

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年12月24日(24.12.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/255906 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/13 (2006.01) *C12N 15/115* (2010.01)

C07K 16/00 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/023340

(22) 国際出願日: 2020年6月15日(15.06.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2019-114690 2019年6月20日(20.06.2019) JP

(71) 出願人: コニカミノルタ株式会社 (**KONICA MINOLTA, INC.**) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 三宅 祐輝 (**MIYAKE Yuki**); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 富岡大輔 (**TOMIOKA Daisuke**); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 高橋 優 (**TAKAHASHI Masaru**); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 **SSINPAT** (**SSINPAT PATENT FIRM**); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

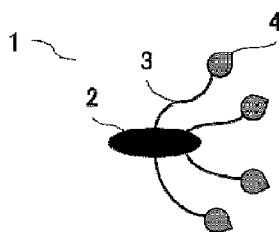
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) **Title:** LINKED BODY FOR FLUORESCENT LABELING AGENTS

(54) 発明の名称: 蛍光標識剤用連結体



(57) **Abstract:** The present invention provides a linked body for fluorescent labeling agents, said linked body suppresses noises caused by specific adsorption during quantitative determination and localization analysis of a target substance. The present invention is a linked body for fluorescent labeling agents obtained by bonding a probe molecule to a bonding group via a linker, wherein the labeling index of the bonding group for the probe molecule is 3 or more.

(57) 要約: 本発明は、標的物質の定量および局在解析をする上で、特異吸着によるノイズを抑制する蛍光標識剤用連結体を提供する。本発明は、プローブ分子がリンカーを介して結合基と結合してなる蛍光標識剤用連結体であって、前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が3以上である蛍光標識剤用連結体である。



WO 2020/255906 A1

明 細 書

発明の名称： 蛍光標識剤用連結体

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光標識剤用連結体に関する。

背景技術

[0002] 現在、医学や薬学をはじめとする生命科学の分野において、免疫組織化学法、FACS法およびELISA法等の手法を利用した、抗体およびガンマーカー等の標的物質を標識するための標識剤の開発が進められている。通常、標識剤は、標的物質と高い親和性を示す抗体等のプローブ分子と、所定の励起光によって発光する発光材が含まれる。中でも、発光材として退色しにくく長時間の観察および撮像が可能な有機蛍光色素や半導体ナノ粒子（量子ドット）等の蛍光体を複数個集積させたナノ粒子である、蛍光体集積ナノ粒子（Phosper Integrated Dots nanoparticles；以下、「PID」と称する場合がある。なお、Fluorescent substance-integrated nanoparticlesと英訳される場合もある）を用いた蛍光標識剤の研究が進められている。

[0003] 特許文献1には、長さが30オングストローム～1000オングストロームの高分子由来のスペーサーを介して第1結合基物質と結合したプローブ生体物質と、該第1結合基物質と特異的に結合可能な第2結合基物質を有する蛍光体集積ナノ粒子とを含む蛍光標識剤が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2015／133523号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1の蛍光標識剤は、スペーサーを所定の長さにすることで、蛍光

免疫染色において、プローブ分子および蛍光体集積ナノ粒子に、標的物質以外の物質が非特異的に吸着することを抑制し、蛍光免疫染色画像において、標的物質以外の輝点によるノイズの発生をある程度抑えることを達成している。

しかしながら、標的物質の定量および局在解析をする上で、例えば、標的物質が陽性と陰性の判断が困難なカットオフ値付近の場合等には、非特異吸着によるノイズを抑制するためにさらなる改善が求められていた。また、例えば特許文献1の蛍光標識剤を用いて8ビット表示した蛍光画像においては、1ピクセルあたりの輝度が30を下回ると、標的物質由来の輝点なのか非特異吸着に由来する輝点なのかの区別がつかない。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記課題に対して鋭意研究を行った結果、リンカー分子を介してプローブ分子と結合基とが結合した蛍光標識剤用連結体において、プローブ分子に対する結合基の標識率を所定の範囲にすることで、プローブ分子への標的物質以外の物質の非特異吸着が抑制され、蛍光免疫染色画像における非特異吸着物質の輝点によるノイズを低減できることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、例えば以下の[1]～[7]に関する。

[0007] [1] プローブ分子と結合基とが、直接、またはリンカー分子を介して結合してなる蛍光標識剤用連結体であって、前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が3以上である蛍光標識剤用連結体。

[2] 前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が20以下である[1]に記載の蛍光標識剤用連結体。

[3] 前記リンカー分子が、ポリアルキレングリコール由来の構造単位からなる親水性高分子を有する、[1]または[2]に記載の蛍光標識剤用連結体。

[4] 前記ポリアルキレングリコールが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールである、[3]に記載の蛍光標識剤用連結体。

[5] 前記プローブ分子と前記結合基とが、直接結合してなるか、または鎖

長が0オングストロームを超えて30オングストローム未満のリンカー分子を介して結合してなる、[1]～[4]のいずれかに記載の蛍光標識剤用連結体。

[6] 前記結合基が、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ハプテンおよび抗ハプテン抗体からなる群から選択される少なくとも1種である、[1]～[5]のいずれかに記載の蛍光標識剤用連結体。

[7] 前記プローブ分子がアプタマーまたは抗体である、[1]～[6]のいずれかに記載の蛍光標識剤用連結体。

発明の効果

[0008] 本発明により、プローブ分子への標的物質以外の物質の非特異吸着を軽減することが可能であり、蛍光免疫染色画像における標的物質以外の非特異吸着物質による輝点のノイズの発生を抑えることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、本発明の蛍光標識剤用連結体の模式図である。

[図2]図2は、本発明の蛍光標識剤用連結体と蛍光材とが親和性物質を介して結合している蛍光標識剤の模式図である。

[図3]図3は、本発明の蛍光標識剤用連結体を含む蛍光標識剤が、標的物質と結合しているときの模式図である。

発明を実施するための形態

[0010] <蛍光標識剤用連結体>

本発明に係る蛍光標識剤用連結体は、プローブ分子と結合基とが、直接、またはリンカー分子を介して結合してなる蛍光標識剤用連結体であって、前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が3以上である。該標識率は20以下であることが好ましい。

[0011] 蛍光標識剤用連結体は、プローブ分子と標的物質とが、直接的に、またはプローブ分子と標的物質の間に他の結合分子（例えば、アプタマーや抗体）を一つ以上介して間接的に結合できるものであれば特に制限はないが、直接

的に結合または他の結合分子を一つ介して間接的に結合できることが好ましい。

[0012] 蛍光標識剤用連結体は、結合基と蛍光材とが、直接的に、またはプローブ分子と蛍光材の間に親和性物質を一つ以上介して間接的に、結合できるものであれば特に制限はないが、直接的に結合または親和性物質を一つ介して間接的に結合できることが好ましい。

[0013] 上記のようにして、蛍光標識剤用連結体は、標的物質および蛍光材と特異的に結合することで、標的物質と蛍光材とを連結する役割を果たす。

[0014] 本発明の蛍光標識剤用連結体の模式図の一例としては図1が挙げられる。図1で表される蛍光標識剤用連結体は、プローブ分子2に結合基4が、リンカー分子3を介して結合しており、標識率が4である。

[0015] <プローブ分子>

プローブ分子は、免疫測定法による測定を行うため、抗原抗体反応により標的物質と特異的に結合する分子であればよく、アプタマーおよび抗体から選択されることが好ましい。アプタマーとしては、抗体に用いる免疫染色法に準じる方法によって標的物質を特異的に認識できるものであれば、特に限定されない。該アプタマーは、標的物質に特異的に結合する1次アプタマー、標的物質に結合した1次抗体または1次アプタマーに特異的に結合する2次アプタマー、またはそれ以上の高次アプタマーであってもよいが、1次アプタマーまたは2次アプタマーが好ましい。

[0016] アプタマーは、核酸（DNAまたはRNA）アプタマーとペプチドアプタマーに大別することができるが、標的物質または標的物質に結合した抗体や低次アプタマーを特異的に認識して結合することができる限り、いずれも使用することができる。アプタマーとしては、オリゴ核酸の入手容易性の点で核酸アプタマーが好ましい。核酸アプタマーおよびペプチドアプタマーは公知の方法により作製することができ、または市販されているものを購入して使用することもできる。

[0017] 抗体には、完全抗体のみならず任意の抗体断片、誘導体または複合体が含

まれ、例えば、完全抗体に加え、 Fab 、 $F(ab')_2$ 、CDR、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体 ($scFv$)、VHH抗体、抗体-薬物複合体が挙げられる。VHH抗体とは、ラマ、アルパカ、ラクダ等のラクダ科に属する動物またはサメ等の軟骨魚類由来の重鎖抗体の可変領域からなる抗体である。上記抗体は公知の方法により作製することができ、または市販されているものを購入して使用することもできる。

[0018] プローブ分子が結合する標的物質としては、例えば、アミノ酸、ポリペプチド等のタンパク質、およびこれらの糖質や脂質等との複合体、並びにDNP、DIGやFITC等のハプテンが挙げられる。具体的には、タンパク質がんマーカー、遺伝子がんマーカー、シグナル伝達物質、ホルモン、または生体に存在する抗体、人工抗体（抗体医薬）およびそのほかの投与された薬剤が含まれる。

[0019] がんマーカーとしては、例えば、がん細胞に発現する免疫系タンパク質、がん細胞に発現するパスウェイ系タンパク質、がん細胞に発現する転移系タンパク質が挙げられる。これらがん関連タンパク質には様々なタンパク質が知られており、診断もしくは治療の目的、または使用する薬剤の作用機序等に応じて、適切なものを選択することができ、特に限定されない。例えば、nCounterが提供するがん関連遺伝子発現パネルに含まれる、免疫系 (Immune) 遺伝子パネル、パスウェイ系 (Pathway) 遺伝子パネル、転移系 (Progression) 遺伝子パネルの遺伝子がコードしているタンパク質が、それぞれがん細胞に発現する免疫系タンパク質、パスウェイ系タンパク質、転移系タンパク質に該当する。また、これらの遺伝子の変異遺伝子に対応する変異タンパク質も、免疫系タンパク質、パスウェイ系タンパク質、転移系タンパク質に含むことができる。

[0020] がん細胞に発現する免疫系タンパク質としては、例えば、免疫チェックポイントタンパク質であるCD40、TL1A、GITR-L、4-1BB-L、CXCL4-L、CD70、HLA2、ICOS-L、CD85、CD86、CD80、MHC-II、PDL1、PDL2、VISTA、BTN

L2、B7-H3、B7-H4、CD48、HVEM、CD40L、TNFRSF25、GITR、4-188、OX40、CD27、TMIGD2、ICOS、CD28、TCR、LAG3、CTLA4、PD1、CD244、TIM3、BTLA、CD160、LIGHT等が挙げられる。

[0021] がん細胞に発現するパスウェイ系タンパク質としては、例えば、がん細胞増殖因子またはがん細胞増殖因子受容体であるEGFR (HER1)、HER2、HER3、HER4、IGFR、HGFR；細胞表面抗原、血管増殖因子または血管増殖因子受容体であるVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-R、PIGF-1、PIGF-2；サイトカインまたはサイトカイン受容体であるインターフェロン、インターロイキン、G-CSF、M-CSF、EPO、SCF、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、TGF；ステロイドホルモン受容体であるER、PgR等が挙げられる。

[0022] がん細胞に発現する転移系タンパク質としては、例えば、がん転移マーカーであるACTG2、ALDOA、APC、BRMS1、CADM1、CAMK2A、CAMK2B、CAMK2D、CCL5、CD82、CDKN1A、CDKN2A、CHD4、CNN1、CST7、CTSL、CXCR2、YBB、DCC、DENR、DLC1、EGLN2、EGLN3、EIF4E2、EIF4EBP1、ENO1、ENO2、ENO3、ETV4、FGFR4、GSN、HK2、HK3、HKDC1、HLA-DPB1、HUNKIL11、KDM1A、KISS1、LDHA、LIFR、MED23、MET、MGAT5、MAP2K4、MT3、MTA1、MTBP、MTOR、MYCL、MYH11、NDRG1、NF2、NFKB1、NME1、NME4、NOS2、NR4A3、PDK1、PEBP4、PFKFB1、PFKFB4、PGK1、PLAUR、PTTG1、RB1、RORB、SET、SLC2A1、SNRPF、SSTR2、TCEB1、TCEB2、TCF20、TF、TLR4、TNFSF10、TP53、TSHR、MMP、MMP2、MMP10、HIF1等が挙げられる。

[0023] さらに、遺伝子がんマーカーとしては、次の核酸分子が含まれる。すなわち、DNA、RNA (mRNA、tRNA、miRNA、siRNA、non-coding-RNA等)等の天然に存在する核酸やPNA、LNA (またはBNA: Bridged Nucleic Acid)等の人工核酸が含まれる。具体的には、核酸プローブ配列によって次のような遺伝子を検出するマーカーを任意に設計できる。すなわち、癌の増殖や分子標的薬の奏効率に関係する遺伝子として、HER2、TOP2A、HER3、EGFR、P53、MET等が挙げられる。さらに、癌関連遺伝子として知られている遺伝子として、以下のものが挙げられる。チロシンキナーゼ関連遺伝子として、ALK、FLT3、AXL、FLT4 (VEGFR3、DDR1、FMS (CSF1R)、DDR2、EGFR (ERBB1)、HER4 (ERBB4)、EML4-ALK、IGF1R、EPHA1、INSR、EPHA2、IRR (INSRR)、EPHA3、KIT、EPHA4、LTK、EPHA5、MER (MERTK)、EPHA6、MET、EPHA7、MUSK、EPHA8、NPM1-ALK、EPHB1、PDGFR α (PDGFRA)、EPHB2、PDGFR β (PDGFRB)、PD-L1、BMI1、LGR5、EPHB3、RET、EPHB4、RON (MST1R)、FGFR1、ROS (ROS1)、FGFR2、TIE2 (TEK)、FGFR3、TRKA (NTRK1)、FGFR4、TRKB (NTRK2)、FLT1 (VEGFR1)、TRKC (NTRK3)が挙げられる。

[0024] また、乳がん関連の遺伝子として、ATM、BRCA1、BRCA2、BRCA3、CCND1、E-Cadherin、ERBB2、ETV6、FGFR1、HRAS、KRAS、NRAS、NTRK3、p53、PTENが挙げられる。カルチノイド腫瘍に関連する遺伝子として、BCL2、BRD4、CCND1、CDKN1A、CDKN2A、CTNNB1、HES1、MAP2、MEN1、NF1、NOTCH1、NUT、RAF、SDHD、VEGFAが挙げられる。大腸がん関連遺伝子として、APC、MSH6、AXIN2、MYH、BMPR1A、p53、DCC、PMS2、KRA

S2 (or Ki-ras)、PTEN、MLH1、SMAD4、MSH2、STK11、MSH6が挙げられる。肺がん関連の遺伝子として、ALK、PTEN、CCND1、RASSF1A、CDKN2A、RB1、EGFR、RET、EML4、ROS1、KRAS2、TP53、MYCが挙げられる。肝臓がん関連の遺伝子として、Axin1、MALAT1、b-catenin、p16 INK4A、c-ERBB-2、p53、CTNNB1、RB1、Cyclin D1、SMAD2、EGFR、SMAD4、IGFR2、TCF1、KRASが挙げられる。腎臓がん関連遺伝子として、Alpha、PRCC、ASPSCR1、PSF、CLTC、TFE3、p54nrb/NONO、TFEBが挙げられる。甲状腺がん関連遺伝子として、AKAP10、NTRK1、AKAP9、RET、BRAF、TFG、ELE1、TPM3、H4/D10S170、TPRが挙げられる。卵巣がん関連遺伝子として、AKT2、MDM2、BCL2、MYC、BRCA1、NCOA4、CDKN2A、p53、ERBB2、PIK3CA、GATA4、RB、HRAS、RET、KRAS、RNASET2が挙げられる。前立腺がん関連遺伝子として、AR、KLK3、BRCA2、MYC、CDKN1B、NKX3.1、EZH2、p53、GSTP1、PTENが挙げられる。骨腫瘍関連遺伝子として、CDH11、COL12A1、CNBP、OMD、COL1A1、THRAP3、COL4A5、USP6が挙げられる。

[0025] 抗体医薬は、抗原を認識する抗体（免疫グロブリン）を主成分とする医薬品である。抗体医薬としては、すでに上市され、臨床において用いられているものでもよいし、または臨床試験や治験において用いられる候補医薬でもよい。抗体医薬の上市品として、例えば、ヒト化抗HER2抗体トラスツマブ（ハーセプチン（登録商標））、抗CD30モノクローナル抗体ブレントキシマブ、抗VEGFモノクローナル抗体ベバシズマブ、ヒト化抗CD33抗体ゲムツズマブ、ヒト化抗PD-1抗体ペムブロリズマブおよびニボルマブ、抗CTLA-4イピリムマブモノクローナル抗体が挙げられる。

[0026] 人工核酸としては核酸医薬も検出対象として含まれる。核酸医薬としては、例えば、デコイ、アンチセンス、*siRNA*、リボザイム、*miRNA-mimic*、アプタマーが挙げられ、*PDGF-B*、*C5*、*MCP-1*、*SDF-1*、*Hepcidin*のような遺伝子をターゲットとする分子として任意に設計できる。

[0027] <結合基>

結合基は、後述する蛍光材に結合している親和性物質と特異的に結合する分子である。結合基としては、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ハプテン、抗ハプテン抗体が挙げられる。これらの結合基は、一種のみでも、二種以上であってもよい。ハプテンとしては、例えば、*FITC*（フルオレセインイソチオシアネート）、*DIG*（ジゴキシゲニン）、*DNP*（ジニトロフェノール）が挙げられる。このうち、結合力の点から、ビオチン、ストレプトアビジン、*FITC*、抗*FITC*抗体が好ましい。親和性物質は結合基と対照的な関係にあり、例えば、前者がビオチンのときは、後者はアビジン、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンであり、また、その逆の場合も成り立つ。同様に、前者がハプテンのとき、後者は抗ハプテン抗体であり、また、その逆の場合も成り立つ（図2参照）。

[0028] 結合基は、結合基とリンカー分子とが予め結合したものをを用いてもよい。結合基とリンカー分子とが予め結合したものとしては、例えば、*EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin*（製品番号：21901、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、*NHS-dPEG4-Biotin*（製品番号：10200、Quanta BioDesign社製）、フルオレセイン-5-マレイミド（製品番号：F0810、東京化成工業社製）、5-*Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester*（製品番号：C2479、東京化成工業社製）等が挙げられる。

[0029] <リンカー分子>

本発明の蛍光標識剤用連結体は、前記プローブ分子と、結合基とが、リンカー分子を介して結合していてもよい。また、前記プローブ分子と、結合基とが、直接結合していてもよい。

[0030] リンカー分子としては、プローブ分子に対する結合基の標識率が3以上、好適には20以下にすることができる分子であればよく、特に制限はされないが、通常は二量体、三量体等の多量体（オリゴマー）、モノマー等の有機物を用いることができる。

[0031] リンカー分子は、ポリアルキレングリコール由来の構造単位からなる親水性高分子を有することが好ましい。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールが挙げられ、ポリエチレングリコール（PEG）が、オキシエチレン単位の数によりリンカー分子の鎖長を設定しやすい観点からより好ましい。

[0032] また、リンカー分子としては、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレンー無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテルー無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、およびポリアスパルトアミドから選択される少なくとも1種を用いてもよい。

[0033] リンカー分子の鎖長とは、後述するプローブ分子と結合基とを連結させたときに、プローブ分子と結合基との間のリンカー分子に由来する化学構造部分の長さを意味する。リンカー分子の鎖長は、国際公開2015/133523号に記載の方法で算出することができる。例えば、リンカー分子としてPEGを使用し、該PEGの両端をアミド化反応によりアミノ基を導入した後、一端のアミノ基と結合基であるビオチンとを結合させ、また、他端のアミノ基を介してマレイミド基を導入し、該マレイミド基とプローブ分子であ

る抗体を結合させて本発明の蛍光標識剤用連結体を製造した場合、リンカー分子の鎖長は、一端のアミド結合の窒素原子から他端のアミド結合の酸素原子までの長さである。

[0034] リンカー分子の鎖長は、原子同士の化学結合の距離の積算値として算出することができる。該化学結合の距離はセルフコンシステントアプローチに基づく原子同士の化学結合距離の理論値の積算値として算出することができる。N-C結合距離は1.46オングストロームであり、C-C結合距離は1.50オングストロームであり、C-O結合距離は1.38オングストロームとして計算する。

[0035] リンカー分子の鎖長は、通常0オングストロームを超えて30オングストローム未満とする。リンカーの長さを、上記範囲にすることで、プローブ分子に対する結合基の標識率を好適な範囲にすることができるため好ましい。また、上記範囲ではプローブ分子への標的物質以外の物質の非特異吸着が抑制され、蛍光免疫染色画像における非特異吸着物質の輝点によるノイズを低減できる。

[0036] また、リンカー分子がPEG由来である場合、リンカー分子の長さを構成単位であるオキシエチレン単位(n)として表現することができる。前記単位が1～5であるか、プローブ分子と結合基とが直接結合する場合には、プローブ分子への標的物質以外の物質の非特異吸着が抑制され、蛍光免疫染色画像における非特異吸着物質の輝点によるノイズを低減できる。

[0037] 上記PEG等のリンカー分子は、公知の方法で合成することができる。また、例えば、Sigma-Aldrich社やサーモフィッシャーサイエンティフィック社等から市販されている所望の長さのリンカー分子を購入することができる。鎖長が0オングストロームを超えて30オングストローム未満になるよう、オキシエチレン単位等の化学構造の繰り返しの数を設定して、試薬メーカー等に製造を依頼して入手することもできる。

[0038] また、上記の結合基およびプローブ分子と結合するための官能基（例えば、N-ヒドロキシエステル基やマレイミド基等）が予め結合しているリンカ

一分子を使用してもよい。

[0039] <標識率>

プローブ分子に対する結合基の標識率は、プローブ分子1分子あたりに、結合している結合基の割合である。標識率は、例えば、本発明の蛍光標識剤用連結体の結合基の濃度をプローブ分子の濃度で除して算出することができ、3以上であり、20以下が好ましく、10以下がより好ましい。該標識率はリンカー分子の鎖長を調整することによって制御することができる。

[0040] 結合基およびプローブ分子の濃度は、公知の方法で測定することができる。例えば、結合基およびプローブ分子が特定の波長の光を吸収する性質がある場合は、吸光度を測定することで求めることができる。あるいは、結合基が蛍光などの発光を示す性質がある場合は、発光強度を測定することで求めることができる。プローブ分子の濃度は、例えば、本発明の蛍光標識剤用連結体の製造時に使用した溶媒に対するプローブ分子の分子量から算出することができる。吸光度測定が困難な場合は、例えば、MALDI-TOFMS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）を用いた測定によって、標識率を求めることができる。即ち、該測定によって、プローブ分子と結合基が結合した蛍光標識剤用連結体は、プローブ分子のみの分子量より高分子量側に、プローブ分子に結合した結合基の数に応じた蛍光標識剤用連結体に由来するピークが通常は複数検出されるため、各ピーク面積の総和に対する各ピーク面積比に各ピークにおける結合基の個数を乗じて算出することができる。

[0041] 標識率を上記範囲にすることで、プローブ分子への標的物質以外の物質の非特異吸着が抑制され、蛍光免疫染色画像における非特異吸着物質の輝点によるノイズを低減できる理由はよくわかっていないが、以下のように推測される。標識率が適度に高い状態では、蛍光材に結合している親和性物質と特異的に結合する結合基が多く存在することになるので、プローブ分子が多くの蛍光材に覆われることになる。そのため、標的物質以外の物質のプローブ分子への非特異吸着が起こりにくくなる。しかしながら、標識率が高すぎる

状態では、プローブ分子が非常に多くの蛍光材に覆われることになるため、肝心の標的物質と結合しにくくなる。一方、標識率が低い場合は、プローブ分子を覆う蛍光材が少なくなるため、標的物質以外の物質のプローブ分子への非特異吸着が起こりやすくなる。

[0042] <蛍光材>

蛍光材は、本発明の蛍光標識剤用連結体の結合基と直接的に、または親和性物質を介して間接的に結合して蛍光標識剤を形成した後に、所定の蛍光を発することができるものであれば、特に限定されないが、退色しにくく長時間の観察や撮像が可能な点で蛍光体集積ナノ粒子が好ましい。

本明細書において、蛍光材とは、外部からのX線、紫外線、可視光線または近赤外光線等の照射を受けて励起し、励起状態から基底状態に到る過程において光を発光する物質一般を指す。したがって、本発明にいう蛍光材は、励起状態から基底状態に戻るときの遷移態様の如何を問うものでなく、励起一重項からの失活に伴う発光である狭義の蛍光を発する物質であってもよいし、三重項からの失活に伴う発光である燐光を発する物質であってもよい。

[0043] 本発明において、蛍光材は、励起光を遮断してからの発光寿命によって限定されるものでもない。したがって、硫化亜鉛やアルミン酸ストロンチウム等の蓄光物質として知られている物質であってもよい。このような蛍光材は、有機蛍光材および無機蛍光材に大別することができる。

[0044] 蛍光体集積ナノ粒子は、有機物または無機物でできた母体となる粒子の内部または表面に、蛍光色素等の蛍光体を複数個集積した構造を有する、直径が1 μm 未満のナノサイズの粒子である。蛍光体集積ナノ粒子一つの粒子で十分な輝度の蛍光を発することができる粒子が好ましい。蛍光体集積ナノ粒子の平均粒子径は、40～300 nmであることが好ましく、80～150 nmであることがより好ましい。また、粒子径の変動係数は、5～15%であることが好ましい。上記平均粒子径および粒子径の変動係数は、例えば、走査型電子顕微鏡による観察を行い、粒子20個の粒子径を測定することにより算出することができる。

[0045] 蛍光体集積ナノ粒子に集積される蛍光体は特に限定されないが、例えば、公知の有機蛍光色素や、半導体ナノ粒子（量子ドット等と称されることがある）を使用することができる。以下、有機蛍光色素を蛍光体として使用した場合の蛍光体集積ナノ粒子を有機蛍光色素集積ナノ粒子といい、無機蛍光体を蛍光体として使用した場合の蛍光体集積ナノ粒子を無機蛍光体集積ナノ粒子という。

[0046] 蛍光体は、用途に応じて所定の波長（色）の発光を発する蛍光体を選択することができる。標的物質が2種類以上ある場合は、それぞれに対応した異なる波長の蛍光を発する蛍光体の組み合わせを選択し、それぞれの蛍光体を集積した蛍光体集積ナノ粒子を作製することができる。その場合、蛍光波長のピークが互いに100nm以上離れている蛍光体を選択することが好ましい。

[0047] [有機蛍光色素集積ナノ粒子]

有機蛍光色素集積ナノ粒子は、粒子の母体となる物質の内部または表面に有機蛍光色素を複数個集積したナノサイズの蛍光材である。

[0048] 有機蛍光色素としては、例えば、ローダミン系色素、ピロメテン系色素、フルオレセイン系色素、Alexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）系色素、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）系色素、カスケード（登録商標、インビトロジェン社製）系色素、クマリン系色素、NBD（登録商標）系色素、ピレン系色素、シアニン系色素、ペリレン系色素、オキサジン系色素等、ポリマー等の高分子有機化合物でない低分子有機化合物からなる蛍光色素が挙げられる。中でも、TAMRA（登録商標）、スルホローダミン101およびその塩酸塩であるTexas Red（登録商標）等のローダミン系色素、ピロメテン556等のピロメテン系色素、ペリレンジイミド等のペリレン系色素が、耐光性が高いため好ましい。

[0049] 具体的には、5-カルボキシーフルオレセイン、6-カルボキシーフルオレセイン、5,6-ジカルボキシーフルオレセイン、6-カルボキシー2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン、6-カルボキ

シー2', 4, 7, 7'-テトラクロロフルオレsein、6-カルボキシシー4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレsein、ナフトフルオレsein、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、5, 6-ジカルボキシローダミン、ローダミン 6G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、及びAlexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、エオジン、NBD、ピレン、Cy5、Cy5.5、Cy7等を挙げることができる。これらは単独でも複数種を混合したものをを用いてもよい。

[0050] 有機蛍光色素集積ナノ粒子を構成する母体としては、例えば、樹脂やシリカ等、物理的または化学的な結合力で有機蛍光色素を集積できる物質等が挙げられる。具体的には、ポリスチレン、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリアクリロニトリル、ポリグリシジルメタクリレート、ポリメラミン、ポリウレア、ポリベンゾグアナミン、ポリフラン、ポリキシレン、フェノール樹脂およびASA樹脂（アクリロニトリル-スチレン-アクリル酸メチル共重合体）等の樹脂、多糖、並びにシリカ等の疎水性の化合物が好ましく、メラミン樹脂

やスチレン樹脂が蛍光色素集積ナノ粒子を作製しやすく、また、発光強度の高い粒子が得られる点でより好ましい。

[0051] 例えば、蛍光体としてTAMRA（登録商標）やピロメテン等の蛍光色素を用い、母体にメラミン樹脂等の樹脂や、シリカを用いて作製される有機蛍光色素集積ナノ粒子は、退色しにくく輝度が高い点から、蛍光体集積ナノ粒子として好ましい。

[0052] 〔無機蛍光体集積ナノ粒子〕

無機蛍光体集積ナノ粒子は、粒子の母体となる物質の内部または表面に、半導体ナノ粒子を複数個集積した、ナノサイズの蛍光材である。半導体ナノ粒子としては、例えば、Ⅲ-Ⅴ族化合物、ⅡⅢ-Ⅴ族化合物またはⅡⅣ族元素を含有する量子ドット、国際公開第2012/133047号に例示されたCdSe等の量子ドットが挙げられる。

[0053] 具体的には、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Geが挙げられるが、これらに限定されない。また、無機蛍光体として、これらの半導体ナノ粒子は単独でも複数種を混合したものをを用いてもよい。

[0054] 無機蛍光体集積ナノ粒子に、半導体ナノ粒子をコアとし、その周囲にシェルを設けた量子ドットを用いることができる。コア-シェル型の半導体ナノ粒子の表記法として、コア/シェルと表記した場合、シェルを有する半導体ナノ粒子としては、例えば、国際公開第2012/133047号に例示されたCdSe/Zn等が挙げられる。

[0055] また、無機蛍光体集積ナノ粒子に、有機ポリマー等により表面処理が施された半導体ナノ粒子を使用することができる。表面処理が施されている半導体ナノ粒子としては、例えば、粒子表面がカルボキシル基で修飾されているCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）、粒子表面がアミノ基で修飾されているCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）が挙げられる。

[0056] 無機蛍光体集積ナノ粒子を構成する母体としては、例えば、樹脂やシリカ等、物理的または化学的な結合力で無機蛍光体を集積できる物質等が挙げら

れる、樹脂としては、例えば、メラミン樹脂、尿素樹脂、ベンゾグアナミン樹脂、フェノール樹脂、およびキシレン樹脂等の熱硬化性樹脂、並びにスチレン樹脂、（メタ）アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、AS樹脂（アクリロニトリル-スチレン共重合体）、およびASA樹脂（アクリロニトリル-スチレン-アクリル酸メチル共重合体）等の、1種類または2種類以上のモノマーを用いて作製される各種の単独重合体および共重合体が挙げられる。

[0057] <蛍光標識剤用連結体の使用態様>

本発明の蛍光標識剤用連結体は、プローブ分子を介して標的物質と結合することができる（図3参照）。また、蛍光標識剤用連結体を使用した標的物質の測定を行う際は、該蛍光標識剤用連結体を親和性物質を介して蛍光材と結合させて蛍光標識剤を作製したあとに、プローブ分子を介して標的物質と結合させたものを用いて行ってもいいし、蛍光標識剤用連結体を標的物質に結合させたあとに、親和性物質を介して蛍光材と結合させたものを用いて行ってもよい。

[0058] <蛍光標識剤用連結体の製造>

蛍光標識剤用連結体を製造する場合、例えば、プローブ分子と結合基とを直接結合させる場合、プローブ分子とリンカー分子の末端とを結合させ、次いで、リンカー分子の別の末端と、結合基とを結合させる場合、あるいは、結合基とリンカー分子の末端とを結合させ、次いで、リンカー分子の別の末端とプローブ分子を結合させる場合には、その結合様式としては特に限定はない。結合様式としては、例えば、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着、化学吸着等の適当な結合様式を用いて結合させることができる。アミド結合、エステル結合、イミド結合、マレイミド基へのチオール付加を利用した結合等の共有結合が結合力の強さの観点から好ましい。具体的には、チオール基-マレイミド基のカップリング反応法、架橋剤を用いた架橋反応法、イオン結合法等が挙げられる。

[0059] 結合基、リンカー分子およびプローブ分子は、これら分子の末端を、例え

ば、以下のような公知の方法によりマレイミド化、アミノ化、チオール化等したあと、公知の方法によって互いを結合させることができる。マレイミド化は、例えば、無水マレイン酸と第1級アミンとを脱水反応させることにより得る方法等の従来から知られている多くの方法で行うことができる。アミノ化は、例えば、アルデヒドまたはケトンと、第1級アミンとを還元的アミノ化反応させることで行うことができる。チオール化は、例えば、D i t h i o t h r e i t o l (D T T) 等の適当な還元剤を用いて分子内のジスルフィド結合を還元させることで行うことができる。

[0060] 結合基とリンカー分子との結合を、リンカー分子を介して行う場合には、結合基、プローブ分子のうち、リンカーと結合させる順番は特に制限されない。例えば、結合基とリンカー分子を結合させたあとにプローブ分子を結合させてもよいし、プローブ分子とリンカー分子を結合させたあとに結合基を結合させてもよい。また、結合基が予め結合してある市販のリンカー分子を入手してプローブ分子を結合させてもよいし、プローブ分子が予め結合してある市販のリンカー分子を入手して結合基を結合させてもよい。

実施例

[0061] 以下、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

[0062] [実施例1]

(1) 還元化抗体溶液の調製

プローブ分子として、抗ウサギIgG抗体を用いた。50 μ gの抗ウサギIgG抗体(LO-RG-1)を50mMTri s溶液に溶解させたあと、最終濃度が3mMとなるようにD i t h i o t h r e i t o l (D T T) 溶液を加えて混合した。該混合溶液を37℃で30分間反応させたあと、脱塩カラムで処理し還元化した抗ウサギIgG抗体を精製した。精製した該抗体のうち、200 μ Lを50mMTri s溶液に溶解し、還元化抗体溶液を調製した。

[0063] (2) 結合基溶液の調製

結合基としてFluorescein-5-maleimide（製品番号：F0810、TCI社製）を用いた。該結合基に、DMSOを用いて0.4 mMの結合基溶液を調製した。

[0064] （3）フルオレセイン標識化抗ウサギIgG抗体溶液の調製

（1）で調製した還元化抗体溶液と、（2）で調製した8.5 μ Lの0.4 mM結合基溶液とを混合し、37℃で30分間反応させた。該反応液を、脱塩カラム（「Zeba Desalt Spin Columns」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、本発明の蛍光標識剤用連結体の一形態であるフルオレセイン標識化抗ウサギIgG抗体を精製した。精製後の溶液を、吸光度計（「F-7000」、日立製）を用いて波長300 nmの吸光度を測定し、溶液中のタンパク質量を算出した。算出した値から、50 mM Tris溶液を用いて250 μ g/mLの実施例1のフルオレセイン標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。

[0065] [実施例2]

結合基を、5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester（製品番号：C2479、TCI社製）を使用したこと以外は、実施例1と同様の方法により、実施例2の5-カルボキシフルオレセイン標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。

[0066] [実施例3]

抗ウサギIgG抗体を抗ウサギVHH抗体（以下、単に「抗VHH抗体」と称す）に変更した以外は、実施例1と同様の方法により、実施例3のビオチン標識化抗VHH抗体溶液を調製した。

[0067] [実施例4]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合したEZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin（製品番号：21901、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に変更したこと以外は、実施例1と同様の方法により、実施例4のビオチン標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は16.1オングストロームであった。

[0068] [実施例5]

抗ウサギ Ig G 抗体を抗 VHH 抗体に変更し、結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した NHS-dPEG4-Biotin (製品番号: 10200、Quanta BioDesign 社製) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、実施例 5 のビオチン標識化抗 VHH 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 25.7 オングストロームであった。

[0069] [比較例1]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した Biotin-PEG6-NH-Mal (製品番号: 2461006-250、PurePEG 社製) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 1 のビオチン標識化抗ウサギ Ig G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 33.6 オングストロームであった。

[0070] [比較例2]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した FITC-PEG-Mal, 500 (製品番号: FL04022-500、Biochemiperg 社製) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 2 の FITC 標識化抗ウサギ Ig G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 55.5 オングストロームであった。

[0071] [比較例3]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した EZ-Link™ Maleimide-PEG11-Biotin (製品番号: 21911、サーモフィッシャーサイエンティフィック 社製) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 3 のビオチン標識化抗ウサギ Ig G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 55.5 オングストロームであった。

[0072] [比較例4]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した FITC-PEG-Mal, 600 (製品番号: FL04022-600、Biochemiperg 社製) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 4 の FITC

TC標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は64.7オングストロームであった。

[0073] [比較例5]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合したBiotin-PEG-Mal, MW1000（製品番号：PG2-BNML-1k、Nanocs社製）に変更した以外は、実施例1と同様の方法により、比較例5のビオチン標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は104.7オングストロームであった。

[0074] [比較例6]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合したFITC-PEG-Maleimide（製品番号：PG2-FCML-2k、Nanocs社製）に変更した以外は、実施例1と同様の方法により、比較例6のFITC標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は202.0オングストロームであった。

[0075] [比較例7]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合したFITC-PEG-NHS（製品番号：PG2-FCNS-2k、Nanocs社製）に変更した以外は、実施例1と同様の方法により、比較例7のFITC標識化抗ウサギIgG抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は202.0オングストロームであった。

[0076] [比較例8]

抗ウサギIgG体を抗VHH抗体に変更し、結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合したBiotin-PEG-SCM, 2kDa（製品番号：PJK-1900、Creative PEG Works社製）に変更した以外は、実施例1と同様の方法により、比較例8のビオチン標識化抗VHH抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は202.0オングストロームであった。

[0077] [比較例9]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した B i o t i n - P E G - S C M, M W 2 0 0 0 (製品番号: P G 2 - B N M L - 2 k、N a n o c s 社製)に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 9 のビオチン標識化抗ウサギ I g G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 2 0 2 . 0 オングストロームであった。

[0078] [比較例 1 0]

抗ウサギ I g G 体を抗 V H H 抗体に変更し、結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した B i o t i n - P E G - N H S (製品番号: P G 2 - B N N S - 5 K - 1、N a n o c s 社製)に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 1 0 のビオチン標識化抗ウサギ I g G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 4 9 4 . 0 オングストロームであった。

[0079] [比較例 1 1]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した B i o t i n - P E G - S C M, M W 5 0 0 0 (製品番号: P G 2 - B N M L - 5 k、N a n o c s 社製)に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 1 1 のビオチン標識化抗ウサギ I g G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 4 9 4 . 0 オングストロームであった。

[0080] [比較例 1 2]

結合基を、結合基とリンカー分子とが予め結合した B i o t i n - P E G - S C M, M W 1 0 0 0 0 (製品番号: P G 2 - B N M L - 1 0 k、N a n o c s 社製)に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法により、比較例 1 2 のビオチン標識化抗ウサギ I g G 抗体溶液を調製した。リンカーの鎖長は 9 8 0 . 7 オングストロームであった。

[0081] <標識率評価>

(1) ビオチン標識化抗体の標識率評価

上記実施例 3 ~ 5、並びに比較例 1、3、5 および 8 ~ 1 2 のビオチン標識化抗ウサギ I g G 抗体 / 抗 V H H 抗体溶液を、M A L D I - T O F M S (「B R U K E R a u t o f l e x s p e e d」、日立ハイテクサイエン

ス社製）を用いて、質量分析を行った。プローブ分子である抗体のみの分子量より高分子量側に検出されたピークがビオチン標識化抗体の結合ビオチン数に由来するピークであるため、各ビオチン標識化抗体に由来する各ピーク面積の総和に対する各ピーク面積比と、各ピークのビオチン個数を乗じて、各ピークの平均値を標識率とした。結果を表 1 に示す。

[0082] (2) フルオレセイン／FITC 標識化抗体の標識率評価

上記実施例 1 および 2、並びに比較例 2、4、6 および 7 のフルオレセイン／FITC 標識化抗ウサギ IgG 抗体／抗 VHH 抗体溶液を、紫外可視分光光度計（「NanoDrop One」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、FITC の吸収波長の 493 nm、およびタンパク質（抗ウサギ IgG 抗体／抗 VHH 抗体）の吸収波長の 280 nm の吸光度を測定した。各波長での吸光度を、下記式（1）および式（2）に当てはめ、フルオレセイン／FITC、および抗ウサギ IgG 抗体／抗 VHH 抗体の濃度を算出した。フルオレセイン／FITC 濃度を抗ウサギ IgG 抗体／抗 VHH 抗体で除して、濃度比を算出し標識率とした。結果を表 1 に示す。

$$[0083] \quad C_{ab} = (A_{280} - (A_{493} \times CF)) / \epsilon_{ab} \dots (1)$$

$$C_{dye} = A_{493} / \epsilon_{dye} \dots (2)$$

（上記式中、C は濃度、A は吸光度測定値、 ϵ はモル吸光係数、CF は補正係数、ab は抗ウサギ IgG 抗体または抗 VHH 抗体、dye はフルオレセインまたは FITC を示す）

[0084]

[表1]

	標的物質	反応基	リンカー分子		プローブ分子		非特異吸着 起因の峰点
			PEGユニット数	鎖長 (Å)	抗体	標識率	
実施例 1	PgR	Maleimide-FITC	0	0	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	3.42	0.23
実施例 2	PgR	NHS-FITC	0	0	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	3.73	0.15
実施例 3	HER2	Maleimide-Biotin	0	0	VHH(Anti rabbit IgG)	9.06	0.07
実施例 4	HER2	Maleimide-Biotin	2	16.1	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	3.07	0.20
実施例 5	HER2	NHS-Biotin	4	25.7	VHH(Anti rabbit IgG)	7.10	0.10
比較例 1	HER2	NHS-Biotin	6	33.6	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.99	0.30
比較例 2	PgR	Maleimide-FITC	11	55.5	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	1.64	0.68
比較例 3	HER2	Maleimide-Biotin	11	55.5	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.88	0.30
比較例 4	PgR	Maleimide-FITC	13	64.7	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.85	0.37
比較例 5	HER2	Maleimide-Biotin	22	104.7	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.65	0.40
比較例 6	PgR	Maleimide-FITC	44	202	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.68	0.42
比較例 7	PgR	NHS-FITC	44	202	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.03	0.58
比較例 8	HER2	NHS-Biotin	44	202	VHH(Anti rabbit IgG)	5.20	0.58
比較例 9	HER2	Maleimide-Biotin	44	202	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.19	0.80
比較例 10	HER2	NHS-Biotin	111	494	VHH(Anti rabbit IgG)	1.30	1.56
比較例 11	HER2	Maleimide-Biotin	111	494	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	0.80	0.80
比較例 12	HER2	Maleimide-Biotin	222	980.7	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	0.19	0.60

[0085] 表1の実施例1～5の結果から、本発明の蛍光標識剤用連結体を構成する、プローブ分子の種類、結合基の種類に関わらず、標識率が3以上のものは

、非特異吸着に起因する輝点の数が0.3未満と少なく、標的物質以外の物質による非特異吸着が起こりにくいと考えられる。なお、同実施例1～5から、標識率が3以上のものは、リンカー分子の鎖長が0オングストローム（プローブ分子と結合基が直接結合している状態）、又は0オングストロームを超えて30オングストローム未満であることが分かる。

[0086] これに対して、表1の比較例1～12の結果から、蛍光標識剤用連結体を構成する、プローブ分子の種類、結合基の種類に関わらず、標識率が3未満のものは、非特異吸着に起因する輝点の数が0.3以上と多く、標的物質以外の物質による非特異吸着が起こりやすいと考えられる。なお、同比較例1～12から、標識率が3未満のものは、リンカー分子の鎖長が30オングストローム以上であることが分かる。

[0087] <蛍光免疫染色1>

実施例3～5、並びに比較例1、3、5および8～12で作製したビオチン標識化抗ウサギIgG抗体等を用いて、以下のようにしてヒト乳房組織の組織免疫染色と形態観察染色を行った。

[0088] (1) 脱パラフィン処理工程

染色用組織切片として、HER2（-）の組織アレイスライド（「CBA-A712シリーズ」、コスモバイオ社製）を用い、該スライドを脱パラフィンした。HER2のスコアが「-」は、トラスツマブ病理部会作成のHER2ガイドライン（第3版）においてスコア「0」と規定される組織切片である。具体的には、「細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞<10%（細胞膜に限局する陽性染色は判定対象外）」に該当する組織切片のうち、DAB法によって「細胞膜に陽性反応なし」であることが確認された組織切片である。

[0089] (2) 賦活化処理工程

(1) で得られた組織アレイスライドを水に置換する洗浄を行ったあと、10mMクエン酸緩衝液（pH6.0）中で121℃、15分間のオートクレーブを行い、抗原の賦活化処理を行った。その後、組織アレイスライドを

PBSにより洗浄し、BSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

[0090] (3) 免疫染色処理

(3-1) 1次反応

BSAを1%含有するPBSを用いて、抗HER2ウサギモノクローナル抗体（「4B5」、ベントナ社製）を0.05 nMに調製した溶液で、(2) で得られた組織アレイスライドを処理し、4℃で1晩反応させた。

[0091] (3-2) 2次反応

上記1次反応を行った組織アレイスライドをPBSで洗浄したあと、1% BSA含有のPBSで6 μ g/mLに希釈した上記ビオチン標識化抗ウサギIgG抗体等、室温で30分間反応させた。

[0092] (4) 形態観察用染色処理（ヘマトキシリンーエオシン染色）

上記2次反応後のスライドをPBSで洗浄したあと、組織アレイスライドを、マイヤーヘマトキシリン液を用いて5分間ヘマトキシリン染色を行った。該組織アレイスライドを45℃の流水で3分間洗浄したあと、1%エオシン液を用いて5分間エオシン染色を行った。

[0093] (5) 封入処理

(4) の染色処理後、組織アレイスライドを純エタノールに5分間浸漬する操作を4回行い、洗浄および脱水処理を行った。次いで、該スライドをキシレンに5分間浸漬する操作を4回行い、透徹処理を行った。最後に、封入剤（「エンテランニュー」、メルクミリポア社製）を用いて組織アレイスライドを封入し、HER2抗原を標的物質とした観察用スライドを得た。

[0094] <蛍光免疫染色2>

上記<蛍光免疫染色1>で使用したビオチン標識化抗ウサギIgG抗体等に変えて、実施例1および2、並びに比較例2、4、6および7で作製したフルオレセイン標識化抗ウサギIgG抗体等に変更し、HER2（-）の組織アレイスライドを、プロゲステロンレセプター（PgR）（-）および（+）の組織アレイスライド（「ポジコンスライドシリーズ」、パソロジー研

研究所社製）に変更した以外、＜蛍光免疫染色 1＞と同様の方法により、P g R 抗原を標的物質とした観察用スライドを得た。

[0095] ＜非特異吸着に起因する輝点の計測＞

上記観察用スライドに対して、所定の励起光を照射して蛍光を発光させた状態を、蛍光顕微鏡（「B X - 5 3」、オリンパス社製）、および顕微鏡用デジタルカメラ（「D P 7 3」、オリンパス社製）により観察および撮像を行った。上記励起光は、光学フィルターを通すことで、5 7 5 ~ 6 0 0 n m に設定した。また、観察する蛍光の波長（n m）の範囲についても、光学フィルターを通すことで6 1 2 ~ 6 9 2 n m に設定した。顕微鏡観察、画像取得時の励起波長の条件は、5 8 0 n m の励起では視野中心部付近の照射エネルギーが9 0 0 W / c m²となるようにした。

[0096] 画像取得時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないように任意に設定（2 0 m 秒に設定）して撮像した。H E R 2（-）の組織の輝点数は、4 0 0 倍で撮像した画像をもとに I m a g e J F i n d M a x i m s 法により計測した1 0 0 0 細胞の平均値とした。P g R（-）の組織の輝点数は、4 0 倍で撮像した画像をもとに I m a g e J F i n d M a x i m s 法により計測した1 0 0 0 細胞の平均値とした。結果を表 1 に示す。

[0097] ＜標的物質に起因する輝点の計測＞

上記実施例 1、2 および 4、並びに比較例 2、4、6 ~ 8 および 1 0 の観察用スライドに対して、上記＜非特異吸着に起因する輝点の計測＞と同様の方法で観察および撮像を行った。

[0098] 画像取得時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないように任意に設定（2 0 m 秒に設定）して撮像した。P g R（+）の組織の輝点数は、4 0 倍で撮像した画像をもとに I m a g e J F i n d M a x i m s 法により計測した1 0 0 0 細胞の平均値とした。さらに、P g R（+）の組織の輝点数を P g R（-）の組織の輝点数で除した値を検出感度として算出した。結果を表 2 に示す。

[0099]

[表2]

	標的物質	反応基	リンカー分子		プローブ分子		非特異的結合		標的物質結合		検出結果	
			PEGユニット数	長さ (Å)	抗体	標識率	検出率	評価	検出率	評価	検出率	評価
実施例 1	PgR	Maleimide-FTIC	0	0	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	3.42	0.23	◎	25.19	◎	109	◎
実施例 2	PgR	NHS-FTIC	0	0	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	3.73	0.15	◎	22.68	◎	149	◎
実施例 4	HER2	NHS-Biotin	4	23.7	VH4(Anti rabbit IgG)	7.10	0.15	◎	437.50	◎	4297	◎
比較例 1	PgR	Maleimide-FTIC	11	55.5	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	1.64	0.66	×	22.21	◎	33	○
比較例 3	PgR	Maleimide-FTIC	13	64.7	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.85	0.37	○	18.03	○	48	○
比較例 5	PgR	Maleimide-FTIC	44	200	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.68	0.42	○	14.34	○	34	○
比較例 7	PgR	NHS-FTIC	44	200	LO-RG-1(Anti rabbit IgG)	2.03	0.53	×	6.34	×	14	×
比較例 9	HER2	NHS-Biotin	44	200	VH4(Anti rabbit IgG)	5.20	0.53	×	213.50	×	160	×
比較例 10	HER2	NHS-Biotin	111	494	VH4(Anti rabbit IgG)	1.50	1.50	✓	159.30	×	89	×

HER2およびPgRの非特異的結合の検出率 (検出率) : ◎ $n \leq 0.3$, ○ $0.3 < n \leq 0.5$, × $0.5 < n$

HER2の標的物質結合の検出率 (検出率) : ◎ $n > 400$, ○ $400 \leq n < 500$, × $500 \leq n$

PgRの標的物質結合の検出率 (検出率) : ◎ $n > 20$, ○ $20 \leq n < 10$, × $10 \leq n$

HER2の検出率の検出率 (検出率) : ◎ $n > 1533$, ○ $1533 \leq n < 600$, × $600 \leq n$

PgRの検出率の検出率 (検出率) : ◎ $n > 66$, ○ $66 \leq n < 20$, × $20 \leq n$

[0100] 表 2 より、標的物質である P g R の検出に同じ抗ウサギ I g G 抗体を使用した場合、実施例 1 および 2 のように標識率が 3 以上である場合は、比較例

2、4、6および7のように標識率が3未満である場合に比べて、非特異吸着に起因する輝点の数が減少するだけでなく、標的物質に起因する輝点の数が増加し、かつ検出感度が向上することが示された。

[0101] 同様なことが、標的物質であるHER2の検出に同じ抗VHH抗体を使用した場合の、実施例4と、比較例8および10との比較において示された。

符号の説明

[0102] 1・・・蛍光標識剤用連結体

2・・・プローブ分子

3・・・リンカー分子

4・・・結合基

5・・・蛍光標識剤

6・・・親和性物質

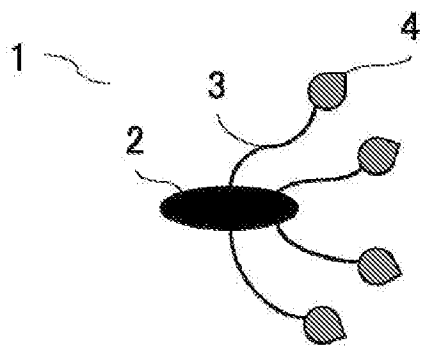
7・・・蛍光材

8・・・標的物質

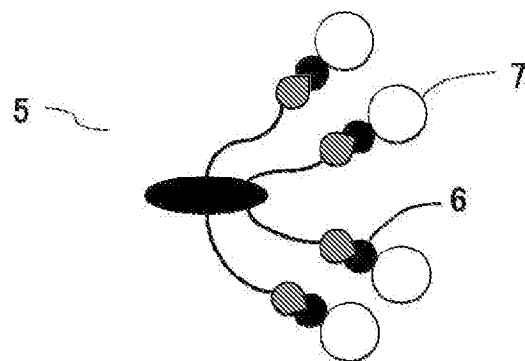
請求の範囲

- [請求項1] プローブ分子と結合基とが、直接、またはリンカー分子を介して結合してなる蛍光標識剤用連結体であって、
 前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が3以上である蛍光標識剤用連結体。
- [請求項2] 前記プローブ分子に対する前記結合基の標識率が20以下である請求項1に記載の蛍光標識剤用連結体。
- [請求項3] 前記リンカー分子が、ポリアルキレングリコール由来の構造単位からなる親水性高分子を有する、請求項1または2に記載の蛍光標識剤用連結体。
- [請求項4] 前記ポリアルキレングリコールが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールである、請求項3に記載の蛍光標識剤用連結体。
- [請求項5] 前記プローブ分子と前記結合基とが、直接結合してなるか、または鎖長が0オングストロームを超えて30オングストローム未満のリンカー分子を介して結合してなる、請求項1～4のいずれか一項に記載の蛍光標識剤用連結体。
- [請求項6] 前記結合基が、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、ハプテンおよび抗ハプテン抗体からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1～5のいずれか一項に記載の蛍光標識剤用連結体。
- [請求項7] 前記プローブ分子がアプタマーまたは抗体である、請求項1～6のいずれか一項に記載の蛍光標識剤用連結体。

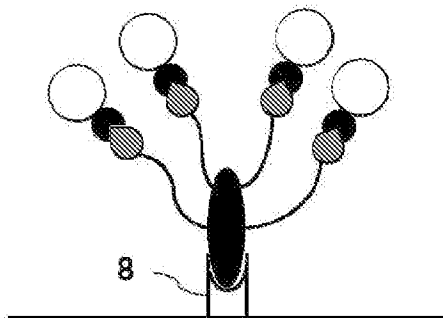
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/023340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/13 (2006.01)i; C07K 16/00 (2006.01)i; C12N 15/115 (2010.01)i; G01N 33/533 (2006.01)i

FI: G01N33/533; C12N15/115 Z; C07K16/00; C07K1/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/13; C07K16/00; C12N15/115; G01N33/533

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Scopus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AAT BIOQUEST, Readilink™ Protein Biotinylation Kit, catalogue, no. 5520, 2014, pp. 1-2, [online], 2014 [retrieval date 06 August 2020], internet:<URL:https://docs.aatbio.com/products/protocol-and-product-information-sheet-pis/protocol-for-readilink-pratein-biotinylation-kit-version-4b3756b08f.pdf> p. 1, paragraph [0001], fig. 1	1-2, 5-7
X	WO 2005/075997 A1 (ASAHI KASEI CORPORATION) 18.08.2005 (2005-08-18) paragraphs [0044]-[0045]	1-4, 6-7
Y	paragraphs [0044]-[0045]	5
Y	THERMO SCIENTIFIC, Avidin-Biotin Technical Handbook, catalogue, no.1601675, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2009, pp. 12-13, [online], 2009 [retrieval date 06 August 2020], internet:<URL:https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1601675_AvBi_HB_I NTL.pdf> pp. 12-13	5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2020 (11.08.2020)

Date of mailing of the international search report

25 August 2020 (25.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/023340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/146896 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 01.10.2015 (2015-10-01) paragraphs [0054], [0095]	1-7
A	WO 2015/133523 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 11.09.2015 (2015-09-11) paragraphs [0141], [0143], [0146]	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/023340

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2005/075997 A1	18 Aug. 2005	US 2008/0131978 A1 paragraphs [0100]- [0101] EP 1712915 A1	
WO 2015/146896 A1	01 Oct. 2015	US 2017/0016911 A1 paragraphs [0082], [0141] EP 3124969 A	
WO 2015/133523 A1	11 Sep. 2015	US 2017/0074886 A1 paragraphs [0153], [0155], [0158] EP 3115783 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 1/13(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; G01N 33/533(2006.01)i FI: G01N33/533; C12N15/115 Z; C07K16/00; C07K1/13		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K1/13; C07K16/00; C12N15/115; G01N33/533		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Scopus		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	AAT Bioquest, Readilink™ Protein Biotinylation Kit, カタログ, No. 5520, 2014, p.1-2, [オンライン], 2014 [検索日 2020.08.06], インターネット:<URL: https://docs.aatbio.com/products/protocol-and-product-information-sheet-pis/protocol-for-readilink-protein-biotinylation-kit-version-4b3756b08f.pdf > p.1,段落1, 図1	1-2, 5-7
X	WO 2005/075997 A1 (旭化成株式会社) 18.08.2005 (2005 - 08 - 18) 段落[0044]-[0045]	1-4, 6-7
Y	段落[0044]-[0045]	5
Y	Thermo Scientific, Avidin-Biotin Technical Handbook, カタログ, No.1601675, Thermo Fisher Scientific Inc, 2009, p.12-13, [オンライン], 2009 [検索日 2020.08.06], インターネット:<URL: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1601675_AvBi_HB_INTL.pdf> p.12-13	5
A	WO 2015/146896 A1 (コニカミノルタ株式会社) 01.10.2015 (2015 - 10 - 01) 段落[0054], [0095]	1-7
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11.08.2020		国際調査報告の発送日 25.08.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小澤 理 2J 1762 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/133523 A1 (コニカミノルタ株式会社) 11.09.2015 (2015 - 09 - 11) 段落[0141], [0143], [0146]	1-7

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/023340

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2005/075997	A1	18.08.2005	US	2008/0131978	A1	
				段落[0100]-[0101]			
				EP	1712915	A1	
WO	2015/146896	A1	01.10.2015	US	2017/0016911	A1	
				段落[0082], [0141]			
				EP	3124969	A	
WO	2015/133523	A1	11.09.2015	US	2017/0074886	A1	
				段落[0153], [0155], [0158]			
				EP	3115783	A	