将150mL的s-(硫代苯甲酰) 巯基乙酸 (0.27g, 2.4mmol) 的二乙醚溶液加入到100mL的2-甲基-2-丙基硫醇钠 (0.510g, 2.9mmol) 的碱性水溶液 (NaOH, 1mol L<sup>-1</sup>) 中。这个两相混合物在室温下剧烈搅拌5小时。随后,去除紫色醚相,用500mL碱性水溶液 (NaOH, 1mol L<sup>-1</sup>) 冲洗两次,用500mL的10%NaCl水溶液冲洗两次,在无水硫酸镁上干燥。通过硅胶色谱纯化, (Kiesegel-60), 其中利用石油醚/乙酸乙酯 (99/1, v/v) 作为洗脱剂,产生作为深紫色油的二硫代苯甲酸叔丁酯 (t-BDB) (90%产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.69 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 7.36 (m, 2H, 间-ArH), 7.50 (m, 1H, 对-ArH) 和7.88 (m, 2H, 邻-ArH)。

[0129] N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺 (NAS) 的制备。<sup>35</sup>N-羟基琥珀酰亚胺 (10g, 0.086mol) 和三乙胺 (13.2g, 0.129mol) 在0℃溶解在氯仿 (130mL) 中。在2小时期间内将丙烯酰氯 (8.6g, 0.094mol) 逐滴加入到搅拌的反应混合物。反应图2的图解1中描述。在0℃搅拌另外的30分钟后,溶液用60mL的饱和NaCl水溶液冲洗两次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩以获得30mL的残余体积。加入乙酸乙酯/戊烷混合物 (14mL, 1:3v/v), 并将温度维持在0℃,以诱导NAS结晶过夜 (70%产率)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.95 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.20 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 6.4 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>) 和6.75 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>)。

[0130] DMA和NAS的无规共聚物的制备。一般实验条件:使用前DMA在减压下蒸馏。将单体 (t-BDB)、引发剂2,2'-偶氮二(2-甲基丁腈) (AMBN) 和溶剂二噁烷引入装备有磁搅拌器的Schlenk管中。混合物通过三个冰冻-真空-解冻循环进行脱气,随后在氩下在80℃恒温油浴中加热。百分比产率重量分析地进行计算。

[0131] 通过应用合适的色谱和光谱方法确认共聚物的结构。凝胶渗透色谱 (GPC) 用于确立共聚物的分子量和分子量分布。使用装备有Viscotek VE3210 UV/vis检测器和VE3580反射率检测器以及Viscotek GMHHR-M Viscogel™ GPC柱的Viscotek液体色谱仪。利用Viscotek VE1121 GPC泵将流量维持在0.5mL/min。1-甲基-2-吡咯烷酮用作洗脱剂。分子量作为聚苯乙烯当量提供。图15为RAFT聚合过程的流程图。

[0132] 包括13mol%NAS单元的共聚物的制备。将NAS (0.81g, 4.82mmol)、DMA (3.2mL, 31mmol)、AMBN (70mg, 0.36mmol) 和t-BDB (116mg, 0.521mmol) 加入33mL的1,4-二噁烷中。Schlenk管中的溶液脱气并在80℃加热18小时。随后溶液冷却并在300mL二乙醚中沉淀。收集的固体在溶解在1,4-二噁烷中并沉淀在二乙醚中。干燥后的聚合物的产率为75%。分子量和多分散性在图8中示出。

[0133] 包括47mol%NAS单元的共聚物的制备。将NAS (2.33g, 13.9mmol)、DMA (N,N-二甲基丙烯酰胺) (1.6mL, 15.5mmol)、AMBN (70mg, 0.36mmol) 和t-BDB (116mg, 0.521mmol) 加入30mL 1,4-二噁烷中。Schlenk管中的溶液脱气并在80℃加热18小时。在管中观察到一些沉淀。随后溶液被冷却并在300mL二乙醚中沉淀。收集的固体再溶解在DMF中并沉淀在二乙醚中。干

燥后的聚合物的产率为80%。分子量和多分散性在图8中示出。

[0134] 包括60mol%NAS单元的共聚物的制备。它通过与上述(47mol%的NAS单元)过程类似的过程制备。加入更多的NAS单体,溶剂1,4-二噁烷用DMF取代。干燥后的聚合物的产率为80%。分子量Mn和多分散性Mw/Mn在图8中示出。

[0135] 实施例2:配体-聚合物结合物的制备。

[0136] 下面的聚合物配体结合物的制备可与根据图解10和图解11,图9的胺官能化的配体使用。

[0137] 向(N,N-二甲基丙烯酰胺(DMA)和N-丙烯酰琥珀酰亚胺(NAS))共聚物(包括47mol%的NAS单元(35mg,3.5461mmol)和在DMF/H<sub>2</sub>O(60:40,1mL)中的N,N-二异丙基乙胺(300 $\mu$ l))的搅拌的溶液中加入在相同混合物中的胺侧向配体9(图9(78mg))的溶液(2ml)。反应混合物在氮气下在室温下搅拌过夜。在真空下去除溶剂,固体溶解在H<sub>2</sub>O中。通过在Amicon离心过滤机(5K MW CO.)中用去离子水(5x4ml)重复冲洗而渗析溶液。留在过滤装置中的溶液浓缩而获得淡黄色油。固体通过用二乙醚从甲醇沉淀而进一步纯化,获得黄色粉末(48mg)。

[0138] 将配体-聚合物结合物(5.5mg)溶解在1ml的50mM磷酸盐缓冲剂中(pH 8.5,2ml,20mM DTT),并将反应混合物在50 $^{\circ}$ C搅拌1小时。反应后,用乙酸使混合物成为酸性(pH 4),在Amicon离心过滤机(5K MW CO.)中用含水乙酸(5mM,5x 4ml)冲洗。留在过滤装置中的溶液随后转移到包括2ml的100mM磷酸盐缓冲剂(pH 8.5)的小反应烧瓶中。将在DMF中的1,4-二(马来酰亚胺)丁烷(50当量;32mg)加入所述烧瓶,反应混合物在50 $^{\circ}$ C搅拌过夜。蒸发溶剂得到残余物,将其溶解在H<sub>2</sub>O中,利用Amicon离心过滤机(5K MW CO.),利用去离子水(5x 5ml)再次冲洗清液。上清液冻干而获得最后的结合聚合物(4mg)。

[0139] 实施例3:配体-聚合物结合物的制备:根据图10的图解12的DOTA基结合物。

[0140] 向在DMF(3ml)和三乙胺(1ml)中具有60mol%NAS单元(100mg)的DMA-NAS共聚物的搅拌溶液中加入在DMF(2ml)中胺侧配体10(363mg,0.590mmol)的溶液。反应混合物在氮气下在室温搅拌过夜。在真空下去除溶剂,残余物11溶解在纯三氟乙酸(3ml)中并在室温下搅拌过夜。蒸发溶液,残余物在水中收集,并在Amicon离心过滤机(5K MW C.O.)中通过用去离子水(6x5ml)重复冲洗进行渗析。残留物在过滤装置中的溶液(大约0.8ml)进行浓缩而获得黄色固体12(179mg)。

[0141] 聚合物-配体结合物12的全部样品溶解在包括20mM DL-二硫苏糖醇的50mM磷酸盐缓冲剂(pH 8.5,2ml)中,反应混合物在50 $^{\circ}$ C搅拌1小时。之后,用乙酸将混合物酸化到pH 4,并用含水乙酸(5mM,5x5ml)在Amicon离心过滤机(5KMW C.O.)中冲洗。留在过滤装置中的溶液(0.8ml)随后转移到包括磷酸盐缓冲剂(100mM,pH 8.5,5ml)的小反应烧瓶中。将在DMF(2ml)中的2,2'-(亚乙二氧基)二(乙基马来酰亚胺)(191mg,0.619mmol)的溶液加入到所述烧瓶中,反应混合物在室温下搅拌1小时。水(3ml)加入所述烧瓶,固体通过过滤去除。利用Amicon离心过滤机(5KMW C.O.)用去离子水(5x5ml)再次冲洗所获得的清液,上清液通过具有HPLC系统的Sephadex G-50柱(利用水作为洗脱剂)纯化。收集馏分并冻干,而获得最后的结合聚合物13(165.0mg)。

[0142] 实施例4:配体-聚合物结合物的制备:根据图9、11和图16的DTPA基结合物。

[0143] 向在DMF(30ml)和三乙胺(4.3ml)中的具有60mol%NAS单元(2.0g)的DMA-NAS共聚

物的搅拌溶液中加入在DMF (10mI) 中的2-氨基乙氨基甲酸叔丁酯14 (2.5g, 15.6mmoI) 的溶液。在氮气下在室温搅拌反应混合物。随后混合物在500mI 二乙醚中沉淀。收集的固体15 (400mg) 溶解在纯三氟乙酸 (3mL) 中并在室温下搅拌过夜。在真空下去除溶剂, 残余物11溶解在纯三氟乙酸 (3mL) 中并在室温下搅拌过夜。蒸发溶液, 在水中收集残余物, 在Amicon离心过滤机 (5KMW C.O.) 中通过用去离子水 (6x5mI) 重复冲洗而渗析。浓缩残留在过滤装置中的溶液 (大约0.8mL) 而获得黄色固体16 (210mg)。

[0144] 根据公开的过程制备DTPA琥珀酰亚胺酯<sup>36</sup>。将16g DTPA (40.64mmoI) 溶解在320mI 乙腈 (加入23g, 230mmoI 三乙胺) 中。在50℃搅拌溶液以溶解DTPA。在室温下同时加入3.36g 二环己基碳二亚胺 (DCC, 16.3mmoI) 和1.9g的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 16.3mmoI)。反应进行过夜。观察到白色沉淀并通过滤纸滤出, 产生溶液 (A)。

[0145] 将210mg固体16 (大约0.8mmoI 氨基基团) 溶解在80mL蒸馏水中并在室温下加入溶液 (A) 中。加入5mL三乙胺, 在室温下溶液搅拌过夜。随后蒸发溶剂 (三乙胺, 乙腈), 加入100mL水。溶液被渗析两天 (1K分离点膜)。随后浓缩水溶液, 加入乙酸。用相同的膜再次渗析另外三天。浓缩溶液而获得固体17 (190mg)。

[0146] 将固体17 (110mg) 溶解在2.3mI 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 中。随后在室温下将三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP, 0.18mI 0.5M溶液) 加入到缓冲溶液中。在溶液搅拌2小时后, 将其在室温下加入到在2.3mI DMF中的2, 2'-(亚乙二氧基)-二(乙基马来酰亚胺) (0.36mmoI, 106mg) 中。2小时后加入100mI 蒸馏水, 溶液通过5k截止 (cut-off) 膜利用5% DMSO/水 (2次) 过滤, 随后用蒸馏水过滤 (3次)。收集馏分并冻干, 获得最后的结合聚合物18 (90mg)。

[0147] 实施例5: 配体-聚合物结合物的制备: 聚 (MAA) 或聚 (AA)。

[0148] 本发明的一个方面涉及具有非常狭窄的摩尔质量分布的聚合物标签的特定功能性优点。聚甲基丙烯酸 [聚 (MAA)] 或聚丙烯酸 [聚 (AA)] 可以通过其叔丁基或三甲硅烷基 (TMS) 酯的阴离子聚合制备<sup>37</sup>。如果在酯水解之前 (参见下文), 反应用叔丁基二甲硅烷基3-氯丙基硫化物终止<sup>38</sup>, 则聚合物将具有被保护的-SH末端官能团。它们与2-氨基乙氨基甲酸叔丁酯反应而形成具有被保护的氨基基团的聚合物, 其随后水解为聚合物19 (图12, 图解13)。在聚合物19的主链上的自由氨基基团提供了用于螯合物附着的位点。用于附着螯合物的途径涉及利用DTPA琥珀酰亚胺酯的之前过程 (图11)。

[0149] 聚 (NMAS)。另一方法已经由Müller<sup>39</sup>报道并用于将药物结合物附着于聚合物骨架。在这个方法中, NMAS通过ATRP聚合, 获得具有从12到40Kda的平均摩尔质量, Mw/Mn为约1.1。使用的引发剂为溴代异丁酸的羟乙基酯; 因此, 所有聚合物链均具有作为端基的伯醇。这里, 基于胱胺20的新引发剂可以被制备 (图12, 图解14)。随后在NMAS的ATRP中使用它来形成具有二硫基的聚合物21 (图12, 图解14)。聚合物21可以与图12的图解13中所示的2-氨基乙氨基甲酸叔丁酯反应而产生具有用于DTPA配体附着的侧氨基的聚合物。通过利用三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP), 二硫键被还原, 并产生硫醇端基用于将连接物附着于抗体 (图12, 图解15)。

[0150] 实施例6: 白血病细胞的多重标记。

[0151] K562细胞 (一种人类慢性骨髓白血病的模型细胞系) 在补充有10% FBS (胎牛血清)、2mM L-谷氨酰胺和抗生素的DMEM (达尔伯克改良伊格尔培养基) 中在标准组织培养条件下进行培养。通过低速离心 (500x g) 收集生长细胞, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗一次,

用附着于金属-聚合物结合物的初级抗体(对于每个抗体分别为Ho、Dy、Nd、Eu、Pr、或La)免疫标记,如图解10和图解11(图9)中所描述的。从试验选择六个细胞表面特异的受体:CD38、CD110、CD61、CD45、CD54、CD49d。细胞在三个管中的等分试样( $0.3 \times 10^6$ )分别用每个抗体或用在在一个反应混合物(全部样品)中组合的所有抗体进行标记。作为阴性对照,将小鼠IgG1同种型免疫球蛋白附着于携带与初级抗体相同的元素-Ho、Dy、Nd、Eu、Pr、或La的金属-聚合物结合物。在冰上反应30分钟后,用PBS通过离心冲洗细胞3次。最后的细胞沉淀溶解在浓缩的HCl(35%)中,与作为内标物等量的1ppb Ir/HCl溶液混合,并进行体积分析ICP-MS。结果在图13中示出。

[0152] 根据下面的方案和试剂,将抗体附着于金属-聚合物结合物(根据图9的图解10和图解11合成)

[0153] 试剂:在100 $\mu$ I PBS/EDTA( $\sim 1\text{mg}/\text{mI}$ )中的至少100-150 $\mu\text{g}$ (-1nmol)抗体。抗体从BD Biosciences, San Jose, CA)购得。

[0154] 来自Pierce#77712的TCEP二硫化物还原凝胶(4%交联的琼脂珠);作为50%糊剂(slurry)供应。以1:1 50%糊剂:抗体v/v使用。

[0155] 配体-聚合物结合物溶解在双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)中(参见图解11,图9)。预期MW 11,000。

[0156] R-缓冲剂为0.1M磷酸钠pH 7.2, 2.5mM EDTA

[0157] C-缓冲剂为TBS, 1mM EDTA

[0158] L-缓冲剂为20mM乙酸胺pH 6.0

[0159] IgG二硫键的还原:将200 $\mu$ I R-缓冲剂和50 $\mu\text{g}$ 抗体溶液加入到渗滤膜。

[0160] 10,000g离心10分钟。丢弃流出物(flow-through)。重复一次。

[0161] 将100 $\mu\text{L}$  R-缓冲剂和0.8 $\mu\text{L}$  0.5M TCEP溶液加入到渗滤膜并温和混合(4mM TCEP)。不形成涡流(vortex)。

[0162] 在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30分钟

[0163] 加入200 $\mu$ I C-缓冲剂。10,000g离心10分钟。丢弃流出物。

[0164] 还原的IgG的标记:将200 $\mu\text{L}$  C-缓冲剂加入到膜。

[0165] 在C-缓冲剂中制备浓度为1mM的元素标签(在50 $\mu$ I C-缓冲剂中的1.1mg元素标签)。

[0166] 将10 $\mu$ I制备的元素标签加入到包括200 $\mu$ I还原IgG溶液的管中并充分混合。不形成涡流。

[0167] 允许反应在37 $^{\circ}\text{C}$ 进行至少1小时。

[0168] 将200 $\mu$ I L-缓冲剂加入到膜。10,000g离心10分钟。丢弃流出物。重复两次。

[0169] 将100 $\mu$ I L-缓冲剂加入到膜以再悬浮标记的抗体。

[0170] 将5 $\mu$ I 0.1M镧系元素溶液(在超纯水中制备,其是本领域技术人员已知的)加入到与聚合物标签结合的抗体。充分混合。不形成涡流。

[0171] 在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30-60分钟。

[0172] 加入300 $\mu\text{L}$  TBS。10,000g离心10分钟。丢弃流出物。重复三次。

[0173] 加入50 $\mu$ I TBS。温和地吸液几次以回收结合物并转移到Eppendorf(德国艾本德股份公司)管。

[0174] 虽然在这个分析中使用ICP-MS,但是可以理解,其他形式的元素分析也可以使用

并包括在申请人教导的范围内。

[0175] 此外,虽然白血病细胞作为分析物靶向,但是可以理解,任何细胞或粒子可以以类似的方式被分析。

[0176] 实施例7:双标记的抗体的分析-荧光标记和元素标签。

[0177] 在这个实施例中,双标记的抗体有利于通过ICP-MS流式细胞仪在混合样品中的稀有细胞的预分类和随后的元素分析。

[0178] 在一种情况下,进行通过流式细胞仪(FACS)和用双标记抗体(CD33-FITC-Pr)染色的细胞的ICP-MS收集的数据一致性的论证。

[0179] 针对结合于异硫氰酸荧光素(FITC)的细胞表面抗原CD33(CD33-FITC;GenTex Inc.)的单克隆抗体用聚合物-DOTA-Pr构建体标记。这个双标记抗体将进一步称为CD33-FITC-Pr。多个充分表征的人类白血病细胞系(KG1a,THP-1,Kasumi-3;ATCC Inc)在细胞染色研究中使用。在FACSeaLibur™流式细胞仪仪器(BD Biosciences Inc.)上进行FACS分析,并利用ELAN DRCPIus(Perkin Elmer SCIEX)获得ICP-MS数据。通过低速离心冲洗活细胞并与用于抗原表达对照的CD33-FITC-Pr或CD33-FITC或CD33-Pr进行反应。用小鼠IgG-FITC、IgG-Pr或双标记的IgG-FITC-Pr监测非特异性免疫球蛋白结合。在图14中的a中呈现的数据表明,从用双标记CD33-FITC-Pr染色的细胞获得的荧光类似于在测试的所有细胞系上的CD33-FITC。注意到KG1a细胞系不表达CD33。

[0180] 同样,当利用元素标记抗体CD33-Pr和双标记CD33-FITC-Pr(图14中的b)检测CD33表达时,标准化应答类似。

[0181] 实施例8:利用质谱流式细胞仪的粒子元素分析。

[0182] 金属-聚合物结合物标签使得能够进行单一细胞形式中的多重分析来区别复杂样品(如血液)中的稀有(例如患病)细胞。通过采用结合于特异性抗体(识别存在于白血病细胞上的细胞表面抗原)的金属-聚合物标签,所述方法可以用于鉴定患者血液样品中的白血病细胞。例如,利用针对CD33、CD34、CD38、CD13、CD15、CD36(图14中的b)的抗体(用不同金属标记),对外周血单核样品中的一些细胞进行阳性多重染色,并在质谱流式细胞仪中进行分析,将表明患者正在形成急性单核细胞白血病(AML-M5)。以类似的方式,这个方法可以用于鉴定和定量其他细胞或粒子。

[0183] 实施例9:试剂盒

[0184] 本发明涵盖用于制备元素标签和用于实施本发明的方法的试剂盒。所述试剂盒可以包括以下项目中的至少一个:

[0185] 聚合物,其包括至少一个结合金属的侧基(包括至少一个金属原子或能够结合至少一个金属原子)并进一步包括允许聚合物附着于连接物、间隔物、或生物分子之一的官能团;金属溶液;用于连接物、间隔物或生物分子附着于聚合物的试剂;用于官能团附着于连接物或间隔物的试剂;用于金属附着于聚合物的试剂;包括抗体的亲和性试剂;缓冲剂;用于制备元素标签的说明书;用于元素标签附着于亲和性试剂的说明书;用于金属附着于元素标签的说明书;以及用于通过元素分析将元素标签用于分析物的分析的说明书。例如,聚合物可以为丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸、和甲基丙烯酸的均聚物或共聚物。所述试剂可以选自下面中的至少一种:TCEP(三(2-羧乙基)膦)、配体-聚合物-连接物-间隔物结合物、磷酸盐缓冲剂、TBS(tris-缓冲盐水)、EDTA(乙二胺四乙酸)、乙

酸铵缓冲剂、抗体、金属盐溶液、镧系元素盐溶液、封闭剂缓冲剂、冲洗缓冲剂、FBS(胎牛血清)、DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基)、BSA(牛血清白蛋白)、二硫苏糖醇、双马来酰亚胺、以及DMF(二甲基甲酰胺)。聚合物可以附着于连接物或者附着于连接物和间隔物加以提供。

[0186] 所有列出的参考文献以引用方式并入。

[0187] 虽然结合多种实施方式描述了申请人的教导,但是不意味着申请人的教导限于这样的实施方式。相反,申请人的教导涵盖如本领域技术人员理解的多种替换方式、改变、和等同方式。

[0188] 参考文献列表

[0189] 1.Baranov,V.I.;Bandura,D.R.;Tanner,S.D.European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry,HafjeII,Norway 2001,Book of Abstracts,p.85。

[0190] 2.Baranov,V.I.;Quinn,Z.;Bandura,D.R.;Tanner,S.D.Anal.Chem.2002,74,1629-36。

[0191] 3.Baranov,V.I.;Quinn,Z.A.;Bandura,D.R.;Tanner,S.D.J.Anal.Atom.Spectrom.2002,17,1148-52。

[0192] 4.Quinn,Z.A.;Baranov,V.L;Tanner,S.D.;Wrana,J.L.J.Anal.Atom.Spectrom.2002,17,892-96。

[0193] 5.Baranov,V.,Tanner,S.,Bandura,D.,and Quinn,Z.Kit for detecting/measuring transition element,comprising tag having transition element for tagging biologicalIy active material and instruction for tagging material, combining tagged material with analyte,detecting/measuring elements.MDS,S.C.I.E.and MDS INC.[US2004072250-A1;W02005003767-A2]。

[0194] 6.Baranov,V.,Tanner,S.,Bandura,D.,and Quinn,Z.Detecting and measuring transition elements e.g.isotope or ions,in a sample,comprises tagging biologicalIy active materials,and detecting and measuring reactant complexes by an atomic mass or optical spectrometer.MDS,S.C.I.E.and MDS INC.[W0200254075-A;EP1348127-A;US2002086441-AI;W0200254075-A1;EP1348127-A1;AU2002215784-A1;JP2004516490-W]。

[0195] 7.Baranov,V.I.;Quinn,Z.;Bandura,D.R.;Tanner,S.D.Anal.Chem.2002,74,1629-36。

[0196] 8.Bandura,D.R.,Baranov,V.,I,Tanner,S.,and Tanner,S.D.Elemental flow cytometer,e.g.mass spectrometer or optical emission spectrometer based cytometer used in,e.g.health science,food sciences,environmental sciences,and genomics and proteomics,has spectrometer.Bandura,D.R.,Baranov,V.,I,Tanner,S.,and MDS INC.[US2005218319-A1;W02005093784-A1]。

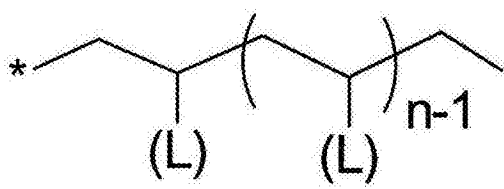
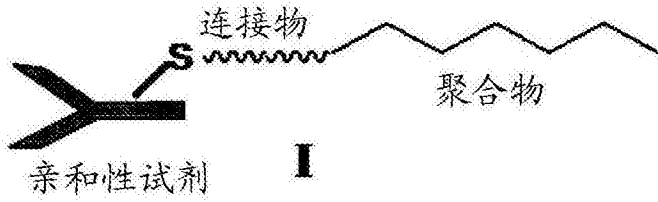
[0197] 9.Hsu,K.C;Zabriskie,J.B.;Rifkind,R.A.Science 1963,142,1471-&。

[0198] 10.Powell,R.D.;Halsey,C.M.R.;Spector,D.L.;Kaurin,S.L.;McCann,J.;Hainfeld,J.F.Journal of Histochemistry&Cytochemistry 1997,45,947-56。

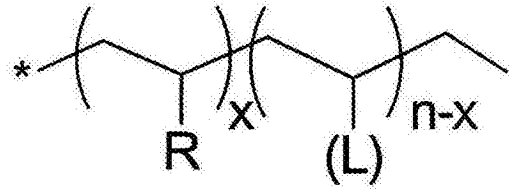
[0199] 11.Riddle,S.M.;Vedvik,K.L.;Hanson,G.T.;Vogel,K.W.Analytical Biochemistry 2006,356,108-16。

- [0200] 12. Shunmugam, R.; Tew, G. N. J. *Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 13567-72.
- [0201] 13. Chapman, A. P. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54, 531-45.
- [0202] 14. Guddat, L. W.; Herron, J. N.; Edmundson, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 4271-75.
- [0203] 15. Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C; Howard, J. A. *Chem. Rev.* 2002, 102, 1977-2010.
- [0204] 16. Liu, S.; Edwards, D. S. *Bioconjug. Chem.* 2001, 12, 1-3A.
- [0205] 17. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2293-352.
- [0206] 18. Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A. *Tetrahedron* 1988, 44, 637-42.
- [0207] 19. Relógio, P.; Charreyre, M. T. C.; Farinha, J. S. P.; Martinho, J. M. G.; Pichot, C. *Polymer* 2004, 45, 8639-49.
- [0208] 20. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Müller, A. H.; Brocchini, S. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2001, 40, 594-97.
- [0209] 21. Wang, X. S.; Dykstra, T. E.; Salvador, M. R.; Manners, L.; Scholes, G. D.; Winnik, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 7784-85.
- [0210] 22. Shen, Y.; Zeng, F.; Zhu, S.; Peiton, R. *Macromolecules* 2001, 34, 144-50.
- [0211] 23. Woghiren, C.; Sharma, B.; Stein, S. *Bioconjug. Chem.* 1993, 4, 314-18.
- [0212] 24. Green, N. S.; Reiser, E.; Houk, K. N. *Protein Sci.* 2001, 10, 1293-304.
- [0213] 25. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Müller, A. H.; Brocchini, S. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2001, 40, 594-97.
- [0214] 26. Hirao, A.; Hayashi, M. *Acta Polymerica* 1999, 50, 219-31.
- [0215] 27. Mizawa, T.; Takenaka, K.; Shiomi, T. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2000, 55, 237-46.
- [0216] 28. Xie, H. Q.; Pan, S. B.; Guo, J. S. *European Polymer Journal* 2003, 39, 715-24.
- [0217] 29. Hill, G.; Lamps, J. P.; Rempp, P. *Polymer* 1993, 34, 2875-82.
- [0218] 30. Takenaka, K.; Hirao, A.; Nakahama, S. *Polymer International* 1995, 37, 291-95.
- [0219] 31. Cozzi, P. G.; Hilgraf, R.; Zimmermann, N. *European Journal of Organic Chemistry* 2004.
- [0220] 32. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 459-76.
- [0221] 33. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Frechet, J. M.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2004, 43, 3928-32.
- [0222] 34. Favier, A.; Charreyre, M. T.; Chaumont, P.; Pichot, C. *Macromolecules* 2002, 35, 8271-80.
- [0223] 35. D'Agosto, F.; Charreyre, M. T.; Pichot, C. *Macromolecular Bioscience* 2001, /, 322-28.

- [0224] 36.Rebizak,R.;Schaeffe,M.;DeIIacherie,E.Bioconjug.Chem.1997,8,605-10。
- [0225] 37.Mori,H.;MuIIer,A.H.Prog.PoIym.Sci 2003,28,1403-39。
- [0226] 38.Tohyama,M.;Hirao,A.;Nakahama,S.;Takenaka,K.MacromoleculAr Chemistry and Physics 1996,197,3135-48。
- [0227] 39.Godwin,A.;Hartenstein,M.;MuIIer,A.H.;Broccchini,S.Angew.Chem.Int.Ed Engl.2001,40,594-97。



a



b

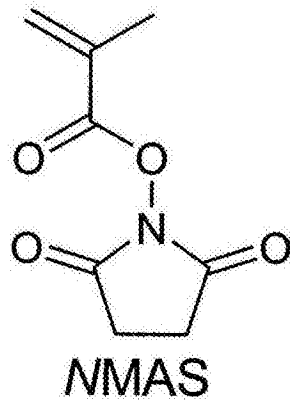
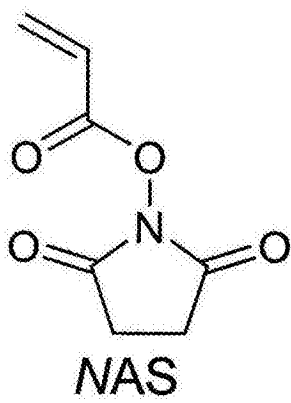


图1

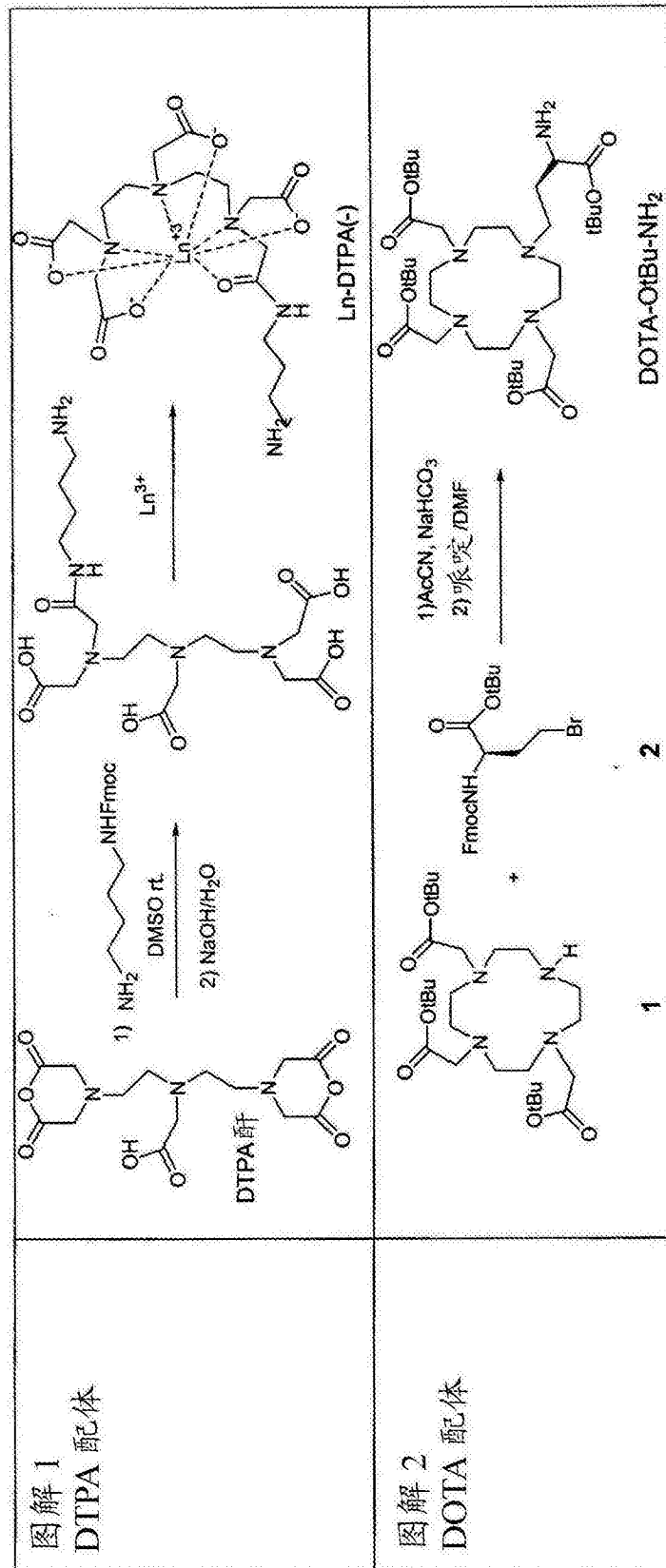


图2

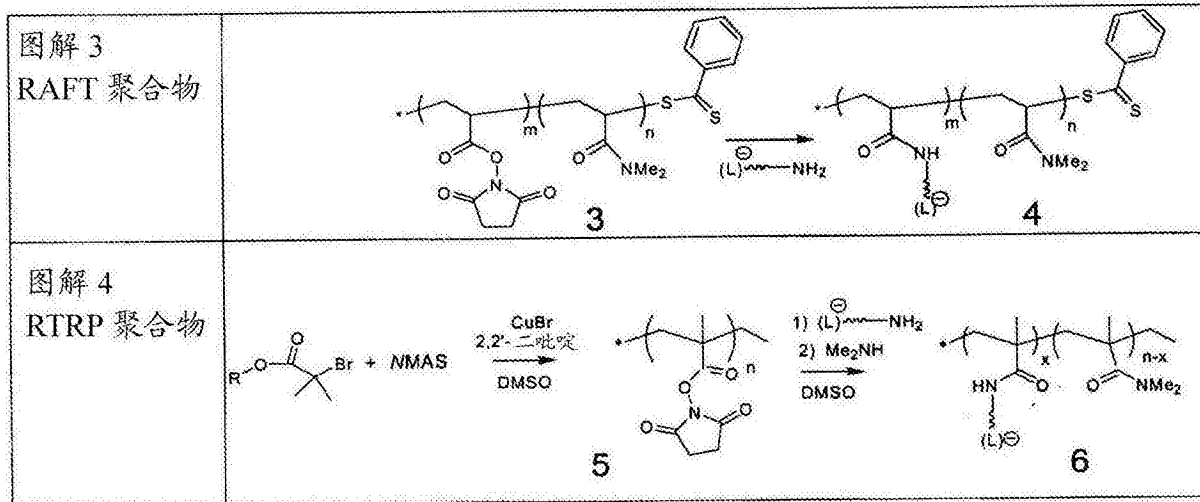


图3

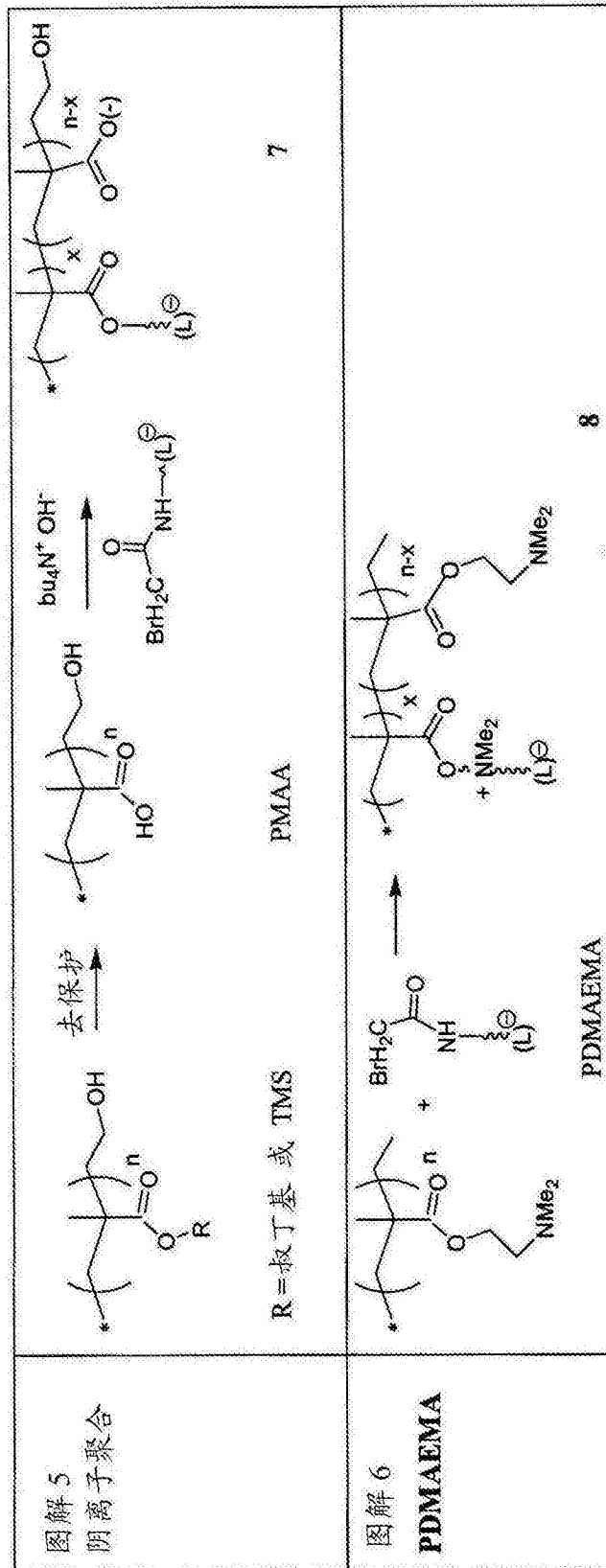
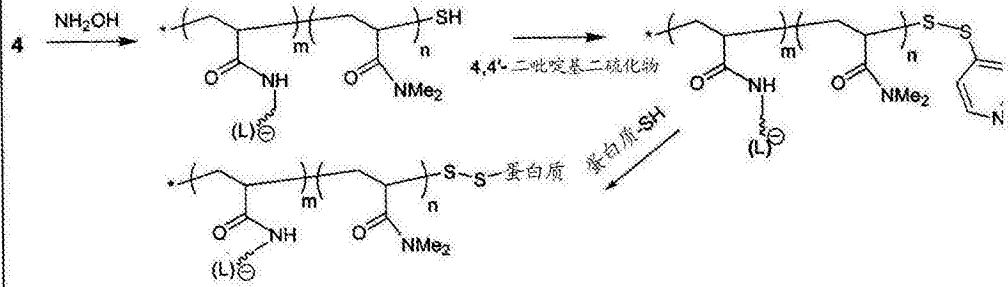
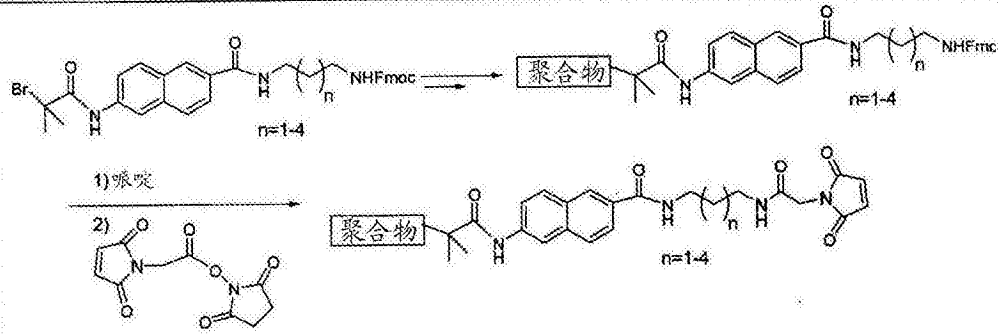


图4

图解 7a  
RAFT  
聚合物:



图解 7b  
ATRP  
聚合物:



图解 7c  
阴离子聚合  
的聚合物

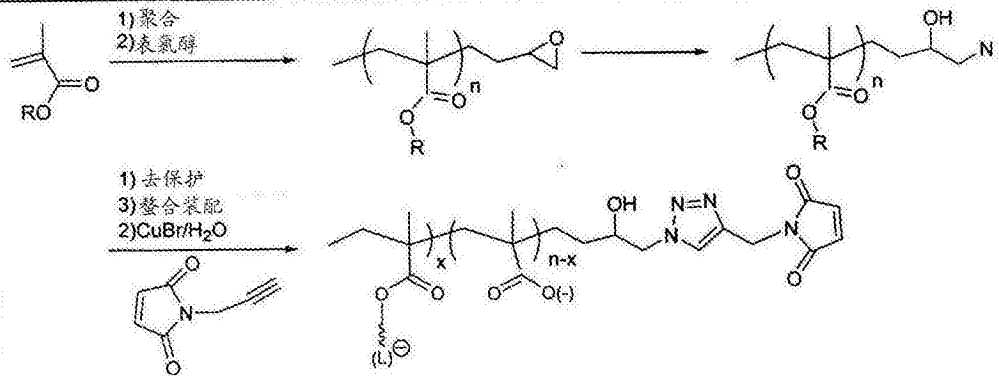


图5

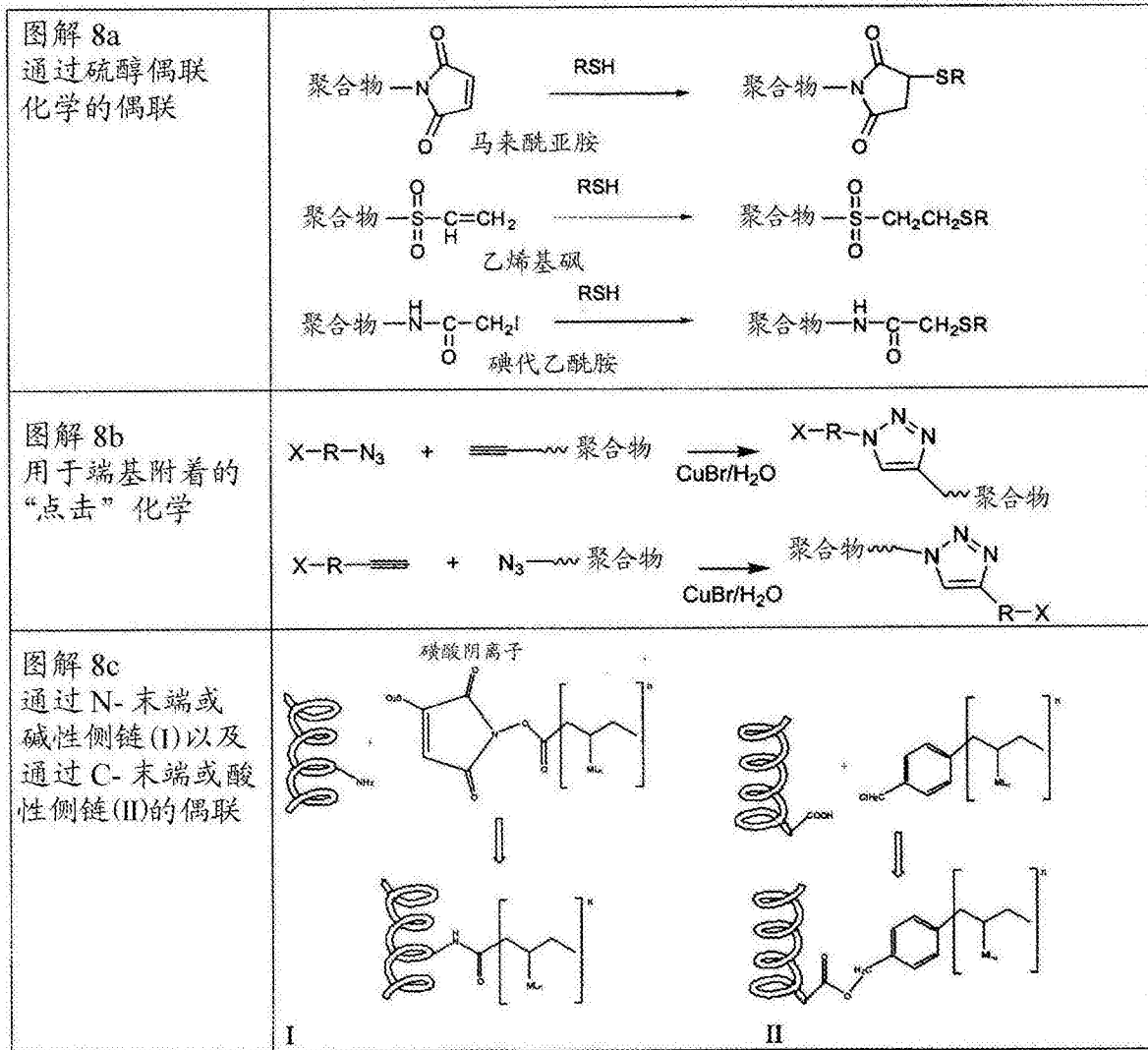


图6

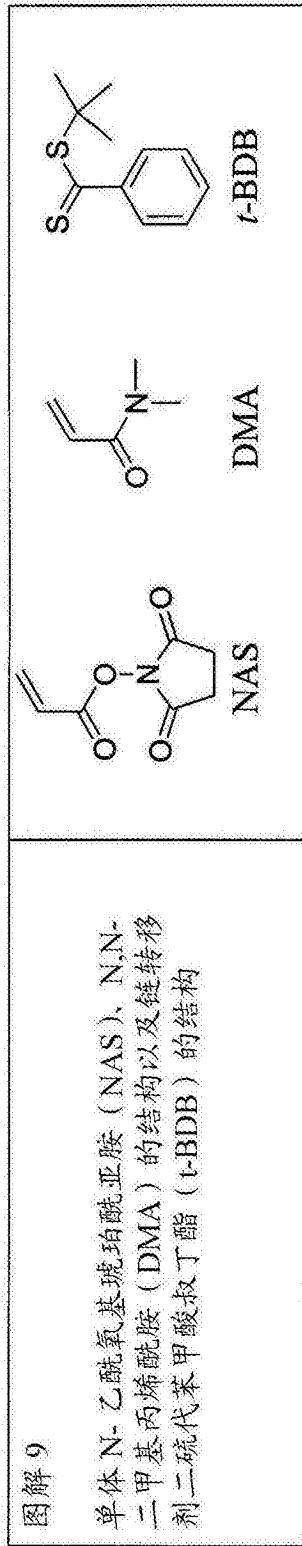


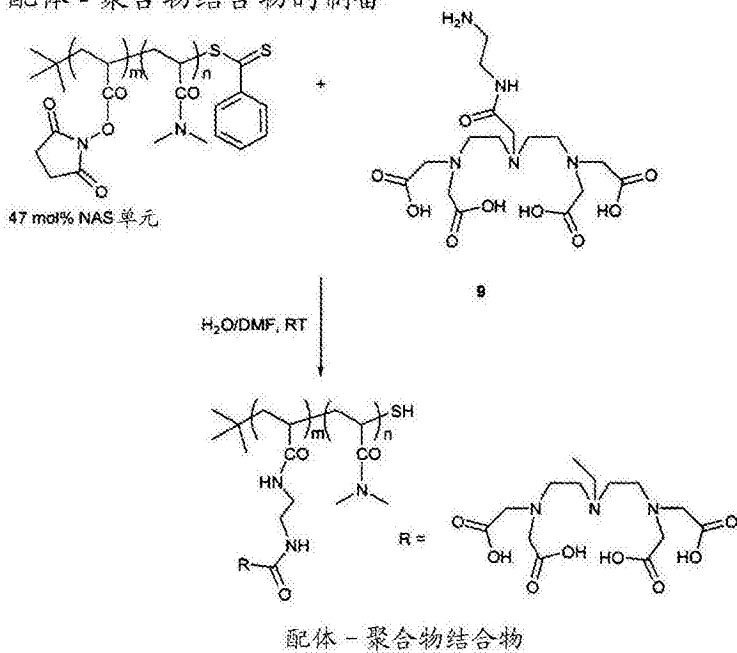
图7

NAS/DMA Mol% Wt% 的比率		$[M]_0$ / $[CTA]_0$	$[CTA]_0$ / $[AMBN]_0$	反应时间 (h)	聚合物 产率	$M_{n,GPC}$	$M_w$ / $M_n$
13	20	70	1.4	18	75%	6500	1.45
47	60	55	1.5	18	80%	8298	1.50
60	72	70	3	18	80%	8000	1.15

CTA: 链转移剂 (t-BDB)。  $[M]_0$ : 起始单体浓度。  $M_{n,GPC}$ : 使用聚苯乙烯标准。

图8

图解 10  
配体-聚合物结合物的制备



图解 11  
配体-聚合物结合物与 1,4-二(马来酰亚氨基)丁烷

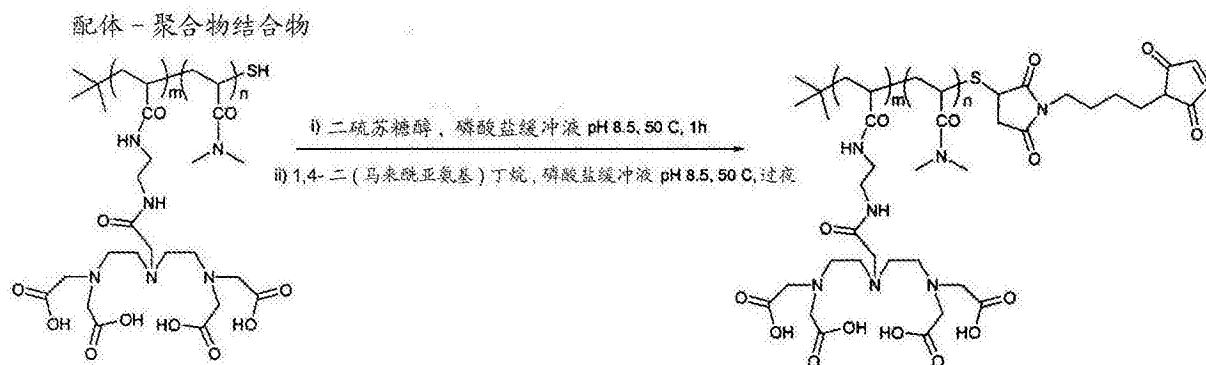
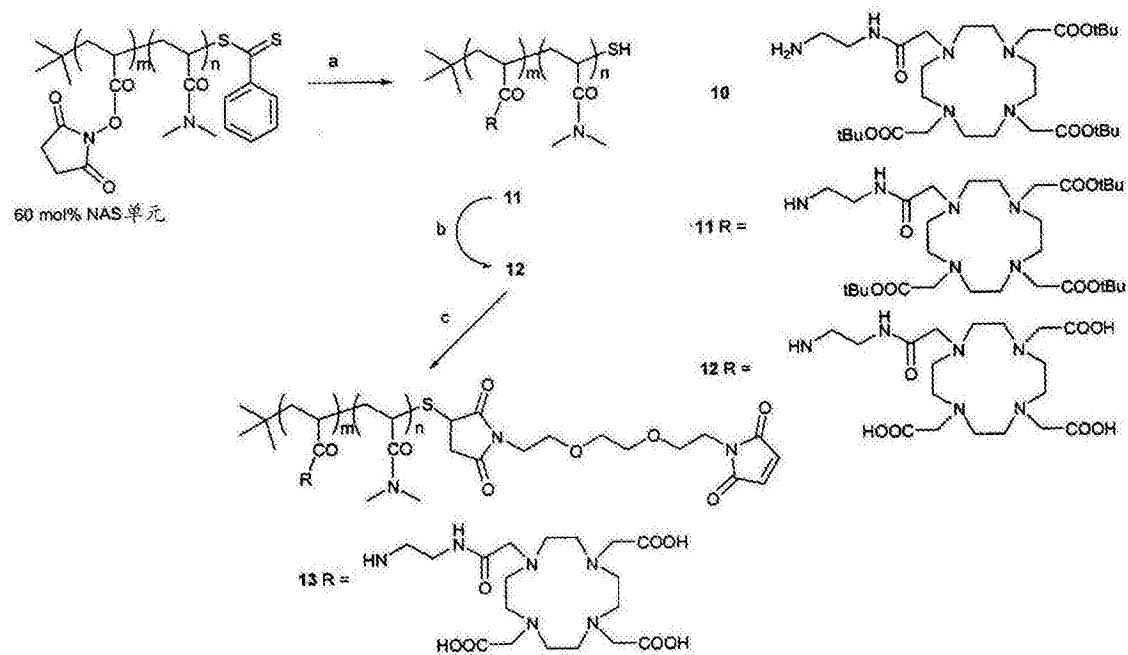


图9

图解 12

## DOTA 基配体-聚合物结合物的制备



- a) 三乙胺, DMF, 胺10, 14 h; b) 三氟乙酸, 14 h;  
 c) (i) 二硫苏糖醇, 磷酸盐缓冲液 pH 8.5, 50 C, 1 h,  
 (ii) 2,2'-(亚乙基二氧基)二(乙基马来酰亚胺), DMF/H<sub>2</sub>O, 1 h, RT

图10



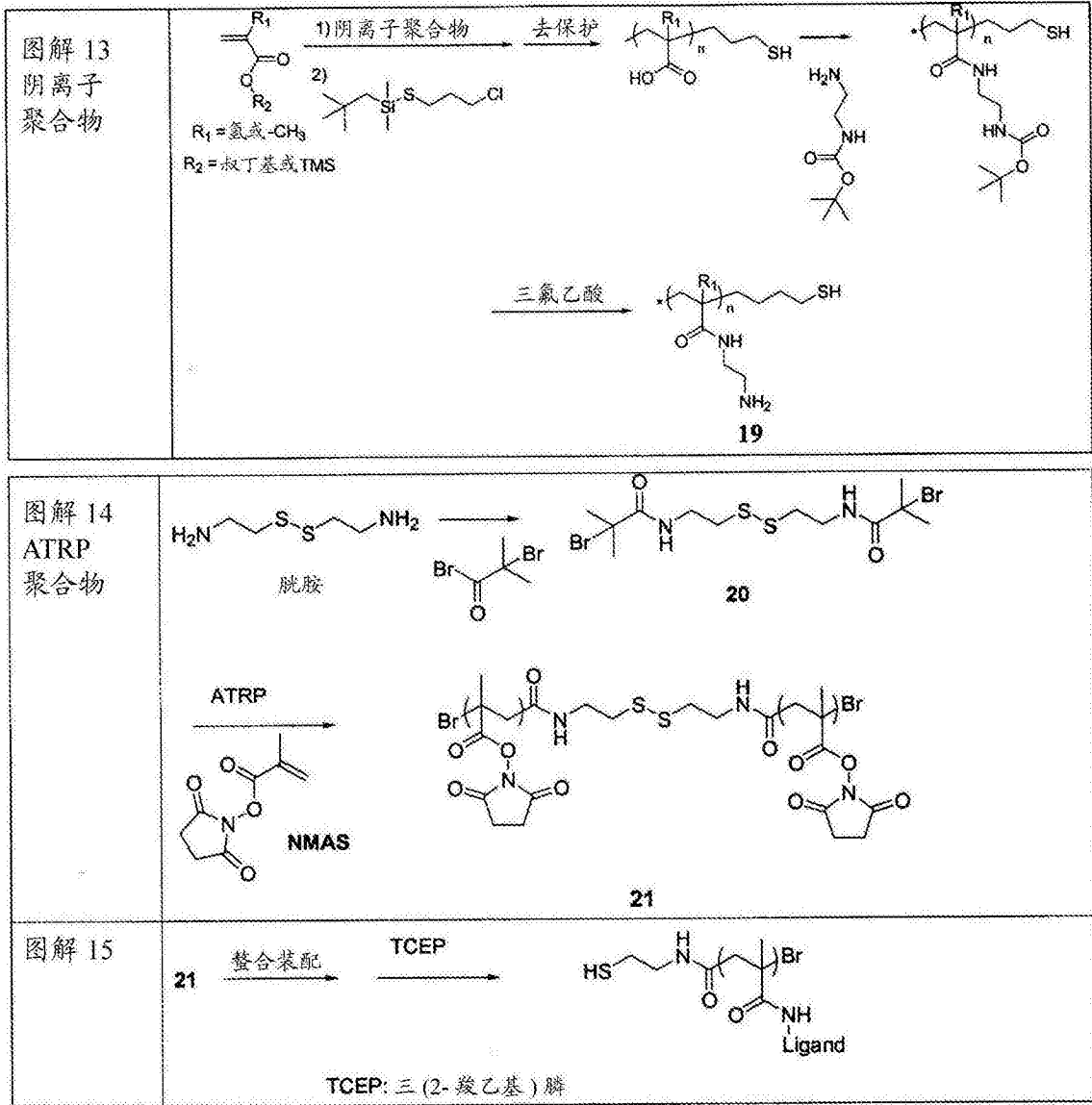


图12

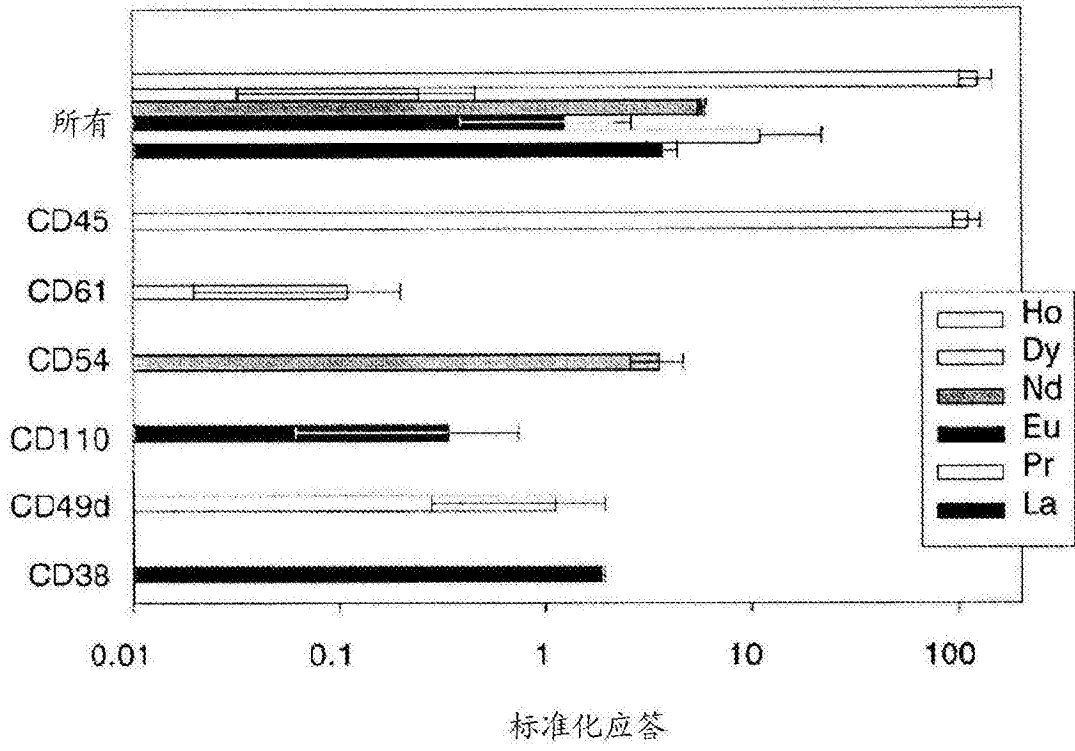
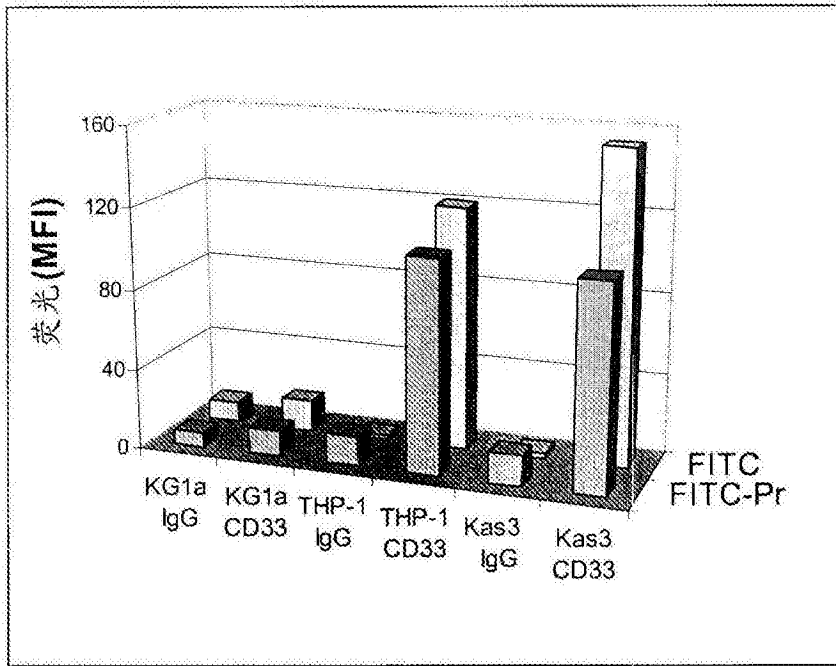
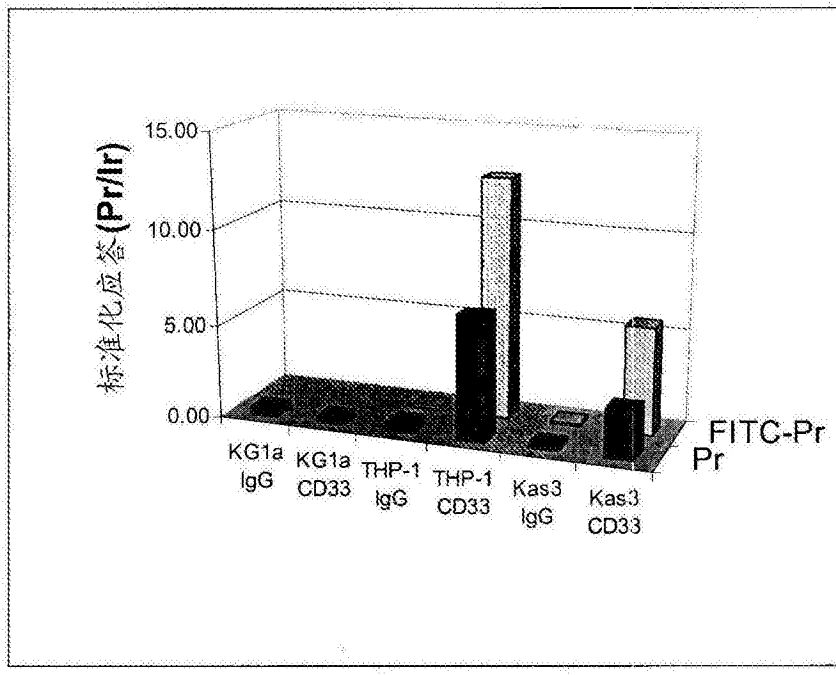


图13



a



b

图14

流程图 I

## RAFT 聚合物过程

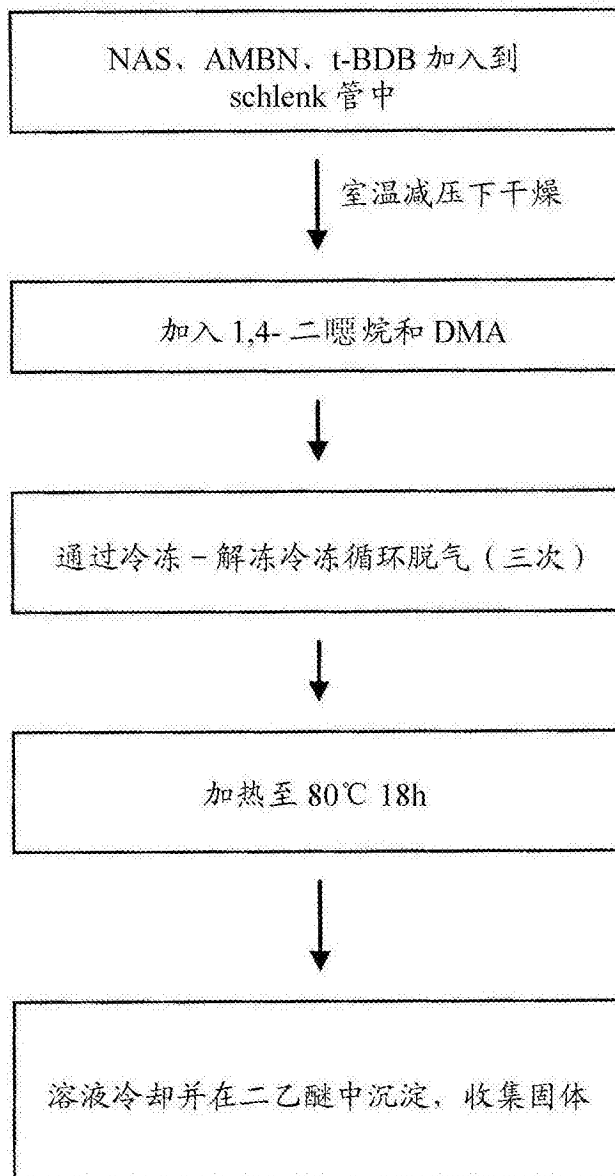


图15

流程图 II  
聚合物-DTPA-连接物附着过程 (对应于图 9)

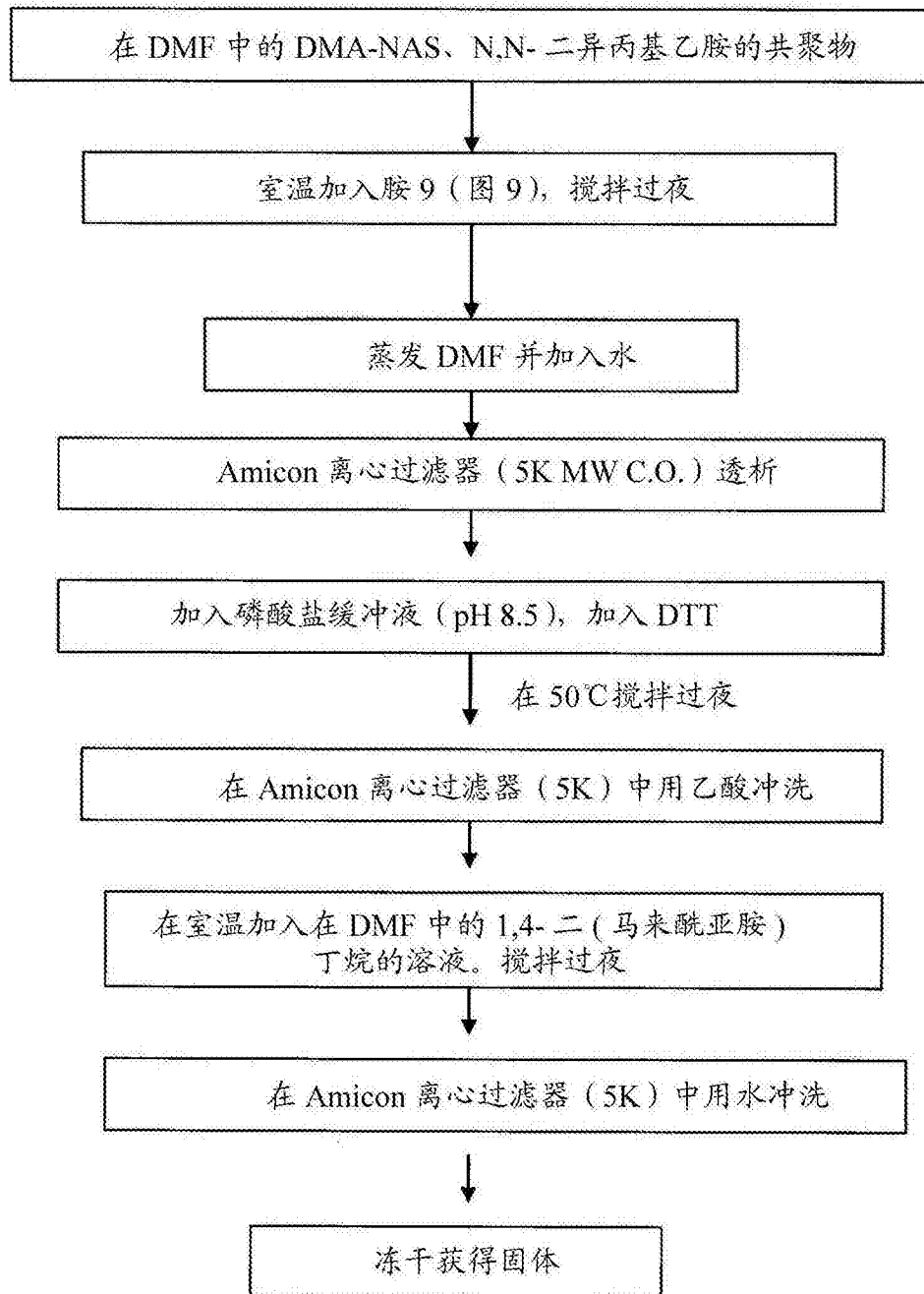


图16

专利名称(译)	聚合物骨架元素标签		
公开(公告)号	<a href="#">CN107573445A</a>	公开(公告)日	2018-01-12
申请号	CN2017110702403.4	申请日	2007-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	富鲁达加拿大公司		
申请(专利权)人(译)	富鲁达加拿大公司		
当前申请(专利权)人(译)	富鲁达加拿大公司		
[标]发明人	米切尔A温尼克 马克尼茨 弗拉迪米尔巴拉诺夫 楼旭东		
发明人	米切尔·A·温尼克 马克·尼茨 弗拉迪米尔·巴拉诺夫 楼旭东		
IPC分类号	C08F8/42 C08F8/32 C08F8/14 C08F220/54 C08F220/36 G01N33/532 G01N33/574 G01N33/58		
CPC分类号	C08F8/42 C08F220/36 G01N33/532 G01N33/58 Y10T436/24 C08F8/14 C08F8/32 C08F220/56 G01N33/57426		
代理人(译)	徐丽华		
优先权	60/803356 2006-05-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了聚合物骨架元素标签。本发明提供了用于分析物元素分析(包括ICP-MS)的基于新型金属-聚合物结合物的元素标签。聚合物骨架被官能化以不可逆地结合在使用之前由使用者选择的金属。所述聚合物被进一步官能化以附着连接物,该连接物允许附着于抗体或其他亲和性试剂。聚合物形式允许附着给定同位素的多个拷贝,其线性地提高灵敏度。所述金属-聚合物结合物标签能够以两种形式进行多重分析:全分析,其中样品中的平均生物标记物分布是诊断性的,和单细胞形式,以区分复杂样品(例如血液)中的少数(例如患病)细胞。

