【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第６部門第１区分
【発行日】平成21年6月18日(2009.6.18)

【公表番号】特表2008-541015(P2008-541015A)
【公表日】平成20年11月20日(2008.11.20)
【年通号数】公開・登録公報2008-046
【出願番号】特願2008-509210(P2008-509210)
【国際特許分類】
Ｇ０１Ｎ　33/533　(2006.01)
Ｂ８２Ｂ　1/00　(2006.01)
Ｂ８２Ｂ　3/00　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　21/64　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　21/78　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｇ０１Ｎ　33/533
Ｂ８２Ｂ　1/00
Ｂ８２Ｂ　3/00
Ｇ０１Ｎ　21/64　Ｆ
Ｇ０１Ｎ　21/78　Ｃ

【手続補正書】
【提出日】平成21年4月23日(2009.4.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
生物学的サンプル中の目的分子の検出方法であって：
生物学的サンプルを、ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介してナノ粒子に共有結合された特異的結合部分を含む特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲート組成物と接触させ；そして
目的分子に結合したコンジュゲートにより生成されるシグナルを検出して、目的分子の存在の指標とする、
ことを含んでなる上記検出方法。
【請求項２】
生物学的サンプルが組織切片または細胞学サンプルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
特異的コンジュゲート部分が抗体またはアビジンを含み、そしてナノ粒子が量子ドットを含む請求項１に記載の方法。
【請求項４】
特異的結合部分が抗体を含む請求項１に記載の方法。
【請求項５】
抗体が抗ハプテン抗体であり、そして目的分子がハプテン－標識化プローブ配列で検出可能な核酸配列である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
抗体が抗抗体抗体を含む請求項４に記載の方法。
【請求項７】

ナノ粒子が量子ドットを含み、そして検出が生物学的サンプルを量子ドットにより発する蛍光を刺激する波長の光で照射することを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

異なる特異的結合部分および別個に検出可能なナノ粒子を有する少なくとも２つのコンジュゲートがサンプルと接触される、請求項１に記載の方法。

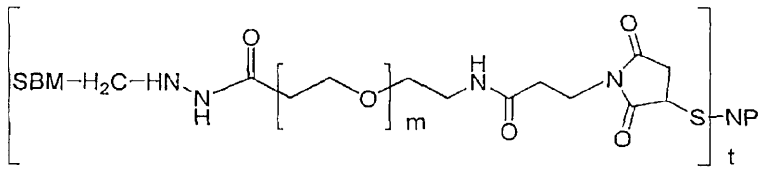
【請求項９】

別個に検出可能なナノ粒子が異なる発光波長を有する量子ドットを含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

コンジュゲートが、式

【化８】



式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍは１～５０の整数であり、そしてｔは１～１０の整数である、

で表される、請求項１に記載の方法。

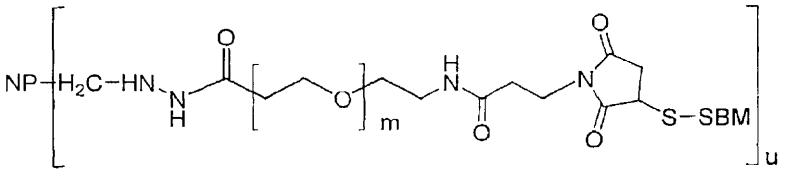
【請求項１１】

ｍが４～１２の整数であり、そしてＮＰが量子ドットである、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

コンジュゲートが、式

【化９】



式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍは１～５０の整数であり、そしてｕは１～１０の整数である、

で表される、請求項１に記載方法。

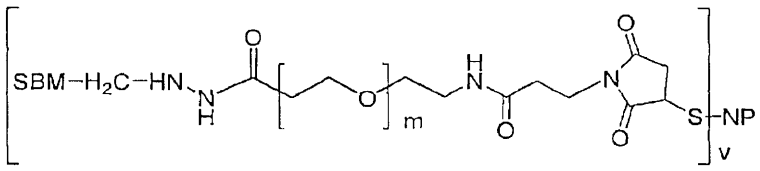
【請求項１３】

ｍが４～１２の整数であり、そしてＮＰが量子ドットである、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

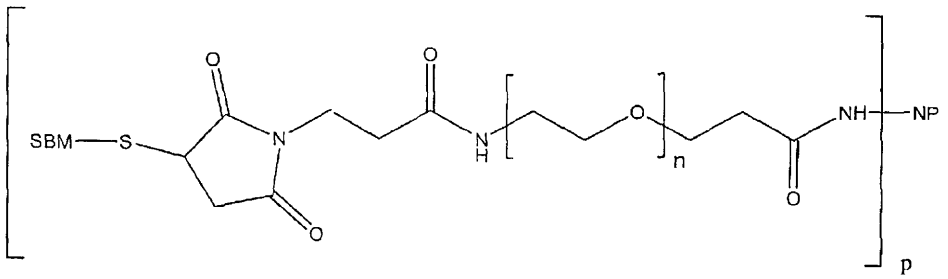
コンジュゲートが、式

【化１０】

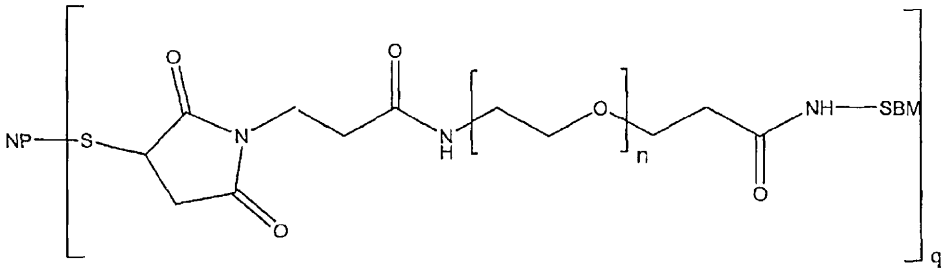


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍは１～５０の整数で

あり、そしてｖは１～１０の整数である、
で表される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
ｍが４～１２の整数であり、そしてＮＰが量子ドットである、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
コンジュゲートが、式
【化４】

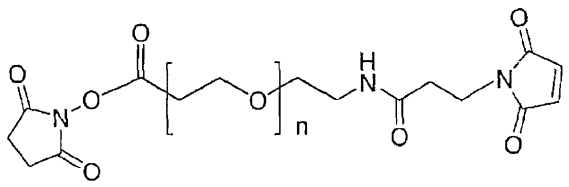


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｎは１～５０の整数であり、そしてｐは１～１０の整数である、
で表される、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
ｍが４～１２の整数であり、そしてＮＰが量子ドットである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
コンジュゲートが、式
【化５】

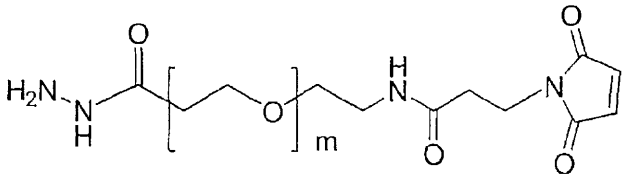


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｎは１～５０の整数であり、そしてｑは１～１０の整数である、
で表される、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
ｍが４～１２の整数であり、そしてＮＰが量子ドットである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
組織切片中の目的分子の検出方法であって、
組織切片をハプテンで標識され、かつ目的分子と結合する核酸分子と接触させ；
組織切片を、ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介して量子ドットに結合された抗ハプテン抗体を含む特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲート組成物と接触させ；そして
目的分子に結合したコンジュゲートにより生成されるシグナルを検出して、組織切片中の目的分子の存在の指標とする、
ことを含んでなる上記検出方法。
【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１１３】
本発明の特徴または主たる態様を以下に記載する。
１．ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介して共有結合された特異的結合部分およびナノ粒子を含んでなるコンジュゲート。
２．リンカーのチオール反応性基が特異的結合部分に共有結合され、そしてリンカーのアミン反応性基がナノ粒子に共有結合されている、態様１に記載のコンジュゲート。
３．リンカーのチオール反応性基が特異的結合部分のシステイン残基に共有結合されている、態様２に記載のコンジュゲート。
４．リンカーのチオール反応性基が、特異的結合部分に導入されたチオール基に共有結合されている、態様２に記載のコンジュゲート。
５．リンカーのアルデヒド反応性基が特異的結合部分に共有結合され、そしてリンカーのアミン反応性基がナノ粒子に共有結合されている、態様１に記載のコンジュゲート。
６．リンカーのアルデヒド反応性基が、特異的結合部分のグリコシル化部分上に形成されたアルデヒドに共有結合されている、態様５に記載のコンジュゲート。
７．リンカーのアルデヒド反応性基が特異的結合部分に共有結合され、そしてヘテロ二官能性リンカーのチオール反応性基がナノ粒子に結合されている、態様１に記載のコンジュゲート。
８．ヘテロ二官能性リンカーが、式：
【化１】

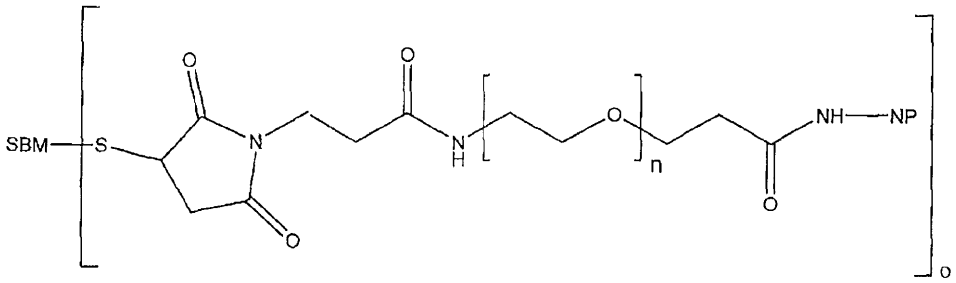


式中、ｎ＝１～５０である；あるいは
【化２】



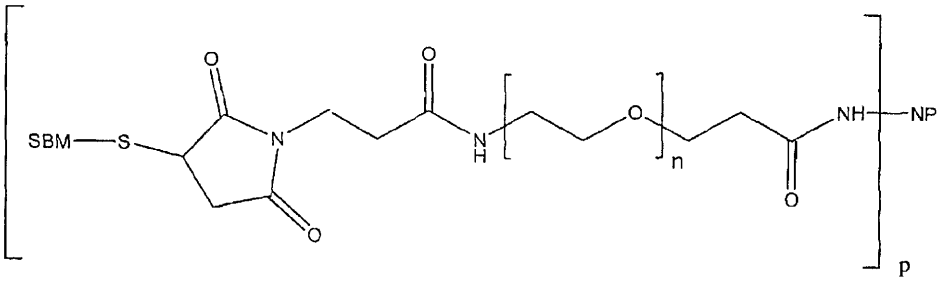
式中、ｍは１～５０である、
を有するヘテロ二官能性ポリエチレングリコールリンカーを含んでなる態様１に記載のコンジュゲート。
９．コンジュゲートが式：

【化３】



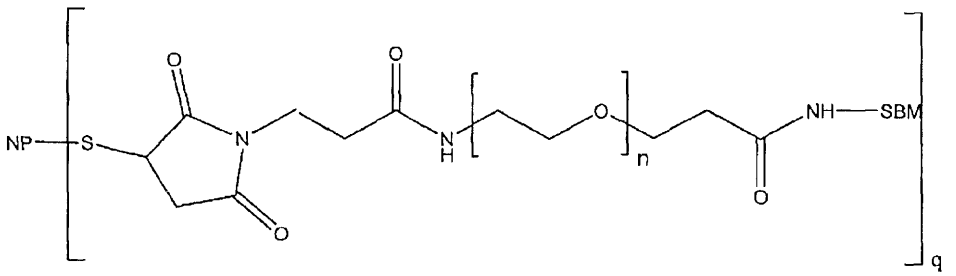
式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｎ＝１～５０、そしてｏ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１０．コンジュゲートが式：

【化４】



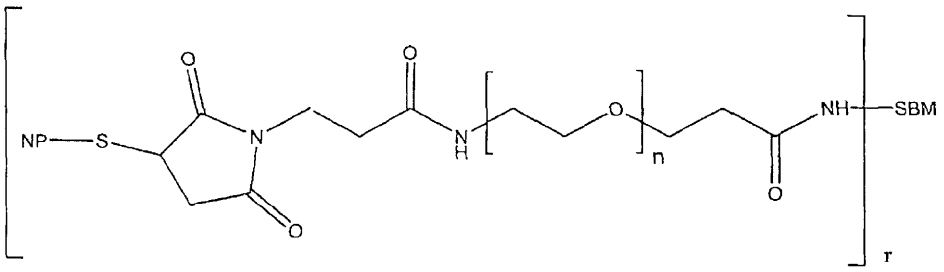
式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｎ＝１～５０、そしてｐ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１１．コンジュゲートが式：

【化５】

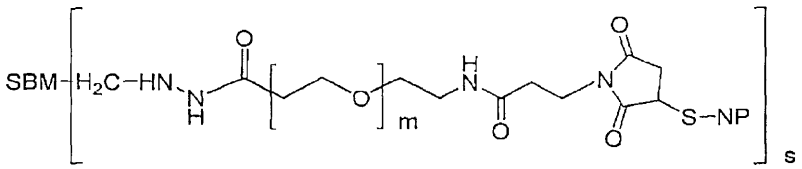


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｎ＝１～５０、そしてｑ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１２．コンジュゲートが式：

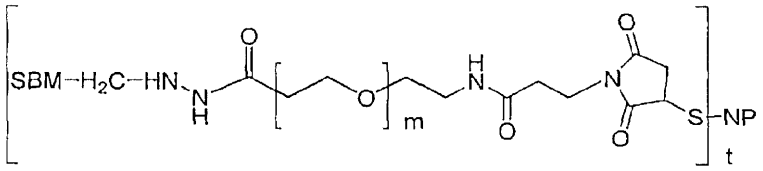
【化６】



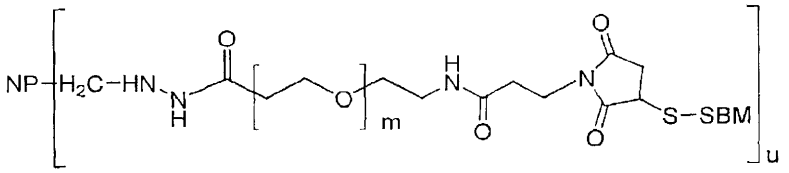
式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、そしてｎ＝１～５０、そしてｒ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１３．コンジュゲートが式：
【化７】



式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍ＝１～５０、そしてｓ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１４．コンジュゲートが式：
【化８】

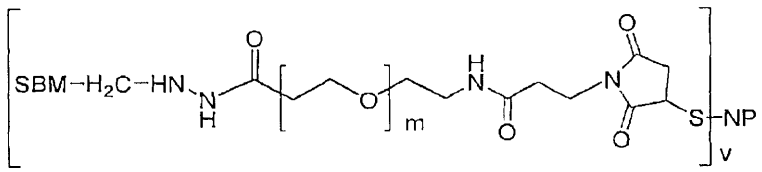


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍ＝１～５０、そしてｔ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１５．コンジュゲートが式：
【化９】



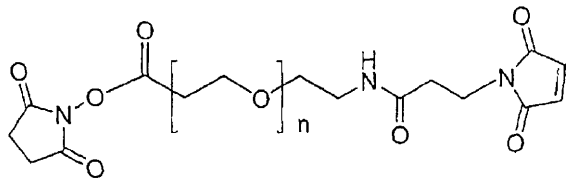
式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍ＝１～５０、そしてｕ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１６．コンジュゲートが式：

【化１０】

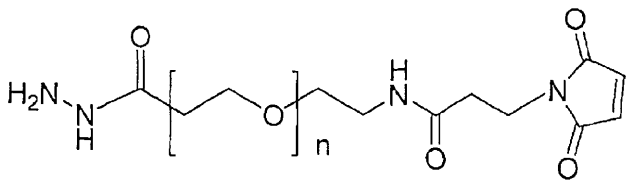


式中、ＳＢＭは特異的結合部分であり、ＮＰはナノ粒子であり、ｍ＝１～５０、そしてｖ＝１～１０である、
を有する態様８に記載のコンジュゲート。
１７．ナノ粒子が量子ドットを含んでなる態様１に記載のコンジュゲート。
１８．特異的結合部分が抗体を含んでなる態様１に記載のコンジュゲート。
１９．特異的結合部分がアビジンを含んでなる態様１に記載のコンジュゲート。
２０．特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲート組成物を調製する方法であって：
特異的結合部分からチオール化特異的結合部分を形成し；
ナノ粒子のアミン基をマレイミド／活性エステル二官能性ＰＥＧリンカーと反応させて、活性化ナノ粒子を形成し；そして
チオール化特異的結合部分を活性化ナノ粒子と反応させて、特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲートを形成する、
ことを含んでなる上記方法。
２１．チオール化特異的結合部分を形成することが、特異的結合部分と還元剤を反応させてチオール化特異的結合部分を形成することを含んでなる、態様２０に記載の方法。
２２．特異的結合部分が抗体を含んでなり、そしてチオール化特異的結合部分を形成することが抗体を還元剤と反応させてチオール化抗体を形成することを含んでなる、態様２０に記載の方法。
２３．抗体と還元剤を反応させてチオール化抗体を形成することが、抗体あたり約１から約１０の間の平均チオール数をもつ抗体を形成することを含んでなる、態様２２に記載の方法。
２４．抗体を還元剤と反応させることが、抗体を２－メルカプトエタノール、２－メルカプトエチルアミン、ＤＴＴ、ＤＴＥおよびＴＣＥＰおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤と反応させることを含んでなる、態様２２に記載の方法。
２５．抗体を還元剤と反応させることが、抗体をＤＴＴおよびＤＴＥおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される還元剤と反応させることを含んでなる、態様２４に記載の方法。
２６．抗体を還元剤と反応させることが、抗体を約１ｍＭから約４０ｍＭの間の濃度の還元剤と反応させることを含んでなる、態様２５に記載の方法。
２７．チオール化特異的結合部分を形成することが、チオール基を特異的結合部分に導入することを含んでなる、態様２０に記載の方法。
２８．チオール基を特異的結合部分に導入することが、特異的結合部分を２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬と反応させることを含んでなる、態様２７に記載の方法。
２９．チオール基を特異的結合部分に導入することが、特異的結合部分をオキシダントと反応させて特異的結合部分の糖部分をアルデヒド基に変換し、そしてアルデヒド基をシスタミンと反応させることを含んでなる、態様２７に記載の方法。
３０．オキシダントが過ヨウ素酸塩イオン、I_2、Br_2およびそれらの組み合わせ、またはノイラミニダーゼ／ガラクトース　オキシダーゼを含んでなる、態様２９に記載の方法。
３１．ナノ粒子のアミン基をマレイミド／活性エステル二官能性ＰＥＧリンカーと反応さ

せて活性化ナノ粒子を形成することが、ナノ粒子を式：
【化１１】



式中、ｎ＝１～５０である、
を有するＰＥＧマレイミド／活性エステルとを反応させることを含んでなる、態様２０に記載の方法。
３２．ｎ＝４～１２である態様３１に記載の方法。
３３．ナノ粒子が量子ドットを含んでなる態様２０に記載の方法。
３４．抗体－ナノ粒子コンジュゲート組成物を調製する方法であって：
抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成し；
アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させて、チオール－反応性抗体を形成し；そして
チオール－反応性抗体を、チオール化ナノ粒子を反応させて、抗体－ナノ粒子コンジュゲートを形成する、
ことを含んでなる上記方法。
３５．抗体をオキシダントと反応させてアルデヒドを持つ抗体を形成することが、抗体のグリコシル化領域を酸化してアルデヒドを持つ抗体を形成することを含んでなる、態様３４に記載の方法。
３６．抗体のグリコシル化領域を酸化することが、抗体を過ヨウ素酸塩、I_2、Br_2またはそれらの組み合わせ、あるいはノイラミニダーゼ／ガラクトース　オキシダーゼで処理することを含んでなる態様３５に記載の方法。
３７．さらにチオール化ナノ粒子をナノ粒子から形成することを含んでなる、態様３５に記載の方法。
３８．チオール化ナノ粒子を形成することが、チオール基をナノ粒子に導入することを含んでなる、態様３７に記載の方法。
３９．チオール基をナノ粒子に導入することが、ナノ粒子を２－イミノチオラン、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ、ＳＰＤＰ、Ｎ－アセチルホモシステインチオラクトン、ＳＡＭＳＡおよびシスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される試薬と反応させることを含んでなる、態様３８に記載の方法。
４０．アルデヒドを持つ抗体をＰＥＧマレイミド／ヒドラジド二官能性リンカーと反応させて、チオール－反応性抗体を形成することが、アルデヒドを持つ抗体を式：
【化１２】



式中、ｎ＝１～５０である、
を有するリンカーと反応させることを含んでなる、態様３５に記載の方法。
４１．チオール化ナノ粒子が量子ドットを含んでなる態様３５に記載の方法。
４２．抗体をオキシダントと反応させて、アルデヒドを持つ抗体を形成することが、抗体あたり平均約１から約１０の間のアルデヒド基を導入することを含んでなる、態様３５に記載の方法。

４３．生物学的サンプル中の目的分子の検出方法であって：
生物学的サンプルを、ヘテロ二官能性ＰＥＧリンカーを介してナノ粒子に共有結合された特異的結合部分を含んでなる特異的結合部分－ナノ粒子コンジュゲート組成物と接触させ；そして
目的分子に結合したコンジュゲートにより生成されるシグナルを検出する、
ことを含んでなる上記検出方法。
４４．生物学的サンプルが組織切片または細胞学サンプルを含んでなる、態様４３に記載の方法。
４５．特異的コンジュゲート部分が抗体またはアビジンを含んでなり、そしてナノ粒子が量子ドットを含んでなる態様４３に記載の方法。
４６．特異的結合部分が抗体を含んでなる態様４３に記載の方法。
４７．コンジュゲートが抗－ハプテン抗体であり、そして目的分子がハプテン－標識化プローブ配列で検出可能な核酸配列である、態様４６に記載の方法。
４８．抗体が抗抗体抗体を含んでなる態様４６に記載の方法。
４９．ナノ粒子が量子ドットを含んでなり、そして検出が生物学的サンプルを量子ドットにより発する蛍光を刺激する波長の光で照射することを含んでなる、態様４３に記載の方法。
５０．異なる特異的結合部分および別個に検出可能なナノ粒子を有する少なくとも２つのコンジュゲートがサンプルと接触させる、態様４３に記載の方法。
５１．別個に検出可能なナノ粒子が異なる発光波長を有する量子ドットを含んでなる、態様５０に記載の方法。