(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118369581 A
(43)申请公布日 2024.07.19

(21)申请号 202180104842.X
(22)申请日 2021.11.12
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/059251 2021.11.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/086103 EN 2023.05.19
(71)申请人 贝克曼库尔特有限公司
地址 美国
(72)发明人 阿迪蒂亚·亚拉雷
拉杰什·文卡特什 苏梅特·舒拉
梅于尔·吉夫拉亚尼
奈纳·阿罗拉 戈皮纳德·亚卡
希瓦·兰吉尼·斯里尼瓦桑
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张珊珊 陈九洲
(51)Int.Cl.
*G01N 33/533*(2006.01)

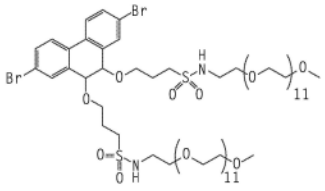
权利要求书8页 说明书61页 附图27页

(54)发明名称

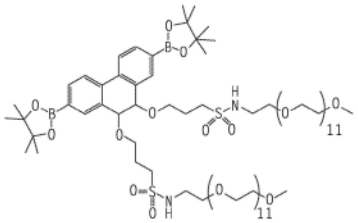
# 用于干燥与聚合物染料缀合的抗体的新的制剂

(57)摘要

提供了用于对流式细胞术所使用的在基底上的多种荧光染料缀合物进行干燥的新的干燥缓冲剂。水性缓冲剂包含水溶性单体、蛋白质稳定剂、碳水化合物稳定剂、以及两性离子表面活性剂。当与包含荧光聚合物染料缀合物的多色组混合、在基底上干燥、并用生物样品重构时，所述缓冲剂当与使用不含水溶性单体或两性离子表面活性剂的缓冲剂相比时，提供了荧光聚合物染料缀合物聚集的降低、以及单核细胞和粒细胞非特异性结合的降低。




单体A




单体B

CN 118369581 A

1.用于对基底上的多种染料缀合物进行干燥的缓冲剂组合物,其包含:

水溶性单体;

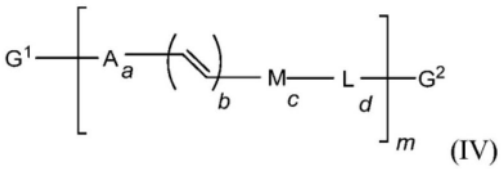
蛋白质稳定剂;

碳水化合物稳定剂;以及

两性离子表面活性剂。

2.根据权利要求1所述的缓冲剂组合物,其中所述多种染料缀合物中的至少一种包含聚合物染料缀合物。

3.根据权利要求2所述的缓冲剂组合物,其中所述聚合物染料缀合物是与荧光聚合物染料缀合的结合配偶体,其具有根据式(IV)的结构:




(IV)

其中:

每个A独立地选自芳族共聚单体和杂芳族共聚单体;

每个L是接头部分;

每个M独立地选自芳族共聚单体、杂芳族共聚单体、带隙改性单体、任选经取代的亚乙基、和亚乙炔基;

$G^1$和$G^2$独立地选自未经修饰的聚合物末端和经修饰的聚合物末端;

a、c和d独立地限定所述结构内每个单元的mol%,所述单元各自可以是均匀或随机重复的,并且其中每个a为10%至100%的mol%,每个c为0至90%的mol%,并且每个d为0至25%的mol%;

每个b独立地是0或1;并且

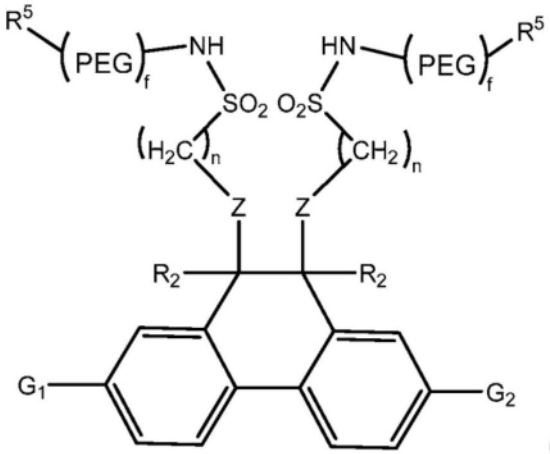
m是1至约10,000的整数。

4.根据权利要求3所述的缓冲剂组合物,其中所述多种染料缀合物包含两种或更多种各自具有根据式(IV)的结构的不同的荧光聚合物染料缀合物。

5.根据权利要求3或4所述的缓冲剂组合物,其中所述水溶性单体是用于制备所述荧光聚合物染料缀合物中的至少一种的单体单元。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的缓冲剂组合物,其中所述水溶性单体是基于二氢菲(DHP)的水溶性单体或基于芴的水溶性单体。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的缓冲剂组合物,其中所述水溶性单体是具有根据式(I)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的水溶性单体:

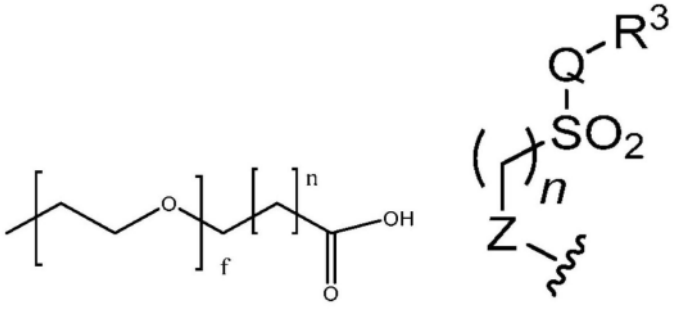


(I)，

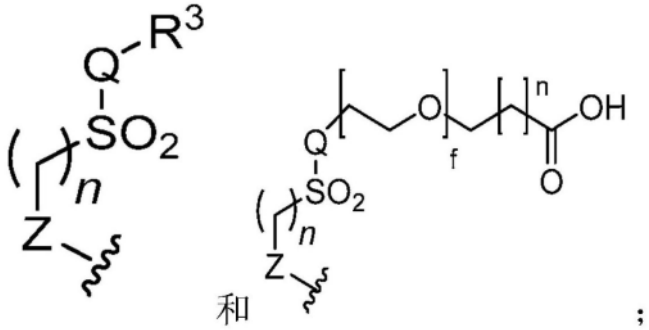
其中

每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢苊(THP)、任选经取代的茚、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、



、



和



；

每个$R^3$是水溶性部分；

每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸和$C_2$-$C_{12}$羧酸酯；

每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$；

每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

每个f独立地是0至50的整数；并且

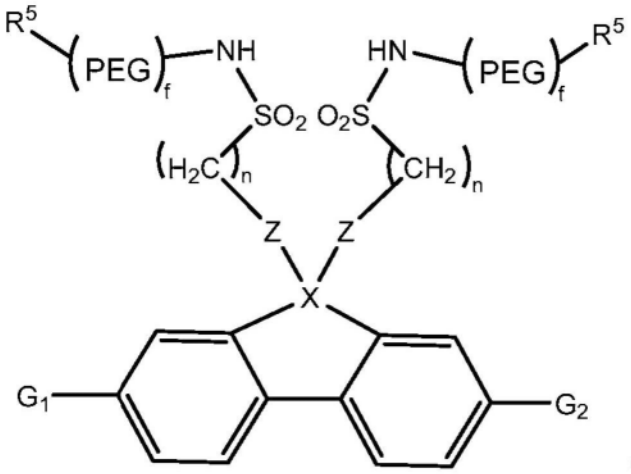
每个n独立地是1至20的整数。

8.根据权利要求7所述的缓冲剂组合物，其中每个$G_1$、$G_2$是卤素；每个Z是O；每个$R_2$是H；

每个$R^5$是H、羟基、$C_1$-$C_6$烷基或$C_1$-$C_6$烷氧基;每个n独立地是2至4;并且每个f独立地是5至20。

9.根据权利要求7或8所述的缓冲剂组合物,其中每个n是3;每个$R^5$是-$OCH_3$;并且每个f是11至12。

10.根据权利要求1至6中任一项所述的缓冲剂组合物,其中所述水溶性单体是具有根据式(II)的化学结构的基于芴的水溶性单体:




(II),

其中

每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢苊(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇;

每个X是C或Si;

每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

每个R5独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基;

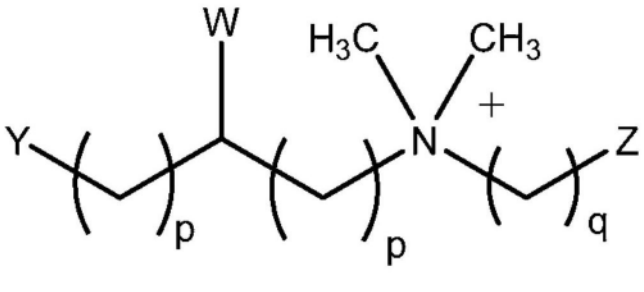
每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$;

每个f独立地是0至50的整数;并且

每个n独立地是1至20的整数。

11.根据权利要求10所述的缓冲剂组合物,其中每个$G_1$、$G_2$是卤素;每个X是C;每个Z是O;每个$R^5$是H、羟基、$C_1$-$C_6$烷基或$C_1$-$C_6$烷氧基;每个n独立地是2至4;并且每个f独立地是5至20。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的缓冲剂组合物,其中所述两性离子表面活性剂具有根据式(XV)的结构:




(XV)，

其中Y＝$CO_2^-$或$SO_3^-$，W＝H或OH，Z＝$CH_3$或NHC(O)R，其中R＝$C_{1-15}$烷基；独立地，每个p＝0或1；并且q＝0至21；任选地，其中W＝H，Z＝$CH_3$，并且q＝11至15。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的缓冲剂组合物，其中所述两性离子表面活性剂选自3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基丙烷磺酸酯(DMMA)、3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯(DMPA)、N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱、和N,N-二甲基-N-十二烷基甘氨酸甜菜碱。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的缓冲剂组合物，其中所述蛋白质稳定剂选自酪蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和明胶。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的缓冲剂组合物，其中所述碳水化合物稳定剂是二糖碳水化合物稳定剂。

16.根据权利要求15所述的缓冲剂组合物，其中所述二糖碳水化合物稳定剂是海藻糖或其水合物，任选地其中所述海藻糖或其水合物是海藻糖二水合物。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的缓冲剂组合物，其还包含一种或更多种选自防腐剂、抗氧化剂、阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂和着色剂的另外的添加剂。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的缓冲剂组合物，其中所述组合物是水性组合物。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的缓冲剂组合物，其pH在pH6.5至7.5或pH 7.0至7.4的范围内。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的缓冲剂组合物，其每次测试包含：

200至800μg的所述水溶性单体；

2000至3000μg的所述碳水化合物稳定剂；

8.4至72μg的所述蛋白质稳定剂；以及

2至9μg的所述两性离子表面活性剂。

21.制备单一反应物膜的方法，所述方法包括：

将液相中的多种染料缀合物一起分配到基底上，所述液相包含根据权利要求1至18中任一项所述的水性缓冲剂组合物，所述多种染料缀合物包含至少一种聚合物染料缀合物；以及

将液相水性缓冲剂中的所述多种染料缀合物一起干燥以在所述基底上形成第一单一反应物膜。

22.根据权利要求21所述的方法，其中所述多种染料缀合物包含两种或更多种聚合物染料缀合物。

23.根据权利要求20或21所述的方法，其中所述基底选自管、孔、膜和珠。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中所述基底包含反应容器的内表面。

25.根据权利要求21至24中任一项所述的方法,其中所述多种染料缀合物包含两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种、十种或更多种、11种或更多种、12种或更多种,或者2至20种、3至18种或4至12种各自包含不同的结合配偶体的不同的染料缀合物。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的方法,其中将所述第一单一反应物膜暴露于液体血液样品的第一等分试样、处理、并通过流式细胞术分析,以获得第一流式细胞术图,

与通过将第二单一反应物膜暴露于所述液体生物样品的第二等分试样、处理、并通过流式细胞术分析而获得的第二流式细胞术图相比,所述第一流式细胞术图表现出以下中的一个或更多个:

单核细胞非特异性结合的降低;

粒细胞非特异性结合的降低;

聚合物染料缀合物非特异性相互作用的降低;以及

聚合物染料缀合物聚集的降低,

其中所述第二单一反应物膜由液相制备,所述液相包含一起干燥以形成所述第一单一反应物膜的相同的多种染料缀合物、以及不含所述水溶性单体并且不含所述两性离子表面活性剂的现有干燥技术试剂缓冲剂。

27.组合物,其包含

多种荧光聚合物染料缀合物;

水溶性单体;

蛋白质稳定剂;

碳水化合物稳定剂;以及

两性离子表面活性剂。

28.根据权利要求27所述的组合物,其为设置在基底上的单一反应物膜的形式。

29.根据权利要求27或28所述的组合物,其每个单一反应物膜包含:

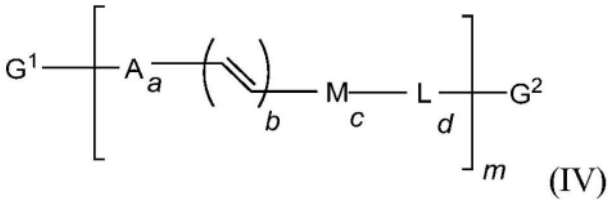
200至800μg的所述水溶性单体;

2000至3000μg的所述碳水化合物稳定剂;

8.4至72μg的所述蛋白质稳定剂;以及

2至9μg的所述两性离子表面活性剂。

30.根据权利要求27至29中任一项所述的组合物,其中所述多种荧光聚合物染料缀合物中的至少一种包含具有根据式(IV)的结构的荧光聚合物染料部分:



(IV)

其中:

每个A独立地选自芳族共聚单体和杂芳族共聚单体;

每个L是接头部分;

每个M独立地选自芳族共聚单体、杂芳族共聚单体、带隙改性单体、任选经取代的亚乙基、和亚乙炔基;

$G^1$和$G^2$独立地选自未经修饰的聚合物末端和经修饰的聚合物末端;

a、c和d独立地限定所述结构内每个单元的mol%,所述单元各自可以是均匀或随机重复的,并且其中每个a为10%至100%的mol%,每个c为0至90%的mol%,并且每个d为0至25%的mol%;

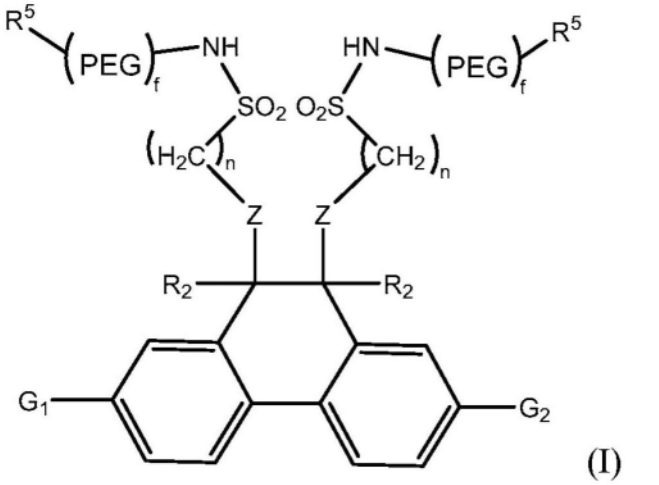
每个b独立地是0或1;并且

m是1至约10,000的整数。

31.根据权利要求27至30中任一项所述的组合物,其中所述水溶性单体是用于制备所述多种荧光聚合物染料中的至少一种的单体单元。

32.根据权利要求27至31中任一项所述的组合物,其中所述水溶性单体是基于二氢菲(DHP)的水溶性单体或基于芴的单体。

33.根据权利要求27至32中任一项所述的组合物,其中所述水溶性单体是具有根据式(I)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的水溶性单体:

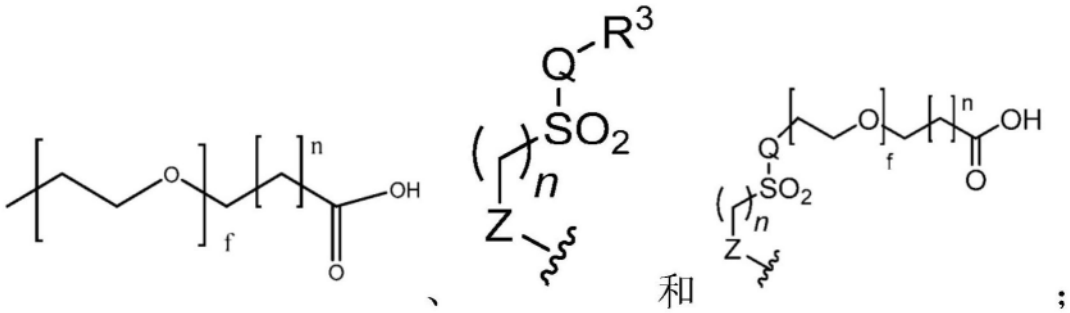



(I),

其中,

每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇;

每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、



和 ；

每个$R^3$是水溶性部分；

每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸和$C_2$-$C_{12}$羧酸酯；

每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$；

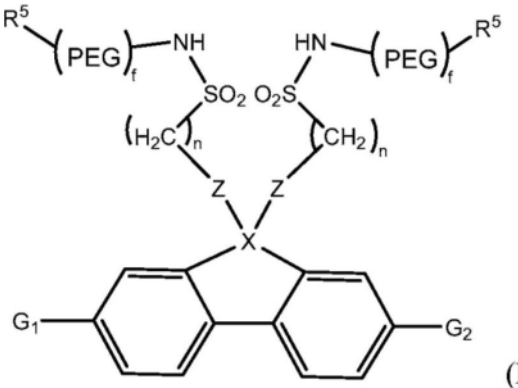
每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

每个f独立地是0至50的整数；并且

每个n独立地是1至20的整数。

34.根据权利要求33所述的组合物，其中$G_1$和$G_2$各自是卤素；每个Z是O；每个$R_2$是H；每个n独立地是2至4；并且每个f独立地是5至20；任选地其中每个n是3；并且每个m是11至12。

35.根据权利要求27至32中任一项所述的组合物，其中所述水溶性单体是具有根据式(II)的化学结构的基于芴的水溶性单体：



(II)，

其中

每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

每个X是C或Si；

每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸

盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

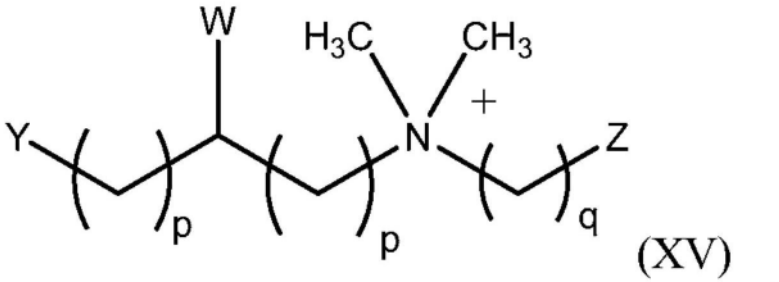
每个R5独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基；

每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

每个f独立地是0至50的整数；并且

每个n独立地是1至20的整数。

36.根据权利要求27至35中任一项所述的组合物，其中所述两性离子表面活性剂具有根据式(XV)的结构：




(XV)，

其中Y＝$CO_2^-$或$SO_3^-$，W＝H或OH，Z＝$CH_3$或NHC(O)R，其中R＝$C_{1-15}$烷基；独立地，每个p＝0或1；并且q＝0至21；任选地，其中W＝H，Z＝$CH_3$，并且q＝11至15。

37.根据权利要求27至36中任一项所述的水性缓冲剂组合物，其中所述两性离子表面活性剂选自3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基丙烷磺酸酯(DMMA)、3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯(DMPA)、N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱、和N,N-二甲基-N-十二烷基甘氨酸甜菜碱。

38.根据权利要求27至37中任一项所述的组合物，其中所述蛋白质稳定剂选自酪蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和明胶。

39.根据权利要求27至38中任一项所述的组合物，其中所述碳水化合物稳定剂是二糖碳水化合物稳定剂。

40.根据权利要求39所述的组合物，其中所述二糖碳水化合物稳定剂是海藻糖或其水合物，任选地其中所述海藻糖或其水合物是海藻糖二水合物。

41.根据权利要求27至40中任一项所述的水性缓冲剂组合物，其还包含一种或更多种选自防腐剂、抗氧化剂、阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂和着色剂的另外的添加剂。

# 用于干燥与聚合物染料缀合的抗体的新的制剂

[0001] 本申请作为PCT国际专利申请于2021年11月12日提交。

## 背景技术

[0002] 多色流式细胞术是使用多种荧光标志物来鉴定和表征目的细胞亚群的快速发展的技术,其允许每秒对数万个细胞进行快速分析。流式细胞术使用抗体染料缀合物以对不同的生物样品(包括全血样品、骨髓和其他生物试样)进行染色。在正常人全血样品中,不同类型的细胞表达不同的标志物,例如T细胞中的CD4和B细胞中的CD20。当使用相互排斥的标志物(仅在一种特定细胞类型中表达的标志物)的反-抗标志物抗体荧光染料缀合物对其进行染色时,来自每种细胞的信号(荧光)在流式细胞仪中被捕获并数字转换以用于分析。

[0003] 多色干燥试剂是包含多种不同抗体染料缀合物的干燥组合混合物,其可用于生物样品的流式细胞术分析。干燥试剂技术(dry reagent technology)用于提高生物分子的稳定性,其允许在室温下储存、简化样品制备、并使用户错误最小化。

[0004] 多色干燥试剂混合物可包含与小分子(例如FITC)、串联(例如PC5.5)或大分子(例如APC)染料(例如CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC、PC5.5等)缀合的数种不同抗体,并可用于对多种生物试样中的细胞进行染色并在流式细胞仪中进行分析。

[0005] 与现有的经典(单体)染料(FITC、PC5.5、APC等)缀合物相比,聚合物染料缀合物在结构和复杂性上不同。聚合物染料结构的刚性有助于降低旋转能量,导致更亮的发射。因此,聚合物染料缀合物特别可用于鉴定和分析几乎不表达受体的细胞。这些亮的聚合物染料可允许检测和分辨暗淡的群体。然而,聚合物染料(例如紫色聚合物染料)由于其固有的疏水性质,倾向于彼此相互作用并形成聚集体。

[0006] 现有干燥技术使得能够在单个管中干燥不同的经典染料缀合物,而不改变功能(对抗原的亲和力)或物理特性(例如亮度和溢出)并在一段时间内稳定。“试剂缓冲剂”(Reagent Buffer,RB)是包含牺牲蛋白(sacrificial protein)、碳水化合物稳定剂、抗微生物剂和缓冲剂的现有技术制剂,其先前开发用于在不改变功能(对抗原的亲和力)或物理特性(例如亮度或荧光)的情况下在单个管中干燥不同的单体染料缀合物。“物理特性”是指荧光染料缀合物的亮度及其到其他通道中的溢出。例如,当使用现有干燥技术进行干燥并用于对生物试样进行染色时,表现出了使用CD4-PE染料缀合物的期望的流式细胞术结果。如图1A中所示,表现出了CD4 PE+单核细胞和CD4 PE+淋巴细胞的细胞群体的期望的功能、物理特性和分辨率。类似地,当使用现有技术进行干燥并用血液样品重构时,表现出了CD20 APC染料缀合物的期望的流式细胞术结果。如图1B中所示,表现出了CD20 APC+细胞群体的期望的功能、物理特性和流式细胞术分辨率。

[0007] 当使用试剂缓冲剂的现有干燥技术用于对在管中的两种聚合物染料抗体缀合物进行干燥时,它不能阻止聚合物染料缀合物之间的非特异性相互作用,从而导致聚集。一般而言,当使用现有干燥技术对两种或更多种聚合物染料抗体缀合物进行干燥时,它们倾向于彼此相互作用,导致不期望的结果。聚集导致其他通道中无法纠正的假阳性群体。该问题在图2A和图2B中示出。

[0008] 图2A示出了CD20-605和CD4-786聚合物染料抗体缀合物在混合并使用现有干燥技术进行干燥时的不期望的流式细胞术结果。无法求解x轴和y轴上的群体被假定为溢出问题。然而,即使在溢出校正之后,群体也没有求解(图2B)。

[0009] 图2B示出了CD20-605和CD4-786聚合物染料抗体缀合物在混合并使用具有溢出校正的现有干燥技术进行干燥时的不期望的流式细胞术结果。当使用现有干燥技术对两种聚合物染料抗体缀合物进行干燥时,无法将群体校正到其相应的荧光通道被认为是由于聚合物染料抗体缀合物的聚集。

[0010] 存在对新的缓冲剂制剂的需要,所述缓冲制剂可以保持聚合物染料抗体缀合物的稳定并在干燥和重构过程时避免聚集,允许改善功能、物理特性和流式细胞术分辨率。

## 发明内容

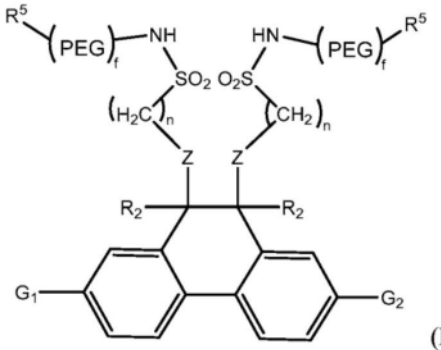
[0011] 提供了用于对基底上的多种染料缀合物进行干燥的新的缓冲剂组合物。染料缀合物可包含荧光染料缀合物。荧光染料缀合物可以是荧光染料和结合配偶体(例如抗体)的缀合物。荧光染料缀合物可以是与结合配偶体(例如抗体)缀合的荧光聚合物染料。荧光染料缀合物可以用于流式细胞术。缓冲剂组合物包含水溶性单体、蛋白质稳定剂、碳水化合物稳定剂、和两性离子表面活性剂。当缓冲剂组合物与包含两种或更多种荧光染料缀合物的多色荧光染料缀合物组混合、在基底上干燥、并用生物试样重构时,所述缓冲剂当与使用不含蛋白质稳定剂、水溶性单体或两性离子表面活性剂的缓冲剂相比时,提供了荧光染料缀合物聚集的降低。在一些情况下,缓冲剂组合物当与使用不含蛋白质稳定剂、单体或两性离子表面活性剂的缓冲剂相比时,还提供了染料与单核细胞非特异性结合的降低和/或染料与粒细胞非特异性结合的降低。

[0012] 在一些实施方案中,本公开内容提供了组合物,其包含组中的多种荧光染料缀合物。在存在适当缓冲剂的情况下,组中的多种荧光染料缀合物可用于鉴定细胞亚群。在不存在适当缓冲剂的情况下,荧光染料缀合物可彼此相互作用,并导致染色伪影,这可影响数据解释。

[0013] 提供了用于对基底上的多种染料缀合物进行干燥的缓冲剂组合物,其包含:水溶性单体;蛋白质稳定剂;碳水化合物稳定剂;和两性离子表面活性剂。多种染料结合配偶体缀合物中的至少一种、至少两种或至少三种可包含荧光聚合物染料部分。

[0014] 水溶性单体可以是包含芳基部分或杂芳基部分的单体单元,其各自任选地具有与其连接的水溶性部分。水溶性部分可以是一个或更多个聚(乙二醇)部分。水溶性单体可适用于制备具有单体A亚基、单体B亚基或单体A和单体B亚基的组合的多种荧光聚合物染料中的至少一种。水溶性单体可以是基于二氢菲(DHP)的水溶性单体。水溶性单体可以是基于芴的水溶性单体。

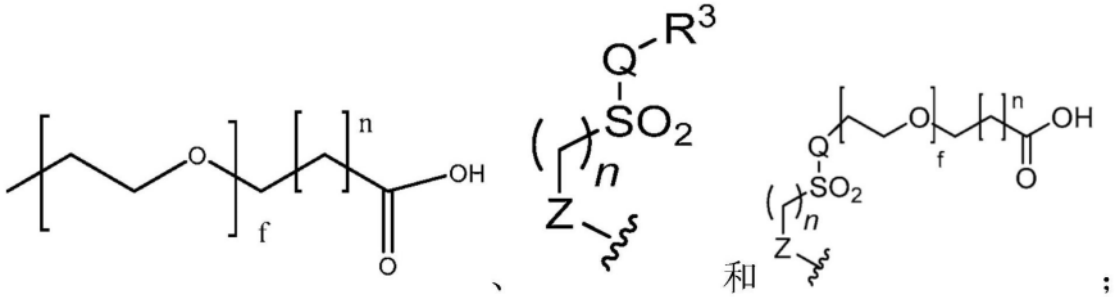
[0015] 水溶性单体可以是具有根据式(I)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的单体:

[0016] 
(I)，

[0017] 其中

[0018] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

[0019] 每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、

[0020] 
、 和 ；

[0021] 每个$R^3$是水溶性部分；

[0022] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

[0023] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基；

[0024] 每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$；

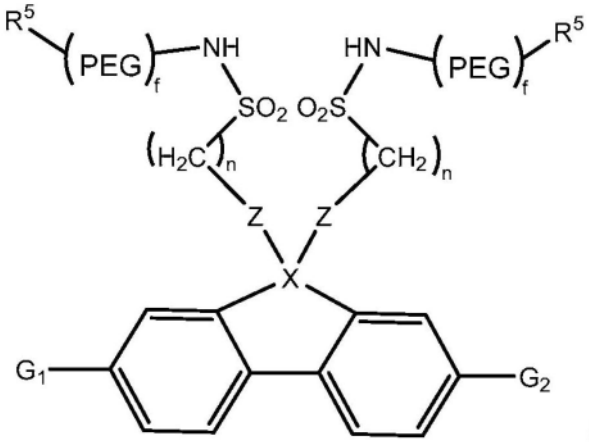
[0025] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

[0026] 每个f独立地是0至50的整数；并且

[0027] 每个n独立地是1至20的整数。

[0028] 在一些实施方案中，每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素(F、Cl、Br、I)、$C_1$-$C_6$烷基和PEG。

[0029] 水溶性单体可以是具有根据式(II)的化学结构的基于芴的单体：

[0030] 

(II)，

[0031] 其中

[0032] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、炔烃、氢、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

[0033] 每个X是C或Si；

[0034] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

[0035] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基；

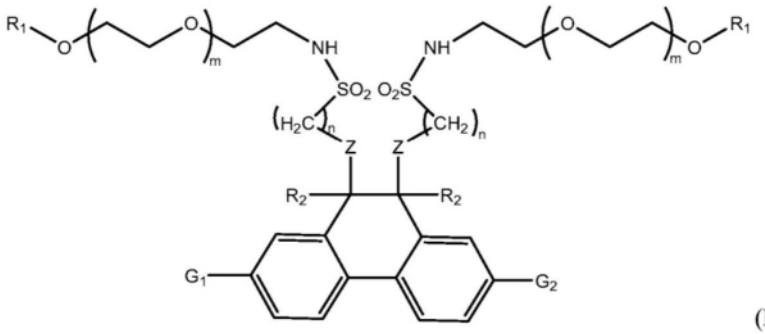
[0036] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

[0037] 每个f独立地是0至50的整数；并且

[0038] 每个n独立地是1至20的整数。

[0039] 在一些实施方案中，每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素(F、Cl、Br、I)、$C_1$-$C_6$烷基和PEG。

[0040] 水溶性单体可以是具有根据式(III)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的单体：

[0041] 

(III)，

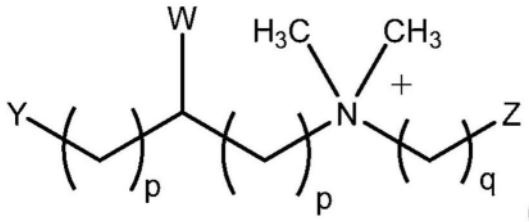
[0042] 其中每个$G_1$、$G_2$独立地是卤素(F、Cl、Br、I)；每个Z独立地选自O、$CH_2$和NH；每个$R_1$独立地是烷基($C_1$-$C_3$)；每个$R_2$独立地是H、烷基($C_1$-$C_6$)；每个n独立地是1至6；并且每个m独立地

是5至50。在一些实施方案中,$G_1$、$G_2$各自是Br;每个Z是O;每个$R_1$是$CH_3$;每个$R_2$是H;每个n独立地是2至4;并且每个m独立地是5至20。在一些实施方案中,每个n是3;并且每个m是11或12。

[0043] 蛋白质稳定剂可选自酪蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)和明胶中的一种或更多种。

[0044] 碳水化合物稳定剂可以是二糖碳水化合物稳定剂。二糖碳水化合物稳定剂可以是海藻糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖或蜜二糖、或其水合物。在一些具体实施方案中,二糖碳水化合物稳定剂可以是海藻糖或其水合物。碳水化合物稳定剂可以是海藻糖二水合物。

[0045] 两性离子表面活性剂可包含根据式(XV)的结构:

[0046] 

(XV),

[0047] 其中Y=$CO_2^-$或$SO_3^-$,W=H或OH,Z=$CH_3$或NHC(O)R,其中R=$C_{1-15}$烷基;独立地,每个p=0或1;并且q=0至21;任选地,其中W=H,Z=$CH_3$,并且q=11至15。

[0048] 两性离子表面活性剂可选自3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基丙烷磺酸酯(DMMA)、3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯(DMPA)、N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱、和N,N-二甲基-N-十二烷基甘氨酸甜菜碱。

[0049] 任选地,缓冲剂组合物可包含一种或更多种、两种或更多种或者三种或更多种另外的添加剂,所述另外的添加剂选自防腐剂、抗氧化剂、阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂和着色剂。

[0050] 缓冲剂组合物的pH可以在pH 6.5至7.5的范围内。在一些情况下,水性缓冲剂组合物的pH可以在pH 7.0至7.4的范围内。

[0051] 缓冲剂组合物每次测试可包含:200至800μg的单体;2000至3000μg的碳水化合物稳定剂;8.4至72μg的蛋白质稳定剂;和2至15μg的两性离子表面活性剂。

[0052] 缓冲剂组合物每次测试可包含:300至600μg的单体;2200至2800μg的碳水化合物稳定剂;15至20μg的蛋白质稳定剂;和8至12μg的两性离子表面活性剂。

[0053] 在一些实施方案中,缓冲剂组合物可包含多种荧光染料缀合物。在一些实施方案中,缓冲剂组合物可包含多种荧光聚合物染料缀合物。荧光聚合物染料缀合物各自根据本公开内容可包含根据式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)和/或式(XIV)的结构。

[0054] 在另一些实施方案中,水性缓冲剂组合物不包含多种荧光染料缀合物。在另一些实施方案中,水性缓冲剂组合物不包含任何荧光染料缀合物。

[0055] 提供了制备单一反应物膜的新的方法,该方法包括将液相中的多种反应物一起分配到基底上,所述液相包含根据本公开内容的缓冲剂组合物,多种反应物包含第一反应物和第二反应物,第一反应物包含与第一染料缀合的第一结合配偶体,其中第一染料包含荧光聚合物染料;第二反应物包含与第二染料缀合的第二结合配偶体;以及将液相水性缓冲剂中的第一反应物和第二反应物一起干燥以在基底上形成第一单一反应物膜。第二染料可

以是荧光聚合物染料。单一反应物膜可以是包含多种反应物的均匀膜。多种反应物可包含两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种、10种或更多种、11种或更多种、或者12种或更多种反应物，或者2至20种、3至18种或4至12种各自包含不同的结合配偶体染料缀合物的不同反应物。染料可以是荧光染料。荧光染料可以是荧光聚合物染料。例如，每种反应物可以是独特的荧光染料缀合物。多种反应物可包含两种或更多种独特的荧光聚合物染料缀合物。基底可以是管、孔、膜或珠。基底可包含反应容器的内表面。

[0056] 本公开内容提供了单一反应物膜，其为包含通过本公开内容的新的方法制备的多种反应物的均匀膜。当与通过将包含第一反应物和第二反应物的第二单一反应物膜暴露于液体生物样品的第二等分试样、处理并通过流式细胞术分析而获得的第二流式细胞术图相比时，在单一反应物膜暴露于液体生物样品的第一等分试样、处理并通过流式细胞术分析之后，单一反应物膜将提供第一流式细胞术图，其表现出以下的一个或更多个：单核细胞非特异性结合的降低；粒细胞非特异性结合的降低；荧光染料缀合物非特异性相互作用的降低；荧光染料缀合物聚集的降低，其中第二单一反应物膜是用不含水溶性单体并且不含两性离子表面活性剂的现有技术的液相制备的。荧光染料缀合物可以是荧光聚合物染料缀合物。

[0057] 根据本公开内容的缓冲剂组合物使得能够在单个管中干燥不同的荧光染料缀合物，以提供均匀的膜，而不改变功能(即对分析物的亲和力)和物理特性(例如亮度或荧光)，同时避免聚集和随后的假阳性群体进入到其他通道中。

## 附图说明

[0058] 图1A示出了当使用现有干燥技术试剂缓冲剂干燥时CD4-PE缀合物的流式细胞术密度图。显示出了期望的功能(对抗原的亲和力)、物理特性(例如亮度或荧光)和细胞群体的分辨率。

[0059] 图1B示出了当使用现有干燥技术试剂缓冲剂干燥时CD20-APC缀合物的流式细胞术密度图。显示出了期望的功能(对抗原的亲和力)和物理特性(例如亮度或荧光)以及细胞群体的分辨率。

[0060] 图2A示出了当在不存在补偿的情况下混合并使用现有干燥技术试剂缓冲剂进行干燥时CD20-SNv605和CD4-SNv786聚合物染料缀合物的流式细胞术二维点图。显示出了不期望的结果和无法求解x轴和y轴上的群体。

[0061] 图2B示出了当在存在补偿的情况下混合并使用现有干燥技术试剂缓冲剂进行干燥时CD20-SNv605和CD4-SNv786聚合物染料缀合物的流式细胞术结果。当使用现有干燥技术对两种聚合物染料进行干燥时，无法补偿群体被认为是由于聚合物染料抗体缀合物的聚集。

[0062] 图3A示出了在不存在补偿的情况下在具有稳定剂(DM2+S)DM缓冲剂的DM2中干燥的CD20-SNv605和CD4-SNv786聚合物染料缀合物的流式细胞术二维点图。在780荧光通道中观察到610荧光通道的溢出。

[0063] 图3B示出了在存在补偿的情况下在本发明的DM缓冲剂DM2+S中干燥的CD20-SNv605和CD4-SN v 786聚合物染料缀合物的流式细胞术二维点图。DM2+SDM缓冲剂可以在

不存在任何非特异性相互作用的情况下求解细胞群体。

[0064] 图4示出了代表性单体A和单体B的化学结构。

[0065] 图5示出了使用CD20-SNv605对DM中酪蛋白进行剂量滴定以测量百分比募集并表明非特异性事件的降低的流式细胞术图。

[0066] 图6示出了在单体A浓度为200μg/测试(上图)和400μg/测试(下图)下进行3色测试的干燥制剂的二维荧光点图。在单体A为400μg/测试下观察到群体扩散降低。

[0067] 图7A示出了剂量优化的DMMA的散射(scatter)特性的流式图。图7A示出了未经染色的(左上)、单独的干燥DM(从左起第二,上图)、DM中的干燥DMMA 0.004％(从左起第三,上图)、DM中的干燥DMMA 0.008％(右上图)、DM中的干燥DMMA 0.018％(左下图)、DM中的干燥DMMA 0.021％(中下图)和DM中的干燥DMMA 0.03％(右下图)。与其他DMMA浓度相比,在0.004％和0.008％下的DMMA显示出更少的非特异性中性粒细胞拉出(由箭头指示)。

[0068] 图7B示出了剂量优化的在DM中的DMMA的所有制剂的CD20-SNv605点图,包括未经染色的(左上)、单独的干燥DM(从左起第二,上图)、DM中的干燥DMMA 0.004％(从左起第三,上图)、DM中的干燥DMMA 0.008％(右上图)、DM中的干燥DMMA 0.018％(左下图)、DM中的干燥DMMA 0.021％(中下图)和DM中的干燥DMMA 0.03％(右下图)。与DM和其他DMMA浓度相比,在0.004％、0.008％和0.018％下的DMMA显示出在610通道中更少的非特异性单核细胞拉出(由箭头指示)。

[0069] 图7C示出了剂量优化的在DM中的DMMA的所有制剂的HLADR-786点图,包括未经染色的(左上)、单独的干燥DM(从左起第二,上图)、DM中的干燥DMMA 0.004％(从左起第三,上图)、DM中的干燥DMMA 0.008％(右上图)、DM中的干燥DMMA 0.018％(左下图)、DM中的干燥DMMA 0.021％(中下图)和DM中的干燥DMMA 0.03％(右下图)。

[0070] 图7D示出了单独的干燥DM(左上图)、DM中的干燥DMMA 0.004％(中上图)、DM中的干燥DMMA 0.008％(右上图)、DM中的干燥DMMA 0.018％(左下图)、DM中的干燥DMMA 0.021％(中下图)和DM中的干燥DMMA 0.03％(右下图)的CD20-605和HLADR-786二维点图。

[0071] 图8A示出了添加剂与0.008％ DMMA的组合的散射特性的流式图,包括未经染色的(左上)、干燥DM(从左起第二,上图)、DMMA 0.008％(右上)、DMMA 0.008％+酪蛋白2.5×(左下)、DMMA 0.008％+Prionex2稀释液(中下图)和DMMA 0.008％+Prionex 3稀释液(右下)。除了示出非特异性粒细胞和单核细胞拉出(如用箭头指示)的DM之外,每种组合的散射特性看起来相似。

[0072] 图8B示出了添加剂与0.008％ DMMA的组合的CD20-SNv605点图,包括单一CD20(左上)、干燥DM(从左起第二,上图)、DMMA 0.008％(右上)、DMMA 0.008％+酪蛋白2.5×(左下)、DMMA 0.002％+Prionex2稀释液(中下图)和DMMA 0.008％+Prionex 3稀释液(右下)。

[0073] 图8C示出了添加剂与0.008％ DMMA的组合的HLADR-786点图,包括单一HLADR(左上)、干燥DM(从左起第二,上图)、DMMA 0.008％(右上)、DMMA 0.008％+酪蛋白2.5×(左下)、DMMA 0.008％+Prionex2稀释液(中下图)和DMMA 0.008％+Prionex 3稀释液(右下)。在所有与0.008％ DMMA的组合中,与各自的液体单一物相比,发现HLADR+的％募集是相似的。

[0074] 图8D示出了添加剂与0.008％ DMMA的组合的CD20-SNv 605和HLADR-786二维点图,包括干燥DM(左上图)、DMMA 0.008％(右上)、DMMA 0.002％+酪蛋白2.5×(左下)、DMMA

0.008％+Prionex 2稀释液(中下图)和DMMA 0.008％+Prionex 3稀释液(右下)。在所有与0.008％DMMA的组合中,与DM相比,发现双阳性群体的％募集是相似的。

[0075] 图9示出了测试组DM2+S、海藻糖+单体、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+DMMA(从左到右,上图),DM2+S、DM2+S不含单体、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白(从左到右,下图)中每一者中的干燥管的物理外观和特性。在此,DM2+S用作对照组。物理观察结果表明,在不含单体的情况下,干燥膜的颜色发生变化(通常红色膜变成浅橙色至棕色)。在不含酪蛋白和DMMA的组中观察到膜收缩。与DM2+S相比,在不含DMMA的管中没有观察到干燥膜外观的变化。然而,不含酪蛋白的管示出了干燥膜的边际收缩。

[0076] 图10A示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD56-SNv428的侧向散射SSC vs FL图。当酪蛋白和DMMA不存在时,存在非特异性单核细胞拉出(用箭头指示)。单体的不存在导致淋巴细胞中阴性群体的扩散(用箭头指示)。阴性群体的扩散主要归因于在不存在单体和酪蛋白的情况下SN染料之间的非特异性相互作用。

[0077] 图10B示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD20-SNv605的侧向散射SSC vs FL图。当酪蛋白不存在时,存在非特异性单核细胞拉出(用箭头指示)。单体的不存在导致淋巴细胞中阴性群体的扩散(用箭头指示)。阴性群体的扩散主要归因于在不存在单体和酪蛋白的情况下SN染料之间的非特异性相互作用。

[0078] 图10C示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD4-SNv786的侧向散射SSC vs FL图。单体的不存在导致淋巴细胞中阴性群体的扩散(用箭头指示)。

[0079] 图10D示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD56-SNv428 vs CD20-SNv605的二维流式图。单体和酪蛋白的不存在导致SN群体之间的非特异性相互作用/群体扩散(用箭头指示)。该图示出,单体和酪蛋白二者对阻止非特异性相互作用都是重要的。

[0080] 图10E示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD4-SNv786 vs CD20-SNv605的二维流式图。单体和酪蛋白的不存在导致SN群体之间的非特异性相互作用/群体扩散(用箭头指示)。该图说明,单体和酪蛋白二者对阻止非特异性相互作用都是重要的。

[0081] 图10F示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、海藻糖+DMMA、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD4-SNv786 vs CD56-SNv428的二维流式图。单体和酪蛋白的不存在导致SN群体之间的非特异性相互作用/群体扩散(用箭头指示)。因此单体和酪蛋白二者对阻止非特异性相互作用都是重要的。

[0082] 图11A示出了用本发明的DM2+S干燥缓冲剂在混合物中干燥并用血液样品重构的三种聚合物染料缀合物CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786(包括设门CD45-APC-A750)的代表性SSC vs FL重叠(overlay)流式图。在第二组中,使用市售BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂制备相同抗体的液体混合物。与DM2+S干燥管相比,BD Horizon™

Brilliant染色缓冲剂导致非特异性粒细胞和单核细胞拉出(用箭头指示)。

[0083] 图11B示出了用本发明的DM2+S干燥缓冲剂干燥并用血液样品重构的三种聚合物染料抗体缀合物CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786的代表性二维重叠流式图。在第二组中,使用市售BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂制备相同抗体的液体混合物。当与DM2+S相比时,BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂在SN缀合物的所有组合中导致非特异性淋巴细胞拉出(例如,CD56和CD20中的非特异性淋巴细胞拉出)。

[0084] 图12示出了DM2+S缓冲剂干燥管在6个月久(6-months old)、打开袋时的照片。

[0085] 图13A示出了新鲜、3个月久和6个月久的DM2+S干燥管的6个月稳定性。示出了三个批次中的每个批次中SN染料的不同组合的代表性二维重叠流式图。干燥管含有12种不同的结合配偶体染料缀合物;即12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))。这些批次在一台流式细胞仪仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。本研究使用了方案和方法中提到的染色-裂解-洗涤方案。这些重叠示出了,3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外,在所有测试供体中的6个月久的批次中,未观察到非特异性相互作用或群体扩散。

[0086] 图13B示出了与3个月和新鲜批次相比,DM2+S干燥管的6个月稳定性:所有三个批次中SN vs经典组合的代表性二维重叠流式图。含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))的干燥管在一台流式细胞术仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。CD3 ECD-A vs CD20紫色610-A(左图)、CD8 KO525-A vs CD4紫色780-A(中间图)和CD45 APC-A750-A vs CD56PB450-A(右图)的6个月久和3个月久的批次与新鲜批次的重叠流式图示出,3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外,在所有测试供体中的6个月久的批次中,未观察到非特异性相互作用或群体扩散。

[0087] 图13C示出了与3个月和新鲜批次相比,DM2+S干燥管的6个月稳定性:所有三个批次中经典vs经典组合的代表性二维重叠流式图。含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))的干燥管在一台流式细胞术仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。CD16 FITC-A vs CD25PE-A(左图)、CD8KO525-A vs CD45APC-A750-A(中间图)和CD3 ECD-A vs CD10APC-A(右图)的6个月久和3个月久的批次与新鲜批次的重叠示出了,3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外,在所有测试供体的6个月久的批次中,未观察到非特异性相互作用或群体扩散。

## 具体实施方式

[0088] 本公开内容提供了当一起干燥时使两种或更多种染料缀合物的聚集最小化的组合物和方法。提供了干燥缓冲剂组合物,其有助于维持荧光染料缀合物的混合物中荧光染料结构的完整性、降低聚集、并降低非特异性相互作用和染色伪影。例如,当一起干燥时或在重构期间,干燥缓冲剂组合物可用于降低或阻止两种或更多种荧光聚合物染料缀合物的聚集。

[0089] 荧光染料缀合物之间的聚集可发生在液体混合物中、或在对荧光染料缀合物的混合物进行干燥时、或在重构期间。本发明通过提供干燥缓冲剂组合物来解决该问题,以降低或避免聚集,例如,使得荧光聚合物染料缀合物在干燥期间不相互作用。在重构时,荧光染料缀合物可以独立地与待分析的液体样品中的靶分析物结合,并且显著减少或消除由聚集

或交联引起的错误结果。

[0090] 已经开发出了新的干燥缓冲剂,其可以降低或消除荧光染料的非特异性相互作用,并且也不阻碍荧光染料缀合物与目的抗原的天然结合能力。

[0091] 图2B和图3B示出了使用(图2B)现有干燥技术和(图3B)本发明的干燥("DM")缓冲剂DM2+S管干燥并根据实施例1处理的CD20-605和CD4-786聚合物染料缀合物的比较流式细胞术点图。图2B示出了使用现有干燥技术进行干燥的聚合物染料缀合物不能求解细胞群体,而图3B示出了本发明的DM缓冲剂DM2+S可以求解细胞群体而没有任何非特异性相互作用。

[0092] 定义

[0093] 本文中使用的以下术语及其变体具有以下给出的含义,除非其中使用这样的术语的上下文明确意指不同的含义。

[0094] 除非上下文另外明确指出,否则没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。

[0095] 术语"和/或"是指并涵盖一个或更多个相关列出项的任何和所有可能的组合。

[0096] 当提及可测量值(例如化合物的量、剂量、时间、温度等)时,术语"约/大约"意指涵盖指定量的10%、5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化,以及用于测量该值的测试方法中的至少行业标准变化。

[0097] 术语"患者"、"对象"包括但不限于人,该术语还可涵盖其他哺乳动物、或者家养动物或外来动物,例如,狗、猫、雪貂、兔、猪、马、牛、鸟类或爬行动物。

[0098] 除非另有说明,否则术语短语"室温"是指18℃至27℃。

[0099] 除非另有说明,否则术语"百分比"或"%"是指重量百分比。

[0100] 术语"经活化酯"或"活化酯"本身或作为另一取代基的一部分是指肽化学中用于促进羧基与氨基酸衍生物的游离氨基容易地缩合的羧基活化基团。这些羧基活化基团的描述可见于肽化学的普通教科书;例如K.D.Kopple,"Peptides and Amino Acids",W.A.Benjamin,Inc.,New York,1966,第50至51页,和E.Schroder and K.Lubke,"The Peptides";Vol.1,Academic Press,New York,1965,第77至128页。

[0101] 本文中使用的术语"酰基"是指包含羰基部分的基团,其中所述基团通过羰基碳原子键合。羰基碳原子与氢键合而形成"甲酰基"基团,或与另一个碳原子键合,其可以是烷基、芳基、芳基烷基环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基等的一部分。酰基可包含0至约12个、0至约20个、或0至约40个另外的碳原子,所述碳原子与羰基键合。酰基可包含本文含义内的双键或三键。酰基任选地还可包含本文含义内的杂原子。酰基的一些实例包括但不限于烟酰基(吡啶基-3-羰基)乙酰基、苯甲酰基、苯乙酰基、吡啶基乙酰基、肉桂酰基和丙烯酰基等。当包含与羰基碳原子键合的碳原子的基团包含卤素时,所述基团称为"卤代酰基"。一个实例是三氟乙酰基。

[0102] 术语"醛"本身或作为另一取代基的一部分是指具有-CHO基团的化合物。

[0103] 术语"烯烃"或"烯基"本身或作为另一取代基的一部分是指在两个碳原子之间具有至少一个双键的直链、支链或环状烃。烯基的一些实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、异戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,3-己二烯基、1,4-己二烯基、1,5-

己二烯基、2,4-己二烯基或1,3,5-己三烯基。烯基通常是一价的,但也可以是二价的,例如当烯基将两个部分连接在一起时。

[0104] 术语“烷氧基”本身或作为另一取代基的一部分是指如上定义的烷基,其具有将烷基与连接点连接的氧原子。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基可进一步被本文所述的多种取代基取代。例如,烷氧基可被卤素取代以形成“卤代-烷氧基”基团。

[0105] 术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指具有所示碳原子数的直链或支链饱和脂族基团。烷基可以是任选地经取代的烷基。例如,$C_1$-$C_6$烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。另一些烷基包括但不限于庚基、辛基、壬基、癸基等。烷基可包含任意数目的碳,例如1至2、1至3、1至4、1至5、1至6、1至7、1至8、1至9、1至10、2至3、2至4、2至5、2至6、3至4、3至5、3至6、4至5、4至6和5至6的碳。烷基通常是一价的,但也可以是二价的,例如当烷基将两个部分连接在一起时。

[0106] 术语“炔烃”或“炔基”本身或作为另一取代基的一部分是指在两个碳原子之间具有至少一个三键的直链或支链烃。炔基的一些实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、丁二炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、异戊炔基、1,3-戊二炔基、1,4-戊二炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、1,3-己二炔基、1,4-己二炔基、1,5-己二炔基、2,4-己二炔基或1,3,5-己三炔基。炔基通常是一价的,但也可以是二价的,例如当炔基将两个部分连接在一起时。

[0107] 术语“分析物”是指样品中的分子、化合物或其他成分。分析物可包括但不限于肽、蛋白质、多核苷酸、有机分子、糖和其他碳水化合物以及脂质。

[0108] 本文中使用的术语“胺”本身或作为另一取代基的一部分是指具有一个或更多个氨基的如本文所定义的烷基。氨基可以是伯、仲或叔氨基。烷基胺可进一步被羟基取代。可用于本公开内容的胺包括但不限于乙胺、丙胺、异丙胺、乙二胺和乙醇胺。氨基可将烷基胺与化合物的剩余部分(rest)的连接点连接,位于烷基的ω位置,或者将烷基的至少两个碳原子连接在一起。本领域技术人员将理解,其他烷基胺可用于本公开内容。

[0109] 术语“氨基”是指以下形式的取代基:$-NH_2$、-NHR、$-NR_2$、$-NR_3^+$,其中每个R是独立选择的;以及每个的质子化形式,除了$-NR_3^+$之外,其不能被质子化。因此,任何被氨基取代的化合物都可被视为胺。在本文含义内的“氨基”可以是伯氨基、仲氨基、叔氨基或季氨基。“烷基氨基”包括单烷基氨基、二烷基氨基和三烷基氨基。

[0110] 术语“酰胺”是指具有与胺基连接的羰基的官能团,其具有通式RC(=O)NR'R",其中R、R'和R"表示有机基团或氢原子。术语“酰胺基”是指含有酰胺基的取代基。

[0111] 术语“铵”本身或作为另一取代基的一部分是指具有式$NHR_3^+$的阳离子,其中每个R基团独立地为氢或者经取代或未经取代的烷基、芳基、芳基烷基或烷氧基。优选地,每个R基团为氢。

[0112] 术语“抗体”是指与分析物特异性结合的免疫球蛋白或者其片段或衍生物。抗体包含多种类别和同种型的免疫球蛋白,例如IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgM。抗体片段包含分子,例如Fab、scFv、F(ab')2和Fab'分子。抗体衍生物包括具有添加或替换的抗体或其片段,例如嵌合抗体。抗体可通过重组方法或本领域已知的任何其他方式来源于人或动物来源、来源于杂交瘤。

[0113] 术语“芳基烷基”是指本文所定义的烷基,其中烷基的氢键或碳键被如本文所定义的芳基的键替代。代表性的芳基烷基包括苄基和苯乙基以及稠合的(环烷基芳基)烷基,例如4-乙基-茚满基。芳烯基是如本文所定义的烯基,其中烷基的氢键或碳键被如本文所定义的芳基的键替代。

[0114] 术语“芳基”本身或作为另一取代基的一部分是指芳环集合体中不包含杂原子的环状芳族烃基。“芳基”可以是含有6至16个环碳原子的单环或稠合双环、三环或更大的芳环集合体。例如,芳基可以是但不限于苯基、萘基、庚搭烯基(heptalenyl)、联苯基、引达省基(indacenyl)、芴基、菲基(phenanthrenyl)、三亚苯基、苊基、并四苯基(naphthacenyl)、䓛基、亚联苯基、蒽基、苉基或荼基。“亚芳基”意指来源于芳基的二价基团。芳基可被选自烷基、烷氧基、芳基、羟基、卤素、氰基、氨基、氨基-烷基、三氟甲基、亚烷基二氧基和氧-$C_2$-$C_3$-亚烷基中的一个、两个或三个基团单取代、二取代或三取代;所有这些任选地被进一步取代,例如如上文所限定的;或者芳基可以是1-或2-萘基;或者1-或2-菲基。亚烷基二氧基是与苯基的两个相邻碳原子连接的二价取代基,例如亚甲基二氧基或亚乙基二氧基。氧-$C_2$-$C_3$-亚烷基也是与苯基的两个相邻碳原子连接的二价取代基,例如氧亚乙基或氧亚丙基。氧-$C_2$-$C_3$-亚烷基-苯基的一个实例是2,3-二氢苯并呋喃-5-基。

[0115] 术语“芳氧基”本身或作为另一取代基的一部分是指O-芳基,其中芳基如上定义。芳氧基可以是未经取代的或被一个或两个合适的取代基取代的。术语“苯氧基”是指芳氧基,其中芳基部分是苯环。本文中使用的术语“(杂)芳氧基”意指-O-杂芳基,其中杂芳基定义如下。术语“(杂)芳氧基”用于表示所述部分是芳氧基或杂芳氧基。

[0116] 术语“杂芳基”本身或作为另一取代基的一部分是指包含5至16个环原子的单环或稠合双环或三环芳环集合体,其中1至4个环原子为杂原子,各自是N、O或S。例如,杂芳基包括吡啶基、吲哚基、吲唑基、喹喔啉基、喹啉基、异喹啉基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、呋喃基、吡咯基、噻唑基、苯并噻唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基或任何其他经取代的基团,尤其是被例如烷基、硝基或卤素单取代或双取代的基团。吡啶基表示2-、3-或4-吡啶基,有利地是2-或3-吡啶基。噻吩基表示2-或3-噻吩基。喹啉基优选地表示2-、3-或4-喹啉基。异喹啉基优选地表示1-、3-或4-异喹啉基。苯并吡喃基、苯并噻喃基(benzothiopyranyl)优选地分别表示3-苯并吡喃基或3-苯并噻喃基。噻唑基优选地表示2-或4-噻唑基,并且最优选地,4-噻唑基。三唑基优选地是1-、2-或5-(1,2,4-三唑基)。四唑基优选地是5-四唑基。

[0117] 在一些实施方案中,杂芳基是吡啶基、吲哚基、喹啉基、吡咯基、噻唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基、呋喃基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、异喹啉基、苯并噻吩基、噁唑基、吲唑基或任何经取代的基团,尤其是单取代的或双取代的基团。

[0118] 在一些实施方案中,芳基和杂芳基的取代基是不同的,并且选自:-卤素、

[0119] -OR′,-OC(O)R′,-NR′R″,-SR′,-R′,-CN,-$NO_2$,-$CO_2$R′,-CONR′R″,-C(O)R′,-OC(O)NR′R″,-NR″C(O)R′,-NR″C$(O)_2$R′,-NR′-C(O)NR″R‴,-NH-C$(NH_2)$=NH,-NR′C$(NH_2)$=NH,-NH-C$(NH_2)$=NR′,-S(O)R′,-S$(O)_2$R′,-S$(O)_2$NR′R″,-$N_3$,-CH$(Ph)_2$、

[0120] 全氟($C_1$-$C_4$)烷氧基和全氟($C_1$-$C_4$)烷基,其数目范围从零至芳环系统上的开放价总数;并且其中R’、R”和R”’独立地选自氢、($C_1$-$C_5$)烷基和杂烷基、未经取代的芳基和杂芳

基、(未经取代的芳基)-($C_1$-$C_4$)烷基、和(未经取代的芳基)氧基-($C_1$-$C_4$)烷基。

[0121] 芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-T-C(O)-($CH_2$)$_q$-U-的取代基替代,其中T和U独立地是-NH-、-O-、-$CH_2$-或单键,并且q是0至2的整数。或者,芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-A-($CH_2$)$_r$-B-的取代基替代,其中A和B独立地是-$CH_2$-、-O-、-NH-、-S-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$NR'-或单键,并且r是1至3的整数。如此形成的新的环的单键之一可任选地被双键替代。或者,芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-($CH_2$)$_s$-X-($CH_2$)$_t$-的取代基替代,其中s和t独立地是0至3的整数,并且X是-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)$_2$-或-S(O)$_2$NR'-。-NR'-和-S(O)$_2$NR'-中的取代基R'选自氢或未经取代的($C_1$-$C_6$)烷基。

[0122] 本文中使用的术语"叠氮化物"本身或作为另一取代基的一部分是指结构-$N_3$。

[0123] 术语"结合配偶体"是指能够特异性结合分析物的分子。结合配偶体可以是许多不同类型的分子中的任一种,所述分子包括抗体或其抗原结合片段,或其他蛋白质、肽、多糖、脂质、核酸或核酸类似物,例如寡核苷酸或PNA(肽核酸)。

[0124] 术语"硼酸"本身或作为另一取代基的一部分是指结构-B(OH)$_2$。本领域技术人员认识到,在猝灭剂合成的不同阶段,硼酸可作为硼酸酯存在。硼酸意指包括这样的酯。本文中使用的术语"硼酸酯(boronic ester)"或"硼酸酯(boronate ester)"是指包含-B($Z^1$)($Z^2$)部分的化合物,其中$Z^1$和$Z^2$一起形成一个部分,其中在每种情况下与硼连接的原子是氧原子。在一些实施方案中,硼酸酯部分是5元环。在另一些实施方案中,硼酸酯部分是6元环。在另一些实施方案中,硼酸酯部分是5元环和6元环的混合物。

[0125] 术语"氨基甲酸酯"本身或作为另一取代基的一部分是指具有结构-NR"$CO_2$R'的官能团,其中R'和R"独立地选自氢、($C_1$-$C_8$)烷基和杂烷基、未经取代的芳基和杂芳基、(未经取代的芳基)-($C_1$-$C_4$)烷基、和(未经取代的芳基)氧基-($C_1$-$C_4$)烷基。氨基甲酸酯的一些实例包括t-Boc、Fmoc、苄氧基-羰基、alloc、氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-(2-磺基)芴基甲基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴)芴基甲基氨基甲酸酯、Tbfmoc、Climoc、Bimoc、DBD-Tmoc、Bsmoc、Troc、Teoc、2-苯乙基氨基甲酸酯、Adpoc、2-氯乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2-卤代乙基氨基甲酸酯、DB-t-BOC、TCBOC、Bpoc、t-Bumeoc、Pyoc、Bnpeoc、V-(2-新戊酰基氨基)-1,1-二甲基乙基氨基甲酸酯、NpSSPeoc。

[0126] 术语"羧酸"本身或作为另一取代基的一部分是指结构R-COOH,其中R是含碳的原子基团。

[0127] 术语"羧酸酯"本身或作为另一取代基的一部分是指羧酸的共轭碱,其通常可由式RCOO表示。例如,术语"羧酸镁"是指羧酸的镁盐。本文中使用的术语"羧酸酯"本身或作为另一取代基的一部分是指来源于羧酸的化合物,其通常可由式RCOOR'表示,其中R'可以是烷基、烯烃、炔烃、卤代烷基、杂烷基、环烷基、芳基、杂芳基、(未经取代的芳基)烷基和(未经取代的芳基)氧基-烷基或其他含碳的原子基团。R'可以任选地含有官能团。

[0128] 术语"CD"是指分化簇。

[0129] 术语"发色团"是指具有可共价键合的反应性基团(例如,羧酸酯/盐部分、氨基部分、卤代烷基部分等)的化合物。合适的发色团的一些实例包括但不限于在美国专利

[0130] No.7,687,282;7,671,214;7,446,202;6,972,326;6,716,979;6,579,718;6,562,632;6,399,392;6,316,267;6,162,931;6,130,101;6,005,113;6,004,536;5,863,753;5,

846,737;5,798,276;5,723,218;5,696,157;5,658,751;5,656,449;5,582,977;5,576,424;5,573,909;和5,187,288中描述的那些,这些专利通过引用整体并入本文。

[0131] 流式细胞术中的术语“补偿”是针对荧光溢出(多参数流式细胞术数据的谱重叠)校正的数学方法。例如,可通过从除了专用于测量任何给定荧光染料的检测器之外的所有检测器中除去所述染料的信号来进行补偿。由于荧光染料可具有宽范围的谱,它们可重叠,在数据分析期间造成不期望的混乱。

[0132] 术语“环烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指包含3至12个环原子的饱和或部分不饱和的单环、稠合双环或桥接多环环集合体,或者是指所示原子数单环环,包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基。双环和多环环包括例如降冰片烷、十氢萘和金刚烷。例如,$C_{3-8}$环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环辛基和降冰片烷。

[0133] 术语“重氮盐”本身或作为另一取代基的一部分是指具有结构$R-N_2^+X^-$的有机化合物的基团,其中R可以是任何有机基团(例如,烷基或芳基),并且X是无机或有机阴离子(例如,卤素)。

[0134] 术语“DM-2”或“DM2”是指DM-2。术语“S”是指提及“DM2+S”缓冲剂的稳定剂。“DM2+S”是根据本公开内容的DM缓冲剂,其中碳水化合物稳定剂是海藻糖或其水合物,水溶性单体是单体A,蛋白质稳定剂是酪蛋白,并且两性离子表面活性剂是DMMA,例如,根据表3。

[0135] 术语“染料缀合物”是指与结合配偶体缀合的染料。

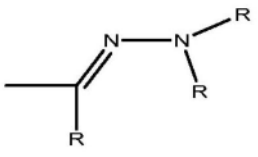
[0136] 术语“荧光染料”是指包含可光激发的荧光团的染料,该荧光团可以在光激发之后重新发射光。术语“荧光染料”涵盖荧光聚合物染料和荧光非聚合物染料二者,包括荧光单体染料和其他传统荧光染料。例如,SuperNova™(“SN”)v428(Beckman Coulter,Inc.)是这样的荧光聚合物染料:由激发最大值为414nm、发射峰为428nm的紫色激光(405nm)最佳激发,并且可使用450/50带通滤波器或等效物进行检测。SN v605和SN v786是来源于核心SN v428聚合物染料的串联聚合物染料。两者共用相同的吸光度特征,其中最大激发在414nm下。在SN v605和SN v786的发射峰分别在605nm和786nm下的情况下,使用流式细胞仪的610/2和780/60nm带通滤波器对其进行最佳检测。

[0137] 术语“荧光团”是指在光激发之后可以重新发射光的荧光化合物。荧光团通常可包含数个组合的芳族基团,或具有数个πpi键的平面和环状分子。

[0138] 术语“卤素”本身或作为另一取代基的一部分是指氟、氯、溴和碘。

[0139] 术语“(杂)芳基氨基”本身或作为另一取代基的一部分是指被芳基取代的胺基(例如,-NH-芳基)。芳基氨基也可以是被胺基取代的芳基(例如,-芳基-$NH_2$)。芳基氨基可以是经取代的或未经取代的。

[0140] 本文中使用的术语“腙”本身或作为另一取代基的一部分是指结构




,

[0141] 其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0142] 术语“肼”和“酰肼”本身或作为另一取代基的一部分是指包含单键合的氮的化合物,所述氮中的一个是伯胺官能团。

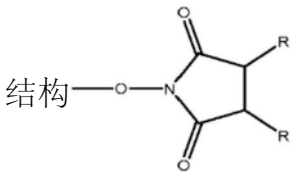
[0143] 术语“烃”或“烃基”是指包含碳和氢原子的分子或官能团。该术语还可指通常包含碳和氢原子二者但其中一些或所有氢原子被另外的官能团取代的分子或官能团。术语“烃基”是指来源于直链、支链或环状烃的官能团,并且可以是烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、酰基、或其任意组合。烃基可表示为($C_a$-$C_b$)烃基,其中a和b是整数并且意指具有任意a至b数目的碳原子。例如,($C_1$-$C_4$)烃基意指烃基可以是甲基($C_1$)、乙基($C_2$)、丙基($C_3$)或丁基($C_4$),并且($C_0$-$C_b$)烃基意指在某些实施方案中没有烃基。亚烃基是二价烃,例如,在两个位置键合的烃。

[0144] 术语“经标记的结合配偶体”是指与染料缀合的结合配偶体。

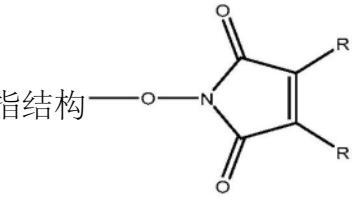
[0145] 术语“接头”或“连接物”是指连接两个基团并具有长度为100个原子或更少原子的主链的连接部分。接头或连接物可以是连接两个基团的共价键或长度为1至100个原子的链,例如长度为1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20或更多个碳原子的链,其中接头可以是直链、支链、环状的或是单个原子。在一些实施方案中,接头是分支接头,所述分支接头是指连接三个或更多个基团的连接部分。在某些情况下,接头主链的一个、两个、三个、四个或五个或更多个碳原子可任选地被硫、氮或氧杂原子取代。在一些实施方案中,接头主链包含连接官能团,例如醚、硫醚、氨基、酰胺、磺酰胺、氨基甲酸盐/酯、硫代氨基甲酸盐/酯、脲、硫脲、酯、硫酯或亚胺。主链原子之间的键可以是饱和的或不饱和的,并且在某些情况下,不多于一个、两个或三个不饱和键存在于接头主链中。接头可包含一个或更多个取代基,例如具有烷基、芳基或烯基。接头可包括但不限于聚乙二醇、醚、硫醚、叔胺、烷基,其可以是直链或支链的,例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)等。接头主链可包含环状基团,例如芳基、杂环或环烷基,其中环状基团的2个或更多个原子,例如2、3或4个原子被包含在主链中。接头可以是可切割的或不可切割的。

[0146] 接头部分可与“L”或“A”连接,如美国公开申请No.2020/0190253A1所教导,其通过引用整体并入本文。接头部分可包含磺酰胺、二磺酰胺、硒酰胺(selenomide)、亚磺酰胺、磺内酰胺、二亚磺酰胺、酰胺、亚硒酰胺、膦酰胺、次膦酰胺、膦酰胺酸酯或仲胺。

[0147] 如其中所述,并且如每个都属于接头部分,术语“磺酰胺”是指部分-S(O)$_2$NR-;术语“二磺酰胺”是指部分-S(O)$_2$NRS(O)$_2$-;术语“硒酰胺(selenonamide)”是指部分-Se(O)$_2$NR-;术语“亚磺酰胺”是指部分-S(O)NR-;术语“二亚磺酰胺”是指部分-S(O)NRS(O)-;术语“亚硒酰胺”是指部分-Se(O)NR-;术语“膦酰胺”是指部分-NR-PR(O)NR-;术语“次膦酰胺”是指部分-PR(O)NR-;以及术语“膦酰亚胺酸酯”是指部分-O-PR(O)NR-;以及术语“磺内酰胺”是指环状磺酰胺(例如,其中R基团通过亚烷基部分与硫原子键合);其中对于每个术语,R基团独立地是H、烷基、卤代烷基或芳基。

[0148] 本文中使用的术语“N-羟基琥珀酰亚胺基”本身或作为另一取代基的一部分是指结构,其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或

更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0149] 术语“反应物溶液”是指包含经标记的结合配偶体的溶液。在一些实施方案中,除了经标记的结合配偶体之外,反应物溶液还包含稳定剂、盐、缓冲剂、表面活性剂和/或其他试剂。术语“马来酰亚胺”本身或作为另一取代基的一部分是指结构,其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0150] 术语“MdFI”或“MDFI”是指中值荧光强度(Median fluorescence intensity)。

[0151] 术语“%募集”是指相关群体的设门细胞的数目。

[0152] 术语“多色抗体组”是指包含液体或干燥形式的多种不同荧光染料缀合物(例如,CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC、CD3-PC5.5、CD16-FITC、CD25-PE、CD3-ECD、CD38-PC5.5、CD27-PC7、CD10-APC、CD14-APCA700、CD45-AA750、CD8-KRO、CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786等)的混合物,其可直接用于染色血液并且在流式细胞术中对其进行分析。

[0153] 术语“多色干燥试剂”是指干燥形式的不同荧光染料缀合物(CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC、CD3-PC5.5等)的混合物,其可直接用于染色血液并在流式细胞术中对其进行分析。仅具有常规染料(例如FITC、PE、ECD、PC5、PC5.5、PC7、APC、AA700、AA750、PBE和KrO)的多色干燥试剂混合物可以使用现有干燥技术进行干燥。然而,在对混合物中的多种荧光聚合物染料抗体缀合物进行干燥时,发现现有干燥技术是无效的。这些聚合物染料缀合物倾向于非特异性相互作用,并导致难以求解群体,这可导致在鉴定给定样品中的期望细胞群体方面具有挑战。

[0154] 术语“多重”在本文中是指可同时分析多种分析物的测定或其他分析方法。

[0155] 术语“低聚醚”是指包含具有醚官能度的结构重复单元的低聚物。本文中使用的“低聚物”理解为意指包含相同或不同式的一个或更多个可识别结构重复单元的分子。

[0156] 术语“有机基团”是指任何含碳官能团。含碳官能团的一些实例可包括含氧基团,例如烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、氧代(羰基)基团;羧基,包括羧酸、羧化物和羧酸酯;含硫基团,例如烷基和芳基硫化物基团;和其他含杂原子的基团。有机基团的一些非限制性实例包括:OR,OOR,OC(O)N(R)$_2$,CN,$CF_3$,$OCF_3$,R,C(O),亚甲基二氧基、亚乙基二氧基、N(R)$_2$,SR,

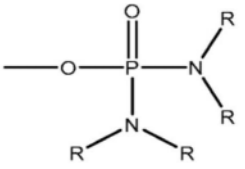
[0157] SOR,$SO_2$R,$SO_2$N(R)$_2$,$SO_3$R,C(O)R,C(O)C(O)R,C(O)$CH_2$C(O)R,C(S)R,C(O)OR,OC(O)R,C(O)N(R)$_2$,OC(O)N(R)$_2$,C(S)N(R)$_2$,$(CH_2)_{0-2}$N(R)C(O)R,$(CH_2)_{0-2}$N(R)N(R)$_2$,N(R)N(R)C(O)R,N(R)N(R)C(O)OR,N(R)N(R)CON(R)$_2$,N(R)$SO_2$R,N(R)$SO_2$N(R)$_2$,N(R)C(O)OR,N(R)C(O)R,N(R)C(S)R,N(R)C(O)N(R)$_2$,N(R)C(S)N(R)$_2$,N(COR)COR,N(OR)R,C(=NH)N(R)$_2$,C(O)N(OR)R,C(=NOR)R,

[0158] 和经取代或未经取代的($C_1$-$C_{100}$)烃基,其中R可以是氢(在包含其他碳原子的实例中)或基于碳的部分,并且其中基于碳的部分可以是经取代或未经取代的。

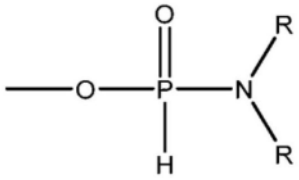
[0159] 术语“PEG”是指聚乙二醇或聚(乙二醇),是基于由式-($CH_2$-$CH_2$-O-)$_n$-或其衍生物

描述的乙二醇单体单元的生物相容性水溶性线性聚合物家族。在一些实施方案中,“n”是1000或更小、500或更小、200或更小、100或更小、50或更小、40或更小、30或更小、20或更小、15或更小,例如3至15或10至15。应当理解,PEG聚合基团可具有任何合适的长度,并且可包含多种端基和/或其他取代基,包括但不限于烷基、芳基、羟基、氨基、酰基、羧酸、羧酸酯、酰氧基和酰氨基端基和/或取代基。“PEG”之后的数字是指平均分子量,其中Mw是指重均分子量,并且Mn是指数均分子量。

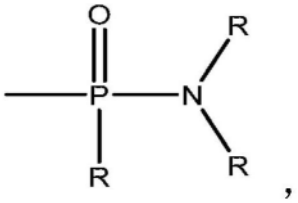
[0160] 术语“PBS”是指磷酸缓冲盐水,其是可包含氯化钠、磷酸氢二钠、氯化钾和/或磷酸二氢钾的水性缓冲液。例如,PBS可包含milliQ水或去离子水和137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM $Na_2HPO_4$、1.8mM $KH_2PO_4$。pH可以是约pH 7.0至7.4。PBS可用或可不用叠氮化物(例如叠氮化钠)保存。PBS是等张溶液。

[0161] 术语“膦酰胺”本身或作为另一取代基的一部分是指结构 ,

[0162] 其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0163] 术语“膦酰胺酸酯”本身或作为另一取代基的一部分是指结构 ,

[0164] 其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0165] 术语“次膦酰胺”本身或作为另一取代基的一部分是指结构 ,

[0166] 其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0167] 术语“物理特性”是指荧光染料缀合物的特性,包括亮度或荧光,及其到其他通道中的溢出。

[0168] 术语“聚合物染料缀合物”是指与结合配偶体缀合的聚合物染料。例如,聚合物染料缀合物可以包含具有单体亚基的荧光聚合物,所述单体亚基包括但不限于二氢菲(DHP)、芴及其组合。

[0169] 术语“显著降低”是指可测量质量降低至少10％、至少25％或至少50％。

[0170] 本文中使用的与本文中所定义的分子或有机基团结合的术语“取代的”是指其中包含的一个或更多个氢原子被一个或更多个非氢原子替代的状态。本文中使用的术语“官能团”或“取代基”是指可被取代到或被取代到分子上或有机基团上的基团。取代基或官能团的一些实例包括但不限于:卤素(例如F、Cl、Br和I);基团中的氧原子,所述基团例如羟基、烷氧基、芳基氧基、芳烷氧基、氧代(羰基)基团、羧基(包括羧酸、羧化物和羧酸酯);基团中的硫原子,所述基团例如硫醇基、烷基和芳基硫化物基团、亚砜基、砜基、磺酰基和磺酰胺基;基团中的氮原子,所述基团例如胺、羟胺、腈、硝基、N-氧化物、酰肼、叠氮化物和烯胺;以及多种其他基团中的其他杂原子。可与经取代的碳(或其他)原子键合的取代基的一些非限制性实例包括F、Cl、Br、I、OR、OC(O)N(R)$_2$、CN、NO、$NO_2$、$ONO_2$、叠氮基、$CF_3$、$OCF_3$、R、O(氧代)、S(硫羰基(thiono))、C(O)、S(O)、亚甲基二氧基、亚乙基二氧基、N(R)$_2$,SR,SOR,$SO_2R$,$SO_2N$(R)$_2$,$SO_3R$,C(O)R,C(O)C(O)R,C(O)$CH_2$C(O)R,C(S)R,C(O)OR,OC(O)R,C(O)N(R)$_2$,OC(O)N(R)$_2$,C(S)N(R)$_2$,$(CH_2)_{0-2}$N(R)C(O)R,$(CH_2)_{0-2}$N(R)N(R)$_2$,N(R)N(R)C(O)R,N(R)N(R)C(O)OR,N(R)N(R)CON(R)$_2$,N(R)$SO_2$R,N(R)$SO_2$N(R)$_2$,N(R)C(O)OR,N(R)C(O)R,N(R)C(S)R,N(R)C(O)N(R)$_2$,N(R)C(S)N(R)$_2$,N(COR)COR,N(OR)R,C(=NH)N(R)$_2$,C(O)N(OR)R,和C(=NOR)R,

[0171] 其中R可以是氢或基于碳的部分;例如,R可以是氢、($C_1$-$C_{100}$)烃基、烷基、酰基、环烷基、芳基、芳基烷基、杂环基、杂芳基或杂芳基烷基;或者其中与氮原子或相邻氮原子键合的两个R基团可与一个或更多个氮原子一起形成杂环基。

[0172] 术语“磺酸盐/酯官能团”或“磺酸盐/酯”本身或作为另一取代基的一部分是指游离磺酸根阴离子(-S(=O)$_2$O-)及其盐二者。因此,术语磺酸盐/酯涵盖磺酸盐,例如磺酸钠、磺酸锂、磺酸钾和磺酸铵。

[0173] 术语“磺酰胺基”本身或作为另一取代基的一部分是指式-$SO_2$NR-的基团,其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0174] 术语“磺酰胺”本身或作为另一取代基的一部分是指式-$SO_2NR_2$的基团,其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0175] 术语“亚磺酰胺”本身或作为另一取代基的一部分是指式-$SONR_2$-的基团,其中R可以是例如水溶性部分、氢、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、芳基或其他,并且可以包含羧酸基。R可以是水溶性聚合物,其包括但不限于包含6个或更多个单体单元的聚合物、非离子水溶性聚合物、PEG、以羧酸或羧酸酯封端的改性PEG。

[0176] 术语“甲硅烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指Si($R^z$)$_3$,其中每个$R^z$独立地是烷基、芳基或其他含碳的原子基团。

[0177] 术语“硫醇”本身或作为另一取代基的一部分是指包含由硫-氢键构成的官能团的化合物。硫醇官能团的通用化学结构是R-SH,其中R表示烷基、烯烃、芳基或其他含碳的原子基团。

[0178] 本文中使用的术语“水溶性部分”本身或作为另一基团的一部分是指在水性环境

中(例如如,在生理条件下)充分溶剂化的任何亲水基团,并且能够提高其所连接的分子的水溶性。分子的水溶性的提高可以根据所连接的部分而变化。在一些情况下,水溶性的提高(与不含所连接部分的分子的水溶性相比)是2倍或更多、5倍或更多、10倍或更多、25倍或更多、50倍或更多、或者100倍或更多。"水溶性部分"包括以下部分,例如但不限于:PEG基团、羧基(包括但不限于羧酸和羧酸盐/酯)、聚乙烯醇、二醇、肽、多磷酸盐/酯、多元醇、磺酸盐/酯、膦酸盐/酯、硼酸盐/酯、胺、铵、锍、鏻、醇、两性离子衍生物、碳水化合物、核苷酸、多核苷酸、经取代的PEG基团、经取代的羧基(包括但不限于经取代的羧酸和经取代的羧酸盐/酯)、经取代的二醇、经取代的肽、经取代的多磷酸盐/酯、经取代的多元醇、经取代的磺酸盐/酯、经取代的膦酸盐/酯、经取代的硼酸盐/酯、经取代的胺、经取代的铵、经取代的锍、经取代的鏻、醇、经取代的两性离子衍生物、经取代的碳水化合物、经取代的核苷酸、经取代的多核苷酸、及其组合。

[0179] 本文中使用的术语"水溶性聚合物"(water-soluble polymer,WSP)是指这样的聚合物:在本文中使用的"水"中的溶解度为1mg/mL或更大,例如3mg/mL或更大、10mg/mL或更大、20mg/mL或更大、30mg/mL或更大、40mg/mL或更大、50mg/mL或更大、60mg/mL或更大、70mg/mL或更大、80mg/mL或更大、90mg/mL或更大、100mg/mL或更大、或者甚至更大。应当理解,在某些条件下,水溶性聚合物可以在水性系统中形成离散的水溶剂化纳米粒并且可以抵抗聚集。

[0180] 反应容器

[0181] 如本文中公开的"反应容器"可以是可发生结合配偶体或其染料缀合物与靶分析物之间的反应的任何容器。例如,反应容器可以是管、板、微量滴定板的孔、室和玻片。在一个优选的实施方案中,反应容器具有盖或帽,使得结合反应可在封闭的环境中发生。

[0182] 基底

[0183] 反应容器包含一种或更多种基底。"基底"可以是任何合适的表面,包括但不限于塑料、硝化纤维素、乙酸纤维素、石英和玻璃。塑料的一些非限制性实例可包括聚苯乙烯、聚丙烯、环烯烃和聚碳酸酯。在一些实施方案中,基底是膜。基底可以是反应容器主体的内表面,例如塑料管或微量滴定板的孔。基底也可以是珠。在一些实施方案中,接收经标记的结合配偶体的至少一种基底(例如,膜)与反应容器主体的内表面键合。在一些实施方案中,膜基底是片或卷,这使得更易于使溶液沉积并且更易于干燥。在一些实施方案中,膜可被切割以分离单独的干燥的反应物斑点。在一些实施方案中,经切割膜简单地落入反应容器中。在一些优选的实施方案中,经切割膜与反应容器的表面键合,使得当液体被移液进或移液出反应容器时,所述膜不会从容器中逃逸。

[0184] 首字母缩写"SN"是指SuperNova™。

[0185] 首字母缩写"SSC"是指侧向散射。

[0186] 术语"WBC"是指白细胞。

[0187] 液体样品

[0188] 将反应容器配置成接收液体样品。本发明中使用的液体样品通常包含作为主要水性介质获得或分散在主要水性介质中的靶分析物。样品可以是任何来源的生物物质,例如可直接或间接从活的生物体中获得的蛋白质、碳水化合物或多核苷酸。样品可包含例如细

胞、组织或液体,以及由生物体留下的沉积物,包括病毒、支原体和化石。样品可包含通过合成手段全部或部分地制备的靶分析物。样品的一些非限制性实例包括血液,血清,血浆,尿,精液,牛奶,痰,黏液,颊拭子,阴道拭子,直肠拭子,抽吸物,针刺活检,例如通过手术或尸检获得的组织切片,血浆,血清,脊髓液,淋巴液,皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物,眼泪,唾液,肿瘤,器官,体外细胞培养成分(包括但不限于由细胞在细胞培养基中生长产生的条件培养基、推定的病毒感染细胞、重组细胞和细胞组分)的样品。

[0189] 靶分析物

[0190] 本发明旨在检测特定靶分析物的存在,并且在一些情况下检测靶分析物的数量。术语“靶分析物”是指生物样品中待检测的靶分子,例如肽、蛋白质、多核苷酸、有机分子、糖和其他碳水化合物、和脂类。本发明的一个重要方面是靶分析物包含在液体样品中,并且是可接近的,或者在某一点上是可接近的,以结合本发明的分析物特异性结合配偶体。靶分析物可存在于生物样品中,例如血液样品、细胞系发育样品、组织培养样品等。

[0191] 靶分析物可在珠上存在,或可在细胞表面上存在并可接近。可用的分析物的一些举例说明性实例包括但不限于以下:1)特定的细胞表面大分子和抗原(包括激素、蛋白质复合体和由细胞受体识别的分子)和2)透化细胞中的细胞蛋白质、DNA或RNA,包括异常的DNA或RNA序列或异常量的某些信使RNA。这些分析物在包含在稀有细胞中和/或它们是稀有细胞的标识子的情况下,例如存在于多种癌症的早期的情况下,这些分析物的检测是特别有用的。

[0192] 结合配偶体

[0193] 术语“结合配偶体”是指与靶分析物的表位特异性结合的分子。在本系统和方法中可以使用多种不同类型的结合配偶体。在一个实施方案中,结合配偶体是抗体。用于结合特定分析物的抗体优选是单克隆的,并因此针对分析物的单一表位。单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术制备,并且通常通过使用产生具有期望的结合特征的抗体的B细胞系产生杂交瘤来制备。针对单一表位的抗体也可以以其他方式产生,例如通过重组方法。在一些实施方案中,多克隆抗体可以用作本系统和方法中的特异性结合配偶体。例如,结合配偶体可以是针对分析物的表位产生的多克隆抗体。多克隆抗体可以以本领域已知的方式制备,例如通过对宿主进行免疫接种并从该宿主收集血浆或血清。保留其特异性结合特征的抗体片段也可在本发明中用作特异性结合配偶体,包括缺乏抗体Fc部分的片段,例如Fab、Fab’和F(ab’)2片段。F(ab’)2片段可以通过本领域已知的方法产生,例如通过用蛋白水解酶(例如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶)切割单克隆抗体。Fab’片段可以通过用试剂(例如二硫苏糖醇或巯基乙醇)还原性切割F(ab’)2片段来产生。抗体片段可替代地使用重组方法产生,例如通过使用噬菌体展示文库。

[0194] 除抗体或抗体片段或衍生物之外的结合配偶体也可用于本系统和方法中。例如,结合配偶体可以是核酸或核酸类似物,例如寡核苷酸或PNA探针。在一个实施方案中,适配体可用作特异性结合配偶体。适配体是单链DNA或RNA(ssDNA或ssRNA)分子,其可以以高亲和力和特异性与预选择的靶标(包括蛋白质和肽)结合。也可使用可与靶分析物结合形成接纳体-配体对、酶-底物对、酶-抑制剂对和酶-辅因子对的其他结合配偶体。这样的结合配偶体对的一些具体实例包括碳水化合物和凝集素、生物素和亲和素或链霉亲和素、叶酸和叶酸结合蛋白、维生素B12和内因子、蛋白A和免疫球蛋白以及蛋白G和免疫球蛋白。还包括与

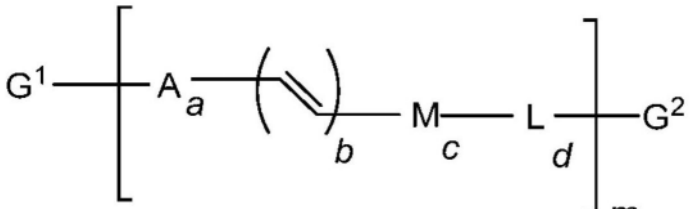
靶分析物形成共价键的结合配偶体。

[0195] 染料

[0196] “染料”是提供可检测信号的部分,其可直接或间接与结合配偶体连接或并入到结合配偶体中。本发明使用的染料可以是有色的、荧光的或发光的,并且通常由流式细胞仪中的检测器(例如PMT或APD)检测。荧光染料可以是单体或聚合物。单体染料的一些非限制性实例包括荧光素、罗丹明和花青素。例如,常用的单体染料荧光染料(fluorochrome)可包括FITC(异硫氰酸荧光素)(激发最大值494nm/发射最大值520nm)、PE(R-藻红蛋白)(激发最大值496nm/发射最大值578nm)、APC(别藻蓝蛋白)(激发最大值650nm/发射最大值660nm)和PerCP(来源于浮游植物的类胡萝卜素-蛋白质复合物)(激发最大值482nm/发射最大值678nm),Cy5.5(花青素染料)(激发最大值675nm/发射最大值694nm)。其他花青素染料可由2-、3-、5-或7-次甲基结构合成,并可包括Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5和Cy7.PC5.5。荧光染料可以是串联染料。串联染料可包括PE-Cy5.5串联(激发最大值566nm/发射最大值671nm)、APC-Cy5.5串联(激发最大值656nm/发射最大值700nm)和PerCP-Cy5.5串联(激发最大值489nm/发射最大值679nm)。

[0197] 荧光染料可以是荧光聚合物染料。荧光聚合物染料特别可用于化学和生物靶标的分析。由于它们包含多个发色团,因此它们是高度响应的光学报道子和有效的光吸收剂。荧光聚合物染料的一些实例包括但不限于具有发色团重复单元的经缀合聚合物、经缀合分子的聚集体、通过侧链与饱和聚合物连接的发光染料、半导体量子点和树枝状结构。美国专利No.7,214,489、8,354,239、8,575,303中公开的荧光聚合物和单体染料也可用于本发明。

[0198] 在一些情况下,荧光染料可以是具有根据式(IV)的结构的荧光聚合物染料:

[0199] 

(IV)

[0200] 其中:

[0201] 每个A独立地选自芳族共聚单体和杂芳族共聚单体;

[0202] 每个L是接头部分;

[0203] 每个M独立地选自芳族共聚单体、杂芳族共聚单体、带隙改性单体、任选经取代的亚乙基、和亚乙炔基;

[0204] $G^1$和$G^2$独立地选自未经修饰的聚合物末端和经修饰的聚合物末端;

[0205] a、c和d独立地限定所述结构内每个单元的mol%,所述单元各自可以是均匀或随机重复的,并且其中每个a为10%至100%的mol%,每个c为0至90%的mol%,并且每个d为0至25%的mol%;

[0206] 每个b独立地是0或1;并且

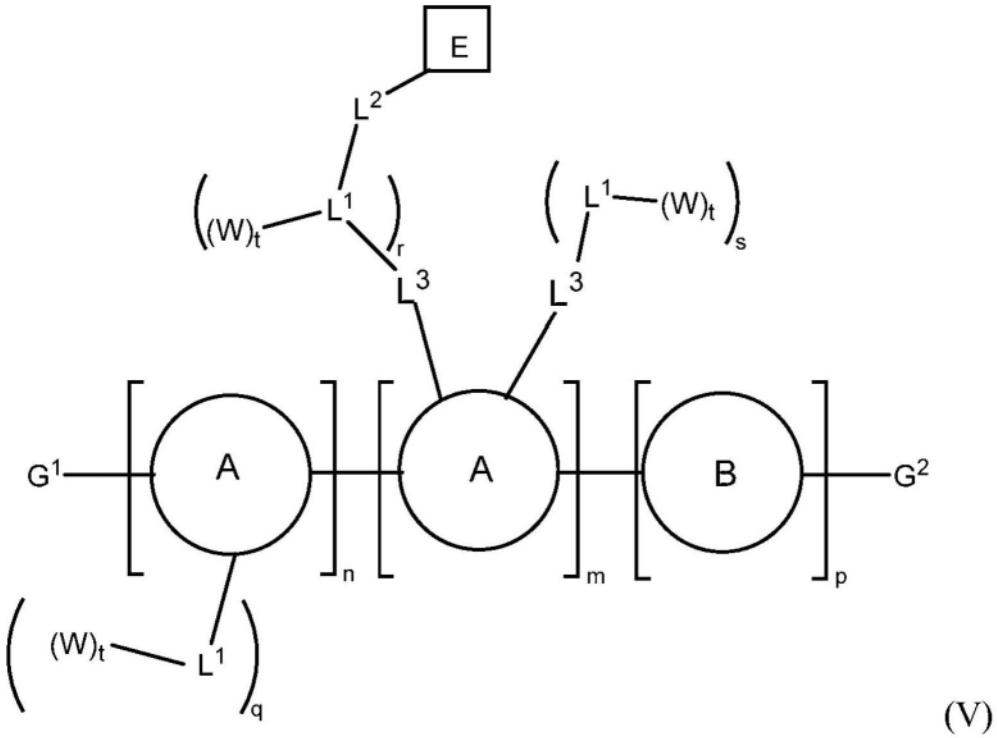
[0207] m是1至约10,000的整数。

[0208] L可以是包含沿聚合物主链均匀或随机分布的芳基或杂芳基的接头部分,并且可被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端以用于与另一底物、接受体

染料、分子或结合剂缀合:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及其被保护基团。

[0209] 荧光聚合物染料可与结合配偶体缀合,以形成例如具有单体A亚基和单体B亚基的荧光聚合物染料缀合物,如例如US2020/0190253中所述,其通过引用并入本文。荧光聚合物染料缀合物可具有式V结构:

[0210]




(V)

[0211] 其中:

[0212] 每个A独立地选自芳族共聚单体和杂芳族共聚单体;

[0213] $L^1$、$L^2$和$L^3$是接头部分;

[0214] W是水溶性部分;

[0215] 每个E是独立选择的发色团、官能部分或结合配偶体;

[0216] 每个B独立地选自芳族共聚单体、杂芳族共聚单体、带隙改性单体、任选经取代的亚乙基、和亚乙炔基;

[0217] $G^1$和$G^2$独立地选自未经修饰的聚合物末端和经修饰的聚合物末端;

[0218] 下标n和m独立地是1至10,000的整数,

[0219] 下标p是0至10,000的整数,并且

[0220] 下标n、m和p之和的范围为2至10,000;

[0221] 下标q是1、2、3或4;

[0222] 下标r是1、2、3或4;

[0223] 下标s是0、1、2或3;

[0224] 下标t是1或2,

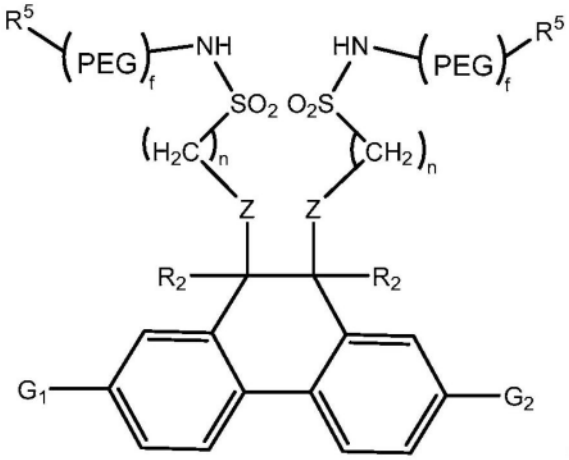
[0225] 下标r和s之和的范围为1至4;并且

[0226] A和B随机或非随机地分布在所缀合的聚合物中。

[0227] 荧光染料可以是具有水溶性单体A亚基和单体B亚基的荧光聚合物染料。聚合物染

料可以是水溶性荧光聚合物染料。例如,单体A或单体B可以包含二氢菲(DHP)部分。单体A或单体B可以包含芴部分。在一些缀合聚合物染料中,单体B可用于改变聚合物带隙。单体单元可以是水溶性的,例如,包含一个或更多个或者两个或更多个水溶性部分(W),例如聚(乙二醇)(PEG)部分。在一些实施方案中,单体A或单体或B各自独立地为水溶性单体分子。水溶性单体A或单体B可以各自独立地包含DHP部分和一个或更多个或者两个或更多个PEG部分。水溶性单体A或单体B可以各自独立地包含具有通过磺酰胺基连接的增溶性PEG部分的DHP部分。

[0228] 包含DHP部分的水溶性单体A或单体B可各自独立地具有根据式(I)的结构:

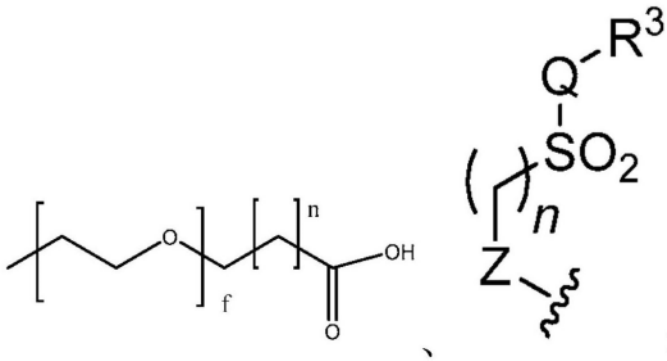
[0229] 

(I),

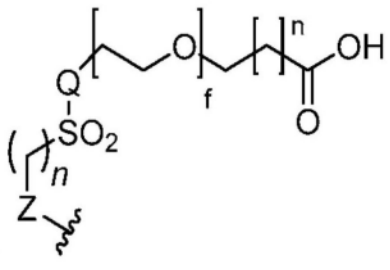
[0230] 其中

[0231] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自氢、烷基、PEG、卤素、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及其被保护基团;

[0232] 每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、

[0233] 

、

和

;

[0234] 每个$R^3$是水溶性部分;

[0235] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

[0236] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基;

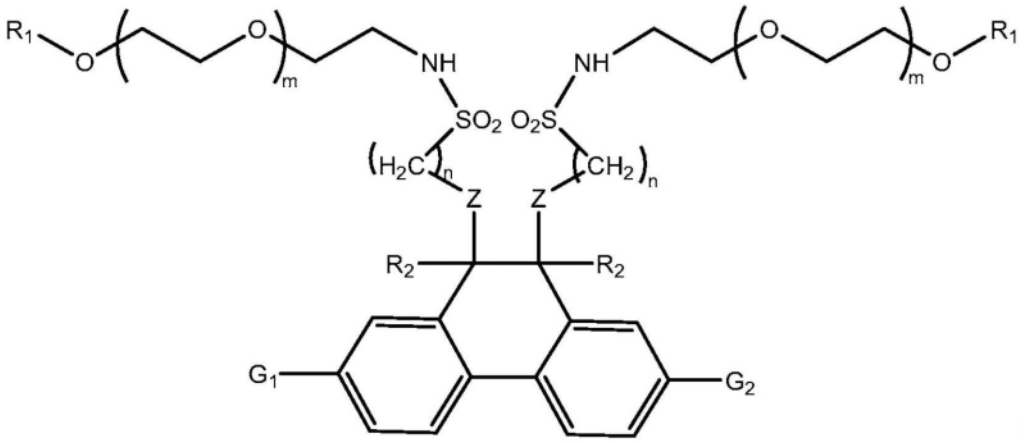
[0237] 每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$;

[0238] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$;

[0239] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0240] 每个n独立地是1至20的整数。

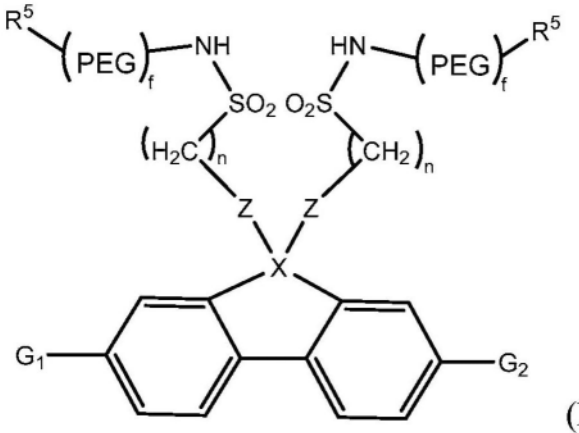
[0241] 在一些实施方案中,包含DHP部分的水溶性单体A或单体B可以各自独立地具有根据式(III)的化学结构:

[0242] 

(III),

[0243] 其中每个$G_1$、$G_2$独立地是卤素(F、Cl、Br、I);每个Z独立地选自O、$CH_2$和NH;每个$R_1$独立地是烷基($C_1$-$C_3$);每个$R_2$独立地是H、烷基($C_1$-$C_6$);每个n独立地是1至6;并且每个m独立地是5至50。在一些实施方案中,$G_1$、$G_2$各自是Br;每个Z是O;每个$R_1$是$CH_3$;每个$R_2$是H;每个n独立地是2至4;并且每个m独立地是5至20。在一些实施方案中,每个n是3;并且每个m是11。

[0244] 水溶性单体A或单体B可以各自独立地包含芴部分和一个或更多个或者两个或更多个PEG部分。包含芴部分的水溶性单体A或单体B可以各自独立地具有根据式(II)的结构:

[0245] 

(II),

[0246] 其中

[0247] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自氢、卤素、烷基、PEG、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选经取代的四氢苊(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及其被保护基团;

[0248] 每个X是C或Si;

[0249] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

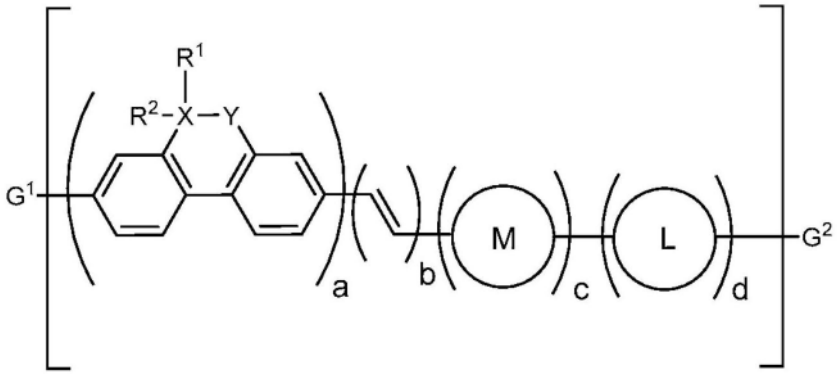
[0250] 每个R5独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基;

[0251] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$;

[0252] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0253] 每个n独立地是1至20的整数。

[0254] 荧光聚合物染料可以是US2019/0144601中所公开的任何染料,其通过引用整体并入本文。荧光聚合物染料可以是例如具有式(VI)结构的紫色荧光聚合物染料:

[0255] 

(VI),

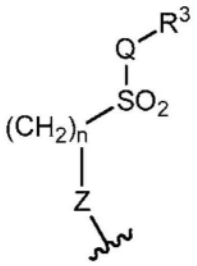
[0256] 其中

[0257] 每个X独立地选自C和Si;

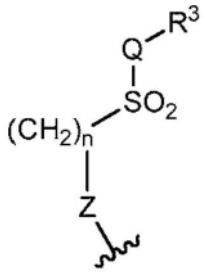
[0258] 每个Y独立地选自键、$CR^1R^2$和$SiR^1R^2$;

[0259] 当Y是键时,X直接与两个环键合;

[0260] 每个$R^1$独立地选自聚乙二醇(PEG)、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、低聚醚铵盐、烷基磺

酸盐、烷氧基磺酸盐、低聚醚磺酸盐、磺酰胺基低聚醚和;

[0261] 每个$R^2$独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳基氧基、芳基、(杂)芳基氨基、PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、低聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、低聚醚磺酸盐、磺酰胺基低聚醚和

[0262] ;

[0263] 每个$R^3$独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳基氧基、芳基、(杂)芳基氨基和PEG;每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、脲、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

[0264] 每个Z独立地是$CH_2$、O和$NR^4$;

[0265] 每个Q独立地选自键、NH、$NR^4$和$CH_2$;

[0266] 每个M独立地是能够改变聚合物带隙的富电子接头单元,并且沿聚合物主链均匀或随机分布;

[0267] 每个$R^4$是能够赋予在水中超过10mg/mL的溶解度的非离子侧基,并且各自独立地选自:卤素;羟基;$C_1$-$C_{12}$烷基;$C_2$-$C_{12}$烯烃;$C_2$-$C_{12}$炔烃;$C_3$-$C_{12}$环烷基;$C_1$-$C_{12}$卤代烷基;$C_1$-$C_{12}$烷氧基;$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基;$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基;$(CH_2)_{x'}(OCH_2-CH_2)_{y'}OCH_3$,其中每个x'独立地是0至20的整数,每个y'独立地是0至50的整数;和$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基;

[0268] 每个任选的接头L是沿聚合物主链均匀或随机分布的芳基或杂芳基,并且其可以由一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端以用于与另一底物、接受体染料、分子或结合剂缀合:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、脲、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇、及其被保护基团;

[0269] 每个$G^1$、$G^2$各自独立地选自以下,以用于与底物或结合剂缀合:氢、卤素、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选经取代的二氢菲(DHP)、任选经取代的芴,芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、脲、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及其被保护基团;

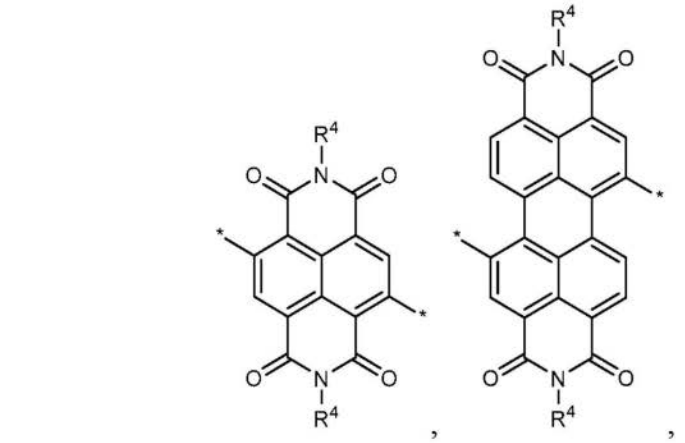
[0270] a、c和d限定了所述结构内每个单元的mol％,所述单元各自可以是均匀或随机重复的,并且其中a为10％至100％的mol％,c为0至90％的mol％,并且每个d为0至25％的mol％;

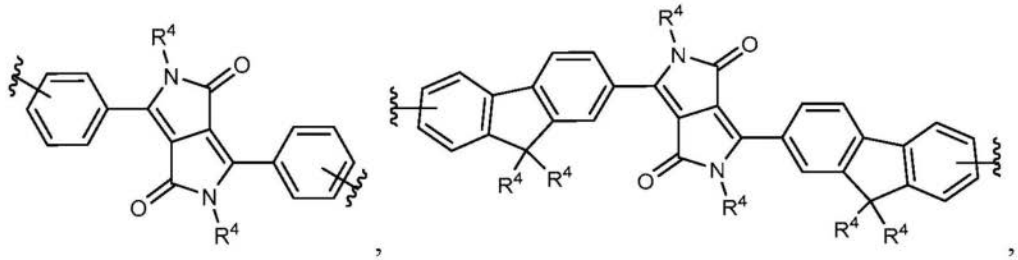
[0271] 每个b独立地是0或1;

[0272] m是1至约10,000的整数;并且

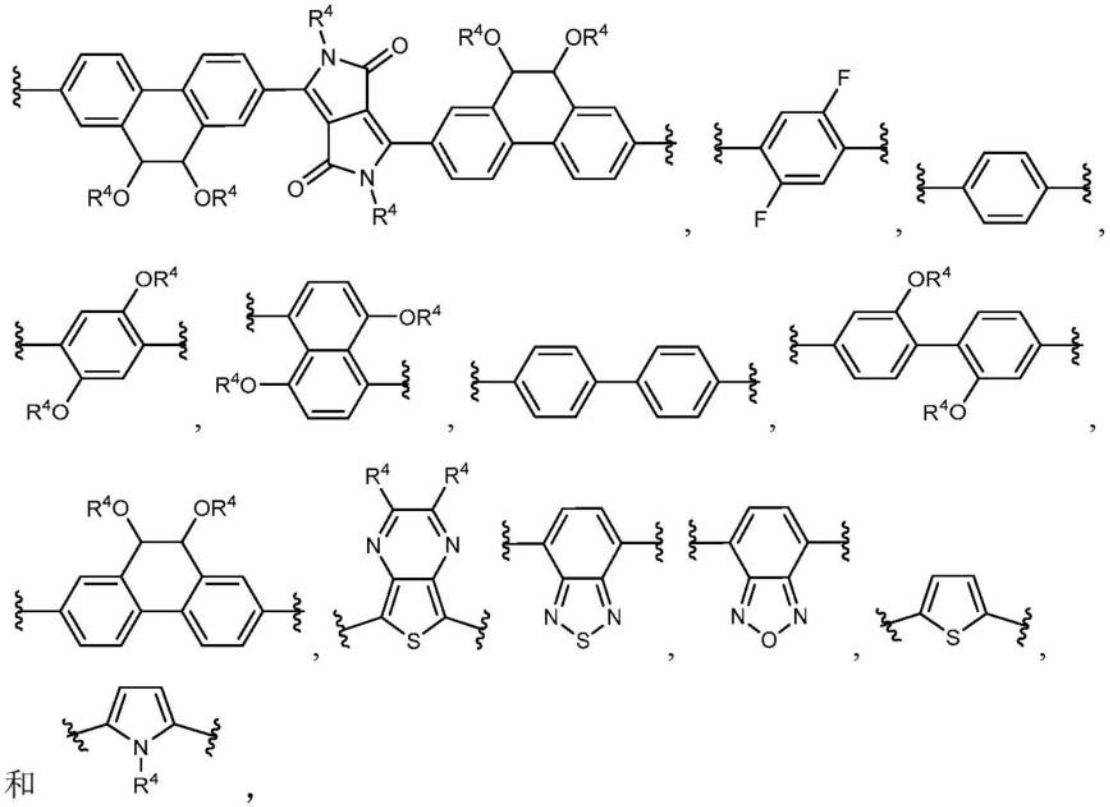
[0273] 每个n独立地是1至20的整数。

[0274] 在一些情况下,每个M可独立地选自:



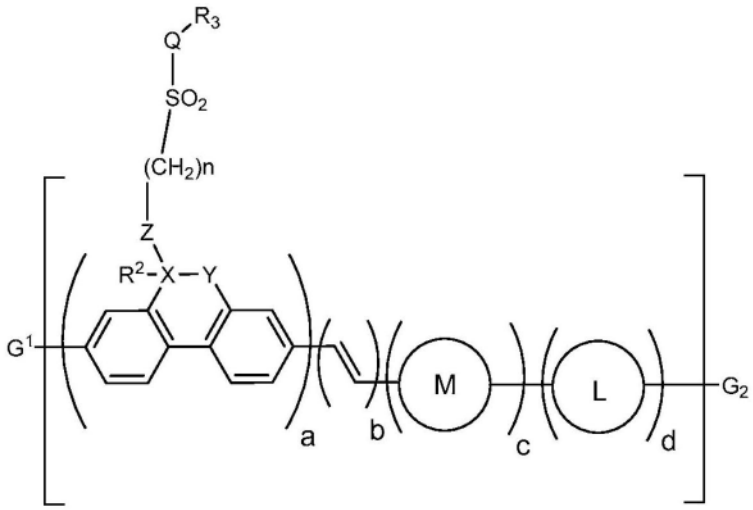


[0275]



[0276] 其中每个$R^4$是能够赋予在水中超过10mg/mL的溶解度的非离子侧基,并且各自独立地选自:卤素;羟基;$C_1$-$C_{12}$烷基;$C_2$-$C_{12}$烯烃;$C_2$-$C_{12}$炔烃;$C_3$-$C_{12}$环烷基;$C_1$-$C_{12}$卤代烷基;$C_1$-$C_{12}$烷氧基;$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基;$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基;$(CH_2)_{x'}(OCH_2-CH_2)_{y'}OCH_3$,其中每个x'独立地是0至20的整数,每个y'独立地是0至50的整数;和$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基。

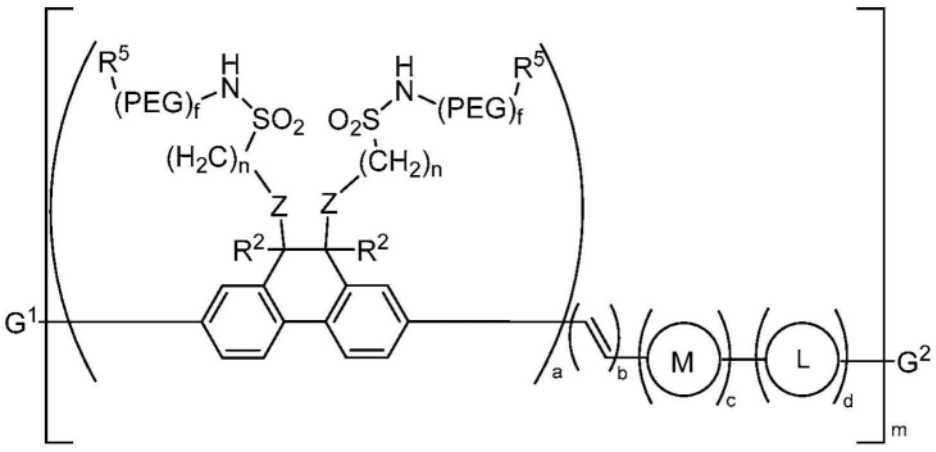
[0277] 在一些情况下,荧光聚合物染料可具有式VII结构:

[0278] 

(VII)，

[0279] 其中X、Y、$R^2$、$R^3$、$G^1$、$G^2$、L、M、Q、Z、a、b、c、d、m和n如先前所限定。

[0280] 在一些情况下，荧光聚合物染料可具有式VIII结构：

[0281] 

(VIII)，

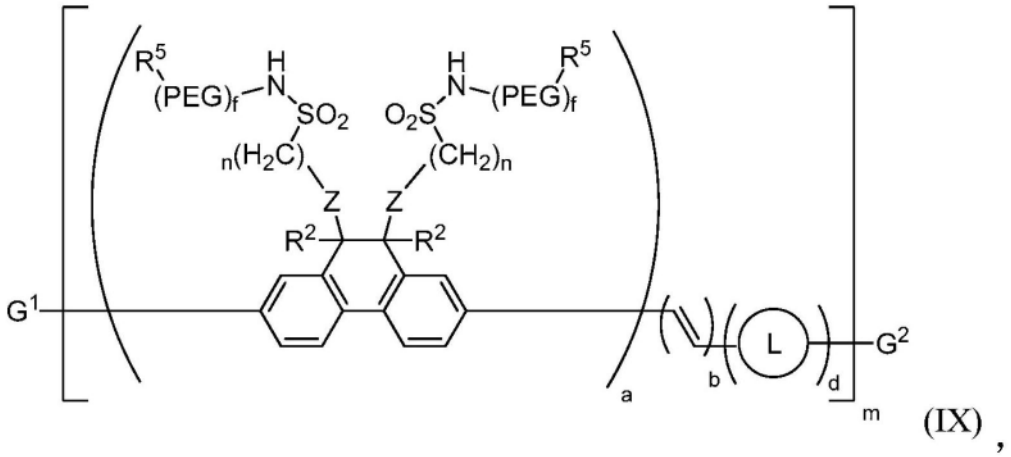
[0282] 其中

[0283] X、Y、$R^2$、$R^4$、$R^5$、$G^1$、$G^2$、L、M、Q、Z、a、b、c、d、m和n如先前所限定；

[0284] 每个f独立地是0至50的整数；并且

[0285] 并且每个$R^5$独立地选自H、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基和$C_1$-$C_{12}$烷氧基。

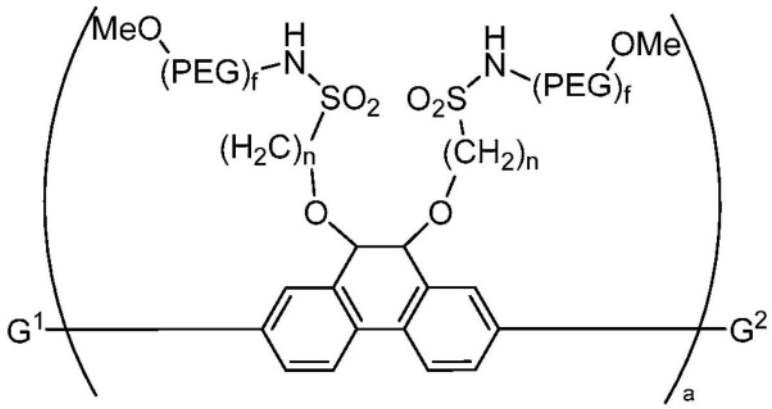
[0286] 在一些情况下，荧光聚合物染料可具有式IX结构：

[0287] 

(IX),

[0288] 其中$R^2$、$R^4$、$R^5$、$G^1$、$G^2$、L、Z、a、b、d、f、m和n如先前所限定。

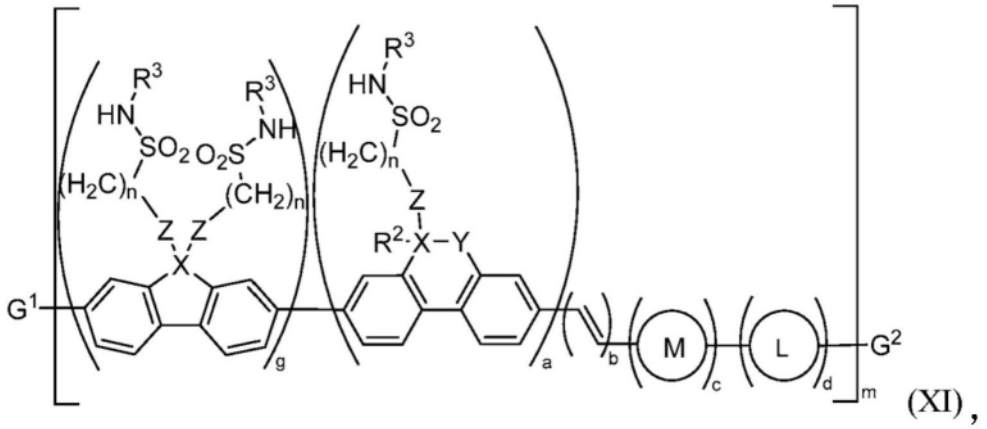
[0289] 在一些情况下,荧光聚合物染料可具有式X结构:

[0290] 

(X),

[0291] 其中$G^1$、$G^2$、a、f和n如先前所限定。

[0292] 在一些情况下,荧光聚合物染料可以是具有式XI结构的共聚物:

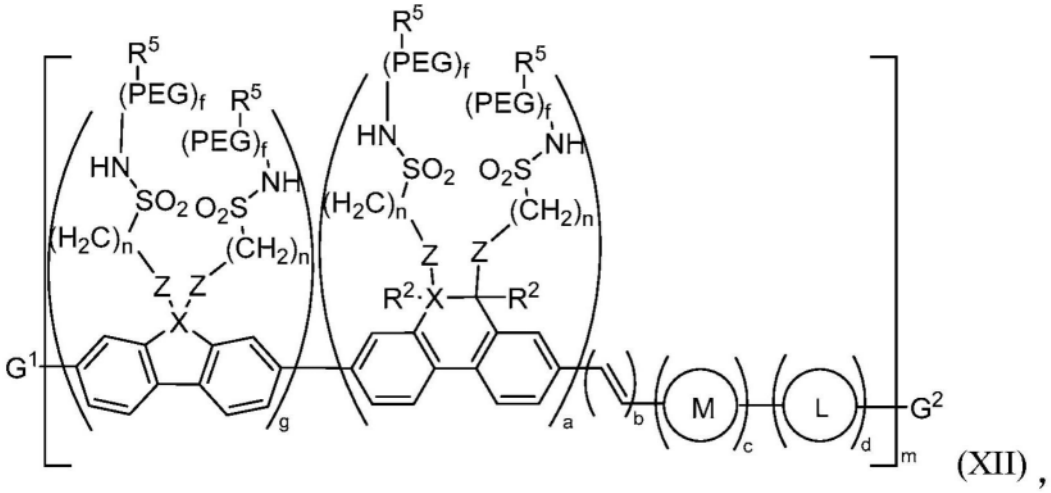
[0293] 

(XI),

[0294] 其中X、Y、$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$G^1$、$G^2$、L、M、Q、Z、a、b、c、d、m和n如先前所限定;并且

[0295] g和a一起为10%至100%的mol%。

[0296] 在一些情况下,荧光聚合物染料可以是具有式XII结构的共聚物:

[0297] 
(XII),

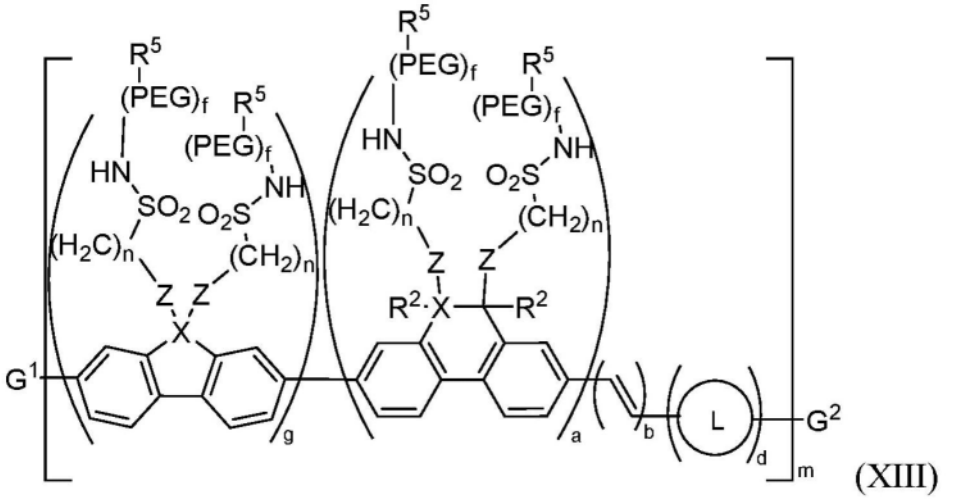
[0298] 其中

[0299] X、Y、$R^2$、$R^4$、$R^5$、$G^1$、$G^2$、L、M、Q、Z、a、b、c、d、m和n如先前所限定;

[0300] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0301] 每个g和a一起为10％至100％的mol％。

[0302] 在一些情况下,荧光聚合物染料可以是具有式XIII结构的共聚物:

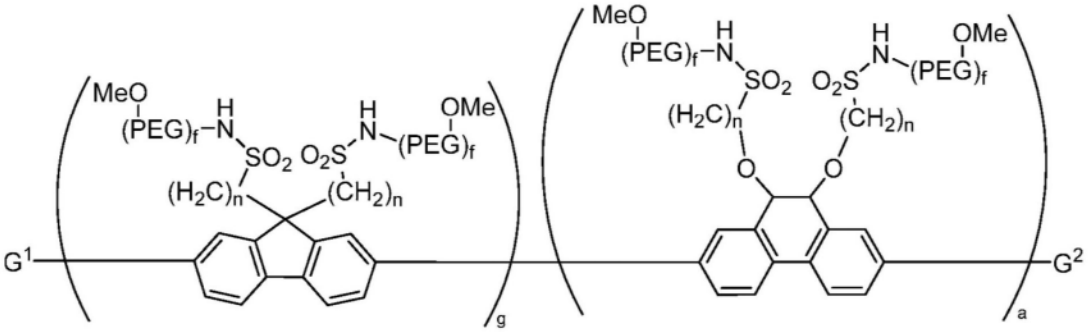
[0303] 
(XIII),

[0304] 其中

[0305] X、$R^2$、$R^4$、$R^5$、$G^1$、$G^2$、L、Z、a、b、d、f、m和n如先前所限定;并且

[0306] 每个g和a一起为10％至100％的mol％。

[0307] 在一些情况下,荧光聚合物染料可以是具有式XIV结构的共聚物:



(XIV)

[0308] 其中

[0309] $G^1$、$G^2$、a、f和n如先前所限定;并且

[0310] 每个g和a一起为10％至100％的mol％。

[0311] 荧光聚合物染料可通过水溶性单体(例如单体A和单体B)聚合来制备,这导致形成高度缀合的荧光骨架。可使用合适的官能度通过活化在聚合物上进行加帽,这导致聚合物能够与结合配偶体缀合。或者,单体A或单体B可通过使用合适的官能度来活化而直接修饰,例如根据US 2020/0190253,其通过引用整体并入本文。经活化的聚合物可与结合配偶体缀合。可使用任何合适的结合配偶体(例如抗体),然后例如通过使用标准操作进行纯化。

[0312] 聚合物染料是市售的。例如,SuperNova™(“SN”)v428(Beckman Coulter,Inc.)是聚合物染料,其由激发最大值为414nm、发射峰为428nm的紫色激光(405nm)最佳激发,并且可使用450/50带通滤波器或等效物进行检测。SN v428是明亮的聚合物染料,其可用胺活化以用于串联染料,随后通过活化以用于串联缀合物。聚合物染料结构的刚性可有助于降低旋转能量,导致更亮的发射。这可有助于实现优化的FRET(荧光共振能量转移)效率和提高的稳定性。

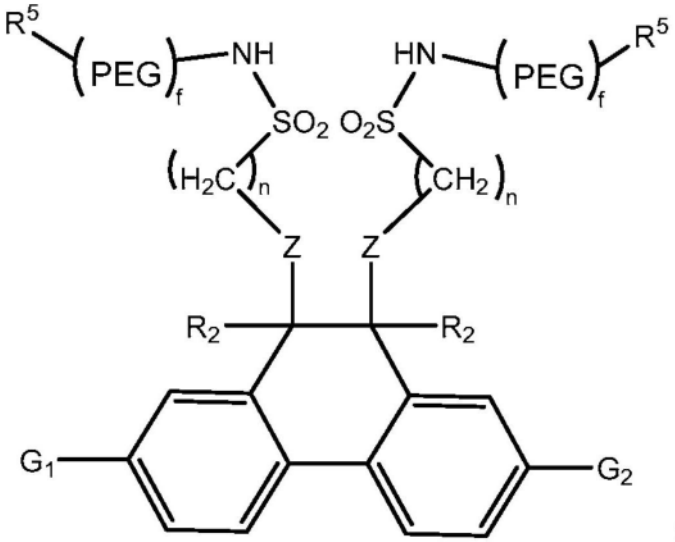
[0313] SN v428是可由紫色激光激发的最亮染料之一,因此其特别适合于评估表达发暗的标志物。SN缀合的抗体可包括抗CD19抗体-SN v428、抗CD22抗体-SN v428、抗CD25抗体-SN v428和抗CD38抗体-SN v428抗体-聚合物染料缀合物。SN v605和SN v786(Beckman Coulter,Inc.)是串联聚合物染料,其来源于核心SN v428聚合物染料。两者共用相同的吸光度特征,其中最大激发在414nm下。在SN v605和SN v786的发射峰分别在605nm和786nm下的情况下,使用流式细胞仪的610/2和780/60nm带通滤波器对其进行最佳检测。

[0314] 荧光聚合物染料可以是从Becton Dickinson商购的荧光聚合物染料,包括Brilliant™蓝色、Brilliant™紫色和Brilliant™紫外染料。荧光聚合物染料可以是从ThermoFisher Scientific商购的荧光聚合物染料,包括Super Bright 436、Super Bright 600、Super Bright 645、Super Bright 702和Super Bright 780染料。

[0315] 水溶性单体

[0316] “水溶性单体”可以是单体单元,该单体单元包含芳基部分或杂芳基部分,各自任选地具有与其连接的一个或更多个水溶性部分。水溶性部分可以是一个或更多个PEG部分。水溶性单体可适用于制备具有单体A亚基、单体B亚基或单体A和单体B亚基的组合的多种荧光聚合物染料中的至少一种。水溶性单体可以是基于二氢菲(DHP)的水溶性单体。水溶性单体可以是基于芴的水溶性单体。

[0317] 水溶性单体可以是具有根据式(I)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的单体：

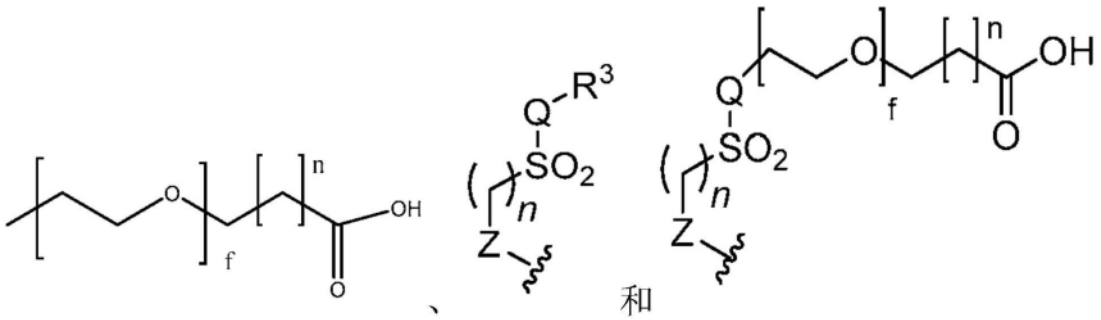
[0318] 

(I)，

[0319] 其中

[0320] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、脲、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

[0321] 每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、

[0322] 

、 和 ；

[0323] 每个$R^3$是水溶性部分；

[0324] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、脲、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

[0325] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基；

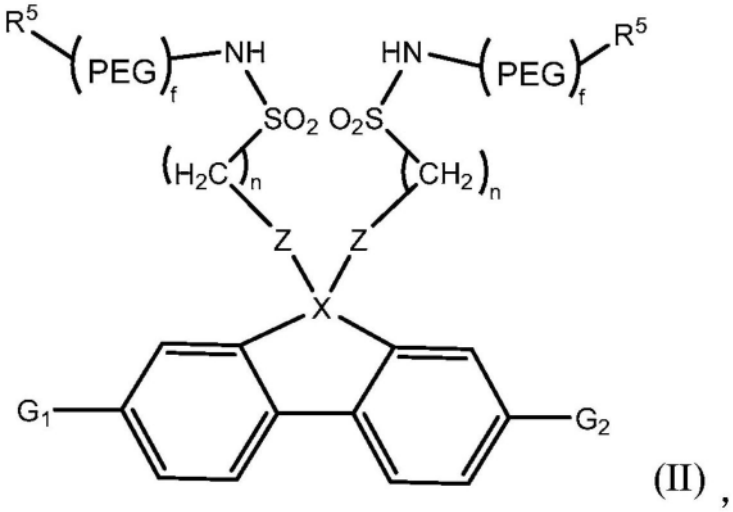
[0326] 每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$；

[0327] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$;

[0328] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0329] 每个n独立地是1至20的整数。

[0330] 水溶性单体可以是具有根据式(II)的化学结构的基于芴的单体:

[0331] 

(II),

[0332] 其中

[0333] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇;

[0334] 每个X是C或Si;

[0335] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

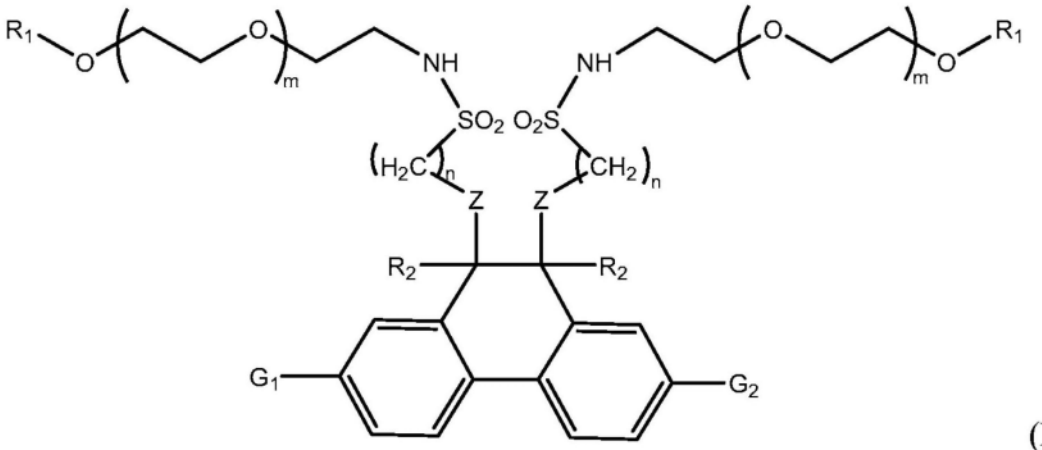
[0336] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基;

[0337] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$,

[0338] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0339] 每个n独立地是1至20的整数。

[0340] 水溶性单体可以是具有根据式(III)的化学结构的基于二氢菲(DHP)的单体:

[0341] 

(III)，

[0342] 其中每个$G_1$、$G_2$独立地是卤素(F、Cl、Br、I)；每个Z独立地选自O、$CH_2$和NH；每个$R_1$独立地是烷基($C_1$-$C_3$)；每个$R_2$独立地是H、烷基($C_1$-$C_6$)；每个n独立地是1至6；并且每个m独立地是5至50。在一些实施方案中，$G_1$、$G_2$各自是Br；每个Z是O；每个$R_1$是$CH_3$；每个$R_2$是H；每个n独立地是2至4；并且每个m独立地是5至20。在一些实施方案中，每个n是3；并且每个m独立地是11或12。

[0343] 经标记的结合配偶体

[0344] 染料可通过位于结合配偶体和标记中的反应性对之间的多种连接化学而与结合配偶体缀合。反应性对可包括但不限于马来酰亚胺/硫醇、琥珀酰亚胺酯(NHS酯)/胺、叠氮化物化学、羧基/EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐)/胺、胺/磺基-SMCC(磺基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基乙基]环己烷-1-羧酸酯)/硫醇和胺/BMPH(N-[~-马来酰亚胺基丙酸]酰肼.TFA)/硫醇。

[0345] 荧光聚合物染料的特征在于缀合聚合物链上的末端，其可以包含提供以用于缀合的官能团。在某些情况下，这样的官能度被称为末端接头。用这些末端接头，可以形成共价键以连接结合配偶体(例如如蛋白质、肽、亲和配体、抗体、抗体片段、多核苷酸或适配体)。另外，正交官能团可以沿缀合聚合物链安置(install)，其可以用于供体接受体聚合物串联染料中接受体信号传导发色团的缀合或连接。

[0346] 用于进行缀合的方法是本领域公知的。用于进行缀合的市售试剂盒也是容易获得的，例如来自Innova Biosciences(Cambridge,UK)、Novus Biologicals(Littleton,Colo.)、Thermo Fisher Scientific(Waltham,Mass.)的试剂盒。

[0347] 干燥过程

[0348] 干燥试剂技术可用于提高生物分子的稳定性。干燥过程可用于产生均匀的试剂层(例如在管的底部)。干燥试剂不需要冷藏。干燥试剂可以在室温下储存。抗体组可以以一次性混合物的形式提供。抗体组可以以多种基底(包括管或板形式)提供。试剂可用于干燥所缀合抗体，使其稳定以用于室温储存。可以定制试剂形式以组合不同的试剂，产生抗体混合物。抗体混合物可以包含多种抗体-染料-缀合物，例如，一种或更多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种、10种或更多种、11种或更多种、或者12种或更多种抗体-缀合物、或者1至20种、2至15种或3至12种不同的抗体-染料缀合物。

[0349] 干燥试剂技术可允许能够对具有混合物的计数(enumeration)珠进行干燥。结合

配偶体-染料缀合物,包括抗体-染料和抗体-聚合物染料缀合物可用于流式细胞术测定。可以采用任何适当的干燥过程来干燥试剂,从而在管或孔的底部产生均匀的层。

[0350] 包含牺牲蛋白、碳水化合物稳定剂、抗微生物剂和缓冲剂的现有技术“试剂缓冲剂”制剂(RB)先前被开发用于在不改变功能(对抗原的亲和力)和物理特性(例如亮度或荧光)的情况下在单个管中干燥不同的单体缀合物染料。现有技术RB制剂不包含两性离子表面活性剂或水溶性单体。物理特性是指缀合物的亮度及其到其他通道中的溢出。

[0351] 如图1A中所示,当使用现有干燥技术进行干燥并用血液样品重构时,使用单体CD4-PE染料缀合物表现出期望的流式细胞术结果;包括CD4 PE单核细胞和CD4 PE+淋巴细胞群体的期望功能、物理特性和分辨率。类似地,如图1B中所示,当使用现有领域的技术进行干燥并用血液样品重构时,单体CD20 APC染料缀合物表现出期望的流式细胞术结果;包括CD20 APC+细胞群体的期望功能、物理特性和分辨率。

[0352] 发现现有干燥技术(例如RB)当用于对管中的两种或更多种聚合物染料缀合物进行干燥时,改变了聚合物结构的完整性,导致聚合物染料缀合物的聚集。聚集提高了非特异性相互作用并产生染色伪影。图2A和2B描绘了当使用现有干燥技术对两种聚合物染料缀合物进行干燥时,由于聚合物染料缀合物的聚集,现有技术不能求解使用聚合物染料染色的细胞群体。

[0353] 图2A示出了当在不存在补偿的情况下混合并使用现有干燥技术进行干燥时CD20-SNv605和CD4-SNv786聚合物染料抗体缀合物的不期望的流式细胞术结果。表现出了非特异性相互作用和无法求解x轴和y轴上的群体。

[0354] 图2B示出了当在存在补偿的情况下混合并使用现有干燥技术进行干燥时CD20-SNv605和CD4-SNv786聚合物染料抗体缀合物的不期望的流式细胞术结果。当使用现有干燥技术对两种聚合物染料进行干燥时,无法阻止非特异性相互作用被认为是由于聚合物染料抗体缀合物的聚集。

[0355] 因此,存在对新的缓冲剂组合物的需要,以在干燥时保持荧光聚合物染料缀合物的稳定并降低聚集。

[0356] 为了克服上述技术问题,最初荧光染料缀合物在混合时应稳定在其液态。发现两种荧光染料缀合物的混合物,即使在液态下,当混合在一起时,也导致非特异性相互作用提高,但溢出可以得到补偿。为了克服液态的限制,对商业缓冲剂进行了测试,包括来自BD Biosciences(Brilliant Stain Buffer,目录号:563794)和Thermo Fisher(Super Bright Complete Staining Buffer,目录号:SB-4401-42)的缓冲剂。在聚合物染料缀合物的干燥期间使用Brilliant Stain Buffer或Super Bright Complete Staining Buffer不能解决较差的稳定性和聚集性的问题。

[0357] 采用了其他技术来对荧光染料缀合物进行干燥,该技术涉及将荧光染料缀合物分别膜固定到基底上,如US2019/0242882中所述,其通过引用并入本文。从这些尝试中得出的结论是,荧光染料缀合物可以在不同的点分别干燥到基底膜上,但两种荧光染料缀合物不能混合并干燥。分别对聚合物染料缀合物进行干燥的缺点包括以下事实:将荧光染料缀合物干燥到纤维素膜上涉及偏离当前干燥技术、将纤维素膜维持在DURAClone™管基底内的不便、以及接受在具有高补偿值的情况下其他通道中的溢出。这些实验表明,只有在存在形成屏障并在干燥过程期间保持每种荧光染料缀合物的特征(individuality)的缓冲剂的情况

下,才可以干燥超过一种荧光染料缀合物。

[0358] 荧光染料缀合物可用于多色干燥试剂(例如,DURAClone™ Tubes,Beckman Coulter,Inc.)。多色干燥试剂是不同荧光染料缀合物(CD4-FITC、CD8-PE、CD20-APC、CD3-PC5.5等)的混合物,其可直接用于对血液进行染色并在流式细胞仪中进行分析。与现有单体缀合染料相比,聚合物染料缀合物在其结构和复杂性上有所不同。

[0359] 为了获得具有不同缀合物的多色干燥试剂混合物,采用了现有干燥技术。常规染料(例如FITC、PE、ECD、PC5、PC5.5、PC7、APC、AA700、AA750、PBE和KrO)可以使用现有干燥技术进行干燥。

[0360] 随着聚合物染料缀合物的引入,在对混合物中的多种聚合物染料抗体缀合物进行干燥时,发现现有干燥技术是无效的。这些聚合物染料缀合物倾向于非特异性相互作用,并导致难以求解群体,这可导致在鉴定给定样品中的期望细胞群体方面具有挑战。

[0361] 组合物

[0362] 为了克服现有干燥技术的局限性,开发了新的“干燥混合物”(“Dry Mix”,“DM”)缓冲剂,其可用于对染料混合物中的一种或更多种荧光(聚合物或单体)染料缀合物进行干燥。染料混合物可包含超过一种荧光聚合物染料缀合物。染料混合物可包含超过一种常规非聚合物荧光染料缀合物。染料混合物可包含一种或更多种荧光聚合物染料缀合物和一种或更多种常规非聚合物荧光染料缀合物的组合。

[0363] 荧光染料缀合物可与其他常规染料一起在混合物中干燥。根据实施例1的方案评价了在DM缓冲剂制剂中使用的数种组分。在DM缓冲剂开发期间评价的这些组分的实验结局在表1中示出。

[0364] 本发明的DM缓冲剂制剂将通常为水溶液,其包含水溶性单体、蛋白质稳定剂、碳水化合物稳定剂、两性离子表面活性剂、以及任选地着色剂和任选地防腐剂。

[0365] 溶液中使用的稳定剂可包含蛋白质稳定剂(例如牛血清白蛋白、明胶、酪蛋白)和碳水化合物稳定剂(例如海藻糖、右旋糖、蔗糖)。在一些实施方案中,稳定剂可以促进干燥组分附着至基底,使得其保持在管的底部并且当反应容器打开时不会被吹走或黏附至盖。DM缓冲剂组合物每次测试可包含:200至800μg的水溶性单体;2000至3000μg的碳水化合物稳定剂;8.4至72μg的蛋白质稳定剂;以及2至15μg的两性离子表面活性剂。

[0366] 稀释剂

[0367] 用于DM缓冲剂的稀释剂可选自水和等张缓冲液。水可以是去离子水(DI水)。等张缓冲液可以是PBS(磷酸缓冲盐水)缓冲液。

[0368] 蛋白质稳定剂

[0369] 术语“蛋白质稳定剂”是指这样的蛋白质:用于降低非特异性结合,例如,用于降低细胞-细胞相互作用,或用于帮助阻止抗体与非靶分子之间的非特异性结合。蛋白质稳定剂可包含牛血清白蛋白(BSA)、多种明胶和酪蛋白。在DM缓冲剂组合物中评价了多种蛋白质稳定剂,如表1中所示。蛋白质稳定剂可以是酪蛋白。蛋白质稳定剂可以是明胶。在一些实施方案中,蛋白质稳定剂可以是BSA。在一些实施方案中,蛋白质稳定剂不是BSA。干燥缓冲剂可以包含一种或更多种蛋白质稳定剂。

[0370] 明胶(Gelatin)或明胶(gelatine)是蛋白质,其通常来源于取自动物身体部分的胶原蛋白。其在干燥时易碎,并且在潮湿时有黏性。其也可称为水解胶原蛋白、胶原蛋白水

解物、明胶水解物、水解明胶和明胶进行水解之后的胶原蛋白肽。数种类型的明胶是市售的,包括A型明胶、B型明胶、Prionex®高纯度A型明胶和冷水鱼明胶。这些中的每一种都被评价为候选DM缓冲剂组分。如表1中所报道的,与相应的液体混合物相比,干燥形式的A型明胶表现出更多的阴性群体扩散。B型明胶干燥混合物能够阻止非特异性相互作用,但储备液的制备是困难的。B型明胶的有效浓度在150微克/测试至450微克/测试的范围内。浓度等同于B型明胶的Prionex®高纯度A型明胶在阻止非特异性相互作用方面是有效的,但稳定性稍微降低。对Prionex®高纯度A型明胶的现成溶液的浓度进行定量,并且有效的干燥混合物浓度在67微克/测试至135微克/测试的范围内。冷水鱼明胶在性能方面等同于B型明胶。冷水鱼明胶的有效浓度在150微克/测试至450微克/测试的范围内。

[0371] 酪蛋白是磷蛋白家族(αS1、αS2、β和κ)。这些蛋白质存在于哺乳动物乳中,占存在于牛乳中的蛋白质的约80%。一种常见的形式是酪蛋白酸钠。酪蛋白含有大量脯氨酸氨基酸残基,其阻碍蛋白质常见二级结构基序的形成。酪蛋白不含二硫桥,因此具有相对少的三级结构。酪蛋白10×封闭缓冲剂(在约14mg/mL至约18mg/mL的范围内)用作干燥混合物组分之一。5×(2倍稀释)和2.5×(4倍稀释)浓度的酪蛋白可以有效地阻止两种聚合物染料抗体缀合物的相互作用以及一种更多种聚合物缀合物的加入。

[0372] 碳水化合物稳定剂

[0373] “碳水化合物稳定剂”是用于帮助提高染料抗体缀合物在溶液中、干燥至基底时和/或用生物样品重建时的稳定性的碳水化合物分子。

[0374] 评价了候选多糖。角叉菜胶(carrageenan)是硫酸化阴离子多糖。发现角叉菜胶储备液的制备具有挑战性。将角叉菜胶添加至DM缓冲剂组合物提高了粒细胞的非特异性结合。藻酸钠是藻酸的钠盐,藻酸是包含(1->4)连接的β-D-甘露糖酸酯(mannuronate)和α-L-古洛糖醛酸酯(guluronate)残基的同聚嵌段的线性多糖。当将藻酸钠添加至DM缓冲剂组合物时,储备液的制备是困难的,并且粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的总体扩散更高。

[0375] 碳水化合物稳定剂可以是二糖。二糖可以是海藻糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、蜜二糖、或其水合物、或其盐。在一些实施方案中,二糖是海藻糖或其水合物。海藻糖是在两个α-葡萄糖单元之间具有1,1-糖苷键的非还原性二糖。海藻糖可以是海藻糖二水合物。二糖稳定剂可以以约2000至约3000微克/测试、或约2200微克至约2800微克/测试、或约2500微克/测试的范围存在,或在储备制剂中以约400mg/mL的水性缓冲溶液存在。

[0376] 还评价了海藻糖衍生物,包括海藻糖癸酸酯、海藻糖十四烷酸酯和海藻糖十六烷酸酯。对于在等同于海藻糖二水合物的剂量下的所有这三种,化合物完全裂解所有细胞,并且降低剂量将不使管干燥。

[0377] 表面活性剂

[0378] 探索了多种类型的表面活性剂,以用于阻止DM缓冲剂制剂中的非特异性相互作用。(参见表1)。

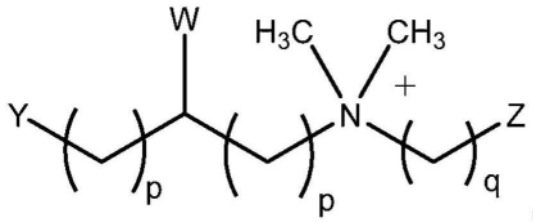
[0379] 评价了阴离子表面活性剂,包括具有烷基为至少十个碳的烷基硫酸酯/盐和烷基磺酸酯/盐。N-月桂基肌氨酸钠盐,也称为sarkosyl、$CH_3(CH_2)_{10}CO-N(CH_3)-CH_2COONa$,是阴离子表面活性剂。发现N-月桂基肌氨酸钠盐阻止单核细胞和粒细胞的非特异性结合,但不能阻止聚合物-聚合物相互作用。木质素磺酸(Lignosulfonic acid,“LSA”),3-(2-羟基-3-甲氧基苯基)-2-[2-甲氧基-4-(3-磺丙基)苯氧基]丙烷-1-磺酸,是阴离子表面活性剂。当添

加LSA时,与DM缓冲剂相比,SN v605和SN v786群体的阴性背景提高。

[0380] 评价了非离子表面活性剂在DM缓冲剂制剂中的可能用途。测试了作为非离子表面活性剂的聚山梨醇酯80。术语“酯连接的非离子表面活性剂”是指含有通过酯键联连接或包含酯键联的疏水性和亲水性基团的非离子有机化合物。酯连接的非离子表面活性剂的一些实例包括聚氧乙烯二醇脱水山梨糖醇酯(聚山梨醇酯,TWEEN)、脱水山梨糖醇烷基酯(Span)。在SN v605缀合物下群体的非特异性单核细胞拉出和扩散被干燥混合物中的0.015%和0.075%聚山梨醇酯80抑制(contain)。

[0381] 评价了两性离子表面活性剂在DM缓冲剂制剂中的可能用途。在DM缓冲剂组合物中评价了两性离子表面活性剂:Empigen® BB(Huntsman Corporation),也称为N,N-二甲基-N-十二烷基甘氨酸,或N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱;3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基丙烷磺酸酯(DMMA),也称为3-(N,N-二甲基十四烷基氨基)丙烷磺酸酯、肉豆蔻基磺基甜菜碱、$CH_3(CH_2)_{13}N^+(CH_3)_2CH_2CH_2CH_2SO_3^-$);和3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯(DMPA),也称为Zwittergent® 3-16洗涤剂(Merck KGaA,Darmstadt,Germany)。Empigen® BB可以阻止单核细胞和粒细胞的非特异性结合,但不能阻止聚合物相互作用。DMPA在室温下沉淀,但在功能上与Empigen® BB等同。DMPA的有效浓度范围为0.002%至0.006%。DMMA在功能上与Empigen® BB等同,因此考虑进行进一步测试。发现DMMA的有效浓度在0.002%至0.037%、或0.004%至0.018%的范围内。

[0382] 在一些实施方案中,两性离子表面活性剂具有根据式(XV)的化学结构:

[0383] 

(XV),

[0384] 其中Y=$CO_2^-$或$SO_3^-$,W=H或OH,Z=$CH_3$或NHC(O)R,其中R=$C_{1-15}$烷基;独立地,每个p=0或1;并且q=0至21。在一些实施方案中,W=H,Z=$CH_3$,并且q=11至15。在一些实施方案中,两性离子表面活性剂可以是DMMA、DMPA、N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱、月桂基羟基磺基甜菜碱、月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基甜菜碱、鲸蜡基甜菜碱、癸基甜菜碱、月桂基甜菜碱、山嵛基甜菜碱(behanyl betaine)、椰油酰胺丙基甜菜碱或椰油酰胺丙基羟基甜菜碱。在一些实施方案中,两性离子表面活性剂可以是DMMA、DMPA、N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱。

[0385] 抗氧化剂

[0386] 抗氧化剂化合物被评价为DM缓冲剂制剂的候选组分。抗氧化剂可包含一个或更多个、两个或更多个、或者三个或更多个羧酸或羧酸酯/盐部分以及$C_1$-$C_8$或$C_2$-$C_6$脂族部分。脂族部分可以是直链、支链或环烷基或烯基部分。例如,L-抗坏血酸和柠檬酸被评价为抗氧化剂。在SN v605缀合物下非特异性单核细胞拉出在0.2mM和0.6mM浓度的L-抗坏血酸下较少。0.6mM L-抗坏血酸具有在V610通道中SN v786阳性群体的较少扩散。柠檬酸在所有浓度下

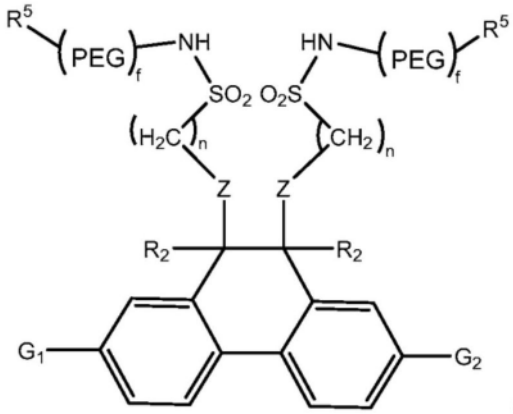
降低了粒细胞的脱颗粒,并且在SN v605缀合物下非特异性单核细胞拉出较少。然而,柠檬酸在抑制群体扩散方面没有另外的影响。

[0387] 单体

[0388] 为了阻止荧光染料缀合物之间并且特别是荧光聚合物染料缀合物之间的非特异性相互作用,研究了多种水溶性单体种类。所用的单体选自用于制备缀合聚合物染料的合成单体。聚合物染料可以是水溶性缀合聚合物,包括具有单体A亚基和单体B亚基的荧光聚合物。例如,单体A或单体B可包含DHP。聚合物染料和单体描述于US2020/0190253中,其整体通过引用并入本文。在一些实施方案中,可使用含有DHP骨架的缀合聚合物染料。在一些实施方案中,研究了具有基于9,10-二氢菲DHP的结构的单体A在DM缓冲剂组合物制剂中的用途,并根据实施例1进行了测试。

[0389] 水溶性单体可以是单体单元,该单体单元包含芳基部分或杂芳基部分,各自任选地具有与其连接的水溶性部分。水溶性部分可以是一个或更多个PEG部分。水溶性单体可适用于制备具有单体A亚基、单体B亚基或单体A和单体B亚基的组合的多种荧光聚合物染料中的至少一种。水溶性单体可以是基于DHP的水溶性单体。水溶性单体可以是基于芴的水溶性单体。

[0390] 水溶性单体可以是具有根据式(I)的化学结构的基于DHP的单体:

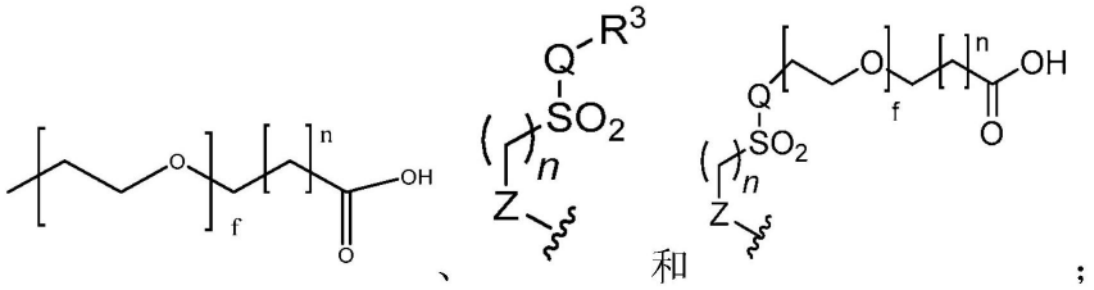
[0391] 

(I),

[0392] 其中

[0393] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP),芳基或杂芳基,其被一个或更多个侧链取代,所述侧链被选自以下的官能团封端:胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇;

[0394] 每个$R^2$独立地选自水溶性部分、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、(杂)芳基氧基、(杂)芳基氨基、磺酰胺-PEG、膦酰胺-PEG、烷基铵盐、烷基氧基铵盐、寡聚醚铵盐、烷基磺酸盐、烷氧基磺酸盐、寡聚醚磺酸盐、磺酰胺基寡聚醚、磺酰胺、亚磺酰胺、膦酰胺酸酯、次膦酰胺、

[0395] 

[0396] 每个$R^3$是水溶性部分；

[0397] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团；

[0398] 每个$R^5$独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基；

[0399] 每个Q独立地是键、$NR^4$或-$CH_2$；

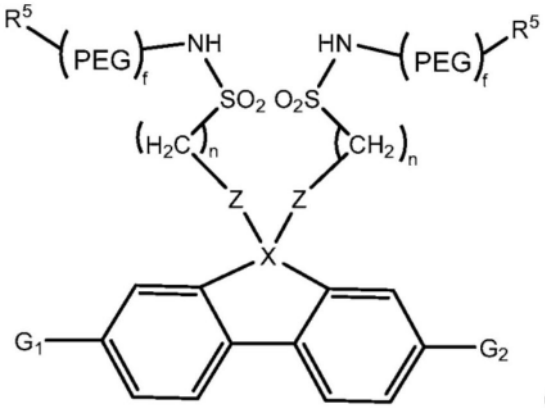
[0400] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$；

[0401] 每个f独立地是0至50的整数；并且

[0402] 每个n独立地是1至20的整数。

[0403] 在一些实施方案中，每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素(F、Cl、Br、I)、$C_1$-$C_6$烷基和PEG。

[0404] 水溶性单体可以是具有根据式(II)的化学结构的基于芴的单体：

[0405] 

(II)，

[0406] 其中

[0407] 每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素、烷基、PEG、氢、炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸盐/酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸盐/酯、磷酸盐/酯、任选经取代的四氢芘(THP)、任选经取代的芴、任选经取代的二氢菲(DHP)，芳基或杂芳基，其被一个或更多个侧链取代，所述侧链被选自以下的官能团封端：胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸盐/酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛和硫醇；

[0408] 每个X是C或Si；

[0409] 每个$R^4$独立地选自H、烷基、PEG、水溶性部分、接头部分、发色团、羧酸胺、胺、氨基甲酸盐/酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化

物、炔烃、醛、或硫醇、或其被保护基团;

[0410] 每个R5独立地选自H、羟基、$C_1$-$C_{12}$烷基、$C_2$-$C_{12}$烯烃、$C_2$-$C_{12}$炔烃、$C_3$-$C_{12}$环烷基、$C_1$-$C_{12}$卤代烷基、$C_1$-$C_{12}$烷氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氧基、$C_2$-$C_{18}$(杂)芳基氨基、$C_2$-$C_{12}$羧酸、$C_2$-$C_{12}$羧酸酯和$C_1$-$C_{12}$烷氧基;

[0411] 每个Z独立地是$CH_2$、O或$NR^4$,

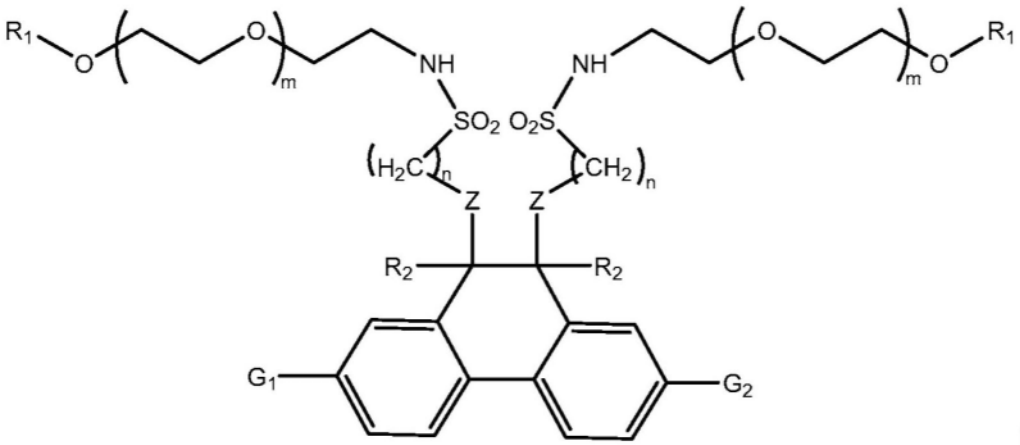
[0412] 每个f独立地是0至50的整数;并且

[0413] 每个n独立地是1至20的整数。

[0414] 在一些实施方案中,每个$G_1$、$G_2$独立地选自卤素(F、Cl、Br、I)、$C_1$-$C_6$烷基和PEG。

[0415] 水溶性单体可以是具有根据式(III)的化学结构的基于DHP的单体:

[0416]



(III),

[0417] 其中每个$G_1$、$G_2$独立地是卤素(F、Cl、Br、I);每个Z独立地选自O、$CH_2$和NH;每个$R_1$独立地是烷基($C_1$-$C_3$);每个$R_2$独立地是H、烷基($C_1$-$C_6$);每个n独立地是1至6;并且每个m独立地是5至50。在一些实施方案中,$G_1$和$R_2$各自是Br;每个Z是O;每个$R_1$是$CH_3$;每个$R_2$是H;每个n独立地是2至4;并且每个m独立地是5至20。在一些实施方案中,每个n是3;并且每个m是11。

[0418] 特定单体A和单体B种类的化学结构在图4中示出。发现如图4中所示的单体A可以阻止两种SN缀合物之间的非特异性相互作用。发现有效浓度在200至800微克/测试(50uL)的范围内。然而,单体B不能阻止两种SN缀合物之间的非特异性相互作用,并且还显示出对阴性细胞的一些非特异性结合。

[0419] 不受理论的束缚,假设单体A与聚合物骨架随机相互作用并因此阻止两种聚合物缀合物之间的相互作用。相比之下,蛋白质稳定剂(例如明胶或酪蛋白)由于其黏性性质,可能掩蔽这些染料缀合物并防止它们紧密接近地靠近。

[0420] 防腐剂

[0421] 水性DM缓冲剂组合物可包含任何合适的防腐剂。防腐剂可以是抗氧化剂、杀生物剂或抗微生物剂。防腐剂可以是无机盐。防腐剂可以是叠氮化钠、2-氯乙酰胺、2-甲基异噻唑啉酮、水杨酸、ProClin™、Kathon™ CG、5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮或2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮。

[0422] 着色剂

[0423] 水性DM缓冲剂组合物可以包含着色剂。着色剂可以是FD&C着色剂。着色剂可以是例如诱惑红(FD&C红40,6-羟基-5-[(2-甲氧基-5-甲基-4-磺酸根基苯基)偶氮]-2-萘磺酸二钠)。

[0424] 聚合物

[0425] 还研究了不同溶剂中的荧光聚合物染料以用于制备DM缓冲剂组合物。然而,与液体混合物相比,表现出了阴性群体的更多扩散。

[0426] 根据测试的不同试剂,首先配制含有海藻糖二水合物、单体A、B型明胶和Empigen®BB两性离子表面活性剂的DM缓冲剂。

[0427] 以DM缓冲剂的形式开发了初始技术解决方案,用于对荧光染料缀合物进行干燥,以维持染料结构的完整性,降低聚集。在一个实施方案中,具有明胶和单体A的DM缓冲剂制剂降低了在干燥过程期间的聚集问题。在现有干燥技术中的最佳蛋白质稳定剂浓度以及单体和明胶的最佳浓度下,DM有助于维持荧光染料缀合物的完整性,并解决了在荧光染料缀合物干燥期间与聚集相关的问题。

[0428] DM缓冲剂包含:水溶性单体;蛋白质稳定剂;碳水化合物稳定剂;以及两性离子表面活性剂。DM缓冲剂可包含水溶性单体,所述水溶性单体包含基于DHP的单体和一个或更多个或者两个或更多个聚(乙二醇)部分。水溶性单体可包含根据式(I)的结构。蛋白质稳定剂可以是白蛋白。蛋白质稳定剂可以是明胶蛋白质。蛋白质稳定剂可以包含酪蛋白。

[0429] 随后,进一步改进了DM缓冲剂以用于阻止SuperNova™缀合物之间的非特异性相互作用以及非特异性单核细胞拉出,其被命名为“DM2”(DM 2)。DM2含有海藻糖二水合物、单体A、Prionex®A型明胶和DMMA表面活性剂。

[0430] 为了提高稳定性,通过用酪蛋白10×封闭缓冲剂代替Prionex®A型明胶,进一步优化了DM2。该缓冲剂被命名为“DM2+S”(稳定剂)。表2中提供了最终制剂中存在的添加剂。发现DM2+S缓冲剂的pH为7至7.4。使用DM2+S产生的干燥管导致对SuperNova™缀合物的非特异性相互作用的阻止以及对非特异性拉出的阻止,而不阻碍混悬在混合物中的缀合物的性能(亮度和群体募集),并实现了干燥产物的较大稳定性(迄今为止6个月实时稳定性已经建立)。在干燥管的制备中,使用了SuperNova™缀合物的整体(bulk)制剂。

[0431] 实施例

[0432] 实施例1A.测试程序

[0433] 下面给出了本实施例中使用的一般过程和程序:

[0434] 干燥:本文中使用的术语干燥是指在特定真空压力下进行一定小时数的真空干燥。

[0435] 混合两种缀合物:混合两种缀合物是指在5ml管中混合两种缀合物。

[0436] 液体测试:术语液体测试是指在试管中将缀合物混合在一起(液体混合物),随后使用经混合的缀合物对细胞进行染色。

[0437] 干燥测试:术语干燥测试是指在试管中将缀合物混合在一起,并使用真空干燥进行干燥,随后使用经干燥的缀合物对细胞进行染色。

[0438] 本文中使用的测试是指以下方案:

[0439] 1.准备所需的x数目的管。(x个管取决于测试的性能)。

[0440] 2.将计算体积的缀合抗体(按所需剂量)添加至每个管,或将经干燥的试管用于下一步。

[0441] 3.在每个管中添加100μL全血。将管轻轻涡旋6至8秒。

[0442] 4.在室温(18℃至27℃)下避光孵育15至20分钟。

[0443] 5.添加2ml VersaLyse+IOTest3固定剂混合物(2ml Versolyse Ref.A09777+50μl IOTest3固定剂10X Ref.A07800),立即涡旋以确保适当混合,并在室温(18℃至27℃)下避光孵育20分钟。

[0444] 6.在室温下以300g离心5分钟。

[0445] 7.通过抽吸除去上清液。

[0446] 8.使用3mL的1×PBS重悬细胞沉淀。

[0447] 9.在室温下以300g离心5分钟。

[0448] 10.通过抽吸除去上清液,并使用0.3ml的1×PBS1×或1×PBS+0.1%甲醛(1ml 1×PBS+12.5μl的10×IOTest3固定剂)重悬细胞沉淀。

[0449] 补偿:在细胞术中,补偿是对不同荧光染料的发射谱通道之间信号重叠的数学校正。因此,该校正系数用于消除信号泄漏到其他不期望的通道。进行手动补偿以评估缀合物性能。

[0450] 实施例1B.流式细胞术方案

[0451] 采用以下方案用于试样处理。

[0452] 使用染色裂解洗涤方案来制备和处理用于流式细胞术采集的样品。在DxFLEX/CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter,Inc.)上处理并采集样品,以分析多种制剂的性能:

[0453] 1.将100μL的K2EDTA抗凝血液添加至干燥染色管或具有液体抗体混合物的管中并涡旋6至8秒。在室温下在黑暗中孵育15至20分钟。

[0454] 2.添加2mL Versa Fix(对于1mL Versalyse,添加25μL IOTest 3固定剂)裂解试剂溶液(Beckman Coulter,Inc.)并短暂涡旋以确保适当混合。在室温下在黑暗中孵育20分钟。

[0455] 3.在用裂解和固定缓冲液(Versa fix)孵育之后,在室温下以300g离心5分钟以沉淀WBC。抽吸并丢弃上清液,并通过涡旋解聚沉淀。

[0456] 4.添加3mL 1×PBS,并在室温下以300g离心5分钟。

[0457] 5.抽吸并丢弃上清液,并将沉淀重悬于300μL的1×PBS中,将管轻轻涡旋,并在DxFLEX流式细胞仪上在建议的设置下采集管。

[0458] 仪器设置

[0459] 使用CytoFLEX或DxFLEX Daily QC荧光球(Beckman Coulter,Inc.)进行流式细胞仪仪器设置。QC珠用于对仪器进行日常质量控制管理,并确定靶增益值。通过QC方案确定的增益的建议设置用于流式细胞仪中样品管的采集。

[0460] 使用通用补偿试剂盒(Beckman Coulter,Inc.)以及液体和/或干燥形式的单一SN聚合物染料缀合物来设置12色的补偿。

[0461] 实施例2.干燥混合物组分选择

[0462] 开发了用于对荧光染料缀合物进行干燥的水性DM缓冲剂制剂。从现有干燥技术开始,测试了用于阻止聚合物染料抗体缀合物的非特异性相互作用以及非特异性结合的数种试剂(表1)。水或PBS用于制备这些试剂的储备溶液。测试的试剂和每种试剂的结局在表1中示出。对以粗体字体显示的试剂进行了进一步评价。

[0463] 表1.所筛选的用于阻止聚合物染料抗体缀合物的非特异性相互作用和非特异性结合的试剂

[0464]

| Sr. No. | 试剂/组分 | 结局 |
|---|---|---|
| 1 | BSA | 不能完全阻止聚合物染料的相互作用。 |
| 2 | PEG550 | 没有干燥并因此稳定性令人担忧。 |
| 3 | BSA-ox | 不能完全阻止聚合物染料的相互作用。 |
| 4 | Empigen® BB 洗涤剂 | 可以阻止在单核细胞和粒细胞上的非特异性结合，但不能阻止聚合物相互作用。 |
| 5 | N-月桂基肌氨酸钠盐 | 可以阻止在单核细胞和粒细胞上的非特异性结合，但不能阻止聚合物相互作用。 |
| 6 | 单体 A | 1. 可以阻止两种 SN 缀合物之间的非特异性相互作用。<br>2. 发现单体的有效浓度在 200 μg/测试至 800 μg/测试的范围内。 |
| 7 | 单体 B | 不能阻止两种 SN 缀合物之间的非特异性相互作用，并且还显示出一些非特异性结合。 |
| 8 | 不同溶剂中的聚合物（Beckman 的内部产品） | 通过非特异性结合影响阴性群体。 |
| 9 | A 型明胶 | 与液体混合物相比，阴性群体的扩散更多。 |
| 10 | B 型明胶 | 1. 能够阻止非特异性相互作用，但储备液的制备是困难的。<br>2. 发现有效浓度在 150 μg/测试至 450 μg/测试的范围内。 |
| 11 | 酪蛋白粉末 | 能够在 0.15%至 0.3%的范围内阻止聚合物之间的非特异性相互作用。<br>酪蛋白储备溶液的制备由于溶解性问题而困难。 |
| 11 | 木质素磺酸 | 当添加 LSA 时，与干燥混合物相比，SN v605 和 SN v786 群体的阴性背景提高。 |
| 12 | 角叉菜胶 | 由于添加了这种添加剂而导致非特异性相互作用提高，因此储备液的制备具有挑战性并且需要特别小心。 |
| 13 | 藻酸钠 | 储备液的制备具有挑战性并且需要特别小心，粒细 |

[0465]

[0466]

| | | |
|---|---|---|
| | | 胞、单核细胞和淋巴细胞的总体扩散较高。 |
| 14 | 酪蛋白封闭缓冲剂 10× | 4×（2 倍稀释）、2.5×（4 倍稀释）、1×（9 倍稀释）浓度的酪蛋白可有效阻止两种聚合物缀合物之间的相互作用。 |
| 15 | Prionex®高纯度 A 型明胶 | 1. 在等同于明胶-B 的浓度下，Prionex®被证明在阻止非特异性相互作用方面是有效的，但明胶的稳定性较差。<br>2. 对明胶（Prionex®）的现成溶液的蛋白质浓度进行定量，并基于此发现有效浓度约在 67 μg/测试至 135 μg/测试的范围内。 |
| 16 | 冷水鱼明胶 | 1. 就性能而言，它等同于 B 型明胶。<br>2. 发现有效浓度在 150 μg/测试至 450 μg/测试的范围内。 |
| 17 | L-抗坏血酸 | SN v605 缀合物的非特异性单核细胞拉出在 0.2 mM 和 0.6 mM 浓度下较少。0.6 mM 浓度在 V610 通道中 SN v786 阳性群体的扩散较少。在抑制群体扩散方面没有另外影响。 |
| 18 | 柠檬酸 | 观察到粒细胞的脱颗粒降低。SN v605 缀合物的非特异性单核细胞拉出在所有浓度（0.1 至 0.6 mM）下都较少。在抑制群体扩散方面没有另外影响。 |
| 19 | 聚山梨醇酯 80 | 在 SN v605 缀合物下，非特异性单核细胞拉出、以及群体扩散在 0.015%和 0.075%下被抑制。 |
| 20 | 丙烯酰胺 | 显示在 V610 通道中 SN v786 阳性群体的扩散更多。 |
| 21 | 海藻糖-癸酸酯/盐 | 在等同于海藻糖（400 μg）的剂量下，该化合物完全裂解所有细胞。降低剂量会损害缀合物的干燥。 |
| 22 | 海藻糖-十四烷酸酯/盐 | 在等同于海藻糖（400 μg）的剂量下，该化合物完全裂解所有细胞。降低剂量会损害缀合物的干燥。 |
| 23 | 海藻糖-十六烷酸酯/盐 | 在等同于海藻糖（400 μg）的剂量下，该化合物完全裂解所有细胞。降低剂量会损害缀合物的干燥。 |

[0467]

| | | |
|---|---|---|
| 24 | 3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯（DMPA） | 1. DMPA 在室温下在水溶液中沉淀，但在功能上与 Empigen 作用相当。<br>2. 发现有效浓度在 0.002%至 0.006%的范围内。 |
| 25 | 3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基)丙烷磺酸酯（DMMA） | 1. DMMA 在功能上与 Empigen 作用相当，因此考虑进行进一步测试。<br>2. 发现有效浓度在 0.004%至 0.018%的范围内。 |

[0468] 以下DM候选试剂用于聚合物染料缀合物管的干燥:BSA(牛血清白蛋白)、PEG550(聚(乙二醇)甲基醚,平均$M_n$ 550)、BSA-ox(经氧化的BSA)、Empigen®BB洗涤剂(N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱)、N-月桂基肌氨酸钠盐、单体A、单体B、不同溶剂中的聚合物、A型明胶、B型明胶、木质素磺酸、角叉菜胶、藻酸钠、酪蛋白封闭缓冲剂10×、Prionex®高纯度A型明胶、冷水鱼明胶、L-抗坏血酸、柠檬酸、聚山梨醇酯80、丙烯酰胺、海藻糖-癸酸酯/盐、海藻糖-十四烷酸酯/盐、海藻糖-十六烷酸酯/盐、3-[N,N-二甲基(3-棕榈酰氨基丙基)氨基]-丙烷磺酸酯(DMPA)和3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基)丙烷磺酸酯(DMMA)。单体A和单体B的化学结构在图4中示出。单体A可以是3,3'-((2,7-二溴-9,10-二氢菲-9,10-二基)双(氧基))双(N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧杂三十七烷-37-基)丙烷-1-磺酰胺)。根据实施例1的方案对干燥管进行测试。测试结果在表1中示出。选择Empigen®、单体A、B型明胶、酪蛋白封闭缓冲剂10×、Prionex®高纯度A型明胶、冷水鱼明胶、DMPA和DMMA用于进一步测试。

[0469] 根据测试的不同试剂,开发了第一DM(DM)缓冲剂制剂,其含有海藻糖二水合物、单体A、B型明胶和EmpigenBB®洗涤剂(N,N-二甲基-N-十二烷基甘氨酸甜菜碱;N-(烷基$C_{10}$-$C_{16}$)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱)。

[0470] 随后,开发了改进的DM缓冲剂制剂,用于阻止SuperNova™缀合物之间的非特异性相互作用和非特异性单核细胞拉出,其被命名为DM2(DM 2)。DM2含有海藻糖二水合物、单体A、Prionex®明胶和DMMA。然而,后来发现使用DM2制备的干燥管具有稳定性问题。最终,通过用酪蛋白10×封闭缓冲剂代替Prionex而进一步优化了DM2。该缓冲剂被命名为DM2+S(稳定剂)。

[0471] 表2中提供了最终DM缓冲剂制剂中存在的添加剂。发现DM2+S缓冲剂的pH为7至7.4。使用DM缓冲剂DM2+S产生的干燥管导致了对SuperNova™缀合物的非特异性相互作用的阻止以及对非特异性拉出的阻止,而不阻碍混悬在混合物中的缀合物的性能(亮度和群体募集),并实现了干燥产物的较大稳定性(迄今为止6个月实时稳定性已经建立)。在干燥管的制备中,使用了SuperNova™缀合物的整体制剂。

[0472] 表2:代表性DM制剂的组分

[0473]

| Sr. No. | 制备DM缓冲剂所需的添加剂 | 零件号 | 供应商 |
|---|---|---|---|
| 1 | 酪蛋白10×封闭缓冲剂 | B6429 | Sigma Aldrich |
| 2 | 海藻糖二水合物 | T9531 | Sigma Aldrich |
| 3 | DMMA (3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基) 丙烷磺酸酯) | T7763 | Sigma Aldrich |
| 4 | 单体A | C37603 | Lumigen |
| 5 | 叠氮化钠 | 10199-00 | Sigma Aldrich |
| 6 | 诱惑红AC偶氮染料 | 458848 | Sigma Aldrich |

[0474] 表3.代表性DM制剂的组分,每次测试的量

[0475]

| 组分 | 量,μg/测试 (活性范围) | 量,μg/测试 (标准化剂量) |
|---|---|---|
| 海藻糖 | 2000-3000 | 2500 |
| 单体A | 200-800 | 400 |
| 酪蛋白 | 8.4-72 | 17.82 |
| DMMA | 2-15 | 9 |
| 诱惑红 | 5-10 | 9 |
| 叠氮化钠 | 2-10 | 5 |

[0476] 表3说明了DM2+SDM缓冲剂组分的优选量/测试。在一些实施方案中,在不含染料缀合物的情况下,量为每28.48微升缓冲剂。在一些实施方案中,在含有染料缀合物的情况下,量为每50微升缓冲剂。

[0477] 在一些实施方案中,DM缓冲剂可包含海藻糖、单体A、DMMA和酪蛋白。在一些实施方案中,干燥缓冲剂可包含适当的浓度以获得2000至3000微克/测试的海藻糖;200至800微克/测试的单体A;8.4至72微克/测试的酪蛋白;以及2至15微克/测试的DMMA。在一些实施方案中,DM缓冲剂是水性缓冲剂,其可包含70至105mg/mL、或80至100mg/mL海藻糖二水合物;7至28mg/mL、或10至20mg/mL单体A;0.07至0.53mg/mL、或0.2至0.4mg/mL DMMA,以及0.3至

2.5mg/mL、或0.5至0.8mg/mL酪蛋白,不含染料缀合物。DM缓冲剂可以由例如在水或PBS缓冲液中的碳水化合物稳定剂、水溶性单体、两性离子表面活性剂和蛋白质稳定剂的储备浓度制备。例如,储备浓度可以包含约400mg/ml海藻糖二水合物、约40mg/ml单体A、约1.5mg/ml DMMA和或约2至20mg/mL酪蛋白。

[0478] 实施例3.用于DM缓冲剂及其结局的实验设计

[0479] 为了获得最佳结果,对DM缓冲剂的每种组分(除海藻糖二水合物、叠氮化钠和诱惑红之外)的浓度进行滴定和优化。

[0480] 1.海藻糖二水合物:

[0481] 海藻糖二水合物是现有技术的组分之一。在不存在这种添加剂的情况下,难以对缀合物和其他缓冲剂组分进行干燥。

[0482] 2.酪蛋白10×封闭缓冲剂的滴定:

[0483] 2.1:实验:1

[0484] 目的:为了找出阻止非特异性结合的液体形式酪蛋白的最佳浓度。

[0485] 方法:在本实验中,根据实施例1的方案,测试酪蛋白10×封闭缓冲剂的不同浓度(5×、2.5×、1.25×、0.625×和0.31×)的即用型溶液。

[0486] 结果和观察结果:

[0487] 图5示出了酪蛋白的剂量滴定,以及在阴性对照(无酪蛋白)、0.31×、0.625×、1.25×、2.25×和5×酪蛋白下的比较性CD20-SNv605流式图。在1.25×、2.5×和5×浓度下的酪蛋白有助于降低V610通道中的非特异性单核细胞拉出。另外,当与单一CD20(不含酪蛋白)相比时,所有制剂中CD20+细胞的%募集相同。还发现HLADR+细胞的%募集在所有组中是一致的(数据未显示)。因此,在不同浓度下在干燥管中进一步评价了单独的酪蛋白。进一步优化了酪蛋白的浓度以找出针对干燥管的最佳浓度。

[0488] 2.2:实验:2

[0489] 目的:为了找出阻止非特异性结合的干燥形式酪蛋白的最佳浓度。

[0490] 方法:在本实验中,使用了酪蛋白10×封闭缓冲剂的不同浓度(4×、2.5×和1×)的即用型溶液,以将12种不同的抗体缀合物与其他添加剂一起适当(in place)干燥。2.5×为标准化浓度。因此,取2.5×浓度作为参考,以与1×和4×浓度进行比较。在此,测试了两个不同批次(L1和L2)的酪蛋白10×封闭缓冲剂。

[0491] 结果和观察结果:

[0492] 比较了不同浓度(4×、2.5×和1×)的DM缓冲剂的双荧光图(V610vs V780、PB450vs V610、和PB450vs V780)的重叠。(数据未显示)。还比较了不同浓度下SuperNova™(紫色通道)vs常规通道、和经典vs经典缀合物通道的双荧光图的重叠(数据未显示)。所有这些比较都确定了测试的不同浓度酪蛋白之间没有显著变化。表4和表5示出了不同浓度酪蛋白之间针对所有特异性的绝对%δ募集和MdFI的比较。

[0493] 表4.与2.5×相比,1×和4×酪蛋白浓度的所有12C特异性的绝对%δ募集

[0494]

| | L1 1X-L1 2.5 X | | | 平均3个供体(L1 1X-L1 2.5 X) | L1 4X-L1 2.5X | | | 平均3个供体 (L1 4X-L1 2.5X) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D5 | D14 | D16 | | D5 | D14 | D16 | |
| CD45+淋巴细胞%亲本 | 0.66% | 0.21% | 2.30% | 1.06% | 0.22% | 1.21% | 1.34% | 0.92% |
| CD4单核细胞%亲本 | 0.31% | 0.10% | 0.47% | 0.29% | 0.13% | 0.29% | 0.80% | 0.41% |

[0495]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CD4 淋巴细胞%亲本 | 0.15% | 1.16% | 2.59% | 1.30% | 0.14% | 0.19% | 0.74% | 0.36% |
| CD20+%亲本 | 0.46% | 0.02% | 0.38% | 0.29% | 0.28% | 0.21% | 0.43% | 0.31% |
| CD16+%亲本 | 1.79% | 0.91% | 2.84% | 1.85% | 0.60% | 0.13% | 1.87% | 0.87% |
| CD16+淋巴细胞%亲本 | 0.00% | 0.29% | 0.05% | 0.11% | 0.06% | 0.18% | 0.03% | 0.09% |
| CD25+%亲本 | 0.31% | 0.23% | 1.58% | 0.71% | 0.28% | 0.13% | 0.02% | 0.14% |
| CD3+%亲本 | 0.08% | 0.89% | 3.05% | 1.34% | 0.01% | 0.43% | 0.76% | 0.40% |
| CD38+%亲本 | 0.36% | 1.37% | 2.83% | 1.52% | 0.93% | 0.14% | 0.28% | 0.45% |
| CD38+单核细胞%亲本 | 0.26% | 0.81% | 0.10% | 0.39% | 0.23% | 0.82% | 0.19% | 0.41% |
| CD27+%亲本 | 0.04% | 0.88% | 3.03% | 1.32% | 0.16% | 0.47% | 0.54% | 0.39% |
| CD10+%亲本 | 1.31% | 0.06% | 2.38% | 1.25% | 0.14% | 0.97% | 1.96% | 1.02% |
| CD14+%亲本 | 0.06% | 0.42% | 0.15% | 0.21% | 0.09% | 0.50% | 0.69% | 0.43% |
| CD56淋巴细胞中值PB450-A | 0.03% | 0.20% | 0.06% | 0.10% | 0.06% | 0.54% | 0.26% | 0.29% |
| CD8+%亲本 | 0.08% | 0.45% | 0.43% | 0.32% | 0.08% | 0.78% | 0.05% | 0.30% |

[0496] 表5.与2.5×相比,1×和4×酪蛋白浓度的所有12C特异性的MdFI比较

[0497]

| | L1 1X/L1 2.5X | | | 平均3个供体 (L1 1X/L1 2.5X) | L1 4x/L1 2.5X | | | 平均3个供体 (L1 4x/L1 2.5X) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D5 | D14 | D16 | | D5 | D14 | D16 | |
| CD45+淋巴细胞中值 APC-A750-A | 101.20% | 95.83% | 98.60% | 98.54% | 100.98% | 100.69% | 95.98% | 99.22% |
| CD4单核细胞中值紫色 780-A | 109.28% | 117.64% | 73.30% | 100.74% | 110.66% | 90.34% | 100.80% | 100.60% |
| CD4淋巴细胞中值紫色 780-A | 99.00% | 103.01% | 104.82% | 102.27% | 99.28% | 97.87% | 100.71% | 99.29% |
| CD20+中值紫色 610-A | 100.28% | 101.75% | 107.97% | 103.33% | 99.12% | 97.69% | 98.14% | 98.32% |

[0498]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CD16+中值 FITC-A | 100.84% | 97.84% | 101.39% | 100.02% | 101.69% | 101.52% | 99.20% | 100.80% |
| CD16+淋巴细胞中值 FITC-A | 95.30% | 84.54% | 85.44% | 88.43% | 98.09% | 91.49% | 99.40% | 96.33% |
| CD25+中值 PE-A | 103.49% | 102.12% | 95.01% | 100.21% | 98.17% | 89.32% | 98.03% | 95.17% |
| CD3+中值 ECD-A | 105.85% | 105.62% | 106.14% | 105.87% | 94.11% | 82.06% | 94.08% | 90.08% |
| CD38+中值 PC5.5-A | 99.35% | 101.27% | 97.58% | 99.40% | 91.24% | 79.19% | 88.14% | 86.19% |
| CD38+单核细胞中值 PC5.5-A | 89.47% | 97.59% | 106.81% | 97.96% | 83.83% | 91.49% | 89.31% | 88.21% |
| CD27+中值 PC7-A | 107.75% | 106.68% | 109.06% | 107.83% | 87.87% | 77.11% | 87.23% | 84.07% |
| CD10+中值 APC-A | 103.25% | 100.34% | 101.26% | 101.62% | 97.67% | 89.50% | 93.20% | 93.46% |
| CD14+中值 APC-A700-A | 106.58% | 104.42% | 103.52% | 104.84% | 98.14% | 100.24% | 99.59% | 99.32% |
| CD56淋巴细胞中值 PB450-A | 108.79% | 100.41% | 107.97% | 105.72% | 119.61% | 104.84% | 105.16% | 109.87% |
| CD8+中值 KO525-A | 100.23% | 102.58% | 100.42% | 101.08% | 101.93% | 97.67% | 99.97% | 99.86% |

[0499] 该实施例表明,在不同浓度(1×、2.5×、4×)的酪蛋白10×封闭缓冲剂下,重叠图、MdFI和绝对%δ募集没有显著变化。发现批次之间和不同测试浓度之间的绝对%δ募集为<5%,归因于不同浓度的酪蛋白10×封闭缓冲剂的最小影响/没有影响。因此,1×至4×的酪蛋白封闭缓冲剂可用于对SuperNova™缀合物以及其他常规染料进行干燥。

[0500] 单体A的滴定:

[0501] 3.1:实验:1

[0502] 目的:为了滴定用于对两种聚合物染料抗体缀合物进行干燥的单体A浓度。

[0503] 方法:在由干燥形式的CD45-FITC、CD20-SN-v605和CD3-SN-v786以及保持恒定的其他添加剂组成的制剂中,测试50μg、100μg、200μg、400μg和800μg微克/测试的单体浓度。

[0504] 结果和观察结果:分析了多个剂量的单体A的CD20-SN v605和CD3-SN v786的二维流式细胞术荧光图(数据未显示)。根据不同剂量的单体,200μg和400μg的单体足以阻止聚合物染料缀合物的相互作用。

[0505] 3.2:实验:2

[0506] 目的:为了滴定用于对三种聚合物染料抗体缀合物进行干燥的单体A浓度。

[0507] 方法:在由干燥形式的CD45-FITC、CD19-SNv428、CD20-SNv605和CD3-SNv786以及保持恒定的其他添加剂组成的制剂中,测试200微克/测试和400微克/测试的单体A浓度。

[0508] 结果和观察结果:图6示出了针对200μg/测试(上排)和400μg/测试(下排)的单体

浓度进行3色测试的干燥制剂的双荧光图。在200μg和400μg的单体A之间,含有400μg的管显示出在群体扩散从一个通道溢出到其他通道方面更好的结果(如图6中的箭头和圆圈所指示),并且足以阻止聚合物染料抗体缀合物的相互作用。

[0509] 4.DMMA的滴定:

[0510] 为了评价DMMA(3-(N,N-二甲基肉豆蔻酰氨基)丙烷磺酸酯)在阻止非特异性相互作用中的作用。

[0511] 4.1:实验1:在存在两种SuperNova™聚合物染料抗体缀合物的情况下两性离子表面活性剂DMMA的剂量滴定

[0512] 目的:为了找出阻止两种SuperNova™缀合物之间的非特异性相互作用的DMMA的最佳浓度。

[0513] 方法:在本实验中,通过在DM版本1中将Empigen® BB替换为DMMA来测试不同浓度的DMMA(Sigma,零件(part)号T7763-5G)。DMMA是水溶性两性离子表面活性剂。测试了DMMA以找出针对Empigen®在降低非特异性相互作用和易于制造方面的更好选择。表6中提供了不同浓度的DMMA以及测试组的细节。

[0514] 表6.对干燥制剂中不同浓度DMMA的评价

[0515]

| Ser. No. | 具有添加剂的样品 | 明胶体积,ul | 海藻糖体积,ul | 单体体积,ul | 缀合物体积,HLADR,ul | CD20体积,ul | empigen体积,ul | 添加剂体积,ul | CD45-AA750的体积,ul | PBS | 总体积 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | DMMA 0.00375% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 1.25 | 2.75 | 19.42 | 50 |
| 2 | DMMA 0.0075% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 2.5 | 2.75 | 18.17 | 50 |
| 3 | DMMA 0.015% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 4 | DMMA 0.03% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 10 | 2.75 | 10.67 | 50 |
| 5 | DM | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |

[0516] 在此,在液体和干燥管中对不同浓度即0.03%、0.015%、0.0075%和0.00375%的DMMA进行测试,并与DM缓冲剂进行比较。DMMA的浓度是基于Empigen BB®浓度(0.15%)选择的,其是DM缓冲剂的组分之一。实验中使用了适当的对照。在最终制剂中添加0.15%的DMMA以达到如表6中提到的DMMA的相应浓度。使用两种Supernova™缀合物CD20-SN-v605和HLADR-SN-v786测试DMMA的作用。使用根据实施例1B的方案对试样进行处理。实验在2个供体上进行。

[0517] 结果和观察结果:对所有测试的干燥DMMA制剂的CD20-SN-v605、HLADR-SN-v786和双阳性群体的散射特性的流式图进行了比较。(数据未显示)。DMMA是表面活性剂并且在较高浓度下可导致细胞死亡。分析了DM vs测试DMMA的每个浓度的重叠散射图。0.03%下的DMMA导致细胞死亡并且未评价其他参数。0.0075%和0.00375%下的DMMA显示出与DM相当

的散射特性。类似地,发现0.0075%和00375%下的DMMA中,CD20+和HLADR+的%募集与各自的液体单一物相比相似。另外,与DM相比,0.0075%和0.00375%下的DMMA显示出在610通道中786+群体的扩散更少。

[0518] 该实施例表明,0.0075%和0.00375%下的DMMA显示出与DM相当的散射特性、CD20+和HLADR+群体的%募集。DMMA的浓度在0.0075%至0.00375%范围内进一步优化,以获得最佳浓度。

[0519] 4.2:实验2:在存在两种Supernova™缀合物的情况下DMMA的剂量优化。

[0520] 目的:为了找出在阻止两种SuperNova™缀合物之间的非特异性相互作用方面的DMMA最佳浓度。

[0521] 方法:在本实验中,DMMA的浓度在0.03%至0.004%之间进一步优化,以找出最佳浓度。表7中提供了不同浓度的DMMA和测试组的细节。

[0522] 表7.干燥制剂中DMMA浓度的优化

[0523]

| Ser. No. | 具有添加剂的样品 | 明胶体积, ul | 海藻糖体积, ul | 单体体积, ul | HLADR, 体积, ul | CD20 体积, ul | emp igen 体积, ul | 添加剂体积, ul | CD45-AA750 的体积, ul | PBS | 总体积 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | DMMA 0.03% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 0 | 10 | 2.75 | 10.72 | 50 |
| 2 | DMMA 0.021% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 0 | 7.15 | 2.75 | 13.57 | 50 |
| 3 | DMMA 0.018% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 0 | 5 | 2.75 | 15.72 | 50 |
| 4 | DMMA 0.008% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 0 | 2.67 | 2.75 | 18.05 | 50 |
| 5 | DMMA 0.004% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 0 | 1.34 | 2.75 | 19.38 | 50 |
| 6 | DM | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.33 | 5 | 0 | 2.75 | 15.72 | 50 |

[0524] 在此,在干燥管中对不同浓度即0.03%、0.021%、0.018%、0.008%和0.004%的DMMA进行测试,并与DM进行比较。实验中使用了适当的对照。在最终制剂中添加0.15%的DMMA以达到如表7中提到的DMMA的相应浓度。使用两种Supernova™缀合物CD20-SN-v605和HLADR-SN-v786测试DMMA的作用。使用如实施例1B中提到的方案对试样进行处理。实验在2个供体上进行。

[0525] 图7A至D示出了所有测试的干燥DMMA制剂的CD20-SN-v605、HLADR-SN-v786和双阳性群体,散射特性的流式图。图7A示出了测试DMMA的所有浓度以及未经染色和DM的散射图。与其他DMMA浓度相比,0.004%和0.008%下的DMMA显示出更少的非特异性中性粒细胞拉出(由箭头指示)。类似地,与DM和其他DMMA浓度相比,0.004%、0.008%和0.018%下的DMMA显示出在V610通道中更少的非特异性单核细胞拉出(用箭头指示,图7B)。发现所有DMMA浓度中CD20+和HLADR+的%募集与各自的液体单一物相比是相似的。类似地,发现所有DMMA浓度中双阳性群体的%募集与DM相比是相似的。另外,与DM相比,0.004%、0.008%和0.018%下

的DMMA显示出在V610通道中786+事件的相似扩散。该实施例表明,与DM相比,0.004％、0.008％和0.018％下的DMMA显示出更好的性能。因此,对与其他所选添加剂组合的这些DMMA浓度进行了进一步评价。

[0526] 5.为了评价所选添加剂的不同组合的性能。

[0527] 5.1:实验1:所选添加剂的组合的性能评价

[0528] 目的:为了评价所选添加剂的组合在阻止SN缀合物之间的非特异性结合和非特异性相互作用方面的性能。

[0529] 方法:在本实验中,对所选添加剂的组合(例如DMMA+酪蛋白、DMMA+Prionex)进行评价。表8中提供了添加剂的不同组合和测试组的细节。

[0530] 表8.添加剂的组合-双色实验

[0531]

| Ser. No. | 具有添加剂的样品 | 明胶体积，ul | 海藻糖体积，ul | 单体体积，ul | HLADR，体积，ul | CD20体积，ul | empigen体积，ul | DMMA | 酪蛋白 | PRIONEX | CD45-AA750的体积，ul | PBS | 总体积 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | DM | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 2 | DMMA 0.018% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 3 | DMMA_0.008% | 6 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 2.67 | 0 | 0 | 2.75 | 18 | 50 |
| 4 | 酪蛋白 2.5X | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 6 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 5 | PRIONEX_2 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 6 | PRIONEX_3 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 7 | DMMA_0.00375+酪蛋白 2.5X | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 6 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 8 | DMMA_0.018%+ PRIONEX_2 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 9 | DMMA_0.018%+ PRIONEX_3 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 10 | DMMA_0.008%+酪蛋白 2.5X | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 2.67 | 6 | 0 | 2.75 | 18 | 50 |
| 11 | DMMA_0.008%+PRIONEX_2 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 2.67 | 0 | 6 | 2.75 | 18 | 50 |
| 12 | DMMA_0.008%+PRIONEX_3 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 2.67 | 0 | 6 | 2.75 | 18 | 50 |
| 13 | 酪蛋白 1X | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 6 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 14 | DMMA_0.018%+ 酪蛋白 1X | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 6 | 0 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 15 | PRIONEX_4 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 5 | 0 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |
| 16 | DMMA_0.018%+ PRIONEX_4 稀释液 | 0 | 6.25 | 10 | 0.95 | 3.38 | 0 | 5 | 0 | 6 | 2.75 | 15.67 | 50 |

[0532] 在此,在干燥管中,对不同浓度即0.018％和0.008％的DMMA与酪蛋白和Prionex的不同稀释液的组合进行测试,并与DM版本1进行比较。实验中使用了适当的对照。使用两种

Supernova™缀合物CD20-SN-v605和HLADR-SN-v786测试DMMA的作用。使用实施例1B的方案对试样进行处理。实验在4个供体上进行。

[0533] 结果和观察结果:比较了添加剂与DMMA 0.008％的组合的CD20-SN-v605、HLADR-SN-v786和双阳性群体,散射特性的流式图。图8A示出了添加剂与DMMA 0.008％的组合的散射图,并与DM进行了比较。除DM之外,每个组合的散射特性看起来相似。DM显示出了非特异性粒细胞和单核细胞拉出,如用箭头所指示的。类似地,与具有0.008％DMMA的其他组合相比,DM显示出在V610通道中更高的非特异性粒细胞和单核细胞拉出(用箭头指示,图8B)。发现所有具有0.008％ DMMA的组合中CD20+和HLADR+的％募集与各自的液体单一物相比是相似的。(图8B、图8C)。类似地,发现所有具有0.008％ DMMA的组合中双阳性群体的％募集与DM相比是相似的。

[0534] 类似地,比较了添加剂与DMMA 0.018％的组合的CD20-SN-v605、HLADR-SN-v786和双阳性群体,散射特性的流式图。(数据未显示)。将所有具有DMMA 0.018％的添加剂的组合的散射图与DM进行了比较。所有组合的散射特性看起来相似。与其他具有0.018％ DMMA的组合相比,DM和DMMA 0.018+酪蛋白1×显示出在V610通道中更高的非特异性单核细胞拉出。发现每个具有0.018％ DMMA的组合中CD20+和HLADR+的％募集与各自的液体单一物相比是相似的。类似地,发现所有具有0.018％ DMMA的组合中双阳性群体的％募集与DM相比是相似的。然而,与DM相比,DMMA 0.018％+酪蛋白2.5×和0.018％ DMMA与Prionex的组合显示出在V610中786+事件的扩散更少。

[0535] 比较了不同浓度的单一添加剂(例如酪蛋白和Prionex(在DM版本1中用酪蛋白和Prionex代替明胶))的CD20-605、HLADR-786和双阳性群体,散射特性的流式图(数据未显示)。每个组合的散射特性表现出相似。与添加剂与DMMA的组合相比,单独的DM与所有单一物显示出在V610通道中更高的非特异性单核细胞拉出。发现在所有单一物中CD20+和HLADR+的％募集与各自的液体单一物相比是相似的。类似地,发现每个单一物中双阳性群体的％募集与DM相比是相似的。与DM相比,具有Prionex稀释液的单一物显示出在V610通道中786+事件的扩散更少。

[0536] 总体而言,在所有组合中,DMMA 0.008％+prionex 2稀释液和3稀释液、DMMA 0.018％+Prionex 3稀释液、以及DMMA 0.018％+酪蛋白2.5×在降低V610通道中的非特异性单核细胞拉出以及降低SN缀合物之间的非特异性相互作用方面提供了良好的性能。该实施例表明,当用两种SN缀合物测试时,组合包括DMMA 0.008％+prionex 2稀释液和3稀释液、DMMA 0.018％+Prionex 3稀释液、以及DMMA 0.018％+酪蛋白2.5×在降低非特异性结合和非特异性相互作用方面提供了良好的性能。

[0537] 根据这些实验,具有DMMA 0.008％+Prionex 2稀释液、和DMMA 0.018％+酪蛋白2.5×稀释液的DM缓冲剂显示出在阻止SN缀合物之间的非特异性相互作用方面并且还在非特异性拉出方面的良好性能。然而,在开发期间发现,DMMA 0.008％+Prionex 2稀释液(命名为DM2制剂)表现出稳定性问题并因此没有进一步评价。随后用DMMA 0.018％+酪蛋白2.5×(命名为DM2+S)进行的实验显示出,该制剂具有良好的稳定性:迄今为止建立的干燥管具有6个月实时稳定性(研究正在进行)。

[0538] 6:添加剂的功能测试,最终制剂中的添加剂减一(Additive minus one,AMO)(DM2+S)

[0539] 目的:为了理解DM2+稳定剂缓冲剂(最终制剂)中存在的每种添加剂对散射特性和非特异性相互作用的影响,对缓冲剂减去每种组分中的一种进行分析。

[0540] 方法:使用下述干燥制剂中的四色组(CD45-AA750、CD56-SNv428、CD20-SNv605 CD4-SNv786)进行实验。在该实验中将DM2+S用作对照,与其他组进行比较。

[0541] 1.DM2+S

[0542] 2.DM2+S无单体

[0543] 3.DM2+S无DMMA

[0544] 4.DM2+S无酪蛋白

[0545] 5.DM2+S海藻糖+单体

[0546] 6.DM2+S海藻糖+DMMA

[0547] 7.DM2+S海藻糖+酪蛋白

[0548] 根据先前实验确定海藻糖是干燥所必需的,因此本实验不使用不含海藻糖的DM2+S。对6个供体以单次重复进行了实验。如方案和方法中提到的,遵循样品处理方案。对10000个CD45+淋巴细胞设置停止门。干燥之后,针对任何明显变化在物理上观察了所有组的干燥管。另外,针对任何非特异性拉出和非特异性相互作用,还观察了散射特性、双荧光图。

[0549] 图9示出了测试组DM2+S、海藻糖+单体、海藻糖+酪蛋白、海藻糖+DMMA(从左到右,上图)、DM2+S、DM2+S不含单体、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白(从左到右,下图)中每一者中的干燥管的物理外观和特性。在此,DM2+S用作对照组。物理观察结果表明,在不含单体的情况下,干燥膜的颜色发生变化(通常红色膜变成浅橙色至棕色)。在不含酪蛋白和DMMA的组中观察到膜收缩。与DM2+S相比,在不含DMMA的管中没有观察到干燥膜外观的变化。然而,不含酪蛋白的管显示出了干燥膜的边际收缩。

[0550] 图10A至C示出了测试组DM2+S、DM2+S不含DMMA、DM2+S不含酪蛋白、DM2+S不含单体(从左到右,上图)、DM2+S:海藻糖+DMMA、DM2+S:海藻糖+酪蛋白、DM2+S:海藻糖+单体(从左到右,下图)中CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786各自的侧向散射SSC vs FL图。从图中可以观察到,当酪蛋白和DMMA不存在时,存在非特异性单核细胞拉出(用箭头指示)。单体的不存在导致淋巴细胞中阴性群体的扩散(用箭头指示)。阴性群体的扩散可主要归因于在不存在单体和酪蛋白的情况下SN染料之间的非特异性相互作用。

[0551] 图10D至F示出了所有测试组中所有SN组合的FL vs FL双荧光图(例如,分别为CD56-SNv428 vs CD20-SNv605、CD4-SNv786 vs CD20-SNv605和CD4-SNv786 vs CD56-SNv428),表明单体和酪蛋白的不存在导致SN群体中的SN缀合物之间的非特异性相互作用/群体扩散。因此,单体和酪蛋白二者都被认为对阻止非特异性相互作用是重要的。

[0552] 该实施例表明,单体A和酪蛋白对SN缀合物的干燥是重要的,因为在不存在它们的情况下观察到对细胞-细胞相互作用的低效阻止。另外,酪蛋白还阻止非特异性单核细胞拉出。DMMA在阻止非特异性单核细胞拉出中发挥主要作用。该实验不仅提供了单个添加剂的功能,其对质量控制问题的故障排除也是重要的。

[0553] 7:与BD染色缓冲剂相比DM2+S干燥管的性能

[0554] 目的:表明与BD染色缓冲剂相比DM2+S干燥管的性能

[0555] 方法:进行本实验以检查当与BD染色缓冲剂的性能相比时干燥管的性能。在此,将DM2+S干燥管的性能与BD horizon brilliant缓冲剂进行了比较。实验使用4色组进行。组

的细节如下。

[0556] 使用市售BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂(Becton,Dickinson and Company)评价三种聚合物染料缀合物以及设门标志物(CD45-APC-A750、CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786)。按照制造商的说明进行染色方案。首先,向管中添加50μl的BD horizon brilliant缓冲剂,随后添加4种缀合物。通过涡旋充分混合。随后,添加100μl的血液试样。通过涡旋适当混合,并在室温下孵育30分钟,并且按照方案和方法部分中提到的步骤2进一步进行处理。

[0557] 将三种聚合物染料缀合物与设门标志物(CD45-APC-A750、CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786)在本发明的DM版本2+稳定剂中进行干燥。样品处理方案与上述方案和方法中的相同。

[0558] 用上述方案对所有提到的两组的6个供体(以单次重复)进行测试。对10000个CD45+淋巴细胞设置停止门。

[0559] 结果和观察结果:

[0560] 图11A示出了用本发明的DM2+S干燥缓冲剂干燥并用血液样品重构或用比较性BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂干燥的三种聚合物染料缀合物CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786的代表性SSC vs FL重叠流式图。与DM2+S干燥管相比,比较性商业BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂导致非特异性粒细胞和单核细胞拉出(用箭头指示)。

[0561] 图11B示出了三种聚合物染料缀合物以及设门标志物(CD45-APC-A750、CD56-SNv428、CD20-SNv605和CD4-SNv786)的代表性双荧光重叠图。当与DM2+S相比时,比较性BD Horizon™ Brilliant染色缓冲剂导致SN缀合物的所有组合中非特异性淋巴细胞拉出。

[0562] 该实施例表明,DM2+S和BD染色缓冲剂显示出散射特性、%募集和MdFI值没有显著差异(数据未显示)。然而,当与BD染色缓冲剂相比时,DM2+S干燥管显示出更紧密的群体(没有任何非特异性拉出)。因此,从数据中可以得出结论,与BD染色缓冲剂相比,DM2+S干燥管具有更好的性能。

[0563] 实施例4.6个月中期稳定性

[0564] 目的:为了评估和检查DM2+S干燥管的6个月稳定性

[0565] 方法:在本实施例中,评价了DM2+S干燥管的6个月稳定性。为了进行比较,研究中包括了3个月久以及新鲜批次。每个批次的细节在表9中给出。本研究中测试的3个月久和6个月久的干燥管二者均属于打开的袋,即从多次打开的袋中测试的干燥管。这些干燥管含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))。这些批次在单个仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。将实施例1B中提到的染色-裂解-洗涤方案用于该研究。对10000个CD45+淋巴细胞设置停止门。针对新鲜批次调整了补偿。随后,将新鲜批次的补偿应用于3个月久和6个月久的批次,并对3个月久和6个月久的批次二者进行了所需的轻微补偿调整。将3个月久和6个月久的批次的绝对%δ募集和MdFI与新鲜批次进行比较(数据未显示)。

[0566] 表9:稳定性研究中使用的批次的细节

[0567]

| 批次 | 批次大小(测试) | 批次建立日期 |
|---|---|---|
| 新鲜批次 | 25 | 27-05-2021 |
| 3个月久批次 | 870 | 08-03-2021 |

| | | |
|---|---|---|
| 6个月久批次 | 50 | 08-12-2020 |

[0568] 结果和观察结果：

[0569] 图12示出了6个月久的干燥管中具有干燥膜的管的照片图像。在干燥膜中没有在视觉上观察到明显的劣化。

[0570] 图13A、13B和13C示出了研究中测试的不同特异性组合的所有3个批次的代表性重叠图。

[0571] 图13A示出了与3个月和新鲜批次相比，针对6个月稳定性的DM2+S干燥管代表性FL vs FL重叠图。含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))的干燥管在单个流式细胞术仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。针对CD56 PB450-A vs CD20紫色610(左图)、CD4紫色780vs CD20紫色610(中间图)和CD4紫色780vs CD56PB450(右图)的所有三个批次中SN染料的不同组合的代表性FL vs FL重叠图。这些重叠显示出，3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外，在所有测试供体中的6个月久批次中，未观察到非特异性相互作用或群体扩散。

[0572] 图13B示出了与3个月和新鲜批次相比，DM2+S干燥管的6个月稳定性：所有三个批次中SN vs经典组合的代表性FL vs FL重叠图。含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))的干燥管在单个流式细胞术仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。CD3 ECD vs CD20紫色610(左图)、CD8 KO525 vs CD4紫色780(中间图)和CD45 APC-A750 vs CD56PB450(右图)的6个月、3个月和新鲜批次的重叠显示出，3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外，在所有测试供体中的6个月久的批次中，未观察到非特异性相互作用或群体扩散。

[0573] 图13C示出了与3个月和新鲜批次相比，DM2+S干燥管的6个月稳定性：所有三个批次中经典vs经典组合的代表性FL vs FL重叠图。含有12色(12C)组(9C常规缀合物+3C SN缀合物(CD56-SNv428、CD20-SNv605、CD4-SNv786))的干燥管在单个流式细胞术仪器上以单次重复在4个供体上进行测试。CD16 FITC vs CD25PE(左图)、CD8 KO525 vs CD45APC-A750(中间图)和CD3 ECD vs CD10APC(右图)的6个月、3个月和新鲜批次的重叠显示出，3个月久和6个月久的批次中的群体与新鲜批次完全重叠。另外，在所有测试供体中的6个月久的批次中，未观察到非特异性相互作用或群体扩散。在该实施例中，6个月中期稳定性结果表明DM2+S干燥管稳定至少6个月。在中期6个月时间点没有观察到非特异性相互作用或扩散。实时稳定性计划持续24个月。

[0574] 实施例5.标准化DM缓冲剂制剂

[0575] 本发明的DM缓冲剂可以如下制备。溶解添加剂(组分)的储备液制剂可以如下制备。在制备储备液之后，如表10中所示制备DM2+S缓冲剂。发现DM2+S缓冲剂的pH范围为7至7.4。

[0576] 表10.DM缓冲剂(DM2+S)制剂

[0577]

| DM缓冲剂的制备 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 输入测试数目 = | 30 |
| 组分 | 储备液浓度 | 溶剂 | 供应商 | PN | 体积/测试 (uL) | 吸取体积 (以uL计) |
| 海藻糖 | 400 mg/ml | 1x PBS | Sigma | T9531 | 6.25 | 187.5 |
| 单体 A | 40 mg/ml | DI 水 | Lumigen | MOA-0010 | 10 | 300 |
| DMMA | 1.5 mg/ml | DI 水 | Sigma | T7763 | 6 | 180 |
| 酪蛋白 | 来自10x储备液的2.5x稀释液 | 1x PBS | Sigma | B6429 | 6 | 180 |
| 叠氮化钠 | 10% | DI 水 | Sigma | 10199-00 | 0.05 | 1.5 |
| 诱惑红 | 50mg/ml | DI 水 | Sigma | 458848 | 0.18 | 5.4 |
| 总计 | | | | | 28.48 | 854.4 |

[0578] 随后,使用了DM2+SDM缓冲剂(表10)以制备如表11中所示的组制剂,作为包含三种荧光聚合物染料缀合物的管形式的单一干燥反应物均匀膜。

[0579] 表11.使用DM2+S缓冲剂制备荧光染料-抗体组制剂(12色)

[0580]

| | | | | 输入测试数目 | 25 |
|---|---|---|---|---|---|
| 缀合物 | 剂量 (μg/测试) | PN | 浓度 (μg/uL) | 体积/测试 (μL) | 体积(吸取) |
| CD16-FITC | 0.25 | 2JF-3GB-FIT | 1.987 | 1.987 | 3.15 |
| CD25-PE | 0.25 | 2JF-B1_49-RPE | 0.268 | 0.933 | 23.32 |
| CD3-ECD | 0.2 | 2JF-UCHT1-ECD | 2.056 | 0.097 | 2.43 |
| CD38-PC5.5 | 0.0625 | 2JF-LS 198-P55 | 0.282 | 0.222 | 5.54 |
| CD27-PC7 | 0.3 | 2JF-1A4LDG-PC7 | 0.301 | 0.997 | 24.92 |
| CD10-APC | 0.125 | 2JF-ALB1-APC | 0.489 | 0.256 | 6.39 |
| CD14-APCA700 | 0.25 | 2JF-RMO52-A70 | 0.23 | 1.087 | 27.17 |
| CD45-AA750 | 1 | 2JF-J33-A75 | 0.452 | 2.212 | 55.31 |
| CD8-KRO | 0.125 | 2JF-B9_11-KRO | 0.75 | 0.167 | 4.17 |
| CD56-SNv428 | 0.125 | C76803 | 0.374 | 0.334 | 8.36 |
| CD20-SNv605 | 1 | C78079 | 0.239 | 4.184 | 104.60 |
| CD4-SNv786 | 0.25 | C281020 | 0.304 | 0.822 | 20.56 |
| DM版本2 | | | | 28.48 | 712.00 |
| 1x PBS | 适量 | | | 9.44 | 252.08 |
| | | | | 总共 | 1250 |

[0581] 每次测试的最终体积为50uL。

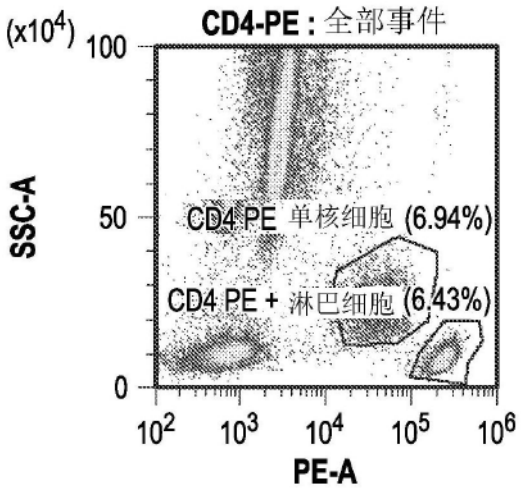

CD4-PE : 全部事件
(x10^4)
100
50
0
SSC-A
CD4 PE 单核细胞 (6.94%)
CD4 PE + 淋巴细胞 (6.43%)
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PE-A

图1A

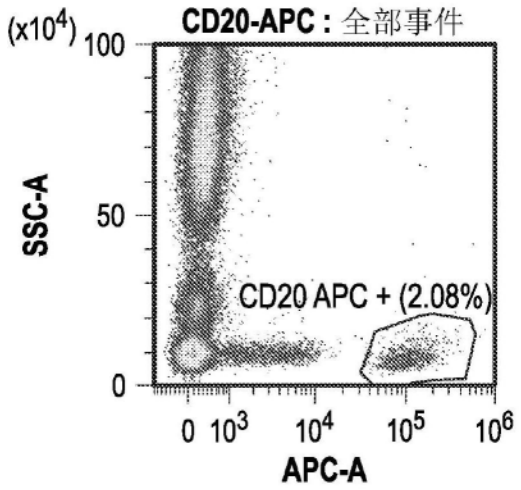

CD20-APC : 全部事件
(x10^4)
100
50
0
SSC-A
CD20 APC + (2.08%)
0
10^3
10^4
10^5
10^6
APC-A

图1B

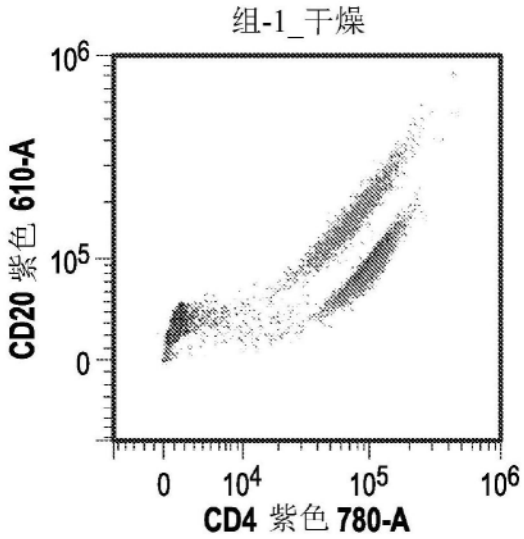

组-1_干燥
CD20 紫色 610-A
CD4 紫色 780-A
0
10^4
10^5
10^6

图2A

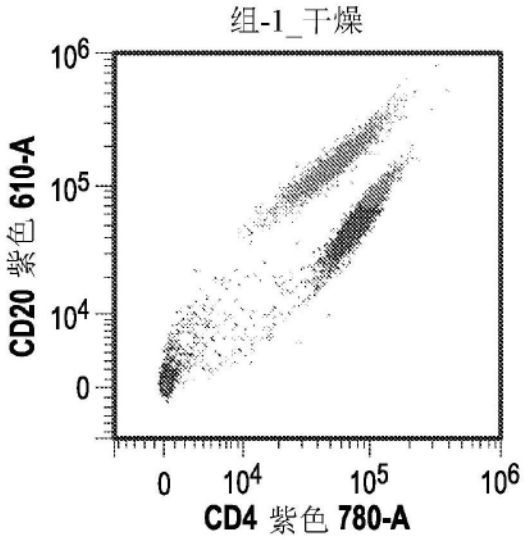

组-1_干燥
CD20 紫色 610-A
CD4 紫色 780-A
0
10^4
10^5
10^6

图2B

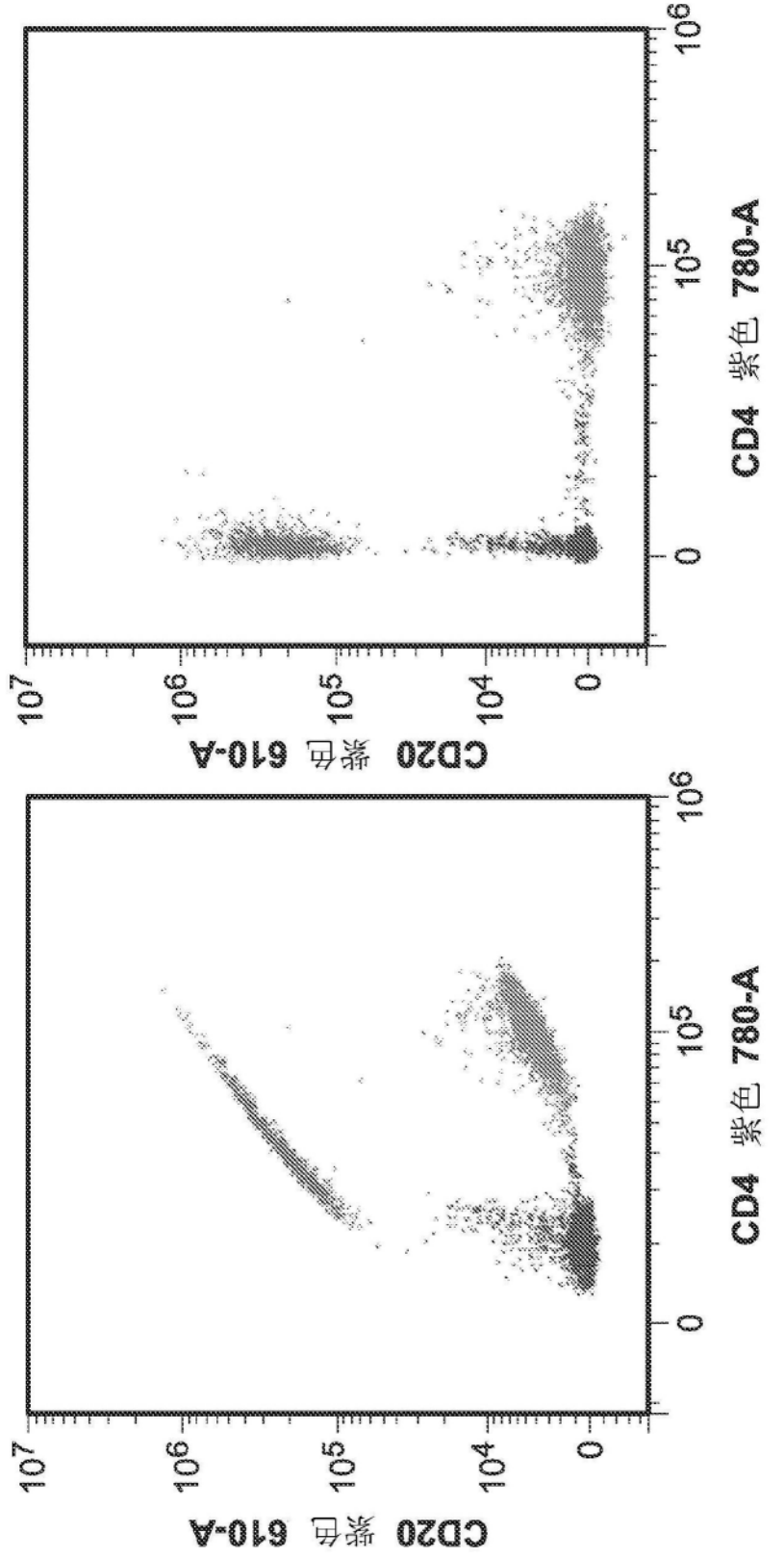
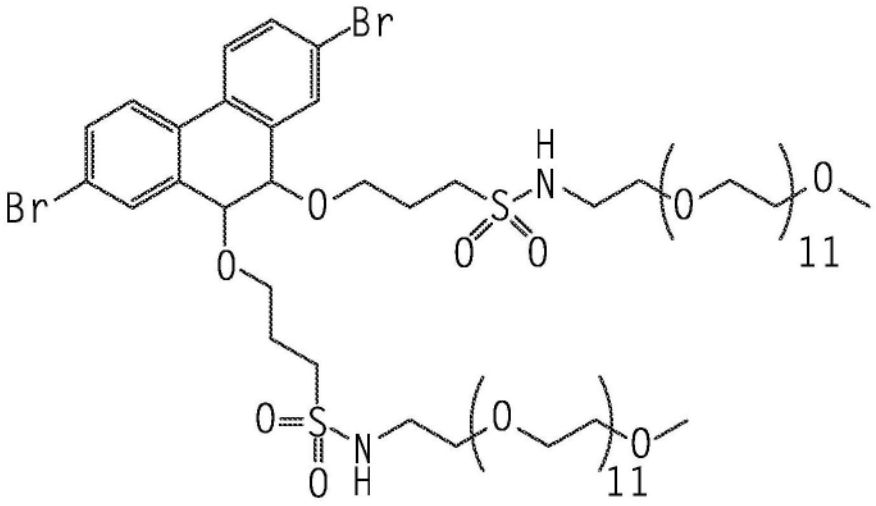

CD20 紫色 610-A
CD4 紫色 780-A
0
10^4
10^5
10^6
10^7

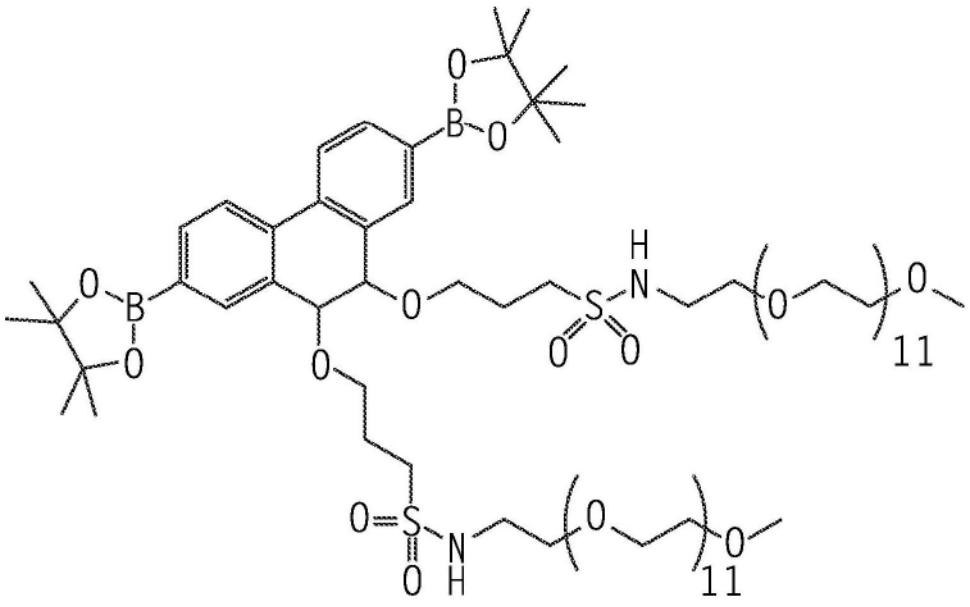
图3A


CD20 紫色 610-A
CD4 紫色 780-A
0
10^4
10^5
10^6
10^7

图3B




单体 A




单体 B

图4

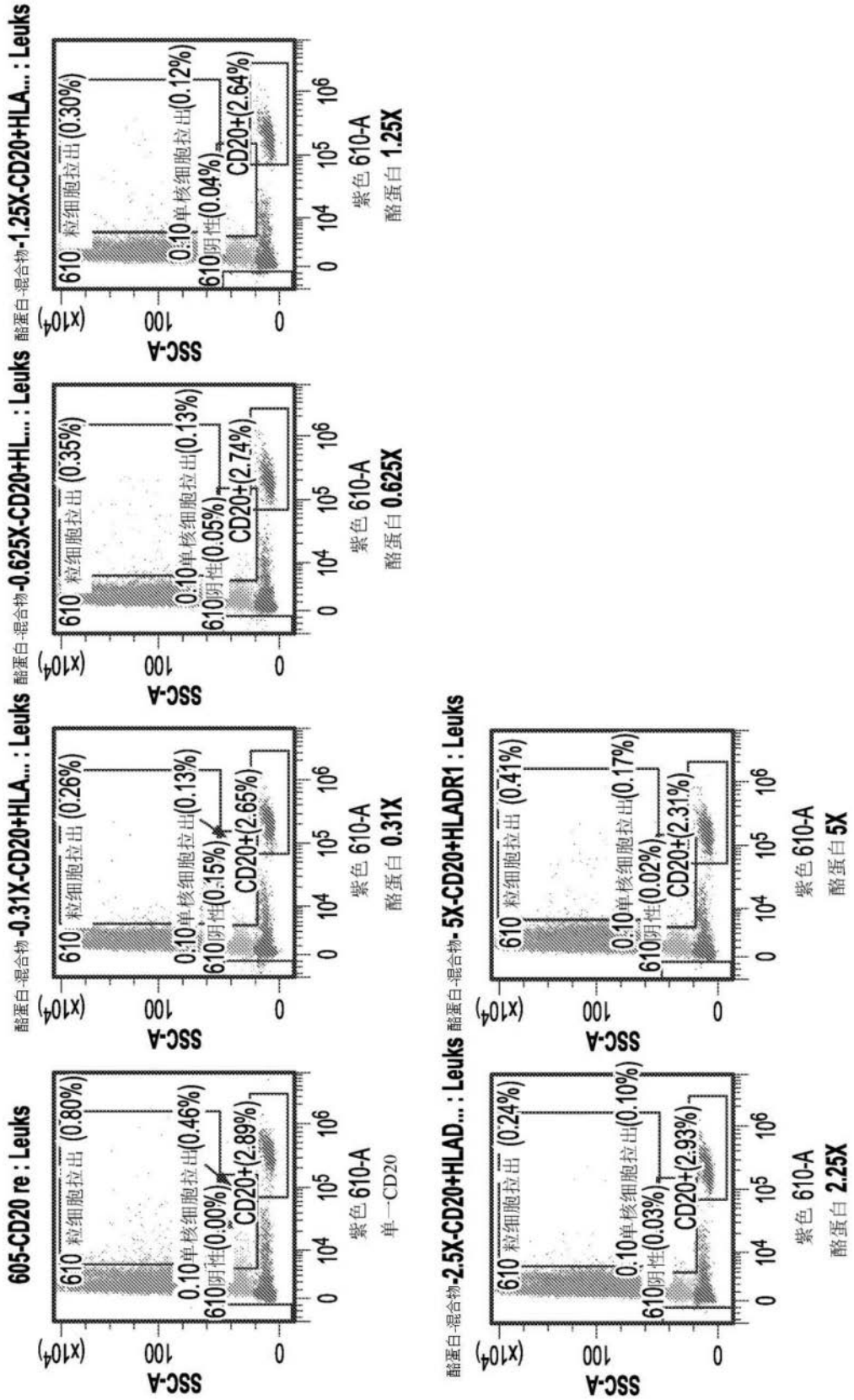

605-CD20 re : Leuks
酪蛋白-混合物-0.31X-CD20+HLA... : Leuks
酪蛋白-混合物-0.625X-CD20+HL... : Leuks
酪蛋白-混合物-1.25X-CD20+HLA... : Leuks
酪蛋白-混合物- 5X-CD20+HLADR1 : Leuks
酪蛋白-混合物-2.5X-CD20+HLAD... : Leuks
610 粒细胞拉出 (0.80%)
0.10单核细胞拉出(0.46%)
610阴性(0.00%)
CD20+(2.89%)
610 粒细胞拉出 (0.26%)
0.10单核细胞拉出(0.13%)
610阴性(0.15%)
CD20+(2.65%)
610 粒细胞拉出 (0.35%)
0.10单核细胞拉出(0.13%)
610阴性(0.05%)
CD20+(2.74%)
610 粒细胞拉出 (0.30%)
0.10单核细胞拉出(0.12%)
610阴性(0.04%)
CD20+(2.64%)
610 粒细胞拉出 (0.41%)
0.10单核细胞拉出(0.17%)
610阴性(0.02%)
CD20+(2.31%)
610 粒细胞拉出 (0.24%)
0.10单核细胞拉出(0.10%)
610阴性(0.03%)
CD20+(2.93%)
SSC-A
(x10⁴)
紫色 610-A
单一CD20
酪蛋白 0.31X
酪蛋白 0.625X
酪蛋白 1.25X
酪蛋白 5X
酪蛋白 2.25X

图5

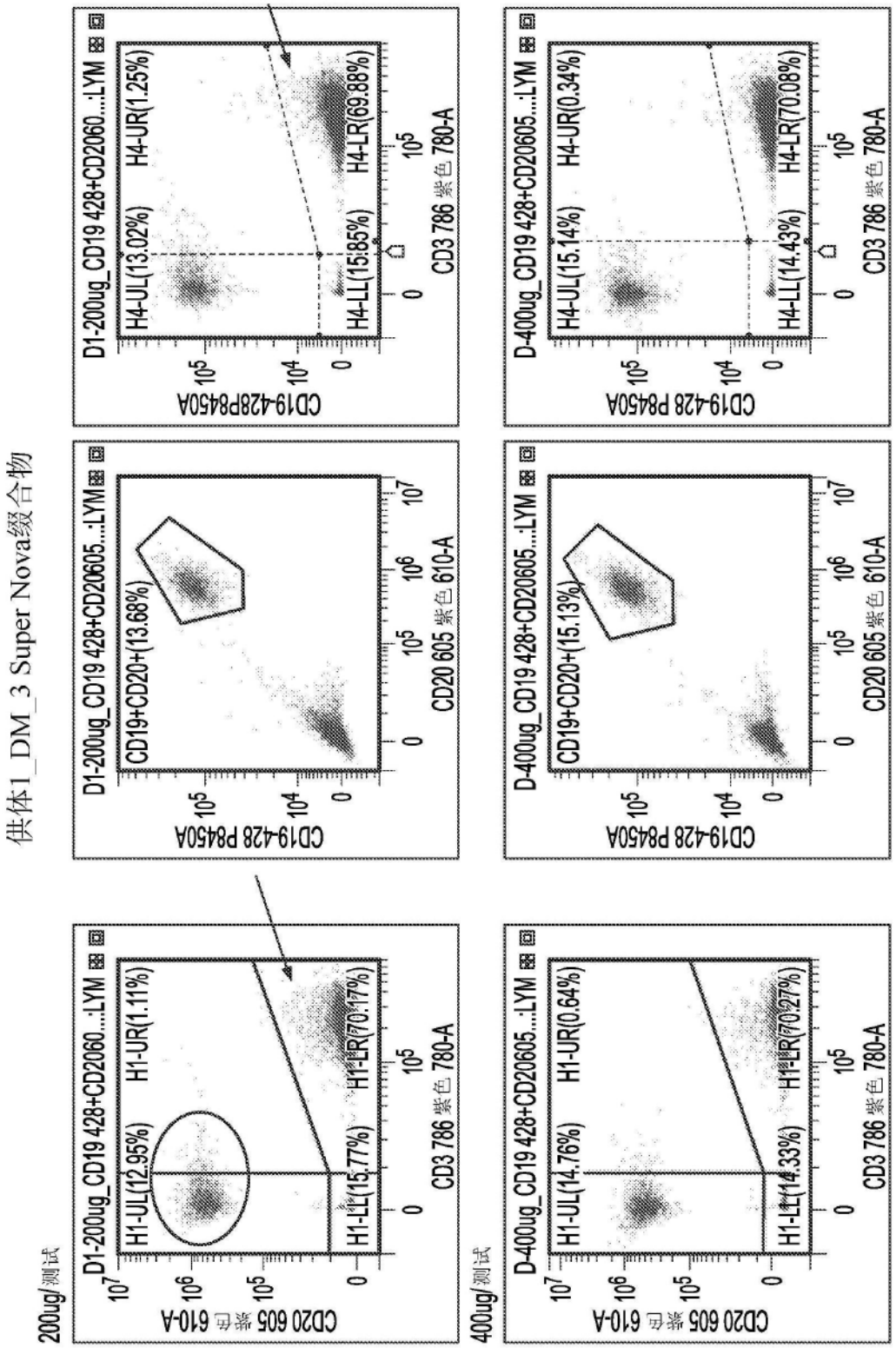

供体1_DM_3 Super Nova级合物
200ug/测试
400ug/测试
D1-200ug_CD19 428+CD2060...:LYM
D-400ug_CD19 428+CD20605...:LYM
H1-UL(12.95%)
H1-UR(1.11%)
H1-LL(15.77%)
H1-LR(70.17%)
H4-UL(13.02%)
H4-UR(1.25%)
H4-LL(15.85%)
H4-LR(69.88%)
H1-UL(14.76%)
H1-UR(0.64%)
H1-LL(14.33%)
H1-LR(70.27%)
H4-UL(15.14%)
H4-UR(0.34%)
H4-LL(14.43%)
H4-LR(70.08%)
CD19+CD20+(13.68%)
CD19+CD20+(15.13%)
CD20 605 紫色 610-A
CD3 786 紫色 780-A
CD19-428 P8450A

图6

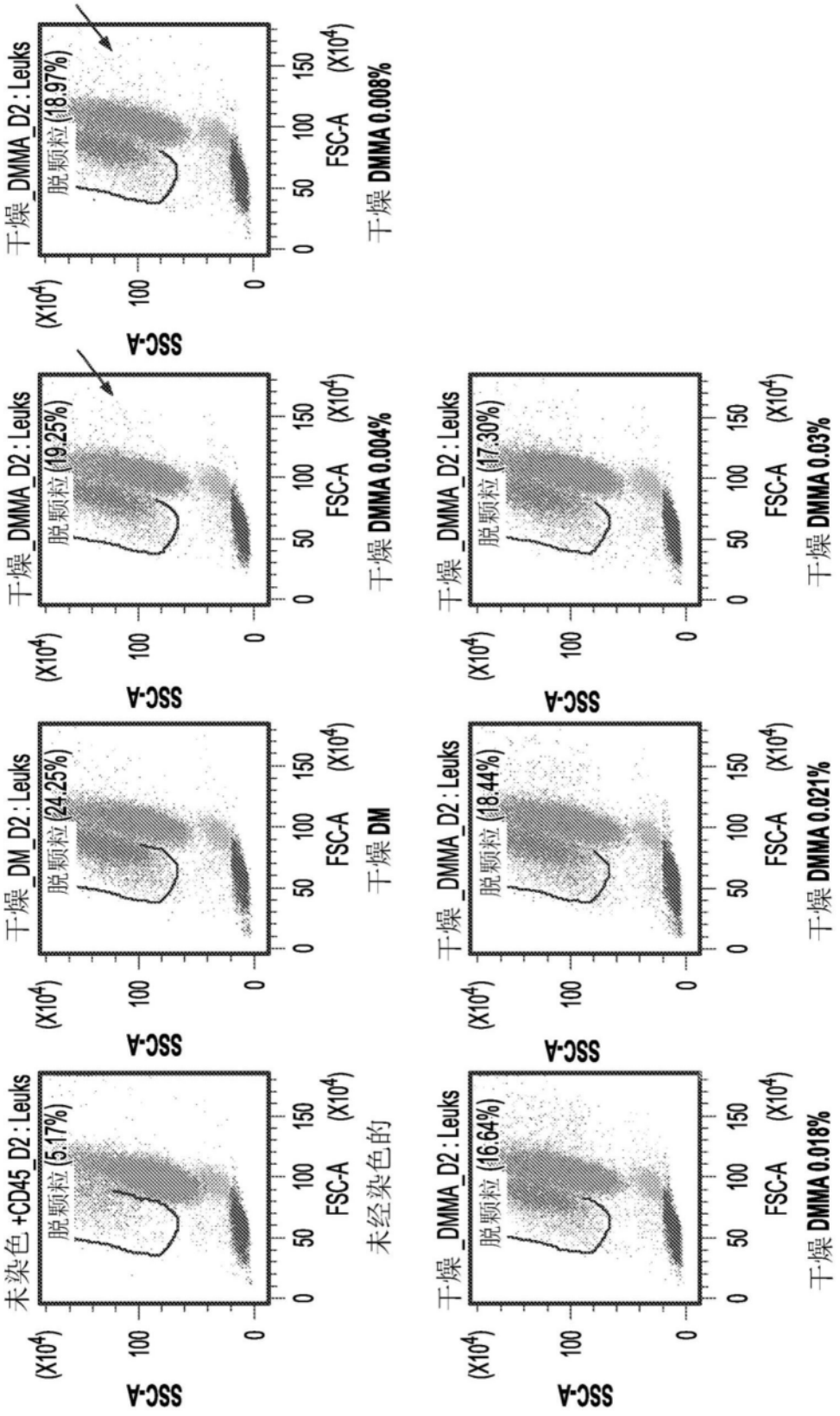

未染色 +CD45_D2:Leuks
脱颗粒 (5.17%)
未经染色的
干燥_DM_D2:Leuks
脱颗粒 (24.25%)
干燥 DM
干燥_DMMA_D2:Leuks
脱颗粒 (16.64%)
干燥 DMMA 0.018%
干燥_DMMA_D2:Leuks
脱颗粒 (18.44%)
干燥 DMMA 0.021%
干燥_DMMA_D2:Leuks
脱颗粒 (19.25%)
干燥 DMMA 0.004%
干燥_DMMA_D2:Leuks
脱颗粒 (17.30%)
干燥 DMMA 0.03%
干燥_DMMA_D2:Leuks
脱颗粒 (18.97%)
干燥 DMMA 0.008%
SSC-A
FSC-A
(X10⁴)
0
50
100
150

图7A

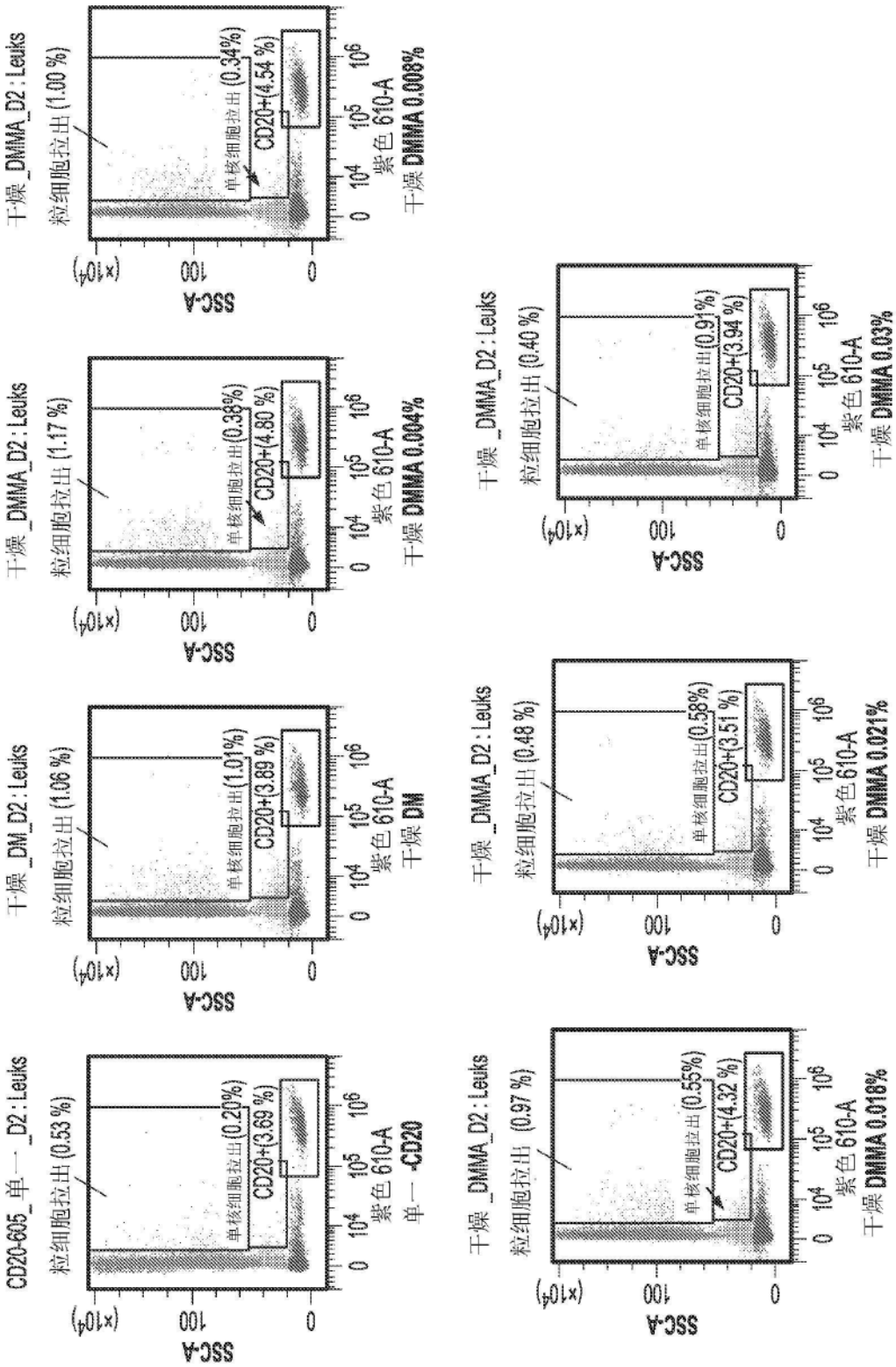

CD20-605_单一_D2:Leuks
粒细胞拉出 (0.53 %)
单核细胞拉出 (0.20%)
CD20+(3.69 %)
单一-CD20
干燥_DM_D2:Leuks
粒细胞拉出 (1.06 %)
单核细胞拉出 (1.01%)
CD20+(3.89 %)
干燥 DM
干燥_DMMA_D2:Leuks
粒细胞拉出 (1.17 %)
单核细胞拉出 (0.38%)
CD20+(4.80 %)
干燥 DMMA 0.004%
干燥_DMMA_D2:Leuks
粒细胞拉出 (1.00 %)
单核细胞拉出 (0.34%)
CD20+(4.54 %)
干燥 DMMA 0.008%
干燥_DMMA_D2:Leuks
粒细胞拉出 (0.97 %)
单核细胞拉出 (0.55%)
CD20+(4.32 %)
干燥 DMMA 0.018%
干燥_DMMA_D2:Leuks
粒细胞拉出 (0.48 %)
单核细胞拉出 (0.58%)
CD20+(3.51 %)
干燥 DMMA 0.021%
干燥_DMMA_D2:Leuks
粒细胞拉出 (0.40 %)
单核细胞拉出 (0.91%)
CD20+(3.94 %)
干燥 DMMA 0.03%
SSC-A
紫色 610-A

图7B

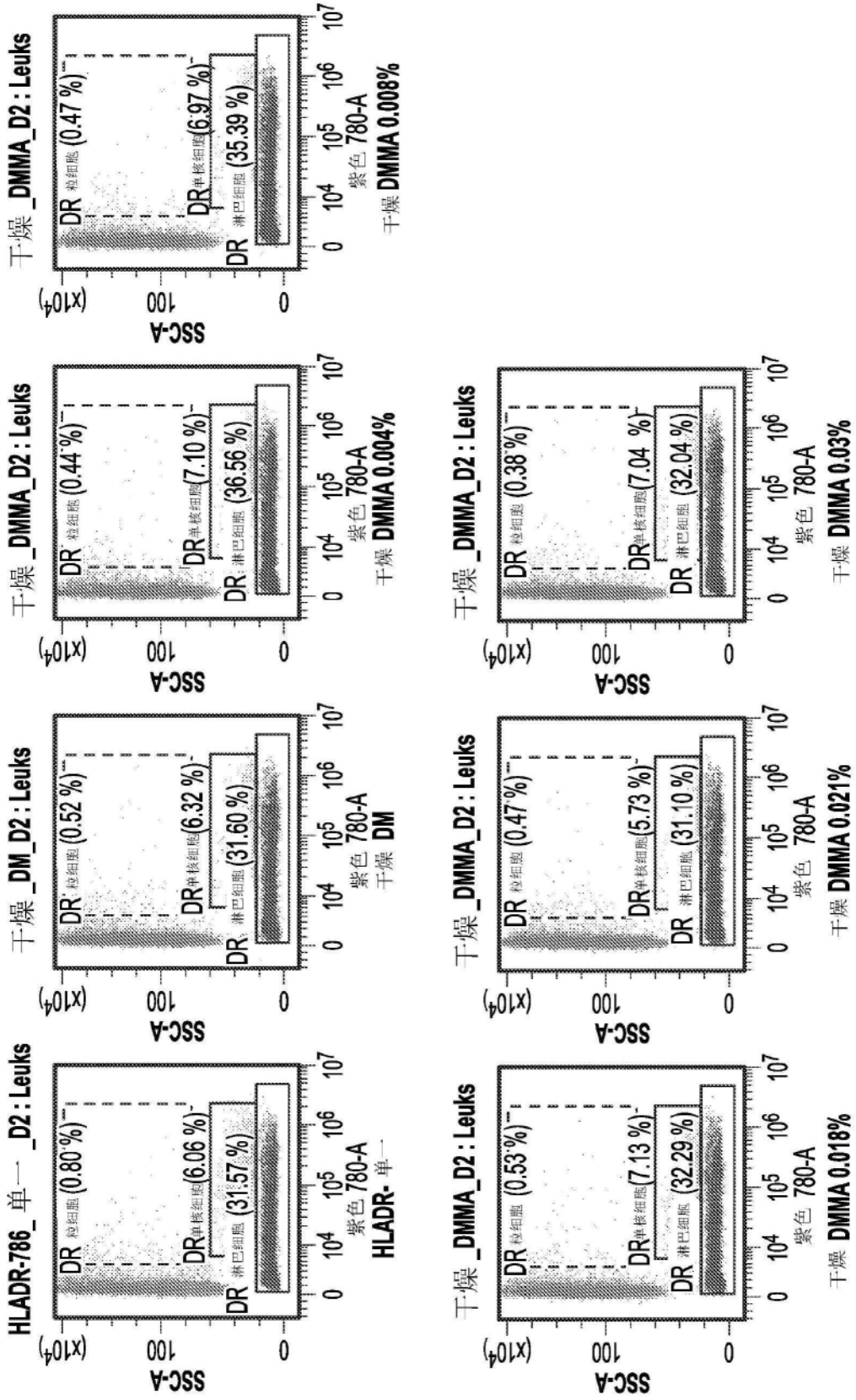

HLADR-786_单一 _D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.80 %)
DR单核细胞(6.06 %)
DR 淋巴细胞 (31.57 %)
SSC-A
紫色 780-A
HLADR- 单一
干燥 _DM_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.52 %)
DR单核细胞(6.32 %)
DR 淋巴细胞 (31.60 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DM
干燥 _DMMA_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.44 %)
DR单核细胞(7.10 %)
DR 淋巴细胞 (36.56 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.004%
干燥 _DMMA_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.47 %)
DR单核细胞(6.97 %)
DR 淋巴细胞 (35.39 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.008%
干燥 _DMMA_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.53 %)
DR单核细胞(7.13 %)
DR 淋巴细胞 (32.29 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.018%
干燥 _DMMA_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.47 %)
DR单核细胞(5.73 %)
DR 淋巴细胞 (31.10 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.021%
干燥 _DMMA_D2 : Leuks
DR 粒细胞 (0.38 %)
DR单核细胞(7.04 %)
DR 淋巴细胞 (32.04 %)
SSC-A
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.03%

图7C

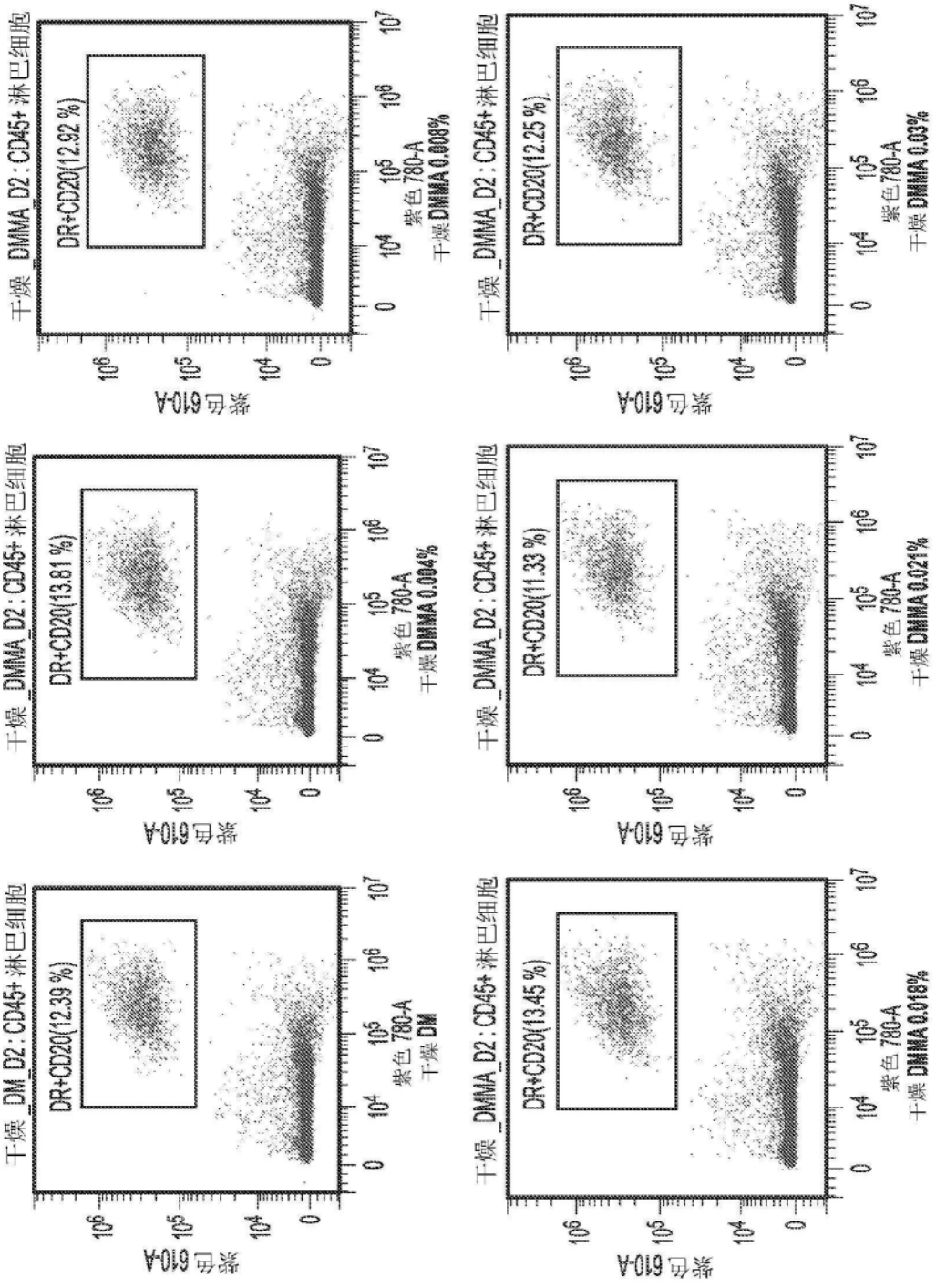

干燥_DMMA_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(12.92 %)
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.008%
紫色 610-A
干燥_DMMA_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(12.25 %)
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.03%
紫色 610-A
干燥_DMMA_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(13.81 %)
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.004%
紫色 610-A
干燥_DMMA_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(11.33 %)
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.021%
紫色 610-A
干燥_DM_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(12.39 %)
紫色 780-A
干燥 DM
紫色 610-A
干燥_DMMA_D2:CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(13.45 %)
紫色 780-A
干燥 DMMA 0.018%
紫色 610-A

图7D

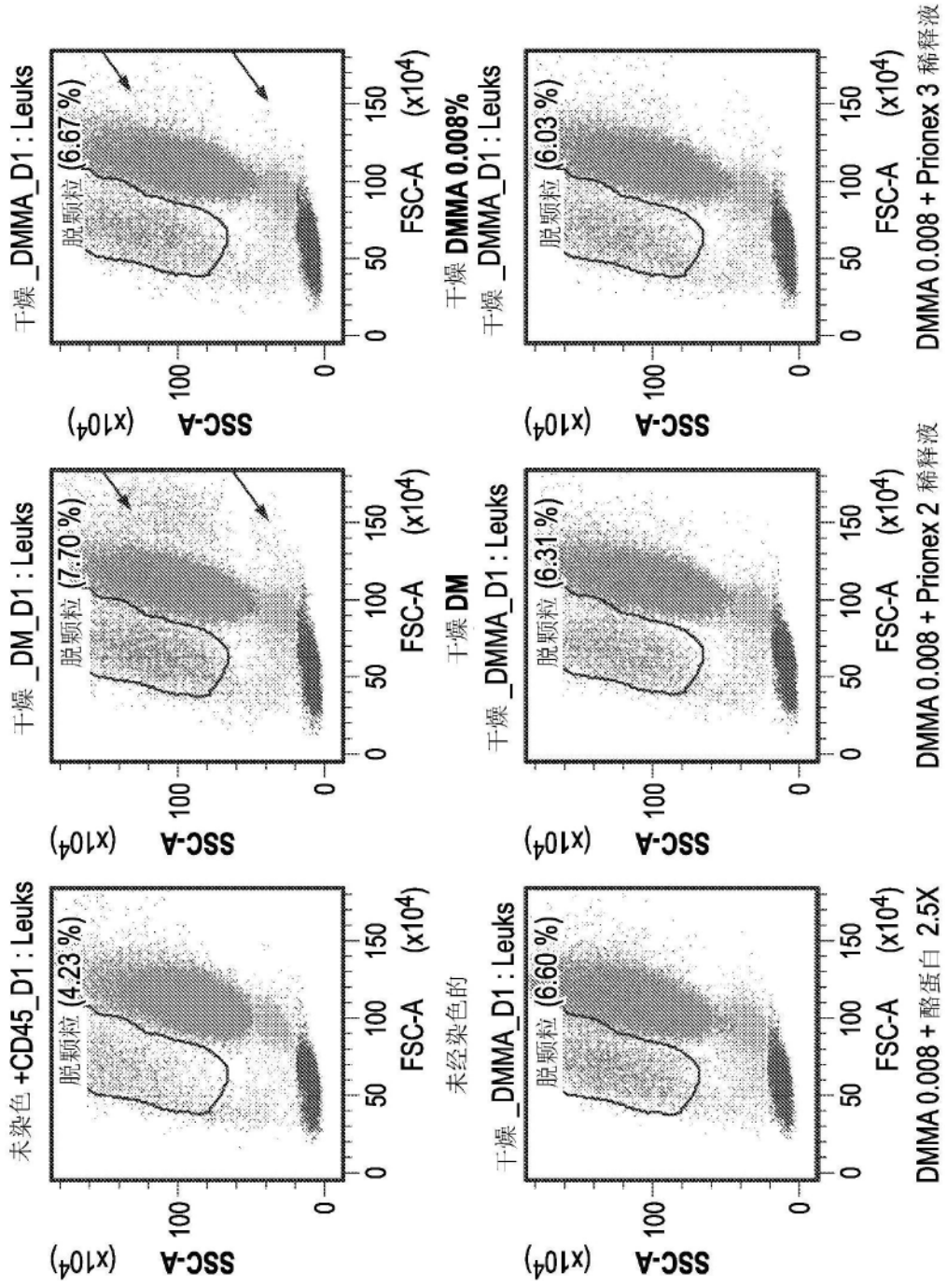

未染色 +CD45_D1 : Leuks
脱颗粒 (4.23 %)
干燥 _DM_D1 : Leuks
脱颗粒 (7.70 %)
未经染色的
干燥 DM
干燥 _DMMA_D1 : Leuks
脱颗粒 (6.60 %)
干燥 _DMMA_D1 : Leuks
脱颗粒 (6.31 %)
干燥 DMMA 0.008%
干燥 _DMMA_D1 : Leuks
脱颗粒 (6.03 %)
干燥 _DMMA_D1 : Leuks
脱颗粒 (6.67 %)
SSC-A (x10⁴)
FSC-A (x10⁴)
0
50
100
150
DMMA 0.008 + 酪蛋白 2.5X
DMMA 0.008 + Prionex 2 稀释液
DMMA 0.008 + Prionex 3 稀释液

图8A

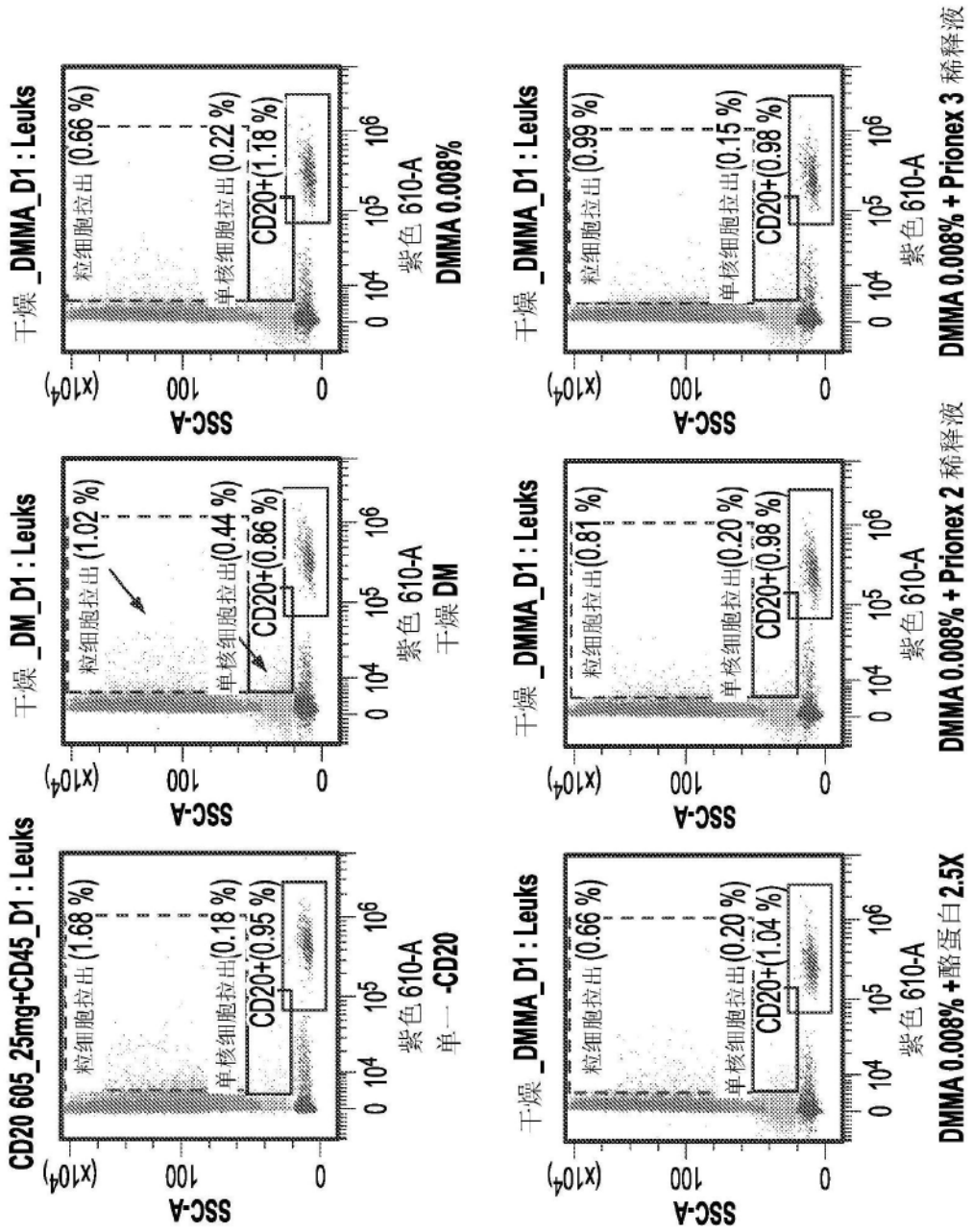

CD20 605_25mg+CD45_D1 : Leuks
干燥_DM_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
粒细胞拉出 (1.68 %)
单核细胞拉出(0.18 %)
CD20+(0.95 %)
粒细胞拉出 (1.02 %)
单核细胞拉出(0.44 %)
CD20+(0.86 %)
粒细胞拉出 (0.66 %)
单核细胞拉出 (0.22 %)
CD20+(1.18 %)
粒细胞拉出 (0.66 %)
单核细胞拉出(0.20 %)
CD20+(1.04 %)
粒细胞拉出(0.81 %)
单核细胞拉出(0.20 %)
CD20+(0.98 %)
粒细胞拉出 (0.99 %)
单核细胞拉出(0.15 %)
CD20+(0.98 %)
SSC-A
(x10⁴)
100
0
0 10⁴ 10⁵ 10⁶
紫色 610-A
单一 -CD20
干燥 DM
DMMA 0.008%
DMMA 0.008% +酪蛋白 2.5X
DMMA 0.008% + Prionex 2 稀释液
DMMA 0.008% + Prionex 3 稀释液

图8B

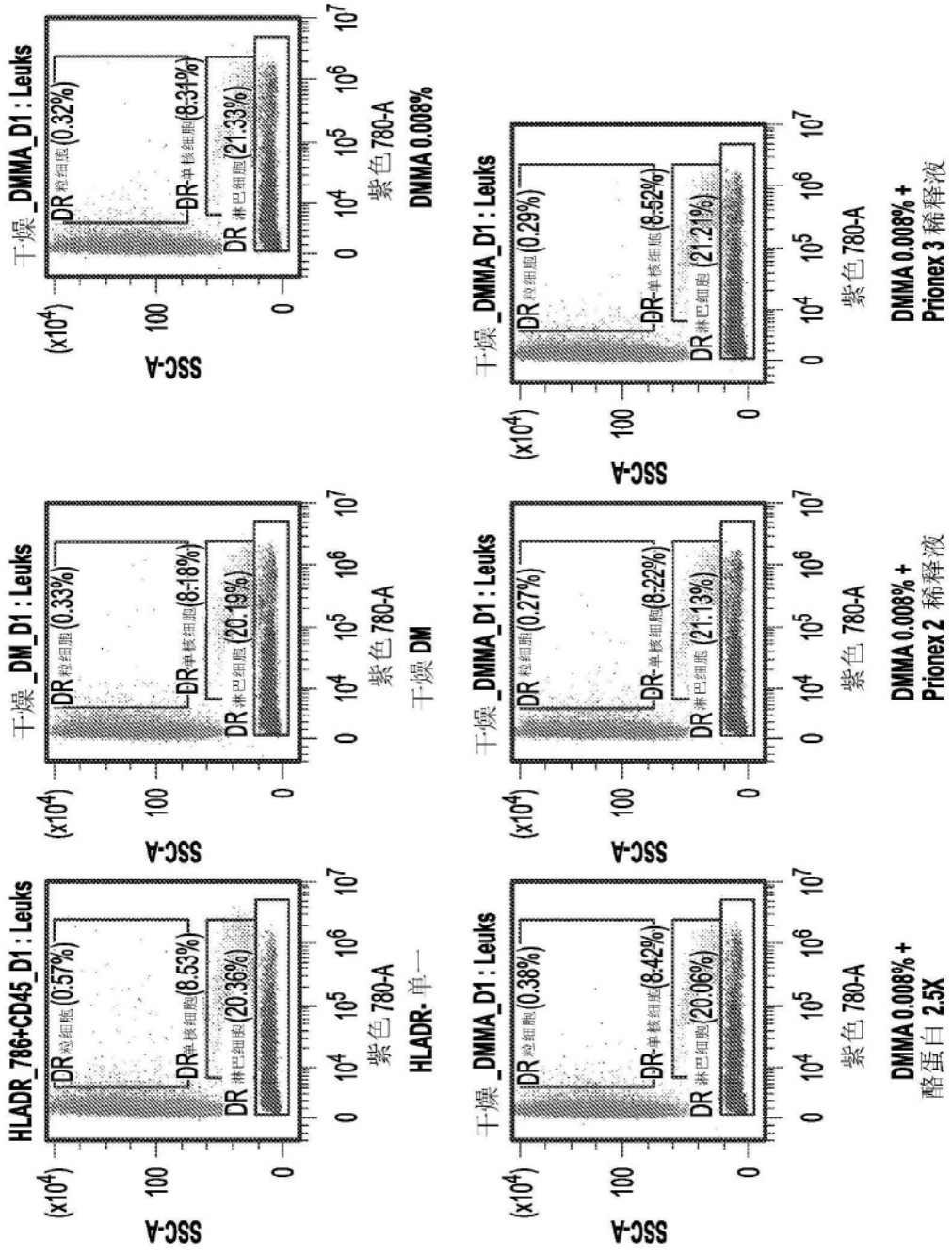

HLADR_786+CD45_D1 : Leuks
干燥_DM_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
干燥_DMMA_D1 : Leuks
DR 粒细胞 (0.57%)
DR-单核细胞 (8.53%)
DR 淋巴细胞 (20.36%)
DR 粒细胞 (0.33%)
DR-单核细胞 (8.18%)
DR 淋巴细胞 (20.19%)
DR 粒细胞 (0.27%)
DR-单核细胞 (8.22%)
DR 淋巴细胞 (21.13%)
DR 粒细胞 (0.38%)
DR-单核细胞 (8.42%)
DR 淋巴细胞 (20.06%)
DR 粒细胞 (0.32%)
DR-单核细胞 (8.31%)
DR 淋巴细胞 (21.33%)
DR 粒细胞 (0.29%)
DR-单核细胞 (8.52%)
DR 淋巴细胞 (21.21%)
SSC-A
(x10⁴)
紫色 780-A
HLADR- 单一
干燥 DM
DMMA 0.008% +
酪蛋白 2.5X
DMMA 0.008% +
Prionex 2 稀释液
DMMA 0.008%
DMMA 0.008% +
Prionex 3 稀释液

图8C

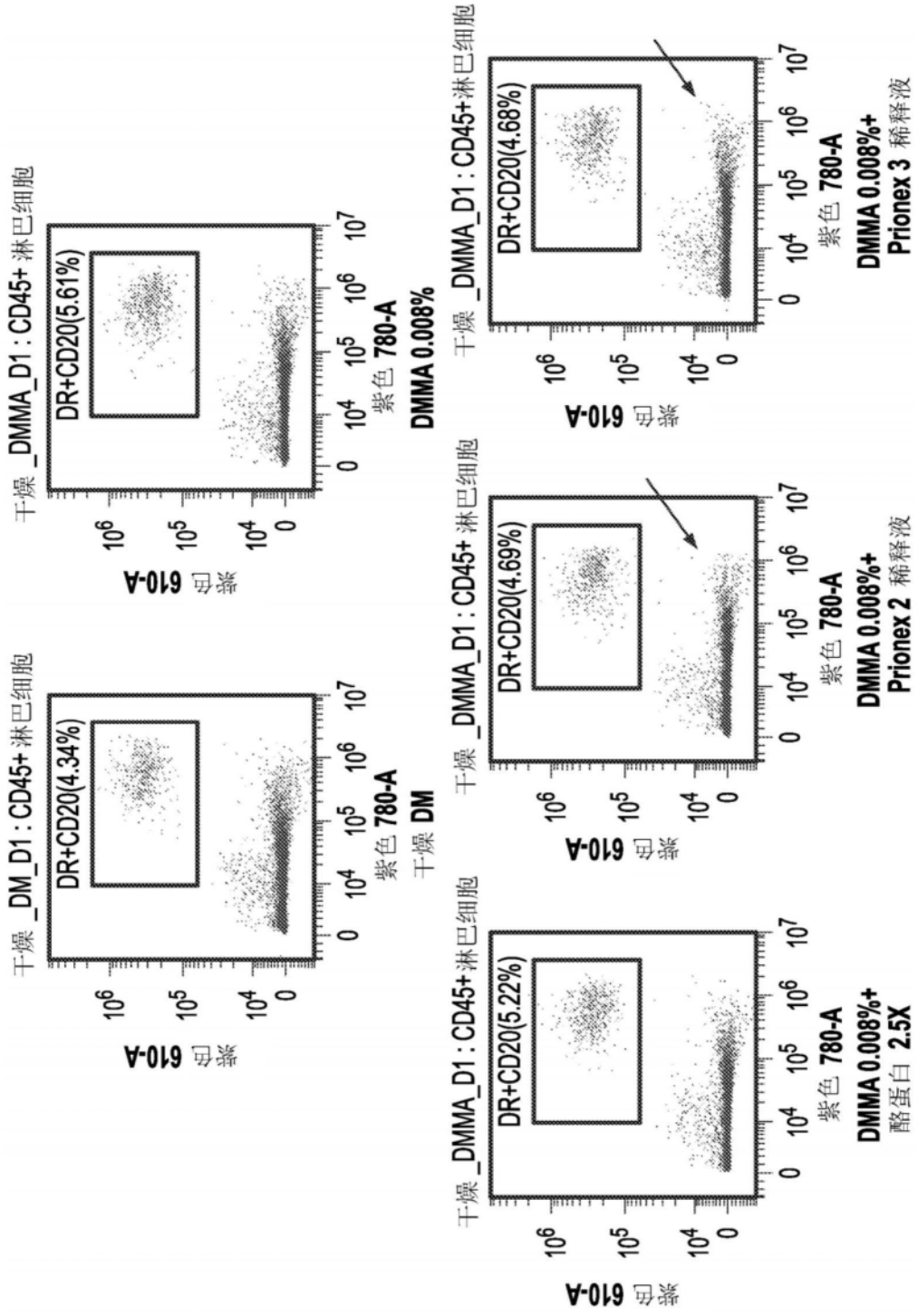

干燥 _DM_D1 : CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(4.34%)
紫色 610-A
紫色 780-A
干燥 DM
干燥 _DMMA_D1 : CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(5.61%)
紫色 610-A
紫色 780-A
DMMA 0.008%
干燥 _DMMA_D1 : CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(5.22%)
紫色 610-A
紫色 780-A
DMMA 0.008%+
酪蛋白 2.5X
干燥 _DMMA_D1 : CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(4.69%)
紫色 610-A
紫色 780-A
DMMA 0.008%+
Prionex 2 稀释液
干燥 _DMMA_D1 : CD45+ 淋巴细胞
DR+CD20(4.68%)
紫色 610-A
紫色 780-A
DMMA 0.008%+
Prionex 3 稀释液

图8D

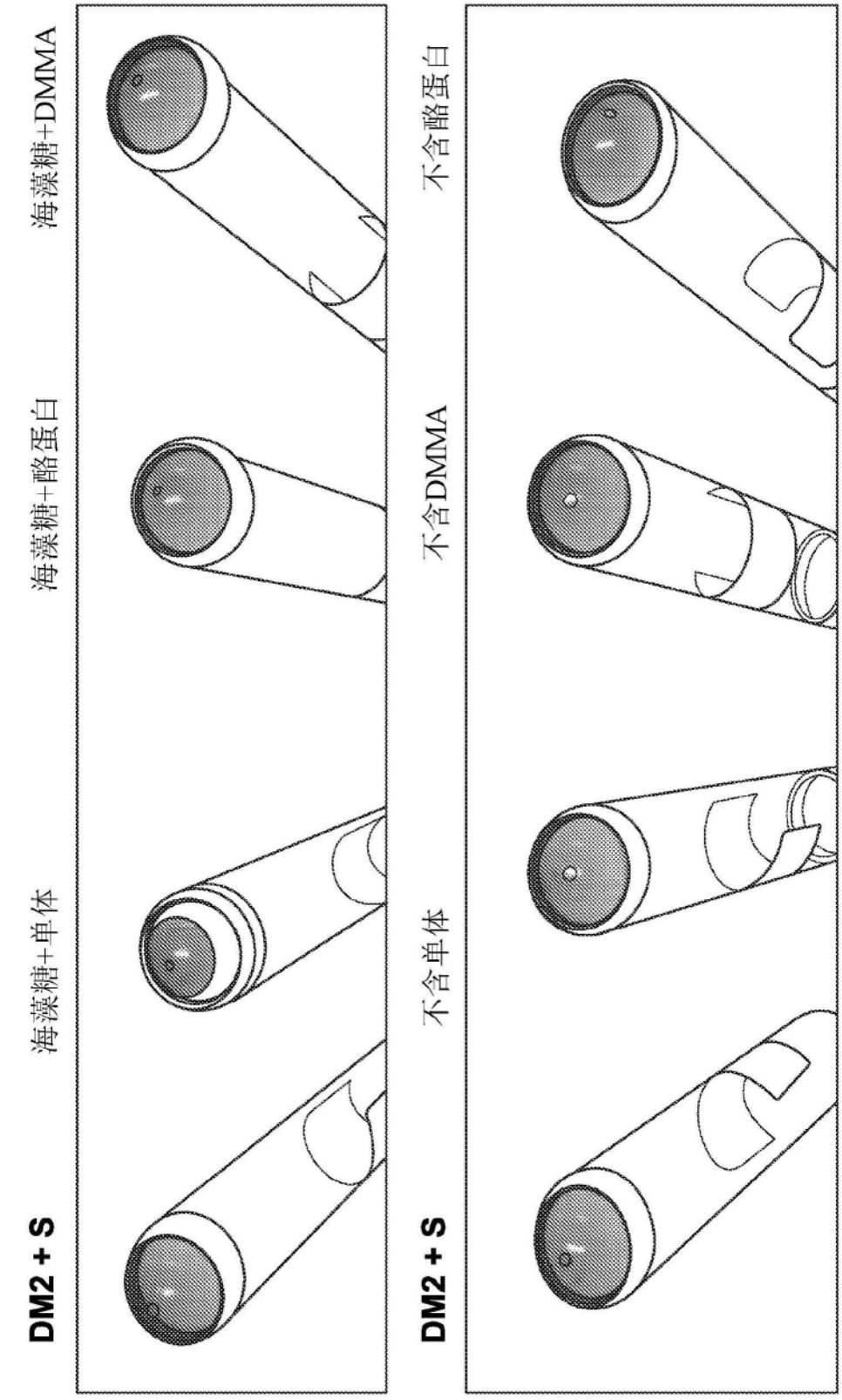



图9

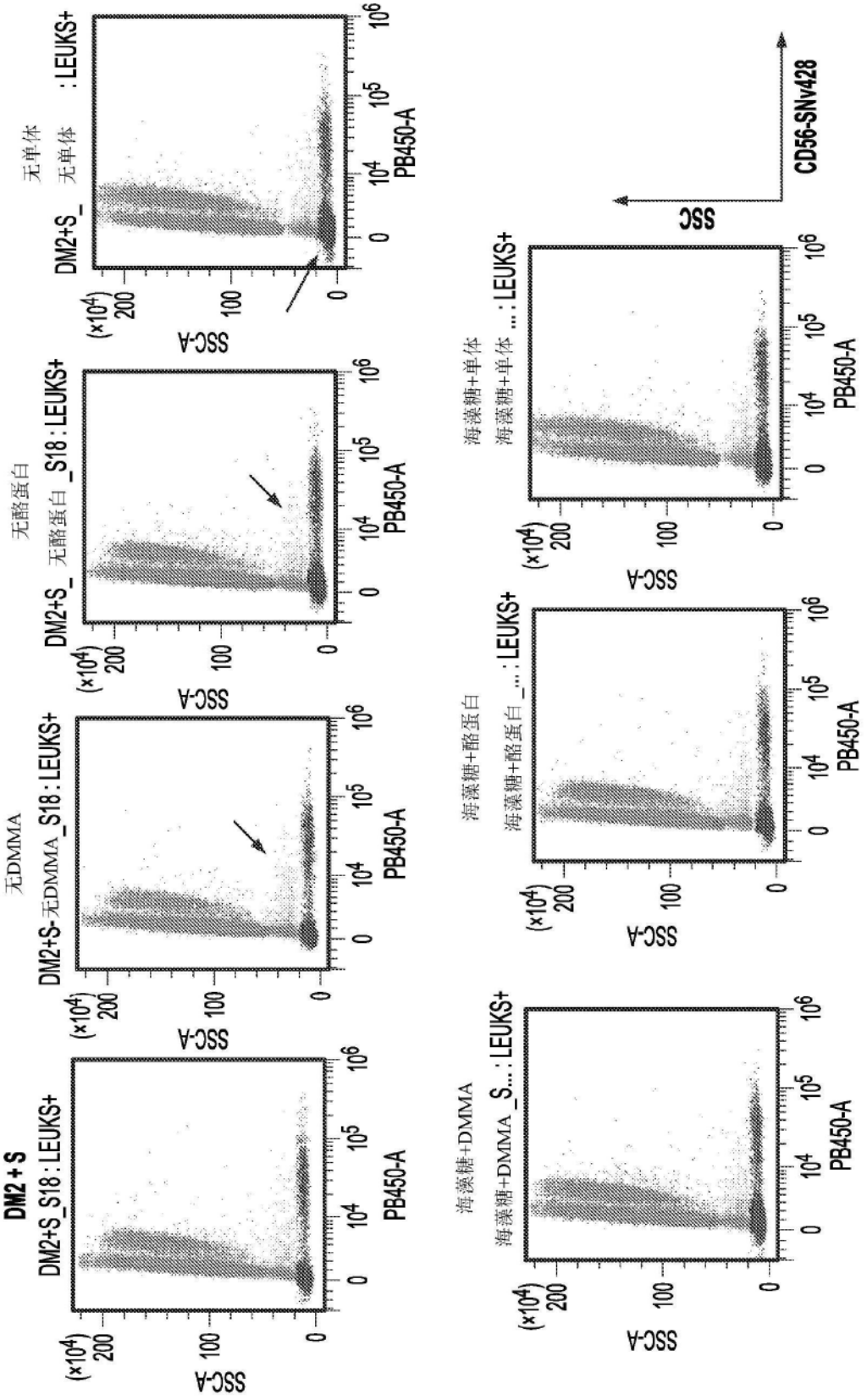

DM2+S
DM2+S_S18 : LEUKS+
无DMMA
DM2+S-无DMMA_S18 : LEUKS+
无酪蛋白
DM2+S_ 无酪蛋白 _S18 : LEUKS+
无单体
DM2+S_ 无单体 : LEUKS+
海藻糖+DMMA
海藻糖+DMMA_S... : LEUKS+
海藻糖+酪蛋白
海藻糖+酪蛋白 _... : LEUKS+
海藻糖+单体
海藻糖+单体 ... : LEUKS+
SSC-A
PB450-A
SSC
CD56-SNv428

图10A

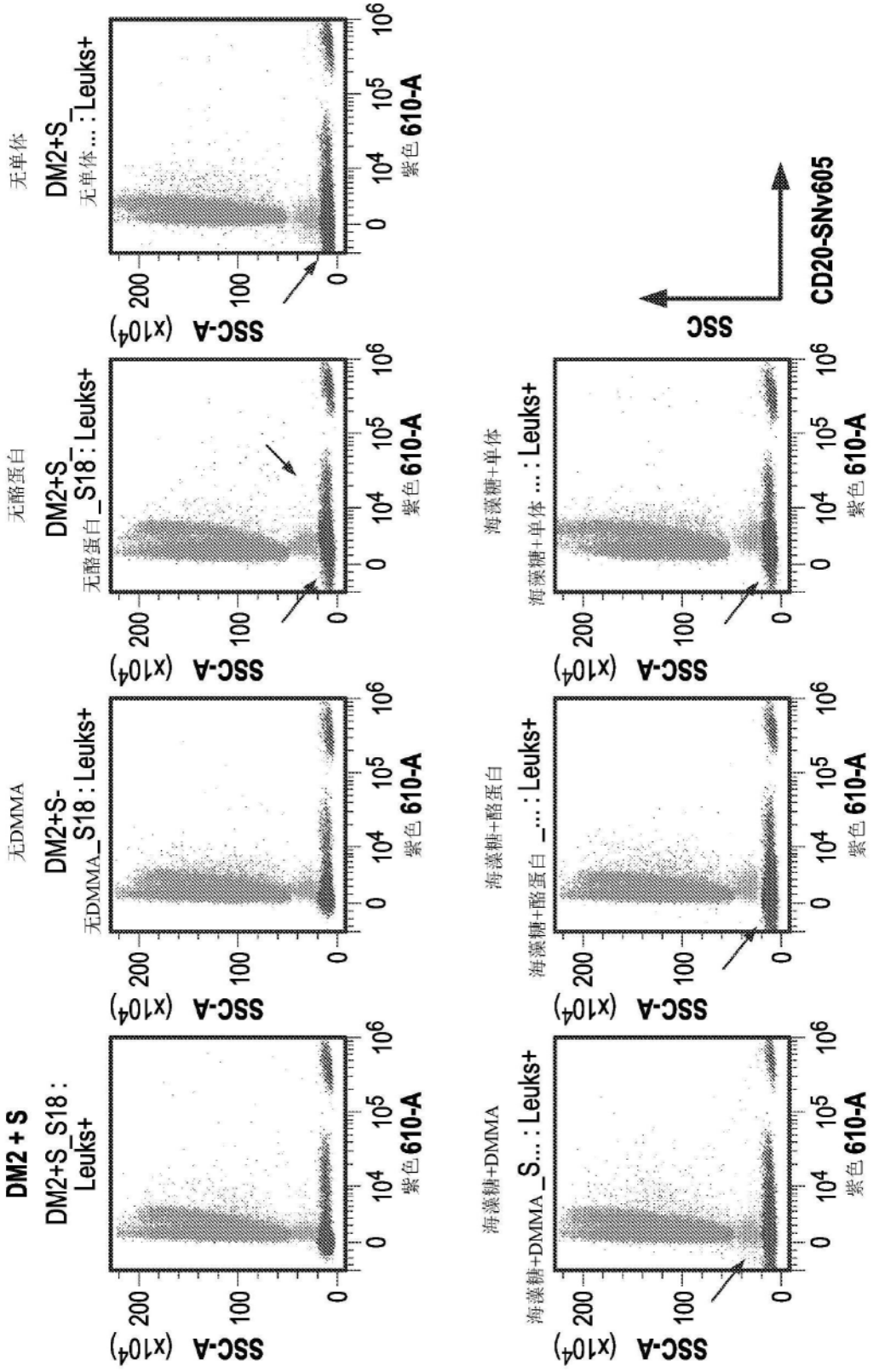

DM2 + S
DM2+S_S18 : Leuks+
无DMMA
DM2+S-无DMMA_S18 : Leuks+
无酪蛋白
DM2+S_无酪蛋白_S18 : Leuks+
无单体
DM2+S_无单体... : Leuks+
海藻糖+DMMA
海藻糖+DMMA_S... : Leuks+
海藻糖+酪蛋白
海藻糖+酪蛋白 _... : Leuks+
海藻糖+单体
海藻糖+单体 ... : Leuks+
SSC-A (x10⁴)
紫色 610-A
SSC
CD20-SNv605

图10B

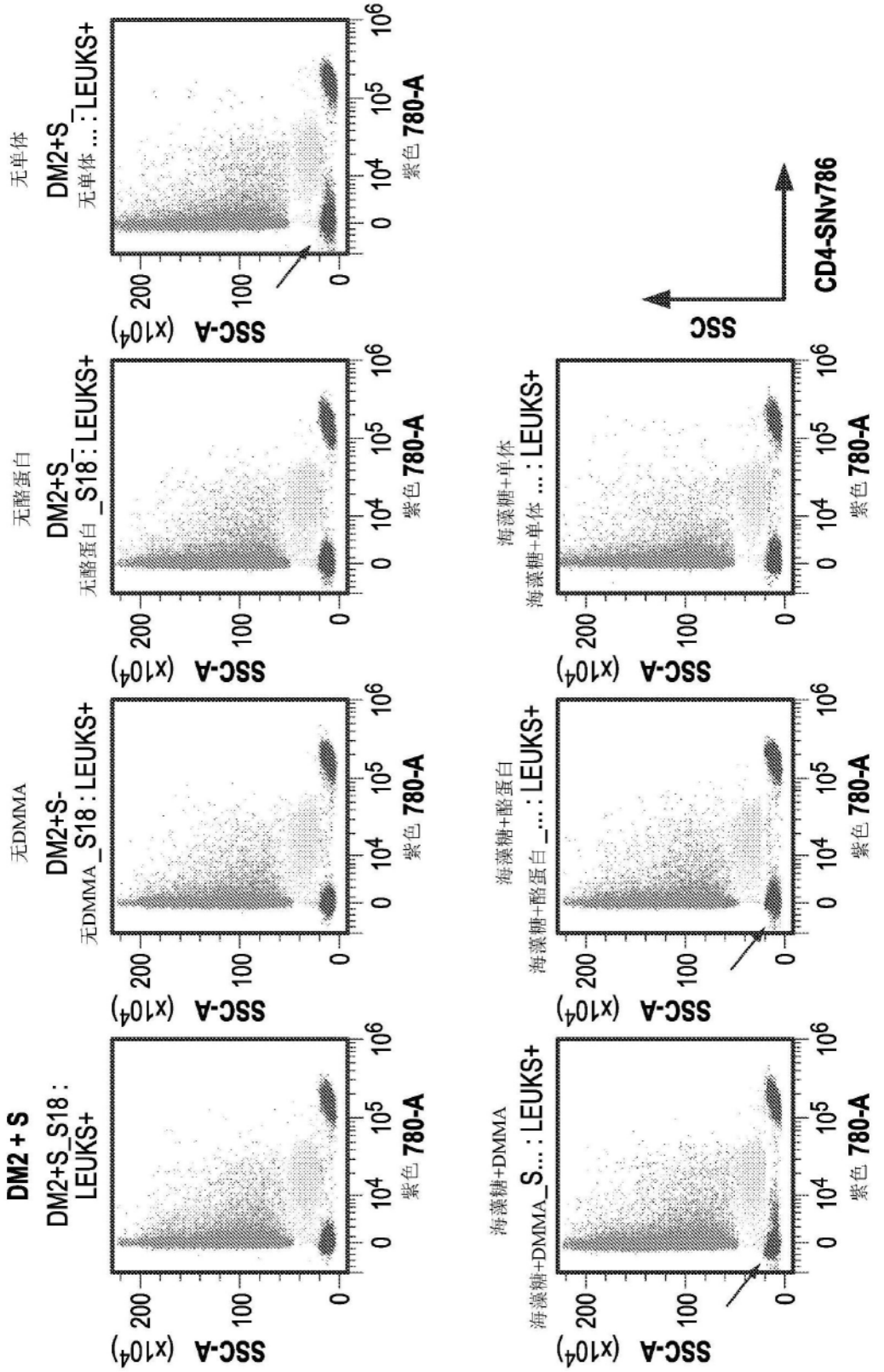

DM2 + S
DM2+S_S18 : LEUKS+
无DMMA
DM2+S- 无DMMA_S18 : LEUKS+
无酪蛋白
DM2+S_ 无酪蛋白 _S18 : LEUKS+
无单体
DM2+S_ 无单体 ... : LEUKS+
海藻糖+DMMA
海藻糖+DMMA_S... : LEUKS+
海藻糖+酪蛋白
海藻糖+酪蛋白 _... : LEUKS+
海藻糖+单体
海藻糖+单体 ... : LEUKS+
SSC-A (x10⁴)
紫色 780-A
SSC
CD4-SNv786

图10C

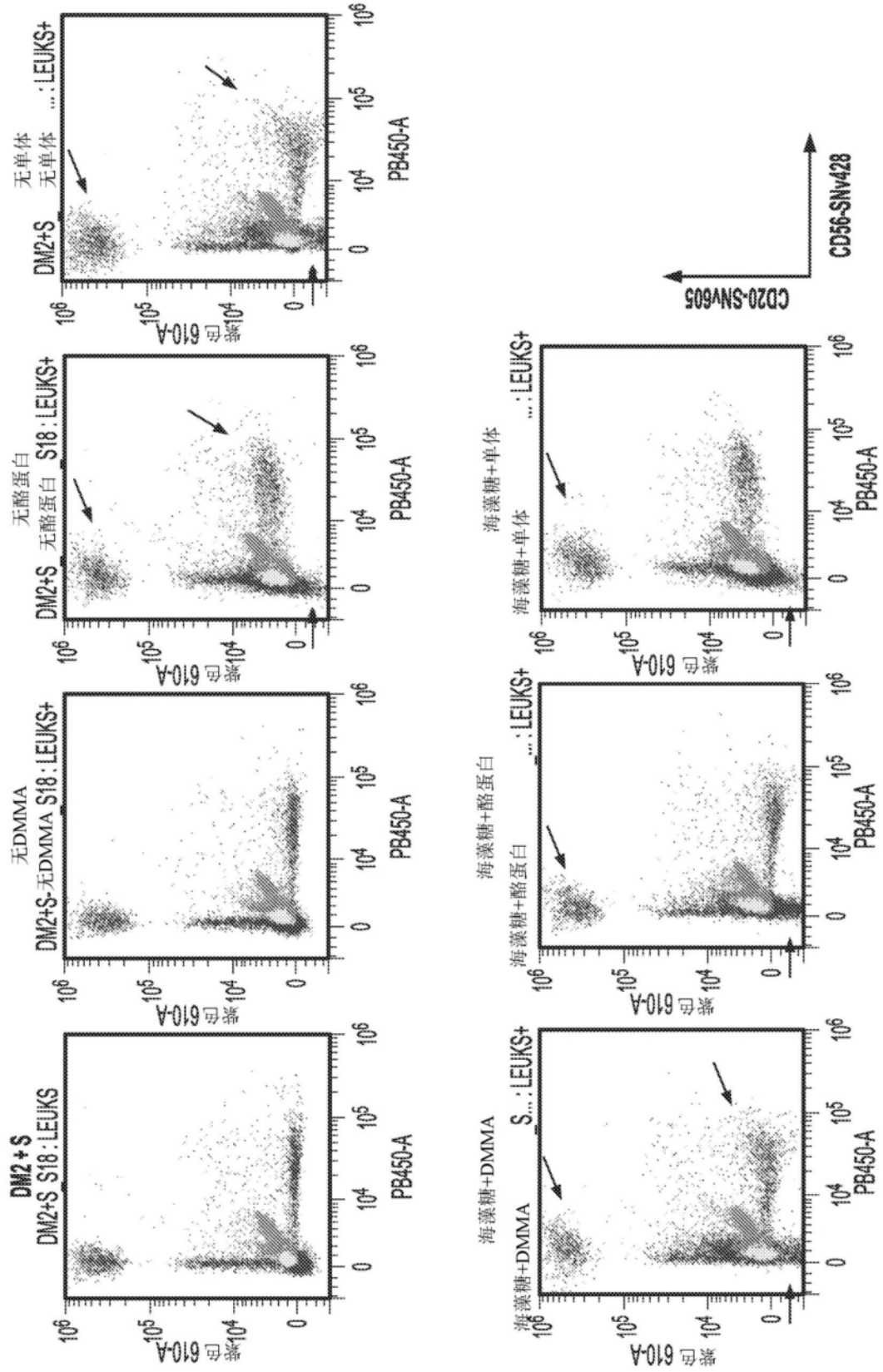

DM2+S S18:LEUKS
DM2+S-无DMMA S18:LEUKS+
无DMMA
DM2+S 无酪蛋白 S18:LEUKS+
无酪蛋白
DM2+S 无单体 ...:LEUKS+
无单体
海藻糖+DMMA S...:LEUKS+
海藻糖+酪蛋白 ...:LEUKS+
海藻糖+单体 ...:LEUKS+
海藻糖+单体
紫色 610-A
PB450-A
CD20-SNv605
CD56-SNv428

图10D

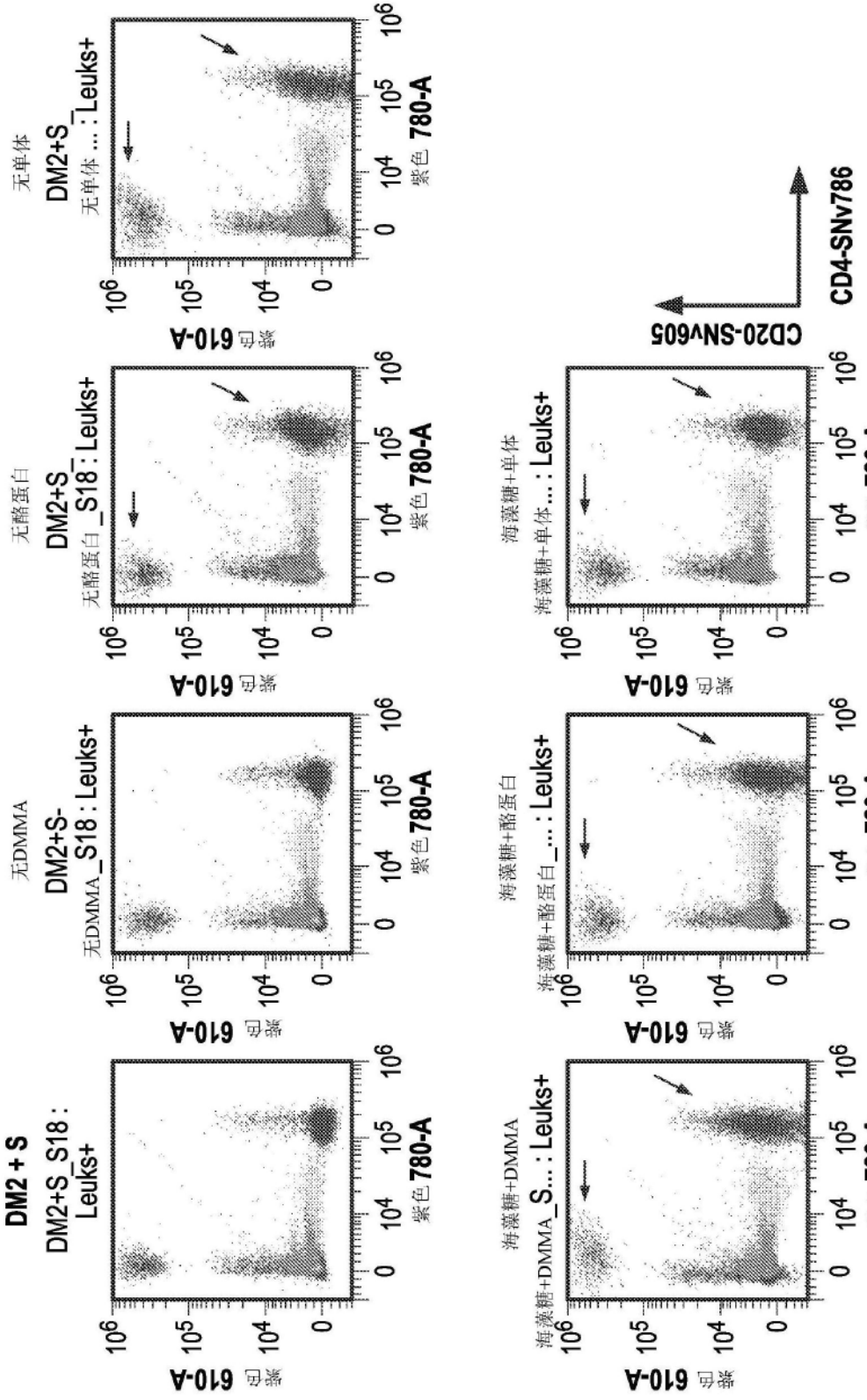

DM2 + S
DM2+S_S18 : Leuks+
无DMMA
DM2+S-
无DMMA_S18 : Leuks+
无酪蛋白
DM2+S
无酪蛋白 _S18 : Leuks+
无单体
DM2+S
无单体 ... : Leuks+
海藻糖+DMMA
海藻糖+DMMA_S... : Leuks+
海藻糖+酪蛋白
海藻糖+酪蛋白_... : Leuks+
海藻糖+单体
海藻糖+单体... : Leuks+
紫色 610-A
紫色 780-A
CD20-SNv605
CD4-SNv786

图10E

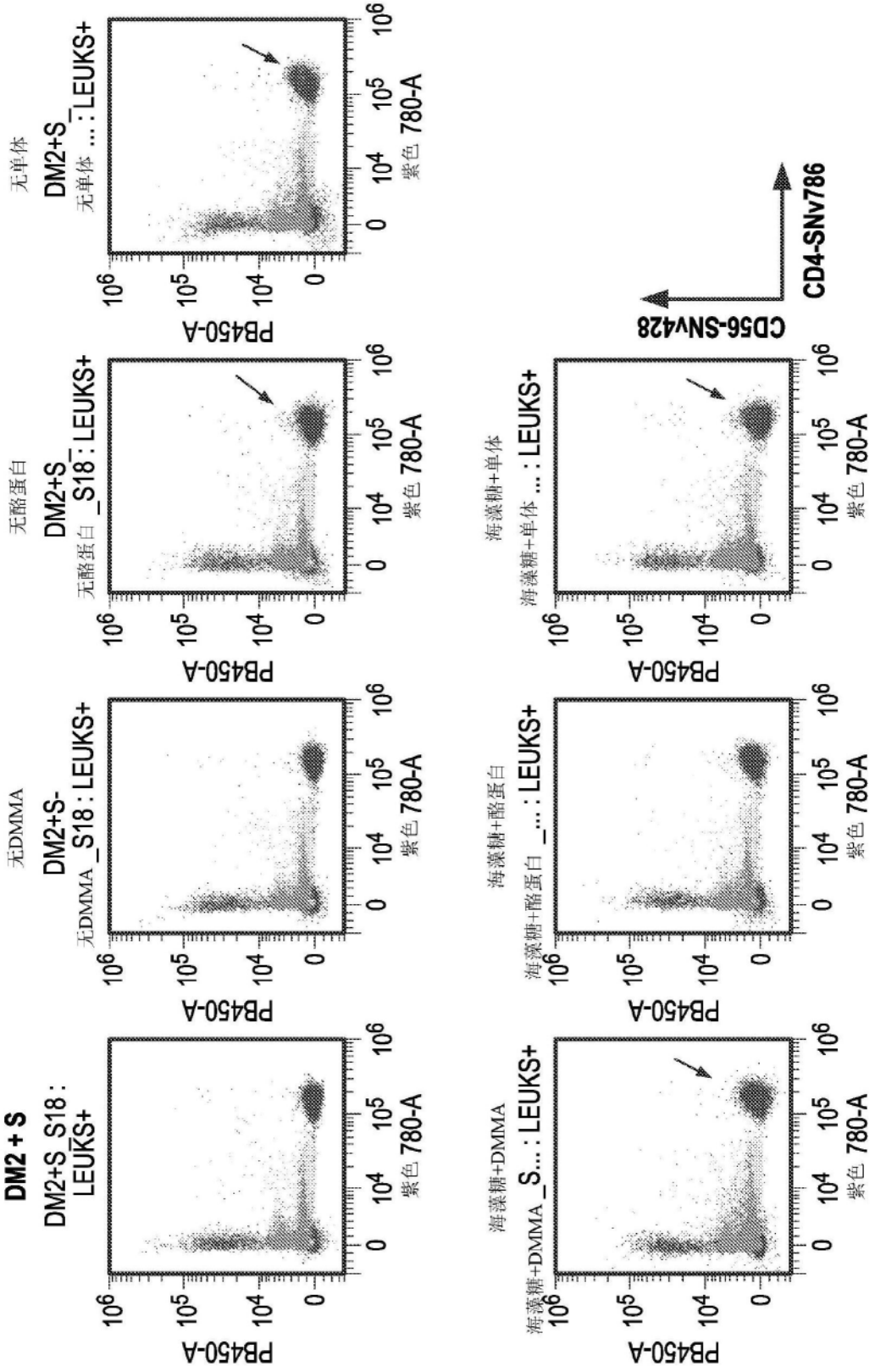

DM2 + S
DM2+S_S18 : LEUKS+
无DMMA
DM2+S-无DMMA_S18 : LEUKS+
无酪蛋白
DM2+S_无酪蛋白_S18 : LEUKS+
无单体
DM2+S_无单体 ... : LEUKS+
海藻糖+DMMA
海藻糖+DMMA_S... : LEUKS+
海藻糖+酪蛋白
海藻糖+酪蛋白_... : LEUKS+
海藻糖+单体
海藻糖+单体 ... : LEUKS+
CD56-SNv428
CD4-SNv786
PB450-A
紫色 780-A

图10F

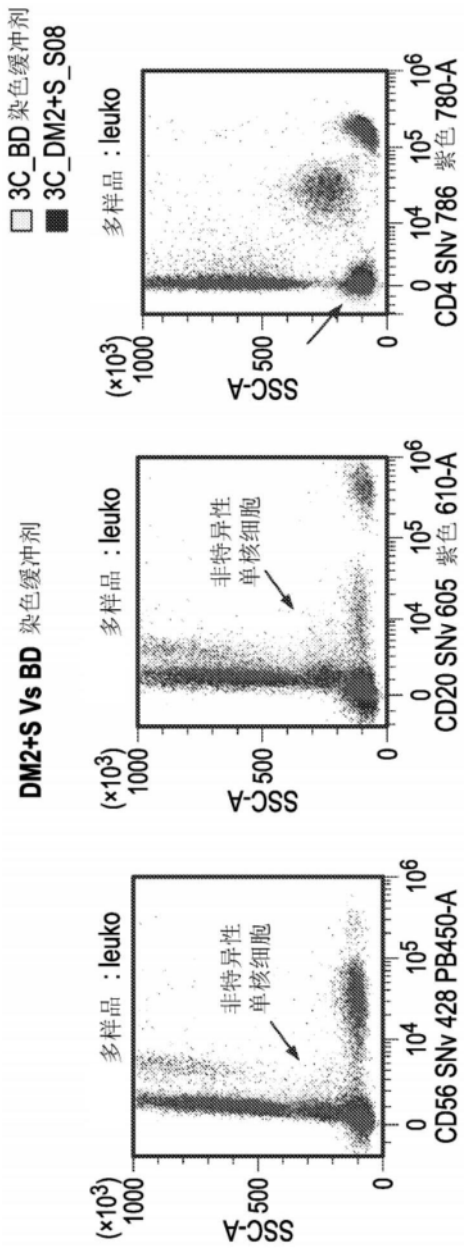

3C_BD 染色缓冲剂
3C_DM2+S_S08
DM2+S Vs BD 染色缓冲剂
多样品 : leuko
非特异性
单核细胞
SSC-A
(×10³)
1000
500
0
0
10⁴
10⁵
10⁶
CD4 SNv 786 紫色 780-A
CD20 SNv 605 紫色 610-A
CD56 SNv 428 PB450-A

图11A

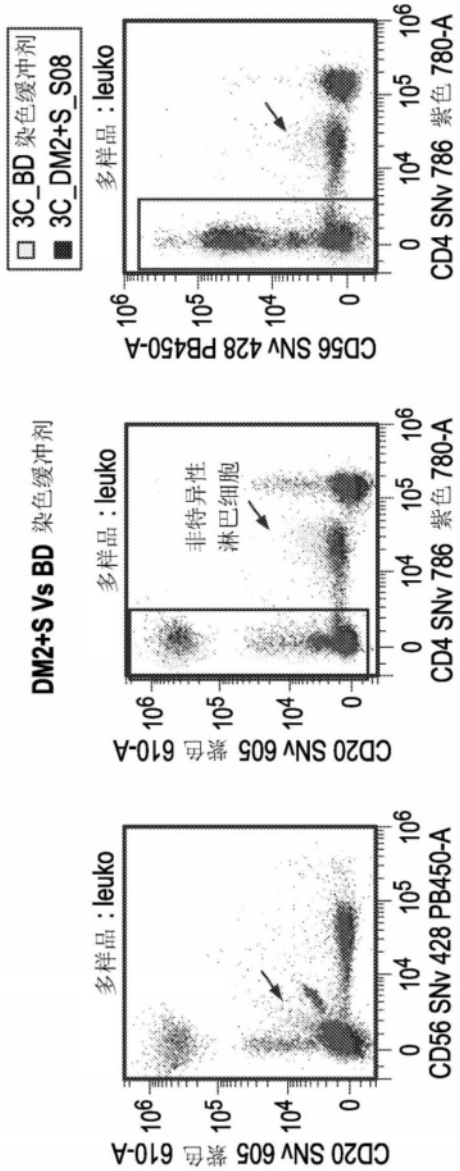

3C_BD 染色缓冲剂
3C_DM2+S_S08
多样品：leuko
CD56 SNv 428 PB450-A
CD4 SNv 786 紫色 780-A
DM2+S Vs BD 染色缓冲剂
非特异性
淋巴细胞
CD20 SNv 605 紫色 610-A

图11B

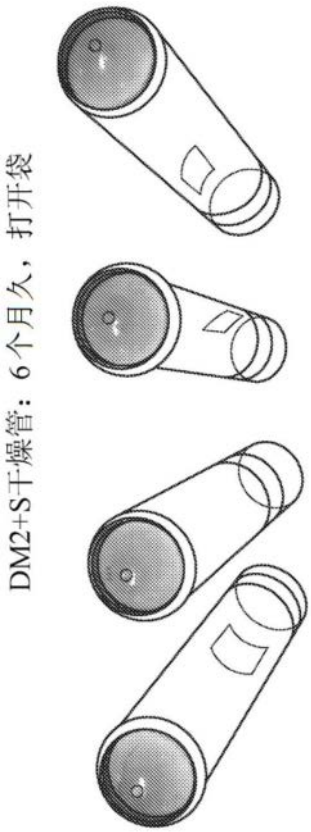



图12

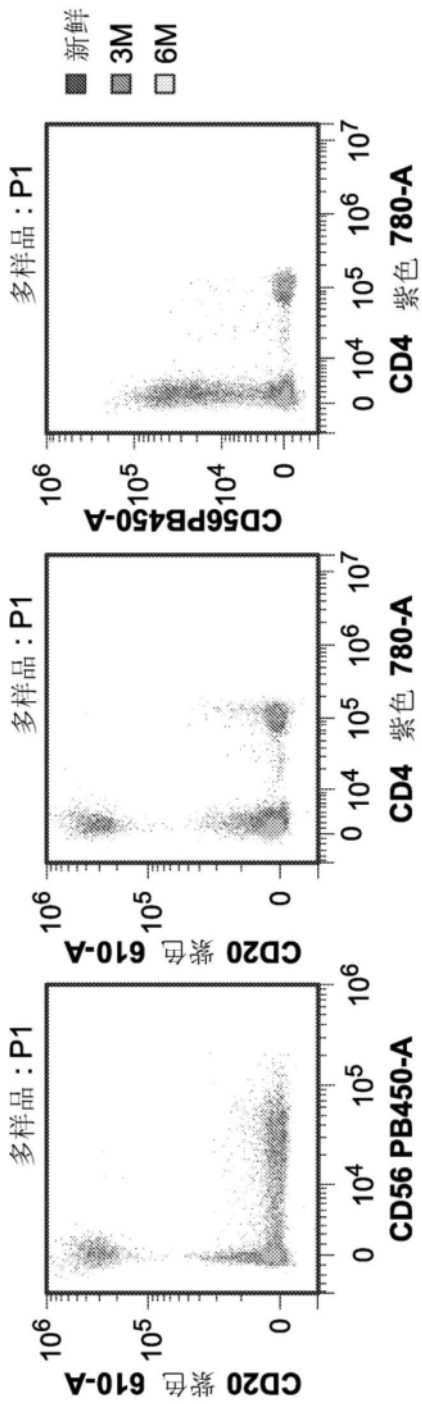

新鲜
3M
6M
多样品 : P1
CD56PB450-A
CD4 紫色 780-A
多样品 : P1
CD20 紫色 610-A
CD4 紫色 780-A
多样品 : P1
CD20 紫色 610-A
CD56 PB450-A

图13A

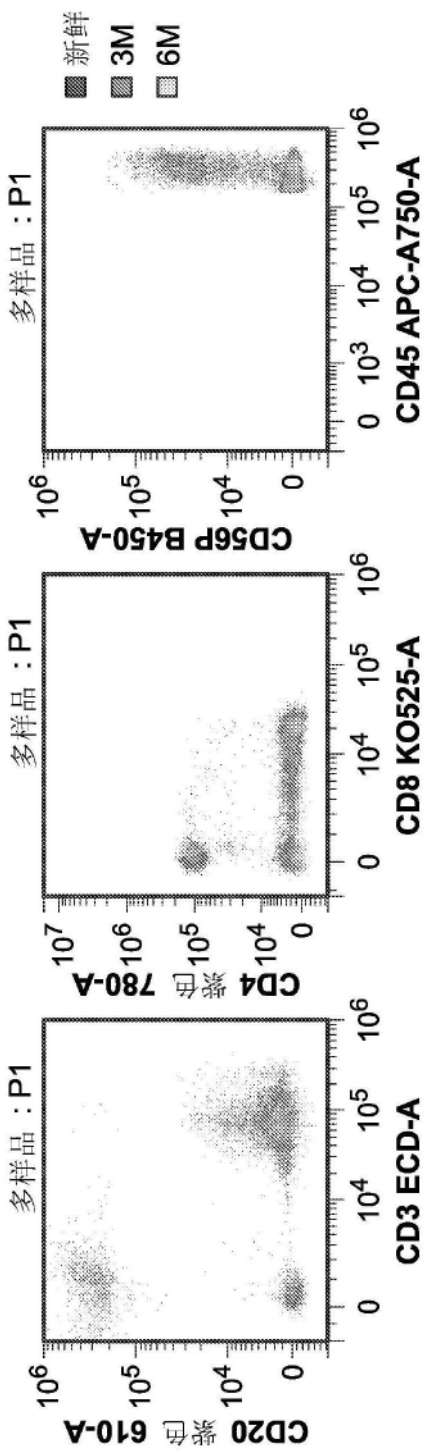

新鲜
3M
6M
多样品 : P1
CD56P B450-A
CD45 APC-A750-A
CD4 紫色 780-A
CD8 KO525-A
CD20 紫色 610-A
CD3 ECD-A

图13B

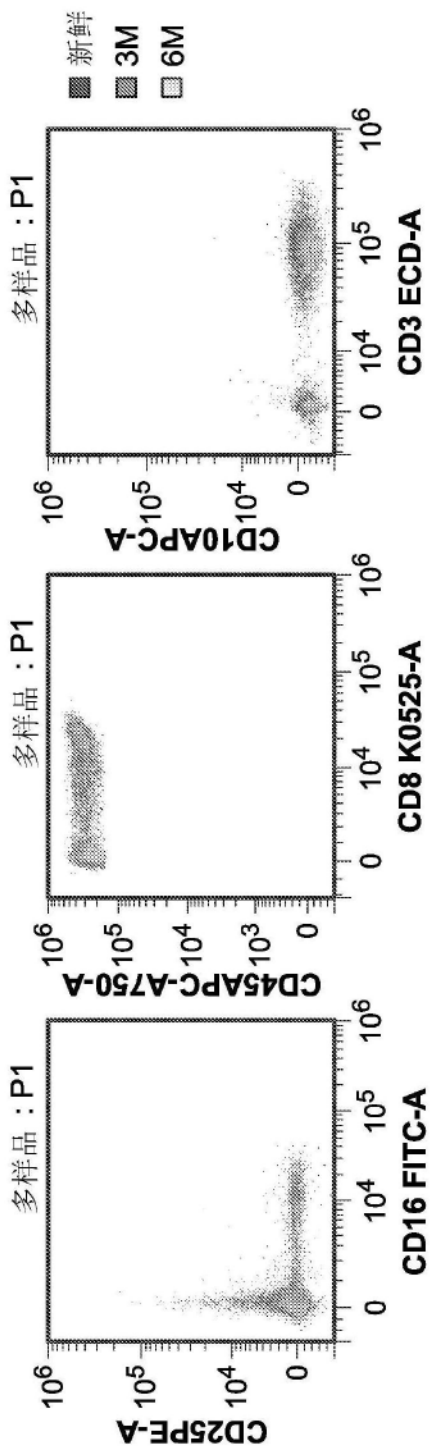

新鲜
3M
6M
多样品 : P1
CD10APC-A
CD3 ECD-A
多样品 : P1
CD45APC-A750-A
CD8 K0525-A
多样品 : P1
CD25PE-A
CD16 FITC-A

图13C