

【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29年1月26日(2017.1.26)

【公表番号】特表2016-508213(P2016-508213A)

【公表日】平成28年3月17日(2016.3.17)

【年通号数】公開・登録公報2016-016

【出願番号】特願2015-545948(P2015-545948)

【国際特許分類】

G 01 N 33/542 (2006.01)

G 01 N 21/63 (2006.01)

【F I】

G 01 N 33/542 A

G 01 N 21/63

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月9日(2016.12.9)

【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】

生体試料中の複数の標的をプローブする方法であって、

(a) 1以上のプローブを、複数の標的を含む生体試料中に存在する1以上の標的に結合させる工程と、

(b) 工程(a)で結合した1以上のプローブからの信号を検出する工程と、

(c) 工程(a)の結合プローブを含む試料を、電子移動試薬及び以下の工程(d)での標的改質を防ぐ添加剤と接触させる工程と、

(d) 工程(c)の試料を照射する工程と、

(e) 1以上のプローブを、工程(d)の試料中に存在する1以上の標的に結合させる工程と、

(f) 工程(e)で結合したプローブからの信号を検出する工程とを含む、方法。

【請求項2】

工程(a)のプローブが光信号発生剤を含み、工程(b)で検出される信号が光信号である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程(a)のプローブが蛍光信号発生剤を含み、工程(b)で検出される信号が蛍光信号である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

工程(d)における試料の照射がpH5~9の緩衝液の存在下で実施される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

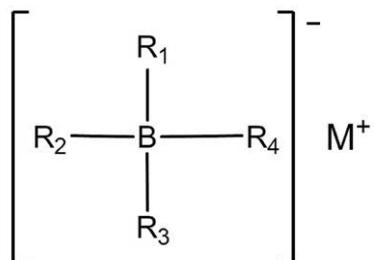
工程(d)における試料の照射が、350nm~1.3μmの波長の光に試料を露光することによって達成される、請求項1記載の方法。

【請求項6】

工程(d)における試料の照射が、400~700nmの波長の光に試料を露光することによって達成される、請求項5記載の方法。

**【請求項 7】**

電子移動試薬が、以下の構造式で表されるボレート塩である、請求項 1 記載の方法。

**【化 1】**

式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は各々独立に、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はヘテロアリールであり、これらのアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はヘテロアリールは、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルコキシ、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルアミノ、アミノ、ヒドロキシル、シアノ、ハロゲン又はニトロからなる群から選択される1以上の置換基で置換されていてもよく、

R<sub>4</sub>は、アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、これらのアルキル、アルケニル又はアルキニルは、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルコキシ、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルアミノ、アミノ、ヒドロキシル、シアノ、ハロゲン又はニトロからなる群から選択される1以上の置換基で置換されていてもよく、

M<sup>+</sup>は、有機カチオン及び無機カチオンからなる群から選択される。

**【請求項 8】**

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>が各々アリール又は置換アリールであり、R<sub>4</sub>がアルキル又は置換アルキルである、請求項7記載の方法。

**【請求項 9】**

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>が各々非置換フェニルであり、R<sub>4</sub>が非置換ブチルであり、ボレート塩がトリフェニルブチルボレート塩である、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

プローブが形態染色剤である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 11】**

電子移動試薬が高水溶性ボレート塩である、請求項 3 記載の方法。

**【請求項 12】**

高水溶性ボレート塩が、テトラ-n-ブチルボレート塩、フェニル-トリス-2-(4-メトキシPEG(10)メチルフェニル)エチルボレート塩又はジフェニル-ビス-2-(4-(メトキシPEG(10)メチル)フェニル)エチルボレート塩である、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

工程(c)～(f)が1回以上繰り返される、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 14】**

工程(c)及び(d)が約100ミリ秒～約15分間実施される、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 15】**

工程(d)の後に、試料から残留電子移動試薬を有効に除去する洗浄溶液で試料を洗浄することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 16】**

洗浄溶液が助剤を含有する、請求項15記載の方法。

**【請求項 17】**

工程(a)のプローブ及び工程(e)のプローブが各々信号発生剤を含み、工程(a)の信号発生剤が工程(e)の信号発生剤とは異なる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 18】**

工程( d )における試料の照射が、光活性化型ケミカルブリーチングによって信号発生剤を実質的に不活性化する光反応を開始する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】

工程 d )の後に、検出可能な信号が検出されない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

標的改質を防止する添加剤がラジカルスカベンジャーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 1】

ラジカルスカベンジャーが、アスコルビン酸、n - プロピルガレート、メルカプトエタノール、システインヒドロクロリド、t - ブチルヒドロキシトルエン、シクロヘプタトリエン、ジオクチルフタレート、1 , 4 - ジヒドロ - o - トルアミド、a - トコフェロール及びトロロクスからなる群から選択される、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

標的改質を防止する添加剤が一重項酸素用クエンチャーである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

一重項酸素用クエンチャーが、アスコルビン酸、a - トコフェロール、クルクミン及び D A B C O からなる群から選択される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

生体試料中の複数の標的をプローブする方法であって、

( a ) 第 1 のプローブセット及び第 2 のプローブセットを含む複数のプローブを、複数の標的を含む生体試料中に存在する複数の標的に結合させる工程と、

( b ) 工程( a )で結合した第 1 のプローブセットからの第 1 の信号セットを検出する工程と、

( c ) 工程( a )の結合プローブを含む試料を、電子移動試薬及び以下の工程( d )での標的改質を防ぐ添加剤と接触させる工程と、

( d ) 工程( c )の試料を照射する工程と、

( e ) 工程( a )で結合した第 2 のプローブセットからの第 2 の信号セットを発生させる工程と、

( f ) 第 2 の信号セットを検出する工程と

を含む、方法。

【請求項 2 5】

ハイスループット多重化生体試料分析方法であって、

各サイクルにおいて、染色及びイメージングし、続いて、電子移動試薬及び標的改質を防止する添加剤を適用し、生体試料を照射するシグナルサイクリングプロセスを含む、方法。

【請求項 2 6】

プローブと異なる生体試料成分を有意に改質せずに迅速なシグナルサイクリングを可能にする、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

光標識生体標的を示す一連の 2 以上の画像であって、画像が、生体試料中の複数の標的をプローブするプロセスで得られるものであり、プロセスが、

( a ) 1 以上の光プローブを、複数の標的を含む生体試料中に存在する 1 以上の標的に結合させる工程と、

( b ) 工程( a )で結合した光プローブからの信号を検出する工程と、

( c ) 工程( a )の結合光プローブを含む試料を、電子移動試薬及び以下の工程( d )での標的改質を防ぐ添加剤と接触させる工程と、

( d ) 工程( c )の試料を照射する工程と、

( e ) 1 以上の光プローブを、工程( d )の試料中に存在する 1 以上の標的に結合させる工程と、

( f ) 工程( e )で結合した光プローブからの信号を検出する工程と  
を含む、画像。

**【請求項 2 8】**

結合剤及び信号発生剤が単体において統合されている、請求項1記載の方法。

**【請求項 2 9】**

単体が小分子プローブである、請求項2 8記載の方法。

**【請求項 3 0】**

小分子プローブが有機色素である、請求項2 9記載の方法。

**【請求項 3 1】**

有機色素が、試料中の特定の構造又はタンパク質に結合する、請求項3 0記載の方法。

**【請求項 3 2】**

生体試料中の複数の標的を調べるための信号をブリーチングするためのキットであって

、  
信号発生剤と接触すると、照射により信号発生剤をブリーチングすることができる電子移動試薬と、

信号発生剤の光活性化型ケミカルブリーチング中の標的改質を防止する添加剤と  
を含む、キット。

**【請求項 3 3】**

生体試料中の複数の標的を調べるためのシグナルサイクリングプロセスが可能となるよ  
うに請求項3 2記載のキットを使用して信号をブリーチングする方法であって、生体試料  
中に存在する1以上の標的に結合した1以上のプローブからの信号を検出した後に、試料  
を電子移動試薬及び標的改質を防止する添加剤と接触させる工程と、試料を照射する工程  
とを含む、方法。

**【請求項 3 4】**

フローセルデバイス内にロード／捕捉された生体試料の光活性化型ケミカルブリーチ  
ング用自動化プロセスであって、以下の自動化工程

- a ) 1以上のプローブを、生体試料中に存在する1以上の標的に結合させる工程と、
- b ) 工程(a)で結合した1以上のプローブからの信号を検出する工程と、
- c ) 電子移動試薬及び場合により後続の試料照射中の標的改質を防止する添加剤をフロー  
セルに充填する工程と、
- d ) 露光により試料を照射してプローブからの信号を不活性化する工程と、
- e ) 場合により、電子移動試薬及び添加剤を洗い流す工程と、
- f ) 別のラウンドのイメージング用の1以上の他のプローブを用いて、工程a)及びb)  
を繰り返す工程と

を含む、光活性化型ケミカルブリーチング用自動化プロセス。

**【請求項 3 5】**

光学フィルタ、顕微鏡対物レンズ及び移動台を使用して試料の特定領域を光に曝露する  
ことによって、試料の照射を達成する、請求項3 4記載の光活性化型ケミカルブリーチ  
ング用自動化プロセス。

**【請求項 3 6】**

試料全体を同時に露光することによって、試料の照射を達成する、請求項3 4記載の光  
活性化型ケミカルブリーチング用自動化プロセス。