

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7216638号
(P7216638)

(45)発行日 令和5年2月1日(2023.2.1)

(24)登録日 令和5年1月24日(2023.1.24)

(51)国際特許分類	F I
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	G 0 1 N 33/533
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531 A
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64 F
G 0 1 N 33/542 (2006.01)	G 0 1 N 33/542 A

請求項の数 18 (全90頁)

(21)出願番号	特願2019-512260(P2019-512260)	(73)特許権者	502221282
(86)(22)出願日	平成29年9月1日(2017.9.1)		ライフ テクノロジーズ コーポレーション
(65)公表番号	特表2019-531474(P2019-531474 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 8 , カールズバッド , ニュートン
(43)公表日	令和1年10月31日(2019.10.31)		ドライブ 5 8 2 3
(86)国際出願番号	PCT/US2017/049838	(73)特許権者	504104350
(87)国際公開番号	WO2018/045278		ピラス・バイオテクノロジー・インコー
(87)国際公開日	平成30年3月8日(2018.3.8)		ポレイテッド
審査請求日	令和2年8月31日(2020.8.31)		アメリカ合衆国、イリノイ州 6 1 1 0
(31)優先権主張番号	62/382,594		5、ロックフォード、エヌ・メリディア
(32)優先日	平成28年9月1日(2016.9.1)		ン・ロード 3 7 4 7、ピー・オー・ボ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100094569
前置審査			弁理士 田中 伸一郎
		(74)代理人	100103610

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 増強された蛍光のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の抗体を含む組成物であって、

2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が前記第1の抗体に共有結合し、前記蛍光標識およびスペーサー分子が互いに共有結合しておらず、

前記第1の抗体は、前記蛍光標識を用いて検出され、

前記スペーサー分子が、

アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル(-C(O)C_nH_m) (式中、nは1~20個の原子であり、m>nであり、前記アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイルの炭素原子は、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、また、前記アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイルのアルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、ポリ(エチレン)グリコール部分、アンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム(-NR₃⁺)基(式中、RはC₁~6アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ₃⁺) (式中、Qはアリール、置換アリール、またはC₁~6アルキルである)でさらに置換されていてもよい) ;

アルキル、アルケニル、およびアルキニル基(-C_nH_m) (式中、nは1~20個の原子であり、m>nであり、前記アルキル、アルケニル、およびアルキニル基の炭素原子は、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、また、前記アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、スルホネート基(-OSO₃-)、カルボキシレート基(-CO₂-)、ホスフェート基(-OP₃-)、ホスホネート基(-

- P O₃ -)、ポリ(エチレン)グリコール部分、アンモニウム(- N H₃⁺)、第 4 級アンモニウム(- N R₃⁺) 基(式中、R は C₁ ~ 6 アルキルである)、またはホスホニウム基(- P Q₃⁺) (式中、Q はアリール、置換アリール、または C₁ ~ 6 アルキルである)でさらに置換されていてもよい) ; および

アセテート分子から選択されるか、または

前記スペーサー分子は、ポリエチレングリコール(P E G)、M S - P E G、またはペプチンを含む、組成物。

【請求項 2】

前記第 1 の抗体が、等量の蛍光標識を用いて調製されたが前記スペーサー分子を含まない第 2 の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示す、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記第 1 の抗体が第 2 の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示し、前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体がそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、前記第 2 の抗体が共有結合したスペーサー分子を有さない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記スペーサー分子が、前記蛍光標識の消光を、前記スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記スペーサー分子が、反応性基を介して前記抗体にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記反応性基がアミン基である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記アミン基がリジン残基上にある、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

ポリ(エチレン)グリコール部分が、 $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$ (式中、 x は 1 ~ 20 であり、 y は 1 ~ 6 であり、そして R は H または $C_1 \sim 6$ アルキルである) である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記スペーサー分子が、アセテートおよびポリエチレングリコール(P E G) から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 10】

蛍光標識の抗体に対する比が 1 ~ 50 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

蛍光標識の抗体に対する前記比が 5 ~ 30 である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

蛍光標識された生体分子の蛍光を増加させる方法であって、

(a) スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートすることと、

(b) 前記生体分子に蛍光標識をコンジュゲートすることと、を含み、

ステップ (a) および (b) は同時にまたは任意の順序で行うことができ、

前記スペーサー分子と蛍光標識は互いにコンジュゲートされておらず、

前記生体分子は、前記蛍光標識を用いて検出される、方法。

40

【請求項 13】

前記スペーサー分子が、前記蛍光標識の消光を、前記スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記スペーサー分子が、反応性基を介して前記生体分子にコンジュゲートされている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記反応性基がアミン基である、請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

前記アミン基がリジン残基上にある、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記スペーサー分子が、

アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル ($-C(O)C_nH_m$) (式中、 n は 1 ~ 20 個の原子であり、 $m > n$ であり、前記アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイルの炭素原子は、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、また、前記アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイルのアルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、ポリ(エチレン)グリコール部分、アンモニウム ($-NH_3^+$)、第 4 級アンモニウム ($-NR_3^+$) 基 (式中、 R は C_{1-6} アルキルである)、またはホスホニウム基 ($-PQ_3^+$) (式中、 Q はアリール、置換アリール、または C_{1-6} アルキルである) でさらに置換されていてもよい) ;

10

アルキル、アルケニル、およびアルキニル基 ($-C_nH_m$) (式中、 n は 1 ~ 20 個の原子であり、 $m > n$ であり、前記アルキル、アルケニル、およびアルキニル基の炭素原子は、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、また、前記アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、スルホネート基 ($-OSO_3-$)、カルボキシレート基 ($-CO_2-$)、ホスフェート基 ($-OPO_3-$)、ホスホネート基 ($-PO_3-$)、ポリ(エチレン)グリコール部分、アンモニウム ($-NH_3^+$)、第 4 級アンモニウム ($-NR_3^+$) 基 (式中、 R は C_{1-6} アルキルである)、またはホスホニウム基 ($-PQ_3^+$) (式中、 Q はアリール、置換アリール、または C_{1-6} アルキルである) でさらに置換されていてもよい) ; および

20

アセテート分子から選択されるか、または

前記スペーサー分子は、ポリエチレングリコール (PEG)、MS-PEG、またはペプティンを含む、請求項 12 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

ポリ(エチレン)グリコール部分が、 $-(OCH_2CH_2O)_x-(CH_2)_y-OR$ (式中、 x は 1 ~ 20 であり、 y は 1 ~ 6 であり、そして R は H または C_{1-6} アルキルである) である、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

発明の分野

本開示は、蛍光色素の分野に関し、具体的には、蛍光シグナルを増加させ、そして蛍光消光を減少させるための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

蛍光標識された生体分子は、定量アッセイおよび細胞イメージングに関連するものを含む様々な方法において広く使用されている。抗体、抗原、DNA、および RNA などの生体分子は蛍光標識されており、免疫蛍光 (IFC)、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、免疫組織化学 (IHC)、ウエスタンブロッティング、薬物結合試験、酵素反応速度論、HCA を含むイメージング (免疫細胞化学 ICC)、インビボイメージングなどの用途において、および核酸ハイブリダイゼーションにおいて使用される。蛍光色素は、使用しやすく、特異的かつ高感度であるだけでなく、多重化の選択肢も提供するので、これらの用途に引き続き選ばれている。しかしながら、全ての用途が蛍光標識化に適しているわけではない。例えば、多くの用途において、増加した量の蛍光標識 (高い色素対タンパク質比) が生体分子に付加されるにつれて、蛍光の強度は減少し得る (消光)。さらに、蛍光はまた、生体分子の蛍光標識化によって引き起こされる立体障害を通して減少し得る。増強されたシグナル強度を示す蛍光標識およびコンジュゲーション方法が必要とされている。

40

50

【発明の概要】

【0003】

概要

本明細書に開示されているのは、例えば修飾リンカー、化学物質、および特定のプロトコールを介して生体分子にコンジュゲートした蛍光色素の強度を増加させるための組成物および方法である。したがって、本発明の一態様は、色素の性能を向上させることである。蛍光強度は、色素単独で作られた対応するコンジュゲートと比較して、生体分子が色素とスペーサー分子の両方で標識されているときに増加し得ることが見出された。これらのスペーサー分子を用いて作製したコンジュゲートは、ウエスタンブロッティング、ドットプロットアッセイ、プレートアッセイ、フローサイトメトリー、およびイムノアッセイ用途（例えば、免疫蛍光イメージング用途）において蛍光増強を示す。

10

【0004】

さらに、より少数の色素分子が（共有結合的または非共有結合的に）各生体分子と結合しているときにでも、増強された蛍光が見られる。この効果は、増強された蛍光を示す生体分子へのスペーサー基の結合に関連すると考えられている。理論に束縛されるものではないが、増強された蛍光は色素発光の消光の減少から生じると考えられる。いくつかの態様では、本発明は、部分的に、第1の生体分子（例えば第1の抗体）を含む組成物であって、2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が第1の生体分子に共有結合し、蛍光体とスペーサー分子は互いに共有結合していない組成物に関する。いくつかの場合では、第1の生体分子（例えば、第1の抗体）は、等量の蛍光標識を用いて調製されたがスペーサーを含まない第2の生体分子（例えば、第2の抗体）よりも高い蛍光発光レベルを示す。さらなる例では、第1の生体分子は第2の生体分子よりも高い蛍光発光レベルを示し、第1の生体分子および第2の生体分子はそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、第2の生体分子は共有結合したスペーサーを有さない。特定の実施形態では、スペーサー分子は、スペーサーの非存在下での消光と比較して、蛍光標識の消光を減少させる。

20

【0005】

本発明のいくつかの態様において、スペーサー分子は反応性基を介して生体分子にコンジュゲートしている。そのような反応性基は、アミン反応性基（例えば、NHSエステル、1つまたは複数のアミン基はポリペプチドおよび/またはリジン側鎖のアミン末端にあり得る）、スルフヒドリル基、カルボン酸基などであり得る。スペーサー分子がコンジュゲートされ得るさらなる基としては、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、および/またはポリペプチドのカルボキシ末端が含まれる。さらに、蛍光標識は、コンジュゲーションアームによって生体分子にコンジュゲートすることができる。これらの蛍光標識は、正に荷電していても、中性でも、および/または負に荷電していてもよい。

30

【0006】

いくつかの実施形態では、本発明の実施（組成物と方法の両方）において使用される蛍光標識は、シアニン、ベンゾローダミン、ボディピー、フルオレセイン、ベンゾピリリウム誘導体であり得、さらにALEXA FLUOR（登録商標）色素および/またはDYLIGHT（商標）色素を含み得る。そのような色素は、ALEXA FLUOR（登録商標）350、ALEXA FLUOR（登録商標）405、ALEXA FLUOR（登録商標）430、ALEXA FLUOR（登録商標）488、ALEXA FLUOR（登録商標）500、ALEXA FLUOR（登録商標）514、ALEXA FLUOR（登録商標）532、ALEXA FLUOR（登録商標）546、ALEXA FLUOR（登録商標）555、ALEXA FLUOR（登録商標）568、ALEXA FLUOR（登録商標）594、ALEXA FLUOR（登録商標）610-X、ALEXA FLUOR（登録商標）633、ALEXA FLUOR（登録商標）647、ALEXA FLUOR（登録商標）660、ALEXA FLUOR（登録商標）680、ALEXA FLUOR（登録商標）700、ALEXA FLUOR（登録商標）750、ALEXA FLUOR（登録商標）790、AMCA-X、BODIPY（登録商標）630/65

40

50

0、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン) スクシンイミジルエステル (DDAO-SE)、DYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、および DYLIGHT (商標) 800 からなる群から選択され得る。当然のことながら、他の色素、および上述の色素の修飾形態を本発明の実施において使用することができる。

10

【0007】

本発明の実施において、スペーサーは負に荷電していても中性に荷電していてもよい。さらに、スペーサーは、例えば、アセテートおよびポリエチレングリコール (PEG) から選択され得る。スペーサーは、アセチル基を含み得、そしてアセテート分子 (例えば、スルホ-NHS-アセテート) であり得る。さらに、スペーサーは、(PEG)_n を含むかまたはそれからなることができ、式中、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択され、および/またはMS-(PEG)_n を含むかまたはそれからなることができ、式中、n は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される。

20

【0008】

さらに、本発明の実施において使用されるスペーサーは、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル (-C(O)C_nH_m) から選択される1つ以上の基を含むか、またはそれらからなることができ、式中、n は1~20個の原子であり、m > n であり、炭素原子は、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができる。アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基は、-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR によってさらに置換されていてよく、式中、x は1~20であり、y は1~6であり、そしてR はHまたはC₁~6アルキルである。さらに、アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基は、アンモニウム (-NH₃⁺)、第4級アンモニウム (-NR₃⁺) 基でさらに置換されていてよく、ここで、R はC₁~6アルキルである。

30

【0009】

さらに、本発明の特定の実施形態では、蛍光色素は、1つ以上のALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY

40

50

Y (登録商標) TR - X、CASCADE BLUE (登録商標) ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標) OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、tetramethyl rhodamine、FAM、TEXAS RED (登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)を含み得、スペーサーは、スルホ-NHS-アセテート；(PEG)_n(式中、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される)；MS-(PEG)_n(式中、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される)；アルカノイル、アルケノイル、またはアルキノイル(-C(O)C_nH_m)(式中、nが1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合で互いに結合し得る)；あるいは-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-OR(式中、xが1~20であり、yが1~6であり、RがHもしくはC₁~6アルキルである)によってさらに置換されたアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基であって、またはアルキル、アルケニル、および/もしくはアルキニル基がアンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム(-NR₃⁺)基でさらに置換され、式中、RがC₁~6アルキルである、アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基、のうちの1つ以上を含み得る。さらに、アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基は、Qがアリール、置換されたアリール、またはC₁~6アルキルである、ホスホニウム基(-PQ₃⁺)でさらに置換されていてもよい。

【0010】

本発明の組成物および方法は、蛍光標識された生体分子(例えば、抗体)を含むかまたは使用することができ、蛍光標識された生体分子に対する比は、1~50、5~30、または1~20である。本発明の組成物および方法は、蛍光標識された生体分子(例えば、抗体)を含むかまたは使用することができ、スペーサー剤の生体分子に対する比は、1~50、5~30、5~30、または1~20である。

【0011】

さらに、本発明の組成物および方法は、蛍光標識された生体分子(例えば、抗体)を含むかまたは使用することができ、ここでスペーサー剤は0.1~25倍、1~15倍、もしくは2.5~10倍の量で、複数の蛍光標識に対してモル過剰であるか；ここでスペーサー剤は2.5倍の量で、複数の蛍光標識に対してモル過剰であるか；ここでスペーサー剤は5倍の量で、複数の蛍光標識に対してモル過剰であるか；ここでスペーサー剤は7.5倍の量で、複数の蛍光標識に対してモル過剰であるか；または、ここでスペーサー剤は10倍の量で、複数の蛍光標識に対してモル過剰である。

【0012】

さらに、本発明の組成物および方法は、蛍光標識された生体分子(例えば、抗体)を含むかまたは使用することができ、複数の蛍光標識によって占められる生体分子上の結合部位(例えば、アクセス可能なアミン基)の割合は1%~99%である。

【0013】

いくつかの実施形態において、スペーサーの存在は、蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。

【0014】

本発明はまた、部分的には、蛍光標識された生体分子の蛍光を増大させる方法に関する。そのような方法には、(a)スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートさせることと

10

20

30

40

50

、(b) 生体分子に蛍光標識をコンジュゲートさせることとを含むものが含まれ、ここでステップ(a)および(b)は同時にまたは任意の順序で実施することができ、ここでスペーサーと蛍光標識は互いにコンジュゲートしていない。さらに、スペーサー分子は、スペーサーの非存在下で生じる消光の量と比較して、蛍光標識の消光を減少させ得る。

【0015】

本発明はまた、部分的には、蛍光発光蛍光標識された生体分子を増強することができるスペーサー分子を同定するための方法にも関する。そのような方法は、(a) 生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識と独立して、スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートすることと、(b) 生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識に加えてスペーサー剤の存在が複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるかどうかを試験することと、(c) スペーサー剤を、生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識に加えてスペーサー剤の存在が複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるときにタンパク質にコンジュゲートした蛍光標識の消光を減少させるものとして同定することと、を含み得る。いくつかの場合において、スペーサー剤は、生体分子上に存在する最初のリジン側鎖で生体分子にコンジュゲートされる。さらに、生体分子は抗体または抗体断片である。また、複数の蛍光標識は、負および/または正に荷電していてもよい。さらに、スペーサー剤は、負および/または正に荷電していてもよい。

10

【0016】

本発明はさらに、部分的には、生体試料中の所望の標的の存在を決定するための方法に関する。そのような方法は、(a) 生体試料を組成物の抗体と接触させることと、ここで2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子は抗体に共有結合し、蛍光分子およびスペーサー分子は互いに共有結合しない、接触させることと、(b) 複数の蛍光標識が発光する蛍光を検出することと、(c) 複数の蛍光標識によって発光された蛍光が検出されたときに、生体試料中の所望の標的の存在を決定することと、を含み得る。本発明の実施において使用される生体試料は、細胞溶解物、無傷の細胞(例えば、体液などの流体中の無傷の細胞)、単離されたタンパク質、および/または組換えタンパク質を含み得る。さらに、生体試料は、固体支持体上に固定化されてもよい。さらに、生体試料は哺乳動物のような生きている動物を含む。

20

【0017】

本発明はまた、部分的に、第1の核酸分子を含む組成物であって、2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が第1の核酸分子に共有結合し、蛍光体とスペーサー分子は互いに共有結合していない組成物に関する。いくつかの実施形態では、第1の核酸分子は、等量の蛍光標識を用いて調製されたがスペーサーを含まない第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示す。さらに、いくつかの実施形態では、第1の核酸分子は第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示してもよく、第1の核酸分子および第2の核酸分子はそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、第2の核酸分子は、共有結合したスペーサーを有さない。

30

【0018】

本発明はまた、それぞれが複数の蛍光標識(例えば、約2~約30、約2~約20、約3~約30、約2~約15、約3~約15、約4~約30、約6~約20、約7~約30などの平均)とコンジュゲートした抗体を含むコンジュゲート抗体を含み、ここで、コンジュゲート抗体は、以下の特徴、

40

(a) 蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比、

(b) 少なくとも4つの蛍光標識を抗体にコンジュゲートすること、

(c) 抗体の全蛍光が、非コンジュゲート蛍光分子の蛍光より少なくとも20パーセント大きい、および/または

(d) 各抗体分子に結合した平均約3~約80個の蛍光標識、のうちの1つ以上を含む。

【0019】

さらに、蛍光標識は、1つ以上(例えば、約1~約15、約2~約10、約2~約15、約2~約8、約3~約10、約3~約6など)のマルチアームポリマーによって生体分

50

子（例えば、抗体）にコンジュゲートされ得る。さらに、マルチアームポリマーのアームは、（a）ポリエチレングリコール、（b）多糖類、および（c）ポリペプチド、ならびに他の物質からなる群から選択される種類の化学物質から構成されてもよい。さらに、蛍光標識間の平均ブラシ距離は、200～800オングストローム（例えば、約200～約700、約300～約800、約400～約800、約500～約800、約200～約600、約500～約800、約300～約700、約350～約800など）であり得る。また、抗体（または他の生体分子）にコンジュゲートした蛍光標識は、抗体（または他の生体分子）から少なくとも16（例えば、約16～約800、約25～約800、約40～約800、約60～約800、約100～約800、約200～約800、約250～約800、約150～約600など）の共有結合によって分離され得る。さらに、コンジュゲート抗体（または他の生体分子）は、ALEXA FLUOR（登録商標）350、ALEXA FLUOR（登録商標）405、ALEXA FLUOR（登録商標）430、ALEXA FLUOR（登録商標）488、ALEXA FLUOR（登録商標）500、ALEXA FLUOR（登録商標）514、ALEXA FLUOR（登録商標）532、ALEXA FLUOR（登録商標）546、ALEXA FLUOR（登録商標）555、ALEXA FLUOR（登録商標）568、ALEXA FLUOR（登録商標）594、ALEXA FLUOR（登録商標）610-X、ALEXA FLUOR（登録商標）633、ALEXA FLUOR（登録商標）647、ALEXA FLUOR（登録商標）660、ALEXA FLUOR（登録商標）680、ALEXA FLUOR（登録商標）700、ALEXA FLUOR（登録商標）750、ALEXA FLUOR（登録商標）790、AMCA-X、BODIPY（登録商標）630/650、BODIPY（登録商標）650/665、BODIPY（登録商標）FL、BODIPY（登録商標）TMR、BODIPY（登録商標）TR、BODIPY（登録商標）TR-X、CASCADE BLUE（登録商標）、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE（登録商標）、OREGON GREEN（登録商標）488、OREGON GREEN（登録商標）514、PACIFIC BLUE（商標）、PACIFIC ORANGE（商標）、RHODAMINE GREEN（商標）、QSY（登録商標）7、QSY（登録商標）9、QSY（登録商標）21、QSY（登録商標）35、ROX、RHODAMINE RED（商標）、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED（登録商標）、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル（DDAO-SE）からなる群から選択される1つ以上の色素であり得る蛍光標識、ならびにDYLIGHT（商標）350、DYLIGHT（商標）405、DYLIGHT（商標）488、DYLIGHT（商標）550、DYLIGHT（商標）594、DYLIGHT（商標）633、DYLIGHT（商標）650、DYLIGHT（商標）680、DYLIGHT（商標）755、およびDYLIGHT（商標）800、およびPEG化DYLIGHT（商標）色素からなる群からの蛍光標識にコンジュゲートされ得る。

【0020】

本発明はまた、蛍光標識された生体分子を調製する方法であって、（a）反応性基および2つ以上の蛍光標識をスペーサー分子にコンジュゲートし、それによって蛍光標識されたスペーサー分子を形成することと、（b）蛍光標識されたスペーサー分子を生体分子にコンジュゲートし、それによって蛍光標識された生体分子を形成することと、を含み得、ここで、蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識が、蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比を有する、方法を含む。さらに、平均1～10（例えば、約1～約9、約2～約10、約3～約10、約4～約10、約5～約10、約2～約6、約3～約6、約3～約7など）の蛍光標識されたスペーサー分子を各生体分子にコンジュゲートさせることができる。さらに、蛍光標識されたスペーサー分子は、マルチアームポリマー（例えば、分岐鎖ポリエチレングリコール分子）であり得る。さらに、スペーサー分子（例えば、マルチアームポリマー）は、それぞれ平均4～20（例えば、約4～約10、約3～約

10

20

30

40

50

8、約4～約8、約3～約9など)の蛍光標識にコンジュゲートされ得る。さらに、スペーサー分子(例えば、マルチアームポリマー)は、4,000～80,000ダルトン(例えば、約4,000～約70,000、約4,000～約60,000、約4,000～約50,000、約4,000～約40,000、約10,000～約70,000、約15,000～約60,000など)の分子量を有してもよい。

【0021】

本発明はさらに、蛍光標識された生体分子を検出する方法を含む。そのような方法は、(a)生体分子にコンジュゲートした蛍光標識を励起する光で蛍光標識された生体分子(例えば、抗体)を露光することと、(2)生体分子にコンジュゲートした蛍光標識によって生成される発光を検出することと、を含み得る。いくつかの場合において、蛍光標識された生体分子は、4つ以上の蛍光標識にコンジュゲートし得る。さらに、蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識は、蛍光標識1個あたりに基づいて0.7以上(例えば、約0.7～約1.0、約0.7～約0.95、約0.7～約0.9、約0.7～約0.85、約0.75～約0.95など)の蛍光比を有し得る。

【図面の簡単な説明】

【0022】

(図1)本発明の一実施形態の概略図を示す。この実施形態では、抗体を、50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)中で2つの異なる色素モル過剰でNHS蛍光色素およびスルホNHS-アセテートスペーサーとコンジュゲートさせる。色素とスペーサーのコンジュゲーションは、感度の増強と消光の減少をもたらす。

(図2)本発明のいくつかの実施形態の概略図を示す。この実施形態では、抗体を、50mMホウ酸緩衝液(pH8.5)中でNHS蛍光色素およびメチル-PEG-NHS-エステルスペーサーとコンジュゲートさせる。この実施形態で使用されるスペーサーは、MS(PEG)₄、MS(PEG)₈およびMS(PEG)₁₂である。

(図3)イメージング機器を用いて撮影したドットプロットのソフトウェア解析の結果を示す。ドットプロットを、NHSアセテートまたはMS(PEG)₄スペーサーおよびDYLIGHT(商標)488蛍光色素(表1において略称「DYLIGHT(商標)488」)で共標識したGAM抗体を用いて試験した。NHSアセテートまたはMS(PEG)₄を用いて作製されたDYLIGHT(商標)488-GAMコンジュゲートは、(スペーサーなしで作製された)基本コンジュゲートに対して1.2～1.8倍の範囲の蛍光強度の1.2～1.8倍の改善をもたらした。この図のレーンは次の通りである。

(表1)

10

20

30

40

50

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランクウェル	22	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 488-5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 488-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランクウェル	29	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 488-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 488-10X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 488-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランクウェル		

10

20

30

(図4) ドットプロット - マウス IgG の DyLIGHT (商標) 488 - GAM 検出、様々なモル過剰の色素で、基本コンジュゲートに比べて NHS アセテート (2.5x、5x) または MS (PEG)₄ (3.75x) の改善倍率。この図は、イメージング機器を用いて撮影したドットプロットのソフトウェア解析の結果を示す。ドットプロットを、NHS アセテートまたは MS (PEG)₄ スパーサーおよび DyLIGHT (商標) 488 蛍光色素で共標識した GAM 抗体を用いるアッセイによって試験した。これらのデータは、抗体についての別の供給源を用いて図3からの結果を確認した。NHS アセテートと MS (PEG)₄ スパーサーの両方が、抗体 - 色素コンジュゲート単独と比較して蛍光シグナル強度において顕著な改善 (約 2.6 倍程度の増加) をもたらした。

40

(図5) ドットプロット - DyLIGHT (商標) 550 - 2x PEG - GAR を用いたマウス IgG の検出。様々なモル過剰で、基本コンジュゲートに比べて NHS アセテート (2.5x、5x) または MS (PEG)₄ (3.75x) からのシグナル/バックグラウンドの改善倍率。これは、イメージング機器を用いて撮影したドットプロットのソフトウェア解析の結果を示す。ドットプロットを、NHS アセテートまたは MS (PEG)₄ スパーサーおよび DyLIGHT (商標) 550 蛍光色素で共標識した DyLIGHT

50

(商標)550-GAM抗体を用いて試験した。マウスIgGを1000ng/ドットから1:1で段階希釈した。全てのDYLIGHT(商標)550-2xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/5000に希釈した。コンジュゲーション混合物に付加されたNHSアセテートまたはMS(PEG)₄は、各々のそれぞれの色素のモル過剰での基本コンジュゲートと比較して、シグナル強度の改善(約1.6程度の増加)をもたらした。改善は1.2~1.6倍の範囲であり、特に、以下のGAM-DYLIGHT(商標)550-2xPEG:10x色素+5xアセテート、15x色素+3.75xMS(PEG)₄、20x色素+5xアセテート、および20x+3.75xMS(PEG)₄は、それぞれの基本コンジュゲートに対して1.3倍を超える改善を示した。

(図6)ドットプロット-マウスIgGのDyLight650-4xPEG-GAM検出、各々の色素のモル過剰での基本コンジュゲートに対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x、5x、10x)での改善倍率。この図は、イメージング機器を用いて撮影したドットプロットのソフトウェア解析の結果を示す。ドットプロットを、NHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x)およびDYLIGHT(商標)650-4xPEG(表2において略称「DYLIGHT(商標)650」)(10x~20x)で共標識したGAM抗体を用いて試験した。マウスIgGを1000ng/ドットから1:1で段階希釈した。全てのDYLIGHT(商標)650-4xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/10,000に希釈した。高度の色素の置換を有するコンジュゲートは、ドットプロットおよびウエスタンブロットティングなどの用途においてよりよく機能する傾向がある。NHSアセテートと(MS)PEG₄の両方は、初期の基本コンジュゲートよりも感度およびシグナル/バックグラウンド(約2.2程度の増加)において顕著な改善をもたらす。2.5xモル過剰でGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-15xに付加されたNHSアセテートは、強度を1.7倍改善した。NHSアセテートによってもたらされた改善は、最高モル過剰(20x)で調製されたコンジュゲートを用いた場合よりも1.3倍優れた性能を示した。GAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-15xコンジュゲーションに付加された全てのMS(PEG)₄は、蛍光強度を1.8~2.2倍改善し、対応する最高基本コンジュゲートGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-20xよりも良好に機能した。この図のレーン

(表2)

10

20

30

40

50

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランクウェル	22	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランクウェル	29	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランクウェル		

10

20

30

40

(図 7) ドットプロット - 各々のモル過剰での基本コンジュゲートに対する NHS アセテート (2 . 5 x 、 5 x 、 および 1 0 x) または MS (PEG) 4 (3 . 7 5 x 、 5 x 、 1 0 x) での DY LIGHT (商標) 8 8 0 - 4 x PEG コンジュゲートの改善倍率。この図は、蛍光ドットプロットアッセイでの、GAM - DY LIGHT (商標) 8 0 0 - 4 x PEG (表 3 において略称「DY LIGHT (商標) 8 0 0」) の検出可能な蛍光レベルに対する NHS アセテート (2 . 5 x 、 5 x 、 および 1 0 x) または MS (PEG) 4 (3 . 7 5 x 、 5 x 、 1 0 x) の付加の効果を実証する。マウス IgG を 1 0 0 0 n g / ドットから 1 : 2 に段階希釈した。全ての DY LIGHT (商標) 8 0 0 - 4 x PEG - GAR 二次抗体を、1 mg / ml ストックの 1 / 2 0 , 0 0 0 に希釈した。このドットプロット用途は、MS (PEG) 4 (3 . 7 5 x および 5 x) および NHS アセテート (5 x) の付加が、基本の DY LIGHT (商標) 8 0 0 - 4 x PEG コンジュゲートの蛍光強度および感度を 1 . 5 ~ 6 倍で顕著に増強したことを示す。この図のレーンは次の通りである。

(表 3)

50

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランクウェル	22	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 800-5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 800-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランクウェル	29	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 800-10X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 800-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランクウェル		

10

20

30

40

(図8) 5x ~ 20x の範囲の色素のモル過剰で抗体にコンジュゲートしたGAR - DyLIGHT (商標) 488 の蛍光検出レベルに対する、NHS アセテート (2.5x、5x、および10x モル過剰) またはMS(PEG)₄ (3.75x モル過剰) の付加の効果を示すウエスタンブロットアッセイ。A431 細胞溶解物を1 μg / ウェルから3倍に希釈した。使用したウサギ一次抗体は、1 mg / ml から1 / 5000 に希釈した抗Hsp90 および1 mg / ml から1 / 5000 に希釈した抗シクロフィリンBであった。全てのDyLIGHT (商標) 二次抗体を、1 mg / ml ストックから1 / 5000 に希釈した。これらの結果は、ウエスタンブロット用途において、NHS アセテートまたはMS(PEG)₄ の付加とコンジュゲートしたDyLIGHT (商標) 488 - GAR について7.5x ~ 20x までの各色素モル過剰において、基本コンジュゲート (スパーサーを含まず作製) を超える蛍光強度の顕著な増加があることを示す。

(図9) ウエスタンブロットでのGAM - DyLIGHT (商標) 650 - 4x PEG - GAR (7.5x モル過剰の色素で) に対するNHS アセテート (5x) またはMS(PEG)₄ (5x) の効果を示す。HeLa 細胞溶解物を0.5 μg / ウェルから4倍に希釈した。一次抗体マウス抗PDIを1 mg / ml の1 / 5000 に希釈した。全ての

50

DY LIGHT (商標) 二次抗体を、1 mg / ml ストックの 1 / 5000 に希釈した。5 × モル過剰で GAM - DY LIGHT (商標) 650 - 4 × PEG - 7.5 × コンジュゲートに付加された NHS アセテートは、強度を 1.5 倍改善した。3.75 × モル過剰で GAM - DY LIGHT (商標) 650 - 4 × PEG - 7.5 × コンジュゲートに付加された NHS アセテートは、強度を 1.4 倍改善した。

(図 10) GAR - DY LIGHT (商標) 800 - 4 × PEG (表 4 において略称「DY LIGHT (商標) 800」) の検出可能な蛍光レベルに対する NHS アセテート (2.5 ×、5 ×) または MS (PEG)₄ の効果を試験するウエスタンブロットアッセイの結果を示す。A431 細胞溶解物を 1 : 1 で段階希釈した。一次抗体ウサギ抗 Hsp90 と抗シクロフィリン B を両方とも 1 / 5000 に希釈した。全ての DY LIGHT (商標) 二次抗体を、1 mg / ml ストックの 1 / 20,000 に希釈した。このウエスタンブロットティング用途で、MS (PEG)₄ (3.75 × と 5 ×) および NHS アセテート (2.5 ~ 5 ×) の付加は、異なるモル過剰の色素で、基本 DY LIGHT (商標) 800 - 4 × PEG コンジュゲートの蛍光強度と感度を 20 ~ 100 % 顕著に増強した。この図のレーンは次の通りである。

(表 4)

レーン	色素/スペーサー	レーン	色素/スペーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 800-5x スペーサーなし	9	DyLIGHT ^(商標) 800-10x スペーサーなし
2	DyLIGHT ^(商標) 800-5x 2.5X NHS アセテート	10	DyLIGHT ^(商標) 800-10x 2.5X NHS アセテート
3	DyLIGHT ^(商標) 800-5x 5X NHS アセテート	11	DyLIGHT ^(商標) 800-10x 5X NHS アセテート
4	DyLIGHT ^(商標) 800-5x 5X MS(PEG) ₄	12	DyLIGHT ^(商標) 800-10x 5X MS(PEG) ₄
5	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5x スペーサーなし	13	DyLIGHT ^(商標) 800-15x スペーサーなし
6	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5x 2.5X NHS アセテート	14	DyLIGHT ^(商標) 800-15x 2.5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5x 5X NHS アセテート	15	DyLIGHT ^(商標) 800-15x 5X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 800-7.5x 5X MS(PEG) ₄	16	DyLIGHT ^(商標) 800-15x 5X MS(PEG) ₄

(図 11) 蛍光のウエスタンブロットおよびドットブロットアッセイでの、GAM - DY LIGHT (商標) 550 - 2 × PEG (12.5 × モル過剰の色素で) への NHS アセテート (2.5 ×、5 ×、および 10 ×) または MS (PEG)₄ (5 ×) および MS (PEG)₈ (5 ×) の付加の効果を示す。HeLa 細胞溶解物を 0.5 μg / ウェルから 4 倍に希釈し、1 mg / ml の 1 / 5000 に希釈した抗 PDI 一次抗体で染色した。全ての DY LIGHT (商標) 二次抗体を、1 mg / ml ストックの 1 / 5000 に希釈した。ウエスタンブロットティングおよびドットブロットアッセイは、MS (PEG)₄ (5 ×) および NHS アセテート (2.5 × および 5 ×) を付加すると、DY LIGHT (商標) 550 - 2 × PEG コンジュゲートの蛍光強度と感度が少なくとも 2 倍、顕著に増強したことを示した。長鎖 MS (PEG)₈ によって調製されたコンジュゲートは、基本コンジュゲートを超えて顕著な改善を示さなかった。

(図 12) ウエスタンブロットおよびドットブロットアッセイでは、GAM - DY LIGHT (商標) 680 - 4 × PEG - GAR (10 倍モル過剰での色素) に対する NHS アセテート (2.5 ×、5 ×) または MS (PEG)₄ (5 ×) の効果を示す。ウエスタンブロットのために、HeLa 細胞溶解物を 0.5 μg / ウェルから 4 倍に希釈し、抗 PDI 一次抗体を 1 mg / ml の 1 / 5000 に希釈した。ドットブロットのために、マウス IgG を 1000 ng / ドットから 1 : 2 に段階希釈した。全ての DY LIGHT (

商標) 680 - 4 x PEG - GAR 二次抗体を、1 mg / ml ストックの 1 / 20000 に希釈した。ウエスタンブロッティングとドットプロットアッセイの両方は、MS (PEG)₄ (5 x) および NHS アセテート (2.5 x および 5 x) を付加すると、DYLIGHT (商標) 680 - 4 x PEG コンジュゲートの蛍光強度と感度が 3 ~ 4 倍、顕著に増強したことを示した。

(図 13 A) (DYLIGHT (商標) 488 - GAM 4 μg / ml による IFC。様々なモル過剰で、基本コンジュゲートに比べて NHS アセテート (2.5 x、5 x) または MS (PEG)₄ (3.75 x) からのシグナル / バックグラウンドの改善倍率、そして図 13 B (IFC - DYLIGHT (商標) 488 - GAR 4 μg / ml による PDI の検出。様々なモル過剰で、基本コンジュゲートに比べて NHS アセテート (2.5 x、5 x) または MS (PEG)₄ (3.75 x) の倍率でシグナル / バックグラウンドの向上) は、細胞イメージングアッセイでの 7.5 x ~ 20 x モル過剰の色素での GAM - DYLIGHT (商標) 488 (13 A) および GAR - DYLIGHT (商標) 488 (13 B) の蛍光に対する NHS アセテート (2.5 x および 5 x) または MS (PEG)₄ 細胞 (3.75 x) の付加の効果を実証する。図 13 A : A549 細胞を、1 mg / ml ストックの 1 / 1000 に希釈した pH 2 A x 一次抗体で染色した。全ての DYLIGHT (商標) 488 二次抗体を 1 mg / ml ストックの 1 / 250 に希釈した。NHS アセテート修飾コンジュゲートは、15 x の色素モル過剰で基本コンジュゲートと比較してシグナル / バックグラウンドの 1.4 ~ 1.5 倍 (GAM) および 1.1 ~ 1.6 倍 (GAR) の範囲での改善をもたらした。GAM コンジュゲートについては、5 x での NHS アセテートおよび 3.75 x での GAR コンジュゲートについての MS (PEG)₄ で最も顕著な改善が観察され、2.5 x での NHS アセテートおよび 3.75 x での MS (PEG)₄ でより顕著な改善が観察された。

(図 13 B) 図 13 B は、A549 細胞を pH 2 A x 一次抗体で染色した同様の実験を示す。

(図 14) DYLIGHT (商標) 550 - 2 x PEG (7.5 x ~ 20 x) 4 μg / ml による PDI の IFC 検出。各々の色素モル過剰での基本コンジュゲートに対する NHS アセテート (2.5 x、5 x、および 10 x) または MS (PEG)₄ (3.75 x、5 x、10 x) の付加からの改善倍率。この図は、蛍光細胞イメージングアッセイでの、GAM - DYLIGHT (商標) 550 - 2 x PEG - GAM (7.5 x ~ 20 x モル過剰の色素での) への NHS アセテート (2.5 x、5 x、および 10 x) または MS (PEG)₄ (3.75 x、5 x、および 10 x) の付加の効果を示す。U2OS 細胞を、1 mg / ml ストックの 1 / 100 に希釈した抗 PDI 一次抗体で染色した。全ての DYLIGHT (商標) 550 - 2 x PEG - GAM 二次抗体 (表 5 において略称「DYLIGHT (商標) 550」) を 1 mg / ml ストックの 1 / 250 に希釈した。この細胞イメージング用途において、5 x NHS アセテートの付加は、12.5 x 色素モル過剰の DYLIGHT (商標) 550 - 2 x PEG GAM コンジュゲートについての基本コンジュゲート (付加なしで作られた) と比較して約 50 % の改善をもたらし、3.75 x MS (PEG)₄ の付加は、20 倍の色素モル過剰で、基本コンジュゲートに対して約 50 % の改善をもたらした。この図のレーンは次の通りである。

(表 5)

10

20

30

40

50

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランク	22	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 550-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 550-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランク	29	DyLIGHT ^(商標) 550-25X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 550-10X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 550-12.5X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 550-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランク		

10

20

30

40

50

(図15) DyLIGHT^(商標) 650-4×PEG(7.5×~20×) 4 μg/ml による PDI の IF C 検出。各々の色素モル過剰での基本コンジュゲートに対する NHS アセテート (2.5×、5×、および 10×) または MS(PEG)₄ (3.75×、5×、10×) の付加からの改善倍率。この図は、蛍光細胞イメージングアッセイの GAM-DyLIGHT^(商標) 650-4×PEG での、GAM-DyLIGHT^(商標) 650-4×PEG に対する NHS アセテート (2.5×、5×、および 10×) または MS(PEG)₄ (3.75×、5×、10×) 付加の効果を示す。U2OS 細胞を、1 mg/ml ストックの 1/100 に希釈した抗 PDI 一次抗体で染色した。全ての DyLIGHT^(商標) 650-4×PEG-GAM 二次抗体 (表6において略称「DyLIGHT^(商標) 650」) を 1 mg/ml ストックの 1/250 に希釈した。この用途において、NHS アセテート-5×の付加は、20×モル過剰の DyLIGHT^(商標) 650-4×PEG-GAM コンジュゲートについての基本コンジュゲート (付加なしで作られた) と比較して約 70% の改善をもたらし、MS(PEG)₄-3.75×の付加は、20倍のモル過剰で、基本コンジュゲートに対して約 90% の改善を示した。この図のレーンは次の通りである。

(表6)

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランク	22	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 650-5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 650-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランク	29	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 650-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 650-10X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 650-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランク		

10

20

30

40

50

(図16) IFC-DYLIGHT(商標)680-4xPEG、各々のモル過剰での基本コンジュゲートに対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x、5x、10x)での改善倍率。この図は、細胞イメージングアッセイでの、GAM-DYLIGHT(商標)680-4xPEGへのNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x、5x、10x)の付加の効果を示す。U2OS細胞を、1mg/mlストックの1/100に希釈したマウス抗PD1一次抗体で染色した。全てのDYLIGHT(商標)680-4xPEG-GAM二次抗体(表7において略称「DYLIGHT(商標)680」)を1mg/mlストックの1/250に希釈し、この細胞イメージング用途では、NHSアセテート-5xの付加は、DYLIGHT(商標)680-4xPEGの基本コンジュゲート(付加なしで作製)と比較して、7.5xと10xの両方で色素コンジュゲートの約70%の改善をもたらした。15xモル過剰のモル過剰でのGAMコンジュゲートとMS(PEG)₄-3.75xは、15xモル過剰での基本コンジュゲートよりも約80%の改善を示した。この図のレーンは次の通りである。

(表7)

レーン	色素/スパーサー	レーン	色素/スパーサー
1	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, スパーサーなし	19	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, 3.75X MS(PEG) ₄
2	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, 2.5X NHS アセテート	20	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, 5X MS(PEG) ₄
3	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, 5X NHS アセテート	21	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, 10X MS(PEG) ₄
4	ブランク	22	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, スパーサーなし
5	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, 3.75X MS(PEG) ₄	23	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 2.5X NHS アセテート
6	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, 5X MS(PEG) ₄	24	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 5X NHS アセテート
7	DyLIGHT ^(商標) 680-5X, 10X MS(PEG) ₄	25	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 10X NHS アセテート
8	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, スパーサーなし	26	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 3.75X MS(PEG) ₄
9	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, 2.5X NHS アセテート	27	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 5X MS(PEG) ₄
10	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, 5X NHS アセテート	28	DyLIGHT ^(商標) 680-15X, 10X MS(PEG) ₄
11	ブランク	29	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, スパーサーなし
12	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, 3.75X MS(PEG) ₄	30	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 2.5X NHS アセテート
13	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, 5X MS(PEG) ₄	31	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 5X NHS アセテート
14	DyLIGHT ^(商標) 680-7.5X, 10X MS(PEG) ₄	32	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 10X NHS アセテート
15	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, スパーサーなし	33	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 3.75X MS(PEG) ₄
16	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, 2.5X NHS アセテート	34	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 5X MS(PEG) ₄
17	DyLIGHT ^(商標) 680-10X, 5X NHS アセテート	35	DyLIGHT ^(商標) 680-20X, 10X MS(PEG) ₄
18	ブランク		

10

20

30

(図17) ベタイン有りまたはなしの TAMRA - GAM 共コンジュゲート。この図は、ベタイン有りまたはなしの、TAMRA - ヤギ抗マウス抗体 (GAM) コンジュゲートの様々な色素/タンパク質モル比で観察された蛍光レベルを例示する。抗体のモル数と比較して、2.5、5、および10×モル過剰でベタインのレベルを試験した。NHS - ロードミン (TAMRA) で標識し、様々な NHS - ベタイン濃度 (ベタイン 2.5×、ベタイン 5×、ベタイン 10×モル過剰の色素) とコンジュゲートしたこれらの抗体は、抗体をスパーサー剤としてのベタインとコンジュゲートするとき全蛍光の増加を示した。

40

(図18) 蛍光標識を含む分岐鎖 PEG 分子の生成および抗体分子への結合の概略図を示す。ステップ1では、反応性基および蛍光標識を分岐鎖 PEG 分子上の NH₂ 基に結合させる。ステップ2において、付着部位が抗体分子に付加される。ステップ3では、蛍光標識された分岐鎖 PEG 分子を抗体分子に共有結合させる。

(図19) シングルアームコネクター (アミロースなど) とマルチアームコネクター (デキストラン) の各々の一例を示す図である。BM は生体分子を表し、AP は結合点を表し、これは蛍光標識がその点に結合されることを意味する。

50

(図20) スターポリマーの種々の種類といくつかのスターポリマーの成分の例およびスターポリマーの製造方法の例である。図20Aは、コア(黒丸)および複数のアーム(黒線)を有するスターポリマーの図である。スターはアームに共有結合した蛍光標識を表す。いくつかのアームは蛍光標識されておらず、標識が完了しなかったことを示している。図20Bは、アームが2つの異なる種類(例えば、ポリエチレングリコールおよびポリビニルアルコール)であり、異なるアームの種類が実線および破線で表される、同様のスターポリマーの図である。図20Cの左側は、他の化学物質を結合するため、または重合のための開始剤として作用するために使用することができる反応性基(灰色のバー)を有するコア(黒い半円)の部分図を示す。コアは反応性基に結合したアダプター(黒い実線)を有して中心に表される。ポリマーアームは、アダプターに結合した右側(黒い破線)に示され、そして蛍光分子(スター)で標識されている。

10

(図21) 本発明の実施において使用することができる種類の例示的なポリリジン分子を示す。R₁およびR₂基は標識なしとして示されている。これらの基は、蛍光標識のためのおよび生体分子(例えば、抗体)へのコンジュゲートのための結合点として使用することができる。

(図22) AF647分岐鎖PEGコンストラクトとコンジュゲートしたSK3マウス抗ヒトCD4抗体。SK3マウス抗ヒトCD4抗体(5.5 mg/mL)を、抗体に対して10倍モル過剰エステルでのALEXA FLUOR(登録商標)647スクシンイミジルエステルで修飾した(破線)。抗体に対して10倍過剰のアジド-SEでタグ化されたSK3を、1 mg/mLのアジド-SK3抗体で100 μMのAF647-HG20K8 PEG-sDIBOに25 で20時間クリックコンジュゲートし、5 mMのNaN₃でクエンチし、コンジュゲートをMillipore AMICON(商標)Ultra-2 100 kDa遠心分離フィルターで精製した(点線)。抗体に対して20倍過剰のアジド-SEでタグ化されたSK3を、3 mg/mLのアジド-SK3抗体で600 μMのAF647-HG20K8 PEG-sDIBOに37 で3時間クリックコンジュゲートし、5 mMのNaN₃でクエンチし、コンジュゲートをMillipore AMICON(商標)Ultra-2 100 kDa遠心分離フィルターで精製した(実線)。96ウェルプレート中の100万個のFicol1で単離されたPBMC/ウェルを、1 μg~0.015 μgの抗体の7点滴定を用いてSK3コンジュゲートで染色した。染色された細胞の分析は、ATTUNE(商標)NXTフローサイトメーターを用いて実施された。

20

30

(図23) AF647分岐鎖PEGコンストラクトとコンジュゲートしたSK3マウス抗ヒトCD4抗体。SK3マウス抗ヒトCD4抗体(5.5 mg/mL)を、抗体に対して10倍モル過剰エステルでのALEXA FLUOR(登録商標)647スクシンイミジルエステルで修飾した(AF)。抗体に対して20倍過剰のアジド-SEでタグ化されたSK3を、3 mg/mLのアジド-SK3抗体で600 μMのAF647-HG20K8 PEG-sDIBOに37 で3時間クリックコンジュゲートし、5 mMのNaN₃でクエンチし、コンジュゲートをMillipore AMICON(商標)Ultra-2 100 kDa遠心分離フィルターで精製した(B1)。抗体に対して10倍過剰のアジド-SEでタグ化されたSK3を、1 mg/mLのアジド-SK3抗体で100 μMのAF647-HG20K8 PEG-sDIBOに25 で20時間クリックコンジュゲートし、5 mMのNaN₃でクエンチし、コンジュゲートをMillipore AMICON(商標)Ultra-2 100 kDa遠心分離フィルターで精製した(B2)。96ウェルプレート中の100万個のFicol1で単離されたPBMC/ウェルを、1 μg~0.015 μgの抗体の7点滴定を用いてSK3コンジュゲートで染色した。染色された細胞の分析は、ATTUNE(商標)NXTフローサイトメーターを用いて実施し、アロフィコシアニン(APC)(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号MHCD0405)と比較された。

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

50

詳細な説明

蛍光標識は、タンパク質および核酸を含む生体分子の直接的、定量的、特異的、および高感度の検出をもたらすので、イメージングに広く用いられている。スルホン化および/または PEG 修飾されている修飾蛍光標識は、塩基性の未修飾色素と比較して感度が高い。しかしながら、これらの修飾蛍光標識でさえも、特定の色素対タンパク質 (D/P) 比で蛍光消光を示す。

【0024】

蛍光の増加は標識色素のモル過剰の増加と共に見られるが、タンパク質に対する最適色素の比 (D/P) を超えるモル過剰は、典型的には特に抗原/抗体または DNA/RNA 相互作用の空間的立体配座が静的消光を引き起こし得る蛍光イメージング用途において生体分子の消光および/または沈殿をもたらす。

10

【0025】

いくつかの実施形態において、本発明は、標準的なコンジュゲーションにおいて蛍光の減少をもたらす高度に標識されたコンジュゲート (例えば、高い色素対タンパク質比 (D/P) を有する生体分子) を用いて消光を低減および/または蛍光シグナルを増加させる方法を含む。タンパク質、核酸および他の生体分子 (例えば、オリゴ糖) に修飾を加えることができる。いくつかの実施形態において、本発明は、蛍光シグナルの増加および/または消光の減少を示す蛍光標識された生体分子を含む組成物を含み、組成物は生体分子、スペーサー、および蛍光標識を含み、スペーサーと蛍光標識は、互いに直接コンジュゲートしていない。

20

【0026】

本発明はまた、蛍光標識 1 個あたりに基づいて増強された蛍光を示す組成物、ならびにそのような組成物を製造および使用方法に関する。例として、生体分子に結合した単一の蛍光標識が 100% の蛍光発光のベースラインを設定すると仮定する。さらに、2 つの蛍光標識が同一の生体分子に結合しているとき、2 つの蛍光標識のそれぞれがベースライン蛍光発光の平均 80% を示すと仮定する。本発明は、部分的には、平均蛍光発光をベースラインの 80% を超えて増加させるための組成物および方法に関する。

【0027】

いくつかの場合において、本発明の組成物、および本発明の方法で使用される組成物は、1 つ以上の機能的特性によって定義され得る。そのような特性の例は、標識された分子 (例えば、生体分子) に結合する蛍光標識の数、標識された分子上の蛍光標識間の平均距離 (多数の異なる方法のいずれかで測定される)、および/または標識された分子上の蛍光標識の量子収率である。

30

【0028】

蛍光強度を測定する 1 つの手段は、量子収率の測定によるものである。蛍光系についての量子収率 () は、事実上、所与のフルオロフォアの発光効率であり、そして以下の式によって決定され得る。

$$\Phi = \frac{\text{発光された光子の数}}{\text{吸収された光子の数}}$$

40

【0029】

以下の実施例 8 に示されるように、量子収率も消光効果を測定するために使用され得る。さらに、量子収率を測定するために使用され得る Hamamatsu Absolute PL Quantum Yield Spectrometer (Hamamatsu Corp., Bridgewater NJ 08807, C11347-11 Quantaurus-QY Absolute PL Quantum Yield Spectrometer) のような装置は市販される。

【0030】

実施例 8 および表 25 に示すように、蛍光標識された分子の量子収率は遊離の蛍光標識の量子収率と比較することができる。消光が実質的に起こらない条件下での単一ユニット

50

の遊離の蛍光標識の量子収率を 1 と設定すれば、これは標識された分子に結合した各蛍光標識によって発生する蛍光の比較のためのベンチマークとして使用できる。多くの場合、本発明の組成物は、複数の蛍光標識で標識された蛍光標識された分子を含み、ここで蛍光発光の平均量は、蛍光標識 1 個あたりに基づいて、遊離の蛍光標識の蛍光発光の、少なくとも 70% (0.7 蛍光比) (例えば、約 70% ~ 約 99%、約 70% ~ 約 90%、約 80% ~ 約 99%、約 85% ~ 約 99%、約 87% ~ 約 99%、約 90% ~ 約 99%、約 80% ~ 約 95%、約 85% ~ 約 96% など) である。

【0031】

実施例 8 および表 25 に示すように、蛍光強度は、遊離の標識の蛍光と比較した蛍光標識された分子の全蛍光の測定によって決定することができる。消光が実質的に起こらない条件下での単一ユニットの遊離の蛍光標識の蛍光を 1 と設定すれば、これは標識された分子に結合した各蛍光標識によって発生する蛍光の比較のためのベンチマークとして使用できる。多くの場合、本発明の組成物は、複数の蛍光標識で標識された蛍光標識された分子を含み、ここで蛍光発光の平均量は、蛍光標識 1 個あたりに基づいて、遊離の蛍光標識の蛍光発光の、少なくとも 70% (0.7 蛍光比) (例えば、約 70% ~ 約 99%、約 70% ~ 約 90%、約 80% ~ 約 99%、約 85% ~ 約 99%、約 87% ~ 約 99%、約 90% ~ 約 99%、約 80% ~ 約 95%、約 85% ~ 約 96% など) である。

10

【0032】

表 25 に示されるように、遊離の蛍光標識と比較した蛍光標識された分子の明度を決定することができる。明度は、次の式で与えられるように、量子収率 ()、吸光係数 ()、および 1 分子あたりの色素数 (N) の積に比例する。

20

$$B = \quad \times \quad \times N$$

したがって、遊離の蛍光標識の明度の標識された分子の明度に対する比を用いて、全蛍光増強を記載することができる。

【0033】

例として、表 25 のデータは、脱イオン水中の ALEXA FLUOR (登録商標) 647 のベンチマークとして設定されている。さらに、これは遊離の色素の 100% 量子収率および 1.0 の明度の比のベンチマークを設定する。試料のうちで、分子 AF 647 - 20K8 は遊離の色素の 73% の量子収率を有していたが、遊離の色素に対して 5.8 × の蛍光増強を示した。試料 AF 647 - 10K4 が遊離の色素の最高量子収率 (89%) を有するが、遊離の色素に対してわずか 3.6 × の蛍光増強を有することもまた示される。これらのデータは、これらの分子について見られる蛍光増強の程度がアームの長さとは直接相関し得ることを示す。データはまた、アームの長さを一定に保ち、より多くの蛍光標識されたアームをポリマーに付加すると、蛍光増強が増大する傾向があることを示している。

30

【0034】

したがって、本発明は、蛍光標識が蛍光シグナルを増強する様式で間隔を空けられるように、複数の蛍光標識を個々の分子 (例えば、生体分子) に連結するための組成物および方法を含む。これは消光の減少によってなされ得る。蛍光シグナルを増強するための 1 つの方法は、試料中に存在する蛍光標識を空間的に分離することである。これは、複数の蛍光標識が検出されるべき同一の分子 (例えば、生体分子) に結合しているときに特に有用である。

40

【0035】

いくつかの態様において、本発明は、スパーサーと蛍光標識とにコンジュゲートした抗体を産生する方法であって、ここでスパーサー剤を用いてスパーサーを抗体にコンジュゲートし、そしてスパーサーは蛍光標識にコンジュゲートしていない、方法を含む。スパーサー、抗体、および蛍光標識を含む組成物であって、ここでスパーサーが蛍光標識にコンジュゲートしていない組成物もまた包含される。

【0036】

いくつかの実施形態において、スパーサーは、抗体にコンジュゲートした複数の蛍光標

50

識の消光を低減することができる。

【0037】

いくつかの実施形態では、スペーサー剤にコンジュゲートされた核酸を産生する方法であって、ここでスペーサー剤が蛍光標識に直接コンジュゲートされていない方法が含まれる。そのようなスペーサー剤は、核酸にコンジュゲートした蛍光標識の消光を低減させ得る。

【0038】

いくつかの実施形態において、本発明は、それらがコンジュゲートしている分子（例えば、生体分子）上の点からの空間的に分離した蛍光標識に関する組成物および方法を含む。多くの場合、これは1つ以上の蛍光標識をスペーサーに接続し、スペーサーを分子（例えば、生体分子）に接続することにより実施される。そのような組成物および方法の例を図18に示す。

10

【0039】

定義

本明細書および例示的な実施形態は、限定的なものとして捉えられるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲の目的において、別途示されない限り、数量、割合、または比率を表す全ての数、ならびに明細書および特許請求の範囲に使用される他の数値は、全ての場合において、それらが修正されすぎない程度まで「約」という用語によって修正されているものとして理解されるべきである。したがって、反対が示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、得ようとする所望の特性によって変化し得る近似値である。最低でも、特許請求の範囲に対する均等の原則の適用を限定することを企図しないように、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の桁数に照らしてかつ通常の見捨入の技術を適用することによって解釈されるべきである。

20

【0040】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その(the)」、ならびに任意の単語の任意の単数使用には、明確かつ疑いの余地なく1つの指示対象に限定されていない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本明細書で使用されるとき、「含む」という用語およびその文法的異形は、リスト中の項目の列挙が、列挙される項目と置き換えられるか、またはそこに追加され得る他の同様の項目を除外するものではないように、非限定的であることが意図される。

30

【0041】

本明細書中で使用されるとき、「生体分子」とは、合成または天然に存在する、タンパク質またはその断片、糖タンパク質、リポタンパク質、アミノ酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、炭水化物、糖、脂質、脂肪酸、ハプテン、抗体などを含むがこれらに限定されない。

【0042】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書では任意の長さのアミノ酸残基のポリマーを含むように一般的な意味で使用されている。本明細書で使用されるとき、「ペプチド」という用語は、モノマーがアミノ酸であり、アミド結合を介して互いに結合しているポリマーを指し、あるいはポリペプチドと呼ばれる。アミノ酸が - アミノ酸であるとき、L - 光学異性体またはD - 光学異性体のいずれかを使用することができる。さらに、非天然アミノ酸、例えば、 - アラニン、フェニルグリシンおよびホモアルギニンもまた含まれる。遺伝子コードされていない一般的に遭遇するアミノ酸もまた本発明において使用され得る。本発明で使用される全てのアミノ酸は、D - またはL - 異性体のいずれかであり得る。L - 異性体が一般的に使用されている。さらに、他のペプチド模倣薬もまた本発明において有用である。一般的な概説については、Spatola, A. F., *単 Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, B. Weinstein, ed

40

50

s. , Marcel Dekker , New York , p . 267 (1983) を参照のこと。

【 0043 】

本明細書で使用されるとき、「抗体」という用語は、ハイブリドーマ細胞株によって、ポリクローナル抗体応答を誘発するための免疫化によって、化学合成によって、および抗体をコードする発現ベクターで形質転換された組換え宿主細胞によって、産生される抗体を含むがこれに限定されない抗体 - 抗原複合体を形成するために特定の物質（例えば、抗原および免疫原）に非共有結合的に結合する免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのタンパク質を指す。ヒトにおいて、免疫グロブリン抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMとして分類され、そして各クラスのメンバーは同一のアイソタイプを有すると言われる。ヒトIgAおよびIgGアイソタイプはさらにサブタイプIgA₁およびIgA₂、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄にさらに細分される。マウスは概してヒトと同一のアイソタイプを有するが、IgGアイソタイプはIgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、およびIgG₃サブタイプに細分される。したがって、本明細書で使用されるとき、「抗体」という用語はその範囲内に、（a）免疫グロブリンの任意の様々なクラスまたはサブクラス（例えば、抗体を産生する任意の動物由来のIgA、IgD、IgG、IgM、およびIgE）、ならびに（b）マウス、キメラ、またはヒト化抗体などのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含むことが理解されよう。抗体分子は、抗原決定基として作用し得るアミノ酸配列の領域（例えば、Fc領域、カップ軽鎖、ラムダ軽鎖、ヒンジ領域など）を有する。選択された領域に対して生成された抗体は抗 - [領域]（例えば、抗Fc、抗カップ軽鎖、抗ラムダ軽鎖など）と呼ばれる。抗体は、典型的には、免疫グロブリンタンパク質を発現させるためにリンパ球活性化を開始するために高分子で生物を免疫することによって抗原に対して生成される。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」はまた、非限定的に、単鎖Fv分子（scFv）を含む抗体結合ドメインであるか、またはそれと相同な結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたはタンパク質を包含し、ここでVHドメインとVLドメインは、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能にするペプチドリンカーによって連結されている（Bird et al. , Science 242 : 423 (1988)、およびHuston et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5879 (1988)）。これらは天然源に由来することができ、あるいはそれらは部分的または全体的に合成的に産生されてもよい。

【 0044 】

さらに、VHH抗体は、抗原刺激細胞から得られたものとして、または遺伝子操作された抗原結合タンパク質としてのいずれかで使用され得る。

【 0045 】

本明細書で使用されるとき、「抗体断片」という用語は、抗体全体の主要な選択的結合特性を保持する抗体の断片を指す。特定の断片、例えば様々なプロテアーゼでの消化により得られ、そして無傷の抗体のFc断片を欠くFab、Fab'、およびF(ab')₂、または無傷抗体中の重鎖成分を連結するジスルフィド結合の還元的切断により得られるいわゆる「半分子」断片は、当該技術分野において周知である。そのような断片には、軽鎖可変領域からなる単離された断片、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、ならびに軽鎖可変領域と重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結されている組換え単鎖ポリペプチド分子もまた含まれる。結合断片の他の例には、（i）VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；（ii）VHドメインからなるdAb断片（Ward et al. , Nature 341 : 544 (1989)）、（iii）単離されたCDR領域、ならびに（iv）上述の単鎖Fv分子（scFv）が含まれる。さらに、抗原認識特性を保持する組換え技術を用いて任意の断片を作製することができる。

【 0046 】

使用され得る例示的なVHH抗体は、単一のモノマーの可変抗体ドメインからなる抗体断片である単一ドメイン抗体である。そのような抗体断片は、典型的にはわずか12~2

5 k D a の分子量を有し、したがって2本の重鎖タンパク質鎖および2本の軽鎖からなる他の多くの抗体 (1 5 0 ~ 1 6 0 k D a) よりも小さい。

【 0 0 4 7 】

本明細書中で使用されるとき、「抗原」とは、抗体の形成を誘導するか、または誘導することができる、または抗体が選択的に結合する、生物由来物質を含むがこれらに限定されない分子を指す。抗原はまた「免疫原」を指す。存在する他の物質との交差反応性または干渉が相対的に欠如するとき、抗体は抗原に選択的に結合する。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用されるとき、「反応性基」という用語は、別の化学基と反応して共有結合を形成することができる、すなわち適切な反応条件下で共有結合的に反応する基を指し、一般的に別の物質に対する結合点を表す。反応性基は一般に求核性、求電子性、および光活性化可能の基を含む。例示的な反応基としては、オレフィン、アセチレン、アルコール、フェノール、エーテル、酸化物、ハロゲン化物、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、シアネート、イソシアネート、チオシアネート、イソチオシアネート、アミン、ヒドラジン、ヒドラゾン、ヒドラジド、ジアゾ、ジアゾニウム、ニトロ、ニトリル、メルカプタン、スルフィド、ジスルフィド、スルホキシド、スルホン、スルホン酸、スルフィン酸、アセタール、ケタール、無水物、硫酸、スルフェン酸イソニトリル、アミジン、イミド、イミダート、ニトロン、ヒドロキシルアミン、オキシム、ヒドロキサム酸、アルキン、およびアジドが挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 4 9 】

本明細書中で使用されるとき、「スペーサー」、「スペーサー分子」、または「スペーサー剤」とは、生体分子に直接または間接的にコンジュゲートしたときに、生体分子から発光される蛍光を増強し得る化合物 (例えば、有機化合物) をいう。これは蛍光標識の蛍光消光の低減から生じると考えられている。任意の数の化合物がスペーサーとして作用し得、例示的な化合物には、N H S - アセテートおよび様々な形態のポリエチレングリコール (P E G) が含まれる。本明細書で使用されるとき、用語「ポリエチレングリコール」または「P E G」は、エチレンオキシドのオリゴマーまたはポリマーを指す。P E G ポリマー鎖長は大きく変動し得るが、1 0 , 0 0 0 , 0 0 0 g / m o l 程度の高い分子量を有する傾向がある。P E G もまた、様々な形状で利用可能である。例えば、分岐鎖 P E G は典型的には、中心コア基から生じる 3 ~ 1 0 個の P E G 鎖を有する。スター P E G は、中心コア基から生じる 3 ~ 1 0 0 個の P E G 鎖を有する。コーム P E G は、通常ポリマー骨格にグラフトされた複数の P E G 鎖を有する。ほとんどの P E G は、分子量分布を有する分子を含む (すなわち、それらは多分散性である) 。サイズ分布は、その重量平均分子量およびその数平均分子量によって統計的に特徴付けることができ、その比は多分散性指数と呼ばれる。本発明の実施において使用され得る例示的な P E G 化合物としては、M S (P E G) 4、M S (P E G) 8、および M S (P E G) 1 2 (それぞれ、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A、カタログ番号 2 2 3 4 1、2 2 5 0 9 B、および 2 2 6 8 6)、ならびに (メチル - P E G 1 2) 3 - P E G 4 - N H S エステル (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A、カタログ番号 2 2 4 2 1) などの分岐鎖 P E G 化合物が含まれる。

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用されるとき、用語「直接スペーサー」は、それに結合した少なくとも1つの蛍光標識を有し、生体分子に直接結合する分子を指す。直接スペーサーは、(1) 単一ポリマーまたは (2) コアに結合した複数のポリマーであり得る。直接スペーサーの例には、シングルアームポリマーおよびマルチアームポリマーが含まれる。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用されるとき、「ポリマー」は、繰り返しサブユニット (典型的には少なくとも4つの繰り返しサブユニット) からなる分子である。ポリマーは合成でも天然に存在するものでもよい。ポリマーの繰り返し単位は同一である必要はない。例えば、タンパク質は、異なるアミノ酸サブユニットからなるポリマーである。さらに、ポリマーは完全

10

20

30

40

50

に直鎖状の分子である必要はなく、したがってデキストランのように分岐していてもよい。

【0052】

本明細書中で使用されるとき、用語「シングルアームポリマー」とは、少なくとも1つの蛍光標識が結合し、非分岐鎖構造を有する、非分岐鎖分子を指す(図19を参照)。本発明の実施において使用され得るシングルアームポリマーの例は、「直鎖状」多糖類(例えば、アミロース)、ポリエチレングリコール、長鎖炭素分子(例えば、Ahx)、およびポリペプチドである。いくつかの場合では、非分岐鎖/直鎖多糖類は、1,4結合によって互いに結合したモノマーからなる。

【0053】

本明細書中で使用されるとき、用語「マルチアームポリマー」とは、少なくとも1つの蛍光標識が結合し、そして非分岐鎖構造を有する分岐鎖分子を指す(図19参照)。本発明の実施において使用され得るマルチアームポリマーの例は、分岐鎖多糖類(例えば、デキストラン、グリコゲン)、ポリエチレングリコール、分岐鎖状長鎖炭素分子(例えば、Ahx)、および分岐鎖ポリペプチドである。

10

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「コンジュゲーション分子」または「コンジュゲーションアーム」とは、それを通して色素が分子(例えば、生体分子)に結合される(例えば、共有結合される)リンカーを指す。コンジュゲーション分子は、単一の色素分子または複数の色素分子(同一の色素または異なる色素)に結合してもよい。

【0055】

本明細書で使用されるとき、用語「蛍光」は、分子が高エネルギー光子を吸収し、それを低エネルギー(長波長)光子として再発光する光学現象を指し、吸収された光子と発光された光子とのエネルギーの差分は分子振動または熱として終わる。

20

【0056】

本明細書で使用されるとき、「蛍光標識」、「蛍光色素」、「フルオロフォア」、または「蛍光部分」という用語は、本質的に蛍光性である化合物、化学基、または組成物を指す。フルオロフォアは、フルオロフォアの溶解度、スペクトル特性、または物理的特性を改変する置換基を含み得る。多数のフルオロフォアが当業者に既知であり、クマリン、シアニン、ベンゾフラン、キノリン、キナゾリノン、インドール、フラン、ベンザゾール、ポラポリアザインダセン、ならびにフルオレセイン、ローダミンおよびロドールを含むキサントゲン、ならびにRICHARD P. HAUGLAND, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (9th edition, CD-ROM, September 2002)に記載される他のフルオロフォアを含むがこれらに限定されない。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、マレイミド、およびヒドラジドなどの反応性化学ならびにクリック化学(例えば、SITECLICK(商標))が、現在、蛍光標識の生体分子へのコンジュゲーションに使用されている。

30

【0057】

本明細書中で使用されるとき、用語「コンジュゲート」とは、共有結合または非共有結合のいずれかによって、直接的または間接的のいずれかで別の分子に結合している分子をさす。

40

【0058】

「色素コンジュゲート」という用語は、抗体などの別の担体分子に共有結合または非共有結合で結合した色素分子を指し、多くの場合、色素は共有結合している。色素コンジュゲートは、単一の共有結合を介した直接結合、C、N、O、SおよびPからなる群から選択される1~20個の非水素原子を組み込んだ一連の安定な共有結合などのリンカーを介した架橋または結合によって結合され得、抗体または化学反応性基などの別の部分または生物学および非生物学的構成要素へと蛍光色素を共有結合させる。コンジュゲーションまたはリンカーは、ビオチン/アビジンなどの受容体結合モチーフを含み得る。

【0059】

50

本明細書で使用されるとき、「近赤外色素」または「近赤外レポーター分子」または「NIR色素」または「NIRレポーター分子」という用語は、約580nm～約800nmの励起波長を有する色素またはレポーター分子を指す。多くの場合、NIR色素は約590nm～約860nmの範囲で発光する。多くの場合、NIR色素は約680～約790nmで励起される。多くの場合、色素には、ALEXA FLUOR（登録商標）660色素、ALEXA FLUOR（登録商標）680色素、ALEXA FLUOR（登録商標）700色素、ALEXA FLUOR（登録商標）750色素、およびALEXA FLUOR（登録商標）790色素が含まれる。NIR色素は、生体内に存在する内在性物質を励起することなく、選択的に可視化することができるので、インビボイメージングに特に有利である。いくつかのNIR色素は大きなストークスシフトを有し、そのため励起波長と発光波長は少なくとも20、30、40、50、60、70、または80nm離れている。

10

【0060】

「固体支持体」は、硬質または半硬質表面を有する基材材料を意味する。典型的には、基材の少なくとも1つの表面は実質的に平坦であるが、例えばウェル、隆起領域、エッチングされたトレンチ、または他のそのようなトポロジーによって特定の領域を物理的に分離することが望ましい場合がある。固体支持体物質はまた、球体（ミクروسフェアを含む）、棒状体（例えば光ファイバー）、ならびに加工品および不規則成形品を含む。

【0061】

固体支持体物質は、非限定的に、ポリ（ビニリデンジフルオライド）（PVDF）、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ナイロン、ガラス、デキストラン、キチン、砂、軽石、ポリテトラフルオロエチレン、アガロース、多糖類、 dendリマー、バッキーボール、ポリアクリルアミド、珪藻土 - ポリアクリルアミド非共有結合複合体、ポリスチレン - ポリアクリルアミド共有結合複合体、ポリスチレン - PEG [ポリ（エチレングリコール）] 複合体、シリコン、ゴム、固相合成、アフィニティー分離および精製、ハイブリダイゼーション反応、イムノアッセイおよび他のそのような用途のための支持体として使用される他の物質などの親和性マトリックスまたは化学的および生物学的分子合成および分析用支持体として使用される任意の材料を含む。固体支持体は粒状であってもよく、またはマイクロタイターディッシュもしくはウェル、スライドガラス、シリコンチップ、ニトロセルロースシート、ナイロンメッシュ、または他のそのような物質などの連続表面の形態であってもよい。

20

30

【0062】

「キット」とは、関連する構成要素、典型的には1つ以上の化合物または組成物の包装されたセットを意味する。

【0063】

検出可能な生体分子

いくつかの実施形態において、スペーサー剤をも含む複数の蛍光標識で検出可能に標識されている生体分子が本明細書に開示されている。

【0064】

a. スペーサー

スペーサーは、生体分子にコンジュゲートしたときに、独立して生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識の励起から生じる蛍光発光を増強することができる任意の分子であり得る。これは蛍光標識の蛍光消光の低減によるものと考えられる。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、スペーサーはアセチル（-C(O)CH₃）基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーはアセテート分子である。いくつかの実施形態では、アセテート分子はスルホ-NHS-アセテートである。

【0066】

いくつかの実施形態では、スペーサー剤はポリエチレングリコール（PEG）を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー剤は（PEG）_nを含み、式中、nが、1、2、3

50

、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される。いくつかの実施形態では、スペーサー剤はMS-(PEG)_nを含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、スペーサーは、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル(-C(O)C_nH_m)から選択され、式中、nは1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、ならびにアルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基はさらに置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、具体的な置換は、-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-ORなどのポリ(エチレン)グリコール部分を含み、式中、xは1~20であり、yは1~6であり、そしてRはHまたはC₁~₆アルキルである。いくつかの実施形態では、具体的な置換は、アンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム((-NR₃⁺)基(式中、RはC₁~₆アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ₃⁺) (式中、Qはアリーール、置換アリーール、またはC₁~₆アルキルである)を含む。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、スペーサーは、アルキル、アルケニル、またはアルキニル基(-C_nH_m)から選択され、式中、nは1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができ、ならびにアルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基はさらに置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、具体的な置換は、負に荷電したスルホネート基(-OSO₃⁻)、カルボキシレート基(-CO₂⁻)、ホスフェート基(-OPO₃⁻)、および/またはホスホネート基(-PO₃⁻)を含む。いくつかの実施形態では、他の置換は、-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-ORなどのポリ(エチレン)グリコール部分を含み、式中、xは1~20であり、yは1~6であり、そしてRはHまたはC₁~₆アルキルである。いくつかの実施形態では、他の具体的な置換は、アンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム((-NR₃⁺)基(式中、RはC₁~₆アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ₃⁺) (式中、Qはアリーール、置換アリーール、またはC₁~₆アルキルである)を含む。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、スペーサーは正に荷電している。いくつかの実施形態において、スペーサー剤はベタイン(すなわち、トリメチルグリシン)を含む。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、スペーサー剤は負に荷電している。

【0071】

b. 蛍光標識

本明細書に記載の蛍光色素は、アミン基またはチオール基を非限定的に含む、タンパク質上の官能基へのコンジュゲーションの結果として直接的または間接的に検出可能なシグナルを試料に与えるレポーター分子として機能する。これは、一般に試料の全タンパク質のサブセットの検出と組み合わせ、試料中の全タンパク質を検出する能力をもたらす。そのような場合、全タンパク質標識は、試料中の全タンパク質のサブセットを標識する色素とは区別して識別可能である。

40

【0072】

典型的には、検出可能な応答とは、蛍光の変化、例えば、蛍光の強度、蛍光の励起または発光波長、蛍光の分布、蛍光寿命、蛍光偏光、またはそれらの組み合わせの変化である。

【0073】

蛍光色素は、当業者に既知の任意のフルオロフォアであり得る。典型的には、色素は、ハロゲン、ニトロ、スルホ、シアノ、アルキル、ペルフルオロアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリーールアルキル、アシル、アリーールもしくはヘテロアリーール環系、ベンゾ、または当該技術分野で既知の発色団もしくはフルオロフォア上に典型的に存在する他の置換基を含む様々な置換基で1回以上任意選択で置換されている1つ以上の芳香環またはヘテロ芳香環を含むがこれらに限定されない。

50

【 0 0 7 4 】

本明細書中に記載されるような全タンパク質標識化に適切であり得る多種多様なフルオロフォアは、当該技術分野において既に知られている (R I C H A R D P . H A U G L A N D , M O L E C U L A R P R O B E S H A N D B O O K O F F L U O R E S C E N T P R O B E S A N D R E S E A R C H P R O D U C T S (2 0 0 2)) 。本明細書に記載の方法および組成物に使用される蛍光色素は、280 nmを超える吸収極大を示す任意の化学部分である。そのような化学部分としては、ピレン、スルホン化ピレン、スルホン化クマリン、スルホン化カルボシアニン、スルホン化キサンテン、アントラセン、ナフタレン、アクリジン、スチルベン、インドール、イソインドール、インドリジン、ベンズインドール、オキサゾールまたはベンゾオキサゾール、チアゾールまたはベンゾチアゾール、4 - アミノ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾール (N B D) 、カルボシアニン、カルボスチリル、ポルフィリン、サリチレート、アントラニレート、アズレン、ペリレン、ピリジン、キノリン、イソキノリン、クロメン、ポラポリアザインダセン、キサンテン、フルオレセイン、ロサミン、ローダミン、ローダミン、ベンゾ - またはジベンゾフルオレセイン、セミナフトフルオレセイン、ナフトフルオレセイン、ピマン、オキサジンまたはベンゾオキサジン、カルバジン、フェナレノン、クマリン、ベンゾフラン、ベンゾフェナレノン) およびそれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で使用されるとき、オキサジンは、レゾルフィン、アミノオキサジノン、ジアミノオキサジン、およびそれらのベンゾ置換類似体を含む。

10

【 0 0 7 5 】

一態様では、蛍光色素は、ハロゲン、ニトロ、スルホ、シアノ、アルキル、ペルフルオロアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリールアルキル、アシル、アリールもしくはヘテロアリール環系、ベンゾ、または当該技術分野で既知の発色団もしくはフルオロフォア上に典型的に存在する他の置換基を含む様々な置換基で1回以上任意選択で置換されている1つ以上の芳香環またはヘテロ芳香環を含む。一態様では、フルオロフォアは、1つ以上のジュロリジン環を含むキサンテンである。

20

【 0 0 7 6 】

例示的な実施形態では、色素は、水素、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アルコキシ、スルホ、反応性基、固体支持体および担体分子からなる群から選択される置換基によって独立して置換される。別の実施形態では、本発明のキサンテン色素は、キサンテン系色素に典型的に見られる置換基、例えばフェニルおよび置換フェニル部分による、キサンテンの中心環の炭素原子上での置換および非置換の両方の化合物を含む。多くの場合、色素はローダミン、フルオレセイン、ポラポリアザインダセン、インドール、およびそれらの誘導体である。

30

【 0 0 7 7 】

コンジュゲートされるタンパク質に全タンパク質標識または発現タグ標識を結合させるために使用される反応基の選択は、典型的には、コンジュゲートさせる物質上の反応性または官能基および所望の共有結合の種類または長さに依存する。有機または無機の基材 (生体分子または非生体分子) に典型的に存在する官能基の種類には、アミン、アミド、チオール、アルコール、フェノール、アルデヒド、ケトン、ホスホネート、イミダゾール、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、二置換アミン、ハロゲン化物、エポキシド、ハロゲン化シリル、カルボン酸エステル、スルホン酸エステル、プリン、ピリミジン、カルボン酸、オレフィン結合、またはこれらの基の組み合わせを含むがこれらに限定されない。タンパク質において、アミン、チオール、アルコール、およびフェノールを含むがこれらに限定されない様々な部位が生じ得る。

40

【 0 0 7 8 】

本明細書中に記載されるタンパク質標識化方法において使用され得るアミン反応性蛍光色素には、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録

50

商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、および7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0079】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質標識化方法で使用されるタンパク質に結合したタグに結合する蛍光発生試薬/色素は、ほんの一例としてFLASH-EDT2(4'-5'-ビス(1,3,2-ジチオアルソラン-2-yl)フルオレセイン-(2,2-エタンジチオール)2)(LUMIO(商標)Green, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA)などのフルオレセインの二ヒ素誘導体を含む二ヒ素フルオロフォア、またはほんの一例としてReAsh-EDT2(LUMIO(商標)Red, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA)などのレゾルフィンの二ヒ素誘導体であり、あるいは、代替的に、CHOXASH-EDT2もしくはHOXASH-EDT2などの酸化誘導体であり得る。さらに、二ヒ素フルオロフォアは、Molecular Probes (Eugene, Oregon)から市販される、ほんの一例として、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 663、およびALEXA FLUOR (登録商標) 660などの本明細書に記載のALEXA FLUOR (登録商標) シリーズを含むがこれらに限定されない他の既知のフルオロフォアの二ヒ素誘導体であり得る。

30

40

【0080】

いくつかの実施形態では、二ヒ素フルオロフォアは、少なくとも約1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、10 μM、15 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、100 μM、またはそれ以上の濃度で、および約500 μM、400 μM、300 μM、200 μM、100 μM、90 μM、80 μM、70 μM、60 μM、50 μM、40 μM、30 μM、20 μM、15 μM、10 μM、5 μM、4 μM、3 μM、2 μM、または1 μM以下の濃度で存在することができる。

【0081】

いくつかの実施形態では、そのような蛍光色素が結合するタンパク質に結合したタグは、テトラシステインペプチドモチーフ、cys-cys-Xn-cys-cys(配列番号1)であり、式中各Xは任意の天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはそれらの組み合

50

わせであり、そして n は 2 ~ 100 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 90 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 80 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 70 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 60 の整数である。特定の実施形態において、 n は、2 ~ 50 の整数であり、他の実施形態において、 n は、2 ~ 40 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 30 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 20 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 10 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 5 の整数である。そのようなモチーフである場合、天然アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを含むがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、テトラシステインタグは配列 C C P G C C (配列番号 2) を有する。他の実施形態では、アミノ酸配列、A G G C C P G C C G G G (配列番号 3) を含むがこれに限定されない、テトラシステインモチーフを含む 12 アミノ酸ペプチドが使用される。さらに、タンパク質は単一のテトラシステインタグで標識することができ、またはタンパク質は 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 個のテトラシステインタグを含むがこれらに限定されない複数のテトラシステインタグで標識することができる。そのようなタグは、タンパク質の一次アミノ酸配列内で互いに分離されてもよく、またはコンカテマーとして直列に直接多量体化されていてもよい。

10

【0082】

20

ある特定の実施形態では、テトラシステインペプチドは、配列 $c y s - c y s - X n - c y s - X - c y s - X$ (配列番号 1) を有し、式中、各 X は、任意の天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはそれらの組み合わせであり、そして n は 2 ~ 100 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 90 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 80 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 70 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 60 の整数である。特定の実施形態において、 n は、2 ~ 50 の整数であり、他の実施形態において、 n は、2 ~ 40 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 30 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 20 の整数である。特定の実施形態では、 n は 2 ~ 10 の整数であり、他の実施形態では n は 2 ~ 5 の整数である。そのようなモチーフである場合、天然アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンを含むがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、テトラシステインタグは配列 C C G G K G N G G C G C (配列番号 4) を有する。

30

【0083】

テトラシステインペプチドタグ(単数または複数)は、N末端、C末端、またはタンパク質配列内のインフレームのいずれかで、標識されることが望まれるタンパク質に組換え的に融合され得、テトラシステイン融合組換えタンパク質を作製するための発現ベクターは、当業者に既知の技術を用いて容易に構築され得る。ある特定の実施形態では、テトラシステインタグ化タンパク質は、細菌宿主細胞、真菌宿主細胞、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞を含むがこれらに限定されない宿主細胞において組換え発現される。そのような細菌宿主細胞には、ほんの一例としてエシェリキア (*Escherichia*) 属(例えば、大腸菌 (*E. coli*))、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、シゲラ (*Shigella*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属(例えば、バチルス・セレウス (*B. cereus*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、およびバチルス・メガテリウム (*B. megaterium*))、セラチア (*Serratia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属(例えば、緑膿菌 (*P. aeruginosa*))、およびシユ

40

50

ードモナス・シリング (*P. syringae*)、ならびにサルモネラ (*Salmonella*) 属 (例えば、サルモネラ・チフィ (*S. typhi*)、およびサルモネラ・チフィリウム (*S. typhimurium*)) を含む、任意の属のグラム陰性およびグラム陽性細菌が含まれるがこれらに限定されない。本発明に適した好適な細菌株および血清型は、大腸菌血清型 K、B、C、および W を含み得る。典型的な細菌宿主は大腸菌株 K-12 である。真菌宿主細胞は、ほんの一例としてサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞を含み、一方で哺乳類細胞はほんの一例としてヒト細胞を含む。そのような実施形態では、対象のタンパク質を含むタンパク質試料は宿主細胞の溶解物であり、これは本明細書に記載の方法を用いた標識化および分析の前に、未精製であり得、部分的に精製され得、または実質的に精製され得る。

10

【0084】

他の実施形態では、テトラシステインタグ化タンパク質はインビトロで発現され、対象のタンパク質を含むタンパク質試料は、翻訳 (および場合によっては転写) が実施される無細胞抽出物、またはその部分的精製もしくは精製画分である。大腸菌に基づく EXPRESSWAY (商標) または EXPRESSWAY (商標) Plus システム (Life Technologies Corp., Carlsbad, Ca) のような、抽出物が単一の無細胞抽出物中での共役した転写と翻訳を可能にする実施形態において、試料は、転写および翻訳が通常起こる無細胞抽出物、またはその画分である。

【0085】

代替的に、GATEWAY (登録商標) Technology (Life technologies Corp., Carlsbad, CA) は、対象の遺伝子を大腸菌内で発現させるために使用することができる普遍的なクローニング技術である。

20

【0086】

本明細書に記載の二ヒ素色素を用いて標識されるタンパク質は、テトラシステインモチーフを有する任意のタンパク質であり得る。テトラシステインタグ (単数または複数) が融合またはコンジュゲートされるタンパク質は、標識されることが望まれる任意のタンパク質 (天然に存在するかまたは非天然に存在する) のいずれかであり得る。天然に存在するタンパク質は、既知の生物学的機能を有していてもいなくてもよく、そして発現することが知られていてもよいかまたはゲノム配列から予測されるだけであってもよい。タンパク質は、天然に存在するものである場合、完全長タンパク質またはその断片のみであり得る。したがって、テトラシステインタグ化タンパク質は、ヒトタンパク質または非ヒト哺乳動物タンパク質、真菌タンパク質、真正細菌タンパク質および古細菌タンパク質を含む細菌タンパク質、植物タンパク質、昆虫タンパク質、またはウイルスタンパク質などの動物タンパク質であり得る。

30

【0087】

テトラシステインタグに加えて、他のタンパク質配列を標識することが望まれるタンパク質に組換え的に有用に付加することができる。そのような追加のタンパク質配列の中には、リンカーおよび/もしくは短いタグ、有用には FLAG タグもしくは myc タグなどのエピトープタグ、またはポリヒスチジン (例えば、6xhis) タグなどの精製に有用な他の配列がある。代替的に、テトラシステインタグ (単数または複数) は、当該技術分野で慣用されているコンジュゲーション化学を用いて標識されるタンパク質に化学的にコンジュゲートすることができる。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、蛍光標識は正に荷電している。いくつかの実施形態では、蛍光標識は負に荷電している。

【0089】

いくつかの実施形態では、蛍光標識の励起波長は 350 ~ 850 nm の間である。いくつかの実施形態では、蛍光標識の励起波長は遠赤色である。いくつかの実施形態では、蛍光標識の励起波長は近赤外である。いくつかの実施形態では、蛍光標識の励起波長は紫外 (UV) である。

50

【0090】

いくつかの実施形態では、蛍光標識はDYLIGHT(商標)(登録商標)蛍光体を含む。いくつかの実施形態では、DYLIGHT(商標)(登録商標)蛍光体は、DYLIGHT(商標)350、DYLIGHT(商標)405、DYLIGHT(商標)488、DYLIGHT(商標)550、DYLIGHT(商標)594、DYLIGHT(商標)633、DYLIGHT(商標)650、DYLIGHT(商標)680、DYLIGHT(商標)755、およびDYLIGHT(商標)800から選択される。いくつかの実施形態において、DYLIGHT(商標)蛍光体は、PEG分子(例えば、2×PEG、4×PEG、8×PEG、または12×PEG)にコンジュゲートしている。

【0091】

いくつかの実施形態において、蛍光標識はALEXA FLUOR(登録商標)を含む。いくつかの実施形態において、ALEXA FLUOR(登録商標)は、ALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)635、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、およびALEXA FLUOR(登録商標)790から選択される。

【0092】

いくつかの実施形態では、蛍光標識はキサントレン、クマリン、シアニン、ピレン、オキサジン、ポラポリアザインダセン、ベンゾピリリウム、およびカルボピロニンから選択される部分を含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、蛍光標識はフルオレセイン(例えば、Cy2またはFITC)を含む。いくつかの実施形態では、蛍光標識はローダミン(例えば、TRITCまたはCy3)を含む。いくつかの実施形態では、蛍光標識は、MCA、クマリン、RHODAMINE RED、TEXAS RED、CASCADE BLUE、Cy5、Cy5.5、IR680、IR800、およびCy7を含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、蛍光標識は修飾蛍光標識である(例えば、蛍光標識はスルホン化されているかまたはPEGとコンジュゲートされている)。

【0095】

いくつかの実施形態では、蛍光標識は蛍光タンパク質である。いくつかの実施形態では、蛍光タンパク質はフィコビリタンパク質である。本発明において有用なフィコビリタンパク質の例は、アロフィコシアニン、フィコシアニン、フィコエリスリン、アロフィコシアニンB、B-フィコエリスリン、フィコエリスロシアニン、およびb-フィコエリスリンである。フィコビリタンパク質の構造は研究されており、それらの蛍光スペクトル特性は既知である。A.N.Glazer,「Photosynthetic Accessory Proteins with Bilin Prosthetic Groups」,Biochemistry of Plants,Volume 8,M.D.Hatch and N.K.Boardman,EDS.,Academic Press,p.p.51-96(1981)、およびA.N.Glazer,「Structure and Evolution of Photosynthetic Accessory Pigment Systems with Special Reference to Phycobiliproteins」,The Evolution of Protein Structure and Function,B.S.Sigman and

10

20

30

40

50

M. A. Brazier, EDS., Academic Press, pp. 221 - 244 (1980) を参照されたい。いくつかの実施形態では、蛍光タンパク質は、少なくとも約 450 nm、多くの場合少なくとも約 500 nm の吸収極大を有し、少なくとも 15 nm、多くの場合少なくとも約 25 nm のストークスシフトを有し、少なくとも約 500 nm、多くの場合少なくとも約 550 nm の最大蛍光発光を有する。

【0096】

いくつかの実施形態では、蛍光標識は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、US 2014/0349,893 に開示されているような、ジピロメテンボロンニふっ化色素である。

【0097】

本明細書に記載のタンパク質標識化方法で使用されるアミン反応性蛍光色素としては、アロイル - 2 - キノリン - カルボキシアルデヒド型の試薬が含まれるが、これらに限定されない。そのような試薬は、米国特許第 5,459,272 号および米国特許第 5,631,374 号に記載されており、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、使用されるアロイル - 2 - キノリン - カルボキシアルデヒド試薬は、3 - (4 - カルボキシベンゾイル) キノリン - 2 - カルボキシアルデヒドまたは 3 - (2 - フロイル) キノリン - 2 - カルボキシアルデヒドである。ある特定の実施形態において、アミン反応性蛍光色素は 3 - (2 - フロイル) キノリン - 2 - カルボキシアルデヒド) であり、一方、他の実施形態においてアミン反応性蛍光色素は 3 - (4 - カルボキシベンゾイル) - キノリン - 2 - カルボキシアルデヒドである。

【0098】

c. 生体分子

本明細書に開示される組成物および方法において使用され得る生体分子は、分子生物学的用途において有用である任意の生体分子を含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、生体分子は抗体（例えば、一次抗体または二次抗体）である。いくつかの実施形態では、生体分子は抗体断片である。本発明の実施において使用される抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または遺伝子操作された抗体であり得、そして任意の供給源（例えば、サメ、トリ、またはラマ、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、ラットなどの哺乳動物）からのものであり得る。さらに、ヒト化抗体を使用することができる。

【0100】

いくつかの実施形態において、抗体はキメラである。

【0101】

いくつかの実施形態では、生体分子はタンパク質またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、生体分子は組換えポリペプチドである。

【0102】

いくつかの実施形態では、生体分子は核酸分子である。いくつかの実施形態では、核酸分子はオリゴヌクレオチド（例えば、15 ~ 50 ヌクレオチド長）である。いくつかの実施形態では、核酸分子は、50 ヌクレオチド長を超え、100 ヌクレオチド長を超え、500 ヌクレオチド長を超え、1 kb 長を超え、2 kb 長を超え、または 5 kb 長を超える。

【0103】

d. 蛍光色素の生体分子へのコンジュゲーション

典型的には励起波長が少なくとも 580 nm である場合、所望のスペクトル特性を有する適切な色素を選択した後、当該技術分野で周知の方法を用いて色素を標的担体分子にコンジュゲートさせることができる (Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK, 上述 (2002))。多くの場合、共有結合を形成するためのコンジュゲーションは、反応性化合物とコンジュゲートされるスペーサー分子の両方が可溶性である適切な溶媒中で本発明の反応性化合物を単に混合することからなる。多くの場合、反応は試薬を添加することなく、室温以下で自然に進行する。光活性化されているそれらの

10

20

30

40

50

反応性化合物については、反応性化合物を活性化するための反応混合物の照射によってコンジュゲーションが促進される。所望の化合物 - コンジュゲートを調製し得るような非水溶性物質の化学修飾は、多くの場合、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、酢酸エチル、トルエン、またはクロロホルムなどの非プロトン性溶媒中で実施される。水溶性物質の同様の修飾は、本反応性化合物を使用してそれらを有機溶媒中により容易に溶解させることによって容易に達成される。

【0104】

生体分子（例えば、タンパク質）コンジュゲートの調製は、典型的には、最初にコンジュゲートされる生体分子を水性緩衝液中に室温以下で約1～10mg/mLで溶解することを含む。例えば、重炭酸緩衝液（pH約8.3）、炭酸緩衝液およびホウ酸緩衝液（pH約9）は、スクシンイミジルエステルとの反応に特に好適であり、リン酸緩衝液（pH約7.2～8）は、チオール反応性官能基との反応に特に好適であり、炭酸緩衝液およびホウ酸緩衝液（pH約9）は、イソチオシアネートおよびジクロロトリアジンとの反応に特に好適である。次いで、適切な反応性化合物を、コンジュゲートされる生体分子の溶液に添加したときに適切な程度のコンジュゲーションを与えるのに十分な量で非ヒドロキシル溶媒（通常はDMSOまたはDMF）中に溶解させる。任意の生体分子（例えば、タンパク質）または他の成分に対する化合物の適切な量は、様々な量の化合物を生体分子に付加し、コンジュゲートをクロマトグラフィーで精製して非コンジュゲート化合物を分離し、化合物 - 生体分子コンジュゲートを所望の用途で試験する実験によって都合よく事前に決定される。

【0105】

任意の数の緩衝液が、コンジュゲーション反応のために、そして本明細書中に示される他のために使用され得る。説明の目的で実施例1および5を使用すると、リン酸緩衝生理食塩水およびホウ酸緩衝液がコンジュゲーション反応に使用され得、そして使用される。pH9.5の炭酸塩緩衝液を使用できるとも考えられる。そのため、より高いpHのコンジュゲーションはより低いモル過剰の色素およびスペーサー分子を必要とすると考えられている。したがって、本発明は、pHが約4.0～約10.0（例えば、約4.0～約10.0、約5.0～約10.0、約6.0～約10.0、約7.0～約10.0、約7.5～約10.0、約8.0～約10.0など）であるコンジュゲーション反応を実施するための組成物および方法を含む。コンジュゲーション反応は、様々なモル過剰での、蛍光色素または各蛍光色素の混合物と、NHS - アセテート、NHS - MS(PEG)₄、NHS - MS(PEG)₈、またはNHS - MS(PEG)₁₂から選択されるスペーサーと共に、ホウ酸緩衝液50mM、pH8.5中で実施され得る。標識化反応は、室温（RT）で約1時間インキュベートすることができる。NHS活性化色素およびNHS活性化スペーサー剤は、両方の反応が同時に起こるように抗体に添加する前に組み合わせることができ、色素置換およびスペーサーのランダムな間隔を可能にする。

【0106】

本発明の実施において使用され得る緩衝剤としては、例として、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES)、リン酸塩、3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS)、トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン (TRIS)、ホウ酸塩、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)、および炭酸塩緩衝液が含まれる。

【0107】

本明細書に記載の生体分子（例えば、タンパク質）標識化方法において使用される蛍光試薬の濃度は、50nM～100mM（例えば、約50nM～約25mM、約50nM～約10mM、約50nM～約5mM、約100nM～約10mM、約100nM～約5mM、約200nM～約5mM、約50nM～約100μM、約1μM～約100μMなど）の範囲内である。ある特定の形態では、そのような濃度は、100nM～200mM（例えば、約10μM～約500μM、約1μM～約100μM、約100μM～約200μMなど）の範囲内の濃度を有する蛍光色素の原液の希釈によって得られる。ある特

定の実施形態では、原液の濃度は100 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は50 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は20 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は10 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は1 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は500 μ Mである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は10 μ Mである。

【0108】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の生体分子（例えば、タンパク質）の標識化方法において使用されるアミン反応性蛍光色素の濃度は、50 nM～約100 mM（例えば、約50 nM～約50 mM、約50 nM～約25 mM、約50 nM～約10 mM、約50 nM～約5 mM、約50 nM～約5 μ M、約50 nM～100 μ M、約100 nM～約5 mMなど）の範囲内である。ある特定の実施形態では、そのような濃度は、100 nM～200 mMの範囲内の濃度を有する蛍光色素の原液の希釈によって得られる。ある特定の実施形態では、原液の濃度は100 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は50 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は20 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は10 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は1 mMである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は500 μ Mである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は10 μ M～500 μ Mである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は1 μ M～100 μ Mである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は10 μ Mである。ある特定の実施形態では、原液の濃度は100 μ M～200 μ Mである。

【0109】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法を用いて標識されたタンパク質またはタンパク質断片（例えば、抗体断片）の濃度は、0.01 mg/mL～200 mg/mLの範囲内（例えば、約0.1 mg/mL～100 mg/mL、約0.1 mg/mL～約50 mg/mL、約0.1 mg/mL～約10 mg/mL、約0.2 mg/mL～約100 mg/mL、約0.2 mg/mL～約50 mg/mL、約0.2 mg/mL～約10 mg/mL、約0.3 mg/mL～10 mg/mL、約0.4 mg/mL～約10 mg/mL、約0.5 mg/mL～約10 mg/mLなど）である。

【0110】

いくつかの例では、生体分子上の各位置に1つを超える色素分子を結合させることができる。生体分子上の単一の位置に1つを超える色素分子を結合させる1つの方法は、1つを超える色素分子に結合するコンジュゲーション分子の使用によるものである。次いで、これらのコンジュゲーション分子は生体分子に結合し、それらと共に複数の色素分子を担持する。一例として、米国特許出願公開第2012/0256102号に記載されているものなどのポリマーデンドリマーを、これらの色素分子の生体分子への結合のために単一ポリマー主鎖またはコア（本明細書では「デンドリマー」と呼ぶ）にコンジュゲートした複数の蛍光色素分子を使用できる。これらのデンドリマーは、コンビナトリアル様式で、複数の色素分子、複数の色の色素、および/または複数の官能基の化学結合を可能にする規則的または不規則な、分岐鎖ポリマーネットワーク構造を有してもよい。

【0111】

使用され得るコンジュゲーション分子のさらなる例は、スペーサーとして使用される同一分子の多くを含む。したがって、いくつかの例において、スペーサー分子およびコンジュゲーション分子は、コンジュゲーション分子がそれに結合した色素分子を有することを除いて同一の構造を有するであろう。そのため、様々な形態のPEG分子がコンジュゲーション分子として使用され得る。したがって、スペーサー分子は、色素分子（例えば、蛍光標識）を含み得る（図18参照）。

【0112】

したがって、本発明は、各々が平均で約2～約50個（例えば、約2～約45個、約2～約40個、約2～約35個、約2～約30、約2～約20、約5～約45、約10～約45など）の結合した色素分子を有するコンジュゲーション分子の使用を企図する。多くの場合、コンジュゲーション分子に結合した色素分子の平均数の標準偏差は10%、15

10

20

30

40

50

%、および/または20%未満であろう。

【0113】

標識度は、標識された生体分子について測定され得る。標識度は以下のように計算することができる。第一に、標識された生体分子のモル濃度は、例えば以下の式を用いて計算される。

$$\text{タンパク質濃度 (M)} = \frac{A_{280} - (A_{\text{最大}} \times \text{CF})}{\epsilon} \times \text{希釈率}$$

= タンパク質のモル吸光係数（例えば、IgGのモル吸光係数は約210,000 M⁻¹ cm⁻¹である）

A_{最大} = 色素分子についての最大波長（max）で測定された色素溶液の吸光度（A）

CF = 補正係数、色素によって引き起こされる280 nmの吸光度の量を調整する（表8参照）

希釈率 = タンパク質：色素試料を吸光度測定のために希釈した程度（もし希釈していれば）

【0114】

次に、以下の式を使用して標識度を計算する。

$$\text{タンパク質1モルあたりのモル色素} = \frac{\text{標識されたタンパク質の } A_{\text{最大}}}{\epsilon' \times \text{タンパク質濃度 (M)}} \times \text{希釈率}$$

' = 蛍光色素のモル吸光係数

【0115】

（表8）例示的な色素の特性

フルオロフォア	最大波長 (λ _{最大})	吸光係数 (ε')	補正係数 (CF)
DyLight ^(登録商標) 350	353 nm	15,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1440
DyLight 405	405 nm	30,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.5640
DyLight 488	493 nm	70,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1470
DyLight 550	562 nm	150,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.0806
DyLight 594	595 nm	80,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.5650
DyLight 633	627 nm	170,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1100
DyLight 650	652 nm	250,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.0371
DyLight 680	684 nm	140,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1280
DyLight 755	754 nm	220,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.0300
DyLight 800	777 nm	270,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.0452
フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、 NHS-フルオレセイン、5-IAF	494 nm	68,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.3000
テトラメチルローダミン5-(および6)- イソチオシアネート (TRITC)	565 nm	65,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.3400
NHS-ローダミン	570 nm	60,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.3400
Texas Red ^(登録商標) スルホニルクロリド	595 nm	80,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1800
R-フィコエリトリン	566 nm	1,863,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1700
AMCA-NHS, AMCA-スルホ-NHS または AMCA-ヒドラジド	346 nm	19,000 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.1900

【0116】

本発明のいくつかの実施形態において、増強された蛍光は、スペーサーを有さない生体分子よりも低い標識度（DOL）を有するスペーサーを含む生体分子について観察される。一例として、スペーサーの有無にかかわらず、蛍光色素で標識された抗体があると仮定する。同等のDOL基準で、それに結合したスペーサーも有する色素で標識された抗体は、1.5～3.5倍の間の蛍光の増強を示し得、ここで、1は両方の抗体について同一のレベルの蛍光を示す。重要なのは、色素とスペーサーの両方に結合した生体分子について、色素分子1個あたりに基づく蛍光シグナル量が増加することである。

【0117】

10

20

30

40

50

成分溶液への反応性化合物の添加に続いて、混合物を適切な期間（典型的には室温で約1時間から氷上で数時間）インキュベートし、過剰の化合物をゲル濾過、透析、HPLC、イオン交換もしくは疎水性ポリマーへの吸着、または他の適切な手段によって除去する。化合物-コンジュゲートは溶液中で使用されるかまたは凍結乾燥される。このようにして、適切なコンジュゲートは、抗体、抗体断片、および他の標的化担体分子から調製され得る。

【0118】

本明細書に記載の方法で使用されるインキュベーション温度は、室温、周囲温度、またはほんの一例として少なくとも約26、27、28、29、30、40、50、60、70、80などの室温を超える温度、さらには90、95、96、97、98、99、または100までの高温であり得る。本明細書に記載の方法で使用される第1のインキュベーション温度および第2のインキュベーション温度は、同一でも異なってもよい。いくつかの実施形態では、第1のインキュベーション温度は、20～80の間、25～30の間、および/または周囲温度もしくは室温である。いくつかの実施形態において、第2のインキュベーション温度は、20～80の間、65～75の間、および/または約70である。他の態様において、第2のインキュベーション温度は周囲温度または室温である。

10

【0119】

本明細書に記載の方法で使用されるインキュベーション時間は、少なくとも30秒間、少なくとも1分間、少なくとも2分間、3分間、4分間、5分間、6分間、7分間、8分間、9分間、10分間、15分間、20分間、30分間、40分間、50分間、少なくとも1時間、または本明細書中の任意の範囲を含むがこれらに限定されない。本明細書に記載の方法で使用される第1のインキュベーション時間および第2のインキュベーション時間は、同一でも異なってもよい。一実施形態において、第1のインキュベーション時間は、0～60分、5～10分、および/または室温で5～10分である。いくつかの実施形態では、第2のインキュベーション時間は0～20分および/または約10分である。特定の例において、第2のインキュベーション時間は、約70で約10分である。他の実施形態において、第1のインキュベーション時間は25で1～3時間であり、第2のインキュベーション時間は25で一晩であり、そして第3のインキュベーション時間は37で2～3時間である。

20

30

【0120】

バイオポリマーおよび他の高分子量ポリマーを含むポリマーのコンジュゲートは、典型的には当該技術分野でよく知られている手段によって調製される（例えば、Brinkley et al., Bioconjugate Chem., 3:2 (1992)）。これらの実施形態では、多糖類に典型的なように単一種類の反応部位が利用可能であり得るか）、またはタンパク質に典型的なように複数種類の反応部位（例えば、アミン、チオール、アルコール、フェノール）が利用可能であり得る。標識化の選択性は適切な反応性色素の選択によって最もよく得られる。例えば、ハロアセトアミドまたはマレイミドなどのチオール選択的試薬によるチオールの修飾、または活性エステル、アシルアジド、イソチオシアネートまたは3,5-ジクロロ-2,4,6-トリアジンなどのアミン反応性試薬によるアミンの修飾。反応条件を注意深く制御することによって部分選択性もまた得ることができる。

40

【0121】

ポリマーを化合物で修飾するとき、予想される化合物置換度に対して過剰の化合物が典型的に使用される。任意の残留する未反応の化合物、または化合物加水分解生成物は、通常、透析、クロマトグラフィー、または沈殿によって除去される。残留する非コンジュゲート色素の存在は、色素をそのコンジュゲートから溶出させる溶媒を用いた薄層クロマトグラフィーによって検出することができる。全ての場合において、適切な速度のコンジュゲーションを得るために、試薬は実用的な限り濃縮されているのが普通である。

【0122】

50

本明細書に記載の方法のある特定の実施形態では、並行反応において、または標識されることが望まれるタンパク質から容易に分離可能な場合は、同一の反応に含めることによってかのいずれかで対照タンパク質またはタンパク質を標識して標識化の有効性をモニターし得る。

【0123】

本明細書に記載の方法のある特定の実施形態では、標識された試料のタンパク質は一連の蛍光分子量標準と並行して有用に分離することができる。有用には、標準は、タンパク質を標識するために使用される少なくとも1つのフルオロフォアとスペクトル的に一致する。そのようなスペクトルマッチングは、例えば、タンパク質試料を標識するのに使用されるのと同じ二ヒ素フルオロフォアと並行して標識されるテトラシステインタグ化タンパク質標準を使用することによって、または試料タンパク質を標識するために使用される二ヒ素フルオロフォアもしくは他のフルオロフォアとスペクトル的に一致する蛍光部分を有する標準を使用することによって達成できる。本発明の実施に有用な標準の例には、BENCHMARK (商標) ファミリーのタンパク質標準 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) および MARK L2 (商標) Unstained Standard (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) が含まれる。

10

【0124】

本明細書に記載の方法および組成物はまた、試料中に存在する蛍光標識されたタンパク質の量を定量化するためにも使用され得る。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、二ヒ素フルオロフォアからの蛍光の量を定量化することをさらに含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、アミン反応性蛍光色素からの蛍光の量を定量化することをさらに含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、アミン反応性蛍光色素の蛍光部分からの蛍光の量を定量化することをさらに含む。タンパク質試料中に存在するタンパク質を分離せずに、またはPAGE、2D-PAGE、もしくはIEFなどの電気泳動またはクロマトグラフィーまたははそれらの組み合わせによって、タンパク質を部分的または完全に分離した後に、定量化を実施することができる。

20

【0125】

e. スペーサー分子の生体分子へのコンジュゲーション

いくつかの実施形態において、スペーサー分子は、本明細書の実施例に記載されている NHS-エステル化学を用いて生体分子にコンジュゲートされ、他の化学、例えばマレイミド、ピリジルジスルフィド、およびヒドラジド、ならびにアジド/アルキンを含む SITECLICK (商標) 技術もまた、このコンジュゲーション戦略のために使用され得る。

30

【0126】

いくつかの実施形態において、スペーサー分子は、抗体などのタンパク質上に存在する最初のリジン側鎖で生体分子 (例えば、抗体) にコンジュゲートされている。

【0127】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法を用いて標識されたタンパク質、タンパク質断片、または他の生体分子の濃度は、約 0.01 mg/mL ~ 約 200 mg/mL の範囲内 (例えば、約 0.1 mg/mL ~ 約 100 mg/mL、約 0.1 mg/mL ~ 約 50 mg/mL、約 0.1 mg/mL ~ 約 10 mg/mL、約 0.2 mg/mL ~ 約 100 mg/mL、約 0.2 mg/mL ~ 約 50 mg/mL、約 0.2 mg/mL ~ 約 10 mg/mL、約 0.3 mg/mL ~ 約 10 mg/mL、約 0.4 mg/mL ~ 約 10 mg/mL、約 0.5 mg/mL ~ 約 10 mg/mL など) である。

40

【0128】

いくつかの実施形態において、抗体への蛍光標識の、色素とタンパク質の比は 1 ~ 50 である。いくつかの実施形態において、抗体への蛍光標識の、色素とタンパク質の比は 5 ~ 30 である。いくつかの実施形態において、抗体への蛍光標識の、色素とタンパク質の比は 1 ~ 20 である。

【0129】

50

いくつかの実施形態において、スパーサーのタンパク質に対する比は1～50である。
 いくつかの実施形態において、スパーサー剤のタンパク質に対する比は5～30である。
 いくつかの実施形態において、スパーサー剤のタンパク質に対する比は1～20である。

【0130】

いくつかの実施形態において、スパーサー剤が、0.1～25倍、1～15倍、または2.5～10倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰で付加される。いくつかの実施形態において、スパーサー剤は、2.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である。いくつかの実施形態において、スパーサー剤は、5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である。いくつかの実施形態において、スパーサー剤は、7.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である。いくつかの実施形態において、スパーサー剤は、10倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である。

10

【0131】

いくつかの実施形態において、スパーサー剤は核酸分子にコンジュゲートされている。部分(例えば、蛍光標識)を核酸にコンジュゲートするためのプロトコールは当該技術分野において記載されている(例えば、Rombouts et al., Bioconjugate Chem., 27:280-207(2016)を参照)。核酸分子を標識化するための1つの方法は、ARES(商標)ALEXA FLUOR(登録商標)488 DNA Labeling Kit(Thermo Fisher、カタログ番号A21665)の使用によるものである。アミン修飾ヌクレオチドもまた、核酸分子の標識化を可能にするために使用され得る。例えば、5-アミノヘキシルアクリルアミド-dUTP(aha-dUTP)および5-アミノヘキシルアクリルアミド-dCTP(aha-dCTP)を用いて、逆転写、ニックトランスレーション、ランダムプライムラベリング、またはPCRなどの従来の酵素組み込み方法によってアミン修飾DNAを産生することができる。次いでアミン修飾DNAを任意のアミン反応性色素またはハプテンで標識することができる。この二段階技術は、他の方法では得ることが困難である、均一で高度のDNA標識化を一貫して作り出す。

20

【0132】

空間的に分離された蛍光標識を用いて高いDOLを達成するための1つの方法が図18に示される。図18は、蛍光標識された分岐鎖PEG分子の調製および得られたPEG分子(直接スパーサー)の抗体への結合を示し、ここでPEG分子はCLICK-IT(商標)反応によって抗体に共有結合している(実施例7参照)。

30

【0133】

図18に示すPEG分子は、それぞれ7つの蛍光標識に共有結合している。さらに、蛍光標識は、標識が標識された分子に対して特定の「ブラシ」長を有するように、個々のPEG分子に結合させることができる。「ブラシ長」は、蛍光標識を標識された分子に結合させる化学基の延長された長さを指す。一例として、PEG分子中の平均モノマー長が約3.5オングストロームであると仮定すると、図18においてn=1のとき、蛍光標識のブラシ長は約5～約10オングストロームの範囲であろう。多くの場合、図18のnは1にはならない。さらに、PEG分子は典型的にはサイズが異なり、平均分子量に基づいて記載されている。したがって、説明の目的で図18に示すPEG分子を使用すると、10,000の平均重量を有するPEG分子の集団は、約30のnを有するであろう。また、40,000の平均重量を有するPEG分子の集団は、約120のnを有するであろう。この分子を標識された分子に連結する分岐鎖PEG分子のアームおよび他のアームの両方が全て反復領域を有するという事実を考慮すると、ブラシ長は、約15オングストローム～約800オングストロームの範囲(例えば、約25～約800、約150～約800、約450～約800、約600～約800、約65～約800、約25～約700、約40～約700、約28～約600、約28～約500、約70～約700など)であり得る。したがって、本発明は、少なくとも1つの蛍光標識に共有結合している分子を産生および使用するための組成物および方法を含み、蛍光標識は約22オングストローム～約800オングストロームのブラシ長を有する。

40

50

【 0 1 3 4 】

代替として、本発明の組成物は、分子とそれらが結合している蛍光標識との間の共有結合の数によって記載され得る。説明の目的で図 1 8 に示した分岐鎖 P E G 分子を再び使用すると、介在する共有結合の数は、蛍光標識が分岐鎖 P E G 分子に結合している場所に応じて、約 2 4 ~ 約 3 2 となる。本発明は、少なくとも 1 つの蛍光標識に共有結合している分子を産生および使用するための組成物および方法を含み、ここで蛍光標識は約 1 6 ~ 約 8 0 0 (例えば、約 1 6 ~ 約 7 0 0、約 3 2 ~ 約 8 0 0、約 6 0 ~ 約 8 0 0、約 1 0 0 ~ 約 8 0 0、約 1 5 0 ~ 約 8 0 0、約 2 0 0 ~ 約 8 0 0、約 2 5 0 ~ 約 8 0 0、約 2 5 0 ~ 約 7 0 0、約 2 5 0 ~ 約 6 5 0、約 2 5 0 ~ 約 6 0 0、約 3 5 0 ~ 約 8 0 0 など) の介在する共有結合で分子に結合する。

10

【 0 1 3 5 】

本発明はまた、部分的には、個々の標識された分子上の同一の位置に結合した複数の蛍光標識の間隔を空けることに関する。標識された分子からの蛍光標識の分離に関して上述したものと同様に、個々の標識された分子上の同一の位置に結合した複数の蛍光標識は、約 1 5 オングストローム ~ 約 8 0 0 オングストローム (上述の範囲を含む) の距離で、および / または約 1 6 ~ 約 8 0 0 (上述の範囲を含む) の介在する共有結合で、互いに分離することができる。

【 0 1 3 6 】

本明細書で述べたように、本発明の態様は蛍光標識の間隔に関する。表 9 は、一連の分岐鎖 P E G 分子の推定された特性を示す。これらの P E G 分子、ならびに他の分子は、異なる時点で複数のフォーマットで存在することを理解されたい。例えば、分岐鎖 P E G 分子のアームは、完全に伸長 (ブラシ) または完全にコイル状 (マッシュルーム) であり得、さらにその間の実質的に全ての立体配座もあり得る。さらに、各アームは、ある時点での他のアームとは独立して異なる伸長状態またはコイル状態にあり得る。従って、表 9 において、用語「ブラシ」は完全に伸長した P E G アームを指し、そして用語「マッシュルーム」は完全にコイル状の P E G アームを指す。マッシュルーム状態は、最小数を得るために 8 0 オングストロームの非常に大きい F l o r y 半径 (隣接する P E G アーム間の距離) をモデルにする。

20

【 0 1 3 7 】

表 9 の F - F 距離は、全てのフルオロフォアが互いに等距離にあると仮定した、異なるアームの末端上の 2 つのフルオロフォア間の距離である。最大距離はアームの長さの 2 倍である。さらに、最近傍の値は、4 本のアームに対しては四面体配置、8 本のアームに対しては球形 / 立方体を仮定する。当然のことながら、ある時点での F - F 距離の実際の値は、典型的にはブラシ距離とマッシュルーム距離の間のどこかとなるであろう。

30

【 0 1 3 8 】

(表 9) 分岐鎖 P E G のアームの長さ (推定フルオロフォア ~ フルオロフォア (F - F) 距離)

40

50

MW	アーム	アーム MW	EG/ アーム*	アームの 長さ (Å) (BAL)**	アームの 長さ (Å) (MAL)**	最大 F-F 距離 (Å) BAL (3)	F-F 最近傍距離 (Å) ブラシ (3)	最大 F-F 距離 (Å) MAL (4)	F-F 最近傍距離 (Å) MAL (4)
10000	4	2500	60	208	26	417	340	52	42
10000	8	1250	30	104	13	208	120	26	15
20000	8	2500	60	208	26	417	241	52	30
40000	8	5000	119	417	52	833	481	104	60

* EG/アーム=アーム MW/EG MW~アーム MW/42 (MW=分子量)

** ブラシアームの長さ (BAL)=EG/アーム*モノマー長~EG/アーム*3.5

*** マッシュルームアームの長さ (MAL)、以下の式で決定される (L=...)

(3) 完全に伸長した、互いに等距離のアームの末端 (Dist = 距離)

(4) 完全にコイル状に巻かれた、互いに等距離のアームの末端

これらの計算は、以下の生成物: 4ARM-NH₂HCl および 8ARM-NH₂HCl の JenKem に基づく

$$L = \frac{Na^{5/3}}{D^{2/3}} \quad \begin{array}{l} a = 0.35 \text{ nm (3.5Å)} \\ N = 30, 60, 120 \\ D = 80\text{Å} \end{array}$$

10

【0139】

デキストランは、蛍光標識を分子に結合するための別の適切な物質である。デキストランは、それらの中程度から高分子量、良好な水溶性、および低い毒性を特徴とする親水性多糖類である。デキストランは、それらの卓越したポリ-(D-1,6-グルコース)結合のために生物学的に不活性である傾向がある。これらの結合はそれらを大部分の内在性細胞グリコシダーゼによる切断に対して耐性にする。それらはまた、通常は低い免疫原性を有し、一般に分岐鎖分子である。

20

【0140】

デキストランは、3000ダルトン~2,000,000ダルトンの間で変動する公称分子量(MW)で市販されている。本発明の実施における使用に適したデキストランは、3000、10,000、40,000、70,000、500,000、および2,000,000ダルトン(例えば、約4,000~約150,000、約6,000~約150,000、約8,000~約150,000、約15,000~約150,000、約10,000~約80,000、約12,000~約70,000など)を含む任意の数の異なる分子量のものであり得る。

30

【0141】

デキストランは、通常、10,000 MWの範囲のデキストランについて、デキストラン分子あたり0.2~2の色素分子の置換度(例えば、DOL)を有する。さらに、デキストランは典型的には3000 MW範囲のデキストランあたり0.2~0.7の色素、10,000 MW範囲のデキストランあたり0.4~2の色素、40,000 MW範囲で1~4の色素、および70,000 MW範囲で2~6の色素を含む。したがって、本発明の実施において使用されるデキストラン、ならびに他の標識されたポリマーは、1,000 MWあたり約0.03~0.3(例えば、1,000 MWあたり、約0.03~約0.25、約0.08~約0.3、約0.09~約0.3、約0.1~約0.3、約0.05~約0.2、約0.07~約0.25など)の蛍光標識の範囲のDOLを有し得る。

40

【0142】

デキストラン、ならびに他のポリマーは、いくつかの方法で標され得る。例えば、蛍光標識されたデキストランは、水溶性アミノデキストランとスクシンイミジルエステル基を有する蛍光標識との反応によって調製され得る。蛍光標識されたデキストランは、天然デキストランとFITCのような蛍光標識のイソチオシアネート誘導体との反応によってもまた調製され得る。適切な場合には、一旦蛍光標識が付加されると、デキストラン上の未

50

反応アミンをキャップして中性または荷電デキストラン（すなわち、負または正に荷電）を得ることができる。さらに、キャッピングが実施されない場合でも、デキストランをアニオン性またはカチオン性にすることができる荷電蛍光標識を使用することができる。

【0143】

本発明の実施において有用であり得る別の種類の多糖類はアミロースである。アミロースは、 α -1,4-グリコシド結合によって連結された α -D-グルコース単位からなる直鎖多糖類である。水素結合のために、アミロースは1ターンあたり6個のグルコース単位を含まない構造を形成する傾向がある。この種類の分子は、意識的に設計された方法で配置された蛍光標識を使用することができる構造規則性を提供する。したがって、本発明は、蛍光標識間の距離を均一に保つために使用することができるかなり静的な構造的特徴を有する組成物、ならびにそのような組成物を製造および使用方法を含む。多くの場合、2つの蛍光標識をもたらすような様式および条件下でそのような分子と結合した2つの蛍光標識間の距離は、互いから30%を超えて（例えば約5%~約30%、約10%~約30%、約15%~約30%、約20%~約30%、約10%~約20%など）距離が変化しない。

10

【0144】

ポリペプチドもまた本発明の実施において使用され得る。そのような分子の一例は図21に示される分岐鎖ポリリジン分子である。この分子は、米国特許出願公開第2010/0278750号に記載されている方法に従って作製することができる。蛍光標識を結合させることができる位置を表すいくつかの「R基」を図21に示す。そのような分子では、R基は同一でも異なって（例えば、 R_1 および R_2 ）いてもよい。さらに、いくつかのR基が同一である場合、これらの基は、R基が完全に標識されていない蛍光標識された結合点として作用し得る。

20

【0145】

例として、図21は、33個のR基、すなわち32個の R_1 基および1個の R_2 基を有するポリマーを示す。全てのR基が同一の種類であると仮定する。これらのR基は半ランダム方式で部分的に蛍光標識されてもよい。これは、ある割合のR基のみが蛍光標識を受けるように条件が提供され得ることを意味する。さらに、ポリマー中のそれらの位置のために、いくつかのR基が蛍光標識をより多く受ける傾向があるので、標識化は半ランダムである。したがって、本発明は、所望の蛍光効果のために、ポジショニングとDOLが調整されている蛍光標識されたポリマーの設計を含む。いくつかの場合において、標識を受容するポリマーあたりに基づいて利用可能な結合部位の平均数は、10%~90%の範囲内（例えば、約10%~約85%、約15%~約85%、約20%~約85%、約20%~約75%、約30%~約75%、約30%~約80%、約40%~約80%など）である。

30

【0146】

上述のように、図21は、 R_1 および R_2 基を有するポリマーを示す。ポリマーの生体分子（例えば、抗体）への「指向性」結合が望まれる場合、 R_2 基は R_1 基と異なってもよい。R基が同一である場合、ポリマー上の適切な位置にある任意のR基が生体分子へのコンジュゲーション点として作用することができるという意味で、結合しているのは「無指向性」であろう。当然ながら、生体分子に対する高レベルの生物活性（例えば、抗原結合）を維持しながら、高レベルの蛍光を達成するように条件を調整する。

40

【0147】

生体分子蛍光の最大化は、対象の生体分子上の蛍光標識の数と部分的に無関係であり得る。例えば、第1の組の条件下で標識したときには特定の抗体上に7つの蛍光標識があり、第2の組の条件下で標識したときには同一の抗体上に10の蛍光標識があると仮定する。さらに、第1の組の条件下で標識された抗体の全蛍光量が、第2の組の条件下で標識された抗体の全蛍光量よりも大きいと仮定する。この場合、より少ない蛍光標識はより多くの蛍光をもたらした。したがって、他の要素（例えば、生体分子の機能的活性）が等しい場合、第1の条件セットは第2の条件セットよりも好ましいであろう。

50

【0148】

蛍光標識を生体分子に結合させるために任意の数の連結基を使用することができる。これらの結合は、非共有結合または共有結合であり得る。さらに、非共有結合または共有結合は、(1) 蛍光標識のポリマーへの結合、(2) コア(存在するとき)へのポリマーの結合、および/または(3) ポリマーまたはコア(存在するとき)の生体分子への結合の1つまたは全てを指すことができる。

【0149】

多くの場合、ポリマー(コアを有するかまたは有さない)、ならびに本明細書に記載の他の種類のスパーサーは、生体分子に結合した蛍光標識の蛍光強度を増大させる機能を果たし得る。

【0150】

本発明の実施において有用である分子の1つのカテゴリーはスターポリマーと呼ばれる(Ren et al., Star Polymers, Chemical Reviews, 116:6743-6836(2016)を参照)。スターポリマーは、コアと一連の直鎖状ポリマー(「アーム」と呼ばれる)を含むマルチアーム分子である。これらのアームは通常、他の分子の結合を促進するために末端官能基を含む。スターポリマーは、ホモ-アーム(1種のみ組成のアームを含む)またはミクト-アーム(1種を超える組成、分子量、または末端官能基のアームを含む)として分類することができる。スターポリマーの合成は、典型的には、コアファースト、アームファースト、または接ぎ木のアプローチのいずれかを用いて行われる。

【0151】

コアは、アームの分岐点として効果的に機能する。任意の数の分子が本発明の組成物のためのコアとして機能し得る。適切なコアの例には、オリゴグリセロール(例えばヘキサグリセロール)、オリゴエリスリトール(例えばペンタエリスリトール、ジペンタエリスリトール、トリペンタエリスリトール)、ソルビトール、トリメチロールプロパン、シラン(例えば1,2-ビス(メチルシリル)エタン)、アダマンタン、PAMAM(第1-、第2-、および第3世代(G-1-3)ポリ(アミドアミン)デンドリマー、ポリエチレンイミン(PEI)分岐鎖ポリマー、ペプチド(例えば、ポリリジン、ポリアスパラギン酸など)が含まれる。

【0152】

コアは、重合の開始またはアーム上への結合のための官能基を既に有していてもよく、または図20に示すように、アームの結合を促進するために化学修飾を必要としてもよい。

【0153】

例としてヘキサグリセロールを使用すると、この化合物は市販されており、スター型PEGポリマーのコアファースト合成に使用することができる。ヘキサグリセロールコアを有するスターPEGは、薬物の制御放出および創傷密閉のために使用され得る。ヘキサグリセロールコアを有するスターPEGは、ヘキサグリセロールコアからのエチレンオキシドの制御された重合によって産生することができる。この場合、コアはヘキサグリセロールであり、アームはポリエチレングリコールである。

【0154】

アームは任意の数の直鎖状ポリマーからなり得、典型的には蛍光標識のための結合点として、およびこれらの標識を互いに間隔を開けさせるために、ならびに標識を、同一の標識された分子(例えば、生体分子)に結合した他の蛍光標識から間隔を開けさせるために機能するであろう。適切なアームの例には、ポリエチレングリコール、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリグリセロール、およびポリビニルアルコール、双性イオンポリマー(例えば、ポリスフロベタイン)、ならびに水溶性ポリマーが含まれる。多くの場合、本発明での使用に適したポリマーは荷電していないであろう。

【0155】

存在すると、蛍光標識の結合に特に有用である抗体の一領域は、Fc(断片結晶化可能)領域である。Fc領域は、抗原結合部位に対して抗体の遠端にある。抗体のこの領域は

10

20

30

40

50

、Fc受容体と呼ばれる細胞表面受容体および補体系のタンパク質と相互作用する。典型的には、Fc領域またはその近傍における化学物質の結合は、抗体による抗原結合にほとんど影響を与えない。しかしながら、抗原結合事象との干渉は、抗体に結合した化学物質のサイズに伴い増大する傾向がある。さらに、大きな結合した化学物質は、立体障害のために、生体分子に結合する能力に関して互いに干渉する傾向がある。従って、高レベルの蛍光と高レベルの機能的活性（例えば、抗原結合能）の両方を有する生体分子（例えば抗体）を生産するために一連の要素をバランスさせる必要がある場合がある。これらの要素のいくつかは以下の通りである。（１）生体分子のサイズ、（２）蛍光標識化のための生体分子上の結合点の位置、および（３）生体分子に結合した蛍光標識された分子のサイズおよび三次元構造。

10

抗体に関して、本発明は以下の特徴のうちの１つ以上を含む抗体を含む。

- 抗体分子上の平均２～１０個の異なる位置で結合（例えば、共有結合）した蛍光標識ポリマー。

- 各抗体分子に結合した平均３～８０個の蛍光標識。

- 蛍光標識された抗体分子の抗原結合親和性（ K_D ）は、標識されていない形態の抗体と比較して、２桁以下（例えば、約０．５～約２．０、約１．０～約２．０、約０．５～約１．５、約０．７５～約１．５など）減少する。

- 抗体分子に結合した蛍光標識あたりに基づいて、平均蛍光発光量は、遊離の蛍光標識の少なくとも６０％（例えば、約６０％～約９８％、約７０％～約９８％、約８０％～約９８％、約８５％～約９８％、約８０％～約９３％など）である。

20

【 0 1 5 6 】

f. 生体分子 / 蛍光標識 / スペーサーの組み合わせ

本発明は、部分的には、３つの成分：生体分子、蛍光標識、およびスペーサーの組み合わせに基づく。タンパク質（例えば、抗体）に関して、特にタンパク質が変性していないとき、蛍光標識およびスペーサーのための結合部位として使用され得る基は、常に結合のためにアクセス可能であるとは限らない。さらに、多くの場合、タンパク質を未変性形態に維持することが望ましいであろう。

【 0 1 5 7 】

蛍光発光の増強は、生体分子（例えば、抗体）を標識するために使用される蛍光標識およびスペーサーの様々な比に関係することが見出されている。さらに、各生体分子は、特定の増強された蛍光レベルを生じるためにコンジュゲーションプロセスにおいて異なる比の成分を必要とする可能性を有する。これは、抗体などの生体分子の異なる構造（例えば、一次、二次、三次および四次構造）、ならびに特定の蛍光標識および特定のスペーサーの特性に起因し得る。

30

【 0 1 5 8 】

いくつかの例では、比は成分のそれぞれの重量に基づき得る。他の例では、比はモル比に基づき得る。本出願のいくつかの図および例は、モル比に関する。場合によっては（例えば、生体分子が大きく、多数のコンジュゲーション部位を有する場合）、成分重量の使用がより適切であり得る。

【 0 1 5 9 】

抗体、および他の生体分子について、コンジュゲーションプロセスにおいて使用される以下の生体分子対蛍光標識対スペーサーの比は大きく変動し得るが、ほとんどの場合、生体分子の量は蛍光標識およびスペーサーの両方の量よりも少ないであろう。

40

【 0 1 6 0 】

さらに、生体分子上のコンジュゲーション部位の密度および / または間隔は、蛍光標識のスペーサーに対する最適な比率をしばしば決定する１つの要素である。これは、増強された蛍光が低減した消光によるものであると仮定すると、コンジュゲーション部位の全体または局所の密度が低いほど、消光量が少なくなると予想されるためである。いずれにしても、使用することができる生体分子対蛍光標識対スペーサーの比は、以下のように示される： $B_1 : FL_{2-30} : S_{2-20}$ 、 B は生体分子であり、 FL は蛍光標識であり、 S

50

はスペーサーである。本発明の実施において使用され得る比の具体的な範囲は、1 : 2 ~ 25 : 2 ~ 20 (例えば、約1 : 2 : 2 ~ 約1 : 25 : 20、約1 : 5 : 2 ~ 約1 : 25 : 5、約1 : 10 : 2 ~ 約1 : 25 : 5、約1 : 5 : 2 ~ 約1 : 15 : 10、約1 : 10 : 5 ~ 約1 : 25 : 20、約1 : 10 : 5 ~ 約1 : 15 : 20、約1 : 10 : 5 ~ 約1 : 20 : 20など)に入る比を含み、ここで最初の数字は生体分子の量(例えば、モル)であり、2番目の数字は蛍光標識の量、3番目の数字はスペーサーの量である。

【0161】

いくつかの場合では、コンジュゲーションに使用される蛍光標識およびスペーサーの濃度は、生体分子上の利用可能な結合部位が効果的に飽和するようになる(例えば、利用可能な結合部位の少なくとも95%が蛍光標識またはスペーサーのいずれかに結合する)。そのような場合、蛍光標識とスペーサーの比は、蛍光増強のレベルにおける決定要素となり得る。多くの場合、蛍光標識のスペーサーに対する比は、10 : 1 ~ 10 : 50 (例えば、約10 : 1 ~ 約10 : 25、約10 : 1 ~ 約10 : 10、約10 : 1 ~ 約10 : 5、約10 : 5 ~ 約10 : 50、約10 : 5 ~ 約10 : 20、約10 : 3 ~ 約10 : 30、約10 : 5 ~ 約10 : 30、約10 : 10 ~ 約10 : 25など)であろう。

10

【0162】

スペーサーおよび色素は、同時にまたは逐次的に、最初にスペーサーまたは色素のいずれかを生体分子にコンジュゲートさせて、生体分子にコンジュゲートさせることができる。多くの場合、スペーサーおよび色素が同一の場所で生体分子結合すると、それらは同時に生体分子にコンジュゲートする。しかしながら、結合部位が生体分子であり、飽和していない条件下で(例えば、スペーサーによる)第1のコンジュゲーション反応が実施される場合、したがって、結合部位を(例えば色素による)第2のコンジュゲーション反応のために利用可能とする場合に、逐次的なコンジュゲーションを使用することができる。

20

【0163】

g. 緩衝剤

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、緩衝液中に1つ以上のスペーサー、1つ以上の蛍光標識を含む。本明細書に開示されている蛍光分子およびスペーサー分子のいずれも、当該技術分野において既知の任意の緩衝剤と一緒に使用することができる。

【0164】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組成物は、分子生物学的用途のために適切な任意の緩衝剤を含む。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は適切な保存緩衝剤(例えば、ホウ酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、または炭酸塩緩衝剤)である。

【0166】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、検出アッセイにおける使用中に、本明細書に開示されるように検出可能な生体分子を緩衝するのに適している。

【0167】

方法

本発明は、基礎研究、ハイスループットスクリーニング、免疫組織化学、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)、マイクロアレイ技術、診断学、および医学療法において有用な用途を有する。本発明は、微生物学、免疫学、血液学および輸血、組織病理学、法医学的病理学、および獣医学的病理学の分野における診断用途のための様々なアッセイ形式で使用することができる。

40

【0168】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、蛍光標識された分子が検出される任意の分子生物学的用途に使用することができる。例えば、本明細書に開示されるように、検出可能な生体分子は、ウエスタンブロッティング、ELISA、フローサイトメトリー、フローサイトメトリー、およびFRETを含む用途において使用され得る。本明細書中に開示されるような検出可能な生体分子はまた、蛍光免疫組織化学(IHC)、蛍光

50

免疫細胞化学（ＩＣＣ）、およびインビボイメージング用途において使用され得る。

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態において、生体試料中の所望の標的の存在を決定するための方法が包含され、該方法は、a) 生体試料を1つ以上の蛍光標識および1つ以上のスパーサー分子を含む組成物と接触させることであって、スパーサーおよび蛍光標識は生体分子にはコンジュゲートしているが互いにはコンジュゲートしていない、接触させることと、b) 複数の蛍光標識によって発光される蛍光を検出することと、c) 複数の蛍光標識によって発光された蛍光が検出されるときに、生体試料中の所望の標的の存在を決定することと、を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は細胞溶解物を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は無傷の細胞を含む。いくつかの実施形態では、生物学的試料は組織試料を含む。さらにそのような組織試料は固定されてもよい。さらに、本発明の組成物は免疫組織化学などの用途に使用することができる。いくつかの実施形態では、生体試料は単離されたタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は組換えタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は固体支持体上に固定化されている。いくつかの実施形態では、生体試料は流体中の無傷の細胞を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は生きている動物である。いくつかの実施形態では、生きている動物は哺乳動物である。いくつかの例において、試料は肝臓、肺、筋肉、および皮膚などの組織を含む。

10

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態では、生体内の標的抗原を画像化するための方法が本明細書に開示され、該方法は、a) 本明細書に開示されているように、標的抗原に結合する複数の蛍光標識およびスパーサー剤に結合した抗体を提供することと、b) 抗体を生体内に導入して接触体を形成することと、c) 接触体を適切な波長で照射して照明体を形成することと、d) 標的抗原が撮像された照明体を観察することと、を含む。いくつかの実施形態では、生体内の標的または抗原に特異的なこれらの抗体、または他の標的タンパク質またはペプチドは、インビボイメージングに適合する励起波長、典型的には約580nm～約800nmを有する蛍光色素とコンジュゲートしている。標的的特異的色素コンジュゲートは、それらの優先的隔離が病的または傷害組織部位などの標的の病理学的または非病理的組織部位で起こるまで、循環血中を比較的自由に移動する。

20

【 0 1 7 1 】

h. キット

本発明の組成物は、様々なアッセイの実施を容易にするキットに組み込むことができる。キットは、乾燥形態の組成物または溶液中の組成物と共に包装されてもよい。キットは、アッセイを実施するための、典型的には水溶液として存在する1つ以上の緩衝剤、試料調製試薬、追加の検出試薬、有機溶媒、他の蛍光検出プローブ、標準物質、マイクロスフェア、特定の細胞株、抗体および/または取扱説明書をさらに含み得る。追加の任意の剤は、化合物と共に他の細胞機能を試験するための成分を含む。

30

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に開示されるように、生体分子、スパーサー剤、および蛍光標識を含む。いくつかの実施形態において、キットは緩衝剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、生体分子はすでにスパーサー剤および蛍光標識にコンジュゲートされている。いくつかの実施形態において、キットは、バイオコンジュゲーションキットとして、蛍光標識および反応基にコンジュゲートしたポリマーを含み得る。

40

【 0 1 7 3 】

本発明のキットは、蛍光標識された生体分子（例えば、抗体）を調製するために使用される試薬をさらに含み得る。例示的な試薬は、以下の1つ以上を含む：蛍光色素、キットに提供される説明書に従って予め標識されているかまたは標識されているかのいずれかのスパーサー、ならびに(1) スパーサーを生体分子にコンジュゲートするためおよび/または(2) 蛍光標識を生体分子にコンジュゲートするために使用され得る化合物。

【 0 1 7 4 】

本明細書および例示的な実施形態は、限定的なものとして捉えられるべきではない。本

50

明細書および添付の特許請求の範囲の目的において、別途示されない限り、数量、割合、または比率を表す全ての数、ならびに明細書および特許請求の範囲に使用される他の数値は、全ての場合において、それらが修正されすぎない程度まで「約」という用語によって修正されているものとして理解されるべきである。したがって、反対が示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、得ようとする所望の特性によって変化し得る近似値である。最低でも、特許請求の範囲に対する均等の原則の適用を限定することを企図しないように、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の桁数に照らしてかつ通常の四捨五入の技術を適用することによって解釈されるべきである。

【実施例】

10

【0175】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を説明するために提供されており、決して本開示の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0176】

実施例1：蛍光ウエスタンブロットティング法

a) NHS 活性化蛍光色素およびスルホNHS - アセテート / NHS - アセテートおよび NHS - MS (PEG)₄、NHS - MS (PEG)₈ および NHS - MS (PEG)₁₂ を用いた抗体標識化。

D Y L I G H T (商 標) 6 5 0 - 4 x P E G などの NHS 活性化蛍光色素をジメチルホルムアミド (DMF) 中に 1 0 m g / m l で再構成した。NHS - アセテートをジメチルホルムアミド (DMF) 中に 1 m g / m l で新たに調製した。NHS - MS (PEG)₄ (カタログ番号 2 2 3 4 1 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c))、NHS - MS (PEG)₈ (カタログ番号 2 2 5 0 9 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c))、NHS - MS (PEG)₁₂ (カタログ番号 2 2 6 8 6 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)) を DMF 中に 1 0 0 m g / m l で再構成した。使用直前に、PEG 試薬を DMF 中で 1 m g / m l にさらに希釈した。ホウ酸緩衝液 5 0 m M (カタログ番号 2 8 3 8 4 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c))、p H 8 . 5 中 7 ~ 1 0 m g / m l の 1 m g のヤギ抗マウス (G A M) およびヤギ抗ウサギ (G A R) 抗体を、様々なモル過剰での、蛍光色素または各蛍光色素の混合物と、NHS - アセテート、NHS - MS (PEG)₄、NHS - MS (PEG)₈、または NHS - MS (PEG)₁₂ から選択されるスペーサーと共に、標識した。標識化反応は、室温 (R T) で約 1 時間インキュベートした。NHS 活性化色素および NHS 活性化スペーサー剤は、両方の反応が同時に起こるように抗体に添加する前に組み合わせ、色素置換およびスペーサーのランダムな間隔を可能にした。p H 4 . 7 の 1 0 0 m M M E S 緩衝液を各試料に添加して、p H を 8 . 5 から約 7 . 2 に下げた。この時点で、コンジュゲートの濃度を、保存緩衝液中の最終希釈物を収容するために約 6 m g / m l に調整した。D y e R e m o v a l R e s i n (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 、カタログ番号 2 2 8 5 8) および 5 μ m の H a r v a r d カラム (H a r v a r d A p p a r a t u s 、カタログ番号 7 4 - 3 8 2 0) を用いて遊離の色素を除去した。タンパク質 1 m g あたり 0 . 2 m l の 5 0 % 精製樹脂スラリーを使用した。コンジュゲートを 0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液、p H 7 . 2 (P B S) で 1 : 5 0 に希釈し、U V C a r y 分光光度計を使用してスキャンした。OD スキャン (2 5 2 n m ~ 9 0 0 n m) を用いてコンジュゲートの濃度を決定し、色素モル / タンパク質モルの比 (D / P) を計算した。最後に、長期保存のためにコンジュゲートを S T A B I L Z Y M E (登録商標) N O B L E S t o r a g e B u f f e r (S u r m o d i c s 、カタログ番号 S Z 0 4) で 1 m g / m l に希釈した。

20

30

40

【0177】

段階希釈した細胞溶解物 (5 0 0 n g ~ 2 n g) を S D S - P A G E 試料バッファーと混合した。試料を 9 5 ° で 5 分間加熱し、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c T r i s G l y c i n e S D S - P A G E ゲル (N o v e x G e l s 、 4 ~ 2

50

0%、10ウェル、カタログ番号WT4202BX10)にロードした。製造者の指示に従ってゲルを電気泳動し、次いでセミドライ転写法を用いてニトロセルロース膜に転写した。膜をSEA BLOCKブロッキング緩衝液(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号0037527)で30分間ブロッキングした。一次抗体を、Sea Block Blocking Buffer中で最終濃度0.1~2.5 µg/mlに調製した。プロットをSea Block Blocking Bufferで調製した抗体と共に室温(RT)で振盪しながら1時間インキュベートした。抗体溶液をデカントし、膜を10mM Tris、150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.2(TBST)中で10分間2回洗浄した。蛍光標識された二次抗体コンジュゲートをSEA BLOCK Blocking Bufferで20~1000 ng/mLの終濃度に希釈した。洗浄した膜を適切な二次抗体コンジュゲートと共に攪拌しながら30~60分間インキュベートした。緩衝液をデカントし、膜をTBSTで5分間6回洗浄した。適合性蛍光イメージャーを用いて膜を画像化した。

10

【0178】

ウエスタンブロッティングアッセイにおいて、5x~20xモル過剰でDYLIGHT(商標)488にコンジュゲートしたGAM二次抗体に対するNHSアセテート(2.5x、5xおよび10x)ならびにMS(PEG)₄(3.75x)スペーサーの付加の効果を試験する実験についての結果を図8に示す。A431細胞溶解物を1 µg/ウェルから3倍に希釈した。使用した一次抗体ウサギは、1 mg/mlから1/5000に希釈した抗Hsp90であった。全てのDYLIGHT(商標)二次抗体を、1 mg/mlストックから1/5000に希釈した。ウエスタンプロット用途において、NHSアセテートまたはMS(PEG)₄の付加とコンジュゲートしたDYLIGHT(商標)488-GARについて7.5x~20xまでの各色素モル過剰において、基本のコンジュゲート(スペーサーを含まず作製)を超える蛍光強度の顕著な増加がある。

20

【0179】

ウエスタンプロットアッセイにおける、DYLIGHT(商標)650-4xPEG(7.5x色素で)にコンジュゲートしたGAM二次抗体へのNHSアセテート(5X)またはMS(PEG)₄(5x)スペーサーの付加の効果を実証する結果を図9に示す。HeLa細胞溶解物を0.5 µg/ウェルから4倍に希釈した。一次抗体マウス抗PDIを1 mg/mlの1/5000に希釈した。全てのDYLIGHT(商標)二次抗体を、1 mg/mlストックの1/5000に希釈した。5xモル過剰でGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-7.5xコンジュゲートに付加されたNHSアセテートは、強度を1.5倍改善した。3.75xモル過剰でGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-7.5xコンジュゲートに付加されたNHSアセテートは、強度を1.4倍改善した。

30

【0180】

ウエスタンプロットアッセイにおける、GAR-DYLIGHT(商標)800-4xPEG二次抗体へのNHSアセテート(2.5x、5X)およびMS(PEG)₄スペーサーの付加の効果を実証する結果を図10および表10に示す。A431細胞溶解物を1:1で段階希釈した。一次抗体ウサギ抗Hsp90と抗シクロフィリンBを1/5000に希釈した。全てのDYLIGHT(商標)二次抗体を、1 mg/mlストックの1/20,000に希釈した。このウエスタンブロッティング用途で、MS(PEG)₄(3.75xと5x)およびNHSアセテート(2.5~5x)の付加は、異なるモル過剰の色素で、基本のDYLIGHT(商標)800-4xPEGコンジュゲートの蛍光強度と感度を20~100%顕著に増強した。

40

【0181】

(表10)ウエスタンプロットアッセイにおけるGAR-DYLIGHT(商標)800-4xPEGに対する±NHSアセテート(2.5X、5X)またはMS(PEG)₄(5X)の効果

50

改善倍率 (WB)	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 5X MS(PEG) ₄
GAR-DyLight ^(商標) 800- 4xPEG_5x	1.0	1.4	1.2	1.8
GAR-DyLight ^(商標) 800- 4xPEG_7.5x	1.0	1.5	1.2	1.7
GAR-DyLight ^(商標) 800- 4xPEG_10x	1.0	1.7	1.5	1.9
GAR-DyLight ^(商標) 800- 4xPEG_15x	1.0	1.9	1.5	2.0

10

NA = 付加なし

【0182】

ウエスタンブロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)550-2xPEGコンジュゲート(12.5xモル過剰の色素で)へのNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)およびMS(PEG)₄(5x)およびMS(PEG)₈(5x)スペーサーの付加の効果を実証する結果を図11に示す。HeLa細胞溶解物を0.5μg/ウェルから4倍に希釈し、1mg/mlの1/5000に希釈した抗PDI一次抗体で染色した。全てのDYLIGHT(商標)二次抗体を、1mg/mlストックの1/5000に希釈した。この実験は、ウエスタンブロットアッセイにおいて、MS(PEG)₄(5x)およびNHSアセテート(2.5xおよび5x)を付加すると、基本のDYLIGHT(商標)550-2xPEGコンジュゲートの蛍光強度と感度が少なくとも2倍、顕著に増強することを示した。長鎖MS(PEG)₈を用いて調製したコンジュゲートは、この実験において基本のコンジュゲートを超える顕著な改善を示さなかった。

20

【0183】

GAM-DYLIGHT(商標)680-4xPEG-GAR(10xモル過剰の色素で)へのNHSアセテート(2.5x、5x)およびMS(PEG)₄(5x)スペーサーの付加の効果を実証する結果を図12に示す。HeLa細胞溶解物を0.5μg/ウェルから4倍に希釈し、抗PDI一次抗体を1mg/mlの1/5000に希釈した。全てのDYLIGHT(商標)680-4xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/20,000に希釈した。この実験は、ウエスタンブロットアッセイにおいて、MS(PEG)₄(5x)およびNHSアセテート(2.5xおよび5x)を付加すると、基本のDYLIGHT(商標)680-4xPEGコンジュゲートの蛍光強度と感度が3~4倍、顕著に増強することを示す。

30

【0184】

実施例2：ドットブロットアッセイ

段階希釈(1:1)マウスまたはウサギIgGを選択されたストック濃度から作製した。20μLの12チャンネルマルチピペットを用いて、希釈液を最高から最低まで96ウェルプレートに入れた。11の段階希釈液のうち1または2μLをニトロセルロースメンブレン上に慎重にスポットした。膜を一晚乾燥させ、次いでTBS T中の2%BSAブロッキング緩衝液でブロックした。膜を室温で1時間攪拌しながらインキュベートした。ブロッキング溶液を容器からデカントした。二次抗体コンジュゲートをTBSまたはブロッキング緩衝液で希釈した。二次抗体コンジュゲート希釈物は、コンジュゲートされた標識に応じて変動した: 1:5,000(DYLIGHT(商標)488および550-2xPEGコンジュゲート); 1:10,000(DYLIGHT(商標)650-4xPEGコンジュゲート); ならびに1:20,000(DYLIGHT(商標)680-4xPEGおよびDYLIGHT(商標)800-4xPEGコンジュゲート)。膜を適切な二次抗体コンジュゲートと共に攪拌しながら30~60分間インキュベートした。膜をTBS T緩衝液で5分間5回洗浄した。膜を適切な画像装置、例えばChemidoc MP(488、550、650、680nm)およびLiCOR Odyssey CLx(

40

50

650、680、800nm)で画像化した。

【0185】

図3および表11に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)488(5x~20xモル過剰の色素)に対するNHSアセテート(2.5x、5xおよび10x)およびMS(PEG)4(3.75x)スパーサーの効果を示す。ドットプロット用途において、NHSアセテートおよびMS(PEG)4を付加して作製したDYLIGHT(商標)488-GAMコンジュゲートは、種々の色素の7.5倍~20倍のモル過剰で、(スパーサーなしで作製した)基本のコンジュゲートに対して1.2~1.8倍の範囲の蛍光強度の明らかな改善をもたらした。

【0186】

(表11)ドットプロットにおける5x~20xのモル過剰でのGAM-DYLIGHT(商標)488のコンジュゲーションにおけるNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)4(3.75x~10x)付加の効果

改善倍率	NA	+2.5X NHS アセテート	+5X NHS アセテート	+10X NHS アセテート	+3.75X MS(PEG) ₄	+5X MS(PEG) ₄	+10X MS(PEG) ₄
DYLIGHT(商標) 488_5x	1.0	1.5	1.1		0.3	1.0	0.6
DYLIGHT(商標) 488_7.5x	1.0	1.2	1.6		1.8	1.0	1.3
DYLIGHT(商標) 488_10x	1.0	1.6	1.3		1.3	1.3	0.8
DYLIGHT(商標) 488_15x	1.0	1.4	1.0	0.8	1.6	1.2	1.1
DYLIGHT(商標) 488_20x	1.0	1.0	0.7	0.6	1.5	1.3	1.0

NA = 付加なし

【0187】

図4および表12に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)488(7.5x~20xモル過剰の色素)に対するNHSアセテート(2.5xおよび5x)ならびにMS(PEG)4(3.75x)の付加の効果を実証する。この実験では、異なる二次抗体源を使用した。コンジュゲーション混合物にNHSアセテートおよびMS(PEG)4を付加すると、5x、15xおよび20xの色素モル過剰で、シグナル強度が、基本のコンジュゲーションと比較して1.2~2.6倍の範囲で顕著に改善された。

【0188】

(表12)ドットプロットアッセイにおける5x~20xのモル過剰でのGAM-DYLIGHT(商標)488のコンジュゲーションにおけるNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)4(3.75x)付加の効果

改善倍率	付加なし	+2.5X NHS アセテート	+5X NHS アセテート	+3.75X MS(PEG) ₄
DYLIGHT(商標) 488_7.5x	1.0	1.8	2.1	2.1
DYLIGHT(商標) 488_10x	1.0	1.2	1.0	1.2
DYLIGHT(商標) 488_15x	1.0	1.5	1.9	2.0
DYLIGHT(商標) 488_20x	1.0	2.0	2.6	1.3

【0189】

図5および表13に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)550-2xPEG-GAR(10x~20xモル過剰の色素)に対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)ならびにMS(PEG)4(3.

75x)の付加の効果を実証する。マウスIgGを1000ng/ドットから1:1で段階希釈した。全てのDYLIGHT(商標)550-2xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/5000に希釈した。コンジュゲーション混合物に付加されたNHSアセテートまたはMS(PEG)₄は、各々のそれぞれの色素のモル過剰での基本コンジュゲートと比較して、シグナル強度の改善をもたらした。改善は1.2~1.6倍の範囲であった。

【0190】

(表13)ドットプロットアッセイにおける10x~20xのモル過剰でのGAM-DYLIGHT(商標)550-2xPEG-GARのコンジュゲーションにおけるNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x)付加の効果

10

改善倍率	付加なし	+2.5X NHS アセテート	+5X NHS アセテート	+3.75X MS(PEG) ₄
GAR-DYLIGHT(商標)550-2xPEG_10x	1.0	1.23	1.35	1.32
GAR-DYLIGHT(商標)550-2xPEG_12.5x	1.0	0.77	0.98	0.93
GAR-DYLIGHT(商標)550-2xPEG_15x	1.0	1.12	1.1	1.52
GAR-DYLIGHT(商標)550-2xPEG_20x	1.0	0.9	1.51	1.63

20

【0191】

図6および表14に示す結果[SurbhiとMarie:図6および表14のデータは完全には一致していない。どちらが正しいのかわからない。これを整理されたい。これは大きな問題ではないが、正しく実行する必要がある。]は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-GAM(10x~20xモル過剰)に対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)ならびにMS(PEG)₄(3.75x)の付加の効果を実証する。マウスIgGを1000ng/ドットから1:1で段階希釈した。全てのDYLIGHT(商標)650-4xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/10000に希釈した。NHSアセテートと(MS)PEG₄の両方は、初期の基本コンジュゲートよりも感度およびシグナル/バックグラウンドにおいて顕著な改善をもたらした。2.5xモル過剰でGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-15xに付加されたNHSアセテートは、強度を1.7倍改善した。NHSアセテートによってもたらされた改善は、最高モル過剰の色素(20x)で調製されたコンジュゲートを用いた場合よりも1.3倍優れた性能を示した。GAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-15xコンジュゲートに付加された全てのMS(PEG)₄は、蛍光強度を1.8~2.2倍改善し、対応する最高基本コンジュゲートGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-20xよりも良好に機能した。

30

40

【0192】

(表14)ドットプロットアッセイにおける10x~20xのGAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEG-GARのコンジュゲーションにおけるNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x)付加の効果

50

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 10X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄	+ 5X MS(PEG) ₄	+ 10X MS(PEG) ₄
GAM-DYLIGHT ^(商標) 650-4xPEG_5x	1.0	1.0	1.2		1.1	1.9	1.1
GAM-DYLIGHT ^(商標) 650-4xPEG_7.5x	1.0	1.7	1.5		1.8	1.2	1.6
GAM-DYLIGHT ^(商標) 650-4xPEG_10x	1.0	1.2	2.9		1.8	1.3	1.5
GAM-DYLIGHT ^(商標) 650-4xPEG_15x	1.0	1.6	1.5	1.0	2.2	1.0	2.2
GAM-DYLIGHT ^(商標) 650-4xPEG_20x	1.0	1.0	0.8	0.8	1.6	0.9	1.3

NA = 付加なし

【 0 1 9 3 】

図7および表15に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)800-4xPEG-に対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)ならびにMS(PEG)₄(3.75x、5x、10x)スパーサーの付加の効果を実証する。マウスIgGを1000ng/ドットから1:2に段階希釈した。全てのDYLIGHT(商標)800-4xPEG-GAR二次抗体を、1mg/mlストックの1/20,000に希釈した。この実験は、ドットプロット用途において、MS(PEG)₄(3.75xおよび5x)およびNHSアセテート(5x)の付加が、基本のDYLIGHT(商標)800-4xPEGコンジュゲートの蛍光強度および感度を1.5~6倍で顕著に増強したことを示す。

【 0 1 9 4 】

(表15)ドットプロットアッセイにおけるGAM-DYLIGHT(商標)800-4xPEGへのNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x、5x、および10x)付加の効果

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 10X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄	+ 5X MS(PEG) ₄	+ 10X MS(PEG) ₄
GAM-DYLIGHT ^(商標) 800-4xPEG_5x	1.0	1.7	0.2		3.1	5.5	1.8
GAM-DYLIGHT ^(商標) 800-4xPEG_7.5x	1.0	0.6	1.4		1.8	2.9	1.3
GAM-DYLIGHT ^(商標) 800-4xPEG_10x	1.0	1.7	1.3		2.1	0.7	1.0
GAM-DYLIGHT ^(商標) 800-4xPEG_15x	1.0	1.3	1.6	1.2	3.1	1.3	1.9
GAM-DYLIGHT ^(商標) 800-4xPEG_20x	1.0	1.3	1.8	1.5	3.2	1.3	1.6

NA = 付加なし

【 0 1 9 5 】

図11に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT(商標)550-2xPEG-GAR(12.5xモル過剰の色素)に対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)ならびにMS(PEG)₄(5x)およびMS(PEG)₈(5x)スパーサー付加の効果を実証する。マウスIgGを0.5μg/ウェルから3倍に希釈した。全てのDYLIGHT(商標)二次抗体を、1mg/mlストックの1/5000に希釈した。これらのドットプロットアッセイは、MS(PEG)₄(5x)およびNHSアセテート(2.5xおよび5x)を付加すると、基本DYLIGH

T (商標) 550 - 2 x PEGコンジュゲートの蛍光強度と感度が少なくとも2倍、顕著に増強することを示した。長鎖MS (PEG)₈によって調製したコンジュゲートは、基本コンジュゲートを超えて顕著な改善を示さなかった。

【0196】

図12に示した結果は、ドットプロットアッセイにおける、GAM-DYLIGHT (商標) 680 - 4 x PEG-GAR (10 x モル過剰の色素) に対するNHSアセテート (2.5 x、5 x) およびMS (PEG)₄ (5 x) スペーサーの付加の効果を実証する。マウスIgGを1000 ng / ドットから1 : 2に段階希釈した。全てのDYLIGHT (商標) 680 - 4 x PEG-GAR二次抗体を、1 mg / mlストックの1 / 20, 000に希釈した。これらのドットプロットアッセイは、MS (PEG)₄ (5 x) およびNHSアセテート (2.5 x および5 x) を付加すると、基本DYLIGHT (商標) 680 - 4 x PEGコンジュゲートの蛍光強度と感度が顕著に増強したことを示す。

10

【0197】

実施例3：プレートアッセイ法

プレートを調製するために、10 µg / ml から始まるマウスまたはウサギIgGの11の(1 : 1) 段階希釈物を調製した。300 µLの12チャンネルマルチピペットを使用して、100 µLの各希釈液を96ウェルプレートの対応するウェルの最高から最低までの1 ~ 11の間に入れ、PBSを最後のカラムに加えた(#12; 陰性対照)。これを列AからHまで繰り返した。プレートを一晚インキュベートした後、以下の通りに、ブロッキングし、SUPERBLOCK (商標) Blocking Buffer (Thermo Fisher、カタログ番号37515) でインキュベートした：200 µLで5分間を2回、続いて200 µLで10分間を1回。プレートを乾燥させ、次いで4で乾燥して保存した。

20

【0198】

マウスIgGまたはウサギIgGでコーティングしたプレートをPBST 20を200 µLで2回洗浄し、次いでPBSで1回洗浄した。二次抗体コンジュゲートをTBSまたはPBSで希釈した。二次抗体コンジュゲートを1 : 100に希釈した(DYLIGHT (商標) 488 および550 - 2 x PEG、DYLIGHT (商標) 650 - 4 x PEG、DYLIGHT (商標) 680 - 4 x PEG およびDYLIGHT (商標) 800 - 4 x PEGコンジュゲート)。マウスIgGコートプレート中の100 µLの適切なコンジュゲートGAM、ウサギIgGコートプレート中のGARをプレートウェルに添加した。各希釈物を、試験する各コンジュゲートについて異なる列に加えた。全ての比較は同じプレート上で行われた。プレートを60分間インキュベートした。プレートをTBSTまたはPBST緩衝液により200 µLで3回洗浄した。100 µLのPBSを各ウェルの各列に添加した。蛍光強度は、Varioskan装置を使用するか、またはChemidoc MP (488、550、650、680 nm) およびLiCOR Odyssey CLx (650、680、800 nm) などの適切な撮像装置で蛍光シグナルを画像化することによって測定した。

30

【0199】

実施例4：免疫蛍光(IFC)法(すなわち、細胞イメージング法)

40

方法1：-80で保存した凍結U2OS細胞プレートを50で30分間解凍した。保存緩衝液(PBS)を除去し、細胞を1 x PBS緩衝液中の0.1% Triton-X 100で15分間(100 µl / ウェル)透過処理した。プレートを2% BSA / PBS - 0.1% Triton-X 100ブロッカーで30分間ブロッキングした。2% BSA / PBS - 0.1%のTriton-X 100で希釈した一次抗体マウス抗PDIまたはウサギ抗HDAC2 (10 µg / ml) (カタログ番号PA1-861、Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) を、プレートに加え、室温で1時間インキュベートした。陰性対照は2%のBSA / PBS - 0.1% Triton-X 100ブロッカーのみを含む。インキュベーション後、一次抗体溶液をプレートから除去し、プレートを100 µl / ウェルPBSTで3回および100 µl / ウェルPB

50

Sで1回洗浄した。次に、種々のモル過剰の色素で標識されたGAMまたはGAR二次抗体をPBS中で4 μg/mlに希釈し、そして室温で1時間インキュベートした。プレートを100 μl/ウェルPBSTおよび1 x 100 μl/ウェルPBSで3回洗浄し、Hoechst 33342 (カタログ番号62249、Thermo Scientific, Waltham, MA) (PBS中0.1 μg/mlに希釈)を各ウェル(100 μl/ウェル)に加えた。プレートをARRAYSCAN (商標) Plate Reader VTI 3、20 x 対物レンズでスキャンした。

【0200】

方法2：384ウェルプレート中のA549細胞において特定の実験を行った。二次抗体の希釈率を変えつつ、一次抗体を同一の濃度(1 μg/ml)で使用した。エトポシド(50 μMで3時間、Tocris Bioscience、カタログ番号12-261-00)で処理した細胞中でのpH2AX測定を用いてBシグナル/ノイズ(S/N、シグナル対バックグラウンドとも呼ばれる)を測定し、異なる抗体を比較するために明度を比較した。二次抗体コンジュゲートを4つの異なる希釈(0.5、1、2、および4 mg/ml)で試験した。標準的な手順を抗体染色に使用した：15分間の4%ホルムアルデヒド固定。透過処理は、0.5% Triton X-100中で10分間行った。ブロッキングを3% BSAで30分間行った。一次抗体インキュベーションを室温で1時間行った。これに続いてPBSで3回洗浄した。二次抗体コンジュゲートを室温で1時間インキュベートした後、PBSで3回洗浄した。細胞をARRAYSCAN (商標) VTI (Thermo Fisher)で分析した。

10

20

【0201】

図13ならびに表16および17に示す結果は、細胞イメージング用途において、GAM-DYLIGHT (商標) 488 (13A) およびGAR-DYLIGHT (商標) 488 ((13B) 7.5 x ~ 20 x モル過剰の色素で)へのNHSアセテート(2.5 x および5 x) およびMS(PEG)₄ (3.75 x) スペーサー付加の効果を実証する。DYLIGHT (商標) 488-GAMおよびDYLIGHT (商標) 488-GAR。A549細胞を、1 mg/mlストックの1/1000に希釈したpH2AX一次抗体で染色した。全てのDYLIGHT (商標) 488二次抗体を1 mg/mlストックの1/250に希釈した。コンジュゲーション混合物へと付加されたNHSアセテートは、15 x の色素モル過剰で基本コンジュゲートと比較してシグナル/バックグラウンドの1.4 ~ 1.5倍(GAM) および1.1 ~ 1.6倍(GAR)の範囲での改善をもたらした。GAMコンジュゲートについては、5 xでのNHSアセテートおよび3.75 xでのGARコンジュゲートについてのMS(PEG)₄で最も顕著な改善が観察され、2.5 xでのNHSアセテートおよび3.75 xでのMS(PEG)₄でより顕著な改善が観察された。

30

【0202】

(表16) 細胞イメージング用途における5 x ~ 20 xのモル過剰でのGAM-DYLIGHT (商標) 488のコンジュゲーションにおけるNHSアセテート(2.5 x、5 x、および10 x) またはMS(PEG)₄ (3.75 x) 付加の効果 - DYLIGHT (商標) 488-GAM

40

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄
DYLIGHT ^(商標) 488_7.5x	1.00	1.07	1.14	1.23
DYLIGHT ^(商標) 488_10x	1.00	1.04	1.13	1.17
DYLIGHT ^(商標) 488_15x	1.00	1.11	1.48	1.53
DYLIGHT ^(商標) 488_20x	1.00	0.72	1.09	1.07

NA = 付加なし

【0203】

(表17) 細胞イメージング用途における5 x ~ 20 xのモル過剰でのGAR-DYLIGHT

50

G H T (商 標) 4 8 8 の コ ン ジ ュ ゲ ー シ ョ ン に お け る N H S ア セ テ ー ト (2 . 5 x 、 5 x 、 お よ び 1 0 x) ま た は M S (P E G) 4 (3 . 7 5 x) 付 加 の 効 果 - D Y L I G H T (商 標) 4 8 8 - G A R

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄
DyLIGHT ^(商標) 488_7.5x	1.00	1.13	1.07	1.13
DyLIGHT ^(商標) 488_10x	1.00	1.20	1.21	1.02
DyLIGHT ^(商標) 488_15x	1.00	1.60	1.31	1.67
DyLIGHT ^(商標) 488_20x	1.00	1.23	1.14	1.11

10

NA = 付加なし

【 0 2 0 4 】

図 1 4 お よ び 表 1 8 に 示 す 結 果 は 、 細 胞 蛍 光 イ メ ー ジ ン グ 用 途 で の 、 G A M - D Y L I G H T (商 標) 5 5 0 - 2 x P E G - G A M (7 . 5 x ~ 2 0 x モ ル 過 剰 の 色 素 で の) へ の N H S ア セ テ ー ト (2 . 5 x 、 5 x 、 お よ び 1 0 x) な ら び に M S (P E G) 4 (3 . 7 5 x 、 5 x 、 お よ び 1 0 x) の 効 果 を 実 証 す る 。 U 2 O S 細 胞 を 、 1 m g / m l ス ト ッ ク の 1 / 1 0 0 に 希 釈 し た 抗 P D I 一 次 抗 体 で 染 色 し た 。 全 て の D Y L I G H T (商 標) 5 5 0 - 2 x P E G - G A M 二 次 抗 体 を 、 1 m g / m l ス ト ッ ク の 1 / 2 5 0 に 希 釈 し た 。 こ の 細 胞 イ メ ー ジ ン グ 用 途 に お い て 、 5 x N H S ア セ テ ー ト の 付 加 は 、 1 2 . 5 x 色 素 モ ル 過 剰 の D Y L I G H T (商 標) 5 5 0 - 2 x P E G G A M コ ン ジ ュ ゲ ー ト に つ い て の 基 本 コ ン ジ ュ ゲ ー ト (付 加 な し で 作 ら れ た) と 比 較 し て 約 5 0 % の 改 善 を も た ら し 、 3 . 7 5 x M S (P E G) 4 の 付 加 は 、 2 0 倍 の 色 素 モ ル 過 剰 で 、 基 本 コ ン ジ ュ ゲ ー ト に 対 し て 約 5 0 % の 改 善 を も た ら し た 。

20

【 0 2 0 5 】

(表 1 8) 細 胞 イ メ ー ジ ン グ 用 途 に お け る G A M - D Y L I G H T (商 標) 5 5 0 - 2 x P E G の 蛍 光 強 度 に 対 す る 2 . 5 x ~ 1 0 x の N H S ア セ テ ー ト お よ び M S (P E G) 4 (3 . 7 5 x ~ 1 0 x) の 効 果

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 10X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄	+ 5X MS(PEG) ₄	+ 10X MS(PEG) ₄
GAM-DyLIGHT ^(商標) 550-2xPEG_7.5x	1.0	0.5	0.7		0.5	0.9	0.7
GAM-DyLIGHT ^(商標) 550-2xPEG_10x	1.0	1.7	1.7		0.9	1.4	1.5
-GAM-DyLIGHT ^(商標) 550-2xPEG_12.5x	1.0	1.8	2.0		0.9	1.1	1.2
GAM-DyLIGHT ^(商標) 550-2xPEG_15x	1.0	2.2	2.2	1.9	1.3	1.9	1.1
GAM-DyLIGHT ^(商標) 550-2xPEG_20x	1.0	1.7	1.3	1.0	1.2	1.2	1.0

30

NA = 付加なし

【 0 2 0 6 】

細 胞 イ メ ー ジ ン グ 用 途 に お け る 、 G A M - D Y L I G H T (商 標) 6 5 0 - 4 x P E G) に 対 す る N H S ア セ テ ー ト (2 . 5 x 、 5 x 、 お よ び 1 0 x) な ら び に M S (P E G) 4 (3 . 7 5 x 、 5 x 、 1 0 x) ス ペ ー サ ー の 効 果 を 試 験 す る 実 験 の 結 果 を 図 1 5 お よ び 表 1 9 に 示 す 。 U 2 O S 細 胞 を 、 1 m g / m l ス ト ッ ク の 1 / 1 0 0 に 希 釈 し た 抗 P D I 一 次 抗 体 で 染 色 し た 。 全 て の D Y L I G H T (商 標) 6 5 0 - 4 x P E G - G A M 二 次 抗 体 を 、 1 m g / m l ス ト ッ ク の 1 / 2 5 0 に 希 釈 し た 。 こ の 細 胞 イ メ ー ジ ン グ 用 途 に お い て 、 N H S ア セ テ ー ト - 5 x の 付 加 は 、 2 0 x モ ル 過 剰 の D Y L I G H T (商 標) 6 5 0 - 4 x P E G G A M コ ン ジ ュ ゲ ー ト に つ い て の 基 本 コ ン ジ ュ ゲ ー ト (付 加 な し で 作 ら れ

40

50

た)と比較して約70%の改善をもたらし、MS(PEG)₄-3.75xの付加は、20倍のモル過剰で、基本コンジュゲートに対して約90%の改善を示した。

【0207】

(表19) GAM-DYLIGHT(商標)650-4xPEGへのNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.75x、5x、10x)の付加の効果 - 細胞イメージング用途

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 10X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄	+ 5X MS(PEG) ₄	+ 10X MS(PEG) ₄
GAM-DYLIGHT(商標) 650-4xPEG_5x	1.0	1.0	1.0		0.9	1.2	1.1
GAM-DYLIGHT(商標) 650-4xPEG_7.5x	1.0	0.5	0.5		0.5	0.4	1.6
GAM-DYLIGHT(商標) 650-4xPEG_10x	1.0	1.3	1.7		0.9	1.0	1.5
GAM-DYLIGHT(商標) 650-4xPEG_15x	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	2.2
GAM-DYLIGHT(商標) 650-4xPEG_20x	1.0	1.0	0.9	1.1	1.9	1.1	1.3

10

NA = 付加なし

20

【0208】

細胞イメージング用途における、GAM-DYLIGHT(商標)680-4xPEGの検出可能な蛍光レベルに対するNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)ならびにMS(PEG)₄(3.3.75x、5x、10x)スパーサーの付加の効果を試験する実験の結果を図16および表20に示す。U2OS細胞を、1mg/mlストックの1/100に希釈したマウス抗PDI一次抗体で染色した。全てのDYLIGHT(商標)680-4xPEG-GAM二次抗体を1mg/mlストックの1/250に希釈し、この細胞イメージング用途では、NHSアセテート-5xの付加は、DYLIGHT(商標)680-4xPEGの基本コンジュゲート(付加なしで作製)と比較して、7.5xと10xの両方で色素コンジュゲートの約70%の改善をもたらした。15xモル過剰のモル過剰でのGAMコンジュゲートとMS(PEG)₄-3.75xは、15xモル過剰での基本コンジュゲートよりも約80%の改善を示した。

30

【0209】

(表20) GAM-DYLIGHT(商標)680-4xPEGへのNHSアセテート(2.5x、5x、および10x)またはMS(PEG)₄(3.3.75x、5x、10x)の付加の効果 - 細胞イメージング用途

改善倍率	NA	+ 2.5X NHS アセテート	+ 5X NHS アセテート	+ 10X NHS アセテート	+ 3.75X MS(PEG) ₄	+ 5X MS(PEG) ₄	+ 10X MS(PEG) ₄
GAM-DYLIGHT(商標) 680-4xPEG_5x	1.0	0.8	0.7		0.7	1.0	0.8
GAM-DYLIGHT(商標) 680-4xPEG_7.5x	1.0	1.2	1.7		1.1	1.1	1.1
GAM-DYLIGHT(商標) 680-4xPEG_10x	1.0	1.7	1.7		1.1	1.5	1.5
GAM-DYLIGHT(商標) 680-4xPEG_15x	1.0	1.4	1.2	1.1	1.8	1.3	1.4
GAM-DYLIGHT(商標) 680-4xPEG_20x	1.0	0.8	0.9	1.1	1.0	1.1	1.1

40

NA = 付加なし

50

【0210】

結果

NHS - アセテート、NHS - MS (PEG)、および NHS - ベタインなどのスペーサー剤の使用は、蛍光シグナル感度および強度を、典型的には消光をもたらす最適 D / P レベルを超えて増加させた。これは、ヤギ抗マウス (GAM) およびヤギ抗ウサギ (GAR) 二次抗体を、NHS - アセテートならびに NHS - MS (PEG)₄、NHS - MS (PEG)₈ および NHS - MS (PEG)₁₂ を含むがこれらに限定されないスペーサー剤と組み合わせて、NHS - DYLIGHT (商標) 488、NHS - DYLIGHT (商標) 550 2 × PEG、NHS - DYLIGHT (商標) 650 4 × PEG、NHS - DYLIGHT (商標) 680 4 × PEG、NHS - DYLIGHT (商標) 800 4 × PEG で標識化することによって実証された。色素コンジュゲーションおよび精製後の D / P 値の我々による計算は、スペーサー剤の付加が D / P 比に顕著な差を生じさせなかったことを実証したが、これは、これらの試薬およびフルオロフォアが抗体上の異なる第 1 級アミンを標識したことを示す (すなわち、それらは同一の第 1 級アミンについて競合しなかった)。

10

【0211】

異なる色素およびスペーサー剤を用いて作製したコンジュゲートを、IFC、ウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、または IgG 結合プレートベースのアッセイを含む様々な用途において試験した。それぞれの場合において、色素に対するスペーサー剤の特定のモル過剰値における特定のスペーサー剤では、スペーサー剤を使用したときに、スペーサー剤を欠く対照と比較して、蛍光強度の増加が観察された。

20

【0212】

上記の実験に加えて、NHS - ロードミンで標識し、様々な NHS - ベタイン濃度 (ベタイン 2.5、ベタイン 5、ベタイン 10 モル比) とコンジュゲートした抗体は、抗体をスペーサー修飾試薬としてのベタインとコンジュゲートしたとき、全蛍光の増加を示した。以下の図 17 ならびに表 21 および 22 を参照のこと。異なるベタイン鎖長のうち、ベタイン 10 は、色素の全モル過剰での TAMRA および D / P 比が 12 を超える ALEXA FLUOR (登録商標) 555 に対して正の効果を示した (データ示さず)。

【0213】

(表 21) TAMRA GAM コンジュゲートの蛍光にライする 2.5 × ~ 10 × ベタインの効果

30

NHS-ベタイン MR	NHS-TAMRA MR	TAMRA/IgG DOL	相対量子収率	全蛍光
2.5	5	NA	NA	NA
2.5	10	6.3	0.4	2.52
2.5	20	8.6	0.3	2.58
5	5	5.9	0.56	3.3
5	10	7.1	0.34	2.41
5	20	6.4	0.18	1.15
10	5	5.4	0.56	3.02
10	10	8.4	0.5	4.2
10	20	15.7	0.34	5.34
0	5	4.2	0.54	2.27
0	10	6.7	0.42	2.81
0	20	11.4	0.38	4.33

40

MR = モル比

DOL = 標識度

【0214】

実施例 5 : N , N , N - トリメチルグリシン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルブ

50

ロミド (ベタイン - SE) 有りおよびなしのヤギ抗マウス IgG (GAM) および 5 - (および - 6) - カルボキシテトラメチルローダミン、スクシンイミジルエステル (5 (6) - TAMRA - SE) の反応

TAMRA - SE を秤量して無水 DMSO 中 10 mg / mL の原液として調製し、ベタイン - SE を秤量して無水 DMSO 中 4 mg / mL のストックとして調製した。次いで、DMSO 溶液を反応バイアルに移し、TAMRA - SE + / - ベタイン - SE を、IgG に対する 5、10、または 20 倍の色素の IgG に対するモル比に基づいて測定してバイアルに入れ、ベタイン - SE の IgG に対するモル比 0 または 10 の当量もまたバイアルに添加した。

【 0 2 1 5 】

別個に、10 mM リン酸カリウム、150 mM 塩化ナトリウム緩衝液 (PBS) 中の GAM の 8 . 4 mg / mL 溶液の 0 . 417 mL (3 . 5 mg) をプラスチックチューブに測定して入れ、pH を 1 M 重炭酸ナトリウム、pH 9 . 0 の 42 μ L で > 8 . 0 に上げた。0 . 5 mg の GAM 溶液を SE を含む反応バイアルに添加し、室温で 1 時間反応させた。色素 - タンパク質コンジュゲートを、PBS 中の BIORAD (商標) BIO - GEL (登録商標) P - 30 微粒子を充填した 5 ~ 0 . 75 x 20 cm カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって遊離の色素およびベタインから分離し、同一のもので溶離した。各カラムからの最初のタンパク質含有バンドを回収した。

【 0 2 1 6 】

吸光度スペクトルは、Perkin - Elmer Lambda 35 UV / Vis 分光計で得られ、各試料について置換度 (DOS) または色素モル / GAM モルを決定した。蛍光発光スペクトルは、Perkin Elmer LS 55 蛍光分光計を用いて、545 nm で一致した光学濃度を有し、545 nm で励起された試料を用いて得た。発光データは 550 ~ 750 nm から収集した。相対量子収率 (RQY) は、試料スペクトルの面積 / 試料標準スペクトルの面積として測定した。次いで、全蛍光を RQY * DOS の積として計算した。

【 0 2 1 7 】

(表 2 2) TAMRA / GAM の異なるモル比の全蛍光出力

TAMRA/GAM (モル比)	5	10	20
TAMRA-GAM とベタイン-SE を MR=10 で追加	3.02	4.2	5.34
TAMRA-GAM (ベタイン-SE なし)	2.27	2.81	4.33

【 0 2 1 8 】

実施例 6 : 1 , 3 - プロパンスルホン (3 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸 - スルホン) 有りおよびなしのヤギ抗マウス IgG (GAM) と Alexa Fluor (登録商標) 488 カルボン酸、スクシンイミジルエステル、ジリチウム塩 (AF 488 - SE) との反応

AF 488 - SE を秤量して無水 DMSO 中 10 mg / mL の原液として調製し、プロパン - スルホン を秤量して E - Pure H₂O 中 1 mg / mL のストックとして調製した。

【 0 2 1 9 】

10 mM リン酸カリウム、150 mM 塩化ナトリウム緩衝液 (PBS) 中の GAM の 11 . 2 mg / mL 溶液の 0 . 357 mL (4 . 0 mg) をプラスチックチューブに測定して入れ、pH を 1 M 重炭酸ナトリウム、pH 9 . 0 の 36 μ L で > 8 . 0 に上げた。0 . 5 mg の GAM 溶液を反応バイアルに移し、0、2、5 または 10 倍モル過剰のプロパンスルホンと 2 分間反応させ、次いで AF 488 ストックを GAM に対して 8 または 15 倍モル過剰で混合物に加え、室温で 1 時間反応させた。色素 - タンパク質コンジュゲートを、PBS 中の BIORAD (商標) BIO - GEL (登録商標) P - 30 微粒子を充填した 5 ~ 0 . 75 x 20 cm カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって遊離の色素およびプロパンスルホンから分離し、同一のもので溶離した。各カラムからの最初のタンパク質含有バンドを回収した。

10

20

30

40

50

【0220】

吸光度スペクトルは、Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis分光計で得られ、各試料について置換度(DOS)または色素モル/GAMモルを決定した。蛍光発光スペクトルは、Perkin Elmer LS 55 蛍光分光計を用いて、475 nmで一致した光学濃度を有し、475 nmで励起された試料を用いて得た。発光データは480~800 nmから収集した。相対量子収率(RQY)は、試料スペクトルの面積/試料標準スペクトルの面積として測定した。次いで、全蛍光をRQY * DOSの積として計算した。

【0221】

(表23) AF488/GAMの異なるモル比の全蛍光出力

AF488/GAM (モル比)	8	15
AF488-GAM + プロパンスルトン/GAM MR=2	2.52	3.67
AF488-GAM + プロパンスルトン/GAM MR=5	2.62	3.73
AF488-GAM + プロパンスルトン/GAM MR=10	2.69	3.86
AF488-GAM 対照 (プロパンスルトンなし)		3.56

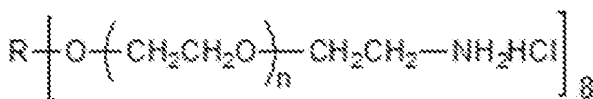
10

【0222】

実施例7: ALEXA FLUOR (登録商標) 647 NHSエステル、トリス(トリエチルアンモニウム塩)(AF647-SE)で修飾された20 kDaの8アームPEGアミン(20K8PEG)を用いたSK3マウス抗ヒトCD4アジドの標識化

20

「AF647-SE」と略されるALEXA FLUOR (登録商標) 647 NHS/スクシンイミジルエステル(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A37573)を秤量し、無水DMSO(Thermo Fisher Scientific、D12345)中32 mMの原液として調製した。CLICK-IT(商標)SDPエステルsDIBOアルキン(sDIBO)(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C20025)を無水DMSO中9 mg/mLの原液として調製した。以下の構造を有し、「20K8 PEG」と称される、8アームPEGアミン(ヘキサグリセロール)、HCl塩(JenKem, Plano, TX 75024, カタログ番号8 ARM-NH2HCl)



R = ヘキサグリセリンコア構造

30

を秤量し、無水DMSO中40 mg/mLの原液として調製した。

【0223】

プラスチックチューブに、300 μLの20K8 PEG原液、176 μLのsDIBO原液(2.4倍モル過剰/20K8 PEG)、および6 μLのニートリエチルアミン(TEA)を加え、25°Cで3時間反応させた。反応後、300 μLのAF647-SE原液(2倍モル過剰/PEG-アミン)をチューブに添加し、そして反応を25°Cで一晩進行させた。AF647-20K8 PEG-sDIBOコンストラクトを、PBS中のBioRad BIO-GEL(登録商標)P-10Fを充填した1×30 cmカラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィーにより遊離の色素およびsDIBOから精製し、同一のもので溶離した。最初の色素含有画分を集めそしてEMD Millipore AMICON(商標)Ultra-4 10 kDa遠心分離フィルターを用いて濃縮した。

40

【0224】

「Azide-SE」と略されるAzido(PEO)₄プロピオン酸、スクシンイミジルエステル(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A10280)を秤量し、無水DMSO(Thermo Fisher Scientific、D12345)中10 mMの原液として調製した。266 μLのSK3マウス抗ヒトCD

50

4抗体(2.5mg)および134μLのPBSをプラスチックチューブに添加し、50μLの1M重炭酸ナトリウム、pH9.0でpHを>8.0に上げた。8.3μLのアジド-SE原液(5倍モル過剰/抗体)および42μLのDMSOを抗体溶液に添加した。反応を25℃で2時間進行させた。アジド-SK3抗体を2mLのBioRad BIO-GEL(登録商標)P-30Mスピンカラムを用いて精製した。アジド-SK3抗体は、抗体に対して5倍~20倍過剰のアジド-SEで調製した。

【0225】

AF647-20K8 PEG-sDIBOの2mM溶液(DIBO濃度)の24.2μLおよび4.3mg/mLアジド-SK3の116μLをプラスチックチューブ中で混合した。360μLのPBSを添加して、溶液の最終濃度を100μMのAF647-20K8 PEG-sDIBO(DIBOの濃度)および1mg/mLのアジド-SK3抗体にした。クリック反応を37℃で2時間進行させ、続いて5mMのNaN₃で室温で1時間クエンチした。AF647-20K8 PEG-SK3コンジュゲートをPBS中0.5mg/mLに希釈した。1~3mg/mLのアジド-SK3抗体を用いて、100~600μMの最終DIBO濃度で、25~37℃の反応温度で、2時間~20時間、コンジュゲーション反応を行った。実施した実験ごとの具体的な条件を表24に示す。

10

【0226】

AF647-20K8 PEG-sDIBOの2mM溶液(DIBO濃度)の24.2μLおよび4.3mg/mLアジド-SK3の116μLをプラスチックチューブ中で混合した。360μLのPBSを添加して、溶液の最終濃度を100μMのAF647-20K8 PEG-sDIBO(DIBOの濃度)および1mg/mLのアジド-SK3抗体にした。クリック反応を37℃で2時間進行させ、続いて5mMのNaN₃で室温で1時間クエンチした。コンジュゲートを精製し、EMD Millipore AMICON(商標)Ultra-4 100kDa遠心分離フィルターを用いて濃縮した。AF647-20K8 PEG-SK3コンジュゲートをPBS中0.5mg/mLに希釈した。1~3mg/mLのアジド-SK3抗体を用いて、100~600μMの最終DIBO濃度で、25~37℃の反応温度で、2時間~20時間、コンジュゲーション反応を行った。実施した実験ごとの具体的な条件を表24に示す。

20

【0227】

(表24)コンジュゲーション条件

30

40

50

実施例	SK3-N ₃		スターPEG ³	クリックインキュベーション条件		
	MR ¹	DOS ²		SK3 mg/mL ⁴	スターPEG DIBO μM ⁵	時間/温度 ⁶
sa1	5	3	HG 20kD	1	100	2h/37°C
sa2	10	6.1	HG 20kD	1	100	2h/37°C
sa3	20	12	HG 20kD	1	100	2h/37°C
sa4	5	3	HG 20kD	1	200	2h/37°C
sa5	10	6.1	HG 20kD	1	200	2h/37°C
sa6	20	12	HG 20kD	1	200	2h/37°C
sa2*	10	6.1	HG 20kD	1	100	20h/25°C
sa7	5	3	TP 20kD	1	100	2h/37°C
sa8	10	6.1	TP 20kD	1	100	2h/37°C
sa9	20	12	TP 20kD	1	100	2h/37°C
sa10	5	3	TP 20kD	1	200	2h/37°C
sa11	10	6.1	TP 20kD	1	200	2h/37°C
sa12	20	12	TP 20kD	1	200	2h/37°C
sa8*	10	6.1	TP 20kD	1	100	20h/25°C
sa13	10	6.1	HG 20kD	3	600	3h/37°C
sa14	20	12	HG 20kD	3	600	3h/37°C

¹ MR: モル比、SK3 抗体をアジド-SE:抗体 (モル/モル) でタグ化するために使用される x 倍過剰量。
² DOS: 置換度、抗体分子あたりに組み込まれるアジド基の数。
³ スターPEG: スターPEG (20kD) とコアの MW を示す。HG: ヘキサグリセロール、TP: トリペンタエリスリトール。
⁴ クリックインキュベーションでは、SK3 は mg/mL で示された濃度で存在していた (各例で指定)。
⁵ クリックコンジュゲーション中スターPEG DIBO は μM で示された濃度で存在した。
⁶ クリック反応は表示された温度で示された時間実行された。

【 0 2 2 8 】

実施例 8 : 分岐鎖 PEG AF 6 4 7 コンストラクトの量子収率の分析

量子収率測定用の試料を調製するために、AF 6 4 7 分岐鎖 PEG コンストラクト (AF 6 4 7 - 2 K 4、AF 6 4 7 - 1 0 K 4、AF 6 4 7 - 1 0 K 8、および AF 6 4 7 - 2 0 K 8) の溶液を脱イオン水中 0 . 1 6 μ M の最終色素濃度に希釈した。量子収率 () は、Hamamatsu Absolute PL Quantum Yield Spectrometer を用いて測定した。分岐鎖 PEG コンストラクトについての量子収率を遊離色素のものと比較して、最終コンストラクトにおける消光度を決定した。さらに、分岐鎖 PEG スペースャーを用いて達成される蛍光増強を決定するために明度を決定した。最小のコンストラクト、AF 6 4 7 - 2 K 4 (4 つのアームを有する 2 , 0 0 0 分子量の分岐鎖 PEG) は最大の消光 (2 0 % の遊離色素の QY、0 . 2 の蛍光比) を示し、そして全蛍光における全体的な改善が最も低かった。8 9 % までの蛍光量子収率が遊離色素 (蛍光比 0 . 9) で保持されている 4 つまたは 8 つのアーム (AF 6 4 7 - 1 0 K 4 および AF 6 4 7 - 2 0 K 8) のいずれかを有する高分子量コンストラクトについて最大の蛍光増強が見られ、そして 5 . 8 倍までの明度の改善が見られた。

【 0 2 2 9 】

(表 2 5) A L E X A F L U O R (登録商標) 6 4 7 のパーセント量子収率 (Q Y) および明度 (B) に対する分岐鎖 PEG スペースャーの効果

10

20

30

40

50

試料	色素/分子 (N)	量子収率 (QY)	遊離色素の %QY (蛍光比)	明度、B (QY x ε x N) AU	遊離色素に対する 明度比
AF647	1	0.404	100% (1.0)	1.09E+05	1.0
AF647-2K4	4	0.087	22% (0.2)	9.40E+04	0.9
AF647-10K4	4	0.359	89% (0.9)	3.88E+05	3.6
AF647-10K8	8	0.145	36% (0.4)	3.13E+05	2.9
AF647-20K8	8	0.295	73% (0.7)	6.37E+05	5.8

事実上1つの蛍光標識が各アームの末端に結合していると仮定する。言い換えれば、PEG分子は飽和状態まで標識されていると仮定され、したがってN=アーム/ポリマーの数である。ALEXA FLUOR (登録商標) 647の場合、 $\epsilon = 270,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

10

【0230】

実施例9：AF647-20K8 PEG-SK3コンストラクトのフローサイトメトリー評価

新たに採取した抗凝固全血(ヒト)を、ACK溶解緩衝液を用いて室温で20分間溶解した。白血球を遠心分離(400 x g、5分)により単離し、そして1%ウシ血清アルブミン/PBS(1%BSA/PBS)中で2回洗浄した。単離後、COUNTESS(登録商標)自動細胞計数器を用いて白血球の全数を決定し、次いで1mLあたり1000万細胞に希釈した。96ウェルプレート中の100万個の細胞/ウェルを、1μg~0.015μgの抗体の7点滴定を用いてAF647-20K8 PEG-SK3コンジュゲートで染色した。染色細胞を1%BSA/PBSで2回洗浄した。染色された細胞の分析は、ATTUNE(商標)NxTフローサイトメーターを用いて実施し、APC(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号MHCD0405)、ALEXA FLUOR(登録商標)488(Invitrogen、カタログ番号MHCD0420)、FITC(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号MA1-81103)およびBRILLIANT VIOLET(商標)605(BioLegend, San Diego, CA、カタログ番号300555)CD4コンジュゲートと比較された。

20

30

【0231】

図22は、ATTUNE(商標)NxTフローサイトメーターのRL1チャンネルにおける蛍光強度の関数としてのCD4陽性リンパ球細胞のヒストグラムプロットを示す。CD4にコンジュゲートされたALEXA FLUOR(登録商標)647は破線として示され、そしてAF647-20K8 PEG-SK3コンジュゲートは点線または実線として示される。AF647コンジュゲート単独と比較して、スターPEGコンジュゲートは、明度において0.5logより大きい増加を示す。図23は、フローサイトメトリー実験においてコンジュゲート濃度の関数としてプロットしたシグナル対ノイズ比(S/N)および陽性パーセント(陽性%)を示す。スターPEGコンストラクト(ここではB1およびB2)は、試料中のいくつかのCD4陽性細胞数を正確に評価する能力を保持しながら、APC CD4ベンチマークコンジュゲートに対してS/Nにおいて2.5倍までの増加、およびAF647 CD4ベンチマークコンジュゲートに対してS/Nにおいて2倍までの増加を有する。

40

【0232】

実施例10：ALEXA FLUOR(登録商標)488のアミノデキストラン足場へのコンジュゲーション

70kDのアミノデキストランAF488足場の調製：10mgのアミノデキストラン(70,000MW、20個のアミノ基；Thermo Fisher Scientific、カタログ番号D1862)を1.0μLのDIEAを含む1.2mLの乾燥DMS

50

Oに溶解した。0.9 mgのALEXA FLUOR (登録商標) 488スクシンイミジルエステルリチウム塩 (643MF; Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A20000)を溶液に添加し、混合物を周囲温度で3.5時間攪拌した。溶液を12 mLの酢酸エチルで希釈し、得られた懸濁液を遠心分離した。上清を廃棄し、そして固形物を10 mLの新たな酢酸エチルと共に振盪し、そして遠心分離した。この洗浄を10 mLの新たな酢酸エチルでさらに3回繰り返す、得られた沈殿物を真空中で乾燥させた。固体を0.5 mLの水に再溶解し、そして溶液を両側から切り取った10 cmのSpectra/Por Dialysis膜 (Spectrum Labs、MWC012-14, 000、平坦、幅10 mm) 中に入れた。透析膜を1 Lの水中で1週間ゆっくり攪拌した。水は1日に2回交換した。透析膜を一端から開け、溶液を凍結乾燥してアミノデキストランALEXA FLUOR (登録商標) 足場を得た。測定されたDOLは9.7であり、相対QYは0.6である (ALEXA FLUOR (登録商標) 488のQYを基準とする)。

10

【0233】

70 kDのアミノデキストランAF488足場へのチオールリンカーの結合：アミノデキストランAF488足場 (4.5 mg) を、0.055 μLのN、N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を含む0.5 mLのDMSOに溶解した。3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジル (SPDP) (20 μg) を溶液に加え、混合物を一晩周囲温度に保ち、次いで酢酸スクシミジルエステル (1.0 mg、3時間) でキャップした。溶液を10 mLの酢酸エチルで希釈した。得られた懸濁液を遠心分離し、上清を廃棄した。固体を10 mLの新たな酢酸エチルと共に振盪し、そして遠心分離した。洗浄をさらに5回繰り返した。得られた固体を真空乾燥した。測定されたDOLは0.74である。この物質を2 mLの水に再溶解し、16 mgのDTTを溶液に加えた。混合物を5分間攪拌し、G15 SEPHADEX (登録商標) カラムにロードし、生成物を緑色蛍光溶液としてDE水で溶離し、これをSMCC修飾ストレプトアビジンへのコンジュゲーションに使用した。決定された濃度は48 μMであった (色素吸着による)。

20

【0234】

チオールリンカーで修飾されたアミノデキストランAF488足場のSMCC修飾ストレプトアビジンへのコンジュゲーション：SMCC修飾ストレプトアビジン (35 μL水溶液) を1、2、3および4当量のチオール修飾アミノデキストランAF488足場 (48 μM水溶液) で処理した。反応を周囲温度で3時間実施し、その後反応混合物を一晩4に保持した。コンジュゲートを10 nMのPBS緩衝液を用いてP100サイズ排除カラムで精製する。

30

【0235】

(表26) 70 kDアミノデキストランAF488足場で標識されたストレプトアビジン (足場あたり平均9.7分子の色素)

足場によるDOL (平均)	色素によるDOL (平均)	QY	明度
0.9	9.2	0.52	4.8
1.1	10.2	0.50	5.1
1.8	18	0.53	9.5
2.6	25.5	0.54	13.7

40

【0236】

(表27) AF488色素で標識されたストレプトアビジン

50

DOL(平均)	QY	明度
1.5	0.70	1.0
3.0	0.60	1.8
4.0	0.55	2.1
4.5	0.40	1.8
5.0	0.34	1.7

【0237】

結果：表26および27に示されるように、足場から作製されたコンジュゲートは、単一のAF488色素から作製されたコンジュゲートと比較してより明るい。同様に、アミノデキストラン足場で標識化するためのほぼ一定のQYとは対照的に、AF488フルオロフォアのQYは、単一色素コンジュゲーションについて0.70から0.34に低下する。

10

【0238】

本発明はさらに以下の項によって提示される。

【0239】

1. 第1の抗体を含む組成物であって、2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が第1の抗体に共有結合し、蛍光標識とスペーサー分子は互いに共有結合していない組成物。

【0240】

2. 第1の抗体が、等量の蛍光標識を用いて調製されたがスペーサー分子を含まない第2の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示す、項1に記載の組成物。

20

【0241】

3. 第1の抗体が第2の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示し、第1の抗体および第2の抗体がそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、第2の抗体が共有結合したスペーサー分子を有さない、項1および2に記載の組成物。

【0242】

4. スペーサー分子が、蛍光標識の消光を、スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、項1～3に記載の組成物。

【0243】

5. スペーサー分子が、反応性基に対して抗体にコンジュゲートされている、項1～4に記載の組成物。

30

【0244】

6. 反応性基がアミン基である、項5に記載の組成物。

【0245】

7. アミン基がリジン残基上にある、項6に記載の組成物。

【0246】

8. 蛍光標識がコンジュゲーション分子によって抗体にコンジュゲートされている、項1に記載の組成物。

【0247】

9. 蛍光標識が正に荷電している、項1～5に記載の組成物。

40

【0248】

10. 蛍光標識がALEXA FLUOR(登録商標)色素またはDYLIGHT(商標)色素である、項1～5に記載の組成物。

【0249】

11. 蛍光標識が、ALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)500、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA

50

FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)からなる群から選択される色素である、項1~9に記載の組成物。

10

【0250】

12. 蛍光標識が、DYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、およびDYLIGHT (商標) 800からなる群から選択される色素である、項10に記載の組成物。

20

【0251】

13. スペーサー分子が負に荷電しているか中性である、項1~12に記載の組成物。

【0252】

14. スペーサー分子が、アセテートおよびポリエチレングリコール(PEG)から選択される、項1~13に記載の組成物。

【0253】

15. スペーサー分子がアセチル基を含む、項1~12に記載の組成物。

30

【0254】

16. スペーサー分子がアセテート分子を含む、項1~14に記載の組成物。

【0255】

17. アセテート分子がスルホ-NHS-アセテートである、項16に記載の組成物。

【0256】

18. スペーサー分子が(PEG)_nを含むかまたはそれからなり、式中、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、項1~17に記載の組成物。

【0257】

19. スペーサー分子がMS-(PEG)_nを含み、式中、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、項1~17に記載の組成物。

40

【0258】

20. スペーサー分子が、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル(-C(O)C_nH_m)から選択される基を含むか、またはそれらからなり、式中、nが1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合することができる、項1~19に記載の組成物。

【0259】

21. アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基が、-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-ORによってさらに置換され、式中、xが1~20であり、yが1~6

50

であり、RがHまたはC₁~6アルキルである、項20に記載の組成物。

【0260】

22. アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基が、アンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム(-NR₃⁺)基でさらに置換され、式中、RがC₁~6アルキルである、項21に記載の組成物。

【0261】

23. 蛍光色素が、1つ以上のALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)500、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610-X、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、ALEXA FLUOR(登録商標)790、AMCA-X、BODIPY(登録商標)630/650、BODIPY(登録商標)650/665、BODIPY(登録商標)FL、BODIPY(登録商標)TMR、BODIPY(登録商標)TR、BODIPY(登録商標)TR-X、CASCADE BLUE(登録商標)ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE(登録商標)OREGON GREEN(登録商標)488、OREGON GREEN(登録商標)514、PACIFIC BLUE(商標)、PACIFIC ORANGE(商標)、RHODAMINE GREEN(商標)、QSY(登録商標)7、QSY(登録商標)9、QSY(登録商標)21、QSY(登録商標)35、ROX、RHODAMINE RED(商標)、TET、TAMRA、tetramethyl rhodamine、FAM、TEXAS RED(登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)を含み、ならびに、DYLIGHT(商標)350、DYLIGHT(商標)405、DYLIGHT(商標)488、DYLIGHT(商標)550、DYLIGHT(商標)594、DYLIGHT(商標)633、DYLIGHT(商標)650、DYLIGHT(商標)680、DYLIGHT(商標)755、およびDYLIGHT(商標)80からなる群からのものであり、

スペーサー分子が、

スルホ-NHS-アセテート；

(PEG)_n(式中、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される)；

MS-(PEG)_n(式中、nが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される)；

アルカノイル、アルケノイル、またはアルキノイル(-C(O)C_nH_m)(式中、nが1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合で互いに結合し得る)；あるいは

- (OCH₂CH₂O)_x - (CH₂)_y - OR(式中、xが1~20であり、yが1~6であり、RがHもしくはC₁~6アルキルである)によってさらに置換されたアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基であって、またはアルキル、アルケニル、および/もしくはアルキニル基がアンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム((-NR₃⁺)基でさらに置換され、式中、RがC₁~6アルキルである、アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基

のうちの1つ以上を含む、項1~22に記載の組成物。

【0262】

24. アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基が、ホスホニウム基(-P

Q₃⁺)によってさらに置換され、式中、Qがアリール、置換されたアリール、またはC₁~C₆アルキルである、項23に記載の組成物。

【0263】

25. 蛍光標識の抗体に対する比が1~50である、項1~24に記載の組成物。

【0264】

26. 蛍光標識の抗体に対する比が5~30である、項25に記載の組成物。

【0265】

27. 蛍光標識の抗体に対する比が1~20である、項25に記載の組成物。

【0266】

28. スペーサー分子の抗体に対する比が1~50である、項1~27に記載の組成物。 10

【0267】

29. スペーサー分子の抗体に対する比が5~30である、項28に記載の組成物。

【0268】

30. スペーサー分子の抗体に対する比が5~30である、項28に記載の組成物。

【0269】

31. スペーサー分子の抗体に対する比が1~20である、項28に記載の組成物。

【0270】

32. スペーサー分子が、0.1~2.5倍、1~1.5倍、または2.5~1.0倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項1~31に記載の組成物。

【0271】

33. スペーサー分子が、2.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項32に記載の組成物。 20

【0272】

34. スペーサー分子が、5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項33に記載の組成物。

【0273】

35. スペーサー分子が、7.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項33に記載の組成物。

【0274】

36. スペーサー分子が、1.0倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項33に記載の組成物。 30

【0275】

37. 複数の蛍光標識によって占有されている抗体上の結合部位の割合が1%~99%である、項33に記載の組成物。

【0276】

38. スペーサー分子の存在が、蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる、項1~37に記載の組成物。 40

【0277】

39. 蛍光標識された生体分子の蛍光を増加させる方法であって、
 (a) スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートすることと、
 (b) 生体分子に蛍光標識をコンジュゲートすることと、を含み、
 ステップ(a)および(b)は同時にまたは任意の順序で行うことができ、
 スペーサーと蛍光標識は互いにコンジュゲートしていない、方法。

【0278】

40. スペーサー分子が、蛍光標識の消光を、スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、項39に記載の方法のための方法。

【0279】

4 1 . スペーサー分子が、反応性基に対して抗体にコンジュゲートされている、項 3 9 に記載の方法。

【 0 2 8 0 】

4 2 . 反応性基がアミン基である、項 4 1 に記載の方法。

【 0 2 8 1 】

4 3 . アミン基がリジン残基上にある、項 4 2 に記載の方法。

【 0 2 8 2 】

4 4 . 蛍光標識が正に荷電している、項 3 9 ~ 4 3 に記載の方法。

【 0 2 8 3 】

4 5 . 蛍光色素が A L E X A F L U O R (登録商標) および D Y L I G H T (商標) から選択される、項 3 9 ~ 4 3 に記載の方法。 10

【 0 2 8 4 】

4 6 . 蛍光標識が、A L E X A F L U O R (登録商標) 3 5 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 4 0 5、A L E X A F L U O R (登録商標) 4 3 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 4 8 8、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 0 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 1 4、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 3 2、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 4 6、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 5 5、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 6 8、A L E X A F L U O R (登録商標) 5 9 4、A L E X A F L U O R (登録商標) 6 1 0 - X、A L E X A F L U O R (登録商標) 6 3 3、A L E X A F L U O R (登録商標) 6 4 7、A L E X A F L U O R (登録商標) 6 6 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 6 8 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 7 0 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 7 5 0、A L E X A F L U O R (登録商標) 7 9 0、A M C A - X、B O D I P Y (登録商標) 6 3 0 / 6 5 0、B O D I P Y (登録商標) 6 5 0 / 6 6 5、B O D I P Y (登録商標) F L、B O D I P Y (登録商標) T M R、B O D I P Y (登録商標) T R、B O D I P Y (登録商標) T R - X、C A S C A D E B L U E (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、H E X、J O E、M A R I N A B L U E (登録商標)、O R E G O N G R E E N (登録商標) 4 8 8、O R E G O N G R E E N (登録商標) 5 1 4、P A C I F I C B L U E (商標)、P A C I F I C O R A N G E (商標)、R H O D A M I N E G R E E N (商標)、Q S Y (登録商標) 7、Q S Y (登録商標) 9、Q S Y (登録商標) 2 1、Q S Y (登録商標) 3 5、R O X、R H O D A M I N E R E D (商標)、T E T、T A M R A、テトラメチルローダミン、F A M、T E X A S R E D (登録商標)、および 7 - ヒドロキシ - 9 H - (1 , 3 - ジクロロ - 9 , 9 - ジメチルアクリジン - 2 - オン) スクシンイミジルエステル (D D A O - S E) からなる群から選択される、項 3 9 ~ 4 3 に記載の方法。 20 30

【 0 2 8 5 】

4 7 . 蛍光標識が、D Y L I G H T (商標) 3 5 0、D Y L I G H T (商標) 4 0 5、D Y L I G H T (商標) 4 8 8、D Y L I G H T (商標) 5 5 0、D Y L I G H T (商標) 5 9 4、D Y L I G H T (商標) 6 3 3、D Y L I G H T (商標) 6 5 0、D Y L I G H T (商標) 6 8 0、D Y L I G H T (商標) 7 5 5、および D Y L I G H T (商標) 8 0 0 からなる群から選択される、項 3 9 ~ 4 3 および 4 5 に記載の方法。 40

【 0 2 8 6 】

4 8 . スペーサー分子が負に荷電しているか中性である、項 3 9 ~ 4 3 に記載の方法。

【 0 2 8 7 】

4 9 . スペーサー分子が、アセテートおよびポリエチレングリコール (P E G) から選択される、項 3 9 ~ 4 3 に記載の方法。

【 0 2 8 8 】

5 0 . スペーサー分子がアセチル基を含む、項 3 9 ~ 4 8 に記載の方法。

【 0 2 8 9 】

5 1 . スペーサー分子がアセテート分子を含む、項 3 9 ~ 4 9 に記載の方法。

【 0 2 9 0 】

52. アセテート分子がスルホ - N H S - アセテートである、項 5 1 に記載の方法。

【0291】

53. スペーサー分子が (P E G) n を含み、式中、n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、項 3 9 ~ 5 2 に記載の方法。

【0292】

54. スペーサー分子が M S - (P E G) n を含み、式中、n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、項 3 9 ~ 5 2 に記載の方法。

【0293】

55. スペーサー分子が、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル (- C (O) C_nH_m) から選択される基を含み、式中、n が 1 ~ 20 個の原子であり、m > n であり、炭素原子が、単結合、二重結合、および / または三重結合によって互いに結合することができる、項 3 9 ~ 4 8 に記載の方法。

【0294】

56. アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、 - (O C H₂ C H₂ O)_x - (C H₂)_y - O R によってさらに置換され、式中、x が 1 ~ 20 であり、y が 1 ~ 6 であり、R が H または C₁ ~ 6 アルキルである、項 3 9 ~ 4 8 に記載の方法。

【0295】

57. アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、アンモニウム (- N H₃⁺)、第 4 級アンモニウム (- N R₃⁺) 基でさらに置換され、式中、R が C₁ ~ 6 アルキルである、項 5 5 に記載の方法。

【0296】

58. アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、ホスホニウム基 (- P Q₃⁺) によってさらに置換され、式中、Q がアリール、置換されたアリール、または C₁ ~ 6 アルキルである、項 5 5 に記載の方法。

【0297】

59. 蛍光標識の抗体に対する比が 1 ~ 50 である、項 3 9 ~ 5 8 に記載の方法。

【0298】

60. 蛍光標識の抗体に対する比が 5 ~ 30 である、項 5 9 に記載の方法。

【0299】

61. 蛍光標識の抗体に対する比が 1 ~ 20 である、項 5 9 に記載の方法。

【0300】

62. スペーサー分子のタンパク質に対する比が 1 ~ 50 である、項 3 9 ~ 6 1 に記載の方法。

【0301】

63. スペーサー分子のタンパク質に対する比が 5 ~ 30 である、項 6 2 に記載の方法。

【0302】

64. スペーサー分子のタンパク質に対する比が 5 ~ 30 である、項 6 2 に記載の方法。

【0303】

65. スペーサー分子のタンパク質に対する比が 1 ~ 20 である、項 6 2 に記載の方法。

【0304】

66. スペーサー分子が、0.1 ~ 2.5 倍、1 ~ 1.5 倍、または 2.5 ~ 1.0 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項 3 9 ~ 6 5 に記載の方法。

【0305】

67. スペーサー分子が、2.5 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項 6 6 に記載の方法。

【0306】

68. スペーサー分子が、5 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項 6 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 3 0 7 】

69．スペーサー分子が、7.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項66に記載の方法。

【 0 3 0 8 】

70．スペーサー分子が、10倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項66に記載の方法。

【 0 3 0 9 】

71．複数の蛍光標識によって占有されている抗体上の結合部位の割合が1%～99%である、項39～70に記載の方法。

【 0 3 1 0 】

72．スペーサー分子の存在が、蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる、項39～71に記載の方法。

【 0 3 1 1 】

73．蛍光標識された生体分子の蛍光発光を増強することができるスペーサー分子を同定する方法であって、

(a) 生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識とは独立して、スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートすることと、

(b) 生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識に加えてスペーサー分子の存在が複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるかどうかを試験することと、

(c) スペーサー分子を、生体分子にコンジュゲートした複数の蛍光標識に加えてスペーサー分子の存在が複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるときにタンパク質にコンジュゲートした蛍光標識の消光を減少させるものとして同定することと、を含む、方法。

【 0 3 1 2 】

74．スペーサー分子が、生体分子上に存在する最初のリジン側鎖で生体分子にコンジュゲートされている、項73に記載の方法。

【 0 3 1 3 】

75．生体分子が抗体または抗体断片である、項73～74に記載の方法。

【 0 3 1 4 】

76．複数の蛍光標識が正に荷電している、項73～75に記載の方法。

【 0 3 1 5 】

77．スペーサー分子が正に荷電している、項73～76に記載の方法。

【 0 3 1 6 】

78．複数の蛍光標識が負に荷電している、項73～74に記載の方法。

【 0 3 1 7 】

79．スペーサー分子が負に荷電している、項73～76に記載の方法。

【 0 3 1 8 】

80．複数の蛍光標識がALEXA FLUOR(登録商標)およびDYLIGHT(商標)分子から選択される色素である、項73～79に記載の方法。

【 0 3 1 9 】

81．複数の蛍光標識が、ALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)500、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610-X、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、A

10

20

30

40

50

LEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630 / 650、BODIPY (登録商標) 650 / 665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、および7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)から選択される、項73~79に記載の方法。

10

【0320】

82. 複数の蛍光標識が、DYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、およびDYLIGHT (商標) 800から選択される、項73~80に記載の方法。

20

【0321】

83. スペーサー分子が、アセテートおよびPEGから選択される、項73~82に記載の方法。

【0322】

84. 複数の蛍光標識がコンジュゲーション分子によって抗体にコンジュゲートされている、項73~83に記載の方法。

【0323】

85. 複数の蛍光標識が最初のリジン側鎖で抗体にコンジュゲートされている、項73~84に記載の方法。

【0324】

86. スペーサー分子が、最初のリジン側鎖で抗体にコンジュゲートされている、項85に記載の方法。

30

【0325】

87. 抗体への複数の蛍光標識の、色素とタンパク質の比が1~50である、項73~86に記載の方法。

【0326】

88. 抗体への複数の蛍光標識の、色素とタンパク質の比が5~30である、項87に記載の方法。

【0327】

89. 抗体への複数の蛍光標識の、色素とタンパク質の比が1~20である、項87に記載の方法。

40

【0328】

90. スペーサー分子のタンパク質に対する比が1~50である、項73~88に記載の方法。

【0329】

91. スペーサー分子のタンパク質に対する比が5~30である、項90に記載の方法。

【0330】

92. スペーサー分子のタンパク質に対する比が5~30である、項90に記載の方法。

【0331】

93. スペーサー分子のタンパク質に対する比が1~20である、項90に記載の方法。

50

【0332】

94．スペーサー分子が、0.1～25倍、1～15倍、または2.5～10倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項73～89に記載の方法。

【0333】

95．スペーサー分子が、2.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項94に記載の方法。

【0334】

96．スペーサー分子が、5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項94に記載の方法。

【0335】

97．スペーサー分子が、7.5倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項94に記載の方法。

【0336】

98．スペーサー分子が、10倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、項94に記載の方法。

【0337】

99．複数の蛍光標識によって占有されている抗体上の結合部位の割合が1%～99%である、項73～98に記載の方法。

【0338】

100．スペーサー分子の存在が、蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる、項99に記載の方法。

【0339】

101．生体試料中の所望の標的の存在を決定する方法であって、
 (a) 生体試料を組成物、抗体と接触させることであって、2つ以上の蛍光標識と2つ以上のスペーサー分子が抗体と共有結合し、蛍光体とスペーサー分子が互いに共有結合していない、接触させることと、
 (b) 複数の蛍光標識によって発光される蛍光を検出することと、
 (c) 複数の蛍光標識によって発光された蛍光が検出されるときに、生体試料中の所望の標的の存在を決定することと、を含む、方法。

【0340】

102．生体試料が細胞溶解物を含む、項101に記載の方法。

【0341】

103．生体試料が無傷の細胞を含む、項101に記載の方法。

【0342】

104．生体試料が単離されたタンパク質を含む、項101に記載の方法。

【0343】

105．生体試料が組換えタンパク質を含む、項101に記載の方法。

【0344】

106．生体試料が固体支持体上に固定化されている、項101～105に記載の方法。

【0345】

107．生体試料が流体中の無傷の細胞を含む、項101に記載の方法。

【0346】

108．生体試料が生きている動物である、項101に記載の方法。

【0347】

109．生きている動物が哺乳動物である、項108に記載の方法。

【0348】

110．第1の核酸分子を含む組成物であって、2つ以上の蛍光標識および2つ以上の

10

20

30

40

50

スペーサー分子が第1の核酸分子に共有結合し、蛍光体とスペーサー分子は互いに共有結合していない組成物。

【0349】

111. 第1の核酸分子が、等量の蛍光標識を用いて調製されたがスペーサー分子を含まない第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示す、項110に記載の組成物。

【0350】

112. 第1の核酸分子が第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示し、第1の核酸分子および第2の核酸分子がそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、第2の核酸分子が、共有結合したスペーサー分子を有さない、項110に記載の組成物。

【0351】

113. 複数の蛍光標識にコンジュゲートした抗体を含むコンジュゲート抗体であって、以下の特徴、

(a) 蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比、

(b) 少なくとも4つの蛍光標識を抗体にコンジュゲートすること、および/または

(c) 抗体の全蛍光が、非コンジュゲート蛍光分子の蛍光より少なくとも20パーセント大きい、のうちの1つ以上を含む、コンジュゲート抗体。

【0352】

114. 蛍光標識が1つ以上のマルチアームポリマーによって抗体にコンジュゲートされている、項113に記載のコンジュゲート抗体。

【0353】

115. 蛍光標識が1つのマルチアームポリマーによって抗体にコンジュゲートされている、項113～114に記載のコンジュゲート抗体。

【0354】

116. 蛍光標識が2～10のマルチアームポリマーによって抗体にコンジュゲートされている、項113および114に記載のコンジュゲート抗体。

【0355】

117. 2つ以上の蛍光標識が抗体にコンジュゲートしている、項116に記載のコンジュゲート抗体。

【0356】

118. マルチアームポリマーのアームが、

(a) ポリエチレングリコール、

(b) 多糖類、および

(c) ポリペプチド

からなる群から選択される種類の化学物質から構成される、項113～117に記載のコンジュゲート抗体。

【0357】

119. 蛍光標識間の平均ブラシ距離が200～800オングストロームである、項113～118に記載のコンジュゲート抗体。

【0358】

120. 蛍光標識が少なくとも16の共有結合によって抗体から離れている、項113～119に記載のコンジュゲート抗体。

【0359】

121. 蛍光標識が16～800の共有結合によって抗体から離れている、項120に記載のコンジュゲート抗体。

【0360】

122. 蛍光標識が、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA

10

20

30

40

50

FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)からなる群から選択される色素、ならびにDYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、およびDYLIGHT (商標) 800、およびPEG化DYLIGHT (商標) 色素からなる群からの蛍光標識である、項120に記載のコンジュゲート抗体。

10

20

【0361】

123. 蛍光標識された生体分子を調製する方法であって、

(a) 反応性基および2つ以上の蛍光標識をスペーサー分子にコンジュゲートし、それによって蛍光標識されたスペーサー分子を形成することと、

(b) 蛍光標識されたスペーサー分子を生体分子にコンジュゲートし、それによって蛍光標識された生体分子を形成することと、を含み、

蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識が、蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比を有する、方法。

30

【0362】

124. 平均1~10個の蛍光標識されたスペーサー分子が各生体分子にコンジュゲートしている、項123に記載の方法。

【0363】

125. 平均3~10個の蛍光標識されたスペーサー分子が各生体分子にコンジュゲートしている、項123に記載の方法。

【0364】

126. 蛍光標識されたスペーサー分子がマルチアームポリマーである、項123~125に記載の方法。

【0365】

127. マルチアームポリマーが分岐鎖ポリエチレングリコール分子である、項126に記載の方法。

40

【0366】

128. マルチアームポリマーが4~10個の蛍光標識にコンジュゲートしている、項126に記載の方法。

【0367】

129. マルチアームポリマーが、4,000~80,000ダルトンの分子量を有する、項126に記載の方法。

【0368】

130. 蛍光標識された生体分子を検出する方法であって、

50

(a) 生体分子にコンジュゲートした蛍光標識を励起する光に蛍光標識された生体分子を曝露することと、

(b) 生体分子にコンジュゲートした蛍光標識によって生成された発光を検出することと、を含み、

蛍光標識された生体分子が、4つ以上の蛍光標識にコンジュゲートし、

蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識が、蛍光標識1個あたりに基づいて0.7以上の蛍光比を有する、方法。

【0369】

131. 蛍光標識された生体分子が抗体である、項130に記載の方法。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕第1の抗体を含む組成物であって、

2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が前記第1の抗体に共有結合し、前記蛍光標識およびスペーサー分子が互いに共有結合していない、組成物。

〔2〕前記第1の抗体が、等量の蛍光標識を用いて調製されたが前記スペーサー分子を含まない第2の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示す、前記〔1〕に記載の組成物。

〔3〕前記第1の抗体が第2の抗体よりも高い蛍光発光レベルを示し、前記第1の抗体および前記第2の抗体がそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、前記第2の抗体が共有結合したスペーサー分子を有さない、前記〔1〕に記載の組成物。

〔4〕前記スペーサー分子が、前記蛍光標識の消光を、前記スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、前記〔1〕に記載の組成物。

〔5〕前記スペーサー分子が、反応性基に対して前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔1〕に記載の組成物。

〔6〕前記反応性基がアミン基である、前記〔5〕に記載の組成物。

〔7〕前記アミン基がリジン残基上にある、前記〔6〕に記載の組成物。

〔8〕前記蛍光標識がコンジュゲーション分子によって前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔1〕に記載の組成物。

〔9〕前記蛍光標識が正に荷電している、前記〔1〕に記載の組成物。

〔10〕前記蛍光標識がALEXA FLUOR(登録商標)色素またはDYLIGHT(商標)色素である、前記〔1〕に記載の組成物。

〔11〕前記蛍光標識が、ALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)500、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610-X、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、ALEXA FLUOR(登録商標)790、AMCA-X、BODIPY(登録商標)630/650、BODIPY(登録商標)650/665、BODIPY(登録商標)FL、BODIPY(登録商標)TMR、BODIPY(登録商標)TR、BODIPY(登録商標)TR-X、CASCADE BLUE(登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE(登録商標)、OREGON GREEN(登録商標)488、OREGON GREEN(登録商標)514、PACIFIC BLUE(商標)、PACIFIC ORANGE(商標)、RHODAMINE GREEN(商標)、QSY(登録商標)7、QSY(登録商標)9、QSY(登録商標)21、QSY(登録商標)35、ROX、RHODAMINE RED(商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED(登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO

10

20

30

40

50

- SE) からなる群から選択される色素である、前記〔1〕に記載の組成物。

〔12〕前記蛍光標識が、DYLIGHT(商標)350、DYLIGHT(商標)405、DYLIGHT(商標)488、DYLIGHT(商標)550、DYLIGHT(商標)594、DYLIGHT(商標)633、DYLIGHT(商標)650、DYLIGHT(商標)680、DYLIGHT(商標)755、およびDYLIGHT(商標)800からなる群から選択される色素である、前記〔1〕に記載の組成物。

〔13〕前記 Spacer 分子が負に荷電しているか中性である、前記〔1〕に記載の組成物。

〔14〕前記 Spacer 分子が、アセテートおよびポリエチレングリコール(PEG)から選択される、前記〔1〕に記載の組成物。

〔15〕前記 Spacer 分子がアセチル基を含む、前記〔1〕に記載の組成物。

〔16〕前記 Spacer 分子がアセテート分子を含む、前記〔1〕に記載の組成物。

〔17〕前記アセテート分子がスルホ-NHS-アセテートである、前記〔1〕に記載の組成物。

〔18〕前記 Spacer 分子が(PEG)_nを含むかまたはそれからなり、式中、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、前記〔1〕に記載の組成物。

〔19〕前記 Spacer 分子がMS-(PEG)_nを含み、式中、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、前記〔1〕に記載の組成物。

〔20〕前記 Spacer 分子が、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル(-C(O)C_nH_m)から選択される基を含むか、またはそれらからなり、式中、nが1~20個の原子であり、m>nであり、炭素原子が、単結合、二重結合、および/または三重結合によって互いに結合し得る、前記〔1〕に記載の組成物。

〔21〕前記アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基が、-(OCH₂CH₂O)_x-(CH₂)_y-ORによってさらに置換され、式中、xが1~20であり、yが1~6であり、RがHまたはC₁~6アルキルである、前記〔1〕に記載の組成物。

〔22〕前記アルキル、アルケニル、および/またはアルキニル基が、アンモニウム(-NH₃⁺)、第4級アンモニウム(-NR₃⁺)基でさらに置換され、式中、RがC₁~6アルキルである、前記〔21〕に記載の組成物。

〔23〕前記蛍光色素が、1つ以上のALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)500、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610-X、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、ALEXA FLUOR(登録商標)790、AMCA-X、BODIPY(登録商標)630/650、BODIPY(登録商標)650/665、BODIPY(登録商標)FL、BODIPY(登録商標)TMR、BODIPY(登録商標)TR、BODIPY(登録商標)TR-X、CASCADE BLUE(登録商標)、ジトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE(登録商標)、OREGON GREEN(登録商標)488、OREGON GREEN(登録商標)514、PACIFIC BLUE(商標)、PACIFIC ORANGE(商標)、RHODAMINE GREEN(商標)、QSY(登録商標)7、QSY(登録商標)9、QSY(登録商標)21、QSY(登録商標)35、ROX、RHODAMINE RED(商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED(登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H

10

20

30

40

50

- (1 , 3 - ジクロロ - 9 , 9 - ジメチルアクリジン - 2 - オン) スクシンイミジルエステル (D D A O - S E) 、 ならびに D Y L I G H T (商標) 3 5 0 、 D Y L I G H T (商標) 4 0 5 、 D Y L I G H T (商標) 4 8 8 、 D Y L I G H T (商標) 5 5 0 、 D Y L I G H T (商標) 5 9 4 、 D Y L I G H T (商標) 6 3 3 、 D Y L I G H T (商標) 6 5 0 、 D Y L I G H T (商標) 6 8 0 、 D Y L I G H T (商標) 7 5 5 、 および D Y L I G H T (商標) 8 0 からなる群からのものを含み、

前記スペーサー分子が、

スルホ - N H S - アセテート ;

(P E G) n (式中、 n が 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , または 1 5 から選択される) ;

M S - (P E G) n (式中、 n が 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , または 1 5 から選択される) ;

アルカノイル、アルケノイル、またはアルキノイル (- C (O) C_nH_m) (式中、 n が 1 ~ 2 0 個の原子であり、 $m > n$ であり、炭素原子が、単結合、二重結合、および / または三重結合で互いに結合し得る) ; あるいは

- (O C H₂ C H₂ O)_x - (C H₂)_y - O R (式中、 x が 1 ~ 2 0 であり、 y が 1 ~ 6 であり、 R が H もしくは C₁ ~ 6 アルキルである) によってさらに置換されたアルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基であって、または前記アルキル、アルケニル、および / もしくはアルキニル基がアンモニウム (- N H₃⁺) 、第 4 級アンモニウム ((- N R₃⁺) 基でさらに置換され、式中、 R が C₁ ~ 6 アルキルである、アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基

のうちの 1 つ以上を含む、前記 [1] に記載の組成物。

[2 4] 前記アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、ホスホニウム基 (- P Q₃⁺) によってさらに置換され、式中、 Q がアリール、置換されたアリール、または C₁ ~ 6 アルキルである、前記 [2 3] に記載の組成物。

[2 5] 蛍光標識の抗体に対する比が 1 ~ 5 0 である、前記 [1] に記載の組成物。

[2 6] 蛍光標識の抗体に対する前記比が 5 ~ 3 0 である、前記 [2 5] に記載の組成物。

[2 7] 蛍光標識の抗体に対する前記比が 1 ~ 2 0 である、前記 [2 5] に記載の組成物。

[2 8] 前記スペーサー分子の抗体に対する比が 1 ~ 5 0 である、前記 [1] に記載の組成物。

[2 9] 前記スペーサー分子の抗体に対する前記比が 5 ~ 3 0 である、前記 [2 8] に記載の組成物。

[3 0] 前記スペーサー分子の抗体に対する前記比が 5 ~ 3 0 である、前記 [2 8] に記載の組成物。

[3 1] 前記スペーサー分子の抗体に対する前記比が 1 ~ 2 0 である、前記 [2 8] に記載の組成物。

[3 2] 前記スペーサー分子が、 0 . 1 ~ 2 . 5 倍、 1 ~ 1 . 5 倍、または 2 . 5 ~ 1 0 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記 [1] に記載の組成物。

[3 3] 前記スペーサー分子が、 2 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記 [3 2] に記載の組成物。

[3 4] 前記スペーサー分子が、 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記 [3 3] に記載の組成物。

[3 5] 前記スペーサー分子が、 7 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記 [3 3] に記載の組成物。

[3 6] 前記スペーサー分子が、 1 0 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記 [3 3] に記載の組成物。

[3 7] 前記複数の蛍光標識によって占有されている前記抗体上の結合部位の割合が 1 % ~ 9 9 % である、前記 [3 3] に記載の組成物。

[3 8] 前記スペーサー分子の存在が、前記蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも 2 0 % 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 6 0 % 、少

10

20

30

40

50

なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる、前記〔1〕に記載の組成物。

〔39〕蛍光標識された生体分子の蛍光を増加させる方法であって、

（a）スペーサー分子を生体分子にコンジュゲートすることと、
（b）前記生体分子に蛍光標識をコンジュゲートすることと、を含み、
ステップ（a）および（b）は同時にまたは任意の順序で行うことができ、
前記スペーサーと蛍光標識は互いにコンジュゲートされていない、方法。

〔40〕前記スペーサー分子が、前記蛍光標識の消光を、前記スペーサー分子の非存在下での消光と比較して減少させる、前記〔39〕に記載の方法。

〔41〕前記スペーサー分子が、反応性基に対して前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔39〕に記載の方法。

〔42〕前記反応性基がアミン基である、前記〔41〕に記載の方法。

〔43〕前記アミン基がリジン残基上にある、前記〔42〕に記載の方法。

〔44〕前記蛍光標識が正に荷電している、前記〔39〕に記載の方法。

〔45〕前記蛍光色素がALEXA FLUOR（登録商標）およびDYLIGHT（商標）から選択される、前記〔39〕に記載の方法。

〔46〕前記蛍光標識が、ALEXA FLUOR（登録商標）350、ALEXA FLUOR（登録商標）405、ALEXA FLUOR（登録商標）430、ALEXA FLUOR（登録商標）488、ALEXA FLUOR（登録商標）500、ALEXA FLUOR（登録商標）514、ALEXA FLUOR（登録商標）532、ALEXA FLUOR（登録商標）546、ALEXA FLUOR（登録商標）555、ALEXA FLUOR（登録商標）568、ALEXA FLUOR（登録商標）594、ALEXA FLUOR（登録商標）610-X、ALEXA FLUOR（登録商標）633、ALEXA FLUOR（登録商標）647、ALEXA FLUOR（登録商標）660、ALEXA FLUOR（登録商標）680、ALEXA FLUOR（登録商標）700、ALEXA FLUOR（登録商標）750、ALEXA FLUOR（登録商標）790、AMCA-X、BODIPY（登録商標）630/650、BODIPY（登録商標）650/665、BODIPY（登録商標）FL、BODIPY（登録商標）TMR、BODIPY（登録商標）TR、BODIPY（登録商標）TR-X、CASCADE BLUE（登録商標）、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE（登録商標）、OREGON GREEN（登録商標）488、OREGON GREEN（登録商標）514、PACIFIC BLUE（商標）、PACIFIC ORANGE（商標）、RHODAMINE GREEN（商標）、QSY（登録商標）7、QSY（登録商標）9、QSY（登録商標）21、QSY（登録商標）35、ROX、RHODAMINE RED（商標）、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED（登録商標）、および7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)からなる群から選択される、前記〔39〕に記載の方法。

〔47〕前記蛍光標識が、DYLIGHT（商標）350、DYLIGHT（商標）405、DYLIGHT（商標）488、DYLIGHT（商標）550、DYLIGHT（商標）594、DYLIGHT（商標）633、DYLIGHT（商標）650、DYLIGHT（商標）680、DYLIGHT（商標）755、およびDYLIGHT（商標）800からなる群から選択される、前記〔39〕に記載の方法。

〔48〕前記スペーサー分子が負に荷電しているか中性である、前記〔39〕に記載の方法。

〔49〕前記スペーサー分子が、アセテートおよびポリエチレングリコール(PEG)から選択される、前記〔39〕に記載の方法。

〔50〕前記スペーサー分子がアセチル基を含む、前記〔39〕に記載の方法。

〔51〕前記スペーサー分子がアセテート分子を含む、前記〔39〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔 5 2 〕 前記アセテート分子がスルホ - N H S - アセテートである、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 5 3 〕 前記スペーサー分子が (P E G) n を含み、式中、n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 5 4 〕 前記スペーサー分子が M S - (P E G) n を含み、式中、n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15から選択される、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 5 5 〕 前記スペーサー分子が、アルカノイル、アルケノイル、およびアルキノイル (- C (O) C_nH_m) から選択される基を含み、式中、n が 1 ~ 20 個の原子であり、m > n であり、炭素原子が、単結合、二重結合、および / または三重結合によって互いに結合し得る、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

10

〔 5 6 〕 前記アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、- (O C H₂ C H₂ O)_x - (C H₂)_y - O R によってさらに置換され、式中、x が 1 ~ 20 であり、y が 1 ~ 6 であり、R が H または C₁ ~ 6 アルキルである、前記〔 5 5 〕に記載の方法。

〔 5 7 〕 前記アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、アンモニウム ((- N H₃⁺))、第 4 級アンモニウム (- N R₃⁺) 基でさらに置換され、式中、R が C₁ ~ 6 アルキルである、前記〔 5 5 〕に記載の方法。

〔 5 8 〕 前記アルキル、アルケニル、および / またはアルキニル基が、ホスホニウム基 (- P Q₃⁺) によってさらに置換され、式中、Q がアリール、置換されたアリール、または C₁ ~ 6 アルキルである、前記〔 5 5 〕に記載の方法。

20

〔 5 9 〕 蛍光標識の抗体に対する比が 1 ~ 50 である、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 6 0 〕 蛍光標識の抗体に対する前記比が 5 ~ 30 である、前記〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 1 〕 蛍光標識の抗体に対する前記比が 1 ~ 20 である、前記〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 2 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する比が 1 ~ 50 である、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 6 3 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 5 ~ 30 である、前記〔 6 2 〕に記載の方法。

〔 6 4 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 5 ~ 30 である、前記〔 6 2 〕に記載の方法。

30

〔 6 5 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 1 ~ 20 である、前記〔 6 2 〕に記載の方法。

〔 6 6 〕 前記スペーサー分子が、0 . 1 ~ 2 . 5 倍、1 ~ 1 . 5 倍、または 2 . 5 ~ 1 . 0 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 6 7 〕 前記スペーサー分子が、2 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 6 6 〕に記載の方法。

〔 6 8 〕 前記スペーサー分子が、5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 6 6 〕に記載の方法。

〔 6 9 〕 前記スペーサー分子が、7 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 6 6 〕に記載の方法。

40

〔 7 0 〕 前記スペーサー分子が、1 . 0 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 6 6 〕に記載の方法。

〔 7 1 〕 前記複数の蛍光標識によって占有されている前記抗体上の結合部位の割合が 1 % ~ 99 % である、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 7 2 〕 前記スペーサー分子の存在が、前記蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 100 %、少なくとも 125 %、少なくとも 150 %、少なくとも 200 %、少なくとも 300 %、少なくとも 400 %、または少なくとも 500 % 増加させる、前記〔 3 9 〕に記載の方法。

〔 7 3 〕 蛍光標識された生体分子の蛍光発光を増強することができるスペーサー分子を同

50

定する方法であって、

〔 a 〕生体分子にコンジュゲートされた複数の蛍光標識とは独立して、スパーサー分子を前記生体分子にコンジュゲートすることと、

〔 b 〕前記生体分子にコンジュゲートされた前記複数の蛍光標識に加えて前記スパーサー分子の存在が前記複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるかどうかを試験することと、

〔 c 〕前記スパーサー分子を、前記生体分子にコンジュゲートされた前記複数の蛍光標識に加えて前記スパーサー分子の存在が前記複数の蛍光標識の検出可能な蛍光を増加させるときに、前記タンパク質にコンジュゲートされた前記蛍光標識の消光を減少させるものとして同定することと、を含む、方法。

〔 74 〕前記スパーサー分子が、前記生体分子上に存在する最初のリジン側鎖で前記生体分子にコンジュゲートされている、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 75 〕前記生体分子が抗体または抗体断片である、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 76 〕前記複数の蛍光標識が正に荷電している、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 77 〕前記スパーサー分子が正に荷電している、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 78 〕前記複数の蛍光標識が負に荷電している、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 79 〕前記スパーサー分子が負に荷電している、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 80 〕前記複数の蛍光標識が ALEXA FLUOR (登録商標) および DYLIGHT (商標) 分子から選択される色素である、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 81 〕前記複数の蛍光標識が、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、BODIPY (登録商標) TR、BODIPY (登録商標) TR-X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、および 7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル (DDAO-SE) から選択される、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 82 〕前記複数の蛍光標識が、DYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、および DYLIGHT (商標) 800 から選択される、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 83 〕前記スパーサー分子が、アセテートおよび PEG から選択される、前記〔 73 〕に記載の方法。

〔 84 〕前記複数の蛍光標識がコンジュゲーション分子によって前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔 73 〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔 8 5 〕 前記複数の蛍光標識が最初のリジン側鎖で前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 8 6 〕 前記スペーサー分子が、最初のリジン側鎖で前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 8 7 〕 前記抗体への前記複数の蛍光標識の、前記色素とタンパク質の比が 1 ~ 5 0 である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 8 8 〕 前記抗体への前記複数の蛍光標識の、前記色素とタンパク質の前記比が 5 ~ 3 0 である、前記〔 8 7 〕に記載の方法。

〔 8 9 〕 前記抗体への複数の蛍光標識の、前記色素とタンパク質の前記比が 1 ~ 2 0 である、前記〔 8 7 〕に記載の方法。

〔 9 0 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する比が 1 ~ 5 0 である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 9 1 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 5 ~ 3 0 である、前記〔 9 0 〕に記載の方法。

〔 9 2 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 5 ~ 3 0 である、前記〔 9 0 〕に記載の方法。

〔 9 3 〕 前記スペーサー分子のタンパク質に対する前記比が 1 ~ 2 0 である、前記〔 9 0 〕に記載の方法。

〔 9 4 〕 前記スペーサー分子が、0 . 1 ~ 2 5 倍、1 ~ 1 5 倍、または 2 . 5 ~ 1 0 倍の量で複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 9 5 〕 前記スペーサー分子が、2 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 6 〕 前記スペーサー分子が、5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 7 〕 前記スペーサー分子が、7 . 5 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 8 〕 前記スペーサー分子が、1 0 倍の量で前記複数の蛍光標識に対してモル過剰である、前記〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 9 〕 前記複数の蛍光標識によって占有されている前記抗体上の結合部位の割合が 1 % ~ 9 9 % である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 1 0 0 〕 前記スペーサー分子の存在が、前記蛍光標識の検出可能な蛍光を、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 1 0 0 %、少なくとも 1 2 5 %、少なくとも 1 5 0 %、少なくとも 2 0 0 %、少なくとも 3 0 0 %、少なくとも 4 0 0 %、または少なくとも 5 0 0 % 増加させる、前記〔 9 9 〕に記載の方法。

〔 1 0 1 〕 生体試料中の所望の標的の存在を決定する方法であって、

（ a ）前記生体試料を組成物、抗体と接触させることであって、2 つ以上の蛍光標識と 2 つ以上のスペーサー分子が前記抗体と共有結合し、前記蛍光体とスペーサー分子が互いに共有結合していない、接触させることと、

（ b ）前記複数の蛍光標識によって発光される蛍光を検出することと、

（ c ）前記複数の蛍光標識によって発光された蛍光が検出されるときに、前記生体試料中の前記所望の標的の存在を決定することと、を含む、方法。

〔 1 0 2 〕 前記生体試料が細胞溶解物を含む、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 3 〕 前記生体試料が無傷の細胞を含む、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 4 〕 前記生体試料が単離されたタンパク質を含む、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 5 〕 前記生体試料が組換えタンパク質を含む、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 6 〕 前記生体試料が固体支持体上に固定化されている、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 7 〕 前記生体試料が流体中の無傷の細胞を含む、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

〔 1 0 8 〕 前記生体試料が生きている動物である、前記〔 1 0 1 〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔109〕前記生きている動物が哺乳動物である、前記〔108〕に記載の方法。

〔110〕第1の核酸分子を含む組成物であって、

2つ以上の蛍光標識および2つ以上のスペーサー分子が前記第1の核酸分子に共有結合し、

前記蛍光体およびスペーサー分子が互いに共有結合していない、組成物。

〔111〕前記第1の核酸分子が、等量の蛍光標識を用いて調製されたが前記スペーサー分子を含まない第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示す、前記〔110〕に記載の組成物。

〔112〕前記第1の核酸分子が第2の核酸分子よりも高い蛍光発光レベルを示し、前記第1の核酸分子および前記第2の核酸分子がそれぞれ同数の共有結合した蛍光標識を有し、前記第2の核酸分子が、共有結合したスペーサー分子を有さない、前記〔110〕に記載の組成物。

10

〔113〕複数の蛍光標識にコンジュゲートされた抗体を含むコンジュゲート抗体であって、以下の特徴、

(a) 蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比、

(b) 少なくとも4つの蛍光標識を前記抗体にコンジュゲートすること、および/または

(c) 前記抗体の全蛍光が、非コンジュゲート蛍光分子の蛍光より少なくとも20パーセント大きい、うちの1つ以上を含む、コンジュゲート抗体。

〔114〕前記蛍光標識が1つ以上のマルチアームポリマーによって前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔113〕に記載のコンジュゲート抗体。

20

〔115〕前記蛍光標識が1つのマルチアームポリマーによって前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔114〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔116〕前記蛍光標識が2~10のマルチアームポリマーによって前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔114〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔117〕2つ以上の蛍光標識が前記抗体にコンジュゲートされている、前記〔116〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔118〕前記マルチアームポリマーのアームが、

(a) ポリエチレングリコール、

(b) 多糖類、および

(c) ポリペプチド

30

からなる群から選択される種類の化学物質から構成される、前記〔113〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔119〕前記蛍光標識間の平均ブラシ距離が200~800オングストロームである、前記〔113〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔120〕前記蛍光標識が少なくとも16の共有結合によって前記抗体から離れている、前記〔113〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔121〕前記蛍光標識が16~800の共有結合によって前記抗体から離れている、前記〔120〕に記載のコンジュゲート抗体。

〔122〕前記蛍光標識が、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610-X、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790、AMCA-X、BODIPY (登録商標) 630/650、BODIPY (登録商標) 650/665、BODIPY (登録商標) FL、BODIPY (登録商標) TMR、B

40

50

ODIPLY (登録商標) TR、BODIPLY (登録商標) TR - X、CASCADE BLUE (登録商標)、ジニトロフェニル、フルオレセイン、HEX、JOE、MARINA BLUE (登録商標)、OREGON GREEN (登録商標) 488、OREGON GREEN (登録商標) 514、PACIFIC BLUE (商標)、PACIFIC ORANGE (商標)、RHODAMINE GREEN (商標)、QSY (登録商標) 7、QSY (登録商標) 9、QSY (登録商標) 21、QSY (登録商標) 35、ROX、RHODAMINE RED (商標)、TET、TAMRA、テトラメチルローダミン、FAM、TEXAS RED (登録商標)、または7-ヒドロキシ-9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン)スクシンイミジルエステル(DDAO-SE)からなる群から選択される色素、ならびにDYLIGHT (商標) 350、DYLIGHT (商標) 405、DYLIGHT (商標) 488、DYLIGHT (商標) 550、DYLIGHT (商標) 594、DYLIGHT (商標) 633、DYLIGHT (商標) 650、DYLIGHT (商標) 680、DYLIGHT (商標) 755、およびDYLIGHT (商標) 800、およびPEG化DYLIGHT (商標) 色素からなる群からの蛍光標識である、前記〔120〕に記載のコンジュゲート抗体。

10

〔123〕 蛍光標識された生体分子を調製する方法であって、

(a) 反応性基および2つ以上の蛍光標識をスペーサー分子にコンジュゲートし、それによって蛍光標識されたスペーサー分子を形成することと、

(b) 前記蛍光標識されたスペーサー分子を前記生体分子にコンジュゲートし、それによって前記蛍光標識された生体分子を形成することと、を含み、

20

前記蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識が、蛍光標識1個あたりに基づいて0.5以上の蛍光比を有する、方法。

〔124〕 平均1~10個の蛍光標識されたスペーサー分子が各生体分子にコンジュゲートされている、前記〔123〕に記載の方法。

〔125〕 平均3~10個の蛍光標識されたスペーサー分子が各生体分子にコンジュゲートされている、前記〔123〕に記載の方法。

〔126〕 前記蛍光標識されたスペーサー分子がマルチアームポリマーである、前記〔123〕に記載の方法。

〔127〕 マルチアームポリマーが分岐鎖ポリエチレングリコール分子である、前記〔126〕に記載の方法。

30

〔128〕 前記マルチアームポリマーが4~10個の蛍光標識にコンジュゲートされている、前記〔126〕に記載の方法。

〔129〕 前記マルチアームポリマーが、4,000~80,000ダルトンの分子量を有する、前記〔126〕に記載の方法。

〔130〕 蛍光標識された生体分子を検出する方法であって、

(a) 前記生体分子にコンジュゲートされた蛍光標識を励起する光に前記蛍光標識された生体分子を曝露することと、

(b) 前記生体分子にコンジュゲートされた前記蛍光標識によって生成された発光を検出することと、を含み、

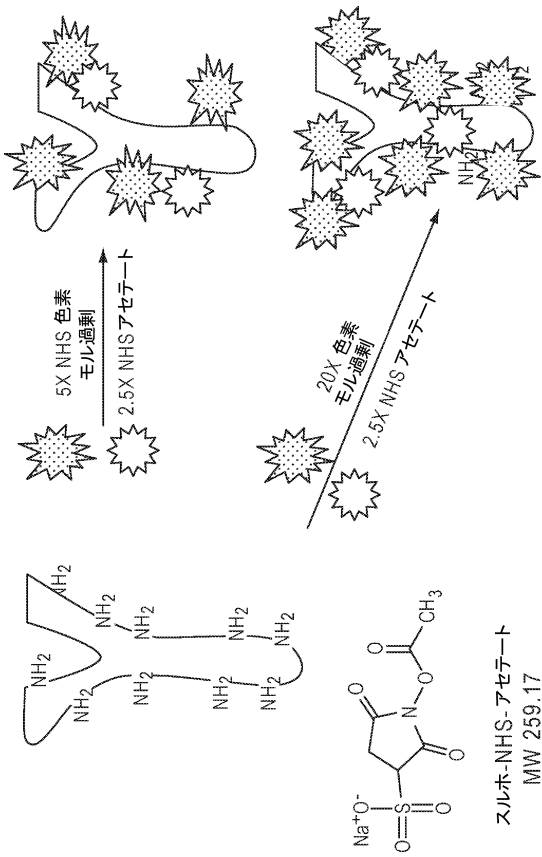
40

前記蛍光標識された生体分子が、4つ以上の蛍光標識にコンジュゲートされ、前記蛍光標識された生体分子の個々の蛍光標識が、蛍光標識1個あたりに基づいて0.7以上の蛍光比を有する、方法。

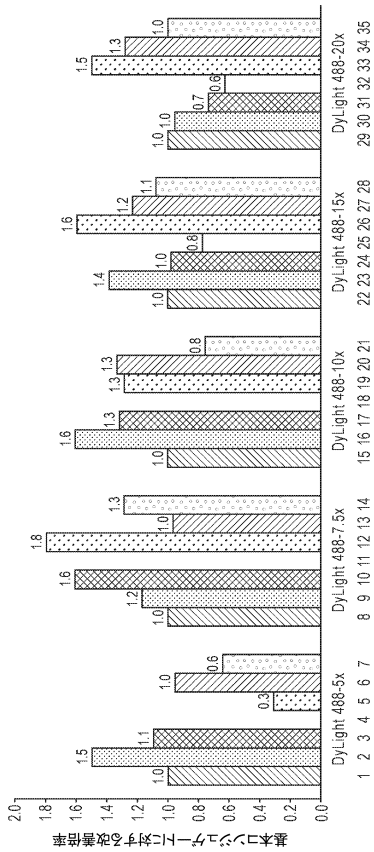
〔131〕 前記蛍光標識された生体分子が抗体である、前記〔130〕に記載の方法。

50

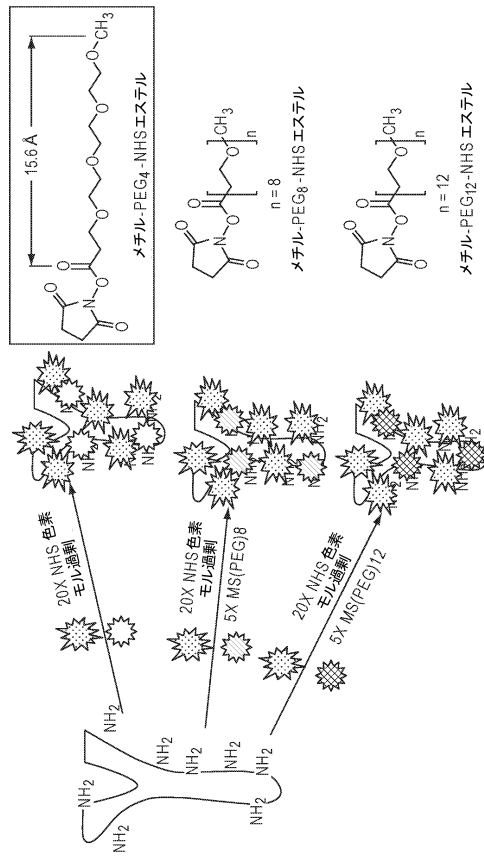
【図面】
【図 1】



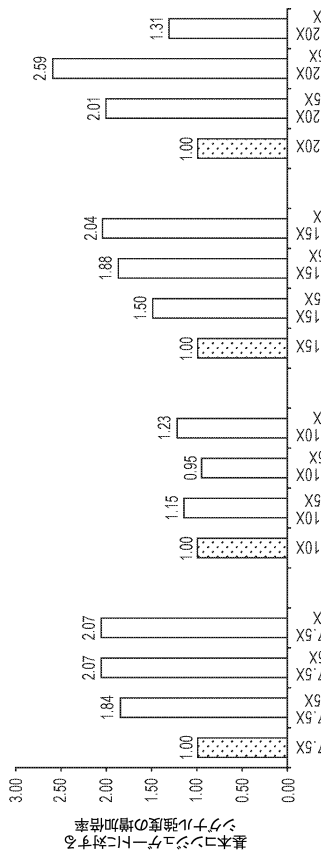
【図 3】



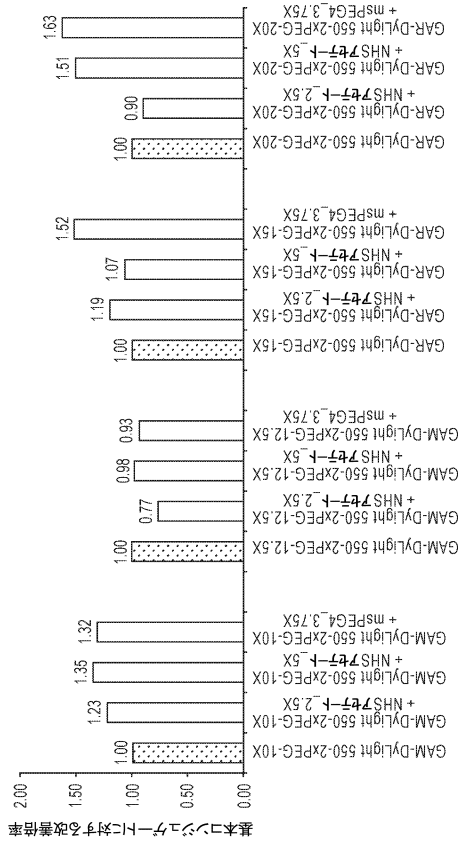
【図 2】



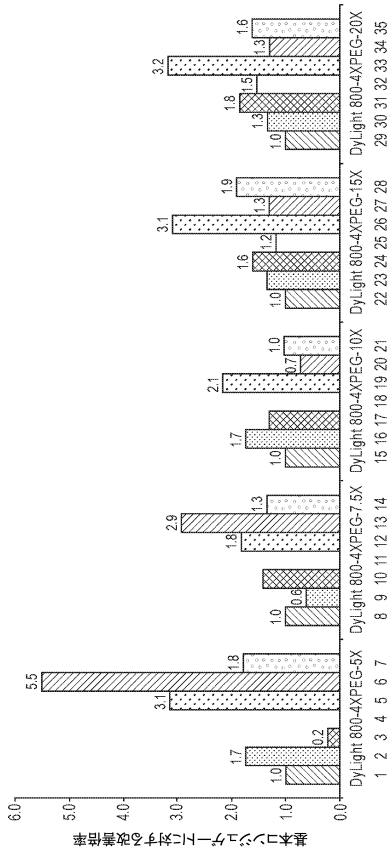
【図 4】



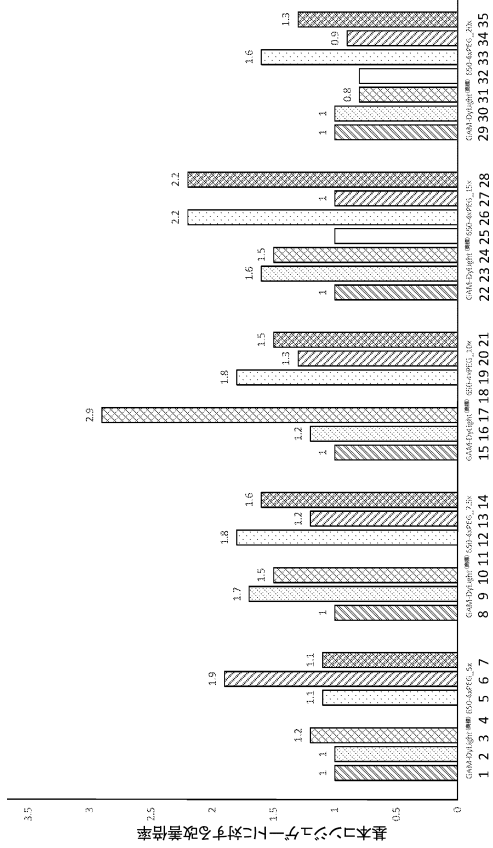
【図5】



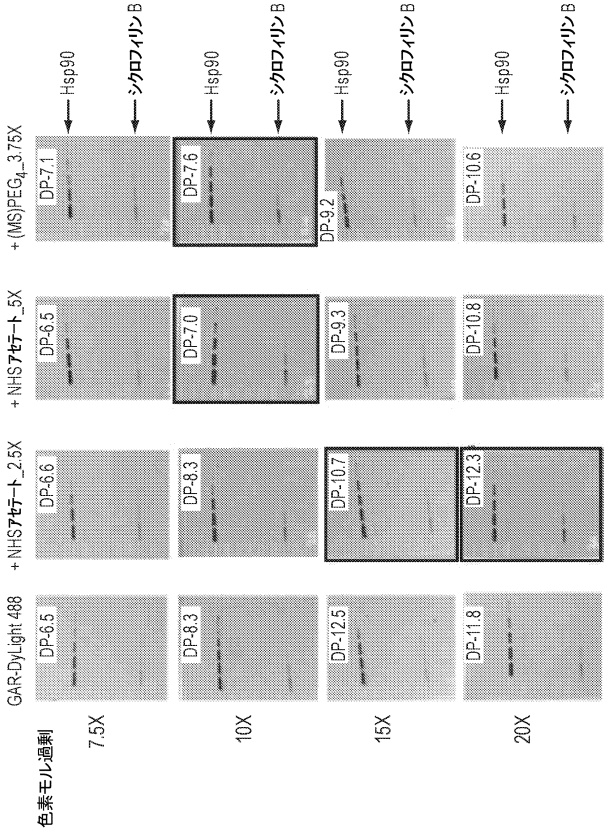
【図7】



【図9】



【図8】



10

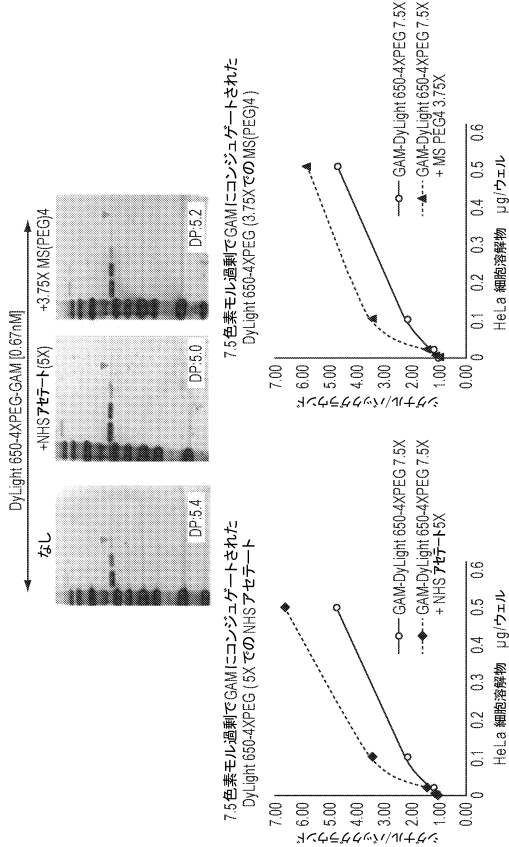
20

30

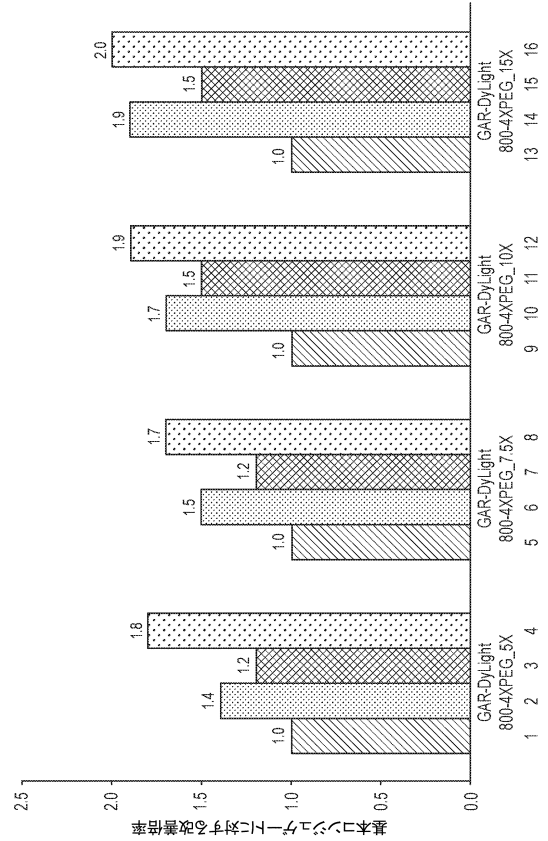
40

50

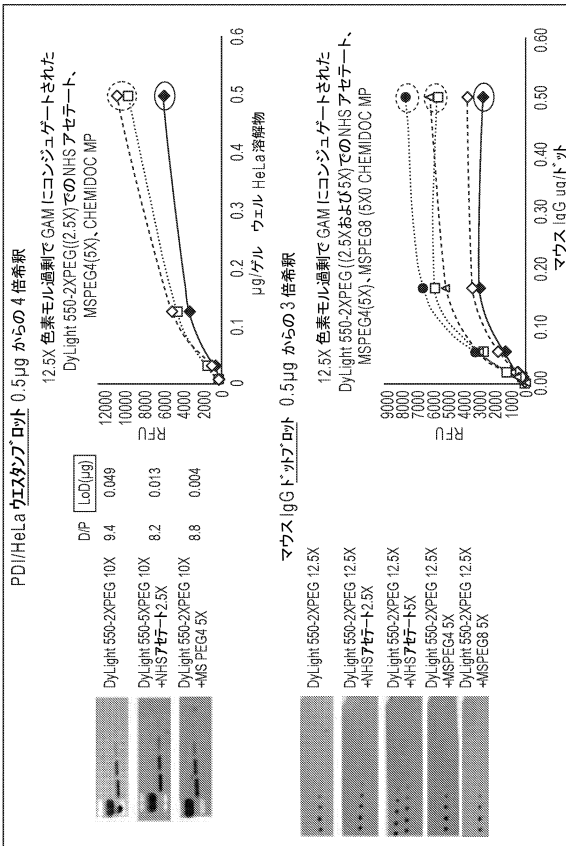
【 図 9 】



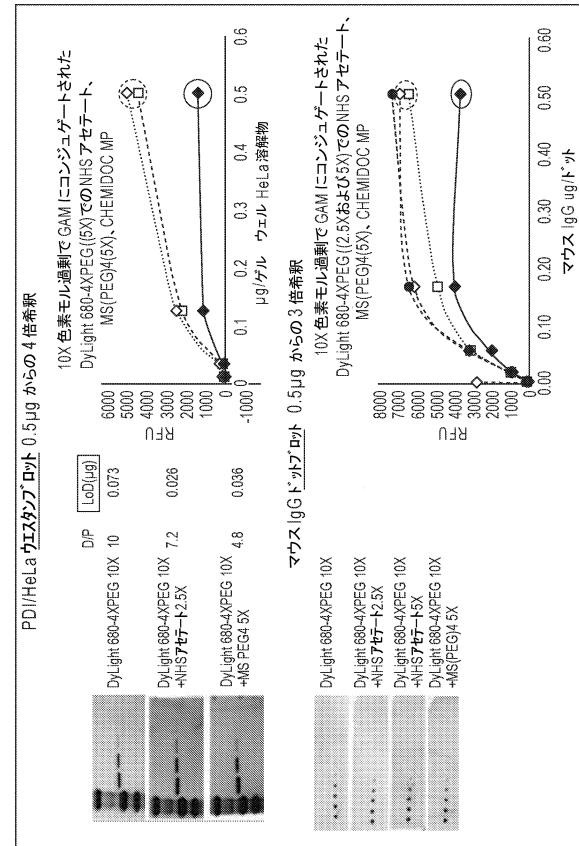
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



10

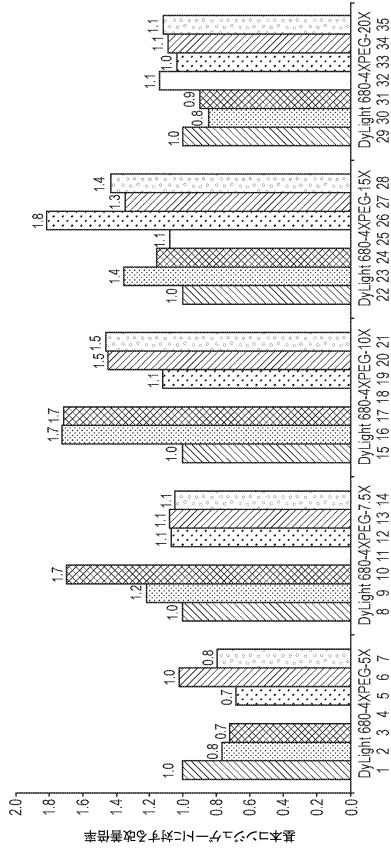
20

30

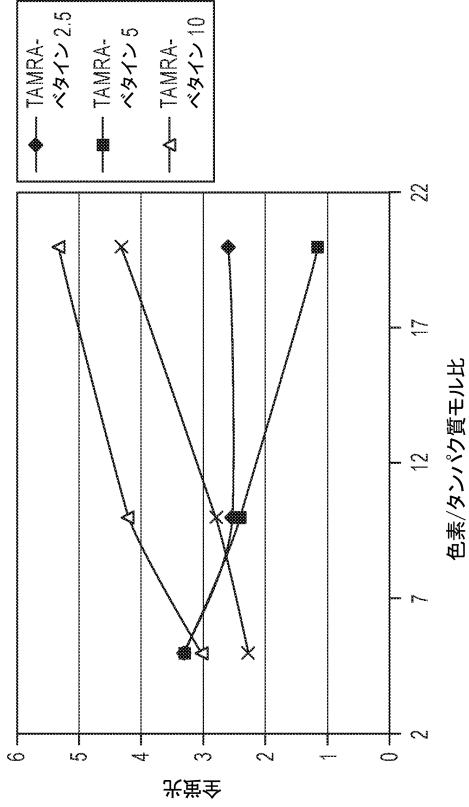
40

50

【図 16】



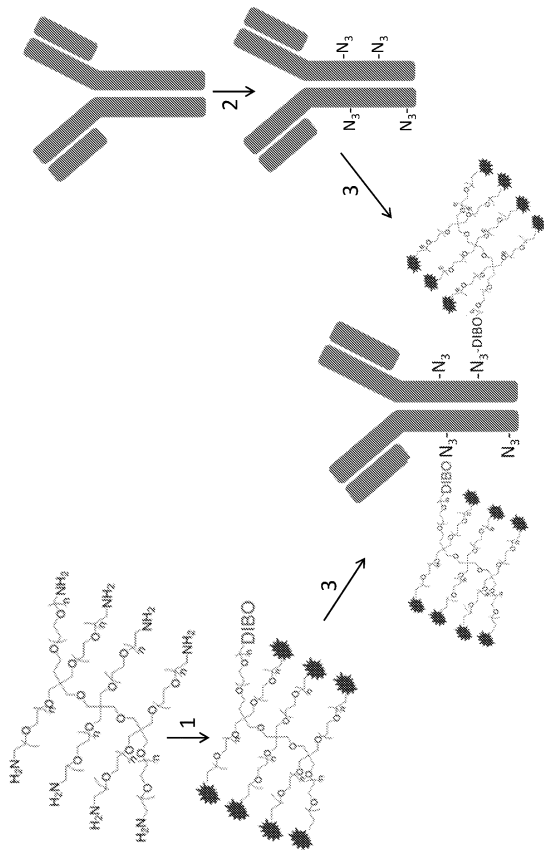
【図 17】



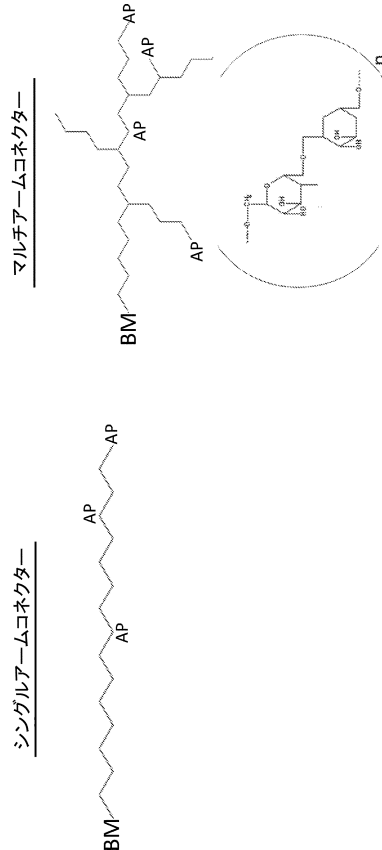
10

20

【図 18】



【図 19】

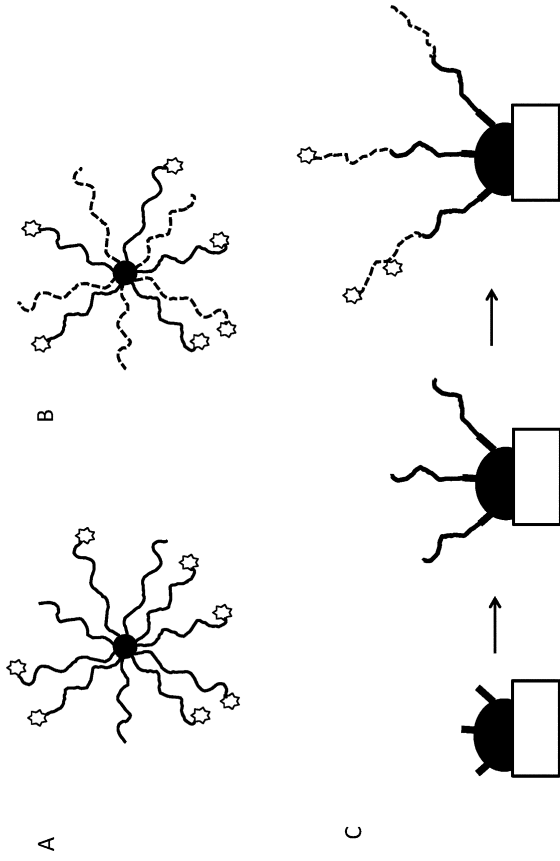


30

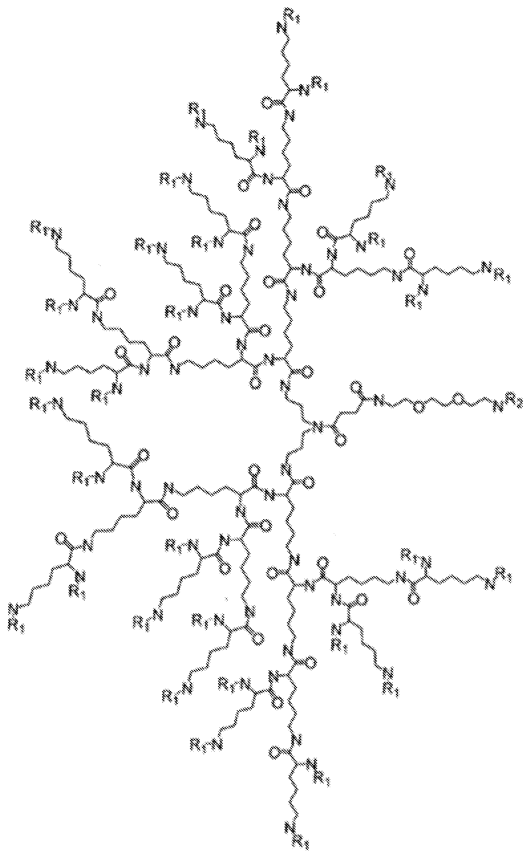
40

50

【図 20】



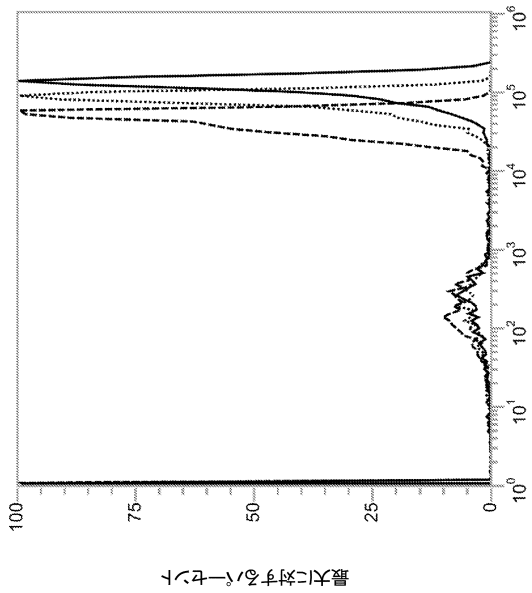
【図 21】



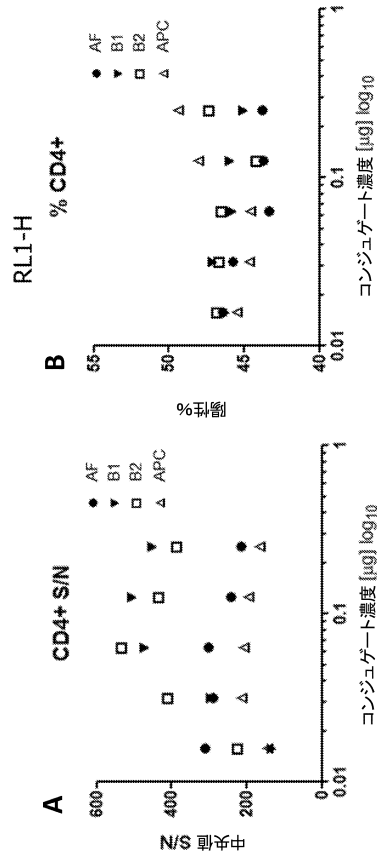
10

20

【図 22】



【図 23】



30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 吉 田 和彦
 (74)代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき
 (74)代理人 100111796
 弁理士 服部 博信
 (74)代理人 100123766
 弁理士 松田 七重
 (74)代理人 100136249
 弁理士 星野 貴光
 (72)発明者 デサイ サービ
 アメリカ合衆国 6 1 1 0 1 イリノイ州 ロックフォード ノース メリディアン ロード 3 7 4 7
 ピアース バイオテクノロジー インコーポレイテッド
 (72)発明者 ナレンド マリー
 アメリカ合衆国 6 1 1 0 1 イリノイ州 ロックフォード ノース メリディアン ロード 3 7 4 7
 ピアース バイオテクノロジー インコーポレイテッド
 (72)発明者 ギー カイル
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールズバッド ニュートン ドライブ 5 8 2 3
 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
 (72)発明者 ベイカー マシュー
 アメリカ合衆国 6 1 1 0 1 イリノイ州 ロックフォード ノース メリディアン ロード 3 7 4 7
 ピアース バイオテクノロジー インコーポレイテッド
 (72)発明者 アグジェラー ロバート
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールズバッド ニュートン ドライブ 5 8 2 3
 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
 (72)発明者 スウィーニー スコット
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールズバッド ニュートン ドライブ 5 8 2 3
 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
 (72)発明者 ルカビシュニコブ アレクシー
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールズバッド ニュートン ドライブ 5 8 2 3
 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
 (72)発明者 ファン シー - ジュン
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州 カールズバッド ニュートン ドライブ 5 8 2 3
 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
 審査官 白形 優依
 (56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 2 9 1 8 6 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 7 / 1 2 0 7 6 2 (W O , A 1)
 特開 2 0 1 2 - 0 2 6 8 7 9 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 0 6 0 9 9 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 5 - 5 0 4 9 4 3 (J P , A)
 KUNTSON, S. et al. , Development and Evaluation of a Fluorescent Antibody-Drug Conjugate
 for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer , PLOS ONE , 2016年0
 6月23日 , Vol.11, No.6, e0157762 , pp.1-25
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8