

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4731018号
(P4731018)

(45) 発行日 平成23年7月20日 (2011. 7. 20)

(24) 登録日 平成23年4月28日 (2011. 4. 28)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/532 (2006. 01)

GO 1 N 33/532

A

GO 1 N 33/58 (2006. 01)

GO 1 N 33/58

Z

請求項の数 7 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2000-595154 (P2000-595154)	(73) 特許権者	508004410
(86) (22) 出願日	平成12年1月21日 (2000. 1. 21)		マーテック バイオサイエンス コーポレーション
(65) 公表番号	特表2002-535657 (P2002-535657A)		アメリカ合衆国 メリーランド州 コロンビア ドビン ロード 6480
(43) 公表日	平成14年10月22日 (2002. 10. 22)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/001350	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開番号	W02000/043784		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成12年7月27日 (2000. 7. 27)	(74) 代理人	100071124
審査請求日	平成19年1月18日 (2007. 1. 18)		弁理士 今井 庄亮
(31) 優先権主張番号	60/116, 689	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成11年1月22日 (1999. 1. 22)		弁理士 増井 忠式
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識された抱合体生成のための簡便法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、
水溶性カルボジイミド、および
アミンまたはカルボキシル残基を含んでいる標識
を含んでいる単一容器であって、これらの成分は pH 約 7 での再水和に適した乾燥形で単一容器中に存在している単一容器。

【請求項 2】

標的残基へ標識を抱合させる方法であって、
a . 標識、NHS およびカルボジイミドが下記工程 (c) において互いに反応するまで、
互いに反応しないように容器中に当該三つの成分を配置し；
b . 該成分を乾燥形で保存し；および
c . 成分を水和し、そしてそれらが互いに接触することを可能にすることにより、それらの間で反応を開始させ、そして同時に か又は続いて標的残基を上記の反応させた成分に加え、それにより標的部分が標識へ抱合されることを含む、上記方法。

【請求項 3】

成分が水和される時点で標的が加えられる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

成分の水和の後で標的が加えられる請求項 2 に記載の方法。

10

20

【請求項 5】

標的残基へ標識を抱合させる方法であって、

- a. NHS エステルヘテロ二官能性試薬の一つの官能基との反応により標識を誘導体化し；
 - b. 誘導体化標識およびカルボジイミドが下記工程（c）において互いに反応するまで、互いに反応しないように、カルボジイミドと共に容器へ誘導体化標識を配置し；
 - c. 標識およびカルボジイミドを水和し、そしてそれらが互いに接触することを可能にすることにより、それらの間で反応を開始させ；
 - d. 標的残基の存在下でカルボジイミドを除去し、それにより標的残基が標識へ抱合される
- ことを含む上記方法。

10

【請求項 6】

標的残基へ標識を抱合させる方法であって、

- a. 第一級または第二級アミンを含んでいる標識をマレイミド官能基により誘導体化し；
 - b. 当該マレイミド誘導体化標識を還元体が入った容器中へ乾燥形で配置し；
 - c. 標識および還元体を水和し；および
 - d. 標的残基の存在下で還元体を除去し、それにより標的残基は標識へ抱合される
- ことを含む上記方法。

【請求項 7】

NHS エステルヘテロ二官能性試薬の一つの官能基で誘導体化された標識およびカルボジイミドを含んでいる単一容器であって、これらの成分は再水和に適した乾燥形で単一容器中に存在している、上記単一容器。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は遊離アミノ基を含んでいる分子（例えば、タンパク質、核酸およびアミノ糖）、特異的結合部位を持っている分子への検出可能標識の結合に関し、それにより、標識された分子により特異的に結合された残基へ標識を方向付ける方法を提供する。

【0002】

背景技術

30

N - ヒドロキシスルホスクシンイミド（NHS）エステルは反応性アシル化剤を作り出すための最も普通の活性化化学の一つを提供する。ホモ二官能性 NHS エステルは 1970 年代初期に反応性架橋剤として最初に導入されており、市販品として広く入手可能である。[Bragg, P., & Hou, C. (1975), "大腸菌および鼠チフス菌の Ca^{2+} および Mg^{2+} 活性化アデノシン三リン酸のサブユニット組成物、機能および空間配置" Eur. J. Biochem., 106, 495 - 503, Lomant, A. & Fairbanks, G. (1976) J. Mol. Biol., 104, 243 - 261.]。NHS エステルはヘテロ二官能性架橋剤を経てタンパク質をお互いに（例えば、NHS 側面を持つすべての Pierce Chemicals "二重試薬"；Muramoa K, Kamiya H (1988), "タンパク質のための切断可能で光活性化可能な二官能性蛍光試薬の製造および特徴付け" Agric. Biol. Chem. 52, 547 - 554 を参照されたい）、または色素と（アクリジニウムのような；Zomer G., Van den Berg R. H., Jansen E. H. J. M. (1988) "アクリジニウムエステルによるタンパク質の最適標識" Anal. Chim. Acta, 205, 267 - 27) 結合させるためにルーチン的に使用されている。

40

【0003】

N - ヒドロキシスクシンイミド（NHS）化学

NHS エステルはカルボジイミド存在下、カルボン酸と NHS との反応により形成される。安定なエステルを製造するには、反応を非水環境で行わなければならない、さもなければ非生産的な反応で分解されるであろう；水性で製造されたエステルは不安定であり、最

50

良の条件下でも数時間内に分解する。NHSエステル - またはスルホ - NHSエステル - 含有反応体は求核試薬と反応してNHSまたはスルホ - NHS脱離基の放出を伴ってアシル化生成物を形成する。反応はイミダゾリル環窒素、スルフヒドラルまたはヒドロキシル基に対しては非生産的であり、水性分解されたエステルまたはチオエステル結合を形成する。第一級および第二級アミンとの反応では、各々安定なアミドおよびイミド結合が生成される。

【0004】

タンパク質において、これらの試薬は主としてN末端のアルファアミンおよびリジン側鎖のエプシロンアミンと反応する。水性媒質中、本来の場所ですぐに標的分子と反応させてNHSエステルを生成させることが可能である (Staros, J., Wright, R. & Swingel, D. (1986), Anal. Biochem., 156, 220 - 222; Staros, J. (1982), Biochemistry 21, 3950 - 3955)。NHSエステルはpH7の水性環境下、数時間程度の半減期を持っている (0、pH7.0で4 - 5時間; Lomant, A. & Fairbanks, G. (1976), J. Mol. Biol., 104, 243 - 261)。

10

【0005】

カルボジイミドはカルボン酸およびアミンまたはリン酸およびアミン間の各々アミドまたはホスホロアミデート結合の形成を媒介するゼロ長架橋剤である。(Chu, B., Kramer, F. & Orgel, L. (1986), "バイオアッセイのための増幅可能レポーターRNAの合成" Nucleic Acids Research, 14, 5591 - 5603; Hoare, D. & Koshland, D. E. (1966) J. Am. Chem. Soc., 88, 2057)。カルボジイミドはカルボン酸と反応して高度に反応性なO - アシルイソ尿素を形成し、それは非常に短寿命であるが求核試薬と反応してアミド結合を形成する。水と反応してカルボン酸基を再生するような、いくつかの競合するおよび非生産的である反応が存在する。この反応はpH4.5から7.5の間で効率よく進行する。オリゴヌクレオチド上の5'リン酸のようなリン酸基を持つ分子もカルボジイミド反応を使用することによりアミン含有基と反応できる。

20

【0006】

DCCD (カルボジイミド) およびNHSはマイクロプレート表面を活性化するために使用されており、プレートは続いて洗浄されウェルにタンパク質が加えられる (プレートへのタンパク質の共有結合を容易にするため) (Dagenais P., Desprez B., Altert J., Escher E. (1994), Anal. Biochem., 222, 149 - 155)。

30

【0007】

EDACカルボジイミド) およびスルホ - NHSを使用する方法はHermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York, London, 1966、に要約されている。

【0008】

タンパク質 / 標識複合体は、それがタンパク質輸送体へ結合された場合にそこで複合体形成し、輸送体位置の可視化を可能にするようにNHS誘導体として作製されている。これは基本的に活性NHSを持つ活性化タンパク質 / 色素複合体である (Fan J., Pope L. E., Vitols K. S., Huennkens F. M. (1991), "フルオレセイン - メトトレキセート g 異性体のN - ヒドロキシスルホスクシンイミド エステルによる葉酸輸送タンパク質のアフィニティー標識" Biochem., 30, 4573 - 4580)。NHS活性化色素はまた市販品としても販売されている (例えば、FluoroLink™Cy5™またはFluorolink™Cy5.5™のような、Amersham Pharmacia Biotechから販売されている活性化シアニン色素を参照されたい)。

40

【0009】

4 - ヒドロキシテストステロン - 4 - ヘミグルタレート - NHSエステルはカルボジイミ

50

ドおよびNHSによる処理により製造されている。これは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）または - ガラクトシダーゼと混合されて酵素標識された4HT-4-HGが製造された。この酵素標識ヒドロキシテストステロンはトレーサー研究に使用された（Hosada H., Karube T., Kobayashi N., Nambara T. (1985), "N-スクシンイミジルエステル法によるステロイドの酵素標識。酵素イムノアッセイで使用するための西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗原の製造", Chem. Pharm. Bull., 33, 249-255）。

【0010】

発明の要約

本発明は特定の標的部分に標識をカップリングさせるための簡便化された方法に関する。そのようなカップリングは高度に反応性の活性化化学物質による標識、標的部分またはその両方を活性化することにより達成される。通常のカップリングプロトコールは、活性化化学物質が望ましくない副産物を生成する制御不可能な反応を起こしやすく、あるいは非常に急速な反応は望まれるカップリングを起こすことなしに活性化化学物質の消失を生じるので問題がある。本発明に従ったカップリング反応は従来の方法の物理的間隔の代わりに、反応の開始および終結を制御するために相変化による反応体の時間的間隔を使用している（例えば、急速凍結による）。

【0011】

例えば、NHSエステルをその場所で発生する技術（凍結乾燥なしで、ただ試薬を加えるだけで）はBioconjugate Techniquesに記載されている。本発明は別の分子に結合された標識を得ることと同一の化学および同一の考えを使用しているが、その相違は容易に使用できる形式である（即ち、"一本の試験管形式"）。この方法においてすべての反応体は別々に調製され、続いて、それらは架橋化学物質を活性化するために標的化合物が加えられるまではお互いに反応しないような方法で一緒にされる。一つのそのような様式は反応体の瞬間凍結水性溶液を連続的に調製し、一つのユニットとして一緒に凍結乾燥する（例えば、微量遠心管中で）。本発明の別の様式において、凍結乾燥またはその他の方法で乾燥された成分が別々に調製され、水溶性成分が標識されるべき化合物（水性の形で）の添加まではお互いに反応しない条件下にあるように、乾燥形でまたは空間的に離れた様式（例えば、隔てられた部分に仕切られている微量遠心管の上部で）で一緒にされる。

【0012】

本発明はN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）化学を用いて特異的結合部分（例えば分析標的を選択するために有用である部分）へ標識を結合する改良された方法を提供する。特に、本発明は適切な緩衝液中で連続的または別々に凍結することにより達成された活性成分の分離および安定化を提供する（本質的には利用前の成分の空間的または時間的分離）。

【0013】

別の様式において、本発明はNHS、水溶性カルボジイミド（例えば、EDAC）およびアミンまたはカルボキシル残基を含んでいる標識からなるキットを提供し、これらの成分は、すべての成分が活性化および架橋のために十分な活性を持つpH7付近での再水和に適した乾燥形である。

【0014】

フィコビリプロテインは抱合させるのがやっかいであると考えられているが、本発明は特異的標的結合タンパク質へ抱合された安定なフィコビリプロテインを迅速におよび容易に作製するための方法を提供する。SMCCおよびSPDP前活性化フィコビリタンパク質はいくつかの処方で入手可能である。しかしながら、本発明はより少ない工程しか必要とせずおよびより迅速である、抱合体を作成するためのより簡便な方法を提供する。実際、本発明ではカルボキシル含有標識を持つであろう特異的結合分子が何であれ（例えば、フィコビリプロテイン、酵素、PBXLTMその他）、研究者は容易に標識が可能である。本方法の終わりに使用可能な抱合体を得るために、本キットを使用する作業者はタンパク質

10

20

30

40

50

抱合の熟練者である必要ではない、抱合体を作製するためのキットも本発明は提供する。

【0015】

発明の詳細な説明

本発明の方法は標識されるべき標的部分（例えば緩衝化溶液のタンパク質）へ検出可能な標識（フィコビリプロテイン、酵素、タンパク質またはP B X LTMフィコビリソーム色素の様な）、緩衝液、N H Sおよびカルボジイミドを含んでいる乾燥粉末を加えることを可能にする。標識された標的部分はトレーサーとして直接的に使用できるか、または非結合色素およびクエンチング試薬を除くためにさらに精製でき高度に純粋な標的化合物が提供できる。

【0016】

一つの態様において、本発明は凍結乾燥のE D A C（カルボジイミド）、標識残基（例えばフィコビリプロテイン、フィコビリソームその他）およびN H Sを含んでいる反応容器から成るキットが提供される。これらの成分はお互いに反応しないが、各々の成分の安定性を維持するために各々に最適な緩衝液に連続的様式で加えられおよび凍結される（E D A CおよびN H Sは異なったp Hで安定であるので）。これらの試薬の最適条件にまたがるp Hでの再水和により、反応を完了させるのを導く環境が創られ、使用に適した抱合体が生成される（環境はカルボジイミドまたはN H Sの両方には最適ではないけれども）。

【0017】

これと同一の様式が、もし適した反応条件（適したp H範囲を含んで）が応用される特定の化学に利用されるならば、使用前に標的分子が最初に修飾されていることが必要とされる他の型の架橋剤にも使用できる。例えば、問題とするタンパク質の標的への単純な架橋は、S M C C（スクシンイミジル 4 - （N - マレイミドメチル）シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート）または任意のその誘導体およびジチオスレイトール（D T T）または - メルカプトエタノールのような還元体の使用により達成されるであろう。これらの化学物質は連続的に凍結され、続いて凍結乾燥される。凍結乾燥材料は次に、抱合されるべきタンパク質を溶解した緩衝液で再水和される。このことは材料を活性化し、脱塩または透析により還元体が除かれると、お互いに架橋することが可能になる。最適な抱合にはタンパク質比の注意深い整合が必要とされる。緩衝液および標的化合物の連続的添加で、生じる生成物が改善できるであろう。本発明のこの態様はまたキットを含んでおり、ここで材料（タンパク質、オリゴヌクレオチドプローブその他）はマトリックス内で連続的に凍結され、それに所望の結合相手（標的部分）が加えられ、およびその後還元すると同時に還元体は徐々に除去されることを可能にし、それにより抱合反応が駆動され、所望のおよび特異的モル比の決められた抱合体が生じる。そのようなマトリックスは還元体および活性化タンパク質を含んでいる高分子量透析チューブのように単純であってもよいし、またはゲル濾過（即ち、脱塩）または化学的/熱的不活性化を経る、還元体の遅い空間的分離を可能にする反応容器のように複雑なものでもよい。

【0018】

この方法の利点は、簡便であることであり、および研究者自身の抱合を行って迅速な成功が得られることに懐疑的であろう研究者に一つの道を提供する。その理論的な結論まで延長すると、反応停止がほとんどまたは全く必要とされず、混合し、インキュベートし、次ぎに標識を直接使用するように、比を均衡させることが可能である。もしくは、反応した抱合体はゲル濾過カラムまたは他の型の分離工程により精製され、高度に精製された抱合体が得られる。

【0019】

実験作業の要約

本発明は、可能な限り使用者に使いやすいことを目標として、タンパク質（特には標識）と他のタンパク質または核酸とを結合するための安定なN H Sエステルまたは他の機能的な反応性架橋剤を発見する努力のなかで実施された実験作業から開発された。特に、二つのタンパク質の抱合のための簡単な一工程法を提供することが望まれた。いくつかの実験法が企てられた。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

第一に、適切なカップリングのために適した条件および比を決定するため、液体 N H S エステル抱合体がストレプトアビジン (S A) および種々の検出可能標識、アロフィコシアニン (A P C)、安定化フィコビリソーム (P B X L - 3) またはフィコエリスリン (P E) 間で作製された。N H S エステルは、エステルの加水分解のため、中性付近の条件下では比較的短い半減期しか持っておらず、タンパク質へ架橋している活性 N H S エステルの長期間の安定性は、少なくとも 6 ヶ月の在庫期間を必要とする製品では続かないことが観察された。

【 0 0 2 1 】

次の方法は凍結に対するフィコビリプロテインの安定性を促進するためにトレハロースを添加し、基本的には同一のプロトコールを使用して同一の活性 N H S エステルタンパク質複合体が作製され、次に全複合体を完全に凍結するまで液体窒素に沈め、続いて全複合体を凍結乾燥させた。凍結乾燥複合体は次にストレプトアビジン溶液に再懸濁し、得られた抱合体は液体様式で作製された抱合体と比較された。結果は、凍結乾燥複合体の絶対結合能力の相当な損失を明瞭に示している。凍結乾燥活性 N H S エステルタンパク質複合体は決して液体複合体より性能が優れてはいなかった。

【 0 0 2 2 】

長期間にわたって安定な複合体を維持するために試みられた別の方法として、複合体が検出可能標識および S A と一緒にカップリングする準備ができるまでは複合体が形成されないプロトコールを発明者は研究した。材料は連続的に添加され、各々の添加時に凍結された；第一に標識、次に E D A C および最後にスルホ - N H S。しかしながら、試薬は凍結により分離されているので、この添加の順序は重要ではない。ほとんど瞬間的な層の凍結および非常に低い温度は、本質的にお互いに関して材料を不活性なものにする。凍結された組成物は次に凍結乾燥された。抱合体は水性タンパク質溶液が凍結乾燥粉末に加えられた時に形成された。生じた抱合体は液体で形成されたものと非常に類似して働き、B S A - ビオチンマイクロプレートアッセイで試験された場合、同様のシグナルを発生する能力を持っていた。

【 0 0 2 3 】

N H S 活性化色素の生成

本発明は三つの成分 (標識部分、N H S およびカルボジイミド) を望まれるまでお互いに反応することなく一緒にすることによりこれらの利点を提供する。典型的には、このことは図 1 に示したように、試薬の連続的添加および急速凍結、続いての凍結乾燥工程により達成される。このことはまた、各々の成分を別々に凍結乾燥 (またはその他の乾燥) し、それぞれを湿気のない条件下、バルク試薬として適した比で混合できる均質な粉末となすことによって達成できる。

【 0 0 2 4 】

標識の型 -

適した標識は遊離カルボキシル基を持つ検出可能な残基である。好適には標識残基は遊離アミンを持っていないが、すべての場合において標識 - 標識の架橋を最少にするように標識の濃度を調節しなければならない (アミンがあってもなくても)。起こりうる色素内架橋を防止するために、アミンをカルボキシル基 (無水酢酸の場合) またはチオール (例えば、S A T A) のような N H S と反応しない他の基へ変換するために無水酢酸のようなアシル化剤が使用されるであろう。標的は、特異的結合対の片方の半分とひとたび結合すると、モニターされるべきいくつかの特性を持っていないなければならない。これは蛍光、発色性、放射活性、酵素活性、物理的密度などであろう。便宜上、活性化標識は " 色素 " と称されるが、光吸収に関わらず、N H S 化学により結合できる任意の検出可能残基が使用されるであろう。典型的な標識には以下に掲げたものが含まれるが、これらに限定されるわけではない：

・フィコビリプロテイン (例えば、アロフィコシアニン、フィコシアニン、フィコエリスリン、フィコエリスロシアニン、C r y p t o F l u o r TM 色素)、フィコビリプロテ

10

20

30

40

50

ンのサブユニット（例えば、フィコエリスリンのアルファ、ベータおよびガンマサブユニット）

・フィコビリソーム（青緑色細菌または紅藻類）、フィコビリソーム亜複合体（杆体およびコア）を含んで、

・安定化フィコビリソーム、安定化フィコビリソーム亜複合体（杆体およびコア）を含んで、またはポルフィリジウム クルエンタムまたはアルトロスピラ プラテンシスから単離されたもの（例えば、各々 P B X L - 1 または P B X L - 3 ）のような化学的に安定化されたフィコビリソーム、またはこれらの化学的に安定化されたフィコビリソームおよび C y 5 . 5 を含んでいるタンデム色素（例えば、各々 P B X L - 2 または P B X L - 4 ）

、
・酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ）、

・ラテックスビーズ（例えば、天然、染色、活性化）

・核酸（例えば、RNA、DNA、PNA）、

・修飾核酸（例えば、メチル化、ビオチニル化、アミン終結）

・アガロースビーズ（例えば、S e p h a r o s eTM、S e p h a d e xTM）、・活性化ガラスビーズ（例えば、修飾 C P G ビーズ）、

・磁気ビーズ（例えば、B i o M a gTM）、

・ランタニド含有キレート、クリプテートのよう（例えば、ユーロピウム、テルビウム）、遊離カルボキシル基または遊離アミンを含むように修飾されている、

・遊離アミンを持つ有機色素 - アミン含有アミノフルオレセイン誘導体のよう（例えば、フルオレセイン - 5 - チオセミカルバゾール、5 - (((2 - (カルボヒドラジノ (カルボヒドラジノ) メチル) チオ) アセチル) - アミノフルオレセイン、またはローダミン

、
・緑蛍光タンパク質、赤蛍光タンパク質、青蛍光タンパク質、および黄色蛍光タンパク質。

【 0 0 2 5 】

N H S の型 -

・ N - ヒドロキシスクシンイミド

・スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミド

・水溶性 N H S 類似体

水溶性カルボジイミドの型 -

[E D A C] 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド

[C M C] 1 - シアノヘキシル - 3 - (2 - モルホリノ - 4 - エチル) - カルボジイミド

[D C C] ジシクロヘキシル カルボジイミド

[D I C] ジイソプロピル カルボジイミド

他の可能な架橋剤 -

[ウッドワード試薬 K] N - エチル - 3 - フェニルイソキサゾリウム - 3 ' - スルホネート

[C D I] N , N ' - カルボニルジイミダゾール

反応性粉末の製造法 -

試薬はお互いから反応体を分離するために連続的様式で乾燥され、一方、化合物を可能な限り最良の形で維持するのに適した環境（例えば、pH）が維持されている。例えば、標識は水性の形で添加され、液体窒素中で凍結され、次ぎにこの上部に N H S が加えられて即座に凍結され、次ぎに E D A C が加えられて即座に凍結される。この全構築物は凍結乾燥され、得られたチューブは必要になるまで乾燥下で保存される。標識およびその他の必要な反応体を含んでいる粉末を調製するための別の方法には以下の方法が含まれる：

・凍結乾燥 / 相の時間的分離 - 連続的に液体を加えおよび凍結し、それにより異なった pH および試薬を混合しない凍結部分として分離する。次ぎに、全体が凍結乾燥される。（

10

20

30

40

50

実際)

・試薬保存溶液を独立して凍結し、凍結乾燥して湿気のない環境下で微粉末とする。これを別々にチューブへ加えるか、または使用のためのチューブ内へ分配する前に他の試薬と適した比で混合する。

・連続的に凍結乾燥されるというよりもむしろ、乾燥化学薬品を一つの成分としてチューブ内へ分配する。それらは水の添加により混合され、標識の活性化が開始される。適したインキュベーション時間の後、化合物(アミン含有)が加えられ、カルボジイミド活性化カルボキシルと反応する。得られた物質は適当な重量で反応チューブへ分配される。

・乾燥化学物質が緩衝液を作るように混合され、反応チャンバーへ分配された。乾燥NH₂Sおよびカルボジイミドを適切な比率で反応混合物へ加える。すべてを使用するまで湿気のない環境に、好適には真空下で封をする。(予想)

添加する順序は上記のプロトコールを使用する結果には関係しない。材料を急速に凍結させ、先行する層を有意に融解させないことを確実にすることが重要である。このことは液体を入れるチューブを非常に低い(液体窒素またはドライアイス)温度に保ち、および添加には非常に冷たい溶液を用いることで達成される。最初に最も多い容量の材料を加え、次ぎにより少ない容量を加えるのが簡単である。チューブ側面は、層が出会う前から凍結を実行するのに使用できる。

【0026】

材料は上記のような層積の代わりに凍結乾燥または急速乾燥粉末として前もって混合できる。この場合、少量の材料を各々のチューブに加えなければならないので、より小さなチューブを作ることがより難しくなるであろう。しかしながら、一度混合されたら、自動化分配機は非常に規定された様式でチューブ内へ材料を秤量することができる。

【0027】

キット形

好適な様式において、所望の標的残基へのカップリングのための検出可能標識を含んでいる反応性粉末は、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)、水溶性カルボジイミド(例えば、EDAC)およびアミンまたはカルボキシル残基を含んでいる標識から成るキットで提供され、ここでこれらの成分は6.0から8.0のpH範囲での再水和に適した乾燥形である。典型的なキットは以下のものを含んでいるであろう：

【0028】

キット1：

- 粉末化NHS、カルボジイミドおよび標識を含んでいるバイアル、好適には梱包に含まれている乾燥パックで、
- 停止試薬を含んでいるバイアル
- 使用されなかった標識および停止試薬から抱合体の分離のためのカラム
- 抱合体の充填および溶出のための乾燥粉末化緩衝液を含んでいる瓶(使用される分離法に依存して一つ以上であろう)

キット2：

- 粉末化NHS、カルボジイミドおよび標識を含んでいるバイアル、好適には梱包に含まれている乾燥パックで、
- 停止試薬を含んでいるバイアル

キット3：

- 粉末化NHS、カルボジイミドおよび標識を含んでいるバイアル、好適には梱包に含まれている乾燥パックで。多標識のためのセット。

【0029】

標識された抱合体の製造 -

未反応標識、NHSおよびカルボジイミドの混合物を標的残基(典型的には特異的結合対の一つ)との反応のために再水和し、標的残基に標識を抱合させる。

特異的結合相手の型 -

最終”標的”成分の添加までは反応しないような様式で別々の材料を混合することは、非

10

20

30

40

50

常に一般的な、およびフィコビリプロテイン、P B X LTM色素、酵素またはまったく任意のカルボキシル含有標識に応用できる組成物を構成する。加えて、多くの有機色素は標準的有機化学を使用してカルボキシルを含むように修飾できる。例えば、アリール環構造へカルボキシル基を導入するために、フリーデル-クラフト触媒存在下でホスゲンが使用できる。3月 1985 J. Advanced Organic Chemistry。

【0030】

適した標的残基には：レセプター、アプトマー、核酸、修飾核酸、抗体（Ig G、Ig A、Ig M、Fcフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント）、リガンド、孔形成化合物、レクチン、ペプチド、細胞抽出物、分子の混合物、合成抗体および人工抗体および反応部位を提供できる遊離カルボキシル基または遊離アミンを含んでいるコンビナトリー化学で生成された物質などが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0031】

本発明の一つの方法において、試薬の凍結乾燥混合物は小さなチューブ中に提供され、使用者は問題とする標的分子を直接的にかまたはタンパク質の最上の活性化を得るために短いプレインキュベーション後に加え、30分から一夜の間インキュベートした後に反応停止試薬を加える。抱合体はそのままかまたはゲル濾過カラムを通して精製される。凍結乾燥混合物は1mg抱合体のための小さなバイアルで提供されるであろう。

【0032】

プロセスパラメータ

20

試薬の連続的添加および不活性な状態での各々の隔離は一工程で抱合体を作成することを可能にする。しかしながら、反応が再水和により同時に起こるので、緩衝液（特にpH）、提供モル比（反応混合物へ加えられた種々の反応体の）、および二つの相手（即ち、酵素に対する抗体）間およびスルホ-NHSおよびEDAC間の反応の時間のような抱合条件に対してある種の制限が強いられる。

【0033】

最適な標識に対して適切なpHを見いだすために実験が行われた。EDACは酸性pHでより反応性が高く、およびスルホ-NHSはより塩基性pHでより反応性が高いので、有効な抱合には狭いpH範囲（好適にはpH6.8-7.4）しか存在しない。EDACが非常に反応性であり、およびスルホ-NHSの反応性が低いpH6.0で行われた実験では、これらの条件下ではAPCおよびストレプトアビジン間に抱合体は形成されないことが示された。

30

【0034】

結合相手に対するタンパク質（即ち、標的に対する標識）の提供モル比は好適には抱合相手の各々の組に対して実験的に最適化されるであろう。例えば、SAに対するPBXL色素の好適な比（1：25）はSAに対するAPCの比（1.2：1）とは異なっている。別の例はウサギIgGに対するPBXL-3の抱合であり、1PBXL-3分子に対して20のIgGの提供比が使用された。

【0035】

反応の時間は最適化されるであろう。SAに対するAPC抱合については、一夜標識が2時間標識時間よりも有効である。しかしながら、2時間標識がほとんどの研究者にとってより都合がよい。

40

【0036】

スルホ-NHSおよびEDAC間の反応の時間が、結合相手を再水和色素複合体へ添加する前に重要である。いくつかの色素（標識）は異なった速度で再水和することが知られている。しかしながら、中性pH付近でのEDACの短い半減期は、活性化を可能にし、および標識のお互いの架橋を防止するため、即座の標識の再水和または少なくともかなり均質な溶液が得られることを必要とする。

実施例

本発明のより完全な理解を容易にするため、以下にいくつかの実施例が提供されている。

50

しかしながら、本発明の範囲はこれらの実施例に記載されている特定の実施態様に制限されるわけではなく、それらは例示のためのみを目的としている。

【0037】

実施例 1 直接（標準同時法）または凍結乾燥試薬（連続凍結法）からの 1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノ - プロピル）カルボジイミド（EDAC） / N - ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ - NHS）を経たフィコエリスリンおよびストレプトアビジンの抱合

方法：抱合体を製造する二つの方法が以下に概説するようなプロトコールに従って実施された。第一の方法において（標準同時法または標準法）、フィコエリスリン（PE）はストレプトアビジン（SA）と、緩衝液中で二つのタンパク質（PE & SA）と EDAC およびスルホ - NHS を同時に混合することにより抱合された。混合物を室温で 2 時間インキュベートすると抱合体が得られた。第二の方法において（連続的凍結法または本発明の方法）、規定した含量の PE + D - （+） - トレハロース、EDAC およびスルホ - NHS 溶液を化学物質の相互作用を防止するために連続的に瞬間凍結して凍結乾燥した。凍結乾燥された後、凍結乾燥物質はストレプトアビジン含有リン酸緩衝液に再懸濁した。反応体は室温で少なくとも 2 時間反応させた。生じた抱合体はゲルろ過により精製した。抱合体の濃度および結合較差が決定され、以下に説明される詳細なプロトコールに続くデータ表に報告されている。

【0038】

標準同時法 - B - フィコエリスリン（B - PE）は 0.05% アジ化ナトリウムを含んでいる 1 L の 100 mM リン酸ナトリウム（pH = 6.8）に対して透析した。この緩衝液は 3 時間の間 1 時間ごとに交換し、B - PE の濃度はその吸光係数を用いて決定された。約 3 mg / mL の B - PE 溶液へストレプトアビジンを 2 対 1（B - PE / SA）の比で加えた。1 M EDAC を上で使用したものと同一の緩衝液で調製し、0.05 M EDAC の最終濃度が得られるように反応混合物へ加えた。次に、0.1 M スルホ - NHS 溶液を上と同一の緩衝液を使用して調製した。0.005 M スルホ - NHS の最終濃度が得られるようにスルホ - NHS を反応混合物へ加えた。反応は室温で 2 時間行われた。抱合体は溶出緩衝液として 100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl および 0.05% アジ化ナトリウム（pH 7.2）を使用する SEPHADEX 300（AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH）で精製した。

【0039】

連続凍結法 - B - PE は上記のように 0.05% アジ化ナトリウムを含んでいる 1 L の 100 mM リン酸ナトリウム（pH = 6.8）に対して透析した。この緩衝液は 3 時間の間 1 時間ごとに交換した。B - PE の濃度はその吸光係数を用いて決定された。0.1 M トレハロースの最終濃度が得られるように 1 mL の 3 mg / mL の B - PE 溶液へ D - （+） - トレハロース粉末を加えた。混合物は粉末が溶解するまでボルテックスし、微量遠心チューブ中、1 mL を液体窒素中で瞬間凍結した。次に 1 M EDAC および 0.1 M スルホ - NHS 保存溶液を上と同一の緩衝液を使用して調製した。EDAC 保存液は、1 mL に再構築した場合 0.05 M EDAC の最終濃度が得られるような容量で色素を含んでいる凍結試薬上へ層積し、瞬間凍結した。スルホ - NHS は、1 mL に再構築した場合、0.005 M スルホ - NHS の最終濃度が得られるような容量で上記凍結試薬中へ加え、瞬間凍結した。連続的凍結の順序は決定的ではない；しかしながら、試薬の急速な凍結は、加えられている試薬の活性維持、ならびに再水和工程前の試薬の相互作用を防止するための両方に決定的である。次に凍結試薬は一夜凍結乾燥した。次の日、チューブに加えた場合に SA に対して B - PE が 2 / 1 のモル比になるように、SA を含んでいる 1 mL の蒸留水を調製した。凍結乾燥混合物を 1 mL の SA 溶液に懸濁して溶解させた。反応を室温で 2 時間行わせた後、一夜 4 で保存した。抱合体は溶出緩衝液として 100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl および 0.05% アジ化ナトリウム（pH 7.2）を使用する SEPHADEX 300（AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH）で精製した。

【 0 0 4 0 】

結合較差アッセイ。 黒色の 96 ウェルマイクロタイタープレート (DYNEX LABORATORIES) をウェル当たり 100 μ L の 100 μ g/mL ビオチニル化 BSA を用い、37 で 4 時間、受動的に被覆した。プレートはウェル当たり 200 μ L のシングル強度の PBS 緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウムおよび 0.05 % アジ化ナトリウム) で 5 回洗浄した。プレートは次にウェル当たり 100 μ L の半強度の PBS で希釈した MBB ブロッキング緩衝液 (1.5 % BSA、1 % カゼイン、0.5 % ゼラチンおよび 0.1 % トウイーン 20) を用い RT で 2 時間ブロックした。抱合体は指定された濃度で、100 ng ビオチン / 100 μ L を含む (または ビオチン を含まない) 0.05 % アジ化ナトリウム含有 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH = 6.8) と混合し、室温で 20 分間プレインキュベートした。次に、100 μ L の試料 (競合的 ビオチン を添加してまたは添加しないで) を BSA - ビオチン前被覆プレートのウェルに加えた。これらは室温で 1 時間放置して反応させた。次にプレートを 100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.05 % NaN_3 (pH 7.2) で 3 回洗浄し、各々の洗浄にはウェル当たり 200 μ L の溶液が用いられた。湿ったプレートは 550 nm 励起および 590 nm 発光のフィルターの組を使用して FLUOROLITE 1000 プレートリーダー (DYNEX LABORATORIES) にて読みとった。

特異的結合に対する標的タンパク質対色素比 (F/P) の影響。 この実験において、標的タンパク質に対する蛍光色素比 (F/P) を凍結乾燥試料で変化させてより良好な抱合体が生成されるかどうかを観察した。凍結乾燥試料に対し、凍結乾燥に先立って冷凍保護剤として 100 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8) 緩衝液に 0.5 M トレハロースが加えられた。凍結乾燥は最初の実験で 16 時間実施された。連続凍結法および標準同時法両方での生成抱合体に対し、EDAC の量は 0.05 M であり、およびスルホ - NH_2 の量は 0.005 M であった。材料は調製後直ちに使用された。アッセイは室温で 2 時間実施され、続いて試料は結合アッセイに先だって 4 で一夜保存された。

【 0 0 4 1 】

データから、標準同時法抱合体では最適化された抱合化性能はまだ良好ではないが、連続凍結法では試薬のさらなる最適化をしなくても比較的良好に働いているようである (78 % 結合較差)。しかしながら、凍結乾燥材料に対して、2 の F/P 比を使用したデータは 3 のデータよりもより良い結合較差を与えた。

【 0 0 4 2 】

【表 1】

処理	抱合体 (μ g/mL)	- ビオチン	+ ビオチン	% 結合較差
液体 F/P 比 = 3	10	3506	116	97
	5	2327	105	95
	2.5	1100	104	91
	0.25	466	102	78
凍結乾燥 F/P 比 = 3	10	1858	403	78
	5	730	415	43
	2.5	427	435	-2
	0.25	405	399	1
凍結乾燥 F/P 比 = 2	10	nd	nd	nd
	5	1688	157	91
	2.5	649	163	75
	0.25	176	157	11

【 0 0 4 3 】

実施例 2 . 連続凍結法を用いる抱合体生成に対するより長い凍結乾燥時間の影響
液体材料に対する凍結乾燥形式により密接に関連した作業において、材料からすべての液

体が除去されていることを確実にするためにこの実験ではより長いおよび徹底的な凍結乾燥が実施された（16時間に対して64時間）。すべての実験において、二つのみの抱合体濃度（10および5 $\mu\text{g/mL}$ ）が使用され、および2のF/P比が使用された。他の点では、すべての条件は実施例1に記載されているとおりである。凍結乾燥直後または-20で1週間保存後の抱合体のための色素を使用したものの間では相違は観察されなかった。達成された結合較差は以前に標準同時法抱合法で観察されたものと等しかった。完全乾燥はこれらの試薬の適切な性能に決定的であるようである。

【0044】

【表2】

処理	抱合体 ($\mu\text{g/mL}$)	-ビオチン (cps)	+ビオチン (cps)	% 結合較差
凍結乾燥	10	2062	82	96%
F/P 比 = 2	5	1085	63	94%
すぐ使用した				
凍結乾燥	10	1855	74	96%
F/P 比 = 2	5	1173	64	95%
1週間保存した				

10

【0045】

実施例3．連続凍結／凍結乾燥 R - P E 活性化材料から生成される抱合体に対する pH の影響

20

このフォーマットからの抱合体生成に対する最適 pH 値を決定するため、ストレプトアビジンへの R - P E 抱合体が B - P E について実施例2で記載されたように生成された、ただし、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液は6.8から7.4の間の異なった pH 値に調整され、および室温での2時間の反応後に0.1 M リジンで反応停止された。

【0046】

すべての色素は2のF/P比で提供され、試薬は凍結乾燥直後に抱合に使用された。抱合体の3つの濃度が用いられたが、これらの異なった pH 値での結合較差の相違はほとんど観察されなかった。pH 6.8で最良のデータが得られたが、この相違は pH 7.4よりも本質的に良好ではなく、実際すべてが多分、抱合試薬として適切な性能を果たしているであろう。

30

【0047】

【表3】

pH	抱合体 ($\mu\text{g/mL}$)	-ビオチン (cps)	+ビオチン (cps)	% 結合較差
6.8	10	1975	75	96
	5	1159	73	94
	2.5	513	74	86
7.0	10	1840	74	96
	5	1083	70	94
	2.5	383	77	80
7.2	10	1755	76	96
	5	555	68	88
	2.5	285	70	75
7.4	10	1633	72	96
	5	736	64	91
	2.5	254	68	73

40

【0048】

実施例4．-20での保存における凍結乾燥試薬の機能的安定性

本発明に安定な生成物が必要であるのは明白である。生成物が急速に分解されるかどうかを決定するために短期間の研究が、実施例3に記載されたように（ただし、0.1 M トレ

50

ハロースが凍結媒質に使用されている) 作製および凍結乾燥された B - P E を使用して実施された。反応は pH 6 . 8 で実施され、反応停止は行われなかった。少なくとも 3 週間までの保存では、これらの試薬により生成された抱合体に対してはほとんど影響はなく、有益な影響さえもあるように思われた。

【 0 0 4 9 】

【表 4】

保存時間 (週)	抱合体 ($\mu\text{g/mL}$)	-ビオチン (cps)	+ビオチン (cps)	% 結合較差
0	10	2023	209	90
	5	1206	185	85
1	10	902	77	91
	5	264	72	73
2	10	2920	63	98
	5	1579	61	96
	2.5	474	58	88
3	10	2360	57	98
	5	990	57	94
	2.5	394	56	86

10

【 0 0 5 0 】

実施例 5 . スルホ - N H S / E D A C / D (+) - トレハロース連続凍結法を使用するストレプトアビジンへの化学的に安定化したフィコビリソーム (P B X L - 3 ; M A R T E K B I O S C I E N C E S) の抱合

20

P B X L - 3 標識ストレプトアビジン抱合体の作製について連続凍結法が標準同時法と比較された。標準同時法において、P B X L - 3 をストレプトアビジン (S A)、E D A C およびスルホ - N H S と緩衝液中で混合し、文献の方法と類似の様式で同時に反応させた。混合物は室温で 2 時間インキュベートした。連続凍結法においては、以下の試薬を連続的に凍結乾燥した：規定の容量の D (+) - トレハロースを加えた 1 0 0 m M リン酸ナトリウム中の P B X L - 3、1 M E D A C および 0 . 1 M スルホ - N H S。凍結材料は一夜凍結乾燥し、乾燥粉末はストレプトアビジン含有の非常に低濃度のリン酸緩衝液に再懸濁した。室温で 2 時間放置して反応させた。抱合体は次に S E P H A R O S E 6 B によるゲル濾過により精製した。抱合体の結合較差が決定され、抱合フォーマットの性能が比較された。

30

【 0 0 5 1 】

プロトコール：

標準同時法 - P B X L - 3 は 1 L の 1 0 0 m M リン酸ナトリウム (pH 7 . 4) に対して透析し、3 時間の間 1 時間ごとに緩衝液を交換した。P B X L - 3 の濃度は 6 2 0 n m での吸光度により決定された (5 A u / m g P B X L - 3)。P B X L - 3 溶液へストレプトアビジンを 0 . 4 の F / P 比または P B X L - 3 複合体当たり 2 5 の S A で加えた。1 M E D A C 保存液を上で使用したものと同一の緩衝液で調製し、0 . 0 5 M の最終濃度が得られるように反応混合物へ加えた。0 . 1 M スルホ - N H S 溶液を上と同一の緩衝液を使用して調製し、0 . 0 0 5 M の最終濃度が得られるように反応混合物へ加えた。室温で 2 時間反応させた。抱合体は溶出緩衝液として 1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l および 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム (pH 7 . 2) を使用する S E P H A R O S E C L 6 B (A M E R S H A M P H A R M A C I A B I O T E C H) で精製した。

40

【 0 0 5 2 】

連続凍結法 - P B X L - 3 は 1 L の 1 0 0 m M リン酸ナトリウム (pH 7 . 4) に対して透析し、この緩衝液は 3 時間の間 1 時間ごとに交換した。P B X L - 3 の濃度は 6 2 0 n m での吸光度により決定された (5 A u / 1 m g タンパク質)。この液は 0 . 5 M の最終濃度が得られるように D - (+) - トレハロース粉末と混合し (ボルテックスするこ

50

とにより) 一部を微量遠心チューブに加え液体窒素中またはメタノール/ドライアイス浴上で瞬間凍結した。1 M E D A C 保存溶液を上と同一の緩衝液を使用して調製し、凍結材料の上面へ 0.05 M の最終濃度(すべての試薬が混合された時)で送達されるような容量で加え、その間、加えられた材料がほとんど瞬間的に凍結するように液体窒素温度下である。0.1 M スルホ-NHS 保存溶液を上と同一の緩衝液を使用して調製し、加えられた材料がほとんど瞬間的に凍結するような液体窒素温度下、すべての試薬が混合された時 0.005 M の最終濃度で送達されるような容量で前の凍結試薬の上面へ加えた。種々のモル比で S A を含んでいる溶液を上記と同じ緩衝液を用いて調製した。この S A 溶液は凍結乾燥工程前に規定の容量に凍結乾燥混合物を再懸濁するために使用された(すべての試薬を規定の濃度に保つため)。再懸濁した試薬および S A は室温で 2 時間一緒にして反応させた。得られた抱合体は溶出緩衝液として 100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl および 0.05 % アジ化ナトリウム(pH 7.2)を使用する SEPHAROSE CL6B (AMERSHAM PHARMACIA) で精製した。

【0053】

結合較差アッセイ。 黒色の 96 ウェルマイクロタイタープレート(DYNEX LABORATORIES)をウェル当たり 100 μ L の 100 μ g/mL ビオチニル化 BSA を用い、37 で 4 時間、受動的に被覆した。プレートは前に記載したように 1 x PBS 緩衝液で 5 回洗浄し、MBB ブロッキング緩衝液でブロックした。プレートはウェル当たり 200 μ L の 1 x PBS で 5 回洗浄した。抱合体と 100 ng ビオチン/100 μ L を(またはビオチン無しで)を表に示されたようにアッセイ緩衝液と一緒に混合し、ウェル内へ加える前に 20 分間プレインキュベートした。プレインキュベートした材料は 100 μ L /ウェルで加え、室温で 1 時間放置して反応させた。プレートはウェル当たり 200 μ L の 100 mM リン酸ナトリウム(pH 7.2)、150 mM NaCl、0.05 % Na₂SO₄ 緩衝液で 3 回洗浄した。プレートは次に励起に 590 nm フィルターおよび発光に 660 nm フィルターを使用して FLUOROLITE 1000 (DYNEX LABORATORIES)にて読みとった(電圧は 7.7 V にセットされた)。

【0054】

【表 5】

処理 *	抱合体 μ g/mL	-ビオチン (cps)	+ビオチン (cps)	% 結合較差
同時 PBXL-3/SA 比 = 25 液体試薬	50	オーバー	30	nd
	25	3056	15	100
	12.5	1594	11	99
	6.25	642	8	99
連続 PBXL-3/SA 比 = 25 凍結乾燥試薬	36	903	17	98
	18	115	14	88
	9	10	10	0
	4.5	8	8	0

【0055】

実施例 6. E D A C / スルホ-NHS 架橋のための標準同時法、およびその他の標準架橋法、S M C C / S A T A との連続凍結法の比較

実施例 5 に記載されているような二つのスルホ-NHS / E D A C 法(連続凍結および標準同時法)および標準 S M C C / S A T A 抱合法により作製された抱合体を比較する別の組の実験が行われた。類似の性能がこれらの方法により提供された。

【0056】

【表 6】

同時 スルホ-NHS/EDAC			連続 スルホ-NHS/EDAC		SMCC/SATA	
抱合体 μg/mL	-ビオチン/ +ビオチン	%Δ 結合	-ビオチン/ +ビオチン	%Δ 結合	-ビオチン/ +ビオチン	%Δ 結合
50	729/4	99%	280/2	99%	451/6	99%
25	516/3	99%	42/2	95%	194/4	99%

* 同時＝標準同時法；連続＝連続凍結法または発明の方法

実施例 7 . 標準同時法と比較されたスルホ - N H S / E D A C 連続凍結法（発明）による
ストレプトアビジンへのアロフィコシアニン（A P C）の抱合

方法： 本発明の方法が機能性 A P C 標識ストレプトアビジン抱合体を生成する能力で標準同時法と比較された。標準同時法において、A P C はストレプトアビジン（S A）、E D A C およびスルホ - N H S と同時に混合された。次に混合物は室温で 2 時間インキュベートして抱合体を形成させ、抱合体はゲル濾過により精製された。連続凍結法においては、A P C を D - (+) - トレハロースと混合し、凍結した。凍結色素の上面に特定量の E D A C 溶液を層積して瞬間凍結し、次に凍結試薬の上面にスルホ - N H S の溶液を層積して瞬間凍結した。混合していない（瞬間凍結のため）凍結試薬は一夜凍結乾燥した。乾燥試薬はストレプトアビジン含有低リン酸緩衝液に再懸濁し、室温で少なくとも 2 時間反応させた。得られた抱合体はゲル濾過により精製した。抱合体の濃度および結合較差は特異的にビオチンを結合する能力で決定され、比較された。

【 0 0 5 7 】

プロトコール：

標準同時法 - A P C は 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含んでいる 1 L の 1 0 0 m M リン酸ナトリウム（p H 7 . 2）に対して透析し、3 時間の間 1 時間ごとに緩衝液を交換した。A P C 濃度はその吸光係数を用いて決定された。3 - 5 m g / m L の A P C 溶液へストレプトアビジンを 1 . 2 対 1 の F / P 比（蛍光対標的タンパク質）で加えた。1 M E D A C 溶液を上で使用したものと同一の緩衝液で調製し、0 . 0 5 M E D A C の最終濃度が得られるように反応混合物へ加えた。スルホ - N H S の 0 . 1 M 保存溶液を上と同一の緩衝液で作製し、0 . 0 0 5 M スルホ - N H S の最終濃度が得られるように反応混合物へ加えた。反応混合物は室温で少なくとも 2 時間インキュベートした。得られた抱合体は溶出緩衝液として 1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l および 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム（p H 7 . 2）を使用する S E P H A D E X 3 0 0（A M E R S H A M P H A R M A C I A）カラムで精製した。

【 0 0 5 8 】

連続凍結法 - A P C は上記のように透析して定量した。0 . 5 M トレハロースの最終濃度が得られるように 3 - 5 m g / m L の A P C 溶液へトレハロース粉末を加えた。混合物は粉末が溶解するまでボルテックスした。これを分割して液体窒素またはメタノール/ドライアイスで瞬間凍結した。次に 1 M E D A C および 0 . 1 M スルホ - N H S 保存溶液が前記のように調製された。再懸濁で 0 . 0 5 M の最終濃度が得られるような容量で色素を含んでいる凍結試薬上へ E D A C 溶液の一部を層積し、その間、E D A C 添加で瞬間凍結が得られるようにチューブは凍結溶液に浸されている。0 . 0 0 5 M の最終濃度が得られるような容量でチューブ内ですでに凍結した試薬の上面にスルホ - N H S 保存溶液を加え、その間、スルホ - N H S 試薬の急速な凍結が得られるようにチューブは凍結溶液に浸されている。凍結試薬は一夜凍結乾燥した。1 . 2 / 1 の F / P 比が得られるように水性 S A 溶液が作製され、凍結乾燥試薬を 1 m L に再懸濁するために使用された。これらは室温で 2 時間反応させ、一夜 4 で保存した。得られた抱合体は前記のように精製した。

【 0 0 5 9 】

結合較差アッセイ - 5 9 0 n m 励起および 6 6 0 n m 発光のフィルターの組を使用して P B X L - 3 で前に説明したように行われた。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

本発明で説明されたNHS / E D A C 仲介架橋のための連続凍結法が同時混合法と十分に
対照され、競合するビオチン存在下または不在下で、B S A ビオチンプレートへのA P C
標識ストレプトアビジンの首尾一貫した高い結合較差を与えた。トレハロースは - 2 0
での1週間までの保存には必要ないようである。

【 0 0 6 1 】

【表 7】

処理	*	抱合体 ($\mu\text{g/mL}$)	-ビオチン (cps)	+ビオチン (cps)	% 結合較差
同時		10	4013	16	100
液体		5	3894	11	100
同時		10	3638	14	100
液体		5	2712	10	100
連続		10	2198	11	99.5
凍結乾燥		5	2039	10	99.5
トレハロース		2.5	1273	10	99.2
なし		0.25	114	9	92
連続		10	2349	11	99.5
凍結乾燥		5	2146	9	99.6
0.1 M		2.5	998	10	99
トレハロース		0.25	42	9	78
連続		10	3182	19	99.4
凍結乾燥		5	2842	13	99.5
トレハロースなし		2.5	2225	13	99.4
1週間保存		0.25	244	11	99.5

* 同時＝標準同時法；連続＝連続凍結法または発明の方法

【 0 0 6 2 】

実施例 8 . スルホ - N H S / E D A C を経た連続凍結法 (発明) を使用するヤギ抗ウサギ
I g G への P B X L - 3 (M A R T E K B I O S C I E N C E S) の抱合

この実験において、P B X L - 3 は前記のように透析され、定量された。D - (+) - ト
レハロース粉末は 0 . 5 M トレハロースの最終濃度が得られるように 3 m g / m L P B
X L - 3 溶液に加えられた。混合物は粉末が溶解するまでボルテックスした。これを分割
して液体窒素浴で瞬間凍結した。次に 1 M E D A C および 0 . 1 M スルホ - N H S 保存
溶液が前記のように調製された。再懸濁 (1 m L) で 0 . 0 5 M の最終濃度が得られるよ
うな容量で凍結色素溶液上面へ E D A C 溶液の一部を層積し、その間、E D A C 添加で瞬
間凍結が得られるようにチューブは凍結溶液にまだ浸されている。0 . 0 0 5 M の最終濃
度が得られるような容量でチューブ内ですでに凍結した試薬の上面にスルホ - N H S 保存
溶液を加え、その間、スルホ - N H S 試薬の急速な凍結が得られるようにチューブは凍結
溶液に浸されている。凍結試薬は一夜凍結乾燥した。2 / 1 の F / P 比を与えるように水
性ヤギ抗ウサギ I g G 溶液を作製し、凍結乾燥試薬の 1 m L での再懸濁に使用した。これ
らは室温で 2 時間反応させ、一夜 4 で保存した。得られた抱合体は前記のように精製し
た。

結合較差アッセイ - 5 9 0 n m 励起および 6 6 0 n m 発光のフィルターの組を使用し
て P B X L - 3 で前に説明したように行われた。

【 0 0 6 3 】

この連続法はこの実施例では最適化されてはいなかったが、市販品として入手可能な抗体
を P B X L 色素に結合できることが示されている。これらの抱合体は機能結合アッセイに
使用できるであろう。

【 0 0 6 4 】

【表 8】

処理	* 抱合体 μg/mL	-ウサギIgG (cps)	+ウサギIgG (cps)	% 結合較差
連続	50.00	170	38	77.6
	25.00	70	28	60.0
	12.50	58	23	60.3
	6.25	42	22	47.6

連続＝連続凍結法または発明の方法

実施例 9 . 連続凍結法として構成されたスルホ - N H S / E D A C 化学を使用する再懸濁された凍結乾燥試薬への標的タンパク質 (ストレプトアビジン) 添加のための最適時間の決定

10

図 2 のデータは、連続凍結法において、何時抱合相手を添加するのが最適時間であるのかを決定するために使用された時間変化の例を示している。本方法の使用の容易さのための本質的な問題は、それが一工程で (溶液のタンパク質加えるとそれでお終い) できるか、あるいは再水和し最適な時間後に添加するかである。もし、結合相手を加える前に標識を最初に活性化しなければ、不適切な試薬の制限できない架橋が起こるかもしれないと考えられていたので、どのくらい良好に抱合体が生成できるかを見るためにこの実験が行われた。

【 0 0 6 5 】

結合較差アッセイ - 結合アッセイは 5 9 0 n m 励起および 6 6 0 n m 発光のフィルターの組を使用して P B X L - 3 で前に説明したように行われた。図 2 は連続的に凍結した試料を再水和して 3 0 分以内に結合相手を加えることの重要性を示している。抱合効率は、結合相手の添加に先立って化学反応体および P B X L - 3 を溶液中に持続して保つことにより大いに影響される。興味あることに、3 0 分後 (この時色素は完全に活性化されている) に結合相手を添加することと直後に結合相手を添加することの間には機能的効率において大きな増加は存在しなかった。このことは予期されなかったことであり、連続凍結法に非常に単純なフォーマットを提供する (標的タンパク質の水性懸濁液による再水和、インキュベート、精製および使用) 。

20

【 0 0 6 6 】

溶液相化学反応体は、結合相手の添加に先立ってより長く待つほど無効になるので、液体材料を保存するフォーマットはこの型の反応には適していないであろう。2 4 時間後、反応性基はもはや機能していない。このデータは連続凍結法により提供された N H S 、 E D A C および P B X L - 3 間の空間的または時間的分離の有用性を示しており、有用な抱合体を作製するための簡便で迅速な方法が提供されている。

30

【 0 0 6 7 】

実施例 1 0 . 連続凍結法を使用して生成された P B X L - 3 標識ストレプトアビジンの安定性

連続凍結法で生成された標識タンパク質に適切な安定性が存在するかどうかを決定するため、P B X L - 3 標識ストレプトアビジン抱合体の安定性が評価された。結合アッセイが前記のように行われたが、これらの抱合体の安定性をよりよく評価するために、各々の時間点でビオチン応答曲線が描かれた。図 3 は、1 ヶ月の経過にわたって (1 日、7 日、2 8 日) 再水和された連続凍結法の一実験で作製された 3 つの試料に対応している 3 つのビオチン用量応答曲線を示しており、再水和の日には同一のロットのストレプトアビジンに抱合させた。3 つの実質的に重なっている遊離ビオチン用量応答曲線は、本発明により説明された凍結乾燥試薬の 1 ヶ月の保存時間を通してストレプトアビジンへの P B X L - 3 の標識はかなり首尾一貫していることを示している。

40

【図面の簡単な説明】

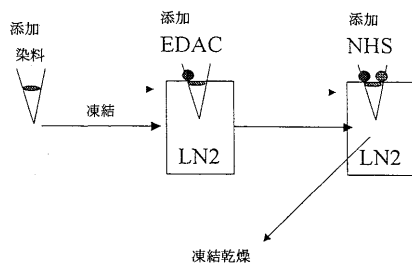
【図 1】図 1 は本発明の方法の一つの態様に含まれる工程を示している概要図である。

【図 2】図 2 は抱合相手の添加時間を最適化するために使用された時間経過の例を示している棒グラフである。

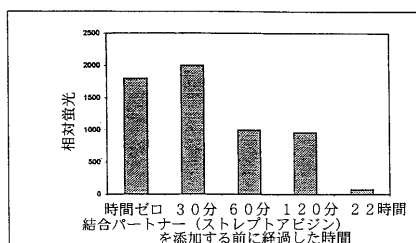
50

【図 3】図 3 は 3 つの時間点で活性化された色素により描かれたビオチン用量応答曲線を示している。

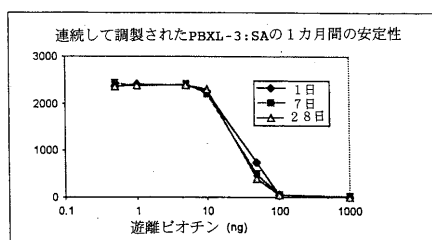
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 モースマン, ジョン・ピー

アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 0 4 5 , コロンビア, ロックスパークル・ロウ 9 6 1 5

(72)発明者 ヴェン, シャンフェイ

アメリカ合衆国オレゴン州ビーヴァートン, ノース・ウエスト・コトリック・ブレイス 4 0 7

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開平 0 2 - 1 5 2 9 5 6 (J P , A)

特開平 0 3 - 1 8 1 8 5 3 (J P , A)

特開平 0 1 - 2 9 4 7 0 0 (J P , A)

国際公開第 9 8 / 0 0 3 8 7 6 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/532

G01N 33/58