

【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】令和2年10月15日(2020.10.15)

【公表番号】特表2019-531474(P2019-531474A)

【公表日】令和1年10月31日(2019.10.31)

【年通号数】公開・登録公報2019-044

【出願番号】特願2019-512260(P2019-512260)

【国際特許分類】

G 01 N 33/533 (2006.01)

G 01 N 21/64 (2006.01)

【F I】

G 01 N 33/533

G 01 N 21/64

F

【手続補正書】

【提出日】令和2年8月31日(2020.8.31)

【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】

第1の抗体を含む組成物であつて、

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。

【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。

【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。

【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】

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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>) (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(例えば、 $-\left(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\left(\text{CH}_2\right)_y-\text{OR}$ (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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ<sub>3</sub><sup>+</sup>)(式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>)(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<sub>3</sub><sup>-</sup>)、カルボキシレート基(-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、ホスフェート基(-OP(O)<sub>3</sub><sup>-</sup>)、ホスホネート基(-PO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、ポリ(エチレン)グリコール部分(例えば、 $-\left(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\left(\text{CH}_2\right)_y-\text{OR}$ (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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ<sub>3</sub><sup>+</sup>)(式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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(PEG)、MS-(PEG)、またはベタインを含む、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(PEG)から選択される、請求項1に記載の組成物。

#### 【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いない、方法。

#### 【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。

#### 【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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>)(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(例えば、-

$(OCH_2CH_2O)_x - (CH_2)_y - OR$  (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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ<sub>3</sub><sup>+</sup>) (式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>) (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<sub>3</sub>-)、カルボキシレート基(-CO<sub>2</sub>-)、ホスフェート基(-OP(O<sub>3</sub>-))、ホスホネート基(-PO<sub>3</sub>-)、ポリ(エチレン)グリコール部分(例えば、-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ<sub>3</sub><sup>+</sup>) (式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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(PEG)、MS-(PEG)、またはベタインを含む、請求項12~16のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項18】

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、

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。

#### 【請求項19】

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、請求項18に記載の方法。

#### 【請求項20】

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、請求項18に記載の方法。

#### 【請求項21】

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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>) (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(例えば、-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-PQ<sub>3</sub><sup>+</sup>) (式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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<sub>n</sub>H<sub>m</sub>) (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<sub>3</sub>-)、カルボキシレート基(-CO<sub>2</sub>-)、ホスフェート基(-OP(O<sub>3</sub>-))、ホスホネート基

( - P O<sub>3</sub> - )、ポリ(エチレン)グリコール部分(例えば、- (O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O)<sub>x</sub> - (C H<sub>2</sub>)<sub>y</sub> - O R(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<sub>1~6</sub>アルキルである)など)、アンモニウム(-N H<sub>3</sub><sup>+</sup>)、第4級アンモニウム(-N R<sub>3</sub><sup>+</sup>)基(式中、RはC<sub>1~6</sub>アルキルである)、またはホスホニウム基(-P Q<sub>3</sub><sup>+</sup>)(式中、Qはアリール、置換アリール、またはC<sub>1~6</sub>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)、またはベタインを含む、請求項18~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

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、請求項18に記載の方法。

【請求項23】

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、請求項22に記載の方法。