

【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 3 年 6 月 10 日 (2021.6.10)

【公表番号】特表 2020-519866 (P2020-519866A)

【公表日】令和 2 年 7 月 2 日 (2020.7.2)

【年通号数】公開・登録公報 2020-026

【出願番号】特願 2019-560168 (P2019-560168)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/542 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 21/63 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/03 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/542 A

G 0 1 N 21/64 F

G 0 1 N 21/64 A

G 0 1 N 21/63 Z

G 0 1 N 21/64 G

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/00 Z

G 0 1 N 21/03 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 4 月 23 日 (2021.4.23)

【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】

繫留バイオ分子に付着した 2 光子蛍光標識の角度パラメータを決定するための方法であって、前記方法は、

(a) 配向された様式でバイオ分子を平面に付着させることであって、前記バイオ分子は、2 光子蛍光標識を用いて既知の部位において標識される、ことと、

(b) 第 1 の偏光を使用する第 1 の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明することと、

(c) ステップ (b) における照明の結果として、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 1 の物理的性質を検出することと、

(d) 第 2 の偏光を使用する前記第 1 の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明することと、

(e) ステップ (d) における照明の結果として、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出することと、

(f) ステップ (e) において検出される前記光の第 2 の物理的性質を、ステップ (c) において検出される前記光の第 1 の物理的性質と比較し、前記平面に対する前記 2 光子蛍光標識の角度パラメータを決定することと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の物理的性質は、p 偏光された光強度 I_p であり、前記第 2 の物理的性質は、s 偏光された強度 I_s であり、ステップ (f) における比較は、角度パラメータを決定するための方程式

【数 1】

$$\frac{\langle \cos^4 \phi \sin^2 \phi \rangle}{\langle \sin^6 \phi \rangle} = \frac{3}{8} \frac{1}{f^4} \frac{I_p}{I_s}.$$

を解くことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

一連の 2 つ以上の異なるバイオ分子複合体毎にステップ (a) から (f) を繰り返すことであって、前記一連の中の前記バイオ分子複合体はそれぞれ、同一の 2 光子蛍光標識を用いて異なる部位において標識される前記バイオ分子を含む、ことと、前記 2 つ以上の異なるバイオ分子複合体毎に決定される前記角度パラメータを使用して、前記バイオ分子の構造を決定することとをさらに含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記バイオ分子は、タンパク質であり、前記一連の 2 つ以上の異なるバイオ分子複合体はそれぞれ、単一位点システインまたはメチオニン置換を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 2 光子蛍光標識はまた、第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

同時に、または続いて、第 2 の基本周波数の励起光による照明に応じて、ステップ (c) において前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識によって生成される光の第 1 の物理的性質、およびステップ (e) において前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出することとをさらに含み、前記第 2 の基本周波数は、前記第 1 の基本周波数と同一であり得るまたは異なり得る、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (e) において検出される前記光の第 2 の物理的性質を、ステップ (c) において検出される前記光の第 1 の物理的性質と比較し、前記平面に対する前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識の角度パラメータを決定することとをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

1 つ以上の 2 光子蛍光標識、第 2 高調波 (SH) 活性標識、和周波数 (SF) 活性標識、または差周波数 (DF) 活性標識、またはそれらの任意の組み合わせの前記角度パラメータのデータを、前記バイオ分子の構造モデルに大域的に適合させることとをさらに含み、前記構造モデルは、前記バイオ分子内の前記 1 つ以上の標識の既知の部位についての情報を備える、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記バイオ分子は、タンパク質であり、前記 2 光子蛍光標識は、非線形活性非天然アミノ酸である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記非線形活性非天然アミノ酸は、明らかに非線形活性ではない非天然アミノ酸に付着される非線形活性部分を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、強度または偏光である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 2 光子蛍光標識によって生成される前記光は、集光レンズを使用することなく、低開口数ピンホール構成を使用して検出される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記平面は、支持脂質二重層を備え、前記バイオ分子は、前記支持脂質二重層に付着される、または前記支持脂質二重層の中に挿入される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記励起光は、全内部反射を使用して前記平面に指向される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 2 光子蛍光標識はまた、第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性であり、

(g) 前記第 1 の基本周波数の励起光と同一であり得るまたは異なり得る第 2 の基本周波数の励起光を用いた照明に応じて、前記付着したバイオ分子に付着した前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される光の強度を同時または連続的に検出することであって、検出は、

(i) 前記励起光の第 1 の偏光状態と、

(i i) 前記励起光の第 2 の偏光状態と

を使用して実施される、ことと、

(h) ステップ (c) (i) および (c) (i i) において検出される光強度の比を計算することによって、基板表面への法線に対して第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識の角度パラメータを決定することと、

(i) 前記 2 光子蛍光標識の角度パラメータに関する方程式および 2 光子蛍光に関して計算される光強度比を積分し、前記 2 光子蛍光方程式を満たす角度パラメータ値対を決定することと、

(j) 前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識の角度パラメータに関する方程式、および前記第 2 高調波 (S H)、和周波数 (S F)、または差周波数 (D F) 光に関して計算される前記光強度比を積分し、前記第 2 高調波 (S H)、和周波数 (S F)、または差周波数方程式を満たす角度パラメータ値対を決定することと、

(k) ステップ (i) および (j) において識別される前記角度パラメータ値対の交差を決定し、前記 2 光子蛍光および前記第 2 高調波 (S H)、和周波数 (S F)、または差周波数方程式の両方を満たす一意の一对の角度パラメータ値を決定することと

によって、前記標識の角度パラメータを決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記角度パラメータは、平均傾転角、配向分布幅、またはそれらの一对の組み合わせを備える、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

バイオ分子の配座変化を検出するための方法であって、前記方法は、

a) 配向された様式で前記バイオ分子を平面に付着させることであって、前記バイオ分子は、2 光子蛍光標識を用いて標識される、ことと、

b) 第 1 の偏光および第 2 の偏光を使用する第 1 の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明することと、

c) ステップ (b) における前記第 1 および第 2 の偏光を伴う照明の結果として、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 1 の物理的性質および光の第 2 の物理的性質を検出することと、

d) 前記付着したバイオ分子に、(i) 既知のリガンドとの接触、(i i) 候補結合バ

ートナとの接触、または (i i i) 実験条件の変化を受けさせることと、

e) 前記第 1 の偏光および前記第 2 の偏光を使用する前記第 1 の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明することと、

f) ステップ (e) における前記第 1 および第 2 の偏光を伴う照明の結果として、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 3 の物理的性質および光の第 4 の物理的性質を検出することと、

g) ステップ (f) において検出される前記光の第 3 および第 4 の物理的性質の比を、ステップ (c) において検出される前記光の第 1 および第 2 の物理的性質の比と比較することであって、前記光の物理的性質の比の変化は、前記バイオ分子が配座変化を受けたことを示す、ことと

を含む、方法。

【請求項 18】

前記 2 光子蛍光の物理的性質は、約 0.01 ~ 約 0.2 の開口数を有するピンホール検出装置を使用して、レンズを使用することなく検出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 2 光子蛍光標識はまた、第 2 高調波、和周波数、または差周波数活性であり、第 2 高調波、和周波数、または差周波数光の物理的性質は、前記 2 光子蛍光の物理的性質の検出と連続的または同時に検出される、請求項 17 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (f) において比較される比は、前記第 2 高調波、和周波数、または差周波数光の物理的性質に対する前記 2 光子蛍光の物理的性質の比を備える、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記バイオ分子は、タンパク質分子である、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記タンパク質分子は、薬剤標的であり、前記既知のリガンドは、既知の薬剤である、または前記候補結合パートナーは、薬剤候補である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 2 光子蛍光標識は、1 つ以上の工学的システイン残基において前記タンパク質分子に付着される、請求項 21 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記 2 光子蛍光標識は、前記タンパク質分子に組み込まれた非線形活性非天然アミノ酸である、請求項 21 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記励起光は、全内部反射を使用して前記平面に送達される、請求項 17 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記バイオ分子は、支持脂質二重層の中への挿入または前記支持脂質二重層への繫留によって前記平面に付着される、請求項 17 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

候補結合パートナーを選別し、標的分子の配座を変調させる結合パートナーを識別するための方法であって、前記方法は、

(a) 前記標的分子を基板表面に繫留することとであって、前記標的分子は、結合パートナーとの接触に応じて配座変化を受ける、前記標的分子の一部に付着される 2 光子蛍光標識を用いて標識され、前記繫留標的分子は、前記基板表面上に正味の配向を有する、ことと

、

(b) 第 1 の基本周波数の励起光を用いて前記繫留標的分子を照明することと、

(c) 前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 1 の物理的性質を検出し、基準信号を生成することと、

(d) 連続的かつ個別に、前記繫留標的分子を前記 1 つ以上の候補結合パートナーと接触させることと、

(e) 前記 1 つ以上の候補結合パートナー毎に前記第 1 の基本周波数の励起光による照明に
応答して、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出することと、

(f) 前記 1 つ以上の候補結合パートナー毎に前記第 2 の物理的性質を前記第 1 の物理的性質と比較することとであって、前記第 1 の物理的性質の値に対する所与の候補結合パートナーに関する前記第 2 の物理的性質の値の変化は、前記候補結合パートナーが前記標的分子の配座を変調させることを示す、ことと

を含む、方法。

【請求項 28】

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、前記励起光の 2 つの異なる偏光の下の前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の強度を備える、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

2 光子蛍光は、集光レンズを使用することなく、約 0.01 ~ 約 0.2 である開口数を有するピンホール開口であって、前記ピンホール開口は、前記第 1 の基本周波数の励起光が前記基板表面上に入射する点において前記基板表面の直接上方または下方に位置付けられる、ピンホール開口を使用して、収集される、請求項 27 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

いくつかの実施形態では、第 1 の基本周波数および第 2 の基本周波数は、同一である。いくつかの実施形態では、標識反応は、バイオ後続薬剤候補および参照薬剤上の天然官能基への非線形活性標識の共有共役を備える。いくつかの実施形態では、天然官能基は、天然アミン基、天然カルボキシル基、または天然スルフヒドリル基から成る。いくつかの実施形態では、標識反応は、バイオ後続薬剤候補および参照薬剤上の遺伝子操作された官能基への非線形活性標識の共有共役を備える。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された官能基は、遺伝子操作されたアミン基、遺伝子操作されたカルボキシル基、または遺伝子操作されたスルフヒドリル基から成る。いくつかの実施形態では、標識反応は、参照薬剤の特異的領域に結合することが公知である非線形活性標識ペプチドの間の非共有相互作用を備える。いくつかの実施形態では、非線形活性標識ペプチドは、モノクローナル抗体の FC 領域に結合することが公知であるペプチドから成る。いくつかの実施形態では、非線形活性標識は、ピリジルオキサゾール (PyMPO) 部分、6 - プロモアセチル - 2 - ジメチルアミノナフタレン (パダン) 部分、または 6 - アクリロイル - 2 - ジメチルアミノナフタレン (アクリロダン) 部分から成る。いくつかの実施形態では、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、同一の界面に繫留される。いくつかの実施形態では、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、異なる界面に繫留される。いくつかの実施形態では、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、界面上で固定化されるタンパク質 A またはタンパク質 G 分子を使用して、界面に繫留される。いくつかの実施形態では、界面は、支持脂質二重層を備え、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、支持脂質二重層に係留される、またはその中に埋め込まれる。いくつかの実施形態では、界面は、支持脂質二重層を備え、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、Ni - NTA 部分から成る二重層脂質に結合する、遺伝学的に組み込まれた His タグを使用して、支持脂質二重層に係留される。いくつかの実施形態では、遺伝学的に組み込まれた His タグは、6x - His タグ、7x - His タグ、8x - H

i s タグ、9 x - H i s タグ、10 x - H i s タグ、11 x - H i s タグ、または12 x - H i s タグから成る。いくつかの実施形態では、非線形活性標識バイオ後続薬剤候補および参照薬剤は、全内部反射の使用を通して第1の基本周波数の光を用いて照明される。いくつかの実施形態では、2光子蛍光は、第1の基本周波数の励起光が界面上に入射する点において界面の直接上方または下方に位置付けられる、ピンホール開口を使用して収集される。いくつかの実施形態では、2光子蛍光は、集光レンズを使用することなく収集される。いくつかの実施形態では、バイオ後続薬剤候補および参照薬剤に関して測定される光の物理的性質、またはバイオ後続薬剤候補および参照薬剤に関して測定される比の統計的有意差は、0.05未満のp値によって示される。

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

懸留バイオ分子に付着した2光子蛍光標識の角度パラメータを決定するための方法であって、前記方法は、

(a) 配向された様式でバイオ分子を平面に付着させるステップであって、前記バイオ分子は、2光子蛍光標識を用いて既知の部位において標識される、ステップと、

(b) 第1の偏光を使用する第1の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明するステップと、

(c) ステップ(b)における照明の結果として、前記2光子蛍光標識によって生成される光の第1の物理的性質を検出するステップと、

(d) 第2の偏光を使用する前記第1の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明するステップと、

(e) ステップ(d)における照明の結果として、前記2光子蛍光標識によって生成される光の第2の物理的性質を検出するステップと、

(f) ステップ(e)において検出される前記光の第2の物理的性質を、ステップ(c)において検出される前記光の第1の物理的性質と比較し、前記平面に対する前記2光子蛍光標識の角度パラメータを決定するステップと

を含む、方法。

(項目2)

前記第1の物理的性質は、p偏光された光強度 I_p であり、前記第2の物理的性質は、s偏光された強度 I_s であり、ステップ(f)における比較は、角度パラメータを決定するための方程式

(数1)

$$\frac{\langle \cos^4 \phi \sin^2 \phi \rangle}{\langle \sin^6 \phi \rangle} = \frac{3}{8} \frac{1}{f^4} \frac{I_p}{I_s},$$

を解くステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

一連の2つ以上の異なるバイオ分子複合体毎にステップ(a)から(f)を繰り返すステップであって、前記一連の中の前記バイオ分子複合体はそれぞれ、同一の2光子蛍光標識を用いて異なる部位において標識される前記バイオ分子を含む、ステップと、前記2つ以上の異なるバイオ分子複合体毎に決定される前記角度パラメータを使用して、前記バイオ分子の構造を決定するステップとをさらに含む、項目1または項目2に記載の方法。

(項目4)

前記バイオ分子は、タンパク質であり、前記一連の2つ以上の異なるバイオ分子複合体はそれぞれ、単一部位システインまたはメチオニン置換を含む、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記バイオ分子は、2つ以上の異なる部位において2つ以上の異なる2光子蛍光標識を用いて標識され、前記2つ以上の異なる2光子蛍光標識のそれぞれによって生成される光の第1の物理的性質および第2の物理的性質は、前記2つ以上の異なる2光子蛍光標識に

関して同一である、または異なり得る、基本周波数の光による照明に応じて、ステップ (c) および (e) において同時または連続的に検出され、前記 2 つ以上の異なる 2 光子蛍光標識毎に、ステップ (c) において検出される前記光の第 1 の物理的性質とのステップ (e) において検出される前記光の第 2 の物理的性質の比較は、前記平面に対する前記 2 つ以上の異なる 2 光子蛍光標識のそれぞれの角度パラメータを決定するために使用される、項目 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6)

前記付着したバイオ分子はまた、第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識を用いて既知の部位において標識される、項目 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

前記 2 光子蛍光標識、および第 1 の第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識は、前記バイオ分子上の同一の既知の部位に付着した同一の標識である、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

同時に、または続いて、第 2 の基本周波数の励起光による照明に応じて、ステップ (c) において前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識によって生成される光の第 1 の物理的性質、およびステップ (e) において前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出するステップをさらに含み、前記第 2 の基本周波数は、前記第 1 の基本周波数と同一である、または異なり得る、項目 6 または項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

ステップ (e) において検出される前記光の第 2 の物理的性質を、ステップ (c) において検出される前記光の第 1 の物理的性質と比較し、前記平面に対する前記第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識の角度パラメータを決定するステップをさらに含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

1 つ以上の 2 光子蛍光標識、第 2 高調波 (SH) 活性標識、和周波数 (SF) 活性標識、または差周波数 (DF) 活性標識、またはそれらの任意の組み合わせの前記角度パラメータのデータを、前記バイオ分子の構造モデルに大域的に適合させるステップをさらに含み、前記構造モデルは、前記バイオ分子内の前記 1 つ以上の標識の既知の部位についての情報を備える、項目 1 - 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 11)

前記バイオ分子の構造モデル化のための構造的制約を提供する、X 線結晶構造解析データ、NMR データ、または他の実験データを組み込むステップをさらに含む、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記バイオ分子は、タンパク質であり、前記 2 光子蛍光標識、または第 2 高調波 (SH) 活性、和周波数 (SF) 活性、または差周波数 (DF) 活性標識は、非線形活性非天然アミノ酸である、項目 1 - 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 13)

前記非線形活性非天然アミノ酸は、L-Anap、Aladan、またはナフタレンの誘導体である、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

非線形活性部分は、明らかに非線形活性ではない非天然アミノ酸に付着される、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記光の第 2 の物理的性質は、前記光の第 1 の物理的性質と異なる、項目 1 - 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、同一の偏光を保有するが、異なる規模または強度である、項目 1 - 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記光の第 1 および前記第 2 の物理的性質は、異なる偏光を保有する、項目 1 - 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記照明するステップは、前記励起光の偏光を調節するステップを含む、項目 1 - 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記励起光の第 1 の偏光状態は、その入射面に対する p 偏光を備え、前記励起光の第 2 の偏光は、その入射面に対する s 偏光を備える、項目 1 - 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 0)

ステップ (c) および (e) における検出するステップは、検出器に到達する、前記 2 光子蛍光標識、または第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される前記光の偏光を調節するステップを含む、項目 1 - 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、強度または偏光である、項目 1 - 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記 2 光子蛍光標識によって生成される前記光は、集光レンズを使用することなく、低開口数ピンホール構成を使用して検出される、項目 1 - 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記低開口数ピンホールは、前記励起光が前記平面上に入射する、前記平面上の点の直接上方および下方に設置される、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記平面は、支持脂質二重層を備え、前記バイオ分子は、前記支持脂質二重層に付着される、またはその中に挿入される、項目 1 - 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記励起光は、全内部反射を使用して前記平面に指向される、項目 1 - 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記 2 光子蛍光標識はまた、第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性であり、

(g) 前記第 1 の基本周波数の励起光と同一である、または異なり得る、第 2 の基本周波数の励起光を用いた照明に応じて、前記付着したバイオ分子に付着した前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される光の強度を同時または連続的に検出するステップであって、検出は、

(i) 前記励起光の第 1 の偏光状態、および

(i i) 前記励起光の第 2 の偏光状態、

を使用して実施される、ステップと、

(h) ステップ (c) (i) および (c) (i i) において検出される光強度の比を計算することによって、基板表面への法線に対して第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識の角度パラメータを決定するステップと、

(i) 前記 2 光子蛍光標識の角度パラメータに関する方程式および 2 光子蛍光に関して計算される光強度比を積分し、前記 2 光子蛍光方程式を満たす角度パラメータ値対を決定するステップと、

(j) 前記第2高調波(SH)活性、和周波数(SF)活性、または差周波数(DF)活性標識の角度パラメータに関する方程式、および前記第2高調波(SH)、和周波数(SF)、または差周波数(DF)光に関して計算される前記光強度比を積分し、前記第2高調波(SH)、和周波数(SF)、または差周波数方程式を満たす角度パラメータ値対を決定するステップと、

(k) ステップ(i)および(j)において識別される前記角度パラメータ値対の交差を決定し、前記2光子蛍光および前記第2高調波(SH)、和周波数(SF)、または差周波数方程式の両方を満たす一意の一对の角度パラメータ値を決定するステップと、

によって、前記標識の角度パラメータを決定するステップをさらに含む、

項目1-25のいずれか1項に記載の方法。

(項目27)

バイオ分子は、前記バイオ分子に付着した前記2光子蛍光標識の配向分布の幅が35度以下であるように、前記平面に付着される、項目1-26のいずれか1項に記載の方法。

(項目28)

前記角度パラメータは、平均傾転角、配向分布幅、またはそれらの一对の組み合わせを備える、項目1-27のいずれか1項に記載の方法。

(項目29)

バイオ分子の配座変化を検出するための方法であって、前記方法は、

a) 配向された様式で前記バイオ分子を平面に付着させるステップであって、前記バイオ分子は、2光子蛍光標識を用いて標識される、ステップと、

b) 第1の偏光および第2の偏光を使用する第1の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明するステップと、

c) ステップ(b)における前記第1および第2の偏光を伴う照明の結果として、前記2光子蛍光標識によって生成される光の第1の物理的性質および光の第2の物理的性質を検出するステップと、

d) 前記付着したバイオ分子に、(i) 既知のリガンドとの接触、(ii) 候補結合パートナーとの接触、または(iii) 実験条件の変化を受けさせるステップと、

e) 前記第1の偏光および前記第2の偏光を使用する前記第1の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明するステップと、

f) ステップ(e)における前記第1および第2の偏光を伴う照明の結果として、前記2光子蛍光標識によって生成される光の第3の物理的性質および光の第4の物理的性質を検出するステップと、

(f) ステップ(f)において検出される前記光の第3および第4の物理的性質の比を、ステップ(c)において検出される前記光の第1および第2の物理的性質の比と比較するステップであって、前記光の物理的性質の比の変化は、前記バイオ分子が配座変化を受けたことを示す、ステップと

を含む、方法。

(項目30)

前記2光子蛍光の物理的性質は、0.2以下である開口数を有する、ピンホール検出装置を使用して検出される、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記開口数は、約0.01~約0.2である、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記2光子蛍光の物理的性質は、レンズを使用することなく検出される、項目29-31のいずれか1項に記載の方法。

(項目33)

前記2光子蛍光標識はまた、第2高調波、和周波数、または差周波数活性であり、第2高調波、和周波数、または差周波数光の物理的性質は、前記第1および第2の偏光を使用する第2の基本周波数の光を用いた照明の結果として、前記2光子蛍光の物理的性質の検出と連続的または同時に検出される、項目29-32のいずれか1項に記載の方法。

(項目 3 4)

ステップ (f) において比較される比は、前記第 2 高調波、和周波数、または差周波数光の物理的性質に対する前記 2 光子蛍光の物理的性質の比を備える、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記第 2 の基本周波数は、前記第 1 の基本周波数と同一である、項目 3 3 または項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記第 1 および第 2 の偏光は、s 偏光および p 偏光を備える、項目 2 9 - 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記バイオ分子は、タンパク質分子である、項目 2 9 - 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記タンパク質分子は、薬剤標的である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記既知のリガンドは、既知の薬剤である、または前記候補結合パートナーは、薬剤候補である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記 2 光子蛍光標識は、1 つ以上の工学的システイン残基において前記タンパク質分子に付着される、項目 3 7 - 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記 2 光子蛍光標識は、ピリジルオキサゾール (P y M P O) である、項目 2 9 - 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記 2 光子蛍光標識は、前記タンパク質分子に組み込まれた非線形活性非天然アミノ酸である、項目 3 7 - 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記非線形非天然アミノ酸は、L - A n a p、A l a d a n、またはナフタレンの誘導体である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記励起光は、全内部反射を使用して前記平面に送達される、項目 2 9 - 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記バイオ分子は、支持脂質二重層の中への挿入またはそこへの繫留によって前記平面に付着される、項目 2 9 - 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 6)

候補結合パートナーを選別し、標的分子の配座を変調させる結合パートナーを識別するための方法であって、前記方法は、

(a) 前記標的分子を基板表面に繫留するステップであって、前記標的分子は、結合パートナーとの接触に応じて配座変化を受ける、前記標的分子の一部に付着される 2 光子蛍光標識を用いて標識され、前記繫留標的分子は、前記基板表面上に正味の配向を有する、ステップと、

(b) 第 1 の基本周波数の励起光を用いて前記繫留標的分子を照明するステップと、

(c) 前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 1 の物理的性質を検出し、基準信号を生成するステップと、

(d) 連続的かつ個別に、前記繫留標的分子を前記 1 つ以上の候補結合パートナーと接触させるステップと、

(e) 前記 1 つ以上の候補結合パートナー毎に前記第 1 の基本周波数の励起光による照明に応答して、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出するス

テップと、

(f) 前記 1 つ以上の候補結合パートナー毎に前記第 2 の物理的性質を前記第 1 の物理的性質と比較するステップであって、前記第 1 の物理的性質の値に対する所与の候補結合パートナーに関する前記第 2 の物理的性質の値の変化は、前記候補結合パートナーが前記標的分子の配座を変調させることを示す、ステップと、

を含む、方法。

(項目 4 7)

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、前記励起光の 2 つの異なる偏光の下の光の強度を備え、ステップ (f) は、前記光の 2 つの強度の比を決定するステップを含み、前記比の変化は、前記候補結合パートナーが前記標的分子の配座を変調させることを示す、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記標的分子はまた、第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識を用いて標識される、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記 2 光子蛍光標識、および前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識は、同一の標識部分である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

(g) ステップ (c) を実施することと同時に、またはそれに続いて、第 2 の基本周波数の励起光を用いた照明に応じて、前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される光の第 1 の物理的性質を検出するステップであって、前記第 2 の基本周波数は、前記第 1 の基本周波数と同一である、または異なり得る、ステップと、

(h) ステップ (e) を実施することと同時に、またはそれに続いて、第 2 の基本周波数の励起光を用いた照明に応じて、前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される光の第 2 の物理的性質を検出するステップと、

(i) 前記 1 つ以上の候補結合パートナー毎に前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される前記第 2 の物理的性質を、前記第 2 高調波 (S H) 活性、和周波数 (S F) 活性、または差周波数 (D F) 活性標識によって生成される前記第 1 の物理的性質と比較するステップであって、前記第 1 の物理的性質の値に対する所与の候補結合パートナーに関する前記第 2 の物理的性質の値の変化はさらに、前記候補結合パートナーが前記標的分子の配座を変調させることを示す、ステップと

をさらに含む、項目 4 8 または項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記光の第 1 および第 2 の物理的性質は、前記励起光の 2 つの異なる偏光の下の光の強度を備え、ステップ (i) は、前記光の 2 つの強度の比を決定するステップを含み、前記比の変化は、前記候補結合パートナーが前記標的分子の配座を変調させることを示す、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記励起光は、前記表面から完全に内部反射されるような方法で前記基板表面に指向される、項目 4 6 - 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 3)

2 光子蛍光は、前記第 1 の基本周波数の励起光が前記基板表面上に入射する点において前記基板表面の直接上方または下方に位置付けられるピンホール開口を使用して収集される、項目 4 6 - 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 4)

2 光子蛍光は、集光レンズを使用することなく収集される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記ピンホール開口の開口数は、0.01～0.2である、項目53に記載の方法。

(項目56)

前記非線形活性標識は、ピリジルオキサゾール(PyMPO)部分、6-プロモアセチル-2-ジメチルアミノナフタレン(パダン)部分、または6-アクリロイル-2-ジメチルアミノナフタレン(アクリロダン)部分を含む、項目46-55のいずれか1項に記載の方法。

(項目57)

前記標的分子は、遺伝学的に組み込まれたHisタグを含むタンパク質である、項目46-56のいずれか1項に記載の方法。

(項目58)

前記Hisタグは、6x-Hisタグ、7x-Hisタグ、8x-Hisタグ、9x-Hisタグ、10x-Hisタグ、11x-Hisタグ、または12x-Hisタグを含む、項目57に記載の方法。

(項目59)

前記繫留標的分子は、全内部反射の使用を通して前記第1の基本周波数の光を用いて照明される、項目46-58のいずれか1項に記載の方法。

(項目60)

標的タンパク質の構造内でジェネリック薬剤または薬剤候補および参照薬剤によって誘発される配座変化を比較するための方法であって、前記標的タンパク質は、非線形活性標識を用いて標識され、界面上に正味の配向を有するように前記界面に繫留され、前記方法は、

a) 前記標的タンパク質を前記参照薬剤と接触させるステップであって、前記標的タンパク質は、特異的様式で前記参照またはブランド薬剤と相互作用する、ステップと、

b) 表面選択的技法を使用して、前記非線形活性標識によって生成される第1の信号または信号変化を測定することによって、前記標的タンパク質と前記参照薬剤との間の相互作用を検出するステップであって、前記第1の信号または信号変化は、前記参照薬剤に特異的である前記標的タンパク質の構造の配座変化を示す、ステップと、

c) 前記標的タンパク質を前記ジェネリック薬剤または薬剤候補と接触させるステップであって、前記標的タンパク質は、特異的様式で前記ジェネリック薬剤または薬剤候補と相互作用する、ステップと、

d) 表面選択的技法を使用して、前記非線形活性標識によって生成される第2の信号または信号変化を測定することによって、前記標的タンパク質と前記ジェネリック薬剤または薬剤候補との間の相互作用を検出するステップであって、前記第2の信号または信号変化は、前記ジェネリック薬剤または薬剤候補に特異的である前記標的タンパク質の構造の配座変化を示す、ステップと、

e) 前記第2の信号または信号変化を前記第1の信号または信号変化と比較し、前記ジェネリック薬剤または薬剤候補によって前記標的タンパク質において誘発される前記配座変化が、前記参照薬剤によって誘発される変化と同一または実質的に同一であるかどうかを決定するステップと、

を含む、方法。

(項目61)

前記標的タンパク質は、細胞表面受容体または抗原である、項目60に記載の方法。

(項目62)

前記参照薬剤は、モノクローナル抗体(mAb)である、項目60または項目61に記載の方法。

(項目63)

前記ジェネリック薬剤または候補薬剤は、小分子化合物、非抗体阻害性ペプチド、抗体、およびそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、項目60-62のいずれか1項に記載の方法。

(項目64)

前記ジェネリック薬剤または薬剤候補は、モノクローナル抗体（mAb）である、項目60 - 63のいずれか1項に記載の方法。

（項目65）

前記ジェネリック薬剤は、バイオ後続品である、項目60 - 64のいずれか1項に記載の方法。

（項目66）

前記標的タンパク質の構造の配座変化は、リアルタイムで検出される、項目60 - 65のいずれか1項に記載の方法。

（項目67）

前記非線形活性標識は、前記標的タンパク質の表面上の1つ以上のスルフヒドリル基によって前記標的タンパク質に結合される、項目60 - 66のいずれか1項に記載の方法。

（項目68）

前記1つ以上のスルフヒドリル基は、工学的スルフヒドリル基である、項目67に記載の方法。

（項目69）

前記非線形活性標識は、第2高調波（SH）活性標識または2光子蛍光標識である、項目60 - 68のいずれか1項に記載の方法。

（項目70）

前記非線形活性標識は、PyMPOマレイミド、PyMPO-NHS、PyMPOスクシンイミジルエステル、パダン、およびアクリロダンから成る群から選択される、第2高調波（SH）活性標識である、項目60 - 69のいずれか1項に記載の方法。

（項目71）

前記非線形活性標識は、非天然アミノ酸である、項目60 - 69のいずれか1項に記載の方法。

（項目72）

前記非天然アミノ酸は、L-Anap、Aladan、またはナフタレンの誘導体である、項目71に記載の方法。

（項目73）

生体類似性の決定は、少なくとも第2の構造特性評価または機能分析技法から取得される構造または機能データと組み合わせて、誘発された配座変化の比較に基づいて行われる、項目60 - 72のいずれか1項に記載の方法。

（項目74）

前記少なくとも第2の構造特性評価または機能分析技法は、円偏光二色性、X線結晶構造解析、生物学的分析、結合分析、酵素分析、細胞ベースの分析、細胞増殖分析、細胞ベースのレポータ分析、および動物モデル研究から成る群から選択される、項目73に記載の方法。

（項目75）

2つ以上のタンパク質サンプルを比較するための方法であって、前記方法は、

a) タンパク質産生プロセスの同一のステップに関して異なる時間に、タンパク質産生プロセスの異なるステップにおいて、同一のタンパク質産生プロセスの別個の工程から、または公称上同一のタンパク質を産生する異なるタンパク質産生プロセスから収集される、2つ以上のタンパク質サンプルを提供するステップと、

b) 光学界面の1つ以上の離散領域中で前記1つ以上のタンパク質サンプルからのタンパク質を繫留するステップであって、各サンプルからの前記繫留タンパク質は、非線形活性標識を用いて標識され、前記光学界面において正味の配向を有する、ステップと、

c) 基本周波数の光を用いた前記非線形活性標識の照明に応じて生成される、前記1つ以上の繫留タンパク質サンプル毎に基準非線形光学信号を測定するステップと、

d) 前記1つ以上の繫留タンパク質サンプルの測定された基準非線形光学信号を、相互と、または参照サンプルに関して測定される基準非線形光学信号と比較するステップであって、規定割合未満である、前記1つ以上の固定化タンパク質サンプルに関して測定され

る前記基準非線形光学信号の差異、または前記1つ以上のタンパク質サンプルに関して測定される前記基準非線形光学信号と参照サンプルのものとの間の差異は、前記1つ以上のタンパク質サンプルまたは前記参照サンプルのタンパク質が同等構造を有することを示す、ステップと、

を含む、方法。

(項目76)

前記1つ以上のタンパク質サンプルは、タンパク質産生プロセスの終点において収集され、ステップ(d)における比較は、タンパク質産物の品質管理に使用される、項目75に記載の方法。

(項目77)

前記1つ以上のタンパク質サンプルは、タンパク質産生プロセスの1つ以上のステップにおいて収集され、ステップ(d)における比較は、前記タンパク質産生プロセスの最適化に使用される、項目75に記載の方法。

(項目78)

前記1つ以上のタンパク質サンプルは、公称上同一のタンパク質を産生する異なるタンパク質産生プロセスから収集され、ステップ(d)における比較は、生体類似性を実証するために使用される、項目75に記載の方法。

(項目79)

前記光学界面は、ガラス表面、溶融石英表面、またはポリマー表面から成る群から選択される表面を備える、項目75 - 78のいずれか1項に記載の方法。

(項目80)

前記光学界面は、支持脂質二重層を備える、項目75 - 79のいずれか1項に記載の方法。

(項目81)

前記支持脂質二重層はさらに、N_i/N_TA - 脂質分子を含む、項目80に記載の方法。

(項目82)

前記1つ以上のタンパク質サンプルのタンパク質は、H_isタグを含む、項目81に記載の方法。

(項目83)

前記基準非線形光学信号またはその変化は、リアルタイムで監視される、項目75 - 82のいずれか1項に記載の方法。

(項目84)

前記非線形活性標識は、前記タンパク質の表面上の1つ以上のスルフヒドリル基によって前記タンパク質に結合される、項目75 - 83のいずれか1項に記載の方法。

(項目85)

前記1つ以上のスルフヒドリル基は、工学的スルフヒドリル基である、項目84に記載の方法。

(項目86)

前記非線形活性標識は、第2高調波(SH)活性標識である、項目75 - 85のいずれか1項に記載の方法。

(項目87)

前記固定化または繫留タンパク質は、それ自体がSHG活性である、ペプチド、ペプチド模倣薬、または他のリガンドとそれを接触させることによって標識され、前記固定化または繫留タンパク質に結合された前記SHG活性リガンドをもたらす、項目75 - 86のいずれか1項に記載の方法。

(項目88)

前記非線形活性標識は、PyMPOマレイミド、PyMPO - NHS、PyMPOスクシンイミジルエステル、パダン、およびアクリロダンから成る群から選択される第2高調波(SH)活性標識である、項目75 - 87のいずれか1項に記載の方法。

(項目 8 9)

前記非線形活性標識は、前記 1 つ以上のタンパク質サンプルのタンパク質に遺伝学的に組み込まれた非天然アミノ酸である、項目 7 5 - 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 0)

前記非天然アミノ酸は、L - A n a p、A l a d a n、またはナフタレンの誘導体である、項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記非線形活性標識は、第 2 高調波 (S H) 活性および 2 光子蛍光の両方であり、ステップ (c) における測定するステップはさらに、基準第 2 高調波信号および基準 2 光子蛍光信号の両方を測定するステップを含む、項目 7 5 - 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 2)

ステップ (d) の比較はさらに、前記 1 つ以上の繫留されるタンパク質サンプルの 2 光子蛍光基準信号に対する第 2 高調波の比を、相互と、または参照サンプルのものと比較するステップを含み、規定割合未満の差異は、前記 1 つ以上のタンパク質サンプルまたは前記参照サンプルのタンパク質が同等の構造を有することを示す、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

繫留バイオ分子に付着した 2 光子蛍光標識の 2 光子蛍光を検出するための方法であって、前記方法は、

(a) 配向された様式でバイオ分子を平面に付着させるステップであって、前記バイオ分子は、2 光子蛍光標識を用いて既知の部位において標識される、ステップと、

(b) 第 1 の偏光を使用する第 1 の基本周波数の励起光を用いて、前記付着したバイオ分子を照明するステップと、

(c) ステップ (b) における照明の結果として、前記 2 光子蛍光標識によって生成される光の物理的性質を検出するステップであって、前記 2 光子蛍光標識によって生成される前記光は、集光レンズを使用することなく、低開口数ピンホール構成を使用して検出される、ステップと

を含む、方法。

(項目 9 4)

前記低開口数ピンホールは、前記励起光が前記平面上に入射する、前記平面上の点の直接上方および下方に設置される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記平面は、支持脂質二重層を備え、前記バイオ分子は、前記支持脂質二重層に付着される、またはその中に挿入される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記励起光は、全内部反射を使用して前記平面に指向される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記低開口数ピンホールは、0 . 0 1 ~ 0 . 2 の開口数を有する、項目 9 4 に記載の方法。