

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410094918.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323294C

[22] 申请日 1999.7.29

[21] 申请号 200410094918.3

分案原申请号 99809129.4

[30] 优先权

[32] 1998.7.30 [33] DK [31] PA199800992

[73] 专利权人 香港澳维有限公司

地址 中国香港

[72] 发明人 A · O · F · 利赫梅

C · J · 斯坦利

[56] 参考文献

EP 0594772 B1 1996.8.28

EP 0291194 A1 1988.11.17

DIVINYLSULPHONE - ACTIVATED AGAROSE FORMATION OF STABLE AND NON - LEAKING AFFINITY MATRICES BYIMMOBILIZATION OF IMMUNOGLOBULINS AND OTHER - PROTEINS A LIHME ET AL, Journal of Chromatography, Vol. 376 1986

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 王杰

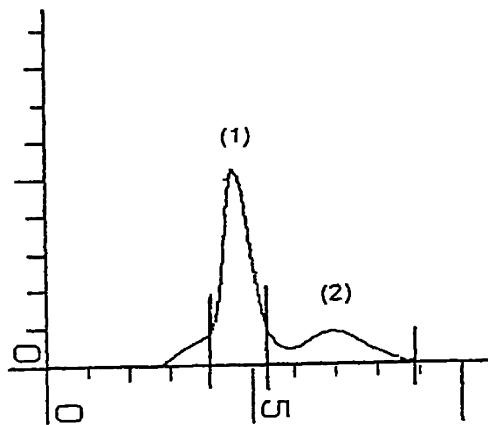
权利要求书 2 页 说明书 71 页 附图 6 页

[54] 发明名称

制备水溶性交联轭合物的方法

[57] 摘要

制备新的水溶性交联轭合物和交联共轭配合物，它改进了免疫化学测定包括横向流动装置的检测能力，该制备依赖一种“盐析”方法，其中在易溶性盐浓度大于 1M 时形成可逆沉淀物，并使该水溶性中间体轭合物的骨架发生交联。该骨架由多糖(包括葡聚糖)组成，并与信号组分如染料连接，该信号组分通过双官能度连接组分如表氯醇或二乙烯基砜和可选择通过蛋白质间隔剂组分如卵清蛋白(OA)或牛血清白蛋白(BSA)而产生颜色。在“盐析”方法中该葡聚糖通过连接组分发生交联，从而在存在合适的目标如抗体或抗原的情况下制得水溶性交联轭合物和交联共轭配合物。



1. 一种水溶性轭合物，含有一种载体组分、一种连接组分、一种间隔剂组分、一种信号组分和一种基本靶向组分，

该信号组分共价结合到该间隔剂组分上，而该间隔剂组分通过该连接组分共价结合到该载体组分上，

其中该水溶性轭合物在具有至少 1.25M 易溶盐浓度的水溶液中能够形成可逆沉淀物。

2. 根据权利要求 1 的轭合物，其中该载体组分选自葡聚糖；淀粉；糖原；琼脂糖衍生物；纤维素衍生物；和天然树胶及其混合物。

3. 根据权利要求 2 的轭合物，其中该载体组分为葡聚糖。

4. 根据权利要求 3 的轭合物，其中该连接组分选自二乙烯基砜和表氯醇。

5. 根据权利要求 4 的轭合物，其中该连接组分为二乙烯基砜。

6. 根据权利要求 1 - 5 任一项的轭合物，其中该间隔剂组分选自蛋白质和多肽。

7. 根据权利要求 6 的轭合物，其中该间隔剂组分选自 BSA、卵清蛋白和球蛋白。

8. 根据权利要求 1 - 5 任一项的轭合物，其中该信号组分为染料。

9. 根据权利要求 1 - 5 任一项的轭合物，其中该水溶性交联轭

合物在 25℃下的溶解度为至少 10 毫克干轭合物每毫升水。

10. 根据权利要求 1-5 任一项的轭合物，进一步含有配位体和第二靶向组分，该配位体共价结合到该第二靶向组分上，并且该配位体通过非共价键的方式结合到该轭合物的基本靶向组分上。

11. 根据权利要求 1 的轭合物，其中该易溶盐选自锂、钠、钾、钙和铵的硫酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐和酒石酸盐及其混合物。

12. 根据权利要求 1-5 任一项的水溶性轭合物的用途，其用于免疫化学测定技术，免疫组织化学方法，细胞化学方法，流式细胞测量术，当场应用的杂化技术，膜杂化技术，生物传感器，横向流动装置，或者以外源凝集素 / 糖相互作用为基础的方法。

13. 一种用于检测液体样品中是否存在至少一种目标组分的横向流动装置，该横向流动装置包括：

I) 包括应用部分、沉积部分和检测部分的试验片，这些部分的排列方式使该液体样品能够从应用部分经沉积部分流到检测部分；

II) 位于该试验片的沉积部分的至少一种根据权利要求 1-5 任一项的轭合物的干燥沉积物，和

III) 至少一种能够与存在于该液体样品中的一种或一种以上的目标组分发生选择性结合或选择性反应的靶向组分，该靶向组分被固定在该试验片的检测部分。

制备水溶性交联轭合物的方法

本申请是申请日为 1999 年 7 月 29 日、申请号为 99809129.4 的中国专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及一种新的制备水溶性交联轭合物和共轭配合物的方法以及新的水溶性交联轭合物和共轭配合物本身。该轭合物和共轭配合物改进了免疫化学测定中的灵敏度，特别是在其被应用于横向流动装置和检测液体样品中是否存在少量活性组分的方法中时。

发明背景

大量的研究努力专注于发明一种改进如在家庭怀孕和受精能力测试中的免疫化学测定的可靠性和灵敏度的方法，因此人们一直需要新的和改进的在这种免疫化学测定中具有高灵敏度和特异性的轭合物的制备方法。显然在研制新的用于高灵敏度免疫化学测定的轭合物时，存在于轭合物中的这种“活性”组分如抗体或抗原的数量和“可检测单元”如染料分子的数量是最为重要的。

L. j. Kricka (1994) Clin. Chem. 40, 347-357 已对各种用于改进免疫测定的可靠性和灵敏度的策略作了回顾。

EP0594772B1 涉及含有衍生于二乙烯基砜部分的水溶性、以聚合物为基础的轭合物。EP0594772B1 描述了通过利用所谓的“盐析”作用加强分子类如抗体和抗原结合到水溶性载体分子上的可能性。但结果是其通过将盐浓度增大到约 1M 的浓度来形成不可逆的沉淀物。

现在已惊奇地发现如果在该反应混合物中进一步增大反应混合物中盐的浓度，则会形成含有可用于各种免疫化学测定中如在横向流动装置中的“大”水溶性轭合物的可逆（即可重新溶解）的沉淀物。

发明描述

本发明的第一方面涉及一种制备含有至少一种载体组分、一种以上连接组分、至少一种间隔剂组分、至少一种信号组分和至少一种基本靶向组分的水溶性交联轭合物的方法，该信号组分共价结合到间隔剂组分

上而该间隔剂组分通过连接组分共价结合到载体组分上，所述方法包括：

- a) 使含有至少一种载体组分、一种以上连接组分、至少一种间隔剂组分、至少一种信号组分的水溶性中间体轭合物通过来自连接组分的未反应活性部分与至少一种基本靶向组分在水溶液中在产生可逆沉淀物的反应条件下进行反应，该信号组分共价结合到间隔剂组分上而间隔剂组分通过连接组分共价结合到载体组分上；
- b) 将含有水溶性交联轭合物的可逆沉淀物重新溶于含水介质中；
- c) 可选择对该水溶性交联轭合物进行纯化步骤。

本文中的术语“水溶性”与交联轭合物相关使用时意味着由本文公开的方法所获得的轭合物在室温下溶于水介质如水，即由本文公开的方法所获得的交联轭合物应该产生通过视觉观测该样品而判断其为基本澄清和均匀的溶液。

在本发明的一个优选的实施方案中，通过本文公开的方法所获得的交联轭合物的水溶解度在25°C时为每毫升水至少0.1mg，优选至少1mg如至少10mg，更优选50mg、如至少100mg，特别是至少200mg的干轭合物。

在对有关上述的沉淀步骤进行详细讨论之前，应该注意到可以通过以下方法制备水溶性中间体轭合物，该方法包括：

I) 将至少一种水溶性载体组分和一种以上连接组分在水溶液中在PH大于7的条件下进行反应，以产生含有水溶性中间前体的水溶液，该中间前体含有其上已共价结合有衍生自该连接组分的活性部分的载体组分的水溶性部分，

II) 可选择对该中间前体进行纯化步骤，

III) 通过该活性部分的反应，将该可选择进行纯化的水溶性中间前体与以下物质反应，

i) 在水溶液中在PH大于7的条件下与至少一种间隔剂组分反应，以产生第二水溶性中间前体，反应条件为只有一部分活性部分与该间隔剂组分反应而保留了大量未反应的活性部分，

- i i) 可选择对该第二水溶性中间前体进行纯化步骤，和
- i ii) 通过间隔剂组分的反应，将可选择进行纯化的第二水溶性中间前体与至少一种信号组分在水溶液中在 PH 大于 7 的条件下反应，以产生水溶性中间体轭合物，反应条件为大部分信号组分与间隔剂部分而不是连接组分发生反应，而大量的该连接组分的未反应活性部分仍保持未反应（即只有少部分的信号组分与该连接组分的活性部分发生反应）；和
- IV) 可选择对由步骤 III) 获得的水溶性中间体轭合物进行纯化步骤。

图 4 图解表示了通式概括的上述步骤 I-IV 中的方法及其所提及的组分。该图只用于表明它所代表的某一实施方案的任意实施例。在该处以图解表示了作为该方法的一部分的不同中间产物和前体阶段，从而帮助读者遵循该制备过程。

水溶性载体组分

本文中的术语“载体组分”用于指示该轭合物的“骨架”，即该载体组分用作其上可能结合有各种分子的骨架。

作为该制备轭合物的方法中的载体组分的水溶性聚合物可选自宽范围类型的聚合物，包括：

天然和合成的多糖及其衍生物如葡聚糖及其衍生物、淀粉衍生物、纤维素衍生物、糖淀粉和果胶，以及某些天然树胶及其衍生物如阿拉伯树胶和褐藻酸盐。

具有适宜的活性官能团的均聚物（氨基酸）如聚赖氨酸、聚组氨酸和聚鸟氨酸。

天然和合成的多肽和蛋白质如牛血清白蛋白和其它哺乳动物白蛋白；和

具有亲核官能团的合成聚合物如聚乙烯醇、聚烯丙基醇、聚乙二醇和取代的聚丙烯酸酯。

非常适于本发明目的的聚合物为多糖及其衍生物，例如葡聚糖、羧甲基葡聚糖、羟乙基和羟丙基淀粉、糖原、琼脂糖衍生物、羟乙基和羟

丙基-纤维素。从本文的实施例（见下页）可以看出，典型的葡聚糖被证明是特别适合于本发明的聚合物，并且是目前最为优选的载体组分。

已经指出，尤其对于许多该轭合物的免疫化学应用来说，通常以该轭合物不带有或基本不带有净电荷较为理想，因为在这种情况下存在的正或负电荷尤其会导致该轭合物与不需要的物质和 / 或材料 (substances and/or materials)发生不期望的非特异性结合。在许多情况下，除非引入了带电种类，通过确保该聚合物载体组分本身不带有净电荷可以获得该条件。因此，本发明方法中所用的优选的聚合物载体组分为游离状态、基本线性和在 PH 约为 4-10 的范围内基本不带电，后者的 PH 区间为与大部分免疫化学过程、杂化过程和轭合物的其它应用实际相关的区间。符合这一标准的各种聚合物例如有多种多糖和多糖衍生物，如葡聚糖和羟乙基和羟丙基纤维素。

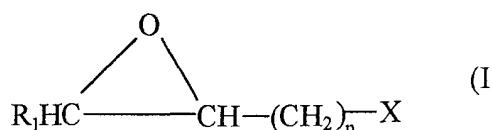
根据轭合物的用途，该轭合物可以具有某一分子量范围的水溶性聚合物载体组分为基础。在本发明的一个实施方案中，该聚合物载体组分的峰值分子量范围约为 40,000-40,000,000 (在该水溶性聚合物载体组分和连接反应剂如 DVS 或 EPCH 反应之前，或在所得的水溶性中间前体和间隔剂或信号组分进行反应以最终形成交联轭合物和交联共轭配合物之前)。所需要的峰值分子量的范围为 100,000-10,000,000，如范围为 500,000-8,000,000，优选的范围为 500,000-4,000,000，如范围为 500,000-2,000,000。以葡聚糖作为聚合物载体组分的情况为代表，特别需要的峰值分子量为约 500,000、约 1,000,000、约 1,500,000、约 2,000,000、2,500,000、约 3,000,000、约 3,500,000 和约 4,000,000。

更为具体地说，分子量范围在 20,000-2,000,000 的葡聚糖为优选的起始载体组分。最具体说，优选但不限于 20,000Da 的葡聚糖作为采用抗生素链菌素作为基本或次要目标的轭合物和 / 或配合物。而且，优选但不限于 500,000Da 的葡聚糖作为采用某些染料、酶和某些特异性结合的分子作为基本或次要的目标的轭合物和 / 或配合物。而且，优选但不限于 2,000,000Da 的葡聚糖作为某些其它染料。

在本说明书和权利要求书中使用的与该载体组分相关的术语“峰值分子量”指最大数量分子的分子量，即在分子量分布中，在所给的聚合物样品或批量中最多数分子所具有的分子量。采用这种方式来特定化大量类型的聚合物是很正常的，因为获得或制得分子量分布非常窄（尤其是最高分子量）的聚合物组分是困难的。在多数商业可得的本文所需要的载体组分的情况下，例如葡聚糖，其制造者或销售者能够提供可靠的峰值分子量数据（例如通过凝胶渗透色谱测定），这些数据提供了选择聚合物载体组分的适当部分的基础。这里需要指出的是，本说明书和权利要求书中所引用的峰值分子量值（如果与该载体组分相关联使用）指的是所讨论的游离聚合物的峰值分子量，而不考虑例如形成交联聚合物单元的可能性，如作为在轭合物制备方法中两种或两种以上的聚合物分子通过与连接组分如 DVS 或 EPCH 发生反应而发生交联的结果；平均来说这种交联单元比形成它们的各个游离的聚合物分子的分子量要大。

水溶性中间前体的形成

在本文中，术语“连接组分”指能在其它—一般更大分子之间产生共价连接的双官能团分子。适用于本发明方法的连接组分的实施例如具有双官能团活性的分子如戊二醛、碳化二亚胺、N,N'-亚苯基双马来酰亚胺、N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基硫代)丙酸酯、对苯醌、双环氧乙烷、二乙烯基砜(DVS)和环氧化物衍生物如通式 I 的环氧化物：



其中 R₁ 为氢或 C₁₋₄ 的烷基，n 为范围为 1-4 的整数，即 1、2、3 或 4，而 X 为离去基团如甲苯磺酰基、甲磺酰基或卤素如氟、氯、溴或碘，优选为氯。

在本文中，术语“C₁₋₄ 的烷基”代表具有 1-4 个碳原子的直链或支链的取代烃基如甲基、乙基、丙基、正丁基、异丙基、异丁基等。

从本文所提供的实施例可以看出非常有潜力的环氧化物衍生的连接组分为表氯醇(EPCH)，即上述通式 I 的化合物，其中 R₁ 为氢，n 为 1 而离去基团 X 为氯。

优选该连接组分应稳定存在于含水环境中，因此该连接组分 EPCH 与连接组分 DVS 共同构成本发明方法中所用的最为优选的连接组分。

第一步，即形成水溶性中间前体的步骤 I) 是在水溶液中在 PH 大于 7 如大于 8.5，尤其是大于 9 如大于 10，例如 PH 约为 10、10.5、11 或 11.5 的条件下进行的。在其最为普遍的方式中，这种反应可以在温度范围为 0-60℃ 的条件下进行，而如在本文所给的实施例中所示的，对于载体组分如葡聚糖来说，通常温度范围为 20-25℃ 是相当合适的。在本发明的一个优选的实施方案中，发生反应的 PH 范围通常约为 10-11.5，在该 PH 范围内大部分类型的载体组分的活性官能团对于本发明优选的组分 DVS 和 EPCH 来说是具有活性的。

就水溶液中载体组分的浓度而言，一般其范围为 0.1-20%w/v，通常其范围为 0.5-10%w/v，如范围为 0.5-5%w/v；尤其是范围为 0.5-2%，如约 0.5% w/v、约 1% w/v、约 1.5% w/v 或约 2% w/v。通常水溶液中连接组分的浓度范围约为 0.1-35%v/v，并取决于实际所用的连接组分。本发明中优选的连接组分即 DVS 和 EPCH 在水溶液中的一般的浓度范围为：如果该连接组分为 DVS，则其浓度范围为 0.1-15%v/v，一般为 1-10%v/v；如果该连接组分为 EPCH，则其一般的浓度范围为 1-30% v/v，通常为 3-20%v/v。如果制备该连接组分的反应剂为固体，则一般考虑使其浓度范围为 0.1-10%w/v。

要给出关于连接组分和载体组分在水溶液中的反应该进行的时间的一般性准则是困难的，因为该时间根据以下因素而有相当大的变化：如反应发生的温度和 PH、在反应混合物中载体组分的浓度和连接组分的浓度、该载体组分的性质和 / 或分子量、该连接组分的性质以及在发生诸如胶凝或沉淀等风险之前该载体发生交联(如通过与 DVS 的反应)的程度。

但是，所讨论的反应时间范围一般为 5 分钟到 10 小时。从本文所提供的实施例可以看出在将 DVS 作为连接组分时，所需要的反应时间范围一般为 5-120 分钟，例如时间范围为 15-60 分钟，如 30 分钟，而该载体组分和 EPCH 的活化时间一般需要更长的反应时间，一般时间范围

为 1-10 小时，例如时间范围为 3-7 小时，如约为 5 小时。

已经讨论了在水溶性中间前体中该载体组分上已结合了一种或一种以上来自双官能度连接组分的部分，其中的每一部分通过该双官能度连接组分的两个官能团之一与该载体组分上的活性官能团之间形成的共价键而被结合上去的。可以理解该双官能度连接组分的残余官能团是游离的（“悬挂的”），因此它能与如基本靶向组分、间隔剂组分和/或信号组分等在适宜的条件（见下）下反应。

“载负量”，即在步骤 I 中结合到载体组分上的连接组分数的范围一般约为 1-5,000 微摩尔 (μmoles) 连接组分每克载体组分，如在以下的任一子范围内（以微摩尔连接组分每克载体组分表示）：约 1-50、约 50-300、约 300-1,000、约 1,000-5,000。可以由本身已知的滴定方法测定结合到载体组分上的连接组分的数目，例如采用 Porath et al. (1975) J. Chromatogr. 103, 49 所述的硫代硫酸盐滴定法。从本文所提供的实施例可以看出，典型的以微摩尔连接剂每克载体表示的连接剂“载负量”的范围约为 300 至约大于 2000。因此，在关于本发明这方面的优选实施方案中，约 1-5,000 微摩尔连接组分每克载体组分的范围应该具体在 200-3000 之间，优选在 500-2500 之间。

例如，可选择的纯化步骤（步骤 II）包括如适于本发明目的的透析（为了除去过量的反应剂或其它低分子量种类）或色谱技术如凝胶过滤等方法。但是应该明白上述的纯化方法只是被指示为示例，而本领域技术人员能够在每一种个别情况下选择最为合适的纯化方法，这种选择取决于在偶联步骤中所采用的实际条件、在偶联步骤中所采用的实际成分及在生产部位的可用设备。

适用于本发明方法的载体组分（如上所述的该轭合物的“骨架”）优选为隋性未交联的，并且在与本发明的应用范围内相关的 PH 值下基本上不带电荷。

由于本发明方法中所采用偶联化学反应的性质的缘故，即在该载体组分上形成来自双官能度分子如 DVS 和 EPCH 的共价结合活性部分一般要求在该载体组分上存在活性官能团，优选亲核性官能团，因此合适的

载体组分将是以下物质：例如具有以下官能团的聚合物载体组分：如-O⁻（例如除去质子的酚羟基，如多肽或蛋白质的酪氨酸残留物中的除去质子的芳羟基）、-S⁻（例如芳环或脂肪基上的除去质子的硫醇基，如多肽或蛋白质半胱氨酸残留物中除去质子的硫醇基）、-OH（例如糖环上的脂肪族羟基，如低聚或多糖上的葡萄糖或其它单糖环；或多元醇上的醇羟基，如聚乙烯醇 / 或在多肽或蛋白质的某种氨基酸残留物如丝氨酸或苏氨酸残留物上的羟基）、-SH（例如在多肽或蛋白质半胱氨酸残留物上的硫醇基）、伯氨基（例如在多肽或蛋白质的赖氨酸或鸟氨酸残留物上的；或在某些多糖或其衍生物如壳聚糖的氨基取代的糖环上）或仲氨基（例如在多肽或蛋白质的组氨酸残留物上）。本领域技术人员可以理解上述的官能团是处于质子化状态或处于除去质子的状态的问题当然要取决于所选择的反应条件如该反应混合物的 PH。

由于类似的原因，本发明范围内所讨论的在靶向组分和间隔剂组分上的官能团（见下）正常情况下也是亲核官能团，如上述类型之一的亲核官能团。

制备第二水溶性中间前体

在本发明的步骤 III i) 中，该间隔剂组分通过与连接组分的反应而共价结合到水溶性中间前体上，从而形成第二水溶性中间前体。

如上所述，该“间隔剂组分”通过连接基团而共价结合到该载体组分上。因此，本发明范围内所用的术语“间隔剂组分”意指具有大量可与信号组分如染料（见下）发生共价结合的部位的蛋白质或多肽。

为了引入间隔剂组分，尤其是引入具有大量可与信号组分发生结合的部位的间隔剂，本发明方法提供了增加可被结合到该轭合物上的信号组分的数目（即在水溶性中间前体上的信号组分的“载负量”，见前）的方法，因此它增强了这种轭合物在应用于多种测定如免疫化学测定和在本文所述的横向流动装置（见下）时的灵敏度。应该理解在某个实施方案中，信号组分（如染料分子）是直接结合到该连接组分上的（并不通过间隔剂组分），这意味着（至少原则上）只有一个信号分子结合到

每一个存在于该轭合物的连接组分分子上。

在制备该第二水溶性前体的一些实施方案中，每摩尔起始葡聚糖中间隔剂的摩尔数(该间隔剂的“载负量”)范围为1-500，尤其是2-100，最常用为5-75。同样，如本文实施例3A所详述的，该第二水溶性中间体(因此步骤IIIi中该反应的效力)可以用例如结合到每摩尔载体组分上的间隔剂组分的数目(摩尔)来表征。

如前所述，该水溶性中间产物的连接组分的活性部分只有部分与该间隔剂组分发生反应。根据该间隔剂组分和该连接剂组分，在与间隔剂组分反应之后，该连接剂组分的未反应活性部分仍有1-99%，优选20-99%，特别是30-99%，如40-99%的范围，一般为50-99%保持未反应。这就是说，在某一实施方案中，在某种条件下，有1-49%的未反应的连接剂部分与该间隔剂组分发生反应。

优选该间隔剂组分为蛋白质如BSA、卵清蛋白、球蛋白等或多肽如同多肽如聚赖氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸等。但是，本领域技术人员明白间隔剂的选择取决于所用的信号组分(如在特定的轭合物上实际采用的染料)和所用的连接组分。

该间隔剂组分的分子量如蛋白质优选至少为10,000Da、更优选的范围为10,000-2,000,000，如范围为20,000-500,000。由于所引入的间隔剂组分的特征之一是增加引入信号组分的可结合部位的数目，因而进一步优选与信号组分结合的可用官能团数至少为每分子间隔剂组分5个，优选10-1,000，特别是10-500。

此外，该间隔剂组分也可以为多糖或聚核酸。在制备水溶性中间体轭合物之前需要对这些聚合物进行化学修饰。

如前所述，由于结合间隔剂组分的化学反应的性质的缘故(指在制备第二水溶性中间前体中的连接剂组分，或后来在制备水溶性中间体轭合物中的信号组分，见下)，该间隔剂组分上存在活性官能团如亲核性官能团。合适的间隔剂组分将是以下组分：例如具有以下亲核性官能团的组分： $-O^-$ (例如除去质子的酚羟基，如多肽或蛋白质的酪氨酸残基中的除去质子的芳羟基)、 $-S^-$ (例如芳环或脂肪基上的除去质子的

硫醇基，如多肽或蛋白质半胱氨酸残留物中除去质子的硫醇基）、-OH（例如在多肽或蛋白质的某种氨基酸残留物如丝氨酸或苏氨酸残留物上的脂肪族羟基）、-SH（例如在多肽或蛋白质半胱氨酸残留物上的硫醇基）、伯氨基（例如在多肽或蛋白质的赖氨酸或鸟氨酸残留物上的；或在某些多糖或其衍生物如壳聚糖的氨基取代的糖环上）或仲氨基（例如在多肽或蛋白质的组氨酸残留物上）。本领域技术人员可以理解上述的官能团是处于质子化状态或处于除去质子的状态的问题当然要取决于所选择的反应条件如该反应混合物的 PH。

在本发明方法的步骤 IIIi) 中产生该第二水溶性中间前体，该步骤宜于在水溶液中在 PH 大于 7 如大于 8、尤其是大于 9 如大于 10，例如 PH 范围为 10-11 如 10-10.5 的条件下进行。通常在 0-60℃ 的温度范围内足以进行该反应，最佳的温度取决于其中实际采用的 PH。在大部分情况下，尤其是该反应在 PH 大于 9 时，特别是该反应在 PH 大于 10 下进行时，通常非常适宜的温度范围为 20-40℃，如约 30℃。关于该反应时间，应该理解有许多参数影响所需的反应时间。因此根据所用的 PH、该反应的温度、肽或多肽间隔剂组分的浓度和该水溶性中间前体的浓度，反应的时间在宽范围内变化。但是，从本文所提供的实施例可以理解，预期适宜的反应时间范围一般为 1 小时到 48 小时，本发明者已发现如采用实施例 3A 和 3B 中所公开的特定组合的反应条件，则反应时间范围为 10-30 小时，例如范围为 15-25 小时，如 18 小时是非常适合。

如前所述，该水溶性中间产物连接剂组分的未反应的活性部分只有部分与该间隔剂组分发生反应。这就是说，第二水溶性中间产物仍含有大量未反应的活性部分。

可以采用已讨论的与纯化步骤 II) 相关，即与水溶性中间前体的纯化相关的方法对所得的第二水溶性中间前体进行纯化。从本文提供的实施例可以看出，适宜的纯化第二水溶性中间前体的方法是凝胶过滤。

制备水溶性中间体轭合物

在步骤 IIIii) 中，该信号组分通过与间隔剂组分的反应而共价结合到该第二水溶性中间前体上，由此形成水溶性中间体轭合物。

本文所用的术语“信号组分”是指可被直接物理检测的组分或这种可物理检测组分的前体的组分。换句话说，该信号组分功能为一种标签或标记，可以容易地采用现有技术中某种已知的物理技术例如采用光学方法，如分光光度法、荧光法、发光法、磷光法或其它方法如在“Instrumental Methods of Chemical Analysis” G. W. Ewing, 5th Ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1988 中所述的方法检测这种组分。如前所述，该信号组分可选择为这种可被物理检测组分的前体。这种前体的一种典型的实例为酶，这种酶通过其对适宜的底物的作用，能够产生某些种类，特别是着色的种类，并且可以采用一种或一种以上上述的物理方法对其进行检测。

对本领域技术人员来说在上述讨论的启发下将明白该信号组分可以选自以下物质：如染料；荧光性、发光性、磷光性和其它光发射性物质；金属螯合物，包括亚氨基二乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和去铁敏B；放射性同位素标记的物质、重原子标记的物质；以及它们的混合物。

为给出某些进一步的实例，荧光性物质可以选自如荧光素(适宜为荧光素异硫氰酸酯，FITC)、荧光素胺、1-萘酚、2-萘酚、曙红、藻红、桑色素、邻苯二胺、若丹明和8-苯胺基-1-萘磺酸。例如，相关的放射性同位素可选自以下原子的同位素：氢(即氚,³H)、碳(如¹⁴C)、磷(如³²P)、硫(如³⁵S)、碘(如¹³¹I)、铋(如²¹²Bi)、钇(如⁹⁰Y)、锝(如^{99m}Tc)、钯(如¹⁰⁹Pd)和钐(如¹⁵³Sm)。例如相关的重原子可选自Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、In、Ag、Au、Hg、I、Bi、Y、La、Ce、Eu和Gd。在许多情况下金(Au)为特别有用的重原子。

特别优选的信号组分为染料。本文中的术语“染料”指任何分光光度测定法可测定的染料分子或其衍生物。优选的在本发明方法制备的轭合物中引入的染料来自可视染料、磷光染料、荧光染料、激光染料、红外染料和镧素螯合物。特别需要的染料为可视染料，包括可溶性可视染

料如溶剂染料、色素、瓮染料、硫染料、媒染料、无色瓮染料和如荧光素、若丹明及其衍生物(如硫代若丹明、若丹明-氯化物和若丹明酰肼)等种类，以及噁嗪染料、花青染料、偶氮染料。例如适宜染料的特定实例为德克萨斯红酰肼、刚果红、锥虫红、丽丝胺蓝、Remazol 黑、Remazol 亮红、若丹明 B 异硫代氰酸酯、Cy5-0su 单官能团活性染料、反应橙 16、单蓝 A 等。

上述用作本发明目的的信号组分的染料是本领域已知的。对于本领域技术人员来说，显然可以采用其它染料作为信号组分来实现本发明目的，如在“Dyeing and Chemical Technology of Textile Fibers”，Trotman, 34th Ed., C. Griffin & Co., London 和“The Chemistry of Synthetic Dyes”，Vankataramon (Ed.), Academic Press, New York, 1979 所述的染料，本文引用其公开内容作为参考。

对以下所述的选择性的实施方案来说，优选的信号组分应该能够与蛋白质如 BSA 反应和/或能与连接组分的未反应活性部分反应。而且，该信号组分在与该间隔剂进行反应或结合时优选不应带来任何所得的水溶性中间体轭合物不需要的属性，即该信号组分优选不应促进任何不可控制的非特异性结合，也不应抑制该靶向组分(如抗体)与该轭合物结合的活性。而且，该信号组分优选不明显降低该轭合物的水溶解度。

该信号组分的“载负量”根据起始葡聚糖的大小、所用的信号组分的类型，尤其是根据该间隔剂的“载负量”而有明显变化。如前所述，每一间隔剂能容纳许多信号组分。在优选的实施方案中，每个间隔剂组分中信号组分的数量范围以摩尔数/组分表示为 1-100。特别是 2-80，更特别是 2-75。

如前所述，在形成水溶性中间体轭合物中，该第二水溶性中间产物连接组分的活性部分只有部分与信号组分发生反应。根据该信号组分、该间隔剂组分和连接组分，在与该信号组分反应后，相对于在第二水溶性中间前体中存在的未反应的活性连接组分的数量，该连接组分的未反应活性部分大约有 50-100%，优选 60-100%，特别是 70-100% 如范围为 80-100%，尤其是 90-100% 仍保持未反应(注：与该第二水溶性中间

前体相比)。

根据特定的染料，由本发明方法制得的轭合物在可见区域、UV 区域和近红外区域，优选在可见区域内吸收或释放出质子。采用可视染料如若丹明将使本发明轭合物在可见区域(如蓝色)吸收质子，从而将补充波长的颜色(如红色)传给观测者。由于电子回到基态，因此使用荧光染料(如果受照射)还可选择导致本发明轭合物在特定波长处释放出质子。

在本发明方法的步骤 IIIiii)中形成水溶性中间体轭合物，该步骤宜于在水溶液中在 PH 大于 7 如大于 8，尤其是 PH 范围约为 8-11 如 PH 范围约为 8.5-10.5 的条件下进行。根据实际所用的信号组分，该含水反应混合物可以含有 0-60%v/v 的有机助溶剂。因此，为了溶解相当疏水的信号组分(如某种染料分子)，有必要在该含水反应混合物中加入不同数量的水易混性有机助溶剂，如二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、二甲基甲酰胺(DMF)等以确保所用信号组分的充足溶解度。为了避免先前结合的间隔剂组分(一般为多肽或蛋白质)发生变性，该反应混合物中有机助溶剂的浓度应优选尽可能小。

与上述形成水溶性中间前体和形成第二水溶性中间前体有关的步骤的方法相似，同样在该步骤中，在温度范围为 0-60℃，例如温度范围为 20-40℃，如 30℃的条件下足以进行反应。

从本文提供的实施例可以看出，该反应时间在宽范围内变动。因此，该反应时间取决于如载体组分上间隔剂组分的“载负量”和实际所采用的反应参数，如 PH、温度和反应剂的性质和浓度。但是该反应时间的范围一般为 1-48 小时。优选该反应时间应尽可能小，即该时间范围为 1-24 小时，尤其是时间范围为 1-12 小时，如时间范围为 1-5 小时。

在一种类似于上述的方法中，采用本领域技术人员已知的多种不同的技术可以对所得的中间体轭合物进行纯化。而且，可以通过如冻干或溶剂蒸发法将所得的中间体轭合物分离得到其固体形式。在后者的情况下，一般在减压的条件下，如采用(蒸发的)干燥器法进行蒸发。

可以采用不同的方法对所得的中间体轭合物进行表征。例如，如果

所用的信号组分为可视染料，则可以读出它的吸光率而该中间体轭合物（从而该结合步骤 IIIiii）的效力）可以被表示为每毫克间隔剂组分该中间体轭合物中的消光单元(EU)的数目，如在本文实施例 4A 中所述。当然，本领域技术人员能够采用多种其它的方法对所得的中间体轭合物进行表征。

应该注意到在目前所讨论的本发明的方法中，该间隔剂组分是通过连接基团结合到该载体组分上的，然后该信号组分结合到该间隔剂组分上。因此，当该信号组分（如染料）结合到该间隔剂组分上时该间隔剂组分已结合到该载体组分上（通过连接基团）。

水溶性中间体轭合物制备的其它替代方法

如前所述，并且也可以从本文提供的实施例中理解，本方法也适于制备水溶性交联轭合物，其中该信号组分共价结合到该连接组分上，进而结合到该载体组分上，即在该轭合物中不引入蛋白质或多肽间隔剂组分（见下）。

在这种情况下，除了上述的信号组分之外，该信号组分当然还可以选自以下这些物质：如蛋白质，包括铁蛋白、藻红蛋白、藻青蛋白、藻胆色素；酶，包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖激酶、尿素酶；以及它们的混合物。

显然对于本领域技术人员来说，该信号组分也可以在该间隔剂组分结合（通过连接基团）到该载体组分上之前共价结合到该间隔剂组分上。

在一个优选的实施方案中，在某种条件下，该水溶性中间产物连接剂组分的活性部分只有部分与该信号组分反应。根据该连接剂组分，在其与信号组分反应之后，该连接剂组分的未反应活性部分仍有 1-99%，优选为 1-89%，尤其是 1-69%，如范围为 1-59% 和特别为 1-49% 保持未反应。这就是说，在优选的实施方案中，50-99% 的活性部分与该信号组分发生了反应。

因此，在另一有用的实施方案中，该水溶性中间体轭合物可以通过以下方法制备，该方法包括：

I) 将至少一种水溶性载体组分和一种以上连接组分在水溶液中在 PH 大于 7 的条件下进行反应，以产生含有水溶性中间前体的水溶液，该中间前体含有其上已共价结合有衍生自该连接组分的活性部分的载体组分的水溶性部分；

II) 可选择对该中间前体进行纯化步骤；

III) 在水溶液中在 PH 大于 7 的条件下通过所述活性部分的反应，将可选择进行纯化的水溶性中间前体与至少一种已共价结合有至少一种信号组分的间隔剂组分进行反应以形成水溶性中间体轭合物，在该反应的条件下只有部分活性部分与共价结合有至少一种信号组分的间隔剂组分发生反应；和

IV) 可选择对在步骤 III) 中所得的水溶性中间体轭合物进行纯化的步骤。

该纯化 / 分离方法可以采用已讨论的与该水溶性中间前体的可选择进行的纯化相关的方法。

水溶性交联轭合物的制备

为对该沉淀步骤进行更为详细的描述，本领域技术人员应该理解本发明方法的“关键步骤”为步骤 a)，其中将基本靶向组分结合到该中间体轭合物上，其反应条件为形成可逆沉淀物的反应条件。

在本文中，“可逆沉淀物”指所形成的在 25℃下用水稀释时能够重新溶解的沉淀物。

这里所用的术语“基本靶向组分”指能够与生物源物质的互补分子或互补结构部位发生选择性结合或反应的分子，尤其是生物源分子。例如，相关的基本靶向组分的实例为：抗原、半抗原、单克隆和多克隆抗体、基因探针、天然和合成的低聚和多核苷酸、天然和合成单、低聚和多糖、外源性凝集素、抗生素蛋白、抗生素蛋白链菌素、辅酶 R、生长因子、激素、受体分子、蛋白 A 和蛋白 G，以及它们的混合物。

考虑特别适合本发明目的的基本靶向组分的实例为如抗人体绒膜促性腺素 (anti hCG)、兔抗人 CRP、抗生素蛋白链菌素、抗生素蛋白、

抗 HIV、抗丙肝病毒、抗衣原体、抗疱疹、抗促甲状腺激素(anti TSH)、抗李斯特菌和抗沙门氏菌。

如果相关的基本靶向组分的实例为激素，则它们为类固醇激素（如雌激素、孕酮或可的松）、氨基酸激素（如甲状腺素）和缩氨酸和蛋白激素（如抗利尿激素、铨蟾素、胃泌素或胰岛素）。EP05947721B1 在其第 12 页第 20-38 行指出当分子类（如抗体）结合到载体（如葡聚糖）上时，利用所谓的“盐析”作用可增强其效力，并且它指出适宜的浓度为对应于离子强度范围为 0.5-5 的浓度。EP0594772B1 公开的实施例表明如果将盐浓度升高到某一水平，则实际上会获得关于结合到该载体上不同种类的数量的积极作用。但是，当该盐浓度增长到约 1M 时形成一种不可逆的沉淀物。

如已所述的，目前本发明者已惊奇地发现如果进一步增大反应混合物中易溶盐的浓度，则会形成含有“大”轭合物的可逆沉淀物，该轭合物为 i) 被认为广泛交联，ii) 水溶性和 iii) 在各种测定中，如在本文公开的横向流动装置（见下）中应用时具有高灵敏度（由于靶向组分的“高”载负量和 / 或信号组分的“高”载负量）。以下将详细描述由本文所述方法获得的水溶性交联轭合物的优点。

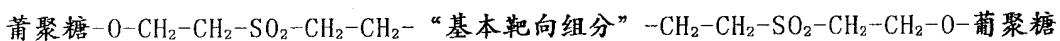
在不拘泥于特定的理论情况下，目前认为反应混合物中存在的盐使该中间体轭合物的活性系数增大，借此降低该中间体轭合物的溶解度。类似地，基本靶向组分的活性系数（如抗体）将增大，借此降低该基本靶向组分的溶解度。因此，一种假设是如果该中间体轭合物和基本靶向组分被沉淀（可能携带一些共沉水），则这种两种反应剂将非常紧密地结合在一起，借此增大了化学反应发生的可能性，即增大了基本活性成分与前述的该连接剂组分的未反应活性部分发生反应的可能性。但是应该强调，目前仍未能详细地解答该反应的确切机理，而大体上在溶液中该基本靶向组分发生了广泛的交联(cross-linking/attachment)，之后沉淀出交联轭合物或者该反应可在产生沉淀时发生，或者该反应在沉淀产生之后发生（如上所述）。但是应该强调，不管该基本靶向组分发生交联(cross-linking/attachment)的实际机理如何，可以断定

采用本发明的方法时，所得的可逆沉淀物并不与 EP0594772B1 所公开的教导 - 导致具有不可逆沉淀发生属性的轭合物相矛盾。

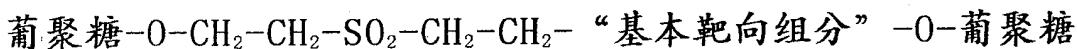
在不拘泥于特定理论的情况下，目前认为采用双功能连接组分至少在某种程度上形成了沉淀步骤有关的结构交键，即该连接组分的第一活性部分共价结合到该载体组分的第一部分的活性官能团上，而该连接组分的第二活性部分共价结合到载体组分的第二部分的活性官能团上。例如，作为示意性的实例，采用 DVS 作为连接组分可以在两个葡聚糖载体组分之间形成如下的交联：



但是，考虑到采用基本靶向组分可以促进该沉淀步骤中个别载体组分的交联，因此例如在采用 DVS 作为连接组分时两种葡聚糖载体组分之间的交联可以具有以下的结构：



或



有可能在某些交联中引入一种以上基本靶向组分，并考虑到该基本活性组分可能与第三或者甚至与第四连接组分发生反应，借此在两部分以上载体组分之间形成交联。实际上，基本靶向组分至少在原则上可以与和它所具有的活性部位数相同的连接组分发生反应。

认为交联的程度与可在“盐析”过程中发生反应的连接剂组分的未反应活性部分直接有关。在优选的实施方案中，在间隔剂结合（形成第二水溶性中间前体）以后所保留的未反应的活性部分的数量的范围为 50-99%，而当在其后结合信号组分（形成水溶性中间体轭合物时），在优选的实施方案中仍有 50-99% 数量的未反应活性部分保持没有发生变化，可用于交联的活性部分的数量以及因此进行高度交联的潜力很大。显然，交联越广泛（可能通过在两个葡聚糖之间一个或更多的键，通过间隔剂或基本目标），则该轭合物分子量越大。显然，交联的程度也与可逆沉淀步骤中所采用的方法有关。

本发明方法中的沉淀步骤 a) 宜于在水溶液中，在 PH 范围为 6-11，

优选范围为 6-10，例如 PH 范围为 8-10，尤其是范围为 8-9 的条件下进行。

至于反应时间和反应温度，这些参数随所用的反应剂的浓度和 / 或性质而变。但是本发明者已发现，适宜的反应温度范围一般为 2-30°C，例如温度范围为 4-16°C，优选范围为 4-10°C，尤其是 4-6°C。

反应时间可以在 1-36 小时之间变化，一般在 6-24 小时之间，例如 15-21 小时之间，如约 18 小时。

在本发明的有用的实施方案中，中间体轭合物和基本靶向组分在溶液中最初摩尔比（即在任何沉淀发生之前）范围为 1:1-1:50，例如范围为 1:1-1:25，如范围为 1:1-1:10，优选范围为 1:1-1:5，尤其是范围为 1:2.5-1:5。

可逆沉淀优选通过盐析进行，适宜采用往反应混合物中加入易溶性盐的方法获得。例如，易溶性盐的适宜的实施例为锂、钠、钙、钾或铵的硫酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐，或它们的混合物。在“Purification Tools for Monoclonal antibodies”，Gagnon, P., Validated Biosystems, 1996 中给出了易溶性盐的进一步实例，本文引用作为参考。

在本发明盐析方法的优选实施方案中，易溶性盐磷酸钙和硫酸铵特别有效。

易溶性盐的浓度应足以保证该可逆沉淀方法产生交联轭合物。达到理想效果所需的盐浓度取决于易溶性盐的阳离子和阴离子的性质。如前所述，导致形成不可逆沉淀的最高盐浓度为 1M (EP0594772B1)，但它并没有达到理想的效果。但是，如果盐浓度大于 1M，如范围为 1.25-3M，则产生理想交联的轭合物。如已所述的，用于特定的可逆沉淀的盐浓度根据所选择使用的盐而变化。而且，用于特定的可逆沉淀的盐浓度根据每种组分的载负量和性质而变化。连接剂组分、间隔剂组分和信号组分的载负量和选择将影响确切的盐浓度（关于特定选择的盐）。在优选的实施方案中，该易溶性盐浓度的范围为 1.25-2.75M，例如至少 1.25M，或至少 1.5M，或至少 1.75M，或至少 2M，或至少 2.25M，或至少 2.5M，

或至少 2.75M。

该易溶性盐存在的浓度应足以保证产生可逆沉淀物，即易溶性盐的浓度，也即磷酸钙或硫酸铵优选的浓度范围为 1.25–2.75M，更优选范围为 1.75–2.50M。

虽然如上所述，盐沉淀步骤非常有效地结合了基本靶向组分，可以通过往含有可逆沉淀物的水溶液中加入低分子量的灭活种类来灭活任何保留在连接组分上的游离的“悬挂”基团。例如适宜的灭活种类的实施例可以是乙醇胺、巯基乙醇或某些氨基酸如半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸。

在可逆盐沉淀步骤之后，将该（可逆的）沉淀的轭合物重新溶解于含水介质优选水中。由本文公开的方法得到的轭合物在室温下应该非常好地溶于含水介质如水中，并且其溶解度在 25°C 下应优选至少为 0.1，更优选至少为 1，如至少为 10；更优选至少为 50，如至少为 100；特别是至少为 200mg 干轭合物每毫升水。

对于本领域技术人员来说显然可以采用如冻干方法对所得的水溶性交联轭合物进行进一步的纯化和 / 或分离得到其固体形式。该纯化 / 分离过程可以采用已经讨论的与该水溶性中间前体的可选择纯化有关的方法。

虽然沉淀步骤优选采用往反应混合物中加入易溶性盐的方法进行，必须认识到可以采用除盐沉淀法之外的其它技术来进行发生基本靶向组分交联(cross-linking/attachment)的步骤。因此，上述盐析沉淀的一个替代实例为在冷冻的水溶液中即在温度范围为 -20°C–0°C 下进行反应。在该冷冻溶液中将发生许多小的水“袋”，其中该反应剂以非常高的浓度存在，借此增大化学反应发生的可能性，即增大了基本靶向组分与前述的连接组分的未反应活性部分反应的可能性。另外考虑在本发明中使用的方法的其它实例包括如溶剂沉淀、即往含水反应混合物中加入水易混性有机溶剂；聚合物沉淀，即往含水反应混合物中加入一种或多种惰性聚合物；各种浓缩技术，如蒸发，优选在减压的条件下进行等。上述所有技术的共同特征是增加了反应剂的接近，借此增大了基

本靶向组分与前述的该连接组分的未反应活性部分的反应。

在通过冻干对该水溶性交联轭合物进行纯化并且未将该连接剂组分的任何残留的未反应活性部分灭活（采用灭活种类）的实施方案中，采用冻干法可以增大交联的程度。如果上述关于交联轭合物形成的机理的假设的基础是反应剂的接近，则冻干可能在某种程度上在一个或多个方面促进了盐析方法。因此，在该实施方案中，与以前的纯化方法相比，其交联水平和因此的平均分子量得到了增大。相反，在另一实施方案中，在进行可选择的纯化方法之前采用该方法来灭活该连接组分的未反应活性部分。

如已所述的，在将由本文所公开的方法制得的水溶性交联轭合物用于横向流动装置时，目前可见这种轭合物的主要价值，以下将对其进行详细地描述。因此，本发明者已提供了一种适宜的横向流动装置测定，它使本领域技术人员能够选用由本发明方法制得的有效的和优选的水溶性交联轭合物。因此，实施例 7A 公开了由本文公开的方法制备的水溶性交联轭合物的灵敏度试验。应该指出，如果该试验完全按本文所述进行应用，则它仅适用于信号组分为可视染料而基本靶向组分为兔抗人 CRP 的轭合物。但是，本领域技术人员将意识到如何将该试验扩展到其它信号组分和更为重要的其它基本靶向组分。

本领域技术人员将意识，同时也可以从本文提供的实施例看出，本文所公开的方法并不一定产生“单一类型”的轭合物，而是具有某种分子量分布的轭合物。根据上述的试验可估计所得的水溶性交联轭合物是否适于本发明目的或进一步的纯化 / 分离是否理想。本发明者已发现，在本发明的一个非常有用实施方案中，采用凝胶过滤法将沉淀步骤 a) 中所得的水溶性交联轭合物进行进一步的纯化 / 分离。因此，例如非常适用于横向流动装置系统的水溶性交联轭合物为这样的轭合物：它在含水介质中被重新溶解之后，在被进行如采用凝胶物质 SephacrylTM HR S-500 或 SepharcyrlTM HR S-1000 的凝胶过滤时在空隙体积中被洗脱（所用的条件如本文所公开的实施例中指定）。

如前所指出的，该水溶性交联轭合物比已知的轭合物“大”。本领

域技术人员可以理解，也如以上所述的，由本文所公开的方法制得的轭合物不会产生单一分子量的轭合物，而所得到是具有某种分子量分布的轭合物。可以采用本领域技术人员已知的多种可能的方法用于测定不同种类的这种多相轭合物的平均分子量。但是，应指出非常适宜的方法为如分析性超速离心法，和尤其是光散射技术。因此，在本发明的有用的实施方案中，由本文方法所得到的轭合物的质量平均分子量为至少 10^6 、至少 2×10^6 、至少 3×10^6 、至少 4×10^6 、至少 5×10^6 、至少 6×10^6 、至少 7×10^6 、至少 8×10^6 、至少 9×10^6 、至少 10^7 、至少 2×10^7 、至少 3×10^7 、至少 4×10^7 、至少 5×10^7 、至少 6×10^7 、至少 7×10^7 、至少 8×10^7 、至少 9×10^7 、至少 10^8 、至少 2×10^8 、至少 3×10^8 、至少 4×10^8 、至少 5×10^8 、至少 6×10^8 、至少 7×10^8 、至少 8×10^8 、至少 9×10^8 、至少 10^9 、至少 2×10^9 、至少 3×10^9 、至少 4×10^9 、至少 5×10^9 、至少 6×10^9 、至少 7×10^9 、至少 8×10^9 、至少 9×10^9 、至少 10^{10} 、至少 2×10^{10} 、至少 3×10^{10} 、至少 4×10^{10} 、至少 5×10^{10} 、至少 6×10^{10} 、至少 7×10^{10} 、至少 8×10^{10} 、至少 9×10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 2×10^{11} 、至少 3×10^{11} 、至少 4×10^{11} 、至少 5×10^{11} 、至少 6×10^{11} 、至少 7×10^{11} 、至少 8×10^{11} 、至少 9×10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 2×10^{12} 、至少 3×10^{12} 、至少 4×10^{12} 、至少 5×10^{12} 、至少 6×10^{12} 、至少 7×10^{12} 、至少 8×10^{12} 、至少 9×10^{12} 、或至少 10^{13} g/mol。虽然该轭合物优选尽可能地大，但应该理解该轭合物优选不应大于用于横向流动装置中所用的固体支承物质（如硝基纤维素）的孔径大小，因此该轭合物应该能够在该孔径中流动。在本发明的一个特别有用的实施方案中，由本文所公开的方法得到的轭合物的质量平均分子量范围约为 10^6 到 10^{10} Da，优选的范围为 10^6 到 10^8 Da，如范围约为 10^6 到 10^8 Da。

如果采用质量平均分子量，则根据它们在样品中的质量分数， m_i/m 对各种轭合物进行加权。因此在本文中，术语“质量平均分子量”是根据以下式 II 定义的：

$$\langle M \rangle = (1/m) \sum_i m_i M_i \quad (\text{II})$$

其中， $\langle M \rangle$ 为质量平均分子量， m 为样品的总质量（即该轭合物的总质量），而 m_i 为分子量为 M_i 的分子（即轭合物）的总质量。

该凝胶过滤曲线(图3a-3f)清楚地显示了在高离子强度下(3a, c, e)制得的轭合物的分子量大于在低离子强度下(3b, d, f)制得的轭合物。因此,本发明的一个重要的特征在于由本发明方法制得的轭合物明显不同于用于制备EP0594772B1所述方法制备的水溶性以聚合物为基础的轭合物的物质。本发明方法的结构差异(交联的程度和性质)与分子量差异以及其它特征一起在赋予不同于上述关于水溶性以聚合物为基础的轭合物活性中起到了部分的作用。

如前文关于术语“信号组分”的描述,本文的方法也适用于制备不含间隔剂组分的水溶性交联轭合物,即通过连接组分将信号组分如酶和染料分子直接结合到载体组分上(如在水溶性中间体轭合物制备的替代方法中所述)。

因此,本发明另一方面涉及一种制备含有至少一种载体组分、一种以上连接组分、至少一种信号组分和至少一种基本靶向组分的水溶性交联轭合物的方法,该信号组分通过该连接组分共价结合到该载体组分上,所述方法包括:

- a)使含有至少一种载体组分、一种以上连接组分、至少一种信号组分的水溶性中间体轭合物通过连接组分的未反应活性部分的反应与至少一种基本靶向组分在水溶液中产生可逆沉淀物的反应条件下进行反应,该信号组分通过该连接组分共价结合到载体组分上;
- b)将含有水溶性交联轭合物的可逆沉淀物重新溶于含水介质中;
- c)可选择对该水溶性交联轭合物进行纯化步骤。

类似地,可以采用以下方法制备用于制备上述水溶性交联轭合物的水溶性中间体轭合物,该方法包括:

I) 将至少一种水溶性载体组分和一种以上连接组分在水溶液中在PH大于7的条件下进行反应,以产生含有水溶性中间前体的水溶液,该中间前体含有其上已共价结合有衍生于该连接组分的活性部分的载体组分的水溶性部分,

II) 可选择对该中间前体进行纯化步骤,

III) 将可选择进行纯化的水溶性中间前体与至少一种信号组分在

水溶液中在 PH 大于 7 的条件下进行反应，以形成水溶性中间体轭合物，其反应的条件为只有部分活性部分与该信号组分发生反应的反应条件；和

IV) 可选择对在步骤 III) 中所得的水溶性中间体轭合物进行纯化的步骤。

显然，步骤 III) 中水溶性中间体轭合物的制备不同于前面所讨论的水溶性中间体轭合物的制备方法。一般来说，上述步骤 III) 可以在与前述的将信号组分结合到间隔剂组分的类似条件下进行。因此，以上公开的制备水溶性中间体轭合物的方法的步骤 III) 宜于在水溶液中在 PH 大于 7 例如 PH 范围为 8-12，优选范围约为 9-12，特别优选范围约为 10-12 或范围为 11-12 的条件下进行。根据实际所用的信号组分，该含水反应混合物可以含有 0-60%v/v 的有机助溶剂。因此，为了溶解相当疏水的信号组分（如某种染料分子），有必要往含水反应混合物中加入不同量的水易混性有机助溶剂，如二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、二甲基甲酰胺(DMF)等以保证所用的信号组分充分地溶解度。一般在范围为 0-60°C，例如范围为 15-40°C 如范围为 20-25°C 的温度下足以进行该反应。

一般反应时间范围为 1-48 小时。但是，优选反应时间尽可能小，即时间范围为 1-24 小时，尤其是范围为 1-12 小时，如范围为 1-5 小时。

在特别优选的实施方案中，采用峰值分子量为 500,000 的葡聚糖、活化度为 20-30% 的连接组分 DVS、间隔剂组分 BSA、信号组分若丹明 B 异硫氰酸酯和基本靶向组分抗生素蛋白链菌素或者单克隆或多克隆抗体作为关键的可逆沉淀步骤中存在的组分。

如前所述，本文所述方法的“关键步骤”为步骤 a)，其中基本靶向组分结合到中间体轭合物上，反应产生了可逆沉淀物。通常用于制备本文所述轭合物的最为昂贵的反应剂为基本靶向组分（如抗体或抗原），同时可逆盐沉淀步骤是在轭合物的制备中最为耗时的步骤。而且，由于该基本靶向的变化取决于实际要被检测的目标组分，因而本发明的一个有用方面涉及含有水溶性中间体轭合物（优选固体的形式）的试剂盒，

该试剂盒提供了关于进行可逆盐沉淀步骤、随后重新溶解可逆沉淀和借此最终对水溶性交联轭合物进行纯化（如通过凝胶过滤法）的说明。对该试剂盒的各种改进如包括常用于在食品工业或医院中诊断 / 分析的成套基本靶向组分，都在本发明的范围之内。当然，该试剂盒也提供将该制备的轭合物用于本文所述的横向流动装置的说明。

水溶性交联共轭配合物的制备

本发明另一有用方面涉及一种制备含有根据本文所公开的任何方法制备的轭合物、配位体、第二靶向组分的水溶性交联共轭配合物的方法，该配位体共价结合到第二靶向组分上，并且该配位体通过非共价键的方式结合到该轭合物的基本靶向组分上，该方法包括：

I) 根据本文公开的方法制备水溶性轭合物；

II) 将可选择进行纯化的水溶性交联轭合物与配位体在水溶液中发生反应，该配位体共价结合到第二靶向组分上；

III) 结束该反应；和

IV) 可选择对该水溶性交联共轭配合物进行纯化步骤。

本文中的术语“第二靶向组分”指能与生物源物质的互补分子或互补结构部位发生选择性结合或选择性反应的分子，尤其是生物源分子。因此，第二靶向组分可以选自上述与术语“基本靶向组分”的定义有关的同类分子，即有用的第一靶向组分的实例为：例如，抗原、半抗原、单克隆和多克隆抗体、基因探针、天然和合成的低聚和多核苷酸、天然和合成单、低聚和多糖、外源性凝集素、抗生素素蛋白、抗生素蛋白链菌素、辅酶 R、生长因子、激素、受体分子、蛋白 A 和蛋白 G，以及它们的混合物。在本发明的一个特别的实施方案中，该第二靶向组分为 hCG。

本文所用的术语“配位体”指与实际所用的基本靶向组分具有高度亲合力从而保证存在于水溶性交联轭合物中的配位体和基本靶向组分之间的非共价键的热力学稳定的分子。因此，在本发明的一个优选实施方案中，选择该配位体 / 基本靶向组分以使该配位体与该轭合物的基本靶向组分之间结合常数至少为 10^6 ；优选至少为 10^8 ，如至少为 10^{10} ；

更优选至少为 10^{11} , 如至少为 10^{12} ; 尤其是至少为 10^{13} , 例如至少为 10^{14} , 如至少为 10^{15}1/mol 。

如上所述, 配位体的选择当然取决于实际所用的基本靶向组分。例如, 适宜的配位体的特定实施例为辅酶 R、抗二硝基酚或抗二氧化素, 尤其是辅酶 R。

在本发明的一个非常有用实施方案中, 所用的该配位体 / 基本靶向组分为“辅酶 R/抗生蛋白链菌素系统”或“辅酶 R/抗生物素蛋白系统”。如上所述, 该配位体应共价结合到第二靶向组分上, 而本领域技术人员已知生物素基化的化合物如生物素基化的抗体可以容易地制备得到, 如在 Kendall et al. Journal of Immunological Methods (1993), 56, 329–339 中所述。因此, 通过本文所公开的方法制备水溶性交联轭合物, 采用抗生蛋白链菌素或抗生物素蛋白作为基本靶向组分, 则可以获得可以结合任何有用的生物素基化的第二靶向组分的“模板”。但是, 应该理解, 如果所用的抗体和所用的半抗原之间的结合常数满足上述的要求, 则任何“半抗原 / 抗体系统”可以用作配位体 / 基本靶向组分。

上述的反应步骤 II)一般在室温下进行, 然后通过例如改变反应混合物的 PH 和 / 或加入过量的游离配位体如辅酶 R 来结束该反应[步骤 III)]。

本领域技术人员理解, 可以采用与上述关于水溶性交联轭合物相同的纯化方法对水溶性交联共轭配合物进行纯化。此外, 应该指出当然可以通过与上述关于轭合物的类似方法来分离出固体形式的该共轭配合物。

由于该水溶性交联轭合物和水溶性交联共轭配合物代表了一类新的化合物, 因此本发明的另一方面涉及一种含有至少一种载体组分、一种以上交联成分、至少一种间隔剂组分、至少一种信号组分和至少一种基本靶向组分的水溶性交联轭合物, 该信号组分共价结合到该间隔剂组分上, 而该间隔剂组分通过该连接组分共价结合到该载体组分上。

该信号组分选自染料、蛋白质(包括铁蛋白、藻红蛋白、藻青蛋白和藻胆色素), 酶(包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖激酶、尿素酶), 荧光性、发光性、磷光性和其它光发射性物质,

金属螯合物（包括亚氨基二乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和去铁敏B），放射性同位素标记的物质，重原子标记的物质，以及它们的混合物。

该间隔剂组分选自蛋白质和多肽。

本发明的进一步的方面涉及一种含有有本文所定义的水溶性轭合物、配位体和第二靶向组分的水溶性交联共轭配合物，该配位体共价结合到该第二靶向组分上，而该配位体通过非共价键结合到该轭合物的基本靶向组分上。

可以理解，关于本发明的水溶性交联轭合物和水溶性交联共轭配合物的详细和具体的性质和组成与上述的本发明方法的这些方面有关的水溶性轭合物和水溶性交联共轭配合物的详细和具体的性质和组成相同或近似。这意味着，如适宜，关于本发明方法的这些方面的描述适用于这种轭合物和共轭配合物。

轭合物和配合物的装置和用途

本发明涉及一种用于测定液体样品中是否存在至少一种目标组分的横向流动装置，该横向流动装置包括：

I) 包括应用部分、沉积部分和检测部分的试验片，这些部分的排列方式使该液体样品能够从应用部分经沉积部分流到检测部分；

II) 位于该试验片的沉积部分的至少一种本文所定义轭合物的干燥沉积物，或至少一种本文所定义的共轭配合物的干燥沉积物或它们的混合物；和

III) 至少一种能够与存在于该液体样品中的一种或一种以上的目
标组分发生选择性结合或选择性反应的靶向组分，该靶向组分被固定在该试验片的检测部分。

本发明的另一有用方面涉及一种检测液体样品中是否存在至少一种目标组分的方法，该方法包括：

I) 将该液体样品加到本文所定义的横向流动装置的应用部分；

II) 可选择将洗涤缓冲液加至该横向流动装置的应用部分；

III)使该应用液体在充足的时间内并在供给洗涤缓冲液的条件下，从应用部分经过沉积部分流至检测部分；

IV)在检测部分检测信号是否存在。

本发明的轭合物和/或共轭配合物以以下方式被支持(如作为沉积物)在该试验片的沉积部分：当弄湿该轭合物和/或共轭配合物时，通过往该试验片的检测部分施加毛细力能使其发生转移(溶解状态)。

被支持在该试验片的检测部分的靶向组分被支持的方式为：该靶向组分保持固定，从而不能通过毛细力使其发生转移。因此，可以通过吸收、共价结合等方法使该靶向组分被支持在试验片上。现有技术中公知用于将靶向组分，如抗体和抗原固定在支持材料上的方法。

在本发明的一个实施方案中，应用现有技术中已知的所谓的“三明治”技术及其所有变型进行该试验分析。

本领域技术人员理解所谓的该试验片的“应用”部分，即被含有要被检测的目标组分的样品润湿的(即该分析物)试验片部分可以与该沉积部分相同。因此，在本发明的另一有用的实施方案中，将含有要被检测的目标组分的样品直接应用于含有该轭合物和/或共轭配合物的试验片部分。

该试验片是一种能够从应用样品中吸收目标组分的物质，当它被润湿时，通过毛细引力提供从应用部分经沉积部分(借此溶解该轭合物和/或共轭配合物的沉积物，然后使其结合到目标组分上并与目标组分一起转移)到检测部分的流动的目标组分。

所用的试验片由能够支持本发明轭合物和/或共轭配合物和靶向组分如抗体和/或抗原等的材料制成的。制备该试验片的适宜材料的实施例如玻璃纤维、纤维素、尼龙、交联葡聚糖、各种色谱纸、纤维素酯如硝基纤维等。目前最为优选的材料为硝基纤维。

虽然称之为“试验片”，其中各部分排列在同一平面上并且其排列方式使含有目标组分的液体能够通过毛细引力从应用部分经过沉积部分流至检测部分，但该支持材料当然可以是满足不同部分和流动性要求的形状或形式。

要被检测的含有目标组分的液体通常（但不是必须）来源于生物，如血清样品、血浆样品、尿样、精液样品，或它们的混合物。

本文所述的横向流动装置能够检测少量的各种目标组分如抗原、半抗原、单克隆和多克隆抗体、基因探针、天然和合成低聚和多核苷酸、天然和合成单、低聚和多糖、生长因子、激素、受体分子、以及它们的混合物。例如该目标组分的特定的实施例为 hCG、兔抗人 CRP、HIV、丙肝病毒、衣原体、疱疹、促甲状腺激素(TSH)、李斯特菌和沙门氏菌及其混合物。

在本发明的一个特定优选的实施方案中，所用的水溶性交联轭合物和/或共轭配合物的信号组分为可以用裸眼直接检测的染料。因此，当在本文所公开的横向流动装置中使用这种轭合物/共轭配合物时，有可能视觉检测该应用液体样品中靶向组分是否存在。但是，本发明的另一有用方面包括本文所述的轭合物/共轭配合物的应用，其中，该信号组分为这样的一种信号组分：当它被应用于本文所述的横向流动装置时，在往检测部分加入反应剂之后可以通过裸眼检测该信号组分。

如前所述，本发明轭合物明显“大”于现有技术中公开的轭合物。虽然难以得到本发明轭合物确切结构，但目前相信已发生了广泛的交联，而这又进一步是该轭合物大小(和因此的质量平均分子量)的原因。从本文所公开的实施例中可以看出似乎存在如下的规律：分子量越大，则在本文实施例 7A 中所描述的“标准横向流动性能试验”中的进行试验时获得的性能更好(即高灵敏度)。

应该指出，EP0291194A1 公开的横向流动装置是适宜的横向流动装置的实例，其中可以引入本发明的水溶性交联轭合物和/或共轭配合物。

本发明的进一步的方面涉及一种本文所定义的水溶性交联轭合物和本文所定义的水溶性交联共轭配合物在以下技术中的应用，免疫化学测定技术包括酶免疫测定(DIA)如 ELISA、放射免疫测定(RIA)、比浊(nephelometric and turbidimetric)免疫测定、免疫组织化学方法，细胞化学方法；流式细胞测量术；当场应用的杂化技术；膜杂化技术，

包括 Southern 和 Northern 印痕，生物传感器、横向流动装置；或者以外源凝集素 / 糖相互作用为基础的方法。

附图的简要说明

图 1: Dex-BSA-若丹明/a-CRP 鞣合物的纯化

在高离子强度(1.75M 的磷酸钾缓冲液)下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上之后得到的样品的凝胶过滤 UV 吸收曲线(实施例 5A “溶液 B”，在 Sephacryl™ S-300 上进行凝胶过滤)。主峰(1)包括水溶性交联“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物。在横轴上每一个刻度代表 2ml。纵轴上的标记代表在 280nm 处的任意吸收单元。该图表明可以从该轭合物中分离出游离的、未结合的抗体，峰(2)。

图 2: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物的表征

在高离子强度(1.75M 的磷酸钾缓冲液)下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上之后得到的样品的凝胶过滤 UV 吸收曲线(实施例 5A “溶液 B”，Sephacryl™ S-500 上进行凝胶过滤)。主峰(1)包括水溶性交联“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物。在横轴上每一个刻度代表 2ml。纵轴上的标记代表在 280nm 处的任意吸收单元。该图表明该轭合物具有所定义的高分子量，表现为被早期洗脱的尖峰。

图 3a-3f: 在高和低离子强度下沉淀的轭合物的表征

在高离子强度(2.2M 的磷酸钾缓冲液)和低离子强度(0.1M 的磷酸钾缓冲液)下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上之后得到的样品的凝胶过滤 UV-吸收曲线(图 3a-b：在 Sephacryl™ HRS-300 上进行凝胶过滤的特征曲线；图 3c-d：在 Sephacryl™ HRS-500 上进行凝胶过滤的特征曲线；图 3e-f：在 Sephacryl™ HRS-1000 上进行凝胶过滤的特征曲线)。

图 3a、3c、3e 描述了在高离子强度下制备的轭合物，而图 3b、3d、

3f 描述了在低离子强度下制备的轭合物。标记(1)代表该轭合物而标记(2)代表游离的未被结合的抗体。在横轴上每一个刻度代表 2ml。纵轴上的标记代表在 280nm 处的任意吸收单元。

该凝胶过滤曲线清楚地表明在高离子强度下制备的轭合物的分子量比在低离子强度下制备的轭合物要大。

图 4：制备水溶性交联共轭配合物的方法概述

制备本说明书中提到的组分和前体的一个实施方案的示意图说明如图 4 所述。该图仅用于说明的目的，它代表了某一实施方案的任意实例，以帮助读者遵循该方法所述过程的概述。

通过以下所述的实施例对本发明进行进一步说明。

实施例

实施例 1：制备水溶性中间前体

实施例 1A

峰值 MW 为 500,000 和 2,000,000 的葡聚糖的 DVS 活化

在 0.25M 磷酸氢二钾 / 氢氧化钠 (PH11.5) 中制备五种分别的含有同样数量葡聚糖 (购自 Pharmacia, Sweden)、不同浓度的 DVS 和 0.25mg 的硼氢化钠 (PH 11.5) 的溶液 (A、B、C、D 和 E)，从而获得以下的最终浓度：

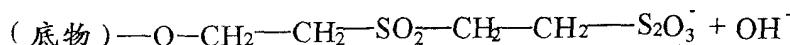
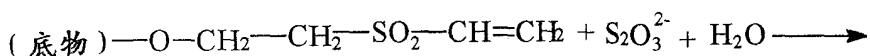
溶液	葡聚糖类型 (峰值 MW)	葡聚糖的数量 (%w/v)	DVS 浓度 (%v/v)
A	500,000	1	5
B	500,000	1	10
C	2,000,000	1	3
D	2,000,000	1	5
E	2,000,000	1	10

在室温 (20-25°C) 下将该葡聚糖溶于水中。往该溶液中加入同体积

的 0.5M 磷酸氢二钾 / 氢氧化钠 (PH 11.5) 和 0.25mg 硼氢化物/ml。在该氢氧化钠溶解之后立即将该反应混合物转入井式通风罩中，加入 DVS (Merck Cat. No. 821215)。采用磁式搅拌器缓慢搅拌 30 分钟。在活化之后，用 25% (v/v) 的盐酸将该反应混合物的 PH 调节到 PH 为 7。

将所有五种样品针对水进行完全透析以除去过量的反应剂。在透析之后，测定每种溶液的体积并计算葡聚糖的最终浓度。

通过以下方法测定游离的活性乙烯基的含量：使其与大量过量的硫代硫酸钠反应，然后用标准盐酸对所得的氢氧根离子进行滴定。根据以下反应图解 (Porath et al. (1975) J. Chromatogr. 103, 49) 进行游离的乙烯基与硫代硫酸盐的反应：



滴定的结果（见下表）宜表示为 μmoles 乙烯基每克葡聚糖和 / 或 moles 乙烯基每 mole 葡聚糖。计算出以占葡聚糖分子中葡萄糖总数的百分比表示的活化的葡萄糖单元平均数（峰值 MW 为 500,000 的葡聚糖含有平均 2,778 葡萄糖单元 / 葡聚糖分子，而峰值 MW 为 2,000,000 的葡聚糖含有平均 11,112 葡萄糖单元 / 葡聚糖分子）：

溶液	μmoles	moles 乙烯基	% 的活化的葡萄糖单
	乙烯基/g 葡聚糖	/mole 葡聚糖	元/葡聚糖分子
A	1,425	713	26%
B	1,857	930	33%
C	554	1,154	10%
D	1,639	3,144	28%
E	2,078	4,175	38%

实施例 1B

峰值 MW 为 500,000 的葡聚糖的表氯醇-活化

制备三种分别的含有同样数量的分子量为 500,000 的葡聚糖溶液

(A、B 和 C)，以获得以下的最终浓度：

溶液	葡聚糖的数量 (%w/v)	表氯醇 (%v/v)	氢氧化钠 (%w/v)
A	1	6	1.6
B	1	12	3.3
C	1	19	4.3

在室温(20-25°C)下将该葡聚糖溶于水中。往该溶液中加入氢氧化钠并将该反应混合物转入井式通风罩中，加入表氯醇(Merck Cat. No. 903296)。采用磁式搅拌器缓慢搅拌5小时。在活化之后，用25%(v/v)的盐酸将该反应混合物的PH调节到PH为7。

将所有三种样品针对水进行完全地透析以除去过量的反应剂。在透析之后，测定每种溶液的体积并计算葡聚糖的最终浓度。

通过以下方法测定游离的活性环氧基的含量：使其与大量过量的硫代硫酸钠反应，然后如实施例1A所述用标准盐酸对所得的氢氧根离子进行滴定。

所得的结果为：

溶液	μmoles 环氧基 /g 葡聚糖	moles 环氧基 /mole 葡聚糖	% 的活化的葡萄糖 单元/葡萄糖分子
A	323	161	6%
B	806	403	15%
C	802	400	14%

根据所给出的实施例可以得出：DVS和EPCH可用作高和低分子量的葡聚糖的良好的活化反应剂。

实施例2：制备第二水溶性中间前体

实施例2A

将牛血清白蛋白(BSA)结合到峰值MW为500,000和2,000,000的DVS-活化的葡聚糖上

将五种DVS-活化的葡聚糖溶液(A、B、C、D和E)与BSA(Boehringer

Mannheim Cat. No. 100350)结合。将 BSA 结合到 DVS 活化的葡聚糖上的过程如下：

溶液 A：将 60mg 的 DVS-活化的葡聚糖（峰值 MW 为 500,000，如实施例 1A 的“溶液 A”所述制备）和 200mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 B：将 30mg 的 DVS-活化的葡聚糖（峰值 MW 为 500,000，如实施例 1A 的“溶液 B”（此处原文可能有误）所述制备）和 200mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 C：将 152mg 的 DVS-活化的葡聚糖（峰值 MW 为 2,000,000，如实施例 1A 的“溶液 C”所述制备）和 500mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 D：将 152mg 的 DVS-活化的葡聚糖（峰值 MW 为 2,000,000，如实施例 1A 的“溶液 D”所述制备）和 500mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 E：将 152mg 的 DVS-活化的葡聚糖（峰值 MW 为 2,000,000，如实施例 1A 的“溶液 E”所述制备）和 500mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

在 BSA 溶解以后，加入缓冲液以得到以下最终浓度：

17mg 的 BSA/ml

5.2mgDVS-活化的葡聚糖/ml

PH 为 10.4 的 10mM 磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液

在 30℃ 下结合 18 小时，然后加入 1M 的盐酸调节该溶液的 PH 至 PH 为 6-7 以停止反应。

在 Sephadex HR S-300 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0599-01) 上进行凝胶过滤以测定被结合的 BSA 的数量。通过 FPLC (Pharmacia, Sweden)，采用直径为 2.7cm 而柱床体积为 230ml 的 Sephadex HR S-300 的药学柱 (Cat. No. XK26/40) 进行所有的凝胶过滤。该凝胶过滤是在 100mM 的氯化钠中，在流速为 3ml/分钟和最大样品载负量为 20ml 的条件下进行。采用 UV-监测仪 (Pharmacia,

Sweden, Cat. No. 19-2448-01/18-0601-01) 和笔尖记录器 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 19-8004-01) 对各部分进行监测。

在 Sephadryl HR S-300 上分离得到两个峰，并将其收集为两个分别的级分。

如果采用凝胶过滤技术，则上述所谓的该凝胶的“排阻限”不能进入细孔，从而将这种大分子从柱上所谓的“空隙体积”中洗脱，即该空隙体积为各个小珠之间的体积。通常该空隙体积约为总柱体积的 1/3。

测定这两部分的 OD 280nm，将所得的结果表示为结合到一个平均 MW 对应于该葡聚糖峰值分子量的葡聚糖分子上的 BSA 数。所得的结果汇总如下。

溶液	葡聚糖类型 (峰值 MW)	结合量 (%)	moles BSA/mole
			葡聚糖
A	500,000	66	17
B	500,000	41	21
C	2,000,000	48	48
D	2,000,000	55	55
E	2,000,000	54	54

可以根据以下所述计算上述值。

通过以下方法计算采用 30mg 的葡聚糖 (峰值 MW 为 500,000) 和 200mg 的 BSA(即在溶液中的摩尔比为葡聚糖:BSA=1:25) 进行的结合。

A=OD 280nm, 1cm 比色杯, Sephadryl S-300 上的峰 1;

B=OD 280nm, 1cm 比色杯, Sephadryl S-300 上的峰 1;

C=峰 1 的体积 (以 ml 表示);

D=峰 2 的体积 (以 ml 表示);

$$\epsilon(\text{BSA}, 280\text{nm}, 1\text{cm}, 1\text{mg/ml}) = 0.65;$$

$$\text{mg 峰 1 的 BSA} = (A \times C) / 0.65 = Y \text{ mg BSA};$$

$$\text{mg 峰 2 的 BSA} = (B \times D) / 0.65 = Z \text{ mg BSA};$$

结合的 BSA 的百分数 = $(Y \times 100) / (Y+Z)$;

结合的 moles BSA/mole 葡聚糖 = (葡聚糖:BSA 的比率 × % 结合的 BSA) / 100;

以下将含有结合到葡聚糖上的 BSA 的第一峰 (即从 Sephadex HR S-300 上的空隙体积得到的峰) 称为“Dex-BSA”复合物。

在 Sephadex HR S-500 (Pharmacia Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 上表征该“Dex-BSA”复合物。通过 FPLC (Pharmacia, Sweden), 采用柱床体积为 25ml 的 Sephadex HR S-500 的药学柱 (Cat. No. HR 10/30, Pharmacia, Sweden) 进行所有的凝胶过滤。该凝胶过滤是在 100mM 的氯化钠中, 在流速为 1ml/分钟和最大样品载负量 (每一流程) 为 100–500μl 的条件下进行。

在 Sephadex HR S-500 上的分离产生了两个发生部分融合的峰。第一峰 (峰 1) 在 8ml 的 “空隙体积” 之后被洗脱 (25ml 的 Sephadex HR S-500 的空隙体积为 8ml)。

Sephadex HR S-500 上的表征表示为位于该曲线第一峰上的 “Dex-BSA” 复合物的百分数 (下文称之为 “在空隙体积中被洗脱的复合物”)。计算该级分的大小, 从起始峰 1 到刻度 5.25 (即从凝胶过滤起始 10.5ml) 测定该级分。所得的结果为:

溶液	在空隙体积中被洗脱的 “Dex-BSA” 复合物的%
A	30
B	18
C	41
D	41
E	36

实施例 2B

将牛血清白蛋白 (BSA) 结合到峰值 MW 为 500,000 的表氯醇-活化的葡聚糖上

将三种表氯醇-活化的葡聚糖溶液(A、B和C)与 BSA(Boehringer Mannheim Cat. No. 100350)结合。将 BSA 结合到表氯醇-活化的葡聚糖上的过程如下：

溶液 A：将 90mg 的表氯醇-活化的葡聚糖(峰值 MW 为 500,000, 如实施例 1B 的“溶液 A”所述制备)和 300mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 B：将 90mg 的表氯醇-活化的葡聚糖(峰值 MW 为 500,000, 如实施例 1B 的“溶液 B”所述制备)和 300mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

溶液 C：将 90mg 的表氯醇-活化的葡聚糖(峰值 MW 为 500,000, 如实施例 1B 的“溶液 C”所述制备)和 300mg 的 BSA 溶解于 PH 为 10.4 的磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液中。

在 BSA 溶解以后，加入缓冲液以得到以下最终浓度：

18mg 的 BSA/ml

5.5mg 表氯醇-活化的葡聚糖/ml

PH 为 10.4 的 10mM 磷酸氢二钾 / 氢氧化钠缓冲液

在 30°C 下结合 18 小时，然后加入 1M 的盐酸调节该溶液的 PH 至 PH 为 6-7 以停止反应。

采用实施例 2A 中所述的在 Sephadex HR S-300 上的凝胶过滤测定结合的 BSA 的数量。

所得的结果为：

溶液	葡聚糖类型 (峰值 MW)	结合量 (%)	moles BSA/mole	
				葡聚糖
A	500,000	24		4
B	500,000	30		5
C	500,000	29		6

然后如实施例 3A 所述在 Sephadex HR S-500 上表征该“Dex-BSA”轭合物。在 Sephadex HR S-500 上的分离产生了两个峰，但在空隙

体积部分没有观察到“Dex-BSA”轭合物。

从所给的实施例可以得出：如果采用 BSA 作为间隔剂组分，则两种不同类型的葡聚糖活化带来了满意的结合产物。

实施例 3:制备水溶性中间体轭合物

实施例 3A

将若丹明染料结合到 DVS-活化的葡聚糖上

将三种具有两种不同峰值 MW (峰值 MW 分别为 500,000 和 2,000,000) 的“DeX-BSA”溶液 (A、B 和 C) 与若丹明 B 异硫氰酸酯 (Sigma, Cat. No. R1755, 若丹明 ITC) 结合。

溶液 A: 如实施例 2A 的“溶液 A”所述的结合了 17moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”；

溶液 B: 如实施例 2A 的“溶液 B (原文可能有误)”所述的结合了 17moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”；

溶液 C: 如实施例 2A 的“溶液 C”所述的结合了 48moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 2,000,000 的“Dex-BSA”。

将三种分别的含有 20mg 的 BSA (如“Dex-BSA”) 的溶液和若丹明 ITC (来源于浓度为 5mg 若丹明 ITC/ml DMSO 的储备液) 与缓冲液混合得到以下最终浓度：

溶液 A: 400 μ g 若丹明 ITC/ml 和 2mg BSA/ml

溶液 B+C: 200 μ g 若丹明 ITC/ml 和 2mg BSA/ml

所有的三种溶液含有 30% 的 DMSO 和 0.2M 的碳酸氢钠，PH 为 8.6。

在 30°C 下结合 3 小时，然后将该溶液针对 PH 为 7.2 的 10mM 的磷酸钾缓冲液进行完全地透析以除去过量的反应剂。

透析之后，测定每一溶液的体积并计算结合到若丹明 ITC (下文所指的“Dex-BSA-若丹明”轭合物) 上的“Dex-BSA”的数量。在 558nm (1cm 的比色杯) 处测定所有的样品的光密度并计算每一样品的消光单元 (EU)。

溶液	葡聚糖类型(峰值 MW)	moles BSA/mole 葡聚糖	EU/mg BSA
A	500,000	17	29
B	500,000	17	13
C	2,000,000	48	11

如上表所示，被结合的若丹明 ITC 的数目可以表示为 OD558EU/mg BSA。该值计算如下：

A=透析后“Dex-BSA-若丹明”溶液的体积

B=mg 用于结合的 BSA

结合的 OD 558EU/mg BSA=(A×OD 558)/B

在 Sephadryl HR S-500 (Pharmacia Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 和 Sephadryl S-300 (Pharmacia Sweden, Cat. No. 17-0599-01) 上表征该“Dex-BSA-若丹明”轭合物。

所有的凝胶过滤如实施例 2A 所述在 FPLC 柱 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. HR 10/30) 上，即在柱床体积为 25ml 的 Sephadryl HR S-300 或 25ml 的 Sephadryl HR S-500 的 FPLC 柱 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 上进行。该过滤是在由 1M 盐酸调节至 PH 为 9 的 50mM 的 Tris、0.1M 氯化钠、1%v/v Tween 20 中进行的。流速为 1ml/分，而样品的载负量根据样品的浓度为 100-500μl (每一流程)。所得的结果为：

溶液	在空隙体积中被洗脱的“Dex-BSA-若丹明”轭合物的%	
	(S-300)	(S-500)
A	69%	36%
B	52%	52%
C	31%	41%

实施例 3B

将若丹明染料结合到表氯醇-活化的葡聚糖-BSA 轼合物上

将三种峰值 MW 为 500,000 的“DeX-BSA”溶液 (A、B 和 C) 与若丹明

B 异硫氰酸盐(Sigma, Cat. No. R1755, 若丹明 ITC)结合。

溶液 A: 如实施例 2B 的“溶液 A”所述的结合了 4moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”;

溶液 B: 如实施例 2B 的“溶液 B”所述的结合了 5moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”;

溶液 C: 如实施例 2B 的“溶液 C”所述的结合了 6moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”。

将三种分别的含有 6mg 的 BSA (如“Dex-BSA”) 的溶液和若丹明 ITC (来源于浓度为 5mg 若丹明 ITC/ml DMSO 的储备液) 与缓冲液混合得到以下最终浓度:

200 μ g 若丹明 ITC/ml

0.5mg BSA/ml

30%的二甲基亚砜

PH 为 8.6 的 0.2M 的碳酸氢钠

如实施例 3A 所述进行结合及其后的透析。

透析之后, 在 558nm (1cm 的比色杯) 处测定所有的样品的光密度并计算每一样品的消光单元(EU)。所得结果为:

溶液	葡聚糖类型(峰值 MW)	moles BSA/mole 葡聚糖	EU/mg BSA
A	500,000	4	25
B	500,000	5	24
C	500,000	6	25

在如实施例 4A 所述的 Sephacryl HR S-500 (Pharmacia Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 和 Sephacryl S-300 (Pharmacia Sweden, Cat. No. 17-0599-01) 上表征该 Dex-BSA-若丹明轭合物。区别仅为其洗脱剂含有由 1M 盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 氯化钠、1%v/v Tween 20。所得的结果为:

溶液 在空隙体积中被洗脱的“Dex-BSA-若丹明”轭合物的%

	(S-300)	(S-500)
A	60%	13%
B	71%	17%
C	70%	17%

实施例 3C

将 Cy5 染料结合到 DVS-活化的葡聚糖-BSA 鞣合物上

将两种峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”溶液 (A、B 和 C) 与 Cy5-0Su 单官能度活性染料 (Amersham Pharmacia Biotec UK, Cat. No. PA15102) 结合。

溶液 A 和溶液 B: 如实施例 2A 的“溶液 A”所述的结合有 17moles 的 BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”。

将两种分别的含有 BSA (如“Dex-BSA”) 的溶液和 Cy5 (来源于浓度为 8mg Cy5/ml DMSO 的储备液) 与缓冲液混合以得到以下的最终浓度:

溶液 A: 2mg BSA/ml、4000μg Cy5/ml、50% DMSO、0.05M 碳酸氢钠, PH8.6。

溶液 B: 1mg BSA/ml、4000μg Cy5/ml、50% DMSO、0.05M 碳酸氢钠, PH8.6。

进行如实施例 3A 所述的结合及其后的透析, 区别仅在于将反应时间减至 2 小时。

透析后, 在 655nm (1cm 比色杯) 处测定所有样品的光密度并计算每一样品的消光单元 (EU)。所得结果为:

溶液	葡聚糖类型 (峰值 MW)	moles BSA/mole 葡聚糖	EU/mg BSA
A	500,000	17	57
B	500,000	17	87

实施例 3D

将反应橙染料结合到 DVS-活化的葡聚糖-BSA 鞣合物上

将如实施例 2A 的“溶液 A”所述的结合有 17moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”溶液与反应橙染料 (Aldrich, Cat. No. 30.650-9) 结合。

将含有 10mg BSA (如“Dex-BSA”) 的溶液和反应橙 (来源于浓度为 5mg 反应橙 16/ml DMSO 的储备液) 与缓冲液混合以得到以下的最终浓度：

5mg BSA/ml

250 μ g 反应橙 16/ml

5% 的二甲基亚砜

pH 为 10.4 的 0.4M 的磷酸钾

进行如实施例 3A 所述的结合及其后的透析，区别仅在于将反应时间增大到 18 小时。

透析之后，在 493nm (1cm 的比色杯) 处测定所有的样品的光密度并计算每一样品的消光单元 (EU)。所得结果为：

葡聚糖类型 (峰值 MW)	moles BSA/mole 葡聚糖	EU/mg BSA
500,000	17	1.4

如实施例 3A 所述在 Sephadryl HR S-500 和 Sephadryl S-300 上表征该 Dex-BSA-若丹明轭合物，区别仅为其洗脱剂含有由 1M 盐酸调节 pH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 氯化钠、0.5% v/v Tween 20。所得的结果为：

在空隙体积中被洗脱的“Dex-BSA-反应橙 16”轭合物的%

(S-300)	(S-500)
86%	17.4%

实施例 3E

将单蓝 A 染料结合到 DVS-活化的葡聚糖-BSA 鞍合物上

将如实施例 2A 的“溶液 A”所述的结合有 17moles BSA/mole 葡聚糖的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA”溶液与单蓝 A (Sigma, Cat. No. 29.840-9) 结合。

将含有 10mg BSA (如“Dex-BSA”) 的溶液和反应橙 (来源于浓度为 5mg 反应橙 16/ml DMSO 的储备液) 与缓冲液混合以得到以下的最终浓度:

5mg BSA/ml

500μg 单蓝 16/ml

10%的 DMSO

PH 为 10.4 的 0.4M 的磷酸钾

进行如实施例 3A 所述的结合及其后的透析。

透析之后，在 595nm (1cm 的比色杯) 处测定所有的样品的光密度并计算每一样品的消光单元 (EU)。所得结果为:

葡聚糖类型 (峰值 MW)	moles BSA/mole 葡聚糖	EU/mg BSA
500,000	17	3

如实施例 3A 所述在 Sephadryl HR S-500 和 Sephadryl S-300 上表征该 Dex-BSA-若丹明轭合物，区别仅在于其洗脱剂含有由 1M 盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 氯化钠、0.5%v/v Tween 20。所得的结果为:

%在空隙体积中被洗脱的“Dex-BSA-单蓝 A”轭合物	(S-300)	(S-500)
78%		16%

从所给的实施例可以得出：大量的不同的染料有效地结合到已被 DVS 或 EPCH 活化的 Dex-BSA 中间产物上。

实施例 4：制备水溶性中间体轭合物

实施例 4A

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上

将“Dex-BSA-若丹明”轭合物的五种溶液 (A、B、C、D 和 E) 与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分 (DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329) 结合。

溶液 A 和 D: 如实施例 3A 的“溶液 A”所述的结合有 29 OD 558

单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的 “Dex-BSA-若丹明”；

溶液 B、C 和 E：如实施例 3A 的“溶液 B”所述的结合有 13 OD 558 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的 “Dex-BSA-若丹明”。

制备以下含有抗体和 “Dex-BSA-若丹明”的溶液。

溶液 A 和 B：将 0.0016 μmol 的抗体和 0.000645 μmol 的葡聚糖（如 “Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合，以得到以下的最终浓度。

1. 75M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.24mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗体：1/2.5

溶液 C：将 0.007742 μmol 抗体和 0.001548 μmol 的葡聚糖（如 “Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合以得到以下的最终浓度：

2. 2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.21mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗体：1/5

溶液 D：将 0.003226 μmol 抗体和 0.00129 μmol 的葡聚糖（如 “Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合以得到以下的最终浓度：

2. 2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.13mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗体：1/2.5

溶液 E：将 0.0016 μmol 抗体和 0.000645 μmol 的葡聚糖（如 “Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合以得到以下的最终浓度：

2. 2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.15mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明”/抗体：1/2.5

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗体的结合在4-6°C下持续18小时。在结合之后，将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1.02838)加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为0.01M。往溶液C、D和E中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到1.75M。将所有的五种溶液在10,000rpm下旋转5分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物(球团)溶解于去离子水中。

将溶液A和B中的球团溶于400μl的去离子水中，加入Tween-20至最终浓度为1%v/v。

将溶液C中的球团溶于700μl的去离子水中，然后针对由1M的盐酸调节至PH为7.2的50mM的Tris和0.1M的氯化钠进行透析1个小时。在透析之后加入Tween-20至最终浓度为0.5%v/v。

将溶液D和C的球团溶于500μl的去离子水中，加入Tween-20至最终浓度为0.5%v/v。

通过在Sephacryl HR S-300(Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0599-01)进行凝胶过滤对样品中游离的抗体和“Dex-BSA-若丹明”-结合的抗体进行分离。在FPLC(Pharmacia, Sweden)上采用直径为1cm和柱床体积为25ml的Sephacryl HR S-300的药学柱(Cat. No. HR10/30)进行所有的凝胶过滤。溶液A和B的凝胶过滤在由1M盐酸调节PH至9的50mMTris、0.1M氯化钠、1%v/v的Tween-20中进行。溶液C、D和E的凝胶过滤在由1M盐酸调节PH至7.2的50mMTris、0.1M氯化钠、Tween-20(溶液C和D的Tween-20的浓度为0.5%v/v,溶液E的Tween-20的浓度为0.5%v/v)中进行。所有的凝胶过滤都在1ml/分的流速下进行。

在Sephacryl HR S-300上的分离产生两个峰。下文将含有结合到“Dex-BSA-若丹明ITC”上的兔抗人CRP的Sephacryl HR S-300上的峰1称为“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物。

将在 8-10.5ml 收集到“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物（来源于“溶液 B”）作为一个级分（从图 1 所示的曲线中的标记 4-5.25）。

测定“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物的 OD558，然后在 Sephadryl HR S-500 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 上表征该轭合物。在 FPLC (Pharmacia, Sweden) 上采用直径为 1cm 和柱床体积为 25ml 的 Sephadryl HR S-300 的 FPLC 柱 (Cat. No. HR10/30, Pharmacia Sweden) 进行所有的凝胶过滤。溶液 A 和 B 的凝胶过滤在由 1M 盐酸调节 PH 至 9 的 50mMTris、0.1M 氯化钠、1%v/v 的 Tween-20 中进行。溶液 C 和 E 的凝胶过滤在由 1M 盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mMTris、0.1M 氯化钠、Tween-20 (溶液 C 的 Tween-20 的浓度为 0.5%v/v, 溶液 E 的 Tween-20 的浓度为 0.1%v/v) 中进行。所有的凝胶过滤都在 1ml/分的流速下进行。

在 Sephadryl HR S-500 (“溶液 B”) 上的分离产生一个图 2 所示的在 7ml 之后被洗脱的主峰。但是，通过溶液 C 的轭合物的凝胶过滤收集到两个峰。在 7-10.5ml 处收集到级分 1，而在 10.5-18ml 处收集到级分 2。

在 Sephadryl HR S-500 上的表征表示为位于该曲线第一峰处的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物的百分数，下文称其为“在空隙体积中洗脱的轭合物”。该级分的大小为从峰 1 的起始处到凝胶过滤起始处的 10.5ml 处。所得的结果为：

溶液	在 Sephadryl HR S-300 上进行凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD558	在 Sephadryl HR S-500 上进行凝胶过滤后在空隙体积中洗脱的轭合物的%
A	2.5	74%
B	1.4	70%
C	2.5	54%
D	1.7	51%
E	1.1	80%

实施例 4B

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 EPCH-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上

将“Dex-BSA-若丹明”轭合物溶液与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分(DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329)结合。

如实施例 3B 的“溶液 C”所述的结合有 25 OD 558 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA-若丹明”。

制备以下含有抗体和“Dex-BSA-若丹明”的溶液。

将 0.003226 μmol 的抗体和 0.00129 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-若丹明”)与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合以得到以下的最终浓度。

1. 75M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.1mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明”/抗体：1/2.5

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后，将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1.02838)加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1.75M。将该溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物(球团)溶解于 500 μl 的去离子水中并加入 Tween-20 使最终浓度达 0.5%w/v。

在 Sephadryl HR S-300 上在由 1M 的盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 的氯化钠、0.5% 的 Tween-20 中进行凝胶过滤分离出样品中游离的抗体和“Dex-BSA-若丹明”-结合的抗体。在如实施例 4A 所述的 Sephadryl HR S-500 上表征 Sephadryl HR S-300 上的峰 1。随后在 Sephadryl HR S-500(如实施例 4A 所述)上的分离产生两个重叠的峰。第一峰，峰 1 在 7ml 后被洗脱。所得的结果为：

在 Sephadryl HR S-300 上进行凝胶

过滤后得到的峰 1 的 OD558

0.45

在 Sephadryl HR S-500 上进行凝胶

过滤后在空隙体积中洗脱的轭合物的%

42%

实施例 4C

在高离子强度下将抗 hCG 单克隆抗体结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上

将“Dex-BSA-若丹明”轭合物溶液与抗 hCG (Genzyme MIH, Batch No. M21452) 结合。

结合有 25 OD 558 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA-若丹明”，即实施例 3A 所述的“溶液 A”。

制备以下含有抗体和“Dex-BSA-若丹明”的溶液。

将 0.0016 μmol 的抗体和 0.00064 μmol 的葡聚糖（如“Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合，以得到以下的最终浓度。

2.2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.06mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗体：1/2.5

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后，将半胱氨酸 (Merck, Cat. No. 1.02838) 加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1.75M。将该溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物（球团）溶解于 500 μl 的去离子水中并加入 Tween-20 使最终浓度达 0.5%w/v。

在 Sephadryl HR S-300 上在由 1M 的盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 的氯化钠、0.5% 的 Tween-20 中进行凝胶过滤分离出样品中游离的抗体和“Dex-BSA-若丹明” -结合的抗体。在如实施例 4A 所述的 Sephadryl HR S-500 上表征 Sephadryl HR S-300 上的峰 1。随后在 Sephadryl HR S-500（如实施例 4A 所述）上的分离产生两个重叠的峰。第一峰，峰 1 在 7ml 后被洗脱。所得的结果为：

在 Sephadex HR S-300 上进行凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD558	在 Sephadex HR S-500 上进行凝胶过滤后在空隙体积中洗脱的结合物的%
0.88	58%

实施例 4D

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-反应橙 16”结合物上

将“Dex-BSA-反应橙 16”结合物溶液与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分(DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329)结合。

如实施例 3D 所述的结合有 1.4 OD493 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA-反应橙 16”。

制备以下含有抗体和“Dex-BSA-反应橙 16”的溶液。

将 0.00323 μmol 的抗体和 0.00129 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-反应橙 16”)与 PH 为 8.8 的 3.5M 磷酸钾缓冲液混合, 以得到以下的最终浓度。

2.2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.23mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比: “Dex-BSA-反应橙 16” / 抗体: 1/2.5

混合后在溶液中观察到沉淀物, 而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后, 将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1.02838)加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1.75M。将该溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟, 用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物(球团)溶解于 500 μl 的去离子水中并加入 Tween-20 使最终浓度达 0.5%w/v。

在 Sephadex HR S-300 上在由 1M 的盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mM 的 Tris、0.1M 的氯化钠、0.5% 的 Tween-20 中进行凝胶过滤分离出样品中游离的抗体和“Dex-BSA-反应橙 16”-结合的抗体。在如实施例

4A 所述的 Sephadryl HR S-500 上表征 Sephadryl HR S-300 上的峰 1。随后在 Sephadryl HR S-500 (如实施例 4A 所述) 上的分离产生两个重叠的峰。第一峰, 峰 1 在 7ml 后被洗脱。所得的结果为:

在 Sephadryl HR S-300 上进行凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD558	在 Sephadryl HR S-500 上进行凝胶滤过后在空隙体积中洗脱的轭合物的%
0.73	55%

实施例 4E

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的 “Dex-BSA-单蓝 A” 轼合物上

将 “Dex-BSA-单蓝 A” 轼合物的两种溶液(A 和 B)与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分(DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329)结合。

实施例 3E 所述的结合有 3 OD 595 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的 “Dex-BSA-单蓝 A”。

制备以下含有抗体和 “Dex-BSA-单蓝 A” 的溶液。

溶液 A: 将 0.0015μmol 的抗体和 0.0015μmol 的葡聚糖(如 “Dex-BSA-单蓝 A”)与 PH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.09mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比: “Dex-BSA-单蓝 A” /抗体: 1/1

溶液 B: 将 0.0030μmol 的抗体和 0.0015μmol 的葡聚糖(如 “Dex-BSA-单蓝 A”)与 PH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.2M 磷酸钾缓冲液

PH 8.6

0.2mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-单蓝 A” / 抗体：1/2

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后，将半胱氨酸 (Merck, Cat. No. 1.02838) 加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1.75M。将该溶液在 10,000 rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物（球团）溶解于 500 μl 的去离子水中并加入 Tween-20 使最终浓度达 0.5% w/v。

在 Sephadryl HR S-300 上在由 1M 的盐酸调节 pH 至 7.2 的 50 mM 的 Tris、0.1M 的氯化钠、0.5% 的 Tween-20 中进行凝胶过滤分离出样品中游离的抗体和“Dex-BSA-单蓝 A” - 结合的抗体。在如实施例 4A 所述的 Sephadryl HR S-500 上表征 Sephadryl HR S-300 上的峰 1。随后在 Sephadryl HR S-500（如实施例 4A 所述）上的分离产生两个重叠的峰。第一峰，峰 1 在 7 ml 后被洗脱。所得的结果为：

溶液	在 Sephadryl HR S-300 上进行凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD558	在 Sephadryl HR S-500 上进行凝胶过滤后在空隙体积中洗脱的轭合物的%
A	0.86	52%
B	0.88	48%

实施例 4F

在高离子强度和低离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明” 轼合物上的比较

将“Dex-BSA-若丹明” 轼合物的两种溶液 (A 和 B) 与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分 (DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329) 结合。

溶液 A 和 B: , 如实施例 3A 的“溶液 B” 所述的结合有 13 OD 558 单元/mg BSA 的峰值 MW 为 500,000 的“Dex-BSA-若丹明”。

制备以下含有抗体和“Dex-BSA-若丹明”的溶液。

溶液 A: 将 0.01548 μmol 的抗体和 0.003097 μmol 的葡聚糖（如“Dex-BSA-若丹明”）与 pH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得

到以下最终浓度:

2. 2M 磷酸钾缓冲液

PH 8. 6

0. 21mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比: “Dex-BSA-若丹明” /抗体: 1/5

溶液 B: 将 0. 00645 μmol 的抗体和 0. 00129 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-单蓝 A”)与 PH 为 8. 8 的 3. 5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

0. 1M 磷酸钾缓冲液

PH 8. 6

0. 54mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比: “Dex-BSA-若丹明” /抗体: 1/5

混合后在溶液 A 中观察到沉淀物。而两种溶液的结合在 4-6℃ 下持续 18 小时。在结合之后, 将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1. 02838)加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0. 01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1. 75M。将该溶液在 10, 000rpm 下旋转 5 分钟, 用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物(球团)溶解于 1ml 的去离子水中。将重新溶解的沉淀物(得自溶液 A)和溶液 B(没有沉淀物的澄清液)针对由 1M 盐酸调节 PH 至 7. 2 的氯化钠 50mM Tris、0. 1M 氯化钠进行透析 1 小时。

采用凝胶过滤进行表征:

在如实施例 4A 所述的 Sephadryl HR S-500 和 Sephadryl HR S-1000 上表征在 Sephadryl HR S-300 上进行凝胶过滤得到的峰。

在 Sephadryl HR S-300、Sephadryl HR S-500、Sephadryl HR S-1000 上进行凝胶过滤得到的曲线如图 3a-3f。

实施例 4G:

在高离子强度下将抗生素蛋白链菌素结合到 DVS-活化的“Dex-BSA-若丹明”轭合物上

将“Dex-BSA-若丹明”轭合物的五种溶液(A、B、C、D和E)与抗生素蛋白链菌素(KEM-EN-TEC, Denmark, Cat. No. 4610H)结合。如实施例3B的“溶液A”所述所有的样品结合有250D 558单元/mg BSA。

制备以下含有抗体和“Dex-BSA-若丹明”的溶液。

溶液 A: 将0.00833 μmol 的抗生素蛋白链菌素和0.004165 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-若丹明”)与PH为9的3.5M的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.5M 磷酸钾缓冲液

PH 9

0.05mg 抗生素蛋白链菌素/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明”/抗生素蛋白链菌素：1/2

溶液 B: 将0.00833 μmol 的抗生素蛋白链菌素和0.001667 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-若丹明”)与PH为9的3.5M的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.5M 磷酸钾缓冲液

PH 9

0.11mg 抗生素蛋白链菌素/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明”/抗生素蛋白链菌素：1/5

溶液 C: 将0.00833 μmol 的抗生素蛋白链菌素和0.000833 μmol 的葡聚糖(如“Dex-BSA-若丹明”)与PH为9的3.5M的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.5M 磷酸钾缓冲液

PH 9

0.22mg 抗生素蛋白链菌素/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明”/抗生素蛋白链菌素：1/10

溶液 D: 将 0.00833 μmol 的抗生蛋白链菌素和 0.0004165 μmol 的葡聚糖（如“Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 9 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度：

2.5M 磷酸钾缓冲液

PH 9

0.42mg 抗生蛋白链菌素/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗生蛋白链菌素：1/20

溶液 E: 将 0.00833 μmol 的抗生蛋白链菌素和 0.000208 μmol 的葡聚糖（如“Dex-BSA-若丹明”）与 PH 为 9 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度：

2.5M 磷酸钾缓冲液

PH 9

0.71mg 抗生蛋白链菌素/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-BSA-若丹明” / 抗生蛋白链菌素：1/40

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗生蛋白链菌素的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后，将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1.02838) 加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。往该溶液中加入去离子水而将这些溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 1.75M。将该溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将含有游离的抗体和结合的抗体的沉淀物（球团）溶解于去离子水中。

将所有溶液中的球团溶于 1ml 去离子水中。将该溶液针对由 1M 的盐酸调节 PH 至 7.2 的 0.1M 的氯化钠和 50mM Tris 进行透析 1 小时。在透析之后，将 Tween-20 加到这些溶液中以得到 0.1%v/v 的最终浓度，将溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出上清液（样品），而对该轭合物（球团）的剩余部分不加以利用。

通过在 Sephadryl HR S-300(Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0599-01) 上进行凝胶过滤对样品中游离的抗生蛋白链菌素和

“Dex-BSA-若丹明”-结合的抗生蛋白链菌素进行分离。在FPLC(Pharmacia, Sweden)上采用直径为1cm和柱床体积为25ml的Sephacryl HR S-300的药学柱(Cat. No. HR10/30)上进行所有的凝胶过滤。所有的凝胶过滤在由1M盐酸调节PH至7.2的50mMTris、0.1M氯化钠、1%v/v的Tween-20中进行。溶液C、D和E的凝胶过滤在由1M盐酸调节PH至7.2的50mMTris、0.1M氯化钠、0.1%v/v的Tween-20中，在1ml/分的流速下进行。

在Sephacryl HR S-300上的分离产生两个峰。下文将含有结合到“Dex-BSA-若丹明 ITC”上的抗生蛋白链菌素的Sephacryl HR S-300上的峰1称为“Dex-BSA-若丹明/抗生蛋白链菌素”轭合物。

将在8ml后收集的“Dex-BSA-若丹明/抗生蛋白链菌素”轭合物作为一个级分。

测定“Dex-BSA-若丹明/抗生蛋白链菌素”轭合物的OD558，然后在Sephacryl HR S-500(Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0613-01)上表征该轭合物。在FPLC(Pharmacia, Sweden)上，即采用直径为1cm和柱床体积为25ml的Sephacryl HR S-300的FPLC柱(Cat. No. HR10/30, Pharmacia Sweden)进行所有的凝胶过滤。所有的凝胶过滤在由1M盐酸调节PH至9的50mMTris、0.1M氯化钠、1%v/v的Tween-20中在1ml/分的流速下进行。

在Sephacryl HR S-500上的分离产生一个在7ml之后被洗脱的主峰。

在Sephacryl HR S-500上的表征表示为位于该曲线第一峰处的“Dex-BSA-若丹明/抗生蛋白链菌素”轭合物的百分数，下文称其为“在空隙体积中洗脱的轭合物”。所得的结果为：

溶液	在Sephacryl HR S-300上进行 凝胶过滤后得到的峰1的OD558	在Sephacryl HR S-500上进行凝胶过 滤后在空隙体积中洗脱的轭合物的%
A	6	77%
B	4	75%
C	2.7	72%
D	1.6	71%
E	0.7	65%

从所给的实施例可以得出，多种不同的基本靶向组分如抗体、特异性结合分子，优选在高离子强度下，可以被结合到携带间隔剂组分和染料的活化的葡聚糖上。

实施例 5：制备水溶性轭合物的替代方法

实施例 5A

将染料结合到峰值 MW 为 2,000,000 的 DVS-活化的葡聚糖上

如实施例 1A 的“溶液 C”所述采用 DVS 活化葡聚糖(峰值 MW 为 2,000,000) (即采用 1% (w/v) 的葡聚糖和 3% (v/v) 的 DVS)。该活化的葡聚糖含有 554 μ mol 活性乙烯基每克葡聚糖。该 DVS 活化的葡聚糖的最终浓度为 8.3mg 活化的葡聚糖/ml。

制备四种分别的含有同样浓度的 DVS-活化的葡聚糖溶液 (A、B、C 和 D)。加入缓冲液以使磷酸氢二钾 / 氢氧化钠的最终浓度为 0.25M，而氯化钠的最终浓度为 0.50M。这些溶液的 PH 为 11.5。

在经 0.45 μ m 的过滤器过滤之后加入浓缩的染料溶液 (Remazol-Black B gran, DE HA 725, Hoechst)。DVS-活化的葡聚糖和染料的最终浓度如下：

溶液	葡聚糖的数量 (%w/v)	染料的类型 (%w/v)
A	0.4	1.0
B	0.4	0.50
C	0.4	0.25
D	0.4	0.13

将溶液 A、B、C 和 D 在室温 (20–25°C) 下培养 3 小时。在结合之后采用 1M 盐酸将该反应混合物的 PH 调节到 PH 为 8。对所有的样品针对 50mM 的氯化钠进行完全地透析以除去未结合的染料。在透析之后测定各个溶液的体积并计算葡聚糖的最终浓度。

在透析之后，在 OD 600nm (1cm 比色杯) 处对各个样品进行测定，并采用 OD 600 结合单元/mg 葡聚糖的数量进行表征。将该结合反应的

结果汇总如下：

溶液	OD600 结合单元/mg 葡聚糖
A	11
B	8
C	4
D	2

根据下式计算 OD 600 结合单元/mg 葡聚糖的数量：

$$(A \times B) / C = OD 600 \text{ 结合单元/mg 葡聚糖的数量}$$

其中 A 为在最终的透析之后测定的 OD600，B 为在最终的透析之后得到的溶液的体积，而 C 为在该实验中所用的 DVS-活化的葡聚糖的数量 (mg)。

实施例 5B

将染料结合到峰值 MW 为 2,000,000 的 DVS-活化的葡聚糖上

如实施例 1A 的“溶液 C”所述，采用 DVS 活化葡聚糖 (峰值 MW 为 2,000,000) (即采用 1% (w/v) 的葡聚糖和 3% (v/v) 的 DVS)。该活化的葡聚糖含有 554 μmol 活性乙烯基每克葡聚糖。该 DVS 活化的葡聚糖的最终浓度为 8.3 mg 活化的葡聚糖/ml。

制备两种分别的含有同样浓度的 DVS-活化的葡聚糖溶液 (A 和 B)。加入缓冲液以使磷酸氢二钾 / 氢氧化钠的最终浓度为 0.25M，而氯化钠的最终浓度为 0.50M。这些溶液的 PH 为 11.5。

在经 0.45 μm 的过滤器过滤之后加入浓缩的染料溶液 (Remazol-亮红 F3B, DE BE305, Hoechst)。DVS-活化的葡聚糖和染料的最终浓度如下：

溶液	葡聚糖的数量 (%w/v)	染料的类型 (%w/v)
A	0.4	0.50
B	0.4	0.25

将溶液 A 和 B 在室温 (20–25°C) 下培养 4 小时。在结合之后采用 1M 盐酸将该反应混合物的 PH 调节到 7。对所有的样品针对 50 mM 的氯化钠进行完全地透析以除去未结合的染料。在透析之后测定各个溶液的体积

并计算最终浓度。

在透析之后，在 OD 530nm (1cm 比色杯) 处对各个样品进行测定，并采用 OD 530 结合单元/mg 葡聚糖的数量来表征。该结合反应的结果汇总如下：

溶液	OD530 结合单元/mg 葡聚糖
A	7
B	5

如实施例 5A 所述计算 OD 530 结合单元/mg 葡聚糖的数量：

从所给的实施例得出：两种不同的染料（黑或红）结合了几乎等量的 OD。

实施例 6：制备水溶性交联轭合物替代方法

实施例 6A

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS-活化的“Dex-Remazol 黑”轭合物上

将五种“Dex-Remazol 黑”轭合物的溶液 (A、B、C、D 和 E) 与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分 (DAKO, Denmark Cat. No. Q0329) 结合。

溶液 A 和 E：如实施例 5A 的“溶液 A”所述，峰值 MW 为 2,000,000 的“Dex-Remazol 黑”结合了 11 OD600 单元/mg 葡聚糖。

溶液 B：，如实施例 5A 的“溶液 B”所述，峰值 MW 为 2,000,000 的“Dex-Remazol 黑”结合了 8 OD600 单元/mg 葡聚糖。

溶液 C：如实施例 5A 的“溶液 C”所述，峰值 MW 为 2,000,000 的“Dex-Remazol 黑”结合了 4 OD600 单元/mg 葡聚糖。

溶液 D：如实施例 5A 的“溶液 D”所述，峰值 MW 为 2,000,000 的“Dex-Remazol 黑”结合了 2 OD600 单元/mg 葡聚糖。

溶液 A、B、C 和 D：将 0.003226 μmol 的抗体和 0.000645 μmol 的葡聚糖（如“Dex-Remazol 黑”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度：

1. 75M 磷酸氢二钾缓冲液

PH 8.6

0.6mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-Remazol” / 抗体：1/5

溶液 E：将 0.00645 μmol 的抗体和 0.00129 μmol 的葡聚糖（如“Dex-Remazol 黑”）与 PH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度：

2.2M 磷酸氢二钾缓冲液

PH 8.6

0.22mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比：“Dex-Remazol” / 抗体：1/5

混合后在溶液中观察到沉淀物，而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后，将半胱氨酸 (Merck, Cat. No. 1.02838) 加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。将溶液 A、B、C 和 D 针对 PH 为 9 的 0.1M 磷酸钾缓冲液透析 1 小时。透析后加入 Tween-20 以使最终浓度为 0.5%v/v。

往溶液 E 中加入去离子水以将该溶液中磷酸盐缓冲液的浓度调节至 1.75M。将该溶液在 10,000rpm 下旋转 5 分钟，用吸管小心地吸出清澈和几乎无色的上清液。将沉淀物（球团）溶解于 1ml 的去离子水中并加入 Tween-20 使其最终浓度达 0.5%v/v。

通过在 Sephadex HR S-300 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0599-01) 上进行凝胶过滤对样品中游离的抗体和“Dex-Remazol 黑”-结合的抗体进行分离。在 FPLC (Pharmacia, Sweden) 上采用直径为 1cm 和柱床体积为 25ml 的 Sephadex HR S-300 的药学柱 (Cat. No. HR10/30) 进行所有的凝胶过滤。对于溶液 A、B、C 和 D，其凝胶过滤在 PH 为 9 的 0.1M 的磷酸钾缓冲液、0.5%v/v 的 Tween-20 中进行的。溶液 E 是在由 1M 盐酸调节 PH 至 7.2 的 50mMTris、0.1M 氯化钠、1%v/v 的 Tween-20 中进行凝胶过滤的。所有的凝胶过滤在 1ml/分的流速下进行。

在 Sephadex HR S-300 上的分离产生两个峰。下文将含有结合到“Dex-Remazol 黑”上的兔抗人 CRP 的 Sephadex HR S-300 峰 1 称为“Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭合物。

将在 8ml 后收集“Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭合物作为一个级分。

测定“Dex-Remazol 黑 / a-CRP”轭合物的 OD600，然后在 Sephadex HR S-500 (Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0613-01) 上表征溶液 A、B、C 和 D 的轭合物。在 FPLC (Pharmacia, Sweden) 上采用直径为 1cm 和柱床体积为 25ml 的 Sephadex HR S-500 的 FPLC 柱 (Cat. No. HR10/30, Pharmacia Sweden) 进行所有的凝胶过滤。该凝胶过滤是在 PH 为 9 的 0.1M 的磷酸钾缓冲液、0.5% v/v 的 Tween-20 中和 1ml/分的流速下进行的。

在 Sephadex HR S-500 上的分离产生两个重叠的峰。第一峰，峰 1 在 7ml 后被洗脱。

在 Sephadex HR S-500 上的表征表示为位于该曲线第一峰处的“Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭合物的百分数，下文称其为“在空隙体积中洗脱的轭合物”。所得的结果为：

溶液	在 Sephadex HR S-300 上进行 凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD600	在 Sephadex HR S-500 上进行凝胶过 滤后在空隙体积中洗脱的轭合物的%
A	3	28%
B	2	24%
C	1	10%
D	0.6	20%
E	1.7	未试验

实施例 6B

在高离子强度下将兔抗人 CRP 结合到 DVS 活化的“Dex-Remazol 亮红”轭合物上

将 Dex-Remazol 亮红”轭合物的溶液与兔抗人 CRP 免疫球蛋白级分 (DAKO, Denmark, Cat. No. Q0329) 结合。

如实施例 5B 的“溶液 A”所述, 峰值 MW 为 2,000,000Dex-Remazol 亮红”结合了 7OD530 单元/mg 葡聚糖。

制备以下含有抗体和 Dex-Remazol 亮红”的溶液:

将 0.00645 μmol 的抗体和 0.00129 μmol 的葡聚糖(如“Dex-Remazol 亮红”)与 PH 为 8.8 的 3.5M 的磷酸钾缓冲液混合以得到以下最终浓度:

2.2M 磷酸氢二钾缓冲液

PH 8.6

0.57mg 抗体/ml

溶液中的摩尔比: “Dex-Remazol” / 抗体: 1/5

混合后在溶液中观察到沉淀物, 而抗体的结合在 4-6°C 下持续 18 小时。在结合之后, 将半胱氨酸(Merck, Cat. No. 1.02838)加到该样品至半胱氨酸的最终浓度为 0.01M。将该溶液针对 PH 为 9 的 0.1M 磷酸钾缓冲液透析 1 小时。透析后加入 Tween-20 以使最终浓度为 1%v/v。

在 Sephadex HR S-300(Pharmacia, Sweden, Cat. No. 17-0599-01)上, 在由 1M 盐酸调节 PH 至 9 的 50mMTris、0.1M 氯化钠、1%v/v 的 Tween-20 中进行凝胶过滤分离出样品中游离的抗体和“Dex-Remazol 亮红”结合物抗体。流速为 1ml/分。

在 Sephadex HR S-300 上的分离产生两个峰。下文将含有结合到“Dex-Remazol”上的兔抗人 CRP 的 Sephadex HR S-300 峰 1 称为“Dex-Remazol 亮红/a-CRP”轭合物。在 8ml 后收集“Dex-Remazol 亮红/a-CRP”轭合物作为一个级分并测定其 OD530。

在 Sephadex HR S-300 上进行凝胶过滤后得到的峰 1 的 OD558

1.67

从所给的实施例可以得出, 基本靶向组分可以被结合到携带不同染料的活化的葡聚糖上。

实施例 7: 交联轭合物和交联共轭配合物的装置及其应用

实施例 7A

“标准横向流动性能试验”

设计以下“标准横向流动性能试验”用于采用一系列可重现的标准条件和商业可得的抗原对任何着色的轭合物进行试验。

材料:

硝基纤维纸:	微孔 SRHF, 25×300mm, Cat. No:SRHF 02020
玻璃纤维纸	携带结合剂的 Whatman 玻璃纤维纸, 20×300mm, Cat. No:9599-9432
吸水垫片	Whatman, 20×300mm, 纤维素纸, 3mm Cat No. :3030-9433
塑料衬板	0.01 White. Adhesives Research Inc. P. O. Box 100, Glen Rock, Pennsylvania, 17327, USA
抗原	人血清交叉反应蛋白(CRP) DAKO 人血清校准剂 Cat. No. :X 09325
抗体	兔抗人 CRP, DAKO, Cat. No. :Q 0329
包被缓冲液	PH 为 7.2 的 0.1M 的磷酸钾缓冲液
抗原缓冲液	PH 为 8.6 的 50mM 的 Tris/HCl+0.1M NaCl+0.5%Tween-20
阻断缓冲液	PH 为 8.6 的 50mM 的 Tris/HCl+0.1M NaCl+0.5%Tween-20
洗涤缓冲液	PH 为 8.6 的 50mM 的 Tris/HCl+0.1M NaCl+0.5%Tween-20
轭合物缓冲液	PH 为 8.6 的 50mM 的 Tris/HCl+0.1M NaCl+0.5%Tween-20
轭合物 I	与实施例 4A 类似, 根据本专利制得的 OD558 为 1.49 的“Dex-BSA-若丹明/aCRP”轭合物
轭合物 II	根据 WO9393/01498 制得的 OD558 为 1.74 的“Dex-BSA-若丹明/aCRP”轭合物

方法:

制备横向流动试验片

将干燥的硝基纤维纸切成片(6mm 宽和 6cm 长)并将其装在塑料衬板(5mm 宽和 6cm 长)上。将玻璃纤维垫片(5mm 宽, 20cm 长)装在该硝基纤维试验片的一端。将吸水垫片(5mm 宽, 20cm 长)装在该硝基纤维验片的另一端。

制备抗体溶液

将兔抗人 CRP 稀释至最终浓度为 0.125mg 免疫球蛋白每 ml 包被缓冲液

制备抗原溶液

通过在抗原缓冲液中稀释 DAKO 人血清校准剂制备以下抗原溶液(根据该校准剂中 CRP 的特定浓度对该血清校准剂进行稀释)：

- A: 250ng CRP/ml
- B: 1250ng CRP/ml
- C: 63ng CRP/ml
- D: 31ng CRP/ml
- E: 16ng CRP/ml
- F: 8ng CRP/ml
- G: 0ng CRP/ml (阴性对照)

制备轭合物溶液

制备用于在轭合物缓冲液中进行试验的轭合物 I 和 II 的稀释液

轭合物：“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物(来源于实施例 4A 中的溶液 D), “Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭合物(来源于实施例 6A 中的溶液 E)。

稀释：将该轭合物稀释至以下最终浓度：采用 1cm 的光路在其吸收光谱的可见范围(即在约 450nm-650nm 的范围)的实际吸收的最大处测得的吸光率为 0.7。

进行试验

- 1) 对于七个标记为 A1、B1、C1、D1、E1、F1 和 G1 的横向流动试验片在每一试验片的中间点上 3 μ l 的兔抗人血 CRP (0.125mg 兔疫球蛋白/ml)。让这些垫片干燥 15 分钟。
- 2) 将 25 μ l 的阻断缓冲液应用于每个试验片的玻璃纤维垫片的上端以阻断该试验片的残留蛋白的结合能力。
- 3) 等待约 10 分钟直至毛细流动的缓冲液到达这些试验片另一端的吸水垫片处。
- 4) 将 25 μ l 的抗原溶液应用于每一试验片的玻璃纤维垫片的上端。在标记为 A1 的试验片上应用抗原溶液 A (250ng CRP/ml)，在标记为 B1 的试验片上应用抗原溶液 B 等直至在标记为 G1 的试验片上应用抗原溶液 G。将该抗原溶液缓慢加入以避免该玻璃纤维垫片的“溢出”。
- 5) 等待 10 分钟以使该抗原溶液流至该试验片另一端的吸水垫片处。
- 6) 在每一试验片的玻璃纤维垫片的下端加入 25 μ l 的洗涤缓冲液。等待 10 分钟然后再次在每一试验片的玻璃纤维垫片的下端加入 25 μ l 的洗涤缓冲液。
- 7) 等待 30 分钟。
- 8) 在每一试验片的玻璃纤维垫片的下端加入 50 μ l 的轭合物 I 的稀释液。
- 9) 等待 10 分钟。
- 10) 在每一试验片的玻璃纤维的下端加入 25 μ l 的洗涤缓冲液。等待 10 分钟然后再次在每一试验片的玻璃纤维垫片的下端加入 25 μ l 的洗涤缓冲液。

采用新系列的标记为 A2、B2、C2、D2、E2、F2 和 G2 的横向流动试验片重复步骤 1，并在步骤 8 中采用轭合物 II 的稀释液进行步骤 2-10。

试验结果的评价

采用评分法对试验片上出现的斑点的色度进行评价。以下的数字用于对出现斑点的强度进行表征。

- | | |
|----|-----------|
| 5: | 非常强烈的有色斑点 |
| 4: | 中度有色斑点 |
| 3: | 弱有色斑点 |
| 2: | 几乎不可见斑点 |
| 1: | 没有检测到斑点 |

从评分试验中读出：

轭合物	试验片	得分
轭合物 I	A1	4
	B1	4
	C1	3
	D1	2
	E1	1
	F1	1
	G1	1
轭合物 II	A2	1
	B2	1
	C2	1
	D2	1
	E2	1
	F2	1
	G2	1

实施例 7B

对不同的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进行标准流动性能试验

在标准横向流动性能试验中对不同的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进行试验。所有的试验如实施例7A所述进行。

在该试验中抗原的浓度(CRP)和“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物浓度各不相同，以下对每一项试验分别进行描述。

在所有的试验中，将0.1mg/ml的抗体点于硝基纤维试验片上，每点用量为1μl。

试验号1

对实施例4A的溶液C中的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进行横向流动性能试验。

采用以下轭合物级分进行横向流动性能试验

I: Sephadryl HR S-300上的峰1 浓度: OD₅₅₈=0.1

II: Sephadryl HR S-500上的级分1 浓度: OD₅₅₈=0.1

II: Sephadryl HR S-500上的级分2 浓度: OD₅₅₈=0.1

采用来源于AGFA、ARUSII的平板扫描仪在以下系列的条件下测定出现在该试验片上的斑点的色度:

光源: 反射光

模式: 灰度级

输入: 240dpi

范围: 柱状图最小=130, 最大=254

色调曲线: 无

清晰度: 无

分辨率: 无

大小: A4型式

采用基于windows的软件CREAM(1-D, Kem-En-Tec A/S, Copenhagen, Denmark, Cat. No:990012)计算以强度为单位所给出的结果。

结果：

抗原浓度 ng CRP/ml	读数 轭合物 I	读数 轭合物 II	读数 轭合物 III
250	1147	1848	928
125	752	1447	684
63	426	880	408
31	299	538	265
16	140	527	142
0	66	66	66

结论：

Sephacryl HR S-500 的级分 1 所收集到的轭合物（从 7-10.5ml 收集到）比在级分 2 所收集到的轭合物（从 10.5-18ml 收集到）有更为明显的反应。对 Sephacryl HR S-300 上的含有 Sephacryl HR S-500 上获得的两个级分的峰 1 进行试验的结果所给出的反应与在 Sephacryl HR S-500 上获得的级分 2 相同。上述试验结果表明了采用水溶性、高分子量轭合物即在 Sephacryl HR S-500 上进行凝胶过滤时从所述洗脱体积中完全或几乎完全排出的轭合物的优点。

试验号 2

对实施例 4B 的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进行横向流动性试验。

将上述轭合物的性能与对照轭合物(采用 DVS 活化的葡聚糖制得), 实施例 4A 的溶液 E 中的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”进行比较。

I: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4B

II: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4A，溶液 E (对照)

轭合物浓度: OD=558=0.5

结果：

抗原浓度 ngCRP/ml	读数轭合物 I	读数轭合物 II (对照)
250	2844	2184
125	2736	1778
63	1916	1136
31	980	527
16	592	363
0	66	66

结论:

上述试验结果表明将 EPCH-活化的载体部分用作高分子量轭合物的基础的可行性，该高分子量轭合物与以 DVS-活化的载体部分为基础的轭合物相比性能类似或更好。

试验号 3

对实施例 4F 中的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物(分别在高(溶液 A)和低(溶液 B)离子强度下制得)。对在 Sephadex HR S-1000 的凝胶过滤上收集到的各种级分和实施例 4A 溶液 E 中的对照合物也进行试验：

I: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4F，溶液 A OD558=0.35

II: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4F，溶液 B OD558=0.35

III: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4A，溶液 E (对照) OD558=0.5

IV: 溶液 A 的级分 1(Sephadex S-1000)，从 8-10ml 收集到

V: 溶液 A 的级分 2(Sephadex S-1000)，从 10-12ml 收集到

VII: 溶液 A 的级分 3(Sephadex S-1000)，从 14-16ml 收集到

VIII: 溶液 A 的级分 4(Sephadex S-1000)，从 18-20ml 收集到

采用 OD558=0.35 的浓度对级分 IV-VII 进行试验。

结果:

对照 抗原浓度 ng CRP/ml	读数		读数	
	轭合物 A			
	高离子强度	低离子强度		
250	—	148	2184	
125	—	66	1778	
63	709	66	1136	
31	542	66	527	
16	425	66	363	
8	173	66	66	
4	154	66	66	
0	66	66	66	

对从 Sephacryl HR S-1000 上收集到的级分进行试验。

抗原浓度 ng CRP/ml	读数			
	级分 1	级分 2	级分 3	级分 4
63	2416	1052	612	481
31	1854	624	485	176
16	1064	501	214	66
8	623	430	66	66
4	527	180	66	66
0	66	66	66	66

结论:

该试验表明，由抗体在低离子强度下结合，即不对反应剂进行（可逆）沉淀制得的轭合物（轭合物 B），与已在可逆沉淀条件下进行抗体结合的轭合物（轭合物 A）相比性能非常差。这些结果与轭合物 B 的分子量显著低于轭合物 A 的事实一致。而且可以看到，如果将轭合物分成较小分子量的样品，则该样品的性能随着其分子量而降低，即高分子量

具有高性能。

实施例 7C

对不同的“Dex-BSA-染料/a-CRP”轭合物进行标准流动性能试验
在标准横向流动性能试验中对不同的“Dex-BSA-染料/a-CRP”和
“Dex-染料/a-CRP”轭合物进行试验。所有的试验如实施例 7A 所述进
行。

用于打点的抗体浓度、用于在硝基纤维试验片上打点的抗体的体积
(μl)、抗原浓度(CRP)和轭合物的浓度在各个试验中各不相同，下文分
别对每个试验中的情况进行描述。

试验号 1

对实施例 6A 的溶液 A、B 和 C 中的“Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭
合物进行横向流动性能试验。

将这些轭合物的性能与对照轭合物，实施例 4A 的溶液 E 中的
“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”进行比较。

采用以下条件进行横向流动性能试验。

在对“Dex-Remazol 黑/a-CRP”轭合物进行试验时，用 $3\mu\text{l}$ 浓度
为 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的抗体打点；而在对“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进
行试验时，采用 $1\mu\text{l}$ 浓度为 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 的抗体。

I: “Dex-Remazol 黑/a-CRP”，轭合物 A OD600=0.6

II: “Dex-Remazol 黑/a-CRP”，轭合物 B OD600=0.6

III: “Dex-Remazol 黑/a-CRP”，轭合物 C OD600=0.6

IV: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4A，溶液 E (对照) OD558=0.5

结果：

抗原浓度 ng CRP/ml	读数 轭合物 A	读数 轭合物 B	读数 轭合物 C	读数 轭合物 D
250	989	705	338	2184
0	66	66	66	66

该试验结果表明将 Remazol-黑用作信号组分的可行性。

试验号 2

对实施例 4E 的溶液 A 和 B 中的 “Dex-BSA-单蓝 A/a-CRP” 鞍合物进行横向流动性能试验。

将这些鞍合物的性能与对照鞍合物，实施例 4A 的溶液 E 中的 “Dex-BSA-若丹明/a-CRP” 进行比较。

采用以下条件进行横向流动性能试验。

在对 “Dex-BSA-单蓝 A/a-CRP” 鞍合物和 “Dex-BSA-若丹明/a-CRP” 鞍合物进行试验时，采用 1μl 浓度为 0.1mg/ml 的抗体打点。

I: “Dex-BSA-单蓝 A /a-CRP”，鞍合物 A OD595=0.5

II: “Dex-BSA-单蓝 A /a-CRP”，鞍合物 B OD595=0.5

III: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”，实施例 4A，溶液 E (对照) OD558=0.6

结果：

抗原浓度 ng CRP/ml	读数 鞍合物 A	读数 鞍合物 B	读数 对照
250	1158	1062	2184
0	121	87	66

该试验结果表明将单蓝 A 用作信号组分的可行性。

试验号 3

对实施例 6B 的溶液 A 和 B 中的 “Dex-Remazol 亮红/a-CRP” 鞍合

物进行横向流动性能试验。

将这些轭合物的性能与对照轭合物，实施例 4A 的溶液 E 中的“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”进行比较。

采用以下条件进行横向流动性能试验。

在对“Dex-Remazol 亮红/a-CRP”轭合物进行试验时，用 $3\mu\text{l}$ 浓度为 1mg/ml 的抗体打点；而在对“Dex-BSA-若丹明/a-CRP”轭合物进行试验时，采用 $1\mu\text{l}$ 浓度为 0.1mg/ml 的抗体。

- | | |
|--|------------------------|
| I: “Dex-Remazol 亮红/a-CRP”， 轲合物 A | OD ₆₀₀ =1.0 |
| II: “Dex-BSA-若丹明/a-CRP”， 实施例 4A， 溶液 E (对照) | OD ₅₅₈ =0.5 |

结果：

抗原浓度 ng CRP/ml	读数		读数 对照
	轭合物	对照	
125	231	1778	
0	66	66	

该试验结果表明将 Remazol-亮红用作信号组分的可行性。

从给出的实施例可以得出：可逆沉淀条件使轭合物在存在或不存在间隔剂组分的情况下与抗体和染料结合，从而在横向流动试验片上表现出比不在可逆沉淀的条件下制得的轭合物更好的性能。

图 1

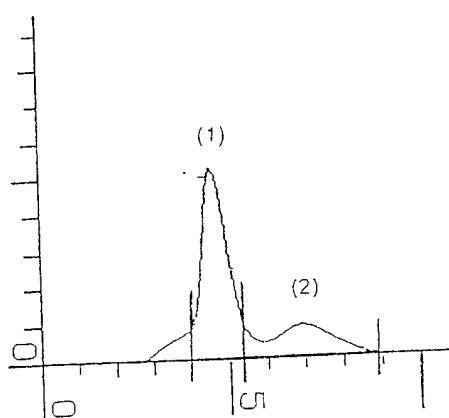


图 2

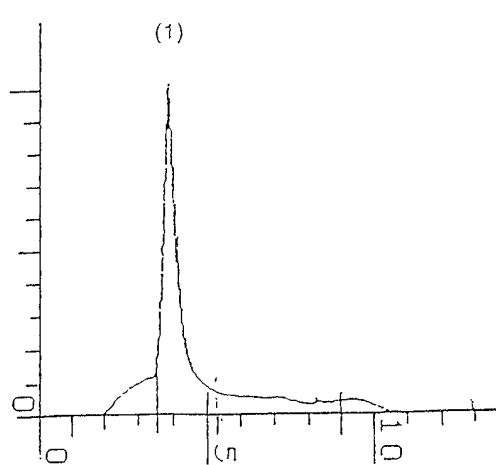


图 3a

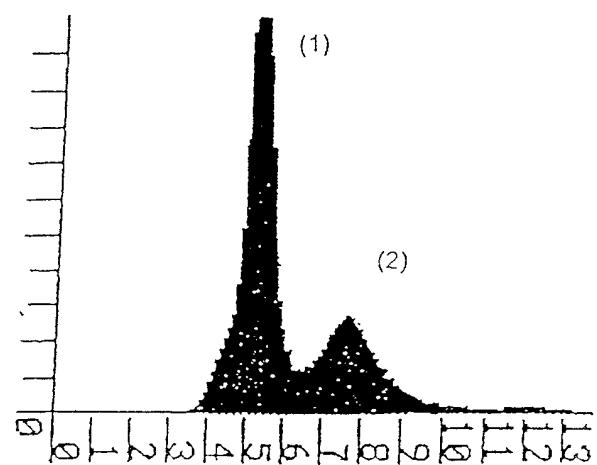


图 3b

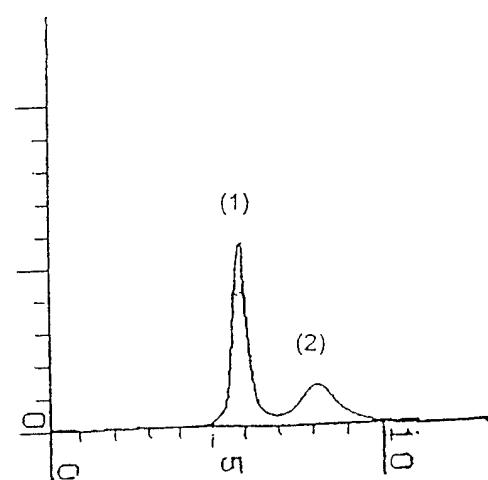


图 3c

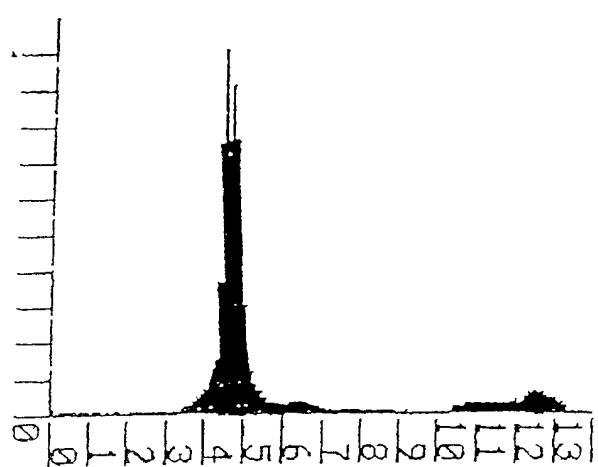


图 3d

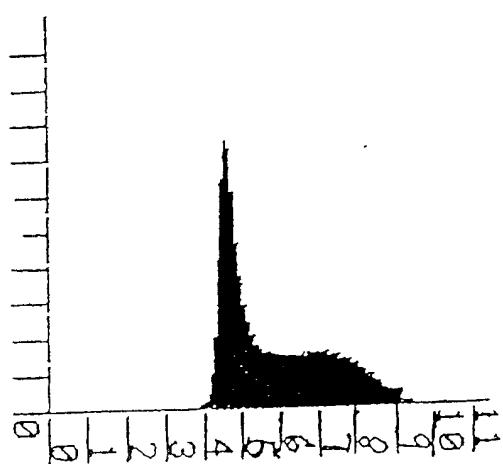


图 3e



图 3f

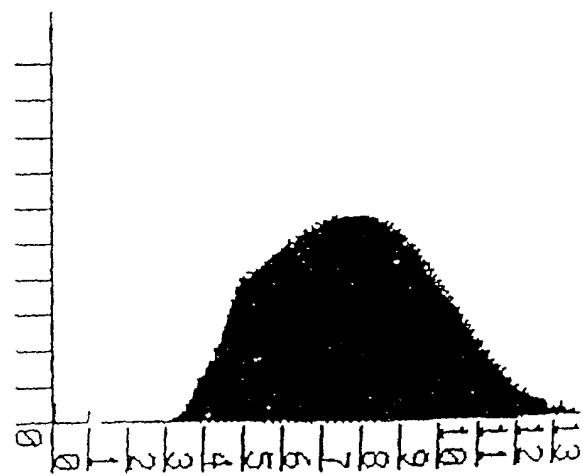


图 4a

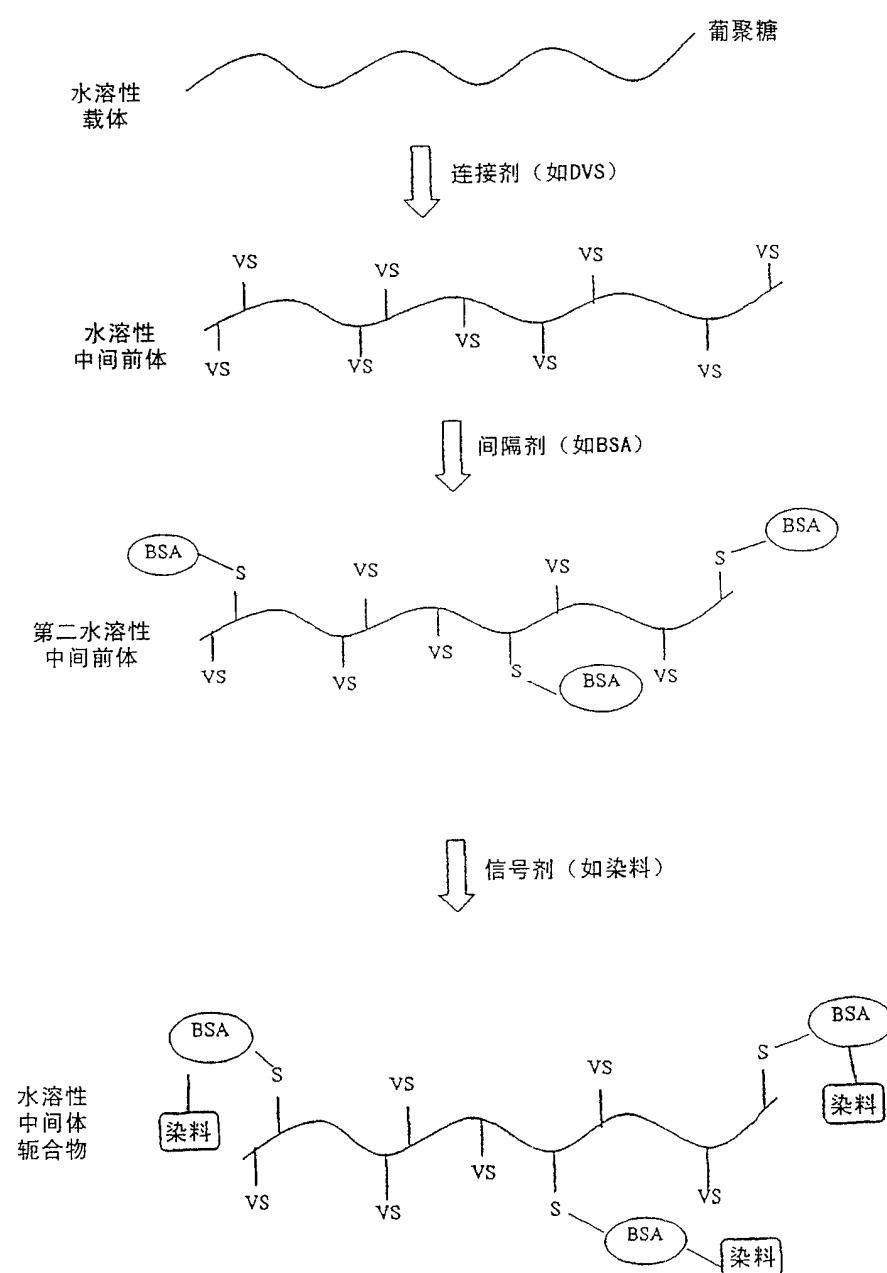


图 4b

