

【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17年12月2日(2005.12.2)

【公表番号】特表2002-504992(P2002-504992A)

【公表日】平成14年2月12日(2002.2.12)

【出願番号】特願平10-549499

【国際特許分類第7版】

G 0 1 N 33/548

G 0 1 N 15/14

G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/543

【F I】

G 0 1 N 33/548 A

G 0 1 N 15/14 C

G 0 1 N 33/483 C

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/543 5 9 7

【手続補正書】

【提出日】平成17年4月19日(2005.4.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成17年4月 19日

特許庁長官 小 川 洋 殿

1. 事件の表示

平成10年特許願第549499号

2. 補正をする者

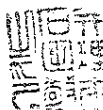
名称 コールター インターナショナル コーポレイション

3. 代 理 人

住所 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁理士(7751)石 田 敬



4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を別紙の通り変更する。

7. 添付書類の目録

請求の範囲

1通



### 請求の範囲

1. フローサイトメトリー分析において実質的に似ている結合パートナー密度を有する細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法であって、該方法が、第1の細胞集団と会合した第1の結合パートナーに結合することができ、かつフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料に直接コンジュゲートしているリガンドで、第1の細胞集団を標識するステップと、第2の細胞集団と会合した第2の結合パートナーに結合することができ、かつ前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料にコンジュゲートしているアミノデキストランと架橋しているリガンドで、第2の細胞集団を標識するステップと、を含み、ここで前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は、活性化に基づいて、各々の細胞について異なる検出可能な蛍光強度を作り出すことを特徴とする方法。

2. 細胞の複数の集団を一回の測定で定量するための方法であって、

(a) 選択された細胞集団の1～複数の対を供するステップであって、各々の前記対の第1の集団は、各々の前記対の第2の集団上の第2の結合パートナーの密度に実質的に等しい第1の結合パートナー密度を有し、ここで前記第1の結合パートナーは各々の対の前記第1の細胞集団内でのみ見い出され、前記第2の結合パートナーは各々の対の前記第2の細胞集団内でのみ見い出され、ここで前記第1の結合パートナーは各々の前記第1の集団の中で異なり、前記第2の結合パートナーは各々の前記第2の集団の中で異なるステップと、

(b) フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料で直接、標識された第1のリガンドを、各々の第1の集団に供するステップであって、前記第1のリガンドは前記第1の結合パートナーに結合することができ、かつ各々の前記第1の集団の中で異なり、そして前記フィコビリプロテイン又はタンデム染料は各々の前記第1のリガンドの中で異なるステップと、

(c) アミノデキストラン（フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料）コンジュゲートで標識された第2のリガンドを、各々の第2の集団に供するステップであって、該第2のリガンドは前記第2の結合パートナーに結合することができ、かつ各々の前記第2の結合パートナーの中で異なり

、そして細胞集団の対の中で、前記コンジュゲートのフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は第1のリガンドのフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料と同一であり、リガンドの各々の対のフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料は異なる色であるステップと、

(d) 前記複数の選択された細胞集団を、前記第1及び第2の標識されたリガンドの各々の対と、結合パートナー標識化リガンド複合体を形成するのを許容するのに十分な時間、インキュベートするステップと、

(e) 各々の前記複合体中のフィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料を、レーザー励起線で励起させて蛍光を生じさせるステップと、

(f) フローサイトメトリーを用いる1回の測定において、各々の前記標識された第1のリガンドに結合した各々の第1の細胞集団の蛍光発光及び各々の前記標識された第2のリガンドに結合した各々の第2の集団の蛍光発光の強度を測定するステップであって、

細胞集団の各々の対において、前記第1の標識されたリガンドは、前記第2の標識されたリガンドと、同じ色であるが定量的に区別できる強度の蛍光シグナルを供し、細胞集団は、標識強度及び色において検出可能なバリエーションにより区別されるステップと、

を含む方法。

3. 前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料が、レーザー励起線488 Ar<sup>+</sup> 下で発光することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料が、レーザー励起線632.8nm He/Ne下で発光することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

5. 前記細胞の集団が白血球であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

6. 前記リガンドが、抗体、機能的なフラグメント、オリゴヌクレオチド又は

MHC-ペプチド- (ストレプトアビジンもしくはアビジン) 複合体であり、前記結合パートナーがレセプターであることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。

7. 前記リガンドがオリゴヌクレオチドであり、前記結合パートナーが核酸配列であることを特徴とする請求項6に記載の方法。

8. 前記第1及び第2の標識されたリガンドの間の強度差が、正常なドナーにおいて前記第1及び第2の細胞集団についての天然の結合パートナー密度の範囲により観察される強度差より大きいことを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の方法。

9. 前記アミノデキストランで架橋されたリガンド- (フィコビリプロテイン又はフィコビリプロテイン含有タンデム染料) コンジュゲートが、アミノデキストラン分子当り2～20のフィコビリプロテイン又はタンデム染料分子を含み、前記アミノデキストランが、 $1/142 \sim 1/5$ の、C2～C6ジアミノアルカンで置換の程度を有することを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載の方法。

10. 前記アミノデキストランが、 $1/45 \sim 1/7$ の1, 3-ジアミノプロパンでの置換の程度を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

11. 前記アミノデキストランが5X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の方法。

12. 前記アミノデキストランが1X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の方法。

13. 更なる細胞集団を、緑色蛍光タンパク質及び青色蛍光タンパク質からなる群から選択されるマーカーで標識することにより、該集団を区別することを更に含む請求項1～12のいずれかに記載の方法。

14. アミノデキストラン分子当り2～20のフィコビリプロテインを含むリガンドアミノデキストラン-タンデム染料コンジュゲートであって、該アミノデキストランが、 $1/142 \sim 1/5$ の、C2～C6ジアミノアルカンでの置換の程度を有することを特徴とするコンジュゲート。

15. 前記アミノデキストランが、 $1/45 \sim 1/7$ の範囲の、1, 3-ジアミノプロパンでの置換の程度を有することを特徴とする請求項14に記載のリガンドア

ミノデキストラン-タンDEM染料コンジュゲート。

16. 前記アミノデキストランが5X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項14又は15に記載のリガンドアミノデキストラン-タンDEM染料コンジュゲート。

17. 前記アミノデキストランが1X-アミノデキストランであることを特徴とする請求項14又は15に記載のリガンドアミノデキストラン-タンDEM染料コンジュゲート。

18. 生物物質を検出する方法であって、

(a) リガンド-アミノデキストラン-フィコビリプロテイン含有タンDEM染料コンジュゲートを、検出すべき生物材料を含むサンプルと混合して、該コンジュゲートのリガンドを該材料と結合させて複合体を形成するステップであって、ここで、該コンジュゲートが、アミノデキストラン分子当り2~20のタンDEM染料分子を含み、前記アミノデキストランが、1/142 ~ 1/5の、C2~C6ジアミノアルカンでの置換の程度を有するステップと、

(b) 前記複合体の各々のタンDEM染料分子を励起させて発光させるステップと、

(c) 前記複合体からの蛍光シグナルを検出するステップと、を含む方法。

19. 前記生物物質がヌクレオチド塩基であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. 前記生物材料物質が、1000未満の細胞表面レセプターを含む抗原であり、前記リガンドが抗体であることを特徴とする請求項18に記載の方法。