



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109642898 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 07

(21) 申请号 201780053045.7
 (22) 申请日 2017.06.27
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109642898 A
 (43) 申请公布日 2019.04.16
 (30) 优先权数据
 62/355398 2016.06.28 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.02.27
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2017/065795 2017.06.27
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/002015 EN 2018.01.04
 (73) 专利权人 文塔纳医疗系统公司
 地址 美国亚利桑那州
 (72) 发明人 J.阿什沃思-夏普 B.D.凯利
 M.勒菲弗 N.W.波拉斯克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
 专利代理师 任晓华 黄希贵

(51) Int.Cl.
 C09B 59/00 (2006.01)
 C09B 23/00 (2006.01)
 C09B 23/08 (2006.01)
 C09B 11/24 (2006.01)
 C09B 11/28 (2006.01)
 G01N 33/532 (2006.01)
 G01N 33/533 (2006.01)
 G01N 33/58 (2006.01)

(56) 对比文件
 WO 2010111674 A2, 2010.09.30
 WO 2010111674 A2, 2010.09.30
 WO 2015124703 A1, 2015.08.27
 CN 101553579 A, 2009.10.07
 CN 103282516 A, 2013.09.04
 WO 03067210 A2, 2003.08.14
 WO 0014545 A1, 2000.03.16

审查员 潘成玉

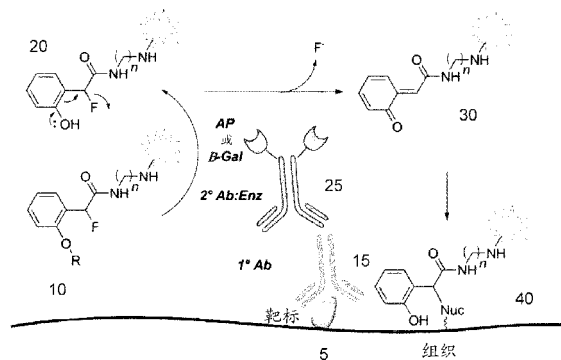
权利要求书17页 说明书49页 附图13页

(54) 发明名称

用多染料醌甲基化物和酪酰胺缀合物的显色IHC和ISH染色的新颜色

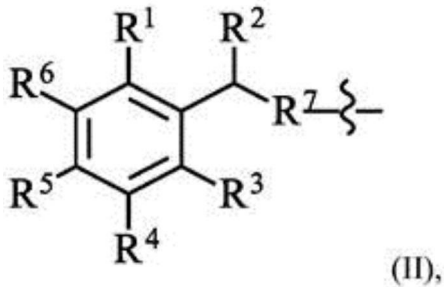
(57) 摘要

本文公开了新型显色缀合物,所述缀合物包含至少两个可检测部分。



1. 包含组织反应性部分和至少两个发色团的多染料缀合物,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺,且其中所述至少两个发色团是不同的;

其中所述醌甲基化物前体具有式(II)的结构:



其中

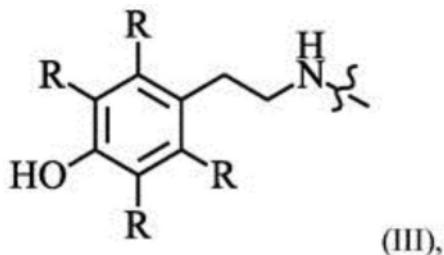
R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基;

R^2 是卤素;

R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团;且

R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$,其中 w 是范围为1至12的整数;

其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构:



其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团;并且

其中所述至少两个发色团选自TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcyl、Cy3、Cy7、Cy3.5、Cy3B、Cy5.5、罗丹明800、荧光素、5,6-羧基荧光素、FITC、5,6-羧基罗丹明110、5,6-羧基罗丹明6G、5,6-羧基-X-罗丹明和罗丹明B异硫氰酸酯。

2. 权利要求1的缀合物,其中所述多染料缀合物显示与所述至少两个发色团中的任一个的颜色不同的颜色。

3. 权利要求1的缀合物,其中所述至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。

4. 权利要求3的缀合物,其中所述多官能接头是异双官能接头。

5. 权利要求4的缀合物,其中所述异双官能接头是赖氨酸或其衍生物。

6. 权利要求3的缀合物,其中所述多官能接头是树枝状分子。

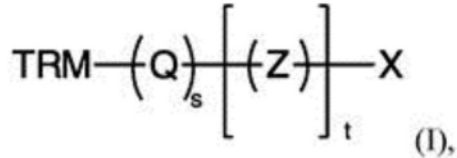
7. 权利要求6的缀合物,其中所述树枝状分子选自聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状分子、Janus树枝状分子和双-MPA树枝状分子。

8. 权利要求3的缀合物,其中所述多官能接头选自降亚精胺和精胺。

9. 权利要求3的缀合物,其中所述多官能接头具有范围为50g/mol和300g/mol之间的分子量。

10. 权利要求1的缀合物,其中所述至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

11. 具有式(I)的多染料缀合物:

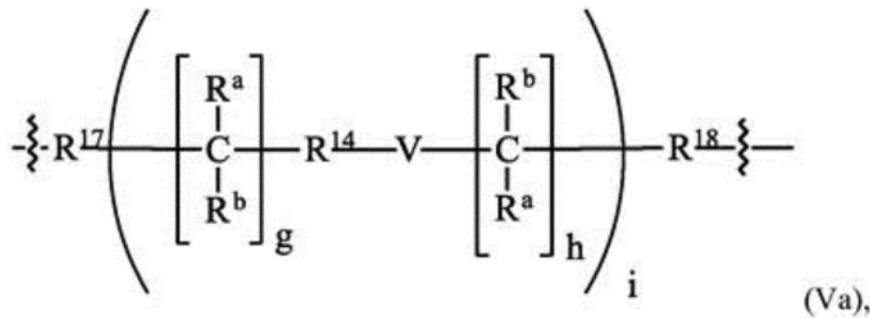


其中

“TRM”是选自醌甲基化物前体或酪酰胺的组织反应性部分;

Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团;

其中Z具有式(Va)的结构:



其中

R^{17} 和 R^{18} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团;

R^{14} 是键、羰基、亚胺或硫酮;

V是 $-\text{N}(\text{X})-$; $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{X})-$; $-\text{C}(\text{X})_2-$ 或 $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{N}(\text{R}^{16})(\text{X}))$;

R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基基团、F、Cl或 $\text{N}(\text{R}^{15})(\text{R}^{16})$;

R^{15} 和 R^{16} 独立地是键或 $-\text{CH}_3$ 或H;

g是0或范围为1至4的整数;

h是0或范围为1至8的整数;且

i是1或2;

每个X是 $-(\text{Q})_d - [\text{A}]_n$;

A是色原;

d是0或1;

e是范围为1至4的整数;

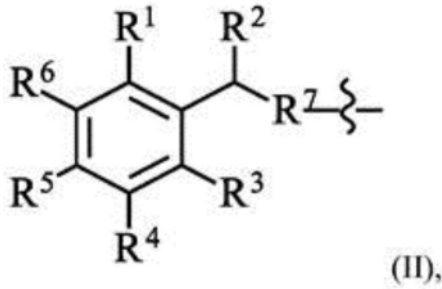
n是1;

s是0或范围为1至4的整数;且

t是0或范围为1至10的整数;

条件是所述多染料缀合物包含至少两个不同的A基团;

其中所述醌甲基化物前体具有式(II)的结构:



其中

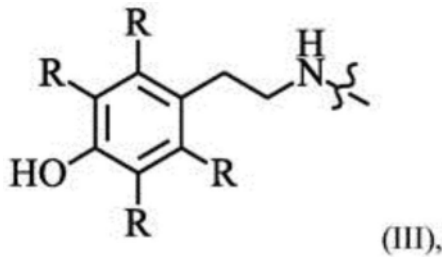
R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基;

R^2 是卤素;

R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团;且

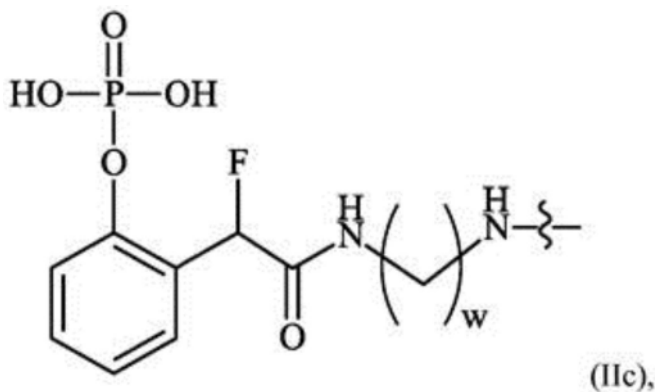
R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$, 其中 w 是范围为1至12的整数;

其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构:



其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团。

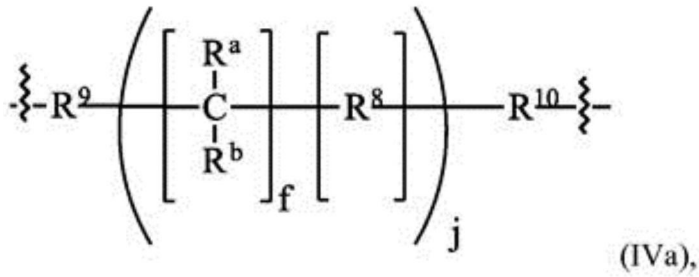
12. 权利要求11的多染料缀合物, 其中醌甲基化物前体具有式(IIc)的结构:



其中, w 范围为1至12。

13. 权利要求12的多染料缀合物, 其中 w 范围为2至6。

14. 权利要求11至13中任一项的多染料缀合物, 其中Q具有式(IVa)的结构:



其中

f是0、1或2；

R⁸是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

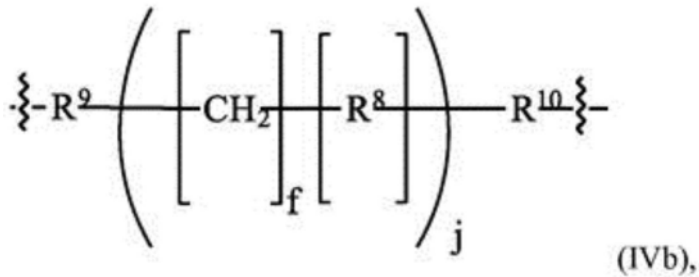
R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或-N(R^c) (R^d)；

R^c和R^d独立地选自CH₃或H；

R⁹和R¹⁰独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺、硫酮、硫醇的基团；且

j是范围为1至8的整数。

15. 权利要求11至13中任一项的多染料缀合物，其中Q具有式(IVb)的结构：



其中f是0、1或2；

R⁸是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

R^c和R^d独立地是CH₃或H；

R⁹和R¹⁰独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团；且

j是范围为1至8的整数。

16. 权利要求11的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，且h范围为2至6。

17. 权利要求11的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，且h范围为2至4。

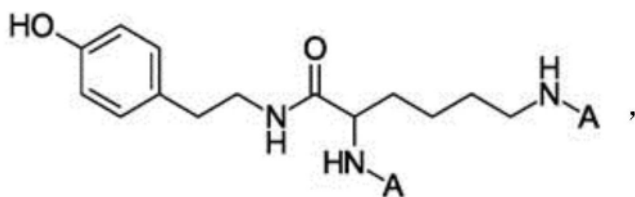
18. 权利要求11的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，且h是4。

19. 权利要求11的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，R^a和R^b是H，且h范围为2至4。

20. 权利要求15的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，R^a和R^b是H，R⁹是键，R¹⁰是胺；且h范围为2至4。

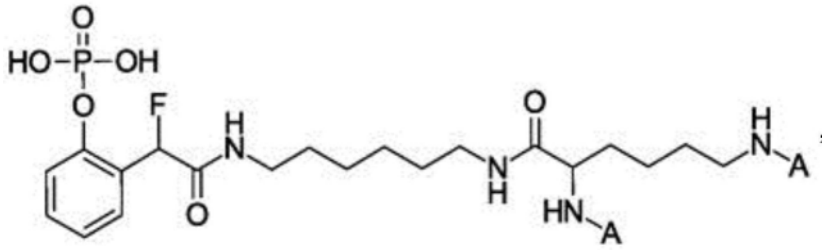
21. 权利要求15的多染料缀合物，其中g是0，R¹⁵是H，R¹⁶是H，R^a和R^b是H，R⁹是键，R¹⁰是胺；d、n和e各自为1，且h范围为2至4。

22. 一种多染料缀合物，其中所述多染料缀合物具有以下结构：



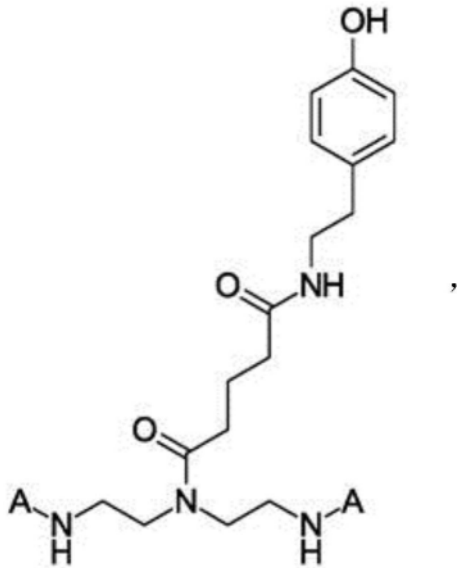
其中每个A包含不同的色原。

23. 一种多染料缀合物, 其中所述多染料缀合物具有以下结构:



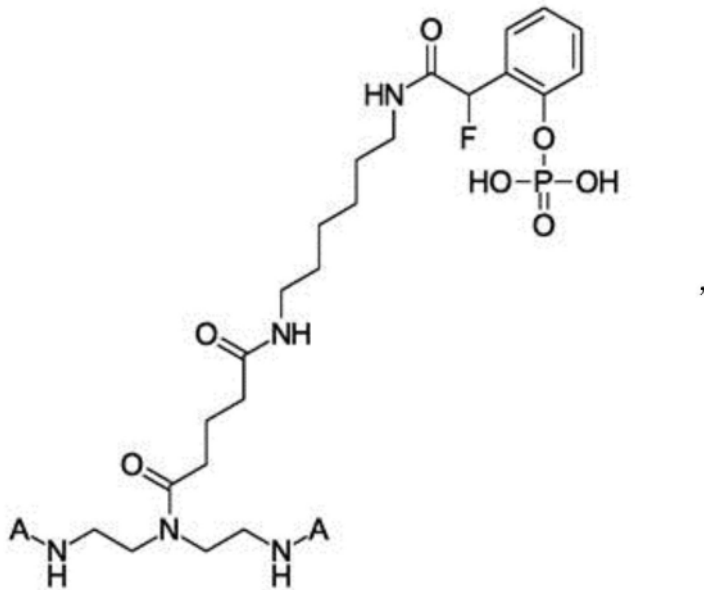
其中每个A包含不同的色原。

24. 一种多染料缀合物, 其中所述多染料缀合物具有以下结构:



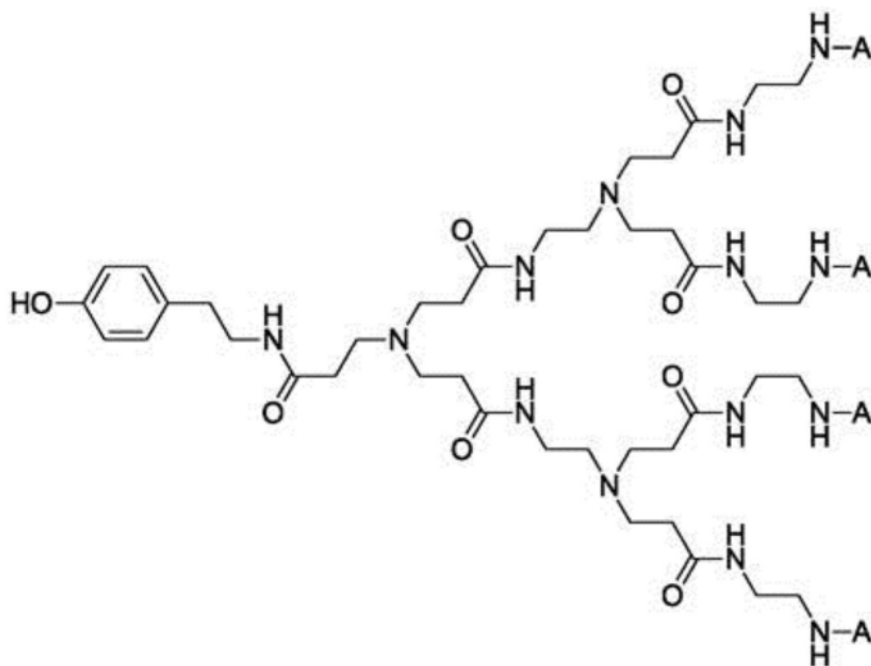
其中每个A包含不同的色原。

25. 一种多染料缀合物, 其中所述多染料缀合物具有以下结构:



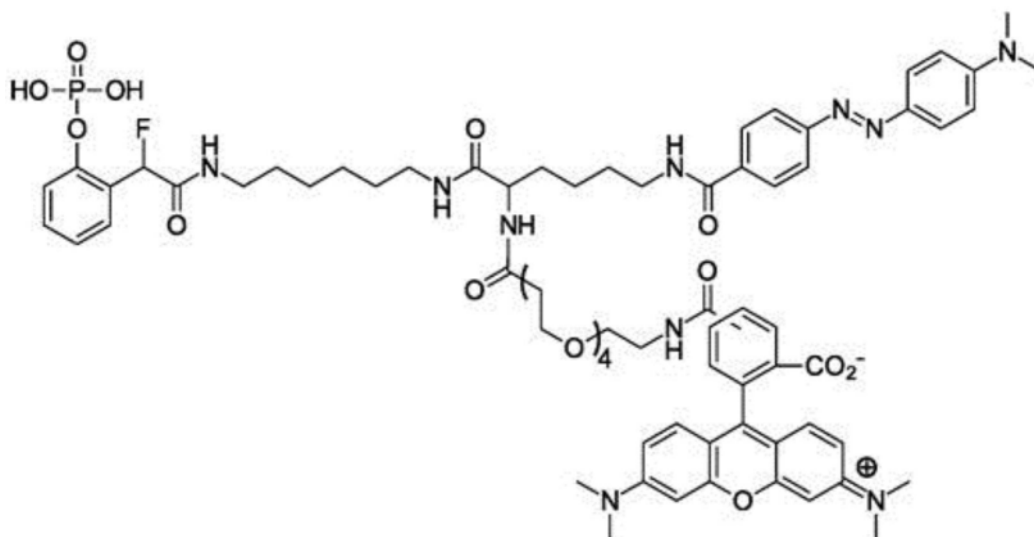
其中每个A包含不同的色原。

26. 一种多染料缀合物, 其中所述多染料缀合物具有以下结构:

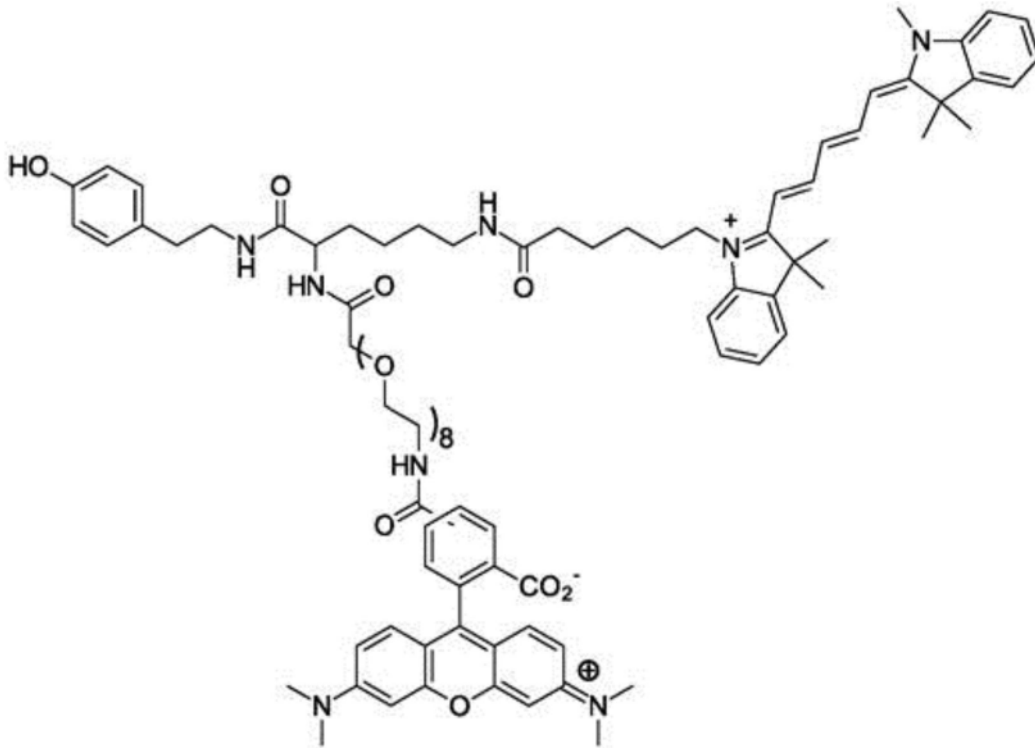


其中每个A包含色原,并且其中至少两个A基团中的色原是不同的。

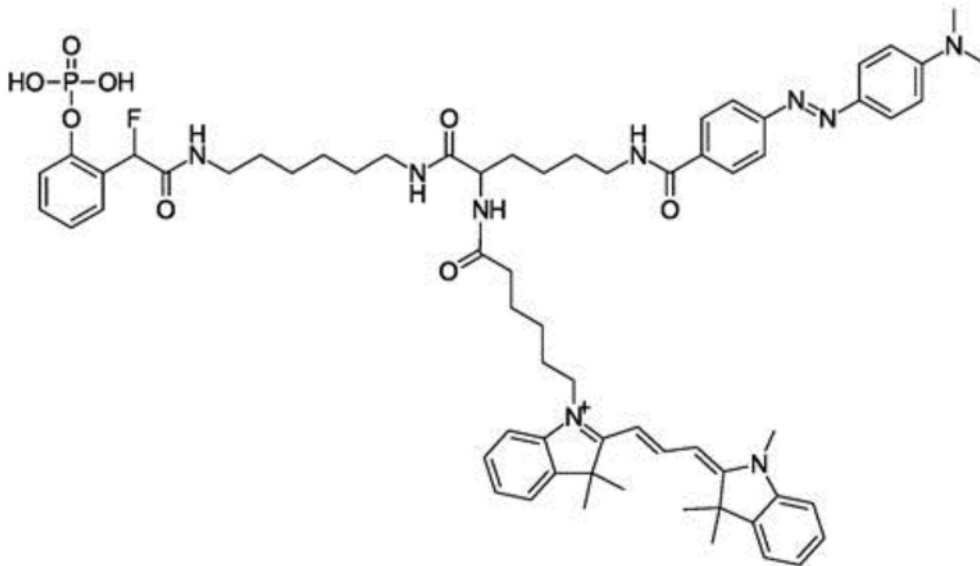
27. 一种多染料缀合物,其中多染料缀合物具有以下结构:



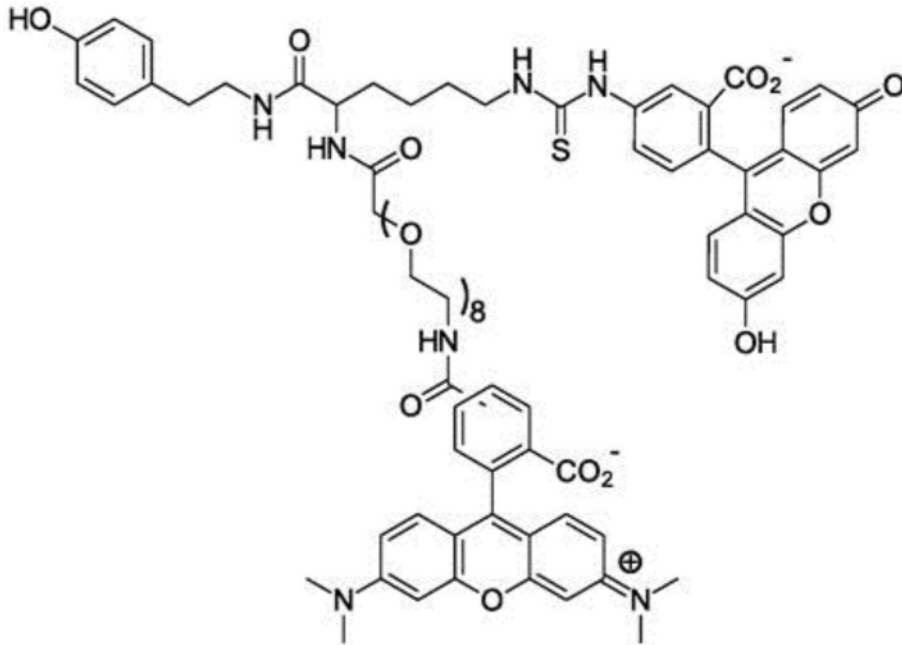
28. 一种多染料缀合物,其中多染料缀合物具有以下结构:



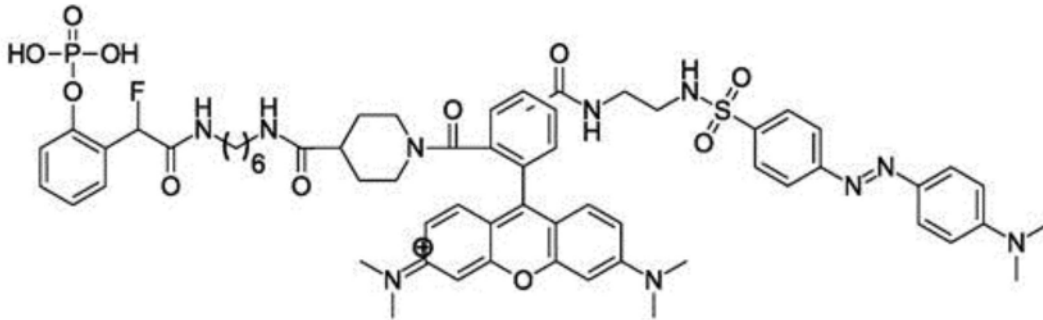
29. 一种多染料缀合物,其中多染料缀合物具有以下结构:



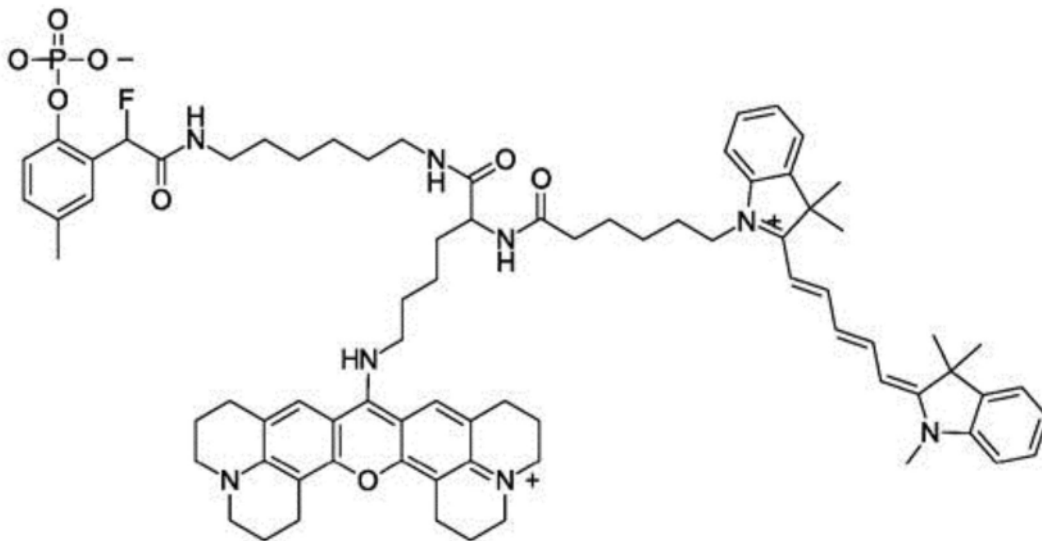
30. 一种多染料缀合物,其中多染料缀合物具有以下结构:



31. 一种多染料缀合物,其中多染料缀合物选自:



或



32. 多染料缀合物在制备用于通过如下方法检测生物样品中的第一靶标的试剂盒中的用途,所述方法包括:

(i) 使所述生物样品与对所述第一靶标特异性的第一检测探针接触以形成第一检测探

针-靶标复合物;

(ii) 使所述生物样品与对所述第一检测探针特异性的第一标记缀合物接触,所述第一标记缀合物包含第一酶;和

(iii) 使所述生物样品与第一多染料缀合物接触,所述第一多染料缀合物如权利要求1-31中任一项所述,其中所述第一酶将所述第一多染料缀合物转化为第一反应性中间体,所述第一反应性中间体靠近第一靶标或直接在第一靶标上共价键合至生物样品。

33. 权利要求32的用途,其中所述第一检测探针是第一抗,且所述第一标记缀合物包含缀合至所述第一酶的抗物种抗体。

34. 权利要求32的用途,其中所述第一检测探针包含缀合至标记物的第一核酸探针,且其中所述第一标记缀合物包含缀合至第一抗体的抗标记物抗体。

35. 权利要求32至34中任一项的用途,其中所述第一酶选自磷酸酶、磷酸二酯酶、酯酶、脂肪酶、酰胺酶、蛋白酶、硝基还原酶、脲酶、硫酸酯酶、细胞色素P450、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、 β -内酰胺酶、 α -葡糖醛酸酶、 β -葡糖醛酸酶、 α -5半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 α -乳糖酶和 β -乳糖酶。

36. 权利要求32的用途,其中所述第一多染料缀合物包含醌甲基化物前体部分,且其中所述第一酶是碱性磷酸酶。

37. 权利要求32的用途,其中所述第一多染料缀合物的至少两个发色团选自TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcyl、Cy3和荧光素。

38. 权利要求37的用途,其中所述至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。

39. 权利要求38的用途,其中所述多官能接头是赖氨酸。

40. 权利要求38的用途,其中所述多官能接头是树枝状分子。

41. 权利要求32的用途,其中所述第一多染料缀合物的至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

42. 权利要求32的用途,其中所述方法进一步包括:(i) 使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;(ii) 使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和(iii) 使所述生物样品与第二多染料缀合物接触,所述第二多染料缀合物包含缀合至至少两个色原的组织反应性部分,其中所述第二酶将所述第二多染料缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品,其中所述第一多染料缀合物显示的信号不同于所述第二多染料缀合物显示的颜色。

43. 权利要求42的用途,其中所述第二多染料缀合物包含酪酰胺部分,且其中所述第一酶是辣根过氧化物酶。

44. 权利要求42的用途,其中所述第二多染料缀合物的至少两个发色团选自TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcyl、Cy3和荧光素。

45. 权利要求42的用途,其中所述第二多染料缀合物的至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。

46. 权利要求45的用途,其中所述多官能接头是赖氨酸。

47. 权利要求45的用途,其中所述多官能接头是树枝状分子。

48. 权利要求42的用途,其中所述第二多染料缀合物的至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

49. 权利要求32的用途,其中所述方法进一步包括:(i)使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;(ii)使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和(iii)使所述生物样品与TSA单一色原缀合物或QMSA单一色原缀合物接触,其中所述第二酶将TSA或QMSA单一色原缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品,其中所述第一多染料缀合物显示的颜色不同于所述TSA或QMSA单一色原缀合物显示的颜色。

50. 权利要求32的用途,其中所述步骤中的一个或多个由自动化系统执行。

51. 多染料缀合物在制备用于通过如下方法检测生物样品内的靶标的试剂盒中的用途,所述方法包括:

(i)使所述生物样品与对第一靶标特异性的第一检测探针接触以形成第一检测探针-靶标复合物;

(ii)使所述生物样品与对所述第一检测探针特异性的第一标记缀合物接触,所述第一标记缀合物包含第一酶;

(iii)使所述生物样品与选自以下的第一缀合物接触:(a)第一多染料缀合物,所述第一多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个发色团,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺;(b)第一TSA-单一色原缀合物,和(c)第一QMSA-单一色原缀合物;其中所述第一酶将所述第一缀合物转化为第一反应性中间体,所述第一反应性中间体靠近第一靶标或直接在第一靶标上共价键合至生物样品;

(iv)使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;

(v)使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;

(vi)使所述生物样品与选自以下的第二缀合物接触:(a)第二多染料缀合物,所述第二多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个发色团,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺;(b)第二TSA-单一色原缀合物,和(c)第二QMSA-单一色原缀合物;其中所述第二酶将所述第二缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品;且

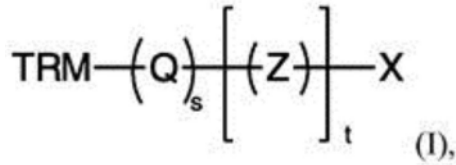
(vii)其中所述第一和第二缀合物显示不同信号。

52. 多染料缀合物在制备用于通过如下方法检测生物样品中的第一靶标的试剂盒中的用途,所述方法包括:

(i)使所述生物样品与对所述第一靶标特异性的第一检测探针接触以形成第一检测探针-靶标复合物;

(ii)使所述生物样品与对所述第一检测探针特异性的第一标记缀合物接触,所述第一标记缀合物包含第一酶;和

(iii)使所述生物样品与式(I)的第一多染料缀合物接触,

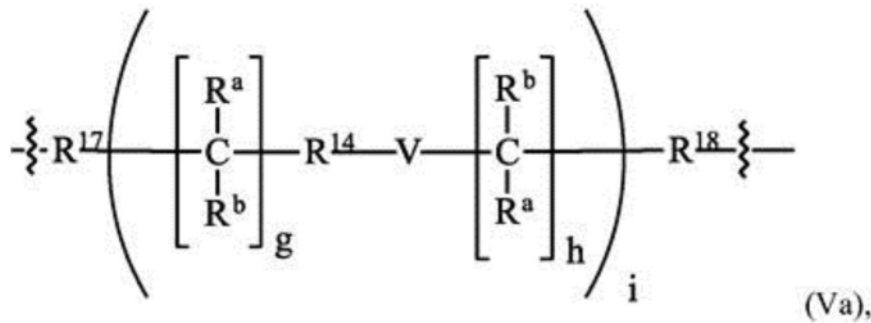


其中

“TRM”是选自醌甲基化物前体或酪酰胺的组织反应性部分;

Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团;

其中Z具有式(Va)的结构:



其中

R^{17} 和 R^{18} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团;

R^{14} 是键、羰基、亚胺或硫酮;

V是-N(X)-; -C(R^{15})(X); -C(X)₂-或-C(R^{15})(N(R^{16}))(X);

R^a 和 R^b 独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R^{15})(R^{16});

R^{15} 和 R^{16} 独立地是键或-CH₃或H;

g是0或范围为1至4的整数;

h是0或范围为1至8的整数;且

i是1或2;

每个X是-(Q)_d-[A]_n;

A是色原;

d是0或1;

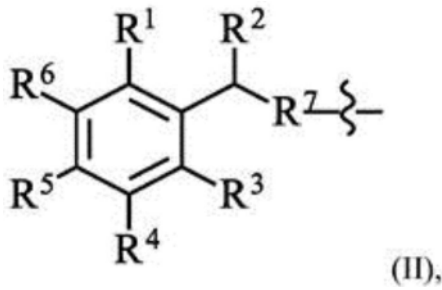
e是范围为1至4的整数;

n是1;

s是0或范围为1至4的整数;且

t是0或范围为1至10的整数;且

其中所述醌甲基化物前体具有式(II)的结构:



其中

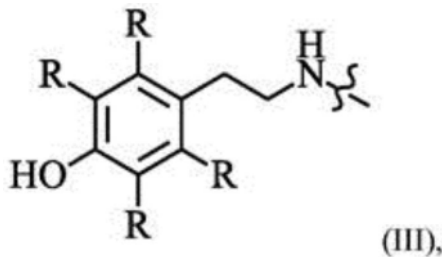
R¹选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、β-内酰胺基和糖基；

R²是卤素；

R³、R⁴、R⁵和R⁶独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团；且

R⁷是 -(CH₂)_wNH-、-O(CH₂)_wNH-、-N(H)C(O)(CH₂)_wNH-、-C(O)N(H)(CH₂)_wNH-、-(CH₂)_wO-、-O(CH₂)_wO-、-O(CH₂CH₂)_w-、-N(H)C(O)(CH₂)_wO-、-C(O)N(H)(CH₂)_wO-、-C(O)N(H)(CH₂CH₂)_w-、-(CH₂)_wS-、-O(CH₂)_wS-、-N(H)C(O)(CH₂)_wS-、-C(O)N(H)(CH₂)_wS-、-(CH₂)_wNH-、-C(O)N(H)(CH₂CH₂)_wCH₂CH₂NH-、-C(O)(CH₂CH₂)_wCH₂CH₂NH-、-C(O)N(H)(CH₂)NHC(O)CH(CH₃)(CH₂)_wNH-或-N(H)(CH₂)_wNH-，其中w是范围为1至12的整数；

其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构：



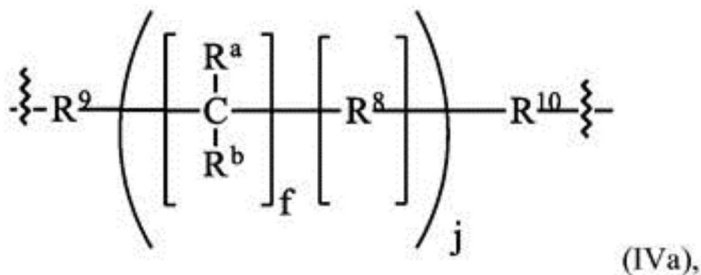
其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团；

其中所述第一酶将所述第一多染料缀合物转化为第一反应性中间体，所述第一反应性中间体靠近第一靶标或直接在第一靶标上共价键合至生物样品，

其中任何缀合物中的至少两个A基团是不同的。

53. 权利要求52的用途，其中所述方法进一步包括 (i) 使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物；(ii) 使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触，所述第二标记缀合物包含第二酶；和(iii) 使所述生物样品与式(I)的第二多染料缀合物接触，其中所述第一多染料缀合物显示的颜色不同于所述第二多染料缀合物显示的颜色。

54. 权利要求52和53中任一项的用途，其中Q具有式(IVa)的结构：



其中

f是0、1或2；

R⁸是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

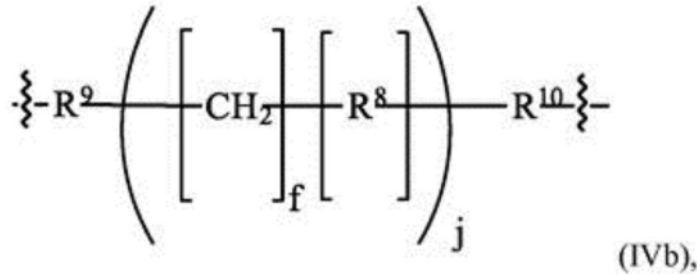
R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或-N(R^c) (R^d)；

R^c和R^d独立地选自CH₃或H；

R⁹和R¹⁰独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺、硫酮、硫醇的基团；且

j是范围为1至8的整数。

55. 权利要求52和53中任一项的用途，其中Q具有式(IVb)的结构：



其中f是0、1或2；

R⁸是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

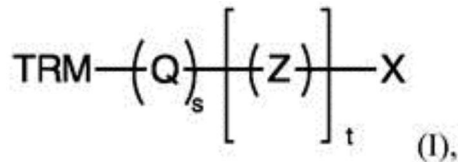
R^c和R^d独立地是CH₃或H；

R⁹和R¹⁰独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团；且

j是范围为1至8的整数。

56. 试剂盒，其包含：

(i) 具有式(I)的多染料缀合物：

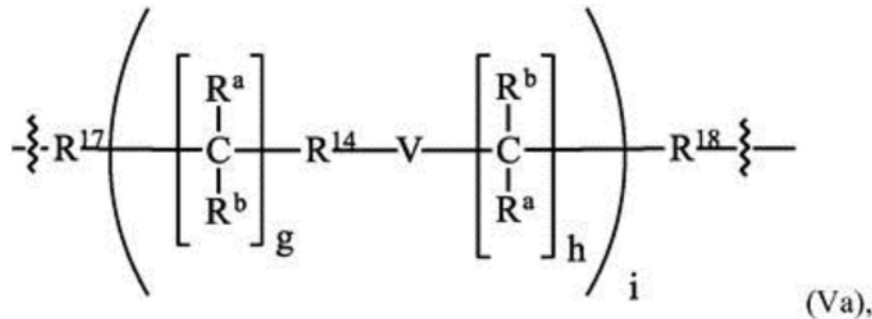


其中

“TRM”是选自醌甲基化物前体或酪酰胺的组织反应性部分；

Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团；

其中Z具有式(Va)的结构：



其中

R¹⁷和R¹⁸独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团；

R¹⁴是键、羰基、亚胺或硫酮；

V是-N(X)-; -C(R¹⁵)(X); -C(X)₂-或-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X));

R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R¹⁵)(R¹⁶);

R¹⁵和R¹⁶独立地是键或-CH₃或H;

g是0或范围为1至4的整数;

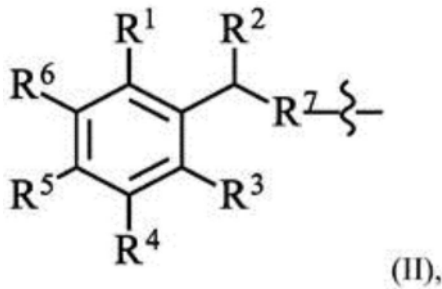
h是0或范围为1至8的整数;且

i是1或2;

每个X是-[(Q)_d-[A]_n]_e;

A是色原,其选自TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcyl、Cy3、Cy7、Cy3.5、Cy3B、Cy5.5、罗丹明800,和荧光素,并且其中任何缀合物中的至少两个A基团是不同的;

其中所述醌甲基化物前体具有式(II)的结构:



其中

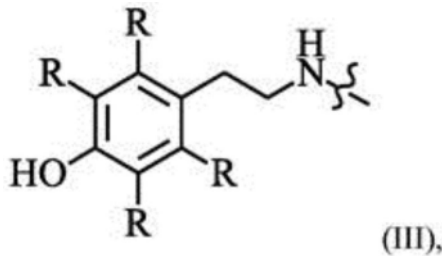
R¹选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、β-内酰胺基和糖基;

R²是卤素;

R³、R⁴、R⁵和R⁶独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团;且

R⁷是-(CH₂)_wNH-、-O(CH₂)_wNH-、-N(H)C(O)(CH₂)_wNH-、-C(O)N(H)(CH₂)_wNH-、-(CH₂)_wO-、-O(CH₂)_wO-、-O(CH₂CH₂)_w-、-N(H)C(O)(CH₂)_wO-、-C(O)N(H)(CH₂)_wO-、-C(O)N(H)(CH₂CH₂)_w-、-(CH₂)_wS-、-O(CH₂)_wS-、-N(H)C(O)(CH₂)_wS-、-C(O)N(H)(CH₂)_wS-、-(CH₂)_wNH-、-C(O)N(H)(CH₂CH₂)_wCH₂CH₂NH-、-C(O)(CH₂CH₂)_wCH₂CH₂NH-、-C(O)N(H)(CH₂)NHC(O)CH(CH₃)(CH₂)_wNH-或-N(H)(CH₂)_wNH-,其中w是范围为1至12的整数;

其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构:



其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团;

d是0或1;

e是范围为1至4的整数;

n是1;

s是0或范围为1至4的整数;且

t是0或范围为1至10的整数;

其中所述多染料缀合物包含至少两个A基团;

- (ii) 对靶标特异性的检测探针; 和
 (iii) 对第一检测探针特异性的标记缀合物。

57. 权利要求56的试剂盒, 其中所述检测探针是一抗。

58. 权利要求56的试剂盒, 其中所述检测探针是缀合至标记物的核酸探针。

59. 权利要求56或57的试剂盒, 其中所述标记缀合物是抗-抗体的抗体, 且其中所述抗-抗体的抗体缀合至酶。

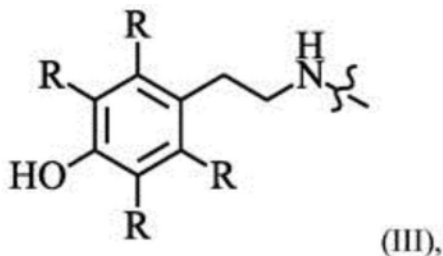
60. 权利要求56或58的试剂盒, 其中所述标记缀合物是抗-标记物抗体, 且其中所述抗-标记物抗体缀合至酶。

61. 权利要求56至58中任一项的试剂盒, 其中所述靶标是CD8。

62. 权利要求56至58中任一项的试剂盒, 其中所述靶标是Ki-67。

63. 权利要求56至58中任一项的试剂盒, 其中所述靶标是染色体-17。

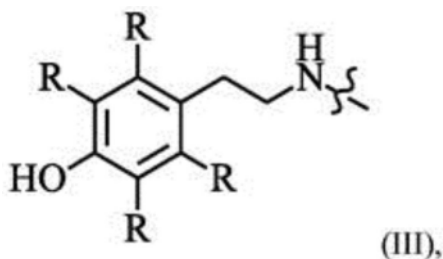
64. 缀合物, 其包含酪酰胺部分、TAMRA和Cy5, 其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构:



其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团。

65. 权利要求64的缀合物, 其中所述TAMRA直接或间接偶联至所述酪酰胺部分, 且其中所述Cy5直接或间接偶联至所述TAMRA。

66. 缀合物, 其包含酪酰胺部分、TAMRA和FITC, 其中所述酪酰胺具有由式(III)提供的结构:

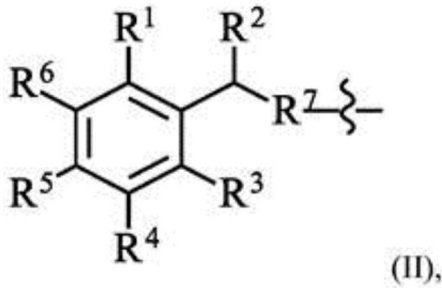


其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团。

67. 权利要求66的缀合物, 其中所述酪酰胺部分、TAMRA和FITC通过多官能接头偶联。

68. 权利要求67的缀合物, 其中所述多官能接头是赖氨酸或其衍生物。

69. 缀合物, 其包含醌甲基化物前体部分、Dabcyl和Cy3, 其中所述醌甲基化物前体部分具有式(II)的结构:



其中

R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基；

R^2 是卤素；

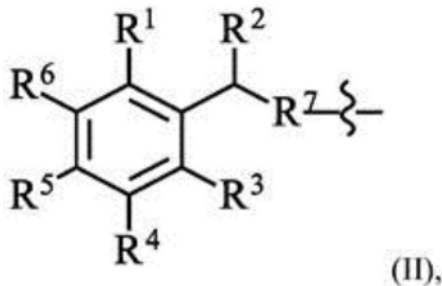
R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团；且

R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$ ，其中 w 是范围为1至12的整数。

70. 权利要求69的缀合物，其中所述醌甲基化物前体部分、Dabcyl和Cy3通过多官能接头偶联。

71. 权利要求70的缀合物，其中所述多官能接头是赖氨酸或其衍生物。

72. 缀合物，其包含醌甲基化物前体部分、TAMRA和Dabcyl，其中所述醌甲基化物前体部分具有式(II)的结构：



其中

R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基；

R^2 是卤素；

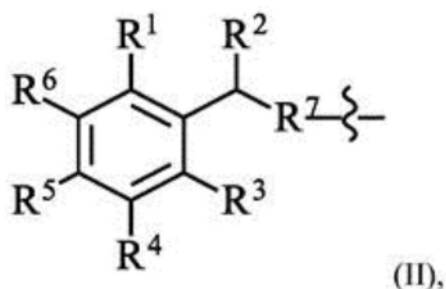
R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团；且

R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$ ，其中 w 是范围为1至12的整数。

73. 权利要求72的缀合物，其中所述醌甲基化物前体部分、TAMRA和Dabcyl通过多官能接头偶联。

74. 权利要求73的缀合物，其中所述多官能接头是赖氨酸或其衍生物。

75. 缀合物, 其包含醌甲基化物前体部分、TAMRA和Dabsyl, 其中所述醌甲基化物前体部分具有式(II)的结构:



其中

R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基;

R^2 是卤素;

R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团; 且

R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$, 其中 w 是范围为1至12的整数。

76. 权利要求75的缀合物, 其中所述醌甲基化物前体部分、TAMRA和Dabsyl通过多官能接头偶联。

77. 权利要求76的缀合物, 其中所述多官能接头是赖氨酸或其衍生物。

用多染料醌甲基化物和酪酰胺缀合物的显色 IHC 和 ISH 染色的新颜色

[0001] 工业适用性的声明

[0002] 本公开在化学和诊断领域中具有工业适用性。

[0003] 公开背景

[0004] 免疫组织化学 (IHC) 是指使用对特定抗原特异性的抗体在生物样品中检测、定位和/或定量抗原 (诸如蛋白质) 的过程。IHC 提供了精确地确定特定蛋白位于组织样品内的位置的实质性优势。它也是检查组织本身的有效方式。原位杂交 (ISH) 是指检测、定位和定量核酸的过程。IHC 和 ISH 两者都可以在各种生物样品 (诸如组织 (例如, 新鲜冷冻、福尔马林固定, 石蜡包埋的) 和细胞学样品) 上进行。无论靶标是核酸还是抗原, 靶标的识别可以使用各种标记 (例如显色、荧光、发光、辐射) 来检测。为了在临床环境中稳健地检测、定位和定量靶标, 扩增识别事件是期望的, 因为确信地检测低丰度的细胞标志物的能力对于诊断目的变得越来越重要。例如, 响应于单一抗原检测事件, 在标志物的位点处沉积数百或数千个标记物分子, 通过扩增增强检测该识别事件的能力。

[0005] 不良事件经常伴随扩增, 诸如作为增加的背景信号而显现的非特异性信号。增加的背景信号通过模糊可能与低、但临床上显著的表达相关的微弱信号而干扰临床分析。因此, 尽管识别事件的扩增是期望的, 但不增加背景信号的扩增方法是高度期望的。一种此方法是酪酰胺信号扩增 (TSA), 其也被称为催化的报告子沉积 (CARD)。美国专利号 5,583,001 公开了使用分析物依赖性酶活化系统检测和/或定量分析物的方法, 所述系统依赖于催化的报告子沉积来扩增可检测的标记信号。通过使标记的酚分子与酶反应, 增强 CARD 或 TSA 方法中酶的催化作用。利用 TSA 的现代方法有效地增加从 IHC 和 ISH 测定获得的信号, 同时不产生显著的背景信号扩增 (对于与酪酰胺扩增试剂相关的公开内容, 参见例如, 美国申请公开号 2012/0171668, 其以其整体通过引用并入)。这些扩增方法的试剂正被应用于临床重要靶标, 以提供先前无法实现的稳健诊断能力 (OPTIVIEW® 扩增试剂盒, Ventana Medical Systems, Tucson AZ, 目录号 760-099)。

[0006] TSA 利用辣根过氧化物酶 (HRP) 和酪酰胺之间的反应。在 H_2O_2 存在的情况下, 酪酰胺被转化为高反应性和短寿命的自由基中间体, 其优先与蛋白上富含电子的氨基酸残基反应。然后, 可以通过各种显色显现技术和/或通过荧光显微术检测共价结合的可检测标记物。在高度重视空间和形态背景的固相免疫测定 (诸如 IHC 和 ISH) 中, 自由基中间体的短寿命导致酪酰胺与生成位点紧密靠近的组织上的蛋白的共价结合, 给出离散和特异性的信号。

[0007] 具有 2015 年 2 月 20 日的国际申请日的标题为 “Quinone Methide Analog Signal Amplification” 的共同未决申请 PCT/EP2015/0533556 描述了一种替代技术 (“QMSA”), 其与 TSA 一样, 可用于增加信号扩增而不增加背景信号。实际上, PCT/EP2015/0533556 描述了新型醌甲基化物类似物前体和使用醌甲基化物类似物前体检测生物样品中的一种或多种靶标的方法。其中, 检测方法被描述为包括使样品与检测探针接触、然后使样品与包含酶的标记缀合物接触的步骤。该酶与包含可检测标记物的醌甲基化物类似物前体相互作用, 形成

反应性醌甲基化物类似物,其靠近靶标或直接在靶标上结合生物样品。然后检测可检测标记物。

[0008] 公开简述

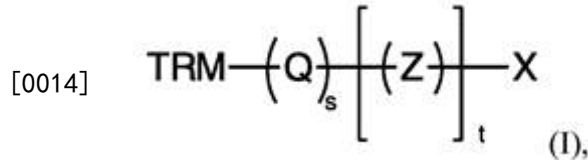
[0009] 在本公开的一个方面是包含组织反应性部分和至少两个发色团的多染料缀合物,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺或其衍生物,且其中所述至少两个发色团允许多染料缀合物显示或产生与至少两个色原中单独的任一者都不同的颜色或信号。

[0010] 在一些实施方案中,所述至少两个发色团选自但不限于罗丹明800、TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcy1、Cy3、Cy7、Cy3.5、CyB、Cy5.5和荧光素。在一些实施方案中,多染料缀合物显示与至少两个发色团中的任一个的颜色(或信号)不同的颜色(或信号)。

[0011] 在一些实施方案中,所述至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。在一些实施方案中,所述多官能接头是异双官能接头。在一些实施方案中,所述异双官能接头是赖氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,所述多官能接头是树枝状分子。在一些实施方案中,所述树枝状分子选自聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状分子、Janus树枝状分子和双-MPA树枝状分子。

[0012] 在一些实施方案中,所述多官能接头选自降亚精胺(norspermidine)和精胺。在一些实施方案中,所述多官能接头包含约50 g/mol和约300 g/mol之间的分子量。在一些实施方案中,所述至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

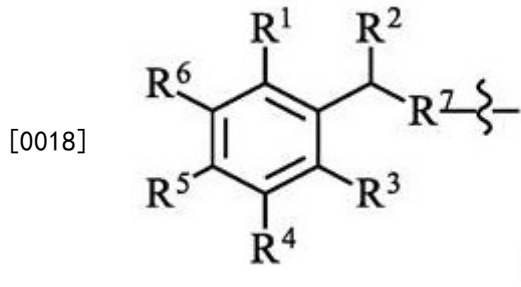
[0013] 在本公开的另一个方面是具有式(I)的多染料缀合物,



[0015] 其中

[0016] “TRM”是组织反应性部分(例如,醌甲基化物前体、酪酰胺或酪酰胺衍生物,诸如本文进一步公开);Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团;Z是键或具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;X是H、 $-(\text{Q})_d - [\text{A}]_n$ 、 $-\text{N} - ([\text{Z}] - [\text{X}]_2)$;或 $-\text{C}(\text{H}) ([\text{Z}] - [\text{X}]_2)$;A是可检测部分(例如色原);d是0或1;e是范围为1至4的整数;s是0或范围为1至4的整数;且t是0或范围为1至10的整数;条件是所述多染料缀合物包含至少两个A基团(例如两个色原)。

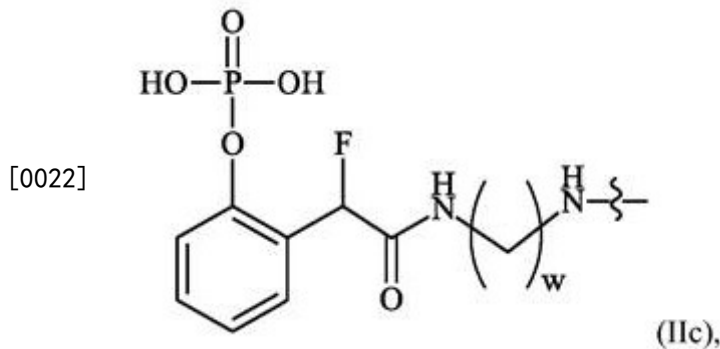
[0017] 在一些实施方案中,TRM具有式(II)的结构:



[0019] 其中

[0020] R^1 选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基和糖基； R^2 是卤素； R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团；且 R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ ，或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$ ，其中 w 是范围为1至12的整数。

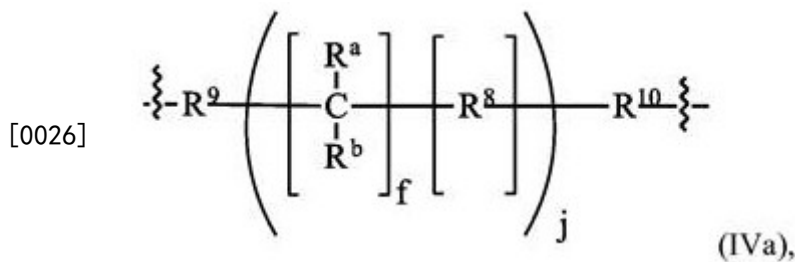
[0021] 在一些实施方案中，TRM具有式(IIc)的结构：



[0023] 其中， w 范围为1至12。在一些实施方案中， w 范围为2至6。

[0024] 在一些实施方案中，TRM是脲酰胺或脲酰胺衍生物。

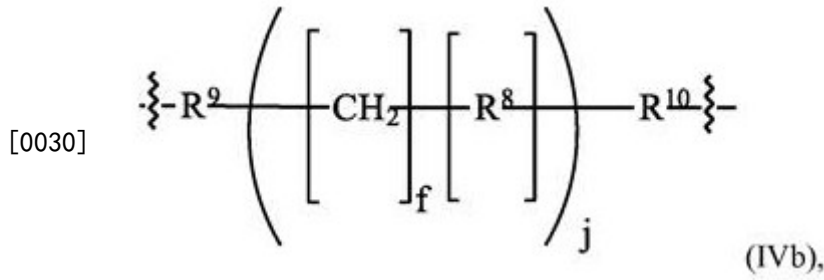
[0025] 在一些实施方案中，Q具有式(IVa)的结构



[0027] 其中，

[0028] f 是0、1或2； R^8 是键、O、S或N(R^c)(R^d)； R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基基团、F、Cl或-N(R^c)(R^d)； R^c 和 R^d 独立地选自 CH_3 或H； R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺、硫酮、硫醇的基团；且 j 是范围为1至8的整数。

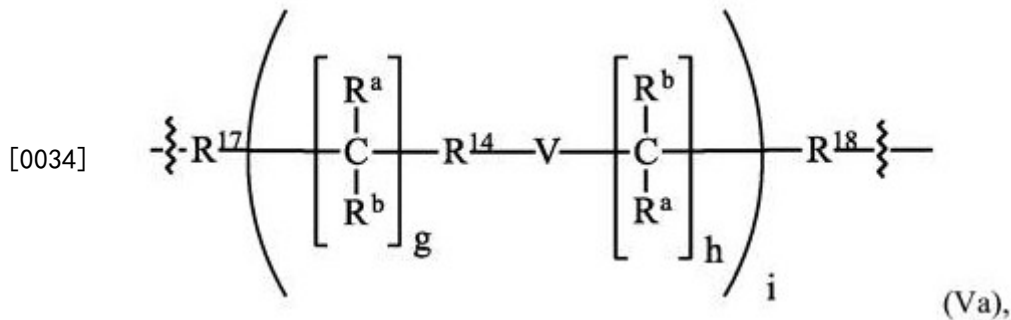
[0029] 在一些实施方案中，Q具有式(IVb)的结构：



[0031] 其中,

[0032] f是0、1或2;R⁸是键、O、S或N(R^c) (R^d);R^c和R^d独立地是CH₃或H;R⁹和R¹⁰独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团;且j是范围为1至8的整数。

[0033] 在一些实施方案中,Z具有式(Va)的结构:

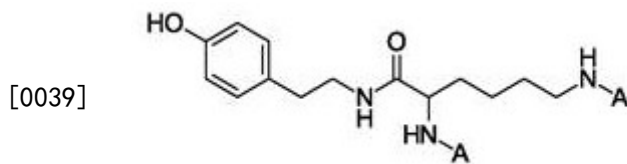


[0035] 其中,

[0036] R¹⁷和R¹⁸独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH-、-N-、硫酮或硫醇的基团;R¹⁴是键、羰基、亚胺或硫酮;V是键、-C(R¹⁵) (R¹⁶)-、-O-、-S-、-N(R¹⁶)-、-N(X)-、-C(R¹⁵)(X)-、-C(X)₂-、或-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X));X如本文所定义;R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R¹⁵) (R¹⁶);R¹⁵和R¹⁶独立地是键或-CH₃或H;g是0或范围为1至4的整数;h是0或范围为1至8的整数;且i是1或2。

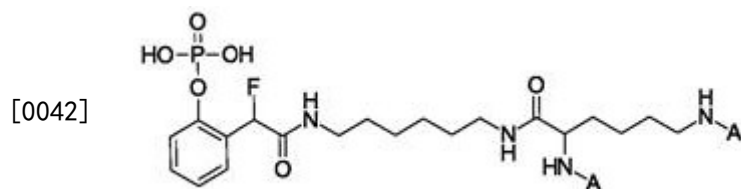
[0037] 在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至6。在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至4。在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h是4。在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,且h范围为2至4。在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;且h范围为2至4。在一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵)(N(R¹⁶)(X)),R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;X是-[(Q)_d-[A]_n]_e,d、n和e各自为1,且h范围为2至4。

[0038] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



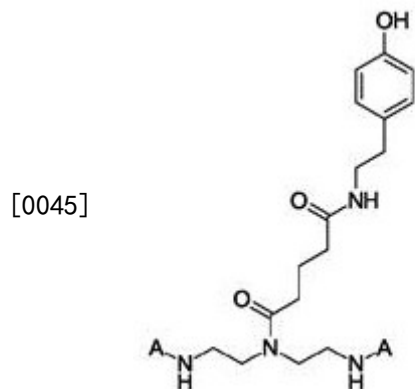
[0040] 其中A是可检测部分。在一些实施方案中,每个A基团包含不同的可检测部分。

[0041] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



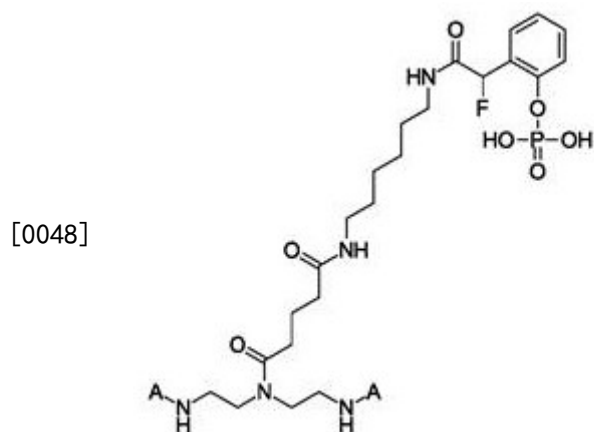
[0043] 其中A是可检测部分。在一些实施方案中,每个A基团包含不同的可检测部分。

[0044] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



[0046] 其中A是可检测部分。在一些实施方案中,每个A基团包含不同的可检测部分。

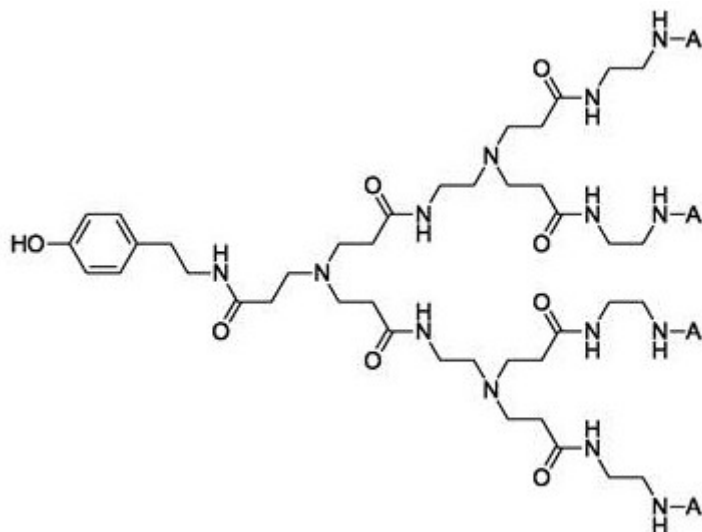
[0047] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



[0049] 其中A是可检测部分。在一些实施方案中,每个A基团包含不同的可检测部分。

[0050] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:

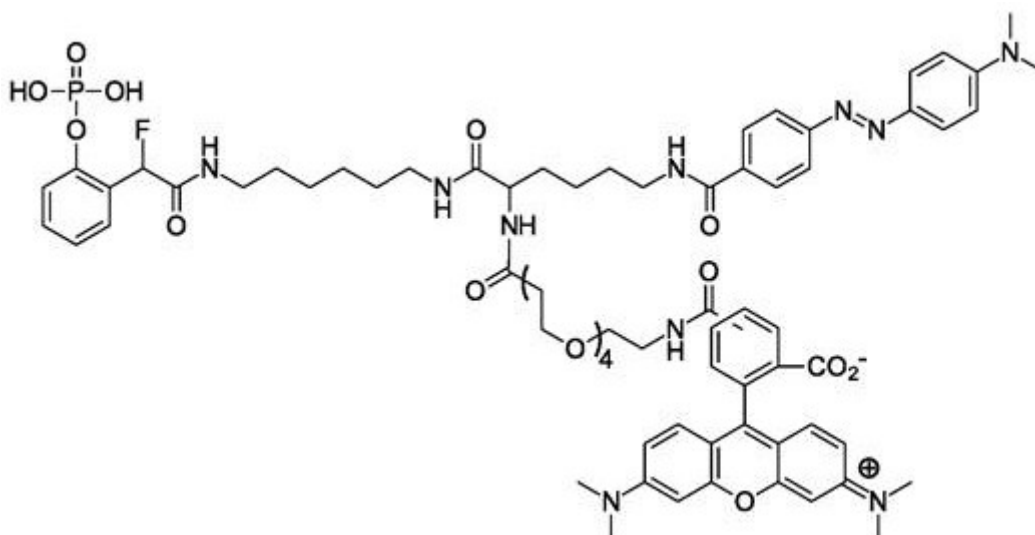
[0051]



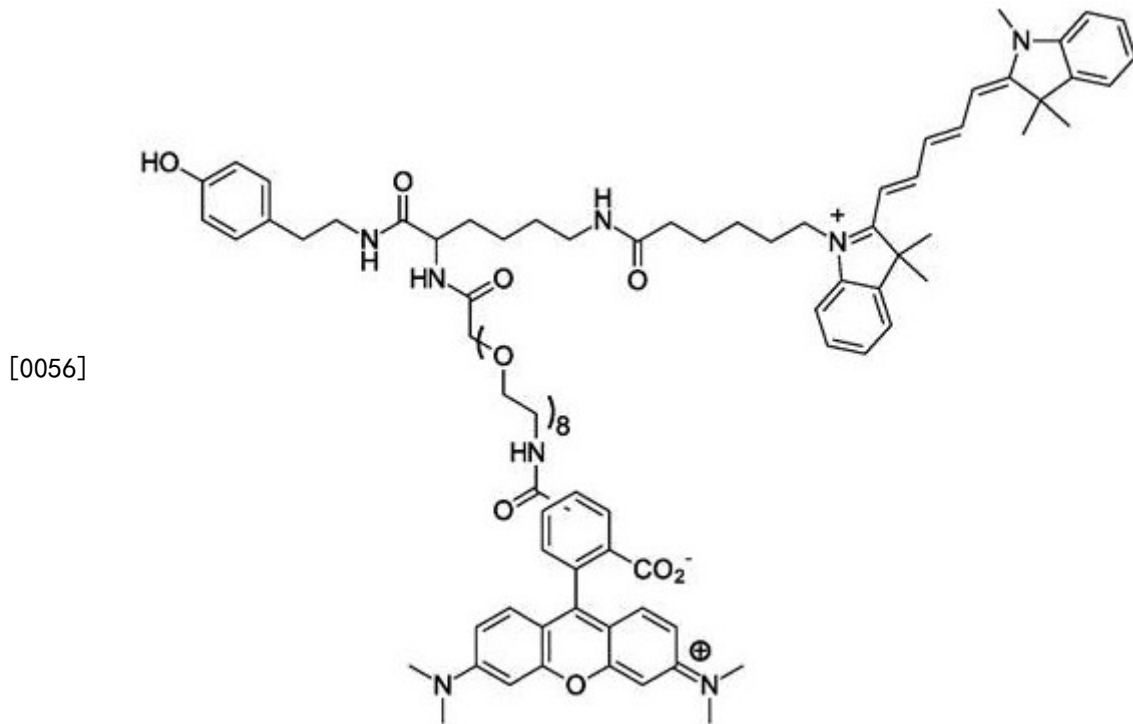
[0052] 其中A是可检测部分。在一些实施方案中,每个A基团包含不同的可检测部分。

[0053] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:

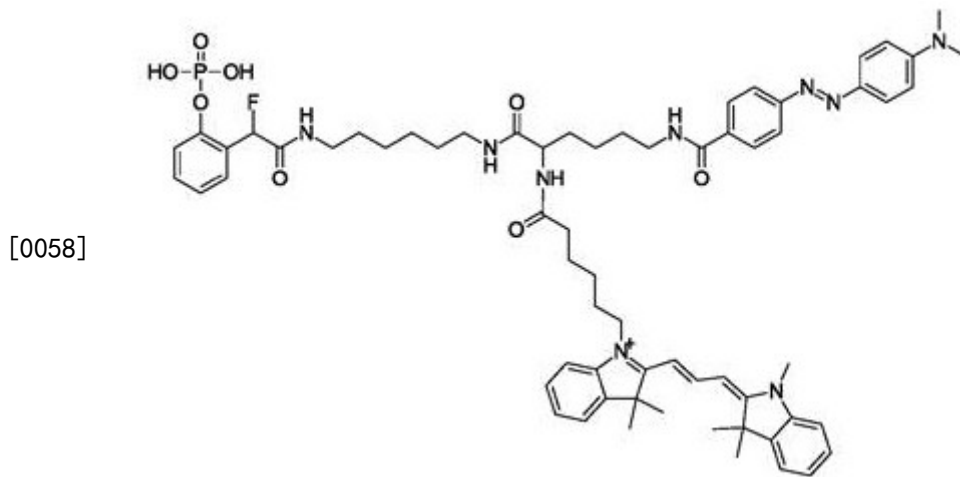
[0054]



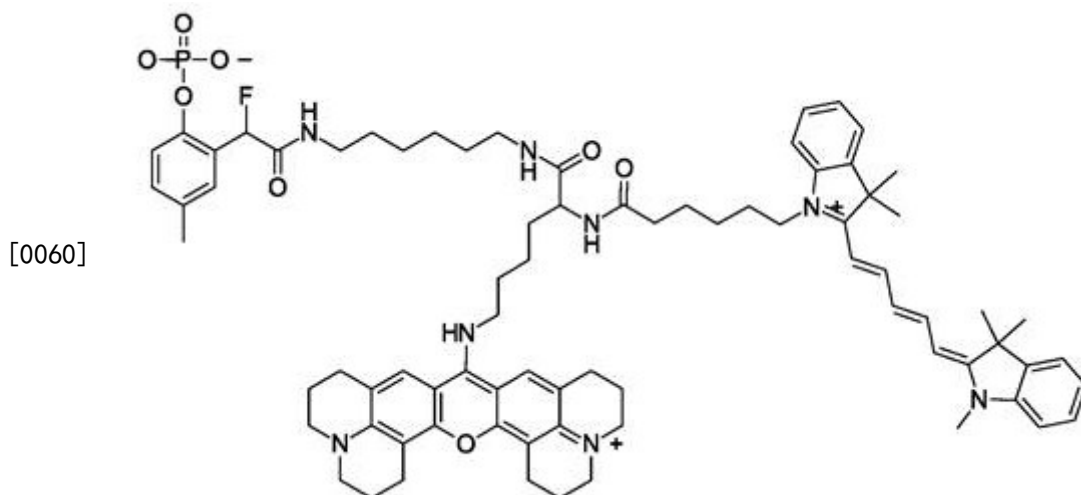
[0055] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



[0057] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



[0059] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物具有以下结构:



实施方案中,至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。在一些实施方案中,所述多官能接头是赖氨酸。在一些实施方案中,所述多官能接头是树枝状分子。在一些实施方案中,所述第一多染料缀合物的至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和使所述生物样品与第二多染料缀合物接触,所述第二多染料缀合物包含缀合至至少两个色原的组织反应性部分,其中所述第二酶将所述第二多染料缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品,其中所述第一多染料缀合物显示的颜色不同于所述第二多染料缀合物显示的颜色。

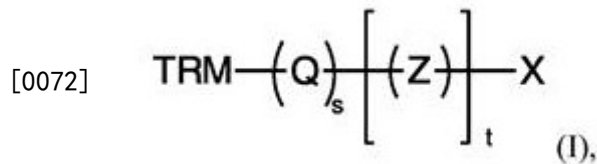
[0068] 在一些实施方案中,所述第二多染料缀合物包含酪酰胺部分,且其中所述第一酶是辣根过氧化物酶。在一些实施方案中,所述第二多染料缀合物包含醌甲基化物前体部分,且其中所述第二酶是碱性磷酸酶。在一些实施方案中,所述第二多染料缀合物的至少两个发色团选自TAMRA、Dabsyl、Cy5、Dabcyl、Cy3、罗丹明800和荧光素。在一些实施方案中,所述第二多染料缀合物的至少两个发色团通过多官能接头缀合至所述组织反应性部分。在一些实施方案中,所述多官能接头是赖氨酸。在一些实施方案中,所述多官能接头是树枝状分子。在一些实施方案中,所述第二多染料缀合物的至少两个发色团中的第一个直接或间接缀合至所述组织反应性部分,且所述至少两个发色团中的第二个直接或间接缀合至所述第一发色团。

[0069] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和使所述生物样品与TSA单一色原缀合物或QMSA单一色原缀合物(参见例如,PCT/EP2015/0533556,其公开内容在此以其整体通过引用并入本文)接触,其中所述第二酶将TSA或QMSA单一色原缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品,其中所述第一多染料缀合物显示的颜色不同于所述TSA或QMSA单一色原缀合物显示的颜色。

[0070] 在本公开的另一个方面是检测生物样品内的靶标的方法,其包括:(i)使所述生物样品与对第一靶标特异性的第一检测探针接触以形成第一检测探针-靶标复合物;(ii)使所述生物样品与对所述第一检测探针特异性的第一标记缀合物接触,所述第一标记缀合物包含第一酶;(iii)使所述生物样品与选自以下的第一缀合物接触:(a)第一多染料缀合物,所述第一多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个发色团,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺或其衍生物;(b)第一TSA-单一色原缀合物,和(c)第一QMSA-单一色原缀合物;其中所述第一酶将所述第一缀合物转化为第一反应性中间体,所述第一反应性中间体靠近第一靶标或直接在第一靶标上共价键合至生物样品;(iv)使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;(v)使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和(vi)使所述生物样品与选自以下的第二缀合物接触:(a)第二多染料缀合物,所

述第二多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个发色团,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酞酰胺或其衍生物;(b) 第二TSA-单一色原缀合物,和(c) 第二QMSA-单一色原缀合物;其中所述第二酶将所述第二缀合物转化为第二反应性中间体,所述第二反应性中间体靠近第二靶标或直接在第二靶标上共价键合至生物样品;且其中所述第一和第二缀合物显示不同颜色。

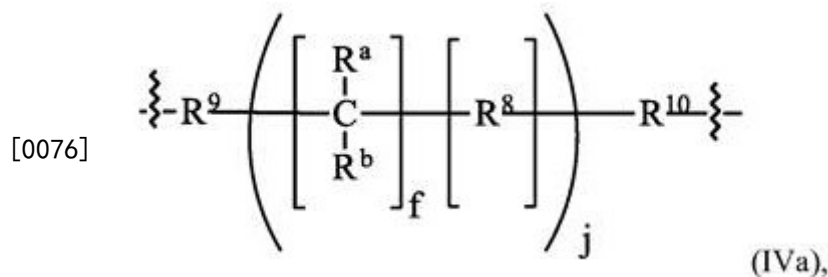
[0071] 在本公开的另一个方面是检测生物样品中的第一靶标的方法,其包括使所述生物样品与对所述第一靶标特异性的第一检测探针接触以形成第一检测探针-靶标复合物;使所述生物样品与对所述第一检测探针特异性的第一标记缀合物接触,所述第一标记缀合物包含第一酶;和使所述生物样品与式(I)的第一多染料缀合物接触,



[0073] 其中,“TRM”是组织反应性部分;Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团;Z是键或具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;X是H、 $-(\text{Q})_d - [\text{A}]_n$; $-\text{N} - ([\text{Z}] - [\text{X}])_2$;或 $-\text{C}(\text{H}) ([\text{Z}] - [\text{X}])_2$;A是可检测部分;d是0或1;e是范围为1至4的整数;s是0或范围为1至4的整数;且t是0或范围为1至10的整数;条件是所述多染料缀合物包含至少两个A基团(例如至少两个色原);且其中所述第一酶将所述第一多染料缀合物转化为第一反应性中间体,所述第一反应性中间体靠近第一靶标或直接在第一靶标上共价键合至生物样品。

[0074] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括(i) 使所述生物样品与对第二靶标特异性的第二检测探针接触以形成第二检测探针-靶标复合物;(ii) 使所述生物样品与对所述第二检测探针特异性的第二标记缀合物接触,所述第二标记缀合物包含第二酶;和(iii) 使所述生物样品与式(I)的第二多染料缀合物接触,其中所述第一多染料缀合物显示的颜色不同于所述第二多染料缀合物显示的颜色。

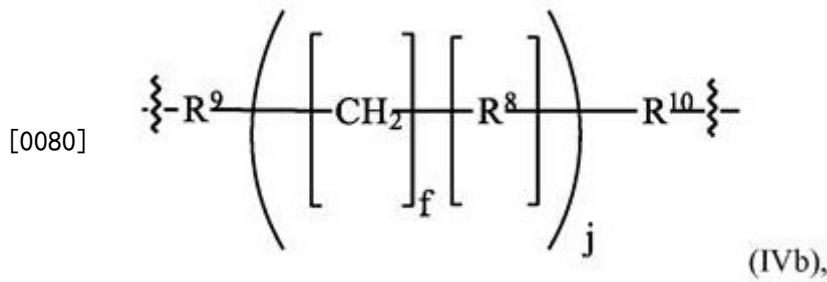
[0075] 在一些实施方案中,Q具有式(IVa)的结构:



[0077] 其中,

[0078] f是0、1或2; R^8 是键、O、S或N(R^c)(R^d); R^a 和 R^b 独立地是H、 $\text{C}_1 - \text{C}_4$ 烷基基团、F、Cl或-N(R^c)(R^d); R^c 和 R^d 独立地选自 CH_3 或H; R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺、硫酮、硫醇的基团;且j是范围为1至8的整数。

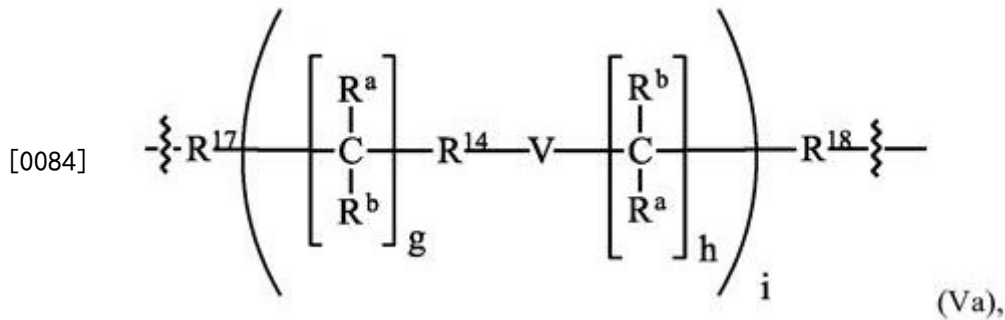
[0079] 在一些实施方案中,(Q)具有式(IVb)的结构:



[0081] 其中,

[0082] f 是0、1或2; R^8 是键、O、S或N(R^c) (R^d); R^c 和 R^d 独立地是 CH_3 或H; R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团;且 j 是范围为1至8的整数。

[0083] 在一些实施方案中, Z 具有式(Va)的结构:



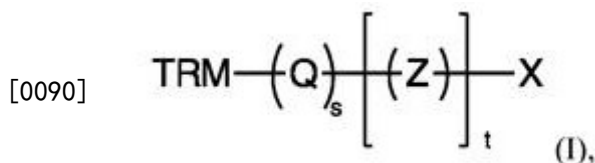
[0085] 其中,

[0086] R^{17} 和 R^{18} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团; R^{14} 是键、羰基、亚胺或硫酮;

[0087] V 是键、-C(R^{15}) (R^{16})-、-O-、-S-、-N(R^{16})-、-N(X)-、-C(R^{15}) (X)-、-C(X)₂-或-C(R^{15}) (N(R^{16}) (X)); X如本文所定义; R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基基团、F、Cl或N(R^{15}) (R^{16}); R^{15} 和 R^{16} 独立地是键或- CH_3 或H; g 是0或范围为1至4的整数; h 是0或范围为1至8的整数;且 i 是1或2。

[0088] 在本公开的另一个方面是试剂盒,其包含:

[0089] (i) 具有式(I)的多染料缀合物:



[0091] 其中,

[0092] “TRM”是组织反应性部分; Q 是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团; Z 是键或具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团; X 是H、-[(Q) _{d} -[A] _{n}] _{e} ;-N-([Z]-[X])₂;或-C(H)([Z]-[X])₂; A是可检测部分; d 是0或1; e 是范围为1至4的整数; s 是0或范围为1至4的整数;且 t 是0或范围为1至10的整数;其中所述多染料缀合物包含至少两个A基团;

[0093] (ii) 对靶标特异性的检测探针;和

[0094] (iii) 对第一检测探针特异性的标记缀合物。

[0095] 在一些实施方案中,所述检测探针是一抗。在一些实施方案中,所述检测探针是缀合至标记物的核酸探针。在一些实施方案中,所述标记缀合物是抗-抗体的抗体,且其中所述抗-抗体的抗体缀合至酶。在一些实施方案中,所述标记缀合物是抗-标记物抗体,且其中所述抗-标记物抗体缀合至酶。

[0096] TSA和QMSA的一个限制是要求缀合的染料包含化学反应性官能团,酪酰胺或醌甲基化物可以与所述化学反应性官能团偶联(以形成相应的TSA或QMSA单一色原缀合物)。尽管存在许多具有此类化学反应性基团(其允许产生具有某些颜色的TSA或QMSA单一色原缀合物)的化合物,但由于缺乏具有必需反应性官能团的染料,存在其他不可得的所需颜色空间(例如,绿色、红色和紫罗兰色)。

[0097] 申请人已经发现新型显色系统,其能够用TSA和QMSA技术扩展用于显色IHC和ISH染色的可用颜色的调色板。实际上,新型显色系统是离散的化学化合物,其表现出使用单一染料缀合物(例如,TSA或QMSA单一色原缀合物)目前无法获得的颜色。

[0098] 此外,新型显色系统的使用优于通过缀合混合生成新颜色的当前方法。首先,申请人已经发现不同的染料-酪酰胺(TSA单一色原缀合物)和染料-醌甲基化物缀合物(QMSA单一色原缀合物)与其同源酶和/或与组织以不同的速率反应,这可以引起染色后的颜色梯度。例如,在黄色缀合物比品红色缀合物更快反应的情况下,品红色和黄色缀合物的混合物(以产生红色)可以导致具有更多橙色色调的更高表达组织区域,而较低表达区域看起来更紫色。申请人已经发现,使用诸如本文所述的多染料缀合物不具有该问题,因为它是离散分子。

[0099] 另外,申请人已经发现,与使用单一染料缀合物(例如,TSA或QMSA单一色原缀合物)的混合物相比,本公开的新的多染料缀合物提供更高的总体信号。不希望受任何特定理论束缚,据信情况就是如此,因为组织上存在有限数量的共价结合位点,并且与利用离散化合物相比,混合两种或更多种色原缀合物有效地降低总体染色浓度。例如,如果总体信号在2 mM处饱和,为了通过以1:1比率混合色原缀合物生成新型颜色,则将使用1 mM的每种染料。然而,通过使用1 mM的在单个分子上含有两个染料的多染料缀合物,可以沉积两倍的染料,导致显著更高的总体信号。

[0100] 最后,申请人已经进一步发现,从制造的观点来看,以特定比例混合多种缀合物的要求产生了不同批次的材料颜色变化的可能性。使用在单个分子上含有两个染料的多染料缀合物将消除该潜在问题。本文进一步描述了这些和其他优点。

[0101] 附图简述

[0102] 本专利或申请文件含有至少一幅以颜色绘制的图。根据请求并支付必要费用后,本专利或专利申请公开的具有彩图的副本将向官方提供。

[0103] 图1提供了说明利用一种或多种特异性结合部分和/或多染料缀合物检测一种或多种靶标的步骤的流程图。

[0104] 图2说明沉积在靶标上的多染料缀合物和酶之间的反应,所述多染料缀合物包含醌甲基化物前体部分的部分。

[0105] 图3说明沉积在靶标上的多染料缀合物和酶之间的反应,所述多染料缀合物包含酪酰胺部分的部分。

[0106] 图4说明用醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物染色的组织样品,其中CD8靶

标被染成红色(在黑白图中可见为黑色和深灰色区域)。

[0107] 图5说明用酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物染色的组织样品,其中CD8靶标被染成紫罗兰色(在黑白图中可见为深灰色斑点)。

[0108] 图6说明用酪酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物染色的组织样品,其中CD8靶标被染成红色(在黑白图中可见为灰色和深灰色斑点)。

[0109] 图7说明用醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物染色的组织样品,其中Ki-67靶标被染成红色(在黑白图中可见为深灰色斑点)。

[0110] 图8说明用醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物染色的组织样品,其中Ki-67靶标被染成红色(在黑白图中可见为深灰色和黑色斑点)。

[0111] 图9说明用醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物染色的组织样品,其中染色体17靶标被染成红色(在黑白图中可见为黑色斑点)。

[0112] 图10说明两种不同色原的组合以及偶联两种不同色原后的所得颜色。

[0113] 图11说明两种不同色原的组合以及偶联两种不同色原后的所得颜色。

[0114] 图12描述不同“Cy”色原的变体。

[0115] 图13A-13D提供了某些双重染料缀合物的光谱。

[0116] 图14说明用醌甲基化物 Cy5-罗丹明800双重染料染色的组织样品,其中Ki67靶标被染成绿色(在黑白图中可见为浅灰色斑点)。

[0117] 详述

[0118] 本文公开了新型缀合物,所述缀合物包含至少两个可检测部分。(在本文中称为“多染料缀合物”)。所述多染料缀合物适用于QMSA和TSA方案中。还公开了使用多染料缀合物以使得能够检测生物样品中的一种或多种靶标的方法。

[0119] 定义

[0120] 如本文所用,单数术语“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数对象,除非上下文另有清楚指出。类似地,词语“或(or)”意在包括“和(and)”,除非上下文另有清楚指出。术语“包括”以包含的方式定义,使得“包括A或B”意味着包括A、B,或者A和B。

[0121] 术语“包含”、“包括”、“具有”等可互换使用且具有相同含义。类似地,“包含”、“包括”、“具有”等可互换使用且具有相同含义。具体地,每个术语都与“包含”的通常美国专利法定义一致地定义,并且因此被解释为开放术语,意指“至少以下”,并且还被解释为不排除额外的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的装置”意味着该装置至少包括组件a、b和c。类似地,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”意味着该方法至少包括步骤a、b和c。此外,尽管本文可以以特定顺序概述所述步骤和方法,但技术人员将认识到,排序的步骤和方法可以变化。

[0122] 如本文所用,碱性磷酸酶(AP)是这样的酶,其通过破坏磷酸-氧键并暂时形成中间酶-底物键而(通过水解)去除并转移磷酸基团有机酯。例如,AP将萘酚磷酸酯(底物)水解成酚类化合物和磷酸。酚类与无色重氮盐(色原)偶联,以产生不溶性的有色偶氮染料。

[0123] 如本文所用,术语“抗体”,偶尔缩写为“Ab”,是指免疫球蛋白或免疫球蛋白分子,包括例如但不限于,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM、其组合以及在任何脊椎动物中(例如在哺乳动物诸如人、山羊、兔和小鼠中)的免疫应答过程中产生的类似分子和抗体片段,其特异性结合目标分子(或一组高度相似的目标分子),以至基本上排除结合其他分子。抗体进一

步是指至少包含特异性识别并结合抗原的表位的轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体。抗体可以由重链和轻链构成,其各自具有可变区,称为可变重(VH)区和可变轻(VL)区。VH区和VL区共同负责结合被抗体识别的抗原。术语抗体还包括完整的免疫球蛋白及其本领域众所周知的变体和部分。

[0124] 如本文所用,短语“抗体缀合物”是指(直接或间接)缀合至一种或多种标记物的那些抗体,其中所述抗体缀合物对特定靶标是特异性的且其中所述标记物能够被(直接或间接)检测到,诸如用二抗(抗-标记物抗体)检测到。例如,抗体缀合物可以诸如通过聚合物接头和/或间隔子与半抗原偶联,并且可以借助半抗原间接检测抗体缀合物。作为一个替代实例,抗体缀合物可以诸如通过聚合物接头和/或间隔子与荧光团偶联,并且可以直接检测抗体缀合物。抗体缀合物进一步描述于美国公开号2014/0147906和美国专利号8,658,389; 8,686,122; 8,618,265; 8,846,320; 和8,445,191。作为进一步的实例,术语“抗体缀合物”包括缀合至酶、例如HRP或AP的那些抗体。

[0125] 如本文所用,术语“抗原”是指可以由特异性体液或细胞免疫的产物诸如抗体分子或T细胞受体特异性结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢物、糖(例如寡糖)、脂质和激素以及大分子诸如复杂碳水化合物(例如多糖)、磷脂、核酸和蛋白。

[0126] 如本文所用,术语“生物样品”可以是获自任何活的生物体、由任何活的生物体排出或分泌的任何固体或流体样品,所述生物体包括但不限于单细胞生物体,尤其是诸如细菌、酵母、原生动物和变形虫等,以及多细胞生物体(诸如植物或动物,包括来自健康或表现健康的人类受试者或受待诊断或调查的病况或疾病诸如癌症影响的人类患者的样品)。例如,生物样品可以是获得自例如血液、血浆、血清、尿液、胆汁、腹水、唾液、脑脊液、房水或玻璃体液或任何身体分泌物、渗出物、流出物(例如,获得自脓肿或任何其他感染或炎症部位的流体)的生物流体,或获得自关节(例如,正常关节或受疾病影响的关节)的流体。生物样品也可以是获得自任何器官或组织的样品(包括活检或尸检样本,诸如肿瘤活检),或者可以包括细胞(无论是原代细胞还是培养细胞)或由任何细胞、组织或器官调节的培养基。在一些实例中,生物样品是核提取物。在某些实例中,样品是质量控制样品,诸如公开的细胞团块切片样品之一。在其他实例中,样品是测试样品。普通技术人员可以使用本领域已知的任何方法来制备样品。可以从用于常规筛选的受试者或从被怀疑具有病症,诸如遗传异常、感染或瘤形成的受试者获得样品。公开的方法的所描述的实施方案也可以应用于被称为“正常”样品的不具有遗传异常、疾病、病症等的样品。样品可以包括可以被一种或多种检测探针特异性结合的多个靶标。

[0127] 如本文所用,术语“发色团”是指分子或负责其颜色的分子部分。当分子吸收某些波长的可见光并透射或反射其他波长时,产生颜色。具有落在可见光谱范围内的两个不同分子轨道之间的能量差的分子可以吸收可见光,且因此被适当地表征为发色团。可以吸收入射在发色团上的可见光,因此将电子从基态分子轨道激发到激发态分子轨道。

[0128] 如本文所用,术语“缀合物”是指共价连接至较大构建体中的两个或更多个分子或部分(包括大分子或超分子的分子)。在一些实施方案中,缀合物包括一种或多种共价连接至一个或多个其他分子部分的生物分子(诸如肽、蛋白、酶、糖、多糖、脂质、糖蛋白和脂蛋白)。

[0129] 如本文所用,术语“偶联(couple)”或“偶联(coupling)”是指一个分子或原子与另一个分子或原子的接合、键合(例如共价键合)或连接。

[0130] 如本文所用,术语“可检测部分”是指可产生可检测(诸如视觉、电子或以其他方式)信号的分子或材料,所述信号指示样品中的标记物的存在(即定性分析)和/或浓度(即定量分析)。可通过任何已知或尚未发现的机制生成可检测信号,所述机制包括光子的吸收、发射和/或散射(包括射频、微波频率、红外频率、可见频率和紫外频率光子)。可检测部分的实例包括显色、荧光、磷光和发光分子和材料。

[0131] 如本文所用,“半抗原”是可以与抗体特异性组合,但除非与载体分子组合,通常基本上不能具有免疫原性的小分子。在一些实施方案中,半抗原包括但不限于吡啶类(例如硝基吡啶类);硝基苯基化合物;苯并咪唑类;三萜类;脲类(例如苯基脲类);硫脲类(例如苯基硫脲类);鱼藤酮和鱼藤酮衍生物;噁唑(例如噁唑磺酰胺类);噻唑类(例如噻唑磺酰胺类);香豆素和香豆素衍生物;和环木脂素类。半抗原的额外非限制性实例包括噻唑类;硝基芳基类;苯并咪唑类;三萜类;和环木脂素类。半抗原的具体实例包括二硝基苯基、生物素、洋地黄毒苷和荧光素及其任何衍生物或类似物。其他半抗原描述于美国专利号8,846,320;8,618,265;7,695,929;8,481,270;和9,017,954;其公开内容以其整体通过引用并入本文。半抗原本身可以适合于直接检测,即它们可以发出合适的信号用于检测。

[0132] 如本文所用,辣根过氧化物酶(HRP)是可以与标记的分子缀合的酶。当与适当的底物一起孵育时,其产生标记的分子的可色、荧光或发光衍生物,允许其被检测和定量。HRP在电子供体存在的情况下起作用,以首先形成酶底物复合物,且然后接着起作用以氧化电子供体。例如,HRP可以作用于3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)以产生可检测的颜色。HRP还可以作用于标记的酪酰胺缀合物,或酪酰胺样反应性缀合物(即阿魏酸盐、香豆酸、咖啡酸、肉桂酸、多巴胺等),以沉积有色或荧光或无色的报告子部分用于酪酰胺信号扩增(TSA)。

[0133] 如本文所用,术语“多重”、“多重的”或“多重化”是指同时、基本上同时或依次检测样品中的多种靶标。多重化可以包括单独地和以任何和所有组合来鉴定和/或定量多种不同的核酸(例如,DNA、RNA、mRNA、miRNA)和多肽(例如,蛋白)。

[0134] 如本文所用,术语“一抗”是指特异性结合组织样品中的靶标蛋白抗原的抗体。一抗通常是免疫组织化学程序中使用的第一抗体。

[0135] 如本文所用,“醌甲基化物”是醌类似物,其中相应醌上的羰基氧之一被亚甲基基团(CH_2)替代以形成烯炔。

[0136] 如本文所用,术语“二抗”在本文中是指这样的抗体,其特异性结合一抗,由此在一抗和后续试剂(例如标记物、酶等,如果有的话)之间形成桥。二抗通常是免疫组织化学程序中使用的第二抗体。

[0137] 如本文所用,术语“特异性结合部分”是指特异性结合对的成员。特异性结合对是分子对,其特征在于它们与彼此结合以实质上排除与其他分子的结合(例如,特异性结合对可具有比结合对的两个成员中任一个与生物样品中的其他分子的结合常数至少大 10^{-3} M、大 10^{-4} M或大 10^{-5} M的结合常数)。特异性结合部分的具体实例包括特异性结合蛋白(例如,抗体、凝集素、抗生物素蛋白诸如链霉抗生物素蛋白和蛋白A)。特异性结合部分还可以包括被此类特异性结合蛋白特异性结合的分子(或其部分)。

[0138] 如本文所用,术语“靶标”是指确定或可以确定其存在、位置和/或浓度的任何分

子。靶标分子的实例包括蛋白、核酸序列和半抗原,诸如共价键合至蛋白的半抗原。通常使用特异性结合分子和可检测标记的一种或多种缀合物来检测靶标分子。

[0139] 缀合物

[0140] 本公开提供了包含多个可检测部分(例如色原)的新型缀合物。所述多染料缀合物的多个可检测部分可以是相同或不同的。在一些实施方案中,所述多染料缀合物的至少两个可检测部分是不同的。例如,所述多染料缀合物可以包含TAMRA色原和Cy5色原。在其他实施方案中,选择所述多染料缀合物的至少两个可检测部分,使得各个可检测部分各自显示不同的信号。例如,所述多染料缀合物可以包含TAMRA色原和Dabsyl色原,其中TAMRA和Dabsyl各自显示不同的颜色。在其他实施方案中,所述多染料缀合物包含多个可检测部分,其中所述可检测部分中的至少两个是相同的,且其中至少第三可检测部分是不同的。

[0141] 在一些实施方案中,设计多染料缀合物,使得它们提供生成新颜色的工具,用于用酪酰胺和酞甲基化物信号扩增技术的显色IHC和ISH染色。再次,如本文所示,某些颜色空间不可用,因为适于产生那些颜色的色原不能与酪酰胺或酞甲基化物前体(例如试卤灵、尼罗蓝和孔雀石绿)偶联。通过偶联多种不同的有色色原,多染料缀合物能够直接提供例如红色、紫罗兰色和绿色,而不依靠混合TSA或QMSA单一色原缀合物的不同组合。因此,与简单混合染料相比,能够实现优异的结果(如本文所述)。

[0142] 产生新的独特颜色的能力基于减色混合的原理(Berns, R. S., Billmeyer, F. W., Saltzman, M.,和Billmeyer, F. W. (2000) *Billmeyer and Saltzman's Principles of Color Technology*, Wiley, New York.)。简而言之,这个构思由于部分或完全吸收一些波长的光而产生新的颜色。不希望受任何特定理论束缚,据信多染料缀合物的颜色取决于在减去每种染料后仍然能够通过的光的波长。在这里利用的染料据信是“窄吸收”,意味着它们仅吸收可见光谱的相对窄的部分,同时允许大部分光通过。使用“窄吸收”染料据信允许染料混合并形成新的独特颜色,因为一定量的光仍可通过。如果使用广泛吸收的染料,据信它们最终会减去太多的光谱,留下不容易与彼此区分的深红色、棕色和黑色。图13A-13D提供了某些双重染料缀合物的光谱,并且具体地说明与单个单一染料颜色相比的双重染料颜色。

[0143] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物以“线性”构型排列。所述以“线性”构型排列意指多染料缀合物的可检测部分包含多个缀合位点,使其能够(i)直接或间接偶联至另一个可检测部分(其自身可以允许偶联至另一个可检测部分),和(ii)直接或间接偶联至组织反应性部分(如该术语在本文中定义)。包含诸如线性排列的多染料缀合物描绘于图10中。例如,将黄色色原与青色色原和组织反应性部分连接,提供了提供绿色的多染料缀合物。同样,将黄色色原与紫色色原和组织反应性部分连接,加工出提供红色的多染料缀合物。类似地,将青色色原与紫罗兰色色原和组织反应性部分连接,提供了靛蓝色。尽管这些实施例各自说明了多个色原与组织反应性部分的串联偶联,但技术人员将理解,任何多染料缀合物可以包含多于两个色原,以提供又进一步的颜色、色调或强度。尽管图10描绘了包含两个可检测部分的实例,技术人员将理解,任何数量的可检测部分可以与彼此直接或间接偶联。

[0144] 在一些实施方案中,所述多染料缀合物以“分支”构型排列。所述以“分支”构型排列意指接头或包含多个缀合位点的多官能接头用于将(i)多个可检测部分与(ii)组织反应

性部分直接或间接偶联,如下面的示意图中所描绘并且如图11中进一步所说明。在一些实施方案中,所述多官能接头包含至少三个用于缀合的位点。在其他实施方案中,所述多官能接头包含四个或更多个用于缀合的位点。尽管下面的示意图指示多官能接头缀合至两个色原,但任何数量的可检测部分可以缀合至组织反应性部分,条件是所述多官能接头包含足够的用于缀合的位点。



[0146] 在一些实施方案中,所述多官能接头提供至少三个能够直接或间接偶联至(i)至少两个色原和(ii)组织反应性部分的官能团。在一些实施方案中,所述多官能接头包含多个胺、羧基、马来酰亚胺或硫醇基团以实现缀合。在一些实施方案中,所述多官能接头选自可以被正交保护和脱保护的接头,允许技术人员一次将一个色原缀合至多官能接头,因此防止不需要的副反应或副产物。

[0147] 在一些实施方案中,所述多官能接头具有范围为约1 g/mol至约300 g/mol的分子量。在其他实施方案中,所述多官能接头具有范围为约20 g/mol至约250 g/mol的分子量。在一些实施方案中,所述多官能接头包含增溶基团,诸如聚乙二醇(PEG)基团,以增加所述多染料缀合物的水溶性。在一些实施方案中,所述多官能接头包含约2至约8个PEG基团。在其他实施方案中,所述多官能接头包含约2至约6个PEG基团。

[0148] 在一些实施方案中,所述多官能接头是多胺。在一些实施方案中,所述多胺包含2至20个胺基。在其他实施方案中,所述多胺包含2至10个胺基。在还有其他实施方案中,所述多胺包含2至6个胺基。多胺的实例包括降亚精胺、精胺及其衍生物或类似物。

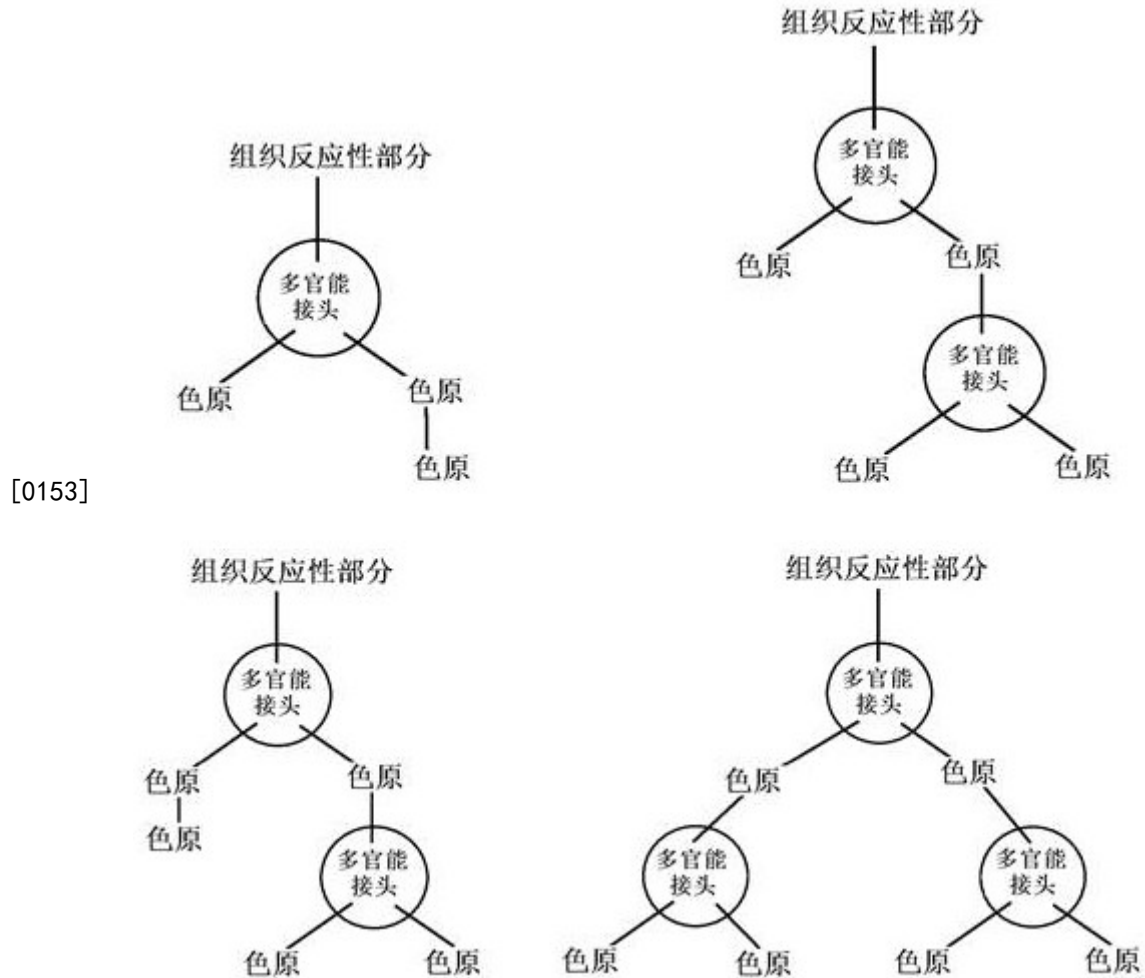
[0149] 在一些实施方案中,所述多官能接头是异双官能接头,即包含至少两个不同反应性官能团的接头。例如,异双官能接头可以包含羧酸基团和两个胺基团。在一些实施方案中,所述多官能接头是赖氨酸或赖氨酸的衍生物。

[0150] 在其他实施方案中,所述多官能接头是具有重复基团的聚合物,所述重复基团包含至少一个用于偶联至色原的缀合位点。在其他实施方案中,所述多官能接头是树枝状分子,所述树枝状分子包含多个分支基团,每个分支基团包含至少一个缀合位点。在一些实施方案中,合适的树枝状分子包括聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状分子、Janus树枝状分子(即由两个树枝状楔构成且由两种不同官能团封端的树枝状分子)和双-MPA树枝状分子及其衍生物。

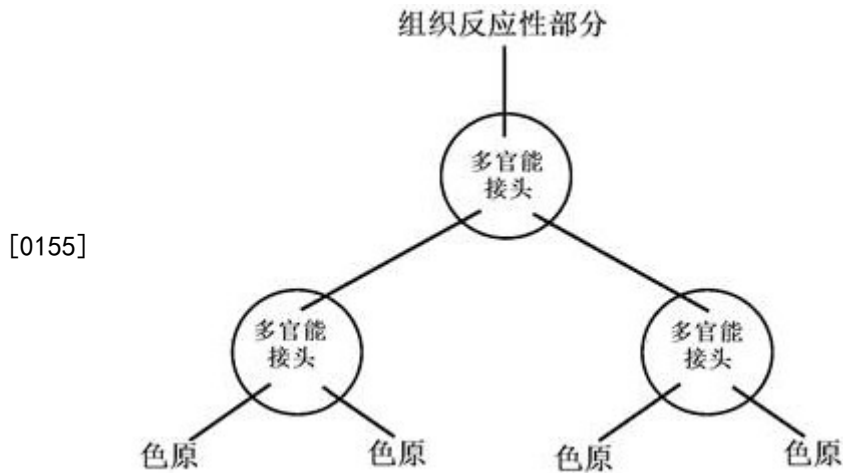
[0151] 通过实例的方式且参考图11,通过多官能接头将黄色色原和青色色原连接至组织反应性部分,提供了提供绿色的多染料缀合物。同样,通过多官能接头将黄色色原和紫色色原连接至组织反应性部分,提供了提供红色的多染料缀合物。类似地,通过多官能接头将青色色原和紫罗兰色色原连接至组织反应性部分,提供了靛蓝色。尽管上面的示意图和图11中的图示描绘了与组织反应性部分偶联的两个色原,但技术人员将理解,可以将多于两个

色原偶联至任何组织反应性部分,条件是所述多官能接头包含足够的用于缀合的位点。

[0152] 还考虑了其他排列。在一些排列中,所述多染料缀合物是“线性”和“分支”排列的杂合物,如下面的示意图中所描绘。尽管下面的示意图指示多官能接头缀合至色原,但可以利用任何可检测部分。此外,技术人员将理解,所述多官能接头或色原可以与彼此直接或间接地偶联。

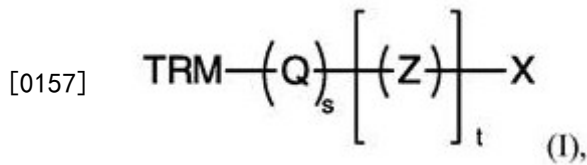


[0154] 还有其他排列包括“高度支化”构型,其中多个多官能接头偶联以形成分支缀合物,诸如在下面说明的方案中。在这些“高度支化”构型中,所述多官能接头可以是树枝状分子或聚合物。尽管下面的示意图指示多官能接头缀合至色原,但可以利用任何可检测部分。此外,技术人员将理解,所述多官能接头或色原可以与彼此直接或间接地偶联。



[0155]

[0156] 在一些实施方案中,本公开的多染料缀合物具有式(I)的结构:



[0158] 其中“TRM”是组织反应性部分;

[0159] Q是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团;

[0160] Z是键或具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;

[0161] X是H、 $-(\text{Q})_d - [\text{A}]_n$; $-\text{N} - ([\text{Z}] - [\text{X}])_2$; 或 $-\text{C}(\text{H}) ([\text{Z}] - [\text{X}])_2$;

[0162] A是可检测部分;

[0163] d是0或1;

[0164] e是范围为1至4的整数;

[0165] s是0或范围为1至4的整数;且

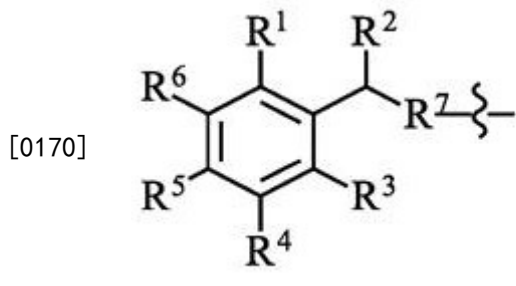
[0166] t是0或范围为1至10的整数;

[0167] 条件是式(I)的多染料缀合物包含至少两个A基团。

[0168] 如本文所用,术语“组织反应性”是指能够与酶反应的部分。因此,当包含组织反应性部分的缀合物与适当的酶反应时,多染料缀合物的组织反应性部分的部分经历结构、构象和/或电子变化,由此提供适于直接或间接键合至生物样品上(或在可能的程度上,在生物样品内)的组织反应性物质(中间体)。例如,在组织反应性部分是酪酰胺或其衍生物的情况下,当酪酰胺与适当的酶(例如HRP)反应时,形成酪酰胺自由基物质。这种高反应性酪酰胺自由基物质能够键合至生物样品中的酪氨酸残基。以类似的方式,在所述组织反应性部分是醌甲基化物前体或其衍生物的情况下,在与适当的酶(例如AP)反应后,醌甲基化物前体被转化为醌甲基化物(或其各自的衍生物),其据信与生物样品中的亲核试剂高度反应。本文进一步描述任何缀合物的组织反应性部分的部分的作用,其与合适的酶的相互作用,以及适于检测的固定化组织-缀合物复合物的形成。

[0169] 在一些实施方案中,所述组织反应性部分是醌甲基化物前体或其衍生物。在一些

实施方案中, 醌甲基化物前体部分具有由式(II)提供的结构:



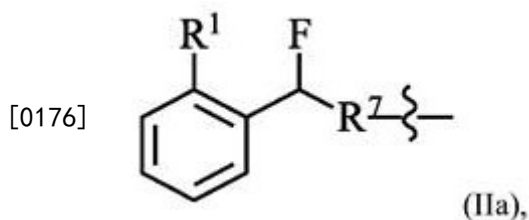
[0171] R^1 是选自磷酸酯基、酰胺基、硝基、脲基、硫酸酯基、甲基、酯基、 β -内酰胺基或糖基的基团;

[0172] R^2 是卤素;

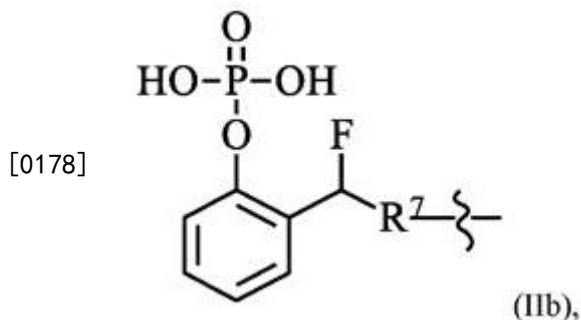
[0173] R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立地选自氢或具有1至4个碳原子的脂族基团;且

[0174] R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$, 其中 w 是范围为1至12的整数。

[0175] 在其他实施方案中, 所述醌甲基化物前体部分具有由式(IIa)提供的结构:



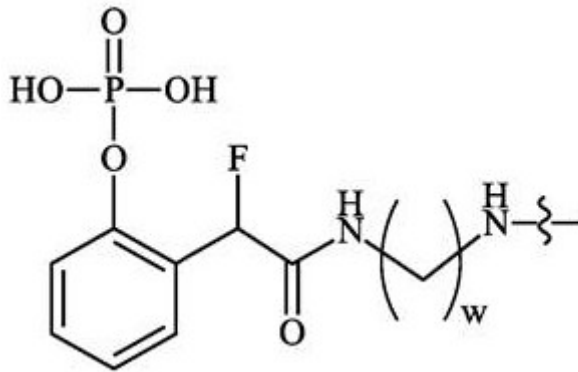
[0177] 在其他实施方案中, 所述醌甲基化物前体部分具有由式(IIb)提供的结构:



[0179] 其中 R^7 是 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-O(CH_2)_wNH-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$ 、 $-(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2)_wO-$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wO-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_w-$ 、 $-(CH_2)_wS-$ 、 $-O(CH_2)_wS-$ 、 $-N(H)C(O)(CH_2)_wS-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)_wS-$ 、 $-(CH_2)_wNH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2NH-$ 、 $-C(O)N(H)(CH_2)NHC(O)CH(CH_3)(CH_2)_wNH-$ 或 $-N(H)(CH_2)_wNH-$, 其中 w 独立地是范围为1至12的整数。在一些实施方案中, R^7 是 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$, 且 w 如上所定义。在其他实施方案中, R^7 是 $-C(O)N(H)(CH_2)_wNH-$, 且 w 范围为2至6。

[0180] 在其他实施方案中, 所述醌甲基化物前体部分具有由式(IIc)提供的结构:

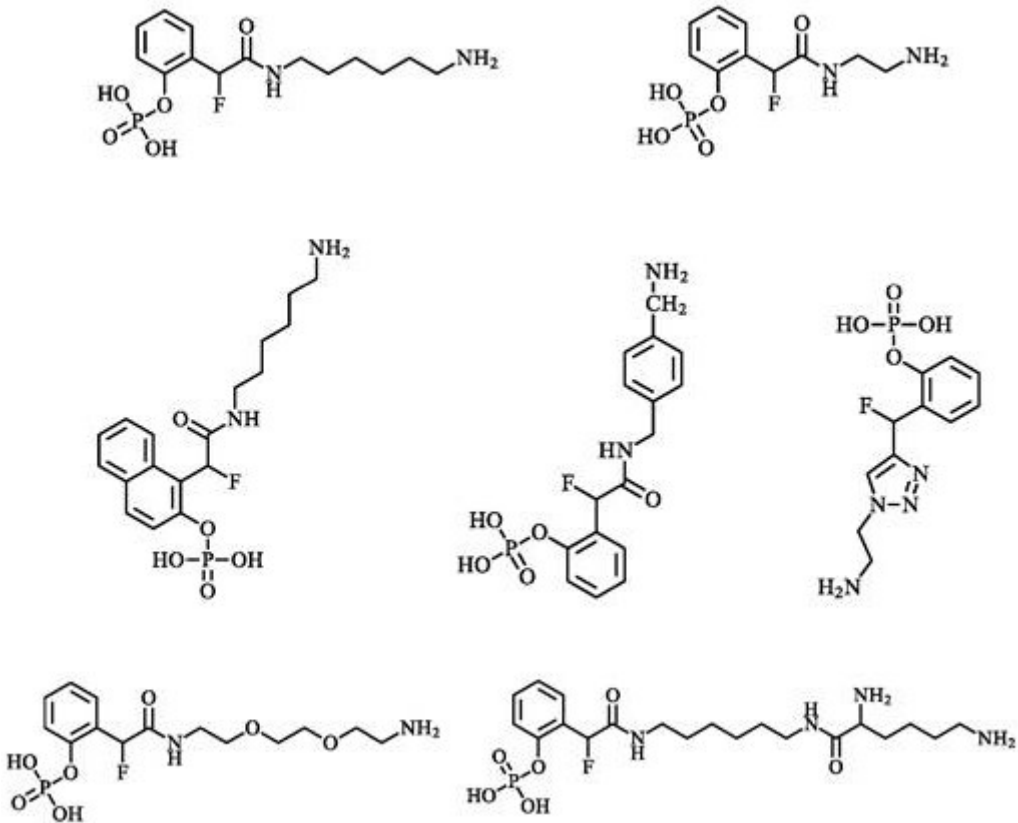
[0181]



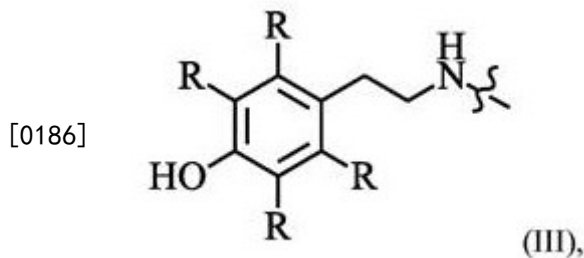
[0182] 其中w范围为1至12。在一些实施方案中,w范围为1至8。在其他实施方案中,w范围为2至8。在还有其他实施方案中,w范围为2至6。在进一步实施方案中,w是6。

[0183] 在一些实施方案中,任何多染料缀合物的酞甲基化物前体部分的部分衍生自以下衍生物之一。技术人员将理解,以下衍生物是用于偶联至多官能接头、可检测部分或多染料缀合物的其他组分的合适起始材料。

[0184]

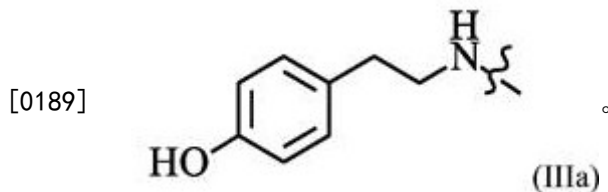


[0185] 在一些实施方案中,所述组织反应性部分是脲酰胺或其衍生物。在一些实施方案中,所述脲酰胺具有由式(III)提供的结构:



[0187] 其中每个R基团独立地选自氢或具有1至4个碳原子的低级烷基基团。

[0188] 在其他实施方案中,所述酪酰胺部分具有由式(IIIa)提供的结构:



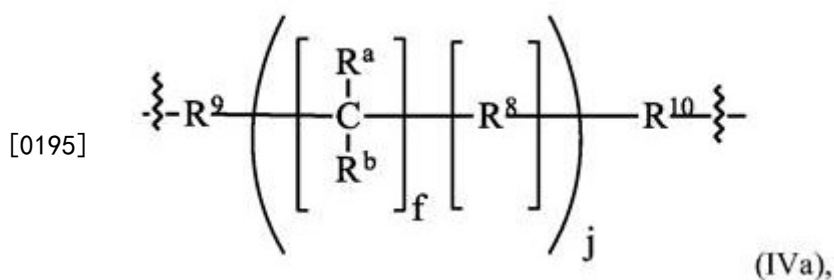
[0190] 技术人员将理解,式(III)和(IIIa)的酪酰胺或衍生物是用于偶联至多官能接头、可检测部分或多染料缀合物的其他组分的合适起始材料。

[0191] 在一些实施方案中,A是色原。色原的非限制性实例包括TAMRA、Dabsyl、Dabcyl、Cy3、CyB、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、罗丹明800和荧光素。在一些实施方案中,所述色原选自具有至少一个缀合位点的显色化合物,所述缀合位点能够直接或间接(诸如通过基团Q)偶联至组织反应性部分、基团Z或另一色原。具有多个缀合位点的色原的非限制性实例包括TAMRA、5,6-羧基荧光素、FITC、5,6-羧基罗丹明110、5,6-羧基罗丹明6G、5,6-羧基-X-罗丹明和罗丹明B异硫氰酸酯。也可以利用在5,6-位取代的其他罗丹明和荧光素衍生物。

[0192] 如本文所示,Q可以是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团。在一些实施方案中,Q可以包含羰基、胺、酯、醚、酰胺、亚胺、硫酮或硫醇基团。在一些实施方案中,Q是具有2至20个碳原子、任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子,和一个或多个选自胺、羰基、酯、醚、酰胺、亚胺、硫酮或硫醇的末端基团的分支或未分支线性基团。在其他实施方案中,Q是具有2至20个碳原子、任选地具有一个或多个氧杂原子的分支或未分支线性基团。在还有其他实施方案中,基团Q包含旨在增加分子的水溶性的组分。

[0193] 在一些实施方案中,基团Q被设计为充当分隔附近多染料缀合物组分(例如,以减轻相邻色原之间的空间相互作用)的“间隔子”。在其他实施方案中,基团Q被设计为增加多染料缀合物的水溶性或将两个多染料缀合物组分偶联在一起。

[0194] 在一些实施方案中,Q具有式(IVa)中描绘的结构:



[0196] 其中f是0、1或2；

[0197] R^8 是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

[0198] R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基基团、F、Cl或-N(R^c) (R^d)；

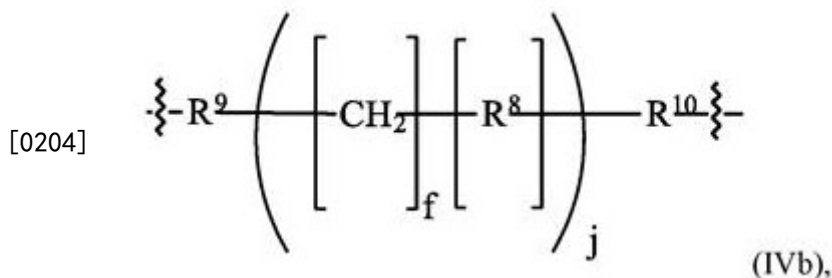
[0199] R^c 和 R^d 独立地选自 CH_3 或H；

[0200] R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺、硫酮、硫醇的基团；且

[0201] j是范围为1至8的整数。

[0202] 在一些实施方案中， R^a 或 R^b 中的至少一个是H。在一些实施方案中， R^a 或 R^b 中的至少一个是H且f是1。在一些实施方案中， R^a 或 R^b 中的至少一个是H，f是1，且s是至少2。

[0203] 在一些实施方案中，Q具有式(IVb)中描绘的结构：



[0205] 其中f是0、1或2；

[0206] R^8 是键、O、S或N(R^c) (R^d)；

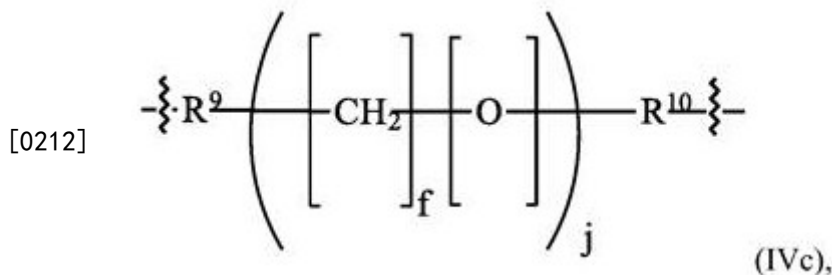
[0207] R^c 和 R^d 独立地是 CH_3 或H；

[0208] R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团；且

[0209] j是范围为1至8的整数。

[0210] 在一些实施方案中，f是1且s是至少2。在一些实施方案中， R^8 是键；f是1；s是2至10；且 R^9 和 R^{10} 如上所定义。在其他实施方案中， R^8 是键；f是1；s是2至6；且 R^9 和 R^{10} 如上所定义。在其他实施方案中， R^8 是键；f是1；s是2至4；且 R^9 和 R^{10} 两者都是胺。

[0211] 在一些实施方案中，Q具有式(IVc)中描绘的结构：



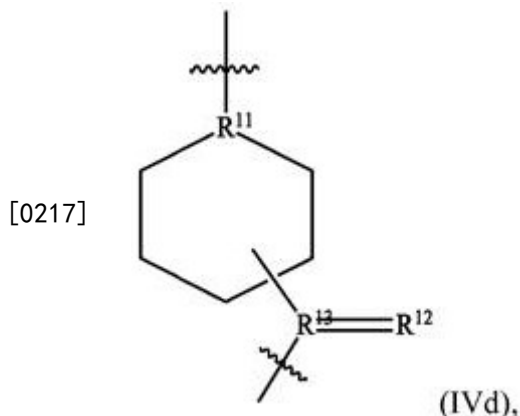
[0213] 其中f是0、1或2；且j是范围为1至8的整数。

[0214] 在一些实施方案中，f是1； R^9 和 R^{10} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、胺或硫醇的基团；且s是至少2。在一些实施方案中，f是1且s是2。在一些实施方案中，f是1且s是3。在一些实施方案中，f是1且s是4。

[0215] 式(IVa)、(IVb)和(IVc)的基于环氧烷的Q基团在本文中通过参考二醇类、诸如乙二醇类来表示。在一些实施方案中，此类环氧烷接头的并入据信增加多染料缀合物的亲水性。本领域普通技术人员将理解，随着接头中环氧烷重复单元的数量增加，缀合物的亲水性也可增加。可用于实施本公开的某些公开实施方案的额外异双官能聚亚烷基二醇间隔子描

述于受让人的共同未决申请,包括“Nanoparticle Conjugates,”2006年4月28日提交的美国专利申请号11/413,778;“Antibody Conjugates,”2006年4月27日提交的美国申请号11/413,415;和“Molecular Conjugate,”2005年11月23日提交的美国临时专利申请号60/739,794;所述申请全部都通过引用并入本文。

[0216] 在式(IVa)的一些实施方案中,基团C(R^a)(R^b)和R⁸形成环状脂族基团。在一些实施方案中,Q具有式(IVd)中描绘的结构:



[0218] 其中R¹¹是N或S;

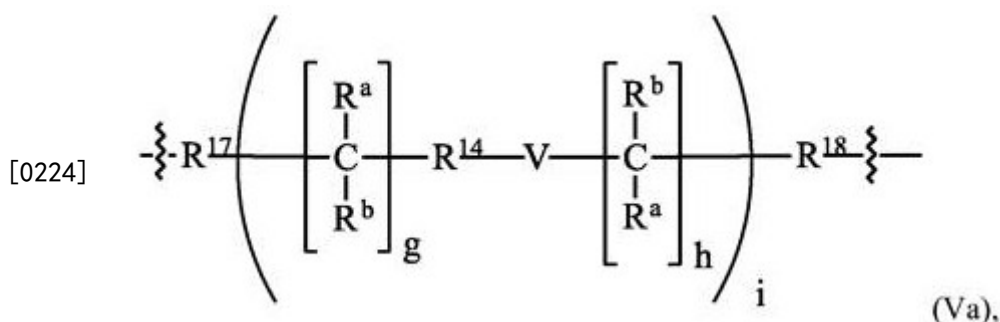
[0219] R¹²是O、N或S;且

[0220] R¹³是C或N;

[0221] 条件是当R¹²是N或S时,R¹³是C;且条件是当R¹³是N时,R¹²是C。在一些实施方案中,Q衍生自4-哌啶甲酸。

[0222] 如本文所示,Z可以是键或具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的分支或未分支、线性或环状、取代或未取代的基团。在一些实施方案中,Z可以包含羰基、胺、酯、醚、酰胺、亚胺、硫酮或硫醇基团。在一些实施方案中,基团Z代表本文所述的多官能接头或异双官能接头,并且如此代表的化合物被设计为允许分支或高度分支的多染料缀合物。技术人员将理解,当合在一起时,基团Q和Z允许不同间隔子、PEG基团、接头等的偶联。

[0223] 在一些实施方案中,Z具有式(Va)的结构:



[0225] 其中R¹⁷和R¹⁸独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH-、-N-、硫酮或硫醇的基团;

[0226] R¹⁴是键、羰基、亚胺或硫酮;

[0227] V是键、-C(R¹⁵)(R¹⁶)-、-O-、-S-、-N(R¹⁶)-、-N(X)-; -C(R¹⁵)(X)-; -C(X)₂-或-C(R¹⁵)(N

(R¹⁶) (X)) ;

[0228] X如本文所定义;

[0229] R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R¹⁵) (R¹⁶) ;

[0230] R¹⁵和R¹⁶独立地是键或-CH₃或H;

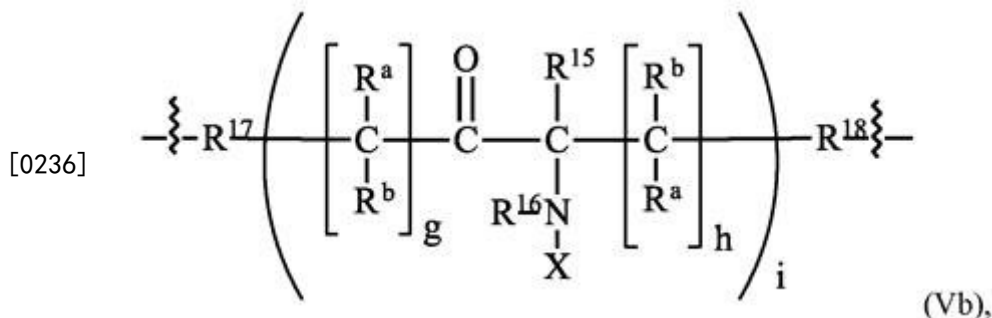
[0231] g是0或范围为1至4的整数;

[0232] h是0或范围为1至8的整数;且

[0233] i是1或2。

[0234] 在式(Va)的一些实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至6。在式(Va)的其他实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至4。在式(Va)的还有其他实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h是4。在式(Va)的进一步实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,且h范围为2至4。在式(Va)的还有进一步实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;且h范围为2至4。在式(Va)的甚至进一步实施方案中,g是0,R¹⁴是羰基,V是-C(R¹⁵) (N(R¹⁶) (X)) ,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;X是-(Q)_d-[A]_n]_e,d、n和e各自为1,且h范围为2至4。

[0235] 在一些实施方案中,Z具有式(Vb)的结构:



[0237] 其中R¹⁷和R¹⁸独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团;

[0238] X如本文所定义;

[0239] R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R¹⁵) (R¹⁶) ;

[0240] R¹⁵和R¹⁶独立地是键或-CH₃或H;

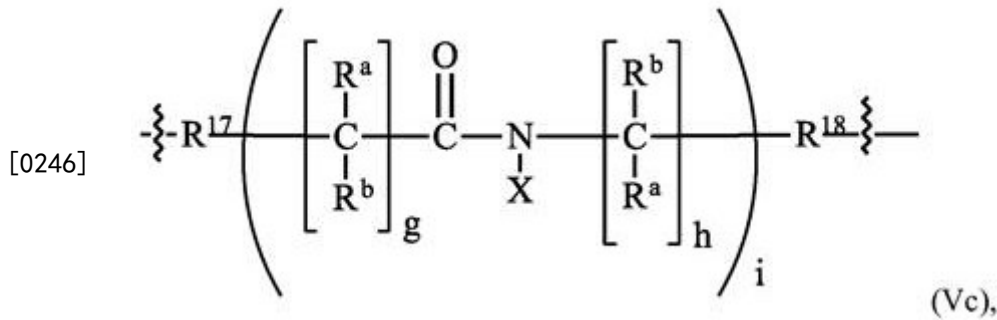
[0241] g是0或范围为1至4的整数;

[0242] h是0或范围为1至8的整数;且

[0243] i是1或2。

[0244] 在式(Vb)的一些实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至6。在式(Va)的其他实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h范围为2至4。在式(Va)的还有其他实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,且h是4。在式(Va)的进一步实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,且h范围为2至4。在式(Va)的还有进一步实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;且h范围为2至4。在式(Va)的甚至进一步实施方案中,g是0,R¹⁵是H,R¹⁶是H,R^a和R^b是H,R⁹是键,R¹⁰是胺;X是-(Q)_d-[A]_n]_e,d、n和e各自为1,且h范围为2至4。

[0245] 在一些实施方案中,Z具有式(Vc)的结构:



[0247] 其中 R^{17} 和 R^{18} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-、硫酮或硫醇的基团；

[0248] X如本文所定义；

[0249] R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基基团、F、Cl或N(R^{15}) (R^{16})；

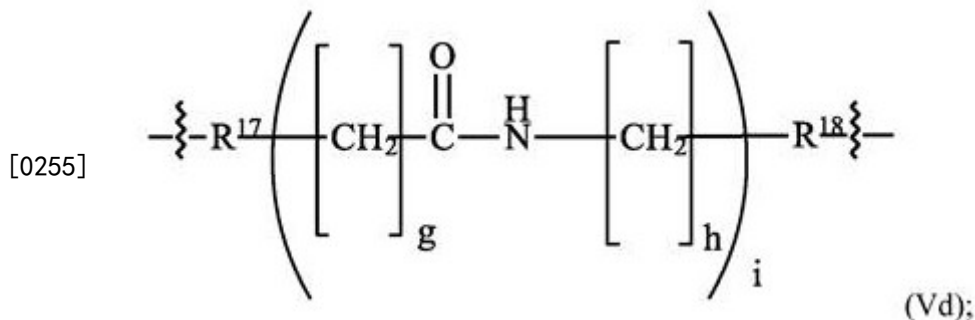
[0250] g是0或范围为1至4的整数；

[0251] h是0或范围为1至8的整数；且

[0252] i是1或2。

[0253] 在式(Vc)的一些实施方案中，g是2至4，且h是2至4。在式(Vc)的其他实施方案中，g是2，h是2，且 R^{18} 是键。在式(Vc)的还有其他实施方案中，g是2，h是2， R^{18} 是键，且X是 $-(Q)_d-[A]_n-e$ 。

[0254] 在一些实施方案中，Z具有式(Vd)的结构：



[0256] 其中 R^{17} 和 R^{18} 独立地是键或选自羰基、酰胺、酰亚胺、酯、醚、-NH、-N-或硫醇的基团；

[0257] g是0或范围为1至4的整数；

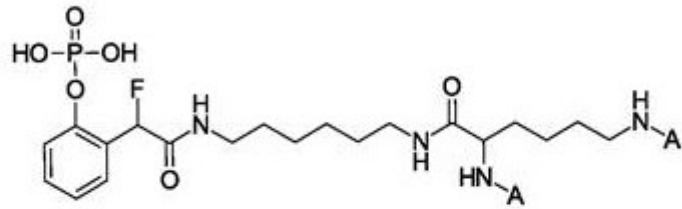
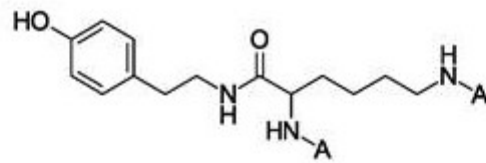
[0258] h是0或范围为1至8的整数；且

[0259] i是1或2。

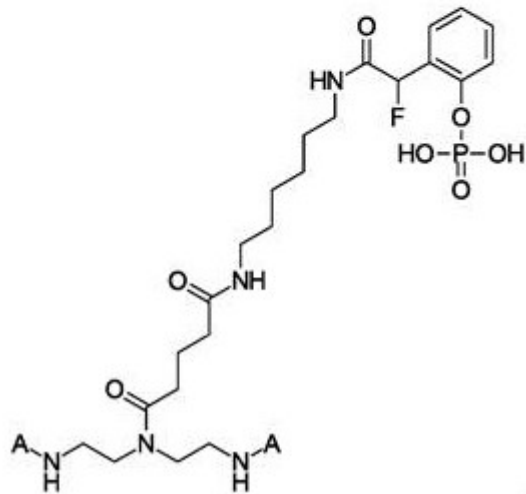
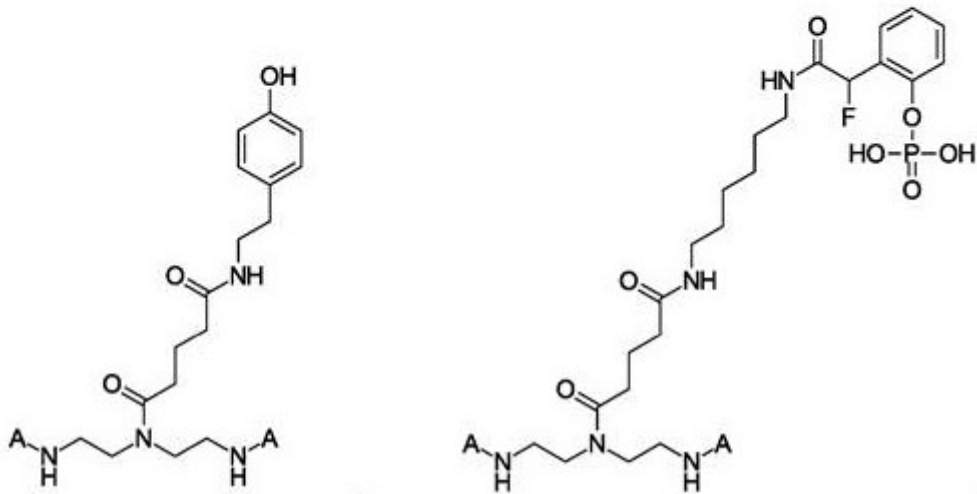
[0260] 在式(Vd)的一些实施方案中，g是2至4，且h是2至4。

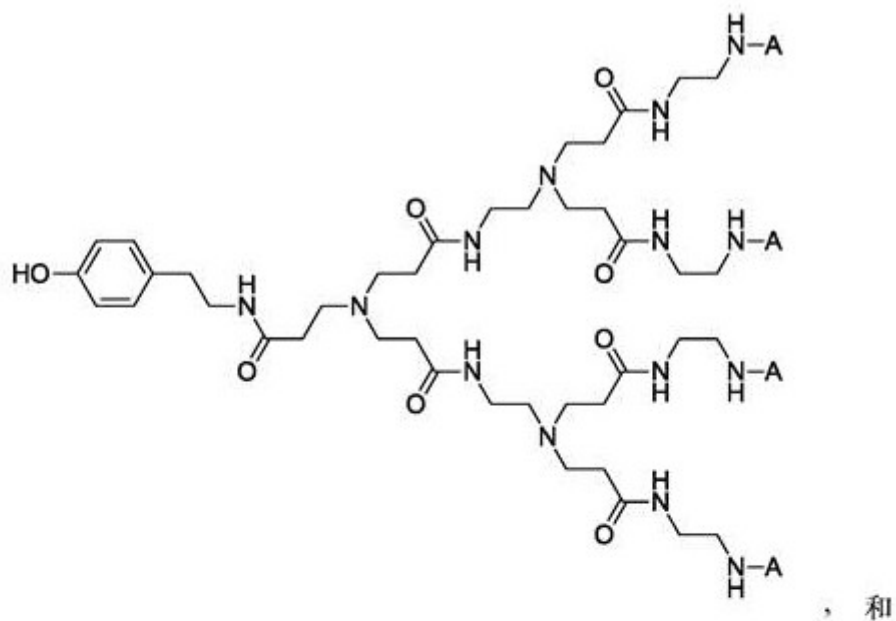
[0261] 在式(Vd)的其他实施方案中，g是2，h是2，且 R^{18} 是键。

[0262] 根据式(I)的多染料缀合物的实例包括下面提供的那些，其中A是可检测部分：

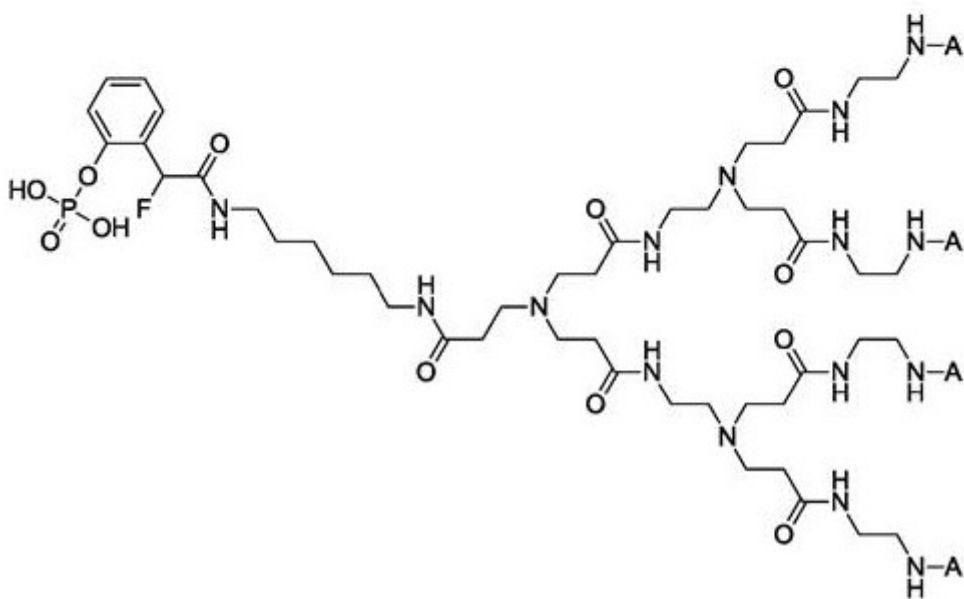


[0263]

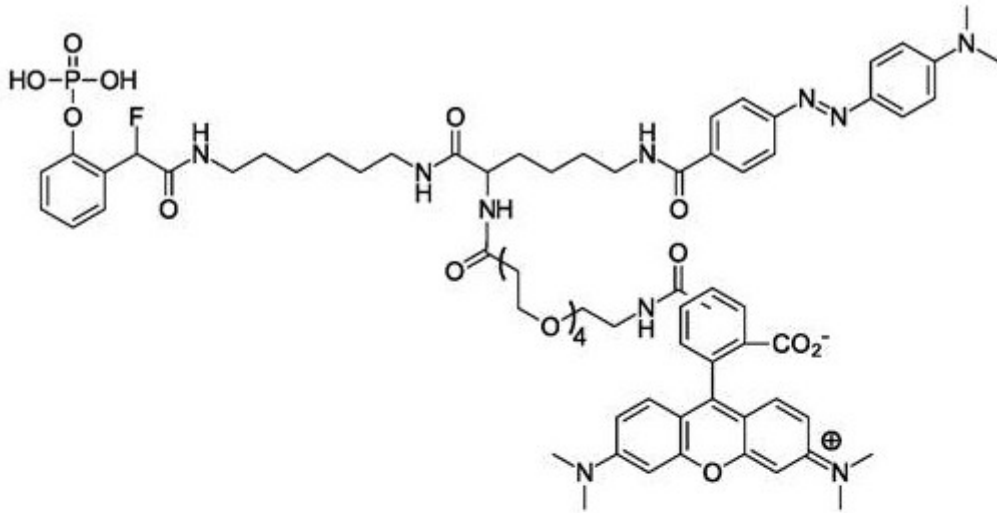




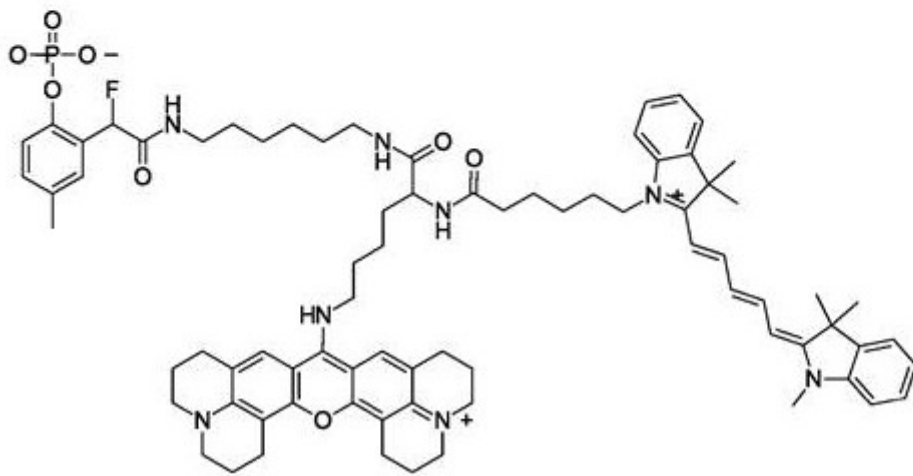
[0264]

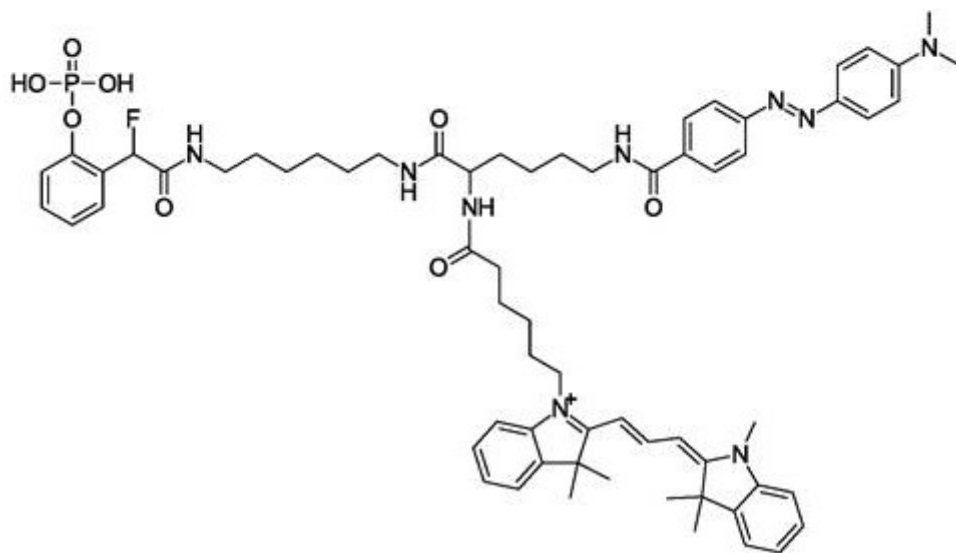
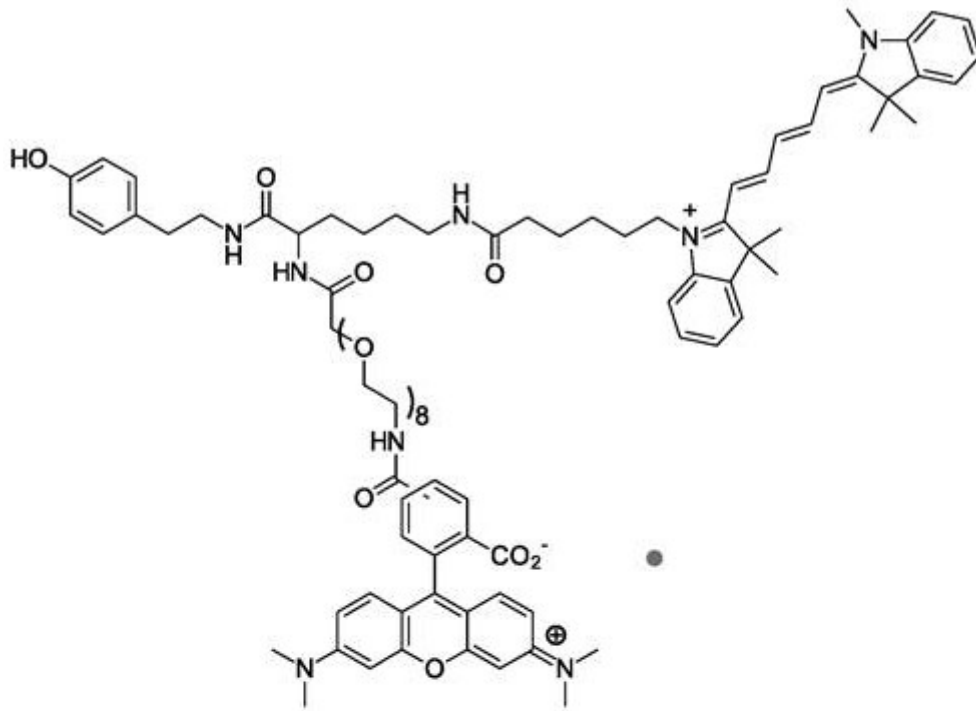


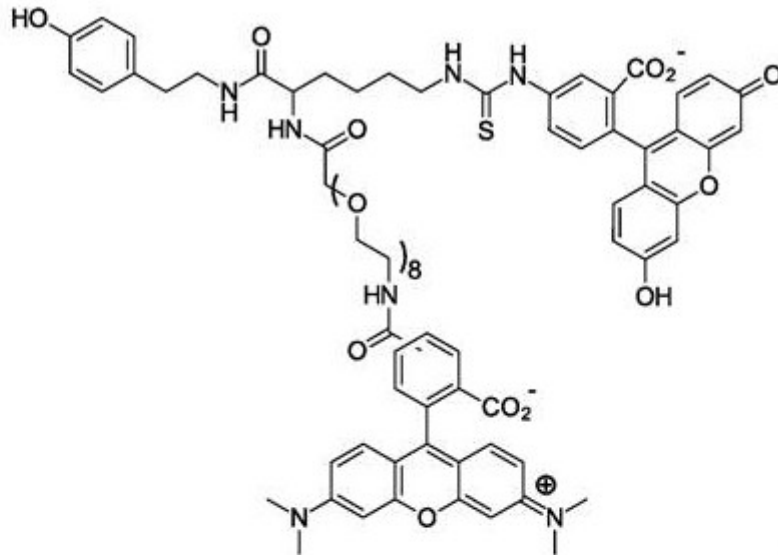
[0265] 根据式(I)的多染料缀合物的具体实例如下所示：



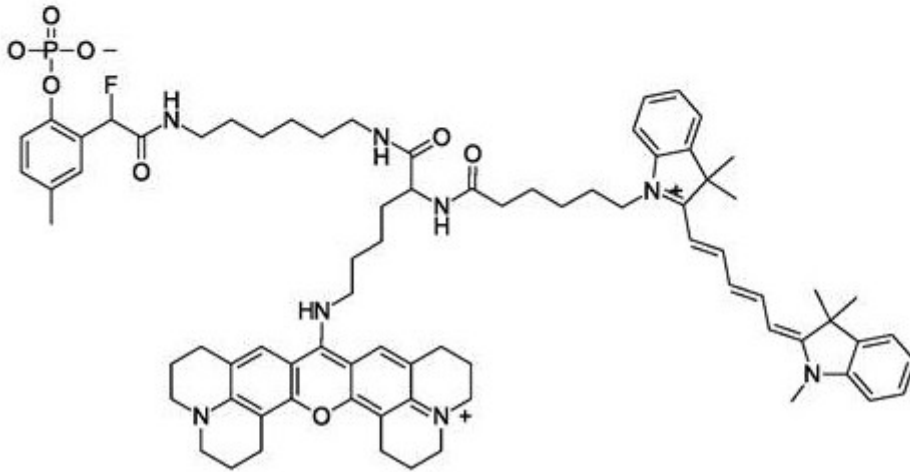
[0266]



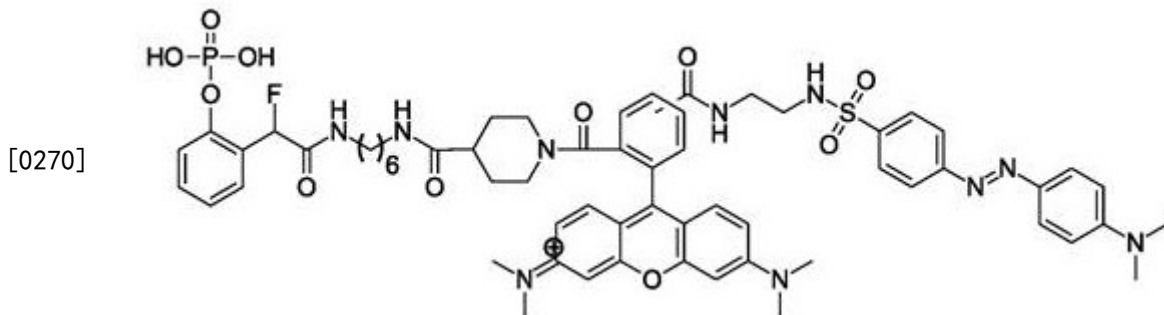




[0268]



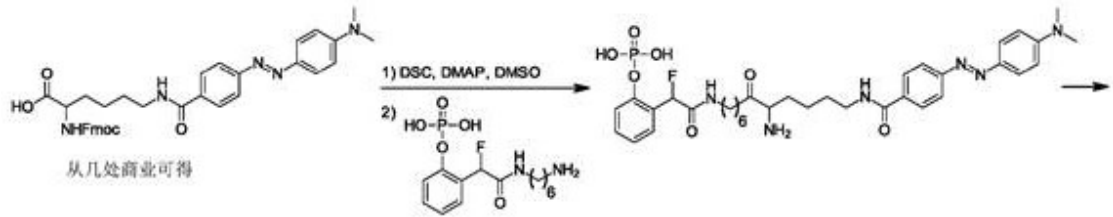
[0269] 或



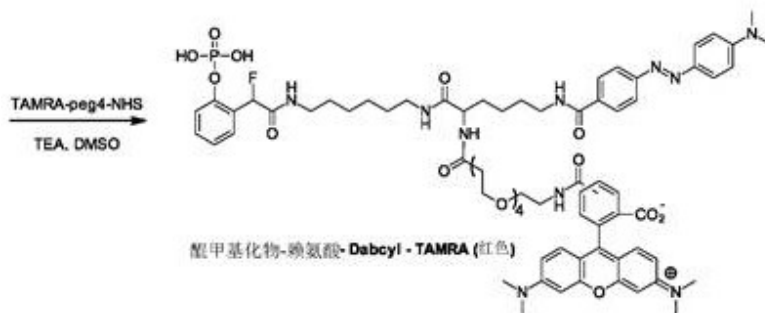
[0271] 多染料缀合物的合成

[0272] 本公开的多染料缀合物可以根据本领域普通技术人员已知的任何方式合成。通常,本公开的多染料缀合物可以通过将多官能接头或间隔子偶联至可检测部分和/或组织反应性部分来合成。技术人员将能够选择包含能够与彼此反应的官能团的合适的起始材料。例如,如果多官能接头包含未保护的胺,则技术人员将能够选择具有能够与胺反应的官能团(例如NHS-酯)的发色团。同样,如果多官能接头包含羧酸基团,则技术人员将能够选择具有能够与羧酸反应的官能团(例如胺)的部分。

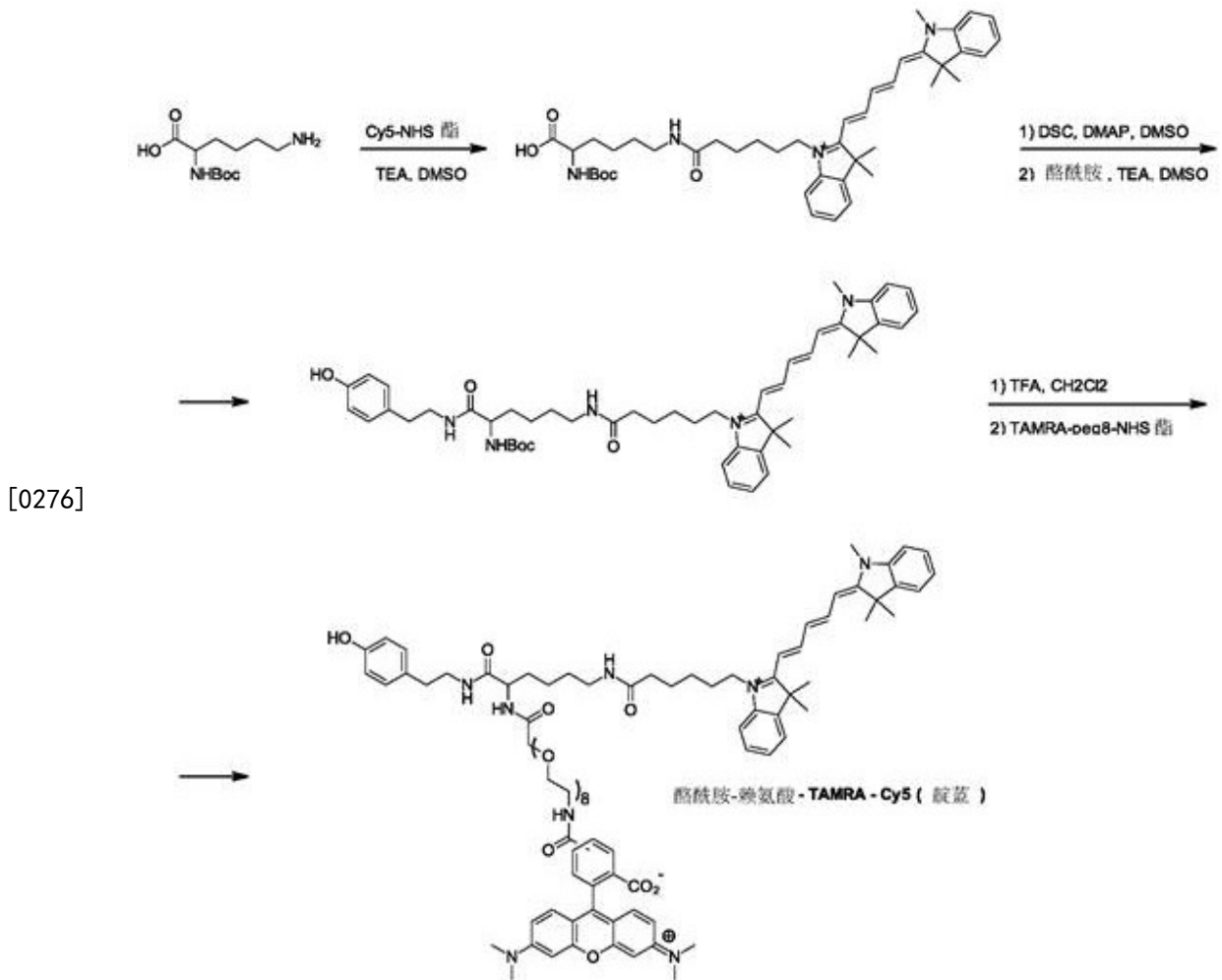
[0273] 在一些实施方案中, 首先将已经包含受保护的多官能接头部分的色原与醌甲基化物前体偶联, 以形成醌-甲基化物前体部分-第一色原缀合物。然后使醌-甲基化物前体部分-第一色原缀合物与第二色原反应, 以形成如下面的示意图中提供的相应的多染料缀合物。在该具体实例中, 所述多官能接头是赖氨酸。



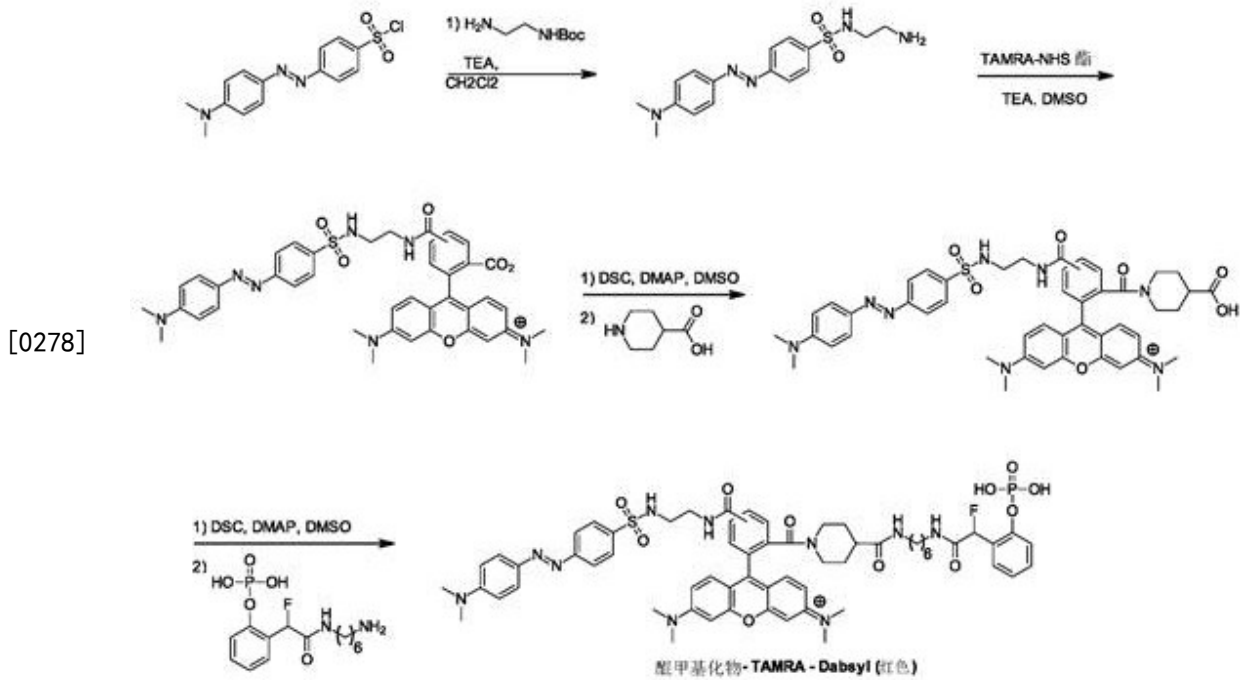
[0274]



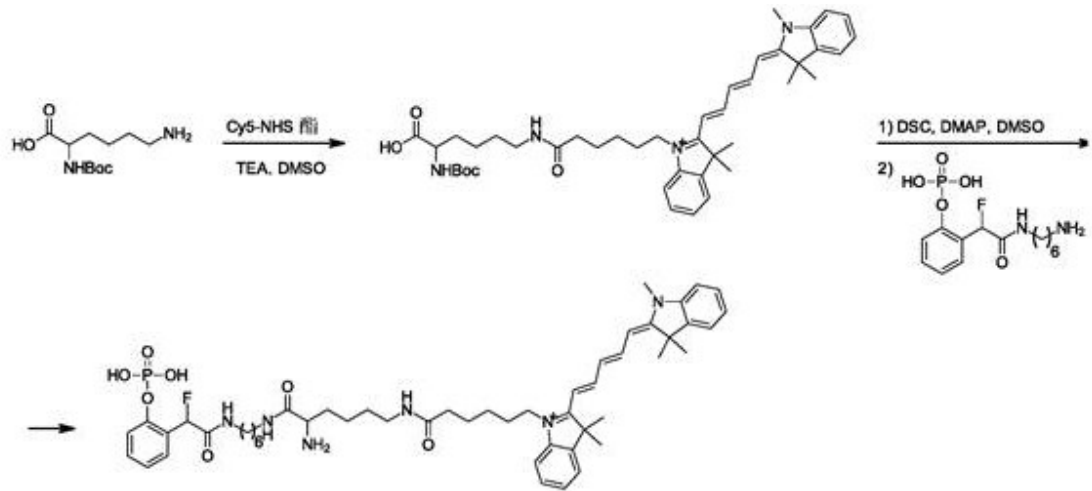
[0275] 或者, 首先使具有一个受保护的反应基团的多官能接头与适当官能色原反应, 以形成第一色原-接头缀合物。然后, 第一色原-接头缀合物可以与适当官能化的组织反应性部分反应, 以形成组织反应性部分-第一色原-接头缀合物。然后可以将组织反应性部分-第一色原-接头缀合物脱保护, 随后与适当官能化的第二色原反应, 以提供如下面的示意图中所说明的多染料缀合物。在该具体实例中, 所述多官能接头是受保护的赖氨酸, 且所述组织反应性部分是酞酰胺。技术人员将理解, 相同的反应条件可用于将替代的多官能接头与色原偶联。技术人员还将理解, 醌甲基化物前体衍生物可以取代酞酰胺。



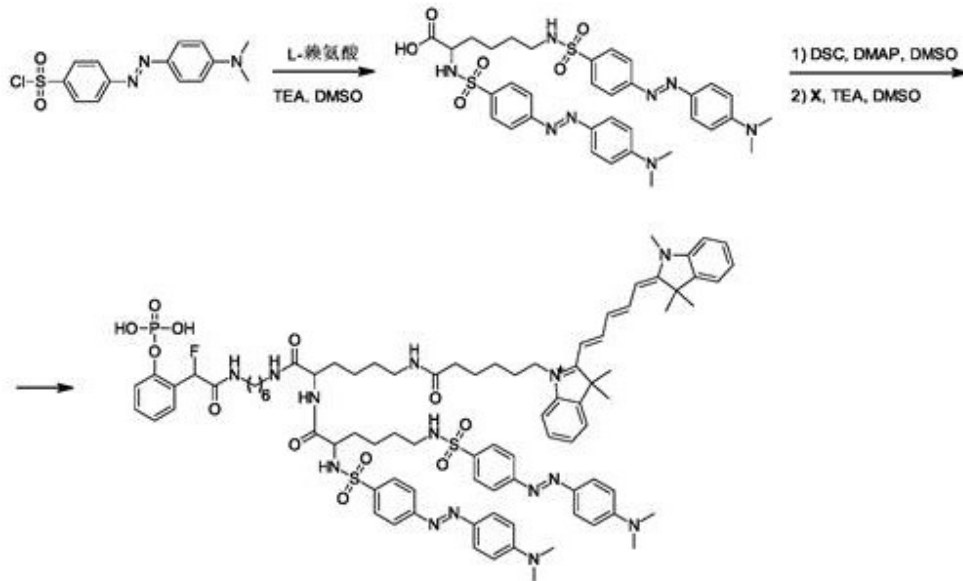
[0277] 在另一种替代合成方法中,将第一显色化合物与受保护的间隔子化合物(诸如 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$) 偶联,以形成色原和间隔子的缀合物。然后将色原和受保护的间隔子的缀合物脱保护并与第二色原偶联以形成第一双色原缀合物。然后使双色原缀合物与4-哌啶甲酸反应,以形成第二双色原缀合物。然后使第二双色原缀合物与适当官能化的组织反应性部分反应,以形成相应的多染料缀合物,如下面的示意图中所说明。



[0279] 下面的合成方法提供了将多于两个色原偶联至组织反应性部分的实例,并且作为在两个阶段中发生的汇集成成进行说明。在第一阶段中,受保护的多官能接头与适当官能化的色原反应以形成第一色原-接头缀合物(如以上实例中所说明)。然后,第一色原-接头缀合物可以与适当官能化的组织反应性部分反应,以形成组织反应性部分-第一色原-接头缀合物。在第二阶段中,将两个当量的相同色原(或两种不同色原各一个当量)偶联至多官能接头(例如赖氨酸)以形成双色原缀合物。然后使双色原缀合物与来自第一阶段的第一色原-接头缀合物反应,以提供包含三个色原的多染料缀合物。



[0280]



[0281] 方法

[0282] 本公开还提供了使用本文公开的多染料缀合物检测生物样品内的一种或多种靶标的方法。尽管本文中某些公开的实施方案、实施例或附图可以指在IHC测定中结合使用多染料缀合物，但技术人员将理解，多染料缀合物也可以用于原位杂交 (ISH) 测定或IHC和ISH测定的任何组合中。技术人员还将理解，多染料缀合物可以用于单纯测定和多重测定两者 (对于IHC和ISH两者) 中。

[0283] 在本文所述的实施方案中，利用检测试剂或检测试剂盒来标记 (例如用酶标记) 生物样品中的一种或多种靶标。例如，检测试剂盒可以包括第一组合物和第二组合物，所述第一组合物包含特异性结合部分 (例如抗体缀合物)，所述第二组合物包含对该第一组合物特异性的检测试剂，使得可以标记靶标。在一些实施方案中，所述检测试剂盒包括多于一种用于检测不同靶标的缀合物，其中每个试剂盒还包括对试剂盒内包括的每种缀合物特异性的检测试剂。

[0284] 在一些实施方案中，所述检测试剂是对特定靶标 (诸如本文进一步列举的那些靶标) 特异性的特异性结合部分。在一些实施方案中，所述特异性结合部分是一抗或一抗缀合物。在一些实施方案中，所述一抗缀合至可检测标记物，诸如半抗原。在其他实施方案中，所

述特异性结合部分是核酸探针,其中所述核酸探针缀合至可检测标记物,诸如半抗原。所述检测试剂还可以包括对特异性结合部分特异性且自身缀合至酶的二抗。合适的酶包括但不限于辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸酶或 β -内酰胺酶。在其他实施方案中,酶包括氧化还原酶或过氧化物酶(例如HRP)。所述二抗可以是抗-抗体的抗体(例如对特定一抗特异性)或抗-标记物抗体(例如对缀合至一抗或核酸探针的特定标记物特异性)。在一些实施方案中,所述二抗是抗-半抗原抗体。可以根据本领域普通技术人员已知的程序将一抗、一抗缀合物、二抗和/或核酸探针引入样品中,以实现用酶标记生物样品中的一种或多种靶标,且如本文所说明。

[0285] 参考图1,使含有一种或多种靶标的组织样品与对第一靶标特异性的第一特异性结合部分接触,以提供第一特异性结合部分-靶标复合物(步骤100)。在一些实施方案中,所述第一特异性结合部分是一抗或抗体缀合物(例如未修饰的抗体或缀合至可检测标记物、诸如半抗原的抗体)。在其他实施方案中,所述第一特异性结合部分是缀合至可检测标记物、诸如半抗原的核酸探针(即寡核苷酸探针)。随后,通过第一特异性结合部分,用第一酶标记第一特异性结合部分-靶标复合物(步骤110)。在一些实施方案中,靶标复合物的标记可以用二抗实现,所述二抗是抗-抗体的抗体(例如对一抗特异性的抗体,即抗-抗体的抗体)或抗-标记物抗体(例如抗-标记物抗体或抗-半抗原抗体),所述二抗缀合至酶(例如HRP、AP等)。然后使所述组织样品与第一多染料缀合物接触(步骤120),所述第一多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个可检测部分(例如至少两个色原)。在所述第一酶与所述第一多染料缀合物的组织反应性部分的部分相互作用后,第一可检测多染料复合物沉积在第一靶标附近或第一靶标上。最后,检测来自所述第一可检测多染料复合物的信号(例如明场显微术)(步骤130)。

[0286] 可以对样品内的任何数量的靶标重复上述过程。在一些实施方案中,可以引入酶失活组合物以基本上或完全失活来自任何上游步骤的任何酶。然后,所述组织样品可以与对第二靶标特异性的第二特异性结合部分接触,以提供第二特异性结合部分靶标复合物(步骤100)。随后,通过第二特异性结合部分,用第二酶标记第二特异性结合部分-靶标复合物(步骤110)。然后使所述组织样品与第二多染料缀合物接触(步骤120),所述第二多染料缀合物包含组织反应性部分和至少两个可检测部分(例如至少两个色原)。在一些实施方案中,来自所述第二多染料缀合物的至少两个可检测部分的波长之和不同于来自所述第一多染料缀合物的至少两个可检测部分的波长之和。在其他实施方案中,所述第二多染料缀合物的颜色不同于所述第一多染料缀合物的颜色。在所述第二酶与所述第二多染料缀合物的组织反应性部分的部分相互作用后,第二可检测多染料复合物沉积在第二靶标附近或第二靶标上。最后,检测来自所述第二可检测多染料复合物的信号(例如明场显微术)(步骤130)。

[0287] 可以重复上文指出的步骤以检测生物样品内的第三、第四或第n靶标,其中第三、第四或第n多染料缀合物各自包含不同的颜色。技术人员还将理解,尽管上文指出的步骤利用多染料缀合物,但可以互换地利用仅偶联至单个可检测部分的TSA或QMSA缀合物。例如,第一靶标可以用具有单一色原的第一TSA-缀合物或具有单一色原的第一QMSA-缀合物染色;第二靶标可以用式(I)的多染料缀合物染色;且第三靶标可以用具有单一色原的第二TSA-缀合物或具有单一色原的第二QMSA-缀合物染色。

[0288] 有利地,对于刚刚描述的方法,所述第一酶和所述第二酶是不同的酶。例如,所述第一酶可以是磷酸酶或磷酸二酯酶,且所述第二酶可以是过氧化物酶。在某些实施方案中,所述第一酶是碱性磷酸酶,且所述第二酶是辣根过氧化物酶。还有利地,所述第一酶不与所述第二多染料缀合物相互作用以形成靠近所述第一靶标的第二可检测多染料复合物,且同样地,所述第二酶不与所述第一多染料缀合物相互作用以形成靠近所述第二靶标的第一可检测多染料复合物。

[0289] 技术人员将理解,图1中所说明的步骤可以依次地(或连续地)或基本上同时地进行。例如,所述组织样品可以在步骤100与两个特异性结合部分同时接触(其中每个特异性结合部分对特定靶标是特异性的);且然后每个特异性结合部分-靶标复合物在步骤110用不同的酶同时标记。在这些实施方案中,在步骤100或110使用的任一试剂可以作为试剂的“合并物”或“混合物”提供。或者,可以沉积第一特异性结合部分(步骤100),随后标记该第一特异性结合部分-靶标复合物(步骤110)。在引入任何多染料缀合物前,步骤100和110可以连续重复任何次数。随后,然后可以使具有多种酶标记的靶标复合物的组织样品与多种多染料缀合物接触。

[0290] 参考图2,首先将检测探针15引入具有靶标5的组织样品以形成靶标-检测探针复合物。在一些实施方案中,所述检测探针15是一抗。随后,将标记缀合物25引入所述组织样品,所述标记缀合物25包含至少一种与其缀合的酶。在描绘的实施方案中,所述标记缀合物是二抗,其中所述二抗是缀合至酶的抗物种抗体。接下来,引入多染料缀合物10。在酶与多染料缀合物10相互作用后,所述多染料缀合物经历结构、构象或电子变化20以形成组织反应性中间体30。在该具体实施方案中,所述多染料缀合物包含醌甲基化物前体部分,其在与碱性磷酸酶相互作用后引起氟离去基团被逐出,产生相应的醌甲基化物中间体30。然后,所述醌甲基化物中间体30与组织附近或直接在组织上形成共价键,以形成可检测多染料复合物40。然后可以根据本领域普通技术人员已知的方法检测来自所述多染料复合物40的缀合发色团的信号。

[0291] 参考图3,首先将检测探针55引入具有靶标50的组织样品以形成靶标-检测探针复合物。在一些实施方案中,所述检测探针55是一抗。随后,将标记缀合物60引入所述组织样品,所述标记缀合物60包含至少一种与其缀合的酶。在描绘的实施方案中,所述标记缀合物是二抗,其中所述二抗是缀合至酶的抗物种抗体。接下来,引入多染料缀合物70。在酶与多染料缀合物70相互作用后,形成组织反应性中间体80。在该具体实施方案中,所述多染料缀合物70包含酪酰胺部分,其在与辣根过氧化物酶相互作用后引起自由基物质80的形成。然后,所述自由基中间体80与组织附近或直接在组织上形成共价键,以形成可检测多染料复合物90。然后可以根据本领域普通技术人员已知的方法检测来自所述多染料复合物90的缀合发色团的信号。

[0292] 在一些实施方案中,所述生物样品用酶失活组合物预处理以使内源性过氧化物酶活性基本上或完全失活。例如,一些细胞或组织含有内源性过氧化物酶。使用HRP缀合的抗体可以导致高的、非特异性背景染色。可以通过用如本文公开的酶失活组合物预处理样品来减少该非特异性背景。在一些实施方案中,所述样品仅用过氧化氢(适当的预处理溶液的约1重量%至约3重量%)预处理以降低内源性过氧化物酶活性。一旦内源性过氧化物酶活性已经减少或失活,可以添加检测试剂盒,随后失活如上文所提供的检测试剂盒中存在的

酶。公开的酶失活组合物和方法也可以用作失活内源性酶过氧化物酶活性的方法。

[0293] 在一些实施方案中,如果样本是嵌入石蜡中的样品,则可以使用适当的脱蜡流体将样品脱蜡。在废物去除剂去除脱蜡流体后,可以连续地向样本应用任何数目的物质。所述物质可以用于预处理(例如蛋白-交联,暴露核酸等),变性,杂交,洗涤(例如严格洗涤),检测(例如将视觉或标记分子连接至探针),扩增(例如扩增蛋白,基因等),复染,盖玻片等。

[0294] 自动化

[0295] 本公开的测定和方法可以是自动化的并且可以与样本处理设备组合。所述样本处理设备可以是自动化设备,诸如由Ventana Medical Systems, Inc.销售的BENCHMARK XT仪器和DISCOVERY XT仪器。Ventana Medical Systems, Inc.是公开用于进行自动化分析的系统和方法的许多美国专利的受让人,包括美国专利号5,650,327、5,654,200、6,296,809、6,352,861、6,827,901和6,943,029以及美国公开专利申请号20030211630和20040052685,其各自以其整体通过引用并入本文。或者,可以手动处理样本。

[0296] 所述样本处理设备可以将固定剂应用于样本。固定剂可包括交联剂(诸如醛,例如甲醛、多聚甲醛和戊二醛,以及非醛类交联剂)、氧化剂(例如,金属离子和络合物诸如四氧化锇和铬酸)、蛋白质变性剂(例如,乙酸、甲醇和乙醇)、机制未知的固定剂(例如氯化汞、丙酮和苦味酸)、组合试剂(例如卡诺固定剂、甲氧基乙酰苯胺(methacarn)、布安液、B5固定剂、罗斯曼氏液和让德尔氏液)、微波和混合固定剂(例如,排除体积固定和蒸气固定)。

[0297] 如果样本是包埋在石蜡中的样品,则可以用样本处理设备使用适当的脱蜡流体将样品脱蜡。在废物去除剂去除脱蜡流体后,可以连续地向样本应用任何数目的物质。所述物质可以用于预处理(例如,蛋白-交联,暴露核酸等),变性,杂交,洗涤(例如,严格洗涤),检测(如将视觉或标记分子连接至探针),扩增(例如扩增蛋白,基因等),复染,盖玻片等。

[0298] 样本处理设备可以将宽范围的物质应用于样本。所述物质包括但不限于染色剂、探针、试剂、漂洗剂和/或调理剂。所述物质可以是流体(例如,气体、液体或气体/液体混合物)等。所述流体可以是溶剂(例如极性溶剂、非极性溶剂等)、溶液(例如水溶液或其他类型的溶液)等。试剂可以包括但不限于,染色剂、润湿剂、抗体(例如单克隆抗体、多克隆抗体等)、抗原回收流体(例如基于水性或非水性的抗原修复溶液、抗原回收缓冲液等)等。探针可以是分离的核酸或分离的合成寡核苷酸,其附接至可检测的标记物。标记物可以包括放射性同位素、酶底物、辅因子、配体、化学发光或荧光试剂、半抗原和酶。

[0299] 在处理样本之后,用户可以将携带样本的载片输送至成像设备。此处使用的成像设备是明场成像仪载片扫描仪。一种明场成像仪是由Ventana Medical Systems, Inc.销售的iScan Coreo™明场扫描仪。在自动化实施方案中,成像设备是如标题为IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUES的国际专利申请号:PCT/US2010/002772(专利公开号:WO/2011/049608)中公开或2014年2月3日提交的标题为IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME的美国专利申请公开号2014/0178169中公开的数字病理学装置。国际专利申请号PCT/US2010/002772和美国专利申请公开号2014/0178169以其整体通过引用并入。在其他实施方案中,所述成像设备包括偶联至显微镜的数字相机。

[0300] 复染

[0301] 复染是在样品已经用试剂染色以检测一种或多种靶标之后进行后处理、使得它们的结构可更容易地在显微镜下被观察到的方法。例如,在盖上盖玻片之前任选使用复染剂

以使得免疫组织化学染色剂更加清晰。复染剂的颜色与初始染色剂不同。众多复染剂是众所周知的,诸如苏木精、伊红、甲基绿、亚甲蓝、姬姆萨染料、阿辛蓝和核固红。DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吡啶)是可以使用的荧光染料。

[0302] 在一些实例中,多于一种染色剂可以混合在一起以产生复染剂。这提供了灵活性以及选择染色剂的能力。例如,可以对混合物选择具有特定属性、但还不具有不同的期望属性的第一染色剂。可向混合物中添加第二染色剂,其显示出缺少的期望属性。例如,甲苯胺蓝、DAPI和溴胺天蓝可以混合在一起以形成复染剂。

[0303] 检测和/或成像

[0304] 公开的实施方案的某些方面或全部方面可以通过计算机分析和/或图像分析系统而自动化且得到促进。在一些应用中,测量精确的颜色或荧光比率。在某些实施方案中,光显微术用于图像分析。某些公开的实施方案涉及获取数字图像。这可通过将数字照相机与显微镜联用来完成。使用图像分析软件来分析染色样品所获得的数字图像。颜色或荧光可以以数种不同方式来测量。例如,颜色可测量为红色、蓝色和绿色值;色调、饱和度和强度值;和/或使用光谱成像照相机来测量特定波长或者波长范围。也可定性和半定量评估该样品。定性评价包括评价染色强度、鉴定阳性染色的细胞和在染色中涉及的细胞内区室以及评估总体样品或者载片品质。在测试样品上进行分开的评估,且该分析可包括与已知的平均值进行比较以确定所述样品是否呈现异常状态。

[0305] 试剂盒

[0306] 在一些实施方案中是试剂盒或组合物,其包含(1)包含组织反应性部分和至少两个发色团的多染料缀合物,其中所述组织反应性部分选自醌甲基化物前体或酪酰胺,且其中所述至少两个发色团是不同的;和(2)对特定靶标特异性的特异性结合部分。在一些实施方案中,所述特异性结合部分是对靶标特异性的一抗。在其他实施方案中,所述特异性结合部分是对靶标特异性的核酸探针。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含抗-抗体的抗体(抗-物种抗体)或抗-标记物抗体,其中所述抗-抗体的抗体或所述抗-标记物抗体缀合至酶,且其中所述抗-抗体的抗体或所述抗-标记物抗体对试剂盒/组合物的一抗或缀合至一抗的标记物或试剂盒/组合物的核酸探针是特异性的。

[0307] 当然,任何试剂盒可以包括其他试剂,包括缓冲剂;复染剂;酶失活组合物;脱蜡溶液等,如用于手动或自动化靶标检测所需的。所述试剂盒还可以包括用于使用试剂盒的任何组分的说明书,包括将试剂盒组分应用于组织样品以实现其中的一种或多种靶标的检测的方法。

[0308] 样品和靶标

[0309] 样品包括生物学组分且通常怀疑包括一种或者多种目标靶标分子。靶标分子可以位于细胞表面上且细胞可在混悬液或者在组织切片中。靶标分子也可在细胞内且在细胞裂解或者细胞经探针渗透之后来检测。本领域普通技术人员将认识到检测样品中靶标分子的方法将取决于使用的样品和探针的类型而改变。收集和制备样品的方法是本领域已知的。

[0310] 在所述方法的实施方式中且与本文公开的组合物一起使用的样品诸如组织或者其他生物样品可由普通技术人员使用本领域已知的任何方法来制备。可以从用于常规筛选的受试者或从被怀疑具有病症,诸如遗传异常、感染或瘤形成的受试者获得样品。公开的方法的所描述的实施方案也可以应用于被称为“正常”样品的不具有遗传异常、疾病、病症等

的样品。此类正常样品可用作(除了别的之外)用于与其他样品比较的对照。样品可针对许多不同目的来分析。例如,样品可用于科学研究或用于诊断可疑疾病,或用于作用于治疗成功、存活等的预后指标。

[0311] 样品可包括可由探针或报告子分子特异性结合的多种靶标。所述靶标可以是核酸序列或蛋白。当涉及靶标蛋白时,在本公开通篇应当理解的是与该蛋白相关的核酸序列也可用作靶标。在一些实例中,所述靶标是蛋白或核酸分子,其来自病原体诸如病毒、细菌或细胞内寄生物,诸如来自病毒基因组。例如,靶标蛋白可由与疾病相关(例如,与其相关、有因果关系等)的靶标核酸序列产生。

[0312] 靶标核酸序列可在尺寸上实质性改变。非限制地,所述核酸序列可具有可变数目的核酸残基。例如,靶标核酸序列可具有至少约10个核酸残基,或至少约20、30、50、100、150、500、1000个残基。类似地,靶标多肽可在尺寸上实质性改变。非无限制地,所述靶标多肽将包含至少一个表位,其结合肽特异性抗体或者其片段。在一些实施方案中,该多肽可包含至少两个表位,其结合肽特异性抗体或者其片段。

[0313] 在具体的非限制性实例中,靶标蛋白由与赘生物(例如,癌症)相关的靶标核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)产生。已经在赘生细胞中鉴定出许多染色体异常(包括易位和其他重排、扩增或者缺失),特别是在癌细胞诸如B细胞和T细胞白血病、淋巴瘤、乳腺癌、结肠癌、神经学癌症等中。因此,在一些实例中,至少部分的靶标分子由在样品中至少一种细胞子集中扩增或缺失的核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)产生。

[0314] 已知致癌基因是几种人类恶性肿瘤的原因。例如,涉及位于染色体18q11.2的断裂点区的SYT基因的染色体重排在滑膜肉瘤软组织肿瘤中是常见的。可例如使用具有不同标记物的探针来鉴定t(18q11.2)易位:第一探针包括由从SYT基因向远端伸展的靶标核酸序列产生的FPC核酸分子,且第二探针包括由向SYT基因3'或近端伸展的靶标核酸序列产生的FPC核酸。当对应于这些靶标核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)的探针用于原位杂交程序中时,在SYT基因区缺失t(18q11.2)的正常细胞显示出两个融合(由邻近的两个标记物生成)信号,反映出SYT的两个完整拷贝。具有t(18q11.2)的异常细胞显示出单一的融合信号。

[0315] 在其他实例中,选择由核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)产生的靶标蛋白质,所述核酸序列为在恶性细胞中缺失(丢失)的肿瘤抑制基因。例如,位于染色体9p21的p16区(包括D9S1749、D9S1747、p16(INK4A)、p14(ARF)、D9S1748、p15(INK4B)和D9S1752)在某些膀胱癌中缺失。涉及染色体1的短臂的远端区(包括例如,SHGC57243、TP73、EGFL3、ABL2、ANGPTL1和SHGC-1322)以及染色体19的着丝粒周围(pericentromeric)区(例如19p13-19q13)(包括例如,MAN2B1、ZNF443、ZNF44、CRX、GLTSCR2和GLTSCR1)的染色体缺失是中枢神经系统的某些类型的实体瘤的特征性分子特征。

[0316] 提供前面提及的实例以仅用于说明的目的且不意在进行限制。与赘生转化和/或生长相关的许多其他细胞遗传异常是本领域普通技术人员已知的。由核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)产生的靶标蛋白(已经与赘生转化相关且可用于公开的方法)也包括EGFR基因(7p12; 例如,GENBANK™ 登记号NC-000007,核苷酸55054219-55242525),C-MYC基因(8q24.21; 例如,GENBANK™ 登记号NC-000008,核苷酸128817498-128822856),D5S271(5p15.2),脂蛋白脂肪酶(LPL)基因(8p22; 例如,GENBANK™ 登记号NC-000008,核苷酸19841058-19869049),RB1(13q14; 例如,GENBANK™ 登记号NC-000013,核苷酸47775912-

47954023), p53 (17p13.1; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000017, 互补序列, 核苷酸7512464-7531642), N-MYC (2p24; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000002, 互补序列, 核苷酸151835231-151854620), CHOP (12q13; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000012, 互补序列, 核苷酸56196638-56200567), FUS (16p11.2; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000016, 核苷酸31098954-31110601), FKHR (13p14; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000013, 互补序列, 核苷酸40027817-40138734), 以及, 例如: ALK (2p23; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000002, 互补序列, 核苷酸29269144-29997936), Ig重链; CCND1 (11q13; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000011, 核苷酸69165054.69178423), BCL2 (18q21.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000018, 互补序列, 核苷酸58941559-59137593), BCL6 (3q27; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000003, 互补序列, 核苷酸188921859-188946169), MALF1, AP1 (1p32-p31; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000001, 互补序列, 核苷酸59019051-59022373), TOP2A (17q21-q22; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000017, 互补序列, 核苷酸35798321-35827695), TMPRSS (21q22.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000021, 互补序列, 核苷酸41758351-41801948), ERG (21q22.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000021, 互补序列, 核苷酸38675671-38955488); ETV1 (7p21.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000007, 互补序列, 核苷酸13897379-13995289), EWS (22q12.2; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000022, 核苷酸27994271-28026505); FLI1 (11q24.1-q24.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000011, 核苷酸128069199-128187521), PAX3 (2q35-q37; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000002, 互补序列, 核苷酸222772851-222871944), PAX7 (1p36.2-p36.12; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000001, 核苷酸18830087-18935219), PTEN (10q23.3; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000010, 核苷酸89613175-89716382), AKT2 (19q13.1-q13.2; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000019, 互补序列, 核苷酸45431556-45483036), MYCL1 (1p34.2; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000001, 互补序列, 核苷酸40133685-40140274), REL (2p13-p12; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000002, 核苷酸60962256-61003682) 和 CSF1R (5q33-q35; 例如, GENBANK™ 登记号NC-000005, 互补序列, 核苷酸149413051-149473128)。

[0317] 在其他实例中, 靶标蛋白选自与疾病或病况相关的病毒或者其他微生物。在细胞或者组织样品中的病毒或微生物来源的靶标核酸序列(例如, 基因组靶标核酸序列)的检出指示生物体的存在。例如, 靶标肽、多肽或蛋白可选自致癌或致病性病毒、细菌或细胞内寄生虫(诸如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)和其他疟原虫属物种、利什曼原虫属(种)、小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)、痢疾内变形虫(*Entamoeba histolytica*)和蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)以及弓形虫属、艾美球虫属、泰勒虫属和巴贝西虫属物种)的基因组。

[0318] 在一些实例中, 靶标蛋白由来自病毒基因组的核酸序列(例如基因组靶标核酸序列)产生。示例性病毒和相应的基因组序列(括号内为GENBANK™ RefSeq登记号)包括人腺病毒A (NC_001460)、人腺病毒B (NC_004001)、人腺病毒C (NC_001405)、人腺病毒D (NC_002067)、人腺病毒E (NC_003266)、人腺病毒F (NC_001454)、人星形病毒(NC_001943)、人BK多瘤病毒(V01109; GI:60851)、人博卡病毒(NC_007455)、人冠状病毒229E (NC_002645)、人冠状病毒HKU1 (NC_006577)、人冠状病毒NL63 (NC_005831)、人冠状病毒OC43 (NC_005147)、人肠病毒A (NC_001612)、人肠病毒B (NC_001472)、人肠病毒C (NC_001428)、人肠病毒D (NC_001430)、人红细胞病毒V9 (NC_004295)、人泡沫病毒(NC_001736)、人疱疹病

毒1 (单纯疱疹病毒类型1) (NC_001806)、人疱疹病毒2 (单纯疱疹病毒类型2) (NC_001798)、人疱疹病毒3 (水痘带状疱疹病毒) (NC_001348)、人疱疹病毒4类型1 (EB病毒类型1) (NC_007605)、人疱疹病毒4类型2 (EB病毒类型2) (NC_009334)、人疱疹病毒5株AD169 (NC_001347)、人疱疹病毒5株Merlin株 (NC_006273)、人疱疹病毒6A (NC_001664)、人疱疹病毒6B (NC_000898)、人疱疹病毒7 (NC_001716)、人疱疹病毒8类型M (NC_003409)、人疱疹病毒8类型P (NC_009333)、人免疫缺陷病毒1 (NC_001802)、人免疫缺陷病毒2 (NC_001722)、人偏肺病毒 (NC_004148)、人乳头瘤病毒-1 (NC_001356)、人乳头瘤病毒-18 (NC_001357)、人乳头瘤病毒-2 (NC_001352)、人乳头瘤病毒-54 (NC_001676)、人乳头瘤病毒-61 (NC_001694)、人乳头瘤病毒-cand90 (NC_004104)、人乳头瘤病毒RTRX7 (NC_004761)、人乳头瘤病毒类型10 (NC_001576)、人乳头瘤病毒类型101 (NC_008189)、人乳头瘤病毒类型103 (NC_008188)、人乳头瘤病毒类型107 (NC_009239)、人乳头瘤病毒类型16 (NC_001526)、人乳头瘤病毒类型24 (NC_001683)、人乳头瘤病毒类型26 (NC_001583)、人乳头瘤病毒类型32 (NC_001586)、人乳头瘤病毒类型34 (NC_001587)、人乳头瘤病毒类型4 (NC_001457)、人乳头瘤病毒类型41 (NC_001354)、人乳头瘤病毒类型48 (NC_001690)、人乳头瘤病毒类型49 (NC_001591)、人乳头瘤病毒类型5 (NC_001531)、人乳头瘤病毒类型50 (NC_001691)、人乳头瘤病毒类型53 (NC_001593)、人乳头瘤病毒类型60 (NC_001693)、人乳头瘤病毒类型63 (NC_001458)、人乳头瘤病毒类型6b (NC_001355)、人乳头瘤病毒类型7 (NC_001595)、人乳头瘤病毒类型71 (NC_002644)、人乳头瘤病毒类型9 (NC_001596)、人乳头瘤病毒类型92 (NC_004500)、人乳头瘤病毒类型96 (NC_005134)、人副流感病毒1 (NC_003461)、人副流感病毒2 (NC_003443)、人副流感病毒3 (NC_001796)、人双埃可病毒 (NC_001897)、人细小病毒4 (NC_007018)、人细小病毒B19 (NC_000883)、人呼吸道合胞病毒 (NC_001781)、人鼻病毒A (NC_001617)、人鼻病毒B (NC_001490)、人泡沫反转录病毒 (NC_001795)、人嗜T淋巴细胞病毒1 (NC_001436)、人嗜T淋巴细胞病毒2 (NC_001488)。

[0319] 在某些实例中,靶标蛋白由来自致癌病毒诸如EB病毒 (EBV) 或人乳头瘤病毒 (HPV, 例如HPV16、HPV18) 的核酸序列 (例如基因组靶标核酸序列) 产生。在其他实例中,由核酸序列 (例如基因组靶标核酸序列) 产生的靶标蛋白来自致病性病毒,诸如呼吸道合胞病毒、肝炎病毒 (例如丙型肝炎病毒)、冠状病毒 (例如SARS病毒)、腺病毒、多瘤病毒、巨细胞病毒 (CMV) 或者单纯疱疹病毒 (HSV)。

实施例

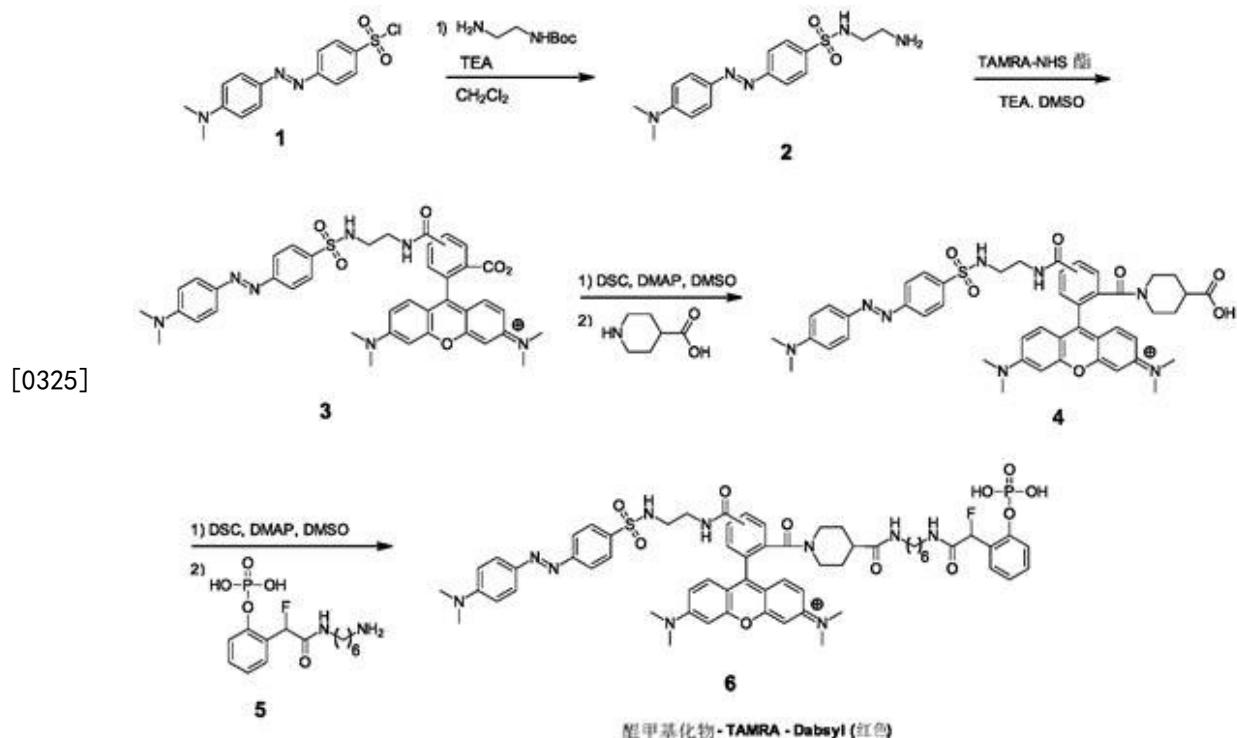
[0320] 通过使用双重染料缀合物可得的色原的调色板据信有助于高对比度多重测定。在一些实施方案中,生成的颜色易于与彼此以及与复染剂区分。这些双重染料色原可用于多重IHC测定中,例如:PD-L1/CD8、PD1/CD8、CD3/CD8、CD4/CD8、PD-L1/CD8/FoxP3 (跨多种组织类型的免疫概况分析); TTF1和P40 (肺中鳞状和腺癌的分层); E-钙粘蛋白和P-120 (鉴定乳房中的小叶相比于导管病变); 和P540s/高分子量细胞角蛋白 (鉴定前列腺中的腺癌和正常腺体)。双重染料色原可以应用于多重ISH测定中,用于鉴定基因融合、缺失和/或易位 (经由分开或分裂信号ISH测定)。实例包括肺中的ALK、ROS1、RET重排; 肺中的TMPRSS2-ERG融合; 和淋巴瘤中的BCL2易位。

[0321] 实施例1- 酰甲基化物-TAMRA- Dabsyl多染料缀合物

[0322] 醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物包含两个发色团,即TAMRA发色团和Dabsyl发色团。尽管单独的TAMRA产生品红色且单独的Dabsyl产生黄色,但多染料缀合物产生红色。

[0323] 在测定中使用醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物来染色扁桃体组织中的CD8标志物。首先将组织脱蜡并修复抗原(细胞调节1, CC1, VMSI #950-124)约64分钟。然后应用兔抗Ki-67抗体并孵育(37°C,约16分钟)。随后洗涤,然后与第二山羊多克隆抗兔,碱性磷酸酶缀合物孵育(37°C;约12分钟)。与AP缀合物孵育之后,将载片用盐水柠檬酸钠缓冲液(SSC, VMSI #950-110)洗涤。200 μ L 0.5 M tris溶液(pH 10.0)和100 μ L溶解于10 mM甘氨酸缓冲液(pH 2.0)中的100至500 μ M醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物的共孵育进行约32分钟。将染色的组织切片用改良的Mayer's苏木精复染(37°C;约4分钟),且然后与发蓝试剂一起孵育(37°C;约4分钟)。然后将载片通过分级乙醇系列脱水,用二甲苯透化,并手动盖上盖片。如图4中所示,醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物将CD8靶标染成红色。

[0324] 本实施例的醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物包含偶联至两种色原的醌甲基化物前体部分。在这里,两种色原以线性排列提供,即TAMRA充当将Dabsyl偶联至缀合物的支架。通过以下方法形成醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物(中间体的编号在方案1中说明):



[0326] 方案1-醌甲基化物-TAMRA-Dabsyl多染料缀合物的合成。

[0327] 向搅拌的N-boc-乙二胺(49 mg, 0.46 mmol)和三乙胺(47 mg, 0.46 mmol)于干燥 CH_2Cl_2 (5 mL)中的溶液中添加dabsyl氯化物1(100 mg, 0.31 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时,此时通过HPLC显示反应完成。在减压下除去溶剂,并将所得粘性油状物与甲苯(3 x 5 mL)共沸。添加TFA: CH_2Cl_2 的1:1混合物(5 mL),并将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后在减压下除去溶剂。将所得粘性油状物与甲苯(3 x 5 mL)共沸。然后,将包含

中间体2的所得粘性油状物溶解于DMSO (3 mL)中,并添加三乙胺(49 mg, 0.46 mmol)。然后添加TAMRA-NHS酯(179 mg, 0.34 mmol),并将所得混合物在室温下搅拌约2小时。将反应混合物用MeOH (2 mL)稀释,并将混合物通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05% TFA, 在H₂O:ACN 95:5至5:95中,经约40分钟)直接纯化,以得到作为红色固体的dabsyl-TAMRA缀合物3 (145 mg, 62 %产率)。MS (ESI) m/z (M+H)⁺, C₄₁H₄₂N₇O₆S⁺的计算值760.3,实测值760.1。

[0328] 将缀合物3 (145 mg, 0.19 mmol)溶解于DMSO (3 mL)中,随后添加DMAP (23 mg, 0.19 mmol)和DSC (49 mg, 0.19 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后第二次添加DMAP (23 mg, 0.19 mmol)和DSC (49 mg, 0.19 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后第三次添加DMAP (23 mg, 0.19 mmol)和DSC (49 mg, 0.19 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后添加4-吡啶甲酸(123 mg, 0.96 mmol)和三乙胺(97 mg, 0.96 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后用MeOH (2 mL)稀释,并通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05% TFA, 在H₂O:ACN 95:5至5:95中,经40分钟)直接纯化,以得到作为红色固体的dabsyl-TAMRA缀合物4 (90 mg, 54%产率)。MS (ESI) m/z (M+H)⁺, C₄₇H₅₁N₈O₇S⁺的计算值871.4,实测值871.2。

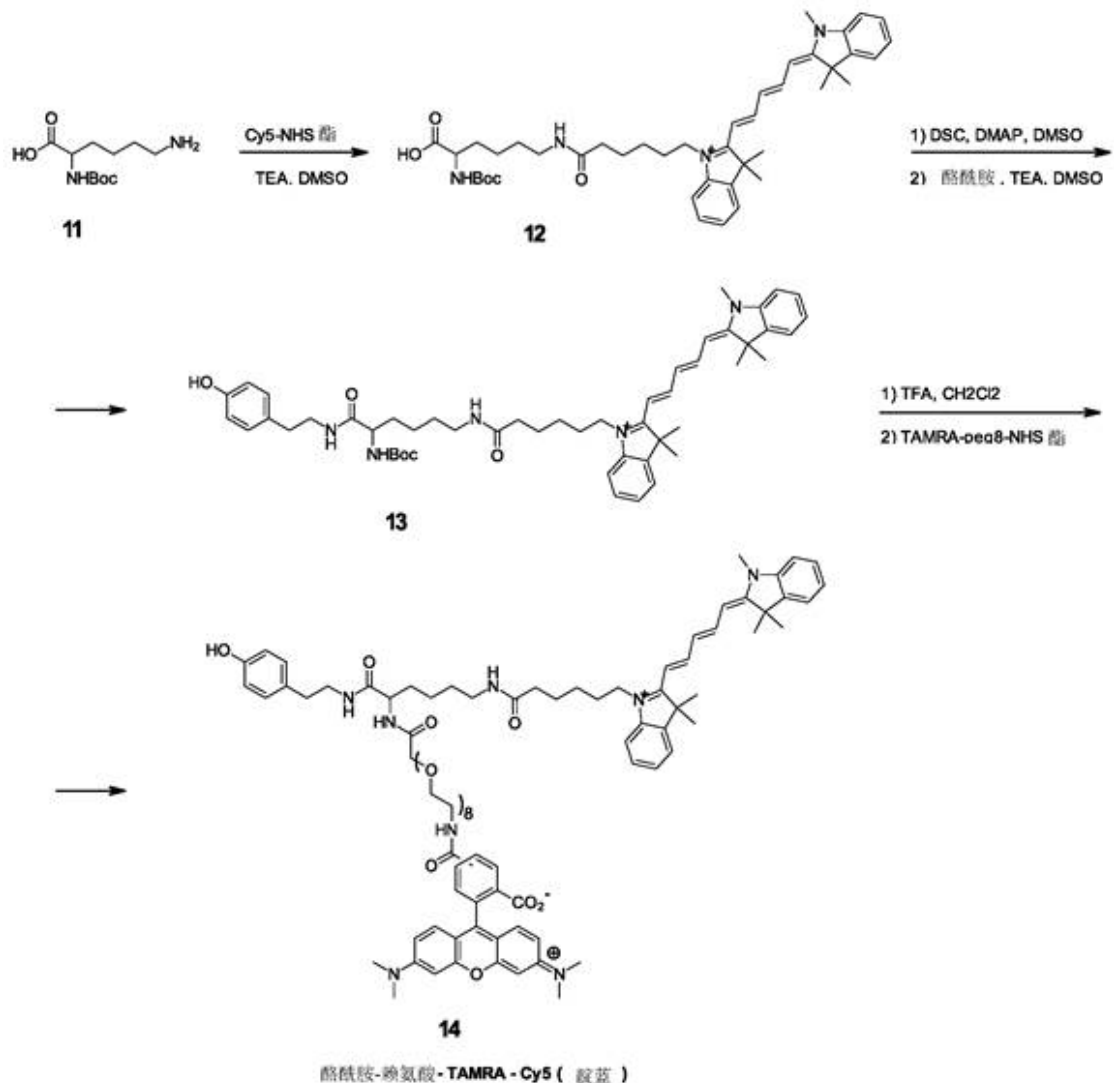
[0329] 将化合物4 (90 mg, 0.10 mmol)溶解于DMSO (3 mL)中,随后添加DMAP (13 mg, 0.10 mmol)和DSC (29 mg, 0.11 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后添加化合物5 (39 mg, 0.11 mmol)和三乙胺(31 mg, 0.31 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后用MeOH (2 mL)稀释,并通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05% TFA, 在H₂O:ACN 95:5至5:95中,经40分钟)直接纯化,以得到作为红色固体的dabsyl-TAMRA缀合物6 (85 mg, 69%产率)。MS (ESI) m/z (M+2H)²⁺, C₆₁H₇₁FN₁₀O₁₁PS²⁺的计算值601.3,实测值601.0。

[0330] 实施例2- 酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物

[0331] 酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物包含两个发色团,即TAMRA发色团和Cy5发色团。尽管单独的TAMRA产生品红色且单独的Cy5产生青色,但多染料缀合物产生紫罗兰色。

[0332] 在测定中使用酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物来染色扁桃体组织中的Ki67标志物。首先将组织脱蜡并用CC1修复抗原64分钟。通过与1% H₂O₂溶液孵育4分钟来使内源性过氧化物酶失活。应用兔抗Ki-67抗体并孵育(37°C, 16分钟)。随后洗涤,然后与第二山羊多克隆抗兔,辣根过氧化物酶缀合物孵育(37°C; 8分钟)。在与HRP缀合物孵育之后,将200 μL约0.1至约1 mM的酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物的溶液和100 μL 0.1% H₂O₂溶液共孵育约32分钟。将染色的组织切片用改良的Mayer's苏木精复染(37°C; 约4分钟),且然后与发蓝试剂一起孵育(37°C; 约4分钟)。然后将载片通过分级乙醇系列脱水,用二甲苯透化,并手动盖上盖片。如图5中所示,酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物将CD8靶标染成紫罗兰色。

[0333] 本实施例的酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物包含偶联至两个色原的酪酰胺部分。在这里,两个色原以“分支”排列提供,使用接头(在此为赖氨酸),用于将两个色原偶联至酪酰胺部分。通过以下方法形成酪酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物(中间体的任何编号在方案2中说明):



[0334]

[0335] 方案2-酰胺-TAMRA-Cy5多染料缀合物的合成。

[0336] 向 N_a -*boc*-L-赖氨酸(20 mg, 0.081 mmol)于DMSO (3 mL)中的溶液中添加三甲胺(25 mg, 0.24 mmol)和Cy5-NHS酯(50 mg, 0.081 mmol)。将反应混合物(包含中间体12)在室温下搅拌1小时,随后添加DMAP (10 mg, 0.081 mmol)和DSC (23 mg, 0.089 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后添加酰胺(17 mg, 0.12 mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,随后用MeOH (2 mL)稀释,并通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05% TFA, 在H₂O:ACN 95:5至5:95中,经40分钟)直接纯化,以得到作为深蓝色固体的化合物13 (37 mg, 65%产率)。MS (ESI) m/z (M)⁺, C₄₃H₅₉N₄O₅⁺的计算值711.5,实测值711.3。

[0337] 将化合物13 (37 mg, 0.052 mmol)溶解于TFA:CH₂Cl₂的4:1溶液(2 mL)中,并将反应混合物在室温下搅拌1小时。在减压下除去溶剂,并将所得深蓝色粘性油状物与甲苯(3 x 5 mL)共沸。在分开的烧瓶中,将氨基-peg₈-甲酸(25 mg, 0.057 mmol)溶解于DMSO (3 mL)中,随后添加三乙胺(17 mg, 0.17 mmol)。然后,添加TAMRA-NHS酯(30 mg, 0.057 mmol)并将反应混合物在室温下搅拌1小时。然后添加DMAP (7.0 mg, 0.057 mmol)和DSC (16 mg, 0.063 mmol),并将反应混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物添加至含有*N*-*boc*-裂解的化合物13的前一烧瓶中,随后添加三乙胺(17 mg, 0.17 mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌2小时,随后用MeOH (2 mL)稀释,并通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05%

TFA, 在 $H_2O:ACN$ 95:5至5:95中, 经40分钟) 直接纯化, 以得到作为紫色固体的TAMRA-Cy5缀合物14 (TFA盐, 35 mg, 40 %产率)。MS (ESI) m/z (M+H)²⁺, $C_{90}H_{118}N_8O_{16}$ ²⁺的计算值783.5, 实测值783.3。

[0338] 实施例3- 酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物

[0339] 酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物包含两个发色团, 即TAMRA发色团和FITC发色团。尽管单独的TAMRA产生品红色且单独的FITC产生黄色, 但多染料缀合物产生红色。

[0340] 在测定中使用酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物来染色扁桃体组织中的Ki67标志物, 如实施例2中所述。首先将对Ki67特异性的一抗引入扁桃体组织样品以形成抗体-靶标复合物。然后引入二抗, 即缀合至辣根过氧化物酶的抗Ki67抗体。在引入酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物后, 辣根过氧化物酶将酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物转化为反应性中间体, 其然后能够在标记的Ki67靶标邻近或直接在标记的Ki67靶标上结合组织。如图6中所示, 酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物将CD8靶标染成红色。

[0341] 本实施例的酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物包含偶联至两个色原的酞酰胺部分。在这里, 两个色原以“分支”排列提供, 使用接头(在此为赖氨酸), 用于将两个色原偶联至酞酰胺部分。使用与酞酰胺TAMRA-Cy5双重染料缀合物类似的程序制备酞酰胺-TAMRA-FITC多染料缀合物, 其中Cy5取代为FITC。MS (ESI) m/z (M+H)²⁺, $C_{79}H_{93}N_7O_{20}S_2$ ⁺的计算值745.3, 实测值744.9。

[0342] 实施例4- 醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物

[0343] 醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物包含两个发色团, 即Dabcyl发色团和Cy3发色团。尽管单独的Dabcyl产生黄色且单独的Cy3产生品红色, 但多染料缀合物产生红色。

[0344] 在测定中使用醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物来染色扁桃体组织中的Ki67标志物, 如实施例1中所述。首先将对Ki67特异性的一抗引入扁桃体组织样品以形成抗体-靶标复合物。然后引入二抗, 即缀合至碱性磷酸酶的抗Ki67抗体。在引入醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物后, 碱性磷酸酶将醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物转化为反应性中间体, 其然后能够在标记的Ki-67靶标邻近或直接在标记的Ki-67靶标上结合组织。如图7中所示, 醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物将Ki-67靶标染成红色。

[0345] 本实施例的醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物包含偶联至两个色原的醌甲基化物前体部分。在这里, 两个色原以“分支”排列提供, 使用接头(在此为赖氨酸), 用于将两个色原偶联至酞酰胺部分。通过类似于以下实施例5中所述方法的方法形成醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物。

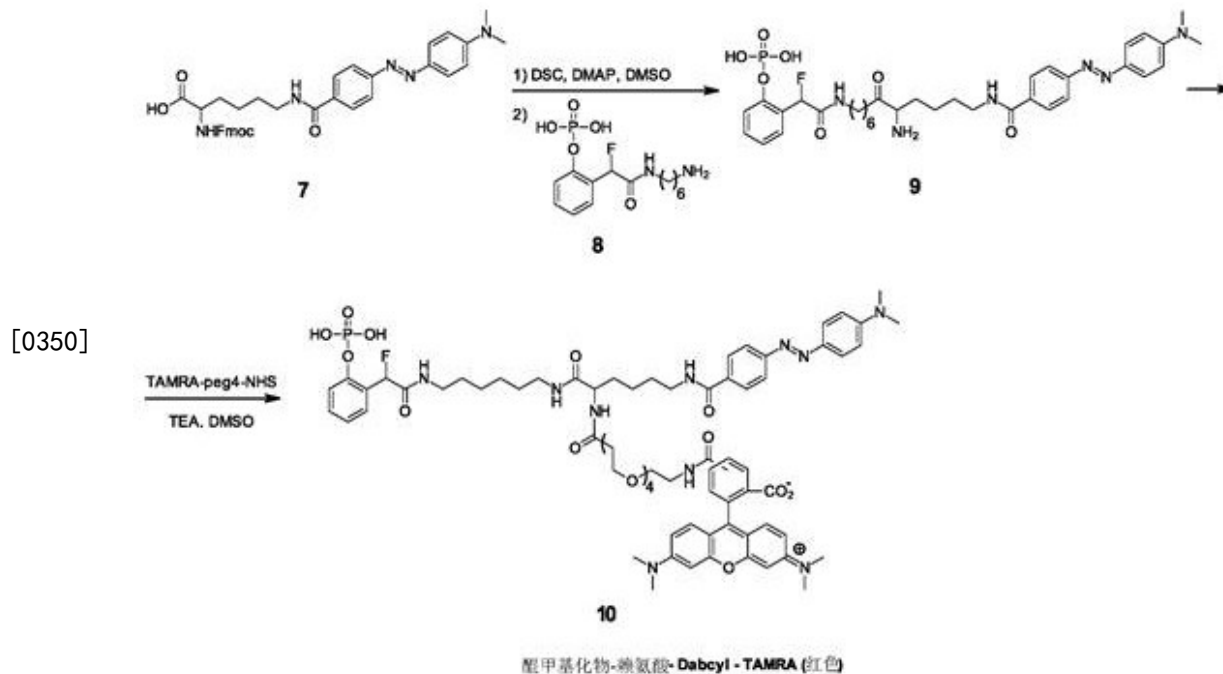
[0346] 实施例5- 醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物(IHC)

[0347] 醌甲基化物-Dabcyl-Cy3多染料缀合物包含两个发色团, 即TAMRA发色团和Dabcyl发色团。尽管单独的TAMRA产生品红色且单独的Dabcyl产生黄色, 但多染料缀合物产生红色。

[0348] 在测定中使用醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物来染色扁桃体组织中的Ki67标志物, 如实施例1中所述。首先将对Ki67特异性的一抗引入扁桃体组织样品以形成抗体-靶标复合物。然后引入二抗, 即缀合至碱性磷酸酶的抗Ki67抗体。在引入醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物后, 碱性磷酸酶将醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物转化为反应性中间体, 其然后能够在标记的Ki-67靶标邻近或直接在标记的Ki-67靶标上结合

组织。如图8中所示, 酞甲基化物-TAMRA-Dabcy1多染料缀合物将Ki-67靶标染成红色。

[0349] 本实施例的酞甲基化物-TAMRA-Dabcy1多染料缀合物包含偶联至两个色原的酞甲基化物前体部分。在这里, 两个色原以“分支”排列提供, 使用接头(在此为赖氨酸), 用于将两个色原偶联至酞酰胺部分。通过以下方法形成酞甲基化物-TAMRA-Dabcy1多染料缀合物(中间体的任何编号在示意图中说明):



[0351] 方案3-酞甲基化物-TAMRA-Dabcy1多染料缀合物的合成。

[0352] 向N-Fmoc-N-dabcy1-L-赖氨酸7 (100 mg, 0.16 mmol)于DSMO (5 mL)中的溶液中添加DMAP (20 mg, 0.16 mmol)和DSC (0.18 mmol, 45 mg)。然后添加化合物8 (62 mg, 0.18 mmol)和三乙胺(49 mg, 0.48 mmol),并将反应混合物在室温下搅拌1小时,此时通过HPLC显示偶联反应完成。然后添加额外量的三乙胺(3 mL),并将反应混合物在室温下剧烈搅拌6小时,此时如HPLC所示Fmoc基团被切割。然后将反应混合物沉淀至剧烈搅拌的EtOAc (100 mL)中。通过真空过滤收集所得橙色固体,并用EtOAc洗涤数次,得到作为橙色固体的化合物9 (双-三乙胺盐, 140 mg, 93%产率)。MS (ESI) m/z (M+H)⁺, C₃₅H₄₈FN₇O₇P⁺的计算值728.3,实测值728.0。

[0353] 在分开的烧瓶中,将氨基-PEG₄-甲酸(40 mg, 0.15 mmol)溶解于DMSO (3 mL)中,随后添加三甲胺(46 mg, 0.45 mmol)。然后,添加TAMRA-NHS酯(79 mg, 0.15 mmol)并将反应混合物在室温下搅拌1小时。然后添加DMAP (18 mg, 0.15 mmol)和DSC (42 mg, 0.17 mmol),并将反应混合物在室温下搅拌1小时。然后添加化合物9 (140 mg, 0.15 mmol)和三乙胺,并将反应混合物在室温下搅拌2小时,随后用MeOH (2 mL)稀释,并通过制备型HPLC (C18, 40mL/min, 0.05% TFA, 在H₂O:ACN 95:5至5:95中,经40分钟)直接纯化,以得到作为红色固体的dabcy1-TAMRA缀合物10 (mg, 54%产率)。MS (ESI) m/z (M+2H)²⁺, C₇₁H₈₉FN₁₀O₁₆P²⁺的计算值694.3,实测值694.0。

[0354] 实施例6-酞甲基化物-TAMRA-Dabcy1多染料缀合物(ISH)

[0355] 酞甲基化物-Dabcy1-Cy3多染料缀合物包含两个发色团,即TAMRA发色团和Dabcy1

发色团。尽管单独的TAMRA产生品红色且单独的Dabcyl产生黄色,但多染料缀合物产生红色。

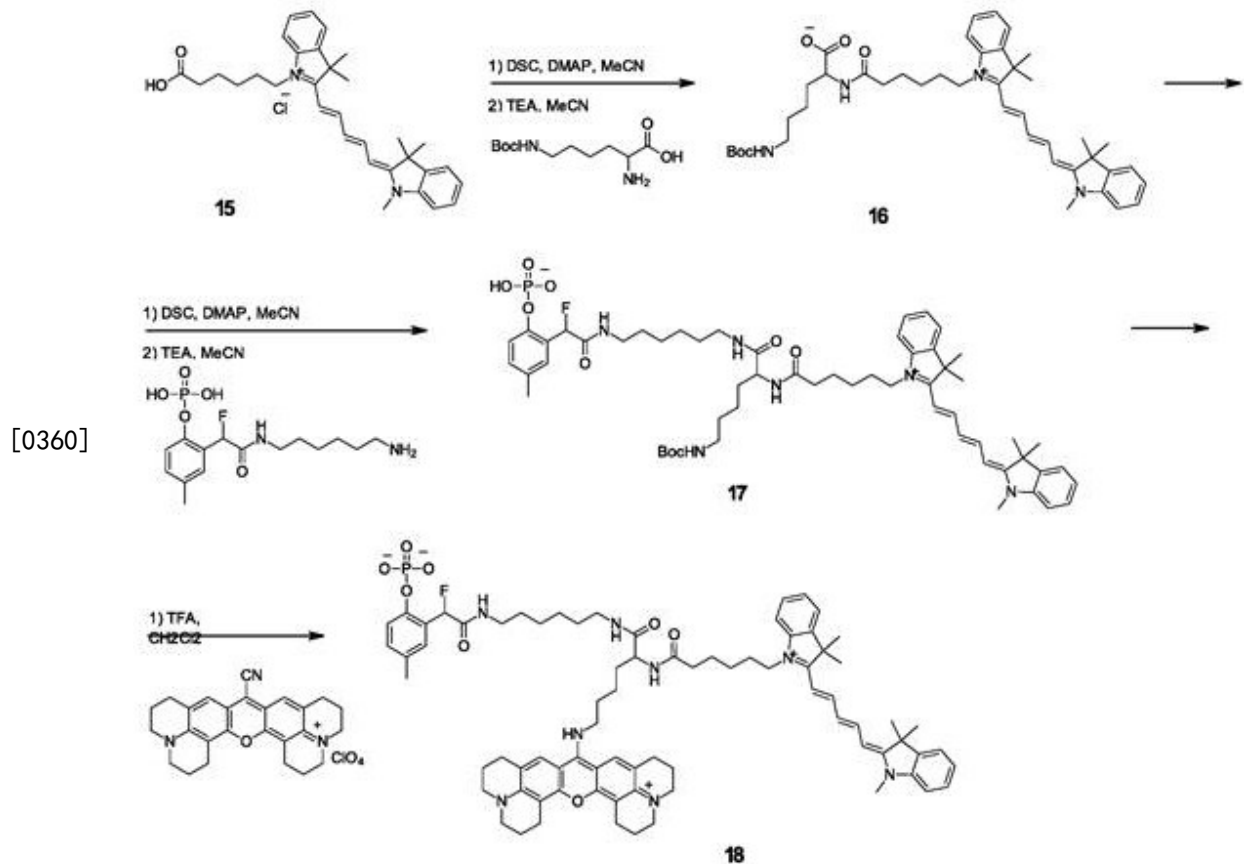
[0356] 在多重ISH测定中使用醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物来染色染色体17标志物,同时银染乳房组织中的HER2基因。将组织脱蜡,随后用细胞调节2 (CC2, VMSI # 950-123, 90°C;28分钟)预处理,并用蛋白酶3 (VMSI #780-4149, 37°C;20分钟)处理。将DNP标记的Her2和DIG标记的染色体17探针的混合物(VMSI # 780-4422)应用于组织,变性(80°C;20分钟)并在44°C下杂交6小时。在76°C下用SSC严格洗涤三次之后,将样品与兔-抗-DNP抗体孵育(37°C;20分钟),随后与HRP缀合的山羊多克隆抗兔抗体一起孵育(37°C;16分钟)。通过与乙酸银、氢醌和过氧化氢孵育,HRP作为银沉积物被检测。连续地,通过与小鼠抗DIG抗体孵育(37°C;20分钟),随后与AP缀合的山羊多克隆抗小鼠抗体孵育(37°C;24分钟),显现染色体17。用SSC洗涤之后,然后将200 μ L pH调节溶液(0.5 M Tris, pH 10.0)和100 μ L在10 mM甘氨酸缓冲液(pH 2.0)中溶解至50-500 μ M的最终浓度的醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物共孵育(37°C;32分钟)。将染色的组织切片用苏木精II复染(37°C;4分钟),且然后与发蓝试剂一起孵育(37°C;4分钟)。然后将它们用去垢剂水混合物冲洗,通过分级乙醇系列脱水,用二甲苯透化,并手动盖上盖片。在引入醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物后,碱性磷酸酶将醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物转化为反应性中间体,其然后能够在标记的染色体17靶标邻近或直接在标记的染色体17靶标上结合组织。如图9中所示,醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物将染色体17靶标染成红色。

[0357] 本实施例的醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物包含偶联至两个色原的醌甲基化物前体部分。在这里,两个色原以“分支”排列提供,使用接头(在此为赖氨酸),用于将两个色原偶联至酰胺部分。根据实施例5中描述的方法形成醌甲基化物-TAMRA-Dabcyl多染料缀合物。

[0358] 实施例7 醌甲基化物Cy5-罗丹明800双重染料缀合物的合成

[0359] 向Cy5酸15 (50 mg, 0.096 mmol)于MeCN (5 mL)中的搅拌溶液中添加DMAP (13 mg, 0.11 mmol)。在DMAP已溶解之后,添加DSC (27 mg, 0.11 mmol)并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。然后添加N ϵ -Boc-L-赖氨酸(47 mg, 0.19 mmol)和三乙胺(49 mg, 0.48 mmol),并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。然后在减压下除去溶剂,并将残余物溶解于CH₂Cl₂ (50 mL)中并用1M HCl (3 x 50 mL)和盐水(50 mL)萃取。收集有机层,经MgSO₄干燥,并在减压下除去溶剂。将所得残余物16 (Cy5-N-boc-L-赖氨酸缀合物)溶解于MeCN (5 mL)中,随后添加DMAP (13 mg, 0.11 mmol)。在DMAP已溶解之后,添加DSC (27 mg, 0.11 mmol)并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。然后添加醌甲基化物前体17. (52 mg, 0.14 mmol)和三乙胺(49 mg, 0.48 mmol),并将所得混合物在室温下搅拌30分钟。然后在减压下除去溶剂,并将残余物溶解于CH₂Cl₂ (50 mL)中并用1M HCl (3 x 50 mL)和盐水(50 mL)萃取。收集有机层,经MgSO₄干燥,并在减压下除去溶剂。将所得残余物(醌甲基化物-N ϵ -boc-L-赖氨酸-Cy5缀合物)溶解于CH₂Cl₂ (5 mL)中,随后添加TFA (1 mL)。将所得混合物在室温下搅拌30分钟,此时在减压下除去溶剂。将所得残余物溶解于MeCN (3 mL)中,随后添加三乙胺(97 mg, 0.96 mmol)和罗丹明800 (48 mg, 0.096 mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时,此时在减压下除去溶剂。将所得残余物溶解于MeOH (5 mL)中,并通过反相快速色谱法(SNAP C18 Ultra 60 g,50 mL/min,0.05% TFA,在H₂O:MeOH 4:1至0:1中,经10 CV)

直接纯化混合物以得到作为绿色固体的QM-Cy5-罗丹明800缀合物18 (70 mg, 55%产率, 来自Cy5酸)。MS (ESI) m/z (M)²⁺, C₇₈H₉₈N₈O₈P²⁺的计算值662.4, 实测值662.1。



[0361] 方案4--醌甲基化物Cy5-罗丹明800双重染料缀合物的合成。

[0362] 实施例8-醌甲基化物-Rhod800-Cy5多染料缀合物(IHC)

[0363] 醌甲基化物-Cy5-Rhod800多染料缀合物包含两个发色团,即罗丹明800发色团和Cy5发色团。尽管单独的罗丹明800产生黄色且单独的Cy5产生蓝色,但多染料缀合物产生绿色。

[0364] 在测定中使用醌甲基化物-Rhod800-Cy5多染料缀合物来染色扁桃体组织中的Ki67标志物,如实施例1中所述。首先将对Ki67特异性的一抗引入扁桃体组织样品以形成抗体-靶标复合物。然后引入二抗,即缀合至碱性磷酸酶的抗Ki67抗体。在引入醌甲基化物-Cy5-Rhod800多染料缀合物后,碱性磷酸酶将醌甲基化物-Cy5-Rhod800多染料缀合物转化为反应性中间体,其然后能够在标记的Ki-67靶标邻近或直接在标记的Ki-67靶标上结合组织。如图14中所示,醌甲基化物-Cy5-Rhod800多染料缀合物将Ki-67靶标染成绿色。

[0365] 在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物以其整体通过引用并入本文。如果必要,可以修改实施方案的方面,以采用各种专利、申请和出版物的构思以提供另外的实施方案。

[0366] 尽管已经参考具体实施方案描述了本文的公开内容,但应当理解,这些实施方案仅仅说明本公开内容的原理和应用。因此,应当理解,可以对说明性实施方案进行许多修改,并且可以在不脱离由所附权利要求限定的本公开内容的精神和范围的情况下设计其他布置。

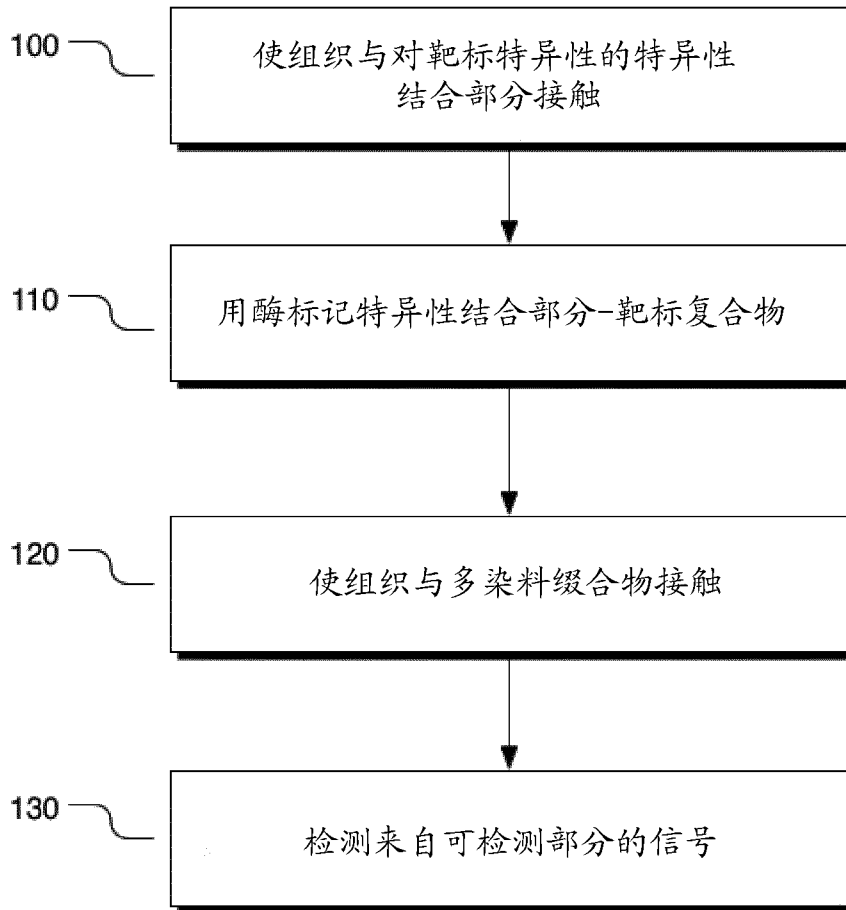


图 1

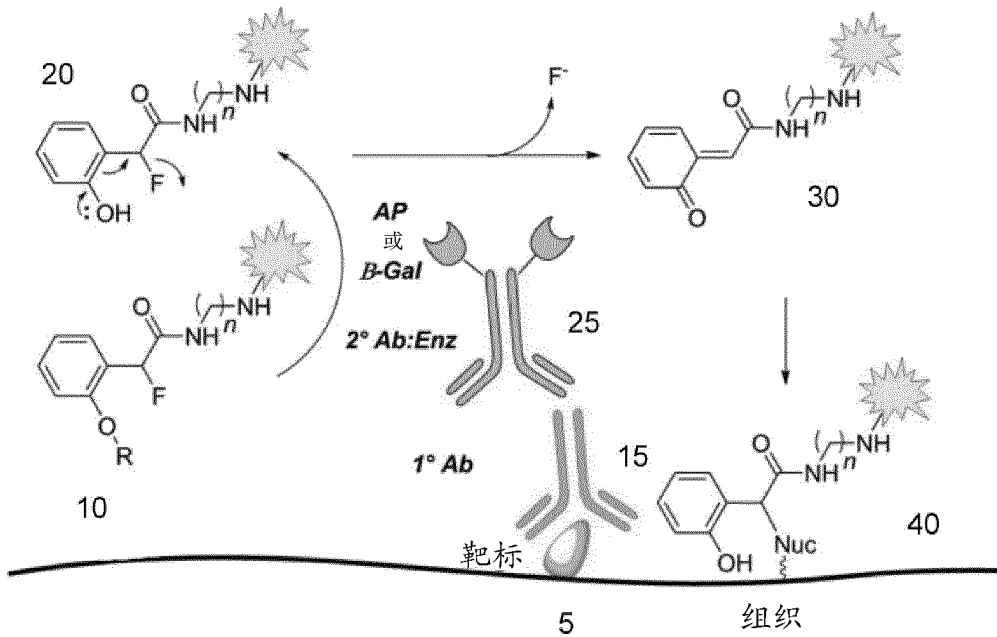


图 2

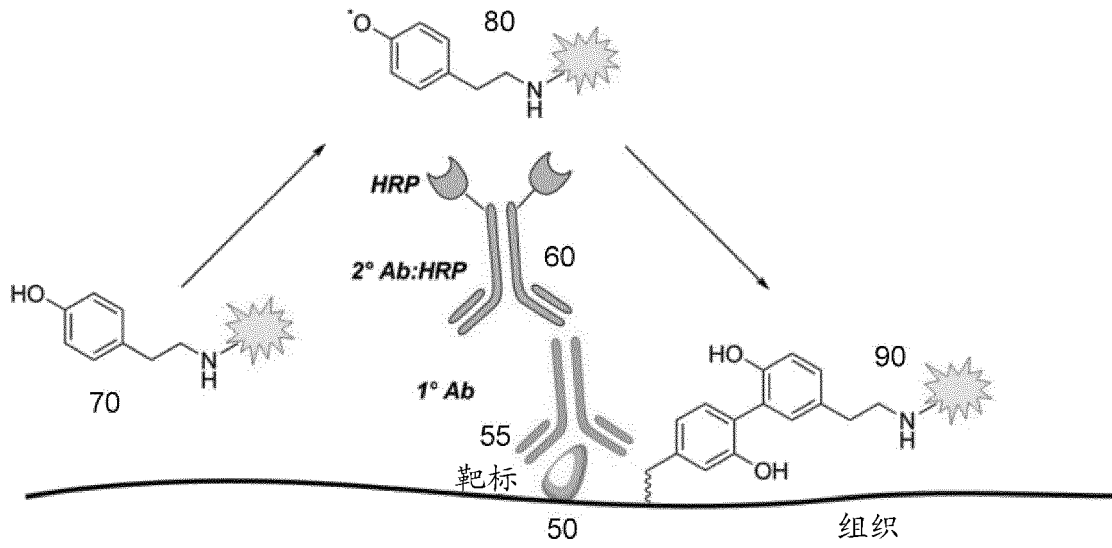


图 3

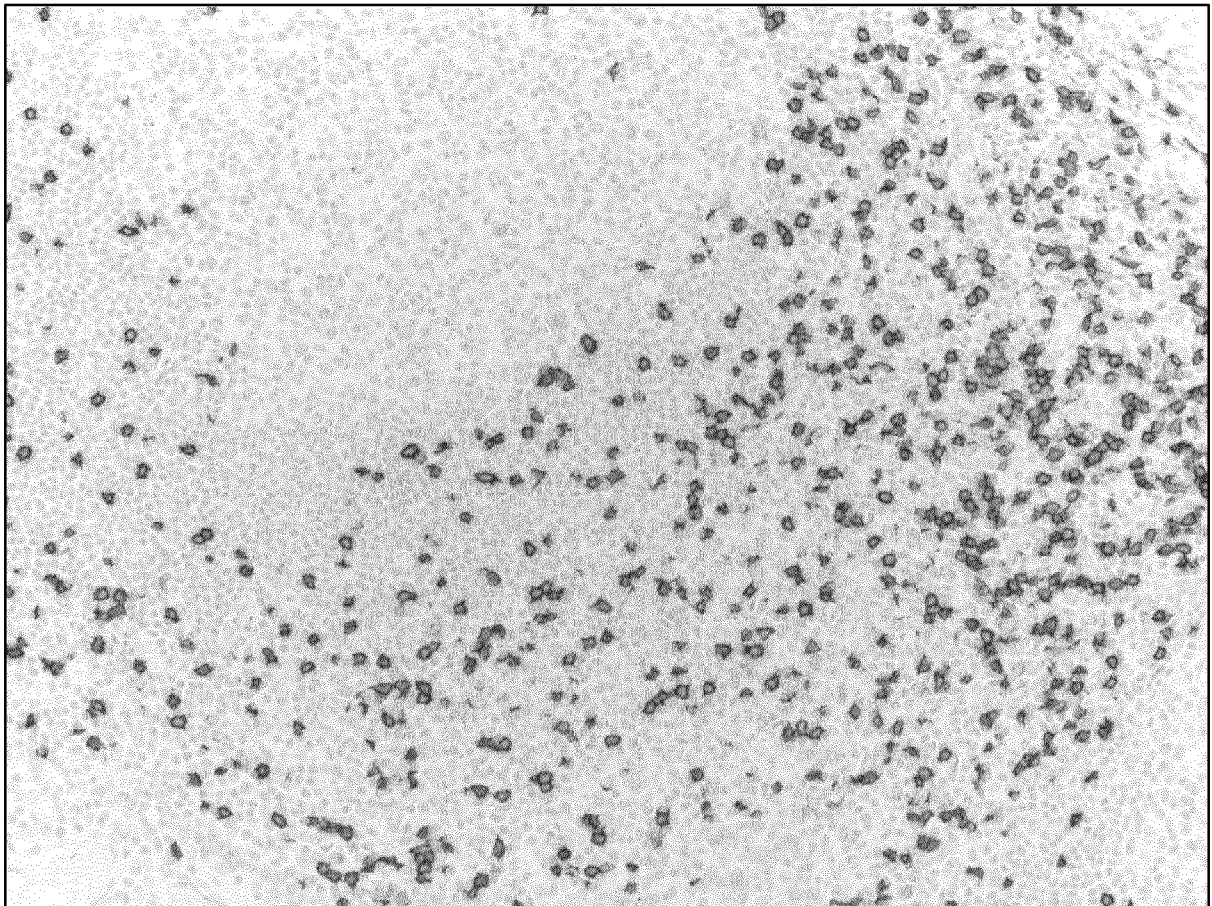


图 4

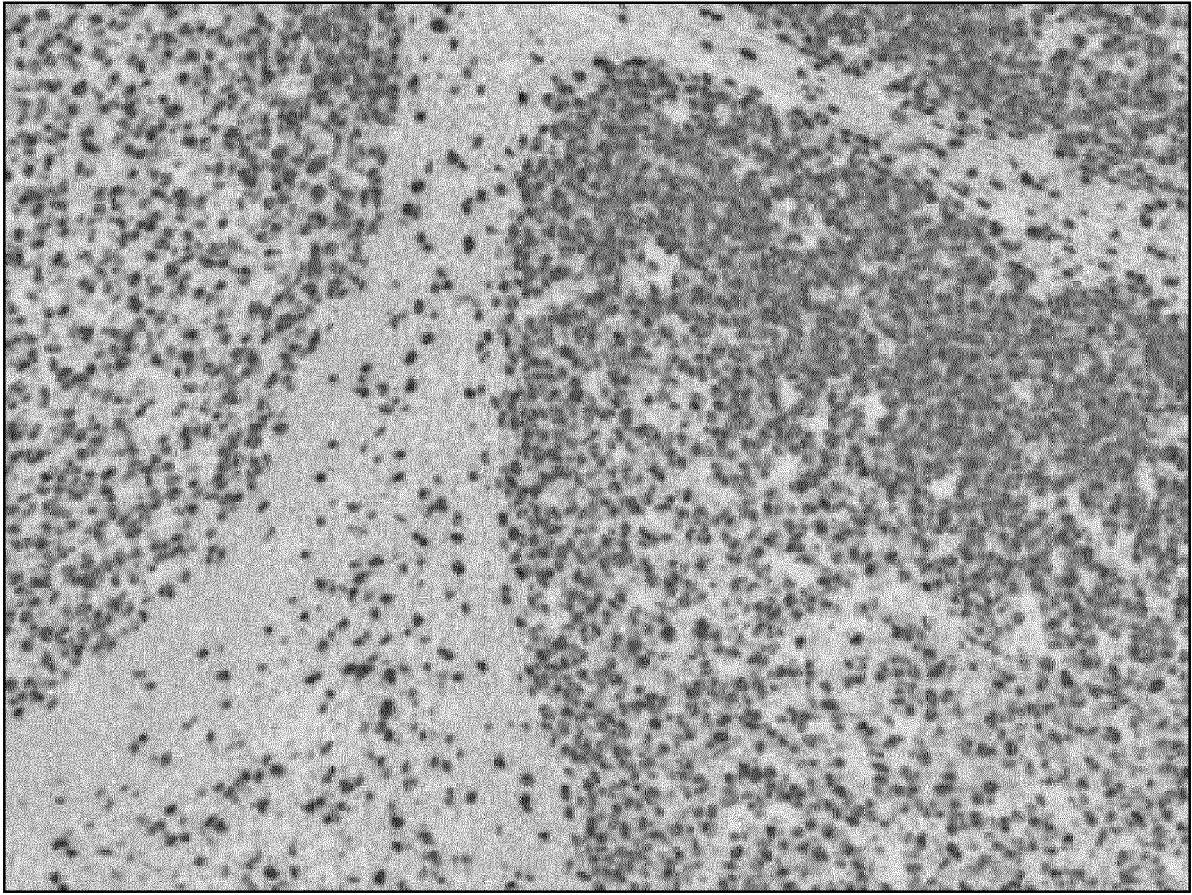


图 5

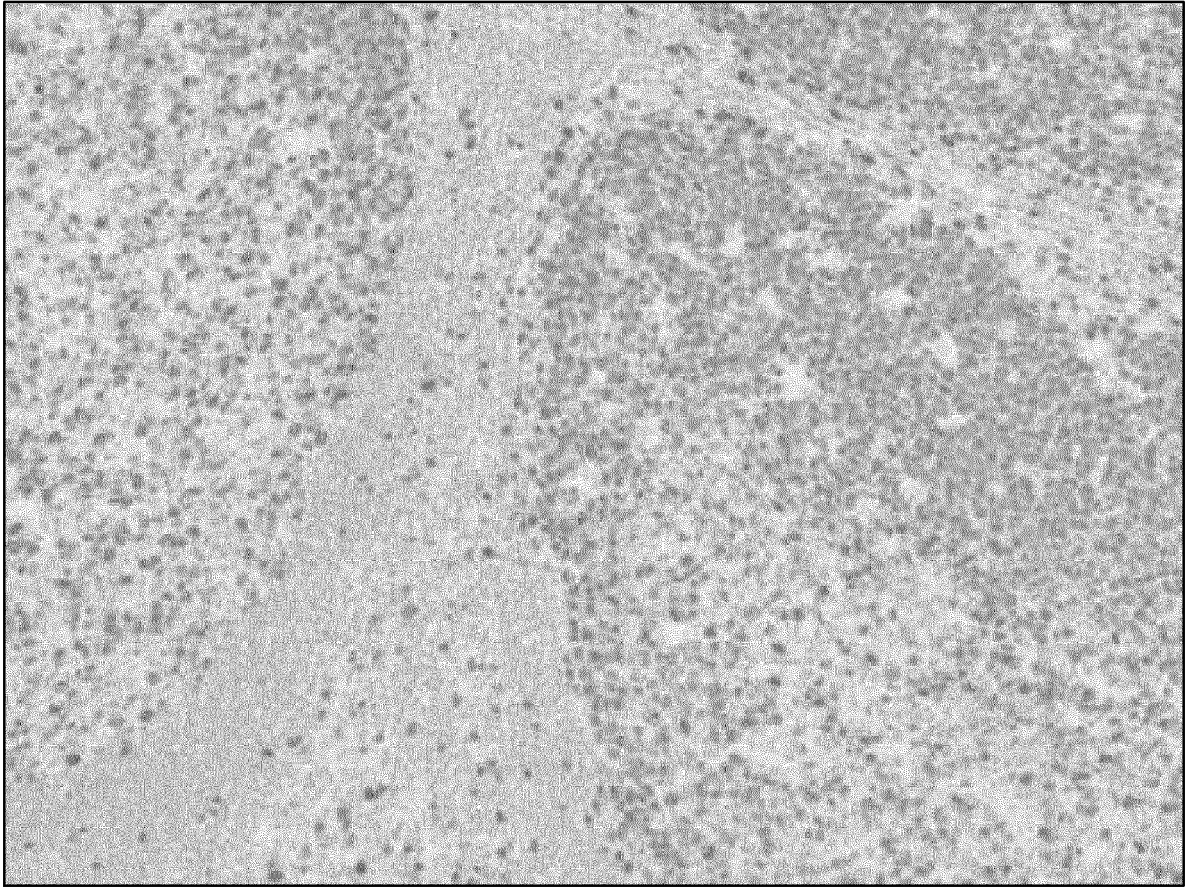


图 6

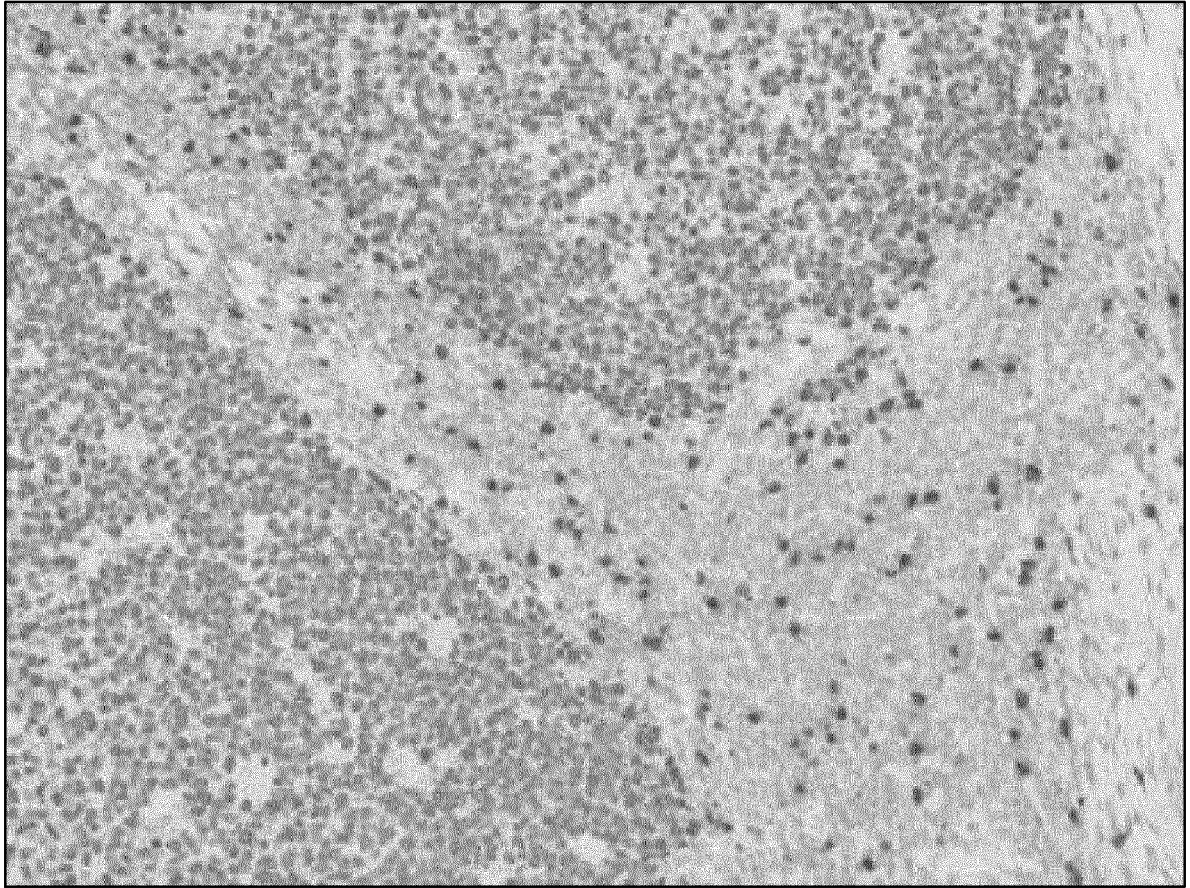


图 7

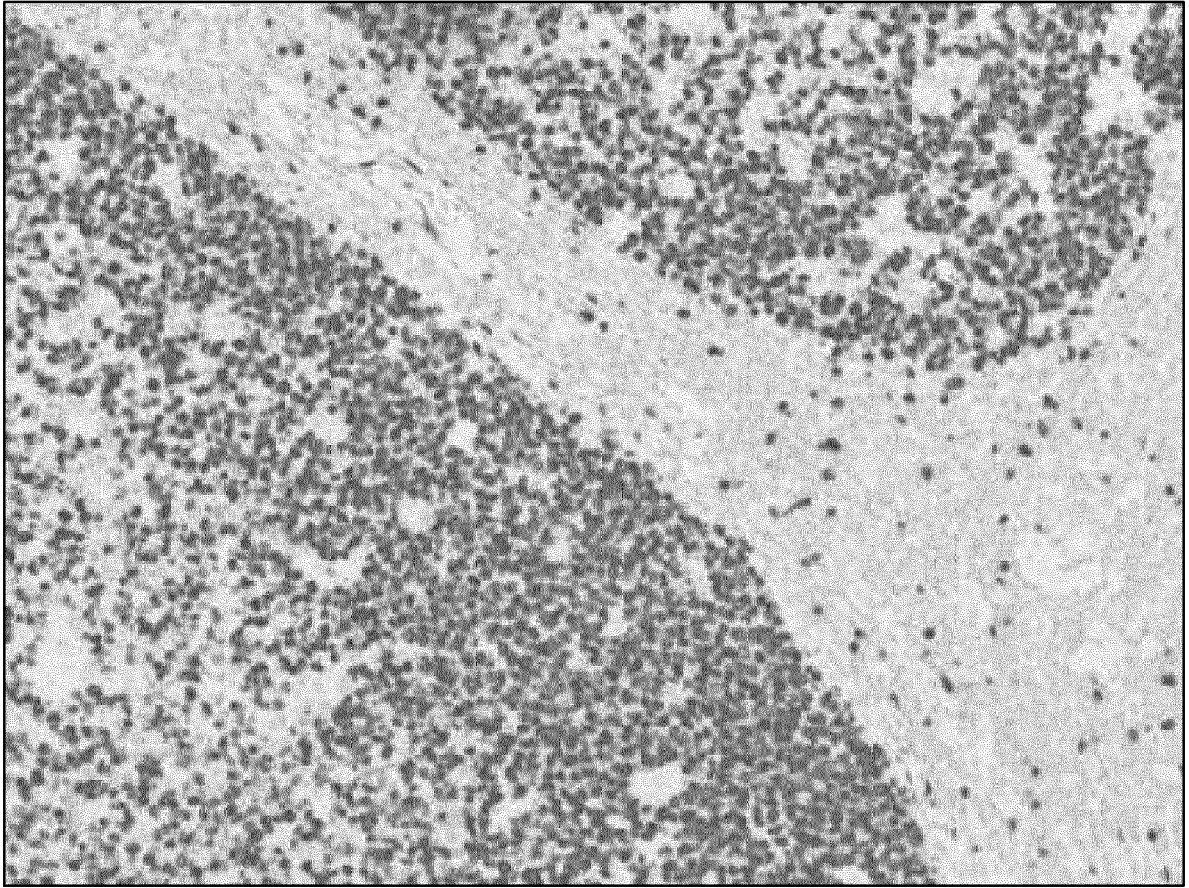


图 8

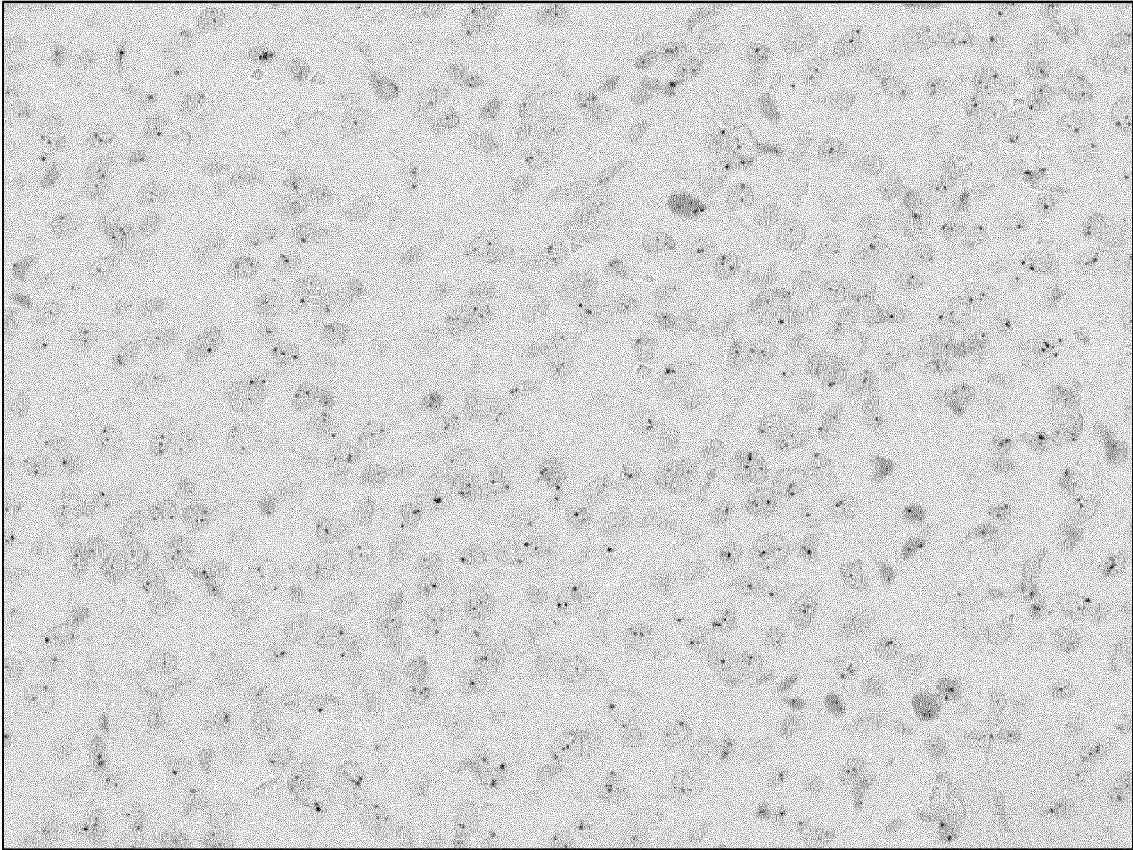


图 9

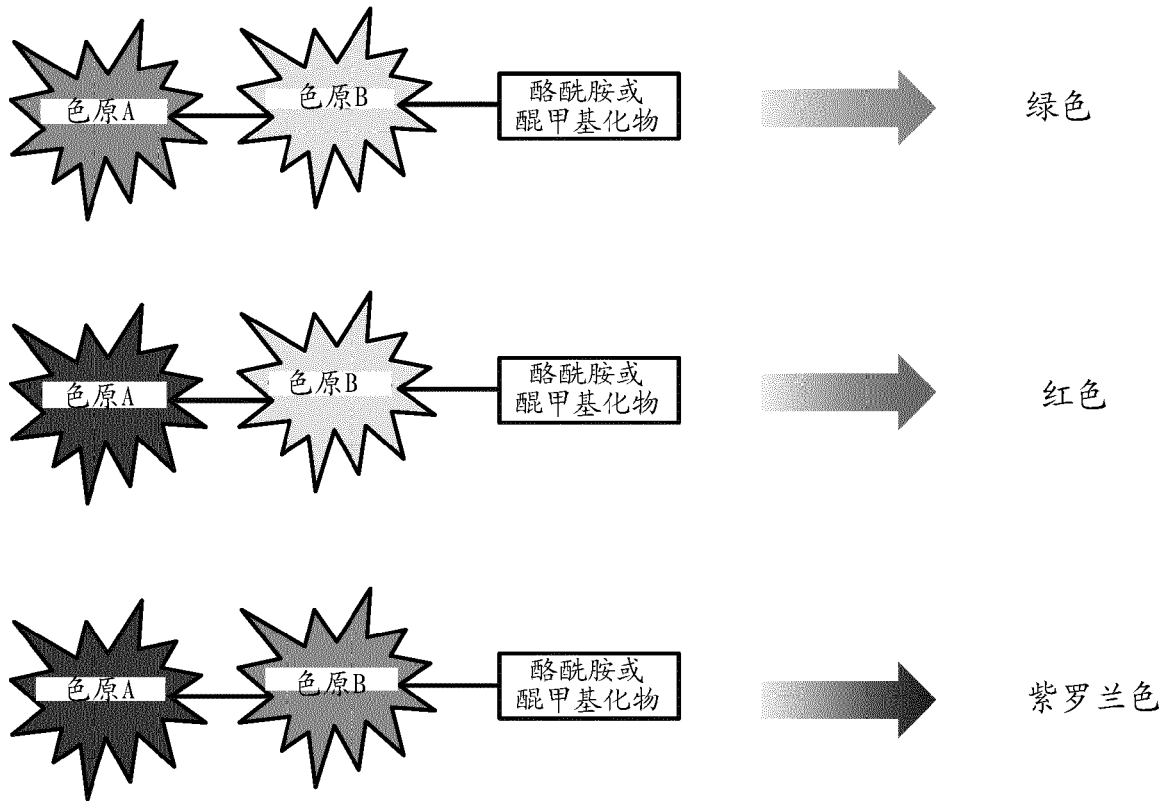


图 10

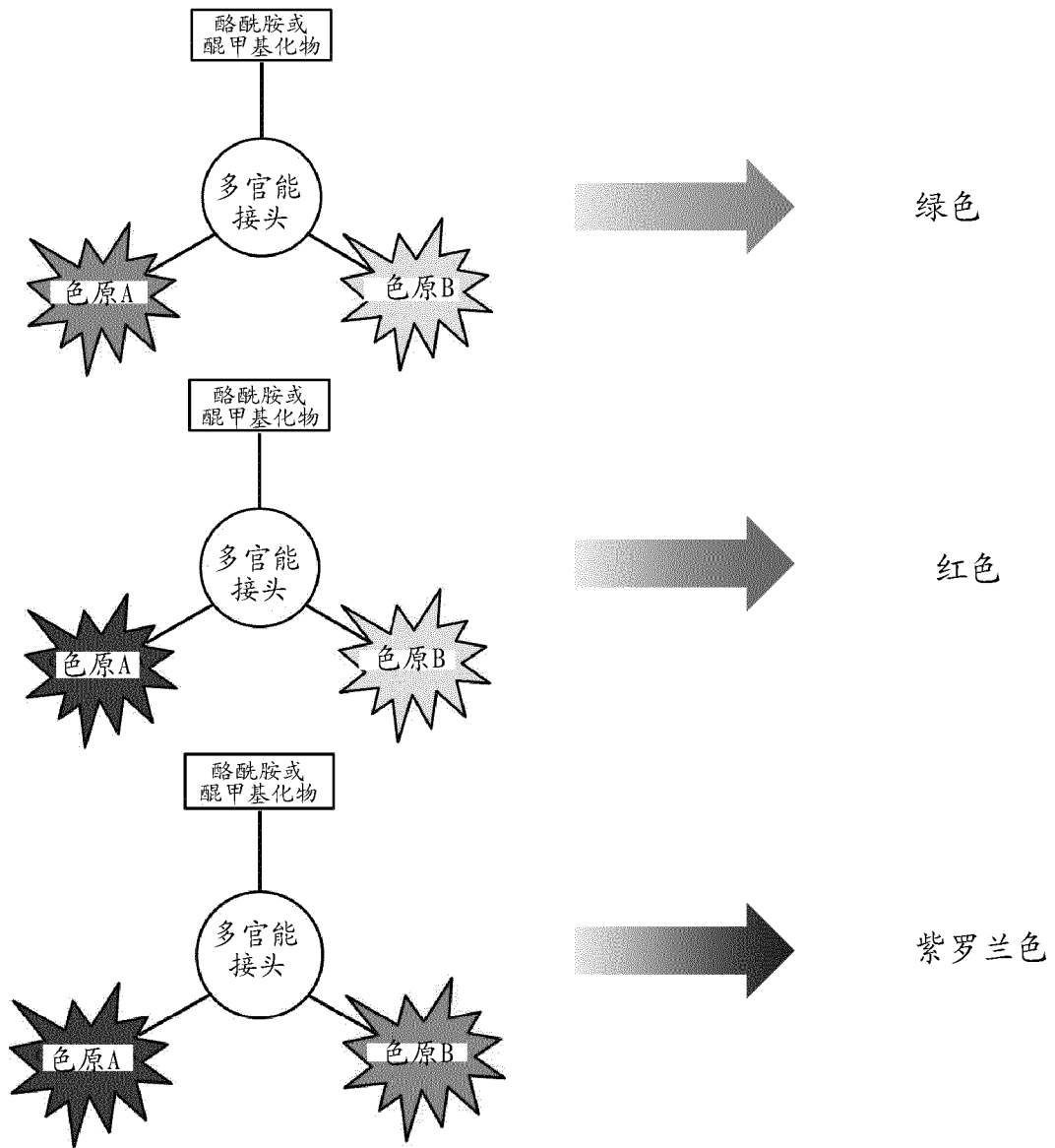


图 11

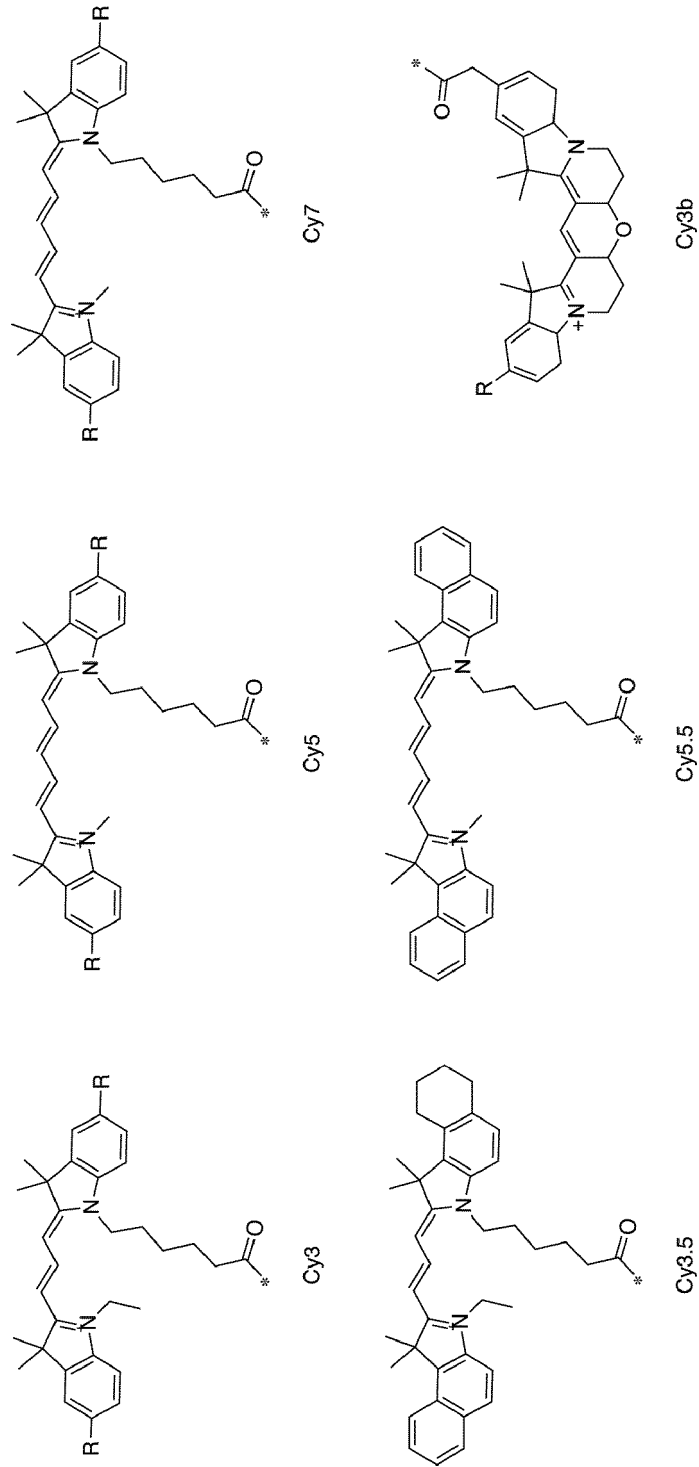


图 12

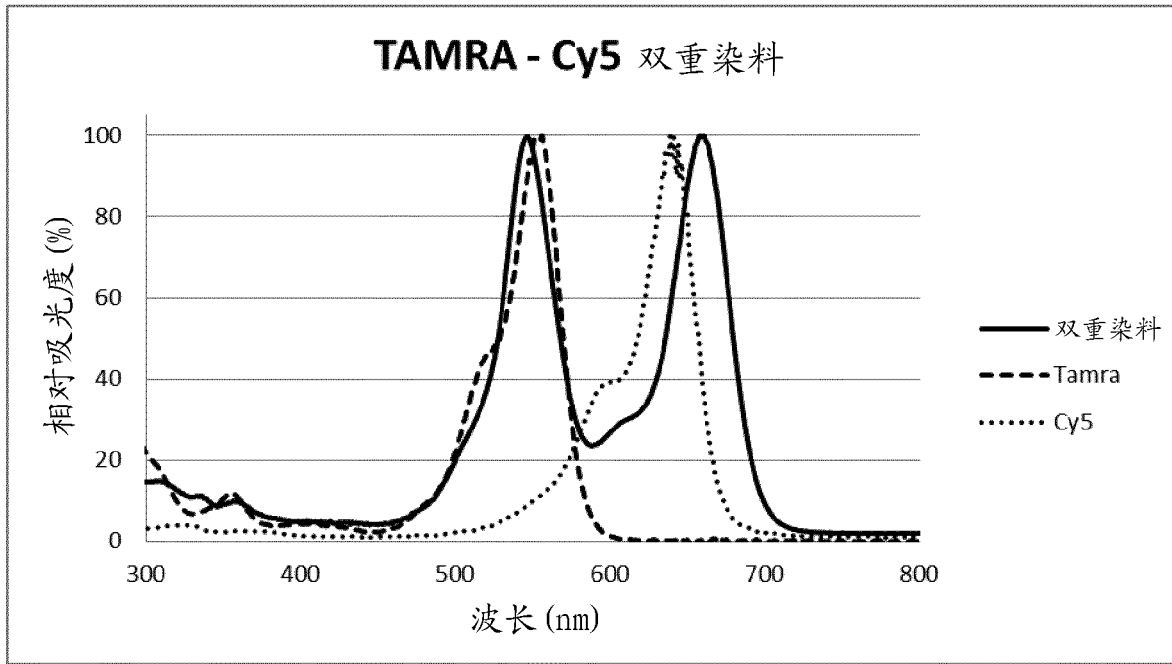


图 13A

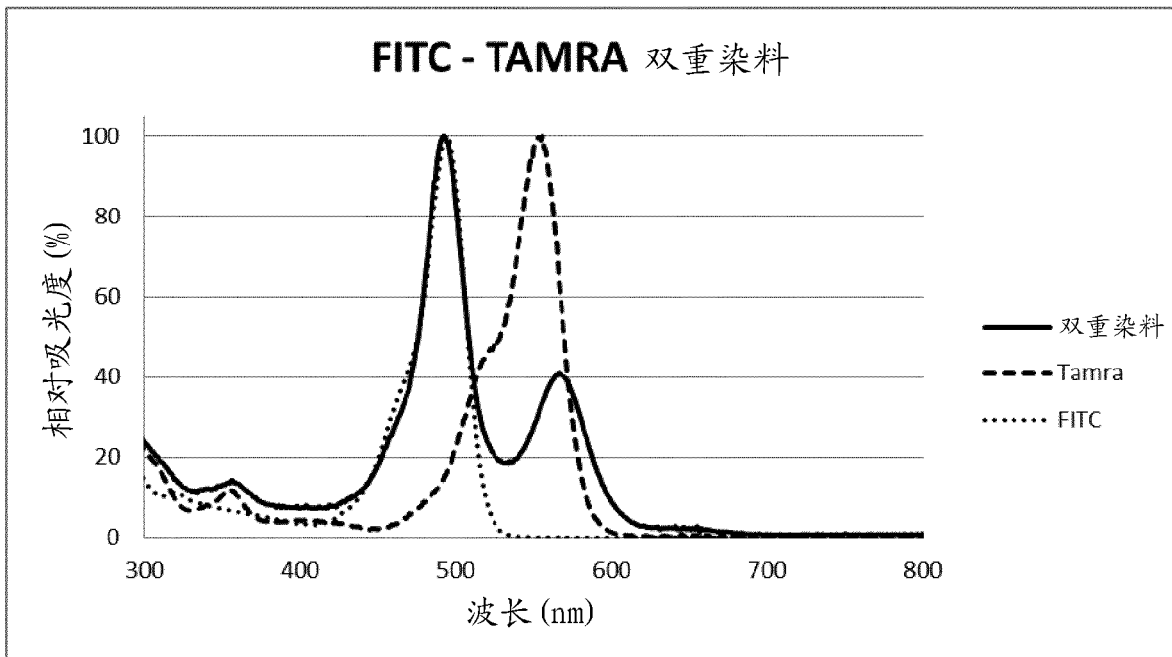


图 13B

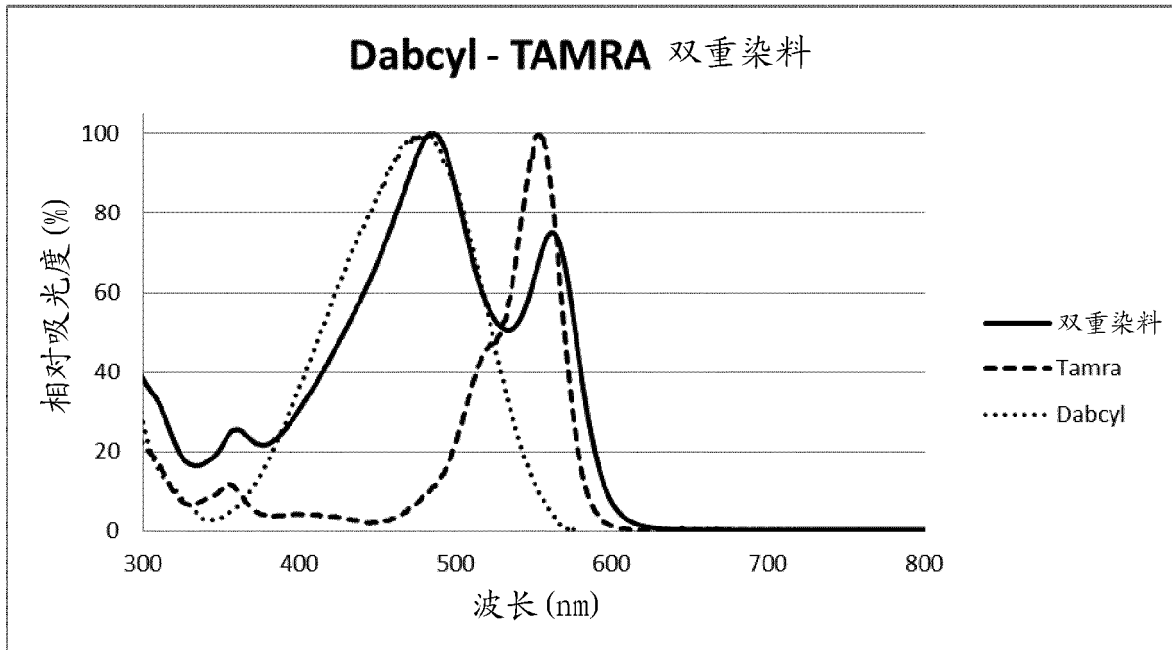


图 13C

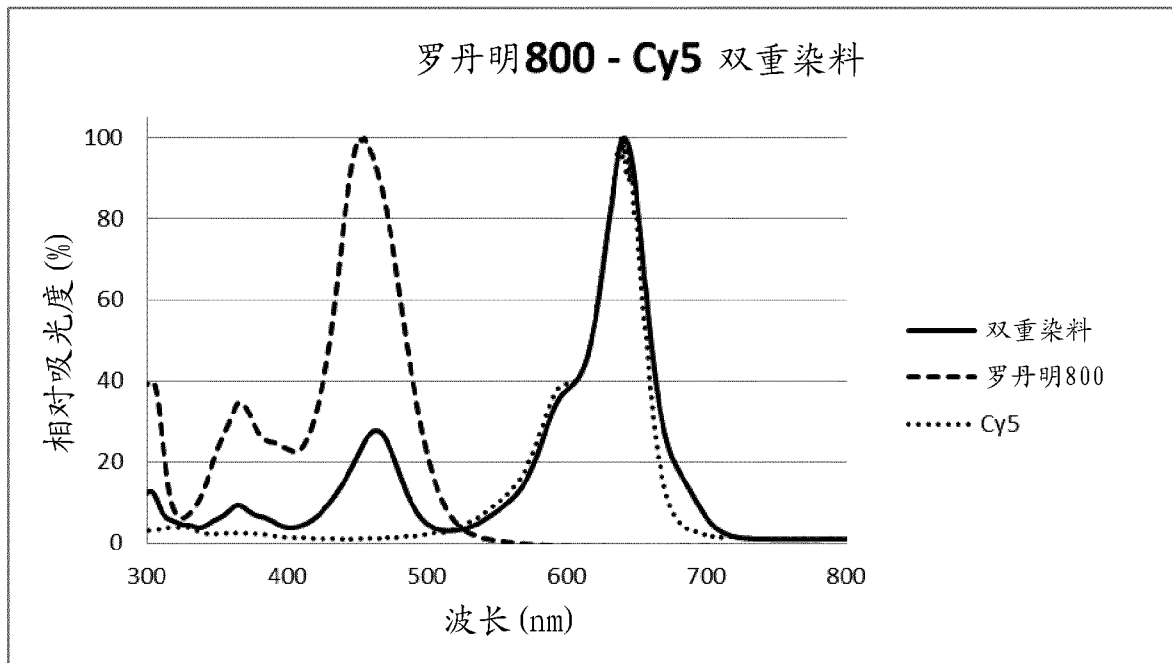


图 13D

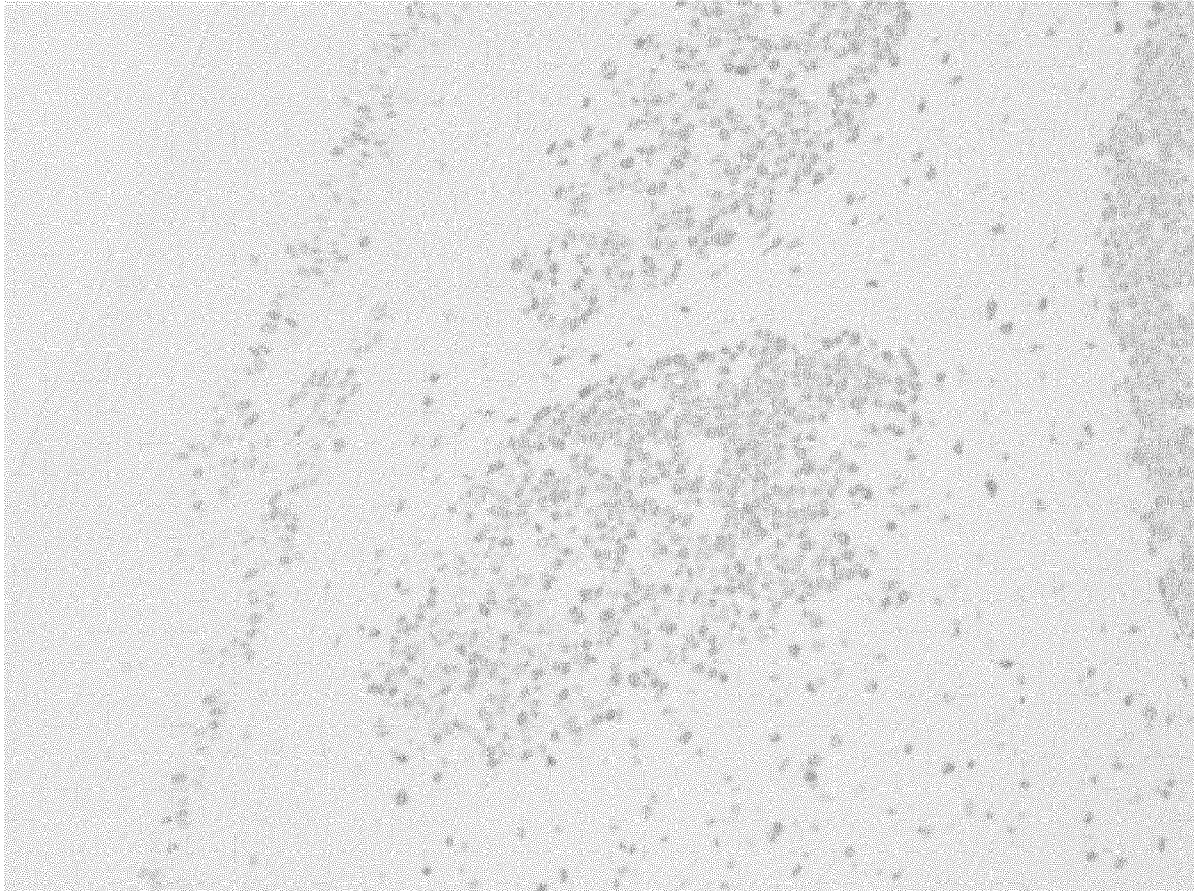


图 14