



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103229057 B

(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 201180056340.0

(22)申请日 2011.09.22

(30)优先权数据

61/385,937 2010.09.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/052837 2011.09.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/040514 EN 2012.03.29

(73)专利权人 生物概念股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·D·米克拉吉塞克 L·S·米勒

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

(56)对比文件

CN 1661372 A,2005.08.31,

Pascal Batard et al.Dextramers: New generation of fluorescent MHC class I/peptide multimers for visualization of antigen-specific CD8+T cells.《Journal of Immunological Methods》.2006,第310卷第136-148页.

审查员 陈伟潘

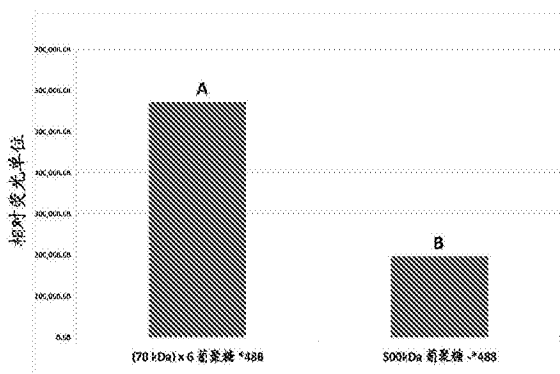
权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

用于信号放大的方法和试剂

(57)摘要

本发明提供了含有与葡聚糖部分缀合的结合部分的试剂、制备这类试剂的方法、以及这类试剂在多种分子测定和细胞测定中的用途。



1. 一种可检测试剂,其包含与葡聚糖组分缀合的结合部分,所述葡聚糖组分包含多个葡聚糖,从而所述可检测试剂的每个结合部分包含4-8个葡聚糖,其中每个葡聚糖具有30kDa至100kDa的分子量。

2. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中所述葡聚糖组分与可检测实体连接。

3. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中可检测试剂的每个结合部分包含6个葡聚糖。

4. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中每个葡聚糖具有50kDa至70kDa的分子量。

5. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中各葡聚糖具有70kDa的分子量。

6. 根据权利要求1所述的可检测试剂,且其中每个葡聚糖具有基本上相同的分子量。

7. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中至少一个葡聚糖的分子量不同于其它葡聚糖。

8. 根据权利要求2所述的可检测试剂,其中所述可检测实体是荧光团。

9. 根据权利要求8所述的可检测试剂,其中所述荧光团选自具有绿色荧光、橙色荧光、红色荧光和远红外荧光的荧光团。

10. 根据权利要求8所述的可检测试剂,其中所述荧光团选自具有在350nm至775nm范围内的激发和发射波谱的荧光团。

11. 根据权利要求10所述的可检测试剂,其中所述荧光团选自具有346nm/446nm、494nm/519nm、554nm/570nm、555nm/572nm、590nm/617nm、651nm/672nm、679nm/702nm或749nm/775nm的激发和发射波谱的荧光团。

12. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中所述结合部分选自:抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、生物素、地高辛配基、免疫试剂、寡核苷酸、肽核酸、蛋白A和蛋白G。

13. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中所述葡聚糖组分中的葡聚糖互联。

14. 根据权利要求1所述的可检测试剂,其中所述葡聚糖组分中的葡聚糖的总分子量是至少500kDa。

15. 根据权利要求13所述的可检测试剂,其中所述互联的葡聚糖构造成分层构型或分支构型。

16. 一种制备权利要求1-15所述的可检测试剂的方法,所述方法包括:

提供包含4-8个葡聚糖的葡聚糖组分,

使所述葡聚糖组分与结合部分缀合,以形成葡聚糖-结合部分复合物;和

将可检测实体连接至所述葡聚糖-结合部分复合物。

17. 一种制备权利要求1-15所述的可检测试剂的方法,所述方法包括:

使结合部分与葡聚糖缀合,以形成核心葡聚糖-结合部分,

使所述核心葡聚糖-结合部分与葡聚糖反应,以形成葡聚糖-结合部分复合物,和

将可检测实体连接至所述葡聚糖-结合部分复合物。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述结合部分是抗生物素蛋白或链霉亲和素。

19. 一种用于检测或定量靶分子的方法,所述方法包括:

使根据权利要求2所述的可检测试剂与疑似含有靶分子的样品接触,其中所述结合部分能够结合所述靶分子;和

检测与所述葡聚糖组分连接的可检测实体的信号,由此检测或定量所述靶分子。

用于信号放大的方法和试剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2010年9月23日提交的美国临时申请号61/385,937的优先权,其特此通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及可用于检测测定的试剂,例如,含有与葡聚糖部分缀合的结合部分的试剂。

背景技术

[0004] 在从血液或其它生物样品中分离稀少细胞的过程中,必须与可能存在于样品中的其它有核细胞区分靶细胞。当分离稀少细胞时,也可能存在多种其它细胞,例如白血细胞(WBC)。就分离循环的肿瘤细胞(CTC)而言,标准方法包括:使用细胞角蛋白抗体将上皮细胞染色,并且还通过抗-CD45抗体染色排除假阳性的细胞角蛋白染色的细胞,以便仅检测出CTC。

[0005] 在未决的美国专利申请号20100255479(其特此通过引用整体并入)中,描述了使用多种抗体进行CTC捕获的方法。

[0006] 尽管可以利用这些方法,诸如CTC等细胞的检测需要其它检测试剂和方法。这样的试剂和方法将能够进行诊断测定以及其它临床上有关的测定。

[0007] 本发明描述了可用于检测生物样品中的细胞的试剂和方法。例如,本发明提供了可以用于检测生物样品中的稀少细胞(诸如CTC)的试剂和方法。

发明内容

[0008] 本发明至少部分地基于下述发现:多个葡聚糖和它们的构型可以用作可检测试剂的一部分。因此,本发明提供了可检测试剂,其含有可用于不同检测测定(例如,细胞检测测定)的多个葡聚糖。在有些实施方案中,本发明提供了可检测试剂,其含有与葡聚糖组分缀合的结合部分。所述葡聚糖组分可以另外与可检测实体连接。

[0009] 在有些实施方案中,所述可检测试剂的葡聚糖组分含有约2个至约10个葡聚糖、约4个至约8个葡聚糖或约6个葡聚糖。每个葡聚糖可以具有约10kDa至约200kDa的分子量、约30kDa至约100kDa的分子量、或约50kDa至约70kDa的分子量。在有些实施方案中,所述葡聚糖具有约70kDa的分子量。

[0010] 在有些实施方案中,所述葡聚糖组分包含超过一个葡聚糖,其中每个葡聚糖具有基本上相同的分子量。在有些实施方案中,所述葡聚糖组分包含超过一个葡聚糖,其中至少一个葡聚糖具有不同于其它葡聚糖的分子量。

[0011] 在有些实施方案中,所述可检测实体是荧光团,其可以选自具有绿色荧光、橙色荧光、红色荧光和远红外荧光的荧光团。在有些实施方案中,所述荧光团选自具有在约350nm至约775nm范围内的激发和发射波谱的荧光团。在有些实施方案中,所述荧光团选自具有约346nm/446nm、约494nm/519nm、约554nm/570nm、约555nm/572nm、约590nm/617nm、约651nm/

672nm、约679nm/702nm或约749nm/775nm的激发和发射波谱的荧光团。

[0012] 在有些实施方案中,所述可检测试剂的结合部分选自抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、生物素、地高辛配基、免疫试剂、寡核苷酸、肽核酸、蛋白A和蛋白G。

[0013] 本发明提供了制备可检测试剂的方法,所述方法包括:提供葡聚糖组分,使所述葡聚糖组分与结合部分缀合,其中所述反应形成葡聚糖-结合部分复合物;然后将可检测实体连接至所述葡聚糖-结合部分复合物。

[0014] 本发明提供了用于制备可检测试剂的方法,所述方法包括:使结合部分与葡聚糖缀合,以形成核心葡聚糖-结合部分,使所述核心葡聚糖-结合部分与葡聚糖反应,以形成葡聚糖-结合部分复合物,然后将可检测实体连接至所述核心葡聚糖-结合部分复合物。在有些实施方案中,所述结合部分是抗生物素蛋白。

[0015] 本发明提供了一种用于检测或定量靶分子的方法,所述方法包括:使根据权利要求1所述的可检测试剂与疑似含有靶分子的样品接触,其中所述结合部分能够结合所述靶分子,和检测与所述葡聚糖组分连接的可检测实体的信号,由此检测或定量所述靶分子。

[0016] 本发明提供了一种包含多个互联的葡聚糖的试剂,其中所述试剂包含至少2个葡聚糖。在有些实施方案中,总分子量是至少500kDa。在有些实施方案中,所述多个互联的葡聚糖构造成分层构型或分支构型。在有些实施方案中,所述多个互联的葡聚糖与可检测实体连接。

附图说明

[0017] 图1:增强染色—靶向捕获的细胞的细胞表面抗体。显示了3种不同类型的染色方法,所述方法可以用于检测已经用抗体混合液捕获在微通道上的细胞。在反应A中,捕获的细胞被在CTC领域中常用的抗-CK染色。细胞角蛋白是一种胞质蛋白,通过与用绿色荧光染料(命名为488)标记的抗-细胞角蛋白抗体一起温育,将细胞染色。在反应B中,通过加入用488染料标记的抗生物素蛋白(抗生物素蛋白-488),将所述细胞进一步染色。在该情况下,所述抗体将细胞质CK染色,并且抗生物素蛋白通过结合已经用生物素标记的捕获抗体而进一步将细胞表面染色。两种染色是累加性的,从而导致更高的细胞标记。这方面的一个实验实施例显示在图2中。在反应C中,细胞未被细胞角蛋白染色,而仅被抗生物素蛋白-488染色。在该情况下,仅仅基于与细胞表面上的生物素化的捕获抗体相结合的抗生物素蛋白的数目而观察细胞。这方面的一个实验实施例显示在图3中。

[0018] 图2:当使用捕获抗体来增加染色时,会增强临床CK+CTC的检测。显示了抗体混合液对乳腺癌肿瘤细胞的捕获、以及CK染色剂对它的检测(图A)。在该情况下,染色非常弱,尽管在背景以上足够高以致于被鉴别为肿瘤细胞。象通常一样,这些CTC细胞同时地被红色荧光标记的CD45染色,且该细胞是CD45阴性的。记录该细胞的位置,然后用抗生物素蛋白-488将微通道染色。图B显示了在抗生物素蛋白-488处理以后该细胞的重新定位,并表明,它被远远更亮地染色。在两幅图中,观察到白血细胞(细胞核被DAPI染色),但是这些细胞不具有可检测的染色。

[0019] 图3:仅仅基于细胞捕获抗体的标记而检测从血液捕获的掺入细胞。显示了仅仅基于捕获抗体的染色的细胞检测的一个实例。在该实验中,将SKOV细胞掺入血液中,并象平常一样为CTC的捕获而处理样品。尽管并非绝对量度,SKOV细胞的核大小通常是典型WBC的细

胞核的2-3倍。在仅用抗生物素蛋白-488染色以后,SKOV细胞被亮染色,而WBC不具有可检测的染色。这证实,通过细胞表面捕获抗体的标记,可以检测出未被CK染色的细胞或不含有CK的细胞。如在美国专利申请号20100255479中所述,通过使用多种抗体,可以显著增强染色。

[0020] 图4:用标记的抗-细胞角蛋白和标记的中和亲和素(Neutravadin)检测的捕获的乳腺癌细胞的计数。显示了在微通道上的乳腺癌样品的计数。在该实验中,首先在标准条件下用荧光标记的488抗-CK抗体将细胞染色。检测绿色标记的细胞,记录它们在微通道上的X-Y坐标。接着,用绿色荧光标记的抗生物素蛋白处理通道,以标记在细胞表面上的抗体。记录通道的绿色荧光细胞,除了关于CK染色剂记录的位置以外。也确定如此鉴别出的所有细胞是CD45阴性的。条形图表明,在大多数情况下,抗生物素蛋白检测出比CK染色剂明显更多的细胞。在使用健康供体血液的对照实验中,当在相同条件下进行时,不存在可检测的细胞,并同时被与抗生物素蛋白-488相组合的抗-CK-488染色(数据未显示)。

[0021] 图5:Beyond NA:使用葡聚糖的放大染色。该图表示了用荧光染料标记的抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物(含有可检测实体的示例性可检测试剂)。每个抗生物素蛋白的理论染料数目高于仅用抗生物素蛋白标记。

[0022] 图6:在SKOV细胞上的FACS荧光强度。显示了用单一生物素化的EpCAM抗体温育、随后用抗生物素蛋白-488(用绿色荧光标记)和抗生物素蛋白-葡聚糖-488温育的SKOV细胞的FACS分析。第一个和第二个条是对照细胞的染色强度,其中加入了抗生物素蛋白或缀合物,但是没有加入生物素化的EpCAM抗体。第三个条显示了当将抗生物素蛋白-488加给EpCAM处理过的细胞时,细胞的染色强度。第四个条显示了用抗生物素蛋白-葡聚糖-488温育的相同细胞的染色强度。这些数据指示,抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物的荧光强度是单独的抗生物素蛋白-488的3-4倍。

[0023] 图7:ADS优点II—更低的WBC染色显示SKOV和白血细胞(WBC)的相对染色。在该实验中,将SKOV细胞掺入血液中,并象平常一样处理,并使用捕获抗体的抗体混合液捕获在微通道上。然后仅用抗生物素蛋白-546(546指示橙色荧光染料)和抗生物素蛋白-葡聚糖-546将不同通道中的细胞染色。在图A和C中,大的强染色的细胞被橙色荧光地标记。得自显微镜的匹配图像B和D是DAPI染色的细胞,其揭示有核细胞,无论它们是SKOV还是WBC。在图B的情况下,检测到10个DAPI阳性的WBC(用箭头指示)。在图像匹配的图A(其中使用适当的滤光片揭示橙色荧光标记的细胞)中,10个WBC中的9个可以视作在暴露2秒以后含有不同水平的橙色染色剂。当将相同标准应用于抗生物素蛋白-葡聚糖处理过的通道时,在图D中检测到9个DAPI阳性的WBC,而在使用橙色滤光片的匹配的图C中,在暴露2秒以后仅1个WBC是微弱可检测的。该实验证实,抗生物素蛋白-葡聚糖染色剂不仅比单独的抗生物素蛋白更强地将细胞染色(图6),而且对周围的WBC具有更少的背景染色。

[0024] 图8:在70kDa x6葡聚糖*488和500kDa葡聚糖之间的相对荧光。对比了通过使用下述缀合物标记SKOV细胞所得到的相对荧光强度:本发明的抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物(A),除了使用单一500kDa的葡聚糖-胺分子(与抗生物素蛋白缀合,并用AIexaFluor-488荧光标记)以外,以相同方式制备的抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物(B)。尽管每个核心抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物含有可比较的葡聚糖重量/抗生物素蛋白分子,并且各自用相同摩尔过量的NHS-AIexaFluor-488衍生化,顺序地制备的(互联的葡聚糖)缀合物导致细胞的荧光标记水平提高了几乎3倍。

具体实施方式

[0025] 本发明至少部分地基于下述发现：多个葡聚糖和它们的构型可以用作可检测试剂的一部分。因此，本发明提供了可检测试剂，其含有可用于不同检测测定（例如，细胞检测测定）的多个葡聚糖。在有些实施方案中，本发明提供了可检测试剂，其含有与葡聚糖组分缀合的结合部分。所述葡聚糖组分可以另外与可检测实体连接。

[0026] 根据本发明，所述可检测试剂的葡聚糖组分可以是多个葡聚糖的任意组合，例如，至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个互联的葡聚糖的组合。在有些实施方案中，以使它的用于连接可检测实体的部位的可用性最大化的方式，构造或互联多个葡聚糖。在其它实施方案中，以支链构型构造或互联多个葡聚糖。在一些其它的实施方案中，以分层构型构造或互联多个葡聚糖。例如，多个葡聚糖可以以有序或无序方式彼此叠加在上面。在一些其它的实施方案中，构造或互联多个葡聚糖，使得每个葡聚糖与至少另一个葡聚糖连接。在另外一些其它的实施方案中，构造或互联多个葡聚糖，使得每个葡聚糖与至少2个、3个、4个、5个或更多个其它葡聚糖连接。

[0027] 在另外一些其它的实施方案中，直接地或间接地互联多个葡聚糖。例如，通过已知方法诸如衍生化，可以直接地互联葡聚糖。在有些实施方案中，间接地互联多个葡聚糖，例如，经由能够引入官能团或反应部位的实体或分子。在一些其它的实施方案中，经由一种或多种能够提供用于连接其它实体（包括葡聚糖或可检测实体）的官能团（例如，硫醇或马来酰亚胺基团）的分子，间接地互联多个葡聚糖。在有些实施方案中，经由一种或多种实体间接地互联多个葡聚糖，所述实体例如交联剂、蛋白或核酸，其还可以提供可检测实体的连接位点。

[0028] 在另一些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约2至约40个葡聚糖。在有些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约2至约30个葡聚糖。在有些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约2至约20个葡聚糖。在有些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约2个至约10个葡聚糖。在有些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约4个至约8个葡聚糖。在有些实施方案中，所述葡聚糖组分含有约4个、约6个或约8个葡聚糖。

[0029] 本发明的葡聚糖组分的葡聚糖可以具有不同的分子量。在有些实施方案中，每个葡聚糖具有约10kDa至约200kDa的分子量。在有些实施方案中，每个葡聚糖具有约30kDa至约100kDa的分子量。在有些实施方案中，每个葡聚糖具有约50kDa至约70kDa的分子量。在有些实施方案中，每个葡聚糖具有约70kDa的分子量。

[0030] 本发明的葡聚糖组分可以包括类似分子量的葡聚糖或不同分子量的葡聚糖的混合物。在有些实施方案中，每个葡聚糖具有基本上相同的或相同的分子量。例如，所述葡聚糖组分可以是所有10kDa葡聚糖、所有30kDa葡聚糖、所有70kDa葡聚糖、所有100kDa葡聚糖或所有200kDa葡聚糖的组合。在其它实施方案中，所述葡聚糖组分含有葡聚糖的混合物，其中至少一个葡聚糖的分子量实质上不同于其它葡聚糖。例如，所述葡聚糖组分可以是10kDa葡聚糖、30kDa葡聚糖、70kDa葡聚糖、100kDa葡聚糖和200kDa葡聚糖的任意组合。在其它实施方案中，所述葡聚糖组分含有低分子量葡聚糖和高分子量葡聚糖的混合物。在另外一些其它的实施方案中，所述葡聚糖组分含有葡聚糖的混合物，其中这些葡聚糖的总分子量累加至预定的分子量，例如，约500kDa至约1000kDa、1500kDa、2000kDa或更高。

[0031] 通过本领域已知的或可利用的任意合适的方法,可以制备本发明的葡聚糖组分。例如,使用标准的衍生化操作,通过顺序地衍生化所需的葡聚糖,可以制备所述葡聚糖组分。

[0032] 所述可检测实体可以是本领域技术人员已知的任意可检测实体,包括:荧光团、酶(例如但不限于过氧化物酶或碱性磷酸酶)、重金属(例如但不限于金或铁蛋白)、放射性标记或本领域技术人员已知的用于检测靶实体的任意其它分子。可检测实体可以包括在荧光检测测定、酶检测测定、金检测测定中使用的那些,放射性标记诸如放射性磷(诸如³¹P、³²P或³³P)、硫(诸如³²S或³⁵S)和地高辛配基。

[0033] 在有些实施方案中,所述可检测实体是荧光团。荧光团是商购可得的,并且任何已知的和/或商购可得的荧光团可以用作本发明的可检测实体。在有些实施方案中,所述荧光团表现出绿色荧光(例如494nm/519nm)、橙色荧光(例如554nm/570nm)、红色荧光(例如590nm/617nm)或远红外荧光(例如651nm/672nm)激发/发射波谱。在有些实施方案中,所述荧光团是具有在约350nm至约775nm范围内的激发和发射波谱的荧光团。在有些实施方案中,所述激发和发射波谱是约346nm/446nm、约494nm/519nm、约554nm/570nm、约555nm/572nm、约590nm/617nm、约651nm/672nm、约679nm/702nm或约749nm/775nm。

[0034] 在有些实施方案中,所述荧光团可以包括AlexaFluor3、AlexaFluor5、AlexaFluor350、AlexaFluor405、AlexaFluor430、AlexaFluor488、AlexaFluor500、AlexaFluor514、AlexaFluor532、AlexaFluor546、AlexaFluor555、AlexaFluor568、AlexaFluor594、AlexaFluor610、AlexaFluor633、AlexaFluor647、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700和AlexaFluor750(Molecular Probes AlexaFluor染料,可得自Life Technologies, Inc.(USA))。在有些实施方案中,所述荧光团可以包括但不限于Cy染料,包括Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5和Cy7(可得自Lumiprobcs)。在有些实施方案中,所述荧光团可以包括但不限于DyLight350、DyLight405、DyLight488、DyLight550、DyLight594、DyLight633、DyLight650、DyLight680、DyLight750和DyLight800(可得自ThermoScientific(USA))。在有些实施方案中,所述荧光团可以包括但不限于FluoProbes390、FluoProbes488、FluoProbes532、FluoProbes547H、FluoProbes594、FluoProbes647H、FluoProbes682、FluoProbes752和FluoProbes782。

[0035] 所述结合部分可以包括能够结合其它分子或分子集合的任意分子或分子集合,包括、但不限于基于蛋白和核酸的结合部分。多种结合部分是本领域已知的,并且可以预见到任何已知的结合部分与本发明的方法一起使用。在有些实施方案中,所述结合部分包括但不限于:抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、生物素、地高辛配基、免疫试剂、寡核苷酸或其衍生物、肽或其衍生物、核酸或其衍生物、肽核酸或其衍生物、以及蛋白A和蛋白G其配体结合部分。免疫试剂可以包括但不限于抗体或其抗原结合部分,且可以包括例如Fab片段。

[0036] 根据本发明的另一个方面,提供了制备可检测试剂的方法。在有些实施方案中,这些方法包括:提供多个互联的葡聚糖,和使所述互联的葡聚糖与结合部分缀合。在一些其它的实施方案中,这些方法任选地包括:将可检测实体与互联的葡聚糖连接。

[0037] 用于制备多个互联的葡聚糖的方法是本领域众所周知的。例如,根据本领域众所周知的标准规程,可以使用标准的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺基酯)和亚氨基四氢噻吩(iminothiolane)胺衍生化试剂。根据本领域已知的或可利用的任何合适的缀合方法,可以

使多个互联的葡聚糖与结合部分缀合。在有些实施方案中,缀合包括在2种实体(例如,多个互联的葡聚糖和结合部分)之间的一个或多个共价键或非共价键或它们的组合。在有些实施方案中,可以用亚氨基四氢噻吩衍生化结合部分,例如抗生物素蛋白。在本领域中已经充分描述了亚氨基四氢噻吩反应(参见,例如,ThermoScientific instructions available with commercially purchased iminothiolane;以及Traut,R.R.,等人.Biochem12(17):3266-3273(1973))。在有些实施方案中,可以进行衍生化反应,以达到每个抗生物素蛋白3-5个硫醇的取代率。

[0038] 在有些实施方案中,还可以用常用的异双功能试剂SMCC(琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯;Pierce Chemical公司,Rockford,IL)衍生化葡聚糖,以形成葡聚糖-胺。SMCC反应在本领域中得到充分描述,且是众所周知的(参见,例如,ThermoScientific instructions available with commercially purchase SMCC;以及Ishikawa,E.,等人,J Immunoassay4:209-327(1983);Brinkley,M.A.,Bioconjugate Chem3:2-13(1992);和Mattson,G.,等人,Molecular Biology Reports17:167-83(1993))。在有些实施方案中,可以进行衍生化反应,以得到每个葡聚糖1-2个马来酰亚胺基团。在有些实施方案中,通过顺序地衍生化所需量的葡聚糖,可以制备多个互联的葡聚糖。

[0039] 通过多种方法,可以使可检测实体添加或连接至可检测试剂上,所述方法都是本领域众所周知的。例如,可以采用NHS反应来将荧光团(通常也称作荧光染料)添加或连接至葡聚糖分子上。在有些实施方案中,所述荧光团可以是NHS酯、琥珀酰亚胺基酯(SE)或四氟苯基(TFP)酯。商购可得的荧光团含有关于将荧光团添加至其它分子上的详细说明,这些荧光团标记方法是本领域众所周知的(参见例如,可与购买的荧光团或其它可检测实体一起得到的产品资料;以及Proudnikov D.,等人,Nucleic Acids Research,24(22):4535-4542(1996),Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,2003;Current Protocols in Molecular Biology(2002);和Current Protocols in Immunology(2002))。

[0040] 在有些实施方案中,用于制备可检测试剂的方法包括:使结合部分与葡聚糖缀合,以形成核心葡聚糖-结合部分,并使所述核心葡聚糖-结合部分与一个或多个葡聚糖缀合,例如,将一个或多个葡聚糖层或分支顺序地添加至所述核心葡聚糖-结合部分上。然后可以将得到的葡聚糖-结合部分复合物任选地连接至可检测实体上。

[0041] 在有些实施方案中,可以使用葡聚糖来提供主要反应部位,例如,当使用NHS酯的胺反应性衍生物时。在一些其它的实施方案中,可以使用葡聚糖来引入次要官能度(functionalities)、官能团或反应部位,例如,可用于与其它分子(诸如葡聚糖或可检测实体)反应或连接的硫醇或马来酰亚胺基团。在一些其它的实施方案中,可以使用葡聚糖来与其它实体反应,以提供其它官能团、反应部位或结合部位,例如,用于与葡聚糖或可检测实体连接。例如,可以将蛋白质诸如藻红蛋白(phycoerythrin)与葡聚糖连接,以提供荧光标记的内源水平,替代使用荧光分子的NHS酯。在另一个实例中,可以将核酸引入葡聚糖中,以充当反应中的其它分子的次要结合部位,或它们可以充当其它官能团(functionality)的探针。

[0042] 在其它实施方案中,本发明提供了制备基于抗生物素蛋白的可检测试剂的方法。在有些实施方案中,所述方法可以包括:衍生化葡聚糖-胺以产生马来酰亚胺基团,和衍生化抗生物素蛋白以产生硫醇基团。然后使所述衍生化的抗生物素蛋白与一定摩尔比的一种

或多种衍生化的葡聚糖-胺分子反应,其中衍生化的抗生物素蛋白与衍生化的葡聚糖-胺的反应会产生葡聚糖-抗生物素蛋白。然后,衍生化所述葡聚糖-抗生物素蛋白以产生每个葡聚糖的一个或多个硫醇基团,并进一步使所述衍生化的葡聚糖-抗生物素蛋白与一定摩尔比的一种或多种马来酰亚胺-衍生化的葡聚糖胺分子反应,其中所述衍生化的葡聚糖-抗生物素蛋白和所述马来酰亚胺-衍生化的葡聚糖胺之间的反应会产生分层的或分支的葡聚糖-抗生物素蛋白复合物。然后,任选地使所述葡聚糖-抗生物素蛋白复合物与一定摩尔比的一种或多种可检测实体反应,其中所述葡聚糖-抗生物素蛋白复合物与所述可检测实体的反应会产生本发明的可检测试剂。

[0043] 在有些实施方案中,用亚氨基四氢噻吩衍生化抗生物素蛋白,以得到每个抗生物素蛋白的3-5个硫醇。然后加入3倍摩尔过量的70kDa葡聚糖-胺,其已经使用常用的异双功能试剂SMCC(琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯,Pierce Chemical公司,Rockford,IL)用1-2马来酰亚胺基团衍生化。进一步用亚氨基四氢噻吩衍生化所述抗生物素蛋白-葡聚糖,以实现每个葡聚糖2-3个硫醇的取代率,然后进一步与相对于原始抗生物素蛋白6倍摩尔过量的葡聚糖一起温育。然后可以用相对于葡聚糖10倍过量的NHS-荧光团标记所述葡聚糖-抗生物素蛋白复合物。在有些实施方案中,所述荧光团是AlexaFluor488或AlexaFluor546。

[0044] 可以调节试剂的摩尔比,以得到期望数目的马来酰亚胺基团、硫醇基团或期望的可检测实体标记程度,病者这样的修改是本领域众所周知的。技术人员可以容易地调节反应物,以实现所需的反应。例如,可以修改反应物,以得到特定应用所需的特定数目的马来酰亚胺和硫醇基团。

[0045] 本发明也提供了用于检测或定量靶分子的方法。这样的方法包括:使本发明的可检测试剂与疑似含有靶实体的样品接触,其中所述可检测试剂的结合部分能够结合所述靶实体,然后检测可检测实体信号,以便检测或定量靶分子。靶实体可以包括但不限于蛋白、蛋白集合、肽、核酸或细胞。

[0046] 样品可以包括任意的生物样品或非生物样品。在有些实施方案中,样品包括任何未经处理的或经处理的细胞、组织和/或人分泌样品。在一些其它的实施方案中,样品包括从粗制生物样品中部分地或完全地分离或纯化的任何核酸、蛋白或亚细胞组分。在另一些其它的实施方案中,可用于本发明的样品包括但不限于:血清、血液、血浆、全血及其衍生物、皮肤、毛发、毛囊、唾液、口腔粘液、阴道粘液、汗液、泪液、上皮组织、尿、精液(semen)、精液(seminal fluid)、精浆、前列腺液、射精前的流体(Cowper氏流体)、排泄物、活组织检查样品、腹水、脑脊液、淋巴、和组织提取物样品、或活组织检查样品样品、或它们的组合(参见,例如,Clinical Proteomics:Methods and Protocols,第428卷,Methods in Molecular Biology,Antonia Vlahou编(2008);和Holland,N.,Mutation Research/Reviews in Mutation Research,543(3):217-234(2003);它们全部通过引用整体并入本文)。

[0047] 就与检测和定量有关的方法而言,这样的方法是本领域众所周知的,且可以采用任意标准方法。基于要与本发明的可检测试剂一起使用的可检测实体,技术人员将容易地理解采用哪种方法。这样的检测和定量方案是众所周知的,且可以采用任意标准方法(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel,Frederick M.编(2010);

Current Protocols in Protein Science Last, Coligan, John E., 等人编(2010); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Egli, Martin编(2010); 和 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Sambrook, Joseph(2001), 它们都通过引用整体并入本文)。

[0048] 本发明的可检测试剂可以与下述测定一起使用: 免疫测定(诸如ELISA)、细胞分选测定(例如但不限于FACS)、流式细胞计量术测定、核酸测定、蛋白测定、药物相互作用测定、微流体测定、稀少细胞检测或定量、或本领域目前使用和描述的多种分选、检测或定量测定中的任意其它测定。这样的测定可以是手工的或自动化的。在有些实施方案中, 本发明的试剂与例如微通道或其它微流体装置一起使用。

[0049] 本发明的可检测试剂可以用于检测和定量靶实体(诸如分子、蛋白和/或核酸)。这样的靶实体还可以包括稀少细胞。在有些实施方案中, 稀少细胞可以包括: 在生物样品中通常不存在的、且可以作为疾病或异常状况的指示剂而呈现的任意细胞。在有些实施方案中, 这些细胞比样品中的其它细胞小约1个或多个数量级存在。这样疾病或状况可以包括慢性疾病(诸如癌症)、损伤或妊娠。在有些实施方案中, 稀少细胞可以包括这样的细胞: 其通常存在于生物样本中, 但是存在的频率比样品中存在的其它细胞小约1个或多个数量级。稀少细胞可以包括但不限于: 循环的肿瘤细胞(CTC)、胎儿细胞和干细胞。

[0050] 用于对比得自各种可检测实体的信号的方法是本领域众所周知的, 技术人员可以容易地获知如何进行这样的对比分析。可以将增强的、增加的和/或放大的检测与下述结合部分进行对比: 直接缀合到一种或多种可检测实体上的结合部分, 或缀合到含有一种或多种可检测实体的单一葡聚糖上的结合部分。增强的、增加的和/或放大的检测可以包括: 例如, 减少的与非靶实体的结合(例如, 减少的与白血细胞(WBC)的结合), 减少的非特异性结合, 增加的可检测实体信号(例如, 增加的来自荧光团的光信号, 增加的来自放射性标记的放射性信号, 或增加的来自酶反应的光), 以及增加的测定灵敏度(例如, 可以增加样品中的稀少细胞的检测水平, 从而检测更多的稀少细胞)。使用本发明的可检测试剂, 还可以增加靶实体(诸如CTC、胎儿细胞、干细胞或其它稀少细胞)的检测选择性。本发明的可检测试剂可以用于增强临床样品中的CK染色细胞的检测, 以及用于在多种测定中检测不含有CK染色剂的细胞, 以便增加在样品中检测出的CTC的数目。

[0051] 在有些实施方案中, 与在没有本发明的葡聚糖组分或缀合到含有一种或多种可检测实体的单一葡聚糖上的结合部分存在下用缀合到可检测实体上的结合部分实现的检测相比, 本发明的可检测试剂会提供增强的、增加的和/或放大的检测。在有些实施方案中, 当将本发明的可检测试剂缀合到可检测实体上时, 所述可检测试剂会产生强2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍的信号。在有些实施方案中, 本发明的可检测试剂具有减少的或下降的与非靶实体的非特异性结合。在有些实施方案中, 所述减少的非特异性结合会导致可检测试剂的信噪比增加/优化5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。

[0052] 实施例

[0053] 提供下述实施例来例证、而不是限制要求保护的发明。

[0054] 实施例1: 使用荧光标记的抗生物素蛋白-葡聚糖生物缀合物在Biocept微通道中对细胞的增强染色

[0055] 本实施例描述了用于替代染色的试剂和方法, 其可以用于增强临床样品中的CK染

色细胞的检测,且其可以用于检测不含有CK染色剂的细胞。通过使结合部分(诸如抗生物素蛋白)与含有荧光标记的氨基-葡聚糖(荧光团可检测实体)缀合,可以实现增强的或放大的染色。该增强形式的抗生物素蛋白的亮度是荧光标记的抗生物素蛋白的数倍,并且重要的是,其具有更低的与血液中的非靶细胞的非特异性结合。二者相加意味着,荧光标记的抗生物素蛋白-葡聚糖具有提高5-10倍的信噪比。通过具有更少的与非靶白血细胞(WBC)的非特异性结合,这会在捕获的CTC的选择性检测中提供独特优点。

[0056] 荧光标记的抗生物素蛋白-葡聚糖的制备

[0057] 在这些实验中使用标准的NHS和亚氨基四氢噻吩胺衍生化试剂。这些试剂的基本反应条件是本领域众所周知的。但是,这些缀合物各自的温育次序和摩尔比对于抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物的最终性能而言是重要的。下面是用于制备抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物的优选实施方案。用亚氨基四氢噻吩衍生化抗生物素蛋白,以实现每个抗生物素蛋白3-5个硫醇的取代率。向其中加入3倍摩尔过量的70kDa葡聚糖-胺,后者已经使用常用的异双功能试剂SMCC(琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯;Pierce Chemical公司, Rockford, IL)用1-2马来酰亚胺基团衍生化。NHS是N-羟基琥珀酰亚胺基酯。结束后,进一步用亚氨基四氢噻吩衍生化抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物,以实现每个葡聚糖2-3个硫醇的取代率,然后进一步与相对于原始抗生物素蛋白6倍摩尔过量的葡聚糖一起温育。最后,用相对于葡聚糖10倍过量的NHS-荧光染料(在当前的实施例中,488或546)标记该缀合物。可以调节马来酰亚胺、硫醇基团的摩尔比或荧光标记程度,以实现缀合物的改良性质。据估计,该方法会产生连接了4-8个70kDa的葡聚糖的抗生物素蛋白,在本实施例中将其称作基于抗生物素蛋白的可检测试剂70kDa葡聚糖。

[0058] 使用500kDa葡聚糖-胺,制备一种替代性的抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物。在该情况下,采用相同的衍生化试剂。如上所述制备硫醇酯化的抗生物素蛋白。还如上所述用SMCC衍生化500kDa葡聚糖-胺,并与抗生物素蛋白缀合。在本实施例中,然后在与使用70kDa葡聚糖-胺的上述方法中相同的摩尔比过量(10倍),用NHS-AlexaFluor488荧光标记500kDa抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物。在本实施例中将该试剂称作基于抗生物素蛋白的试剂500kDa葡聚糖。

[0059] 结果和讨论

[0060] 可以使用3种不同类型的染色方法来检测已经用抗体混合液捕获在微通道上的细胞(参见,图1)。在反应A中,捕获的细胞被在CTC领域中常用的抗-CK染色。细胞角蛋白是一种胞质蛋白,通过与用绿色荧光染料(命名为488)标记的抗-细胞角蛋白抗体一起温育,将细胞染色。在反应B中,通过加入抗生物素蛋白-488(用488染料标记的抗生物素蛋白),将所述细胞进一步染色。在该情况下,所述抗体将细胞质CK染色,并且抗生物素蛋白通过结合已经用生物素标记的捕获抗体而进一步将细胞表面染色。两种染色是累加性的,从而导致更高的细胞标记。这方面的一个实施例显示在图2中。在反应C中,细胞未被细胞角蛋白染色,而仅被抗生物素蛋白-488染色。在该情况下,仅仅基于与细胞表面上的生物素化的捕获抗体相结合的抗生物素蛋白的数目而观察细胞。这方面的一个实验实施例显示在图3中。

[0061] 在图2中显示了抗体混合液对乳腺癌肿瘤细胞的捕获、以及CK染色剂对它的检测(图A)。在该情况下,染色非常弱,尽管在背景以上足够高以致于被鉴别为肿瘤细胞。象通常一样,这些CTC细胞同时地被红色荧光标记的CD45染色,且该细胞是CD45阴性的。记录该细

胞的位置,然后用抗生物素蛋白-488将微通道染色。图B显示了在抗生物素蛋白-488处理以后该细胞的重新定位,并表明,它被远远更亮地染色。在两幅图中,观察到白血细胞(细胞核被DAPI染色),但是这些细胞不具有可检测的染色。

[0062] 在图3中显示了仅仅基于捕获抗体的染色的细胞检测的一个实例。在该实验中,将SKOV细胞掺入血液中,并为CTC的捕获而处理样品(参见,例如,美国专利申请号20100255479)。尽管并非绝对量度,SKOV细胞的核大小通常是典型WBC的细胞核的2-3倍。在仅用抗生物素蛋白-488染色以后,SKOV细胞被亮染色,而WBC不具有可检测的染色。这证实,通过细胞表面捕获抗体的标记,可以检测出未被CK染色的细胞或不含有CK的细胞。如在未决的美国专利申请号20100255479中所述,通过使用多种抗体,可以显著增强该染色。

[0063] 在图4中显示了在微通道上的乳腺癌样品的计数。在该实验中,首先在标准条件下用荧光标记的488抗-CK抗体将细胞染色。检测绿色标记的细胞,记录它们在微通道上的X-Y坐标。接着,用绿色荧光标记的抗生物素蛋白处理通道,以标记在细胞表面上的抗体。记录通道的绿色荧光细胞,除了关于CK染色剂记录的位置以外,也确定如此鉴别出的所有细胞是CD45阴性的。条形图表明,在大多数情况下,抗生物素蛋白检测出比CK染色剂明显更多的细胞。在使用健康供体血液的对照实验中,当在相同条件下进行时,不存在可检测的细胞,并同时被与抗生物素蛋白-488相组合的抗-CK-488染色(数据未显示)。

[0064] 在图5中显示了用荧光染料标记的抗生物素蛋白葡聚糖缀合物(基于抗生物素蛋白的可检测试剂)的图示。每个抗生物素蛋白的理论染料数目高于仅用抗生物素蛋白标记。

[0065] 在图6中显示了用单一生物素化的EpCAM抗体温育、随后用抗生物素蛋白-488(绿色荧光标记的抗生物素蛋白)和抗生物素蛋白-葡聚糖-488(基于抗生物素蛋白的可检测试剂70kDa葡聚糖)温育的SKOV细胞的FACS分析。第一个和第二个条是对照细胞的染色强度,其中加入了抗生物素蛋白或缀合物,但是没有加入生物素化的EpCAM抗体。第三个条显示了当将抗生物素蛋白-488加给EpCAM处理过的细胞时,细胞的染色强度。第四个条显示了用抗生物素蛋白-葡聚糖-488温育的相同细胞的染色强度。这些数据指示,抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物的荧光强度是单独的抗生物素蛋白-488的3-4倍。

[0066] 用抗生物素蛋白-546(橙色荧光标记的抗生物素蛋白)和抗生物素蛋白-葡聚糖-546(基于抗生物素蛋白的可检测试剂70kDa葡聚糖)对SKOV和白血细胞(WBC)的相对染色。在该实验中,将SKOV细胞掺入血液中,并象平常一样处理,并使用捕获抗体的抗体混合液捕获在微通道上。然后仅用抗生物素蛋白-546(546指示橙色荧光染料)和抗生物素蛋白-葡聚糖-546将不同通道中的细胞染色。在图A和C中,大的强染色的细胞被橙色荧光地标记。得自显微镜的匹配图像B和D是DAPI染色的细胞,其揭示有核细胞,无论它们是SKOV还是WBC。在图B的情况下,检测到10个DAPI阳性的WBC(用箭头指示)。在图像匹配的图A(其中使用适当的滤光片揭示橙色荧光标记的细胞)中,10个WBC中的9个可以视作在暴露2秒以后含有不同水平的橙色染色剂。当将相同标准应用于抗生物素蛋白-葡聚糖处理过的通道时,在图D中检测到9个DAPI阳性的WBC,而在使用橙色滤光片的匹配的图C中,在暴露2秒以后仅1个WBC是微弱可检测的。该实验证实,抗生物素蛋白-葡聚糖染色剂不仅比单独的抗生物素蛋白更强地将细胞染色(图6),而且对周围的WBC具有更少的背景染色。

[0067] 对比了通过使用下述缀合物标记SKOV细胞所得到的相对荧光强度:抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物染色剂(A;基于抗生物素蛋白的可检测试剂70kDa葡聚糖),除了使用单一

500kDa的葡聚糖-胺分子(与抗生物素蛋白缀合,并用AIexaFluor-488荧光标记)以外,以相同方式制备的抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物(B;基于抗生物素蛋白的可检测试剂500kDa葡聚糖)。尽管每个核心抗生物素蛋白-葡聚糖缀合物含有可比较的葡聚糖重量/抗生物素蛋白分子,并且各自用相同摩尔过量的NHS-AIexaFluor-488衍生化,顺序地制备的含有分层的或分支的葡聚糖的缀合物导致细胞的荧光标记水平提高了几乎3倍。

[0068] 在本文中讨论和引用的所有出版物通过引用整体并入本文。应当理解,公开的发明不限于描述的特定方法、方案和材料,因为这些可以变化。还应当理解,在本文中使用的术语仅仅是用于描述特定实施方案的目的,无意限制本发明的范围,所述范围仅由所附权利要求限定。

[0069] 本领域技术人员会认识到或者使用不超过例行实验能够确定本文描述的发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案意图被所附权利要求包括在内。

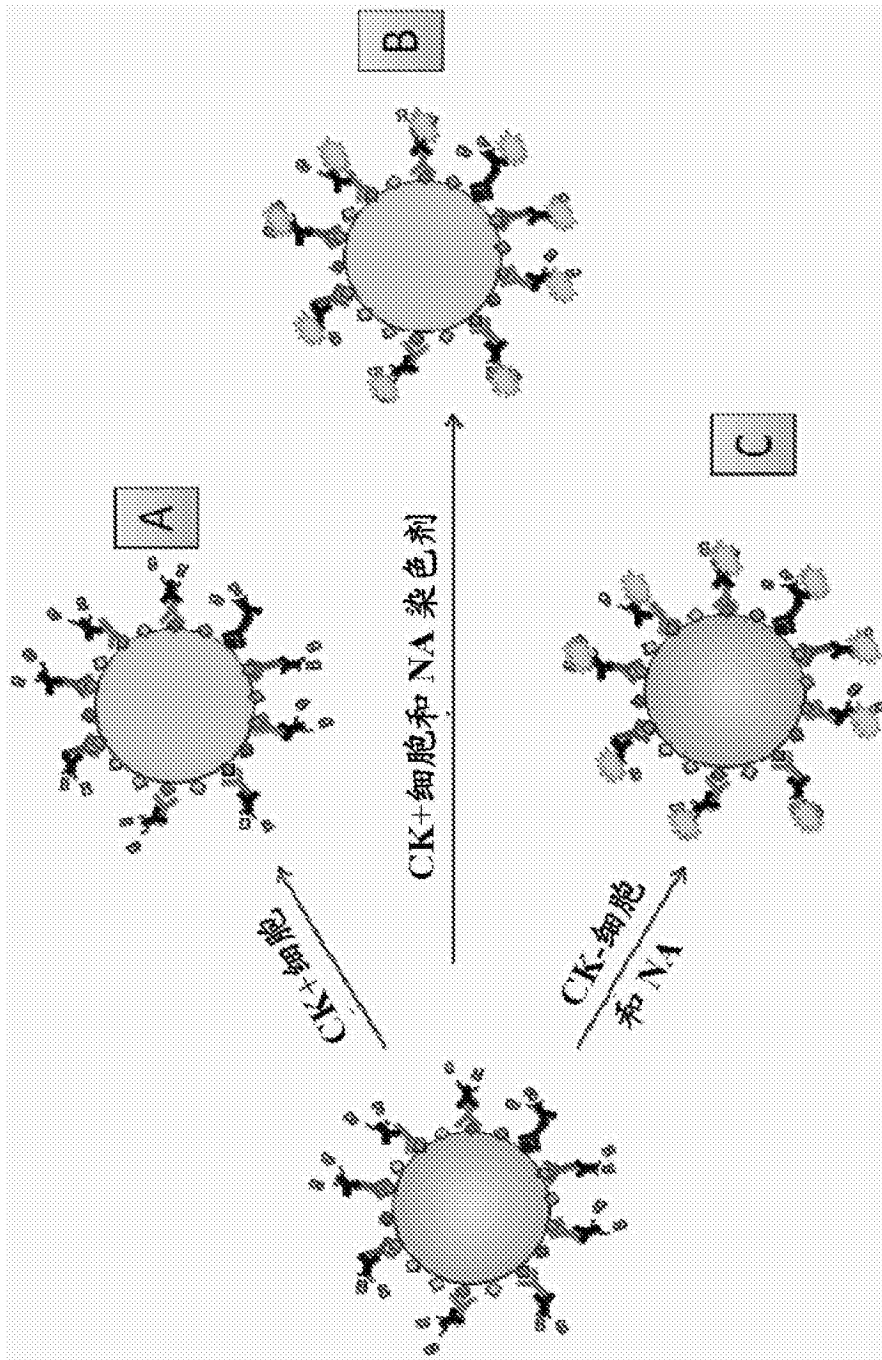


图1

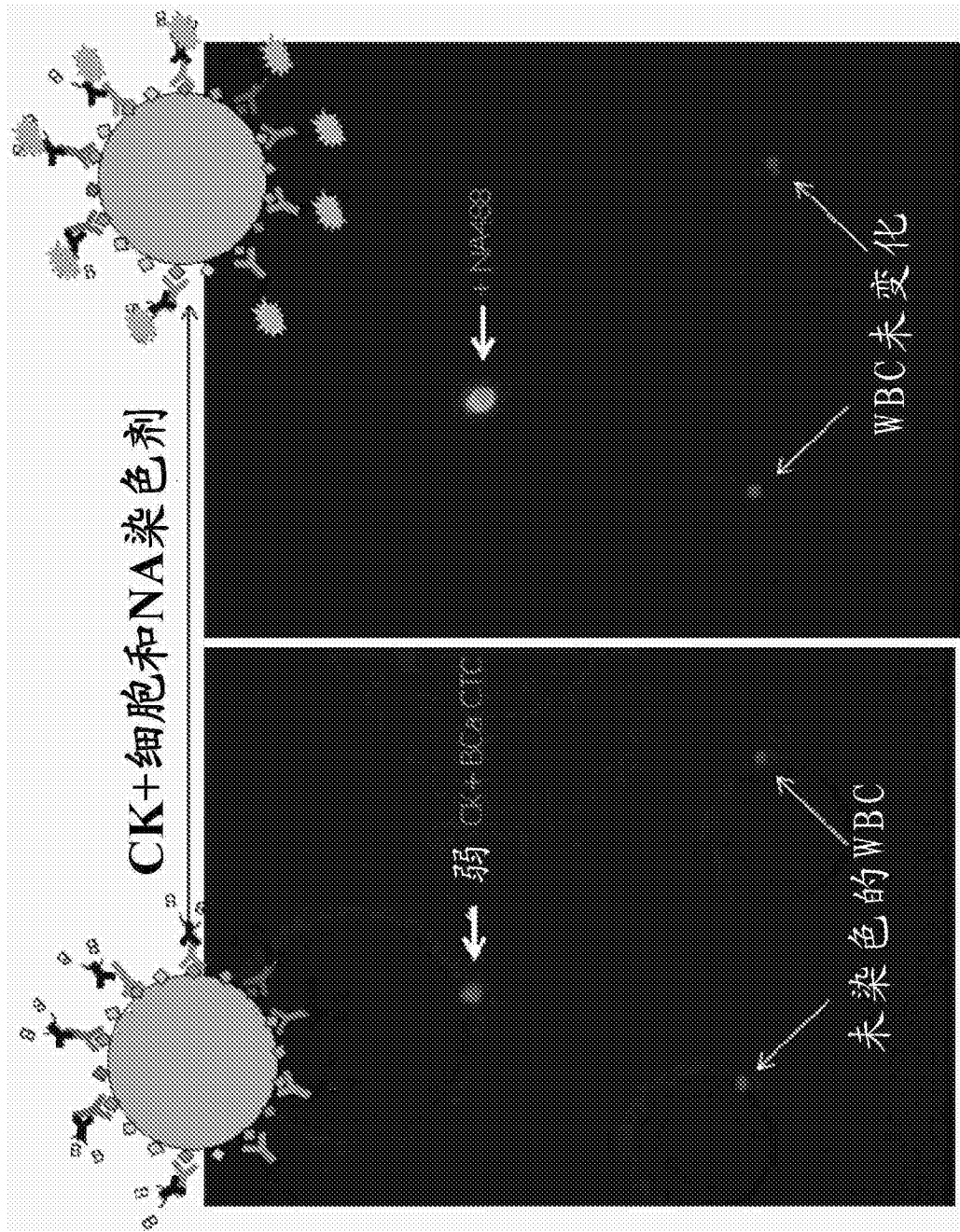


图2

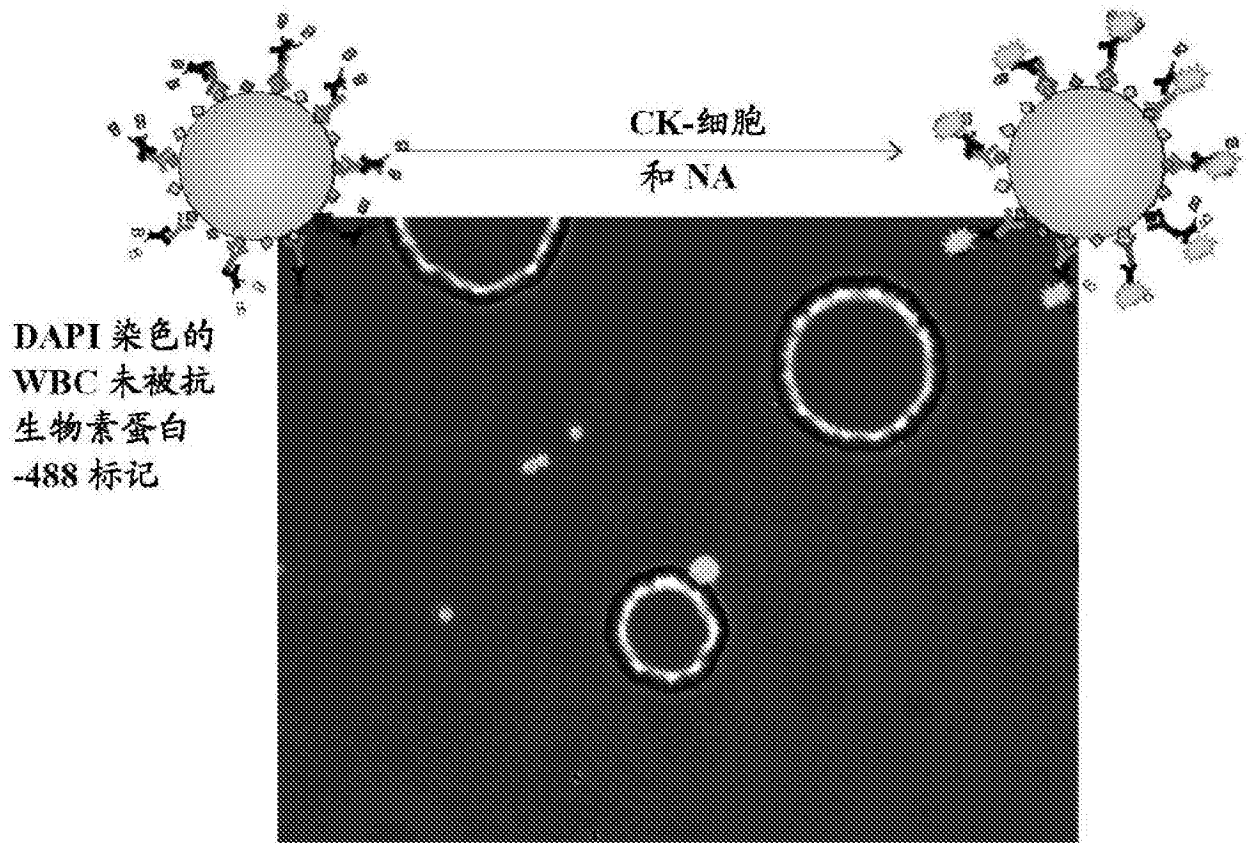


图3

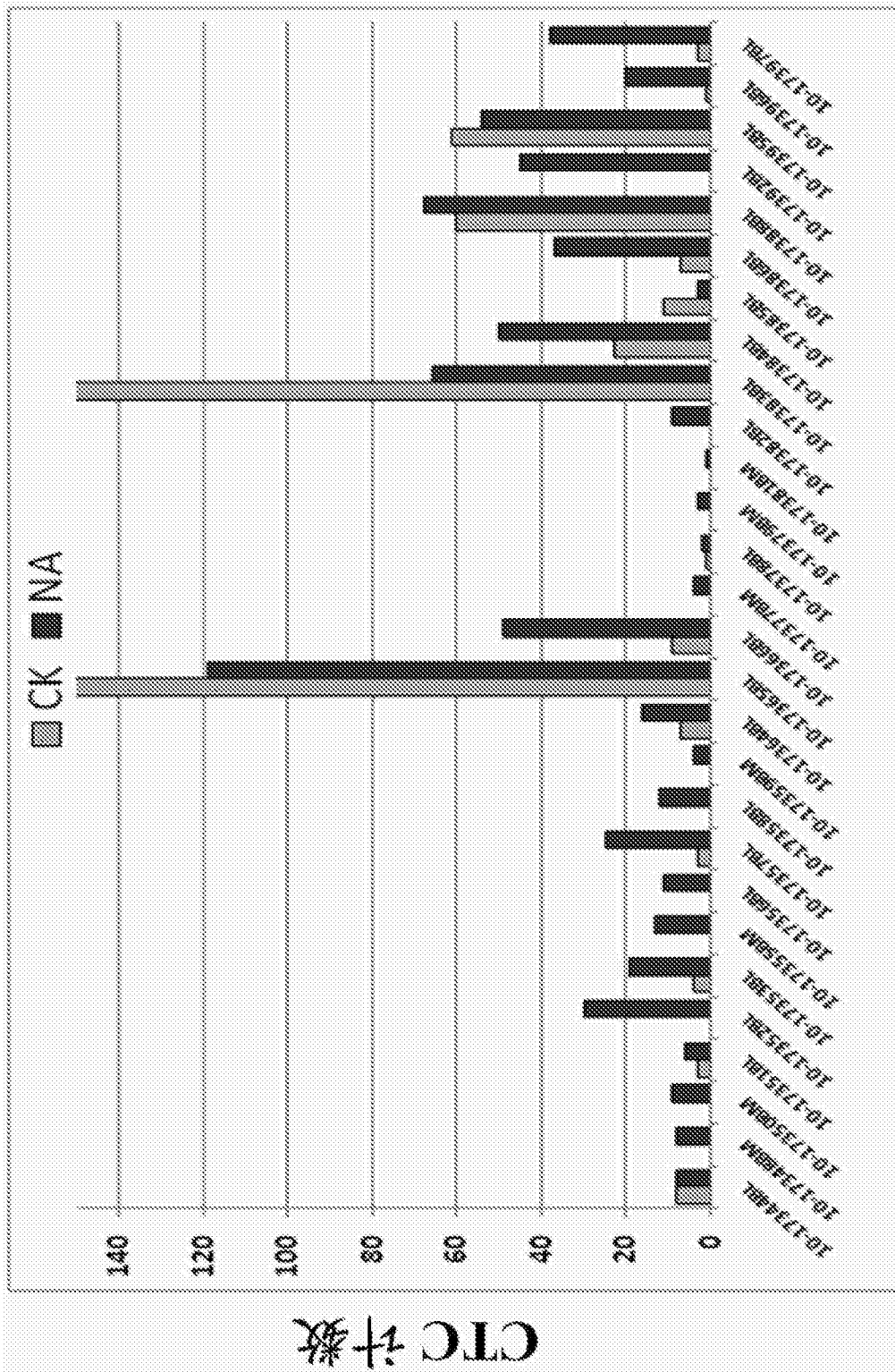


图4

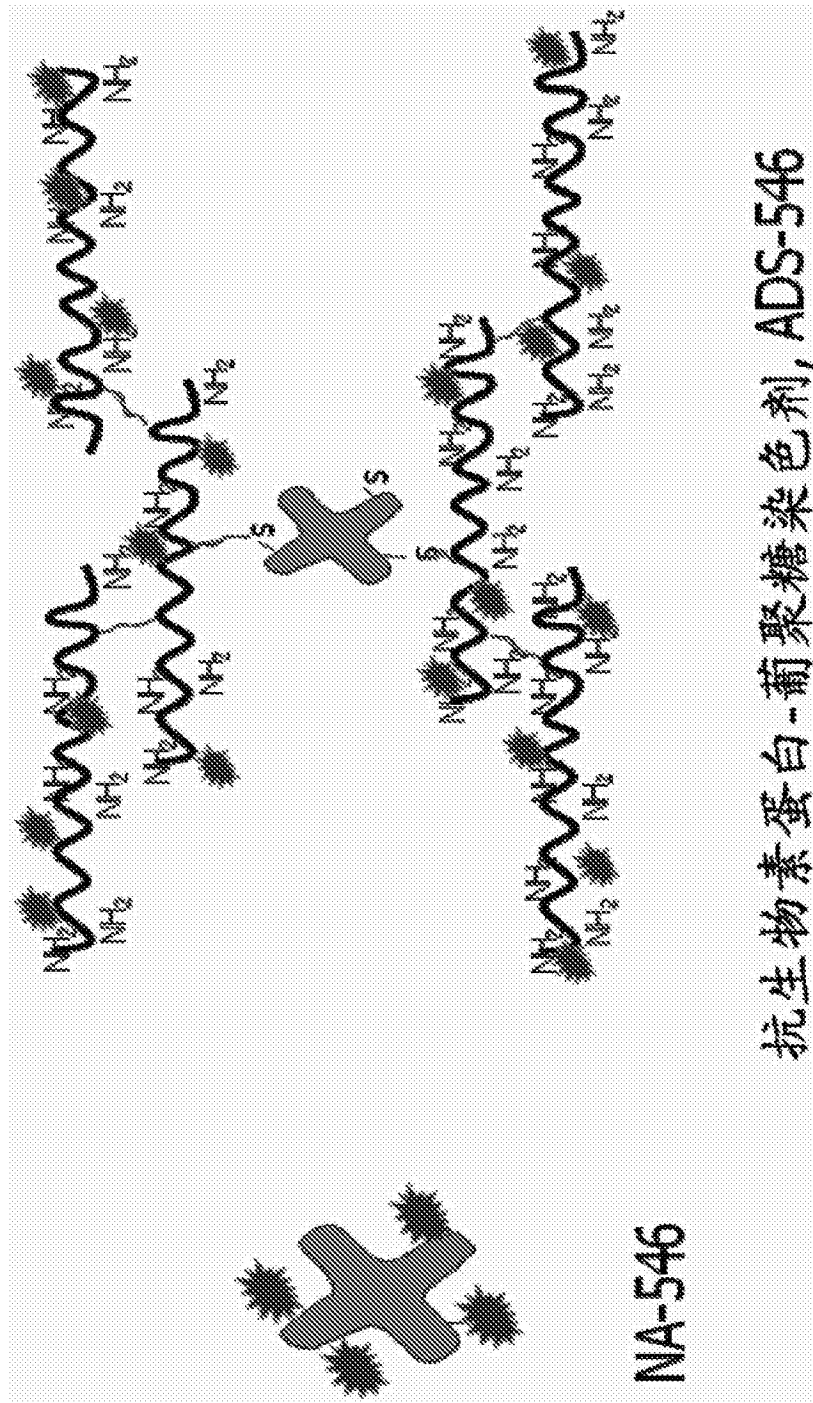


图5

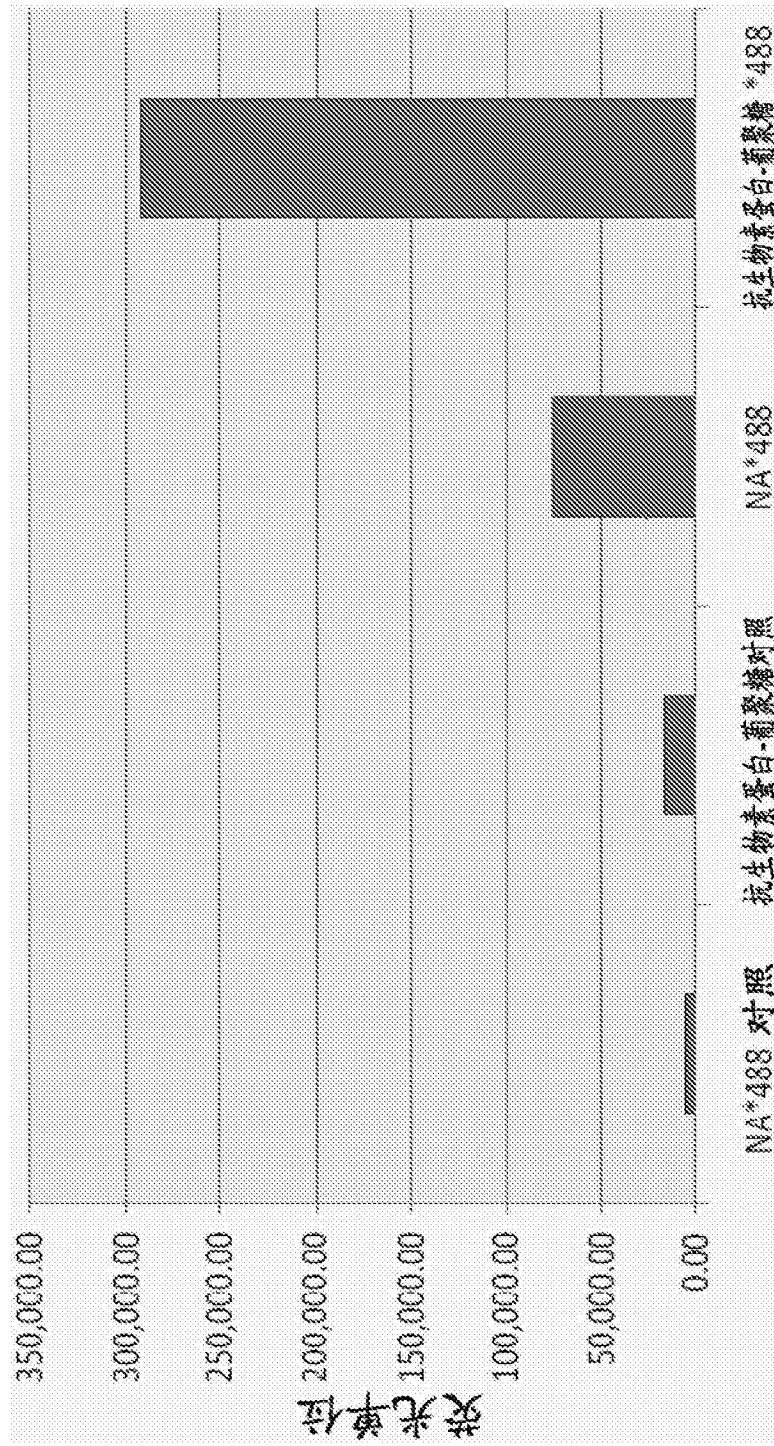


图6

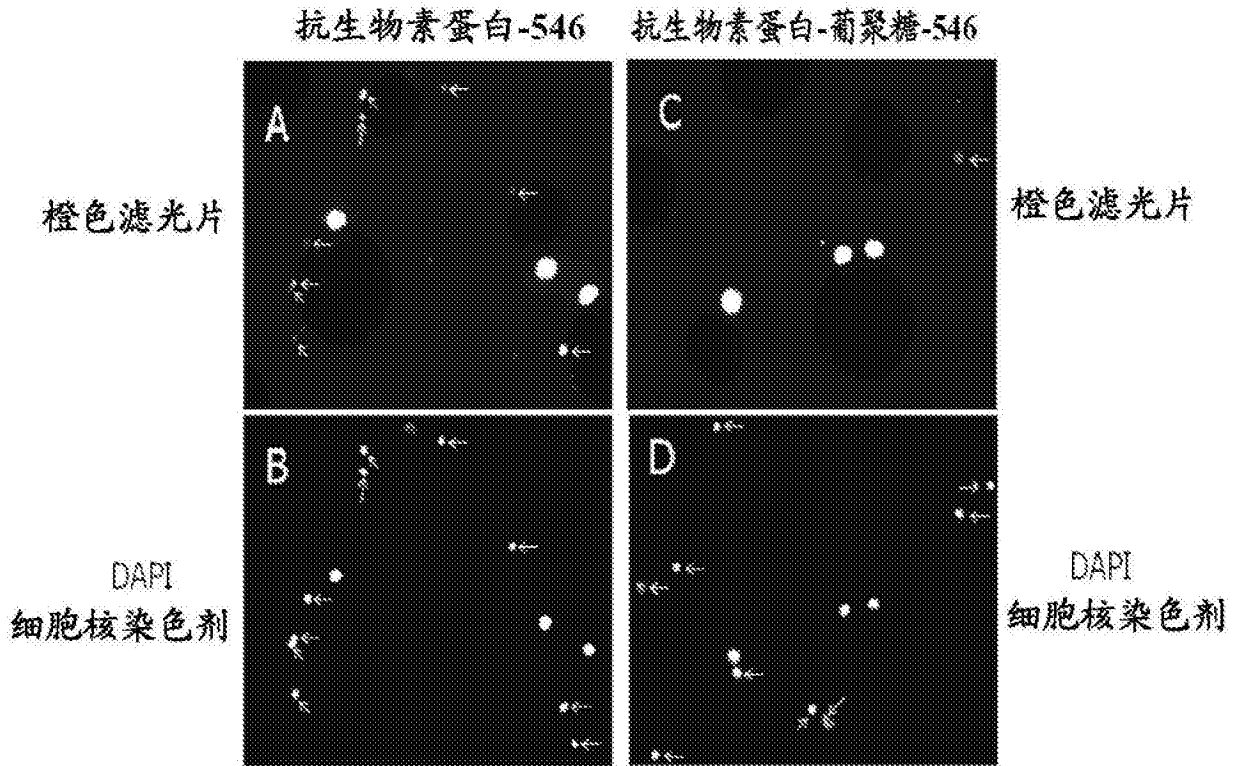


图7

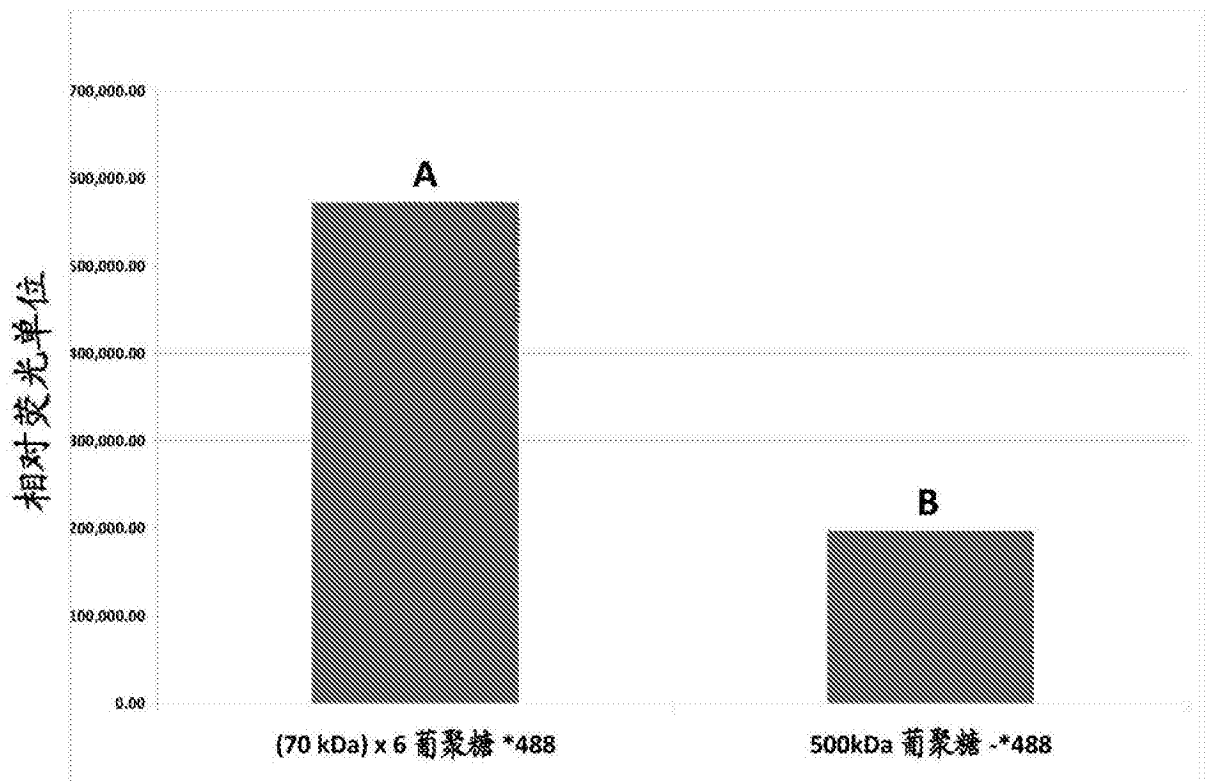


图8

专利名称(译)	用于信号放大的方法和试剂		
公开(公告)号	CN103229057B	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN201180056340.0	申请日	2011-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
[标]发明人	SD米克拉吉塞克 LS米勒		
发明人	S·D·米克拉吉塞克 L·S·米勒		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/53 G01N33/52		
CPC分类号	C08B37/0021 C08L5/02 G01N33/52 G01N33/58 G01N33/533 G01N33/548 G01N33/583		
优先权	61/385937 2010-09-23 US		
其他公开文献	CN103229057A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了含有与葡聚糖部分缀合的结合部分的试剂、制备这类试剂的方法、以及这类试剂在多种分子测定和细胞测定中的用途。

