

(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2013-531801

(P2013-531801A)

(43) 公表日 平成25年8月8日(2013.8.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/58 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/58 Z	2GO45
<b>GO 1 N 33/535 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/535	4BO63
<b>GO 1 N 33/542 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/542 B	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	
<b>C 1 2 Q 1/28 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-518768 (P2013-518768)	(71) 出願人	511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ、 インク。 アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノベーション パーク ドライブ 1910
(86) (22) 出願日	平成23年7月1日 (2011.7.1)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成25年2月28日 (2013.2.28)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/042849	(72) 発明者	ムリーヨ, アドリアン, イー。 アメリカ合衆国 アリゾナ 85739, ツーソン, サウス ファーロング コ ート 38943
(87) 国際公開番号	W02012/003476		
(87) 国際公開日	平成24年1月5日 (2012.1.5)		
(31) 優先権主張番号	61/464, 216		
(32) 優先日	平成23年2月28日 (2011.2.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/398, 946		
(32) 優先日	平成22年7月2日 (2010.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的検出のためのハプテンコンジュゲート

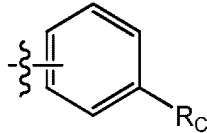
## (57) 【要約】

ハプテン、任意リンカー、及びペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分を含むハプテンコンジュゲートの実施態様が開示されている。幾つかの実施態様では、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分はチラミン又はチラミン誘導体である。また、ハプテンコンジュゲートの生成及び使用方法の実施態様が開示されている。特定の実施態様では、ハプテンコンジュゲートは、シグナル増幅アッセイにおいて使用される。ある実施態様では、ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、ローダミンチオ尿素以外のチオ尿素、ジニトロフェニル又はトリニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、又は7 - ジエチルアミノ - 3 - カルボキシクマリンである。ハプテンは、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分に直接的に、又はリンカーを介して間接的にカップリングされる。ある実施態様では、ハプテンコンジュゲートは、マルチプレックスアッセイにおいて使用される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、ローダミンチオ尿素以外のチオ尿素、ジニトロフェニル又はトリニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、2,3,6,7-テトラヒドロ-1,1-オキソ-1H,5H,11H-[1]ベンゾピラノ[6,7,8-ij]キノリジン-10-カルボン酸、又は7-ジエチルアミノ-3-カルボキシクマリンから選択されるハプテン；  
任意リンカー；及び  
一般式



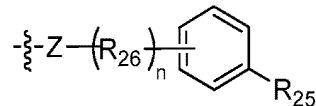
を有するペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分  
を含んでなり、R<sub>C</sub>がヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミンから選択されるハプテンコンジュゲート。

## 【請求項 2】

ペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分が、チラミン又はチラミン誘導体である請求項 1 に記載のハプテンコンジュゲート。

## 【請求項 3】

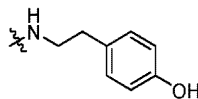
チラミン及び / 又はチラミン誘導体が次の一般式



を有し、ここで、R<sub>25</sub>がヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミンから選択され；R<sub>26</sub>がアルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、-OR<sub>m</sub>、-NR<sub>m</sub>、及び-SR<sub>m</sub>から選択され、ここでmが1-20であり；nが1-20であり；Zが酸素、硫黄、及びNR<sub>a</sub>から選択され、ここでR<sub>a</sub>が水素、脂肪族、アリアル、又はアルキルアリアルから選択される請求項 2 に記載のハプテンコンジュゲート。

## 【請求項 4】

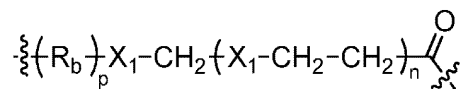
チラミン及び / 又はチラミン誘導体が、次の化学構造



を有する請求項 3 に記載のハプテンコンジュゲート。

## 【請求項 5】

リンカーが、次の一般式



を有し、ここで、各X<sub>1</sub>が独立して-CH<sub>2</sub>、酸素、硫黄、及び-NR<sub>c</sub>から選択され、ここで、R<sub>c</sub>が水素、脂肪族、アリアル、及びアリアルアルキルから選択され；R<sub>b</sub>がカルボニル及びスルホキシルから選択され；nが1-20であり；そしてpが0又は1である請求項 1 - 4 の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

## 【請求項 6】

10

20

30

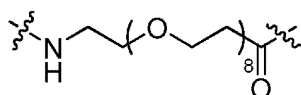
40

50

n が 4 又は 8 である請求項 5 に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項 7】

リンカーが、次の化学構造



を有する請求項 1 - 6 の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項 8】

ハブテンがペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分に直接結合されている請求項 1 - 4 の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

10

【請求項 9】

コンジュゲートが、チラミドシグナル増幅アッセイにおいて使用される場合、4 以上のシグナル：ノイズ比を生成できる請求項 1 - 8 の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項 10】

シグナル：ノイズ比が 10 以上である請求項 9 に記載のハブテンコンジュゲート。

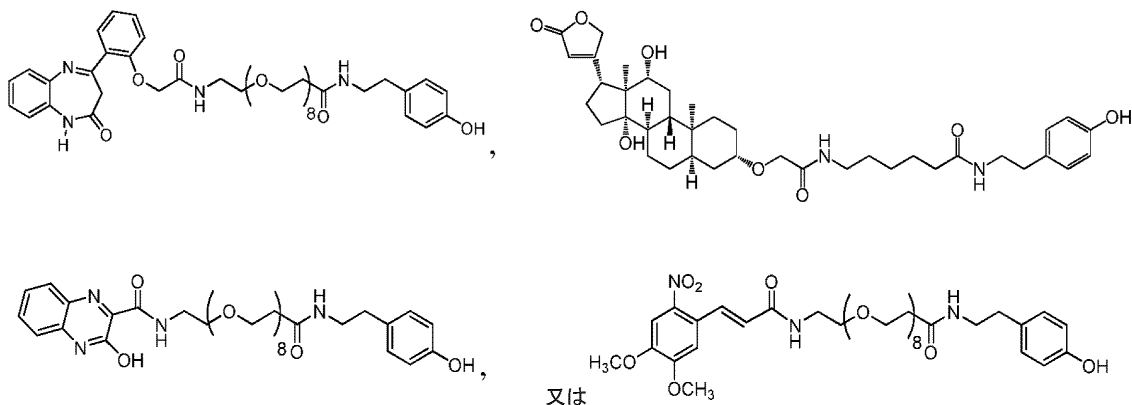
【請求項 11】

コンジュゲートが、*in situ*ハイブリダイゼーションアッセイにおけるコンジュゲートと同じハブテンでハブテン化されている核酸によって生成されるシグナルの少なくとも 2 倍の強さのシグナルを、チラミドシグナル増幅アッセイ生成できる請求項 1 - 8 の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

20

【請求項 12】

請求項 11 に記載のハブテンコンジュゲートであって、



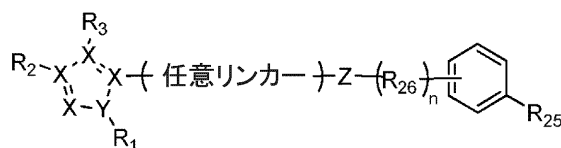
30

から選択される式を有するハブテンコンジュゲート。

【請求項 13】

ハブテンがアゾールであり、ハブテンコンジュゲートが次の一般式

40



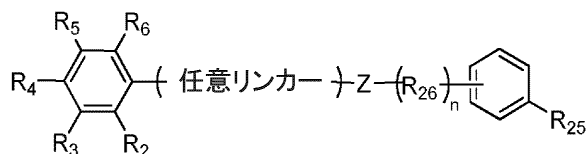
を有し、ここで、 $R_1 - R_3$  が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、及びその組合せから選択さ

50

れ、Xが独立して窒素又は炭素であり、Yが酸素、硫黄又は窒素であり、もしYが酸素又は硫黄である場合はR<sub>3</sub>基はなく、もしYが窒素である場合は少なくとも1つのR<sub>3</sub>基が存在する請求項1-8の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項14】

ハブテンがニトロアリアルであり、ハブテンコンジュゲートが次の一般式

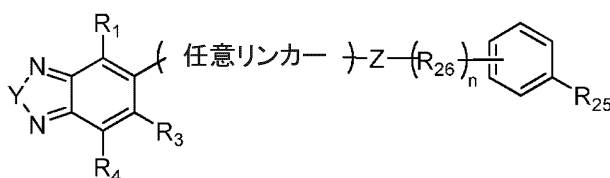


10

を有し、ここで、少なくとも1つのR<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>がニトロであり、残りのR<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>環置換基が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリアル、アルキルアリアル、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環、シアノ、エステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリアル、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレンから選択されるか、2以上のR<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>置換基が環系における原子である請求項1-8の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項15】

ハブテンがベンゾフランであり、ハブテンコンジュゲートが次の一般式



20

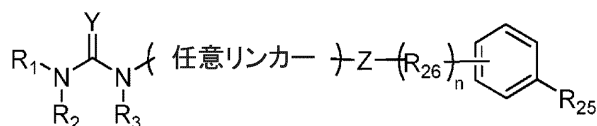
を有し、ここで、R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、及びR<sub>4</sub>が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリアル、アルキルアリアル、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリアル、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、及びその組合せから選択されるか、又は2以上のR<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、及びR<sub>4</sub>置換基が、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子であり、Yが、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>置換基を有する酸素、硫黄又は炭素原子であり、ここでR<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>はR<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、及びR<sub>4</sub>について記載した通りである請求項1-8の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

30

【請求項16】

ハブテンが尿素か、又はローダミンチオ尿素以外のチオ尿素であり、ハブテンコンジュゲートが次の一般式

40

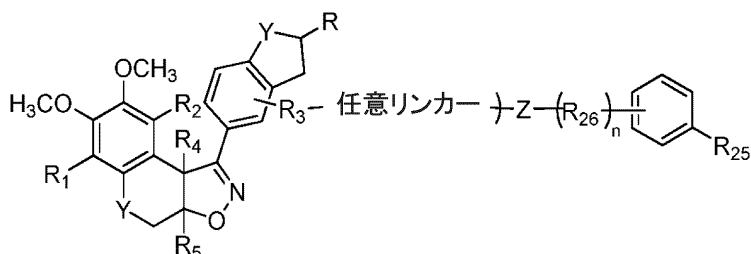


を有し、ここでR<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>が独立して水素、脂肪族、アルキル、環式、複素環、アリアル及びヘテロアリアルであり、Yが酸素又は硫黄である請求項1-8の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項17】

ハブテンがロテノイドであり、ハブテンコンジュゲートが次の一般式

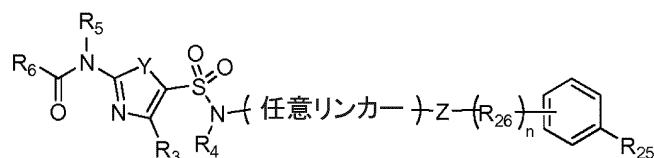
50



を有し、ここで、 $R - R_5$  が独立して水素、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アミノ、アミノ酸、アミド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム、オキシムエーテル、アルキルヒドロキシル、カルボニル、ケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、カルボキシル、カルボキシレート、エステル、アルキルエステル、アシル、エキソメチレン、エーテル、環式、複素環、アリール、アルキルアリール、ヘテロアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、及びその組合せであり、 $Y$  が酸素、窒素、又は硫黄である請求項 1 - 8 の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

【請求項 18】

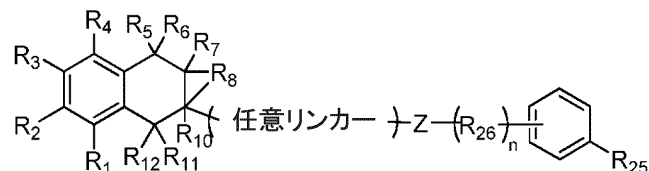
ハプテンがオキサゾール又はチアゾールスルホンアミドであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式



を有し、ここで、 $R_3 - R_6$  が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、及びその組合せから選択され、 $Y$  が酸素又は硫黄である請求項 1 - 8 の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

【請求項 19】

ハプテンがシクロリグナンであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式



を有し、ここで、 $R_1 - R_8$  及び  $R_{10} - R_{12}$  が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、シアノ、エステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホキシド、及びその組合せから選択されるか、又はそのような化合物の形成に利用可能な 2 以上の  $R_1 - R_8$  及び  $R_{10} - R_{12}$  置換基が、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子であってもよい請求項 1 - 8 の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

10

20

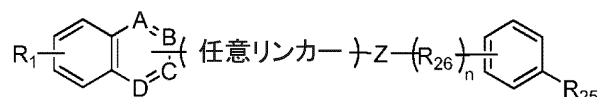
30

40

50

## 【請求項 20】

ハプテンがヘテロビアリールであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式

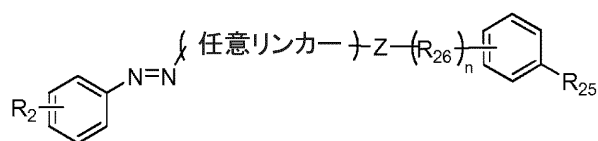


を有し、ここで、A - Dが炭素、窒素、酸素、及び硫黄、及びそのすべての組合せから選択され、R<sub>1</sub>が水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテルアルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、アルコキシアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート環式、複素環、シアノ(-CN)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム(HO-N=)、ケト、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、又はエキソメチレンである請求項1 - 8の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

10

## 【請求項 21】

ハプテンがアゾアリールであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式

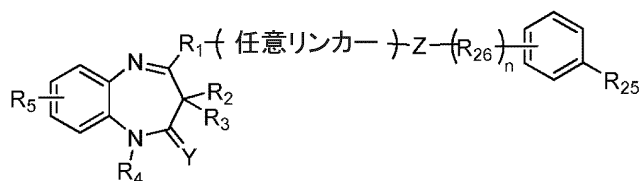


を有し、ここで、R<sub>1</sub>が水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート環式、複素環、シアノ(-CN)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム(HO-N=)、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、又はスルホキシドである請求項1 - 8の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

20

## 【請求項 22】

ハプテンがベンゾジアゼピンであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式

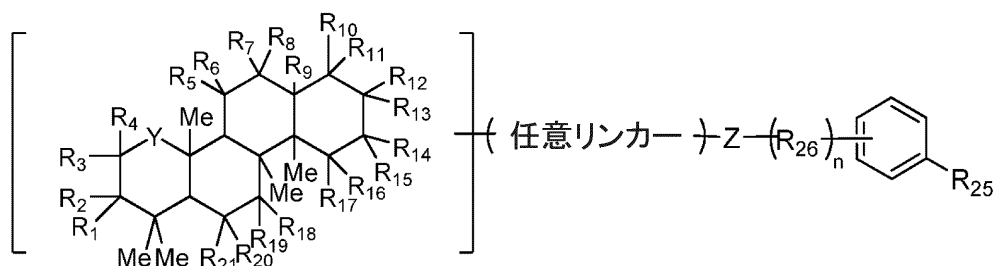


有し、ここで、R<sub>1</sub> - R<sub>5</sub>が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート環式、複素環、シアノ(-CN)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム(HO-N=)、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、又は図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子から選択され、Yが酸素又は硫黄である請求項1 - 8の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

40

## 【請求項 23】

ハプテンがトリテルペンであり、ハプテンコンジュゲートが次の一般式



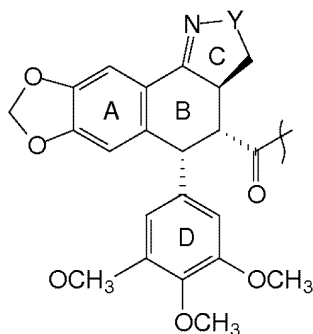
を有し、ここで、 $R_1 - R_{20}$ が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、ハロゲン化アルキル、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート、環式、複素環、シアノ、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレンから選択され、2以上 $R_1 - R_{20}$ 置換基が、図示した一般式を有するハプテンに結合又は縮合されている環系における原子であってもよく、ここで、少なくとも1つの $R_1 - R_{20}$ 置換基が任意リンカー又はチラミド及び/又はチラミド誘導体に結合され、Yが結合であってそれによって5員の環を定めるか、又は $R_{21}$ 及び $R_{22}$ 置換基を有する炭素原子であり、ここで $R_{21}$ 及び $R_{22}$ は $R_1 - R_{20}$ について述べた通りである請求項1 - 8の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

10

20

【請求項24】

ハプテンが、式



30

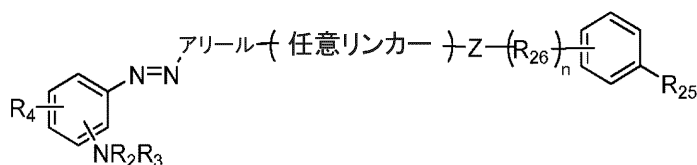
を有するシクロリグナンであり、ここで、Yが窒素、酸素又は硫黄である請求項1 - 8の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲート。

【請求項25】

Yが酸素である請求項24に記載のハプテンコンジュゲート。

【請求項26】

ハプテンコンジュゲートが、次の式



40

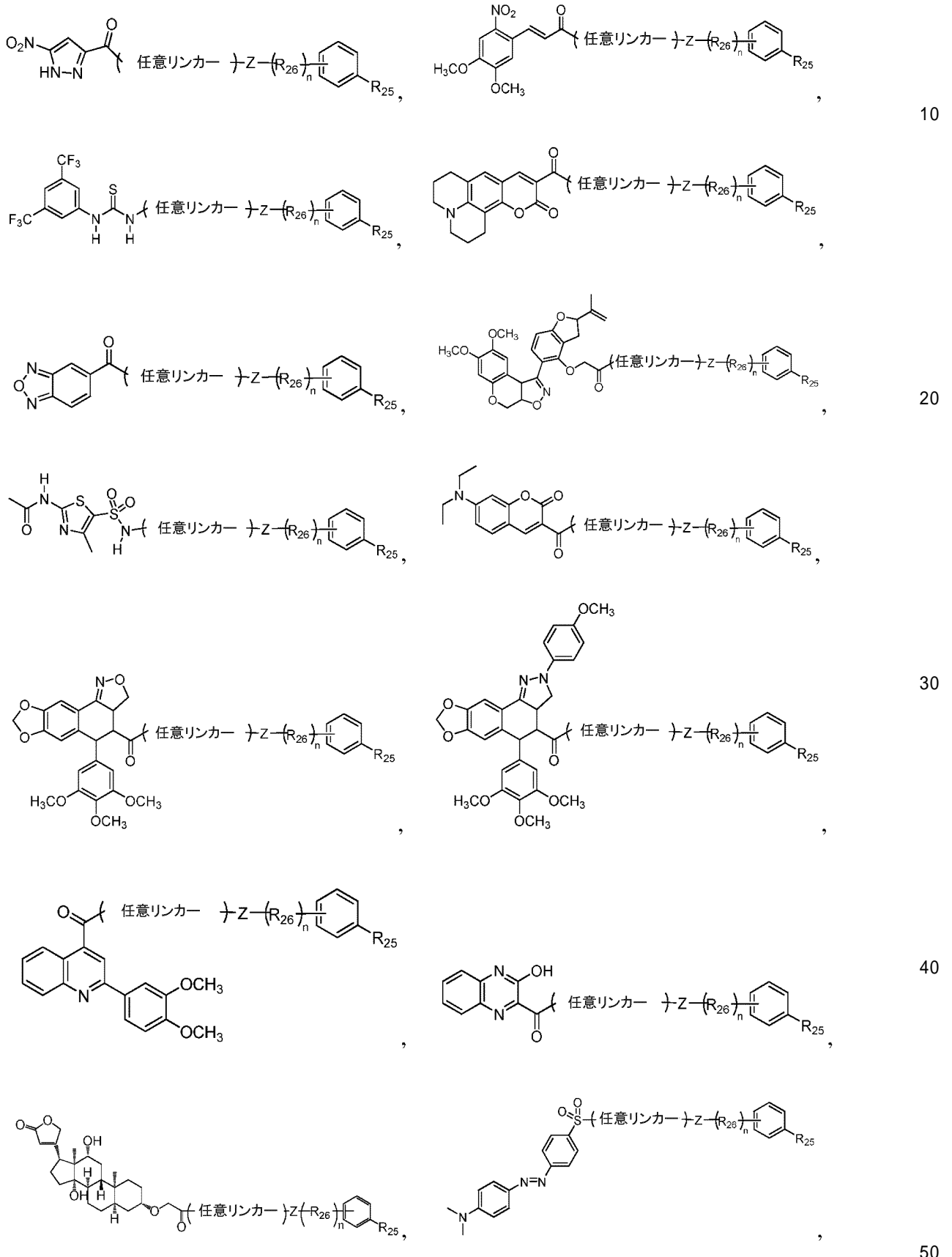
ここで、 $R_1 - R_4$ が独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、ヘテロ脂肪族、オキシム、オキシムエーテル、アルコール、アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、炭水化物、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート環式、複素環、シアノ(-CN)、エステル、アルキルエステル、エーテル、ハロゲン、ヘテロアリール、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシ

50

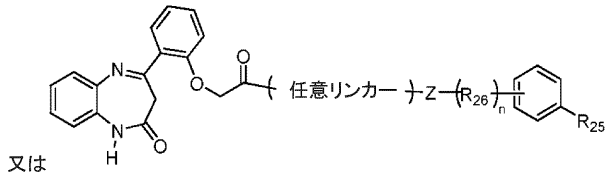
△(HO-N=)、ケト、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシドから選択されるか、又は図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子である請求項1-8の何れか一項に記載のハブテンコンジュゲート。

【請求項27】

請求項1に記載のハブテンコンジュゲートであって、



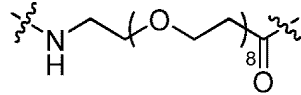




から選択される式を有するハプテンコンジュゲート。

【請求項 28】

リンカーが、次の化学構造

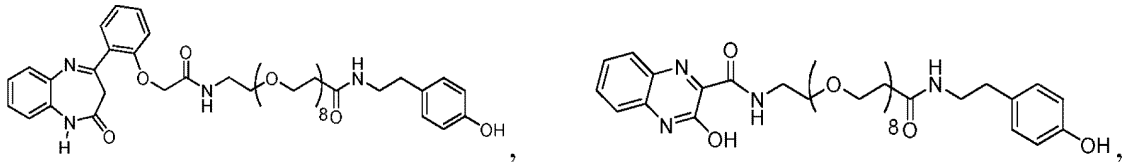


10

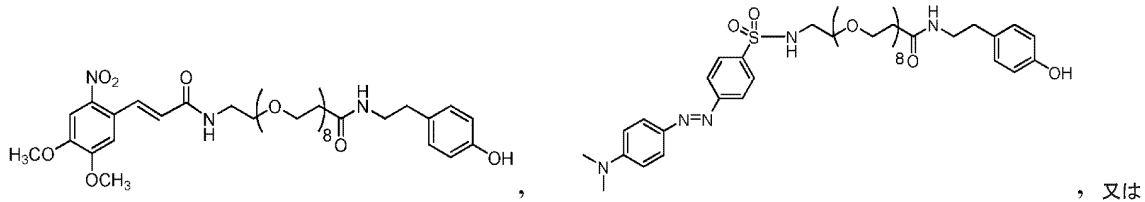
を有する請求項 27 に記載のハプテンコンジュゲート。

【請求項 29】

請求項 1 に記載のハプテンコンジュゲートであって、

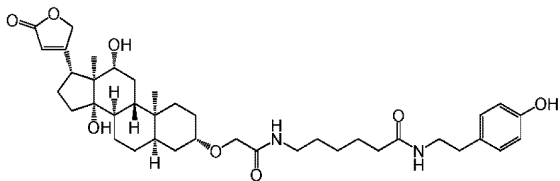


20



、又は

30



から選択される式を有するハプテンコンジュゲート。

【請求項 30】

請求項 1 - 29 の何れか一項に記載のハプテンコンジュゲートを含んでなるキット。

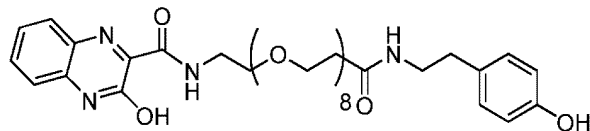
【請求項 31】

過氧化物溶液を更に含んでなる請求項 30 に記載のキット。

40

【請求項 32】

ハプテンコンジュゲートが、



である請求項 30 又は請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】

(a) サンプル中における第一標的上に第一ペルオキシダーゼを固定化させる工程であ

50

って、ここで、第一ペルオキシダーゼがペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分と反応できる工程；

(b) サンプルを、請求項 1 - 29 の何れか一項に記載の第一ハプテンコンジュゲートを含んでなる溶液と接触させる工程；

(c) サンプルを、過酸化物を含んでなる溶液と接触させ、それによって第一ハプテンコンジュゲートを第一ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応させ、固定化第一ペルオキシダーゼ又は固定化第一ペルオキシダーゼの近位に共有結合を形成する工程；及び

(d) 第一ハプテンを検出することによって、サンプル中において第一標的を位置付ける工程

を含んでなる方法。

10

【請求項 34】

ペルオキシダーゼが西洋ワサビペルオキシダーゼである請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ペルオキシダーゼが、標的を認識し結合できる部分にコンジュゲートされている請求項 33 又は請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

部分が、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド又はアミノ酸である請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

部分が抗体である請求項 35 に記載の方法。

20

【請求項 38】

ペルオキシダーゼが、標的に位置する一次抗体を認識し結合できる部分にコンジュゲートされている請求項 33 又は請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

第一標的が核酸配列を含み、第一標的上に第一ペルオキシダーゼを固定化する工程が；サンプル上に第一ハプテン標識されたプローブを固定化する工程であって、第一ハプテン標識されたプローブが DNA、RNA、ロックド核酸オリゴマー、又はオリゴヌクレオチドを含み、第一ハプテン標識されたプローブが第一標的を認識し結合できる工程；及びサンプルを、第一ハプテン標識されたプローブに直接的又は間接的に結合できる第一抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程

30

を含む請求項 33 又は請求項 34 に記載の方法。

【請求項 40】

第一抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートが、第一ハプテン標識されたプローブを認識し結合できる第一抗ハプテン抗体を含む請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

サンプルを、第一抗ハプテン抗体を認識し結合できる第一抗体を含んでなる第一抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程の前に、サンプルを、第一ハプテン標識されたプローブを認識し結合できる第一抗ハプテン抗体と接触させる工程を更に含んでなる請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

第一ハプテンコンジュゲートの第一ハプテンを検出する工程が；サンプルを、第一ハプテンコンジュゲートの第一ハプテンを認識し結合できる第一抗ハプテン抗体、及び第一検出可能標識と接触させる工程；及び第一検出可能標識を検出する工程を更に含む

40

請求項 33 - 41 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 43】

サンプルを、第一抗ハプテン抗体及び第一検出可能標識と接触させる工程が、サンプルを、第一抗ハプテン抗体コンジュゲートと接触させる工程を含み、第一抗ハプテン抗体コンジュゲートが第一抗ハプテン抗体及び第一検出可能標識を含む請求項 42 に記載の方法

50

。

## 【請求項 4 4】

サンプルを、第一抗ハプテン抗体及び第一検出可能標識と接触させる工程が：  
 サンプルを第一抗ハプテン抗体と接触させる工程；及び  
 サンプルを第一抗体コンジュゲートと接触させる工程であり、第一抗体コンジュゲートが、  
 第一抗ハプテン抗体及び第一検出可能標識を認識し結合できる抗体を含む工程  
 を含む請求項 4 2 に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

第一検出可能標識が酵素である請求項 4 2 - 4 4 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼである請求項 4 5 に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

第一検出可能標識が蛍光標識である請求項 4 2 - 4 4 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

蛍光標識が量子ドットである請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 9】

第一標的が、*in situ*ハイブリダイゼーション、明視野顕微鏡、蛍光、又はその  
 任意の組合せによって位置づけされる請求項 3 3 - 4 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 5 0】

請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載の方法であって、サンプルが 2 つ以上の標的を含み、  
 該方法が、  
 工程 (c) の後に、サンプル中における後続標的上に後続ペルオキシダーゼを固定化する  
 工程であり、後続ペルオキシダーゼがペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分と反応  
 できる工程；  
 サンプルを、請求項 1 - 2 4 の何れか一項に記載の後続ハプテンコンジュゲートを含んで  
 なる溶液と接触させる工程であり、後続ハプテンコンジュゲートが第一ハプテン又は何れ  
 か他の後続ハプテンと同じでない後続ハプテンを含む工程；  
 サンプルを、過酸化物を含んでなる溶液と接触させ、それによって、後続ハプテンコンジ  
 ュゲートを後続ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応させ、固定化後続ペルオキシダーゼ  
 又は固定化後続ペルオキシダーゼの近位に共有結合を形成させる工程；及び  
 第一及び後続ハプテンを検出することによってサンプル中における 2 つ以上の標的を位置  
 づける工程  
 を更に含んでなる方法。

## 【請求項 5 1】

後続ペルオキシダーゼを固定化する工程の前に、第一ペルオキシダーゼを不活性化させ  
 る工程を更に含んでなる請求項 5 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

請求項 3 3 又は請求項 3 4 に記載の方法であって、ここで、サンプルが 2 つ以上の標的を  
 含み、各標的が核酸配列を含んでなり、方法が：

工程 (a) の前に、サンプル上に、DNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドを含んでな  
 る第一プローブを固定化する工程であって、ここで、第一プローブは第一ハプテンで標識  
 されており、第一標的を認識し結合でき、ここで、第一ハプテンは、オキサゾール、ピラ  
 ゴール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、ローダミンチオ尿素以外の  
 チオ尿素、ジニトロフェニル又はトリニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド  
 、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、又は 7 - ジエ  
 チルアミノ - 3 - カルボキシクマリンから選択される工程；

工程 (a) の前に、サンプル上に DNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドを含んでなる  
 後続プローブを固定化する工程であって、ここで、後続プローブは後続ハプテンで標識さ  
 れており、後続標的を認識し結合でき、ここで、後続ハプテンは、第一ハプテン又は何れ

10

20

30

40

50

か他の後続ハプテンと同じではなく、またここで、後続ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、ローダミンチオ尿素以外のチオ尿素、ジニトロフェニル又はトリニトロフェニル以外のニトロアリアル、ロテノイド、シクロリグナン、ヘテロピアリアル、アゾアリアル、ベンゾジアゼピン、又は7-ジエチルアミノ-3-カルボキシクマリンから選択される工程；

ここで、工程(a)における第一ペルオキシダーゼを固定化する工程は、サンプルを、第一抗ハプテン抗体及び第一ペルオキシダーゼを含んでなる第一抗ハプテン抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程を含み、ここで、第一抗ハプテン抗体は第一ハプテンを認識し結合でき、またここで、第一ペルオキシダーゼはペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分と反応できる；

工程(c)の後に、サンプルを、後続抗ハプテン抗体及び後続ペルオキシダーゼを含んでなる後続抗ハプテン抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触される工程であって、ここで、後続抗ハプテン抗体は後続ハプテンを認識し結合でき、またここで、後続ペルオキシダーゼはペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分と反応できる工程；

サンプルを、請求項1-29の何れか一項に記載の後続ハプテンコンジュゲートを含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、後続ハプテンコンジュゲートは、第一ハプテン又は何れか他の後続ハプテンと同じではない後続ハプテンを含む工程；

サンプルを過酸化物を含んでなる溶液と接触される工程であって、それによって、後続ハプテンコンジュゲートは後続ペルオキシダーゼ及び過酸化物と反応し、固定化後続ペルオキシダーゼに、又は固定化後続ペルオキシダーゼの近位に共有結合を形成する工程；及び

第一及び後続ハプテンを検出することによって、サンプル中における2つ以上の標的を位置付けする工程

を更に含んでなる方法。

【請求項53】  
請求項52に記載の方法であって、サンプル中における2つ以上の標的を位置付けする工程が、

サンプルを、第一抗ハプテン抗体-量子ドットコンジュゲート及び後続抗ハプテン抗体-量子ドットコンジュゲートを含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、第一抗ハプテン抗体-量子ドットコンジュゲートは、第一ハプテン-チラミドコンジュゲートの第一ハプテン及び第一量子ドットを認識し結合できる第一抗体を含み、後続抗ハプテン抗体-量子ドットコンジュゲートは、後続ハプテン-チラミドコンジュゲートの後続ハプテン及び後続量子ドットを認識し結合できる後続抗体を含み、ここで後続量子ドットは、第一量子ドット又は何れか他の後続量子ドットと同じではない工程；及び

第一及び後続量子ドットから蛍光を検出する工程

を更に含む方法。

【請求項54】

サンプルを後続抗ハプテン抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程の前に、第一抗ハプテン抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートを不活化する工程を更に含んでなる請求項52又は請求項53に記載の方法。

【請求項55】

サンプルが乳癌を有すると疑われる被験体から得られ、第一プローブ又は後続プローブの少なくとも一つが、HER2 mRNA、ER mRNA、Ki-67 mRNA、又はPGR mRNAにハイブリダイズできるアンチセンスRNAプローブである請求項52-54の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

この出願は、2010年7月2日に提出された米国仮出願第61/398,946号、及び2011年2月28日に提出された米国仮出願第61/464,216号の優先件を

10

20

30

40

50

主張するものであって、その全体をここに援用する。

【0002】

(発明の分野)

本開示は、サンプル中における標的の同時の同定及び/又は可視化について、様々な組合せにおいて使用できるハプテン及びハプテンコンジュゲートに関する。

【0003】

(発明の分野)

免疫組織化学、又はIHCは、組織サンプルの細胞中におけるタンパク質等の抗原を位置付け、抗原を使用し、特定抗原への抗体の特異的結合を促進する方法を示す。この検出技術は、任意のタンパク質が組織サンプル内のどこに位置するかを正確に示すことができる利点を有する。組織自体を調べるのにも有効な方法である。

10

【0004】

組織抗原及び核酸を検出するためのハプテン等の小分子の使用は、IHCにおける卓越した方法となった。ハプテンは、抗ハプテン抗体との組合せにおいて、特定の分子標的を検出するのに有用である。例えば、一次抗体及び核酸プローブ等の特異的結合部分は、一又は複数のハプテン分子で標識でき、一旦これらの特異的結合部分がそれらの分子標的に結合したら、それらは、発色ベース検出システムの一部として酵素、又は蛍光標識等の検出可能な標識を含む抗ハプテン抗体コンジュゲートを使用して検出できる。サンプルへの検出可能な抗ハプテン抗体コンジュゲートの結合は、サンプル中における標的の存在を示す。

20

【0005】

二次代謝産物としてジギタリス植物に専ら存在するジゴキシゲニン、様々な分子アッセイにおいて利用されているハプテンの例である。米国特許第4,469,797号は、試験サンプルにおける薬剤への抗ジゴキシシン抗体の特異的結合に基づき、血液サンプルにおけるジゴキシシン濃度を決定するためにイムノアッセイを使用することを開示する。米国特許第5,198,537号は、イムノアッセイ等の免疫学的検査において使用されている多くの更なるジゴキシゲニン誘導体を記載する。

【0006】

組織及び細胞学的サンプルの*in situ*アッセイ、例えば免疫組織化学(IHC)アッセイ及び*in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)アッセイ、特にかかるサンプルのマルチプレックスアッセイでは、バックグラウンド干渉無く所望の結果を提供する方法を特定及び開発することが高く所望される。一つのこのような方法は、特許である触媒レポーター堆積(CARD)に基づく、チラミドシグナル増幅(TSA)の使用を含む。米国特許第6,593,100号は、CARD又はチラミドシグナル増幅(TSA)方法における酵素の触媒作用を、標識フェノールコンジュゲートを酵素と反応させることによって増強させることを開示し、ここで、反応は、増強試薬の存在中において実施される。

30

【0007】

方法は、ハプテンを使用するアッセイから得られるシグナルを増加するために用いられるが、これらの方法からの結果は、シグナル増幅が、対応するバックグラウンドシグナル増幅によって損なわれることを示す。バックグラウンドシグナルにおける対応する増加無く、最適な結果を生成できるシグナル増幅への需要がある。

40

【発明の概要】

【0008】

ハプテンコンジュゲートの実施態様が開示される。幾つかの実施態様では、コンジュゲートはハプテン、任意リンカー、及びペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分を含む。ある実施態様では、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分はチラミン又はチラミン誘導体である。また開示されるのは、ハプテンコンジュゲートの製造及び使用方法の実施態様である。

【0009】

50

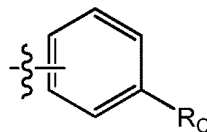
幾つかの実施態様では、ハプテンは、アゾール（例えば、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール）、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、ローダミンチオ尿素以外のチオ尿素、ジニトロフェニル又はトリニトロフェニル以外のニトロアリール、ロテノイド、シクロリグナン、ヘテロピアリール、アゾアリール、ベンゾジアゼピン、又はクマリン（例えば、2,3,6,7-テトラヒドロ-11-オキソ-1H,5H,11H-[1]ベンゾピラノ[6,7,8-ij]キノリジン-10-カルボン酸又は7-ジエチルアミノ-3-カルボキシクマリン）から選択される。ハプテンは、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分、例えばチラミン又はチラミン誘導体に直接カップリングされうる。あるいは、ハプテンは、チラミン又はチラミン誘導体にリンカーを介してカップリングされうる。よって、ある実施態様では、コンジュゲートは、下に示す一般式を有する。

10

ハプテン-任意リンカー-チラミン/チラミン誘導体

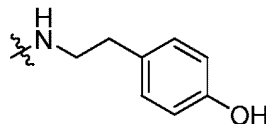
【0010】

開示のハプテンコンジュゲートの実施態様は、ペルオキシダーゼ酵素及び過酸化物と組み合わせられた時にフリーラジカルを形成し、その後、フェノール含有化合物、例えばチロシンと二量体を形成できるペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分を含む。ペルオキシダーゼ-活性化可能部分は一般式



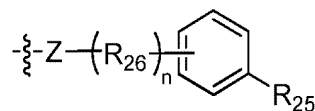
20

を有し、ここで、 $R_C$  は、ペルオキシダーゼ酵素及び過酸化物と組み合わせられた時に、フリーラジカルを形成できる官能基である。適切な官能基は、ヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミン基を含む。幾つかの実施態様では、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分はチラミン



30

又は次の一般式を有するチラミン誘導体であり、

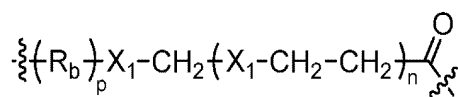


40

ここで、 $R_{25}$  はヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミンから選択され； $R_{26}$  はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、 $-OR_m$ 、 $-NR_m$ 、及び $-SR_m$ から選択され、ここで、 $m$ は1-20であり； $n$ は1-20であり； $Z$ は酸素、硫黄、又は $NR_a$ から選択され、ここで $R_a$ は水素、脂肪族、アリール、又はアルキルアリールから選択される。

【0011】

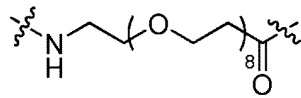
開示のハプテンコンジュゲートの特定の実施態様は、一般式を有するリンカーを含み



ここで、各 $X_1$ は独立して、 $-CH_2$ 、酸素、硫黄、及び $-NR$ から選択され、ここで、 $R_3$ は水素、脂肪族、アリール、及びアリールアルキルから選択され； $R_b$ はカルボニル及びスルホキシルから選択され； $n$ は1-20であり； $p$ は0又は1である。ある実施態様では、リンカーは、式 $PEG_n$ を有するポリエチレングリコールであって、ここで $n$ は1

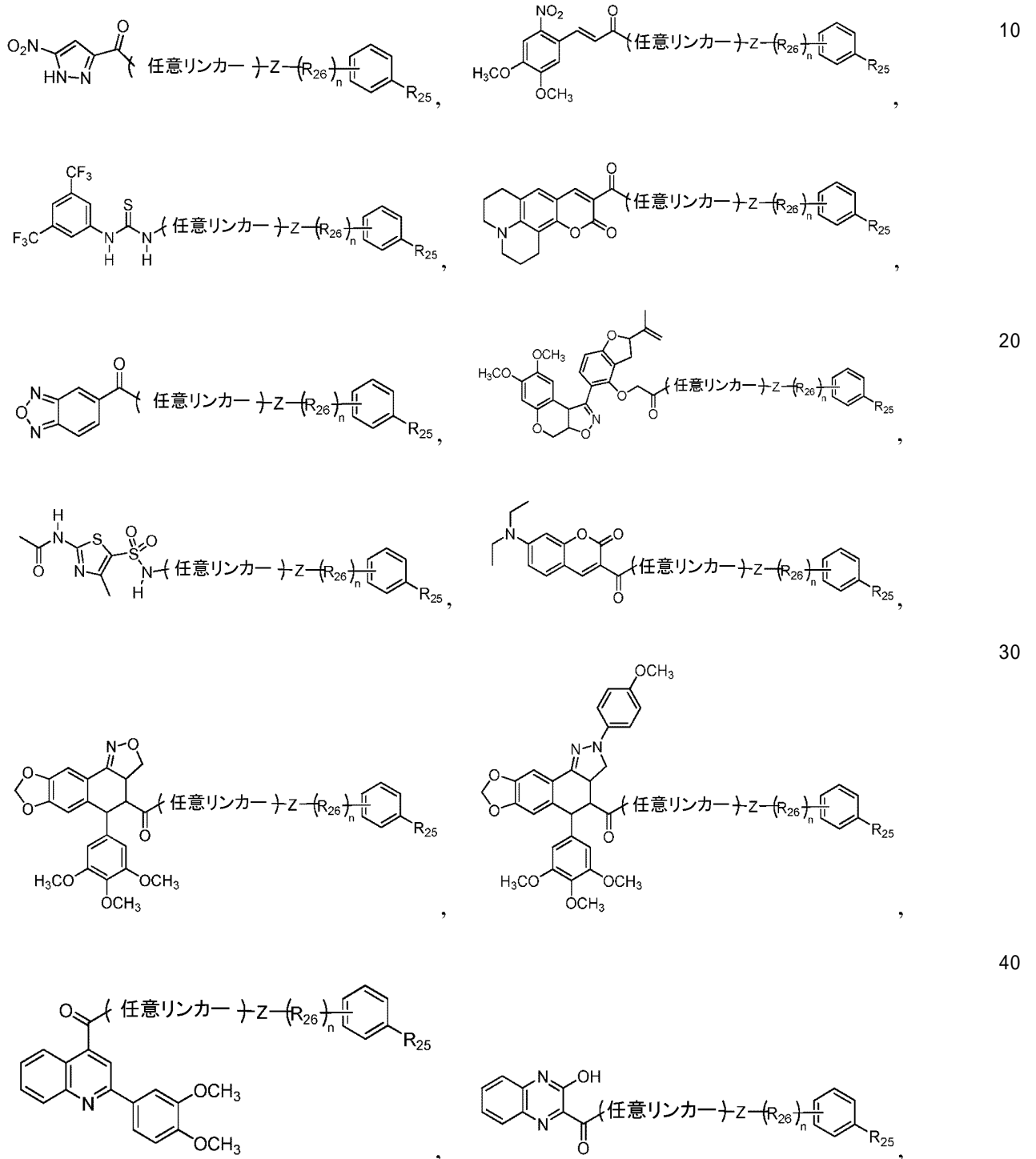
50

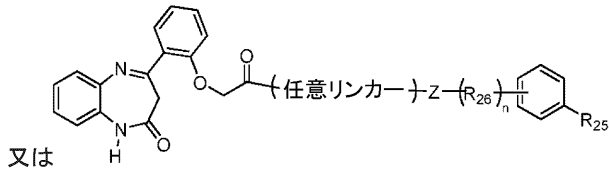
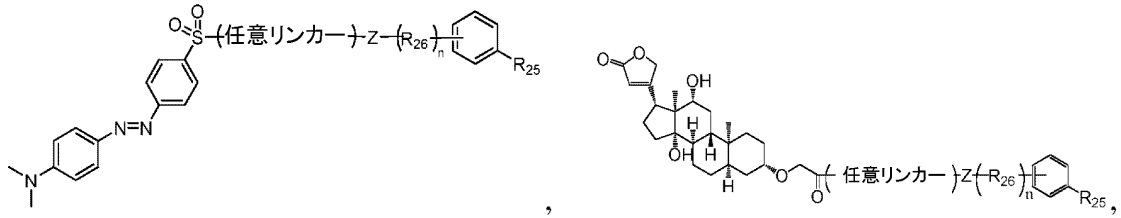
- 50であり、例えば4又は8である。特定の実施態様では、リンカーは次の化学構造を有する。



【0012】

幾つかの実施態様では、ハブテンコンジュゲートは：



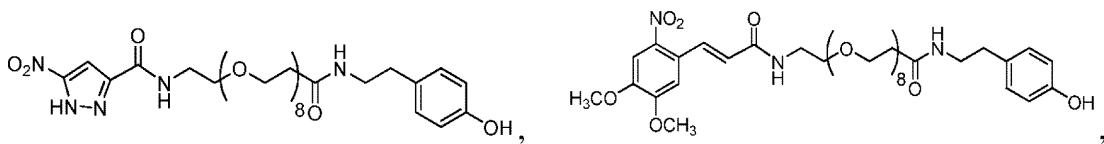


10

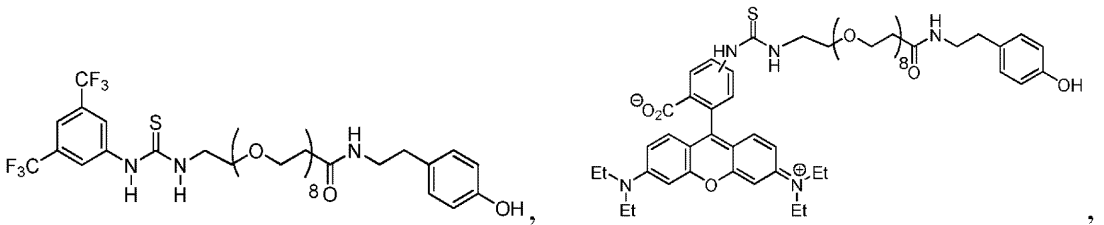
から選択される式を有するハプテン-チラミドコンジュゲートである。

【0013】

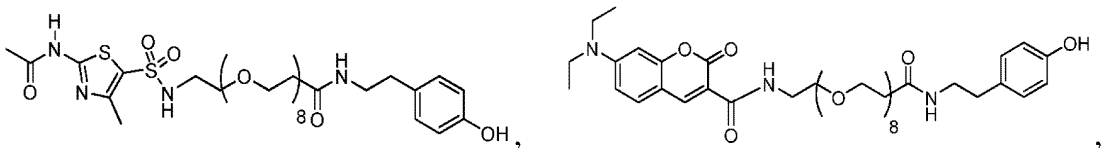
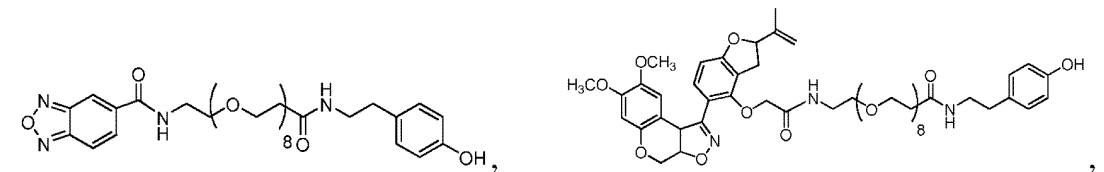
例示的なハプテン-チラミドコンジュゲート：



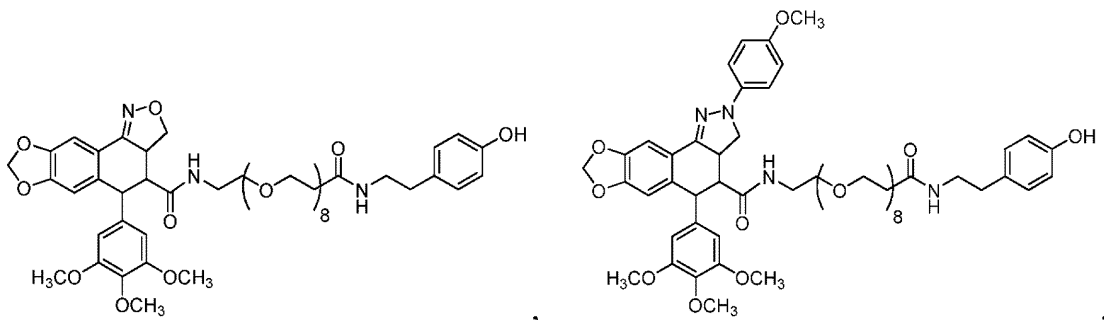
20



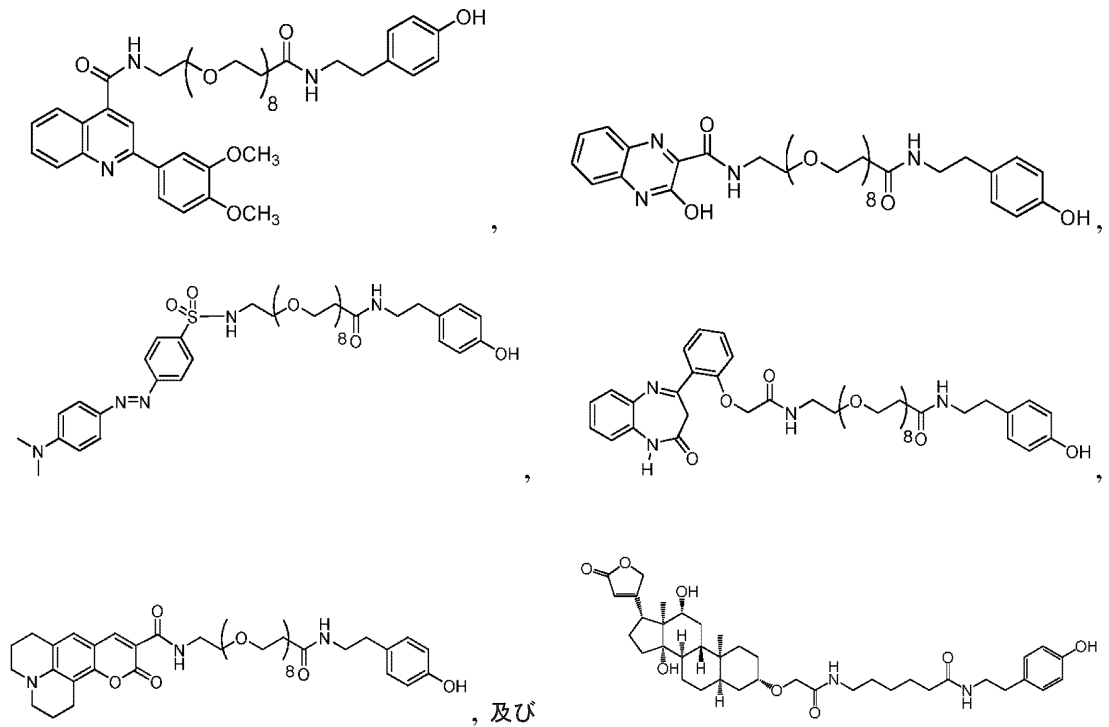
30



40







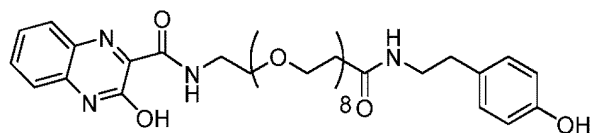
10

20

を含む。

【0014】

上記のハプテンコンジュゲートを含むキットの実施態様も開示される。幾つかの実施態様では、ハプテンコンジュゲートはハプテン-チラミドコンジュゲートである。ある実施態様では、キットは、過酸化剤溶液、例えば過酸化水素溶液を更に含む。特定の実施態様では、キットは、式：



30

を有するハプテン-チラミドコンジュゲートを含む。

【0015】

ハプテンコンジュゲートを使用する方法の実施態様が開示される。一般的に、方法は、a) サンプル中における標的上にペルオキシダーゼを固定化する工程であって、ここで、ペルオキシダーゼはペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分、例えばチラミン又はチラミン誘導体と反応できる工程、b) サンプルを、ハプテンコンジュゲートを含んでなる溶液と接触される工程であって、ここで、ハプテンコンジュゲートは、上記のペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分に結合されたハプテンを含む工程、及びc) サンプルを、過酸化剤を含んでなる溶液と接触させる工程であって、それによってハプテンコンジュゲートがペルオキシダーゼ及び過酸化剤と反応し、固定化ペルオキシダーゼに、又は固定化ペルオキシダーゼの近位に共有結合を形成する工程；及びd) ハプテンを検出することによって、サンプル中における標的を位置付ける工程を含む。

40

【0016】

幾つかの実施態様では、ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼである。ある実施態様では、ペルオキシダーゼは、標的に直接的又は間接的に結合できる、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、又はアミノ酸等の部分にコンジュゲートされる。

【0017】

幾つかの実施態様では、標的は核酸配列を含み、ペルオキシダーゼは、ハプテン標識され

50

たプローブをサンプル上に固定化する工程であって、ここでプローブは標的を認識し結合でき、DNA、RNA、ロックド核酸オリゴマー、又はオリゴヌクレオチドを含む工程；及びサンプルを、抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程によって、標的に固定化される。ある実施態様では、抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートは、ハプテン標識されたプローブを認識し結合できる抗ハプテン抗体を含む。他の実施態様では、サンプルを、抗ハプテン抗体を認識し結合できる抗体を含む抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触される前に、サンプルを、ハプテン標識されたプローブを認識し結合できる抗ハプテン抗体と接触させる。

【0018】

標的は、ハプテンが、何れかの適切な手段によって直接的又は間接的に（例えば、検出可能な標識によって）検出される時、サンプル中において位置付けされうる。幾つかの実施態様では、標的は、明視野顕微鏡、蛍光顕微鏡又は分光法、デジタル画像分析、又はその任意の組合せによって位置付けされる。

10

【0019】

幾つかの実施態様では、ハプテンは直接的に検出される。例えば、ハプテンが量子ドットにコンジュゲートされている場合、量子ドットは、特性波長でのその蛍光によって検出されうる。他の実施態様では、ハプテンの検出は、サンプルを、抗ハプテン抗体及び検出可能な標識と接触させる工程、及び標識を検出する工程を含む。ある実施態様では、検出可能な標識は抗ハプテン抗体にコンジュゲートされ、抗ハプテン抗体-標識コンジュゲートを形成し、コンジュゲートはハプテンに結合する。他の実施態様では、サンプルを、ハプテンに結合する抗ハプテン抗体と接触させる。次いで、サンプルを、抗ハプテン抗体に結合できる抗体コンジュゲートと接触させ、ここで、抗体コンジュゲートは、検出可能な標識又は検出可能な標識システムの要素を含む。ある実施態様では、検出可能な標識システムの要素は、酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼであり、発色性基質又は基質/色原体複合体と反応し、それによって検出可能な発色性析出を生成する。他の実施態様では、標識は蛍光標識、例えば量子ドットである。

20

【0020】

幾つかの実施態様では、方法は、サンプル中における2つ以上の標的を検出するのに適切である。一般的に、方法は、a) 2つ以上の標的を含んでなるサンプルを提供する工程；b) サンプル中における第一標的に第一ペルオキシダーゼを固定化する工程；c) サンプルを、第一ハプテンコンジュゲートを含んでなる溶液、及び過酸化物を含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、第一ハプテンコンジュゲートはペルオキシダーゼ-活性化可能アール部分に結合されている第一ハプテンを含む工程；d) サンプル中において後続標的に後続ペルオキシダーゼを固定化する工程；e) サンプルを、後続ハプテンコンジュゲートを含んでなる溶液、及び過酸化物を含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、後続ハプテンコンジュゲートは、ペルオキシダーゼ-活性化可能アール部分に結合された後続ハプテンを含み、ここで、後続ハプテンは第一ハプテン又は何れかの他の後続ハプテンと同じではない工程；及びf) 第一及び後続ハプテンを検出することによってサンプル中における2つ以上の標的を位置付けする工程を含む。幾つかの実施態様では、第一ペルオキシダーゼは、後続標的に後続ペルオキシダーゼを固定化する前に不活性化される。ある実施態様では、第一ハプテンコンジュゲート及び後続ハプテンコンジュゲートはハプテン-チラミドコンジュゲートである。

30

40

【0021】

幾つかの実施態様では、方法は、サンプル中における2以上の核酸配列標的を検出するのに適切である。一般的に、方法は、a) 2以上の核酸配列標的を含んでなるサンプルを提供する工程；b) サンプル上にDNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドを含んでなる第一プローブを固定化する工程であって、ここで、第一プローブは第一ハプテンで標識されており、第一標的を認識し結合できる工程；c) サンプル上にDNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドを含んでなる後続プローブを固定化する工程であって、ここで、後続プローブは、後続ハプテンで標識されており、後続標的を認識し結合でき、ここで、後続ハ

50

ブテンは第一ハブテン又は何れか他の後続ハブテンと同じではない工程；d) サンプルを、第一抗ハブテン抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程であって、ここで、第一抗ハブテン抗体は、第一ハブテンを認識し結合できる工程；e) サンプルを、第一ハブテンコンジュゲートを含んでなる溶液、及び過酸化物を含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、第一ハブテンチラミドコンジュゲートは、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分に結合された第一ハブテンを含む工程；f) サンプルを、後続抗ハブテン抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートと接触させる工程であって、ここで、後続抗ハブテン抗体は、後続ハブテンに結合し認識できる工程；g) サンプルを、後続ハブテンコンジュゲートを含んでなる溶液、及び過酸化物を含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、後続ハブテンチラミドコンジュゲートは、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリアル部分に結合された後続ハブテンを含む工程；及びh) 第一及び後続ハブテンを検出することによってサンプル中における2つ以上の標的を位置付けする工程を含む。幾つかの実施態様では、第一抗ハブテン抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲートは、サンプルを後続抗ハブテン - 抗体コンジュゲートと接触させる前に、不活性化される。ある実施態様では、第一ハブテンコンジュゲート及び後続ハブテンコンジュゲートはハブテン - チラミドコンジュゲートである。

#### 【0022】

幾つかの実施態様では、サンプル中における2つ以上の標的を位置付ける工程は、サンプルを、第一ハブテン及び第一量子ドットを認識し結合できる第一抗体を含んでなる第一抗ハブテン抗体 - 量子ドットコンジュゲート、及び後続ハブテン及び後続量子ドットを認識し結合できる後続抗体を含んでなる後続抗ハブテン抗体 - 量子ドットコンジュゲートを含んでなる溶液と接触させる工程であって、ここで、後続量子ドットは第一量子ドット又は何れか他の後続量子ドットではない工程、及び第一及び後続量子ドットからの蛍光を検出する工程を更に含む。

#### 【0023】

特定の実施態様では、サンプルは、乳癌を有すると疑われる被験体から得られ、少なくとも1つの第一プローブ又は後続プローブは、HER2 mRNA, ER mRNA, Ki67 mRNA、又は PGR mRNA にハイブリダイズできるアンチセンスRNAプローブである。

#### 【0024】

発明の前述の及び他の目的、特徴、及び利点は、添付の図面の参照と共に進行する以下の詳細な説明からより明瞭となるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0025】

【図1】図1はハブテン-チラミドコンジュゲートを使用する方法の一実施態様の概要図である。

【図2】図2はハブテン-チラミドコンジュゲートからのシグナルを増幅する方法の一実施態様の概要図である。

【図3】図3Aはハブテン-チラミドコンジュゲートを使用する方法の一実施態様の概要図である。図3Bはハブテン-チラミドコンジュゲートを使用する方法の他の実施態様の概要図である。

【図4】図4はマルチプレックスアッセイにおける、ハブテン-チラミドコンジュゲートを使用する方法の実施態様の概要図である。

【図5】図5A及び5Bは共に、マルチプレックスmRNA-ISHアッセイにおける、ハブテン-チラミドコンジュゲートを使用する方法の一実施態様の概要図である。

【図6】図6は、0.75 mMのスズ酸ナトリウム、40 mMのホウ酸、10 mMの四ホウ酸ナトリウム十水和物、及び30 mMの塩化ナトリウム(チラミド増幅希釈剤)中に5.5 μMに希釈されたBD-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図7】図7は、チラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたBD-チラミドコンジュ

ゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 8】図 8 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された B F -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 9】図 9 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された B F -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 10】図 10 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された D A B S Y L -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

10

【図 11】図 11 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された D A B S Y L -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 12】図 12 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された D C C -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 13】図 13 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された D C C -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

20

【図 14】図 14 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された D I G -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 15】図 15 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された D I G -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 16】図 16 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された D N P -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 17】図 17 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された D N P -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

30

【図 18】図 18 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された F I T C -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 19】図 19 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された F I T C -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 20】図 20 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された H Q -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

40

【図 21】図 21 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された H Q -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 22】図 22 はチラミド増幅希釈剤中に 5 . 5  $\mu$  M に希釈された N C A -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図 23】図 23 は、チラミド増幅希釈剤中に 5 5  $\mu$  M に希釈された N C A -チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織における b c l 2 ( 1 2 4 ) 抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

50

【図24】図24はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたNP-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図25】図25は、チラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたNP-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図26】図26はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたPPT-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図27】図27は、チラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたPPT-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図28】図28はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたRhod-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図29】図29は、チラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたRhod-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図30】図30はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたROT-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図31】図31は、チラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたROT-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図32】図32はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたTS-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図33】図33はチラミド増幅希釈剤中に5.5 μMに希釈されたTS-チラミドコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12(124)抗体の評価を示す顕微鏡写真である。

【図34】図34はシグナル強度及び天然ハプテン抗体検出効果の範囲を示すグラフである。

【図35】図35は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるBD標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図36】図36は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるBF標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図37】図37は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるDABSYL標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図38】図38は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるDCC標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図39】図39は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるDIG標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図40】図40は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるDNP標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

10

20

30

40

50

【図4 1】図4 1は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるH Q 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 2】図4 2は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるN C A 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 3】図4 3は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるN P 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 4】図4 4は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるP P T 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 5】図4 5は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるR O T 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 6】図4 6は、ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされたストレプトアビジンで検出されるT S 標識された抗センス及びセンスRNAの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図4 7】図4 7は、天然抗ハプテン抗体及び開示のハプテン-チラミドコンジュゲートの実施態様を用いて得られる相対シグナル強度を示すグラフである。

【図4 8】図4 8は、同族モノクローナル抗体と、その後のQ d 6 5 5コンジュゲートされたヤギ抗マウスポリクローナル抗体を使用して検出されるハプテン-チラミドコンジュゲートの蛍光を示す一連の蛍光顕微鏡写真である。

【図4 9】図4 9は、同族モノクローナル抗体-Q d 6 5 5コンジュゲートで検出されるD N P -チラミドコンジュゲートの蛍光を示す2つの蛍光顕微鏡写真である。

【図5 0】図5 0 A - Dは、C a l u - 3 異種移植片組織にハイブリダイズされたD N P -、B F -、N P -、及びT S 標識された抗センス1 8 S RNAプロープの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真であり、それぞれQ d 6 5 5、Q d 6 0 5、Q d 5 8 5、及びQ d 5 6 5にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出される。

【図5 1】図5 1 AはF I G Sの成画像である。5 0 A - D。図5 1 Bは、それぞれQ d 6 5 5、Q d 6 0 5、Q d 5 8 5、及びQ d 5 6 5にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出される、ハイブリダイズされたD N P -、B F -、N P -、及びT S 標識されたセンス鎖1 8 S RNAプロープの蛍光顕微鏡写真の合成画像である。

【図5 2】図5 2 A - Dは、C a l u - 3 異種移植片組織にハイブリダイズされたN P 標識K i 6 7、T S 標識H E R 2、B F 標識E R、及びD N P 標識A C T B 抗センスRNAプロープの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真であり、それぞれQ d 5 2 5、Q d 5 6 5、Q d 6 0 5、及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出される。

【図5 3】図5 3 A - Dは、M C F - 7 異種移植片組織にハイブリダイズされたN P 標識K i 6 7、T S 標識H E R 2、B F 標識E R、及びD N P 標識A C T B 抗センスRNAプロープの蛍光を示す蛍光顕微鏡写真であり、それぞれQ d 5 2 5、Q d 5 6 5、Q d 6 0 5、及びQ d 6 5 5にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出される。

【図5 4】図5 4 AはF I G Sの成画像である。5 2 A - D。図5 4 BはF I G Sの成画像である。5 3 A - D。

【図5 5】図5 5 A - Cは、それぞれC a l u - 3、Z R 7 5 - 1、及びM C F - 7 異種移植片組織にハイブリダイズされたD N P 標識されたH E R 2 アンチセンスRNAプロープの蛍光顕微鏡写真であり、Q d 6 5 5にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出される。

【図5 6】図5 6は、C a l u - 3、Z R 7 5 - 1、及びM C F - 7 異種移植片組織におけ

10

20

30

40

50

るHER2:ACTB mRNA比を示すグラフであり、qPCR及びmRNA-ISHアッセイで検出される。

【図57】図57は、Calu-3異種移植片細胞におけるHER2の確率的発現を示す蛍光顕微鏡写真である。発現は、Calu-3異種移植片組織にハイブリダイズされたDNP標識されたHER2アンチセンスRNAプローブを使用して可視化し、Qd655にコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体で検出した。

【図58】図58は、小葉乳癌における、増幅無しのmiRNA LNA(ロックド核酸)プローブ、miR205の評価を示す顕微鏡写真である。

【図59】図59は、HQ-チラミドコンジュゲートを使用した、増幅による小葉乳癌組織におけるmiR205の評価を示す顕微鏡写真である。

【図60】図60は、増幅無しの、扁桃組織におけるmiRNA LNAプローブ、miR126の評価を示す顕微鏡写真である。

【図61】図61は、HQ-チラミドコンジュゲートを使用した、増幅による扁桃組織におけるmiR126の評価を示す顕微鏡写真である。

【0026】

(詳細な説明)

I.用語及び略称

特に明記しない限り、技術用語は、従前の使用法に従って用いられる。分子生物学の共通の用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes VII, published by Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); 及びRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); 及び他の類似の文献中に見られる。

【0027】

本願明細書で用いられるように、単数用語「a」、「an」及び「the」は、文脈が明確に示さない限り、複数の指示対象物を含む。同様に、単語「又は」は、文脈が明確に示さない限り、「及び」を含むことを意図している。また、本願明細書で用いられるように、用語「含む」は「包含する」を意味する。したがって、「A又はBを含む」ことは、A、B、又はA及びBを含むことを意味する。核酸又はポリペプチド又は他の化合物に与えられた、全てのヌクレオチドの大きさ又はアミノ酸の大きさ及び全ての分子量又は分子質量値は近似値であり、記載のために提供されたものであることはよく理解されるところである。ここに記載のものに類似又は均等な方法及び材料が、本開示の実施又は試験において使用可能であるが、適切な方法及び材料を下に記載する。本願明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許及び他の文献は、その全てが出典明示により援用される。矛盾する場合には、用語の説明を含み、本願明細書が統制する。さらに、材料、方法及び実施例は、単に例示であり、限定する意図はない。

【0028】

この開示の様々な実施例の検討を容易にするために、特定用語の説明を以下に提供する：

【0029】

ACTB:ベータ-アクチン。

【0030】

増幅:増幅とは、シグナルを強くさせる作用又は結果を指す。

【0031】

抗体:「抗体」は、まとめて、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子(一例として、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、それらの組み合わせ、および任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウス等の哺乳類における免疫応答中に産生される同様の分子を含むが、それらに限定されない)、及び、他の分子(例えば、対象の分子の結合定数、すなわち、生物試料における他の分子の結合定数よりも少なくと

10

20

30

40

50

も  $10^3 \text{ M}^{-1}$  より大、少なくとも  $10^4 \text{ M}^{-1}$  より大、または少なくとも  $10^5 \text{ M}^{-1}$  より大である結合定数を有する抗体および抗体断片)への結合を実質的に除いて、対象の分子(または対象の極めて類似する分子の群)に特異的に結合する、抗体断片を指す。

【0032】

より具体的には、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識して結合する少なくとも1つの軽鎖もしくは重鎖免疫グロブリン可変領域を含んでなるポリペプチドリガンドを指す。抗体は重鎖および軽鎖からなり、これらの各々は可変重( $V_H$ )領域および可変軽( $V_L$ )領域と呼ばれる可変領域を有する。一緒になって、 $V_H$ 領域および $V_L$ 領域は抗体により認識される抗原を結合することに関与する。

【0033】

これには、インタクトな免疫グロブリンならびに当該技術分野において周知であるそれらの変異体及び一部が包含される。抗体断片には、タンパク質分解抗体断片[例えば、当該技術分野において既知であるような $F(ab')_2$ 断片、 $Fab'$ 断片、 $Fab'-SH$ 断片および $Fab$ 断片]、組換え抗体断片(例えば $sFv$ 断片、 $dsFv$ 断片、二重特異性の $sFv$ 断片、二重特異性 $dsFv$ 断片、 $F(ab)'$ 断片、単鎖 $Fv$ タンパク質(「 $scFv$ 」)、ジスルフィド安定化 $Fv$ タンパク質(「 $dsFv$ 」)、ダイアボディ、及びトリアボディ(当該技術分野で知られている)及び、ラクダ科動物抗体が挙げられる(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;及び同第5,759,808号を参照のこと)。

【0034】

抗原:特定の液性又は細胞性免疫の産物、例えば抗体分子又はT細胞受容体によって特異的に結合されうる化合物、組成物、又は物質。抗原は、何れかのタイプの分子であり得、例えば、ハプテン、単純中間代謝産物、糖(例えば、オリゴ糖)、脂質、及びホルモン、並びに高分子、例えば複合炭水化物(例えば、多糖)、リン脂質、核酸及びタンパク質を含む。

【0035】

BD:ベンゾジアゼピン、例えば、(E)-2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[*b*][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ)アセトアミド、ハプテン。

【0036】

BF:ベンゾフラザン、例えば、2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-5-カルバミド、ハプテン。

【0037】

コンジュゲーション、連結、結合又はリンク;一分子を他の分子に連結しより大きな分子を生成すること。例えば、2つのポリペプチドを一つの近接ポリペプチド分子にするか、又はポリペプチドにハプテン又は他の分子を共有結合する。例えば $scFv$ 抗体。

【0038】

コンジュゲート:2以上の化合物の結合によって形成される化合物、例えば、水の脱離と共にアルコール及び有機酸から形成されるエステル。コンジュゲートの例は、限定するものではないが、ハプテン-抗体コンジュゲート、酵素-抗体コンジュゲート、ハプテン-チラミドコンジュゲート、ハプテン-リンカー-チラミンコンジュゲート、標識されたプローブ(例えば、ジニトロフェニル標識されたmRNAプローブ)。

【0039】

カップリング:「カップリング」なる用語は、直接的又は間接的に結合させることを意味する。第一原子又は分子は、第二原子又は分子に直接的にカップリング又は間接的にカップリングされうる。

【0040】

DABSYL:4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド、ハプテン。

【0041】

DCC:7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸(7-(ジエチルアミノ)-2-

10

20

30

40

50



オキソ-2 H-クロメン-3-カルボン酸)、ハプテン。

【0042】

誘導体：誘導体は、一原子又は原子の群を他の原子又は原子の群で置換することによって、類似な化合物から得られる化合物。

【0043】

検出可能な標識：他の分子、例えば抗体又はタンパク質に直接的又は間接的に結合され、該分子の検出を容易にする検出可能な化合物又は組成物。標識の具体的な非限定例は、蛍光タグ、酵素、及び放射性同位体を含む。

【0044】

D I G：ジゴキシゲニン、ハプテン。

10

【0045】

D N P：2,4-ジニトロフェニル、ハプテン。

【0046】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性の、すなわち、特定の免疫反応を引き起こす分子上の特定の化学基又は又は近接又は非近接ペプチド配列。抗体は特定の抗原性エピトープに結合する。

【0047】

E R：エストロゲン受容体； E R陽性乳癌は、抗エストロゲン治療から利益を得うる。

【0048】

F I T C：フルオレセインイソチオシアネート、ハプテン。

20

【0049】

官能基：分子の特徴的な化学反応に関与する、分子内の原子の特定の基。例示的な官能基は、限定するものではないが、アルカン、アルケン、アルキン、アレーン、ハロ（フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード）、エポキシド、ヒドロキシル、カルボニル（ケトン）、アルデヒド、炭酸エステル、カルボキシレート、エーテル、エステル、ペルオキシ、ヒドロペルオキシ、カルボキサミド、アミン（一級、二級、三級）、アンモニウム、イミド、アジド、シアネート、イソシアネート、チオシアネート、硝酸、亜硝酸、ニトリル、ニトロアルカン、ニトロソ、ピリジル、リン酸、スルホニル、スルフィド、チオール（スルフヒドリル）、ジスルフィドを含む。

30

【0050】

ハプテン：抗体と特異的に結合できるが、典型的にはそれ自体では免疫原となることが実質的には不可能な分子、典型的には小分子。

【0051】

H E R 2：ヒト上皮増殖因子受容体2、乳癌における高い攻撃性と連結するタンパク質

【0052】

K i 6 7：M K I 6 7遺伝子にコードされるタンパク質；細胞増殖及びリボソームR N A転写に関連する核タンパク質

【0053】

リンカー：ここで使用される場合、リンカーは2つの部分間に位置する分子又は原子の群。例えば、ハプテン-チラミドコンジュゲートは、ハプテン及びチラミン又はチラミン誘導体間にリンカーを含む。典型的にはリンカーは二官能性、すなわち、リンカーは各端に官能基を含み、官能基はリンカーを2つの部分にカップリングするために使用される。2つの官能基は同じであるか、すなわちホモ二官能性リンカー、又は異なる、すなわちヘテロ二官能性リンカーでありうる。

40

【0054】

ロックド核酸(L N A)：しばしば隔絶R N A (inaccessible RNA)と称されるL N Aは、修飾されたR N Aヌクレオチドである。リボース部分が2'酸素及び4'炭素を連結する余分な架橋によって修飾されている。L N Aオリゴマーは商業的に入手可能であり、オリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション特性(例えば、融解温度)を増加さ

50

せるために使用される。

【0055】

部分：部分は分子の断片、又はコンジュゲートの一部である。

【0056】

興味分子又は標的：その存在、位置及び/又は濃度が決定される分子。興味分子の例はタンパク質及び核酸配列、を含む。

【0057】

モノクローナル抗体：Bリンパ球の単クローンによって、又は単一抗体の軽及び重鎖遺伝子がトランスフェクトされている細胞によって生産される抗体。モノクローナル抗体は当業者に知られている方法によって生産される。モノクローナル抗体はヒト化モノクローナル抗体を含む。

10

【0058】

マルチプレックス (Multiplex、多重、多重化)：本発明の実施態様は、複数の異なるコンジュゲートを用いて、所望されるように、サンプル中の複数の標的を実質的に同時か又は逐次に、検出されることを可能にする実施態様を指す。多重化とは、核酸、一般的には、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質を、両方個別に、かつ任意の及び全ての組み合わせで、同定及び/又は定量することを含み得る。多重化とはまた、その解剖学的文脈において、細胞内の遺伝子、メッセンジャー及びタンパク質の2つ以上を検出することを含めることができる。

20

【0059】

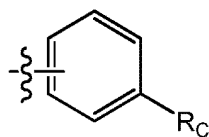
NCA：ニトロケイ皮酸、例えば4,5-ジメトキシ-2-ニトロシンナミド (cinnamide)、ハブテン。

【0060】

NP：ニトロピラゾール、例えば5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド。ハブテン。

【0061】

ペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分：ペルオキシダーゼ酵素及び過酸化剤と結合した場合に、フリーラジカルを形成できるアリール部分。典型的には、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリール部分は、一般式



30

を有し、ここで、R<sub>C</sub>は、ペルオキシダーゼ酵素及び過酸化剤と結合した場合に、フリーラジカルを形成できる官能基である。適切な官能基はヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミン基を含む。

【0062】

PGR又はPR：プロゲステロン受容体； PGR-陽性癌細胞の増殖は、プロゲステロンに影響される。

【0063】

ポリペプチド：単量体が、アミド結合によって一つに連結されるアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がアルファ-アミノ酸の場合、L-光学異性体又はD-光学異性体のどちらかが使用できる。「ポリペプチド」又は「タンパク質」なる用語は、ここで使用される場合、任意のアミノ酸配列を包含することを意図し、糖タンパク質等の修飾された配列を含む。「ポリペプチド」なる用語は具体的に、天然に生じるタンパク質、並びに組換え又は合成で生産されたものを含むことを意図する。「残基」又は「アミノ酸残基」なる用語は、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドに組み込まれているアミノ酸への言及を含む。

40

【0064】

PPT：ポドフィロトキシン、例えばp-メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド (p

50

yrzopodophyllamide)、ハブテン。

【0065】

タンパク質：アミノ酸から成る分子、特にポリペプチド。

【0066】

近位：「近位」なる用語は、付着又は起源の点に、又は近くにあることを意味する。ここで使用される場合、近位とは、サンプル内の標的に固定されているペルオキシダーゼコンジュゲートの約100nm内、約50nm内、約10nm、又は約5nm内を意味する。また、近位とは、約10オングストローム～約100nm、約10オングストローム～約50nm、約10オングストローム～約10nm、又は約10オングストローム～約5nmの範囲内を意味する。

10

【0067】

精製された：「精製された」なる用語は、絶対的な純度を要求せず；むしろ相対的な用語として意図される。よって、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、コンジュゲート、又は他の活性化合物は、タンパク質又は他の混入物から全体又は部分的に単離されたものである。一般的に、開示の使用のための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、コンジュゲート、又は他の活性化合物は、治療的投与のための完全な薬学的製剤中における薬学的担体、賦形剤、バッファー、吸収促進剤、安定剤、保存剤、アジュバント又は他の共成分 (co-ingredient) との、ペプチド、タンパク質、コンジュゲート又は他の活性化合物の混合又は製剤化より前に、調製物中に存在する全高分子種の80%超を含む。より典型的には、ペプチド、タンパク質、コンジュゲート又は他の活性化合物は、他の製剤成分との混合より前に、精製された調製物中に存在する全高分子種の90%より大、しばしば95%より大を示すまで精製される。他の場合では、精製調製物は、本質的に均一であり得、他の高分子種は一般的な技術によって検出できない。

20

【0068】

量子ドット：量子閉込めによる大きさに依存した電子及び光学特性を示すナノスケール粒子。量子ドットは、例えば、半導体材料 (例えばセレン化カドミウム及び硫化鉛) で構成され、結晶子 (分子線エピタキシャル成長を経て成長する) 等から構成される。様々な界面化学及び蛍光特性を有する種々の量子ドットは、Invitrogen Corporation, Eugene, OR から商業的に入手可能である (例えば、米国特許番号6,815,064、6,682,596及び6,649,138を参照のこと (それぞれ本願明細書に出典明示により引用したものとする))。量子ドットは、Evident Technologies (Troy, NY) から商業的に入手可能である。他の量子ドットは、ZnSSe、ZnSeTe、ZnSTe、CdSSe、CdSeTe、ScSTe、HgSSe、HgSeTe、HgSTe、ZnCdS、ZnCdSe、ZnCdTe、ZnHgS、ZnHgSe、ZnHgTe、CdHgS、CdHgSe、CdHgTe、ZnCdSSe、ZnHgSSe、ZnCdSeTe、ZnHgSeTe、CdHgSSe、CdHgSeTe、InGaAs、GaAlAs、InGaN量子ドットなどの合金量子ドットを含む (合金量子ドット及び製造方法は、例えば米国出願公開第2005/0012182号及びPCT公報WO2005/001889に開示される)。

30

【0069】

反応基：この出願中における式は「反応基」に言及し、これはここに記載のように、第一ユニットを第二ユニットにカップリングするのに適した任意の様々な基でありうる。例えば、反応基は、アミン-反応基、例えばイソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、NHSEステル、酸クロリド、例えばスルホニルクロリド、アルデヒド及びグリオキサール、エポキシド及びオキシラン、炭酸、アリール化剤、イミドエステル、カルボジイミド、無水物、及びその組合せでありうる。適切なチオール-反応性官能基は、ハロアセチル及びハロゲン化アルキル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリール化剤、チオール-ジスルフィド交換試薬、例えばピリジルジスルフィド、TNB-チオール、及びジスルフィド還元剤、及びその組合せを含む。適切なカルボキシレート-反応性官能基は、ジアゾアルカン、ジアゾアセチル化合物、カルボニルジイミダゾール化合物

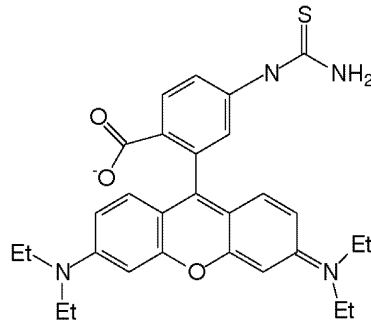
40

50

、及びカルボジイミドを含む。適切なヒドロキシル - 反応性官能基は、エポキシド及びオキシラン、カルボニルジイミダゾール、N、N' - ジスクシンイミジルカーボネート又はN - ヒドロキシスクシンイミジルクロロギ酸、過ヨウ素酸酸化化合物、酵素的酸化、アルキルハロゲン、及びイソシアネートを含む。アルデヒド及びケトン - 反応性官能基は、ヒドラジン、シッフ塩基、還元的アミノ化産物、マンニッヒ縮合産物、及びその組合せを含む。活性水素 - 反応性化合物は、ジアゾニウム誘導体、マンニッヒ縮合産物、ヨード化反応産物、及びその組合せを含む。光反応性化学官能基は、アリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフォノン、ジアゾ化合物、ジアジリン誘導体、及びその組合せを含む。

【0070】

R h o d : ローダミン、ハプテン。ローダミンハプテンの一例は、次の化学構造



を有する。

【0071】

R O T : ロテノン、例えばロテノンイソキサゾリン、ハプテン。

【0072】

サンプル：被験体から得られる、ゲノムDNA、RNA（mRNAを含む）、タンパク質、又はその組合せを有する生物学的試料。例は、限定するものではないが、末梢血、尿、唾液、組織生検、外科的試料、羊水穿刺サンプル及びオートプシー物質を含む。

【0073】

特異的結合部分：特異的結合対のメンバー。特異的結合対は、他の分子への結合を実質的に排除して、互いに結合することを特徴とする分子の対である（例えば、特異的結合対は、生物学的サンプル中における他の分子との、結合対の2メンバーのどちらかの結合定数より、少なくとも  $10^3 \text{ M}^{-1}$  より大、 $10^4 \text{ M}^{-1}$  より大、又は  $10^5 \text{ M}^{-1}$  より大の結合定数を有しうる）。特異的結合部分の特定の例は、特異的結合タンパク質（例えば、抗体、レクチン、アビジン、例えばストレプトアビジン、及びプロテインA）、核酸配列、及びタンパク質 - 核酸を含む。また、特異的結合部分は、このような特異的結合タンパク質によって特異的に結合される分子（又はその部分）を含む。

【0074】

T S : チアゾールスルホンアミド、例えば、2 - アセトアミド - 4 - メチル - 5 - チアゾールスルホンアミド、ハプテン。

【0075】

I I . ハプテン

ハプテンの開示の実施態様は、ピラゾール、具体的にはニトロピラゾール；ニトロフェニル化合物；ベンゾフラザン；トリテルペン；尿素及びチオ尿素、具体的にはフェニル尿素、及びより具体的にはフェニルチオ尿素；ロテノン及びロテノン誘導体、ここではロテノイドとしても言及される；オキサゾール及びチアゾール、具体的にはオキサゾール及びチアゾールスルホンアミド；クマリン及びクマリン誘導体；ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体に例示されるシクロリグナン；及びその組合せを含む。ハプテン及びそれらの調製及び使用の方法の実施態様は、米国特許第7,695,929号に開示されており、参照によってその全体をここに援用する。

10

20

30

40

50

## 【0076】

下に提供する一般式について、置換基が示されていない場合は、当業者は置換基が水素であることを理解するだろう。原子に連結されていないが、例えば環系の内部に伸展するように示されている結合は、このような置換基の位置が可変であることを示す。結合を通過して描かれている曲線は、幾つかの追加構造がその位置に結合されていることを示し、典型的にはリンカー、又はチラミン又はチラミン誘導体にハプテンをカップリングするために使用される官能基又は部分である。更に、一又は複数のキラル中心を有する化合物について立体化学が示されていない場合、全てのエナンチオマー及びジアステロマー (diastereomer) が含まれる。同様に、脂肪族又はアルキル基の記述について、その全ての構造異性体がまた含まれる。他に示さない限り、下に提供する一般式における R 基は独立して、水素、アシル、アルデヒド、アルコキシ、脂肪族、特に低級脂肪族 (例えば、イソブレン)、置換化脂肪族、ヘテロ脂肪族、例えばヘテロ原子を有する有機鎖、例えば酸素、窒素、硫黄、アルキル、特に 20 以下の炭素原子を有するアルキル、及び更により典型的には 10 以下の原子を有する低級アルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、及びブチル、置換化アルキル、例えばハロゲン化アルキル (例えば  $-CX_3$ 、ここで X はハロゲン化物及びその組合せ (鎖においてか又はそれに結合されている))、オキシム、オキシムエーテル (例えば、メトキシイミン、 $CH_3-O-N=$ ) アルコール (すなわち、脂肪族又はアルキルヒドロキシル、特に低級アルキルヒドロキシル) アミド、アミノ、アミノ酸、アリール、アルキルアリール、例えばベンジル、炭水化物、単糖、例えばグルコース及びフルクトース、二糖、例えばスクロース及びラクトース、オリゴ糖及び多糖、カルボニル、カルボキシル、カルボキシレート (その塩を含み、例えば第 1 族金属又はアンモニウムイオンカルボキシレート)、環式、シアノ ( $-CN$ )、エステル、例えばアルキルエステル、エーテル、エキソメチレン、ハロゲン、ヘテロアリール、複素環、ヒドロキシル、ヒドロキシルアミン、オキシム ( $HO-N=$ )、ケト、例えば脂肪族ケトン、ニトロ、スルフヒドリル、スルホニル、スルホキシド、エキソメチレン及びその組合せから選択される。

10

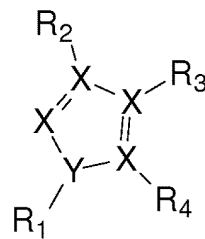
20

## 【0077】

## 1. アゾール

本発明のハプテンの第一の一般的クラスは、典型的にはオキサゾール及びピラゾールであり、より典型的にはニトロオキサゾール及びニトロピラゾールであり、次の一般的な化学式を有する。

30



$R_1 - R_4$  は、ハプテンとしての機能を干渉せず、潜在的に亢進させる任意の基でありうる。より具体的には、 $R_1 - R_4$  は上記した通りである。また、2 以上のこれらの  $R_1 - R_4$  置換基は図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。少なくとも 1 つの  $R_1 - R_4$  置換基はリンカーに結合されているか、又はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適した官能基である。 $R_1 - R_4$  は、最も典型的には脂肪族、水素又はニトロ基、より典型的にはアルキル、水素又はニトロ、更により典型的には低級 (10 以下の炭素原子) アルキル、水素、ニトロ、又はその組合せである。ニトロ基の数は様々であるが、最も典型的には 1 又は 2 のニトロ基がある。X は独立して窒素又は炭素である。Y は酸素、硫黄又は窒素である。Y が酸素又は硫黄である場合は、 $R_1$  基はない。Y が窒素である場合、少なくとも 1 つの  $R_1$  基がある。

40

50

## 【0078】

当業者は、2以上のヘテロ原子を有する化合物について、その相対位置が可変であることを理解するだろう。更に、2以上のヘテロ原子も可能であり、トリアジン等である。

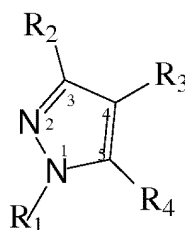
## 【0079】

これらのアゾール化合物の少なくとも1つの $R_1 - R_4$ は、何らかの他の基に結合されるか、又は可変官能基である。例えば、図示した化合物は、アゾール環の任意の適切な位置で、チラミン又はチラミン誘導体に直接、又はリンカーにカップリングされうる。

## 【0080】

作用実施態様は典型的には、モノ-又はジニトロピラゾール誘導体であり、少なくとも1つの $R_1 - R_4$ はニトロ基であり、残りの $R_1 - R_4$ は、リンカー又はチラミン又はチラミン誘導体にハプテンをカップリングするために使用される。

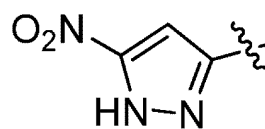
10



## 【0081】

一特定化合物は、次の構造を有する。

20

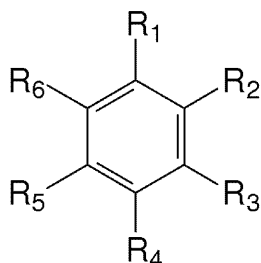


## 【0082】

## 2. ニトロアリール

本発明のハプテンの第二の一般的クラスは、ニトロアリール化合物である。例示的なニトロアリール化合物は、限定するものではないが、ニトロフェニル、ニトロビフェニル、ニトロトリフェニル等、及びすべてのヘテロアリール相応物を含み、次の一般的な化学式を有する。

30



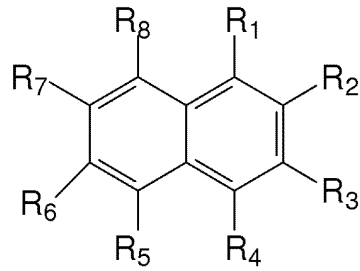
40

この一般式に関して、少なくとも1つの $R_1 - R_6$ はニトロである。一以上の $R_1 - R_6$ がニトロである場合、複数のニトロ置換基の相対的な環位置、又は他の環置換基に対するニトロ置換基の全ての組合せが、このクラスの開示のハプテンに含まれる。ジニトロアリール化合物が最も典型的である。残りの環置換基は上記した通りである。少なくとも1つの $R_1 - R_6$ 置換基はリンカーに結合されているか、又はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適した官能基である。

## 【0083】

また、2以上の $R_1 - R_6$ 置換基は、環系、例えばナフタレン(下に示す)又はアントラセン型誘導体における原子、典型的には炭素原子でありうる。6員の環系以外の環系が形成され得、例えば縮合6-5環系である。

50

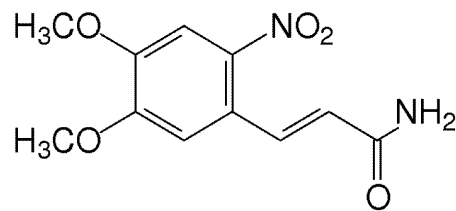


また、R<sub>1</sub> - R<sub>8</sub> が持つ環位置の少なくとも1つは、リンカーに結合されているか、又は共有結合などによるチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適した可変官能基である。例えば、本発明のニトロアリアル化合物は、様々な任意の環位置に、チラミン又はチラミン誘導体、又はリンカーへのカップリングのための官能基を含みうる。

10

## 【0084】

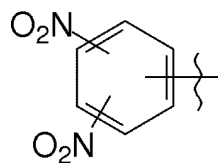
作用実施態様は、ニトロフェニル化合物に例示される。単なる例として、モノニトロアリアル化合物は、ニトロシンナミド化合物に例示される。ニトロシンナミドベースの化合物の一実施態様は、下に示す4,5-ジメトキシ-2-ニトロシンナミドに例示される。



20

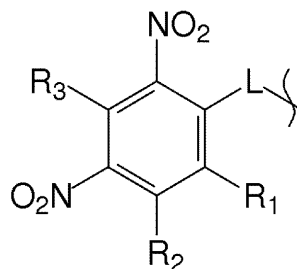
## 【0085】

また、化合物のニトロフェニルクラスは、ジニトロフェニル化合物に代表される。ニトロ基を持たない環位置の残りの炭素原子の少なくとも1つは、官能基に、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に直接結合されている。これらの基の相対位置のすべての組合せは、開示のハプテンのクラスに含まれる。



30

作用実施態様は、下記のように、リンカーにカップリングされた2,4-ジニトロフェニル化合物に、より具体的に例示される。



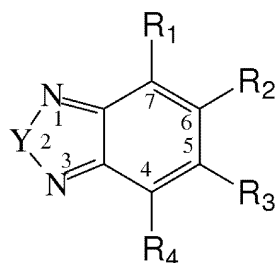
40

R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub> は上記した通りである。

## 【0086】

## 3. ベンゾフラザン

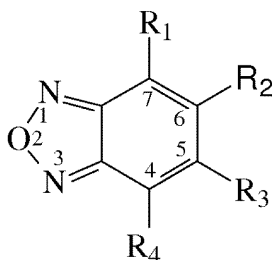
ベンゾフラザン及びその誘導体は、発明の範囲内である他のクラスのハプテンである。ベンゾフラザン型化合物の一般式を下に提供する。



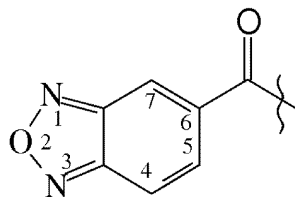
R<sub>1</sub> - R<sub>4</sub> は上記した通りである。また、2以上のこれらのR<sub>1</sub> - R<sub>4</sub>置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。少なくとも1つのR<sub>1</sub> - R<sub>4</sub>置換基はリンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に直接結合されている。YはR<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>置換基を有する炭素原子であり、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、R<sub>1</sub> - R<sub>4</sub>について述べたように、酸素又は硫黄、典型的には酸素である。

【0087】

Yが酸素である化合物は、次の構造を有する化合物によってより具体的に例示され、ここで、R<sub>1</sub> - R<sub>4</sub>上記の通りであり、最も典型的には独立して水素及び低級アルキルである。



このクラスのハブテンによる化合物の一作用実施態様は、次の化学構造を有する。



【0088】

4. トリテルペン

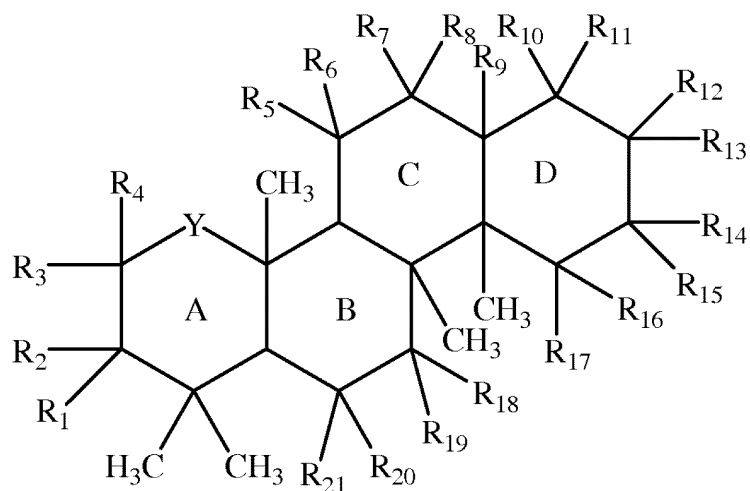
トリテルペンは、発明の範囲内である他のクラスのハブテンである。環状トリテルペンに共通する基本的な環構造は、下に示すように4つの6員の縮合環、A - Dを有する。

10

20

30





10

多くの刊行物が、本発明の実施に有用なトリテルペンの属である、天然に生じる半合成及び合成トリテルペン種に言及しており： J.C. Connolly and R. A. Hill, *Triterpenoids*, *Nat. Prod. Rep.*, 19, 494-513 (2002); Baglin et al., *A Review of Natural and Modified Becnolic, Ursolic and Echinocystic Acid Derivatives as Potential Antitumor and Anti-HIV Agents*, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 525-539; W.N. and M.C. Setzer, *Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents*, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 540-556 (2003); and Baltina, *Chemical Modification of Glycyrrhizic Acid as a Route to New Bioactive Compounds for Medicine*, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 155-171 (2003); を含み、その各々を出典明記によってここに援用する。

20

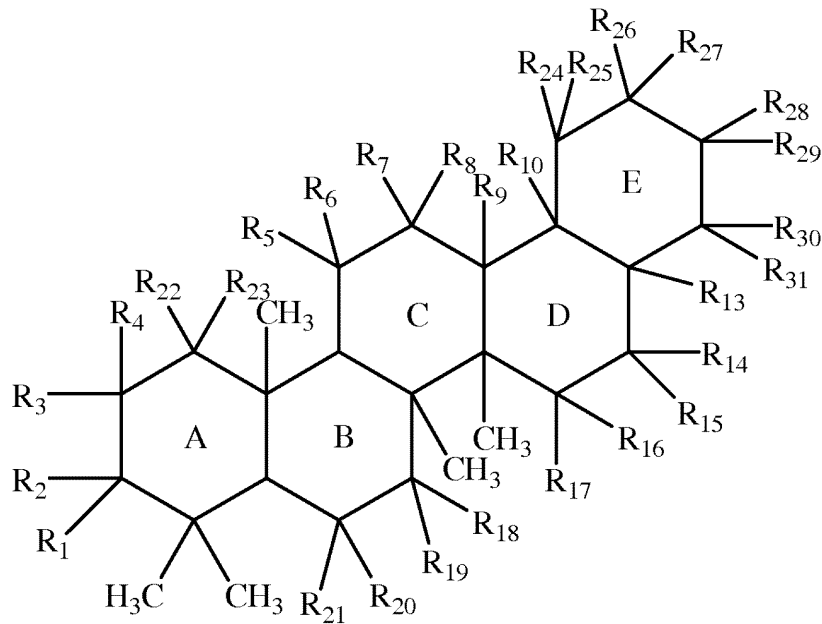
【0089】

本開示及びその作用実施態様、並びにこれらの先行刊行物によって提供される開示に基づき、またこの第一一般式の参照から、 $R_1 - R_{21}$  は上記した通りである。また、2以上のこれらの  $R_1 - R_{21}$  置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。少なくとも1つの  $R_1 - R_{21}$  置換基は、リンカーに結合されているか、又はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適した官能基である。Yは結合であって、それによって5員の環を定めるか、又は  $R_{22}$  及び  $R_{23}$  置換基を持つ炭素原子であり、ここで、これらのR基は上記した通りである。

30

【0090】

また、このクラスのハプテンを例示するトリテルペンの開示の実施態様はE環を含み得、このE環は様々な環サイズであり得、特に、環において5-7の原子、典型的には炭素原子を有する環でありうる。例えば、E環は、次の一般式に示すように6員の環であり得、ここで、 $R_1 - R_{31}$  は  $R_1 - R_{21}$  について上に記載した通りである。

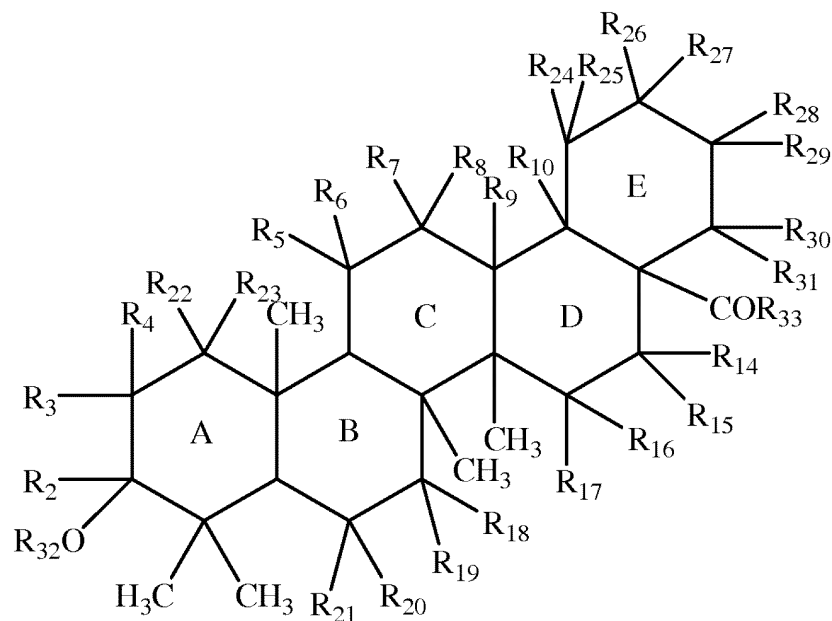


10

## 【0091】

次の一般式は、 $R_{1-3}$  置換基が、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち  $-OR_{3-4}$  から選択される  $R_{3-3}$  置換基を持つアシル基でありうることを示し、ここで、 $R_{3-4}$  は脂肪族、典型的にはアルキル又は置換化アルキル、より典型的には低級アルキル、アミド、例えば一級アミド ( $-NH_2$ )、二級アミド ( $-NHR_{3-5}$ ) 及び三級アミド ( $-NR_{3-5}R_{3-6}$ ) であり、ここで、 $R_{3-5}$  及び  $R_{3-6}$  は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換化アルキル、更に典型的には低級アルキル又は置換化低級アルキルである。また、この一般式は、 $R_1$  置換基がしばしば  $OR_{3-2}$  置換基であることを示し、ここで、 $R_{3-2}$  は水素又は脂肪族、より典型的にはアルキル又は置換化アルキル、更により典型的には低級アルキルである。残りの R 基は、第一一般式について上記した通りである。

20

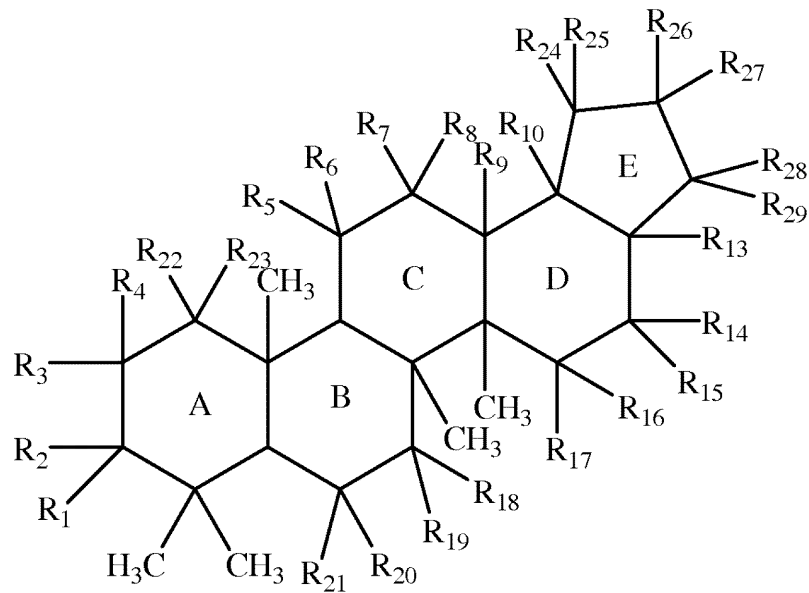


30

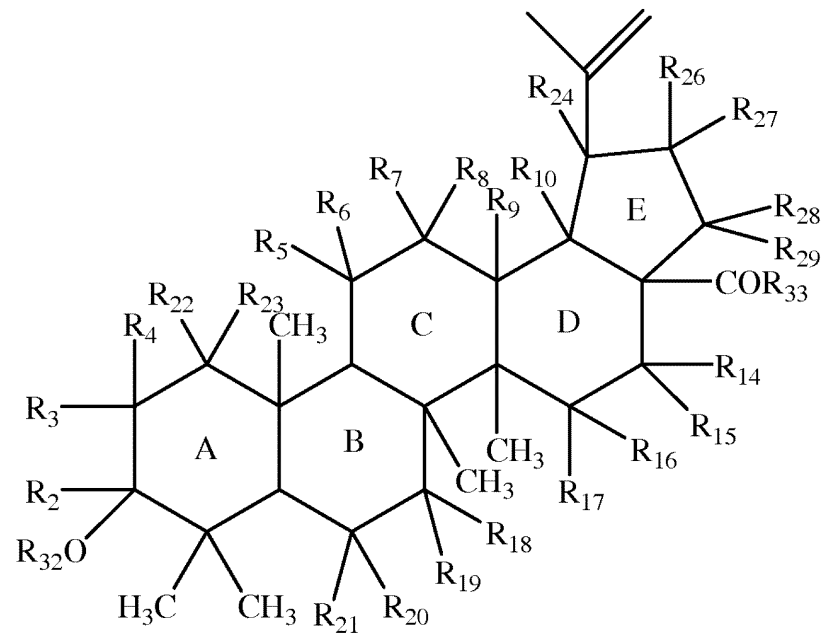
40

## 【0092】

また、下の式によって示す様に 5 員の環であり得、ここで、 $R_1 - R_{2-9}$  基は、 $R_1 - R_{2-1}$  について上記した通りである。



10



20

30

## 【0093】

これらの一般式に関して、 $R_1 - R_{29}$ 基は、 $R_1 - R_{21}$ について上記した通りである。

## 【0094】

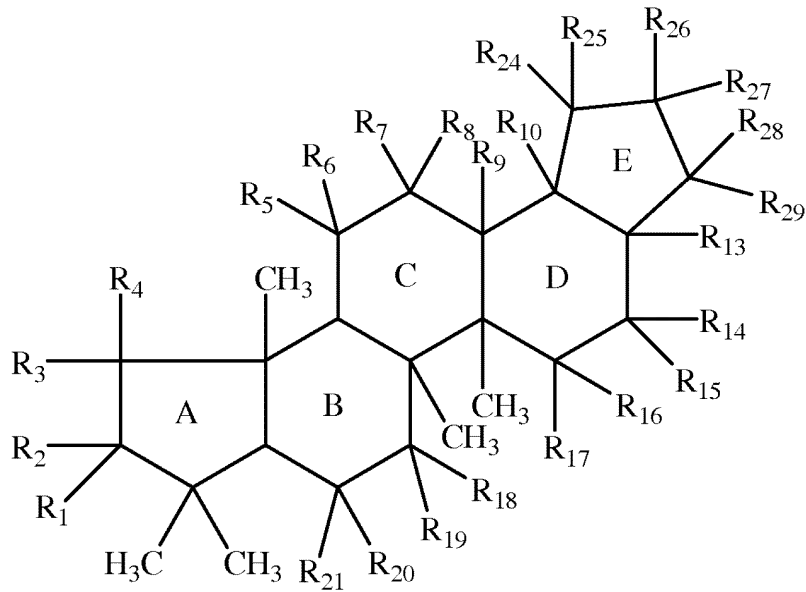
E環が6員の環である例示的な化合物と同様に、E環が5員の環である化合物もまた、上記のように $R_1$ 及び $R_{13}$ に置換基を含みうる。具体的には、この一般式は、 $R_{13}$ 置換基が、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち $-OR_{34}$ から選択される $R_{33}$ 置換基を持つアシル基でありうることを示し、ここで、 $R_{34}$ は脂肪族、典型的にはアルキル又は置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル、アミド、例えば一級アミド( $-NH_2$ )、二級アミド( $-NHR_{35}$ )及び三級アミド( $-NR_{35}R_{36}$ )であり、ここで、 $R_{35}$ 及び $R_{36}$ は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル又は置換化低級アルキルである。また、この一般式は、 $R_1$ 置換基がしばしば $OR_{32}$ 置換基であることを示し、ここで、 $R_{32}$ は水素又は脂肪族、より典型的にはアルキル又は置換化アルキル、更により典型的には低級アルキルである。

40

50

## 【0095】

また、例示的な化合物は、A及びE環の双方として5員の環を含む。このような例示的な化合物の一般式を下に示し、ここで、 $R_1 - R_{29}$ 置換基は上記した通りである。



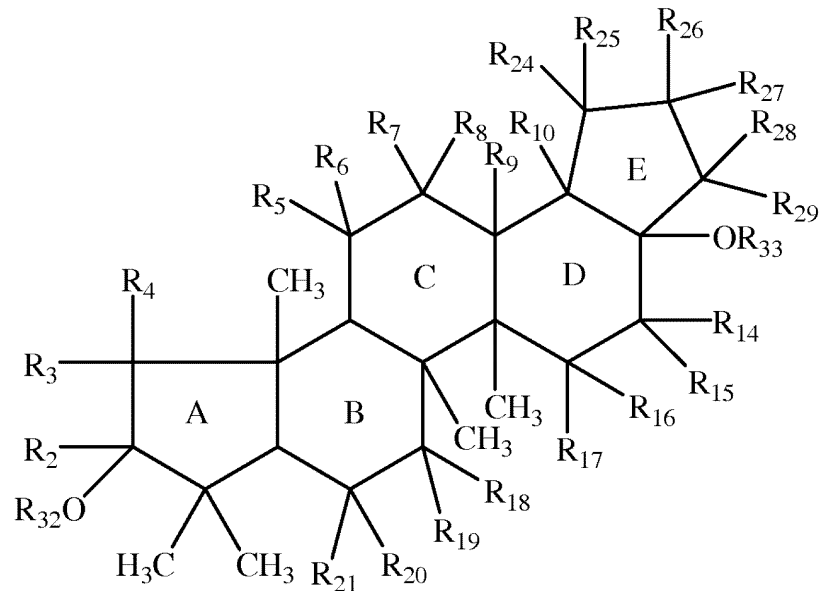
10

20

## 【0096】

また、 $R_1$ 及び $R_{13}$ 置換基は、酸素ベースの官能基でありうる。 $R_{13}$ 置換基は、水素、ヒドロキシル、エステル、すなわち $-OR_{34}$ から選択される $R_{33}$ 置換基を持つアシル基であり得、ここで、 $R_{34}$ は脂肪族、典型的にはアルキル又は置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル、アミド、例えば一級アミド( $-NH_2$ )、二級アミド( $-NHR_{35}$ )及び三級アミド( $-NR_{35}R_{36}$ )であり、ここで、 $R_{35}$ 及び $R_{36}$ は脂肪族、典型的には低級脂肪族、より典型的にはアルキル、置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル又は置換化低級アルキルである。また、この一般式は、 $R_1$ 置換基がしばしば $OR_{32}$ 置換基であることを示し、ここで、 $R_{32}$ は水素又は脂肪族、より典型的にはアルキル又は置換化アルキル、更により典型的には低級アルキルである。

30



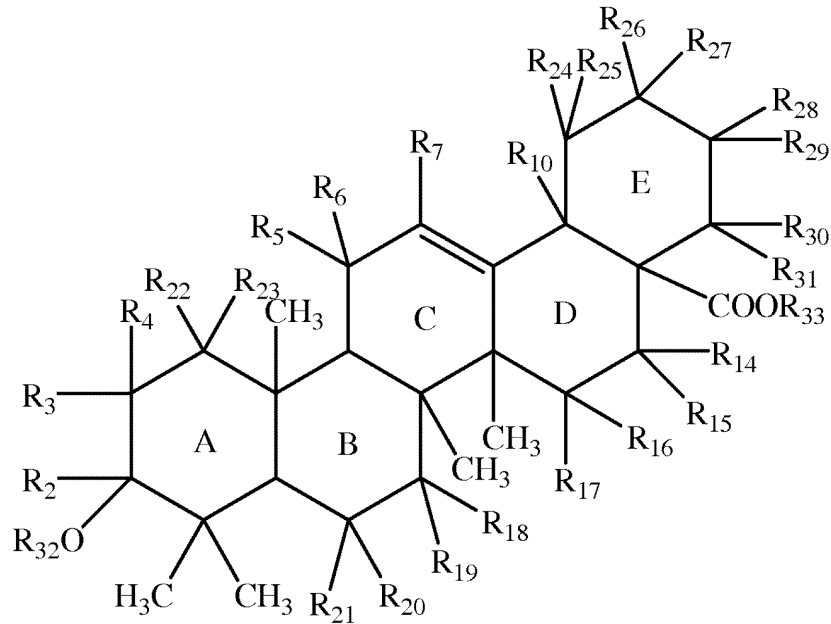
40

## 【0097】

また、本発明の例示的なトリテルペンは、一又は複数のA-E環に、一又は複数の不飽和部位を含みうる。例示的な化合物はしばしば、下に示すように、C環において少なくとも

50

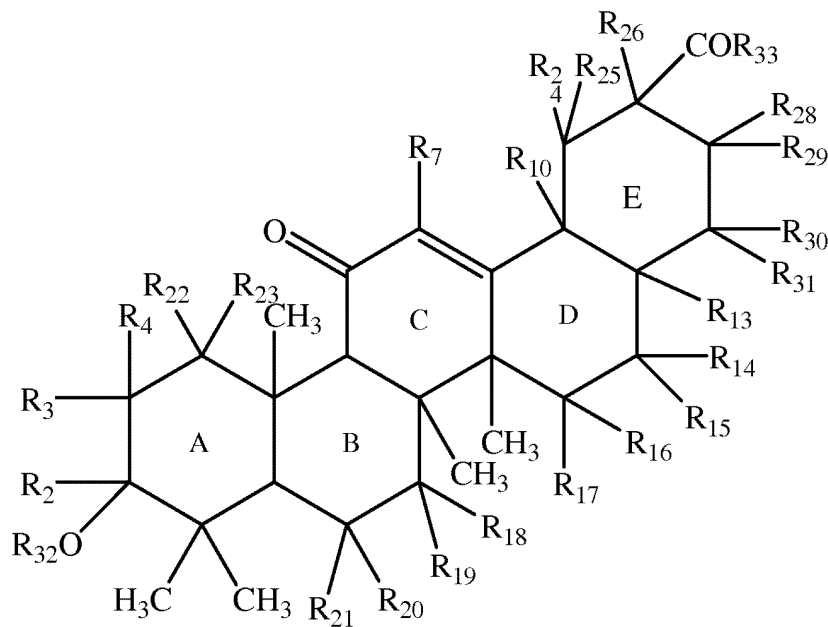
も 1 つの不飽和部位、例えば C 環において二重結合を有する。



10

不飽和部位は、C 環について下に示す様に、アルファ、ベータ不飽和ケトンでありうる。

20



30

【 0 0 9 8 】

また、トリテルペンは多くのステレオジェニック炭素原子を有する。当業者は、特定のエナンチオマーが最も天然に生じ易いことを理解するだろう。天然に生じるエナンチオマーが、開示の実施態様の実施に最も入手可能であり、及び / 又は効果的でありうるが、全ての他の可能な立体異性体が発明の範囲内である。更に、他の天然に生じるトリテルペン、又はその合成誘導体、又は完全な合成化合物は、( 1 ) 異なる立体化学、( 2 ) 異なる置換基を有し得、更に、天然に生じる化合物では置換されていない位置で置換されうる。上に提供されている一般式は、キラル中心で立体化学を示さない。これは、各キラル中心での両エナンチオマー、及びその全ジアステレオマー異性体の組合せが、発明の範囲内であることを示す。

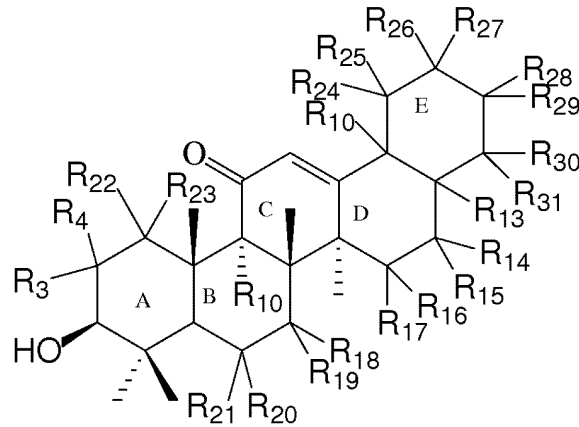
40

【 0 0 9 9 】

本発明の特定の作用実施態様は、次の一般式に例示され、ここで、置換基は上記お通り

50

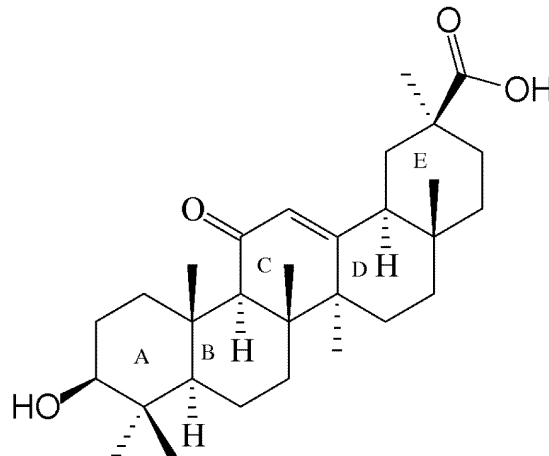
である。



10

【0100】

本発明の実施のためのハプテンとして有用な天然に生じるトリテルペンの立体化学及び置換基を下に示す。



20

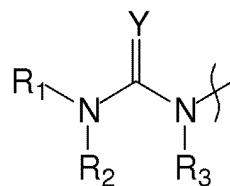
30

A環におけるヒドロキシル基は典型的には、作用実施態様では、カルボニル官能基に酸化される。結果として、カルボニル基を持つ炭素原子はもはやキラル中心ではない。

【0101】

5. 尿素及びチオ尿素

尿素及びチオ尿素、特にアリール及びヘテロアリール尿素及びチオ尿素は、発明の範囲内である他のクラスのハプテンである。本発明の尿素ベースのハプテンの一般式を下に提供する。



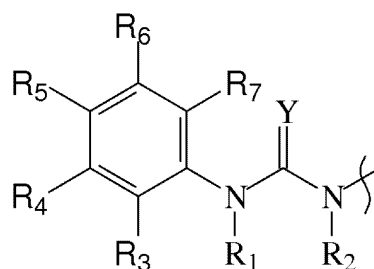
40

この一般式に関して、 $R_1 - R_3$ は独立して、水素、脂肪族、置換化脂肪族、典型的にはアルキル、置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル及び置換化低級アルキル、環式、複素環、アリール及びヘテロアリールである。より具体的には、 $R_1$ は典型的にはアリール又は脂肪族であり、発色活性を促進する少なくとも1つ不飽和部位をしばしば有する。 $R_2$ 及び $R_3$ は最も典型的には独立して水素及び低級アルキルである。 $Y$ は酸素(尿素誘導体)又は硫黄(チオ尿素)である。

50

## 【0102】

アリール誘導体は典型的には次の式を有する。

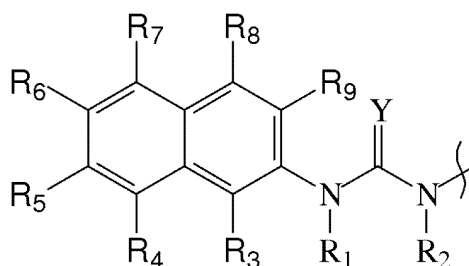


10

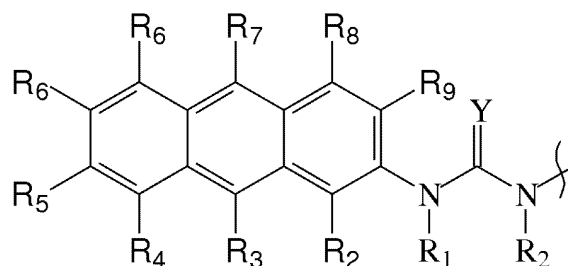
$R_1 - R_7$  は上記した通りである。また、少なくとも1つの  $R_3 - R_7$  置換基は、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に結合されている。また、このような結合に利用可能な2以上のこれらの  $R_3 - R_7$  置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。

## 【0103】

また、下に提供する例示的な構造によって示されるように、更なる環が存在しうる。 $R$  基は  $R_1 - R_7$  について上記した通りであり、 $Y$  は酸素又は硫黄である。



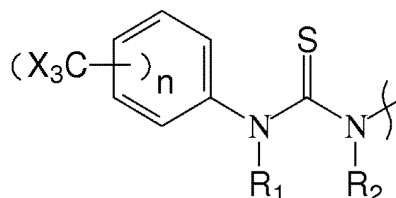
20



30

## 【0104】

チオ尿素の特定のサブクラスを下に示す。

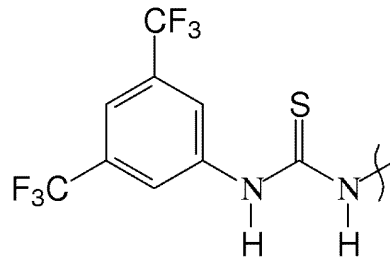


40

この一般式に関して、 $n$  は1～5、典型的には1～2であり、 $R_1$  及び  $R_2$  は独立して水素又は低級アルキルであり、 $X$  は独立してハロゲン化物又は異なるハロゲン化物の組合せである。

## 【0105】

フェニルチオ尿素の作用実施態様の一例を下に提供する。

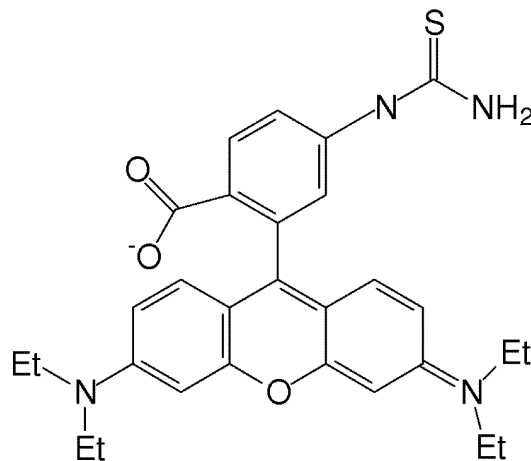


トリフルオロメチル基が、チオ尿素部分に対して2及び4位置に示されている。当業者は、2,3など、2基置換化合物について全ての相対位置を有する化合物、及び2つ以上のトリハロアルキル置換基を、かかる複数のトリハロアルキル置換基の全ての可能な相対位置に有する化合物も、発明の範囲であることを理解するだろう。

10

【0106】

ローダミンチオ尿素ハプテンの特定の例は、次の式を有する。



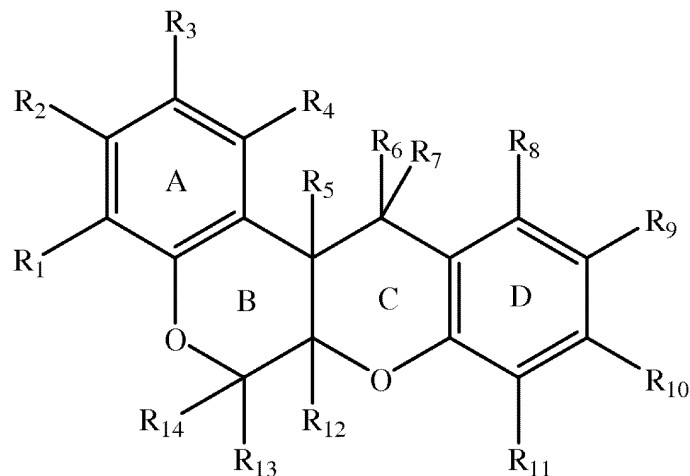
20

【0107】

## 6. ロテノイド

30

ロテノイドと総称されるロテノン及びロテノンベースのハプテンは、発明の範囲内である他のクラスのハプテンを提供する。ロテノン、及びロテノンベースのハプテンの第一般式を下に提供する。



40

多くの刊行物が、本発明の実施に有用なロテノイド属を記述するのに有用な、天然に生じる半合成及び合成ロテノイドに言及しており：Leslie Crombie and Donald Whiting, Biosynthesis in the Rotenoids Group of Natural Products: Application of Isotope

50



Methodology, Phytochemistry, 49, 1479-1507 (1998); and Nianbai Fang, and John Casida, Cube Resin Insecticide: Identification and Biological Activity of 29 Rotenoid Constituents; を含み、その各々を出典明記によってここに援用する。本開示及び作用実施態様、並びにこれらの先行公開によって提供される開示に基づき、またこの第一一般式に関し、 $R_1 - R_{14}$  は上記した通りである。また、2以上のこれらの $R_1 - R_{14}$ 置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。また、少なくとも1つの $R_1 - R_{14}$ 置換基は、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に結合されている。

【0108】

$R_6$  及び  $R_7$  は上記の通りでありうるが、このような置換基はより典型的には独立して水素、 $OR_{15}$  であり、ここで、 $R_{15}$  は水素、脂肪族、置換化脂肪族、典型的にはアルキル、置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル及び置換化低級アルキル、例えば低級アルキルハロゲン化物、環式、複素環、アリール及びヘテロアリール、 $-NR_{21}$  であり、ここで、 $R_{21}$  は水素、脂肪族、置換化脂肪族、典型的にはアルキル、置換化アルキル、更により典型的には低級アルキル及び置換化低級アルキル、例えば低級アルキルハロゲン化物、環式、複素環、アリール及びヘテロアリール、又は  $N-L-RG$  であり、ここで  $L$  はリンカー又は反応基、例えばアミンであり、更なる詳細はここで検討する通りである。

10

【0109】

また、 $R_6$  及び  $R_7$  は二重結合、例えば、カルボニルを形成するための酸素への二重結合を形成しうる。 $R_6$  及び / 又は  $R_7$  が  $-L-RG$  でない場合、少なくとも1つの  $R$  置換基は、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に結合される。

20

【0110】

また、 $B$  環は少なくとも1つの更なる不飽和部位を含みうる。例えば、 $R_5$  及び  $R_{12}$  は二重結合を形成しうる。

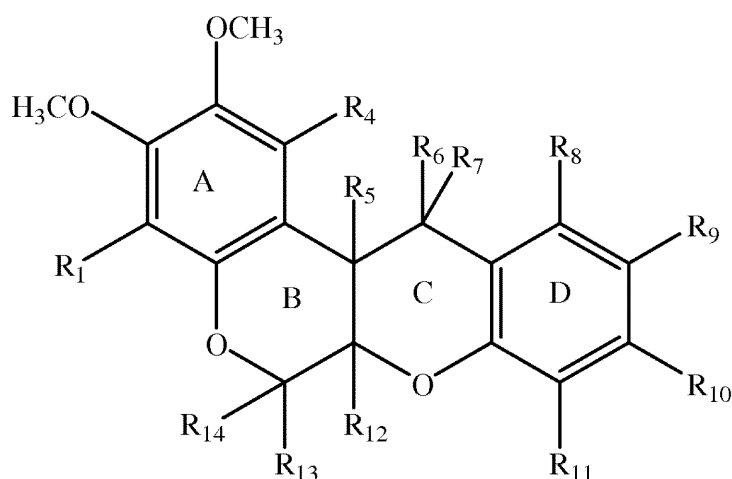
【0111】

$R_{10}$  及び  $R_{11}$  は5 - 又は6員の環に連結されうる。例えば、 $R_{10}$  及び  $R_{11}$  はピラン又はフラン環を定義し得、より具体的には置換化及び / 又は不飽和ピラン又はフラン環である。

30

【0112】

また、本発明の特定の例示的なロテノンベースのハプテンは、典型的には次の第二一般式を満たす。



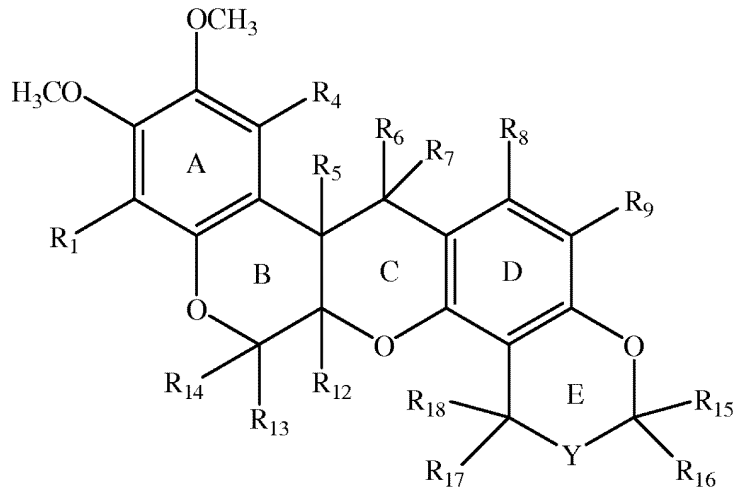
40

この第二一般式に関して、 $R$  置換基は上記した通りである。 $R_6$  又は  $R_7$  が  $-L-RG$  でない場合、少なくとも1つの残りの  $R$  基は、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に結合される。

【0113】

50

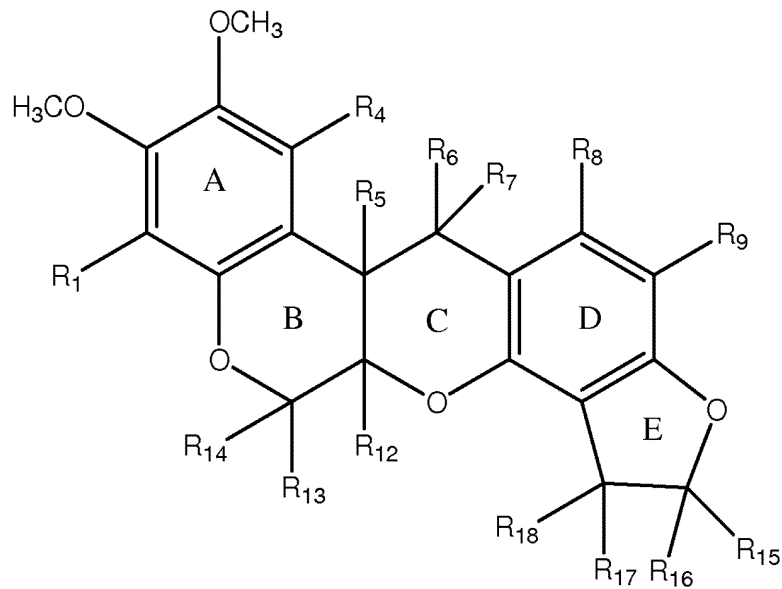
$R_{10}$  及び  $R_{11}$  は 5 - 又は 6 員の環、例えばピラン又はフラン、及びより具体的には置換化及び / 又は不飽和ピラン又はフラン環に連結されうる。よって、本発明の特定のロテノンベースのハプテンの記載に有用な第三一般式を下に提供し、ここで、R 置換基は上記した通りである。



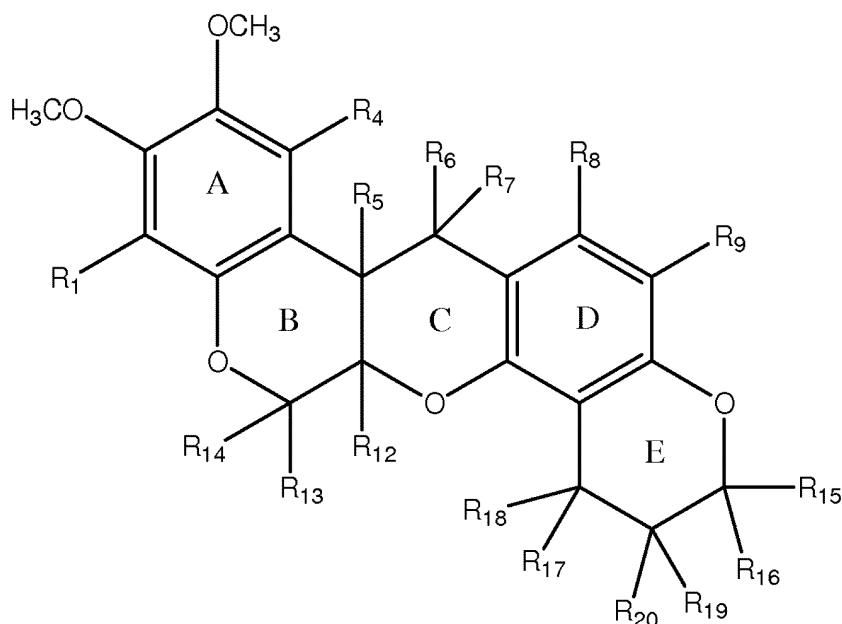
10

下に示すように、Y は結合であってそれによって 5 員の環を定義するか、又は  $R_{19}$  及び  $R_{20}$  置換基を持つ 6 員の環における炭素原子であり、ここで R 置換基は上記した通りである。

20



30



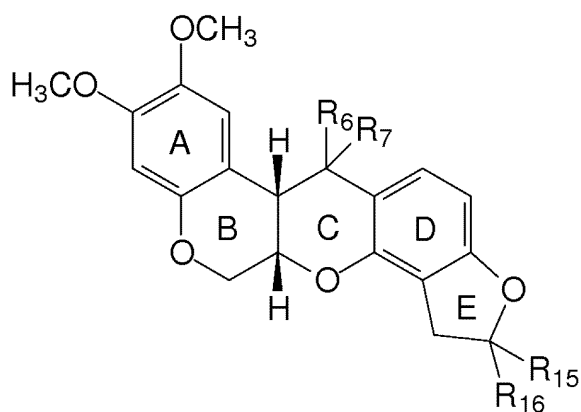
10

環接合部の  $R_5$  及び  $R_{12}$  を、特定の立体化学を示すことなく示している。天然に生じる化合物は *cis*-環接合部を有するが、ラセミ混合物も本発明の実施に有用である。トランス立体異性体も、素早く平衡化されラセミ混合物を形成しうる。

20

## 【0114】

このクラスの化合物の作用実施態様は、より典型的には次の第三一般式を満たす。

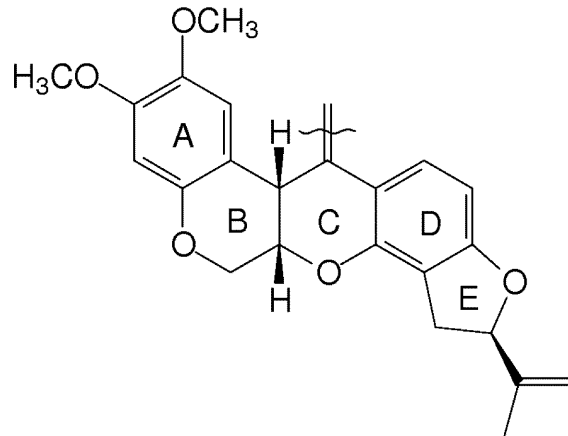


30

## 【0115】

この一般式に関して、 $R_6$  及び  $R_7$  は水素、アルキルであるか、酸素等に対し二重結合を定義しカルボニルを形成する。 $R_{15}$  及び  $R_{16}$  は独立して水素及び脂肪族、典型的には低級脂肪族、例えばアルケニルであり、その一例はイソプレンであり、下に示す。

40



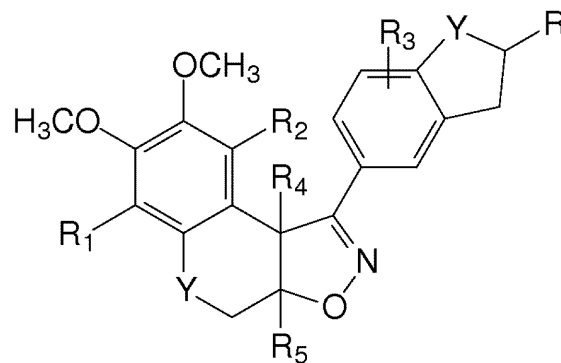
10

また、特定のエナンチオマーが上式に示されているが、当業者は、発明の範囲が、示した特定のエナンチオマーに限定されないことを理解するだろう。代わりに、ハブテンとして作用する全立体異性体もまた、開示の範囲内である。このクラスの化合物について上で検討した全置換が、この特定の化合物に適用される。他の置換も当業者には容易に明瞭である。例えば、A環におけるメトキシ基は、任意のアルコキシ化合物、特定の低級アルコキシ基でありうる。イソプレヌニットはまた、リンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのハブテンのカップリングについて、おそらく他の位置、又は少なくとも第二位置を

20

## 【0116】

本発明のロテノンベースのハブテンを記述する第四一般式は、下に提供するように、特にロテノンイソキサゾリンを対象にする。



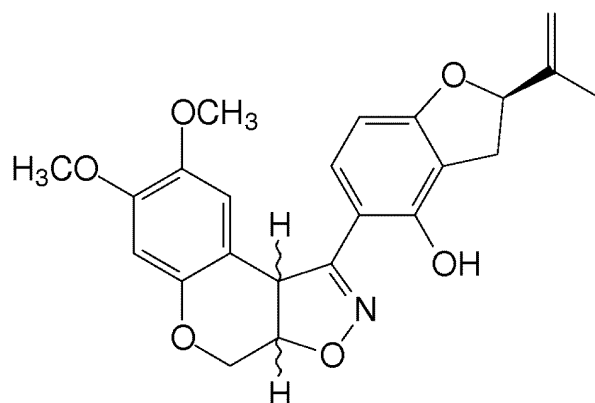
30

R - R<sub>5</sub> は上記の通りであり、更に全ての分岐鎖脂肪族異性体を含む。少なくとも1つのR - R<sub>5</sub> 置換基はまた、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に結合されている。Yは酸素、窒素、又は硫黄である。

40

## 【0117】

この第四一般式を満たすロテノンベースのハブテンの特定の作用実施態様を下に提供する。

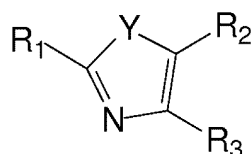


10

## 【0118】

## 7. オキサゾール及びチアゾール

オキサゾール及びチアゾールスルホンアミドは、発明の範囲である他のクラスのハプテンを提供する。オキサゾール及びチアゾールスルホンアミドの一般式を下に提供する。



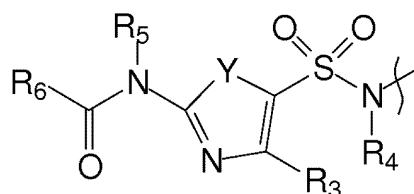
20

この第一一般式に関して、 $R_1 - R_3$  は上記した通りである。2以上のこれらの $R_1 - R_3$ 置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子である。少なくとも1つの $R_1 - R_3$ 置換基は、リンカーに結合されているか、又はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適切な官能基である。Yは酸素又は硫黄、典型的には硫黄である。

## 【0119】

特定の例示的な作用実施態様では、 $R_1$ はアミドであり、例えば下に示すアミド誘導体であった。 $R_2$ はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングの位置を提供するが、 $R_1$ 及び $R_2$ によって示される位置はまた、リンカー及び/又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングのための別の、又は更なる位置を提供する。特定の作用実施態様の $R_2$ は、 $-SO_2$ であり、スルホンアミドを形成することによってリンカーをカップリングするために使用された。よって、このクラスのハプテンを例示するハプテンの作用実施態様のための第二一般式を下に示し、ここで、 $R_3 - R_6$ 置換基及びYは上記した通りである。

30

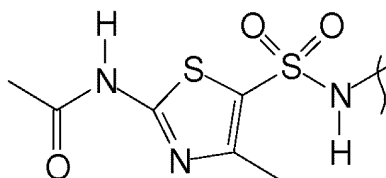


40

特定の作用実施態様 $R_6$ はアルキル、特に低級アルキル、例えばメチルであり、Yは硫黄であった。

## 【0120】

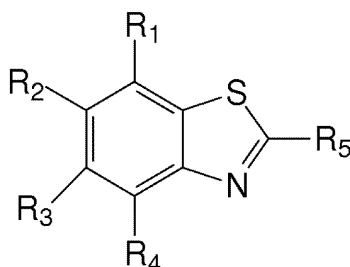
このクラスのハプテンによる化合物の一作用実施態様は、次の化学構造を有した。



## 【 0 1 2 1 】

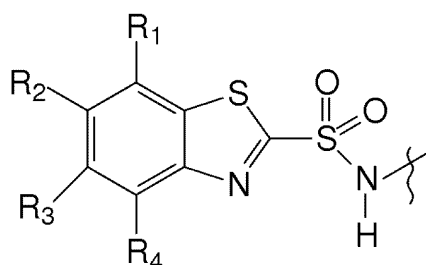
チアゾール又はオキサゾールはまた、より大きな環系の一部でありうる。例えば、5員  
のオキサゾール又はチアゾールは、少なくとも1つの異なる環、例えばフェニル環にカップ  
リングされ得、下に示す。

10



R<sub>1</sub> - R<sub>5</sub> 基は一般的に上記の通りでありうるが、このような化合物はまた、リンカー及  
び / 又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングのための位置、例えば R<sub>5</sub> を提供  
する。一つの可能なスルホンアミド誘導体を下に提供する。

20

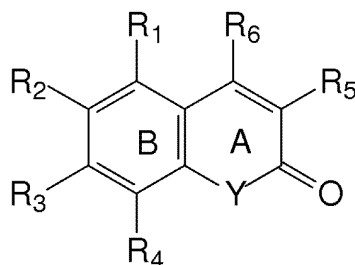


## 【 0 1 2 2 】

30

## 8. クマリン

クマリン及びクマリン誘導体は、発明の範囲内であるハブテンの他のクラスを提供する  
。クマリン及びクマリン誘導体の一般式を下に提供する。

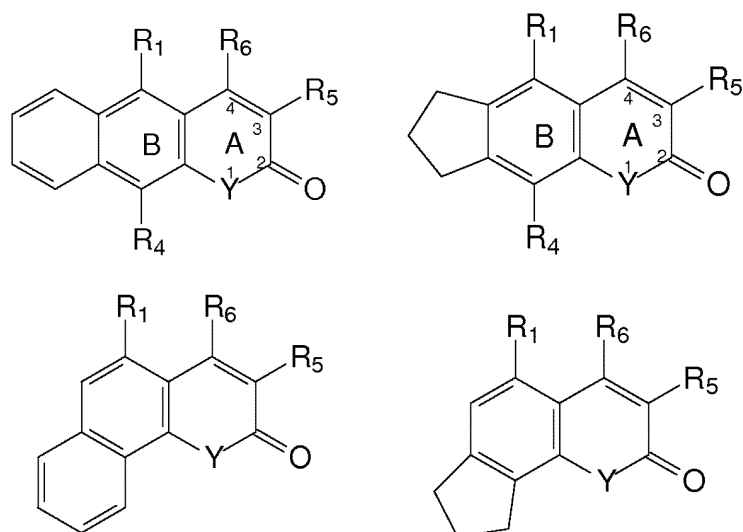


40

この一般式に関し、R<sub>1</sub> - R<sub>6</sub> は上記した通りである。少なくとも1つの R<sub>1</sub> - R<sub>6</sub> 置  
換基がまた典型的には、リンカー又はチラミン又はチラミン誘導体に結合されている。特  
定の作用実施態様は、リンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングにつ  
いて、R<sub>5</sub> 置換基を有するとして示されている位置を使用した。4位置は、蛍光がこれらの  
化合物を検出するために使用される場合、重要でありうる。4位置での水素以外の置換基  
は、蛍光をクエンチすると信じられているが、このような誘導体は依然として発色団であ  
りうる。Yは酸素、窒素又は硫黄である。このような化合物の形成に利用可能な2以上の  
R<sub>1</sub> - R<sub>6</sub> 置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系にお  
ける原子、典型的には炭素原子でありうる。これらのタイプの化合物の例示的な実施態様

50

を下に提供する。



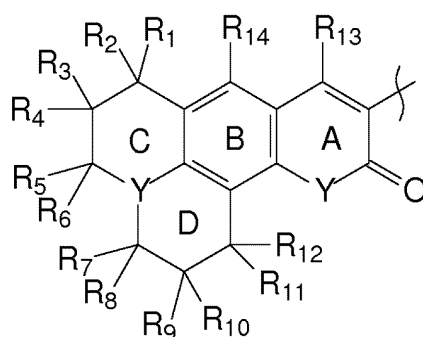
10

当業者は、環が複素環及び / 又はヘテロアリアルであることを理解するだろう。

【 0 1 2 3 】

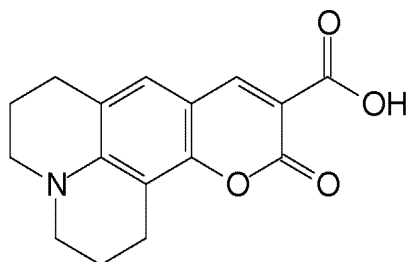
作用実施態様は典型的には、少なくとも1つのリンカー、チラミン又はチラミン誘導体カップリング位置を有する縮合 A - D 環系であり、一つの可能なカップリング位置を下に示す。

20



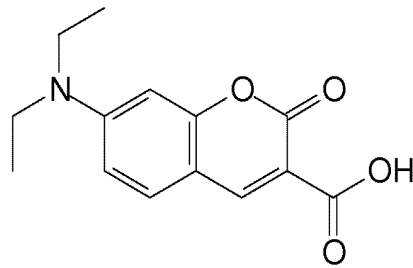
30

この一般式に関して、R 及び Y 可変基は上記した通りである。最も典型的には、R<sub>1</sub> - R<sub>14</sub> は独立して水素又は低級アルキルである。クマリンベースのハプテンの特定の実施態様は、2,3,6,7-テトラヒドロ-11-オキソ-1H,5H,11H-[1]ベンゾピラノ[6,7,8-ij]キノリジン-10-カルボン酸



40

及び 7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸



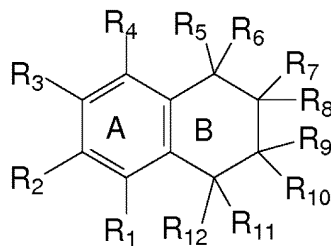
を含む。

【 0 1 2 4 】

10

### 9 . シクロリグナン

リグニンベースの化合物、特にシクロリグナン、例えばポドフィロトキシン及びその誘導体は、発明の範囲内である他のクラスのハブテンを提供する。これらのシクロリグナンベースの誘導体の第一一般式を下に提供する。



20

多くの刊行物が、本発明の実施に有用なシクロリグナンの属を記述するのに有用な、天然に生じる半合成及び合成シクロリグナンに言及しており：Stephanie Desbene and Sylviane Giorgi-Renault, *Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The Particular Case of Podophyllotoxin and Analogues*, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2, 71-90 (2002); M. Gordaliza et al., *Podophyllotoxin: Distribution, Sources, Applications and New Cytotoxic Derivatives*, *Toxicol.*, 44, 441-459 (2004); Phillipe Merresse et al., *Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry*, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2443-2466 (2004); M. Pujol et al., *Synthesis and Biological Activity of New Class of Dioxygenated Anticancer Agents*, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 5, 215-237 (2005); and Youngjae You, *Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents*, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1695-1717 (2005); を含み、その各々を出典明記によってここに援用する。

30

【 0 1 2 5 】

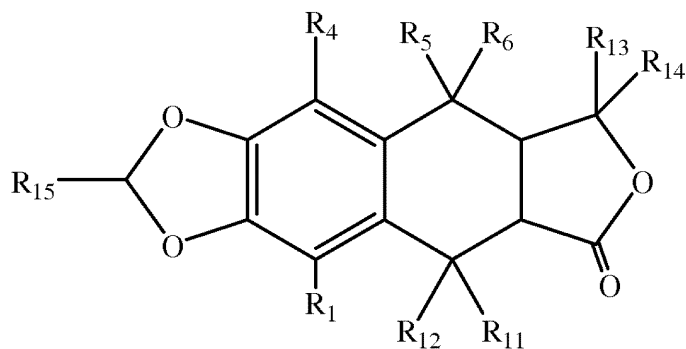
本開示及び作用実施態様、並びにこれらの先行刊行物によって提供されている開示に基づき、また、この第一一般式に関し、 $R_1 - R_{12}$  は上記した通りである。少なくとも1つの  $R_1 - R_{12}$  は、リンカー、又はチラミン又はチラミン誘導体への化合物のカップリングの位置を提供する。更に、特定の R 基は環系における原子でありうる。例えば、 $R_2$  及び  $R_3$ 、並びに2つの  $R_7 - R_{10}$  は、環系において連結されうる。少なくとも1つの  $R_{12}$  及び  $R_{11}$  もしばしばアリール基、例えばベンゼン環又は置換化ベンゼン環である。

40

【 0 1 2 6 】

また、特定の作用実施態様は次の第二一般式を満たし、ここで R 置換基は上記した通りである。

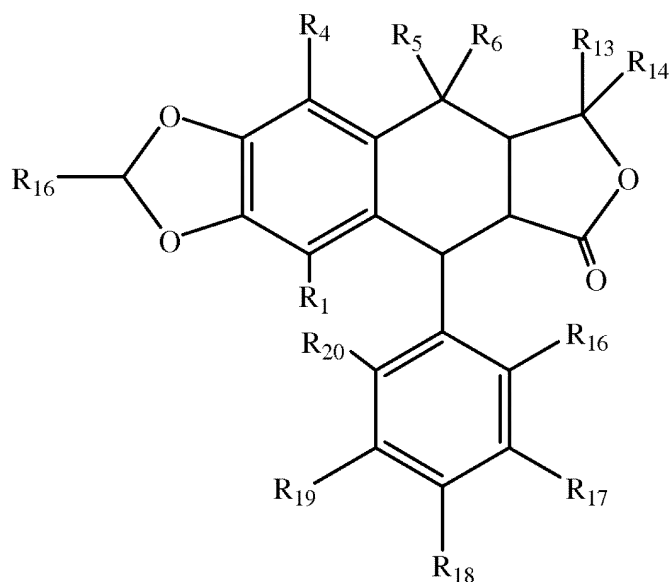




10

## 【0127】

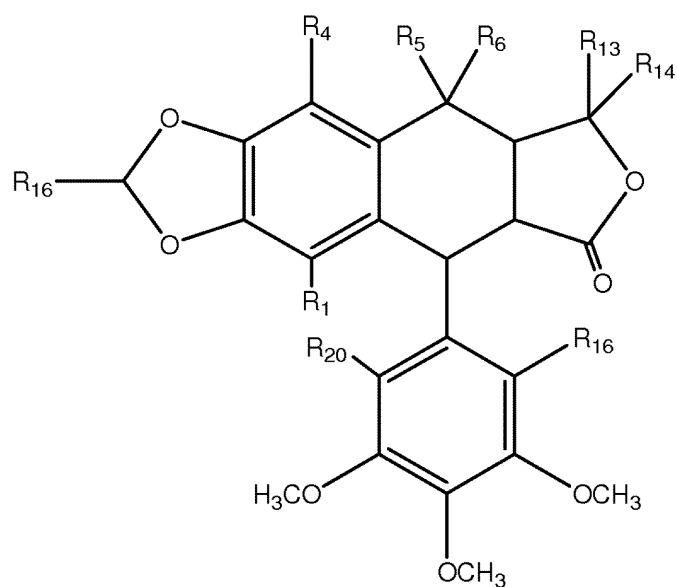
少なくとも1つのR<sub>11</sub>及びR<sub>12</sub>がアリール基である例示的な化合物は次の一般式を有し、ここでR置換基は上記した通りである。



20

R<sub>16</sub> - R<sub>20</sub>は一般的に上記した通りであるが、より典型的には独立して水素又はアルコキシ、典型的には低級アルコキシ、例えばメトキシであり、下に示す。

30



40

少なくとも1つのR置換基は典型的には、リンカーに結合されているか、リンカーと反応可能な反応性官能基であるか、又は-L-RGである。例えば、R<sub>5</sub>はしばしば-L-

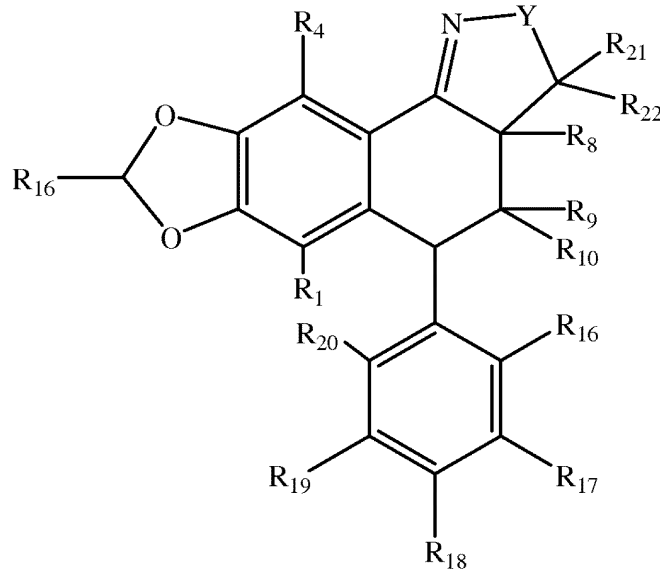
50

R Gである。

【 0 1 2 8 】

R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> はまた二重結合を形成し得、例えば、カルボニル官能基を形成する酸素への二重結合、又はイミンを形成する窒素原子への二重結合である。R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> が二重結合を形成する特定の例示的な化合物は次の一般式を有し、ここで、残りの R 置換基は上記した通りである。Y は窒素、酸素又は硫黄から選択される。Y が窒素である場合、窒素原子は、それに結合される水素、又は水素以外の幾つかの原子、官能基又は化学的部分を更に有しうる。例えば、窒素は、脂肪族置換基、例えばアルキル基、アリール又はヘテロアリール置換基、又は置換化アリール又はヘテロアリール置換基、例えばアルキル及び / 又はアルコキシ置換化アリール又はヘテロアリール置換基を有しうる。

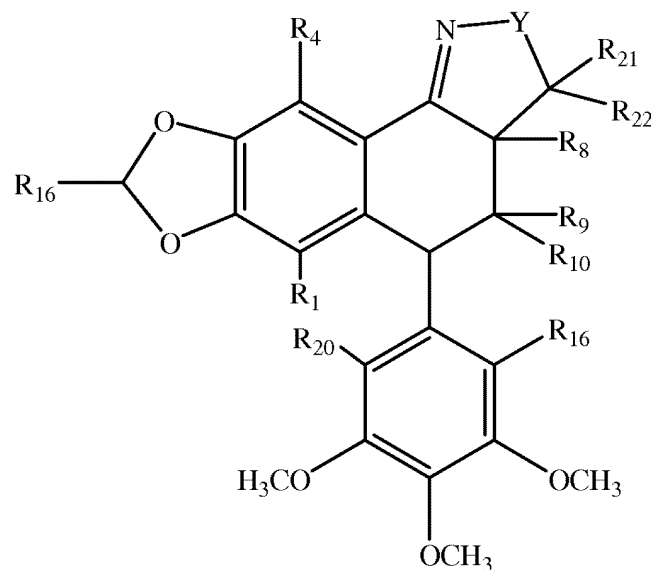
10



20

R<sub>16</sub> - R<sub>20</sub> は独立して、水素及びアルコキシ、より典型的には低級アルコキシ、例えばメトキシから選択され、下に示す。

30



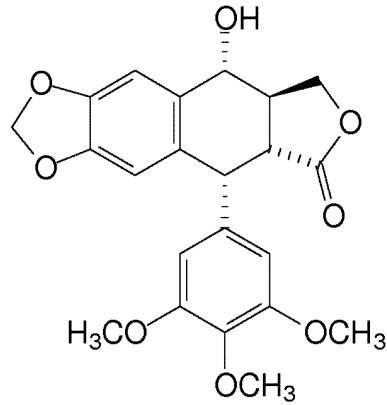
40

本発明の全てのハブテンコンジュゲートと同様に、少なくとも1つの R 置換基は、典型的にはリンカーに結合されるか、リンカーと反応可能な反応性官能基であるか、- L - R Gであるか、又はチラミン又はチラミン誘導体に直接結合されている。例えば、R<sub>9</sub> はしばしば - L - R Gである。

【 0 1 2 9 】

50

このシクロリグナンクラスのハブテンを例示する化合物であるポドフィロトキシンの化学構造を下に提供する。



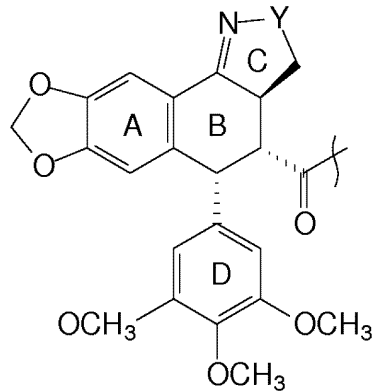
10

ポドフィロックスとも称されるポドフィロトキシンは、414.40の分子量、 $C_{22}H_{22}O_8$ の組成式を有する非アルカロイド毒素である。ポドフィロトキシンは、アメリカハッカクレンポドフィルム (American Mayapple *Podophyllum peltatum*) の根茎に、重さで0.3 ~ 1.0%の濃度で存在する。ポドフィロトキシンの融点は183.3 - 184.0である。

【0130】

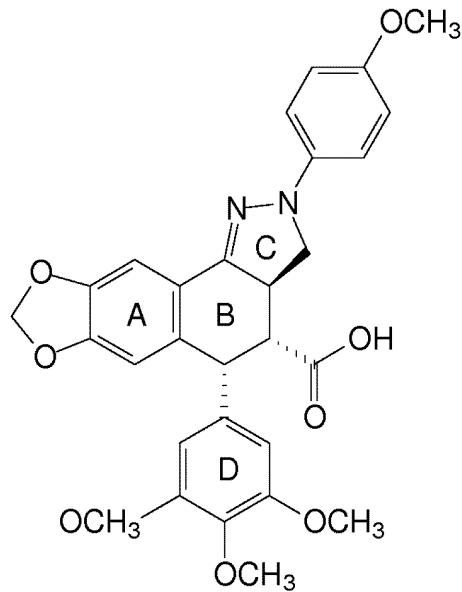
20

従って、本発明によるシクロリグナンは実質的に、次の一般式を有するポドフィロトキシン構造に基づき、Yは窒素、酸素又は硫黄から選択される。



30

本発明によるシクロリグナンハブテンの具体的な例を下に示す。



10

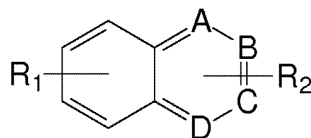
この化合物を、ポドフィロトキシンから開始して作成した。ポドフィロトキシンのヒドロキシル基を酸化し、ケトンにした。次いで、ケトン置換化ヒドラジンと反応させ、上記の化合物を生成した。ヒドラジン試薬は、所望により置換可能であり、脂肪族及びアリアル置換基を含む。

20

【0131】

## 10. ヘテロビアリアル

本発明の他の一般的なクラスのプロテンは、ヘテロビアリアル化合物、典型的にはフェニルキノリン及びキノキサリンである。開示のヘテロビアリアル化合物は、下記の第一の一般的な化学式を有する。



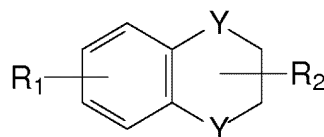
30

この一般式に関し、A - Dは、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、及びそのすべての組合せから選択される。最も典型的にはA - Dは炭素又は窒素であり、置換又は非置換でありうる。R<sub>1</sub> - R<sub>2</sub>は上記した通りであり、アルコキシアリアル、例えばメトキシアリアル及びエトキシアリアルを更に含む。2以上のR<sub>1</sub> - R<sub>2</sub>置換基、最も典型的には複数のR<sub>1</sub>置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。少なくとも1つのR<sub>1</sub> - R<sub>2</sub>置換基は典型的には、リンカーに、又はチラミン又はチラミン誘導体に直接結合されている。

【0132】

ヘテロビアリアル化合物の特定の実施態様は、次の式を有する。

40

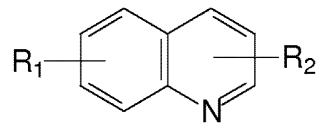


R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、第一一般式について上記した通りである。Yは酸素、窒素又は硫黄であり、典型的には窒素である。Yが窒素である場合、式はまた、一又は複数の窒素原子への二重結合を含みうる。

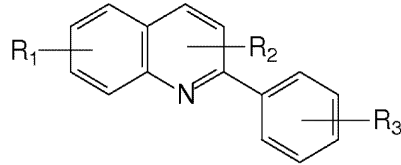
【0133】

単一ヘテロ原子を有する化合物は、次のような、フェニルキノリンに例示される。

50

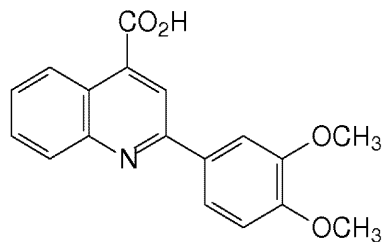


より具体的な実施態様は、次の一般式に例示されるアリール置換化ハブテンを含む。



10

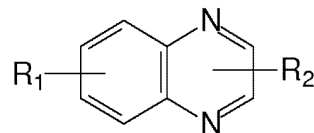
この一般式に関し、R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub> は上記した通りである。より典型的には、R<sub>1</sub> は水素であり、R<sub>2</sub> はアシルであり、また R<sub>3</sub> はアルコキシである。特定の例、2 - (3,4 - ジメトキシフェニル)キノリン - 4 - カルボン酸を下に提供する。



20

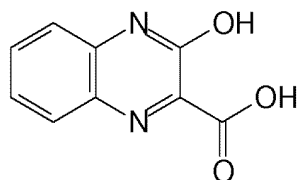
#### 【0134】

2つのヘテロ原子を有する化合物は、下の一般式に示すキノキサリンに代表される。



30

また、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> 置換基は、このクラスの本発明のハブテンに関して、上記した通りである。本発明のビアリール-ジヘテロ原子ハブテンの特定の例は、下の3-ヒドロキシ-2-キノキサリンカルバミドに例示される。

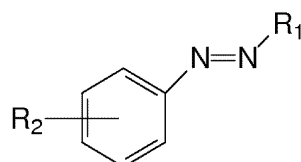


40

#### 【0135】

##### 11. アゾアリール

本発明の他の一般的なクラスの本発明のハブテンは、アゾアリール化合物、例えば下の第一一般化学式を有するアゾベンゼンである。



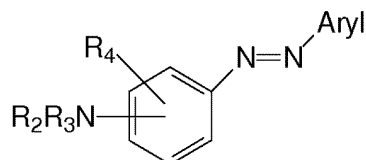
R<sub>1</sub> - R<sub>2</sub> は上記した通りであり、アルコシアリール、例えばメトシアリール及び

50

エトキシアリールを更に含む。また、2以上の $R_2$ 置換基は、図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。例えば、2 $R_2$ 置換基は、縮合フェニル環、又は縮合複素環又はヘテロアリール構造を形成しうる。

【0136】

特定の開示のアゾアリール化合物は、第一アミン置換基及び第二アリール置換基を有する。これらの化合物は典型的には、次の式を有する。

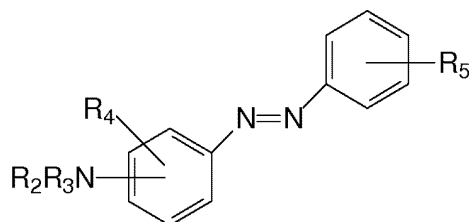


10

この一般式に関し、 $R_2 - R_4$ はこのクラスのプロテンに関して上記した通りであり、特定の実施態様は、 $R_2 - R_3$ 脂肪族、具体的にはアルキル、より具体的には低級アルキル、及び $R_4$ 水素を有する。

【0137】

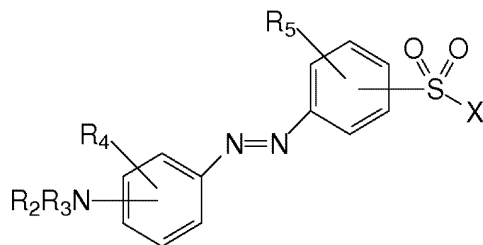
アゾアリール化合物を記載する第三一般式を下に提供する。



20

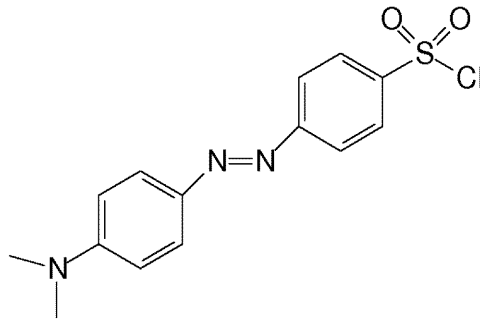
$R_2 - R_5$ は、この特定のクラスのプロテンについて上記した通りである。少なくとも1つの $R_2 - R_5$ は、コンジュゲートを形成するための、アゾアリールプロテンへのリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体のカップリングのための位置を定義する。例えば、 $R_5$ はハロゲン化スルホニル官能基でありうる。例えば下に示すようなハロゲン化スルホニルは、アゾアリールプロテンへのリンカーのカップリングに有用な官能基である。

30



この式に関して、 $R_2 - R_5$ は上記した通りである。 $X$ はハロゲン化物である。これらのアゾアリールプロテンの特定の実施態様、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホニルクロライドは下に提供する式を有する。

40

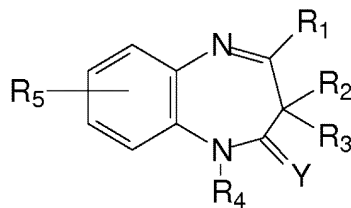


10

## 【0138】

## 12. ベンゾジアゼピン

本発明による他のクラスのハブテンは、下に示す第一一般式を有するベンゾジアゼピンハブテンである。



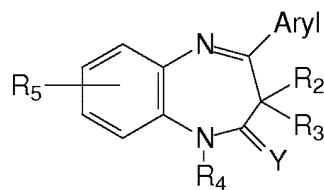
20

$R_1 - R_5$  は上記した通りである。また、2以上の $R_5$ 置換基は図示した一般式を有する化合物に結合又は縮合されている環系における原子、典型的には炭素原子でありうる。少なくとも1つの $R_1 - R_5$ 位置は、リンカーに結合されているか、又はリンカー又はチラミン又はチラミン誘導体へのカップリングに適切な官能基によって占有される。 $R_1 - R_5$ は最も典型的には脂肪族、アリール、水素、又はヒドロキシル、更により典型的にはアルキル、水素又はフェニルである。Yは酸素又は硫黄、最も典型的には酸素である。

## 【0139】

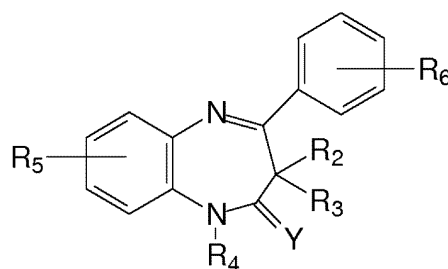
ベンゾジアゼピンハブテンの特定の実施態様は、下に示すように $R_1$ アリールを有する。

30



これらの実施態様について、 $R_2 - R_5$ はこのクラスのハブテンについて上記した通りであり、より典型的には、このような置換基は独立して、脂肪族、特にアルキル、水素及びヒドロキシルから選択される。特定の開示の実施態様は、下に示すようにフェニル化合物である。

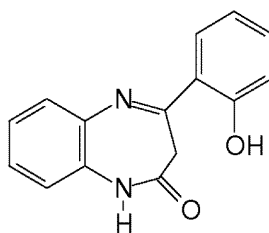
40



また、 $R_2 - R_6$ は上記した通りであるが、より典型的には、このような置換基は独立して、脂肪族、特にアルキル、水素及びヒドロキシルから選択される。特定の開示の実施

50

態様はフェニル化合物であり、下に示す。特定の実施態様、4-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-2(3H)-オンを下に提供する。



10

### 【0140】

#### III. リンカー

##### 1. 一般

一般式に示されるように

ハブテン-任意リンカー-チラミン/チラミン誘導体

本出願のコンジュゲートは、リンカーを含みうる。この目的のために現在知られているか、又は将来開発される任意のリンカーが、ここに開示のハブテンにカップリングすることによって本発明のコンジュゲートを形成するために使用できる。有用なリンカーは、ホモ-又はヘテロ二官能性でありうるが、より典型的にはヘテロ二官能性である。

20

### 【0141】

##### 2. 脂肪族

単に例であって限定するものではないが、開示のハブテンコンジュゲートの形成に適切な第一クラスのリンカーは、脂肪族化合物、例えば-又は複数の不飽和部位を有する脂肪族炭化水素鎖、又はアルキル鎖である。脂肪族鎖はまた典型的には末端官能基を含み、例であって限定するものではないが、ハブテン及び他の所望の化合物、例えばチラミンへのカップリングを容易にするカルボニル-反応基、アミン-反応基、チオール-反応基又は光-反応基を含む。鎖の長さは様々であり得るが典型的には、約30原子の上限実用限界を有する。約30炭素原子より長い鎖連鎖は、より小さい鎖連鎖を有する化合物より効果的でないことが証明されている。よって、脂肪族鎖リンカーは、典型的には、約1炭素原子~約30炭素原子の鎖長を有する。しかしながら当業者は、特定のリンカーが30を超える原子を有し、依然としてチラミン又はチラミン誘導体へのハブテンの結合に効果的に作用し、依然としてコンジュゲートが所望するように機能する場合、このような鎖は発明の範囲内であることを理解するだろう。

30

### 【0142】

##### 3. アルキレンオキシド

本開示の実施態様の実施に有用な第二クラスのリンカーは、アルキレンオキシドである。アルキレンオキシドは、グリコール、例えばエチレングリコールを参照することによってここに代表される。本発明のハブテンコンジュゲートは、リンカーの親水性がそれらの炭化水素鎖と比較して増加する場合、特に有用であると証明された。結果として、アルキレンオキシド、例えばグリコールは、この発明の実施に有用であると証明された。当業者は、酸素原子の数が増加すると、化合物の親水性も増加しうることを理解するだろう。よって、本発明のリンカーは典型的には $(-OCH_2CH_2O-)_n$ の式を有し、ここでnは約2~約15であるが、より具体的には約2~約8である。

40

### 【0143】

本発明の特定の開示の実施態様の実施に有用なヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーは、譲受人の同時係属出願に開示されており、"Nanoparticle Conjugates," U.S. Patent Application No.11/413,778, filed April 28, 2006; "Antibody Conjugates," U.S. Application No. 11/413,418, filed April 27, 2006; and "Molecular Conjugate," U.S. Application No. 11/603,425, filed November 21, 2006を含み、全てのその出願を出典明記によってここに援用する。当業者は、これらの出願に開示のリンカーが

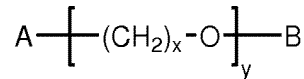
50



、特定の結合部分、シグナル生成部分、及びハプテンを、全ての所望の組合せにおいて連結するために使用できることを理解するだろう。ヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーを下に開示し、それらの使用は、ハプテン及び検出可能な標識へのチラミンのカップリングを参照することによって例示される。

【0144】

開示のコンジュゲートとの使用のためのリンカーの一特定の実施態様は、下に示す一般構造を有するヘテロ二官能性ポリアルキレングリコールリンカーであり：



10

ここで、A及びBは異なる反応基を含み、xは2～10（例えば2、3又は4）の整数であり、そしてyは1～50、例えば2～30、例えば3～20又は4～12の整数である。—又は複数の水素原子は、更なる官能基、例えばヒドロキシル基、アルコキシ基（例えばメトキシ及びエトキシ）、ハロゲン原子（F、Cl、Br、I）、スルファト基及びアミノ基（モノ-及びジ-置換化アミノ基、例えばジアルキルアミノ基を含む）と置換される。

【0145】

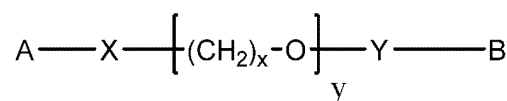
リンカーのA及びBは独立して、カルボニル-反応基、アミン-反応基、チオール-反応基又は光-反応基を含むが、同じではない。カルボニル-反応基の例は、アルデヒド-及びケトン-反応基、例えばヒドラジン誘導体及びアミンを含む。アミン-反応基の例は、活性エステル、例えばNHS又はスルホ-NHS、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、スルホニルクロリド、アルデヒド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、炭酸、ハロゲン化アリール、イミドエステル、無水物及び同様なものを含む。チオール-反応基の例は、非重合性マイケルアクセプター、ハロアセチル基（例えばヨードアセチル）、ハロゲン化アルキル、マレイミド、アジリジン、アクリロイル基、ビニルスルホン、ベンゾキノン、求核性置換を受けうる芳香族基、例えばフルオロベンゼン基（例えばテトラ及びペンタフルオロベンゼン基）、及びジスルフィド基、例えばピリジルジスルフィド基及びエルマン試薬で活性化されるチオールを含む。光-反応基の例は、アリールアジド及びハロゲン化アリールアジドを含む。あるいは、A及び/又はBは、特定タイプの反応基と反応する官能基でありうる。例えば、A及び/又はBは、アミン基、チオール基、又はカルボニル-含有基であり得、それは、ハプテン及び/又はチラミン又はチラミン誘導体に導入されているか、そうでなければ存在する対応する反応基（例えばそれぞれアミン-反応基、チオール-反応基又はカルボニル-反応基）と反応するだろう。これらのタイプの基の各々の更なる例は、当業者に明瞭であろう。一タイプの反応基を他と交換するための反応条件及び方法に関する更なる例及び情報は、Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press, San Diego, 1996に提供されており、出典明記によってここに援用する。特定の実施態様では、チオール-反応基はビニルスルホン以外である。

20

30

【0146】

幾つかの実施態様では、ヘテロ二官能性リンカーは次の式を有し：



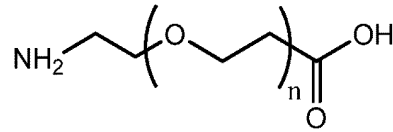
ここで、A及びBは異なる反応基であり、上記した通りであり；x及びyは上記した通りであり、X及びYは更なるスペーサ基であり、例えば、1及び10の間の炭素、例えば1及び6の間の炭素又は1及び4の間の炭素を有し、場合によっては—又は複数のアミド結合、エーテル結合、エステル結合及び同様なものを含むスペーサ基である。スペーサX及びYは同じであるか又は異なり得、直鎖、分岐又は環式（例えば、脂肪族又は芳香族環式構造）であり得、非置換又は置換でありうる。スペーサにおける置換基でありうる官能基

50

は、カルボニル基、ヒドロキシル基、ハロゲン（F、Cl、Br及びI）原子、アルコキシ基（例えばメトキシ及びエトキシ）、ニトロ基、及び硫酸基を含む。

【0147】

特定の実施態様では、ヘテロ二官能性リンカーは次の式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を含み、



ここで、 $n = 1 \sim 50$ 、例えば、 $n = 2 \sim 30$ 、例えば  $n = 3 \sim 20$  又は  $n = 4 \sim 12$  である。特定の実施態様では、 $n = 4$  又は  $8$  である。

【0148】

IV. ハプテンコンジュゲート

ハプテンコンジュゲートは、ハプテン、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分、及び場合によってはリンカーを含む。ある実施態様では、ハプテン及びリンカーは、ペルオキシダーゼ活性可能部分にコンジュゲートされており、一般式

ハプテン - 任意リンカー - ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分  
を有する。

【0149】

幾つかの実施態様では、ペルオキシダーゼ活性化可能アリール部分はチラミン又はチラミン誘導体である。ある実施態様では、ハプテン及び任意リンカーはチラミンにコンジュゲートされており、一般式

ハプテン - 任意リンカー - チラミン  
を有する。

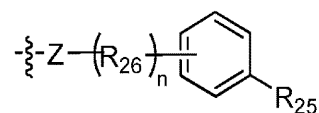
【0150】

他の実施態様では、ハプテン及び任意リンカーはチラミン誘導体にコンジュゲートされており、次の一般式を有する。

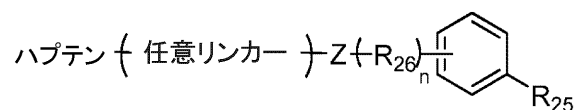
ハプテン - 任意リンカー - チラミン誘導体

【0151】

チラミン誘導体の実施態様は、一般式



を有し、ここで、 $R_{25}$  はヒドロキシル、エーテル、アミン、及び置換化アミンから選択され； $R_{26}$  はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、 $-OR_m$ 、 $-NR_m$ 、及び $-SR_m$ から選択され、ここで $m$ は $1 - 20$ であり； $n$ は $1 - 20$ であり； $Z$ は酸素、硫黄、又は $NR_a$ から選択され、ここで $R_a$ は水素、脂肪族、アリール、又はアルキルアリールから選択される。よって、コンジュゲート次の一般式を有する。



【0152】

幾つかの実施態様では、ハプテンは、オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、ポドフィロトキシンベースの化合物、及びその組合せから選択される。リンカーは、存在するならば、脂肪族、ヘテロ脂肪族、又はヘテロ二官能性でありうる。

【0153】

10

20

30

40

50

ある実施態様では、コンジュゲートは、下の表 1 に示すような一般式を有する。表 1 における各々の一般式では、各 R 基の置換基、X、Y、及び Z は、ハブテン、リンカー、及びチラミド誘導体の上記の検討において挙げた通りである。

表 1

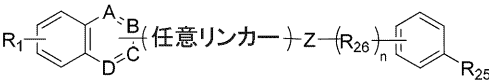
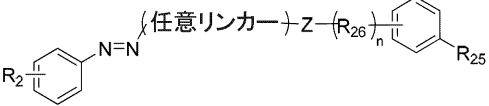
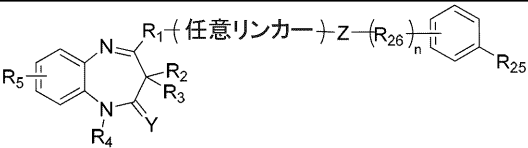
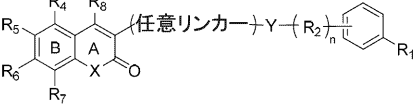
ハブテンクラス	一般式
アゾール	
ニトロアリアル	
ベンゾフラザン	
尿素/チオ尿素	
トリテルペン	
ロテノン	
オキサゾール/チアゾール スルホンアミド	
シクロリグナン	

10

20

30

40

ハブテンクラス	一般式
ヘテロビアリール	
アゾアリール	
ベンゾジアゼピン	
クマリン	

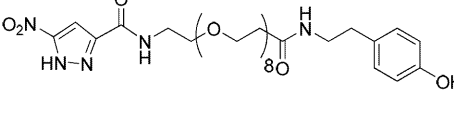
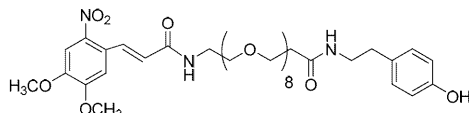
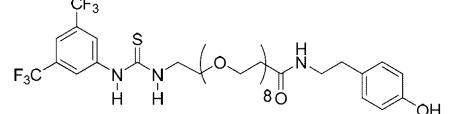
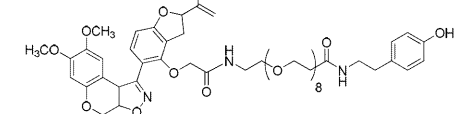
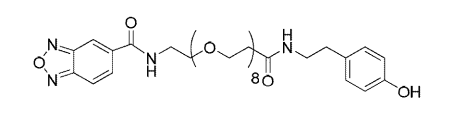
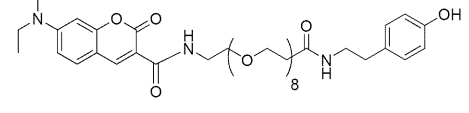
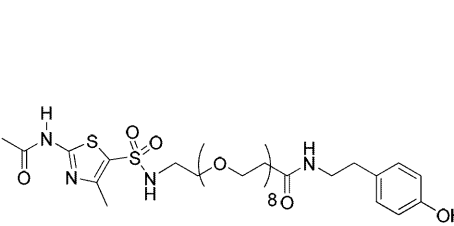
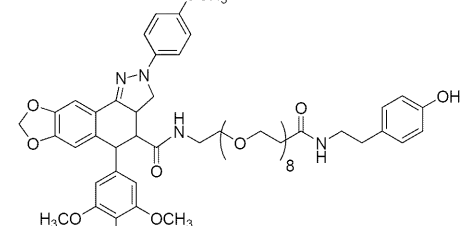
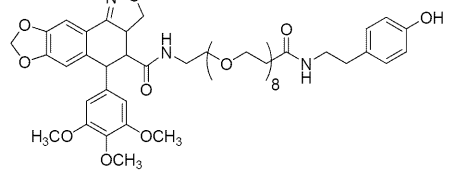
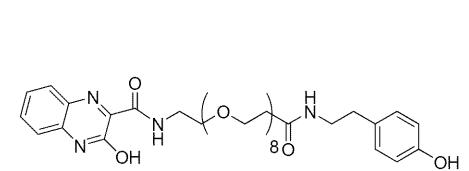
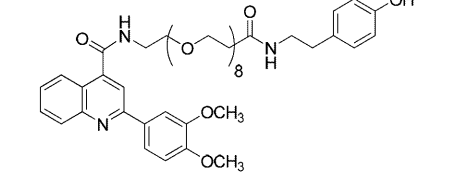
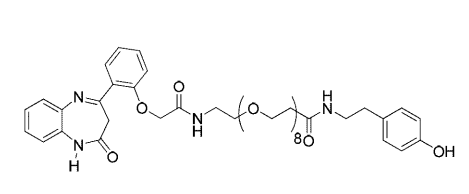
10

## 【 0 1 5 4 】

特定の実施態様では、コンジュゲートは、表 2 に示す式を有するハブテン - チラミドコンジュゲートである。

20

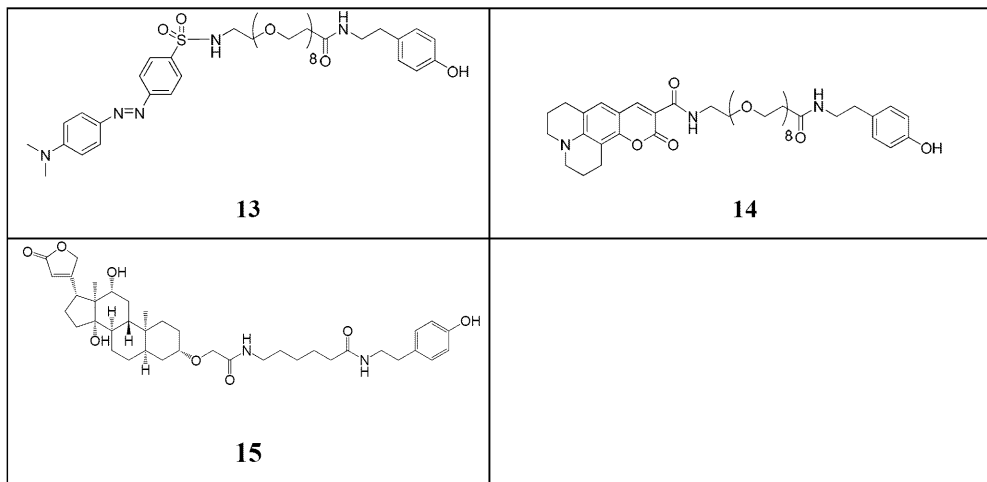
表 2

 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>3</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>8</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>9</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>11</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>12</b></p>

10

20

30



10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 5 】

## V . ハプテンコンジュゲートの生成方法

幾つかの実施態様では、求電子性官能基を有するか、又は求電子性官能基に転換できる官能基を有するハプテンは、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分を含んでなる化合物に、又はリンカー、例えば、脂肪族又はポリ(アルキレンオキシド)リンカーにコンジュゲートされている。ある実施態様では、ハプテンは、カルボン酸官能基を含み、これは、限定するものではないが、ハロゲン化アシル、エステル(例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル)、又は無水物等の、活性化された求電子性カルボニル含有官能基に転換される。ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分は、ハプテンの活性化求電子性官能基と反応できる求核性官能基(例えば、アミノ、ヒドロキシル、チオール、又はそれらから形成される陰イオン)を含む。ハプテンの求電子性基は、有機化学合成の当業者に知られている有機カップリング技術を使用して、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分の求核性基にカップリングできる。コンジュゲートがリンカーを含む実施態様では、リンカーは典型的には、一端に求核性官能基を有し、他端に求電子性官能基を有する。リンカーの求核性基はハプテンの求電子性基にカップリングされ得、リンカーの求電子性基は活性化され、有機化学合成の当業者に知られている有機カップリング技術を使用して、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分の求核性基にカップリングされうる。

## 【 0 1 5 6 】

一実施態様では、下のスキーム 1 に示すように、カルボン酸官能基を有するハプテンは、リンカーを介してチラミンにコンジュゲートされている。ハプテンは、N - ヒドロキシスクシンイミド(NHS)にカップリングされ、ハプテン - NHS エステルを生成する。反応は、ハプテン及び NHS が可溶性である溶媒において実施され；一適切な溶媒はジクロロメタンである。幾つかの実施態様では、N, N' - ジシクロヘキシル - カルボジイミドがカップリング剤として使用される。尿素副産物は濾過によって除去され、活性エステルは更に精製することなく使用されうる。

## 【 0 1 5 7 】

幾つかの実施態様では、ハプテン - NHS エステルはリンカーにカップリングされている。例えば、ハプテン - NHS エステルは、PEG アミノ酸を使用してポリエチレングリコール(PEG)リンカーにカップリングされ得、塩基条件下で(例えば、トリエチルアミン及びジクロロメタンの溶液中において)、PEG アミノ酸を用いる反応によって、対応するアミドに転換される。作用実施態様では、d PEG (登録商標) アミノ酸 (Quanta BioDesign Ltd., Powell, OH) を使用した。産物は、フラッシュクロマトグラフィーによって精製されうる。

## 【 0 1 5 8 】

ハプテン含有リンカーは、室温で NHS 及び N, N' - ジシクロヘキシル - カルボジイミドとの反応によって活性化され、カルボキシ - PEG - ハプテンの対応する NHS エ

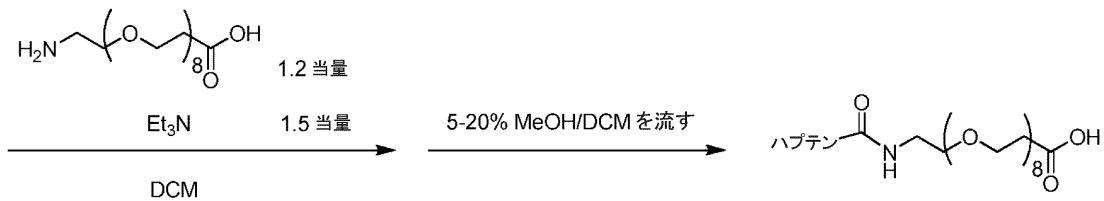
ステルを生成する。尿素副産物は濾過によって除去され、NHS エステルは更に精製することなく使用されうる。

【0159】

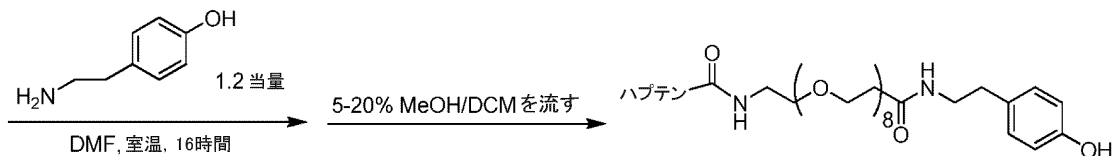
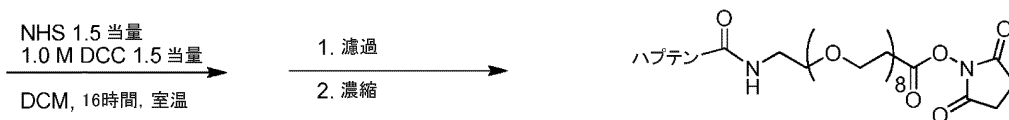
所望のハプテン-チラミドコンジュゲートは、NHS エステルのスクシンイミド部分の、チラミンとの置換によって得られる。反応は、NHS エステルが可溶性である溶媒中において実施され；一適切な溶媒はN, N'-ジメチルホルムアミド(DMF)である。産物はフラッシュクロマトグラフィーによって精製されうる。



10



20



30

スキーム1

【0160】

一実施態様では、ハプテンは3-ヒドロキシキノキサリン-2-カルボン酸であり、カップリング剤は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)である。ハプテン及びNHS エステルは、適切な溶媒、例えばDMFに溶解される。ハプテン-NHS エステルはDMFに不溶性であり、濾過によって収集できる。残りの反応はスキーム1に概要するように実施され、リンカーカップリングはDMF/トリエチルアミンにおいて実施される。

40

【0161】

V. ハプテンコンジュゲートの使用方法

開示のハプテンコンジュゲートの実施態様は、シグナル増幅アッセイにおいて利用できる。シグナル増幅は、固相にペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分を共有結合するために、ペルオキシダーゼ酵素の触媒活性を利用する。固相は、顕微鏡スライド等の基質に固定化されている細胞又は細胞構造のタンパク質成分でありうる。幾つかのペルオキシダーゼ酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)は、過酸化物の存在下において、特定化合物、例えばフェノール化合物の二量体化を、おそらくフリーラジカルの生成によって触媒する。よって、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分が、西洋ワサビペルオ

50

キシダーゼ及び過酸化物質（例えば、過酸化水素）の存在下において、タンパク質含有サンプルに加えられる場合、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分はフリーラジカルを形成し、その後、チロシンアミノ酸のフェノール基と二量体を形成する。しかしながら、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分を、所望の標的か又はその近位においてサンプルと特異的に結合することが所望される。この目的は、下に記載のように、酵素を標的領域上に固定化することによって達成される。固定化酵素に近位であるペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分のみが、固定化酵素の近傍、又は近位においてチロシン残基と反応し二量体を形成し、酵素自身におけるチロシン残基、酵素がコンジュゲートされている抗体におけるチロシン残基、及び/又は固定化酵素に近位、例えば固定化酵素の約100 nm内、約50 nm内、約10 nm内、又は約5 nm内であるサンプルにおけるチロシン残基を含む。例えば、チロシン残基は、固定化酵素から約10オングストローム～約100 nm、約10オングストローム～約50 nm、約10オングストローム～約10 nm、又は約10オングストローム～約5 nmの距離内でありうる。このような近位結合は、IHC及び/又はISHと使用される一般的な染色方法と少なくとも同程度の特異性で、標的が検出されることを可能にする。例えば、開示の方法の実施態様は、核膜対核領域、細胞膜対細胞質領域など、サブ細胞構造が区別されることを可能にする。

10

20

30

40

50

#### 【0162】

幾つかの実施態様では、ハプテンコンジュゲートは、チラミドシグナル増幅アッセイにおいて活用できるハプテン - チラミドコンジュゲートである。チラミドシグナル増幅は、*in situ*ハイブリダイゼーション (ISH)、免疫細胞化学、及び免疫組織化学 (IHC) 検出スキームと適合性のあるペルオキシダーゼベースのシグナル増幅システムである。チラミドシグナル増幅アッセイは、「直接的」又は「間接的」でありうる。直接的チラミドシグナル増幅アッセイは、標識、例えば蛍光標識がチラミンに結合し、標識 - チラミドコンジュゲートを形成する時に実施され、標識は、標識 - チラミドコンジュゲートがサンプルに結合された後に検出される。間接的チラミドシグナル増幅アッセイは、ハプテンがチラミンに結合される時に実施される。蛍光又は酵素標識された抗ハプテン抗体は、ハプテンを検出するために使用される。

#### 【0163】

開示の実施態様では、シグナル増幅アッセイは典型的には次の工程を含む：a) サンプル中における標的上に酵素を固定化する工程；b) 酵素がハプテンコンジュゲートと反応できるようにサンプルをハプテンコンジュゲートと接触させ、それによって固定化酵素に近位でサンプルへのハプテンコンジュゲートの結合を生じさせる工程；c) サンプルを、ハプテンに結合可能な標識された抗ハプテン抗体と接触させる工程；及びd) 任意の適切な手段によって標識された抗ハプテン抗体を検出することによって、サンプル中における標的を位置づけ又は可視化する工程。ある実施態様では、ハプテンコンジュゲートはハプテン - チラミドコンジュゲートである。標的は、その存在、位置及び/又は濃度が決定される任意の興味のある分子でありうる。興味のある分子の例は、タンパク質及び核酸配列を含む。

#### 【0164】

典型的にはサンプルは、タンパク質、例えば組織サンプルを有する。典型的には、固定化酵素は、ペルオキシダーゼ - 活性化可能アリール部分、例えばチラミドと反応できるペルオキシダーゼ酵素である。幾つかの実施態様では、酵素は、サンプルを標的に結合する酵素コンジュゲートでインキュベートすることによって標的上に固定化される。酵素は、標的に結合できる任意の部分にコンジュゲートされうる。適切な部分は、限定するものではないが、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、又はアミノ酸を含む。

#### 【0165】

他の実施態様では、酵素の固定化は複数工程プロセスである。例えば、サンプルは、標的に結合する第一部分（例えば、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、オリゴペプチド、ペプチド、又はアミノ酸）でインキュベートされうる。次いで、サンプルは、第一部分に結合できる部分を含んでなる酵素コンジュゲートでインキュベートさ



れうる。第一部分が標的に対する抗体である幾つかの実施態様では、該2工程プロセスはより多用途であり得、なぜなら使用者が「ユニバーサル」酵素-抗体コンジュゲートを使用することが可能であるからである。例えば、第一抗体がウサギモノクローナル抗体である場合、酵素-抗体コンジュゲートは、任意のウサギモノクローナル抗体に結合できる抗体を含みうる。複数工程プロセスは、各標的に適した酵素-抗体コンジュゲートを生成する必要を排除できる。

#### 【0166】

幾つかの実施態様では、第一部分は、標識されたプローブ、例えば標識されたオリゴヌクレオチドでありうる。プローブがサンプルにハイブリダイズされた後、標識を認識する第一抗体が導入され、標識されたプローブに結合する。第一抗体は酵素-抗体コンジュゲートでありうる。しかしながら、第一抗体が酵素にコンジュゲートされない場合、酵素-抗体コンジュゲートが導入され、ここで、コンジュゲートの抗体部分は、第一抗体を認識し結合する。

10

#### 【0167】

一旦、酵素がサンプルに固定化されたら、ハプテンコンジュゲートが、酵素がペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分と反応できる適切な条件下で導入される。典型的には、酵素はペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼである。よって、適切な条件は、過酸化物質（例えば、過酸化水素）を含み、また酵素にその所望の機能を実施させる塩濃度及びpHを有する反応バッファー、又は溶液を含む。反応は、酵素に適切な温度で実施される。例えば、酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼである場合、反応は35-40 で実施されうる。このような条件下で、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分は過酸化物質及び酵素と反応し、典型的には、固定化酵素自身内のチロシン残基を含む、固定化酵素に近位にチロシン残基に結合することによって、ペルオキシダーゼ-活性化可能アリアル部分は、サンプルに共有結合する活性形態に転換される。

20

#### 【0168】

図1は、固定化組織サンプル110に、ハプテンコンジュゲート、例えばハプテン-チラミドコンジュゲート100を結合する方法の一実施態様を示す概要図である。一次抗体120は、固定化組織サンプル110内においてエピトープ130に結合する。二次抗体140が導入され、一次抗体120に結合する。例えば、一次抗体がマウスIgG抗体である場合、二次抗体は、何れかのマウスIgG抗体に結合する抗マウス抗体でありうる。図1では、西洋ワサビペルオキシダーゼ-抗体コンジュゲート140は二次抗体を含む。ハプテン-チラミドコンジュゲート100を加える。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)及び過酸化物質（例えば、過酸化水素）の存在中において、ハプテン-チラミドコンジュゲート100は、酵素部位の近位に共有結合する。コンジュゲートは、西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体コンジュゲート140内のチロシン残基、一次抗体120内のチロシン残基、又は例えばサンプル110内のタンパク質150中におけるチロシン残基に結合できる。図1は、チラミンのフェノール基がタンパク質中におけるチロシン残基のフェノール基に結合する時に形成される二量体160を図示する。

30

#### 【0169】

ハプテンコンジュゲートがサンプルに結合した後、その存在は適切な手段によって検出される。幾つかの実施態様では、ハプテンは直接検出されうる。例えば、量子ドットにコンジュゲートされたハプテンは、特性波長で量子ドットの蛍光によって検出されうる。他の実施態様では、ハプテンは間接的に検出される。例えば、抗ハプテン抗体が導入され、ハプテンに結合されうる。ある実施態様では、抗ハプテン抗体は、抗体及び検出可能な標識を含んでなるコンジュゲートである。他の実施態様では、抗ハプテン抗体を認識する標識-抗体コンジュゲートがその後導入され、抗ハプテン抗体に結合される。標識は適切な手段によって検出される。

40

#### 【0170】

図2は、ハプテン-チラミド/チロシン二量体160を検出する方法の一実施態様を示す。抗ハプテン抗体170が導入される。抗ハプテン抗体170は典型的には、抗体及び

50

標識（例えば、フルオロフォア又は他の直接検出可能な標識）又は a n 酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ等）を含んでなるコンジュゲートである。図示する実施態様では、抗ハプテン抗体 170 は HRP - 抗体コンジュゲートである。抗ハプテン抗体 170 は、ハプテン - チラミド / チロシン二量体 160 のハプテン部分に結合する。次いで、抗ハプテン抗体 170 は任意の適切な手段によって検出される。例えば、抗ハプテン抗体が HRP - 抗体コンジュゲートである場合、3、3' - ジアミノベンジジン（DAB）アッセイが、HRP の発色検出に使用されうる。他の実施態様では、抗ハプテン抗体は、フルオロフォア - 抗体コンジュゲートであり得、フルオロフォア（例えば、量子ドット）はその蛍光によって検出されうる。

#### 【0171】

図3Aは、ハプテンコンジュゲートを使用して、サンプル中における標的オリゴヌクレオチド配列を検出する方法の一実施態様を示す。標的オリゴヌクレオチド配列を含むサンプル300が提供される。標識320（例えば、標識されたDNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドプローブ）を含む相補プローブ310が導入され、サンプル300中における標的配列に結合する。抗標識抗体 - 酵素コンジュゲート330（例えば、HRPにコンジュゲートされた抗標識抗体）が加えられ、標識320に結合する。ハプテンコンジュゲート、例えばハプテン - チラミドコンジュゲート340が導入される。HRP及び過酸化物の存在中において、ハプテンチラミドコンジュゲート340は、チロシン残基（例えば、抗体 - 酵素コンジュゲート330中、又はサンプル300内のチロシン残基）と反応し、抗体 - 酵素コンジュゲート330の近位に共有結合する。抗ハプテン抗体 - 標識コンジュゲート350が加えられ、ハプテン - チラミドコンジュゲート340に結合する。標識355が適切な手段によって検出される。作用実施態様では、標識355はQd655量子ドットであり、655nmでのその蛍光を蛍光顕微鏡を使用して検出した。

#### 【0172】

図3Bは、ハプテンコンジュゲートを使用して、サンプル中における標的オリゴヌクレオチド配列を検出する方法の他の実施態様を示す。標的オリゴヌクレオチド配列を含むサンプル300が提供される。標識320（例えば、標識されたDNA、RNA、又はオリゴヌクレオチドプローブ）を含む相補プローブ310が導入され、サンプル300中における標的配列に結合する。作用実施態様では、標識320はDNPであった。抗標識抗体332（例えば、抗DNP抗体）が加えられ、標識320に結合する。酵素 - 抗体コンジュゲート334（例えば、HRPにコンジュゲートされた抗体）がその後、抗体332に結合する。ハプテン - チラミドコンジュゲート340が導入される。HRP及び過酸化物の存在中において、ハプテン - チラミドコンジュゲート340は、チロシン残基（例えば、酵素 - 抗体コンジュゲート334中、抗体332中、又はサンプル300内におけるチロシン残基）と反応し、酵素 - 抗体コンジュゲート334に近位に共有結合する。抗ハプテン抗体352が加えられ、ハプテン - チラミドコンジュゲート340に結合する。次に、抗ハプテン抗体352を認識し、結合する標識された抗体360が加えられる。標識362は適切な手段によって検出される。作用実施態様では、標識362はQd655量子ドットであり、655nmでのその蛍光を蛍光顕微鏡を使用して検出した。

#### 【0173】

幾つかの実施態様では、ハプテンコンジュゲートは、サンプル中における異なるタンパク質及び/又はオリゴペプチド標的のマルチプレックス検出に使用される。マルチプレキシングは、免疫組織化学（IHC）、insituハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光IHC/ISH、又はその任意の組合せを用いて実施されうる。図4は、3つのタンパク質及び/又はオリゴペプチド標的のマルチプレックス検出の方法の一実施態様を示す。サンプル400は、複数の標的402、404、406を含む。第一抗体410は第一標的402に結合する。第一抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲート420が導入され、第一抗体410に結合する。第一ハプテンコンジュゲート430が加えられる。過酸化物及びペルオキシダーゼの存在中において、ハプテンコンジュゲート430は、第一標的402の近位に共有結合する。幾つかの実施態様では、第一抗体 - ペルオキシダーゼコ

10

20

30

40

50

ンジュゲート 4 2 0 が、過剰の過酸化物の添加などによって非活性化され、サンプルは、過剰の過酸化物を除去するために洗浄される。非活性化は、第一ペルオキシダーゼ及び後続ハプテン-チラミドコンジュゲート間の何れかの反応を排除するために実施されうる。次いで、第二抗体 4 1 2 が加えられ、第二標的 4 0 4 に結合する。第二抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲート 4 2 2 が導入され、第二抗体 4 1 2 に結合する。第二ハプテンコンジュゲート 4 3 2 が加えられる。過酸化物及びペルオキシダーゼの存在中において、第二ハプテンコンジュゲート 4 3 2 は、第二標的 4 0 4 の近位に共有結合する。幾つかの実施態様では、第二抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲート 4 2 2 が、過剰の過酸化物の添加によって非活性化され、サンプルは、過剰の過酸化物を除去するために洗浄される。次いで第三抗体 4 1 4 が加えられ、第三標的 4 0 6 に結合する。第三抗体-ペル

10

#### 【0174】

特定の実施態様では、抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲート 4 2 0、4 2 2、4 2 4 は同じであり、全3つの一次抗体を認識できる抗体を含む。例えば、一次抗体 4 1 0、4 1 2、4 1 4 が、それらのそれぞれの標的に特異的なマウスモノクローナル抗体である場合、抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲートはヤギ抗マウス抗体を含みうる。

#### 【0175】

典型的にはハプテンコンジュゲート 4 3 0、4 3 2、4 3 4 は、互いに異なるハプテンを含む。ハプテンは、上記の方法の実施態様を使用して検出される。典型的には、各々のハプテンを検出するために異なる標識が使用され、3つの標的 4 0 2、4 0 4、4 0 6 が互いに区別可能である。

20

#### 【0176】

ハプテン-チラミドコンジュゲートを伴うハプテン-チラミドコンジュゲートにおける少なくとも幾つかのハプテンの有用性は、直接的結合アッセイにおけるハプテンの有用性と比較して予測不可能できない。実際、チラミドシグナル増幅アッセイにおける特定のハプテンの有用性は、直接的結合アッセイにおけるハプテンの有用性と逆相関した。例えば、幾つかのハプテン(例えば、DIG及びDNP)は、直接的アッセイにおいて使用される時、例えば、ハプテン-抗体複合体が標的に結合する時、頑強なシグナルを生成する。しかしながら、幾つかの頑強なハプテンは、チラミドシグナル増幅アッセイにおける使用に容認できず、そこではそれらは高バックグラウンドノイズを生成し、低シグナル:バックグラウンドノイズ比を生じる。例えば、扁桃組織において抗体を可視化するためにスクリーニングアッセイを使用する場合(実施例2を参照)、5.5  $\mu\text{M}$ の濃度で適用される場合、DIG-チラミドコンジュゲートは、1.33のシグナル/ノイズ比を生成する。55  $\mu\text{M}$ の濃度では、シグナル:ノイズ比は1.07であった。DNP-チラミドコンジュゲートは、5.5  $\mu\text{M}$ で 2.67のシグナル:ノイズ比を生じる。逆に、直接アッセイにおいて弱い検出のみを提供する他のハプテンは、驚くべきことに優れた結果を生じた。例えば HQ-, ローダミン-, 及びDABSYL-チラミドコンジュゲートは、各々、55  $\mu\text{M}$ の濃度で適用された場合、16のシグナル:ノイズ比を生じた。ロテノン コンジュゲートは、15のシグナル:ノイズ比を生じた。

30

40

#### 【0177】

予期しなかった結果はまた、ハプテンがプローブに直接結合された場合に得られるシグナル、及びチラミドシグナル増幅がハプテン-チラミドコンジュゲートを使用して実施された時に得られるシグナルを含んでなるmRNA-ISHアッセイにおいても見られた(実施例3を参照のこと)。結果は、特定のハプテン-チラミドコンジュゲートの性能が、対応するハプテン化RNAプローブの性能から予測できないことを示した。驚いたことに、BD-, DIG-, HQ-, 及びNCA-チラミドコンジュゲートは全て強いシグナルを生成したが、それらのそれぞれのハプテン化プローブはほとんどあるいは全くシグナルを生成しなかった。

#### 【0178】

幾つかの実施態様では、ハプテンコンジュゲートは、RNA-ISHアッセイを使用する、組

50

織サンプルにおける複数の遺伝子のマルチプレックス検出に使用される(実施例5を参照)。マルチプレックスアッセイは、複数標的遺伝子からの遺伝子発現の同時の可視化及び評価を可能にする。遺伝子発現データは、癌患者のための治療法選択に影響しうる。例えば、乳癌に關与する特定遺伝子に対応するmRNAレベルは、患者のリスクに關する。乳癌のリスク及び評価に關連した例示的なmRNA標的は、増殖標的(例えば、Ki-67, STK15, Survivin, Cyclin B1, MYBL2)、浸潤標的(例えば、ストロメライシン3, カテプシンL2)、HER2標的(例えば、HER2, GRB7)、エストロゲン標的(例えば、ER, PGR, Bcl2, SCUBE2)、及び他の標的(例えば、GSTM1, CD68, BAG1)を含む。RNAレベルの決定は、各患者に特定の治療計画を作成するのに有用なデータを、臨床医に提供する。

#### 【0179】

組織サンプルが得られ、固定される。興味のある特定のRNA標的にハイブリダイズできるハプテン標識されたプローブが調製され、固定化組織サンプルとハイブリダイズされる。各プローブは異なるハプテンで標識され、異なるRNA標的にハイブリダイズされる。幾つかの実施態様では、ハイブリダイゼーションシグナルは、シグナル増幅を使用して増加され、各プローブの近傍に堆積されるハプテンの数を増加する。ハプテンは、互いに異なる波長で蛍光を発することができる量子ドットにコンジュゲートされた抗ハプテン抗体を使用する。マルチプレックスRNA-ISHアッセイは、サンプル中における各標的に点状シグナルを生成し、組織サンプル内の各標的の存在及び相対量の同時評価を可能にする。所望であれば、各プローブは、適切な波長で特定量子ドットからの蛍光を検出するために、波長フィルターを使用して個々に検出できる。幾つかの実施態様では、シグナルは、各画像におけるバックグラウンドより上のピクセルの数を計数することによって定量化される。

#### 【0180】

他の実施態様では、組織に結合した全ての量子ドットからの蛍光を示す合成スペクトル画像が、干渉スペクトル画像を使用して得られる。量子ドットは、紫外線、例えば370 nmを使用して励起され、量子ドットの蛍光の画像は、広域スペクトル、例えば450-800 nmにわたって、例えば3-5 nmごとに様々な波長で得られ、合成スペクトル画像が生成される。量子ドットは、狭ガウス分布において蛍光を放出し、量子ドットの特長波長でスペクトルピークを生じ、例えばQd655は655 nmでスペクトルピークを生じるだろう。この狭分布は、合成スペクトル画像が、適切なソフトウェアパッケージ、及び定量化される各量子ドットからのシグナルを使用して非混合されることを可能にする。合成スペクトル画像を非混合するために、各分離画像における各ピクセルの光強度が、各々の画像化波長で決定される。平均バックグラウンド強度が画像について決定され、バックグラウンドに匹敵する光強度を有する任意のピクセルに、ゼロの値を割り当てる。ピクセルの光強度の激増が、その位置での量子ドットがその放出スペクトルと共に画像化される時、見られ、ピクセルは、その波長について1の値が割り当てられる。量子ドットシグナルは、各量子ドットの特長波長で1の値が割り当てられた、画像におけるピクセルの数を計数することによって定量化される。この手順はまた、共同在量子ドット、すなわち、画像の同じピクセル位置に位置する2つの異なる量子ドット(例えば、Qd525及びQd605)を検出することができる。ソフトウェアが逐次画像をステップスルーすると、特定のピクセル位置での光強度が第一波長(例えば、525 nm)で増加し、第一波長で蛍光を放出する第一量子ドットの存在を示す。ソフトウェアが画像をステップスルーすると、そのピクセル位置での光強度は、バックグラウンドに戻り、次いで、また、第二波長(例えば、605 nm)を増加し、第二波長で蛍光を放出する第二量子ドットの存在を示す。

#### 【0181】

図5A及び5Bは共に、マルチプレックスRNA-ISHアッセイの一実施態様を示す。異なるハプテン806、808で標識された複数のアンチセンス又はセンス鎖RNAプローブ802、804が組織サンプルでハイブリダイズされ、それらのそれぞれの遺伝子標的810、812に結合する。内因性ペルオキシダーゼが、ペルオキシダーゼインヒビターによって非活性化される。幾つかの実施態様では、ペルオキシダーゼは過剰の過酸化物の添加によって非活性化され、サンプルは過剰の過酸化物を除去するために洗浄される

10

20

30

40

50

。ハプテン 806 を認識し、結合できる第一酵素コンジュゲートの抗ハプテンモノクローナル抗体 814 を、組織サンプルに加え、反応させる。幾つかの実施態様では、酵素はペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシド (HRP) 816 である。次いで、組織サンプルを、過酸化物の存在中において、ハプテン 806 を含むハプテン - チラミドコンジュゲート 818 でインキュベートすることによって、ハプテン 806 を増幅させた。ハプテン - チラミドコンジュゲート 816 が酵素と反応すると、複数のハプテン - チラミドコンジュゲート 818 がプローブ 802 の近傍に析出される。HRP 816 は、ペルオキシダーゼインヒビターを使用して不活性化される (「X」で示される)。

#### 【0182】

ハプテン 808 を認識し、結合できる第二酵素コンジュゲートの抗ハプテンモノクローナル抗体 820 を組織サンプルに加え、反応させる。組織サンプルを、過酸化物の存在中において、ハプテン 808 を含むチラミド - ハプテンコンジュゲート 822 でインキュベートすることによって、ハプテン 808 を増幅させる。ハプテン - チラミドコンジュゲート 822 が酵素と反応すると、複数のハプテン - チラミドコンジュゲート 822 が、プローブ 804 の近傍に堆積される。更なるハプテン化プローブが使用される場合、各ハプテンを増幅するために工程が反復される。

#### 【0183】

各ハプテンが増幅された後、抗ハプテンモノクローナル抗体 - 量子ドットコンジュゲート 824、826 の混合が、組織サンプルに加えられる。各コンジュゲート 824、826 は、個々のハプテン、例えばハプテン 806 又は 808 をそれぞれ認識し結合できる抗体 828、830 を含む。各コンジュゲート 824、826 はまた、異なる量子ドット 832、834 を含む。例えば、量子ドット 832 は 655 nm で蛍光を放出する Q655 であり得、量子ドット 834 は 525 nm で蛍光を放出する Qd525 でありうる。

#### 【0184】

幾つかの実施態様では、ハプテン - チラミドコンジュゲートは、RNA - ISH アッセイを使用し、マイクロ RNA (miRNA 又は miR) を検出するために使用される (実施例 6 参照)。マイクロ RNA は、翻訳抑制などによって遺伝子発現を負に調節する、小、非コーディング RNA である。例えば、miR-205 は、胚発生の間に組織リモデリングを促進させるプロセスである、上皮間葉移行 (EMT) を制御する。しかしながら、EMT は、腫瘍転移における初期工程でもある。miR-205 等のマイクロ RNA の下方制御は、腫瘍進行における重要な工程でありうる。例えば、miR-205 の発現は、幾つかの乳癌において下方制御又は欠失されている。MiR-205 はまた、扁平細胞及び非小細胞肺癌を層別化するために使用できる (J. Clin Oncol., 2009, 27(12):2030-7)。

他の micro RNA は、血管新生シグナル伝達カスケードを調節することが分かっている。例えば、miR-126 の下方制御は、血管新生を通して癌進行を悪化させ、炎症を増加させうる。よって、マイクロ RNA 発現レベルは、疾患状態の指標でありうる。

#### 【0185】

#### VI. キット

本開示の開示の実施態様は、発明の方法の様々な実施態様を実施するためのキットを含む。キットは、ここに開示のハプテンコンジュゲート、例えばハプテン - チラミドコンジュゲート又はハプテン - チラミド誘導体コンジュゲートを含む。幾つかの実施態様では、キットは、過酸化物溶液、例えば過酸化水素溶液を更に含む。特定の実施態様では、キットは、HQ - チラミドコンジュゲート及び過酸化水素溶液を含む。

#### 【0186】

幾つかの実施態様では、キットは、ここに開示の複数のハプテンコンジュゲート、例えばハプテン - チラミドコンジュゲート及び / 又はハプテン - チラミド誘導体コンジュゲートを含む。このようなキットは、サンプル中における複数の標的のマルチプレックス検出に特に有用でありうる。ある実施態様では、キットは、サンプル中における一又は複数の標的に結合できる一又は複数のハプテン標識されたプローブを更に含む。

#### 【0187】

10

20

30

40

50

特定の実施態様では、キットは、抗ハプテン抗体、抗ハプテン抗体 - ペルオキシダーゼコンジュゲート、抗体 - 標識コンジュゲートを更に含み得、ここで、抗体は、抗ハプテン抗体、抗ハプテン抗体 - 標識コンジュゲート、又はその任意の組合せを認識し、結合できる。標識は、抗体にコンジュゲートできる任意の検出可能な標識でありうる。検出可能な標識は、例えば、発色アッセイにおいて検出できる酵素、及び蛍光アッセイにおいて検出できる量子ドットを含む。

【0188】

幾つかの実施態様では、キットは、標識の検出に適切な試薬を更に含みうる。例えば、標識がHRPの場合、キットは、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)アッセイを実施するための試薬を含みうる。

【0189】

VII. 実施例

以下の実施例は、作用実施態様及び一般プロトコルのある特定の特徴を説明するために提供される。発明の範囲は、以下の実施例によって例示されるこれらの特性に限定されない。

【0190】

実施例1

ハプテン-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-チラミド合成

この実施例は、ハプテン-リンカー-チラミドコンジュゲートの形成に適した一方法を説明する。

【0191】

ハプテン-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-チラミドコンジュゲートを合成する一般的手順

スキーム1(セクションIV)に示す合成は、下記の異なる合成によって調製されたHQ(3-ヒドロキシキノキサリン)以外の、ハプテンのためのハプテン-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-チラミドコンジュゲートを調製するために使用した。ハプテンは、BD(ベンゾジアゼピン)、BF(ベンゾフラザン)、DABSYL(4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド)、DCC(7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸)、DIG(ジゴキシゲニン)、DNP(ジニトロフェニル)、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)、NCA(ニトロケイ皮酸)、NP(ニトロピラゾール)、PPT(ポドフィロトキシン)、Rhod(ローダミン)、ROT(ロテノン)、及びTS(チアゾールスルホンアミド)を含んだ。合成は、カップリング剤としてN,N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミドを使用して、ハプテン NHS エステルを生成することから始めた。尿素副産物を濾過オフし、活性エステルを更に精製することなく使用した。次いで、活性エステルを、塩基条件下でdPEG(登録商標)<sub>8</sub>アミノ酸(Quanta BioDesign, Ltd., Powell, OH)にカップリングさせ、産物をフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。カルボキシ-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-ハプテンのNHSEステルを、上記で詳細に示したように、N,N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミドを使用して生成した。なるべく少量のチラミンでの処理と、その後のフラッシュクロマトグラフィーから、ハプテン-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-チラミドを得た。

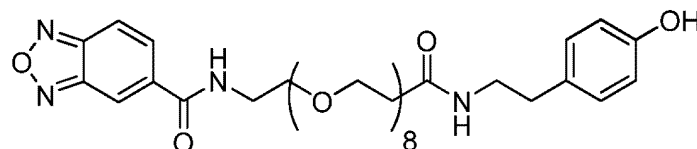
【0192】

個々のチラミドコンジュゲート

記:全ての実施例において、ハプテン dPEG(登録商標)<sub>8</sub> NHS エステルは、上記で詳細に示したように合成した。

【0193】

N-(30-(4-ヒドロキシフェニル)-27-オキソ-3,6,9,12,15,18,21,24-オクタオキサ-28-アザトリアコンチル)ベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾール-5-カルボキサミド(BF):



10

20

30

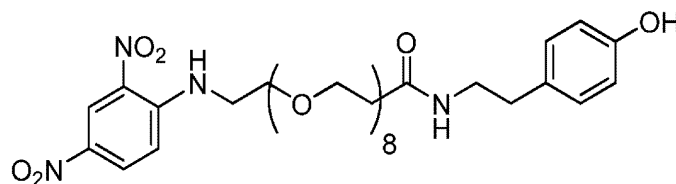
40

50

活性 エステル中間体 (1.26 mmol) 及びチラミド (1.64 mmol) を 3mL の乾燥 D M F に採り、乾燥窒素下で 16 時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限の DCM に溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、765 mg のチラミド産物 (86 %) を厚油として得た。

【 0 1 9 4 】

2,4-ジニトロフェニル-dPEG (登録商標) <sub>8</sub>-カルボキシチラミド (DNP):

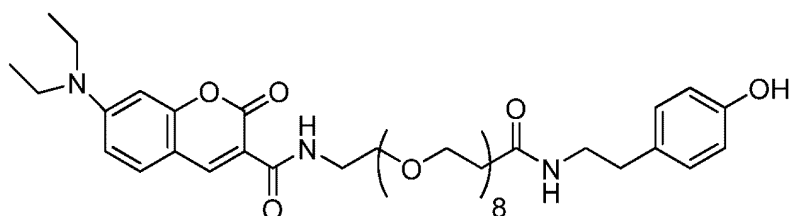


10

活性 エステル中間体 (1.31 mmol) 及びチラミド (1.31 mmol) を 4 m L の乾燥 D M F に採り、乾燥窒素下で 16 時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限の DCM に溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、837 mg のチラミド産物 (88 %) を厚黄色油として得た。

【 0 1 9 5 】

7-(ジエチルアミノ)-N-(30-(4-ヒドロキシフェニル)-27-オキソ-3,6,9,12,15,18,21,24-オクタオキサ-28-アザトリアコンチル)-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボキサミド (DCC):



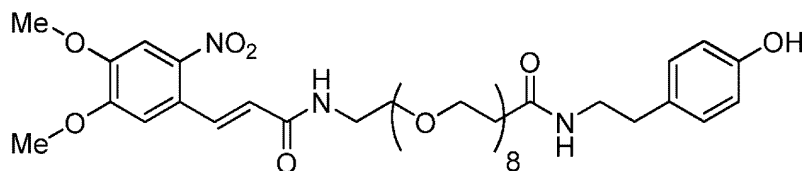
20

活性 エステル中間体 (1.26mmol) 及びチラミド (1.26 mmol) を 3mL の乾燥 D M F に採り、乾燥窒素下で 16 時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限の DCM に溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、508 mg のチラミド産物 (71 %) を厚黄色油として得た。

30

【 0 1 9 6 】

4,5-ジメトキシ-2-ニトロ桂皮酸-dPEG (登録商標) <sub>8</sub>-カルボキシチラミド (NCA):

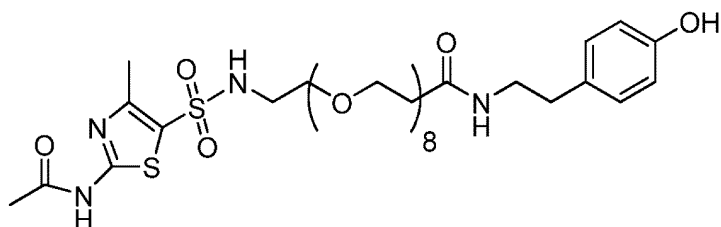


活性 エステル中間体 (1.45 mmol) 及びチラミド (1.60 mmol) を 3mL の乾燥 D M F に採り、乾燥窒素下で 16 時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限の DCM に溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、958 mg のチラミド産物 (83 %) を厚油として得た。

40

【 0 1 9 7 】

2-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾールスルホンアミド-dPEG (登録商標) <sub>8</sub>-カルボキシチラミド (TS):

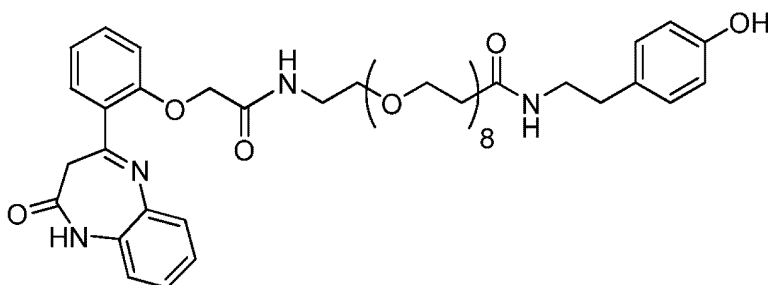


活性エステル中間体(2.27 mmol)及びチラミド(2.72 mmol)を5mLの乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限のDCMに溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、1.255 gのチラミド産物(71%)を厚油として得た。

10

【0198】

2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ)-(27-オキソ-3,6,9,12,15,18,21,24-オクタオキサオクタコシル)カルボキシ-チラミド(BD):

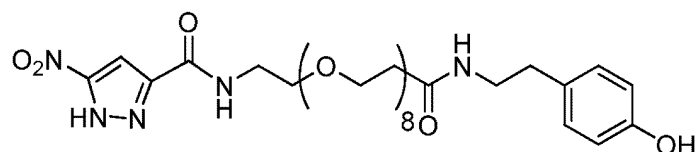


20

活性エステル中間体(0.706 mmol)及びチラミド(0.706 mmol)を3mLの乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限のDCMに溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、536 mgのチラミド産物(91%)を厚油として得た。

【0199】

5-ニトロ-3-ピラゾール-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>カルボキシチラミド(NP):



30

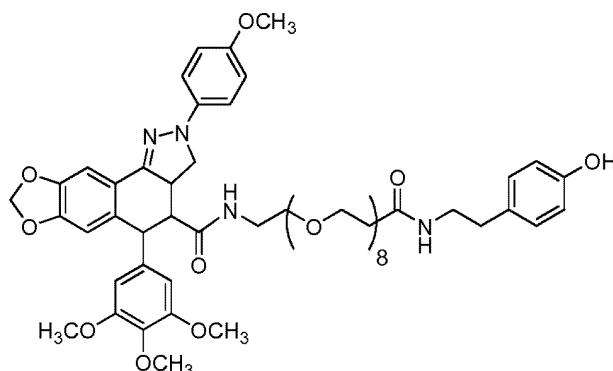
活性エステル中間体(1.27 mmol)及びチラミド(1.33 mmol)を3mLの乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。残留物を濃縮し、最小限のDCMに溶解させ、フラッシュクロマトグラフィーによって精製し、730 mgのチラミド産物(79%)を厚油として得た。

【0200】

ピラゾポドフィラミド-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-カルボキシチラミド(PPT):

40



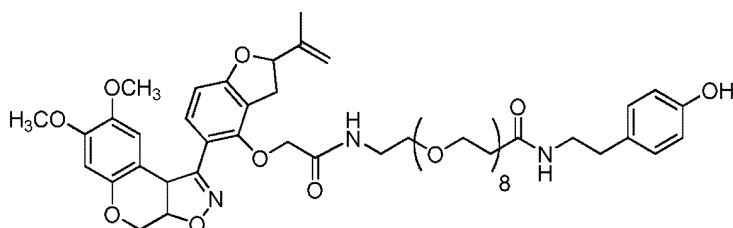


10

活性エステル中間体(7.65  $\mu\text{mol}$ )及びチラミド(7.29  $\mu\text{mol}$ )を10 mg/mLの濃度で乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。反応混合物をsemi-preparative HPLCによって精製し、4.4  $\mu\text{mol}$ のチラミド産物(61%)を厚油として得た。

【0201】

ロテノイソオキサゾリンアミド-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-カルボキシチラミド(ROT):



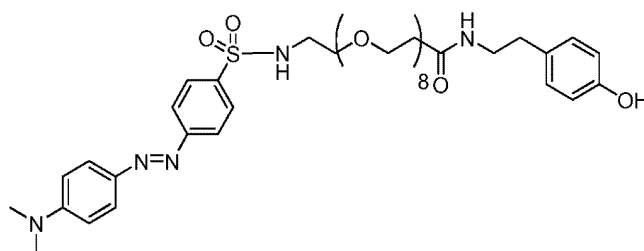
20

活性エステル中間体(7.65  $\mu\text{mol}$ )及びチラミド(7.29  $\mu\text{mol}$ )を10 mg/mLの濃度で乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。反応混合物をsemi-preparative HPLCによって精製し、5.3  $\mu\text{mol}$ のチラミド産物(73%)を厚油として得た。

【0202】

4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-カルボキシチラミド(DABSYL):

30



活性エステル中間体(7.65  $\mu\text{mol}$ )及びチラミド(7.29  $\mu\text{mol}$ )を10 mg/mLの濃度で乾燥DMFに採り、乾燥窒素下で16時間攪拌させた。反応混合物を分取用(semi-preparative)HPLCによって精製し、6.3  $\mu\text{mol}$ のチラミド産物(87%)を厚油として得た。

40

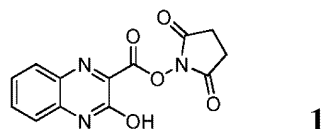
【0203】

HQ-dPEG(登録商標)<sub>8</sub>-チラミド

3-ヒドロキシ-N-(30-(4-ヒドロキシフェニル)-27-オキソ-3,6,9,12,15,18,21,24-オクタオキサ-28-アザトリアコンチル)キノキサリン-2-カルボキサミド(HQ):10 mLの乾燥DMF中における3-ヒドロキシキノキサリン-2-カルボン酸(11.55 mmol, 1.0当量)の溶液に、EDAC(17.33 mmol, 1.5当量)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(17.33 mmol, 1.5当量)を加え、反応物を乾燥窒素下で16時間攪拌した。反応物を焼結ガラス漏斗を通して濾過し、黄色沈殿物を2 mLのDMFで2回洗浄し、真空下で乾燥させ、3.25 g(11.3 mmol, 98%)

50

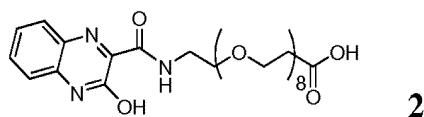
の 活性 エステル 1を黄色固体として得た。



【 0 2 0 4 】

5 mLの乾燥DMF中における2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 3-ヒドロキシキノキサリン-2-カルボキシレート 1 (2.1 mmol, 1.0当量)の溶液に、アミノ-dPEG (登録商標) <sub>8</sub>-カルボン酸 (2.3mmol, 1.1当量)及びトリエチルアミン (3.45 mmol, 1.5当量)を加え、反応物を乾燥窒素下で3時間攪拌させた。反応物を真空下で濃縮し、最小限のDCMに採った。0.5% AcOHを有する10-20% MeOH / DCMで溶出する自動フラッシュクロマトグラフィーにより、1.21 g (1.97 mmol, 94%)のアミノ酸 2 を黄色油として得た。

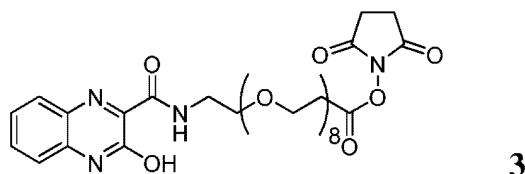
10



【 0 2 0 5 】

10 mLの乾燥DCM中における1-(3-ヒドロキシキノキサリン-2-yl)-1-オキソ-5,8,11,14,17,20,23,26-オクタオキサ-2-アザノナコサン-29-オイック酸 2 (2.18 mmol, 1.0当量)の溶液に、DCM (3.27 mmol, 1.5当量)及びN-ヒドロキシスクシンイミド (3.27mmol, 1.5当量)中における1.0 MのDCCを加え、反応物を乾燥窒素下で16時間攪拌した。反応物を焼結ガラス漏斗を通して濾過して尿素副産物を除去し、残留物を真空下で乾燥させ、1.35 gの活性エステル 3を得て、これを更に精製することなく使用した。

20

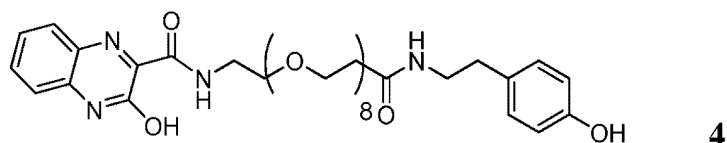


30

【 0 2 0 6 】

5 mLの乾燥DMF中の2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 1-(3-ヒドロキシキノキサリン-2-イル)-1-オキソ-5,8,11,14,17,20,23,26-オクタオキサ-2-アザノナコサン-29-oate 3 (0.49 mmol, 1.0当量)の溶液に、チラミン (0.54 mmol, 1.1当量)を加え、反応物を乾燥窒素下で18時間攪拌させた。反応を、DCMで、次いで飽和炭酸水素ナトリウムで2回、次いでブラインで2回希釈し、有機層を真空下で濃縮し、最低限のDCMに採る。5-20% MeOH / DCMで溶出される自動フラッシュクロマトグラフィーにより、0.312 g (0.426 mmol, 86%)のハプテン-チラミドコンジュゲート 4を厚黄色油として得た。

40



3-ヒドロキシ-N-(30-(4-ヒドロキシフェニル)-27-オキソ-3,6,9,12,15,18,21,24-オクタオキサ-28-アザトリアコンチル)キノキサリン-2-カルボキサミド

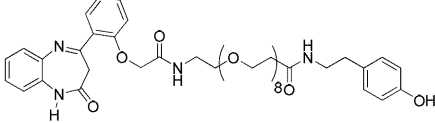
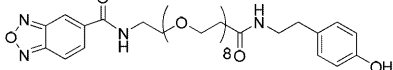
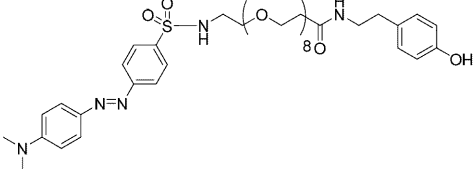
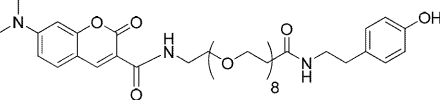
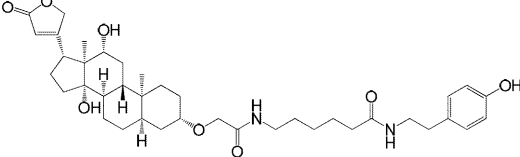
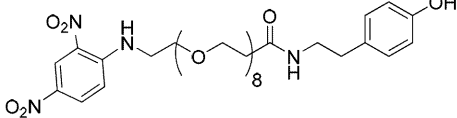
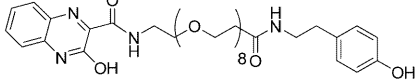
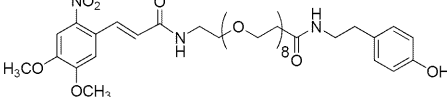
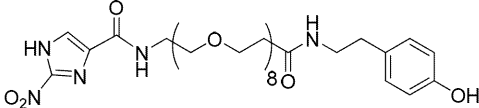
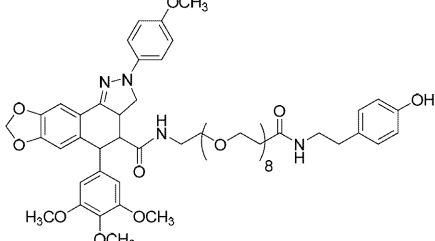
【 0 2 0 7 】

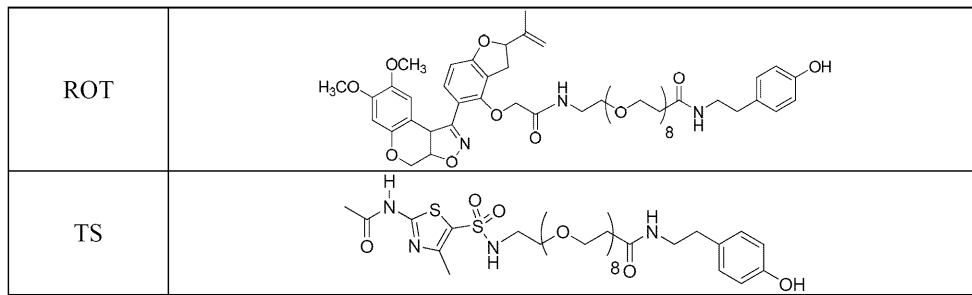
合成ハプテン-チラミドコンジュゲートをHPLC, UV/VIS,及び質量分析によって特徴付けた。HPLCを、8  $\mu$ Lの注入量、15.0分のランタイム、254 nmでの吸光度測定で実施した。水/アセトニトリル勾配を実施するWaters C18 X-Bridge 4.6 x 100 mm (5  $\mu$ )カラムを使用

50

した。UV/VISスペクトルを200-600 nmの範囲にわたって得た。質量分析を、100-3000の取得m/z範囲を用いてESI を使用しJEOL AccuTOFにおいて実施した。合成され、後の実施例において使用される特定のハプテン-チラミドコンジュゲートの構造を下の表3に示す。

表3

ハプテン	構造	
BD		10
BF		
DAB		
DCC		
DIG		20
DNP		
HQ		
NCA		30
NP		
PPT		40



【 0 2 0 8 】

10

実施例2

チラミド-ハプテンコンジュゲートの比較のための扁桃組織におけるbc12 (124) 抗体の評価

この実施例は、チラミド-ハプテンコンジュゲートを使用した、扁桃組織におけるbc12 (124) 抗体の可視化を実証する。ハプテンをポリエチレングリコールリンカーによってチラミンにコンジュゲートさせ、実施例1に記載するようにハプテン-dPEG (登録商標) <sub>8</sub>-チラミドコンジュゲートを形成した。評価したハプテンはBD, BF, DABSYL, DCC, DIG, DNP, FITC, HQ, NCA, NP, PPT, Rhod, ROT, 及びTSを含む。

【 0 2 0 9 】

扁桃組織切片を有するスライドを、自動染色装置(BenchMark (登録商標) XT, Ventana Medical Systems, Inc, (VMSI) Tucson, AZ)の標準プロトコルを使用して作った。典型的な自動プロトコルは次の通りである。

20

【 0 2 1 0 】

スライド上のパラフィンコートされた組織を75 °Cに8分間加熱し、EZPrep (VMSI #950-102)で一度処理し、液体カバースリップ (LCS, VMSI #650-010)の適用の前に体積を75 µLで調整した。75 µLでの更なる8分のインキュベーション後、スライドをすすぎ、EZPrep体積を調整し、その後LCSによって組織を脱パラフィンした。スライドを37 °Cまで冷却し、4分間インキュベートした。スライドをEZPrepで十分にすすぎ、その後LCSを適用した。スライドを95 °Cに8分間加熱し、その後LCSを適用した。次いで、スライドを100 °Cに加熱し、4分間インキュベートした。毎4分間、24分間、セルコンディショニング液(CC1, VMSI #950-124)及びLCSをスライドの乾燥を防ぐために適用した。反応バッファ (VMSI #950-300)で2回すすいだ後、100 µLのUVインヒビター (VMSI ultraView DAB Detection Kit #760-500の要素)をスライドに適用し、4分間インキュベートした。スライドを反応バッファで一度すすいだから、100 µLのbc12 (124)抗体 (VMSI #760-4240)を16分間37 °Cで適用した。スライドを反応バッファで3回すすいだから、100 µLのプロッキング溶液(10% デキストラン硫酸ナトリウム塩(avg. MW 10K), 2.5M 塩化ナトリウム, 1% BSA, 0.1% 冷却された魚の皮膚ゼラチン, 0.1% Triton (登録商標) X-100, 0.05% Tween (登録商標) 20, 0.1% Proclin (登録商標) 300) 及び100 µLのultraView HRP universal multimer (VMSI ultraView DAB Detection Kit #760-500の一要素)を添加した。2試薬を37 °Cで20分間、共にインキュベートした。

30

40

【 0 2 1 1 】

スライドを反応バッファで4回すすいだから、100 µLのチラミドハプテンコンジュゲートを手動でスライドに適用した。チラミド-ハプテンコンジュゲートを、チラミド増幅希釈剤 (0.75 mM スズ酸ナトリウム, 40 mM ホウ酸, 10 mM 四ホウ酸ナトリウム十水和物, 及び30 mM 塩化ナトリウム)中において、55 µM及び5.5 µMに希釈した。手動適用が完了した後、100 µLのultraView H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をスライドに適用し、12分間37 °Cでインキュベートした。スライドを反応バッファにおいて3回洗浄した後、100 µLのプロッキング溶液と、HRPにコンジュゲートされたそれぞれのマウス抗ハプテンモノクローナル抗体の100 µLの5 µg/mL溶液を8分間37 °Cで共インキュベートした。HRPコンジュゲートを、13.5 mg/mLの加水分解カゼインと共に、0.1 M PBSバッファ、pH 7.2中において希釈した

50

。反応バッファーで4回すすいだ後、100  $\mu$ Lの両ultraView DAB及びultraView H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をスライドに適用し、LCSを用い37  $^{\circ}$ Cで8分間共インキュベートした。100  $\mu$ LのUltraView Copperをスライドに適用する前に、スライドを反応バッファー中において1回すすぎ、4分間37  $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いで、スライドを反応バッファーで2回すすいだ後、ヘマトキシリンII (VMSI #750-2021)で対比染色し、これをスライド上で、LCSを用い4分間インキュベートした。反応バッファーで2回すすいだ後、ブルーイング試薬(VMSI #760-2037)を適用し、対比染色を完了させるために4分間インキュベートした。器具からスライドを外し、固体カバースリップの手動適用の前に洗剤で処理した。

【0212】

スライドを明視野顕微鏡を通して見た。スライドの写真を図6-33に示す。表4に示す結果は、1-4のスケールにおけるシグナル強度（例えば、染色の強度）の主観的スコアを含み、4が最も強く染色されている。バックグラウンド(BG) スコア and シグナル:ノイズ比も提供する。

表4

コンジュゲート 濃度	TA-ハプテン	スコア	BG スコア	シグナル:ノイズ
5.5uM	HQ	1	0.5	2
55uM	HQ	4	0.25	16
5.5uM	PPT	2	0.5	4
55uM	PPT	3.5	0.75	5
5.5uM	BD	1	0.5	2
55uM	BD	2	0.25	8
5.5uM	DIG	4	3	1
55uM	DIG	4	3.75	1
5.5uM	DNP	4	1.5	2
55uM	DNP	4	2	2
5.5uM	DCC	4	1.5	2
55uM	DCC	4	3	1
5.5uM	NP	4	1	4
55uM	NP	4	3.5	1
5.5uM	ローダミン	2	0.5	4
55uM	ローダミン	4	0.25	16
5.5uM	NCA	0.5	0.25	2
55uM	NCA	4	1.5	2
5.5uM	FITC	4	1	4
55uM	FITC	4	3	1
5.5uM	TS	4	2.5	2
55uM	TS	4	3.75	1
5.5uM	BF	4	2.75	1
55uM	BF	3.5	2	2
5.5uM	DABSYL	1	0.5	2
55uM	DABSYL	4	0.25	16
5.5uM	ROT	2	0.5	4
55uM	ROT	3.75	0.25	15

例示的な結果を提供するコンジュゲートは、DABSYL-、HQ-、ローダミン-、及びロテノン-チラミドコンジュゲートを含む(図8-9、20-21、及び28-31)。暗い染色が好ましい場合、NCA-及びNP-チラミドコンジュゲートも優れた結果を生成する(図22-25)。染色暗度は、例えばチラミド-ハプテンコンジュゲートのインキュベーション時間の調節、一次抗体濃度の調節(すなわち、この実施例におけるbc12 (124)抗体)、及び/又は一次抗体インキュベーション時間の調節によって調節できる。

【0213】

実施例3

mRNA-ISHアッセイにおける天然抗ハプテンシグナル及びハプテン-チラミドコンジュゲートシグナルの比較

この実施例は、ハプテンがプローブに直接結合される時にmRNA-ISHアッセイにおいて得られるシグナルと、チラミドシグナル増幅がハプテン-チラミドコンジュゲートを使用し  
て実施される時に得られるシグナルとを比較する。ハプテンは、実施例1に記載のように、  
ポリエチレングリコールリンカーを介してチラミンにコンジュゲートされ、ハプテン-d  
PEG (登録商標)<sub>8</sub>-チラミドコンジュゲートを形成する。BD、BF、DABSYL、DCC、DIG、DNP  
、HQ、NCA、NP、PPT、ROT、及びTS ハプテンを評価した。

#### 【0214】

##### 天然抗ハプテンシグナル決定

ドットプロット構成。Genoramaスポッティング溶液に懸濁された異なる濃度の3の1マ  
イクロリットル滴のセンス鎖又はアンチセンス鎖ACTB (ベータ-actin) RNAを、Asper SA-  
1マイクロアレイ(Asper Biotech Ltd., Tartu, Estonia)の異なる領域にスポットし、ス  
ライドを室温で乾燥させた。RNAを、300 mJのUV照射を使用してスライドにクロスリンク  
した。

#### 【0215】

ドットプロットハイブリダイゼーション。Mirusリンカーアームを使用して異なるハプ  
テンで化学的に標識されたACTBアンチセンスリボプローブを、製造者の指示に従い調製し  
た(Mirus Bio LLC, Madison, WI)。100ナノグラムの各プローブを、1 mLのRiboHybe<sup>T</sup>  
<sup>M</sup> (VMSI #760-104)溶液に再懸濁させ、異なるディスペンサーにおいて。RNAを、Asper SA  
-1マイクロアレイスライドに付け、UVクロスリンクさせた。調製したドットプロットスラ  
イドをDiscovery (登録商標) XT instrument (VMSI)に搭載し、一滴(100 µL)のハプテン  
化(haptenylated)アンチセンスACTBリボプローブをスライドに分注し、80 °Cで8分間変  
性させ、65 °Cで6時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、スライドを75  
°Cで8分間、0.1x SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウムバッファー、VMSI #950-110)  
を使用して3回洗浄した。各々独自にハプテン化したプローブを、5 µgの同族天然抗ハ  
プテン抗体、その後ビオチン化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体 (VMSI #213-2194)及び  
量子ドット (Qd) 655にコンジュゲートされたストレプトアビジン(Invitrogen, Carlsbad  
, CA)を使用して検出した。スライドを勾配アルコールを使用して脱水し、カバースリッ  
プを使用した。

#### 【0216】

ドットプロットシグナル定量化。ドットプロットスライドを、Spectral Imaging camer  
a (Applied Spectral Imaging (ASI), Vista, CA)を装着したZeiss 蛍光顕微鏡を使用し  
て分析した。ドットプロットスライドあたり、各々3のセンス(実験)及びアンチセンス  
(ネガティブコントロール)スポットの画像を、40X対物及びASIソフトウェアパッケージを  
使用して撮った。Qd655コンジュゲート抗体から生成される各ドットの蛍光シグナルの値  
を、各ピクセルの生の655-nmスペクトルデータを、エクセルスプレッドシートにエクスポ  
ートすることによって得た；各ピクセルのシグナルを各々異なるドットについて平均し、  
95%信頼区間をスポットについて決定した。バックグラウンドを、ネガティブコントロー  
ルアンチセンススポットのシグナルを使用して決定した。全スライドにおいて、バックグ  
ラウンドは無視でき、実験シグナルへの有意な貢献はなかった。データを、各々のハプテ  
ン/天然抗ハプテン対(図34)についてプロットした。シグナルにおける変動性は、天然-抗  
ハプテン抗体検出効果の範囲を提案し、ここでDCC > DNP > BF > DABSYL > NP > TS > PP  
T > DIG > BD > ROT > NCA > HQである。

#### 【0217】

組織ハイブリダイゼーション。Superfrostスライドに搭載したホルマリン固定パラフィ  
ン包埋Calu-3異種移植片組織を、脱パラフィン化し、抗原を、RiboClear (VMSI #760-412  
5)変性剤、RiboCC VMSI #760-107)試薬、及びプロテアーゼ3 (VMSI #760-2020)を使用し  
て回収した。回収後、一滴(100 µL)のハプテン化 アンチセンス又はセンス鎖 ACTBプロ  
ーブをスライドに分注し、80 °Cで8分間変性させ、65 °Cで6時間ハイブリダイズさせた。ハイ  
ブリダイゼーションスライドを、75 °Cで8分間、0.1x SSCを使用して3回洗浄した後、各  
々独自にハプテン化したプローブを、5 µgの同族天然抗ハプテン抗体、次にビオチン化

ヤギ抗マウスポリクローナル抗体及びQd655にコンジュゲートされたストレプトアビジンを使用して検出した。スライドを、DAPI (VMSI #760-4196)を使用して対比染色した。スライドを、勾配アルコールを使用して脱水し、カバースリッパを適用した。DAPI及び655-nm QDot<sup>T M</sup> 放出シグナルを、Spectral Imaging camera (Applied Spectral Imaging (ASI) Vista, CA)に装着したOlympus 蛍光顕微鏡を使用して画像化した(図35-46)。センス鎖を、ネガティブコントロールとして使用した。センス鎖により観察される何れかの染色は、どのくらいバックグラウンド又は非特異的染色が、検出システム単独に起因するか示す。

#### 【0218】

組織シグナル定量化。QDot<sup>T M</sup> 655 nm蛍光放出シグナルを使用し、画像を順位付けした。順位付けは、相対シグナル:ノイズ (アンチセンス:センスプローブ)強度スケール(0-10) (図47)を使用して、2人の盲検リーダーによって行った。

#### 【0219】

##### ハプテン-チラミドコンジュゲートシグナル決定

Superfrost<sup>T M</sup> スライドに搭載された組織染色。ホルマリン固定パラフィン包埋Calu-3 ヒト肺癌異種移植片組織を、脱パラフィン化し、抗原を、RiboClear変性剤、RiboCC試薬、及びプロテアーゼ3 (VMSI)を使用して回収した。回収後、一滴(100 µL)のDNP標識されたアンチセンス又はセンス鎖 HER2プローブをスライドに分注し、80 °Cで8分間変性させ、65 °Cで6時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、スライドを、75 °Cで8分間、0.1x SSCを使用して3回洗浄した。DNPハプテンを、スライドに分注させた天然ウサギ抗DNP モノクローナル抗体 (VMSI #760-4139)、次いでTSA block (VMSI #760-4142) 及びHRPコンジュゲートされたヤギ抗ウサギポリクローナル抗体(VMSI # 760-4315)を使用して検出した。チラミドシグナル増幅を、次のように実施した。一滴のチラミド-ハプテンコンジュゲート (10 µg/mL)を各スライドに分注し、次いで一滴のTSA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (VMSI #760-4141)を使用した。反応を24分インキュベートした；各チラミドコンジュゲート化ハプテンを、その同族モノクローナル抗体 (5 µg/mL)、次いでQd655コンジュゲート化ヤギ抗マウスポリクローナル抗体(VMSI #213-2194)を使用して検出した。結果として、各チラミド-ハプテンコンジュゲート/抗ハプテン mAbシステムの性能を、個々に、またプローブ又は量子ドットコンジュゲート変動性に非依存性に評価した。手順を、図3Bに概略的に示す。スライドを、DAPI (VMSI #760-4196)を使用して対比染色した。スライドを、勾配アルコールを使用して脱水し、カバースリッパを適用した。DAPI (VMSI #760-4196)及び655-nmシグナルを、Spectral Imaging camera (Applied Spectral Imaging (ASI) Vista, CA)に装着されたOlympus 蛍光顕微鏡を使用して画像化した(図48)。

#### 【0220】

組織シグナル定量化。QDot<sup>T M</sup> 655による蛍光放出シグナルを、2人の盲検リーダーによって順位付けした。相対シグナル強度スケール(0 to 10)を使用した結果を含む(図47)。

#### 【0221】

図47は、ハプテンから得られる蛍光シグナルにおいて有意な可変性があることを示す。更に、図47に見られるように、特定のハプテン-チラミドコンジュゲートの性能は、対応するハプテン化 RNAプローブの性能から予測できなかった。例えば、BF-チラミドコンジュゲートは、BF標識されたRNAプローブの2倍近く強いシグナルを生成した。逆に、DNP-チラミドコンジュゲートは、DNP標識されたRNAプローブより著しく弱いシグナルを生成した。驚くべきことに、BD-、DIG-、HQ-、及びNCA-チラミドコンジュゲートは全て強いシグナルを生成したが、それらのそれぞれのハプテン化 RNAプローブは、皆無かそれに近いシグナルを生成した。下の表5は、各試験におけるハプテンの順位を提供する。

表 5

ハプテン	ランキング	
	ハプテン化プローブ	ハプテン-チラミド コンジュゲート
BD	9	2
BF	3	1
DABSYL	4	6
DCC	1	4
DIG	8	3
DNP	2	4
HQ	12	5
NCA	11	4
NP	5	4
PPT	7	6
ROT	10	7
TS	6	6

10

## 【 0 2 2 2 】

## 実施例4

mRNA-ISHアッセイにおけるハプテン-チラミドコンジュゲートシグナル

この実施例は、チラミドシグナル増幅がハプテン-チラミドコンジュゲートを使用して実施された時に、mRNA-ISHアッセイにおいて得られるシグナルを評価する。ハプテンは、ポリエチレングリコールリンカーを介してチラミンにコンジュゲートされ、ハプテン-dPEG (登録商標) 8-チラミドコンジュゲートを形成し、実施例1に記載される。

20

## 【 0 2 2 3 】

組織染色。Superfrostスライドに搭載されたパラフィン包埋Calu-3異種移植片組織を、脱パラフィン化し、抗原を、RiboClear変性剤、RiboCC試薬、及びプロテアーゼ3 (VMSI) を使用して回収した。回収後、一滴(100  $\mu$ l)のハプテン標識されたアンチセンス又はセンス鎖 HER2プローブをスライドに分注し、80  $^{\circ}$ Cで8分間変性させ、65  $^{\circ}$ Cで6時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、スライドを、75  $^{\circ}$ Cで8分間、0.1x SSCを使用して3回洗浄した。ハプテン標識されたプローブを、50  $\mu$ g/mLの濃度で、HRPにコンジュゲートされた同族抗ハプテンモノクローナル抗体を使用して検出した。HRPコンジュゲートを、TSA Blockと共にスライドに分注した。チラミドシグナル増幅を、次のように実施した：一滴のハプテン-チラミドコンジュゲート (10  $\mu$ g/mLを、各スライドに分注し、その後一滴のTSA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ventana)を分注した。反応を24分インキュベートし；各チラミドコンジュゲート化ハプテンを、Qd655にコンジュゲートされたその同族モノクローナル抗体を使用して検出した。手順を、図3Aに模式的に示す。スライドをDAPIを使用して対比染色した。スライドを、勾配アルコールを使用して脱水し、カバースリップを適用した。DAPI及び655nmのシグナルを、Spectral Imaging cameraに装着されたOlympus 蛍光顕微鏡を使用して画像化した。

30

## 【 0 2 2 4 】

図49は、アンチセンス及びセンス鎖 (コントロール) HER2プローブをDNPで標識した場合に得られる結果を示し、検出は、MSxDNP-HRP (HRPにコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体)、DNP-dPEG (登録商標) 8-チラミドコンジュゲート、及びMSxDNP-Qd655 (Qd655にコンジュゲートされた抗DNPモノクローナル抗体)を使用して実施した。

40

## 【 0 2 2 5 】

## 実施例5

マルチプレックスin situハイブリダイゼーション

この実施例は、18S rRNA及び乳癌パネルのマルチプレックスmRNA-ISHアッセイにおいて得られるシグナルを評価する。

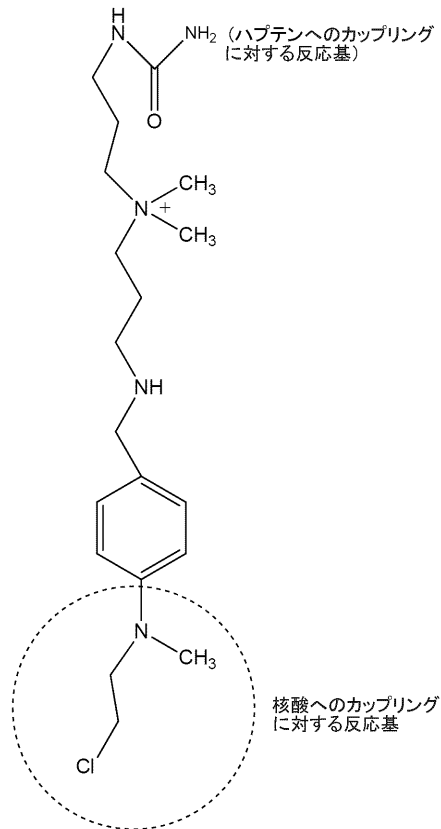
## 【 0 2 2 6 】

プローブ合成及び製剤：Mirusリンカーアーム (Label IT (登録商標) リンカー) を使用

50



し、異なるハプテンで化学的に標識されたACTB, ER, HER2, Ki67, PR及び18S実験アンチセンス及びコントロールセンスリボプローブを、製造者(Mirus Bio LLC, Madison, WI)の指示に従い調製した。具体的には、ERプローブをベンゾフラザン (BF)で標識し、HER2プローブをチアゾールスルホンアミド (TS)で標識し、Ki67プローブをニトロピラゾール (NP)で標識し、ACTBプローブを2,4-ジニトロフェニル (DNP)で標識した。



Label IT (登録商標) リンカー

10

20

30

40

50

【0227】

標識反応を、製造者のプロトコル(Lit. #ML012, rev. March 31, 2005, accessed at the Mirus Bio website on February 4, 2011)に従い、Amine Label IT (登録商標) 試薬(Kit # MIR 3900)及び核酸を、0.2:1~0.8:1の質量比で組み合わせることによって調製した。例えば、Amine Label IT (登録商標) 試薬を、100  $\mu$ Lの再構成溶液を用いて、1 mg/mLのリンカーの最終濃度に再構成した。標識RNAプローブに、37.5  $\mu$ Lの脱イオン化 $H_2O$ 、5  $\mu$ Lの10X Mirus Labeling Buffer A、5  $\mu$ LのRNAプローブ溶液(1mg/mL)、及び2.5  $\mu$ LのAmine Label IT (登録商標) 試薬を組み合わせた。標識反応を、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。

【0228】

標識されたRNAを、1.5容積のAmbion (登録商標) 塩化リチウム沈殿溶液(7.5 M 塩化リチウム, 50 mMのEDTA, pH. 8.0, Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, cat. # AM9480)を加え、溶液を-20  $^{\circ}$ Cで30分間冷却することによって、沈殿させた。溶液を、微量遠心機において15分間、遠心分離し、上澄みを捨てた。ペレットを、氷冷70%エタノールで洗浄し、残留塩を除去した。標識されたRNAを、nuclease-free water (Ambion)に再懸濁させた。

【0229】

1時間、室温で、暗所において、約5  $\mu$ g of 標識されたRNAプローブを、10 mM溶液のハプテン-PEG<sub>(8)</sub>-NHS エステル (無水DMSOにおいて調製)及び100mMの $NaHCO_3$  (pH 8.5, 新鮮に調製)と反応させることによって、所望のハプテンを、Label IT (登録商標) リンカーの遊離端にカップリングさせた。ハプテン標識されたRNAプローブを、前述のように、塩化

リチウム沈殿によって単離した。

【0230】

マルチプレックス乳房パネル *in situ* ハイブリダイゼーションアッセイでは、100 ナノグラムの各プローブを、1 mLのRiboHybe<sup>T M</sup> (VMSI #760-104) 溶液に懸濁させ、ディスペンサーに置いた；モデル18S マルチプレックスアッセイでは、様々なハプテンで標識された1 ナノグラムの18Sプローブを、1 mLのRiboHybe<sup>T M</sup> (VMSI #760-104) 溶液に懸濁させ、ディスペンサーに置いた。

【0231】

マルチプレックス *in situ* ハイブリダイゼーション (18S 及び乳房パネル) : Superfrost スライドに搭載されたホルマリン固定パラフィン包埋 Calu-3、ZR75-1 及び MCF-7 異種移植片組織を、脱パラフィン化し、抗原を、RiboClear (VMSI #760-4125) 変性剤、RiboCC VMSI #760-107) 試薬、及び 3 (VMSI #760-2020) を使用して回収した。回収後、異なるハプテンで標識された一滴 (100  $\mu$ l) のカクテルアンチセンス又はセンス鎖プローブをスライドに分注し、80 °C で8分間変性させ、65 °C で6時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、75 °C で8分間、0.1x SSC を使用して3回洗浄した；カクテルにおける各ハプテンを、次のように逐次的に検出した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、POインヒビター (VMSI #760-4143) を使用して不活性化し、10  $\mu$ g/ml のHRPコンジュゲート抗ハプテンモノクローナル抗体をスライドに分注し、24分間インキュベートし、その後TSA block (VMSI #760-142) を適用した。チラミドシグナル増幅を、スライドに一滴のチラミド-ハプテンコンジュゲート (100  $\mu$ M) を分注し、その後一滴のTSA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (VMSI #760-4141) を分注し、反応を24分間インキュベートすることによって達成した。手順を繰り返し、プローブカクテルにおける各ハプテンを増幅させた。次いで、増幅したハプテンを、各々異なるQdotにコンジュゲートされた抗ハプテンモノクローナル抗体のカクテルを使用して検出した。逐次的マルチプレックス手順を、図5A-5Bに模式的に示す。スライドを、DAPI (VMSI #760-4196) を使用して対比染色し、勾配アルコールを使用して脱水し、カバースリップを適用した。コントロールセンス鎖プローブから成るプローブカクテルを、非特異的相互作用から生じるバックグラウンドを決定するために、全実験において、ネガティブコントロールとして使用した。

10

20

【0232】

画像化: DAPI 及び Qdot シグナルを、Spectral Imaging camera (Applied Spectral Imaging (ASI) Vista, CA) に装着された Olympus 蛍光顕微鏡を使用して画像化した。画像を、40X 対物及び ASI ソフトウェアパッケージを使用して撮った。

30

【0233】

18S マルチプレックスアッセイ: 18S RNA は全細胞において恒常的に発現されるため、それは、マルチプレックスアッセイを展開し試験するのに、適切なモデルシステム及び内因性コントロールになる。18S RNA は細胞において豊富であるため、非常に少量 (例えば、ピコモル) の幾つかの18S RNA プローブ - 各プローブは同じ標的を指向するが、異なるハプテンで標識される - が、単一組織サンプルに適用でき、標的18S RNA 配列に非競合に結合するだろう。等モル量の各プローブは、各プローブから実質的に等しいシグナルを生じることが期待される。

40

【0234】

上記のマルチプレックスアッセイを、DNP、BF、NP、及びTSで標識された18Sプローブを、Calu-30異種移植片組織にハイブリダイズすることによって実施した。DNP-, BF-, NP-, and TS標識プローブを、それぞれ655、605、585、及び565 nmで蛍光を放出できる量子ドットで検出した。モデル18Sマルチプレックス反応において使用される特定の試薬を表6に詳細に記載する。各シグナルを、図50A-Dに示すように、適切な波長で個々に検出した。次いで、画像を、単一合成蛍光画像に組み合わせさせた (図51A)。ネガティブコントロールとして、類似に標識されたセンス鎖プローブを利用した。類似な4つのセンス鎖プローブがCalu-30異種移植片組織にハイブリダイズされた後の合成蛍光画像は、シグナルを示さなかった (図51B)。

50

表 6

プローブ	18S	18S	18S	18S
ハプテン	BF	TS	NP	DNP
HRP コンジュゲート	MSxBF	MSxDIG	MSxNP	MSxDNP
チラミドコンジュゲート	TSA-BF	TSA-DIG	TSA-NP	TSA-DNP
抗ハプテン Q ドット	MSxBF-Qd605	MSxDIG-Qd565	MSxNP-Qd585	MSxDNP-Qd655

10

## 【 0 2 3 5 】

乳房パネルマルチプレックスアッセイ:上記のマルチプレックスアッセイを、Calu-3異種移植片組織及びMCF-7種移植片組織サンプルを、NP標識されたKi67、TS標識されたHER2、BF標識されたER、及びDNP標識されたACTB アンチセンスRNAプローブとハイブリダイズすることによって実施した。Ki67、HER2、ER、及びACTBプローブを、それぞれ525、565、605、及び655 nmで蛍光を放出できる量子ドットで検出した。核のDAPI対比染色を実施した。乳房パネルマルチプレックスハイブリダイゼーションにおいて使用される特定の試薬を、表7に詳細に記載する。各QDot<sup>T M</sup>シグナルを、図52A-D (Calu-3異種移植片組織)及び図53A-D (MCF-7異種移植片組織)に示すように、適切な波長で個々に検出した。Calu-3異種移植片細胞は、HER2+、ER-、Ki67+/-、及びACTB+であることが知られている。予想した通り、強いシグナルがHER2及びACTBプローブから、中程度のシグナルがKi67プローブから、非常に弱いシグナルがERプローブから見られた。MCF-7異種移植片細胞は、HER2-、ER+、Ki67+/-、及びACTB+であると知られている。予想した通り、強いシグナルがER及びACTBプローブから、中程度のシグナルがKi67プローブから、非常に弱いシグナルがHER2プローブから見られた。4つのプローブの合成蛍光画像を、図54A (Calu-3組織)組織54B (MCF-7組織)に示す。Calu-3 and MCF-7組織にハイブリダイズされた4つのネガティブコントロール、類似センス鎖 RNAプローブの合成蛍光画像は、シグナルを示さなかった。

20

表 7

プローブ	ER	HER2	Ki67	ACTB
ハプテン	BF	TS	NP	DNP
HRP コンジュゲート	MSxBF	MSxDIG	MSxNP	MSxDNP
チラミドコンジュゲート	TSA-BF	TSA-DIG	TSA-NP	TSA-DNP
抗ハプテン Q ドット	MSxBF-Qd605	MSxDIG-Qd565	MSxNP-Qd525	MSxDNP-Qd655

30

## 【 0 2 3 6 】

シグナル定量化: Calu-3、ZR75-1、及びMCF-7異種移植片細胞は、高、低、及び中程度のHER2をそれぞれ発現する。しかしながら、ACTB発現は前細胞において一定であり、内部コントロールとして使用できる。RNA発現との蛍光シグナルの相関を決定するために、上述のように、組織サンプルを、DNP標識されたHER2及びTS標識されたACTB アンチセンスRNAプローブでハイブリダイズし、Qd655及びQd565にコンジュゲートされたモノクローナル抗体でそれぞれ検出した。スペクトル画像を、RawCubeViewerソフトウェアパッケージを使用して非混合化した。各QDot<sup>T M</sup>シグナルに閾値設定しバックグラウンドを除去し、バックグラウンドより上の画像におけるピクセルの数を、RawCubeViewerソフトウェアを使用して計数した。各異種移植片におけるACTBに対するHER2の比を、各画像におけるHER2ピクセルの数を、ACTBピクセルの数で割ることによって決定した。図55A-Cは、それぞれC

40

50

alu-3, ZR75-1, and MCF-7異種移植片とハイブリダイズさせたHER2プローブから得られる蛍光を示す蛍光顕微鏡写真である。予想した通り、シグナルは、ZR75-1 and MCF-7よりCalu-3においてずっと強く、MCF-7は非常に少ないハイブリダイゼーションを示す。

#### 【0237】

比較として、ACTBに対するHER2の比も、以下に示すように定量RT-PCR (qPCR) を使用して決定した。全mRNAを、High Pure FFPE抽出キット(Roche)を使用して、各異種移植片の10ミクロン切片から抽出した。各RNA サンプルを、High Capacity RTキット(Applied Biosystems)を使用して逆転写した。各サンプルにおけるHER2及びACTB cDNAの相対レベルを、UNG (Applied Biosystems)と共に、Taqmanプローブ及びPlatinum DNAポリメラーゼを使用して決定した。図56は、qPCR及び mRNA-ISHアッセイによって検出される、HER2:ACTB mRNA比を示すグラフである。予想した通り、Calu-3異種移植片は、ZR75-1及びMCF-7異種移植片より、高いHER2:ACTB比を有した。MCF-7のHER2:ACTB mRNA比はほぼゼロであり、MCF-7の既知の低HER2発現から予想される通りである。Calu-3組織におけるHER2:ACTB mRNA比は、qPCRによって決定される比と比較して、mRNA-ISHで決定されるものはおよそ2.5x大きい。差異は、遺伝子発現パターン及び検出方法によって説明できる。全ての細胞が、類似なレベルでACTBを発現する。しかしながら、HER2発現は確率的であり、組織サンプルにおいて幾つかの細胞のみが、図57に示すように何れかの任意時間でHER2を発現している。mRNA-ISHアッセイは、興味のある遺伝子が発現しているそれらの細胞のみを検出する。蛍光画像は、HER2発現が見られる興味のある領域に注目し得、蛍光シグナルが定量化される場合、高HER2:ACTB比を生成する。対照的に、qPCRを実施する場合、サンプル中における全細胞が破壊され、RNAが抽出され、PCRによって増幅される。よって、qPCR 組織サンプルは、アッセイ時にHER2を活性に発現していない多くの細胞を含みうる。アッセイにおける不活性細胞の包含は、qPCRアッセイによって生成されるHER2 RNAの最終量を低減し、それによって、みかけのHER2:ACTB比を低減させる。

#### 【0238】

##### 実施例6

##### マイクロRNA-ISHアッセイにおけるハプテン-チラミドコンジュゲートシグナル

この実施例は、チラミドシグナル増幅がハプテン-チラミドコンジュゲートを使用して実施される時に、マイクロRNA (miRNA)-ISHアッセイにおいて得られるシグナルを評価する。ハプテンを、ポリエチレングリコールリンカーによってチラミンにコンジュゲートし、実施例1に記載のようにハプテン-dPEG (登録商標)<sub>8</sub>-チラミドコンジュゲートを形成した。

#### 【0239】

A. チラミド-HQ コンジュゲート (Discovery Amp-HQ) を使用した、小葉乳癌組織上におけるmiR205 LNAプローブの評価：以下は、Ventana Discovery Ultra Instrumentからの適合化手順である：

#### 【0240】

1. スライド上のパラフィンコート組織を65°Cに4分間加熱し、液体カバースリップ(LCS)で処理した。スライドをEZPrepですすぎ、LCSを再度適用した。このプロセスを、組織の脱パラフィン化を確実にするために、65°Cで合計3回実施した。

2. スライドを反応バッファーにおいてすすぎ、1mM EDTAを有するpH 7.3の5mMのTris Bufferに希釈したプロテイナーゼK (Roche Applied Science #03115836001)の15ug/mL溶液を、37°Cで8分間適用した。

3. RiboWash (VMSI #760-105)で3回すすいだ後、100 µLの二重 DIG 標識されたmiR205 LNAプローブ (750 fmol, Exiqon #18099-15)をスライドに適用し、80°Cに8分間加熱した。8分のインキュベーションの後、スライドを、60°Cで1時間ハイブリダイズした。

4. プローブのハイブリダイゼーション後、スライドに、60°Cで4分間、2x SSCの2回のストリンジェンシー洗浄を行った。

5. スライドを反応バッファーで2回洗浄し、100 µLの2 µg/mL溶液のマウス抗DIG (

Roche Applied Science #11333062910)をスライドに適用し、液体カバースリップを用い、37°Cで20分間インキュベートした。

6. 100 $\mu$ LのAmp ペルオキシダーゼインヒビター (VMSI #760-052の要素)を、スライドに8分間適用した。

7. 次いで、スライドを反応バッファーで2回洗浄し、一滴のomniMap抗マウスHRP (VMSI #60-4310)を、スライドにおいて16分間37°Cでインキュベートした。

8. スライドを反応バッファーにおいて3回洗浄した後、100 $\mu$ LのDiscovery Amp-HQ コンジュゲート及び一滴のDiscovery Amplification H2O2 (双方ともVMSI #760-052の要素)をスライドに適用し、24分間37°Cでインキュベートした。

9. 次いで、スライドを反応バッファーで2回洗浄し、100 $\mu$ LのDiscovery抗HQA (VMSI #760-4521)を適用し、スライドにおいて16分間37°Cでインキュベートした。 10

10. スライドをEZ prepで2回すすぎ、100 $\mu$ LのアクチベーターCM, NBT CM 及びBC IP CM (全てVMSI #760-161の要素)をスライドに加え、44分間インキュベートした。

11. スライドを反応バッファーにおいて3回すすいだ後、一滴のRed counterstain I (VMSI #780-2218)をスライドに適用し、8分間インキュベートした。

12. 2以上の反応バッファー洗浄をスライドに適用し、実行を終了した。

13. スライドを器具から外し、洗剤洗浄で処理した後、カバースリップを手動適用した。スライドを明視野顕微鏡によって見た。

#### 【0241】

B. 増幅無しでの小葉乳癌組織におけるmiR205 LNAプローブの評価：比較として、上記のPart Aにおける手順を、チラミド-HQ無しで反復した。工程1-5を、Part Aに記載のように実施した。工程5に従い、スライドを反応バッファーで2回洗浄し、100 $\mu$ LのUltraMap抗マウスAP (VMSI #760-4312)を適用し、スライドにおいて16分間37°Cでインキュベートした。次いで、Part Aに記載の工程10-13の手順を実施した。図58-59は、miR205 検出に対するハプテン-チラミドコンジュゲーションの効果を示す顕微鏡写真である。図58をPart B(増幅無し)における手順を使用して得て、図59をPart A(増幅)における手順を使用して得た。図59におけるmiR205シグナルは、図58におけるシグナルと比較して明らかに増加している。 20

#### 【0242】

C. チラミド-HQ コンジュゲート (Discovery Amp-HQ)を使用した増幅を伴う扁桃組織におけるmiR126 LNAプローブの評価：手順は、上のPart Aに記載したのと同じであるが、次の例外を有する：1)工程3において、二重DIG標識されたmiR205 LNAプローブの代わりに二重DIG標識されたmiR126 LNAプローブ (Exiqon #88067-15)を使用し、ハイブリダイゼーションを55°Cで実施した；2)工程4において、洗浄を55°Cで実施した。 30

#### 【0243】

D. 増幅無しでの扁桃組織におけるmiR126 LNAプローブの評価：比較として、上のpart Cにおける手順を、チラミド-HQ増幅無しで反復した。工程1-5をPart Aに記載のように実施したが、次の例外を有する：1)工程3において、二重DIG標識されたmiR205 LNAプローブの代わりに二重DIG標識されたmiR126 LNAプローブ (750 fmol, Exiqon #88067-15)を使用し、ハイブリダイゼーションを55°Cで実施した；2)工程4において、洗浄を55°Cで実施した。工程5に従い、スライドを反応バッファーで2回洗浄し、100 $\mu$ LのUltraMap抗マウスAP (VMSI #760-4312)を適用し、スライドにおいて16分間37°Cでインキュベートした。次いで、Part Aに記載の工程10-13の手順を実施した。 40

#### 【0244】

図60-61は、miR126検出に対するハプテン-チラミドコンジュゲーションの効果を示す顕微鏡写真である。図60をPart Cにおける手順を使用して得て(増幅無し)、図61をPart Dにおける手順を使用して得た(増幅)。図60におけるmiR126シグナルは、図61におけるシグナルと比較して明らかに増加している。

#### 【0245】

以下の米国特許、特許公開、及び出願は、Ventana Medical Systems, Inc.、本出願の 50

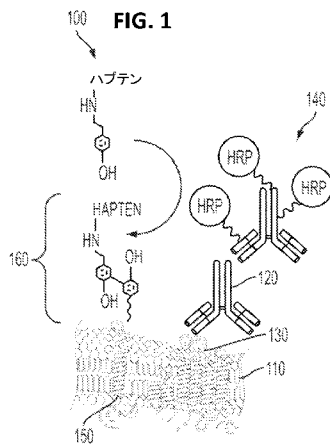
譲受人に譲渡されており、各々を出典明記によりここに援用される：米国特許第7,695,929号；U.S. Patent Publication No. 2007/0117153；U.S. Patent Publication No. 2006/0246524；U.S. Patent Publication No. 2006/0246423；U.S. Patent Application No. 12/154,472；U.S. Provisional Application No. 61/328,494；U.S. Patent Applications entitled Tyramine and Tyramine Derived Mass Tag Conjugate Compositions and Methods, filed on July 2, 2010；and Enzymatic Amplified Mass Tags for Mass Spectrometric Tissue Imaging and Immunoassays, filed on July 2, 2010。

【 0 2 4 6 】

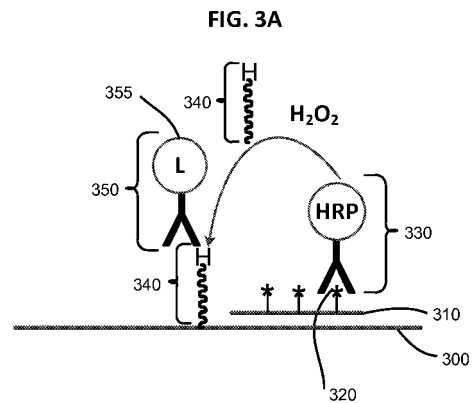
開示の発明の原理が適用されうる多くの可能な実施態様を考慮すると、示した実施態様は、単に発明の好ましい実施例であり、発明の範囲を制限するとしてみなされるべきではない。むしろ発明の範囲は、以下の請求の範囲によって定義される。従って、我々は、これらの請求の範囲及び精神である全てを、我々の発明として主張する。

10

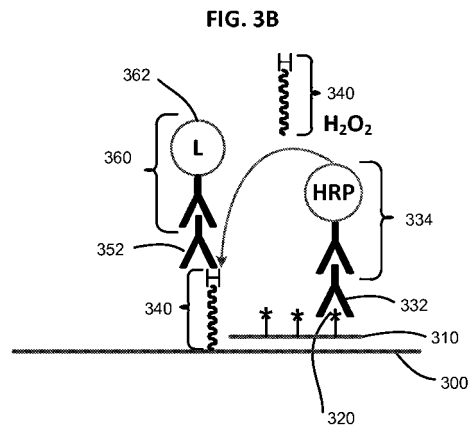
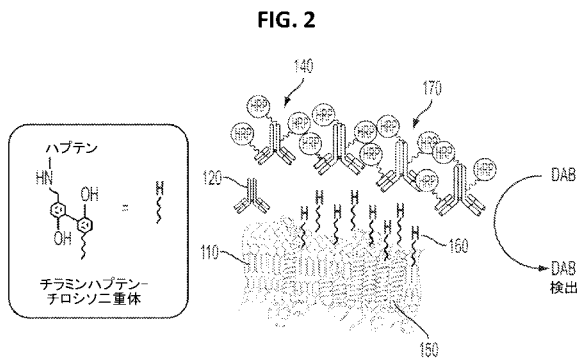
【 図 1 】



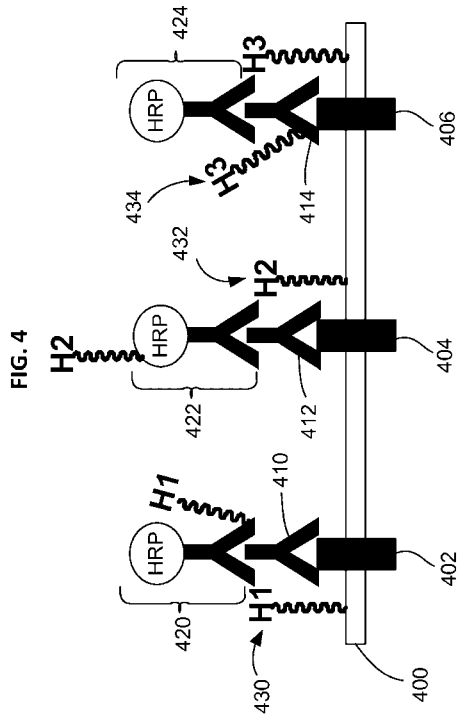
【 図 3 】



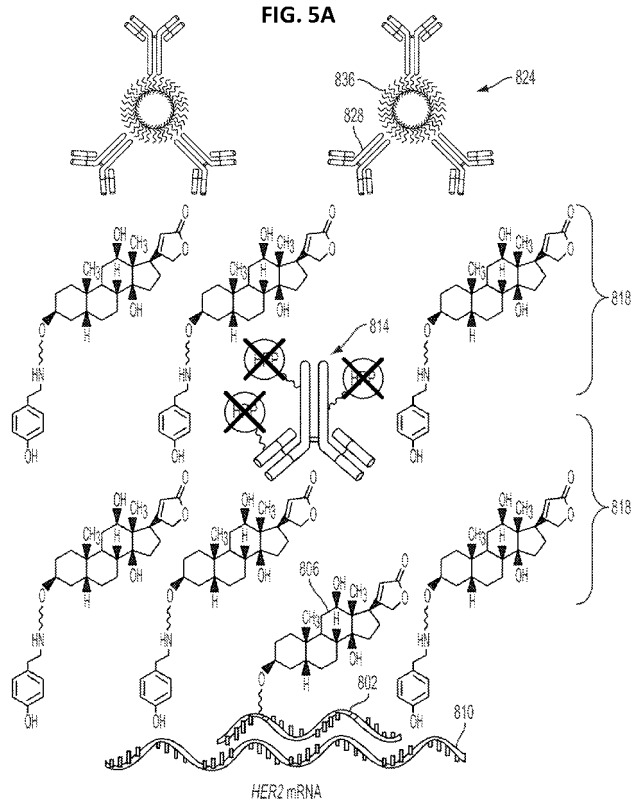
【 図 2 】



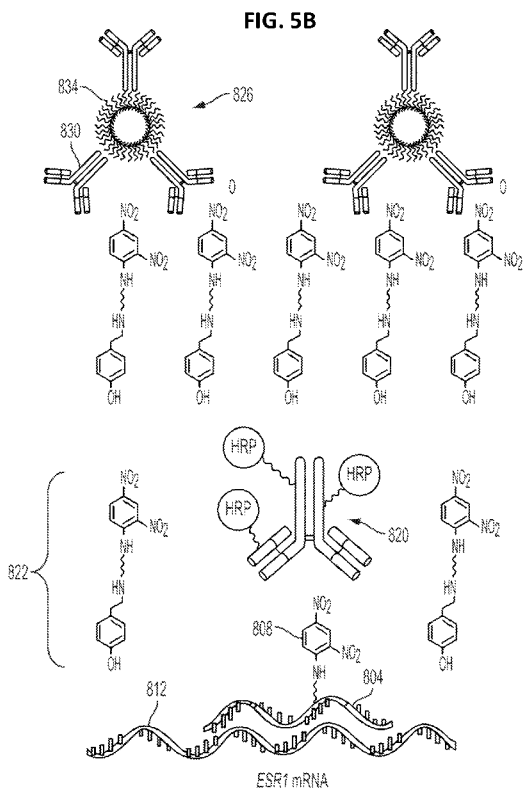
【 図 4 】



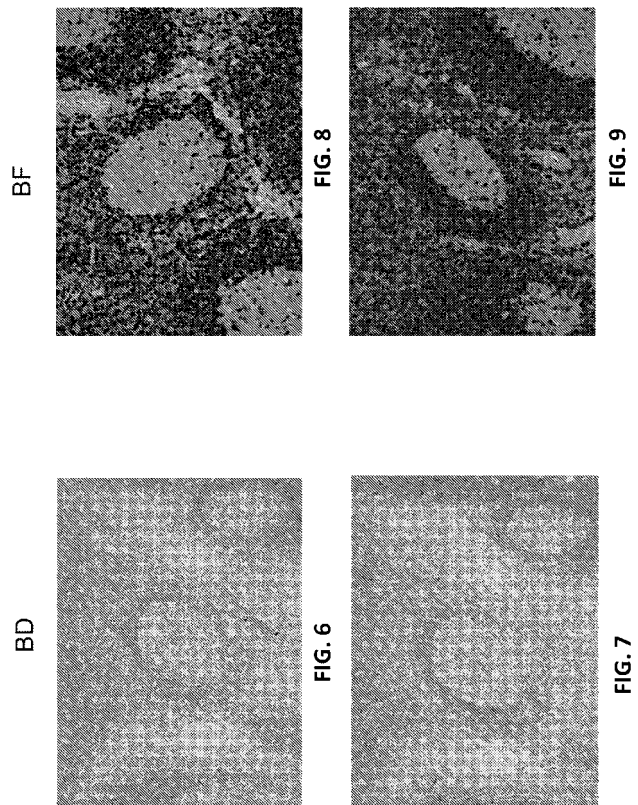
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 - 9 】



【 10 - 13 】

DCC

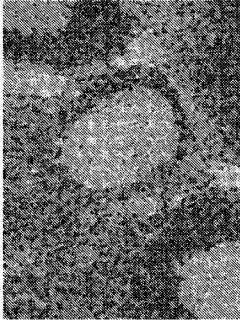


FIG. 12



FIG. 13

DABSYL

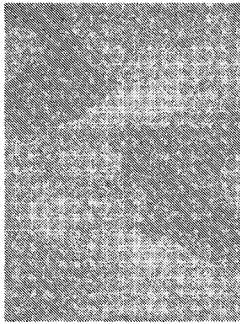


FIG. 10

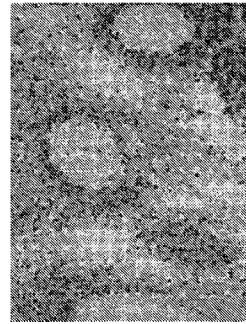


FIG. 11

DNP

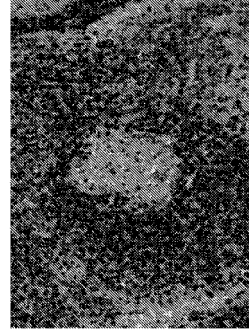


FIG. 16

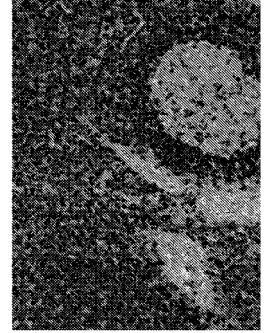


FIG. 17

【 14 - 17 】

DIG



FIG. 14

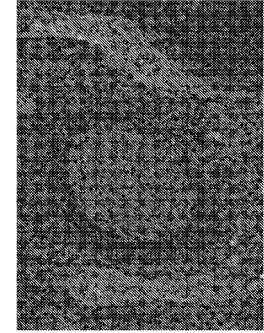


FIG. 15

【 18 - 21 】

HQ

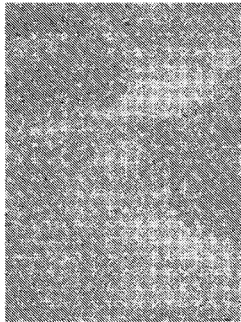


FIG. 20

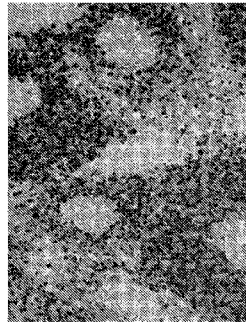


FIG. 21

【 22 - 25 】

NP

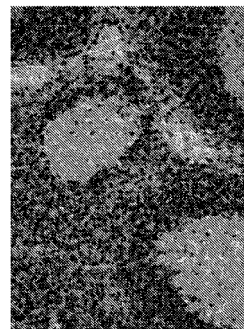


FIG. 24



FIG. 25

FITC

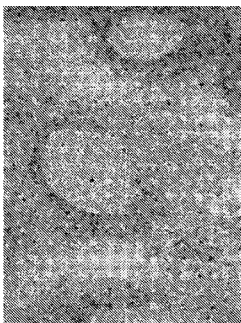


FIG. 18

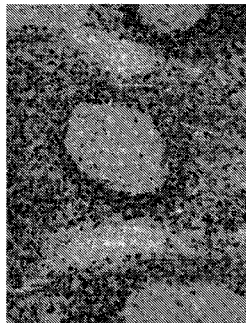


FIG. 19

NCA

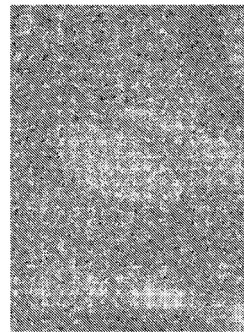


FIG. 22

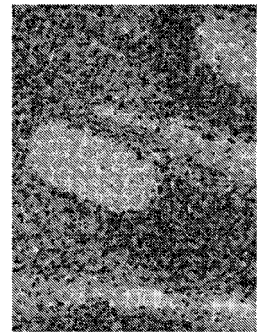
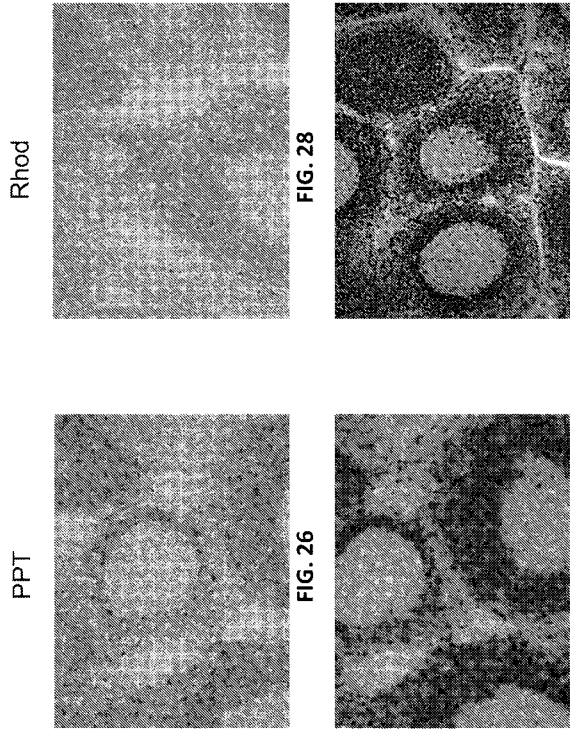


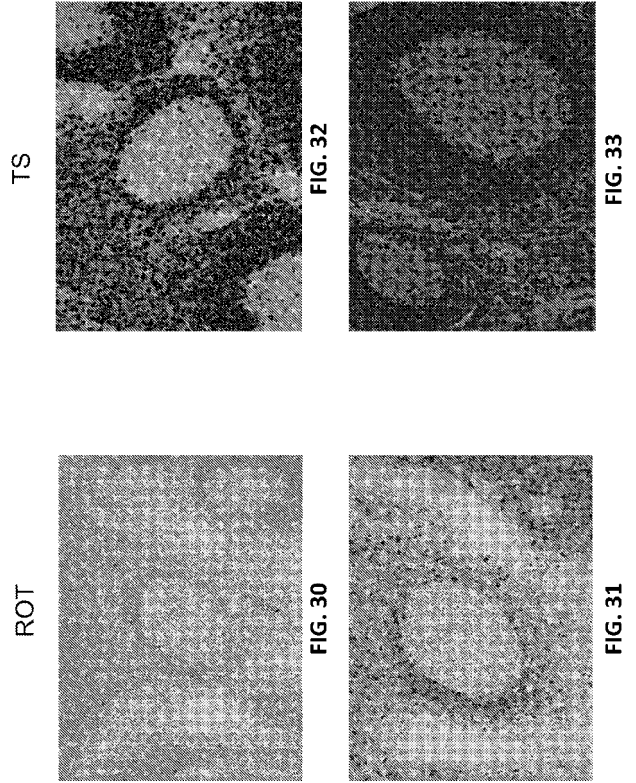
FIG. 23



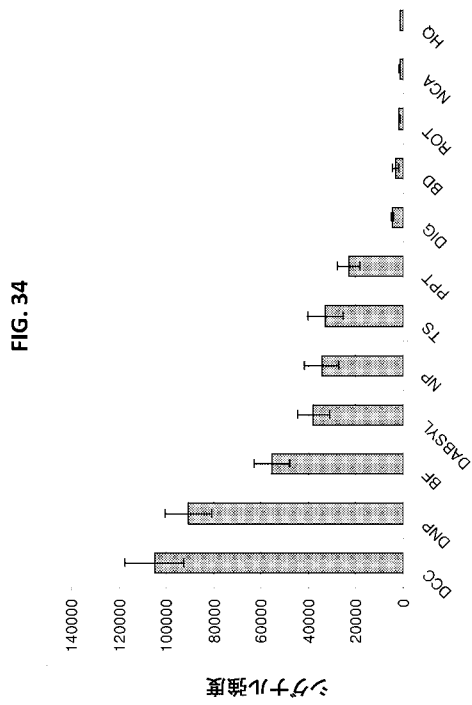
【 図 26 - 29 】



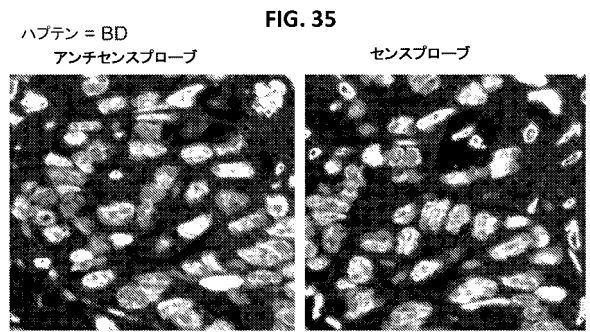
【 図 30 - 33 】



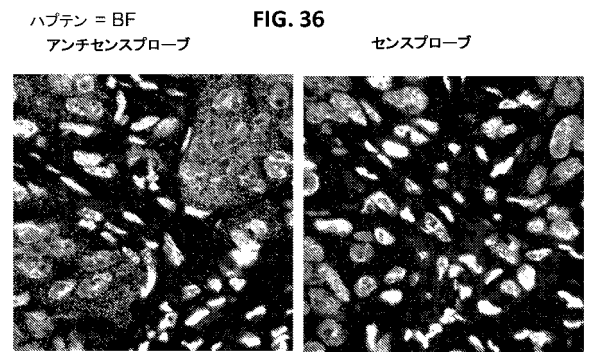
【 図 34 】



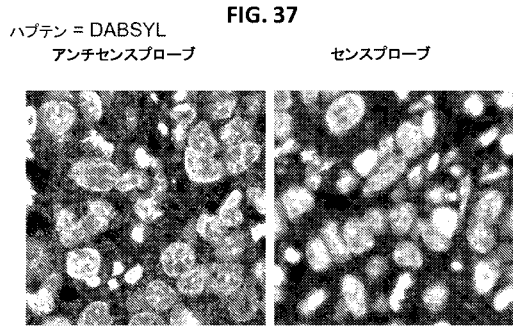
【 図 35 】



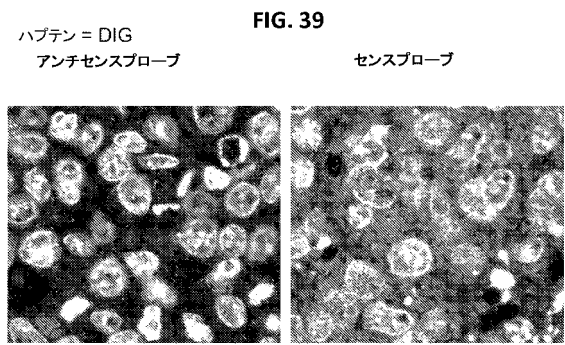
【 図 36 】



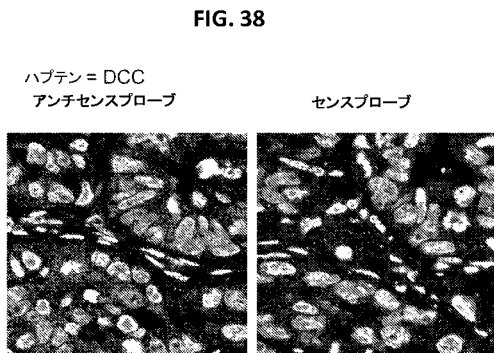
【 図 3 7 】



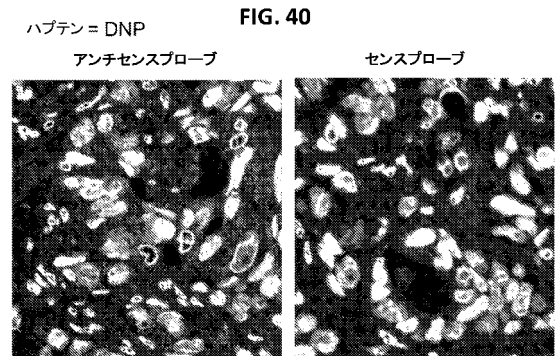
【 図 3 9 】



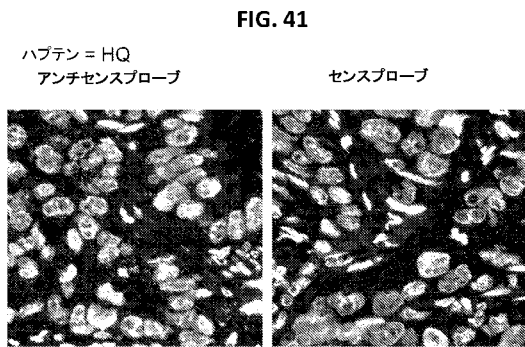
【 図 3 8 】



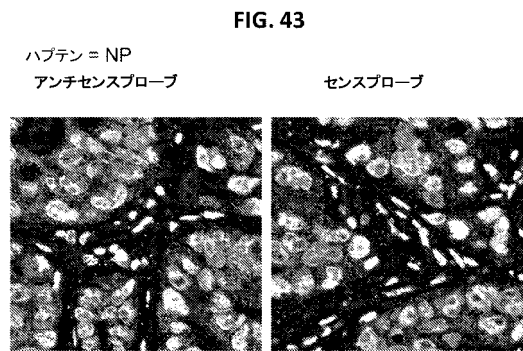
【 図 4 0 】



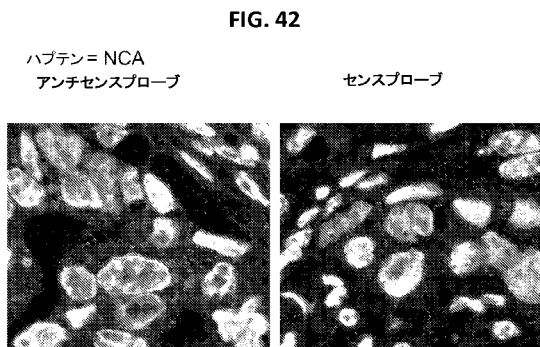
【 図 4 1 】



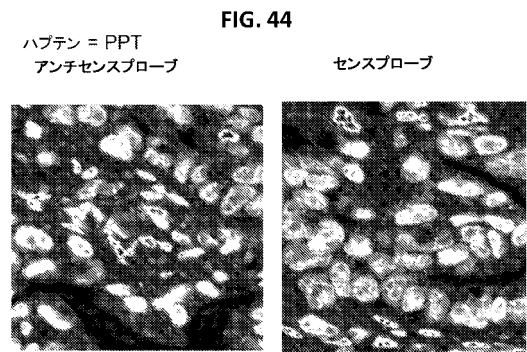
【 図 4 3 】



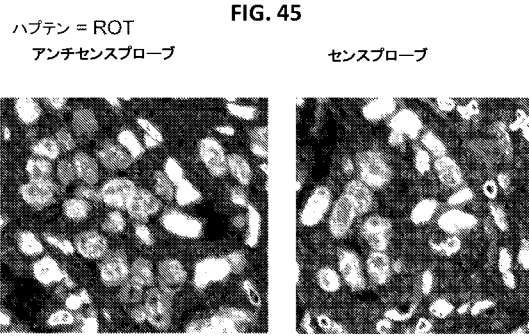
【 図 4 2 】



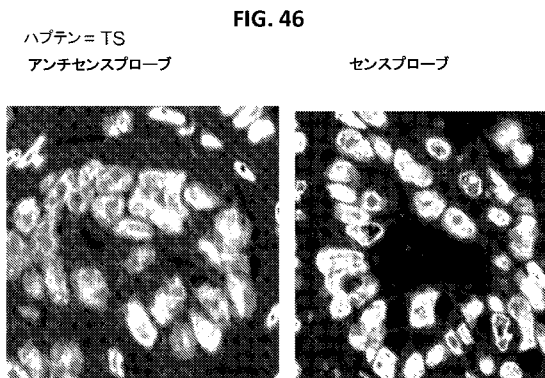
【 図 4 4 】



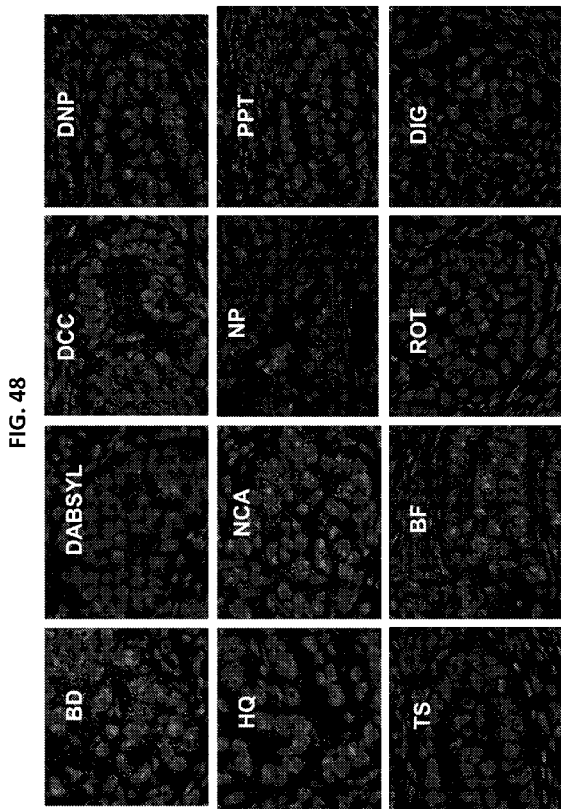
【 図 4 5 】



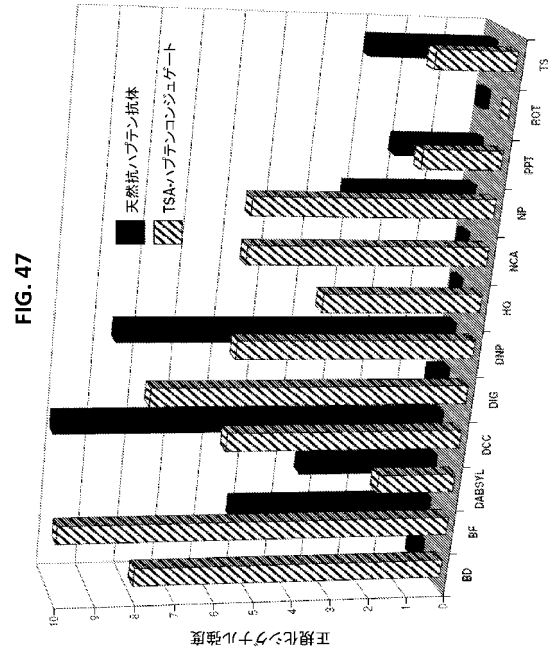
【 図 4 6 】



【 図 4 8 】



【 図 4 7 】



【 図 4 9 】



【 図 5 0 】

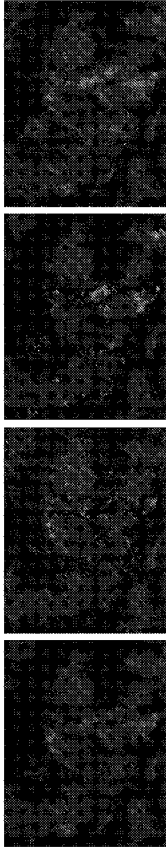


FIG. 50D

FIG. 50C

FIG. 50B

FIG. 50A

【 図 5 1 】

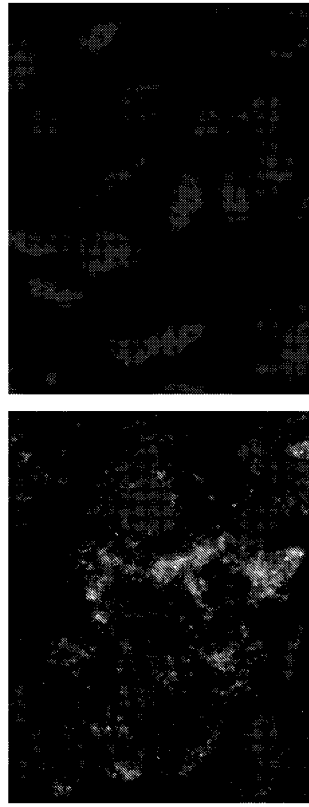


FIG. 51B

FIG. 51A

【 図 5 2 】

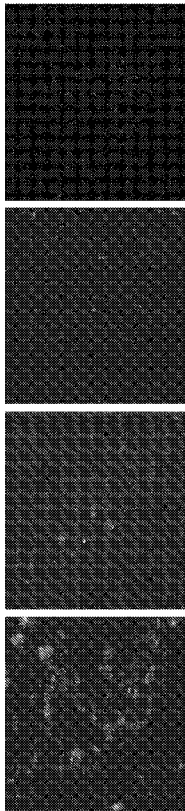


FIG. 52A

FIG. 52B

FIG. 52C

FIG. 52D

【 図 5 3 】

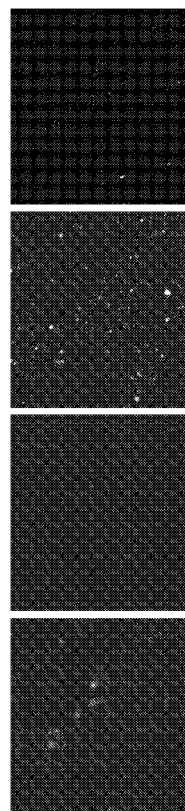


FIG. 53A

FIG. 53B

FIG. 53C

FIG. 53D

【 図 5 4 】

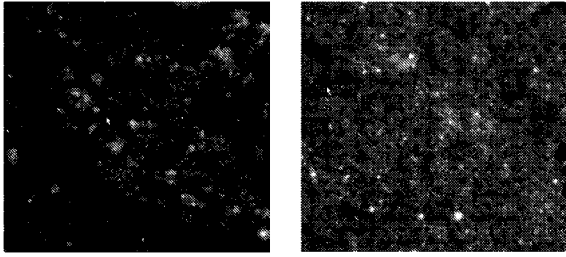


FIG. 54A

FIG. 54B

【 図 5 5 】

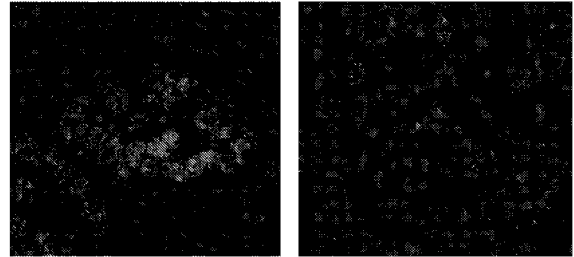


FIG. 55A

FIG. 55B

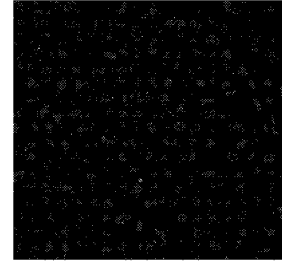


FIG. 55C

【 図 5 6 】

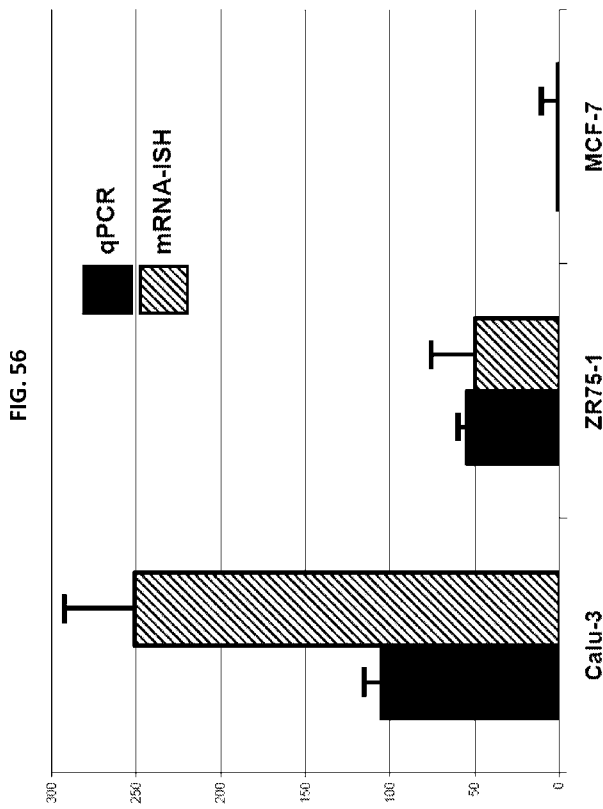


FIG. 56

【 図 5 7 】



FIG. 57

【 図 5 8 - 6 1 】

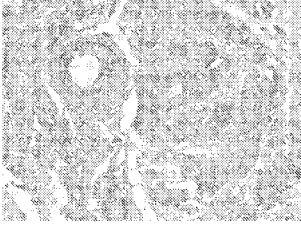


FIG. 58

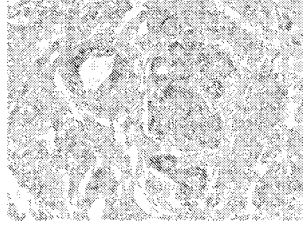


FIG. 59

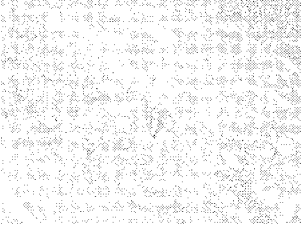


FIG. 60



FIG. 61

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07C213/00 G01N33/58 A61K47/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C G01N 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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 933 355 A1 (UNIV MAASTRICHT [NL]) 4 August 1999 (1999-08-04)  Abstract; par. 25; par. 40; par. 42 par. 44; examples.	1-14,17, 18, 27-31, 33-55
Y	Anonymous: "Tyramide Signal Amplification (TSA) Technology", Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th Ed. 2002, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 152-159, XP55007657, Retrieved from the Internet: URL:http://www.mobitec.com/probes/ [retrieved on 2011-09-21] the whole document	1-14,17, 18, 27-31, 33-55
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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
24 February 2012		09/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  López García, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2011/042849**Box No. 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.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
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 No. 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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
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.:  
  
1-14, 17, 18, 27-31, 33-55
  
4.  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.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



International Application No. PCT/ US2011/ 042849

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 13, 18(completely); 1-11, 27, 28, 30, 31, 33-55(partially)

Hapten conjugate as defined in claim 1 wherein the hapten selected from oxazole, pyrazole and thiazole and methods using the same.

---

- 2-12. claims: 1-12, 14-17, 19-55(all partially)

Hapten conjugate as defined in claim 1 and methods using the same. The haptens have been grouped as follows:  
Invention 2: benzofurazan; Invention 3: triterpene;  
Invention 4: urea and thiourea; Invention 5: nitroaryl;  
Invention 6: rotenoid; Invention 7: cyclolignan; Invention 8: heterobiaryl; Invention 9: azoaryl; Invention 10: benzodiazepine; Invention 11: 2,3,6,7,-tetrahydro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopyrano[6,7,8-ij]quinolizine-10-carboxylic acid; Invention 12: 7-diethylamino-3-carboxycoumarin.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2008/063378 A2 (VENTANA MED SYST INC [US]; KOSMEDER JERRY W [US]; LEFEVER MARK [US]; J) 29 May 2008 (2008-05-29)</p> <p>Abstract; p. 98, l. 4-p.101, l. 11.</p> <p>-----</p>	1-14,17, 18, 27-31, 33-55
X	<p>WEI WANG ET AL: "(-)-Bacillamide C: the convergent approach", ORGANIC &amp; BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 8, no. 3, 1 January 2010 (2010-01-01), page 529, XP55007666, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/b918214d Abstract, scheme 1 in combinatin with table 1.</p> <p>-----</p>	1-4, 8-11,13, 18,30
X	<p>US 3 912 756 A (WOLFF HANS PETER ET AL) 14 October 1975 (1975-10-14)</p> <p>Abstract; examples.</p> <p>-----</p>	1-4, 8-11,13, 18,30
X	<p>WO 00/18744 A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO [JP]; HATTORI KOUJI [JP]; TANAKA AKIRA [JP]) 6 April 2000 (2000-04-06)</p> <p>Abstract; example 2.82.</p> <p>-----</p>	1-4, 8-11,13, 18,30
X	<p>WO 01/12188 A1 (PHARMACIA &amp; UPJOHN SPA [IT]; UPJOHN CO [US]; PEVARELLO PAOLO [IT]; ORS) 22 February 2001 (2001-02-22)</p> <p>Abstract; compounds on p. 41 and 42.</p> <p>-----</p>	1-4, 8-11,13, 18,30
X	<p>US 2002/132844 A1 (SHROFF HITESH [US] ET AL) 19 September 2002 (2002-09-19)</p> <p>Abstract; 4th compound on p. 10.</p> <p>-----</p>	1-4, 8-11,13, 18,30
X	<p>BIANUCCI A M ET AL: "BENZODIAZEPINE RECEPTOR AFFINITY AND INTERACTION OF SOME N-(INDOL-3-YLGLYOXYLYL)AMINO DERIVATIVES", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 35, no. 12, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2214-2220, XP001056519, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM00090A011 Compound 10</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-4, 8-11,30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JORDAN A M ET AL: "MELANOCYTE-DIRECTED ENZYME PRODRUG THERAPY (MDEPT): DEVELOPMENT OF SECOND GENERATION PRODRUGS FOR TARGETED TREATMENT OF MALIGNANT MELANOMA", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 9, no. 6, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1549-1558, XP002282348, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00039-6 Compound 31. -----	1-4, 8-11,30
X	US 4 922 022 A (DIXON JOHN [GB] ET AL) 1 May 1990 (1990-05-01) Compound in col. 34, l. 29-30. -----	1-4, 8-11,30
X	BIGGE C F ET AL: "Synthesis of N-desmethyl PNQX: elaboration into an immunogenic conjugate and a radioiodinated ligand; radioimmunoassay for the AMPA/NMDA antagonist, PNQX", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 7, no. 15, 5 August 1997 (1997-08-05), pages 1979-1984, XP004136370, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/S0960-894X(97)00344-2 Compound 9. -----	1-4, 8-11,30
X	JORDAN ALLAN M ET AL: "Synthesis and analysis of urea and carbamate prodrugs as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT)", BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 10, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 2625-2633, XP002669129, ISSN: 0968-0896 Compounds 5 and 9. -----	1-4, 8-11,30
X	CHENG J F ET AL: "A convenient solution and solid-phase synthesis of DELTA<5>-2-oxopiperazines via N-acyliminium ions cyclization", TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 43, no. 36, 2 September 2002 (2002-09-02), pages 6293-6295, XP027242165, ISSN: 0040-4039 [retrieved on 2002-09-02] Compound 1e -----	1-4, 8-11,30
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOBE M ET AL: "Discovery of Quinazolines as a Novel Structural Class of Potent Inhibitors of NF-kB Activation", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 11, no. 3, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 383-391, XP002980883, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00440-6 Compound on p. 390, LH col. par. 1 "6-nitro-4-(4-phenoxyphenethylamino)quinazoline". -----	1-4, 8-11,30
X	CUNY G D: "Synthesis of (+/-)-aporphine utilizing Pictet-Spengler and intramolecular phenol ortho-arylation reactions", TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 45, no. 26, 21 June 2004 (2004-06-21), pages 5167-5170, XP004512256, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/J.TETLET.2004.04.194 Compound 12. -----	1-4, 8-11,30
X	EP 1 466 902 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP] TAKEDA PHARMACEUTICAL [JP]) 13 October 2004 (2004-10-13) Compound of example 188 -----	1-4, 8-11,30
X	US 2005/009871 A1 (RAMESH USHA V [US] ET AL) 13 January 2005 (2005-01-13) Compound 223 -----	1-4, 8-11,30
X	WO 2005/042464 A1 (KAROBIO AB [SE]; JERNSTEDT HENRIK [SE]; GARG NEERAJ [SE]; GUSTAVSSON A) 12 May 2005 (2005-05-12) Compounds 36, 51, 72 -----	1-4, 8-11,30
X	WO 2005/042530 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM CA LTD [CA]; SIMONEAU BRUNO [CA]; BORDELEAU JOSEE) 12 May 2005 (2005-05-12) Compound 1120 -----	1-4, 8-11,30
X	WO 2005/066139 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; FLEMING PAUL E [US]; SHI ZHAN [US]; CHEN SH) 21 July 2005 (2005-07-21) Compound 52 -----	1-4, 8-11,30
X	US 2002/032199 A1 (POSS MICHAEL A [US] ET AL) 14 March 2002 (2002-03-14) Compound in paragraph 548 -----	1-4, 8-11,30
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/037779 A2 (INST MEDIZINTECHNOLOGIE MAGDEB [DE]; KEYNEUROTEK AG [DE]; ANSORGE SIEG) 28 April 2005 (2005-04-28) Compounds D5.037, D4.064 -----	1-4, 8-11,30
X	US 6 589 983 B1 (TANIKAWA KEIZO [JP] ET AL) 8 July 2003 (2003-07-08) Col. 10, table 7, l. 47 and 48. -----	1-4, 8-11,30
X	STEFAN BECKER ET AL: "Single-Cell High-Throughput Screening To Identify Enantioselective Hydrolytic Enzymes", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 47, no. 27, 23 June 2008 (2008-06-23) , pages 5085-5088, XP55018834, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.200705236 Compound 6 -----	1-4, 8-11,30
X	YANG K ET AL: "Design and synthesis of novel chloramphenicol amine derivatives as potent aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 17, no. 11, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 3810-3817, XP026118926, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/J.BMC.2009.04.038 [retrieved on 2009-04-24] Compound 6k -----	1-4, 8-11,30
X,P	WO 2010/121963 A1 (NERVIANO MEDICAL SCIENCES SRL [IT]; BRASCA MARIA GABRIELLA [IT]; CASAL) 28 October 2010 (2010-10-28) Compound on p. 42 , 3rd paragarph -----	1-4, 8-11,30
X	RZEPECKI ET AL: "New Heterocyclic beta-Sheet Ligands with Peptidic Recognition Elements", JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON.; US, vol. 69, no. 16, 6 February 2004 (2004-02-06), pages 5168-5178, XP002295003, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/J00400111 Compound 9a -----	1-4, 8-11,30
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTIN KESSLER ET AL: "Sequentially Photocleavable Protecting Groups in Solid-Phase Synthesis", ORGANIC LETTERS, vol. 5, no. 8, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 1179-1181, XP55018908, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/ol027454g Compound 13b -----	1-4, 8-11,30
X	KATHLEEN L. WERT ET AL: "Hofmann degradation of .beta.-hydroxy ammonium salts. .alpha.- and .beta.-Hydroxylaunosine, 7-hydroxyglauicine, and 13-hydroxyxylopinine", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 47, no. 26, 1 December 1982 (1982-12-01), pages 5141-5150, XP55018904, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo00147a020 Compound 13 (R=NO2) on p. 5148, LH col. -----	1-4, 8-11,30
X	KAMETANI T ET AL: "STUDIES ON THE SYNTHESSES OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS. DCXXVII: THE FORMATION OF 2,3,9,10-TETRAMETHOXYBENZÜC 3/4 ACRIDINE BY TREATMENT OF 6,7-DIMETHOXY-1-(4,5-DIMETHOXY-2-NITROPHEN ETHYL)-2- METHYLISOQUINOLINE WITH TRIETHYL PHOSPHITE", CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, vol. 23, no. 9, 1 January 1975 (1975-01-01), pages 2025-2028, XP002049516, ISSN: 0009-2363 Compound 8 -----	1-4, 8-11,30
X	J TRÜGER ET AL: "Beiträge zur Erforschung der Angosturaalkaloide", ARCHIV DER PHARMAZIE, vol. 250, 1 January 1912 (1912-01-01), pages 494-531, XP55018903, DOI: 10.1002/ardp.19122500143 Nitrogalipin on p. 511. -----	1-4, 8-11,30
X	LUDWIG REICHEL ET AL: "Über die Nitrierung von 3' .4'-Dimethoxy-flavanon und Derivaten", JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, vol. 712, 1 January 1968 (1968-01-01), pages 146-151, XP55018891, ISSN: 0075-4617 Compounds 4 and 6. -----	1-4, 8-11,30
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TADASHI KATAOKA ET AL: "Synthesis and structure-activity relationships of thioflavone derivatives as specific inhibitors of the ERK-MAP kinase signaling pathway", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 12, no. 9, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 2397-2407, XP55018893, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2004.02.002 Compound 5h -----	1-4, 8-11,30
X	NOUR EDDINE FAHMI ET AL: "Site-Specific Incorporation of Glycosylated Serine and Tyrosine Derivatives into Proteins", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 129, no. 12, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 3586-3597, XP55018882, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja067466n Compound 14 -----	1-4, 8-11,30
X	RASTRELLI L ET AL: "New 12a-hydroxyrotenoids from <i>Gliricidia sepium</i> bark", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 62, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 188-190, XP009156290, ISSN: 0163-3864 Compound 3 -----	1-3, 8-11,30
X	YANG X W ET AL: "Abiesanol A, a novel biflavanol with unique six connective hexacyclic rings isolated from <i>Abies georgei</i> ", TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 19, 5 May 2008 (2008-05-05), pages 3042-3044, XP022594824, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/J.TETLET.2008.03.065 [retrieved on 2008-03-16] Fig. 1. ----- -/--	1-3, 8-11,30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ABIDI ET AL: "High-efficiency resolution of isomeric rotenone compounds by high-performance liquid chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 317, 28 December 1984 (1984-12-28), pages 383-401, XP026553871, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)91678-4 [retrieved on 1984-12-28] Fig. 1, compound 7A-7D, 8A-8D.</p> <p>-----</p>	1-3, 8-11,30
X	<p>CHEN CHAO-TSEN ET AL: "A highly selective fluorescent chemosensor for lead ions", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC; US, vol. 124, no. 22, 5 June 2002 (2002-06-05), pages 6246-6247, XP009156291, ISSN: 0002-7863 Compounds 1, 2.</p> <p>-----</p>	1-3, 8-11,30
X	<p>ISABELLE AUJARD ET AL: "o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation", CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 12, no. 26, 6 September 2006 (2006-09-06), pages 6865-6879, XP55018835, ISSN: 0947-6539, DOI: 10.1002/chem.200501393 Compounds 5c, 8c, 9c, 10c</p> <p>-----</p>	1-3, 8-11,30
X	<p>US 2005/019711 A1 (TAKIZAWA HIROO [JP]) 27 January 2005 (2005-01-27) Compound D-163</p> <p>-----</p>	1-3, 8-11,30
X	<p>ROMAN&amp;EMSP14;V. ROZHKOV ET AL: "Fluorogenic Transformations Based on Formation of C&amp;#xF8FF;C Bonds Catalyzed by Palladium: An Efficient Approach for High Throughput Optimizations and Kinetic Studies", ADVANCED SYNTHESIS &amp; CATALYSIS, vol. 350, no. 1, 4 January 2008 (2008-01-04), pages 71-75, XP55018573, ISSN: 1615-4150, DOI: 10.1002/adsc.200700384 Compound 7b</p> <p>-----</p>	1-3, 8-11,30

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/042849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. S. YATHIRAJAN ET AL: "7-Diethylamino-3-[(2 Z )-3-(6-methoxy-2-naphthyl)prop-2-enoyl]-2 H -chromen-2-one", ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION E STRUCTURE REPORTS ONLINE, vol. 63, no. 3, 15 March 2007 (2007-03-15) , pages 01140-01141, XP55018723, ISSN: 1600-5368, DOI: 10.1107/S1600536807004771 Compound I -----	1-3, 8-11,30
X	US 5 455 143 A (ALI M ZAKI [US]) 3 October 1995 (1995-10-03) Compounds 4-8 -----	1-3, 8-11,30
E	WO 2012/003478 A2 (VENTANA MED SYST INC [US]; HONG RUI [US]; WANG HONG [US]; LEFEVER MARK) 5 January 2012 (2012-01-05) Compound on top of p. 79; compound CDO-PEG8-Arg-PL-Tyr on p. 156 -----	1-11,27, 28,30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/042849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0933355	A1	04-08-1999	NONE
WO 2008063378	A2	29-05-2008	AU 2007322261 A1 29-05-2008 CA 2666234 A1 29-05-2008 EP 2078197 A2 15-07-2009 JP 2010508532 A 18-03-2010 US 2008268462 A1 30-10-2008 US 2010184087 A1 22-07-2010 US 2010297725 A1 25-11-2010 WO 2008063378 A2 29-05-2008
US 3912756	A	14-10-1975	AT 334364 B 10-01-1976 CH 592681 A5 15-11-1977 DE 2320387 A1 31-10-1974 FR 2226179 A1 15-11-1974 GB 1412915 A 05-11-1975 JP 50058056 A 20-05-1975 NL 7405165 A 23-10-1974 US 3912756 A 14-10-1975
WO 0018744	A1	06-04-2000	BR 9914451 A 22-05-2001 CA 2345474 A1 06-04-2000 CN 1328550 A 26-12-2001 EP 1115712 A1 18-07-2001 HU 0103511 A2 28-01-2002 JP 2002525361 A 13-08-2002 US 6437146 B1 20-08-2002 WO 0018744 A1 06-04-2000
WO 0112188	A1	22-02-2001	AR 035557 A1 16-06-2004 AT 361070 T 15-05-2007 AU 6747000 A 13-03-2001 BR 0013277 A 18-06-2002 CA 2380786 A1 22-02-2001 CN 1379668 A 13-11-2002 CO 5200848 A1 27-09-2002 DE 60034683 T2 17-01-2008 EP 1202734 A1 08-05-2002 ES 2284518 T3 16-11-2007 HU 0301857 A2 29-09-2003 JP 2003507328 A 25-02-2003 MX PA02001497 A 21-07-2003 NO 20020687 A 03-04-2002 NZ 517238 A 30-01-2004 PE 04822001 A1 20-04-2001 PL 354058 A1 15-12-2003 SK 2082002 A3 10-09-2002 US 6387900 B1 14-05-2002 WO 0112188 A1 22-02-2001 ZA 200201118 A 28-05-2003
US 2002132844	A1	19-09-2002	US 2002132844 A1 19-09-2002 US 2005026985 A1 03-02-2005
US 4922022	A	01-05-1990	AU 614749 B2 12-09-1991 AU 1706788 A 21-12-1988 CA 1294289 C 14-01-1992 DE 3874206 D1 08-10-1992

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/042849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		EP 0292202 A1	23-11-1988	
		EP 0314725 A1	10-05-1989	
		FI 890207 A	16-01-1989	
		IL 86411 A	29-03-1992	
		JP H01503303 A	09-11-1989	
		NO 890187 A	16-01-1989	
		NZ 224676 A	28-05-1991	
		PT 87503 A	31-05-1989	
		US 4922022 A	01-05-1990	
		US 4939147 A	03-07-1990	
		WO 8809326 A1	01-12-1988	
-----				
EP 1466902	A1	13-10-2004	AU 2002367424 A1	24-07-2003
			CA 2471754 A1	17-07-2003
			EP 1466902 A1	13-10-2004
			US 2005101657 A1	12-05-2005
			WO 03057669 A1	17-07-2003
-----				
US 2005009871	A1	13-01-2005	NONE	
-----				
WO 2005042464	A1	12-05-2005	AU 2004285744 A1	12-05-2005
			CA 2543345 A1	12-05-2005
			EP 1685090 A1	02-08-2006
			JP 2007509116 A	12-04-2007
			US 2008058383 A1	06-03-2008
			WO 2005042464 A1	12-05-2005
-----				
WO 2005042530	A1	12-05-2005	CA 2541618 A1	12-05-2005
			EP 1682547 A1	26-07-2006
			JP 4537407 B2	01-09-2010
			JP 2007509860 A	19-04-2007
			US 2005239814 A1	27-10-2005
			WO 2005042530 A1	12-05-2005
-----				
WO 2005066139	A2	21-07-2005	AR 047185 A1	11-01-2006
			AT 437861 T	15-08-2009
			AU 2005204060 A1	21-07-2005
			CA 2559888 A1	21-07-2005
			DK 1701944 T3	09-11-2009
			EP 1701944 A2	20-09-2006
			EP 2123647 A1	25-11-2009
			ES 2330863 T3	16-12-2009
			HR 20090572 T1	31-01-2010
			JP 2007517895 A	05-07-2007
			PT 1701944 E	03-11-2009
			SI 1701944 T1	31-03-2010
			US 2006040968 A1	23-02-2006
			US 2011071134 A1	24-03-2011
			WO 2005066139 A2	21-07-2005
-----				
US 2002032199	A1	14-03-2002	NONE	
-----				
WO 2005037779	A2	28-04-2005	AU 2004281959 A1	28-04-2005
			CA 2542807 A1	28-04-2005
			CN 1889960 A	03-01-2007
			DE 10348022 A1	25-05-2005
			EP 1675594 A2	05-07-2006
			JP 2008500270 A	10-01-2008

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/042849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2007037785 A1	15-02-2007
		WO 2005037779 A2	28-04-2005
US 6589983	B1 08-07-2003	AT 311378 T	15-12-2005
		AU 766935 B2	23-10-2003
		AU 7314300 A	24-04-2001
		CA 2383583 A1	29-03-2001
		CN 1374957 A	16-10-2002
		CZ 20020802 A3	12-02-2003
		DE 60024471 D1	05-01-2006
		DE 60024471 T2	03-08-2006
		EP 1212314 A1	12-06-2002
		HK 1047106 A1	28-04-2006
		HU 0202690 A2	28-12-2002
		IL 147968 A	10-04-2006
		NO 20021294 A	15-03-2002
		NZ 517404 A	31-01-2003
		RU 2234502 C2	20-08-2004
		SK 3292002 A3	01-04-2003
		US 6589983 B1	08-07-2003
		WO 0121610 A1	29-03-2001
WO 2010121963	A1 28-10-2010	AR 076645 A1	29-06-2011
		EP 2421833 A1	29-02-2012
		TW 201041856 A	01-12-2010
		US 2012046266 A1	23-02-2012
		WO 2010121963 A1	28-10-2010
US 2005019711	A1 27-01-2005	JP 4411153 B2	10-02-2010
		JP 2005055875 A	03-03-2005
		US 2005019711 A1	27-01-2005
US 5455143	A 03-10-1995	NONE	
WO 2012003478	A2 05-01-2012	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/28	
C 1 2 Q	1/42	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
			C 1 2 Q	1/42	

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

- (72) 発明者 コスメーダー, ジェローム, ダブリュ.  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 5 0, ツーソン, ノース モカシン トレイル 5 3 3 0
- (72) 発明者 メイ, エリック  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 2 2 4, チャンドラー, ノース アポロ ドライブ 1 1 3 7
- (72) 発明者 デイ, ウィリアム  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 0 4, ツーソン, チョーヤ エステート ドライブ 1 9 5 2
- (72) 発明者 ラフィーバー, マーク  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 4 2, ツーソン, ウェスト カミーノ デ ラ カターヴァ 2 5 4 1
- (72) 発明者 ペダータ, アン, エム.  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 1 8, ツーソン, イースト カミーノ ラ ソレラ 2 1 4 8
- (72) 発明者 ビーニアーツ, クリストファー  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 1 8, ツーソン, イースト クワイエット キャニオン ドライブ 2 2 6 3
- (72) 発明者 ミラー, フィリップ  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 3 7, ツーソン, カーレ デル ヴァソ 1 8 2 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA14 BB25 CB01 CB02 DA14 DA36 FA16 FB01  
FB02 FB03 FB12 FB13 GC15  
4B063 QA13 QA18 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR56 QR72  
QR77 QS02 QS33 QS34 QX02