



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111491667 A

(43)申请公布日 2020.08.04

(21)申请号 201880081628.5

(22)申请日 2018.06.13

(30)优先权数据

62/599810 2017.12.18 US

PCT/US2017/066976 2017.12.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/065697 2018.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/120635 EN 2019.06.27

(71)申请人 文塔纳医疗系统公司

地址 美国亚利桑那州

(72)发明人 A.巴尔胡米 R.洪

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 任晓华 李唐

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

C12Q 1/6816(2006.01)

C12Q 1/6823(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

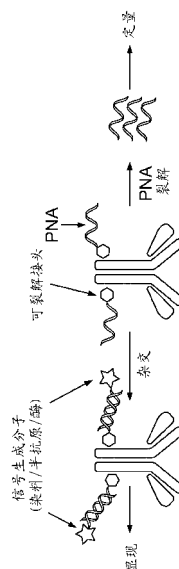
权利要求书5页 说明书53页
序列表8页 附图46页

(54)发明名称

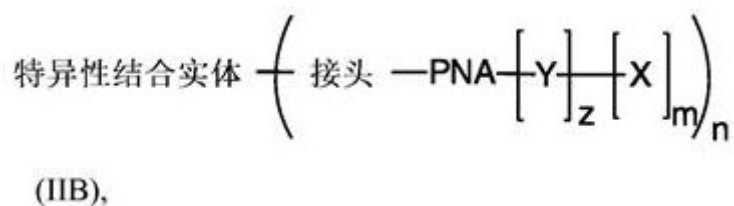
肽核酸缀合物

(57)摘要

本公开涉及特异性结合实体和寡聚物的缀合物,即[特异性结合实体]-[寡聚物]_n,其中n是范围从1至12的整数,且其中,在一些实施方案中,所述寡聚物包括在γ碳位置处具有至少一个取代基的PNA序列。在一些实施方案中,在γ碳位置处的取代基,例如氨基酸、肽、miniPEG或聚合物,包括至少一个报告子部分。



1. 具有式 (IIB) 的结构的PNA缀合物:



其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘接头’是具有2至80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；

‘PNA’是具有至少一个在 γ 碳位置处包括取代的核苷酸的PNA序列；

X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签；

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数。

2. 权利要求1的PNA缀合物，其中‘特异性结合实体’是抗体。

3. 权利要求1或2的PNA缀合物，其中至少一个取代的核苷酸选自赖氨酸残基、具有少于20个氨基酸的肽序列、聚合物和miniPEG。

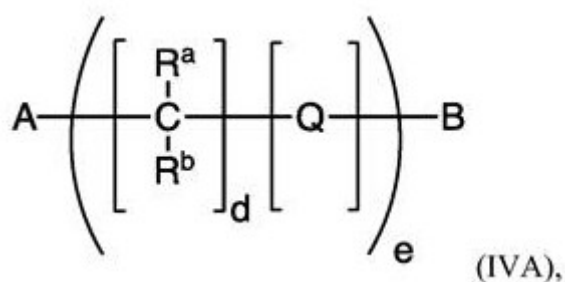
4. 权利要求3的PNA缀合物，其中至少一个报告子部分与至少一个取代的核苷酸偶联。

5. 前述权利要求中任一项的PNA缀合物，其中m是0，z是0，且n大于1。

6. 权利要求5的PNA缀合物，其中n是范围从2至6的整数。

7. 前述权利要求中任一项的PNA缀合物，其中‘接头’包含至少一个亲水性基团。

8. 前述权利要求中任一项的PNA缀合物，其中‘接头’具有式 (IVA) 中描绘的结构：



其中

d和e是各自独立地范围从2至20的整数；

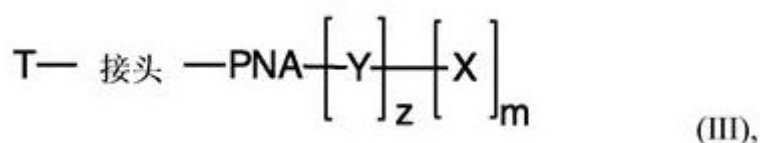
Q是键、O、S或N (R^c) (R^d)；

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 独立地是 CH_3 或H；且

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。

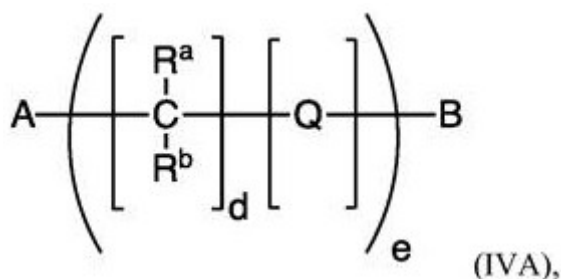
9. 权利要求8的PNA缀合物,其中d和e是范围从2至6的整数。
10. 权利要求8的PNA缀合物,其中A或B中的至少一个包括可裂解部分。
11. 权利要求10的PNA缀合物,其中所述可裂解部分是光可裂解基团。
12. 权利要求10的PNA缀合物,其中所述可裂解部分是化学可裂解基团。
13. 前述权利要求中任一项的PNA缀合物,其中'特异性结合实体'是抗体,'接头'包含至少一个环氧烷基团,m是0,z是0,且n大于1。
14. 前述权利要求中任一项的PNA缀合物,其中'特异性结合实体'是抗体,'接头'包含至少一个环氧烷基团,且n大于1。
15. 权利要求14的PNA缀合物,其中'接头'进一步包含至少一个可裂解部分。
16. 权利要求15的PNA缀合物,其中X是半抗原。
17. 具有式(III)的结构的PNA寡聚物:



其中

- T是具有1至4个碳原子且任选地被O、N或S取代且具有末端反应性部分的基团;
- '接头'是具有2至80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;
- 'PNA'是具有至少一个在 γ 碳位置处包括取代的核苷酸的PNA序列;
- X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签;
- Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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;
- m是0或范围从1至6的整数;且
- z是0或1。

18. 权利要求17的PNA寡聚物,其中至少一个取代的核苷酸选自赖氨酸残基、具有少于20个氨基酸的肽序列、聚合物和miniPEG。
19. 权利要求17或18的PNA缀合物,其中至少一个报告子部分与至少一个取代的核苷酸偶联。
20. 权利要求17至19中任一项的PNA寡聚物,其中m是0,z是0,且n大于1。
21. 权利要求17至20中任一项的PNA寡聚物,其中n是范围从2至6的整数。
22. 权利要求17至21中任一项的PNA寡聚物,其中'接头'具有式(IVA)中描绘的结构:



其中

d和e是各自独立地范围从2至20的整数；

Q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独立地是CH₃或H；且

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。

23. 权利要求22的PNA寡聚物，其中d和e是范围从2至6的整数。

24. 权利要求22的PNA寡聚物，其中A或B中的至少一个包含可裂解部分。

25. 权利要求24的PNA寡聚物，其中所述可裂解部分是光可裂解基团。

26. 权利要求24的PNA寡聚物，其中所述可裂解部分是化学可裂解基团。

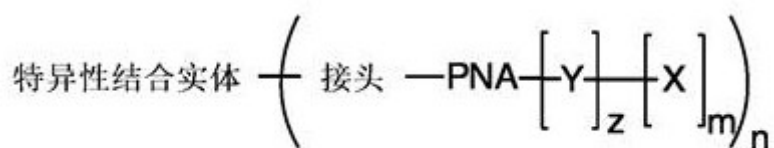
27. PNA缀合物，其包含权利要求17至26中任一项的PNA寡聚物和特异性结合实体。

28. 权利要求27的PNA缀合物，其中所述特异性结合实体是一抗；且其中所述PNA序列或γ PNA序列包含5至30个碱基。

29. 合成PNA缀合物的方法，其包括使权利要求17至26中任一项的PNA寡聚物与特异性结合实体反应。

30. 检测样品中的靶标的方法，其包括：

使所述样品与第一PNA缀合物接触，所述第一PNA缀合物具有式(IIB)的结构：



(IIB),

其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘接头’是具有2至80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；

‘PNA’是具有至少一个在γ碳位置处包括取代的核苷酸的PNA序列；

X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签；

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数；和

使所述样品与第一检测试剂接触以便于PNA缀合物的检测。

31. 权利要求30的方法，其中‘特异性结合实体’是一抗，且其中所述一抗对第一靶标是特异性的。

32. 权利要求30或31的方法，其中‘特异性结合实体’是二抗，且其中所述方法进一步包括在使所述样品与第一PNA缀合物接触前，使所述样品与对第一靶标特异性的一抗接触的步骤，且其中所述第一PNA缀合物对第一抗是特异性的。

33. 权利要求30至32中任一项的方法,其中所述第一检测试剂是对所述PNA缀合物的标记物特异性的抗标记物抗体。

34. 权利要求30至33中任一项的方法,其中所述标记物是半抗原,且所述抗标记物抗体是抗半抗原抗体。

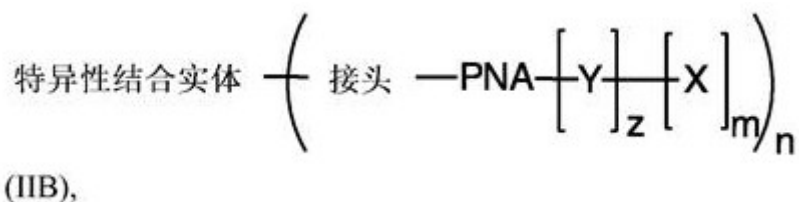
35. 权利要求30至34中任一项的方法,其中所述检测试剂包含与所述第一PNA缀合物的PNA序列或 γ PNA序列互补的PNA或DNA序列,所述互补PNA或DNA序列与报告子部分缀合。

36. 权利要求35的方法,其中所述报告子部分是荧光团。

37. 权利要求35的方法,其中所述报告子部分是半抗原,且其中所述方法进一步包括使所述样品与对互补PNA或DNA序列的半抗原特异的抗半抗原抗体接触。

38. 检测样品中的靶标的方法,其包括:

使所述样品与第一PNA缀合物接触,所述第一PNA缀合物具有式 (IIB) 的结构:



其中

'特异性结合实体'选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸;

'接头'是具有2至80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,其中所述'接头'包括可裂解接头;

'PNA'是具有至少一个在 γ 碳位置处包括取代的核苷酸的PNA序列;

X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签;

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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;

m是0;

z是0;且

n是范围从1至12的整数;和

使所述样品与试剂接触以裂解'接头'上的可切割部分,和

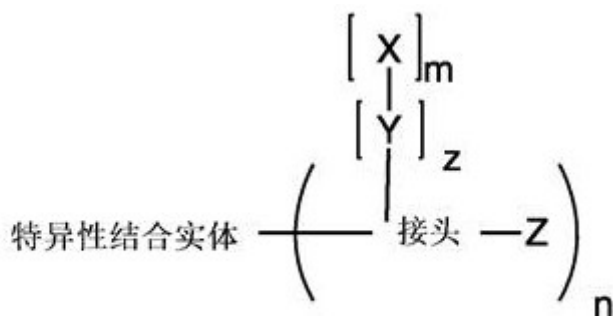
定量裂解的'PNA'序列的量。

39. 权利要求38的方法,其中使用NanoString nCounter技术、Gyros技术或质谱进行PNA序列的量的定量。

40. 权利要求38或39的方法,其中所述可裂解基团选自光可裂解基团、化学可裂解基团或酶促可裂解基团。

41. 权利要求38至40中任一项的方法,其进一步包括显现由其裂解出所述PNA序列的特异性结合实体。

42. 式 (IB) 的缀合物:



(IB),

其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘接头’是具有2至80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；

Z是具有至少一个在 γ 碳位置处包括取代的核苷酸的PNA序列；

X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签；

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数。

43. 权利要求42的缀合物，其中‘特异性结合实体’是一抗。

44. 权利要求42或43的缀合物，其中所述PNA序列具有约5至约30个碱基。

45. 权利要求42至44中任一项的缀合物，其中所述PNA序列具有约10个碱基。

46. 权利要求42至45中任一项的缀合物，其中至少一个取代的核苷酸选自赖氨酸残基、具有少于20个氨基酸的肽序列、聚合物和miniPEG。

47. 权利要求46的缀合物，其中至少一个报告子部分与至少一个取代的核苷酸偶联。

肽核酸缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求在2017年12月18日提交的国际申请号PCT/US2017/66976的申请日的权益；且还要求在2017年12月18日提交的美国临时专利申请号62/599,810的申请日的权益，其公开内容在此以其整体通过引用并入本文。

[0002] 公开背景

细胞染色方法，包括免疫组织化学(IHC)和原位杂交分析(ISH)，是组织学诊断和组织形态学研究中的有用工具。IHC采用特异性结合剂或部分(诸如抗体)来检测可能存在于组织样品中的目标抗原。IHC广泛用于临床和诊断应用中，诸如以诊断特定疾病状态或病况。例如，可以基于从受试者获得的样品中特定标志物分子的存在来诊断特定癌症类型。IHC还广泛用于基础研究中，以理解不同组织中的生物标志物分布和定位。还可以使用原位杂交技术，诸如银原位杂交(SISH)、生色原位杂交(CISH)和荧光原位杂交(FISH)(统称为ISH)，检查生物样品。ISH与IHC的区别在于ISH检测组织中的核酸，而IHC检测组织中的蛋白。

[0003] 由生物体的基因组表达的多种蛋白的表征和定量是蛋白组学的焦点。多重免疫组织化学(mIHC)代表在石蜡包埋的福尔马林固定组织中检测和分析多变量蛋白靶标的主要未满足的技术需求，其在研究和诊断中具有广泛的应用。多重免疫组织化学(mIHC)技术试图解决在福尔马林固定、石蜡包埋的(FFPE)组织中检测和分析多变量蛋白靶标的需求。有效的mIHC技术在研究和诊断中具有广泛的应用。然而，存在很少(如果有的话)有效且可重复的方法，其允许同时和定量检测组织中的多种蛋白靶标。

[0004] 临床试验环境内的转化研究的关键约束是用于实施生物标志物分析的组织的量通常有限。此外，该组织经常存档并存储在FFPE块中。传统的基因表达分析方法对临床应用具有局限性。例如，RT-PCR一次测量一种基因的表达，而当评估低质量RNA样品(诸如来自FFPE的那些)时，覆盖数千种转录物的多重表达概况分析技术(诸如微阵列)通常是昂贵的，并且缺乏灵活性和可重复性。这些测定的评估是半定量的并且内在是主观的。这已导致增加聚焦于开发定量和高度多重测定法，其使得能够用单一测定法对多种标志物进行概况分析。因此，使得能够多重分析来自有限量的低质量材料的生物标志物的平台非常有吸引力。

[0005] 使得能够直接自动化检测核酸(DNA和/或RNA)的NanoString nCounter技术是一种相对新的技术，其已用于各种临床和研究应用中。通常，靶核酸(DNA或RNA)与使得核酸能够固定化至nCounter盒内的链霉抗生物素蛋白表面的生物素化DNA链(捕获链)和荧光标记的DNA链(报告子链，7Kb，其中约50个碱基与靶核酸互补)杂交。据信荧光标记的报告子链的自动化数字读出允许在一个样品内非扩增测量最多达800个核酸靶标。

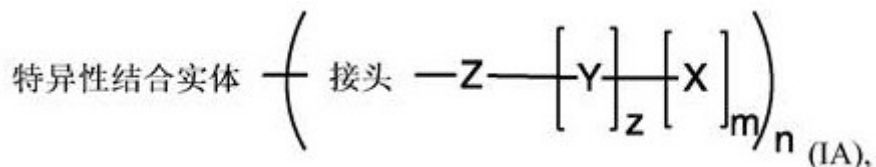
[0006] DNA抗体条形码化由用可以用作独特分子标签的可裂解DNA链标记抗体组成。将DNA抗体条形码化与NanoString nCounter技术组合，扩展了NanoString nCounter技术，以涵盖涉及多重蛋白分析的应用。

[0007] 可以以高亲和力和序列特异性结合基因序列中的所选靶标的合成分子在医学和生物技术背景中是令人感兴趣的。它们显示用于开发基因治疗剂、用于遗传分析的诊断装

置以及作为用于核酸操作的分子工具的前景。肽核酸 (PNA) 是一种核酸类似物, 其中天然核酸的糖磷酸主链已经被通常由 N-(2-氨基-乙基)-甘氨酸单元形成的合成肽骨架替换, 产生非手性和不带电荷的模拟物。据信其是化学稳定的并且耐受水解 (酶促) 裂解, 且因此预期其不在活细胞内被降解。PNA 能够遵循 Watson-Crick 氢键键合方案对 DNA 和 RNA 进行序列特异性识别, 并且杂合复合物表现出非凡的热稳定性和独特的离子强度效应。由于 PNA 不含电荷, 所以对于相同序列, PNA 和 DNA 之间的结合杂交强于 DNA 和 DNA 之间的结合杂交。

[0008] 公开简述

在本公开的一个方面是具有式 (IA) 的结构的多聚物:



其中

‘特异性结合实体’选自抗体 (例如一抗或二抗)、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸;

‘接头’是具有 2 至 80 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;

Z 选自包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的 PNA 序列、不带电荷的 DNA 序列和包含带电荷和不带电荷的碱基的 DNA 序列;

X 是标记物;

Y 是具有 1 至 12 个碳原子且任选地具有一个或多个 O、N 或 S 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;

m 是 0 或范围从 1 至 6 的整数;

z 是 0 或 1; 且

n 是范围从 1 至 12 的整数。

[0009] 在一些实施方案中, X 是生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。

[0010] 在一些实施方案中, ‘特异性结合实体’是一抗。在一些实施方案中, ‘特异性结合实体’是二抗。在一些实施方案中, ‘特异性结合实体’是核酸 (例如 DNA 或 RNA)。

[0011] 在一些实施方案中, Z 包括 DNA 序列, 所述 DNA 序列仅包含不带电荷的 DNA 碱基。在一些实施方案中, Z 包含 DNA 序列, 所述 DNA 序列包含带电荷和不带电荷的碱基的混合物。在一些实施方案中, Z 包含 DNA 序列, 其中 DNA 序列中至少 50% 的碱基不带电荷。

[0012] 在一些实施方案中, Z 包含具有至少两个在 γ 位置处具有取代基的 PNA 碱基的 PNA 序列。在一些实施方案中, Z 包含具有至少三个在 γ 位置处具有取代基的 PNA 碱基的 PNA 序列。在一些实施方案中, Z 包含具有至少四个在 γ 位置处具有取代基的 PNA 碱基的 PNA 序列。

[0013] 在一些实施方案中, 所述 PNA 序列的至少一个取代的核苷酸包括赖氨酸残基或包括报告子部分的赖氨酸残基。在一些实施方案中, 所述 PNA 序列的至少一个取代的核苷酸包含包括至少一个报告子部分的 miniPEG。在一些实施方案中, 所述 PNA 序列的至少一个取代的核苷酸包括具有至少一个报告子部分的聚合物。在一些实施方案中, 所述 PNA 序列的至少一个取代的核苷酸包含包括至少一个报告子部分 (例如色原、荧光团) 的肽。

[0014] 在一些实施方案中, PNA 序列包含约 5 至 20 个碱基。在一些实施方案中, PNA 序列包

含约5至15个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约10个碱基。

[0015] 在一些实施方案中，'特异性结合实体'是一抗，且Z是PNA序列或在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列。在一些实施方案中，'特异性结合实体'是一抗，且Z是具有10个核苷酸的PNA序列。在一些实施方案中，'特异性结合实体'是一抗，且Z是在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列。

[0016] 在一些实施方案中，'接头'包含能够被裂解的基团，例如，光可裂解基团，酶促裂解基团，化学可裂解基团，在某些pH下可裂解的基团。在一些实施方案中，'接头'包含一个或多个如本文所述的赋予水溶性的基团（例如一个或多个PEG基团）。

[0017] 在本公开的另一个方面是具有式 (IIB) 的结构的缀合物：



其中

'特异性结合实体'选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

'接头'是具有2至80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；

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列；

X是标记物；

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数。

[0018] 在一些实施方案中，X是生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。

[0019] 在一些实施方案中，所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中，至少两个 γ PNA碱基各自被相同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中，至少两个 γ PNA碱基各自被不同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中，所述氨基酸、miniPEG、肽或聚合物包括至少一个报告子部分（例如荧光团、色原）。在一些实施方案中，所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中，所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

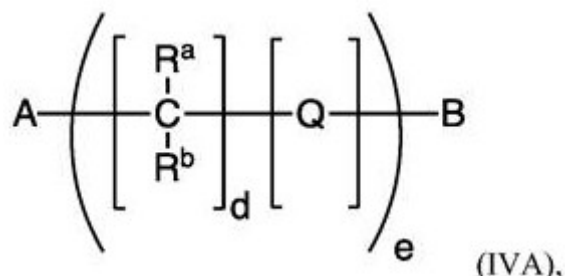
[0020] 在一些实施方案中，所述PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中，所述PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中，所述PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中，所述PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中，所述PNA序列包含约10个碱基。

[0021] 在一些实施方案中，'特异性结合实体'是一抗。在一些实施方案中，'特异性结合实体'是二抗。在一些实施方案中，X是生物素。在一些实施方案中，m是0，z是0，且n大于1。在一些实施方案中，n是范围从2至6的整数。在一些实施方案中，'接头'包含至少一个PEG基

团。

[0022] 在一些实施方案中，‘特异性结合实体’是一抗，且所述PNA序列包含10个核苷酸。在一些实施方案中，‘特异性结合实体’是一抗，且所述PNA序列包含至少两个在 γ 位置处具有取代基的核苷酸。

[0023] 在一些实施方案中，‘接头’具有式(IVA)中描绘的结构：



其中

d和e是各自独立地范围从2至20的整数；

Q是键、O、S或N(R^c)(R^d)；

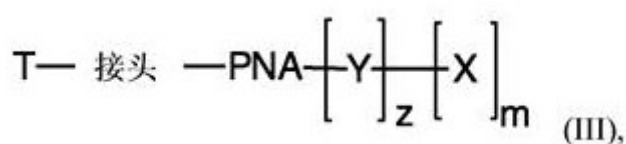
R^a 和 R^b 独立地是H、C₁-C₄烷基基团、F、Cl或N(R^c)(R^d)；

R^c 和 R^d 独立地是CH₃或H；且

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。

[0024] 在一些实施方案中，d和e是范围从2至6的整数。在一些实施方案中，A或B中的至少一个包含可裂解部分。在一些实施方案中，所述可裂解部分是光可裂解基团。在一些实施方案中，所述可裂解部分是化学可裂解基团。在一些实施方案中，‘特异性结合实体’是抗体，‘接头’包含至少一个PEG基团，m是0，z是0，且n大于1。在一些实施方案中，‘特异性结合实体’是抗体，‘接头’包含至少一个PEG基团，且n大于1。在一些实施方案中，‘接头’进一步包含至少一个可裂解基团。在一些实施方案中，X是半抗原。

[0025] 在本公开的另一个方面是具有式(III)的结构的寡聚物：



其中

T是具有1至4个碳原子且任选地被O、N或S取代且具有末端反应性部分的基团；

‘接头’是具有2至80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；

‘PNA’是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列；

X是标记物；

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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；

m是0或范围从1至6的整数；且

z是0或1。

[0026] 在一些实施方案中,X是生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。

[0027] 在一些实施方案中,X是生物素。

[0028] 在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被相同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被不同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,所述氨基酸、miniPEG、肽或聚合物包括至少一个报告子部分(例如荧光团、色原)。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

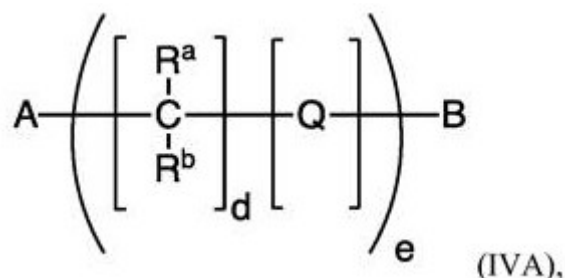
[0029] 在一些实施方案中,所述PNA序列的至少一个取代的核苷酸包括赖氨酸残基、肽或miniPEG,其中赖氨酸残基、肽或miniPEG各自可具有一个或多个与其偶联的报告子部分。

[0030] 在一些实施方案中,PNA序列,包括在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列,包含约5至20个碱基。在一些实施方案中,PNA序列,包括在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列,包含约5至15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列,包括在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列,包含约5至10个碱基。在一些实施方案中,PNA序列,包括在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列,包含约15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列,包括在 γ 位置处具有一个或多个取代基的PNA序列,包含约10个碱基。

[0031] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且PNA序列包含10个核苷酸。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且PNA序列在一个 γ 位置处包括至少一个取代基。

[0032] 在一些实施方案中,m是0,z是0,且n大于1。

[0033] 在一些实施方案中,n是范围从2至6的整数。在一些实施方案中,'接头'包含至少一个PEG基团。在一些实施方案中,'接头'具有式(IVA)中描绘的结构:



其中

d和e是各自独立地范围从2至20的整数;

Q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);

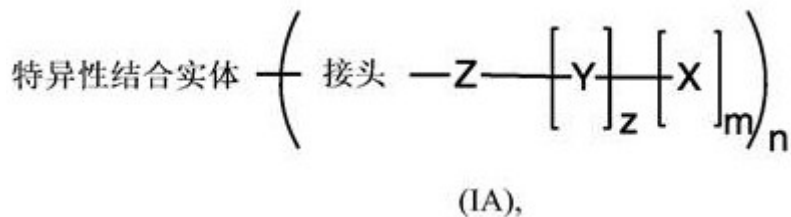
R^c 和 R^d 独立地是 CH_3 或H;且

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。

[0034] 在一些实施方案中,d和e是范围从2至6的整数。在一些实施方案中,A或B中的至少一个包含可裂解部分。在一些实施方案中,所述可裂解部分是光可裂解基团。在一些实施方案中,所述可裂解部分是化学可裂解基团。

[0035] 在本公开的另一个方面是检测样品中的靶标的方法,其包括:

(a) 使所述样品与第一缀合物接触,所述第一缀合物具有式 (IA) 的结构:



其中

'特异性结合实体'选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸;

'接头'是具有2至80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;

Z选自包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列、不带电荷的DNA序列和包含带电荷和不带电荷的碱基的DNA序列;

X是标记物;

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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;

m是0或范围从1至6的整数;

z是0或1;且

n是范围从1至12的整数;和

(b) 使所述样品与第一检测试剂接触以便于所述第一缀合物的检测。

[0036] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括使所述样品与式 (IA) 的第二缀合物接触,其中所述第一和第二缀合物是不同的(例如包括不同的特异性结合实体和/或不同的标记物)。

[0037] 在一些实施方案中,X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。

[0038] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且Z是PNA序列或 γ PNA序列。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且Z是具有10个核苷酸的PNA序列。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且Z是 γ PNA序列。

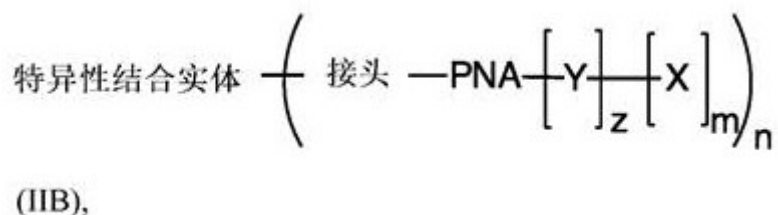
[0039] 在一些实施方案中,Z包含仅包含不带电荷的DNA碱基的DNA序列。在一些实施方案中,Z包含DNA序列,其包含带电荷和不带电荷的碱基的混合物。在一些实施方案中,Z包含DNA序列,其中DNA序列中至少50%的碱基不带电荷。

[0040] 在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被相同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被不同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,所述氨基酸、miniPEG、肽或聚合物包括至少一个报告子部分(例如荧光团、色原)。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0041] 在一些实施方案中,PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约10个碱基。

[0042] 在本公开的另一个方面是检测样品中的靶标的方法,其包括:

(a) 使所述样品与第一PNA缀合物接触,所述第一PNA缀合物具有式(IIB)的结构:



其中

'特异性结合实体'选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸;

'接头'是具有2至80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;

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列;

X是标记物;

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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;

m是0或范围从1至6的整数;

z是0或1;且

n是范围从1至12的整数;和

(b) 使所述样品与第一检测试剂接触以便于PNA缀合物的检测。

[0043] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括使所述样品与第二PNA缀合物(例如式(IIB)的另一缀合物)接触,其中所述第一PNA缀合物和所述第二PNA缀合物是不同的,即具有至少一个不同的组分或部分。

[0044] 在一些实施方案中,X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。

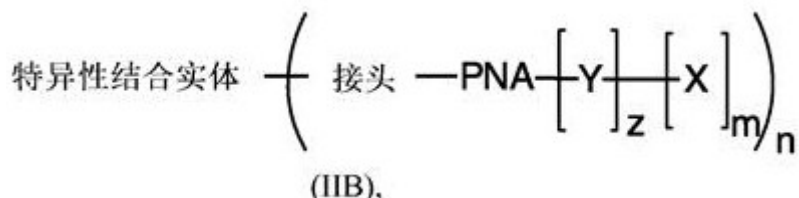
[0045] 在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被相同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,至少两个 γ PNA碱基各自被不同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中,所述氨基酸、miniPEG、肽或聚合物包括至少一个报告子部分(例如荧光团、色原)。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0046] 在一些实施方案中,PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约10个碱基。

[0047] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且其中所述一抗对第一靶标是特异性的。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是二抗,且其中所述方法进一步包括在使所述样品与第一缀合物接触前,使所述样品与对第一靶标特异性的一抗接触的步骤,且其中所述第一缀合物对第一抗是特异性的。在一些实施方案中,所述第一检测试剂是对所述缀合物的标记物特异性的抗标记物抗体。在一些实施方案中,所述标记物是半抗原,且所述抗标记物抗体是抗半抗原抗体。在一些实施方案中,所述检测试剂包含与第一缀合物的PNA序列或 γ PNA序列互补的PNA、 γ PNA或DNA序列,所述互补PNA、 γ PNA或DNA序列与报告子部分缀合。在一些实施方案中,所述报告子部分是荧光团。在一些实施方案中,所述报告子部

分是色原。在一些实施方案中,所述报告子部分是酶。在一些实施方案中,所述报告子部分是半抗原,且其中所述方法进一步包括使所述样品与对互补PNA、 γ PNA或DNA序列的半抗原特异性的抗半抗原抗体接触。

[0048] 在本公开的另一个方面是检测样品中的靶标的方法,其包括:(a)使所述样品与第一PNA缀合物接触,所述第一PNA缀合物具有式(IIB)的结构:



其中

'特异性结合实体'选自抗体(例如一抗或二抗)、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸;

'接头',包括可裂解基团或部分,其为具有2至80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;

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列;

X是标记物;

Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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;

m是0;

z是0;且

n是范围从1至12的整数;和

(b)使所述样品与试剂(或光源,取决于所选择的可裂解基团)接触以裂解'接头'上的可裂解基团;和(c)定量裂解的'PNA'序列或 γ PNA序列的量。

[0049] 技术人员将理解,上面鉴定的步骤可以用不同的PNA缀合物(例如任何式(IIB)的缀合物)重复任何次数以提供多重测定。

[0050] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是抗体。

[0051] 在一些实施方案中,所述可裂解基团选自光可裂解基团、化学可裂解基团或酶促可裂解基团。在一些实施方案中,所述可裂解基团是二硫键。

[0052] 在一些实施方案中,X选自生物素、酶、色原、荧光团、半抗原和质谱标签。在一些实施方案中,X是生物素。

[0053] 在一些实施方案中,使用NanoString nCounter技术(诸如本文所述)进行PNA序列的量的定量。在一些实施方案中,使用Gyrolab技术(诸如本文所述)进行PNA序列的量的定量。

[0054] 在一些实施方案中,在PNA切割之后,用常规方法(诸如免疫组织化学或免疫荧光)重新染色抗体结合的组织切片,以允许显现由PNA标签编码的标志物的空间分布。

[0055] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括引入与式(IIB)的缀合物的PNA序列互补的单链DNA或PNA序列。在一些实施方案中,互补的单链DNA或PNA序列与报告子部分缀合。在一些实施方案中,互补的单链DNA或PNA序列与半抗原缀合。在一些实施方案中,互补的单链DNA或PNA序列与洋地黄毒苷缀合。

[0056] 在一些实施方案中, '特异性结合实体' 是一抗, 且其中所述方法进一步包括引入对一抗特异性的二抗。在一些实施方案中, 所述二抗与报告子部分缀合。

[0057] 在一些实施方案中, 所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中, 至少两个 γ PNA碱基各自被相同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中, 至少两个 γ PNA碱基各自被不同的氨基酸、miniPEG、肽或聚合物取代。在一些实施方案中, 所述氨基酸、miniPEG、肽或聚合物包括至少一个报告子部分 (例如荧光团、色原)。在一些实施方案中, 所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中, 所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0058] 在一些实施方案中, PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中, PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中, PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中, PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中, PNA序列包含约10个碱基。

[0059] 据信由于PNA不含电荷, 与DNA不同, PNA和DNA之间的结合强于DNA和DNA之间的结合, 允许使用相对更短的PNA序列标记抗体, 同时实现用DNA-缀合物不可能实现的结合亲和力和特异性。还预期较短的PNA序列可有助于使其对抗体-抗原结合和组织非特异性结合的干扰最小化。因此, 预期本文公开的PNA-抗体缀合物维持抗体的结合特异性, 而PNA寡聚物作为独特的分子标签发挥功能, 所述独特的分子标签可通过与信号产生分子杂交在载片 (IF或IHC) 上原位显现, 或通过高通量技术诸如NanoString技术、Gryos技术或质谱, 脱离载片定量 (参见图1A)。此外, 可以在几乎相同的条件下, 容易地生成和检测几乎无限的独特序列/标签, 消除了优化单个缀合物的需要。重要地, 可裂解接头 (光可裂解的或化学可裂解的) 可以置于PNA寡聚物和抗体之间 (参见图1A), 允许容易收集样品用于脱离载片的蛋白概况分析 (多重定量)。

[0060] 附图简述

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。

[0061] 图1A提供了PNA缀合物的结构及其在 (定性) 显现样品内的靶标和定量评价从结合抗体裂解的PNA标签中的用途的概述。

[0062] 图1B提供了异双官能交联剂和PNA序列的化学结构。

[0063] 图2A举例说明在PNA缀合之前基于UV-Vis吸光度的抗体和相应的PNA缀合物的表征。黑色和红色迹线代表两种不同的抗体作为实例。

[0064] 图2B举例说明在PNA缀合之后基于UV-Vis吸光度的抗体和相应的PNA缀合物的表征。黑色和红色迹线代表两种不同的抗体作为实例。

[0065] 图3A举例说明生物素化的PNA的IHC检测。该图举例说明用兔抗CD45抗体、随后分别用PNA-缀合的GAR、GAM和GAM处理的扁桃载体片。然后用SA-HRP和DAB沉积检测生物素。

[0066] 图3B举例说明生物素化的PNA的IHC检测。该图举例说明用小鼠抗Ki67抗体、随后分别用PNA-缀合的GAR、GAM和GAM处理的扁桃载体片。然后用SA-HRP和DAB沉积检测生物素。

[0067] 图3C举例说明生物素化的PNA的IHC检测。该图举例说明不用一抗、随后分别用PNA-缀合的GAR、GAM和GAM处理的扁桃载体片。然后用SA-HRP和DAB沉积检测生物素。

[0068] 图3D举例说明根据本公开的一些实施方案的使用生物素化的PNA的检测策略。

[0069] 图4A举例说明作为膜标志物的生物素化的PNA的IHC检测。扁桃载体片用“半抗原

化”一抗(即用半抗原标记的抗体)处理,随后用针对相应的半抗原的对应的PNA-缀合物处理。然后用SA-HRP和DAB沉积检测PNA缀合物中的生物素。

[0070] 图4B举例说明作为核标志物的生物素化的PNA的IHC检测。扁桃体载片用“半抗原化”一抗处理,随后用针对相应的半抗原的对应的PNA-缀合物处理。然后用SA-HRP和DAB沉积检测PNA缀合物中的生物素。

[0071] 图5A举例说明PNA标签的化学裂解。扁桃体载片用小鼠抗Ki67抗体处理,并用SA-HRP和DAB沉积进一步处理。

[0072] 图5B举例说明PNA标签的化学裂解。扁桃体载片用小鼠抗Ki67抗体处理,并用约20 mM TCEP进一步处理,然后进行SA-HRP孵育和DAB沉积。

[0073] 图5C举例说明PNA标签的化学裂解。扁桃体载片用兔抗CD45抗体处理,并用SA-HRP和DAB沉积进一步处理。

[0074] 图5D举例说明PNA标签的化学裂解。扁桃体载片用兔抗CD45抗体处理,并用约20 mM TCEP进一步处理,然后进行SA-HRP孵育和DAB沉积。

[0075] 图6A举例说明生物素化的PNA的荧光检测。扁桃体载片用小鼠抗Ki67抗体处理,随后用PNA-缀合的GAR处理。将载片进一步与SA-FITC孵育。

[0076] 图6B举例说明生物素化的PNA的荧光检测。扁桃体载片不用一抗处理,随后用PNA-缀合的GAR处理。将载片进一步与SA-FITC孵育。

[0077] 图6C举例说明利用生物素化的PNA的基于荧光的检测方案。

[0078] 图7A记载基于裂解的PNA-SA-FITC荧光强度的每个载片的抗体的定量测量。具体地,条形图显示从用小鼠抗CD45、PNA缀合的GAR、随后SA-FITC处理且最后与20 mM TCEP孵育的扁桃体载片裂解的PNA-SA-FITC的荧光强度。对照是与实验相同处理、但没有一抗的扁桃体载片。

[0079] 图7B记载基于裂解的PNA-SA-FITC荧光强度的每个载片的抗体的定量测量。具体地,使用标准曲线测定从实验和对照载片裂解的PNA-SA-FITC的浓度。样品和对照的荧光强度显示为平均值 $\pm$ STDEV (N=3)。

[0080] 图8A举例说明用荧光标记的互补DNA检测PNA。扁桃体载片用兔抗Ki67处理,随后用PNA缀合的GAR处理。然后将载片与荧光标记的DNA序列一起孵育,所述DNA序列与PNA标签互补。利用FITC标记的DNA序列。

[0081] 图8B举例说明用荧光标记的互补DNA检测PNA。扁桃体载片未用一抗处理,且因此充当阴性对照。然后将载片与荧光标记的DNA序列一起孵育,所述DNA序列与PNA标签互补。利用FITC标记的DNA序列。

[0082] 图8C举例说明用荧光标记的互补DNA检测PNA。扁桃体载片用兔抗Ki67处理,随后用PNA缀合的GAR处理。然后将载片与荧光标记的DNA序列一起孵育,所述DNA序列与PNA标签互补。利用罗丹明标记的DNA序列。除了没有添加一抗外条件相同的阴性对照分别显示于图8B和图8D中。

[0083] 图8D举例说明用荧光标记的互补DNA检测PNA。扁桃体载片未用一抗处理,且因此充当阴性对照。然后将载片与荧光标记的DNA序列一起孵育,所述DNA序列与PNA标签互补。利用罗丹明标记的DNA序列。

[0084] 图8E提供了用于生成图8A、8B、8C和8D的图像的检测方法的示意图。

[0085] 图9A举例说明用互补的半抗原化DNA的生色检测。扁桃体载片用小鼠抗CD20一抗处理,且然后与PNA缀合的GAM孵育,随后与DIG标记的DNA序列杂交,所述DNA序列与PNA标签互补。最后,将载片与抗DIG:HRP抗体孵育并DAB沉积。

[0086] 图9B举例说明用互补的半抗原化DNA的生色检测。扁桃体载片用兔抗Ki67处理,且然后与PNA缀合的GAM孵育,随后与DIG标记的DNA序列杂交,所述DNA序列与PNA标签互补。最后,将载片与抗DIG:HRP抗体孵育并DAB沉积。

[0087] 图9C举例说明以与图9A和9B中呈现的组织相同的方式处理、但未用一抗处理的扁桃体组织,因此充当阴性对照。

[0088] 图9D记载用于生成图9A、9B和9C的图像的检测方案的示意图。

[0089] 图10举例说明光可裂解的异双官能交联剂的可能合成方案。

[0090] 图11举例说明用于合成光可裂解PNA的光不稳定接头的化学结构。

[0091] 图12A举例说明PNA的光裂解。载片用Ki67处理,然后用GAR-PL-PNA处理。载片用手持UV灯照射0分钟。

[0092] 图12B举例说明PNA的光裂解。载片用Ki67处理,然后用GAR-PL-PNA处理。载片用手持UV灯照射5分钟。

[0093] 图12C举例说明PNA的光裂解。载片用Ki67处理,然后用GAR-PL-PNA处理。载片用手持UV灯照射10分钟。

[0094] 图13举例说明选择性PNA光裂解。扁桃体载片用Ki67处理,然后用GAR-PL-PNA处理。然后用来自激光捕获显微切割仪器的UV光照射-指示区域。LCM在洗涤载片以除去裂解的PNA之后,用SA-HRP和DAB检测完成染色。与同一载片上的未照射的生发中心相比,UV照射的生发中心失去颜色。

[0095] 图14A记载概述使用本公开的PNA缀合物检测样品中的靶标的各种方法的流程图。

[0096] 图14B记载概述使用本公开的PNA缀合物检测样品中的靶标的各种方法的流程图。

[0097] 图14C记载概述使用本公开的PNA缀合物检测样品中的靶标的各种方法的流程图。

[0098] 图15举例说明PNA抗体缀合物的稳定性。将扁桃体载片与一抗(抗CD45和抗Ki67)孵育,随后分别与GAM-PNA和GAR-PNA孵育,并用SA-HRP和DAB沉积进行检测。在如所示的后来时间使用相同的抗体-PNA缀合物来评价缀合物稳定性。

[0099] 图16举例说明在 γ -碳处具有取代基(由“R”基团指示,其为非限制性的)的PNA和在 γ -碳处不具有取代基的PNA之间的差异。

[0100] 图17举例说明分支的PNA序列。主要的PNA序列(以红色描绘)具有4个取代的PNA碱基。主要的PNA序列的取代基是 γ -PNA序列(以黑色描绘)。每个PNA序列具有4个取代基。这些取代基可以显示为包括四个 γ PNA核苷酸,其各自被miniPEG或其他报告子部分取代。每个miniPEG可以包含一个或多个标记物或报告子部分。

[0101] 图18是举例说明抗体与PNA寡聚物的缀合的示意图,利用“点击化学”偶联。此处,还原的抗体用DBCO基团官能化,且然后与包含叠氮化物基团的PNA寡聚物偶联。PNA寡聚物可以包含一个或多个在 γ 碳处具有取代基的核苷酸。

[0102] 图19举例说明与抗Ki67一抗(兔mAb)和GAR-PNA(用点击化学缀合)二抗孵育并用SA-HRP检测的扁桃体组织。该图像显示PNA经由点击化学成功缀合至抗体。

[0103] 图20是举例说明抗体经由马来酰亚胺部分与PNA寡聚物的缀合的示意图。

[0104] 图21A举例说明与抗Ki67、然后GAR-短PNA (序列显示在前一图片中) 孵育并用SA-HRP检测的扁桃体组织。短PNA序列上的生物素的检测。该图像显示短PNA成功缀合在Ab上。

[0105] 图21B举例说明与抗Ki67、然后GAR-HRP孵育的扁桃体组织。该图像显示短PNA成功缀合在Ab上。这用于将标准检测 (图21B) 与基于GAR短PNA的检测 (图21A) 进行比较。

[0106] 图22A举例说明与CD3-短PNA孵育并用SA-HRP检测的扁桃体。与一抗缀合的短PNA的IHC。使用的Ab-短PNA缀合物的浓度为5 μ g/mL (PNA序列: 生物素-o-CCATCTTCAG-Lys (SMCC) 序列) (SEQ ID NO:19)。

[0107] 图22B、22C和22D举例说明与一抗-短PNA缀合物的第二、第三和第四实例 (分别为CD8-短PNA、CD34-短PNA和Ki67-短PNA) 孵育的扁桃体。

[0108] 图23举例说明用与被称为sPNA2的 (10个碱基) PNA序列缀合的CD3的生色染色, 所述PNA序列具有以下序列: 生物素-o-TTAGTCCAAC-Lys (SMCC) (SEQ ID NO:20)。扁桃体组织用PNA-缀合的Ab染色, 随后用SA-HRP染色, 以靶向PNA序列上的生物素部分。所述染色是局部的, 证明PNA缀合不改变Ab功能。

[0109] 图24举例说明用与sPNA2 (10个碱基) 缀合的CD8的生色染色, 其中PNA序列是生物素-o-CCATCTTCAG-Lys (C₆SH) (SEQ ID NO:21)。扁桃体组织用PNA-缀合的Ab染色, 随后用SA-HRP染色, 以靶向PNA序列上的生物素部分。所述染色是局部的, 证明PNA缀合不改变Ab功能。

[0110] 图25举例说明与抗Ki67和GAR-短PNA、随后DNA-DIG (与称为AB14的短PNA标签互补的DNA序列, 其在其末端具有DIG) 孵育的扁桃体组织。添加抗DIG-HRP抗体用于检测。在这种情况下, 检测到与PNA标签互补的DNA。显示两种不同浓度的互补DNA-DIG。

[0111] 图26举例说明经由DNA缀合的荧光双链化。该图进一步举例说明通过杂交检测, 但这次通过荧光检测。互补DNA包括一个或多个荧光标签。将两种一抗CD3和CD8分别与两种不同的短PNA标签缀合。两个互补DNA序列各自都具有荧光团。

[0112] 图27A、27B和27C举例说明与抗CD3-短PNA1和抗CD8-短PNA2 (分别为与短PNA1和短PNA2缀合的抗CD3和抗CD-8) 的混合物孵育、随后与被称为AB15和AB19的分别与sPNA1和sPNA2互补的2个DNA序列孵育的扁桃体组织载片。AB15在其末端具有AlexaFluor 488, 而AB19在其末端具有AlexaFluor 647。两个荧光标记的DNA序列结合在组织上的其互补PNA序列, 以生成荧光染色的组织载片。用荧光显微镜对荧光染色的组织成像。绿色通道 (图27A) 显示CD3阳性细胞上的AlexaFluor 488。红色通道 (图27B) 显示在相同视野的CD8阳性细胞上的AlexaFluor 647。两个图像的合并 (图27C) 显示所有红色细胞 (CD8阳性) 也是绿色 (CD3阳性), 因为所有表达CD8的细胞的确都表达CD3。一些绿色细胞不是红色的, 因为并非所有CD3细胞都是CD8。CD8是CD3的亚群。

[0113] 图28举例说明与抗Ki67 (兔mAb) 孵育、随后与GAR- γ -PNA (与 γ -PNA缀合的山羊抗兔) 孵育且最后与将结合 γ -PNA的末端处的生物素的链霉抗生物素蛋白-HRP孵育的扁桃体组织。该信号如所预期, 且没有观察到非特异性信号。

[0114] 图29A举例说明与缀合至 γ -PNA的一抗孵育并用SA-HRP检测的扁桃体组织。以2种放大倍数 (20x和40x) 显示不同浓度的CD3- γ -PNA (10 μ g/mL、5 μ g/mL、1 μ g/mL)。这显示一抗也可以与 γ PNA缀合并直接检测。

[0115] 图29B提供了以不同浓度 (10 μ g/mL、5 μ g/mL、1 μ g/mL) 与 γ PNA缀合的一抗 (CD8) 的

另一个实例。

[0116] 图29C提供了以不同浓度(1.5 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL)与 γ -PNA缀合的一抗(PD-L1)的另一个实例。

[0117] 图30举例说明GAR-PNA和GAR- γ PNA缀合物的UV吸收。在这里,所述抗体主要吸收在280nm处的光;而PNA主要吸收主要在260 nm处的光。当PNA与抗体缀合时,在260处的吸光度增加。比率260nm/280nm用于评价缀合效率。260nm/280nm比率的增加表明更高的PNA载量,这是预期的,因为 γ -PNA比没有任何 γ 取代基的PNA更亲水。未缀合的抗体(纯抗体)的260nm/280nm比率为约0.58,当与PNA缀合时,其增加至1.1,且当与 γ -PNA缀合时,其增加至1.3。

[0118] 图31举例说明GAR、CD3和CD8-短PNA缀合物的UV吸光度和260/280比率。显示,当PNA与抗体缀合时,260nm/280nm比率增加。

[0119] 图32举例说明使用Gryos技术用于定量PNA的原理。

[0120] 图33提供了举例说明使用Gryos技术定量裂解的PNA标签并通过IHC重新染色载片以允许显现由PNA标签编码的相同标志物的步骤的示意图。

[0121] 图34A举例说明从PNA-抗体缀合物裂解PNA序列或 γ PNA序列后蛋白靶标的IHC染色。

[0122] 图34B举例说明从PNA-抗体缀合物裂解PNA序列或 γ PNA序列后蛋白靶标的IHC染色。

[0123] 图35A提供了使用Gyros技术检测不同的PNA寡聚物和DNA寡聚物的比较。

[0124] 图35B举例说明使用Gyros技术检测的PNA的信噪比(S/B)。

[0125] 图36A举例说明用Ki67(兔Ab)染色、然后用与PNA序列(CCATCTTCAG)缀合的山羊抗兔(GAR)染色的扁桃体。不存在信号(如此处所示)表明在实验条件(200 nM DNA, 37 $^{\circ}$ C, 30 min)下,DNA没有杂交。DNA PNA亲和力不足够强得足以确保在实验条件下与如此短的PNA序列杂交。

[0126] 图36B举例说明用Ki67(兔Ab)染色、然后用与 γ PNA序列缀合的山羊抗兔(GAR)染色的扁桃体。据信DNA γ PNA亲和力强得足以确保杂交,因此生成棕色信号。

[0127] 详述

通常,本公开涉及缀合物,例如,PNA缀合物,以及采用所述缀合物用于检测生物样品(例如,组织样品)中的一种或多种靶标的方法。不希望受任何特定理论束缚,据信当在测定中使用时,缀合物允许同时定量和定量评估大量靶标,包括蛋白靶标(参见图1A)。

[0128] 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。

[0129] 如本文在说明书中和在权利要求中所用,“或”应当理解为具有与上面定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分隔项目时,“或”或“和/或”应当解释为包括性的,即,包括数字或要素列表中的至少一个,但是也包括超过一个,且任选地包括另外的未列出的项目。仅清楚地相反指出的术语,诸如“中的仅一个”或“中的刚好一个”,或者,当用在权利要求中时,“由……组成”,将是指包括数字或要素列表中的刚好一个要素。一般而言,当前面存在排它性术语诸如“任一个”、“之一”、“中的仅一个”或“中的刚好一个”时,本文中使用的术语“或”仅应当解释为指示排它替代物(即“一个或另一个,但是并非二者”)。当用在权利

要求中时,“基本上由……组成”应当具有如在专利法领域中所用的它的普通含义。

[0130] 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。

[0131] 如本文在说明书中和在权利要求中所用,提到一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应当被理解是指至少一个选自要素列表中的任意一个或多个要素的要素,但不一定包括在所述要素列表内明确地列出的每个和每一个要素中的至少一个,且不排除所述要素列表中的要素的任意组合。该定义也允许可以任选地存在除了在短语“至少一个”所提及的要素列表内明确地指出的要素以外的要素,无论与明确地指出的那些要素有关还是无关。因而,作为一个非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或,等同地,“A或B中的至少一个”,或,等同地“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可以是指,至少一个(任选地包括超过一个)A,且不存在B(且任选地包括除了B以外的要素);在另一个实施方案中,是指至少一个(任选地包括超过一个)B,且不存在A(且任选地包括除了A以外的要素);在另一个实施方案中,是指至少一个(任选地包括超过一个)A,和至少一个(任选地包括超过一个)B(且任选地包括其他要素);等。

[0132] 如本文所用,术语“烷基”是指包含完全饱和的(无双键或三键)烃基的直链或支链烃链。烷基基团可以是被取代的或未被取代的。

[0133] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,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)的免疫响应过程中产生的类似分子和抗体片段(诸如本领域已知的F(ab')₂片段、Fab'片段、Fab'-SH片段和Fab片段,重组抗体片段(诸如sFv片段、dsFv片段、双特异性sFv片段、双特异性dsFv片段、F(ab')₂片段、单链Fv蛋白(“scFv”)、二硫化物稳定的Fv蛋白(“dsFv”)、双抗体和三抗体(如本领域已知的)和骆驼科动物抗体),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。

[0134] 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。

[0135] 如本文所用,术语“生物样品”或“组织样品”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。样品可以是肿瘤样品,包括来自黑色素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌的那些。在一些实施方案中,通过检测组织样品内的靶标(包括生物标志物(例如蛋白或核酸序列))来分析样品的疾病状态,诸如癌症。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”样品或“对照”样品的不具有异常、疾病、病症等的样品。例如,通过从多个位置取组织样品来测试受试者的癌症可能是有用的,并且这些样品可以用作对照并与后来的样品进行比较以确定特定癌症是否已经扩散到其主要来源之外。在一些实施方案中,样品可以通过常规蛋白提取方法从细胞裂解物、组织或整个生物体中提取和纯化的蛋白。在本公开的上下文中,然后可以将提取的蛋白与PNA-缀合的抗体混合,其中所述抗体变得与特定蛋白结合。然后释放PNA并计数以定量蛋白。

[0136] 如本文所用,其中“a”和“b”是整数的“C_a至C_b”是指烷基、烯基或炔基基团中的碳原子数,或环烷基、环烯基、环炔基或芳基基团的环中的碳原子数,或杂烷基、杂环基、杂芳基或杂脂环基基团中的碳原子和杂原子的总数。也就是说,烷基,烯基,炔基,环烷基的环,环烯基的环,环炔基的环,芳基的环,杂芳基的环或杂脂环基的环可以含有“a”至“b”(包括端值)个碳原子。因此,例如,“C₁至C₄烷基”基团是指具有1-4个碳的所有烷基基团,即CH₃—、CH₃CH₂—、CH₃CH₂CH₂—、(CH₃)₂CH—、CH₃CH₂CH₂CH₂—、CH₃CH₂CH(CH₃)—和(CH₃)₃C—。如果关于烷基、烯基、炔基、环烷基环烯基、环炔基、芳基、杂芳基或杂脂环基基团没有指定“a”和“b”,则假定这些定义中描述的最宽范围。

[0137] 如本文所用,“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(和/或材料诸如纳米颗粒)。

[0138] 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。

[0139] 如本文所用,术语“检测探针”包括结合特定靶标(例如核酸序列、蛋白等)的核酸探针或一抗。所述检测探针可包括用于直接检测的标记物,诸如放射性同位素、酶底物、辅因子、配体、化学发光或荧光剂、半抗原(包括但不限于DNP)和酶。或者,所述检测探针可以不含标记物或标签,并且可以间接检测(例如,使用对检测探针特异性的二抗)。

[0140] 如本文所用,术语“ γ PNA”和“ γ PNA序列”是指具有至少一个在 γ 位置、即在 γ 碳处包含取代基的核苷酸的任何PNA序列。图16举例说明PNA核苷酸和在 γ -碳位置处具有取代基的PNA核苷酸之间的差异,其中“R”基团仅用于举例说明目的,并且是非限制性的。

[0141] 如本文所用,术语“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唑类(例如硝基吡唑类);硝基苯基化合物;苯并呋喃类;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；苯并呋喃类；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。

[0142] 如本文所用，术语“卤素原子”或“卤素”意指元素周期表的第7列的任何一种放射稳定原子，诸如氟、氯、溴和碘。

[0143] 如本文所用，术语“免疫组织化学”是指通过检测抗原与特异性结合剂（诸如抗体）的相互作用来确定样品中抗原的存在或分布的方法。在允许抗体-抗原结合的条件下，将样品与抗体接触。抗体-抗原结合可以通过与抗体缀合的可检测标记物的方式（直接检测）或通过与特异性结合一抗的二抗缀合的可检测标记物的方式（间接检测）来检测。

[0144] 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）。

[0145] 如本文所用，术语“寡核苷酸”、“多核苷酸”和“核酸”在此用于涵盖所有形式的核酸分子。非限制性地，该类别包括核糖核酸（RNA）、脱氧核糖核酸（DNA）、肽核酸（PNA）及其衍生物，其分别具有和不具有修饰。

[0146] 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。一抗因此可以充当用于检测组织样品内靶标的“检测探针”。

[0147] 如本文所用，术语“肽核酸”或“PNA”是寡核苷酸类似物，其中糖-磷酸酯骨架已被假肽骨架取代。PNA以高特异性和选择性结合DNA和RNA，产生PNA-RNA和PNA-DNA杂合体，其据信比相应的核酸复合物更稳定。通过将立体中心（诸如基于D-Lys的单元）引入PNA骨架中，可以修饰PNA对核酸的结合亲和力和选择性。PNA可以是寡聚物、连接的聚合物或嵌合寡聚物。PNA的化学合成和组装的方法描述于美国专利号 5,539,082、5,527,675、5,623,049、5,714,331、5,736,336、5,773,571和5,786,571，其公开内容在此以其整体通过引用并入本文。如全文所用的术语“PNA”包括具有一个或多个在 γ 位置处被取代的碱基的PNA序列（“ γ PNA”），即，术语PNA或PNA序列包括 γ PNA或 γ PNA序列。

[0148] 如本文所用，如全文所用的术语“反应性基团”、“反应性基团”意指适合于将第一单元偶联至如本文所述的第二单元的各种基团（例如官能团）中的任一种。例如，反应性基团可能是胺反应性基团，诸如异硫氰酸酯，异氰酸酯，酰基叠氮化物，NHS酯，酰氯，诸如磺酰氯，醛和二醇，环氧化物和氧杂环己烷，碳酸酯，芳基化剂，酰亚胺酯，碳二亚胺，酸酐及其组合。合适的硫醇反应性官能团包括卤代乙酰基和烷基卤化物，马来酰亚胺，氮丙啶，丙烯酰基衍生物，芳基化剂，硫醇-二硫化物交换试剂，诸如吡啶基二硫化物，TNB-硫醇和二硫化物还原剂，及其组合。合适的羧酸酯反应性官能团包括重氮烷，重氮基乙酰基化合物，羰基二咪唑化合物和碳二亚胺。合适的羟基反应性官能团包括环氧化物和氧杂环己烷，羰基二咪唑，N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯或N-羟基琥珀酰亚胺基氯甲酸酯，高碘酸盐氧化化合物，酶促氧化，烷基卤素和异氰酸酯。醛和酮反应性官能团包括肼、席夫碱、还原胺化产物、曼尼希缩合产物及其组合。活性氢反应性化合物包括重氮鎓衍生物、曼尼希缩合产物、碘化反应产物及其组合。光反应性化学官能团包括芳基叠氮化物、卤代芳基叠氮化物、苯甲酮、重氮

基化合物、双吡丙啶衍生物及其组合。

[0149] 如本文所用,短语“报告子部分”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缀合物(包括PNA缀合物)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)。

[0150] 如本文所用,术语“二抗”在本文中是指这样的抗体,其特异性结合检测探针或其部分(例如,半抗原或一抗),由此在检测探针和后续试剂(例如标记物、酶等,如果有的话)之间形成桥。二抗可用于间接检测检测探针,例如,一抗。二抗的实例包括抗标签抗体、抗物种抗体和抗标记物抗体,其各自如本文所述。

[0151] 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⁻¹、大 10^4 M⁻¹或大 10^5 M⁻¹的结合常数)。特异性结合部分的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)。特异性结合实体包括上述一抗或核酸探针。

[0152] 如本文所用,如本文所用的术语“染色(stain)”、“染色(staining)”等通常是指生物样本的任何处理,其检测和/或区分生物样本中的特定分子(诸如脂质、蛋白或核酸)的存在、位置和/或量(诸如浓度)或特定结构(诸如正常或恶性细胞、胞质溶胶、细胞核、高尔基体或细胞骨架)。例如,染色可以提供特定分子或特定细胞结构和生物样本的周围部分之间的对比,并且染色的强度可以提供样本中特定分子的量的量度。染色可用于帮助观察分子、细胞结构和生物体,其不仅用明场显微镜,而且用其他观察工具,诸如相差显微镜、电子显微镜和荧光显微镜。由系统2进行的一些染色可用于显现细胞的轮廓。由系统2进行的其他染色可以依赖于某些细胞组分(诸如分子或结构)被染色而没有染色其他细胞组分或相对较少染色其他细胞组分。由系统2进行的染色方法类型的实例包括但不限于组织化学方法,免疫组织化学方法和基于分子之间的反应(包括非共价结合相互作用)的其他方法,诸如核酸分子之间的杂交反应。具体的染色方法包括但不限于初级染色方法(例如,H&E染色,Pap染色等),酶联免疫组织化学方法,以及原位RNA和DNA杂交方法,诸如荧光原位杂交(FISH)。

[0153] 每当将基团或部分描述为“被取代的”或“任选地取代的”(或“任选地具有”或“任选地包含”)时,该基团可以是未被取代的或被指定取代基中的一个或多个取代。同样地,当将基团描述为“被取代的或未取代的”时,如果被取代,所述取代基可以选自指定取代基中的一个或多个。如果没有指示取代基,它是指指示的“任选地被取代的”或“被取代的”基团可以被一个或多个单独地和独立地选自以下的基团取代:烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基(heteroalicyclic)、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、巯基、烷基巯基、芳基巯基、氰基、氰酸盐、卤素、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫氨基甲酰基、N-硫氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酰、硫氰酰基、异硫氰酰基、硝基、甲硅烷基、次磺酰基、亚磺酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤甲

磺酰基、三卤甲磺酰氨基、氨基、醚、氨基(例如单取代的氨基基团或二取代的氨基基团)和受保护的其衍生物。以上基团中的任一个可以包括一个或多个杂原子,包括O、N或S。例如,在一个部分被烷基取代的情况下,该烷基可以包含选自O、N或S的杂原子(例如-(CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂)-)。

[0154] 如本文所用,术语“基本上”意指表现出模板特征或特性的总的或接近总的程度或等级的定性条件。在一些实施方案中,“基本上”意指在约20%内。在一些实施方案中,“基本上”意指在约15%内。在一些实施方案中,“基本上”意指在约10%内。在一些实施方案中,“基本上”意指在约5%内。

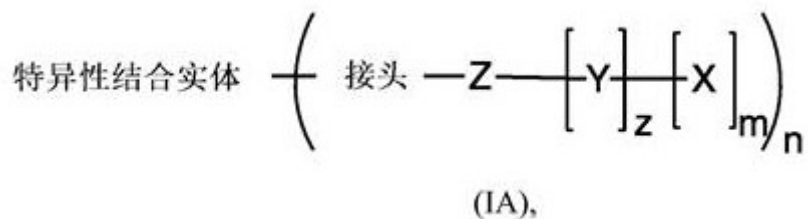
[0155] 如本文所用,术语“靶标”意指确定或可以确定其存在、位置和/或浓度的任何分子。靶标的实例包括核酸序列和蛋白,诸如本文公开的那些。

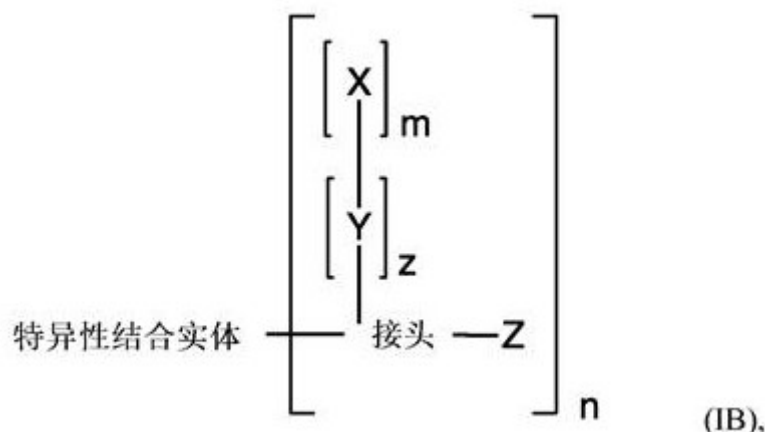
[0156] 寡聚物和缀合物

本公开的一个方面涉及特异性结合实体和寡聚物的缀合物,即[特异性结合实体]-[寡聚物]_n,其中n是范围从1至12的整数。在一些实施方案中,所述缀合物是PNA缀合物,即特异性结合实体和包括PNA序列(诸如在PNA碱基的γ碳处具有一个或多个取代的PNA序列)的寡聚物的缀合物。在一些实施方案中,所述特异性结合实体和所述寡聚物经由接头(在上式中未举例说明)、诸如包含可裂解基团或部分的接头偶联。在一些实施方案中,所述寡聚物包含γ PNA序列、不带电荷的DNA序列或包含带电荷或不带电荷的碱基的DNA序列。在其他实施方案中,所述寡聚物包含γ PNA序列。在还有其他实施方案中,所述特异性结合实体是抗体,且所述寡聚物包括γ PNA序列。

[0157] 通常,本文公开的缀合物适用于免疫组织化学测定或原位杂交测定(包括多重测定)中,且由此可用作检测探针,使得可检测组织样品内的靶标。在一些实施方案中,缀合物可以与互补的PNA、DNA或RNA或类似序列杂交,所述互补的PNA、DNA或RNA或类似序列(i)可以直接检测自身;(ii)携带可直接检测的特异性实体,诸如荧光团、酶(HRP);或(iii)其可以间接检测,诸如通过携带可以被另一抗体识别的半抗原。本文公开的缀合物还可以作为分子“条形码”发挥功能,所述分子“条形码”可以用于定量分析。

[0158] 在一些实施方案中,本公开的缀合物具有式(IA)和(IB)的一般结构:





其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘接头’是具有2至80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；

Z选自包括至少一个在 γ 位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列、不带电荷的DNA序列和包含带电荷和不带电荷的碱基的DNA序列；

X是标记物(诸如本文所述的那些)；

Y是间隔子；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数。

[0159] 在一些实施方案中，Z包含仅具有不带电荷的碱基的DNA序列。在其他实施方案中，Z包含具有带电荷和不带电荷的碱基两者的DNA序列。在还有其它实施方案中，Z包含DNA序列，其中DNA序列中至少50%的碱基不带电荷。在还有其它实施方案中，Z包含PNA序列。

[0160] 在一些实施方案中，Z包含具有至少两个 γ PNA碱基的 γ PNA序列。在一些实施方案中，Z包含具有至少三个 γ PNA碱基的 γ PNA序列。在一些实施方案中，Z包含具有至少四个 γ PNA碱基的 γ PNA序列。

[0161] 在一些实施方案中，PNA序列包含约5至60个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至30个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约10个碱基。

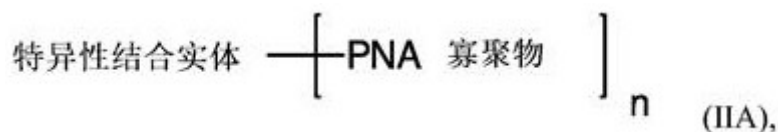
[0162] 在一些实施方案中，缀合物式(IA)和(IB)包括接头，例如，多官能接头，其经设计以将特异性结合部分与含有寡聚物的PNA或DNA偶联。在一些实施方案中，所述多官能接头是异双官能接头，即包含至少两个不同反应性官能团的接头(参见，例如，本文定义的基团A和B)。例如，异双官能接头可以包含羧酸基团和胺基团，其中羧酸基团或胺基团之一能够与特异性结合实体或PNA或DNA序列之一形成键，且其中羧酸基团或胺基团中的另一者能够与特异性结合实体或PNA或DNA序列中的另一者形成键。在一些实施方案中，“接头”包含一个或多个可裂解基团。在一些实施方案中，所述一个或多个可裂解基团包括光可裂解部分。

[0163] 在一些实施方案中，‘接头’是具有2至40个碳原子且任选地具有一个或多个选自

0、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。在其他实施方案中，‘接头’是具有2至20个碳原子且任选地具有一个或多个选自0、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。

[0164] 在一些实施方案中，Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个0、N或S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。在其他实施方案中，Y是具有1至6个碳原子且任选地具有一个或多个0、N或S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。在一些实施方案中，Y包含可裂解基团，诸如本文关于‘接头’描述的那些。在一些实施方案中，n范围从1至9。在其他实施方案中，n范围从1至6。在一些实施方案中，X是生色部分。

[0165] 在一些实施方案中，所述缀合物是具有式 (IIA) 的一般结构的PNA缀合物：



其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘PNA寡聚物’包含包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列；

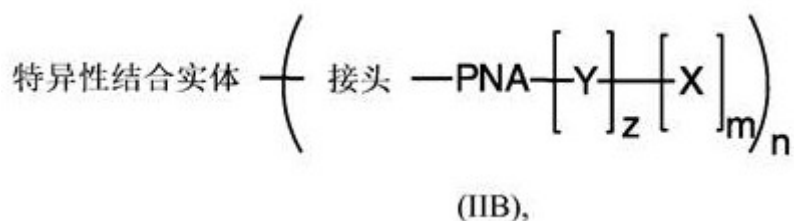
n是范围从1至12的整数。

[0166] 在一些实施方案中，单个PNA寡聚物与特异性结合实体、例如抗体、核酸等偶联。在其他实施方案中，多个PNA寡聚物与特异性结合实体偶联。在一些实施方案中，n是范围从1至10的整数。在其他实施方案中，n是范围从1至8的整数。在还有其它实施方案中，n是范围从1至6的整数。在还有其它实施方案中，n是范围从2至6的整数。在还有其它实施方案中，n是范围从1至4的整数。在还有其它实施方案中，n是范围从2至4的整数。在还有其它实施方案中，n是至少2。在进一步实施方案中，n是至少3。

[0167] ‘PNA寡聚物’可以包括接头或间隔子，其经设计以便于PNA序列或 γ PNA序列与特异性结合实体偶联，如本文进一步描述。在其他实施方案中，所述PNA寡聚物可以包含增加缀合物的水溶性的基团，例如包括增加PNA缀合物的水溶性的官能团的接头或间隔子。

[0168] 在一些实施方案中，‘PNA寡聚物’包括至少一个标记物，以使得能够直接或间接检测缀合物或靶标。

[0169] 在一些实施方案中，所述PNA缀合物具有式 (IIB) 的结构：



其中

‘特异性结合实体’选自抗体、抗体片段、药物/抗体复合物和核酸；

‘接头’是具有2至80个碳原子且任选地具有一个或多个选自0、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；

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列;

X是标记物;

Y是间隔子;

m是0或范围从1至6的整数;

z是0或1;且

n是范围从1至12的整数。

[0170] 在一些实施方案中,Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。在一些实施方案中,Y是具有1至6个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。在一些实施方案中,Y包含可裂解基团,诸如本文关于'接头'描述的那些。

[0171] 在一些实施方案中,单个PNA寡聚物,即-(接头-PNA-[Y]_z-[X]_m)_n,与特异性结合实体偶联。在其他实施方案中,多个PNA寡聚物与特异性结合实体偶联。在一些实施方案中,n是范围从1至10的整数。在其他实施方案中,n是范围从1至8的整数。在还有其它实施方案中,n是范围从1至6的整数。在还有其它实施方案中,n是范围从2至6的整数。在还有其它实施方案中,n是范围从1至4的整数。在还有其它实施方案中,n是范围从2至4的整数。在还有其它实施方案中,n是至少2。在进一步实施方案中,n是至少3。

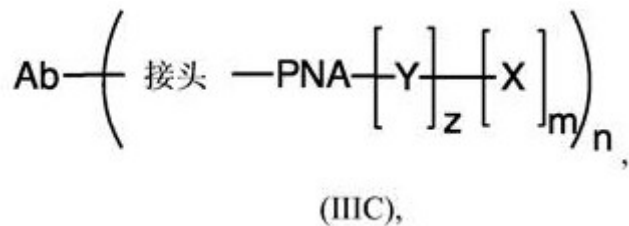
[0172] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且PNA序列具有至少一个 γ PNA碱基,即至少一个在 γ 位置处取代的PNA碱基。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗,且PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0173] 在一些实施方案中,'特异性结合实体'是一抗且PNA序列包含约10个碱基。在其他实施方案中,'特异性结合实体'是二抗且PNA序列包含约15个碱基。在还有其它实施方案中,'特异性结合实体'是一抗且PNA序列包含约15个碱基,且其中PNA序列中的至少一个核苷酸在 γ 碳位置处包含取代基。在进一步实施方案中,'特异性结合实体'是一抗且PNA序列包含约15个碱基,且其中PNA序列中的至少两个核苷酸在 γ 碳位置处包含取代基。

[0174] 在一些实施方案中,PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基,即至少两个在 γ 碳位置处具有取代基的PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0175] 在一些实施方案中,PNA序列包含约5至60个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至30个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约10个碱基。

[0176] 在其他实施方案中,式(IIC)的PNA缀合物具有式(IC)的结构:



其中

'Ab' 选自一抗或二抗)；

'接头'是具有2至80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；

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列；

X是标记物；

Y是间隔子；

m是0或范围从1至6的整数；

z是0或1；且

n是范围从1至12的整数。

[0177] 在一些实施方案中，Y是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。在一些实施方案中，Y包含可裂解基团，诸如上文关于'接头'描述的那些。

[0178] 在一些实施方案中，将一个或多个PNA寡聚物，即-(接头-PNA-[Y]_z-[X]_m)_n，与一抗或二抗偶联以形成PNA-抗体缀合物。在一些实施方案中，至少一个PNA寡聚物与一抗偶联。在一些实施方案中，至少一个PNA寡聚物与二抗偶联。在一些实施方案中，n是范围从1至10的整数。在其他实施方案中，n是范围从1至8的整数。在还有其他实施方案中，n是范围从1至6的整数。在还有其他实施方案中，n是范围从2至6的整数。在还有其他实施方案中，n是范围从1至4的整数。在还有其他实施方案中，n是范围从2至4的整数。

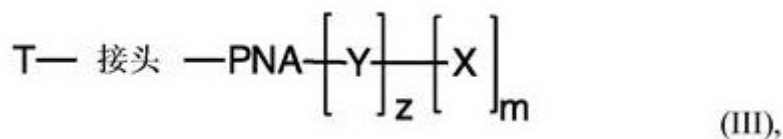
[0179] 当然，可以与任何特定的一抗或二抗偶联的PNA寡聚物的数目取决于所选择的特定抗体及其物理和/或化学特性。在一些实施方案中，每个抗体的寡聚物数目的标记程度范围从约2至约10。在其他实施方案中，标记程度大于约1。在其他实施方案中，标记程度范围从约2至约6。在还有其他实施方案中，标记程度为约4。据信相对低的标记程度防止或减轻对抗体功能性(例如，标记抗体的抗原结合或长期稳定性)的任何有害影响。再次，据信抗体稳定性在很大程度上取决于抗体本身。因此，每个抗体的PNA寡聚物的数目可以取决于抗体耐受官能化的能力。实际上，甚至可能包括包含多个标记物的PNA寡聚物(本文进一步描述)。例如，PNA寡聚物可以包括一个或多个荧光团和/或半抗原。在一些实施方案中，一种或多种半抗原可用于检测。在一些实施方案中，一种或多种荧光团可用于监测PNA与抗体的结合。

[0180] 在一些实施方案中，PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中，PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中，PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。

[0181] 在一些实施方案中，PNA序列包含约5至60个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至30个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至20个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至15个碱基。在一些实施方案中，PNA序列包含约5至10个碱基。在一些实施

方案中,PNA序列包含约15个碱基。在一些实施方案中,PNA序列包含约10个碱基。

[0182] 在一些实施方案中,PNA寡聚物具有式(III)的结构:



其中

T是具有末端反应性部分的基团;

'接头'是具有2至80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;

'PNA'是包括至少一个在 γ 碳位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列;

X是标记物;

Y是间隔子;

m是0或范围从1至6的整数;且

z是0或1。

[0183] 在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少两个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少三个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少四个 γ PNA碱基。在一些实施方案中,所述PNA序列具有至少一个 γ PNA碱基,且其中所述至少一个 γ PNA碱基与报告子部分直接或间接缀合。

[0184] PNA寡聚物可以与抗体的任何部分偶联。抗体中的三个官能团是用于共价修饰的位点:胺($-\text{NH}_2$)、硫醇基团($-\text{SH}$)和碳水化合物残基(Shrestha D,等人,2012)。因此,本文公开的任何PNA寡聚物可以与胺残基、硫醇残基和碳水化合物残基或其任何组合偶联。在一些实施方案中,PNA寡聚物与抗体的Fc部分偶联。在一些实施方案中,PNA寡聚物与抗体的铰链区偶联。在一些实施方案中,PNA寡聚物与抗体的Fc区中的一个或多个和抗体的铰链区中的一个或多个偶联。实际上,本公开考虑任何组合。

[0185] 氨基基团通常是有利的,主要是因为抗体中富含这些部分。然而,氨基基团的随机性造成抗体可变得失活的风险。(Adamczyk M, 等人, 1999, Bioconjug Chem; Jeanson A, 等人, 1988, J Immunol Methods; Vira S, 等人, 2010, Anal Biochem; Pearson JE等人, 1998, J Immunol Methods)。在一些实施方案中,一个或多个PNA寡聚物与抗体的氨基基团偶联。

[0186] 另一方面,且在适当的反应条件下,巯基标记提供了对抗体的两条重链之间的铰链区中的二硫键的高特异性靶向。由于铰链区远离抗原结合位点,所以相信该修饰更好地保留抗体的结合亲和力。在一些实施方案中,一个或多个PNA寡聚物与抗体的硫醇基团偶联。

[0187] 存在于抗体的Fc部分中的碳水化合物部分处的缀合类似于硫醇基团的缀合,使得修饰发生在远离抗原结合位点的 $-\text{CHO}$ 基团处。再次,不希望被任何特定理论束缚,据信碳水化合物处的缀合提供了对抗体的结合亲和力的较少的负面影响。标记程度根据特定抗体的糖基化状态而变化。然而,Jeanson A, 等人, 1988, J Immunol Methods仍然报道了抗体亲和力的丧失。在一些实施方案中,一个或多个PNA寡聚物与抗体的碳水化合物基团偶联。

[0188] 在一些实施方案中,T是能够与特异性结合实体的官能团形成直接键的反应性基

团,例如,抗体的氨基基团,或能够通过接头形成间接键的反应性基团,例如,经由DBCO-马来酰亚胺双功能接头与抗体的巯基基团结合的PNA序列上的叠氮化物。在一些实施方案中,T是NHS酯、硫醇、马来酰亚胺或叠氮化物基团。

[0189] 在其他实施方案中,T包括能够参与亲核取代(例如,胺和醇与酰基卤、活性酯的反应)、亲电取代(例如,烯胺反应)以及向碳-碳和碳-杂原子多键的加成(例如迈克尔反应、Diels-Alder加成)的反应性官能团。这些和其他有用的反应讨论于,例如,March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 第3版, John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 和Feeney等人, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982。

[0190] 在一些实施方案中,所述反应性官能团是羧酸、羧酸的活化酯、碳二亚胺、磺酰卤、酰基卤、甲硅烷基卤、酰基叠氮化物、酰基肼、丙烯酰胺、胺、醛、烷基卤化物(其中所述卤化物后来可以被亲核基团、诸如例如胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、碳负离子或烷氧离子离子取代,由此导致在卤素原子的位点处的新基团的共价附接)、芳基卤、烷基磺酸盐、磺酸酯、酸酐、叠氮化物、氮杂环丙烷、重氮烷、卤代乙酰胺、卤代三嗪、肼、羟胺、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、氨基磷酸酯、硫醇(在一些实施方案中,其可以转化为二硫化物,与酰基卤反应,或与金属键合)、羟基(其可以转化为酯、醚、醛等)、肼和炔烃(其可以经历,例如,环加成、酰化、迈克尔加成)。在一些实施方案中,所述反应性官能团是羧基基团或其各种衍生物,包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰卤、酰基咪唑、硫代酸酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳族酯。在一些实施方案中,所述反应性官能团是亲二烯体基团,其能够参与Diels-Alder反应,诸如例如马来酰亚胺基团。在一些实施方案中,所述反应性官能团是醛或酮基团,使得随后的衍生经由形成羰基衍生物、诸如例如亚胺、腙、半卡巴腙或肟或经由诸如格氏加成或烷基锂加成的机制是可能的。

[0191] 在其他实施方案中,所述反应性官能团选自羧酸、羧酸的活化酯、磺酰卤、酰基卤、胺、烷基或芳基卤、酸酐、叠氮化物、卤代乙酰胺、卤代三嗪、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、氨基磷酸酯、硫醇、羟基和炔烃。在还有其他实施方案中,所述反应性官能团选自羧酸、羧酸的活化酯、胺、叠氮化物、卤代乙酰胺、肼、异氰酸酯、马来酰亚胺和炔烃。

[0192] PNA序列

在一些实施方案中,所述PNA序列是同质的,即包含单一核苷酸类型。在其他实施方案中,所述PNA序列是异质的,即包含多种核苷酸类型,并且核苷酸可以随机组织或在重复组内组织。在还有其他实施方案中,所述PNA序列可以被设计为编码特定信息,诸如条形码,而不是仅作为载体发挥功能。

[0193] 在一些实施方案中,所述PNA序列包括2至60个碱基。在其他实施方案中,所述PNA序列包括2至50个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括2至40个碱基。在进一步实施方案中,所述PNA序列包括2至40个碱基。在又进一步实施方案中,所述PNA序列包括1至30个碱基。在甚至进一步实施方案中,所述PNA序列包括1至20个碱基。在其他实施方案中,所述PNA序列包括20至40个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括20至30个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括30至40个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括5至20个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括5至15个碱基。在还有其

他实施方案中,所述PNA序列包括8至12个碱基。在还有其他实施方案中,所述PNA序列包括12至18个碱基。在进一步实施方案中,所述PNA序列包括约10个碱基。在进一步实施方案中,所述PNA序列包括约15个碱基。在进一步实施方案中,所述PNA序列包括至少10个碱基。在进一步实施方案中,所述PNA序列包括至少150个碱基。

[0194] 在一些实施方案中,任何PNA序列的一个或多个PNA核苷酸独立地用核苷酸的 γ 碳上的部分衍生或取代(参见,例如,图16)。据信 γ PNA(与不具有 γ 取代基的PNA相比)的 T_m 每个单核苷酸取代高约5°C至约8°C,其导致在更高亲和力下更多的序列特异性结合。还据信 γ PNA(与不具有 γ 取代基的PNA相比)可以提供几个优点,诸如提高的溶解性,较少的自聚集,更稳定的PNA-DNA双链体形成以及对于多重标记和其他功能化的灵活性。例如, γ 取代基可以用氨基酸、例如赖氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酸衍生。在一些实施方案中,一个或多个带电荷的部分是赖氨酸或其衍生物。在其他实施方案中,一个或多个带电荷的部分是L-(S)-赖氨酸。在还有其他实施方案中,一个或多个带电荷的部分是D-(R)-赖氨酸。在进一步实施方案中, γ 取代基可以用硫赖氨酸衍生。在一些实施方案中,赖氨酸的并入便于进一步的化学缀合。

[0195] 在一些实施方案中,任何PNA序列(诸如本文所述的那些)的一个或多个PNA核苷酸独立地用PNA碱基的 γ 碳上的带电荷的部分衍生。在一些实施方案中,一个或多个带电荷的部分是赖氨酸。在一些实施方案中,一个或多个带电荷的部分是肽(例如具有2至20个氨基酸的肽,具有2至10个氨基酸的肽,具有2至8个氨基酸的肽,或具有1至5个氨基酸的肽)。例如,肽可以是赖氨酸-鸟嘌呤-赖氨酸或赖氨酸-鸟嘌呤-鸟嘌呤-鸟嘌呤-赖氨酸。通过另一个实例的方式,所述肽可以是赖氨酸-[U]_q-赖氨酸,其中U代表氨基酸,且其中q是0或范围从1至20的整数。在q为1或更大的情况下,U可以代表同质或异质短肽序列,即,包括相同或不同的氨基酸的序列。在一些实施方案中,U选自赖氨酸、丙氨酸、精氨酸、鸟嘌呤、谷氨酸或其任何组合。

[0196] 在一些实施方案中,任何PNA序列的一个或多个PNA核苷酸在 γ 位置处独立地被聚合物取代。在一些实施方案中,所述聚合物是至少部分地赋予PNA序列或PNA寡聚物亲水性的聚合物。在一些实施方案中,一个或多个PNA核苷酸独立地被PNA序列的至少一个 γ 碳上的短链寡乙烯部分衍生。

[0197] 在一些实施方案中,任何PNA序列的一个或多个PNA核苷酸在 γ -碳位置处独立地被“miniPEG”取代。在本公开的上下文内,术语“miniPEG”是指单个聚乙二醇(PEG)单元或包含2-50个PEG单体的PEG的聚合物。根据一个实施方案,术语miniPEG包括但不限于-CH₂-(OCH₂-CH₂)_q-O-P基团,其中下标q是1-50之间的整数,且P选自H、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、(C₃-C₈)芳基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)芳基(C₁-C₆)亚烷基和(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)亚烷基。miniPEG单元的说明性实例包括但不限于-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₄₅OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₄₀OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₃₅OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₃₀OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₂₅OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₂₀OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₁₅OH、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₁₀OH和-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₅OH基团。

[0198] miniPEG类别的进一步说明性实例是-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₄₅O(C₁-C₈)烷基、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₄₀(C₁-C₈)烷基、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₃₅O(C₁-C₈)烷基、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₃₀O(C₁-C₈)烷基、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₂₅O(C₁-C₈)烷基、-CH₂-(OCH₂-CH₂)₁₋₂₀O(C₁-C₈)烷基、-

CH₂—(OCH₂—CH₂)₁₋₁₅O (C₁-C₈) 烷基、—CH₂—(OCH₂—CH₂)₁₋₁₀O (C₁-C₈) 烷基和—CH₂—(OCH₂—CH₂)₁₋₅O (C₁-C₈) 烷基基团。

[0199] γ 取代的PNA的额外实例及其合成方法公开于美国专利申请公开号2016/0096867,其公开内容在此以其整体通过引用并入本文。

[0200] 在一些实施方案中,在 γ 位置处的取代基可以进一步包含与其直接或间接缀合的至少一个报告子部分。在一些实施方案中, γ 位置可以直接被报告子部分取代。在其他实施方案中, γ 位置可以被报告子部分、诸如通过短接头基团间接地取代。例如,如果 γ 位置被赖氨酸残基取代,则报告子部分可以与赖氨酸残基缀合。

[0201] 在一些实施方案中,在 γ 碳位置处的任何取代基包括多于一个报告子部分。仅通过实例的方式,如果 γ 位置被miniPEG、聚合物或肽取代,则多个报告子部分可以相应地缀合至miniPEG、聚合物或肽取代基(参见,例如,图17)。在一些实施方案中,多个PNA核苷酸各自在 γ 位置处具有取代基,提供分支的PNA寡聚物,其中每个分支包括miniPEG、聚合物或具有多个报告子部分的肽。在一些实施方案中,PNA寡聚物的 γ 碳可以被另一个PNA序列或 γ PNA序列取代。

[0202] 以下提供PNA序列的非限制性实例。在一个实施方案中,PNA可具有序列GTCAACCATCTTCAG (SEQ ID NO:1)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列TTAGTCCAACCTGGCA (SEQ ID NO:2)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列CATTCAAATCCCCGA (SEQ ID NO:3)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列CCATCTTCAG (SEQ ID NO:4)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列TTAGTCCAAC (SEQ ID NO:5)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列CATTCAAATC (SEQ ID NO:6)。在另一个实施方案中,PNA可具有序列CATCCTGCCG (SEQ ID NO:7)。由于PNA碱基不带电荷(如DNA碱基),所以相信PNA比DNA比较更疏水。还相信PNA疏水性与构成该PNA序列的碱基数目成比例。因此,PNA序列具有的碱基越多,疏水性将越高。因此,例如,15碱基PNA序列比10碱基PNA序列更疏水。还相信,由于疏水性PNA序列不易溶于水溶液中,所以它们更难以与抗体缀合。此外,疏水性PNA序列在抗体上的缀合引起缀合物的错误行为,其表现为缀合物在组织上的非特异性结合。据信减少PNA序列的碱基数目(例如,从来自15个碱基的10个碱基)导致更高的PNA负载和更稳定的缀合物。

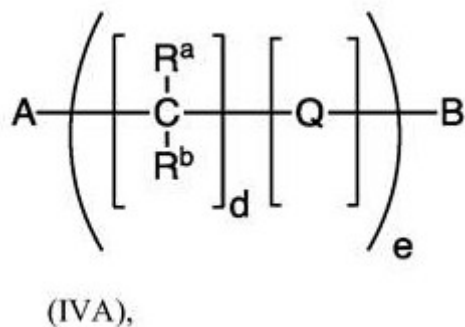
[0203] SEQ ID NO 1至7中的任一个可以由本领域普通技术人员进行修饰,使得取代基存在于任何PNA碱基的 γ 位置。当然,每个 γ 位置可以用相同或不同的取代基修饰(例如一个碱基可以被具有第一分子量的miniPEG取代,而另一个可以被具有第二分子量的另一miniPEG取代,或者反而可以被赖氨酸取代)。通过实例的方式,本文的任何序列表可以在 γ 位置处包括一个或多个取代基,例如GT*CAA*CCA*TCT*TCA*G,其中"*"指示在 γ -碳位置处包含取代基的PNA核苷酸。通过另一个实例的方式,SEQ ID NO:2可以在 γ 位置处包括一个或多个取代基,例如TT*AGT*CCA*ACT*GGC*A,其中"*"指示在 γ -碳位置处包含取代基的PNA核苷酸。通过又一个实例的方式,SEQ ID NO:2可以在 γ 位置处包括一个或多个取代基,例如T*TAGTC*CA*ACT*GGC*A,其中"*"指示在 γ -碳位置处包含取代基的PNA核苷酸。当然,任何 γ 取代基可以包括一个或多个报告子部分。

[0204] 接头

通常,且如上文关于式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(IIC)和(III)所示,'接头'是具有2至80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、

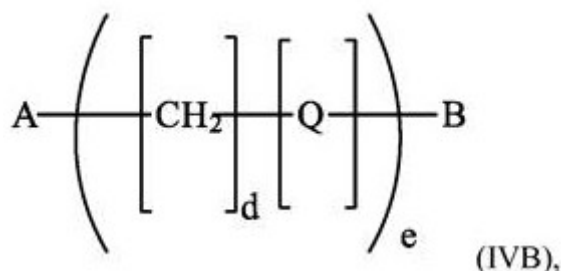
取代或未取代、饱和或不饱和的基团。通常,所述接头具有范围从约1 g/mol至约3000 g/mol的分子量。在其他实施方案中,所述接头具有范围从约20 g/mol至约200 g/mol的分子量。在一些实施方案中,所述接头具有范围从约0.5nm至约20nm的长度。在其他实施方案中,所述接头具有小于约15nm的长度。在还有其他实施方案中,所述接头具有小于约10nm的长度。

[0205] 在一些实施方案中,所述'接头'具有式(IVA)中描绘的结构:



其中d和e是各自独立地范围从2至20的整数;Q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独立地是CH₃或H;且A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。在一些实施方案中,d和e是范围从2至6的整数。在一些实施方案中,且如本文进一步详细描述,A或B中的至少一个包含可裂解部分。

[0206] 在一些实施方案中,所述'接头'具有式(IVB)中描绘的结构:



其中

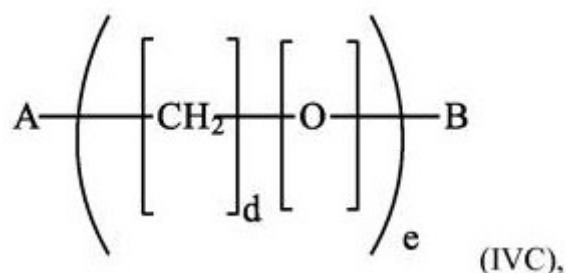
d和e是各自独立地范围从2至20的整数;

Q是键、O、S或N(R^c) (R^d);

R^c和R^d独立地是CH₃或H;且

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。

[0207] 在一些实施方案中,所述"接头"具有式(IVC)中描绘的结构:



其中

d和e是各自独立地范围从2至20的整数；

A和B独立地是具有1至12个碳原子且任选地具有一个或多个O、N或S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。在其他实施方案中，d和e是范围从2至15的整数。在其他实施方案中，d和e是范围从2至10的整数。在还有其他实施方案中，d和e是范围从2至6的整数。

[0208] 在一些实施方案中，‘接头’包含增溶基团，诸如聚乙二醇 (PEG) 基团，以增加PNA缀合物的水溶性。在一些实施方案中，所述接头包含约2至约24个PEG基团。在一些实施方案中，所述接头包含约2至约18个PEG基团。在其他实施方案中，所述接头包含约2至约12个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含约2至约6个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含4个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含8个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含12个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含16个PEG基团。在还有其他实施方案中，所述接头包含24个PEG基团。不希望受任何具体理论所束缚，相信此类环氧烷接头的并入据信增加PNA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目增加，PNA缀合物的亲水性也可增加。可用于实施本公开的某些公开的实施方案的额外异双官能聚亚烷基二醇接头描述于美国专利公开号2006/0246542和2009/00181398，各自的公开内容在此以其整体通过引用并入本文。

[0209] 在一些实施方案中，基团A和B包括能够与特定结合实体的基团或PNA序列的基团形成键的部分。在一些实施方案中，A或B中的一者或两者是羰基反应性基团。合适的羰基反应性基团包括肼、肼衍生物和胺。在其他实施方案中，A或B中的一者或两者是胺反应性基团。合适的胺反应性基团包括活性酯，诸如NHS或磺基-NHS、异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮化物、磺酰氯、醛、乙二醛、环氧化物、氧杂环丙烷、碳酸酯、芳基卤化物、亚氨酸酯、酸酐等。在又一些实施方案中，A或B中的一者或两者是巯基反应性基团。合适的巯基反应性基团包括不可聚合的Michael受体、卤代乙酰基（诸如碘代乙酰基）、烷基卤化物、SPDP（3-（2-吡啶基二巯基）丙酸琥珀酰亚胺酯）、马来酰亚胺、氮杂环丙烷、丙烯酰基、乙烯基砜、苯醌、可经历亲核取代的芳族基团诸如氟苯基团（诸如四氟苯和五氟苯基团）和二硫化物基团诸如吡啶基二硫化物基团和用Ellman试剂活化的巯基。上文关于部分“T”描述其他合适的反应性基团。

[0210] 在一些实施方案中，A和/或B包括紫外 (UV) 或可见光可裂解基团。例如，可以引入可以在暴露于具有约200nm至约400nm (UV) 或约400nm至约800nm (可见) 的波长的电磁辐射源后裂解的基团。在一些实施方案中，UV或可见光可裂解物选自芳基羰基甲基（包括4-乙酰基-2-硝基苄基、二甲基苯甲酰甲基 (DMP)、2-（烷氧基甲基）-5-甲基- α -氯苯乙酮、2,5-二甲基苯甲酰基氧杂环己烷和苯偶姻基团：3',5'-二甲氧基苯偶姻 (DMB)）、0-硝基苄基基团（包括1-（2-硝基苄基）乙基 (NPE)、1-（甲氧基甲基）-2-硝基苄基、4,5-二甲氧基-2-硝基苄基 (DMNB)； α -羧基硝基苄基 (α -CNB)、邻硝基-2-苄氧基羰基基团，包括1-（2-硝基苄基）乙氧基羰基和2-硝基-2-苄基衍生物，和邻硝基苄胺，诸如酰化5-溴-7-硝基吡啶啉）；香豆素-4-基甲基基团（包括7-甲氧基香豆素衍生物）；和芳基甲基（包括邻羟基芳基甲基基团）。

[0211] 在其他实施方案中，A和/或B包括近红外光可裂解基团。在一些实施方案中，可以引入可以在暴露于具有约700nm至约1000nm的波长的电磁辐射源后裂解的基团。合适的近

红外光可裂解基团包括花菁基团,包括C4-二烷基胺取代的七次甲基花菁。不希望受任何特定理论束缚,据信光可裂解接头的并入允许对PNA释放的空间控制并最终定量测量标志物表达。

[0212] 在还有其他实施方案中,A和/或B包括可通过不同化学反应物(包括还原剂)或通过诱导的pH变化裂解(例如,在小于7的pH裂解基团)的化学可裂解基团。合适的化学可裂解基团包括基于二硫化物的基团;重氮苯基(包括2-(2-烷氧基-4-羟基-苯基偶氮)苯甲酸支架,对亚硫酸氢钠敏感);基于酯键的基团(高pH);和酸性敏感性接头(诸如二烷氧基二苯基硅烷接头或酰基脲)。邻位二醇可裂解接头可以被 NaIO_4 裂解,诸如描述于“A simple and effective cleavable linker for chemical proteomics applications,” *Mol Cell Proteomics*, 2013 Jan;12(1):237-44. doi: 10.1074/mcp.M112.021014. Epub 2012年10月1日。在又进一步实施方案中,A和/或B包括酶促可裂解的接头。合适的酶促可裂解基团包括胰蛋白酶可裂解基团和V8蛋白酶可裂解基团。

[0213] 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特异性结合部分或PNA部分之一缀合至多官能接头,因此防止不需要的副反应或副产物。

[0214] 标记物

在一些实施方案中,X选自半抗原、荧光团、色原、酶、配体、磷光或化学发光剂、量子点、质谱标签或任何其他合适的实体。选择的标志物的类型取决于合成的PNA寡聚物或PNA缀合物以及缀合至适当的特异性结合实体之后PNA缀合物的最终作用。例如,在一些实施方案中,可以选择标记物,使得当PNA寡聚物与抗体缀合时,可以直接检测标记物(例如荧光素或荧光素衍生物或类似物)。在其他实施方案中,可以选择标记物,使得当PNA寡聚物与抗体缀合时,可以间接检测标记物(例如通过使用对半抗原特异性的二抗检测半抗原标记物,其中二抗与可检测部分缀合)。选择适合于各种目的的标记物的指导论述于例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 和Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987),其公开内容通过引用并入本文。

[0215] 荧光团属于几种常见的化学类别,包括香豆素类、荧光素类(或荧光素衍生物和类似物)、罗丹明类、试卤灵类、发光团类和花菁类。荧光分子的其他实例可见于The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR。

[0216] 在标记物包括酶的情况下,可检测底物(即酶的底物)诸如生色部分、荧光化合物或发光化合物可与酶组合使用以生成可检测信号(各种各样的此类化合物可商业得自,例如,Invitrogen Corporation, Eugene OR)。生色化合物/底物的具体实例包括二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯基磷酸酯(pNPP)、坚牢红、溴氯吲哚基磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四唑鎓(NBT)、BCIP/NBT、坚牢红、AP橙、AP蓝、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氨基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)、邻联茴香胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -吡喃半乳糖苷(X-Gal)、甲基伞形基- β -D-吡喃半乳糖苷(MU-Gal)、对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-

葡萄糖苷酸(X-Gluc)、3-氨基-9-乙基吡唑(AEC)、品红、碘硝基四唑鎓(INT)、四唑鎓蓝和四唑鎓紫。

[0217] 或者,酶可用于金相检测方案中。金相检测方法包括使用酶诸如碱性磷酸酶与水溶性金属离子和酶的氧化还原无活性底物的组合。在一些实施方案中,通过所述酶将底物转化为氧化还原活性剂,并且氧化还原活性剂还原金属离子,使其形成可检测的沉淀物(参见,例如,2004年12月20日提交的美国专利申请号11/015,646,PCT公开号2005/003777和美国专利申请公开号2004/0265922;其各自通过引用并入本文)。金相检测方法包括使用氧化-还原酶(诸如辣根过氧化物酶)以及水溶性金属离子、氧化剂和还原剂,再次形成可检测的沉淀物。(参见,例如,美国专利号6,670,113,其通过引用并入本文)。

[0218] 本文公开了半抗原的实例。使用质谱法分析PNA序列的实例描述于“Peptide nucleic acid characterization by MALDI-TOF mass spectrometry,” Anal Chem. 1996 Sep 15;68(18):3283-7。

[0219] 在一些实施方案中,X选自二硝基苯基、生物素、洋地黄毒苷、荧光素、罗丹明或其组合。在其他实施方案中,X选自噁唑类、吡唑类、噻唑类、硝基芳基类、苯并咪唑类、三萜类、脲类、硫脲类、类胡萝卜素类、香豆素类、环木脂素类或其组合。在还有其他实施方案中,X选自5-硝基-3-吡唑碳酰胺、2-(3,4-二甲氧基苯基)喹啉-4-羧酸)、3-羟基-2-喹啉碳酰胺、2,1,3-苯并噁二唑-5-碳酰胺和2-乙酰氨基-4-甲基-5-噻唑磺酰胺。在还有其他实施方案中,X可以选自本文进一步描述的任何半抗原、发色团、荧光团和酶(参见例如本文中列为“报告子部分”的那些)。

[0220] 其他合适的标记物描述于PCT公开W0/2018/002015,其公开内容在此通过引用以其整体并入本文。例如,合适的标记物包括具有至少两个彼此直接或间接偶联的色原的多染料缀合物。

[0221] 当然,在一些实施方案中,PNA缀合物不包含任何标记物,即PNA缀合物的PNA寡聚物部分终止于核苷酸中。

[0222] PNA缀合物的合成

可以通过本领域普通技术人员已知的任何方式合成PNA缀合物。在一些实施方案中,PNA或 γ PNA寡聚物(例如,包括接头或报告子部分的寡聚物)通过异双官能交联剂、诸如携带NHS酯基的交联剂(例如SPDP-PEG₈-NHS)偶联至特异性结合实体,如图1B中所举例说明。异双官能交联剂的实例包括图18中所举例说明的_DBCO-PEG_n-马来酰亚胺、DBCO-PEG_n-NHS、N3-PEG_n-NHS或N3-PEG_n-马来酰亚胺(其中n范围从0至20)。适合于缀合的PNA序列的非限制性实例包括以下:

PNA 1:5'-生物素-o-GTCAACCATCTTCAG-Lys (C₆SH)-3' (SEQ ID NO: 8)

PNA 2:5'-生物素-o-TTAGTCCAACTGGCA-Lys (C₆SH)-3' (SEQ ID NO: 9)

PNA 3:5'-生物素-o-CATTCAAATCCCCGA-PL-Lys (C₆SH)-3' (SEQ ID NO: 10)

PNA 4:5'-生物素-o-CTGAAGATGGTTTAC-Lys (C₆SH)-3' (SEQ ID NO: 11)

PNA 5:5'-Alexa488-o-CATCTGCCGCTATG-Lys (C₆SH)-3' (SEQ ID NO: 12)

PNA 6:5'-生物素-o-GTCAACCATCTTCAG-Arg-o-Cys-3' (SEQ ID NO: 13)。

[0223] 尽管上文鉴定的大小PNA序列各自具有15个碱基,但技术人员将理解,类似官能化的PNA序列可包含任何数目的碱基,例如,10个碱基。例如,PNA序列可以是:sPNA4:生物素-

o-CCATCTTCAG-Lys (C6SH)。

[0224] 在一些实施方案中,交联剂的NHS侧用于结合抗体的胺基以形成酰胺键;而交联剂的(3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯) (“SPDP”)侧与PNA序列的3’末端(C末端)的巯基基团反应,形成二硫键。在一些实施方案中,然后可以用还原剂化学裂解二硫键。

[0225] 如本文所述,在一些实施方案中,可以用NanoString nCounter平台检测和测量裂解的PNA序列。例如,PNA序列可以在5’末端(N末端)包括生物素,以使得能够直接固定化在链霉抗生物素蛋白表面上而不需要捕获链(图1B)。预期该修饰使得能够使用短得多的PNA序列(约15个碱基)以直接与报告子链杂交并通过nCounter平台进一步分析。在一些实施方案中,具有约15个碱基的PNA序列在检测期间提供了与报告子序列足够的结合亲和力和特异性。不希望受任何特定理论束缚,据信15-聚体PNA-DNA复合物的 T_m 类似于50-聚体DNA-DNA复合物。用于偶联的合适PNA序列的实例如下。

[0226] 在一些实施方案中,光可裂解(PC)接头可以并入PNA序列和特异性结合实体(例如抗体)之间(参见鉴定为本文定义的A或B的基团)以允许光触发释放PNA。在一些实施方案中,可以合成具有光可裂解接头的PNA序列:生物素-o-CAT TCA AAT CCC CGA-PL-Lys (C6SH) (SEQ ID NO: 10)。在光照射之后,PNA序列可以完整释放,并且可以使用本文描述的任何技术测量。或者,可以合成光可裂解双官能接头(图10)并用于将PNA与抗体连接。

[0227] 多个PNA寡聚物(具有相同或不同的序列)可以经由不同的接头与抗体缀合。此类PNA寡聚物可以具有相同或不同的可裂解基团(例如,PNA序列可以是相同的,但并入可裂解基团的接头可以是不同的)。一些PNA寡聚物可以是可裂解的,而其他则不是;或一些可能在某些条件下可裂解,而其他则不能在相同条件下裂解。

[0228] 在合成PNA缀合物期间将光可裂解的接头并入PNA内的方法是有利的,因为其更节省时间和成本并且确保光可裂解的接头并入所有PNA寡聚物中。或者,可以合成光可裂解的双功能接头(图10)并用于将PNA序列与抗体连接。该方法是有利的,因为光可裂解的双功能接头可用于将任何PNA序列与抗体连接,即使PNA未设计为光可裂解的。不希望受任何特定理论束缚,该方法可以在使用与正常(不是光可裂解的)和光可裂解的抗体标签相同的PNA序列方面提供一些灵活性。在一些实施方案中,二硫键仍存在于合成的光可裂解PNA中,允许光和化学裂解。在一些实施方案中,还保留生物素部分以允许在载片上进行SA-HRP和DAB检测,如本文进一步所示(参见,例如,图15)。

[0229] 在一些实施方案中,可以使用“点击化学”(诸如图18中所举例说明)将PNA序列引入特异性结合部分和/或接头。具有能够经历“点击”反应的反应性基团(例如叠氮化物)的PNA序列的非限制性实例呈现如下:

PNA 7:5’-生物素-0-GTCAACCATCTTCAG-Lys (eg3-N3)-3’ (SEQ ID NO: 14)。

[0230] 技术人员将理解,包含适当反应性基团的PNA序列可与另一分子形成点击加合物,所述另一分子也被适当地官能化以经历“点击”反应。实际上,技术人员将认识到,对于一对点击缀合物中的一个成员与该对点击缀合物中的另一个成员反应、且因此形成共价键,该对点击缀合物的两个成员必须具有能够与彼此反应的反应性官能团。下面的表格例举了不同对的反应性官能团,其将与彼此反应以形成共价键。

一对点击缀合物的第一成员上的反应性官能团	一对点击缀合物的第二成员上的反应性官能团
DBCO	叠氮化物

烯烃	四嗪
TCO	四嗪
马来酰亚胺	硫醇
DBCO	1,3-硝酮
醛或酮	肼
醛或酮	羟胺
叠氮化物	DBCO
四嗪	TCO
硫醇	马来酰亚胺
1,3-硝酮	DBCO
肼	醛或酮
羟胺	醛或酮
四嗪	烯烃

[0231] 在一些实施方案中,存在于抗体(例如,一抗或二抗)上的基团在二硫苏糖醇(“DTT”)存在的情况下被还原,以提供具有一个或多个硫醇基团的抗体。硫醇基团可以与一对点击组分的第一组分反应,所述第一组分携带能够参与“点击化学”反应的反应性官能团(例如DBCO基团)。该对点击缀合物的第一成员还可以包含能够与硫醇化抗体反应的第二官能团(例如马来酰亚胺)。该对点击缀合物的第一成员上的第二官能团是不能在点击化学反应中反应的官能团。如图18中所举例说明,该步骤允许抗体变得用能够参与“点击化学”偶联的第一反应性官能团官能化。然后引入该对点击组分的第二成员,诸如PNA分子,包括能够参与“点击化学”反应的第二反应性官能团(例如叠氮化物基团)。该对点击组分的第二组分也可以包含标记物或报告子部分。在图18中所描绘的实施方案中,携带DBCO基团的抗体能够与该对点击成员的第二成员的叠氮化物基团偶联,使得PNA缀合物变得与抗体偶联。该程序中缀合的PNA不是化学可裂解的或可光裂解的。

[0232] 在一些实施方案中,可以使用“马来酰亚胺”化学将PNA序列引入特异性结合部分和/或接头(参见图20)。在一些实施方案中,该程序中缀合的PNA不是化学可裂解的或可光裂解的。

[0233] 具有SMCC基团的PNA序列的非限制性实例呈现如下:

PNA 8:5'-生物素-0-GTCAACCATCTTCAG-Lys (SMCC)-3' (SEQ ID NO: 15)。

[0234] 不希望受任何特定理论束缚,据信使用点击化学或马来酰亚胺化学允许引入更短的PNA序列,例如,具有10个或更少碱基的序列。

[0235] 缀合物的检测

在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物可以包含促进缀合物的直接检测的标记物。例如,如果缀合物的标记物包含荧光团或发色团,则可以根据本领域普通技术人员已知的方法直接检测荧光团或发色团。

[0236] 在其他实施方案中,利用特定试剂以使得能够检测式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的任何缀合物,并因此检测组织样品中的靶标。在一些实施方案中,利用检测试剂,其对缀合物的特定标记物特异性或与缀合物的核苷酸序列(例如PNA序列)互补,如本文进一步所示。在一些实施方案中,所述检测试剂包含对缀合物标记物特异性的二抗。例如,所述二抗可以是包括标记物的抗标记物抗体(即,本文中的式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)中的‘X’)。在一些实施方案中,所述二抗是抗半抗原抗体,且所述标记物是半抗原。

[0237] 在一些实施方案中,二抗或抗标记物抗体可以与“报告子部分”缀合以实现式(I)、(IA)、(IC)、(ID)和(II)的缀合物的检测。在一些实施方案中,二抗的报告子部分包括生色的、荧光的、磷光的和发光的分子和材料,将一种物质转化成另一种物质以提供可检测差异(诸如通过将无色物质转化成有色物质或反之亦然,或通过产生沉淀物或增加样品浊度)的催化剂(诸如酶),使用额外的可检测地标记的抗体缀合物通过抗体-半抗原结合相互作用可检测的半抗原,以及顺磁和磁性分子或材料。当然,报告子部分本身也可以被间接地检测到,例如如果报告子部分是半抗原,则对该报告子部分具有特异性的另一种抗体可以用于检测报告子部分,如本领域普通技术人员已知的。

[0238] 在一些实施方案中,所述抗标记物抗体包括选自以下的报告子部分:DAB;AEC;CN;BCIP/NBT;坚牢红;坚牢蓝;洋红;NBT;ALK GOLD;级联蓝色乙酰基叠氮化物;Dapoxyl磺酸/羧琥珀酰亚胺酯;DY-405;Alexa Fluor 405琥珀酰亚胺酯;级联黄琥珀酰亚胺酯;吡啶并噁唑琥珀酰亚胺酯(PyMPO);太平洋蓝琥珀酰亚胺酯;DY-415;7-羟基香豆素-3-羧琥珀酰亚胺酯;DYQ-425;6-FAM亚磷酰胺;荧光黄;碘乙酰胺;Alexa Fluor 430琥珀酰亚胺酯;Dabcyl琥珀酰亚胺酯;NBD氯化物/氟化物;QSY 35琥珀酰亚胺酯;DY-485XL;Cy2琥珀酰亚胺酯;DY-490;俄勒冈绿488 羧琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 488琥珀酰亚胺酯;BODIPY 493/503 C3琥珀酰亚胺酯;DY-480XL;BODIPY FL C3琥珀酰亚胺酯;BODIPY FL C5琥珀酰亚胺酯;BODIPY FL-X琥珀酰亚胺酯;DYQ-505;俄勒冈绿514 羧琥珀酰亚胺酯;DY-510XL;DY-481XL;6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯(JOE);DY-520XL;DY-521XL;BODIPY R6G C3琥珀酰亚胺酯;赤藓红异硫氰酸酯;5-羧基-2',4',5',7'-四溴荧光素琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 532琥珀酰亚胺酯;6-羧基-2',4,4',5',7'-六氯荧光素琥珀酰亚胺酯(HEX);BODIPY 530/550 C3琥珀酰亚胺酯;DY-530;BODIPY TMR-X琥珀酰亚胺酯;DY-555;DYQ-1;DY-556;Cy3琥珀酰亚胺酯;DY-547;DY-549;DY-550;Alexa Fluor 555琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 546琥珀酰亚胺酯;DY-548;BODIPY 558/568 C3琥珀酰亚胺酯;罗丹明红-X琥珀酰亚胺酯;QSY 7琥珀酰亚胺酯;BODIPY 564/570 C3琥珀酰亚胺酯;BODIPY 576/589 C3琥珀酰亚胺酯;羧基- γ -罗丹明(ROX);琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 568琥珀酰亚胺酯;DY-590;BODIPY 581/591 C3琥珀酰亚胺酯;DY-591;BODIPY TR-X琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 594琥珀酰亚胺酯;DY-594;羧基萘荧光素琥珀酰亚胺酯;DY-605;DY-610;Alexa Fluor 610琥珀酰亚胺酯;DY-615;BODIPY 630/650-X琥珀酰亚胺酯;食用色素亮蓝(erioglaucine);Alexa Fluor 633琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 635琥珀酰亚胺酯;DY-634;DY-630;DY-631;DY-632;DY-633;DYQ-2;DY-636;BODIPY 650/665-X琥珀酰亚胺酯;DY-635;Cy5琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 647琥珀酰亚胺酯;DY-647;DY-648;DY-650;DY-654;DY-652;DY-649;DY-651;DYQ-660;DYQ-661;Alexa Fluor 660琥珀酰亚胺酯;Cy5.5琥珀酰亚胺酯;DY-677;DY-675;DY-676;DY-678;Alexa Fluor 680琥珀酰亚胺酯;DY-679;DY-680;DY-682;DY-681;DYQ-3;DYQ-700;Alexa Fluor 700琥珀酰亚胺酯;DY-703;DY-701;DY-704;DY-700;DY-730;DY-731;DY-732;DY-734;DY-750;Cy7琥珀酰亚胺酯;DY-749;DYQ-4;和Cy7.5琥珀酰亚胺酯。

[0239] 荧光团属于几种常见的化学类别,包括香豆素类、荧光素类(或荧光素衍生物和类似物)、罗丹明类、试卤灵类、发光团类和花菁类。荧光分子的其他实例可见于Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,

Molecular Probes, Eugene, OR, ThermoFisher Scientific, 第11版。在其他实施方案中,所述荧光团选自咕吨衍生物、花菁衍生物、方酸菁衍生物、蔡衍生物、香豆素衍生物、噻二唑衍生物、葱衍生物、茈衍生物、噻嗪衍生物、吡啶衍生物、芳基次甲基衍生物和四吡咯衍生物。在其他实施方案中,所述荧光部分选自CF染料(可得自Biotium)、DRAQ和CyTRAK探针(可得自BioStatus)、BODIPY(可得自Invitrogen)、Alexa Fluor(可得自Invitrogen)、DyLight Fluor(例如DyLight 649)(可得自Thermo Scientific,Pierce)、Atto和Tracy(可得自Sigma Aldrich)、FluoProbes(可得自Interchim)、Abberior染料(可得自Abberior)、DY和MegaStokes染料(可得自Dyomics)、Sulfo Cy染料(可得自Cyandye)、HiLyte Fluor(可得自AnaSpec)、Seta、SeTau和Square染料(可得自SETA BioMedicals)、Quasar和Cal Fluor染料(可得自Biosearch Technologies)、SureLight染料(可得自APC、RPEPerCP、Phycobilisomes)(Columbia Biosciences)、和APC、APCXL、RPE、BPE(可得自Phyco-Biotech, Greensea、Prozyme、Flogen)。

[0240] 在其他实施方案中,所述抗标记物抗体缀合至酶。在一些实施方案中,合适的酶包括、但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶或 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,AP)。在这些实施方案中,缀合至抗标记物抗体的酶催化生色底物向反应性部分的转化,所述反应性部分共价结合邻近靶标或直接在靶标上的样品。生色化合物/底物的具体非限制性实例包括二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯基磷酸酯(pNPP)、坚牢红、溴氯吲哚基磷酸酯(BCIP)、硝基四氮唑蓝(NBT)、BCIP/NBT、坚牢红、AP橙、AP蓝、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯](ABTS)、邻联茴香胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -吡喃半乳糖苷(X-Gal)、甲基伞形基- β -D-吡喃半乳糖苷(MU-Gal)、对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-葡萄糖醛酸苷(X-Gluc)、3-氨基-9-乙基呋唑(AEC)、品红、碘硝基四氮唑(INT)、四氮唑蓝、四氮唑紫、N,N'-双羧基戊基-5,5'-二磺酸基-吲哚-二羧基花菁(Cy5)、4-(二甲基氨基)偶氮苯-4'-磺酰胺(DABSYL)、四甲基罗丹明(DISCO紫)和罗丹明110(罗丹明)。DAB(其在有过氧化物酶和过氧化氢存在的情况下被氧化)导致棕色的醇不溶性沉淀物在酶活性部位处的沉积。

[0241] 在一些实施方案中,所述生色底物是包含潜在反应性部分和生色部分的信号传导缀合物。在一些实施方案中,所述信号传导缀合物的潜在反应性部分被构造成经历催化活化以形成可与样品或与其他检测组分共价地键合的反应性物质。催化活化由一种或多种酶(例如,氧化还原酶和过氧化物酶,如辣根过氧化物酶)驱动,并导致反应性物质的形成。这些反应性物质能够与邻近其发生的生色部分(即靠近酶)反应。信号传导缀合物的具体实例公开在美国专利公开号2013/0260379,其公开内容特此通过引用整体并入本文。

[0242] 在其中所述标记物是生物素的实施方案中,可以使PNA缀合物与偶联至酶(例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)的链霉抗生物素蛋白接触。不希望被任何特定理论束缚,据信链霉抗生物素蛋白-AP或链霉抗生物素蛋白-HRP缀合物特异性且不可逆地结合生物素标记的PNA缀合物。然后可以使用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶的生色底物(诸如上述那些)显现PNA-生物素-链霉抗生物素蛋白缀合物,以产生可检测的信号。同样,在所述标记物是生物素的情况下,PNA缀合物可以替代地与偶联至荧光团(例如FTIC)的链霉抗生物素蛋白接

触,并检测荧光团的信号。

[0243] 在其中从抗体缀合物裂解(经由本文所述的可裂解接头)PNA标签的实施方案中,可以根据“Peptide nucleic acid characterization by MALDI-TOF mass spectrometry,” Anal Chem.1996 Sep 15;68(18):3283-7 (其公开内容以其整体通过引用并入本文)中描述的方法检测从缀合物裂解的PNA标签。同样,PNA缀合物的PNA序列可以类似地通过其他质谱法、诸如电喷雾电离(ESI)根据本领域普通技术人员已知的方法进行检测。

[0244] 使用互补核苷酸序列(包括互补PNA或DNA序列)检测缀合物

在一些实施方案中,式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物可以通过将PNA序列、 γ PNA序列或DNA序列之一与所述缀合物的核苷酸序列杂交来检测,所述PNA序列或DNA序列与所述缀合物的核苷酸序列互补。例如,在其与PNA缀合物的PNA序列杂交之后,可以检测到与PNA缀合物的PNA序列互补的PNA或DNA序列。

[0245] 在一些实施方案中,式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物不包含标记物。在一些实施方案中,与所述缀合物的核苷酸序列互补的PNA或DNA序列包含报告子部分,诸如本文所述的那些。在一些实施方案中,所述报告子部分是色原。在其他实施方案中,所述报告子部分是荧光团(参见,例如,图8E)。在还有其他实施方案中,所述报告子部分是半抗原(例如洋地黄毒苷,诸如在图9D中)。在进一步实施方案中,所述报告子部分是酶。在甚至进一步实施方案中,所述报告子部分是纳米颗粒(例如金纳米颗粒,其可以用于扫描电子成像或量子点中)。当然,在 γ PNA序列的情况下,可以将多个报告子部分并入缀合物,诸如本文所述和图17中举例说明。

[0246] 当然,技术人员将理解,可以使用相同的式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物来提供多种成像模态。例如,如果提供荧光标记的互补DNA或PNA序列,则其可用于荧光成像。用相同的式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物,半抗原化的DNA或PNA序列也可用于实现生色成像。

[0247] 使用NanoString nCounter平台检测和/或定量缀合物

在一些实施方案中,式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物包含具有可充当分子“条形码”的核苷酸序列的寡聚物。例如,尽管两种PNA缀合物可包含相似的PNA寡聚物部分,但PNA寡聚物部分在PNA序列内的某些碱基可能不同(例如,甚至一个核苷酸的单一变化)。以这种方式,可以检测和/或定量具有不同PNA序列的PNA缀合物,诸如通过使用Nanostring nCounter平台。在一些实施方案中,所述PNA缀合物包含报告子部分,诸如生物素标记物。

[0248] 在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物包含可裂解接头。在将任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物引入样品之后,将化学试剂、酶和/或辐射(例如,UV、IR等)引入样品以裂解一组可裂解接头,因此释放所述缀合物的核苷酸序列(例如PNA-抗体序列或 γ PNA序列)。当然,这可以对不同的任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物进行重复。一旦已释放所有核苷酸序列(例如PNA序列或 γ PNA序列),就可以如本文所示检测和定量它们。技术人员还将理解,不同的缀合物可包含不同的可裂解接头,且因此可在引入不同试剂/辐射后的不同时间释放不同的核苷酸序列,因此允许逐步检测和/或定量。在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物是PNA缀合物,即所述缀合物包含包括PNA序列或 γ PNA序列的寡聚物。

[0249] 通过实例的方式,在PD-L1和Ki67标记物均存在于相同组织切片上时,可以使用抗PD-L1/PNA1缀合物和抗Ki67 PNA 2缀合物来染色组织切片。PNA1和PNA2寡聚物部分可包含具有两种不同的PNA序列,但两者都是借助缀合物内的可裂解部分化学可裂解的,如本文所示。在将组织与两种缀合的抗体孵育并小心冲洗以除去未结合的PNA-缀合的抗体之后,从缀合物裂解两种不同的PNA。可以在nCounter (NanoString技术)上计算两种PNA,并测定裂解的PNA的数目。PNA1和PNA2的数目之间的差异反映了PD-L1和Ki67标志物的蛋白表达水平的差异。

[0250] 在这些实施方案中,PNA缀合物的PNA序列可以以与DNA类似的方式检测和/或定量,因为检测方案基于报告子链与靶标寡聚物(可以是DNA或PNA)的杂交。然而,所述PNA缀合物比通常由NanoString nCounter平台检测的标准DNA靶标(其长度为约70-100个碱基)更短。然而,在PNA的3'末端存在生物素排除了使用捕获链的需求。此外,相比于DNA与DNA,PNA与DNA的较高结合亲和力为相对短的PNA/DNA报告子双链体提供了足够的稳定性。将PNA序列与设计为与PNA序列互补的报告子链混合。去除未结合的PNA之后,将PNA/报告子构建体在链霉抗生物素蛋白包被的盒上孵育,然后使用电场对齐。nCounter将用于读取和计数报告子链。可以使用多个PNA序列完成相同的程序。

[0251] 使用Gyros检测和/或定量缀合物

Gyros是使用具有平行处理和激光诱导荧光检测的亲和力流通格式的免疫测定平台。该测定在含有超过100纳升级通道的光盘(CD)中进行,所述通道使用离心力和毛细作用用于液体递送和移动。

[0252] 在典型的非限制性实验中,生物素化的表位肽首先与由链霉抗生物素蛋白包被的珠粒组成的15nL亲和捕获柱结合。在冲洗之后,对表位肽特异性的一抗流过柱并结合所述肽。然后荧光染料(例如Alexa Fluor 647)标记的二抗结合一抗,然后其使用激光诱导的荧光检测和定量。为了检测本公开的寡聚物,将生物素化的PNA寡聚物(参见,例如,图3D)与互补的单链DNA杂交,所述互补的单链DNA与报告子部分(例如半抗原,包括但不限于洋地黄毒苷)缀合。杂交的核酸链中的生物素结合Gyros CD中的链霉抗生物素蛋白包被的珠粒。然后通过Ms-抗-DIG抗体、随后Alexa Fluor 647标记的山羊抗小鼠抗体(GAM)(其便于原始寡聚物的定量测量)检测杂合体的另一端的DIG标记物。使用Gyros技术用于定量的原理在图32中举例说明。关于Gyros技术装置及其使用方法的额外信息描述于美国专利号8,133,438和8,592,219,其公开内容以其整体通过引用并入本文。关于Gyros技术装置及其使用方法的额外信息也描述于美国专利申请公开号2011/0116972、2011/0195524和2007/0241061,其公开内容以其整体通过引用并入本文。

[0253] 式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的任何缀合物可以用于使用Gyros平台进行定量,条件是所述缀合物包括能够被裂解的接头(例如,包含二硫化物基团的接头)。在将任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物引入样品之后,将化学试剂、酶和/或辐射引入样品以裂解一组可裂解接头,因此释放所述缀合物的核苷酸序列(例如PNA序列或 γ PNA序列)。然后可以如上所示进行定量。

[0254] 在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物是PNA缀合物,即所述缀合物包含包括PNA序列或 γ PNA序列的寡聚物,所述PNA缀合物包含与如本文所述的PNA寡聚物缀合的一抗。在一些实施方案中,引入的单链DNA与PNA缀合物的PNA序列互

补并且能够与PNA缀合物的PNA序列杂交。在一些实施方案中,互补的单链DNA序列与报告子部分缀合。在一些实施方案中,互补的单链DNA序列与半抗原缀合。在一些实施方案中,互补的单链DNA序列与洋地黄毒苷缀合。

[0255] 在一些实施方案中,可以同时或依次引入多种不同的PNA缀合物。技术人员还将理解,不同的PNA缀合物可包含不同的可裂解部分,且因此可在引入不同试剂/辐射后的不同时间释放不同的PNA序列,因此允许逐步定量。

[0256] 在一些实施方案中,在用Gyros平台定量之后,根据本领域常用的方法对组织进行染色。例如,在从PNA缀合物裂解PNA序列或 γ PNA序列之后,可以通过引入包括报告子部分的抗一抗来染色其中结合PNA缀合物的组织,诸如图33中所举例说明。以这种方式,定量可以与生物样品中的靶标的显现组合。

[0257] 包含PNA缀合物和用于检测PNA缀合物的检测试剂的检测试剂盒

在一些实施方案中,式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物可以用作“检测试剂盒”的一部分。通常,任何检测试剂盒可包括一种或多种式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物和用于检测一种或多种缀合物的检测试剂。

[0258] 在一些实施方案中,所述检测试剂盒可包括第一组合物和第二组合物,所述第一组合物包含任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物,且所述第二组合物包含对第一组合物特异性的检测试剂,使得可以经由检测试剂盒检测缀合物。在一些实施方案中,所述检测试剂盒包括多种式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物(诸如在缓冲液中混合在一起的那些,或者在单个运输容器或隔室中提供的那些),其中所述检测试剂盒还包括对多种缀合物中的每一种特异性的检测试剂。

[0259] 通过实例的方式,所述试剂盒可包括对第一靶标特异性的第一PNA缀合物(所述PNA缀合物具有第一PNA寡聚物部分),和对第二靶标特异性的第二PNA缀合物(所述第二PNA缀合物具有第二PNA寡聚物部分),其中第一和第二PNA寡聚物的至少一部分是不同的。所述试剂盒可以进一步包含对不同PNA缀合物各自特异性的检测试剂。

[0260] 通过另一个实例的方式,试剂盒可以包括具有第一PNA寡聚物部分(和不包含标记物的第一PNA寡聚物部分)的第一PNA缀合物,且所述试剂盒可以进一步包括与第一PNA寡聚物部分的PNA序列互补的PNA或DNA序列。

[0261] 通过又一个实例的方式,试剂盒可以包括一系列不同的PNA缀合物,每种PNA缀合物对不同靶标特异性并且具有不同的PNA寡聚物部分。所述试剂盒的每种不同PNA缀合物可以充当不同的分子“条形码”,其可以用于定性和/或定量分析中。

[0262] 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,其根据需要用于手动或自动化靶标检测。所述检测试剂盒还可以包含其他特异性结合实体(例如用于ISH的核酸探针;未修饰的(天然的)抗体和抗体缀合物)和检测那些其他特异性结合实体的检测试剂。例如,试剂盒可以包含一种或多种PNA缀合物;用于检测一种或多种PNA缀合物的一种或多种抗标记物抗体;至少一种未修饰的抗体(即未与PNA序列偶联的天然抗体);和用于检测至少一种未修饰抗体的检测试剂。在一些实施方案中,提供了用于使用PNA缀合物和试剂盒的其他组分用于测定、例如MIHC测定中的说明书。

[0263] 用任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物和检测试剂检测靶标的方法

本公开还提供了使用本文所述的式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的任何缀合物检

测组织样品内的一种或多种靶标的方法。在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物可以用于单一测定中以直接或间接检测组织样品内的特定靶标(例如CD68、Ki67、CD20等)。

[0264] 在一些实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物包含一抗(例如对CD68、Ki67、CD20等特异性的抗体)。在这些实施方案中,包含一抗的缀合物可用于用缀合物直接“标记”靶标。在其他实施方案中,任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物包含二抗。在这些实施方案中,且如本文更详细讨论,靶标(例如蛋白靶标或核酸靶标)可以用一抗(对于IHC)或核酸缀合物(例如,与半抗原偶联的核酸序列,对于ISH)标记,且然后可以用包含二抗的缀合物“标记”一抗或核酸缀合物。本文进一步描述了这些和其他实施方案。

[0265] 在一些实施方案中,所述PNA缀合物包含一抗,其中PNA-一抗缀合物对目标靶标是特异性的,且在将PNA-一抗缀合物应用于组织样品后,形成靶标-PNA-一抗缀合物复合物(参见,例如,图22A-22D和图26)。在应用PNA-一抗缀合物之后,可以随后应用检测试剂(例如抗标记物抗体),使得可以检测靶标-PNA-一抗缀合物复合物。在一些实施方案中,所述检测试剂包含对PNA-一抗缀合物的特定标记物特异性的抗标记物抗体,其中所述抗标记物抗体包含报告子部分。然后可以显现或以其他方式检测单一靶标。

[0266] 在其他实施方案中,首先使组织样品与一抗或核酸探针接触,形成靶标-一抗复合物或靶标-核酸探针复合物。随后,将包含二抗的PNA缀合物引入组织样品,所述PNA缀合物的二抗部分对于以下是特异性的:(i)一抗,(ii)与一抗缀合的标记物,或(iii)与核酸探针缀合的标记物。PNA-二抗缀合物的应用允许形成二级复合物,允许“标记”靶标。在应用PNA-二抗缀合物和形成二级复合物之后,可以应用检测试剂(例如抗标记物抗体),使得可以检测二级复合物。在一些实施方案中,所述检测试剂包含对PNA-二抗缀合物的特定标记物特异性的抗标记物抗体,其中所述抗标记物抗体包含报告子部分。然后可以显现或以其他方式检测靶标。

[0267] 在还有其他实施方案中,使组织样品首先与PNA-一抗抗体缀合物接触;或首先与一抗接触,随后引入PNA-二抗缀合物。在引入相应的PNA缀合物之后,可以使样品与DNA或PNA序列接触,所述DNA或PNA序列与PNA缀合物的PNA序列互补,所述互补的DNA或PNA序列包含一个或多个报告子部分(例如,色原、荧光团、酶或半抗原)。在其中互补的DNA或PNA序列包含色原或荧光团的实施方案中,可以直接检测“标记的”靶标复合物。另一方面,在互补的DNA或PNA序列包含半抗原的情况下,必须引入与报告子部分缀合的抗半抗原抗体以便于“标记的”靶标复合物的最终检测。

[0268] 当然,且作为替代实施方案,在从缀合物裂解DNA或PNA序列之后,可以定量任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物的DNA或PNA序列,诸如用本文所述的NanoString nCounter方法或Gyros技术。在一些实施方案中,所述缀合物包含可裂解基团和生物素标记物。这些方法不需要使用任何另外的检测试剂。

[0269] 在本公开的一些方面,提供了多重检测(包括自动多重检测)的方法。图14A提供了举例说明用于多重检测靶标的一种方法的流程图,其中使组织样品与多种PNA缀合物同时接触(步骤100),其中每种PNA缀合物对特定靶标是特异性的,且其中每种PNA缀合物包含不同的PNA寡聚物(即具有不同PNA序列和/或不同标记物的PNA寡聚物)。尽管图14A描绘了PNA

缀合物的应用,但技术人员将理解PNA缀合物可以包含PNA-核酸缀合物、PNA-一抗缀合物和PNA-二抗缀合物,这取决于样品内的靶标(例如核酸序列,由一抗PNA缀合物识别的蛋白靶标,或由二抗PNA缀合物识别的预沉积的一抗)。当然,任何PNA缀合物可以具有如本文所述的具有任何数目的核苷酸的PNA序列。同样,任何PNA缀合物可以具有包括至少一个在 γ 位置处具有取代基的核苷酸的PNA序列,即 γ PNA。

[0270] 在一些实施方案中,可以使样品与两种PNA缀合物接触,其中每种PNA缀合物对特定靶标是特异性的,且其中每种PNA缀合物包含不同的PNA寡聚物部分。在其他实施方案中,可以使样品与三种PNA缀合物接触,其中每种PNA缀合物对特定靶标是特异性的,且其中每种PNA缀合物包含不同的PNA寡聚物部分。

[0271] 可以将PNA缀合物作为“合并物”或“混合物”提供给组织样品,所述“合并物”或“混合物”包含特定测定所需的每种PNA缀合物。据信PNA缀合物的合并是可能的,因为据信PNA缀合物不与彼此交叉反应,至少在任何交叉反应性会干扰染色性能的程度不与彼此交叉反应。每种PNA缀合物将结合其各自的靶标并形成可检测的靶标-PNA缀合物复合物。在一些实施方案中,并且在应用PNA缀合物之后,进行阻断步骤。

[0272] 在同时应用PNA缀合物(步骤100)之后,将多种检测试剂同时应用至组织样品(步骤110),其中每种检测试剂便于检测最初应用的PNA缀合物之一(在步骤100),且其中每种检测试剂包含不同的报告子部分。在一些实施方案中,所述检测试剂是与荧光团、发色团或半抗原缀合的链霉抗生物素蛋白。在其他实施方案中,所述检测试剂是对PNA缀合物的标记物特异性的二抗(例如,对PNA缀合物的半抗原特异性的抗半抗原抗体)。在还有其他实施方案中,所述检测试剂是与PNA缀合物的PNA寡聚物部分的PNA序列互补的DNA或PNA序列。在采用抗标记物抗体的实施方案中,抗标记物抗体可以作为合并物或混合物提供给组织样品,所述合并物或混合物包含检测靶标-PNA缀合物复合物所必需的每种抗标记物抗体。在应用检测试剂之后,在一些实施方案中,所述组织样品可以用复染剂染色。可以显现或以其他方式检测(例如,同时显现或检测)来自标记物和/或报告部分各自的信号。

[0273] 利用PNA缀合物的多重测定的一个实例如下。将包含第一PNA寡聚物且对第一靶标特异性(例如对CD68、Ki67、CD20等之一特异性)的第一PNA-抗体缀合物引入组织样品。在一些实施方案中,第一PNA-抗体缀合物形成可检测的第一靶标-PNA-抗体缀合物复合物。同时,将包含第二PNA寡聚物且对第二靶标(例如CD68、Ki67、CD20等中的另一种)特异性的第二PNA-抗体缀合物引入样品以形成第二靶标-PNA-抗体缀合物复合物。可以将具有不同PNA序列和/或标记物的与其他靶标的第三、第四和第n额外的PNA-抗体缀合物(形成“n”靶标-检测探针复合物)与第一和第二PNA-抗体缀合物同时进一步引入。

[0274] 在沉积PNA-抗体缀合物之后,可以直接或间接地检测它们,这当然取决于它们的构型。在一些实施方案中,引入抗标记物抗体以使得能够检测每种靶标-PNA-抗体缀合物复合物。在一些实施方案中,抗标记物抗体对PNA缀合物的不同标记物是特异性的,且其中抗标记物抗体各自与不同的报告子部分缀合。在一些实施方案中,可检测试剂是抗标记物抗体,所述抗标记物抗体各自与荧光团缀合。在一些实施方案中,同时引入第一、第二和第n抗标记物抗体,其中第一、第二和第n检测试剂各自对不同PNA-抗体缀合物是特异性的,其中抗标记物抗体各自与荧光团缀合。在其他实施方案中,依次引入第一、第二和第n抗标记物抗体,其中第一、第二和第n检测试剂各自对不同PNA-抗体缀合物是特异性的,且其中抗标

记物抗体各自与酶缀合。

[0275] 或者,可以通过引入与引入的PNA缀合物的PNA寡聚物部分的PNA序列互补的PNA或DNA序列来检测PNA-抗体缀合物。每种互补的PNA或DNA序列可包含本文详述的报告子部分,包括酶、荧光团、半抗原或纳米颗粒。如果互补的PNA或DNA序列包含半抗原,则可以引入额外的检测试剂(例如与酶或荧光团缀合的抗半抗原抗体)以便于检测互补的PNA或DNA序列,且因此检测样品内的靶标。

[0276] 作为根据本公开的多重测定的一个进一步实例,将对第一靶标(例如CD3、Ki67、PD-L1或免疫细胞标志物)特异性的第一PNA-抗体缀合物引入组织样品,所述第一PNA-抗体缀合物具有第一标记物。在一些实施方案中,第一PNA-抗体缀合物形成可检测的第一靶标-PNA-抗体缀合物复合物。同时或随后,将对第二靶标(例如CD3、Ki67、PD-L1中的另一种)特异性的第二PNA-抗体缀合物引入样品以形成第二靶标-PNA-抗体缀合物复合物,所述第二PNA-抗体缀合物具有第二标记物。可以再次与第一和/或第二PNA-抗体缀合物依次或同时进一步引入各自对其他靶标特异性的第三、第四和第n额外PNA-抗体缀合物(形成“n”靶标-PNA-抗体缀合物复合物),其中第三、第四和第n PNA-抗体缀合物各自具有不同的标记物。在沉积PNA-抗体缀合物之后,可以检测它们。在一些实施方案中,引入额外检测试剂以使得能够检测靶标,并且所述额外检测试剂包括本文所述的那些(例如生色检测试剂)。在一些实施方案中,依次引入第一、第二和第n检测试剂,其中第一、第二和第n检测试剂各自包含(i)对PNA-抗体缀合物的标记物各自特异性的二抗,即抗标记物抗体,其中所述二抗与酶缀合;和(ii)生色底物;其中第一、第二和第n生色底物各自是不同的。在其他实施方案中,依次引入第一、第二和第n检测试剂,其中第一、第二和第n检测试剂各自包含与每种PNA缀合物的PNA寡聚物部分的PNA序列互补的PNA或DNA序列,每种互补的PNA或DNA序列包含报告子部分。

[0277] 作为根据本公开的多重测定的又一个进一步实例,将对第一靶标(例如CD3、Ki67、PD-L1或免疫细胞标志物)特异性的第一抗引入组织样品(其中第一抗不是任何式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)和(IIC)的缀合物)。随后,引入对第一抗或与第一抗缀合的标记物特异性的第二抗-PNA缀合物,所述第二抗PNA缀合物包含具有第一PNA序列的第一PNA寡聚物。在一些实施方案中,第二抗-PNA-抗体缀合物形成可检测的第一靶标-二抗-PNA-抗体缀合物复合物。随后,从缀合物裂解二抗PNA缀合物的第一PNA序列。

[0278] 随后,将对第二靶标(例如CD3、Ki67、PD-L1中的另一种)特异性的第二抗引入样品。随后,引入对第二抗或与第二抗缀合的标记物特异性的第二二抗-PNA缀合物,所述第二二抗PNA缀合物包含具有第二PNA序列的第二PNA寡聚物。在一些实施方案中,第二二抗-PNA-抗体缀合物形成可检测的第二靶标-二抗-PNA-抗体缀合物复合物。随后,从缀合物裂解二抗PNA缀合物的第二PNA序列。技术人员将理解,可以依次引入任何数目的一抗和二抗PNA-缀合物,随后从相应的二抗PNA-缀合物的PNA寡聚物裂解PNA序列。最后,可以测量所有不同的PNA序列,并且可以定量靶标。

[0279] 在还有其他实施方案中,多重检测方法包括以下步骤:(i)使生物样品与第一PNA-抗体缀合物接触以形成第一靶标抗体-PNA缀合物复合物;(ii)使所述生物样品与第一标记缀合物接触,其中所述第一标记缀合物包含第一酶(其中第一标记缀合物是特异性结合第一PNA-抗体缀合物的抗标记物抗体,并配置为用酶标记靶标);(iii)使所述生物样品与包

含第一潜在反应性部分和第一生色部分的第一信号传导缀合物接触(参见例如美国专利申请号13/849,160,其公开内容通过引用并入本文,用于描述信号传导缀合物及其组成组分);(iv)使第一酶失活,诸如使样品与第一酶失活组合物接触,以基本上失活或完全失活生物样品中所含的第一酶。

[0280] 在第一种酶失活(任选)之后,多重方法进一步包括以下步骤:(v)使生物样品与第二PNA-抗体缀合物接触以形成第二靶标-PNA-抗体缀合物复合物;(vi)使所述生物样品与第二标记缀合物接触,其中所述第二标记缀合物包含第二酶(其中第二标记缀合物是特异性结合第二PNA-抗体缀合物的抗标记物抗体,并配置为用酶标记靶标);(vii)使所述生物样品与包含第二潜在反应性部分和第二生色部分的第二信号传导缀合物接触;(viii)使第二酶失活,诸如使样品与第一酶失活组合物接触,以基本上失活或完全失活生物样品中所含的第一酶。

[0281] 在第二酶失活之后,可以重复该方法,使得可以引入额外的PNA-抗体缀合物连同额外的检测试剂,以实现其他靶标的检测。在引入所有PNA-抗体缀合物(和其他检测探针)和相应的检测试剂或试剂盒之后,该方法进一步包括复染样品和/或检测来自第一、第二和第n生色部分的信号(手动或经由自动方法)的步骤,其中第一、第二和第n生色部分各自是各自不同的。或者,PNA-抗体缀合物各自可以同时或依次添加,但在添加任何标记缀合物之前。作为另一个实例,在引入任何检测试剂前,可以首先依次应用三种PNA-抗体缀合物,且然后依次添加每种检测试剂。

[0282] 在其中依次检测多种靶标且其中所述检测采用酶的使用的多重测定的背景下,期望在连续的检测步骤之间使任何试剂或内源性酶失活。作为结果,据信任一种检测步骤中存在的酶将不干扰后来的检测步骤中的那些。据信这进而在多重测定中使用的不同可检测部分的显现和检测后得到改善。本领域已知的任何酶失活组合物可用于此目的。在一些实施方案中,应用酶失活组合物以在每个检测步骤之后使试剂或内源酶失活。示例性酶失活组合物公开于共同在审申请US 62/159,297中,其公开内容以其整体通过引用并入本文。

[0283] 在一些实施方案中,变性步骤防止第一组检测试剂中使用的酶作用于第二底物。在一些实施方案中,变性剂是使第一检测试剂组中的酶变性的物质。在一些实施方案中,所述变性剂是例如甲酰胺、烷基取代的酰胺、脲或基于脲的变性剂、硫脲、盐酸胍或其衍生物。烷基取代的酰胺的实例包括但不限于N-丙基甲酰胺、N-丁基甲酰胺、N-异丁基甲酰胺和N,N-二丙基甲酰胺。在一些实施方案中,所述变性剂在缓冲液中提供。例如,甲酰胺可以在杂交缓冲液中提供,所述杂交缓冲液包含20 mM硫酸葡聚糖(50-57%甲酰胺(UltraPure甲酰胺储备液)),2×SSC(含有0.3 M柠檬酸盐和3M NaCl的20×SSC储备液),2.5mM EDTA(0.5M EDTA储备液),5 mM Tris, pH 7.4(1 mM Tris, pH 7.4储备液),0.05% Brij-35(含有聚氧乙烯(23)月桂基醚的10%储备液),pH 7.4。在一些实施方案中,所述样品在足以使第一靶探针检测酶、例如碱性磷酸酶变性的条件下用变性剂处理一段时间。在一些实施方案中,将所述样品用变性剂在37℃下处理约15至约30分钟,优选约20至24分钟。在一些实施方案中,所述样品在足以使靶酶变性、同时保持第二核酸探针与靶标杂交的条件下用变性剂处理一段时间。

[0284] 对于采用与酶缀合的抗标记物抗体的那些实施方案,使用适合于将信号传导缀合物或生色底物与生物样品一起引入的条件,并且通常包括提供包含过氧化物(例如,过氧化

氢)的反应缓冲液或溶液,并且其具有适合于允许或便于酶发挥其期望功能的盐浓度和pH。通常,该方法步骤在范围从约35℃至约40℃的温度下进行,但技术人员将能够选择适合于所选择的酶和信号传导缀合物的适当温度范围。例如,据信这些条件允许酶和过氧化物反应并促进信号传导缀合物的潜在反应性部分上的自由基形成。潜在反应性部分,和因此整个信号缀合物,将共价沉积在生物样品上,特别是在固定化酶缀合物附近的一个或多个酪氨酸残基、酶缀合物的酶部分的酪氨酸残基和/或酶缀合物的抗体部分的酪氨酸残基处。然后用光照射生物样品,并且可以通过由信号传导缀合物的生色部分产生的光的吸光度来检测靶标。

[0285] 用任何式 (IA)、(IB)、(IIA)、(IIB) 和 (IIC) 的缀合物与其他特异性结合实体结合进行检测的方法

在本发明的一些方面,任何式 (IA)、(IB)、(IIA)、(IIB) 和 (IIC) 的缀合物与其他特异性结合实体结合使用以实现组织样品中的靶标的多重检测。技术人员将理解,任何上面鉴定的方法和程序可以相应地适用于采用任何式 (IA)、(IB)、(IIA)、(IIB) 和 (IIC) 的缀合物和其他特异性结合实体的任何测定法。

[0286] 在一些实施方案中,其他特异性结合实体包括用于原位杂交的核酸和用于IHC的未修饰的抗体。如本文所用,术语一种或多种“未修饰的抗体”是指不包含核苷酸序列(例如,如本文所鉴定的DNA、PNA核苷酸序列或 γ PNA核苷酸序列)的那些抗体,但包括与半抗原或另一标记物缀合的那些抗体。实质上,“未修饰的抗体”是传统上用于IHC测定中的天然抗体,其对于特定靶标(例如抗CD3抗体)是特异性的,并且可以检测,诸如用抗物种二抗或者(如果它们包含标记物)抗标记物抗体检测。通过实例的方式,可以用山羊抗兔抗体检测兔抗CD3抗体。同样,可以用抗半抗原抗体检测与半抗原缀合的兔抗CD3抗体。

[0287] 图14B和14C举例说明用于多重检测靶标的方法,其中组织样品与一种或多种未修饰的一抗(同时或依次)接触(第一阶段,220),且然后随后与一种或多种PNA缀合物(同时或依次)接触(第二阶段,250)。技术人员将认识到第一阶段220和第二阶段250可以颠倒,使得首先将PNA缀合物应用于组织样品,随后应用未修饰的抗体。技术人员还将理解,适当的核酸探针(包括与标记物缀合的那些)可以取代未修饰的抗体,使得多重测定法包括ISH和IHC步骤或阶段(以任何顺序)。

[0288] 在一些实施方案中,诸如图14B中所描绘,可以将第一未修饰的二抗应用于组织样品以形成第一靶标-一抗复合物(步骤200)。接下来,将对未修饰的一抗特异性的第一检测试剂应用于组织样品以检测第一靶标-一抗复合物(步骤210)。图14B中的虚线205举例说明第一阶段220的步骤200和210可以重复一次或多次,以提供用未修饰的一抗依次多重检测组织样品内的多种不同靶标。例如,将第二未修饰的一抗应用于组织样品以形成第二靶标-一抗复合物(200),随后应用对第二未修饰的一抗特异性的第二检测试剂检测第二靶标-一抗复合物(210)。

[0289] 图14C代表使用类似于图14B中呈现的方法的两阶段方法的用于多重检测靶标的替代方法。在图14C中描绘的方法中,在步骤260将每种未修饰的抗体缀合物同时引入组织样品中。接下来,在步骤270使样品与检测试剂(例如抗物种抗体或抗标记物抗体)接触以实现未修饰抗体的检测。在一个替代实施方案中,可以依次施用所有未修饰的一抗(步骤260),随后依次施用相应的抗物种抗体(步骤270)(或者,适当时,抗半抗原抗体)。

[0290] 技术人员将理解,未修饰抗体的检测试剂可以包含对利用的未修饰抗体特异性的抗物种抗体。或者,未修饰抗体的检测试剂可以包含对与未修饰抗体缀合的半抗原特异性的抗半抗原抗体。技术人员还将理解,抗物种或抗半抗原抗体可以包含报告子部分,并且在其中报告子部分是酶的实施方案中,可以将额外的生色底物与第一和第二检测试剂一起提供。

[0291] 在多重测定220的第一阶段(图14B或14C)之后,进行第二阶段250,其中组织样品与多种PNA缀合物同时或依次接触(步骤230),其中每种PNA缀合物对特定靶标是特异性的,并且其中每种PNA缀合物包含不同的PNA寡聚物部分。可以将PNA缀合物作为“合并物”或“混合物”提供给组织样品,所述“合并物”或“混合物”包含特定测定所需的每种PNA缀合物。每种PNA缀合物将与特定靶标形成可检测的靶标-PNA缀合物复合物。在同时或依次应用PNA缀合物(步骤230)之后,将抗标记物抗体(二抗)同时应用于组织样品(步骤240),其中每种抗标记物抗体对应用的PNA缀合物之一是特异性的,并且其中每种抗标记物抗体包含不同的报告子部分。可以将抗标记物抗体作为“合并物”或“混合物”提供给组织样品,所述“合并物”或“混合物”包含检测靶标-PNA-抗体复合物所必需的每种抗标记物抗体。

[0292] 或者,在步骤230引入相应的PNA缀合物之后,可以在步骤240使样品与PNA序列或与PNA缀合物的PNA序列互补的DNA序列接触,所述DNA序列包含报告子部分(例如酶、色原、荧光团或半抗原)。在其中DNA序列包含色原或荧光团的实施方案中,可以直接检测“标记的”靶标复合物。另一方面,在DNA序列包含半抗原的情况下,必须引入与报告子部分缀合的抗半抗原抗体以便于“标记的”靶标复合物的最终检测。

[0293] 当然,并且作为替代实施方案,可以定量相应的PNA缀合物的PNA序列,诸如用本文所述的NanoString nCounter方法定量。

[0294] 在步骤250之后,在一些实施方案中,所述组织样品可以用复染剂染色。可以显现或以其他方式检测(例如,同时显现或检测)来自每种报告子部分(例如来自抗物种或抗标记物抗体)的信号。

[0295] 作为包含(i)未修饰的抗体和(ii)根据本公开的PNA-抗体缀合物的多重测定法的实例,将包含半抗原标记物的第一抗体缀合物(例如,与半抗原间接缀合的抗CD3抗体)引入组织样品以形成靶标-抗体-缀合物复合物。同时,将未修饰的抗体(例如兔抗PDL1抗体)引入组织样品以形成靶标-未修饰的抗体复合物。接下来,(同时或依次)引入检测试剂以检测形成的靶标-抗体-缀合物复合物(例如抗半抗原抗体)和形成的靶标-未修饰的抗体复合物(例如山羊抗兔抗体),其中每种检测试剂与不同的荧光团缀合。

[0296] 在多重测定的第二阶段中,将包含第一PNA寡聚物且对第一靶标特异性(例如对CD68特异性)的第一PNA-抗体缀合物引入组织样品。在一些实施方案中,第一PNA-抗体缀合物形成可检测的第一靶标-PNA-抗体缀合物复合物。依次或同时,将包含第二PNA寡聚物且对第二靶标特异性(例如对Ki67特异性)的第二PNA-抗体缀合物引入样品以形成第二靶标-PNA-抗体缀合物复合物。可以将对其他靶标特异性(形成“n”靶标-PNA-抗体复合物)且具有不同PNA寡聚物的第三、第四和第n额外的PNA-抗体缀合物与第一和第二PNA-抗体缀合物同时进一步引入。在替代实施方案中,可以依次添加PNA-抗体缀合物,其中在引入随后的PNA-抗体缀合物前从PNA-抗体缀合物裂解PNA序列。然后可以一起测量裂解的PNA序列。

[0297] 在沉积PNA-抗体缀合物之后,可以直接或间接地检测它们,这当然取决于它们的

构型。在一些实施方案中,同时引入第一、第二和第n检测试剂,其中第一、第二和第n检测试剂各自对不同PNA-抗体缀合物是特异性的。在其他实施方案中,依次引入第一、第二和第n检测试剂,其中第一、第二和第n检测试剂各自对不同PNA-抗体缀合物是特异性的。在一些实施方案中,引入抗标记物抗体以使得能够检测每种靶标-PNA-抗体缀合物复合物。在一些实施方案中,所述检测试剂是对PNA-抗体缀合物的不同标记物特异性的抗标记物抗体,且其中抗标记物抗体各自与报告子部分(例如荧光团或酶)缀合。在一些实施方案中,可检测试剂是抗标记物抗体,所述抗标记物抗体各自与荧光团缀合。在其他实施方案中,可检测试剂是抗标记物抗体,所述抗标记物抗体各自与酶缀合。在还有其他实施方案中,所述可检测试剂是与荧光团缀合的抗标记物抗体和与酶缀合的抗标记物抗体的组合。在其中抗标记物抗体与酶缀合的那些实施方案中,提供酶的底物以实现检测(如本文先前所示)。在其他实施方案中,引入与一种或多种PNA序列互补且包含酶、荧光团或半抗原的PNA或DNA序列,以使得能够检测每种靶标-PNA-抗体缀合物复合物。在还有其他实施方案中,所述检测试剂是与PNA缀合物的PNA寡聚物部分的PNA序列互补的PNA或DNA序列。技术人员将理解,在提供与半抗原缀合的互补的PNA或DNA序列的情况下,可以向样品提供另外的试剂以便于检测互补的PNA或DNA序列。在替代实施方案中,PNA-缀合的抗体可以与互补的PNA或DNA序列非原位杂交,且然后将复合物(即与互补的PNA或DNA序列杂交的PNA-缀合的抗体)引入组织,以使得能够标记样品内的靶标。

[0298] 自动化

多重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。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SYMPHONY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2003/0211630和2004/0052685,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。

[0299] 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)。

[0300] 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。

[0301] 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或报告子分子。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。

[0302] 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2011年9月9日提交的标题为IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME的美国专利公开号2014/0178169中公开的数字病理学装置。

[0303] 复染

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。

[0304] 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。

[0305] 成像

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。

[0306] 样品和靶标

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。

[0307] 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。

[0308] 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。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。

[0309] 技术人员将理解,可以开发对任何以下靶标特异性的PNA缀合物:

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。

[0310] 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。

[0311] 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)。

实施例

[0312] 本文呈现的非限制性实施例各自并入PNA缀合物的用途。申请人认为本文公开的PNA缀合物适用于IHC测定中。当然, 如本文所详述, PNA缀合物可以与其他可检测的特异性结合实体结合使用, 并且可以用于其中组合IHC和ISH的测定法中。

[0313] 实施例1: PNA/抗体缀合

下面描述PNA与山羊抗小鼠 (GAM)、山羊抗兔 (GAR) 和小鼠抗DIG的示例性缀合:

(1) 将100微克抗体 (0.667 nmol) 在PBS中稀释至2 mg/mL, 并用15摩尔当量的SPDP-PEG-NHS (10 nmol, 来自10 mM DMSO储备溶液) 处理2小时。SPDP-PEG-NHS可得自Quanta Biodesign, Ohio, USA (SPDP-dPEG8-NHS酯, 产品# 10376)。

[0314] (2) 用来自ThermoFisher的7 KD MW截止Zeba旋转脱盐柱 (产品# 89882) 纯化标记的抗体。

[0315] (3) 将2 nmol PNA (8 μL, 来自溶解于1:1 (v/v) 水DMF中的251 uM PNA储备溶液的) 添加至抗体溶液中, 并添加5 μL DMF和35 uL PBS, 以得到总共近似100 μL的反应溶液。将混合物在室温下孵育过夜。

[0316] (4) 然后使用Zeba旋转脱盐柱纯化缀合物, 然后将其用于从反应混合物纯化PNA-缀合的抗体。

[0317] 在使用前, 将纯化的PNA-缀合的抗体在合适的稀释剂中稀释。

[0318] 实施例2: 抗体-PNA缀合物的UV-Vis测量

用UV-Vis吸光度表征PNA缀合的抗体。抗体-PNA缀合物的260 nm处吸光度的增加表明PNA的成功并入 (参见图2A和2B)。A260与A280 nm的比率可用于定性评价缀合效率并大概地估计每个抗体的PNA寡聚物的数目。这在图30和31中也举例说明。

[0319] 实施例3: 使用SA-HRP检测PNA-抗体缀合物:

为了证明PNA寡聚物 (15碱基PNA, 10碱基PNA或15碱基γ PNA) 寡聚物的缀合不影响抗体的结合亲和力和特异性, 我们使用PNA-缀合的抗体 (一抗或二抗) 针对不同标志物对扁桃体组织进行IHC测定。所有IHC测定都使用基于特定测定法修改的方案在Benchmark XT (Ventana) 上运行。作为滴定, 以100 μL的体积和适当浓度, 手动添加PNA-缀合的抗体。

[0320] 检测PNA标签上的生物素标记物。将两个扁桃体检片与抗CD45和抗Ki67一抗孵育, 随后分别与PNA-缀合的GAR和GAM二抗 (具有15碱基的PNA序列) 孵育。然后将载片与链霉抗生物素蛋白-HRP (SA-HRP) 孵育, 随后进行DAB沉积 (生色检测)。在其预期位置处观察到标

记物(图3A和3B)。当从测定中省略一抗时没有观察到背景信号(图3C)。使用半抗原化一抗(抗CK5/6: DIG)和PNA-缀合的抗半抗原二抗,随后进行SA-HRP和DAB沉积,也成功地针对CK5/6将扁桃体载片染色(图4A和4B)。用具有10个碱基的PNA序列进行相同的实验。扁桃体组织用抗Ki67染色,然后用与具有10个碱基的PNA序列缀合的GAR染色。使用SA-HRP、随后进行DAB沉积来检测与GAR缀合的具有10个碱基的PNA序列的末端的生物素部分(图21A)。作为比较,扁桃体组织用GAR-HRP (Ventana的常规Ultraview检测)针对Ki67进行染色。实验显示,10个碱基的PNA序列缀合不改变GAR的功能。

[0321] 扁桃体用抗Ki67染色,然后用与 γ PNA序列(15个碱基)缀合的GAR染色。通过SA-HRP、随后进行DAB沉积来检测 γ PNA序列的末端的生物素(图28)。该图显示, γ PNA可以成功地与二抗缀合,而不引起任何错误定位。

[0322] 这些第一实验提供了强有力的证据证明,长度(10个碱基和15个碱基)和性质(常规和 γ PNA)不同的PNA序列可以有效地与二抗缀合,并且缀合不影响它们对扁桃体载片上对应的一抗的结合亲和力和特异性。

[0323] PNA标签(10个碱基的PNA和15个碱基的 γ PNA)与一抗直接缀合,并通过PNA序列上的生物素部分进行检测,如前所述。将扁桃体载片与抗CD3、抗CD8、抗CD34、抗Ki67一抗孵育,所述一抗与在其末端具有生物素的具有10个碱基的PNA序列(称为sPNA1)缀合。然后将载片与链霉抗生物素蛋白-HRP (SA-HRP)孵育,随后进行DAB沉积(生色检测)。在其预期位置观察到所有标记。图22A、22B、22C、22D分别显示用与10个碱基的PNA缀合的抗CD3、与10个碱基的PNA缀合的抗CD8、与10个碱基的PNA缀合的抗CD34和与10个碱基的PNA缀合的抗Ki67染色的扁桃体载片。

[0324] 图23和24显示用抗CD3和抗CD8染色且如前所述进行检测的扁桃体载片,所述抗CD3和抗CD8分别与在其末端具有生物素的被称为sPNA2的不同的10个碱基PNA序列缀合。

[0325] 扁桃体载片也用与15个碱基的 γ PNA序列缀合的抗CD3、抗CD8和抗PD-L1染色。通过与SA-HRP孵育、随后进行DAB沉积来检测 γ PNA序列上的生物素部分。图29A、B和C显示分别用不同浓度的抗CD3、抗CD8和抗PD_L1染色的扁桃体载片。

[0326] 实施例4A: PNA寡聚物的化学裂解

在一些实施方案中,PNA-缀合物抗体被设计为允许通过方法诸如Gyros技术或NanoString nCounter平台多重定量测量蛋白表达,其基于DNA计数。因此,必须在结合组织后从PNA-缀合的抗体裂解PNA序列以允许非原位PNA计数。在该具体实例中,PNA序列经由二硫键与抗体结合,所述二硫键可以化学裂解(例如通过还原二硫键),导致PNA序列释放。

[0327] 图5A-5D显示用一抗、随后PNA-缀合的抗物种二抗针对Ki67和CD45染色并用SA-HRP DAB沉积检测的扁桃体载片。在SA-HRP处理之前,将载片与20 mM TCEP (三(2-羧乙基)膦,还原剂)孵育导致棕色染色的完全丧失,这表明PNA标签的去除。

[0328] 实施例4B: PNA寡聚物的光裂解

将扁桃体载片用一抗(兔Ki67)、二抗(GAR-PL-PNA,具有其上具有生物素的光可裂解PNA的山羊抗兔抗体)处理。然后将载片用UV光(手持式UV灯,365 nm)照射不同的时间段。对照载片未用UV处理并用于比较。然后将所有载片用SA-HRP和DAB处理用于检测。

[0329] 图12A、12B和12C举例说明照射的载片不具有颜色,指示PNA序列的光裂解。在该实验中,整个载片用UV光照射。可以用二硫键的化学还原实现PNA从整个载片的裂解。光照射

给出选择性照射载片上的特定目标区域的可能性。为了证明该概念,我们已使用激光捕获显微切割(LCM)系统来实现选择性照射。LCM使用通过物镜(高空间精度)的UV光来切割组织的特定区域(一直到单个细胞)。我们已经使用UV来选择性照射组织上的特定区域并光裂解PNA。图13举例说明扁桃体载片,其中照射生发中心(-未染色),其旁边是在未照射的另一个生发中心(阳性染色)。LCM UV是355 nm。

[0330] 实施例5:使用SA-FITC荧光检测PNA/抗体缀合物

除了生色检测以外,也可以使用SA-荧光团荧光检测缀合物中的生物素。图6A和6B显示用一抗、随后PNA-缀合的二抗针对Ki67染色并用SA-FITC检测的扁桃体载片的荧光图像。SA-FITC结合PNA序列上的生物素(参见图6C)。荧光信号与Ki67标志物的定位一致。该实验证实PNA-缀合的抗体提供的检测方案的多功能性。

[0331] 实施例6:PNA的定量测量

不希望受任何特定理论束缚,据报道,一旦使用抗体PNA缀合物,NanoString nCounter平台具有潜在地检测高达800种不同DNA序列的能力,允许针对IHC的巨大的多重能力。我们假设PNA可以以与DNA类似的方式检测,因为检测方案基于报告子链与靶寡聚物(据推测可能是DNA或PNA)的杂交。据信,PNA寡聚物可以显著短于通常与NanoString nCounter平台一起使用的标准DNA靶标(通常长度为约100个碱基),因为PNA的3'末端的生物素的存在排除了使用捕获链的需要。此外,相比于DNA与DNA,PNA与DNA的较高结合亲和力据信为相对短的PNA/DNA报告子双链体提供了足够的稳定性。

[0332] 作为概念证明,我们显示本文实施例8中描述的荧光染色的载片可以与TCEP (20 mM) 孵育以除去PNA-SA-FITC。基于荧光强度测量释放的PNA-SA-FITC。然后可以估计与载片结合的PNA-缀合的抗体的数目(图7A和7B)。

[0333] 实施例7:使用互补荧光DNA检测PNA:

在先前的实验中,通过针对生物素标记物染色来检测PNA。携带不同标记物(生色、荧光等)的互补DNA或PNA序列可用作替代染色方法。在该实验中,将扁桃体载片与兔抗Ki67一抗孵育,随后与PNA-缀合的GAR孵育。然后,将载片与和PNA互补的具有荧光标记物(例如FITC或罗丹明)的DNA序列一起孵育。图8A、8B、8C和8D显示载片通过DNA杂交成功染色。荧光染色与标志物定位一致,并且未观察到背景信号。DNA序列作为手动滴定添加,浓度为约185 nM,且体积为约100 μ L。

[0334] DNA序列:

1:5'-CTGAAGATGGTTGAC/罗丹明-3' (SEQ ID NO: 16)

2:5'-FAM/CTGAAGATGGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 17)。

[0335] 该实验证实,与抗体缀合的PNA标签是活性的并且可通过杂交在组织上接近互补DNA。两个DNA序列是相同PNA的互补序列,其各自携带独特的荧光团。将两个荧光团置于DNA序列的不同末端(5'末端的FITC和3'末端的罗丹明)。因此,FITC在与PNA杂交之后位于远离抗体的远端,而罗丹明被置于抗体的密切邻近处。在两种情况下均观察到阳性染色,证明通过与互补DNA序列杂交检测PNA的能力。

[0336] 在另一个实验中,扁桃体组织用与10个碱基的PNA序列1缀合的抗CD3和与10个碱基的PNA序列2缀合的抗CD8染色(PNA序列1与PNA序列2不同)。同时添加两种PNA-缀合的抗体作为混合物(混合物)。然后,两种10个碱基的DNA序列与2种PNA序列互补,使得DNA序列1

与PNA序列1互补,并在其末端具有alexa488荧光团,且DNA序列2与PNA序列2互补且在其末端具有alexa647荧光团。添加两种DNA序列作为混合物(混合物)。荧光图像显示,当我们在绿色通道下观察时,显示所有CD3阳性细胞(图27A),并且当我们在红色通道下观察时,显示所有CD8阳性细胞(图27B)。合并的图像显示两种标志物的共定位(图27C)。

[0337] 实施例8:使用互补半抗原化DNA检测PNA

在该实验中,互补DNA用半抗原(DIG)标记。将两个扁桃体载片与兔抗Ki67和小鼠抗CD45孵育,随后分别与PNA-缀合的GAR和PNA-缀合的GAM孵育。将DIG-标记的互补DNA与两个载片孵育,随后与HRP缀合的抗DIG抗体孵育并DAB沉积。添加DNA作为手动滴定步骤,浓度为约185 nM,且体积为约100 μ L,且温度为37 $^{\circ}$ C。

[0338] 图9A、9B和9C显示载片成功染色,并且染色模式与标志物的定位一致。当省略一抗时没有观察到背景信号。

[0339] DNA序列:5'-CTGAAGATGGTTGAC/DIG/-3' (SEQ ID NO: 18)。

[0340] 图25举例说明用较短的PNA序列(10个碱基)进行的类似实验。扁桃体组织用抗Ki67染色,然后用与短PNA(10个碱基)缀合的GAR染色,随后和与10个碱基的PNA标签互补的10个碱基的DNA序列孵育。DNA序列用DIG标记,其用于显现用抗DIG-HRP抗体染色,随后进行DAB沉积。

[0341] 实施例9:经由点击化学的PNA Ab缀合

将PNA寡聚物与抗体缀合的步骤如下:

(1) 抗体还原以引入巯基(硫醇):向100 μ g的Ab中添加2.5 μ L的1 M DTT(二硫苏糖醇)并孵育30分钟

(2) 用Zeba脱盐旋转柱(7 MWCO)除去过量DTT

(3) 以1:12 Ab:接头的比率添加DBCO-马来酰亚胺异双官能接头(来自点击化学工具A108-25)并孵育过夜

(4) 用Zeba柱清洁并以1:6 Ab:叠氮化物-PNA的比率添加叠氮化物-PNA并孵育过夜。

(5) 用Zeba柱清洁。

[0342] 图19举例说明与抗Ki67一抗(兔mAb)和GAR-PNA(用点击化学缀合)孵育并用SA-HRP检测的扁桃体组织。该图像显示PNA经由点击化学成功缀合至抗体。

[0343] 实施例10:经由马来酰亚胺化学的PNA Ab缀合

将PNA寡聚物与抗体缀合的步骤如下:

(1) 抗体还原以引入巯基(硫醇):向100 μ g的Ab中添加2.5 μ L的1 M DTT(二硫苏糖醇)并孵育30分钟;

(2) 用Zeba脱盐旋转柱(7 MWCO)除去过量DTT;

(3) 以1:6 Ab:马来酰亚胺DNA的比率添加马来酰亚胺-PNA,并孵育过夜;和

(4) 用Zeba柱清洁。

[0344] 实施例11:使用Gyros平台技术的PNA定量

为了证明使用Gyros技术的PNA定量,测试浓度范围在约0.0274 nM至约20 nM的生物素化PNA寡聚物(Bt-PNA)(表1)。对于每种浓度,首先在室温下将1:2比率的Bt-PNA与用洋地黄毒苷标记的互补单链DNA(DNA-DIG)杂交,然后通过Gyros一式两份进行分析。使用Ms-抗DIG、随后使用Alexa Fluor 647-GAM实现检测。使用Gyros程序拟合四点曲线(参见表1),并

生成 R^2 大于0.998的标准曲线。值得注意的是,最低PNA浓度的信号与背景比(S/B)为约10,表明由于PNA或ssDNA导致的背景信号非常低。

[0345] 表1:具有0.0274nM至20nM的浓度范围的PNA的标准Druve曲线

样品 ID	预期浓度 [nM]	响应	S/B	计算浓度 [nM]	平均浓度 [nM]	CV 浓度 [%]	偏差 [%]
空白	0	0.0576	1.07				
空白	0	0.0503	0.933				
Bt-PNA 1	0.0274	0.509	9.44	0.0263	0.0277	6.83	-3.94
Bt-PNA 1	0.0274	0.559	10.4	0.029	0.0277	6.83	5.81
Bt-PNA 2	0.0823	1.43	26.6	0.0813	0.0804	1.51	-1.27
Bt-PNA 2	0.0823	1.41	26.1	0.0795	0.0804	1.51	-3.36
Bt-PNA 3	0.247	3.52	65.3	0.229	0.25	12	-7.41
Bt-PNA 3	0.247	4.07	75.5	0.271	0.25	12	9.73
Bt-PNA 4	0.74	9.68	180	0.762	0.785	4.16	2.97
Bt-PNA 4	0.74	10.2	188	0.808	0.785	4.16	9.21
Bt-PNA 5	2.22	22.9	424	2.2	2.16	2.9	-0.749
Bt-PNA 5	2.22	22.1	410	2.11	2.16	2.9	-4.74
Bt-PNA 6	6.67	52	965	6.55	6.58	0.632	-1.86
Bt-PNA 6	6.67	52.4	971	6.6	6.58	0.632	-0.975
Bt-PNA 7	20	105	1940	19.1	20.3	8.55	-4.44
Bt-PNA 7	20	112	2080	21.6	20.3	8.55	7.86

[0346] 为了进一步证实可以定量从抗体缀合物裂解的PNA并且可以在PNA裂解之后进一步染色抗体,如图33中所示进行实验。三种抗体(Ki67、CD8和PD-L1)与Bt-PNA-1缀合,并用

于检测正常扁桃体组织切片中的相应标志物。大多数组织处理步骤使用Ventana BenchMark XT自动染色机进行。在标准抗原修复之后,将PNA标记的一抗应用于组织并在约37℃下孵育约16分钟。然后将载片从组织染色机中取出并用反应缓冲液和水冲洗。向每个载片中添加约100 μL的20 mM TCEP溶液,并在湿度箱中孵育约20分钟。收集80微升含有裂解的PNA的溶液,并通过Gyros (诸如通过使用本文所述的技术) 进一步定量。将PNA裂解之后的载片放回自动染色机中,并使用Ventana UltraView DAB通用检测试剂盒进一步检测一抗。

[0347] 通过遵循与前述相同的程序与过量的互补单链DNA-洋地黄毒苷杂交,实现裂解的Bt-PNA的定量。结果概述于表2中。结果清楚地表明,可以成功地裂解用于组织染色的来自抗体缀合物的PNA并使用Gyros技术进一步定量。

[0348] 表2:从组织裂解的PNA的定量

	样品 ID	预期浓度 [pM]	响应	S/B	计算浓度 [pM]	偏差 [%]
标准品	空白	0	0.748	1		
	标准品1	5000	117	156	5020	0.394
	标准品2	1000	36.2	48.4	984	-1.56
	标准品3	200	10.3	13.7	205	2.58
	标准品4	40	2.74	3.66	39.4	-1.6
	标准品5	8	0.897	1.2	8.03	0.425
样品	Ki67 A ⁽¹⁾	未知	12.2	16.3	255	N/A
	Ki67 B ⁽¹⁾	未知	14.4	19.2	310	N/A
	CD8 A ⁽¹⁾	未知	1.85	2.47	23.3	N/A
	CD8 B ⁽¹⁾	未知	2.39	3.19	32.9	N/A
	PD-L1 A ⁽¹⁾	未知	4.62	6.18	76.6	N/A
	PD-L1 B ⁽¹⁾	未知	4.94	6.6	83.2	N/A
阴性对照	Bt-PNA 125nM ⁽²⁾		1.01	1.35	9.67	N/A
	Bt-PNA 12.5nM ⁽²⁾		0.529	0.707	< 8.00	N/A
	DIG-DNA 250 nM ⁽³⁾		0.553	0.739	< 8.00	N/A
	TCEP 溶液		0.398	0.532	< 8.00	N/A
(1). DIG-DNA最终浓度 = 250 nM						
(2). 不添加DIG-DNA, 仅PNA作为阴性对照						
(3). 不添加Bt-PNA, 仅DIG-DNA作为阴性对照						

[0349] 在PNA裂解之后,仍然可以通过标准IHC染色同一组织切片上的抗体,以显现PNA编码的标志物,如图34A和34B中所示。观察到每种标志物的特异性染色,表明裂解条件不会引起对组织或对抗体与标志物结合的明显损害。该结果表明将定量与显现FFPE组织中的生物标志物的空间分布组合的新方式,这是抗体-PNA缀合物的独特优势。

[0350] 实施例12 -通过Gyros技术检测的不同PNA寡聚物的比较

利用实施例11中所述的程序。比较以下PNA寡聚物和DNA寡聚物:

PNA1:生物素-o-GTCAACCATCTTCAG-Lys (C6SH)-3'

sPNA1:生物素-o-CCATCTTCAG-Lys (SMCC)

γ PNA (gPNA):生物素-0-GT*-CAA*-CCA*-TCT*-TCA*-G-Lys (SMCC)

短 γ PNA (sgPNA):生物素-0-CCA*-TCT*-TCA*-G-Lys (SMCC)

DNA:生物素-GTCAACCATCTTCAG

用于检测的cDNA-DIG:5'-DIG-CTGAAGATGG-3'

测试的PNA的最终浓度:250 pM、50 pM、10 pM和2 pM

用于检测的cDNA-DIG的最终浓度:25 nM。

[0351] 将PNA或DNA寡聚物在室温下与cDNA-DIG孵育,然后通过Gyros进行分析。分析的结果在图35A和35B中举例说明。

[0352] 如图35A中所示,所有PNA寡聚物都能够以最低浓度(2pM)检测到,但DNA寡聚物不能以相同浓度检测到(低S/B比)。对于所有浓度,来自PNA寡聚物的响应比DNA寡聚物高得多。这表明PNA-DNA杂交体的优异稳定性。不同PNA间的响应差异不显著。

[0353] 图35B举例说明PNA寡聚物的信噪比(S/B)远高于对应的DNA寡聚物,尤其是在较低浓度下(下小图)。总体而言,结果表明,可以使用Gyros将PNA寡聚物(甚至是10-聚体序列)定量至低-pM浓度。另一方面,具有相同序列的DNA寡聚物(15-聚体)不能被定量至如此低-pM浓度。另外,相对于对应的PNA寡聚物, γ -PNA寡聚物提供更高的S/B比。

[0354] 实施例13A

在该实验中,扁桃体组织用Ki67(兔Ab)染色,且然后用与PNA序列(CCATCTTCAG)缀合的山羊抗兔(GAR)抗体染色。将与PNA寡聚物互补并在其末端具有DIG报告子部分的DNA序列与GAR-PNA在载片上孵育。在洗涤后,添加抗DIG:HRP Ab。随后,沉积DAB以生成棕色信号。信号的存在将表明DNA成功地与PNA杂交,因为该信号要求DNA上存在DIG。不存在信号(如图36A中所示)表明在实验条件(200 nM DNA, 37°C, 30 min)下,DNA没有杂交。据信DNA PNA亲和力不足够强得足以确保在实验条件下与如此短的PNA序列杂交。

[0355] 实施例13B

在该实验中,将来自实施例13A的PNA用 γ PNA(15个碱基,但只有10个碱基与相同的DNA序列互补)替换。应用与实施例13A相同的实验条件。与实施例12相比,信号的存在表明, γ PNA/DNA双链体比相同的杂交序列和相同的条件下的PNA/DNA稳定得多(参见图36B)。的确,信号的存在表明, γ DNA与 γ PNA杂交以生成棕色信号。由于实验条件与实施例13A中相同,实验表明 γ PNA DNA亲和力高于PNA DNA,其显示 γ PNA与如实施例13A中的短PNA相比的优异性。

[0356] 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。如果有必要,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。

[0357] 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配置。

序列表

	<110> VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.	
	<120> 肽核酸缀合物	
	<130> P34032-W0-1	
	<150> US 62/599,810	
	<151> 2017-12-18	
	<150> PCT/US2017/66976	
	<151> 2017-12-18	
	<160> 21	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 1	
[0001]	gtcaaccatc ttcag	15
	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 2	
	ttagtccaac tggca	15
	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 3	
	cattcaaadc cccga	15
	<210> 4	
	<211> 10	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 4	
	ccatcttcag	10
	<210> 5	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 5	
	ttagtccaac	10
	<210> 6	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0002]	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 6	
	cattcaaadc	10
	<210> 7	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA序列	
	<400> 7	
	catcctgccg	10
	<210> 8	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	

	<223> 在5'末端的生物素-0 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (15)..(15) <223> 在3'末端的Lys(C6SH) <400> 8 gtcaaccatc ttcag	15
	<210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的: 合成的PNA缀合物 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (1)..(1) <223> 在5'末端的生物素-0 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (15)..(15) <223> 在3'末端的Lys(C6SH) <400> 9 ttagtccaac tggca	15
[0003]	<210> 10 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的: 合成的PNA缀合物 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (1)..(1) <223> 在5'末端的生物素-0 <220> <221> 修饰的碱基 <222> (15)..(15) <223> PL-Lys(C6SH), PL: 在3'末端的光可裂解接头 <400> 10 cattcaaadc cccga	15

	<210> 11	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 在3'末端的Lys (C6SH)	
	<400> 11	
	ctgaagatgg ttac	15
	<210> 12	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0004]	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的Alexa488-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 在3'末端的Lys (C6SH)	
	<400> 12	
	catcctgccg ctatg	15
	<210> 13	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	

	<222> (1).. (1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15).. (15)	
	<223> 在3'末端的Arg-0-Cys	
	<400> 13	
	gtcaaccatc ttcag	15
	<210> 14	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
[0005]	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15).. (15)	
	<223> 在3'末端的Lys(eg3-N3)	
	<400> 14	
	gtcaaccatc ttcag	15
	<210> 15	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15).. (15)	
	<223> Lys(SMCC), SMCC: 在3'末端的马来酰亚胺部分	
	<400> 15	
	gtcaaccatc ttcag	15

	<210> 16	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的DNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 在3'末端的罗丹明	
	<400> 16	
	ctgaagatgg ttgac	15
	<210> 17	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的DNA缀合物	
[0006]	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的FAM	
	<400> 17	
	ctgaagatgg ttgac	15
	<210> 18	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的DNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 在3'末端的DIG	
	<400> 18	
	ctgaagatgg ttgac	15
	<210> 19	
	<211> 10	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 在3'末端的Lys(SMCC), SMCC: 马来酰亚胺部分	
	<400> 19	
	ccatcttcag	10
	<210> 20	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
[0007]		
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (10)..(10)	
	<223> 在3'末端的Lys(SMCC), SMCC: 马来酰亚胺部分	
	<400> 20	
	ttagtccaac	10
	<210> 21	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的：合成的PNA缀合物	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 在5'末端的生物素-0	

	<220>				
	<221>	修饰的碱基			
	<222>	(10)..(10)			
[0008]	<223>	在3'末端的Lys(C6SH)			
	<400>	21			
	ccatcttcag				10

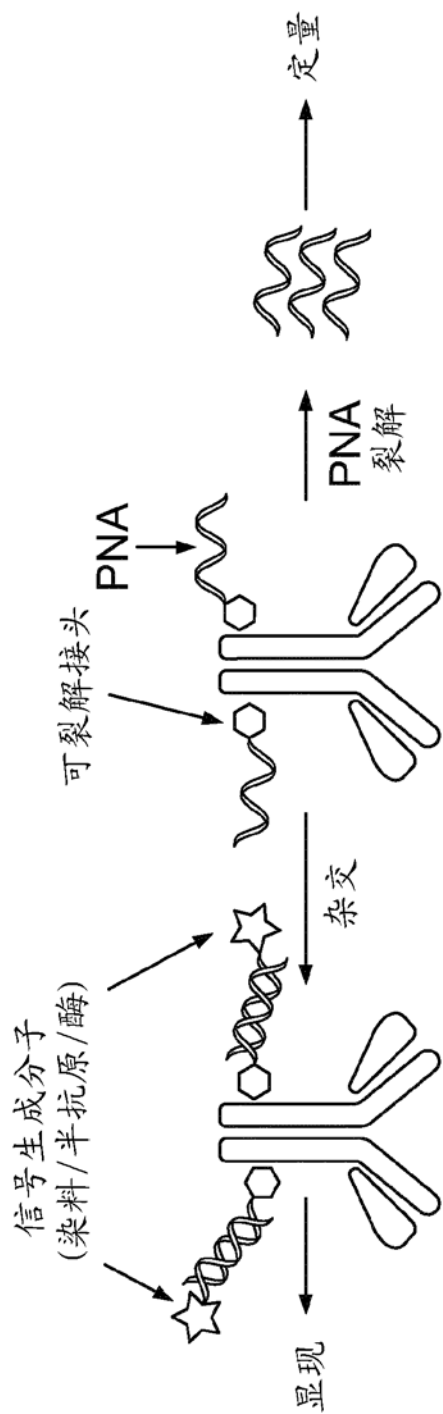


图 1A

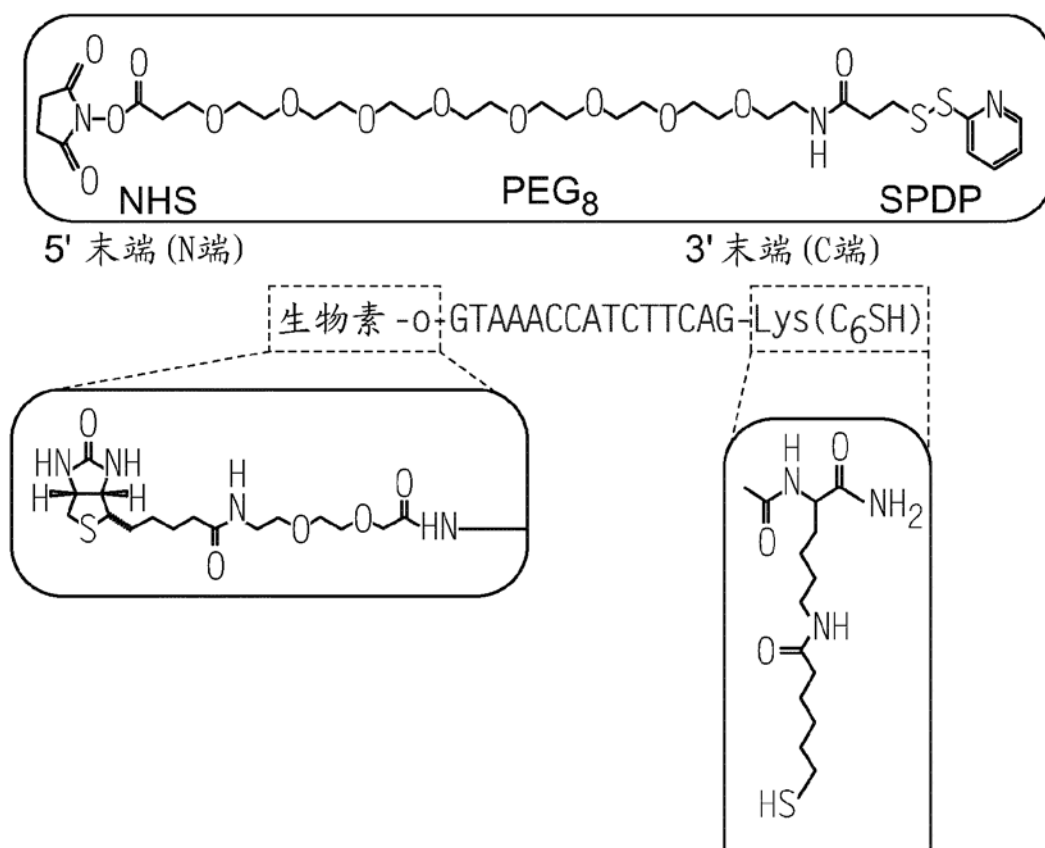


图 1B

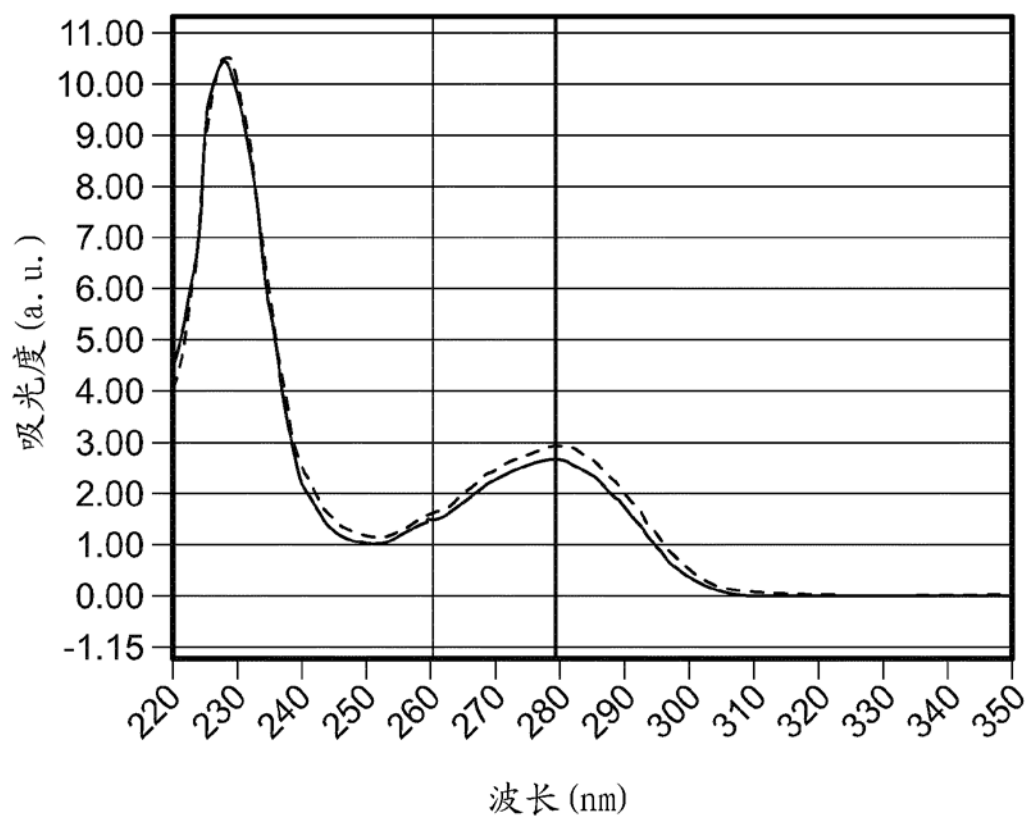


图 2A

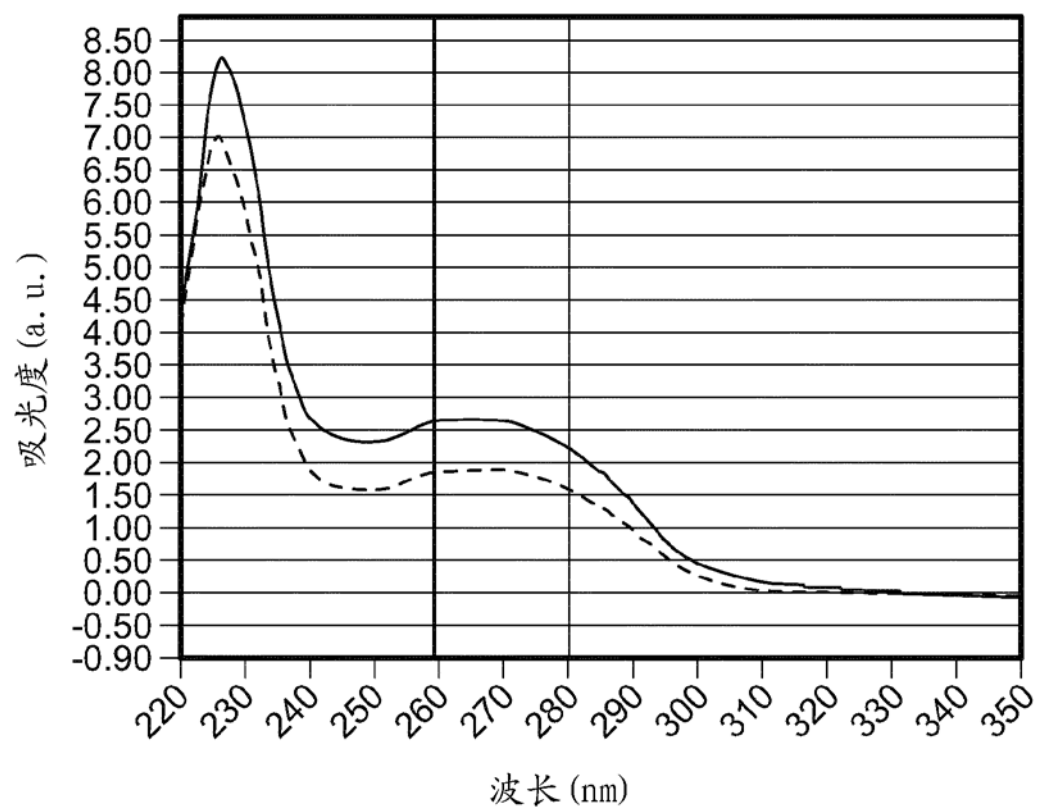


图 2B

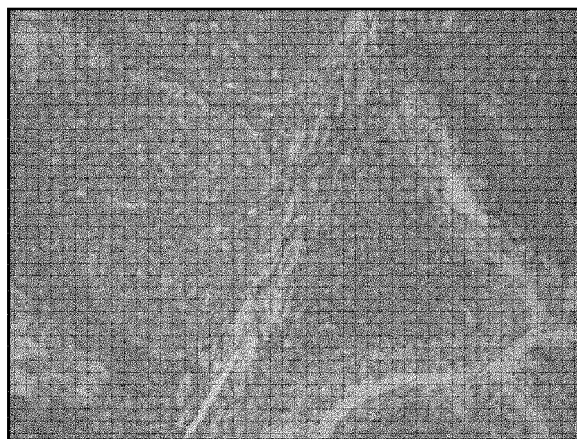


图 3A

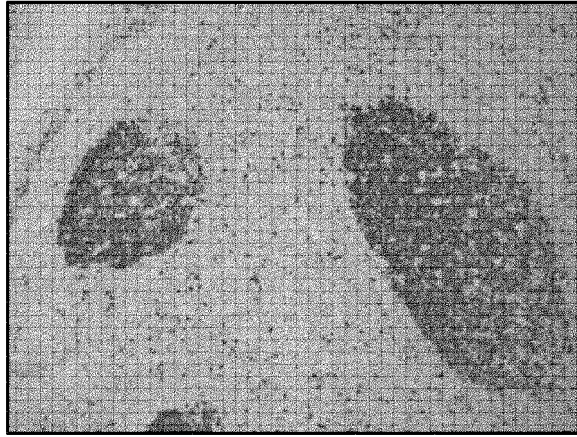


图 3B

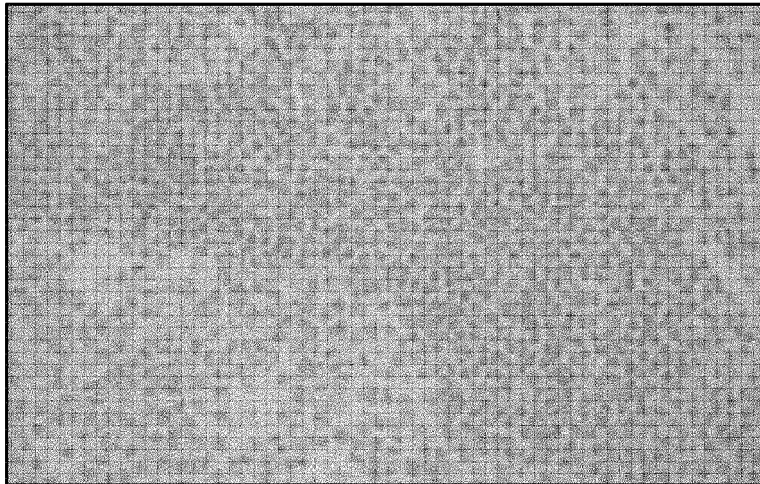


图 3C

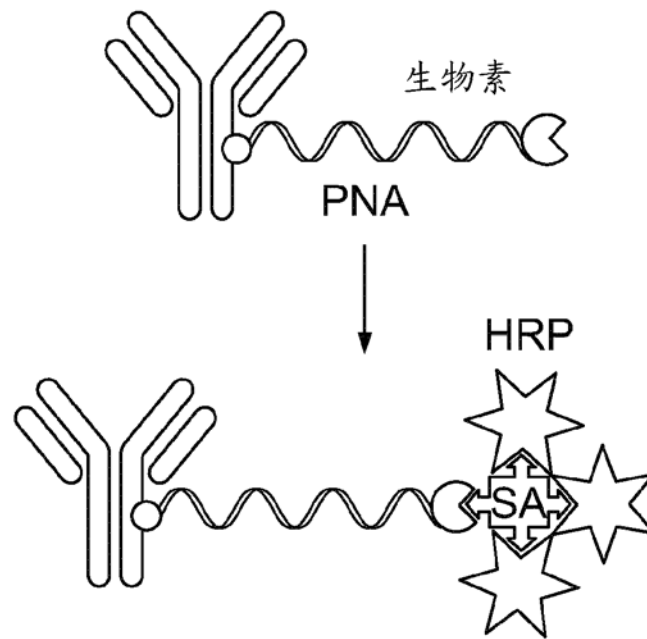


图 3D

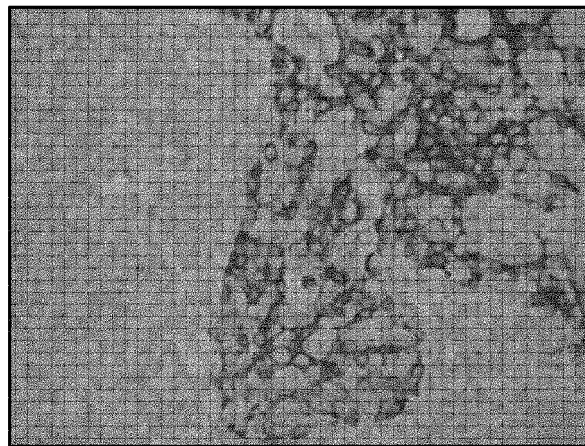


图 4A

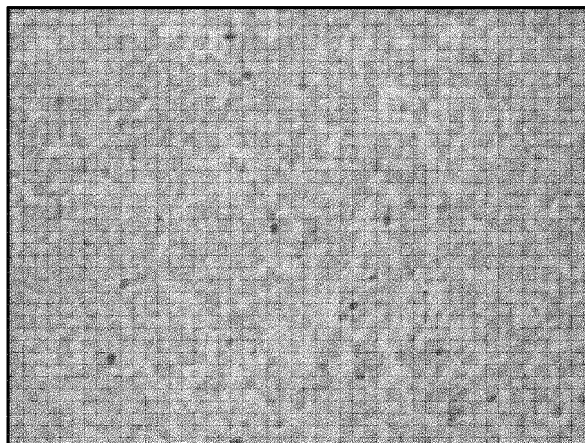


图 4B



图 5A

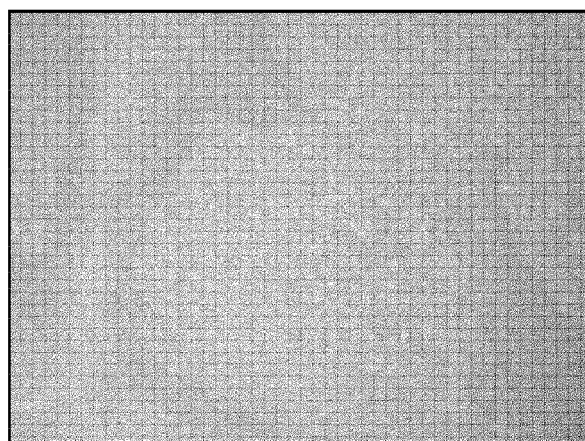


图 5B

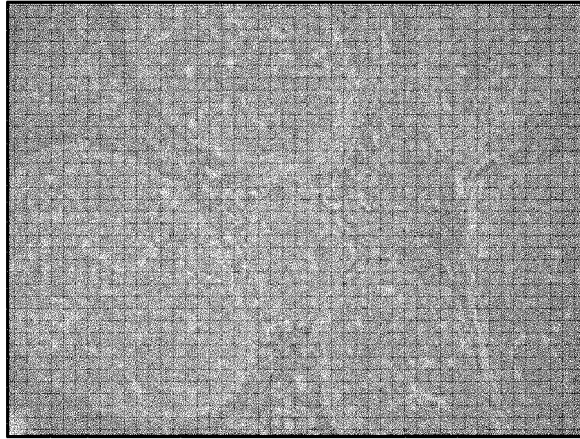


图 5C

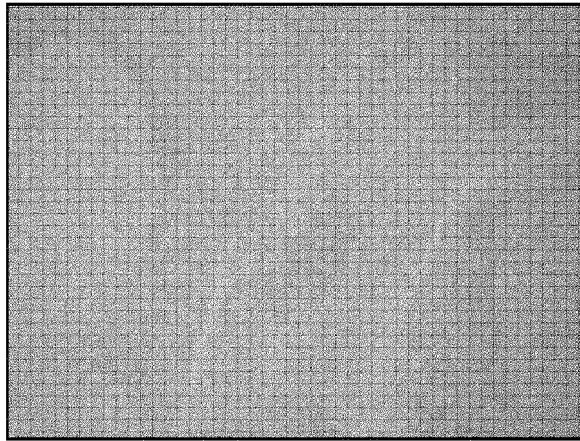


图 5D

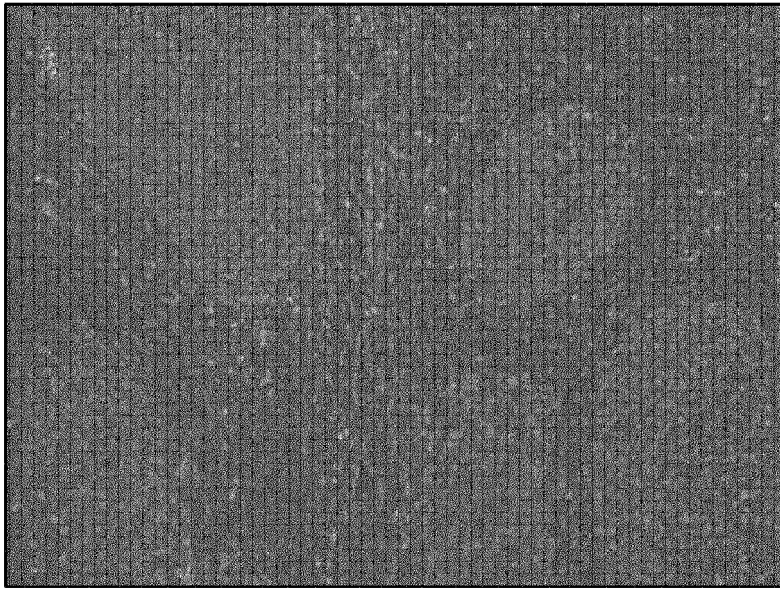


图 6A

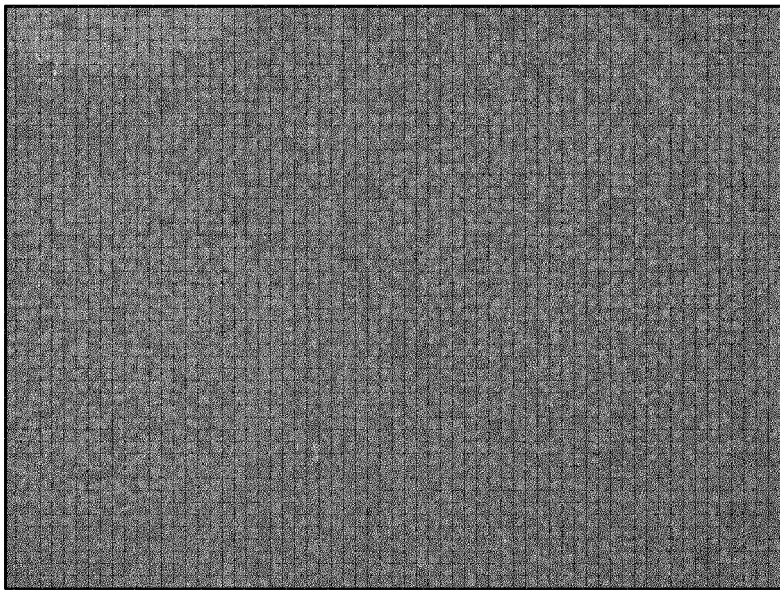


图 6B

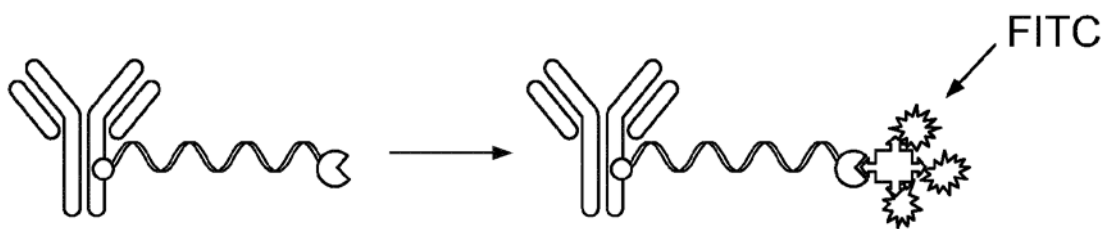


图 6C

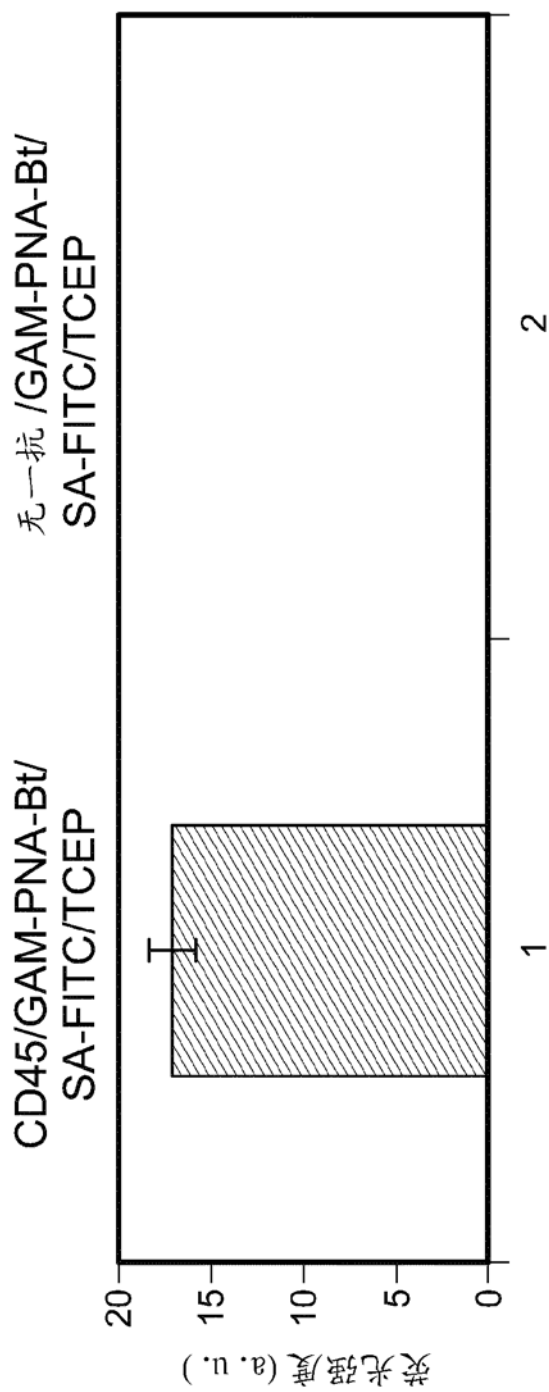


图 7A

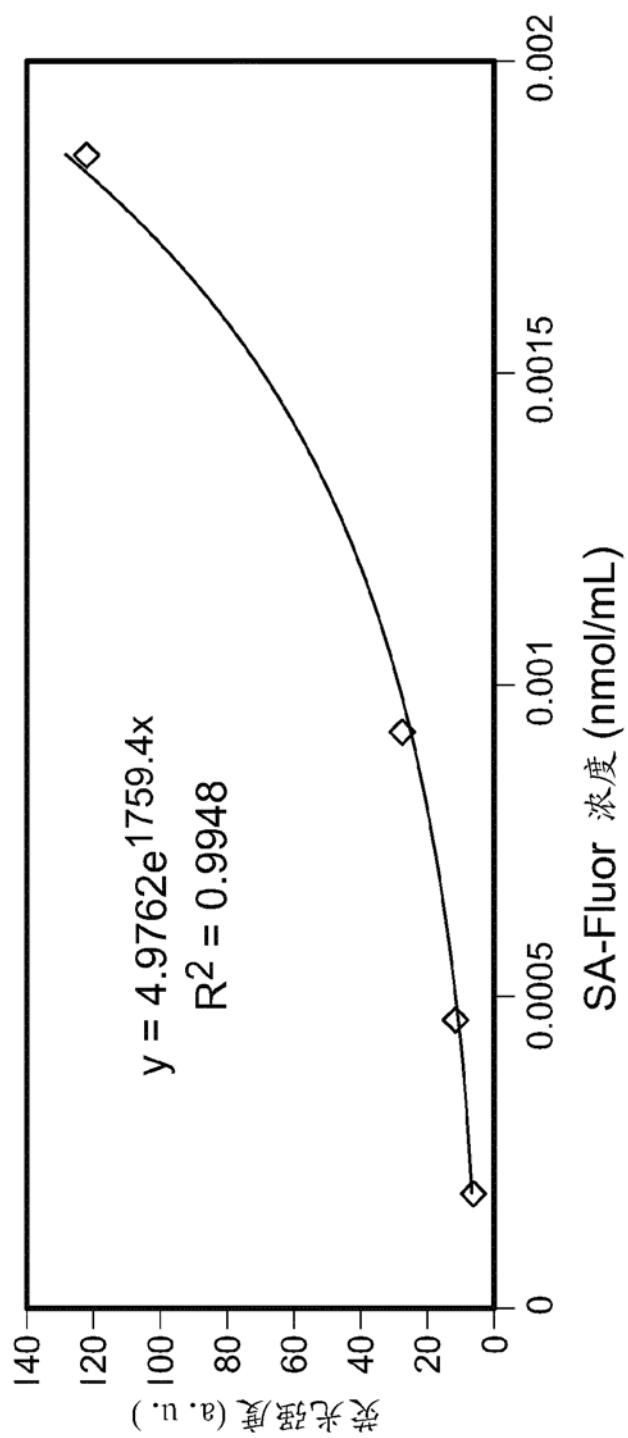


图 7B

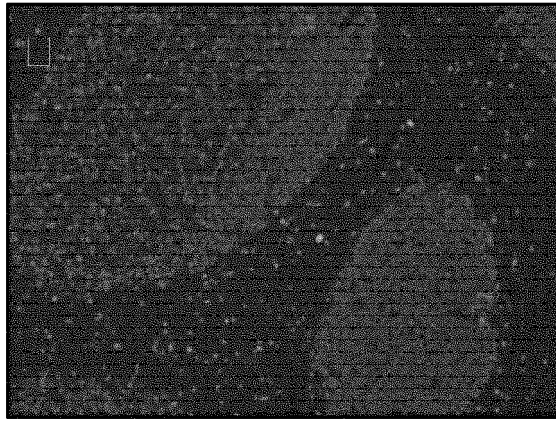


图 8A

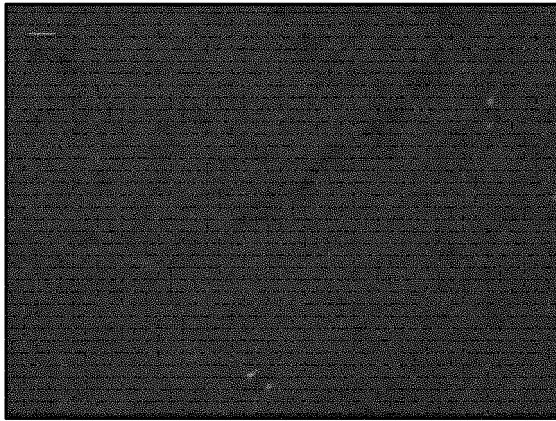


图 8B

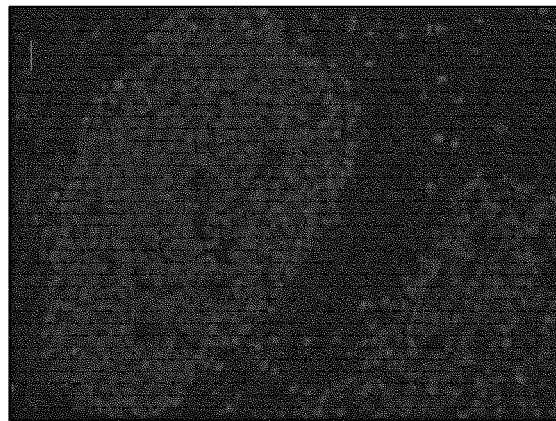


图 8C

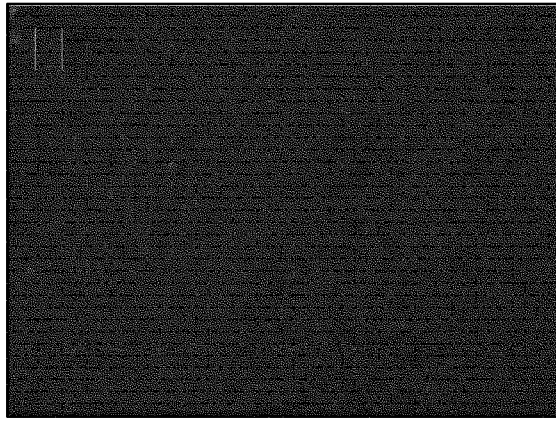


图 8D

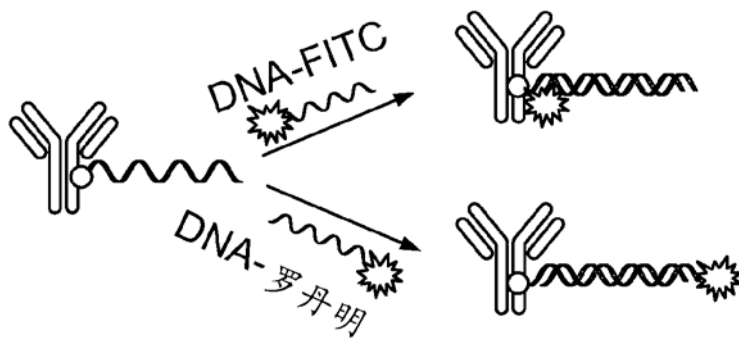


图 8E

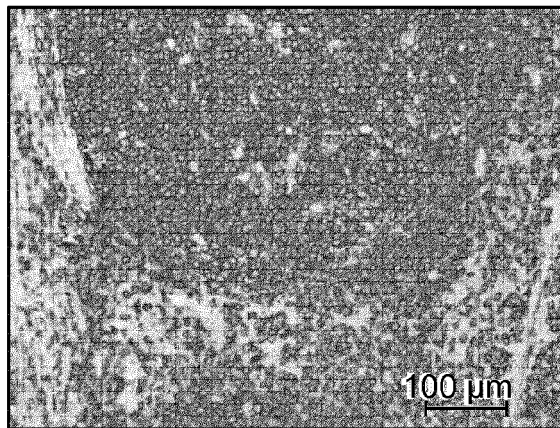


图 9A

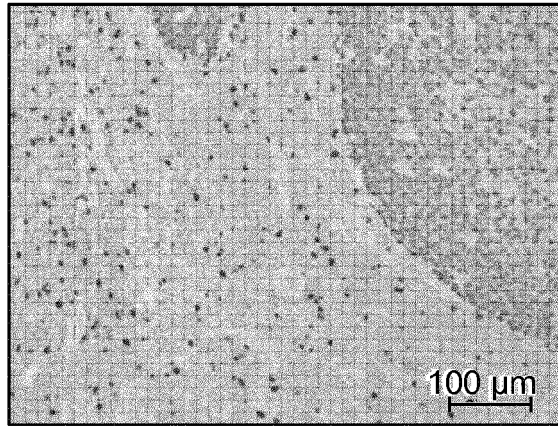


图 9B

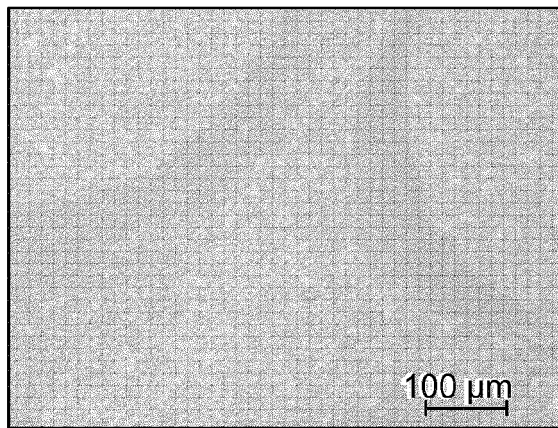


图 9C

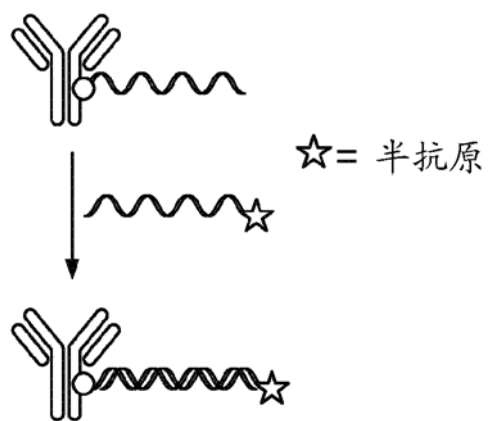


图 9D

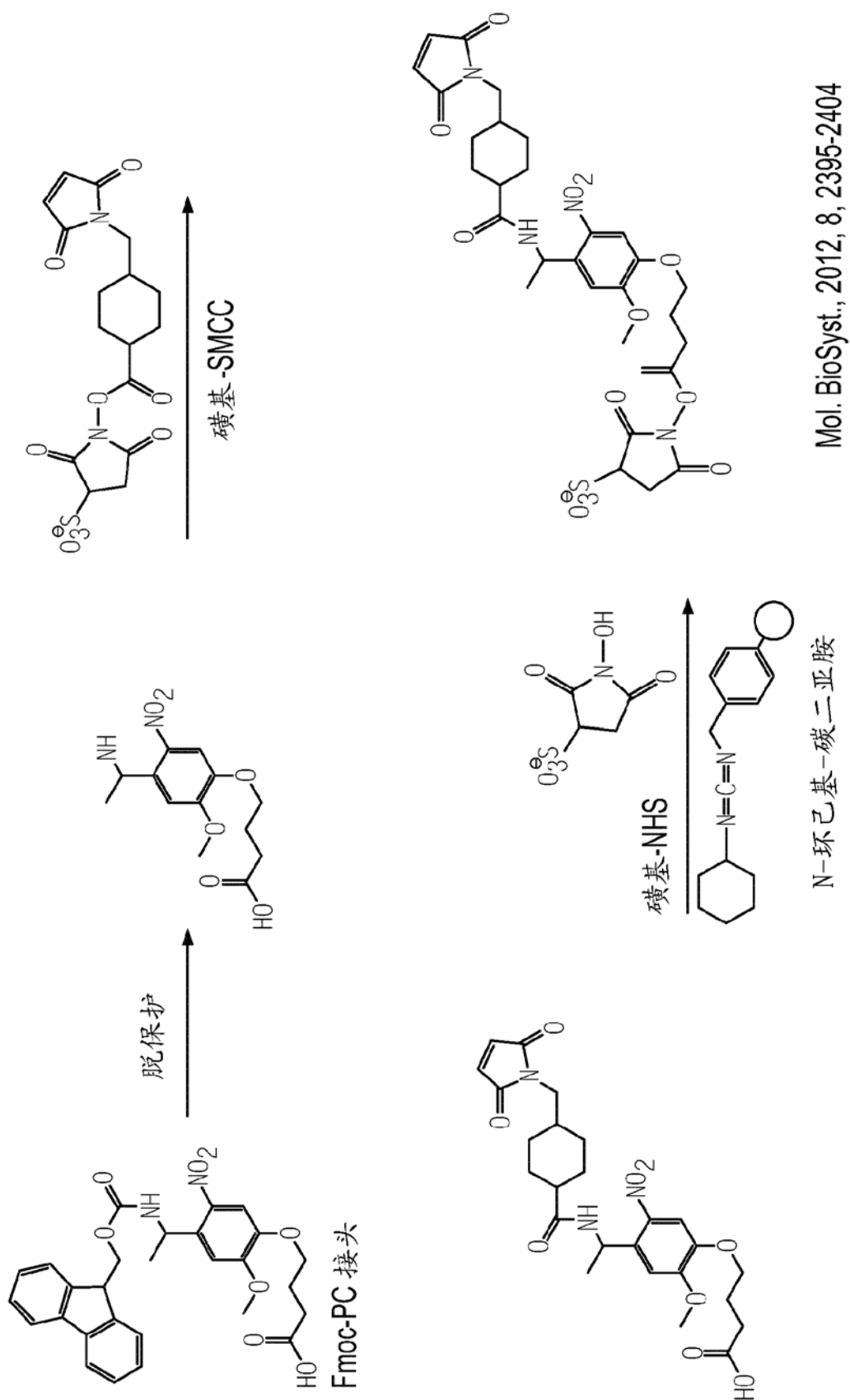


图 10

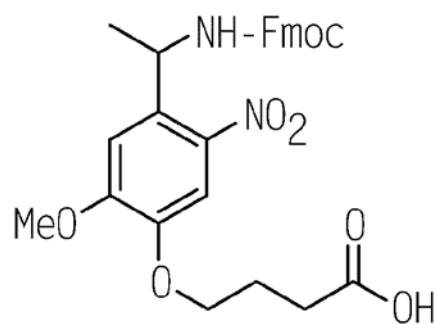


图 11

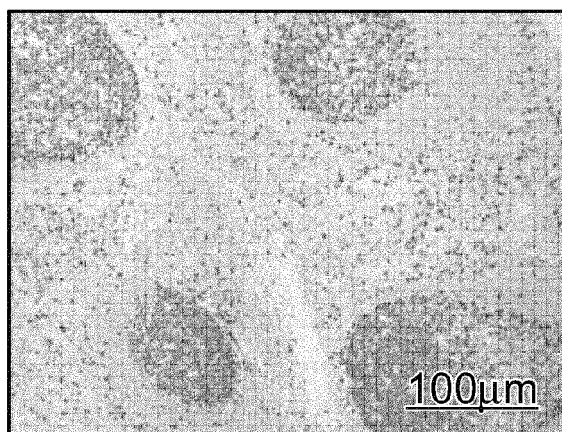
**0 Min**

图 12A

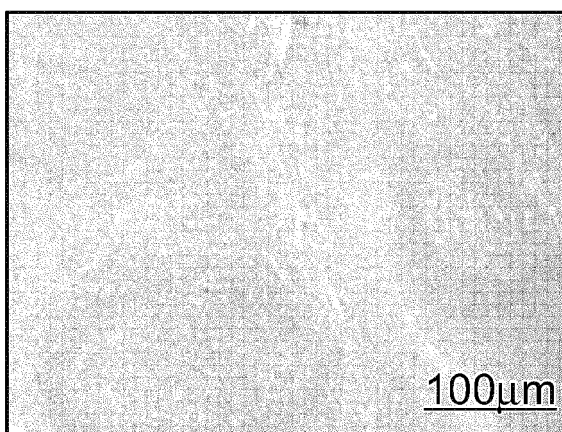
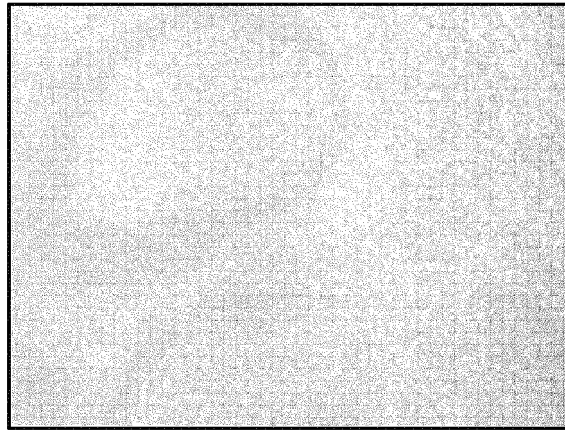
**5 Min**

图 12B



10 Min

图 12C

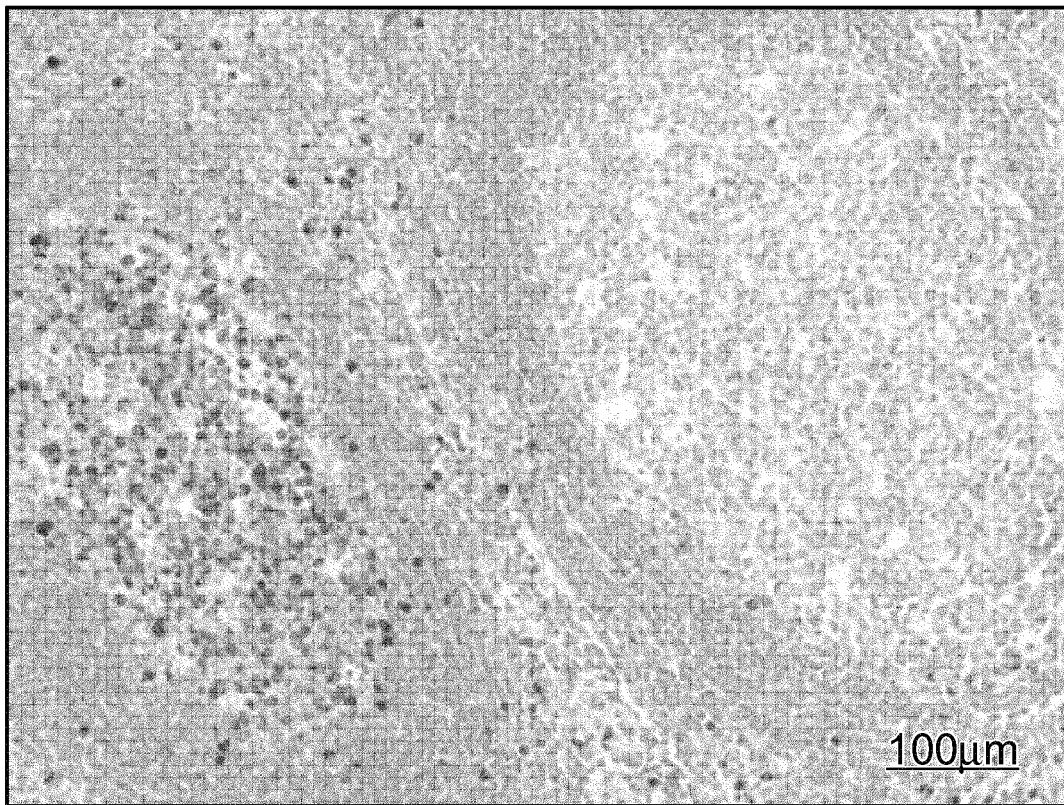


图 13

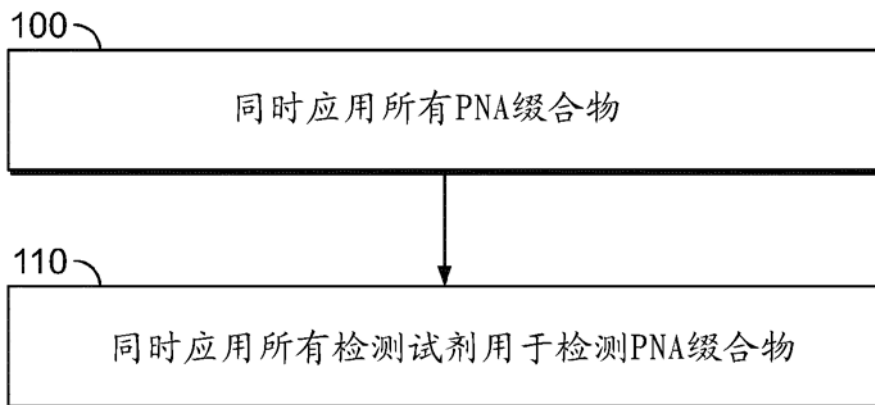


图 14A

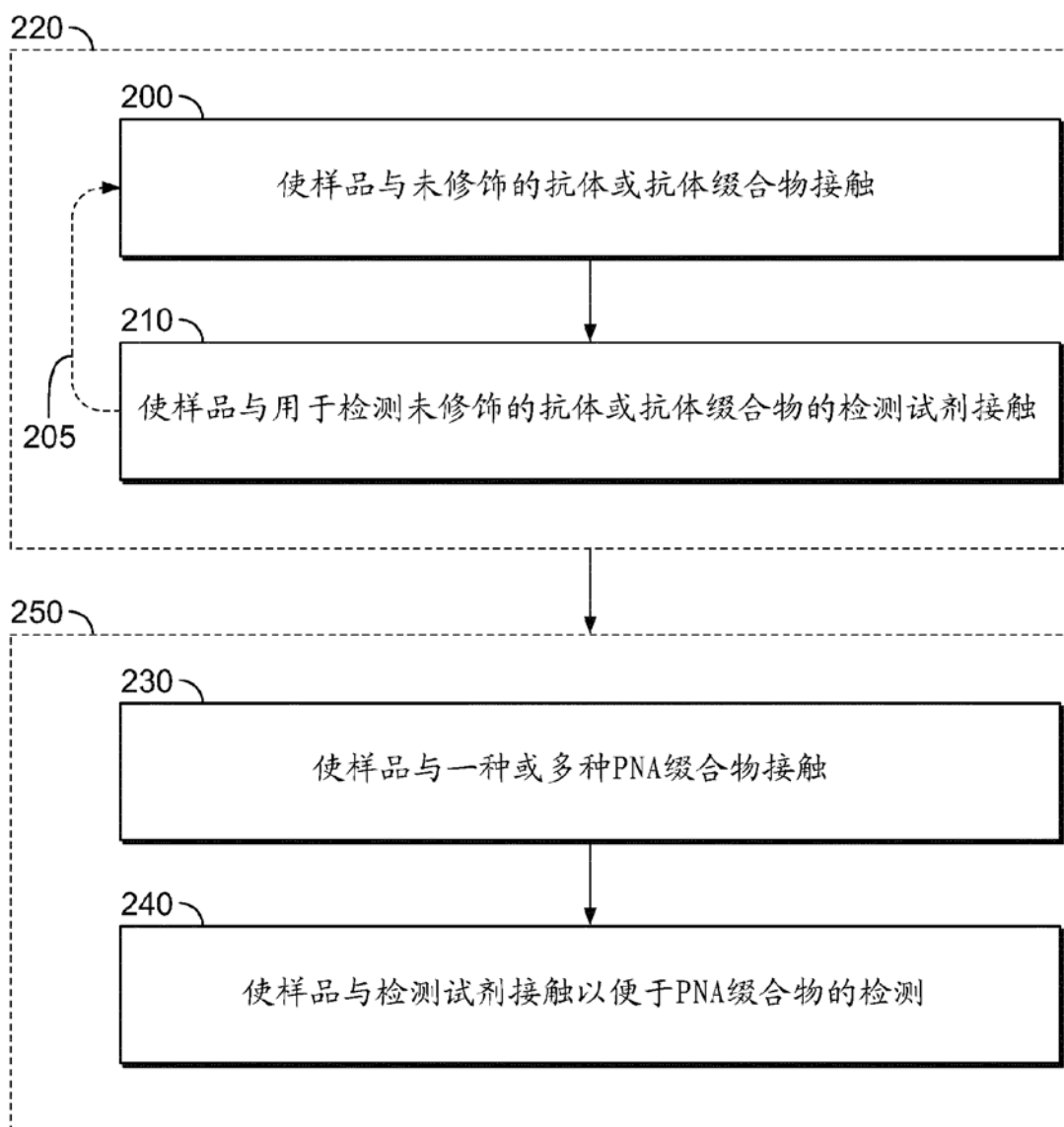


图 14B

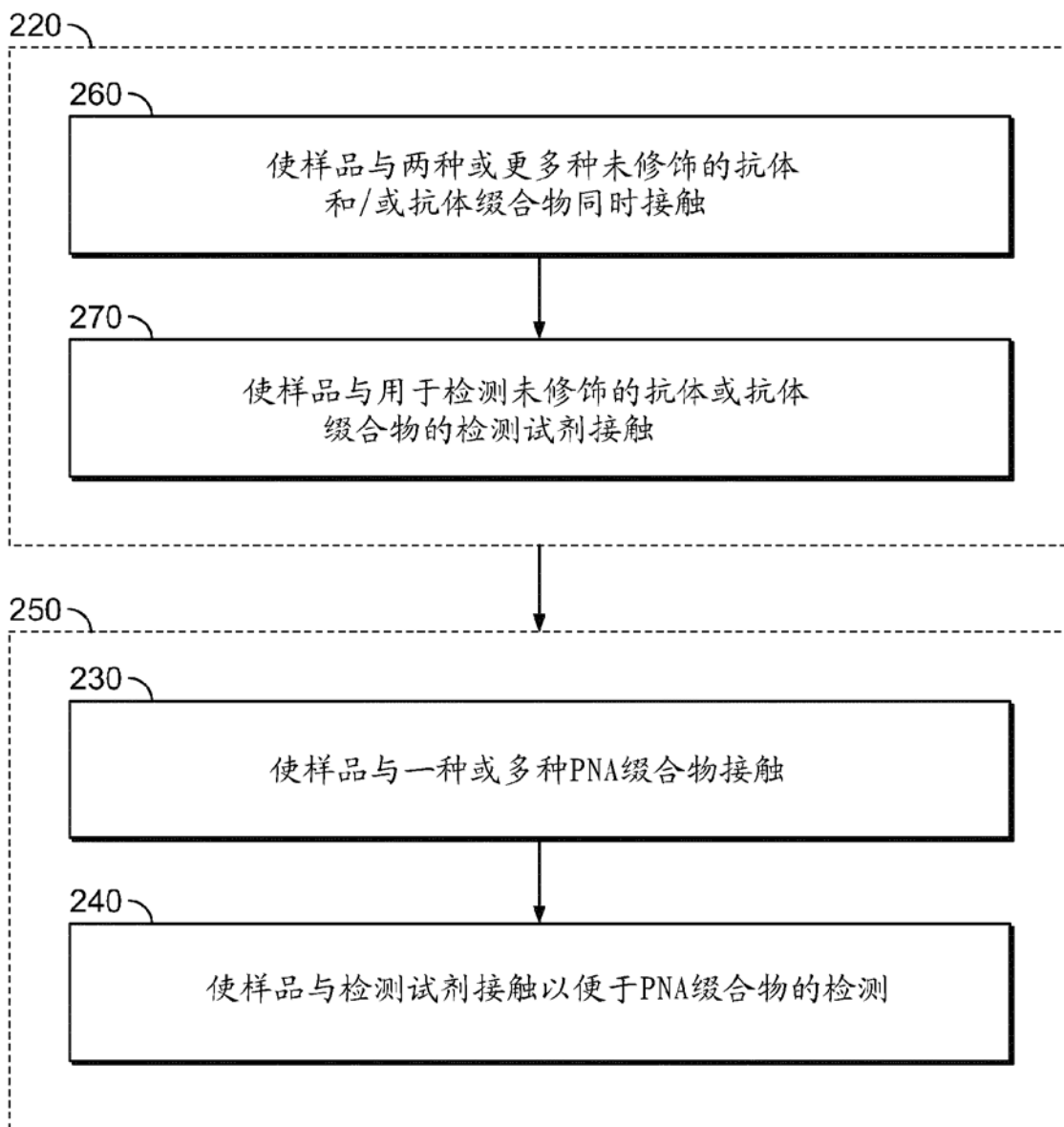


图 14C

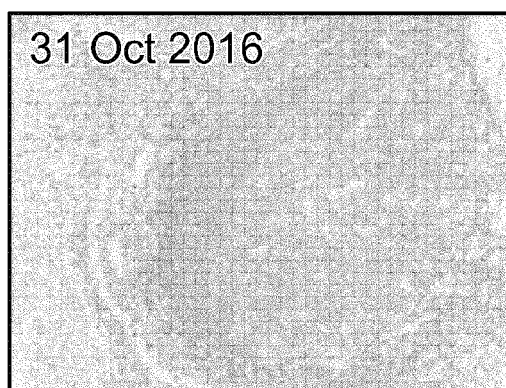
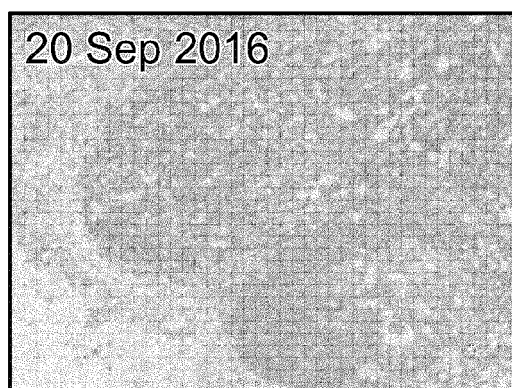
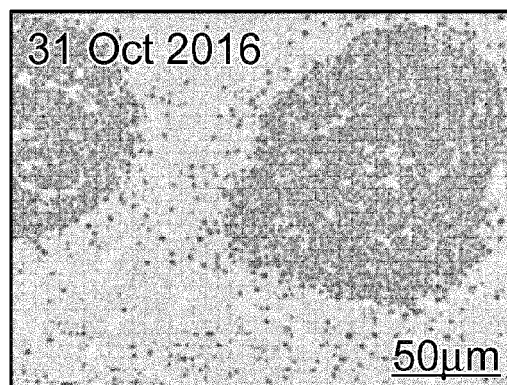
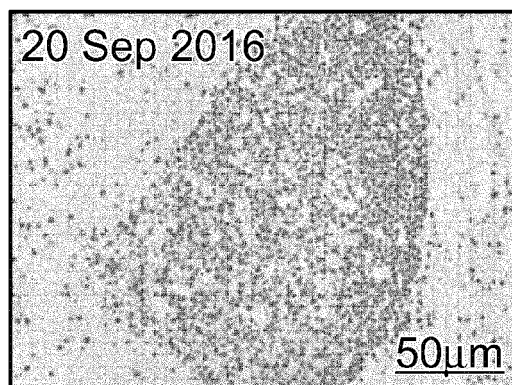
扁桃体 **/CD45/GAM-PNA/SA-HRP**扁桃体 **/Ki67/GAR-PNA/SA-HRP**

图 15

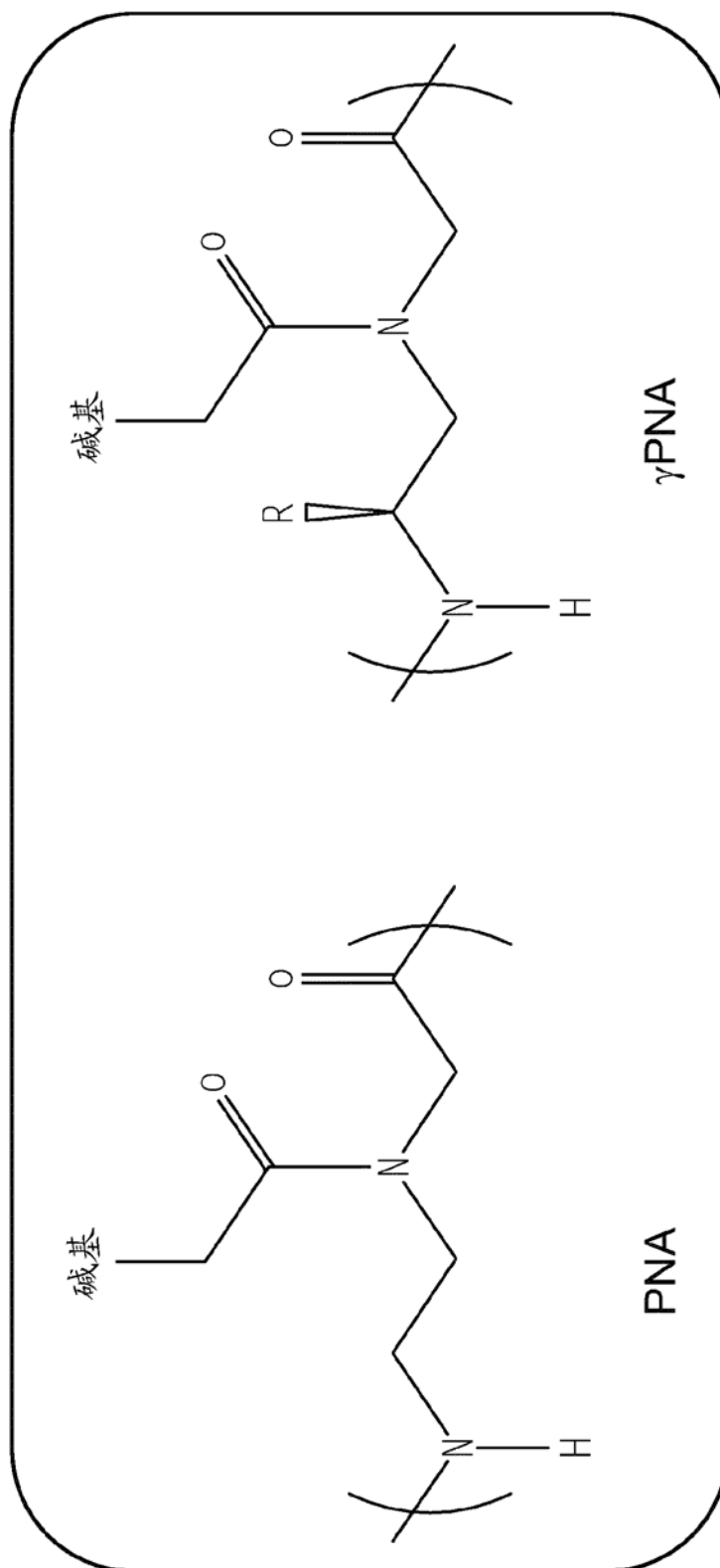


图 16

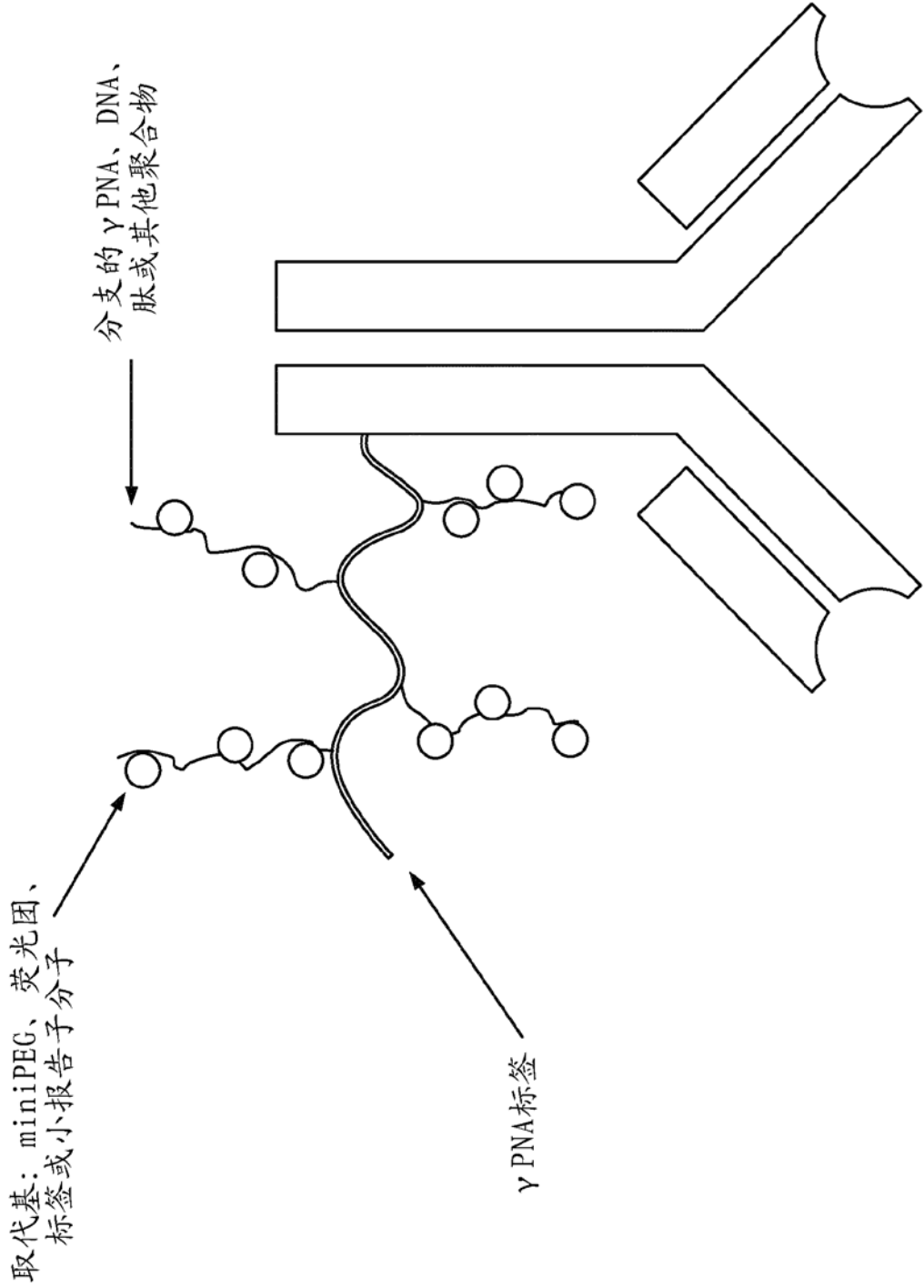


图 17

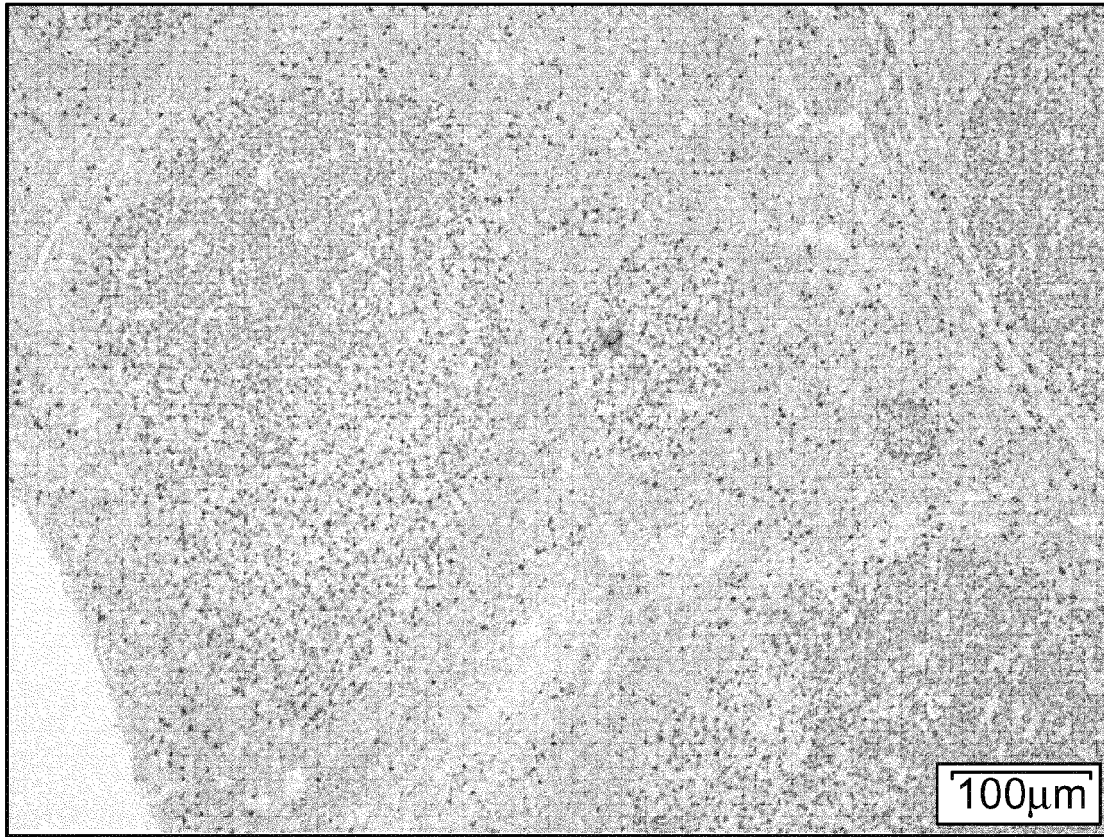


图 19

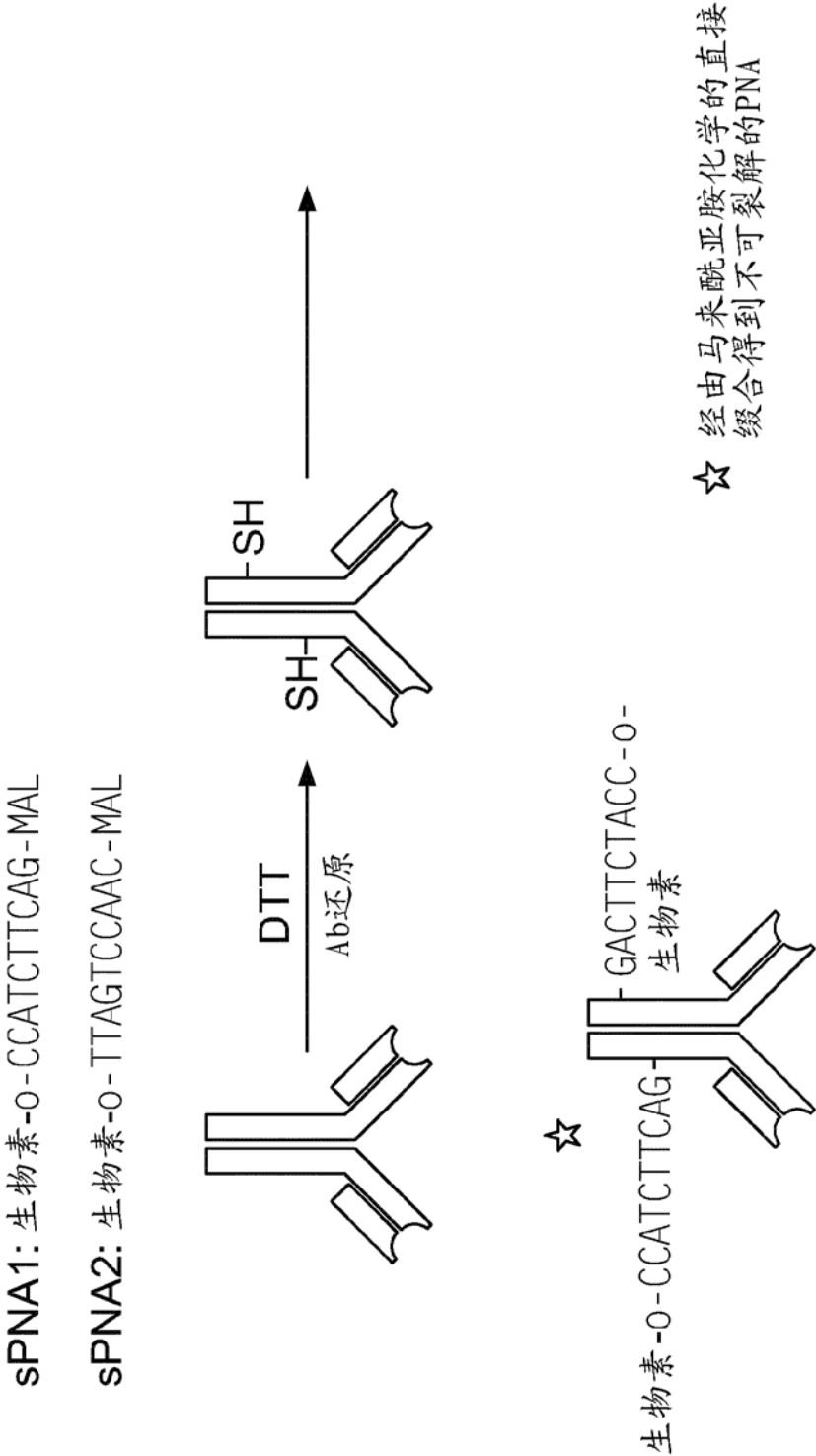


图 20

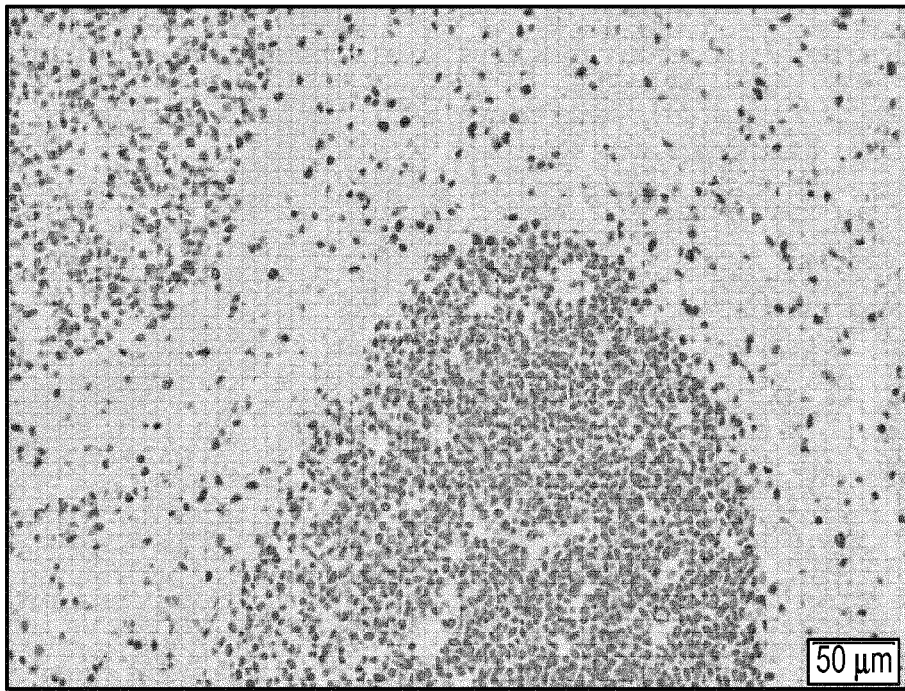


图 21A

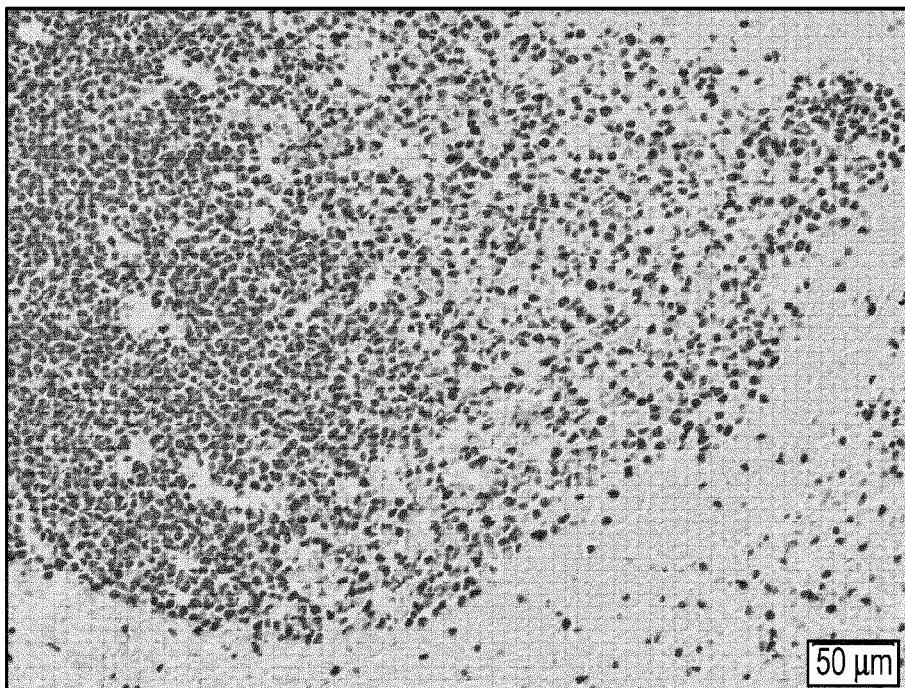


图 21B

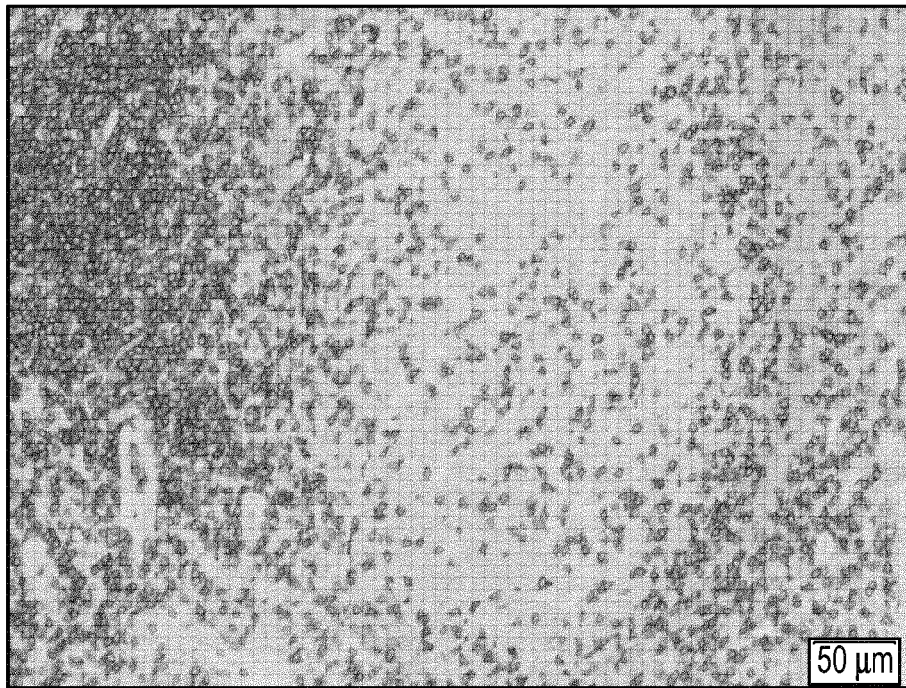


图 22A

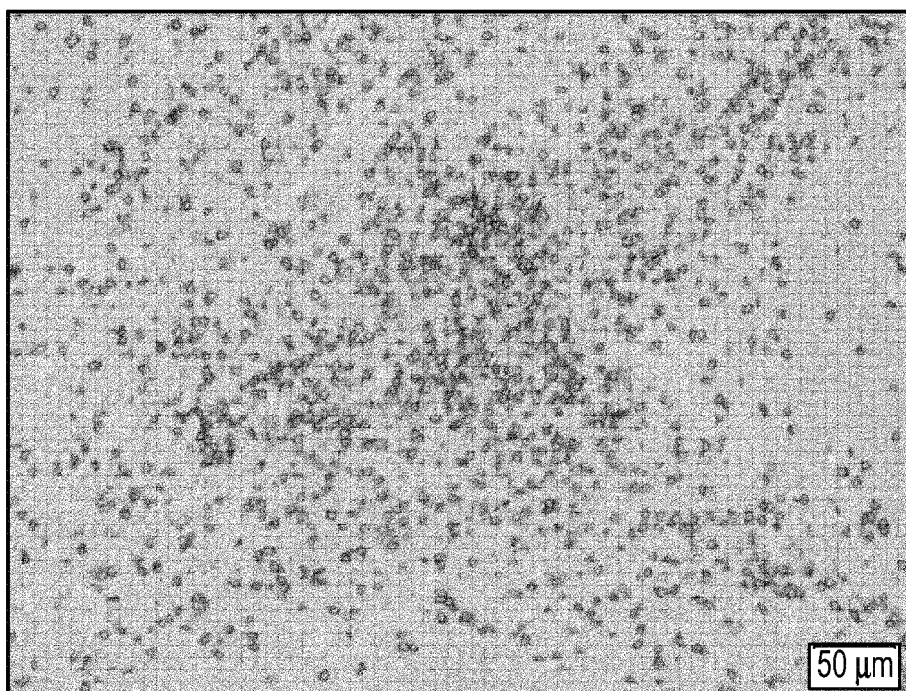


图 22B

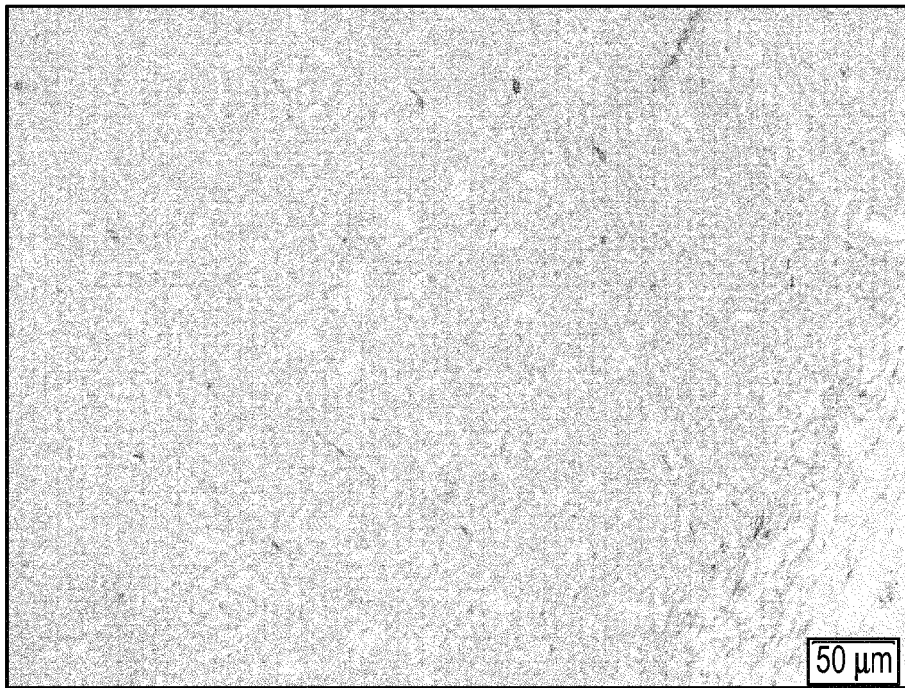


图 22C

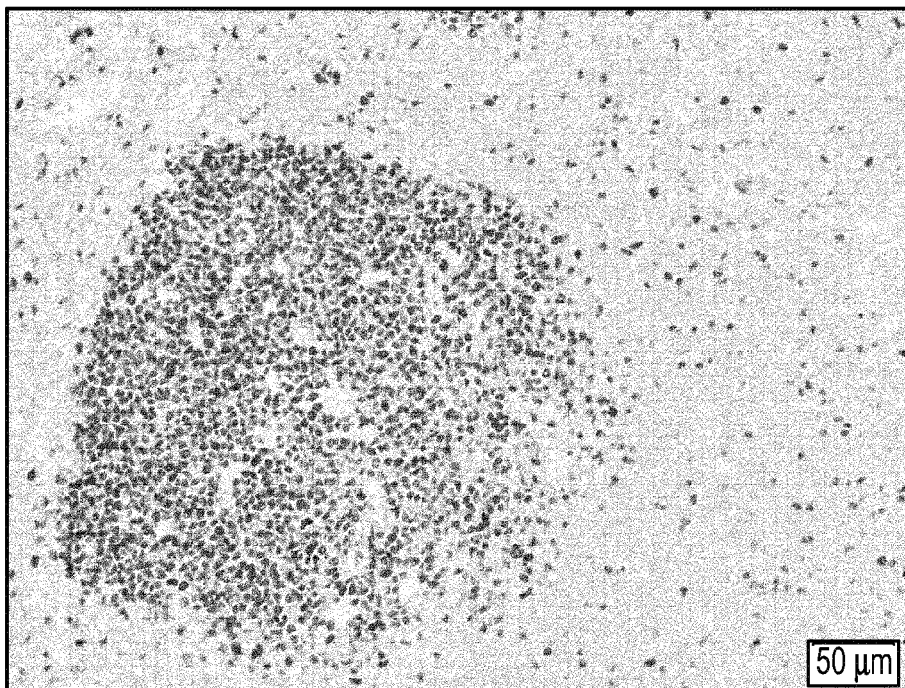


图 22D

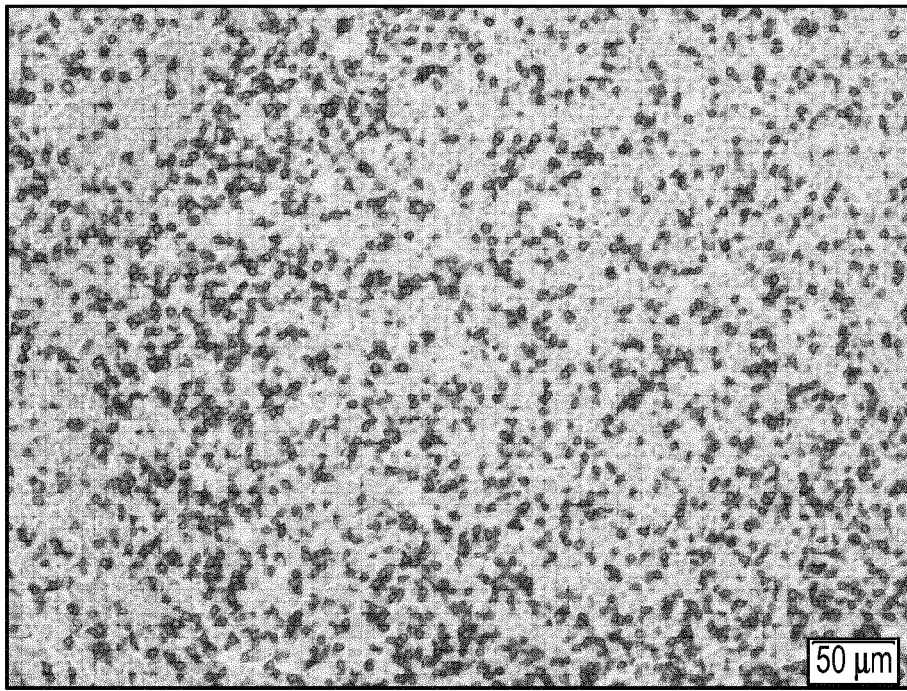


图 23

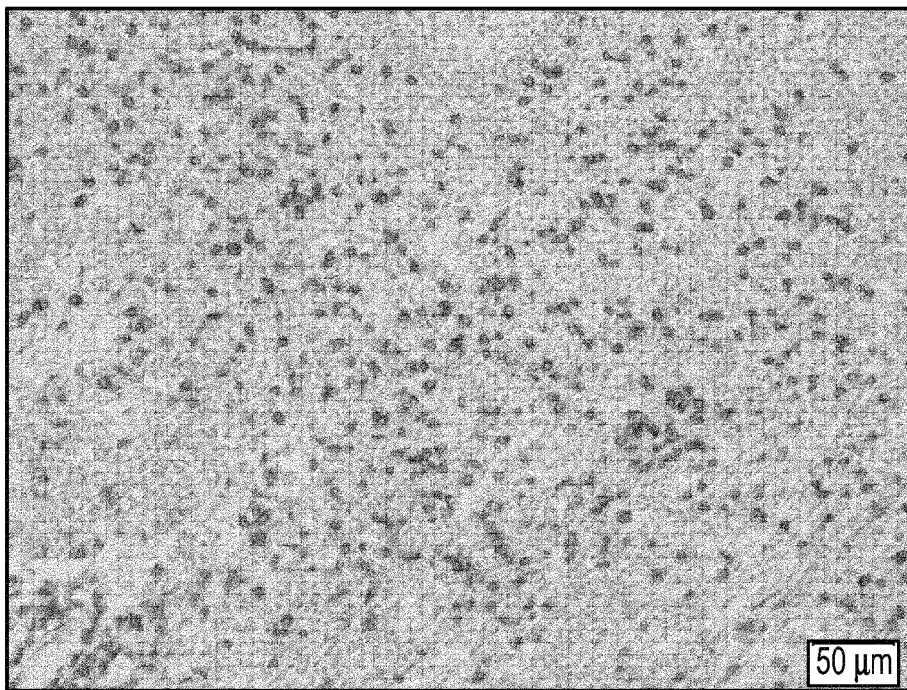
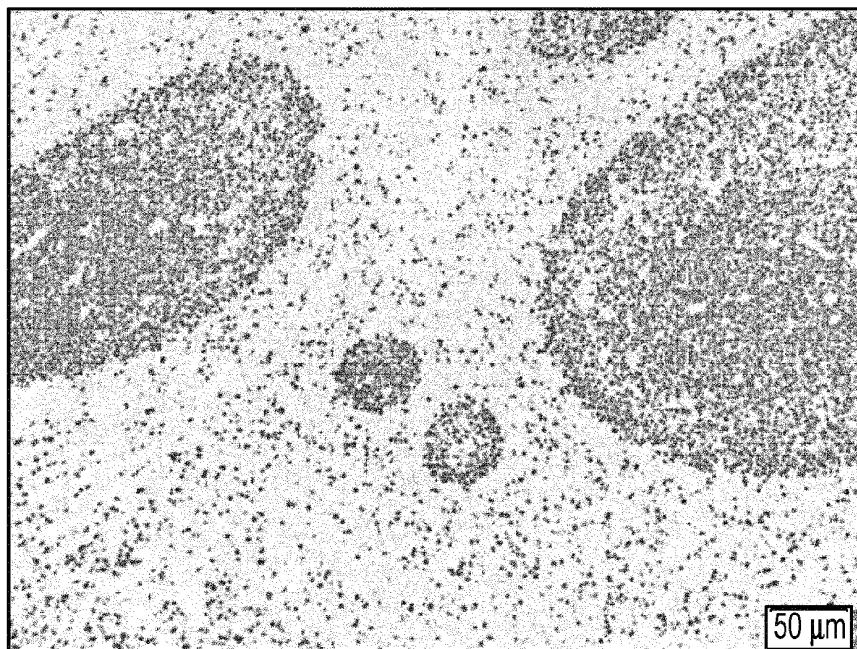
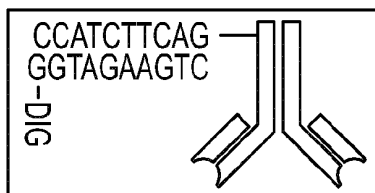
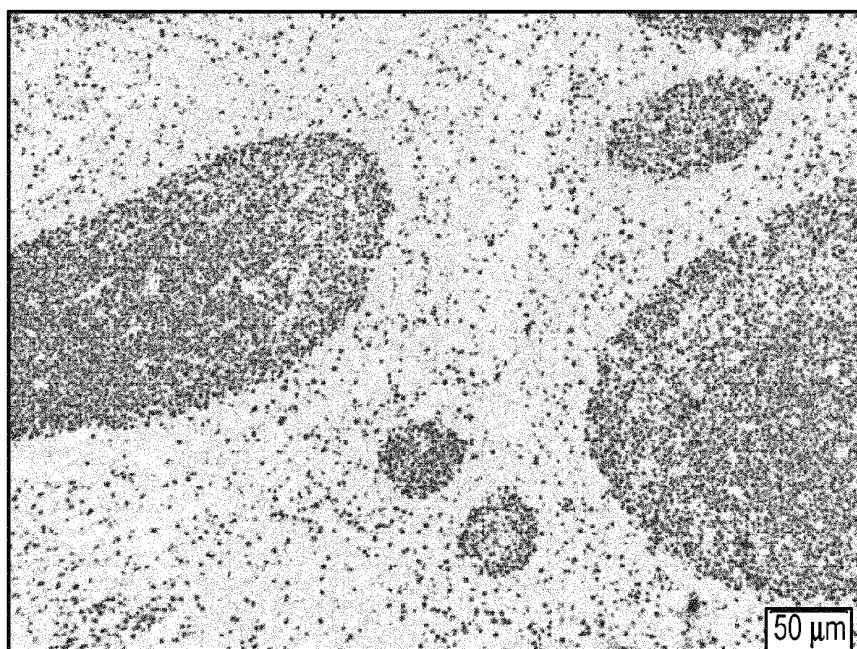


图 24

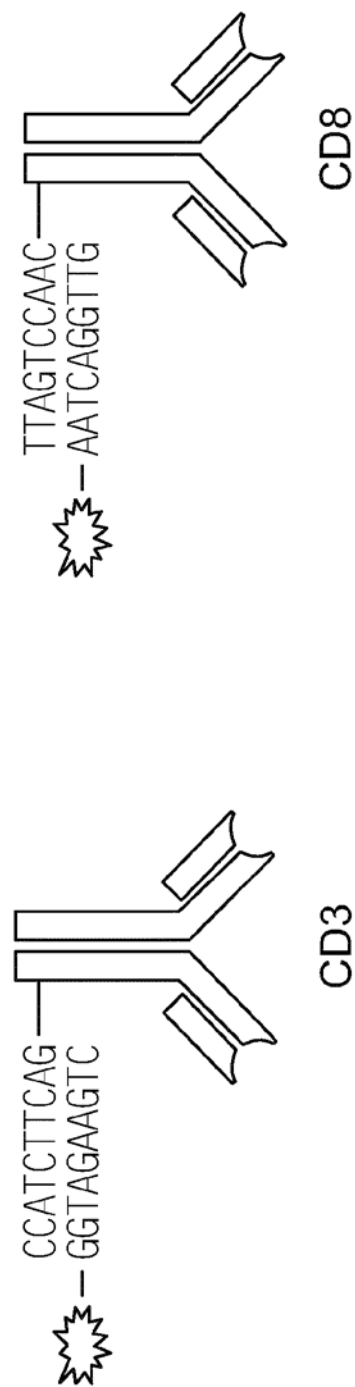


扁桃体_Ki67_GAR-sPNA_AB14_xDIG-HRP
5 uM



扁桃体_Ki67_GAR-sPNA_AB14_xDIG-HRP
10 uM

图 25



sPAN1: 生物素-o-CCATCTTCAG-MAL
sPAN2: 生物素-o-TTAGTCCAAC-MAL
AB15: CTGAAGATGG-Alexa488 , 与sPNA1互补
AB19: GTTGGACTAA-Alexa647 , 与sPNA2互补

图 26

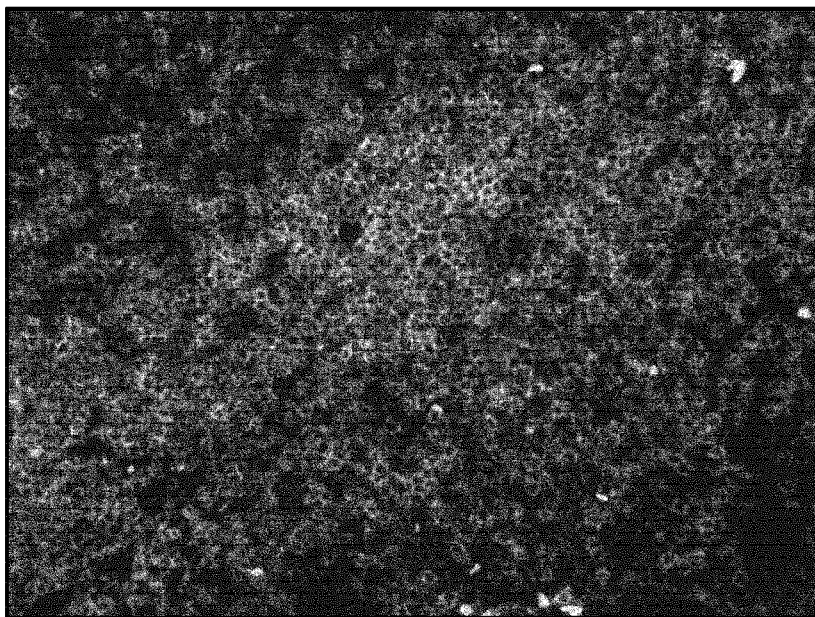


图 27A

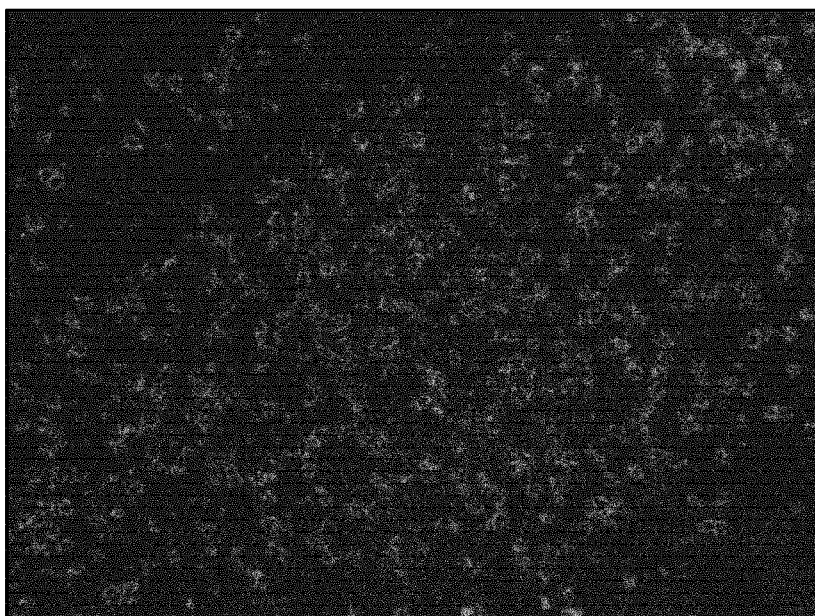


图 27B

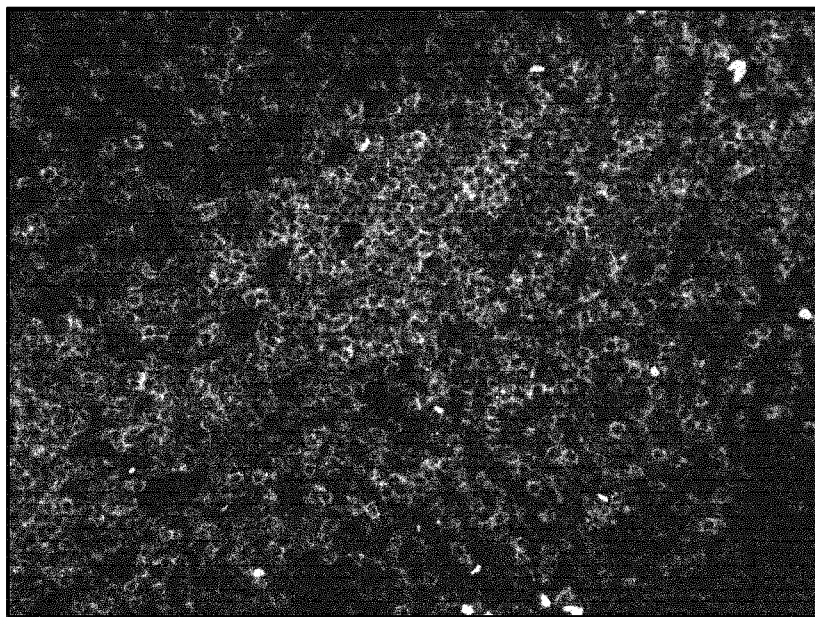


图 27C

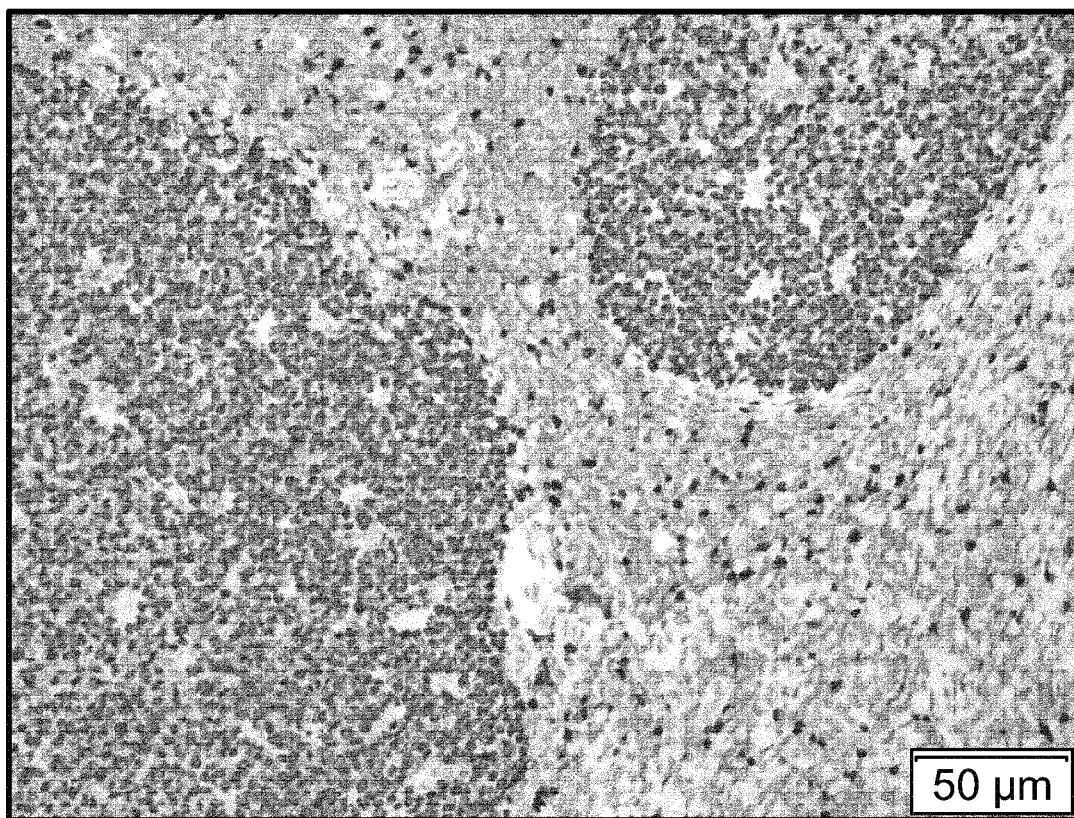


图 28

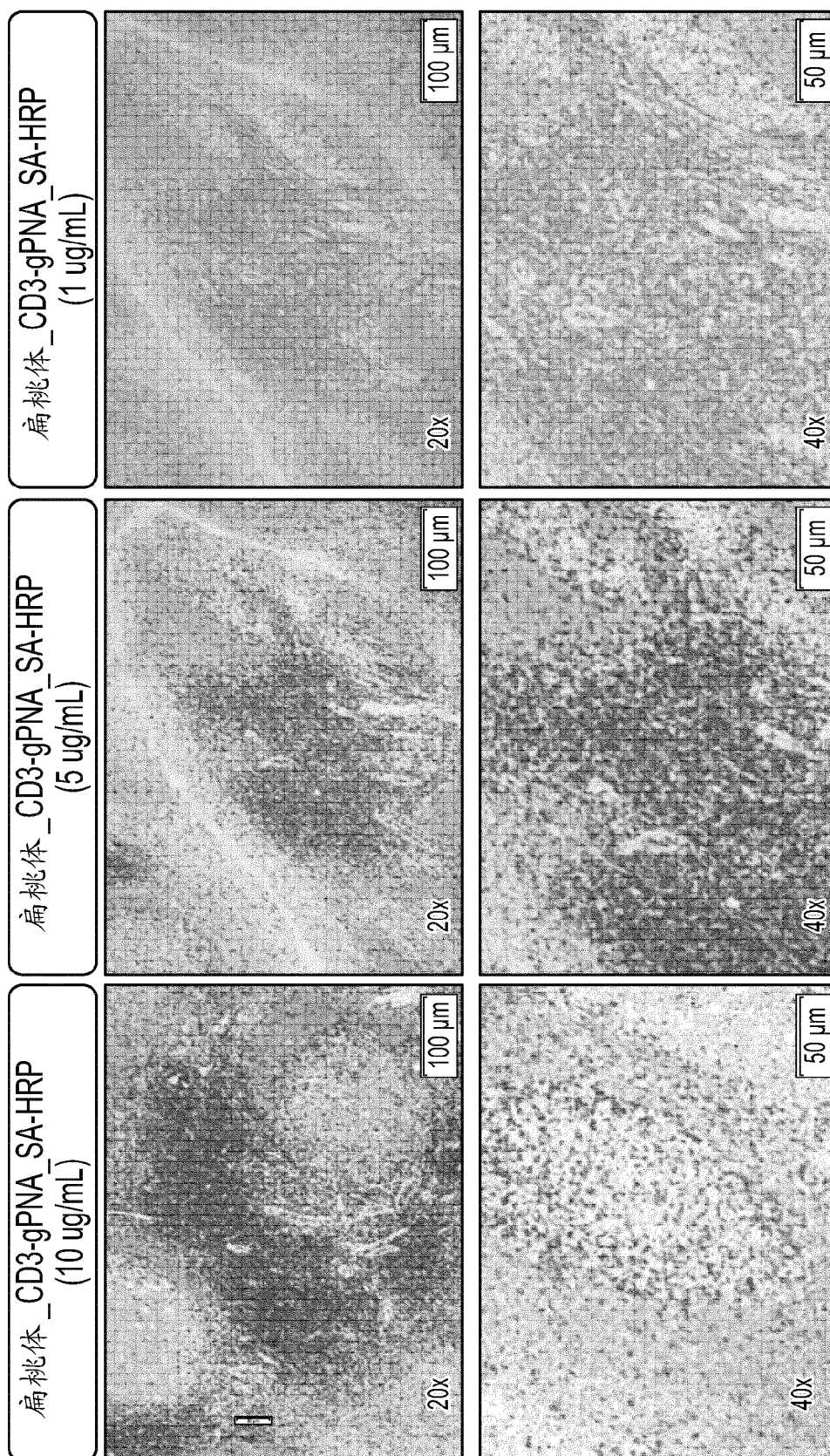


图 29A

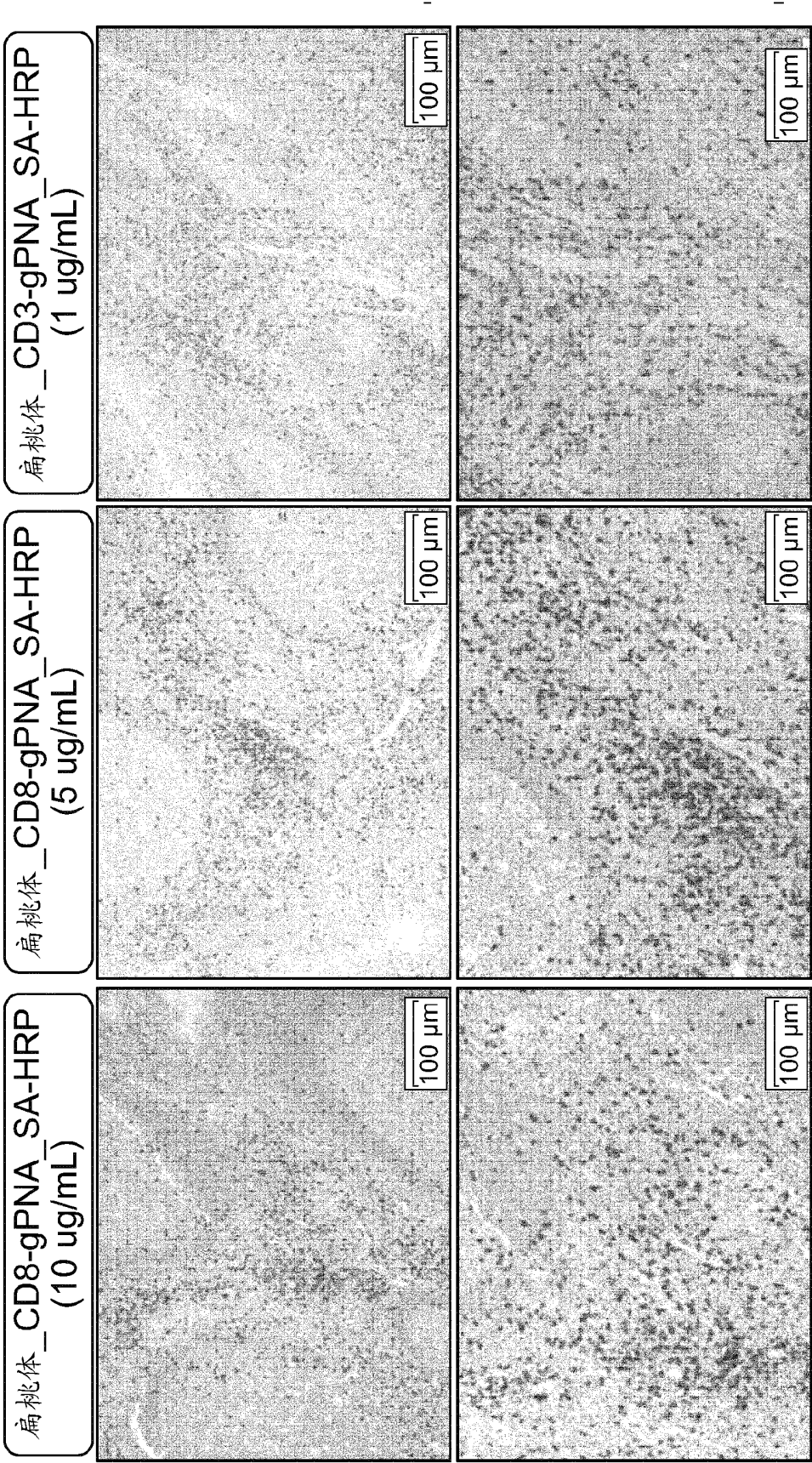


图 29B

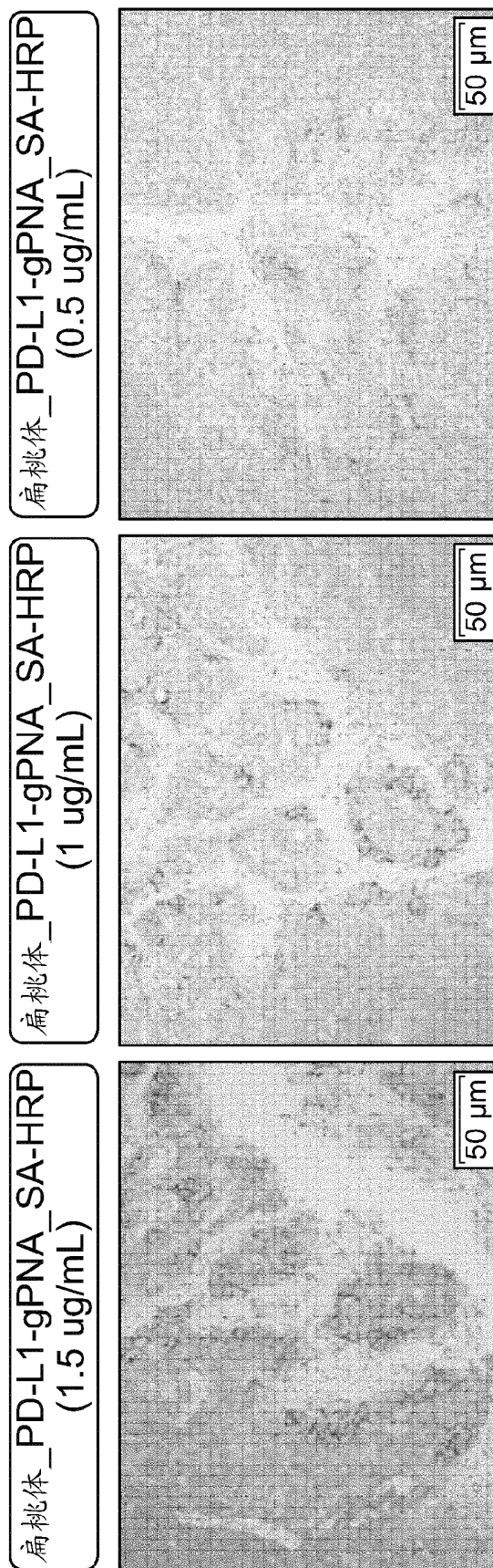


图 29C

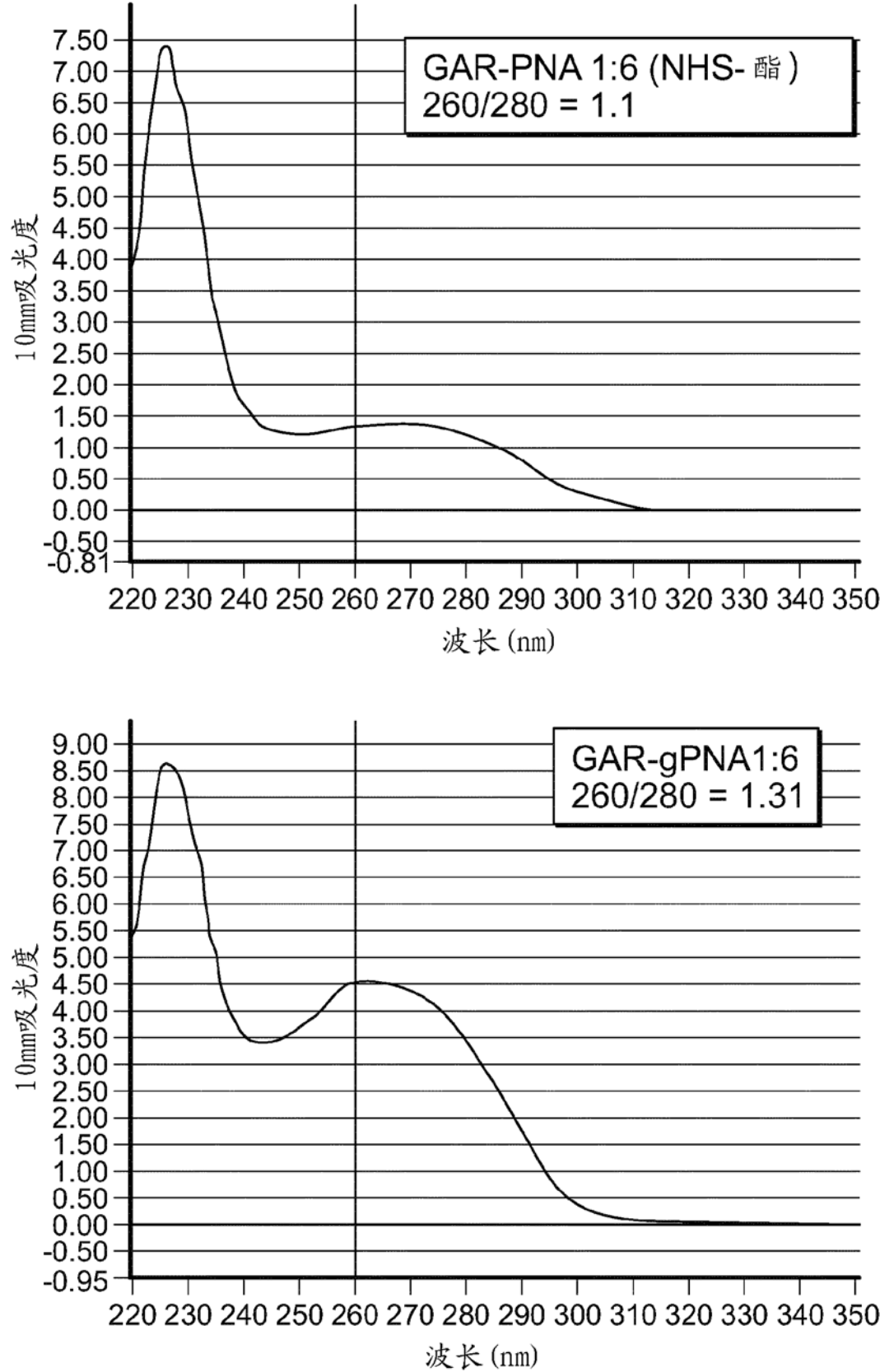


图 30

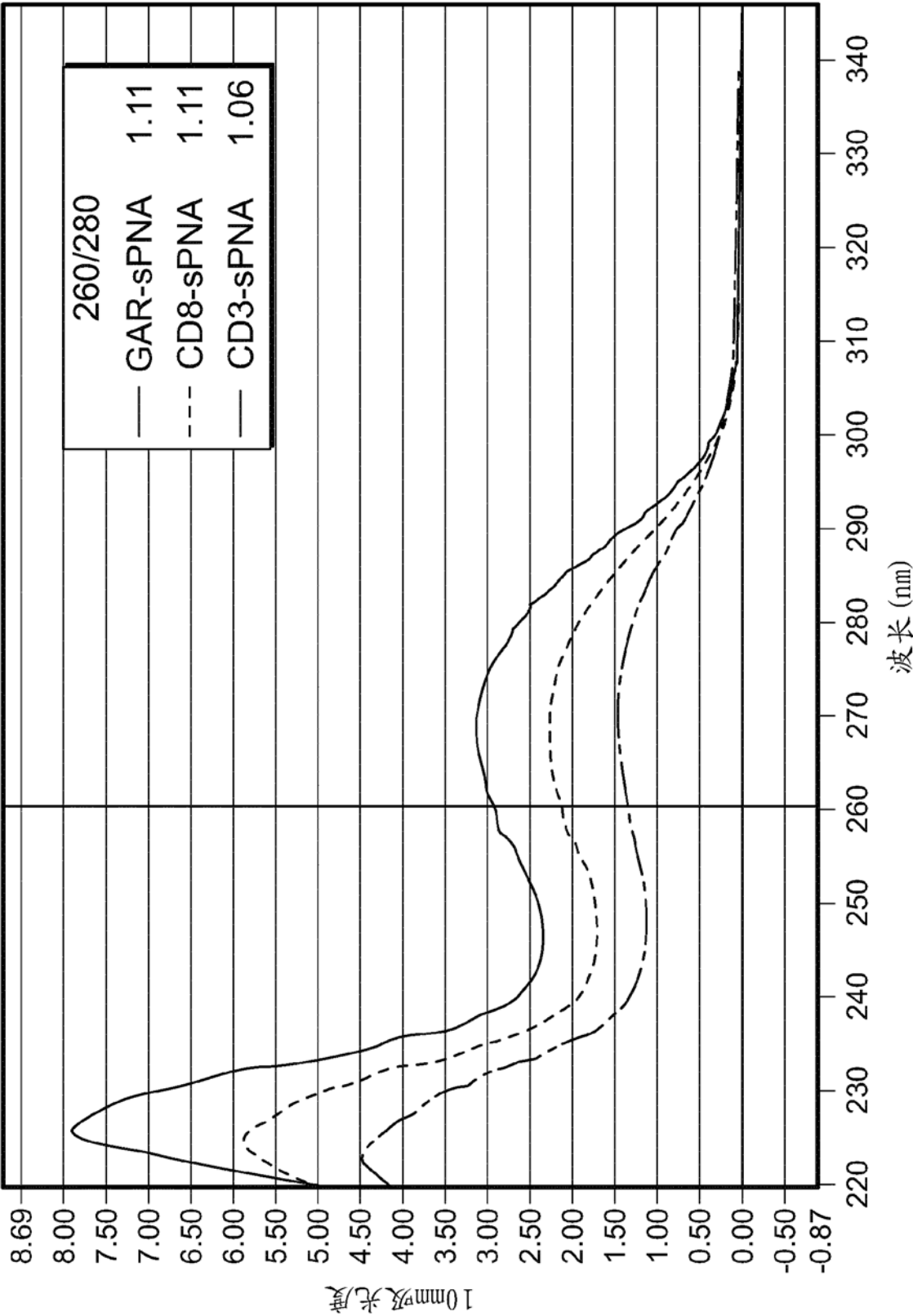


图 31

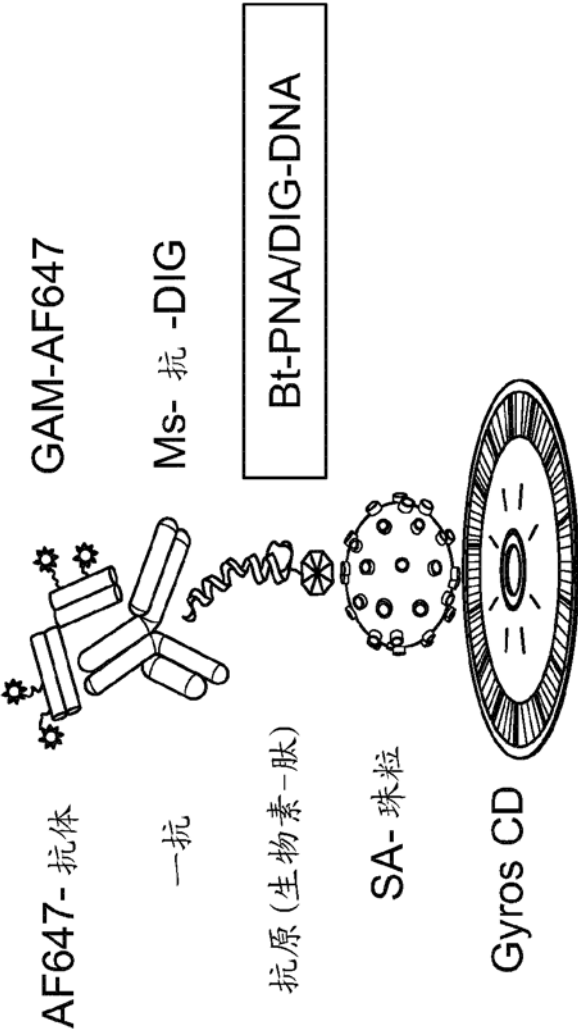


图 32

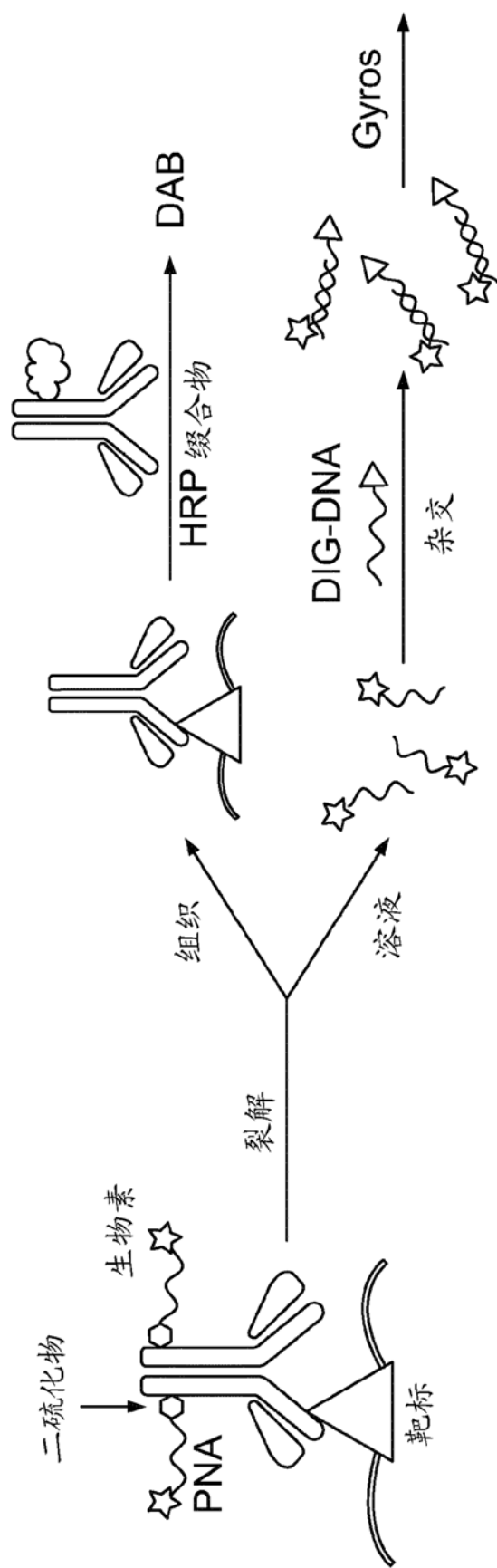


图 33

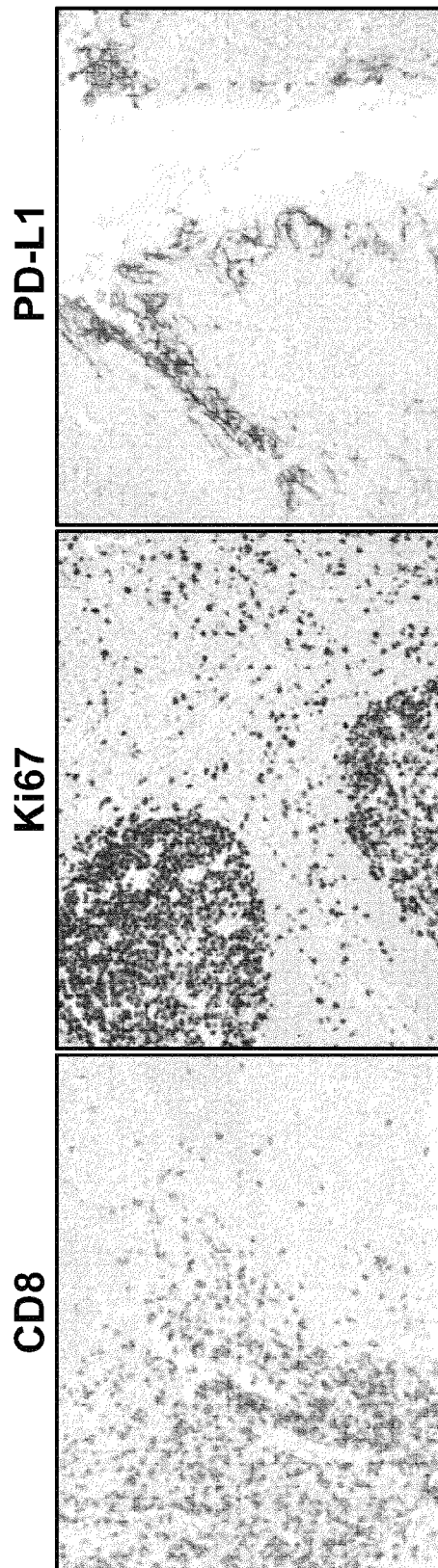


图 34A

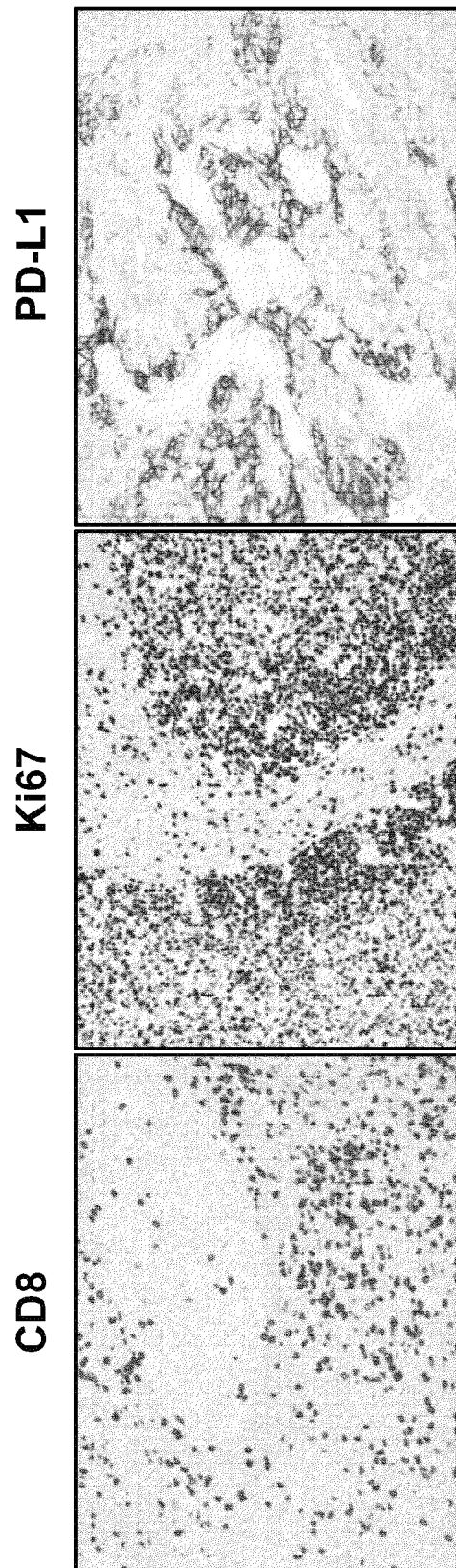


图 34B

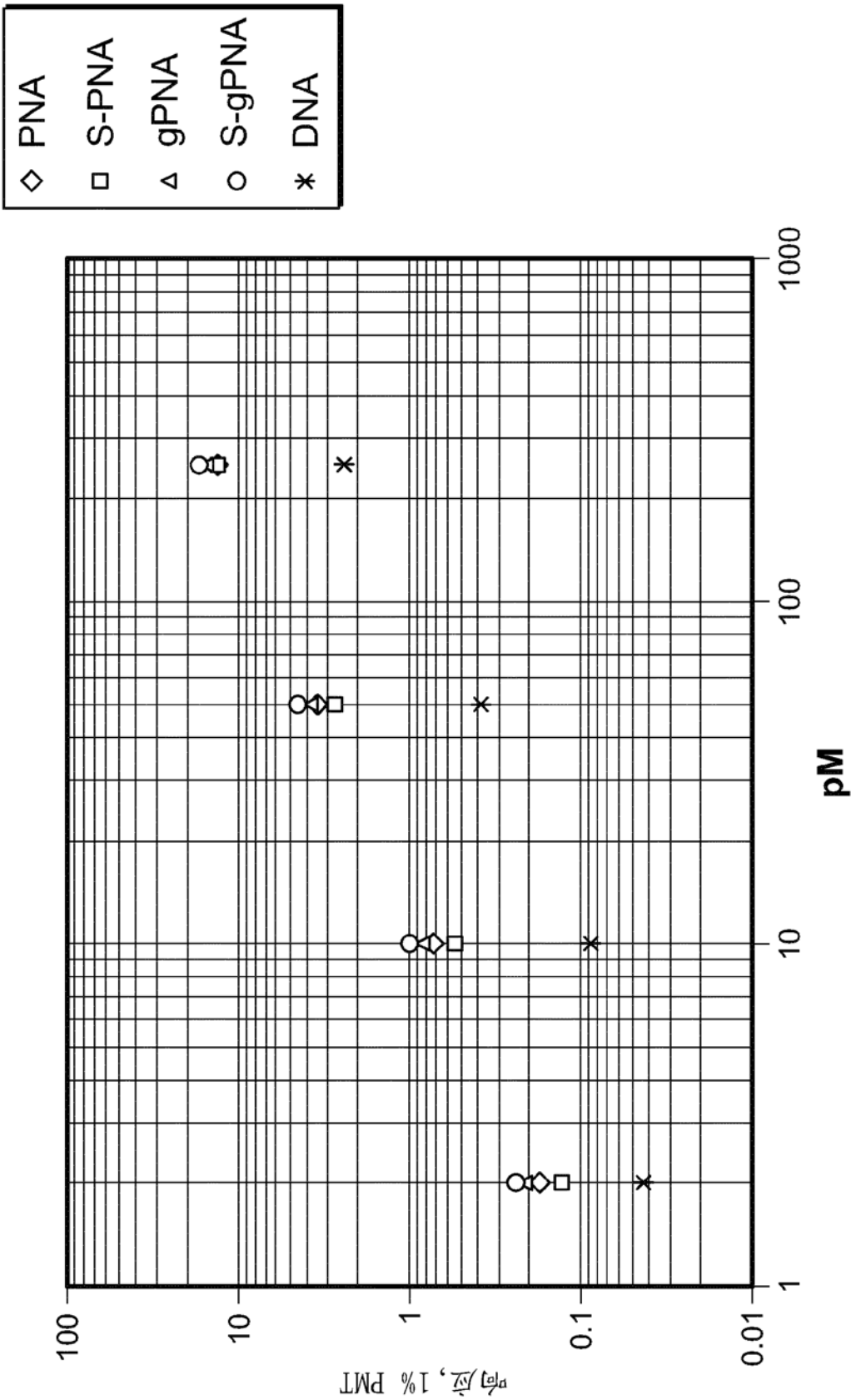


图 35A

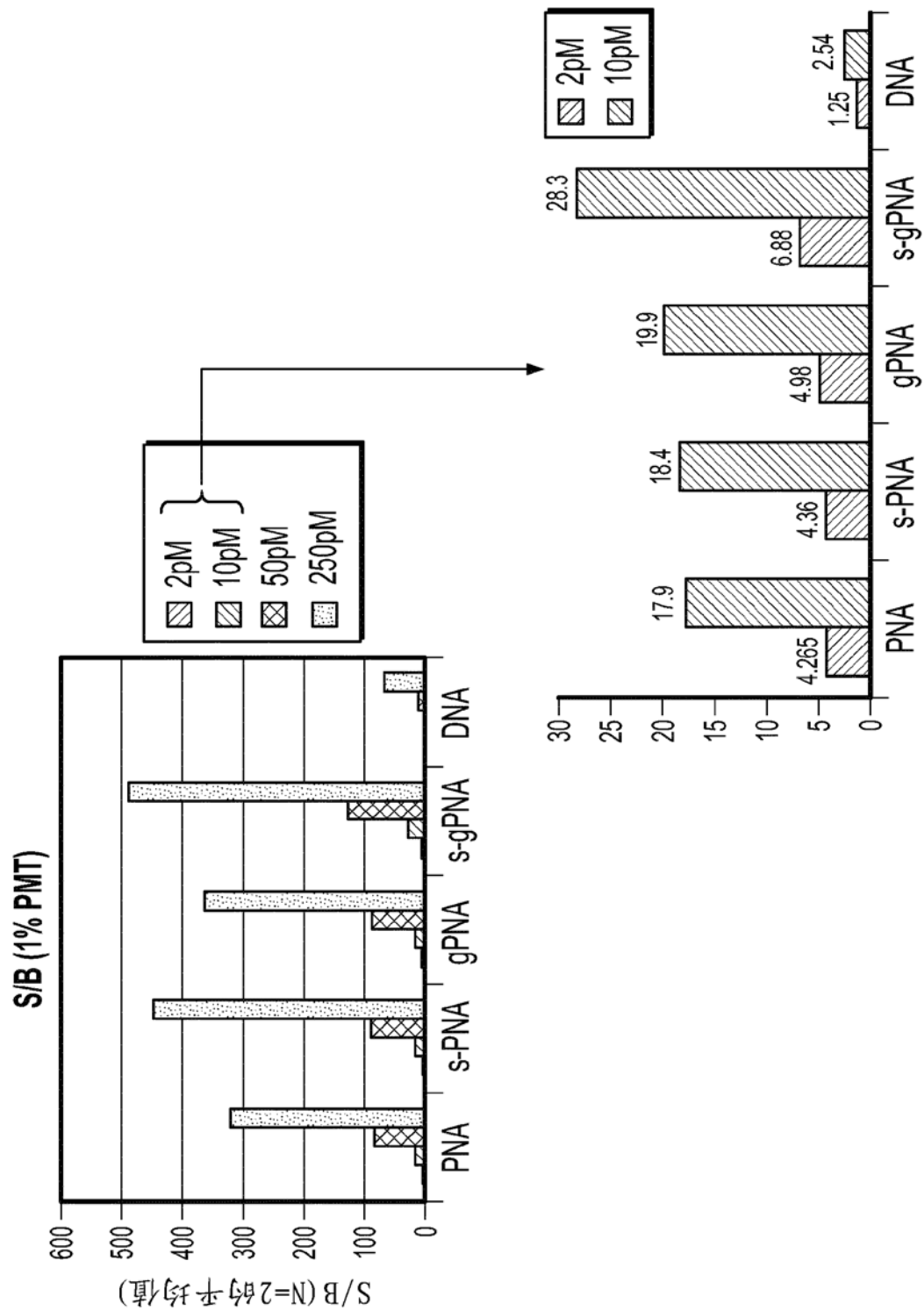


图 35B

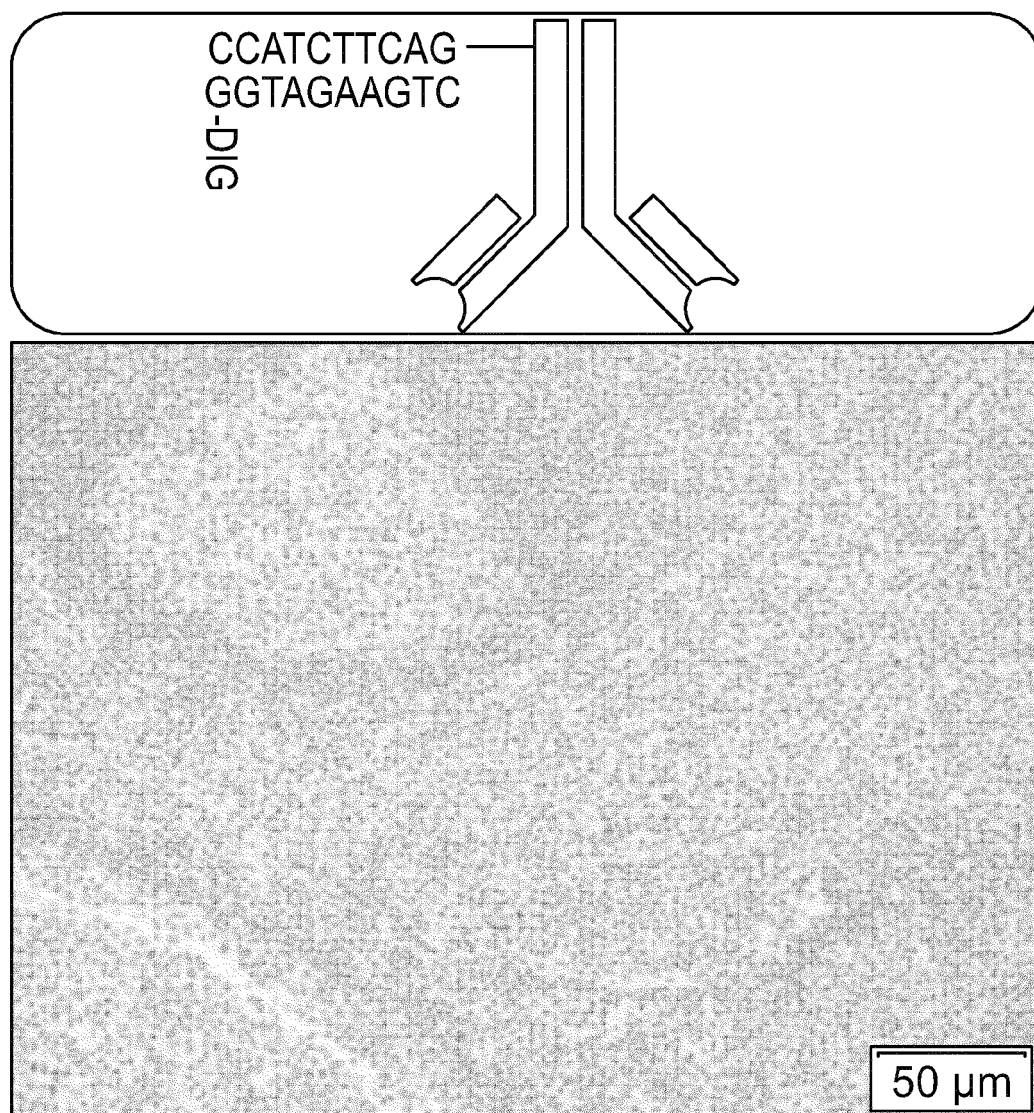


图 36A

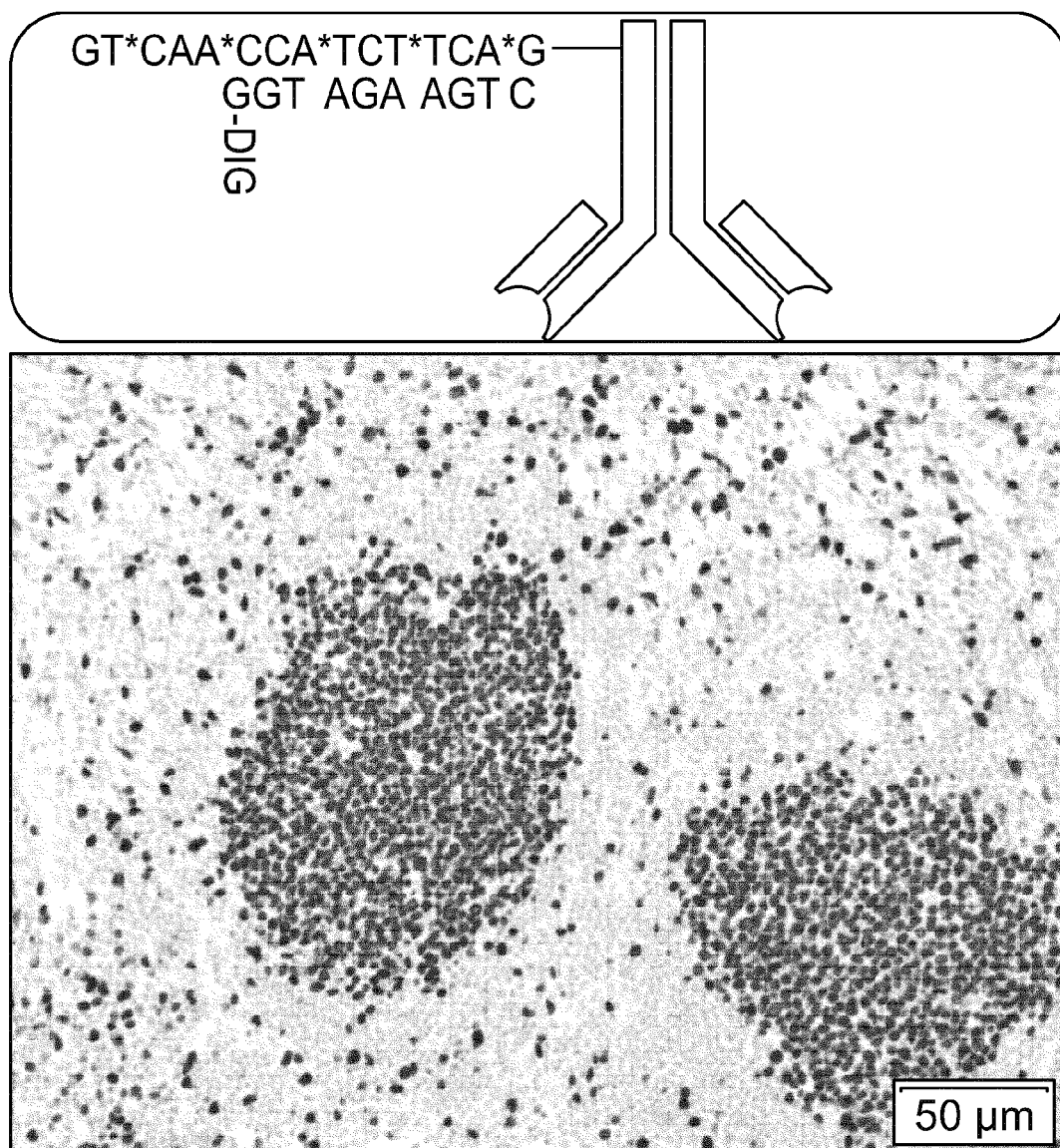


图 36B