

【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 0 1 N 33/533 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/533

G 0 1 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。

【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_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（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_{1-6} アルキルである）など）、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）；

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（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_{1-6} アルキルである）など）、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

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（ $-C(O)C_nH_m$ ）（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（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_{1-6} アルキルである）など）、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

$(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x - (\text{CH}_2)_y - \text{OR}$ (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 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである) など)、アンモニウム ($-\text{NH}_3^+$)、第 4 級アンモニウム ($-\text{NR}_3^+$) 基 (式中、 R は $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである)、またはホスホニウム基 ($-\text{PQ}_3^+$) (式中、 Q はアリール、置換アリール、または $\text{C}_{1\sim6}$ 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 ($-\text{C}_n\text{H}_m$) (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 ($-\text{OSO}_3-$)、カルボキシレート基 ($-\text{CO}_2-$)、ホスフェート基 ($-\text{OPO}_3-$)、ホスホネート基 ($-\text{PO}_3-$)、ポリ (エチレン) グリコール部分 (例えば、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x - (\text{CH}_2)_y - \text{OR}$ (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 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである) など)、アンモニウム ($-\text{NH}_3^+$)、第 4 級アンモニウム ($-\text{NR}_3^+$) 基 (式中、 R は $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである)、またはホスホニウム基 ($-\text{PQ}_3^+$) (式中、 Q はアリール、置換アリール、または $\text{C}_{1\sim6}$ 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)、またはペタインを含む、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 ($-\text{C}(\text{O})\text{C}_n\text{H}_m$) (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 (例えば、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x - (\text{CH}_2)_y - \text{OR}$ (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 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである) など)、アンモニウム ($-\text{NH}_3^+$)、第 4 級アンモニウム ($-\text{NR}_3^+$) 基 (式中、 R は $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである)、またはホスホニウム基 ($-\text{PQ}_3^+$) (式中、 Q はアリール、置換アリール、または $\text{C}_{1\sim6}$ 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 ($-\text{C}_n\text{H}_m$) (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 ($-\text{OSO}_3-$)、カルボキシレート基 ($-\text{CO}_2-$)、ホスフェート基 ($-\text{OPO}_3-$)、ホスホネート基

(- P O₃ -)、ポリ(エチレン)グリコール部分(例えば、 - (O C H₂ C H₂ O)_x - (C H₂)_y - O R (式中、x は 1 ~ 2 0 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) など)、アンモニウム(- N H₃⁺)、第 4 級アンモニウム(- N R₃⁺) 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(- P Q₃⁺) (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

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 1 8 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

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 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

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 2 2 に記載の方法。