

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6893914号
(P6893914)

(45) 発行日 令和3年6月23日(2021.6.23)

(24) 登録日 令和3年6月4日(2021.6.4)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/536	(2006.01)
GO 1 N 33/53	(2006.01)
C 12 M 1/34	(2006.01)
C 07 K 16/00	(2006.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
GO 1 N	33/536
GO 1 N	33/53
C 12 M	1/34
C 07 K	16/00
C 12 N	15/09

GO 1 N 33/536
GO 1 N 33/53
C 12 M 1/34
C 07 K 16/00
C 12 N 15/09

E
U
Y
Z N A F

請求項の数 12 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-506118 (P2018-506118)
(86) (22) 出願日	平成28年8月8日(2016.8.8)
(65) 公表番号	特表2018-523826 (P2018-523826A)
(43) 公表日	平成30年8月23日(2018.8.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/045981
(87) 國際公開番号	W02017/024298
(87) 國際公開日	平成29年2月9日(2017.2.9)
審査請求日	令和1年8月8日(2019.8.8)
(31) 優先権主張番号	62/201, 978
(32) 優先日	平成27年8月6日(2015.8.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	399117121 アジレント・テクノロジーズ・インク A G I L E N T T E C H N O L O G I E S, I N C. アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタク ララ スティーブンス・クリーク・ブル バード 5301
(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(74) 代理人	100125380 弁理士 中村 紗子
(74) 代理人	100142996 弁理士 森本 聰二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】光開裂可能標識を使用する抗原検出の方法

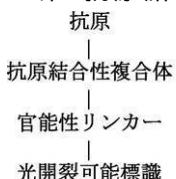
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の光開裂可能標識の存在を検出する工程を含む、第1抗原に特異的に結合することができる第1抗原結合性複合体を含むサンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出するための方法であって、

光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第1抗原結合性複合体へコンジュゲートされており、

第1抗原結合性複合体が、第1抗原へ非共有結合されて、式(1) :



10

の抗原結合された抗原結合性複合体を形成しており、

光開裂可能標識の存在が、第1抗原の存在を示し、かつ、

官能性リンカーが、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドであり、前記少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの各オリゴヌクレオチドが23~70ヌクレオチド長であり、前記部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドにおける二本鎖セクションが少なくとも23ヌクレオチド長であり、前記少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドの各オリゴヌクレオチドが5'末端にビオチン修飾またはC6アミノ修飾を含む、

20

方法。

【請求項 2】

(i) 光開裂可能標識を光開裂する工程をさらに含む、または、
 (i i) 光開裂可能標識が、光開裂可能部分へ共有結合されたレポーター部分を含む、
 請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(i) 部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドが、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである、または、

(i i) 少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドが、ヘアピンオリゴヌクレオチドである、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

第1抗原結合性複合体が、式(II) :

一次抗体



コンジュゲーション部分

によって定義され、

第1抗原結合性複合体が、コンジュゲーション部分へ結合された一次抗体を含み、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(III) :

抗原

一次抗体



コンジュゲーション部分

官能性リンカー



光開裂可能標識

によってさらに定義される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

第1抗原結合性複合体が、式(IV) :

一次抗体



第1リガンド



第1抗-リガンド

によって定義され、

第1抗原結合性複合体が、第1リガンドへ共有結合された一次抗体を含み、

第1リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(V) :

抗原

一次抗体



第1リガンド

第1抗-リガンド



官能性リンカー

光開裂可能標識

によってさらに定義される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

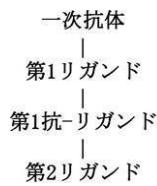
第1抗原結合性複合体が、式(VI) :

10

20

30

40

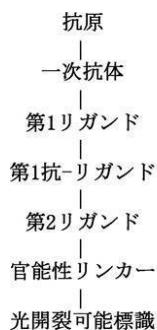


によって定義され、

第1抗原結合性複合体が、第1リガンドへ共有結合された一次抗体を含み、
第1リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、
第2リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(VII)：

10



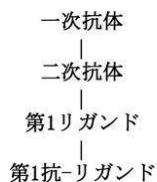
によってさらに定義される、

20

請求項1に記載の方法。

【請求項7】

第1抗原結合性複合体が、式(VIII)：

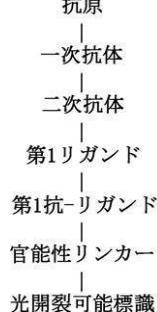


によって定義され、

第1抗原結合性複合体が、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、
二次抗体が、第1リガンドへ共有結合されており、
第1リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、

30

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(IX)：



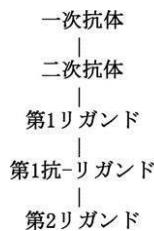
40

によってさらに定義される、

請求項1に記載の方法。

【請求項8】

第1抗原結合性複合体が、式(X)：



によって定義され、

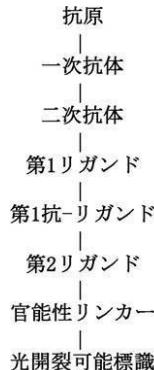
第1抗原結合性複合体が、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、

二次抗体が、第1リガンドへ共有結合されており、

第1リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、

第2リガンドが、第1抗-リガンドへ非共有結合されており、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(XI)：



10

によってさらに定義される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

第1抗原結合性複合体が、式(XII)：



によって定義され、

第1抗原結合性複合体が、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、

30

二次抗体が、官能性リンカーを通して光開裂可能標識へ共有結合されており、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(XIII)：



によってさらに定義される、

請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

第1抗原結合性複合体が、アブタマーを含み、

アブタマーが、官能性リンカーを通して光開裂可能標識へ共有結合されており、

抗原結合された抗原結合性複合体が、式(XIV)：



によってさらに定義される、

50

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

方法が、サンプル中の少なくとも2つの抗原の存在を検出する方法と定義され、方法が、サンプル中の少なくとも第2光開裂可能標識の存在を検出する工程をさらに含み、

第2光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第2抗原結合性複合体へコンジュゲートされており、

第2抗原結合性複合体が、第2抗原へ結合されており、

第2光開裂可能標識の存在が、第2抗原の存在を示す、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

10

(i) 光開裂可能標識が、比色色素、蛍光色素、放射性標識、化学発光基、または生物発光基である、または、

(i i) サンプルが、組織切片、生検サンプル、細胞培養サンプル、細胞スミア、またはタンパク質溶解物である、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年8月6日に出願された米国仮特許出願第62/201,978号の優先権の恩典を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

20

1. 発明の分野

本発明は、概して、組織学、病理学、および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、例えば、多重および連続抗原検出を含む抗原検出のための光開裂可能標識(PCL)の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

典型的に使用される免疫染色プロトコルにおいては、抗原特異的抗体を、組織切片、細胞、またはタンパク質プロットを含むがこれらに限定されない抗原含有標本へ添加し、抗原へ結合させる。この抗原結合化抗体は、次いで、以下を含む様々な技術のいずれかを使用して検出される：(a) フルオロフォア(例えば、Cy5)または比色検出のために使用される酵素(例えば、HRP)へコンジュゲートされた、第1抗体について特異的親和性を有する、第2抗体；(b) フルオロフォア(例えば、Cy5)または比色検出のために使用される酵素(例えば、HRP)へコンジュゲートされたアビジンまたはストレプトアビジンを使用してその後検出されるビオチンへコンジュゲートされた、第1抗体について特異的親和性を有する、第2抗体；ならびに(c) 第1抗体へ直接コンジュゲートされている、フルオロフォア(例えば、Cy5)または比色検出のために使用される酵素(例えば、HRP)またはビオチン。場合(a)および(b)において、そのような技術は、それぞれユニークに標識された、約3個の抗体が、同じサンプルにおいて使用されることを可能にする。場合(c)において、そのような技術は、別々に画像化することができる別個の標識へコンジュゲートされた約4個の抗体に制限される。しかしながら、二次抗体間の非特異的相互作用、および個々の標識を検出する制限された能力は、より高次の多重化を妨げている。新しい多重技術が出現しているが、多くは、例えば、時間がかかる、高価である、かつ／または広範囲に最適化された一次抗体を必要とするという欠点に悩まされている。抗原検出を自動化するための改良された方法および機器が望ましい。

30

【発明の概要】

【0004】

多重および連続抗原検出のために光開裂可能標識を使用する方法を本明細書に提供する。方法は、光開裂可能標識の存在を検出する工程を含み、光開裂可能標識は、抗原結合性複合体へ官能性リンカーを通してコンジュゲートされており、抗原結合性複合体は、次に

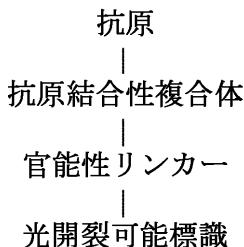
40

50

、抗原へ非共有結合されている。従って、光開裂可能標識の存在は、抗原結合性複合体によって特異的にまたは選択的に結合された抗原の存在を示す。

【0005】

一局面において、第1抗原に特異的に結合することができる第1抗原結合性複合体を含むサンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出するための方法を提供し、方法は、サンプル中の光開裂可能標識の存在を検出する工程を含み、ここで、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第1抗原結合性複合体へコンジュゲートされており、第1抗原結合性複合体は第1抗原へ非共有結合され、式(I)：



10

の抗原結合された抗原結合性複合体を形成しており、

光開裂可能標識の存在は第1抗原の存在を示す。

【0006】

いくつかの態様において、方法は、光開裂可能標識を光開裂する工程をさらに含む。光開裂は、サンプルを紫外線に曝露することを含み得る。

20

【0007】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、光開裂可能部分へ共有結合的にコンジュゲートされたレポーター部分を含む。光開裂可能部分は2-ニトロベンジル基、ベンゾイン基、クマリニル基、またはp-ヒドロキシフェナシル基であり得る。様々な態様において、光開裂可能部分は2-ニトロベンジル基である。ある態様において、2-ニトロベンジル基は、炭素上および／またはベンゼン環上に置換を含む。

【0008】

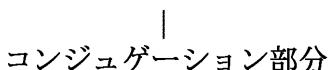
いくつかの態様において、官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)である。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、ヘアピンオリゴヌクレオチドである。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

30

【0009】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(II)：

一次抗体

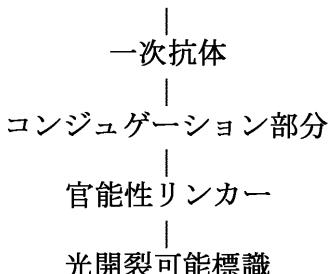


によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、コンジュゲーション部分へ結合された一次抗体を含み、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(III)：

40

抗原



によってさらに定義される。

【0010】

50

いくつかの態様において、一次抗体は、例えばTCEPまたは2-MEAのような、少なくとも1つの還元剤によって修飾されている。いくつかの態様において、コンジュゲーション部分は、例えばSulfo-SMCCまたはSM(PEG)_nのような、ヘテロ二官能性リンカーである。いくつかの態様において、コンジュゲーション部分は一次抗体へ共有結合されている。いくつかの態様において、コンジュゲーション部分は官能性リンカーへ共有結合されている。いくつかの態様において、官能性リンカーは、5'末端にC6アミノ修飾および3'末端に光開裂可能標識を有する部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(IV)：

一次抗体

 |
 第1リガンド

 |
 第1抗-リガンド

によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、第1リガンドへ共有結合的にコンジュゲートされた一次抗体を含み、第1リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(V)：

抗原

 |
 一次抗体

 |
 第1リガンド

 |
 第1抗-リガンド

 |
 官能性リンカー

 |
 光開裂可能標識

によってさらに定義される。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、方法は、サンプルを一次抗体および第1抗-リガンドと連続的に接触させる工程をさらに含む。他の態様において、方法は、サンプルを一次抗体および第1抗-リガンドと同時に接触させる工程をさらに含む。第1リガンドは、ビオチン、アビジンもしくはストレプトアビジン、または第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。第1抗-リガンドは、アビジンもしくはストレプトアビジン、ビオチン、または第1の一本鎖オリゴヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的な第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。

【 0 0 1 3 】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。いくつかの態様において、同じ光開裂可能標識の2つの事象(occurrence)が、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。他の態様において、2つの異なる光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド(例えば、しかしこれに限定されないが、ヘアピンオリゴヌクレオチド)、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)であり得る。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(VI)：

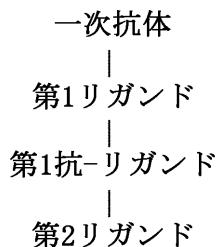
10

20

30

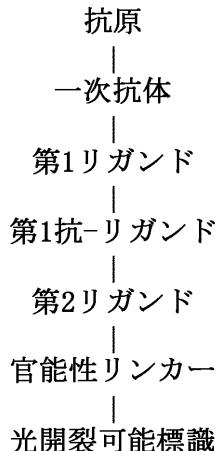
40

50



によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、第1リガンドへ共有結合された一次抗体を含み、第1リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、第2リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(VII)：



によってさらに定義される。

【0015】

いくつかの態様において、方法は、サンプルを一次抗体、第1抗-リガンド、および／または第2リガンドと連続的に接触させる工程をさらに含む。他の態様において、方法は、サンプルを一次抗体、第1抗-リガンド、および／または第2リガンドと同時に接触させる工程をさらに含む。第1リガンドは、ビオチン、アビジン、または抗-アビジン抗体であり得る。第1抗-リガンドは、アビジンもしくはストレプトアビジンまたはビオチンであり得る。第2リガンドは、ビオチン、アビジン、または抗-アビジン抗体であり得る。いくつかの局面において、第1抗-リガンドは一本鎖オリゴヌクレオチドを含み、第2リガンドは、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的な第2の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む。

【0016】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。いくつかの態様において、同じ光開裂可能標識の2つの事象が、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。他の態様において、2つの異なる光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド(例えば、しかしこれに限定されないが、ヘアピンオリゴヌクレオチド)、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)であり得る。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【0017】

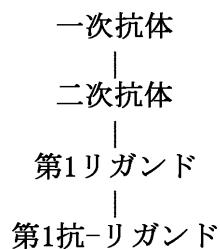
いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(VIII)：

10

20

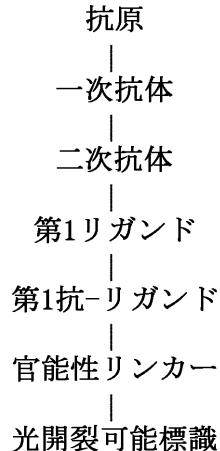
30

40



によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、二次抗体は第1リガンドへ共有結合されており、第1リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(IX)：



によってさらに定義される。

【0018】

いくつかの態様において、方法は、サンプルを一次抗体、二次抗体、および／または第1抗-リガンドと連続的に接觸させる工程をさらに含む。他の態様において、方法は、サンプルを一次抗体、二次抗体、および／または第1抗-リガンドと同時に接觸させる工程をさらに含む。第1リガンドは、ビオチン、アビジンもしくはストレプトアビジン、または第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。第1抗-リガンドは、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、抗-アビジン、または第1の一本鎖オリゴヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的な第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。

【0019】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。いくつかの態様において、同じ光開裂可能標識の2つの事象が、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。他の態様において、2つの異なる光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第1抗-リガンドへ共有結合されている。官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド(例えば、しかしこれに限定されないが、ヘアピンオリゴヌクレオチド)、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)であり得る。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【0020】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(X)：

10

20

30

40

一次抗体
 |
 二次抗体
 |
 第1リガンド
 |
 第1抗-リガンド
 |
 第2リガンド
 によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、二次抗体は第1リガンドへ共有結合されており、第1リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、第2リガンドは第1抗-リガンドへ非共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(XI)：

抗原
 |
 一次抗体
 |
 二次抗体
 |
 第1リガンド
 |
 第1抗-リガンド
 |
 第2リガンド
 |
 官能性リンカー
 |
 光開裂可能標識

によってさらに定義される。

【0021】

いくつかの態様において、方法は、サンプルを一次抗体、二次抗体、第1抗-リガンド、および／または第2リガンドと連続的に接触させる工程をさらに含む。他の態様において、方法は、サンプルを一次抗体、二次抗体、第1抗-リガンド、および／または第2リガンドと同時に接触させる工程をさらに含む。第1リガンドは、ビオチンまたはアビジンもしくはストレプトアビジンであり得る。第1抗-リガンドは、アビジンもしくはストレプトアビジンまたはビオチンであり得る。第2リガンドは、ビオチンまたはアビジンもしくはストレプトアビジンであり得る。いくつかの局面において、第1抗-リガンドは一本鎖オリゴヌクレオチドを含み、第2リガンドは、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的な第2の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む。

【0022】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。いくつかの態様において、同じ光開裂可能標識の2つの事象が、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。他の態様において、2つの異なる光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して第2リガンドへ共有結合されている。官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド(例えば、しかしこれに限定されないが、ヘアピンオリゴヌクレオチド)、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)であり得る。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【0023】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体は、式(XII)：

10

20

30

40

一次抗体

|
二次抗体

によって定義され、

第1抗原結合性複合体は、二次抗体によって結合された一次抗体を含み、二次抗体は、官能性リンカーを通して光開裂可能標識へ共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(XIII)：

抗原
|
一次抗体
|
二次抗体
|
官能性リンカー

|
光開裂可能標識

によってさらに定義される。

【0024】

いくつかの態様において、方法は、サンプルを一次抗体および二次抗体と連続的に接触させる工程をさらに含む。他の態様において、方法は、サンプルを一次抗体および二次抗体と同時に接触させる工程をさらに含む。

【0025】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して二次抗体へ共有結合されている。いくつかの態様において、同じ光開裂可能標識の2つの事象が、官能性リンカーを通して二次抗体へ共有結合されている。他の態様において、2つの異なる光開裂可能標識が、官能性リンカーを通して二次抗体へ共有結合されている。官能性リンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチド(例えば、しかしこれに限定されないが、ヘアピンオリゴヌクレオチド)、ペプチド、またはアルカンジイル_(C₁₆)であり得る。ある態様において、少なくとも部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドは、完全に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。

【0026】

いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体はアプタマーを含み、アプタマーは、官能性リンカーを通して光開裂可能標識へ共有結合されており、抗原結合された抗原結合性複合体は、式(XIV)：

抗原
|
アプタマー
|
官能性リンカー
|
光開裂可能標識

によってさらに定義される。

【0027】

いくつかの態様において、方法は、サンプルをアプタマーと接触させる工程をさらに含む。

【0028】

いくつかの態様において、方法は、サンプル中の少なくとも2つの抗原の存在を検出する方法と定義され、方法は、サンプル中の少なくとも第2光開裂可能標識の存在を検出する工程をさらに含み、ここで、第2光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第2抗原結合性複合体へコンジュゲートされており、第2抗原結合性複合体は第2抗原へ結合されており、第2光開裂可能標識の存在は第2抗原の存在を示す。同様に、方法は、サンプル中の少

10

20

30

40

50

なくとも3つの抗原の存在を検出する方法と定義され得、方法は、サンプル中の少なくとも第3光開裂可能標識の存在を検出する工程をさらに含み、ここで、第3光開裂可能標識は、官能性リンカーを通して第3抗原結合性複合体へコンジュゲートされており、第3抗原結合性複合体は第3抗原へ結合されており、第3光開裂可能標識の存在は第3抗原の存在を示す。

【0029】

いくつかの態様において、第1光開裂可能標識の検出、ならびに第2光開裂可能標識および任意で第3光開裂可能標識の検出は、同時に行われる。いくつかの態様において、第1抗原結合性複合体および第2抗原結合性複合体は、各々、ユニークな光開裂可能標識を含む。他の態様において、第1抗原結合性複合体および第2抗原結合性複合体は、各々、同じ光開裂可能標識を含む。いくつかの態様において、第1光開裂可能標識の検出および第2光開裂可能標識の検出は、連続的に行われる。10

【0030】

いくつかの態様において、方法は、第2光開裂可能標識を検出する前に、第1光開裂可能標識を光開裂する工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、第2光開裂可能標識の検出後に、第2光開裂可能標識を光開裂する工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、第1および第2光開裂可能標識を同時に光開裂する工程をさらに含む。光開裂は、サンプルを紫外線に曝露することを含み得る。

【0031】

いくつかの態様において、方法は、サンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原を検出する工程をさらに含む。同じサンプル内で、いくつかの抗原が同時に検出され得、一方、他の抗原は連続的に検出される。同時検出について、各抗原結合性複合体は、ユニークな光開裂可能標識を含む。少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の異なる抗原が、同時に検出され得る。同時抗原検出の方法において、各抗原結合性複合体は、連続的にサンプルへ添加され、続いて单一の検出段階が行われ得る。あるいは、抗原結合性複合体のいくつかが、同時に添加され得る。様々な態様において、方法の段階の少なくとも一部分が、自動化され得る。いくつかの態様において、方法の段階の全部が、自動化され得る。20

【0032】

いくつかの態様において、光開裂可能標識は、比色色素、蛍光色素、放射性標識、化学発光基、または生物発光基である。いくつかの態様において、サンプルは、組織切片、生検サンプル、細胞培養サンプル、細胞スミア、またはタンパク質溶解物である。

【0033】

ある態様は、本明細書に開示される方法のいずれかを行うように構成された装置を含む。特定の態様は以下を含む：サンプルを画像化するように構成されたイメージングシステム；流体入口および流体出口を含むサンプルチャンバ；ならびに、複数のリザーバーを含む流体制御システムであって、サンプルチャンバの流体入口および流体出口と流体連結されている、流体制御システム。40

【0034】

いくつかの態様において、流体制御システムは、サンプルの自動連續染色を提供するように構成されている。具体的な態様において、流体制御システムは、サンプルチャンバとおよび複数のリザーバーと流体連結されているバルブをさらに含む。ある態様において、バルブはロータリーバルブである。特定の態様は、第1抗原から第1抗原結合性複合体を光開裂するように構成された光源をさらに含む。いくつかの態様において、複数のリザーバーは、イメージング溶液を含有する第1リザーバー、洗浄溶液を含有する第2リザーバー、開裂溶液を含有する第3リザーバー、バッファー溶液を含有する第4リザーバー、ハイブリダイゼーション洗浄溶液を含有する第5リザーバー、および／またはハイブリダイゼーション溶液を含有する第6リザーバーを含む。50

【 0 0 3 5 】

具体的な態様において、流体制御システムは、サンプルチャンバとならびに第1、第2、第3、第4、第5および第6リザーバーと流体連結されているバルブをさらに含む。ある態様において、サンプルチャンバは、顕微鏡用スライド、カバーガラス、および顕微鏡用スライドとカバーガラスとの間に配置されたガスケットを含む。

【 0 0 3 6 】

特定の態様において、サンプルチャンバの流体入口および流体出口は、カバーガラスへ接続されている。いくつかの態様において、サンプルチャンバは、X-Y面で動くように構成されたプラットフォームへ接続されている。具体的な態様において、サンプルチャンバの流体出口は、流体輸送デバイスへ接続されている。ある態様において、流体輸送デバイスはシリングポンプである。特定の態様において、イメージングシステムは、顕微鏡；光源；ライトガイドアダプター；およびカメラを含む。

10

【 0 0 3 7 】

特定の態様は、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出するための装置を含み、装置は以下を含む：流体入口および流体出口を含むサンプルチャンバ；サンプルチャンバ中のサンプルを画像化するように構成されたイメージングシステム；サンプル上または中の第1抗原から第1抗原結合性複合体を光開裂するように構成された光源；ならびに、サンプルチャンバの流体入口および流体出口と流体連結されている流体制御システムであって、サンプルチャンバと流体連結されている複数のリザーバーを含む、流体制御システム。

20

【 0 0 3 8 】

具体的な態様において、流体制御システムは、サンプルの自動連續染色を提供するように構成されている。特定の態様において、イメージングシステムは、サンプルの自動画像化を提供するように構成されている。いくつかの態様において、複数のリザーバーは、イメージング溶液を含有する第1リザーバー、洗浄溶液を含有する第2リザーバー、開裂溶液を含有する第3リザーバー、バッファー溶液を含有する第4リザーバー、ハイブリダイゼーション洗浄溶液を含有する第5リザーバー、およびハイブリダイゼーション溶液を含有する第6リザーバーを含む。ある態様において、流体制御システムは、サンプルチャンバとならびに第1、第2、第3、第4、第5および第6リザーバーと流体連結されているバルブをさらに含む。特定の態様において、バルブはロータリーバルブである。いくつかの態様において、サンプルチャンバは、顕微鏡用スライド、カバーガラス、および顕微鏡用スライドとカバーガラスとの間に配置されたガスケットを含む。

30

【 0 0 3 9 】

具体的な態様において、サンプルチャンバは、X-Y面で動くように構成されたプラットフォームへ接続されている。ある態様において、サンプルチャンバの流体入口および流体出口は、カバーガラスへ接続されている。特定の態様において、サンプルチャンバの流体出口は、流体輸送デバイスへ接続されている。いくつかの態様において、流体輸送デバイスはシリングポンプである。具体的な態様において、イメージングシステムは、顕微鏡、光源、ライトガイドアダプター、およびカメラを含む。ある態様において、装置は、同時にまたはランダムアクセスによって複数のサンプルチャンバを染色および画像化するように構成されている。

40

【 0 0 4 0 】

本発明の他の目的、特徴および利点は、下記の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示すが、例示のためにのみ提供されることが理解されるべきであり、何故ならば、本発明の精神および範囲内の様々な変更および改変が、この詳細な説明から当業者に明らかとなるであろうためである。

【 図面の簡単な説明 】**【 0 0 4 1 】**

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含有する。

50

カラー図面を含む本特許または特許出願公報の写しは、請求および必要な手数料の支払い
で特許庁によって提供されるだろう。

【0042】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書に提示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つまたは複数への参照によって、よりよく理解され得る。

【0043】

【図1】一本鎖のビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能Cy5蛍光色素を使用しての組織切片中の抗原の検出。ビオチン化およびフルオレセイン標識化プローブが対照として含まれる。

10

【図2】例示的な部分的に二本鎖のビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能蛍光色素。上部鎖の配列はSEQ ID NO: 1として提供され；下部鎖の配列はSEQ ID NO: 2として提供される。

【図3】一本鎖のおよび部分的に二本鎖のビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能Cy5蛍光色素を使用しての組織切片中の抗原の検出。

【図4】単一の光開裂可能蛍光色素と複合体化された、例示的な一本鎖のビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能標識。各例の配列はSEQ ID NO: 3として提供される。

【図5】同じ色の2つの光開裂可能蛍光色素と複合体化された、例示的な二本鎖のビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能標識。第1(Cy5)例の上部鎖の配列はSEQ ID NO: 3として提供され；第1(Cy5)例の下部鎖の配列はSEQ ID NO: 4として提供される。第2(AF594)例の上部鎖の配列はSEQ ID NO: 5として提供され；第2(AF594)例の下部鎖の配列はSEQ ID NO: 6として提供される。第3(AF532)例の上部鎖の配列はSEQ ID NO: 7として提供され；第3(AF532)例の下部鎖の配列はSEQ ID NO: 8として提供される。第4(AF488)例の上部鎖の配列はSEQ ID NO: 9として提供され；第4例(AF488)の下部鎖の配列はSEQ ID NO: 10として提供される。

20

【図6】単一の光開裂可能蛍光色素を有する、例示的なヘアピンのビオチン-オリゴヌクレオチド-光開裂可能標識。第1(Cy5)例の配列はSEQ ID NO: 11として提供され；第2(AF594)例の配列はSEQ ID NO: 12として提供され；第3(AF532)例の配列はSEQ ID NO: 13として提供され；第4(AF488)例の配列はSEQ ID NO: 14として提供される。

【図7】官能性リンカーを通してビオチン分子へ共有結合された例示的な光開裂可能標識。官能性リンカーは、核酸、ペプチド、または脂肪酸鎖であり得る。

30

【図8】図2および4~6に示されるもののような、例示的なヌクレオチド-光開裂可能部分-蛍光色素構造。

【図9A】光開裂の効率。図9Aは、開裂前の染色組織切片の画像を示す。

【図9B】光開裂の効率。図9Bは、UV 365 nm曝露による2分間の開裂後の染色切片の画像を示す。

【図9C】光開裂の効率。図9Cは、バッファーリフレッシュ後の染色切片の画像を示す。

【図9D】光開裂の効率。図9Dは、開裂境界を示す異なるFOVの画像である(左上隅を開裂した)。

【図9E】光開裂の効率。図9Eは、開裂後および洗浄後の画像輝度変化を示す、図9A~Cにわたる線に沿った画像ピクセル強度プロフィールである。

40

【図10A】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Aは、最大シグナル強度のトレースを示す。

【図10B】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Bは、シグナルの絶対差(シグナル対バックグラウンド)のトレースを示す。

【図10C】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Cは、最大シグナルのパーセンテージとしてのシグナルの相対差(シグナル対バックグラウンド)のトレースを示す。

【図10D】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Dは、視野の中央における光開裂前および後のスタンダード・デュプレックスPCL(Standard Duplex PCL)の画像を示す。

50

【図10E】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Eは、光開裂前および後のロング・デュプレックスPCL(Long Duplex PCL)の画像を示す。

【図10F】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Fは、光開裂前および後のショートPCL(Short PCL)の画像を示す。

【図10G】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Gは、光開裂前および後のシングル・ビオチン・デュプレックスPCL(Single Biotin Duplex PCL)の画像を示す。

【図10H】様々なPCLを使用しての光開裂の時間的経過。図10Hは、開裂前および開裂後の両方の光開裂可能ビオチンを有するオリゴヌクレオチド(IDTデュプレックスPCL(IDT Duplex PCL))の画像を示す。

【図11】連続組織染色。異なる色の2つの光開裂可能標識を用いての2つの標的タンパク質のFFPE組織染色。同じ視野を、第1色で画像化し、ImageJソフトウェアを用いて前回の色の上に重ね合わせた。
10

【図12】実施例5において使用された光開裂可能標識の図。スタンダード・デュプレックスPCLは、それらの5'末端上にビオチンおよびそれらの3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する2つの34-ヌクレオチドオリゴからなり、オリゴをアニーリングし、各末端上に4ヌクレオチド一本鎖突出部を有する28-ヌクレオチド二本鎖セクションを形成させた。スタンダード・デュプレックスPCLの上部鎖の配列はSEQ ID NO: 3として提供され；スタンダード・デュプレックスPCLの下部鎖の配列はSEQ ID NO: 4として提供される。ロング・デュプレックスPCLは、それらの5'末端上にビオチンおよびそれらの3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する2つの69-ヌクレオチドオリゴからなり、オリゴをアニーリングし、各末端上に2ヌクレオチド一本鎖突出部を有する67-ヌクレオチド二本鎖セクションを形成させた。ロング・デュプレックスPCLの上部鎖の配列はSEQ ID NO: 15として提供され；ロング・デュプレックスPCLの下部鎖の配列はSEQ ID NO: 16として提供される。ショートPCLは、その5'末端上にビオチンおよびその3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する単一の12-ヌクレオチドオリゴ(SEQ ID NO: 17)からなった。シングル・ビオチン・デュプレックスPCLは、各ハイブリッド中の2つのオリゴのうちの1つのみがその5'末端上にビオチンを有したことを探して、スタンダード・デュプレックスPCLと同じであった。シングル・ビオチン・デュプレックスPCLの上部鎖の配列はSEQ ID NO: 3として提供され；シングル・ビオチン・デュプレックスPCLの下部鎖の配列はSEQ ID NO: 4として提供される。IDTデュプレックスPCLは、それらの5'末端上に光開裂可能ビオチンおよびそれらの3'末端上に蛍光標識を有する2つの34-ヌクレオチドオリゴからなり、オリゴをアニーリングし、各末端上に4ヌクレオチド一本鎖突出部を有する28-ヌクレオチド二本鎖セクションを形成させた。IDTデュプレックスPCLの上部鎖の配列はSEQ ID NO: 3として提供され；IDTデュプレックスPCLの下部鎖の配列はSEQ ID NO: 4として提供される。
20
30

【図13】本明細書に開示される例示的な態様に従う装置の図。

【図14】本明細書に開示される例示的な態様に従うサンプルチャンバの分解図。

【図15】図14のサンプルチャンバの組立図。

【図16】流体制御システムおよびサンプルチャンバを含む図13の装置の一部分の図。

【図17】電力および制御システムを含む図13の装置の一部分の図。

【図18】SMCC(スクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート)二官能性架橋剤を有する例示的な修飾オリゴ。
40

【図19A】3つの連続する染色および画像化サイクルの図。

【図19B】コラーゲン、ALCAMおよびHoechstを示す、20×対物レンズで撮影された25枚の写真(5×5)の継ぎ合わされた画像。点線の正方形は、図19C～Eにおいて拡大されチャネルへ分割された領域の輪郭を描く。

【図19C】ALCAM、CD44、Hoechst。

【図19D】SMA、サイトケラチン、Hoechst。

【図19E】フィプロネクチン、ヒストンH3、Hoechst。

【図20】同時に3色の光開裂可能標識を使用する多重染色でのFFPE組織切片の画像。画像は、Cy3、Cy5、およびCy7についての3つの適切な波長でシグナルをキャプチャーし、次
50

いで、ImageJソフトウェアを使用して画像合成を行い、3つの別個の領域を共視覚化した。

【図21A】図20における多重染色組織の開裂後の画像。全てのシグナルが1つの光開裂事象後に放出された。

【図21B】総開裂時間にわたる総シグナルの相対的パーセントのトレースを示す。

【図21C】最大シグナル強度のトレースを示す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

例示的態様の説明

固定組織標本中の抗原の免疫蛍光検出は、臨床診療および研究所において慣例的に使用されている。現在の方法は、1組織切片当たり1~4つの抗原の検出に制限されている。従って、追加の抗原の検出は、別個の切片上における複数の独立した染色を必要とし、単一の切片上における抗原の共局在化を制限する。さらに、現在の方法は、染色および画像化が分離されたプロセスであるために、非常に時間を消費する。

10

【0045】

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片についての自動次世代組織学(NGH: Next Generation Histology)プラットフォームが、これらの制限を克服するために開発された。このプラットフォームは、伝統的な蛍光タグが、UV照射によって放出される新規の光開裂可能フルオロフォアで置き換えられているプローブを使用するように設計された。光開裂可能標識は、抗原検出抗体を除去する必要なく、同じ組織切片における繰り返し染色の迅速なサイクルを可能にする。NGHプラットフォームはまた、手動時間の短縮のための自動流体工学、および単一のプラットフォーム上における多重PCL検出のための四色落射蛍光顕微鏡イメージングシステムを含む。

20

【0046】

I. 抗原検出方法

様々な態様において、本発明は、光開裂可能標識が官能性リンカーを介してコンジュゲートされている「抗原結合性複合体」を構築するために必要とされる様々なインキュベーティング段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する。

【0047】

30

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。

2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。

3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween(登録商標)-20)。

4. 第1リガンド/第1抗-リガンドブロック(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン/ビオチンブロック)を行う。

5. 一次抗体と共にインキュベートする。

40

6. 洗浄する。

7. 第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)二次抗体と共にインキュベートする。

8. 洗浄する。

9. 第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)と共にインキュベートする。

10. 洗浄する。

11. 第2リガンド(例えば、ビオチン)-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。

12. 洗浄する。

50

13. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。

14. 光開裂する。

15. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【 0 0 4 8 】

いくつかのバリエーションにおいて、段階7および9は同時に行われ得；これらのバリエーションにおいて、第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)二次抗体および第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を同時に添加し、段階8を行わない。いくつかの態様において、それらは同じ溶液中にある。いくつかのバリエーションにおいて、段階5～15は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつ 10
かの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するために、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。 20

2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。

3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween (登録商標)-20)。

4. 第1リガンド/第1抗-リガンドブロック(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン/ビオチンブロック)を行う。

5. 一次抗体と共にインキュベートする。

6. 洗浄する。

7. 第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)二次抗体と共にインキュベー 30
トする。

8. 洗浄する。

9. 第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。

10. 洗浄する。

11. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。

12. 光開裂する。

13. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【 0 0 5 0 】

いくつかのバリエーションにおいて、段階7および9は同時に行われ得；これらのバリエーションにおいて、第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)二次抗体および第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を同時に添加し、段階8を行わない。いくつかの態様において、それらは同じ溶液中にある。いくつかのバリエーションにおいて、段階5～13は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつ 40
かの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するために、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。 50

【0051】

別の局面において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和)。これらについての方法は当業者に周知である。
2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。
3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween (登録商標)-20)。
4. 一次抗体と共にインキュベートする。
5. 洗浄する。
6. 光開裂可能標識へコンジュゲートされた二次抗体と共にインキュベートする。
7. 洗浄する。
8. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。
9. 光開裂する。
10. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【0052】

いくつかのバリエーションにおいて、段階4~10は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつかの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するために、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【0053】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。
2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。
3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween (登録商標)-20)。
4. 第1リガンド/第1抗-リガンドブロック(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン/ビオチンブロック)を行う。
5. 第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)一次抗体と共にインキュベートする。
6. 洗浄する。
7. 第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。
8. 洗浄する。
9. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。
10. 光開裂する。
11. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【0054】

いくつかのバリエーションにおいて、段階5および7は同時に行われ得；これらのバリエーションにおいて、第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)一次抗体および第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を同時に添加し、段階6を行わない。いくつかの態様において、それらは同じ溶液中にある。いくつかのバリエーシ

10

20

30

40

50

ヨンにおいて、段階5～11は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつかの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するため、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【0055】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。
2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。
3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween (登録商標)-20)。
4. 第1リガンド/第1抗-リガンドブロック(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン/ビオチンブロック)を行う。
5. 第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)一次抗体と共にインキュベートする。
6. 洗浄する。
7. 第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)と共にインキュベートする。
8. 洗浄する。
9. 第2リガンド(例えば、ビオチン)-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。
10. 洗浄する。
11. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。
12. 光開裂する。
13. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【0056】

いくつかのバリエーションにおいて、段階5および7は同時に行われ得；これらのバリエーションにおいて、第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)一次抗体および第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を同時に添加し、段階6を行わない。いくつかの態様において、それらは同じ溶液にある。いくつかのバリエーションにおいて、段階5～13は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつかの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するため、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【0057】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。
2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。
3. 非特異的抗原ブロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのブロッキング剤、例えばTween (登録商標)-20)。

10

20

30

40

50

4. 非タンパク質第1リガンド-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。

5. 洗浄する。

6. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。

7. 光開裂する。

8. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。

【0058】

いくつかのバリエーションにおいて、段階4~8は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつかの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するために、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。10

【0059】

いくつかのバリエーションにおいて、非タンパク質第1リガンドは、アブタマー、糖質、核酸(例えば、DNA)、ホルモン、または小分子であり得る。

【0060】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、サンプル上または中の少なくとも第1抗原の存在を検出する方法を提供する：20

1. 必要に応じて抗原検出のためにサンプルを調製する(例えば、脱パラフィン、再水和など)。これらについての方法は当業者に周知である。

2. 抗原回復を行う(例えば、熱 + 塩 + pH)。

3. 非特異的抗原プロッキングを行う(例えば、BSA、血清、または非タンパク質ベースのプロッキング剤、例えばTween(登録商標)-20)。

4. 第1リガンド/第1抗-リガンドブロック(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン/ビオチンブロック)を行う。

5. 第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)アブタマーと共にインキュベートする。30

6. 洗浄する。

7. 第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)と共にインキュベートする。

8. 洗浄する。

9. 第2リガンド(例えば、ビオチン)-結合化光開裂可能標識と共にインキュベートする。

10. 洗浄する。

11. 光開裂可能標識からのシグナルを検出する。

12. 光開裂する。

13. 任意で、光開裂可能標識からのシグナルの非存在を検出することによって光開裂の成功を確認する。40

【0061】

いくつかのバリエーションにおいて、段階5および7は同時に行われ得；これらのバリエーションにおいて、第1リガンド-コンジュゲート化(例えば、ビオチン化)アブタマーおよび第1抗-リガンド(例えば、アビジンまたはストレプトアビジン)を同時に添加し、段階6を行わない。いくつかの態様において、それらは同じ溶液中にある。いくつかのバリエーションにおいて、段階5~13は、第2(またはそれ以上)の抗原について繰り返され得る。いくつかの態様において、方法の段階は、サンプル中の複数の抗原を検出するために、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回繰り返され得る50

。例えば、方法は、単一のサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【0062】

いくつかの態様において、本明細書に提供される方法は、ウェスタンプロット法、マイクロアレイ、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、逆相タンパク質アレイ(RPPA)、および免疫組織化学(比色または蛍光読み出しに基づく)を含むが、これらに限定されない、抗原検出について公知の技術と併用してかつ／または組み合わせて使用され得る。

【0063】

いくつかの態様において、サンプルは、抗原結合性複合体の様々な構成要素と共にインキュベートされる前に、抗原検出のために調製される必要があるだろう。いくつかのバリエーションにおいて、標的細胞は、例えば、架橋するための化学固定剤(例えばアルデヒドまたはパラホルムアルデヒド)、沈殿させるためのアルコール、酸化剤、水銀剤、およびピクリン酸塩を添加することによって、固定される必要があるだろう。いくつかのバリエーションにおいて、細胞透過性は、例えば、有機溶媒、例えばメタノールおよびアセトン、または界面活性剤、例えばTriton(商標)-X 100、サポニンおよびTween(登録商標)-20を添加することによって、増加させる必要があるだろう。いくつかのバリエーションにおいて、ブロッキング段階は、例えば、ウシ血清アルブミン、ヤギ血清、フィッシュキンゼラチン、ウマ血清、ブタ血清、ロバ血清、またはウサギ血清を添加することによって、非特異的反応を減少させるために行われる必要があるだろう。

【0064】

いくつかの態様において、様々なインキュベーティング段階は、サンプル中において抗原結合された抗原結合性複合体を構築するために行われる。いくつかの場合において、抗原結合性複合体の2つ以上の構成要素が、同時にサンプルへ添加され得、一方、他のものが連続的に添加される。いくつかの場合において、抗原結合性複合体の各構成要素が、連続的にサンプルへ添加される。いくつかの場合において、抗原結合性複合体の全ての構成要素が、同時にサンプルへ添加され得る。一次抗体、アブタマーなどと、サンプル中に存在し得る標的抗原との相互作用、あるいは／さらに、一次抗体と二次抗体との相互作用、第1リガンドと第1抗-リガンドとの相互作用、または第1抗-リガンドと第2リガンドとの相互作用を促進する条件下で、様々なインキュベーティング段階が行われ得る。所望の相互作用に影響を与えるように調節され得る例示的な条件は、温度およびpHを含む。インキュベーション段階についての例示的な温度は、15～30、18～27、もしくは20～25

、またはその中で導出可能な任意の範囲の任意の温度を含む。インキュベーション段階についての例示的な温度は、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30を含む。インキュベーション段階についての例示的なpH値は、6～8、6.2～7.8、もしくは6.5～7.5、またはその中で導出可能な任意の範囲の任意のpHを含む。インキュベーション段階についての例示的なpH値は、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8.0を含む。

【0065】

いくつかの態様において、洗浄段階は、サンプル中の抗原結合された抗原結合性複合体へ特異的に結合されていないあらゆる構成要素を除去するために、様々なインキュベーティング段階に続いて行われる。洗浄は、例えば、水、バッファー溶液(例えば、PBS)、生理食塩水、またはそれらの組み合わせを含む、洗浄溶液を使用して行われ得る。

【0066】

いくつかの態様において、抗原結合性複合体の様々な構成要素が、ビオチン化され得る。生化学において、ビオチン化は、タンパク質、核酸、または他の分子へビオチンを共有結合するプロセスである。ビオチン化は、迅速であり、特異的であり、ビオチンの小さなサイズ(MW = 244.31 g/mol)に起因して分子の天然機能を乱す可能性が低い。例えばタンパク質および核酸のような、生体高分子をビオチン化するための様々な方法が当技術分野

10

20

30

40

50

において公知である。例えば、Moritz and Wahle (2014); Hermanson (2013)を参照のこと。さらに、複数のビオチン分子を関心対象の分子へコンジュゲートすることができる。タンパク質は、化学的にまたは酵素的にビオチン化することができる。化学的ビオチン化は、様々なコンジュゲーション化学を利用し、アミン、カルボキシレート、スルフヒドリルおよび糖質の非特異的ビオチン化をもたらす(例えば、NHSカップリングはタンパク質中の任意の第1級アミンのビオチン化を与える)。酵素的ビオチン化は、細菌ビオチンリガーゼによってある配列内の特定のリジンのビオチン化を生じさせる。大抵の化学的ビオチン化試薬は、ビオチンの吉草酸側鎖ヘリンカーを介して結合された反応基からなる。アビジン/ストレプトアビジン10中のビオチン結合ポケットはタンパク質表面下に埋もれているため、より長いリンカーを有するビオチン化試薬が望ましく、何故ならば、それらは、ビオチン分子が、アビジン/ストレプトアビジン/ニュートラアビジンタンパク質への結合により利用されやすくするためである。このリンカーはまた、ビオチン化試薬の可溶性を媒介することができ；ポリ(エチレン)グリコール(PEG)を組み込むリンカーは、不水溶性試薬を可溶性にするか、またはある程度既に可溶性であるビオチン化試薬の可溶性を増加させることができる。オリゴヌクレオチドは、市販のビオチンホスホルアミダイトを使用するホスホルアミダイト法によってオリゴヌクレオチド合成の過程において容易にビオチン化される。標準脱保護後に、得られたコンジュゲートを、逆相または陰イオン交換HPLCを使用して精製することができる。

【0067】

いくつかの態様において、光開裂可能標識からのシグナルを検出することは、サンプル中に存在する抗原結合された抗原結合性複合体から発生されるシグナルを測定することを含む。検出は、例えば、蛍光顕微鏡を使用して、抗原結合された抗原結合性複合体の蛍光色素によって発生されるシグナルを測定することを含み得る。例えば蛍光色素によって発生されるシグナルの存在は、抗原がサンプル中に存在することを示し得る。従って、検出は、サンプル中の抗原の存在を決定することを含み得る。いくつかのバリエーションにおいて、シグナルを検出することは、光開裂可能標識からのシグナルを測定することと定義され得、該測定は、サンプル中に存在する抗原の量の相対的定量的測定、絶対的定量的測定、または定性的測定のいずれかを提供する。

【0068】

本明細書に記載されるいくつかの態様において、光開裂可能標識は、2-ニトロベンジルまたは置換2-ニトロベンジル基を含み、これは、例えば365 nm UV光で、効率的に光化学的に開裂され得る。参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2010/0041041号を参照のこと。>300 nmの波長は、DNAおよびタンパク質に対する損傷を最小限にするために使用されることが、一般に理解され(Corrie, 2005)、365 nm以外のいくつかの特定の例示的な波長は340 nmおよび355 nmである(Seo, 2005)。従って、用語「光開裂」または「光開裂する」は、本明細書において使用される場合、一般に、>300 nmの光の波長へサンプルを曝露して光開裂可能結合の開裂をもたらす行為を指すように意図される。

【0069】

いくつかの態様において、光開裂段階後、方法は、サンプル上または中において抗原結合性複合体を構築するためにインキュベーティング段階を繰り返すこと、および抗原結合された抗原結合性複合体へコンジュゲートされた光開裂可能標識からのシグナルを検出し、サンプル中の第2抗原の存在を検出することをさらに含み得る。抗原結合性複合体を構築する任意の所定の方法について、前回構築された抗原結合性複合体からの標識の光開裂後、新しい抗原結合性複合体を構築するためのインキュベーション段階、および光開裂可能標識からのシグナルを検出する段階は、少なくとも1回、連続的に繰り返され得る。いくつかのバリエーションにおいて、段階は、少なくとも2回、3回、4回、5回、10回、20回、30回、40回、50回、60回、70回、80回、90回、または100回、連続的に繰り返され得る。いくつかのバリエーションにおいて、光開裂可能標識は、段階の各繰り返しの間に、光開裂をもたらす条件へ供され得る。いくつかのバリエーションにおいて、段階は、光開裂段階が行われる前に、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、連40

続して繰り返され得る。いくつかのバリエーションにおいて、任意の所定の繰り返しにおける抗原結合性複合体へコンジュゲートされた光開裂可能標識は、任意の前回の繰り返しにおいて使用された標識と同じであっても異なっていてもよい。

【 0 0 7 0 】

いくつかのバリエーションにおいて、抗原結合性複合体を構築するためのインキュベーティング段階は、検出段階が行われる前に、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、連続して繰り返され得る。これらのバリエーションにおいて、各抗原結合性複合体へコンジュゲートされた光開裂可能標識は、1つの検出段階中に識別され得るように、異なるものであり、即ち、標識は、様々な標識の発光スペクトルの重複が最小化されるように選択される。

10

【 0 0 7 1 】

いくつかのバリエーションにおいて、各繰り返しにおいて使用される抗原結合性複合体の構成要素は、前回のサイクルからの抗原結合性複合体中において使用された構成要素と同じであっても異なっていてもよい。いくつかのバリエーションにおいて、抗原へ直接結合する構成要素のみが異なり、一方、他の構成要素は同じである。

【 0 0 7 2 】

II . 光開裂可能標識

本発明のいくつかの局面は、連続的にかつ／または同時に単一のサンプル中における複数のタンパク質を検出することに使用するための、改善されたUV開裂速度を有する光開裂可能標識を提供することへ向けられる。例えば365 nm UV光での、2-ニトロベンジルまたは置換2-ニトロベンジル基の開裂は、前回のサイクルにおいて使用された標識からの干渉なしに、抗原検出の次のサイクルが行われることを可能にする。理論によって拘束されないが、少なくとも2つの因子が、置換2-ニトロベンジル基のUV開裂速度に影響を与えることがわかった：(a)2-ニトロベンジル基の 炭素置換の立体化学、および(b)ベンジル環上の置換。

20

【 0 0 7 3 】

光開裂可能標識は、任意で、リボヌクレオシド三リン酸(NTP)およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)へコンジュゲートされる。例えば、ヌクレオチドまたはヌクレオシド化合物は、蛍光色素のような、レポーター基で標識された化学的にまたは酵素的に開裂可能な基を含み得る。ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物は、DNA合成を終結するように設計されている化学的にまたは酵素的に除去可能な保護基を含み得る。ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物上の蛍光色素で標識されたそのような開裂可能基の存在は、単一のサンプル中の複数のタンパク質の間接的検出の速度および正確度を高めることができる。そのようなヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物の例としては、PCT公開公報第W0 2003/006625号、第WO 2005/084367号、第WO 2008/070749号、第WO 2009/152353号、第WO 2013/040257号に開示されるものが挙げられ、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に各々組み入れられる。いくつかの場合において、市販されているもののような、光開裂可能リンカー(Gene Link Cat. No. 26-6888)または光開裂可能スペーサー(Gene Link Cat. No. 26-6889)を含む、オリゴヌクレオチドが生成され得る。加えて、光開裂可能ヌクレオチド-フルオロフォアコンジュゲートは、Ambergen Technologyから入手可能である。さらに、光開裂可能蛍光基がヌクレオシド塩基へ結合されているオリゴヌクレオチドを作製するために、アミノ修飾剤C6-dT(Integrated DNA Technologies)を使用することができる。

30

【 0 0 7 4 】

本明細書において使用される場合、用語「レポーター」または「標識」は、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生成することができる化学部分を指す。レポーターの例としては、蛍光色素基、比色色素基、放射性標識、または化学発光手段もしくは生物発光手段を通じてシグナルを産出する基が挙げられる。蛍光色素基の例としては、キサンテン誘導体色素(例えば、フルオレセインおよびその誘導体、フルオレセインイソチオシアネート[FITC]、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル[CFSE]、カルボキシ

40

50

フルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル[CFDA-SE]、エオシンY、エオシンB、ローダミンB、ローダミン6G、ローダミン123、ローダミンレッド-X[RRX]、カルボキシテトラメチルローダミン[TAMRA]、テトラメチルローダミン[TMR]、ローダミンのイソチオシアネート誘導体[TRITC]、スルホローダミン101、スルホローダミン101の塩化スルホニル誘導体[Texas Red]、Oregon Green)、BODIPY誘導体色素(例えば、BODIPY FL、BODIPY R 6G、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665)、クマリン誘導体色素(例えば、アミノメチルクマリン[AMCA])、アロフィコシアニン[APC]、ピレン誘導体色素(例えば、Cascade Blue)、4',6-ジアミニジノ-2-フェニルインドール[DAPI]、DyLight色素(例えば、DyLight (商標) 350、DyLight (商標) 405、DyLight (商標) 488、DyLight (商標) 550、DyLight (商標) 594、DyLight (商標) 633、DyLight (商標) 650、DyLight (商標) 680、DyLight (商標) 755、DyLight (商標) 800)、フィコエリトリン[PE]、PI、ペリジニン-クロロフィル-タンパク質[PerCP]、シアニン誘導体色素(例えば、Cy (登録商標) 5.5、インドカルボシアニン(Cy (登録商標) 5)、シアニン(Cy (登録商標) 2)、インドカルボシアニン(Cy (登録商標) 3)、Cy (登録商標) 3B、Cy (登録商標) 3.5、Cy (登録商標) 7、Cy (登録商標) 7Q、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニン、フタロシアニン)、アントラセン誘導体色素(例えば、Draq-5、Draq-7、CyTRAK Orange、IRIS 2、IRIS 3、IRIS 3.5、IRIS 5、IRIS 5.5、IRIS 7G)、eFluor色素(例えば、eFluor (登録商標) 450、PE-eFluor (登録商標) 615、eFluor (登録商標) 660、eFluor (登録商標) 710、PE-eFluor (登録商標) 610、PerCP-eFluor (登録商標) 710、APC-eFluor (登録商標) 780)、FluoProbes色素(FluoProbes 390、FluoProbes 488、FluoProbes 532、FluoProbes 547H、FluoProbes 594、FluoProbes 647H、FluoProbes 682、FluoProbes 752、FluoProbes 782)、GFP、IRDye 800、Pacific Blue、Pacific Green、Pacific Orange、ピレン、フィコビリタンパク質、Quasar (登録商標) 色素(例えば、Quasar (登録商標) 570、Quasar (登録商標) 670、Quasar (登録商標) 705)、SNAFL、スルホシアニン誘導体色素(例えば、スルホ-Cy3、スルホ-Cy5、スルホ-Cy7)、Tokyo Green、Alexa fluor (登録商標) 色素(例えば、ALEXA FLUOR (登録商標) 350、ALEXA FLUOR (登録商標) 405、ALEXA FLUOR (登録商標) 430、ALEXA FLUOR (登録商標) 488、ALEXA FLUOR (登録商標) 500、ALEXA FLUOR (登録商標) 514、ALEXA FLUOR (登録商標) 532、ALEXA FLUOR (登録商標) 546、ALEXA FLUOR (登録商標) 555、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 568、ALEXA FLUOR (登録商標) 594、ALEXA FLUOR (登録商標) 610、ALEXA FLUOR (登録商標) 633、ALEXA FLUOR (登録商標) 635、ALEXA FLUOR (登録商標) 647、ALEXA FLUOR (登録商標) 660、ALEXA FLUOR (登録商標) 680、ALEXA FLUOR (登録商標) 700、ALEXA FLUOR (登録商標) 750、ALEXA FLUOR (登録商標) 790)、スクアライン色素(例えば、Seta (商標) 色素、SeTau色素、Square色素)、またはそれらの組み合わせが挙げられる。本発明のいくつかの態様において使用され得る蛍光色素基の追加の例は、本明細書の全体にわたって、ならびにHaugland, 2005ならびに米国特許第4,439,356号および第5,188,934号に開示されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。蛍光色素は、特定の官能基、例えば、アミノ基(例えば、スクシンイミド、イソチオシアネートもしくはヒドラジンを介して)、カルボキシル基(例えば、カルボジイミドを介して)、チオール(例えば、マレイミドもしくは臭化アセチルを介して)、アジド(例えば、クリック化学を介して)を介して、または非特異的に(グルタルアルデヒド)もしくは非共有結合的に(例えば、疎水性を介してなど)、生体高分子(即ち、タンパク質、核酸、および脂肪酸鎖)へ結合することができる。例えば、Proudnikov and Mirzabekov, 1996; Riedel et al., 2012を参照のこと。当技術分野において周知である、本発明のいくつかの態様においてレポーターとして使用され得る放射性標識の例としては、³⁵S、³H、³²P、または³³Pが挙げられる。化学発光手段または生物発光手段によって機能し、本発明のいくつかの態様においてレポーターとして使用され得るレポーターの例は、Nieman, 1989; Givens & Schowen, 1989; Orosz et al., 1996; およびHastings, 1983に記載されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。

本明細書に開示される方法の各連続繰り返しにおいて使用される抗原結合性複合体の光開裂可能標識は、同じサンプルにおける前回の繰り返しについての抗原結合性複合体中において使用された任意の光開裂可能標識と同じであっても異なっていてもよい。いくつかの場合において、光開裂可能標識は、単独で使用されるレポーターのいずれかのシグナルとは異なるユニークなシグナルを組み合わせて提供する、複数のレポーターから構成され得る。

【 0 0 7 6 】

本明細書に開示される方法の多重繰り返しにおいて同時に使用される抗原結合性複合体の各々の光開裂可能標識は、各レポーターを他のものから識別可能にするために、好ましくは異なるものである。換言すれば、蛍光レポーターの場合、複数の抗原結合性複合体の各蛍光レポーターは、各蛍光レポーターの発光スペクトル間の重複が最小化されるように選択され得る。いくつかの場合において、2つの異なる色素が、同時に使用され、しかし独立して画像化され位置を提供し得る。本明細書に開示される方法の多重繰り返しにおいて同時に使用され得る異なる光開裂可能標識の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である。10

【 0 0 7 7 】

III . 装置

前述したように、本明細書に開示される例示的な方法は、自動次世代組織学(NGH)装置によって行ってもよい。最初に図13を参照して、そのような装置100の一つの例示的な態様の図が提供される。装置100は、抗原検出抗体を除去する必要なく、サンプルの同じ組織切片における複数の迅速な染色サイクルを可能にすることができます。さらに下記において考察されるように、装置100はまた、手動時間の短縮のための自動流体工学、および多重PCL検出のための顕微鏡イメージングシステムを含む。示される態様において、装置100は、イメージングシステム110、サンプルチャンバ120、および流体制御システム130を含む。20

【 0 0 7 8 】

示される態様において、流体制御システム130は、サンプルチャンバ120とおよび複数のリザーバー132～137と流体連結されているバルブ131を含む。リザーバー132～137は、分析下のサンプルについての自動染色プロセスにおいて使用される様々な流体を含有することができる。特定の態様において、リザーバー132はタンパク質ブロッキングバッファーを含み得、リザーバー133は洗浄溶液を含み得、リザーバー134はイメージング溶液を含み得、リザーバー135は開裂溶液を含み得、リザーバー136はビオチンを含み得、リザーバー137はアビジンブロッキングバッファーを含み得る。30

【 0 0 7 9 】

イメージングシステム110は、顕微鏡101、ならびにサンプルチャンバ120中のサンプルを画像化するように構成されたイメージング光源140を含む。示される態様において、光源140は、ライトガイドアダプター148、リキッドライトガイド147、およびTTLシャッターコントロール105へ接続されている。特定の態様において、イメージング光源140は、ソリッドステートライトエンジンである。図示される態様において、顕微鏡101は、ベース115、電動ステージ111、ステージコントローラー112、カメラ113、対物レンズ107、電動ノーズピース109を含む。特定の態様において、イメージングシステム110はまた、電動フィルターレット、フィルターブロックおよびフィルターキューブを含み得る(明瞭さの目的のために図に表示されていない)。40

【 0 0 8 0 】

示される態様において、装置100は、遠隔制御ユニット114を介して制御することができる。装置100は、この態様において、多機能データ収集(DAQ)デバイス116、フレームグラバー118、コンピューター117およびシリアルUSBハブ119をさらに含む。示される態様において、装置100はまた、サンプルチャンバ120についての冷却エレメント145を含む。特定の態様において、冷却エレメント145は、温度制御ブロック(例えば、ペルチェユニット)および液体冷却器を含み得る。50

【 0 0 8 1 】

今度は図14および15をそれぞれ参照して、サンプルチャンバ120の一態様の分解図および組立図が提供される。この態様において、サンプルチャンバは、顕微鏡用スライド121、カバーガラス122、および顕微鏡用スライド121とカバーガラス122との間に配置されたガスケット123を含む。示される態様はまた、カバーガラス122へ接続された流体入口124および流体出口126を含む。ガスケット123は、ガスケット123が開口部分125を囲むように、ガスケット123の内部に配置された開口部分125を含む。この態様において、開口部分125は、流体入口124および流体出口126と流体連結されている中央体積および拡張部分を含む。図15の組立図において、サンプル127は、開口部分125中かつ顕微鏡用スライド121とカバーガラス122との間に置かれている。従って、サンプル127は、サンプルチャンバ120内に含有され、流体入口124および流体出口126は、サンプルチャンバ120中へ流体フローを提供することができる。10

【 0 0 8 2 】

今度は再び図13を参照して、流体入口124および流体出口126は、それぞれ、光学バブルセンサー142および146へ各々接続されている。流体入口124はまた、バルブ141および143ならびにリザーバー138および139(これらは、それぞれ、抗体溶液およびPCL溶液を含有し得る)へ接続および流体連結されている。ある態様において、バルブ141および142は、ソレノイドバルブとして構成されている場合がある。流体出口126はまた、バルブ151および流体輸送デバイス150へ接続されており、これは、ある態様において、シリンジポンプとして構成されている場合がある。バルブ151はまた廃棄物リザーバー152へ接続されている。作動中、リザーバー132～137からの流体のフローは、流体入口124へ(例えば、バルブ131、141および143の作動によって)制御され、本明細書に開示される方法に従うサンプル127の自動標識および染色を提供することができる。20

【 0 0 8 3 】

図16は、流体制御システム130およびサンプルチャンバ120の部分図を提供する。この態様において示されるように、ガスケット123は、顕微鏡用スライド121とカバーガラス122との間に置かれている。流体入口124および流体出口126は、サンプル127の自動連続染色を可能にする流体制御システム130の構成要素と流体連結されている。例えば、流体制御システム130は、本明細書に記載される方法において開示される段階を行うために、リザーバー132～139からサンプルチャンバ120への流体の移送を提供することができる。30

【 0 0 8 4 】

図17は、サンプルチャンバ120中のサンプル上または中の抗原から抗原結合性複合体を光開裂するように構成された光源106についての電力および制御システム160の一つの例示的な態様の図を提供する。特定の態様において、光源106は、LEDヘッドユニットとして構成され得る。図16に示される構成要素モデル番号は、単に一態様の例示であり、例示的なシステムの他の態様は異なる構成要素およびモデル番号を含み得ることが理解される。

【 0 0 8 5 】

図17に示される態様において、システム160は、紫外線(UV)リバースターミネーションサブシステムであり、LEDヘッドユニット106は、PCLの開裂のために365 nmでの励起を提供するように構成されたHamamatsu LC-L5 UV LEDアレイである。この態様において、システム160は、多機能データ収集(DAQ)デバイス116を通してLabViewソフトウェアによりコンピューター117によって制御され、LEDヘッドユニット106をオンおよびオフするためのデジタル出力ライン、ならびに0～10 VシグナルによってUV強度を設定するためのアナログ出力ラインを提供する。エレクトロメカニカルリレー162と接続されたソリッドステートリレー164は、120VAC-12VDC変圧器163からの12VDCシグナルをスイッチングし、LEDヘッドユニット106中のUV LEDアレイをオンおよびオフする。5VDCスイッチングモード電源165は、ソリッドステートリレー164へ電力を供給する。LEDヘッドユニット106は、それ自体の36VDC電源161から電力を得る。40

【 0 0 8 6 】

用語「抗原」は、本明細書において使用される場合、サンプル上または中に存在する任意の標的物質を指す。例えば、抗原は、タンパク質、糖類、脂質、核酸、リガンド、糖質、薬物標的、またはそれらの組み合わせであり得る。抗原は、細胞中または上に存在し得る。抗原は、正常細胞ではなく癌細胞中または上にのみ存在し得る。抗原は、細胞フリーサンプル、例えば、血清または細胞溶解物中に存在し得る。

【0087】

用語「サンプル」は、本明細書において使用される場合、抗原が存在し得る任意の生物学的サンプルを指す。例えば、サンプルは、生検サンプル、組織サンプル、細胞浮遊液、細胞培養物、またはそれらの組み合わせであり得る。さらに、サンプルは、動物、例えば、靈長動物(例えば、ヒト)、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、またはウマより単離され得る。いくつかの場合において、サンプルは、植物サンプル、細菌サンプル、または真菌サンプルであり得る。サンプルは、動物の体液、例えば、血液、骨髓液、リンパ液、唾液、涙液、尿、粘液、羊水、またはそれらの組み合わせであり得る。サンプルは、その中に混合された異なるタイプの細胞を含む細胞混合物であり得る。混合物は、抗原を有する細胞、および抗原を有さない細胞を含み得る。サンプルは、循環腫瘍細胞(CTC)、癌幹細胞、免疫細胞、胎児幹細胞、胎児細胞、癌細胞、腫瘍細胞、および/または正常細胞を含み得る。

10

【0088】

用語「抗原結合性複合体」は、本明細書において使用される場合、抗原へ選択的にまたは特異的に結合することができる構成要素を含む任意の複合体を指す。抗原結合性複合体はまた、光開裂可能標識が共有結合される構成要素を含み、この構成要素は、抗原へ結合する構成要素と同じであっても異なっていてもよい。抗原へ選択的にまたは特異的に結合することができる構成要素は、非限定的に、一次抗体；アプタマー；受容体に対するリガンドであって、受容体が抗原である、リガンド；リガンドに対する受容体であって、リガンドが抗原である、受容体；酵素に対する基質、阻害剤、または補因子であって、酵素が抗原である、基質、阻害剤、または補因子；薬物分子であって、薬物標的が抗原である、薬物分子；レクチンであって、糖質が抗原である、レクチン；RNA分子であって、少なくとも部分的に相補的な核酸(例えば、DNAまたはRNA)が抗原である、RNA分子；DNA分子であって、少なくとも部分的に相補的な核酸(例えば、DNAまたはRNA)が抗原である、DNA分子；などであり得る。追加の例としては、細胞表面上のホスファチジルセリンへ特異的に結合するためのアネキシンA5の使用、糖質部分へ特異的に結合するためのレクチンの使用、ホルモンリガンドへ特異的に結合するための核受容体の使用が挙げられ、抗原は、ホルモンリガンド、またはホルモンリガンドの存在において核受容体によって結合されるDNA調節エレメントのいずれかである。

20

【0089】

用語「一次抗体」は、本明細書において使用される場合、抗原へ選択的にまたは特異的に結合する抗原結合性複合体中の構成要素を一般に指す。一次抗体は、例えば、抗体、抗体模倣物、アプタマー、受容体、リガンド、酵素基質、酵素阻害剤、酵素補因子、または酵素であり得る。

30

【0090】

用語「抗体模倣物」は、本明細書において使用される場合、抗体と同様に、抗原に特異的に結合することができるが、抗体と構造的に関係がない有機化合物(約3~20 kDaのモル質量を有する人工ペプチドまたはタンパク質、核酸、および小分子を含む)を指す。抗体模倣物の例としては、非限定的に、アフィボディ(affibody)分子、アフィリン(affillin)、アフィマー(affimer)、アフィチン(affitin)、アルファボディ(alphabody)、アンチカリン(anticalin)、アビマー(avimer)、DARPin、フィノマー(fynomeric)、Kunitzドメインペプチド、およびモノボディ(monobody)が挙げられる。

40

【0091】

用語「アプタマー」は、本明細書において使用される場合、特定の標的分子、例えば抗原へ結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子を指す。いくつかのアプタマーは、

50

十分に定義された三次元構造へ折り畳まれる一本鎖核酸である。アプタマーは、それらの標的分子について高い親和性および特異性を示し、いくつかの場合において、それらの生物学的機能を阻害する。アプタマーは、大きなランダム配列プールからそれらを選択することによって作られ得る。天然のアプタマーはまたリボスイッチの形態で存在し、これらは、リガンド抗原を選択的にまたは特異的に検出するために使用され得る。オリゴヌクレオチドベースのアプタマーの場合、光開裂可能標識は、アプタマー自体へ直接共有結合され得、従って、単一構成要素抗原結合性複合体が生成され得る。

【 0 0 9 2 】

用語「二次抗体」は、本明細書において使用される場合、一次抗体のFc部分へ特異的に結合する任意の免疫グロブリンクラスの抗体を指す。免疫グロブリン(Ig)単量体のFc部分は、Y型Ig分子の幹に対応し、1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結された2つの重鎖のC末端部分からなる。10

【 0 0 9 3 】

用語「第1リガンド」は、本明細書において使用される場合、抗原結合性複合体の構成要素(例えば、一次抗体、二次抗体など)へ共有結合され得る任意の分子を指す。第1リガンドの一例はビオチンである。ビオチンは、アビジンまたはストレプトアビジンへ高親和性で結合する、全ての生細胞中に存在するビタミンである。ビオチンとアビジン/ストレプトアビジンとの結合は、タンパク質とリガンドとの最も強い($K_a = 10^{15} M^{-1}$)公知の非共有結合相互作用である。ビオチンは比較的小分子であるため、それは、タンパク質(例えば、抗体)へ、それらの生物活性を変更させることなく、コンジュゲートされ得る。さらに、単一のタンパク質(例えば、抗体)が、ビオチンのいくつかの事象へコンジュゲートされ得、これらは、各々、次いで、アビジンの分子に結合することができる。ビオチンは天然に生じ；従って、ビオチン-アビジン/ストレプトアビジンシステムを使用する場合、ビオチンまたはアビジン/ストレプトアビジンの非特異的結合の表面ブロッキングが必要とされる。一般的に使用される二段階ブロッキング戦略は以下を含む：内因性ビオチンリッチ酵素をブロックするための過剰のアビジン/ストレプトアビジンと共にインキュベーション、次いで、導入されたアビジン/ストレプトアビジンをブロックするための過剰のビオチンと共にインキュベーション。第1リガンドの別の例はオリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドは、抗原結合性複合体の構成要素(例えば、一次抗体、二次抗体など)へ共有結合され得る。そのようなオリゴヌクレオチドは一本鎖であり得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはそれらの誘導体から構成され得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100ヌクレオチド長であり得る。2030

【 0 0 9 4 】

用語「第1抗-リガンド」は、本明細書において使用される場合、第1リガンドへ特異的におよび/または選択的に結合することができる任意の分子を指す。例えば、第1リガンドがビオチンである場合、第1抗-リガンドはアビジンであり得る。用語「アビジン」は、本明細書において使用される場合、天然のタンパク質ならびに組換えおよび遺伝子操作タンパク質の両方を含む、任意のビオチン結合性タンパク質を総称的に指す。この用語は、「卵白またはトリアビジン」とおよび「ストレプトアビジン」として公知の2つの一般的なビオチン結合性タンパク質を含む。一般的に単にアビジンと呼ばれる、卵白またはトリアビジンは、卵白の構成成分であり、ビオチンと非共有結合複合体を形成するタンパク質である。ストレプトアビジンは、放線菌門ストレプトミセス・アビジニイ (*Streptomyces avidinii*) から単離されたタンパク質であり、同様にビオチンと非共有結合複合体を形成する。ビオチン結合性タンパク質の他の細菌供給源も公知である。卵白アビジンおよびストレプトアビジンは両方とも、ビオチン結合性部位がアビジン分子の反対面に對で配置されている四量体タンパク質である。従って、上記アビジンの両方は、遊離型または誘導体型いずれかの4分子までのビオチンへ結合する能力を有し、それによって「複合体」を形成する。ビオチンの誘導体型は別の分子へのビオチンのコンジュゲーションにより生じる4050

。別の例として、第1リガンドがオリゴヌクレオチドである場合、第1抗-リガンドは、第1リガンドに対して少なくとも部分的に相補的である第2オリゴヌクレオチドであり得る。

【0095】

用語「第2リガンド」は、本明細書において使用される場合、第1抗-リガンドへ特異的におよび／または選択的に結合することができる任意の分子を指す。例えば、第1リガンドがビオチンでありかつ第1抗-リガンドがアビジンである場合、第2リガンドはビオチンであり得る。

【0096】

用語「官能性リンカー」は、本明細書において使用される場合、光開裂可能標識および抗原結合性複合体の構成要素(例えば、第1リガンド、第1抗-リガンド、第2リガンド、一次抗体、二次抗体、またはアプタマー)によって共有結合され得る任意の分子を指す。官能性リンカーは核酸であり得る。そのような核酸は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100ヌクレオチド長であり得る。そのような核酸は、一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖であり得る。官能性リンカーはペプチドであり得る。官能性リンカーは脂肪酸鎖であり得る。官能性リンカーは光安定性であり得る。

10

【0097】

本明細書において使用される場合、「本質的に含まない」は、指定の構成要素の文脈において、指定の構成要素が、意図的に組成物中へ製剤化されていないこと、および／または混入物としてもしくは微量にのみ存在することを意味する。組成物の意図しない汚染から生じる指定の構成要素の総量は、従って、0.05%を大きく下回り、好ましくは0.01%を下回る。最も好ましいのは、指定の構成要素の量が標準分析方法で検出することができない組成物である。

20

【0098】

特許請求の範囲および／または明細書において「含む」という用語との組み合わせで使用される場合の「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは複数」の意味とも一致している。

【0099】

本開示は選択肢のみおよび「および／または」を指す定義を支持するが、特許請求の範囲における用語「または」の使用は、選択肢のみを指すように明確に示されない限り、または選択肢が互いに排他的でない限り、「および／または」を意味するよう用いられる。本明細書において使用される場合、「別の」は、少なくとも第2のまたはそれ以上を意味し得る。

30

【0100】

本明細書の全体にわたって、用語「約」は、ある値が、その値を決定するために使用される装置や方法に固有の誤差の変動、または試験対象の間で存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0101】

用語「含む(comprise)」、「有する(have)」および「包含する(include)」は、非限定的な連結動詞である。「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「有する(has)」、「有する(having)」、「包含する.includes)」および「包含する(including)」などの1つまたは複数のこれらの動詞の任意の形態または時制も非限定的である。例えば、1つまたは複数の段階を「含む」、「有する」または「包含する」任意の方法は、それらの1つまたは複数の段階のみを有することに限定されず、他の列挙されていない段階も網羅する。

40

【0102】

上記定義は、参照により本明細書に組み入れられる任意の参考文献における任意の矛盾する定義に取って代わる。しかし、特定の用語が定義されているという事実を、未定義の任意の用語が不確定であることを示すと考えるべきではない。むしろ、使用される全ての用語は、当業者が範囲を認識しあつ本発明を実施することができる用語で本発明を説明す

50

ると考えられる。

【実施例】

【0103】

V. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を示すために含まれる。当業者は、以下の実施例で開示される技術が、本発明の実施において十分に機能すると本発明者によって発見された技術を代表するものであり、従って、その実施の好ましい様式を構成すると考えられ得ることを認識すべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、開示されている具体的な態様に多くの変更を行い、なお類似または同様の結果を得ることができることを認識すべきである。

10

【0104】

実施例1 - 一本鎖のビオチン-ヌクレオチド-フルオロフォアタグを使用しての組織切片中の抗原の検出

この実施例は、式(IX)の抗原結合された抗原結合性複合体を説明する。先ず、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)前立腺癌組織切片を調製し、PBS中のBSAでブロッキングした。次いで、切片をマウス抗-サイトケラチン抗体と共にインキュベートし、続いて洗浄した。次に、切片をビオチン化ヤギ抗-マウスIgG二次抗体と共にインキュベートし、続いて洗浄した。次いで、切片をアビジンもしくはストレプトアビジンまたはバッファー単独のいずれかと共にインキュベートし、続いて洗浄した。次いで、切片をビオチン-コンジュゲート化光開裂可能Cy5またはアビジン-フルオレセインのいずれかと共にインキュベートし、続いて洗浄した。ビオチン-コンジュゲート化光開裂可能Cy5は、その5'末端でビオチン修飾およびその3'末端でdC-Cy5(図8)を有した。最後に、20×水浸レンズを使用して、切片を画像化した。図1は、ビオチン-コンジュゲート化光開裂可能Cy5が、二次抗体のビオチン化に依存する様式でシグナルを生じさせたことを示している。

20

【0105】

別の実験において、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト前立腺の切片を、ビオチン化抗-平滑筋アクチンと共にインキュベートした。次いで、切片を、アビジンまたはストレプトアビジン、および光開裂可能Cy5を含有するビオチン-コンジュゲート化プローブと共に連続的にインキュベートした。この場合において、自動流体交換プログラムを、プローブと連携して使用し、このプローブは、2つの対向するビオチンを連結する二本鎖ヌクレオチドからなった。Cy5は、ヌクレオチド骨格中へ組み込まれた。未結合プローブを洗浄し、組織を光開裂前および後で画像化した。スライドをCy5で蛍光顕微鏡によって画像化した後、組織中の単一の位置を、2分間のUV曝露を使用して光開裂し、プレプログラム様式で再画像化した。図9Aは、開裂前の染色切片の画像を示し、一方、図9Bは、光開裂後の同じ領域を示す。バッファー洗浄後に切片を再び画像化した(図9C)。図9Eは、開裂および洗浄後の画像輝度変化を示す、図9A～C中の線に沿った画像ピクセル強度プロフィールを示す。図9Dは、開裂後の異なる視野を示し、開裂境界を示す(左上隅をUV光に曝露した)。

30

【0106】

実施例2 - 異なる色の2つの光開裂可能標識を用いての2つの標的タンパク質の自動連続FFPE組織染色

40

この実施例は、式(VII)の抗原結合された抗原結合性複合体を説明する。連続FFPEについて、組織を、先ず、ビオチン化抗-平滑筋アクチンと共に2時間、アビジンと共に30分間、光開裂可能AF532を含有するビオチン-コンジュゲート化プローブと共に20分間インキュベートし、その後、緑色チャネルを画像化した。150 mW/cm²での2分間のUV曝露後、組織に対して、ヒストンH3抗体および赤色光開裂可能Cy5を用いて同じ染色手順を行った。同じ視野を、赤色チャネルにおいて画像化し、ImageJソフトウェアを使用して前回の緑色チャネル上に重ね合わせた(図11)。

【0107】

Cy色素の化学的不活性化および光退色とPCLとの直接比較は、PCLからの色素の放出が10～100倍より迅速であることを実証している。他の光開裂可能結合との同様の比較が、PCL

50

は、他の光開裂可能反応と比べてより速くかつより完全な色素放出をもたらすことを実証した。

【0108】

UV照射を使用して数秒内に放出される光開裂可能フルオロフォアを使用するように、FFPE組織切片についての自動NGHプラットフォームを開発および設計した。このユニークな光開裂可能標識は、抗原検出抗体を除去する必要なく、同じ組織切片における繰り返し染色の迅速なサイクルを可能にする。NGHプラットフォームはまた、手動時間の短縮のための自動流体工学、および多重レポーター検出のための四色落射蛍光顕微鏡イメージングシステムを含む。

【0109】

FFPE組織切片を、標準スライドガラス上に載せ、熱固定し、脱ろうし、水和させ、そして特殊なフローセル中に置いた。自動流体工学を使用して、標準試薬を使用して、組織をプロッキングし、洗浄し、そしてビオチン化一次抗体に曝露した。抗体結合を、アビジンまたはストレプトアビジン-光開裂可能標識複合体を使用して検出し、これらを画像化し、その後、次の染色サイクルに備えて標識を光開裂した。

【0110】

NGHアプローチは前立腺組織切片の連続染色を可能にした。この染色戦略は抗原の迅速な画像化を可能にした。

【0111】

実施例3 - 2色の光開裂可能標識を用いての単一のFFPE組織切片上の8つの標的領域の多重染色

別の実験において、ヒト前立腺(正常)の $6\text{ }\mu\text{m}$ 切片を調製し、3つの連続するサイクルにおいて染色した。各サイクルにおいて組織切片を複数の標的タンパク質についてプロープし、各サイクルでの様々な波長での単一のイメージング事象は、様々な標的タンパク質からのシグナルをキャプチャーした。UV曝露による開裂事象に続いて、組織を、標的タンパク質の次のセットについて再びプロープした。3つのそのような多重サイクルは、単一の組織切片中において以下の8つの標的をキャプチャーした：サイクルI：コラーゲン(CNA35)、Hoechst(核DNA)、抗-ALCAMおよび抗-CD44；サイクルII：抗-サイトケラチンおよび抗-SMA；サイクルIII：抗-フィブロネクチンおよび抗-ヒストンH3。各サイクルは4つのチャネルからの画像をキャプチャーした：Cy7(750nm)、Cy5(650nm)、Cy2(488 nm)およびHoechst(365 nm)。実験の完了時に、Cy2チャネルを使用して、3つの画像データセットを共表示した。単一の12-チャネル画像への画像統合を、ImageJソフトウェアを使用して行った。図19は、循環的な多重染色および画像化を示す。

【0112】

循環的な多重染色は、染色の3サイクルにわたって、2つの非抗体ステイン(コラーゲンおよび核ステイン)に加えて、6つの別個の抗体を用いての免疫蛍光検出を首尾よく達成した。この手順中に組織の目に見える劣化または変形はなく、ベースライン画像(サイクルI前のキャプチャー)と光開裂後の画像(サイクルI、II、およびIII後にキャプチャーした)とを比較した場合に、サイクルにわたる非特異的シグナルの有意な蓄積はなかった。

【0113】

実施例4 - 3色の光開裂可能標識でのFFPE組織切片の多重染色

実施例2に記載される手順を使用して、FFPE組織切片を調製した。各々がユニークな蛍光色素を有する、3つのユニークなビオチン-光開裂可能標識を有する3つの抗体を使用して、同じ組織切片上の3つの組織領域において、多重染色を達成した。組織切片をプロッキングし、ビオチン標識化一次抗体、ストレプトアビジン、ビオチン標識化光開裂可能標識と共に連続的にインキュベートし、そしてこのサイクルをその後の2つの抗体および光開裂可能標識について繰り返した。抗-CD44は光開裂可能Cy3によって、抗-29-7は光開裂可能Cy5によって、そして抗-ヒストンH3は光開裂可能Cy7によって検出された。単一の画像が、3つの適切な波長でシグナルをキャプチャーし、ImageJソフトウェアを使用して画像合成を行い、3つの別個の色で3つの別個の領域を共視覚化した(図20)。単一の光開裂事

10

20

30

40

50

象が、画像化後、全ての光開裂可能標識からシグナルを放出させた(図21)。

【0114】

実施例5 - 部分的に二本鎖のビオチン-スクレオチド-フルオロフォアタグを使用しての組織切片中の抗原の検出

部分的に二本鎖のビオチン-オリゴスクレオチド-光開裂可能Cy5蛍光色素を調製するために、dC-Cy5(図8)を、図2に示されるように、DNAポリメラーゼを使用して、上部オリゴの3'へ伸長した。二本鎖産物をRP-HPLCによって精製した。収集された二本鎖産物溶液の体積を減らした。次いで、産物を1× PBS中50 μM最終濃度へ希釈した。

【0115】

部分的に二本鎖のオリゴスクレオチド-光開裂可能Cy5蛍光色素を、実施例1に記載されるような実験において使用し、一本鎖オリゴを使用して得られた結果と比較した。光開裂可能標識の両方の設計がうまく機能した。

10

【0116】

実施例6 - 様々なPCLでの染色および光開裂の評価

個々の組織切片(前立腺癌、ヒト)を単一のバッチ中において調製した。切片をブロッキングし(アビジンもしくはストレプトアビジン、ビオチン、総タンパク質)、ビオチン化抗-SMA抗体で染色し、続いて、アビジンを添加し、次いで、一連のPCL(スタンダード・デュプレックスPCL、ロング・デュプレックスPCL、ショート・デュプレックスPCL、およびシングルビオチンPCL；図12を参照のこと)のうちの1つを同一の濃度で添加した。スタンダード・デュプレックスPCLは、それらの5'末端上にビオチンおよびそれらの3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する2つの34-スクレオチドオリゴからなり、オリゴをアニーリングし、各末端上に4スクレオチド一本鎖突出部を有する28-スクレオチド二本鎖セクションを形成させた。ロング・デュプレックスPCLは、それらの5'末端上にビオチンおよびそれらの3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する2つの69-スクレオチドオリゴからなり、オリゴをハイブリダイズさせ、各末端上に2スクレオチド一本鎖突出部を有する67-スクレオチド二本鎖セクションを形成させた。ショート・デュプレックスPCLは、その5'末端上にビオチンおよびその3'末端上に光開裂可能蛍光標識を有する単一の12-スクレオチドオリゴからなった。シングルビオチンPCLは、各ハイブリッド中の2つのオリゴのうちの1つのみがその5'末端上にビオチンを有したことを除いて、スタンダードPCLと同じであった。加えて、光開裂可能ビオチンを有するオリゴスクレオチド(IDT-PCL；Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa製)での染色を、同一の濃度のPCLで別個のバッチ中において行った。IDT-PCLは、それらの5'末端上に光開裂可能ビオチンおよびそれらの3'末端上に蛍光標識を有する2つの34-スクレオチドオリゴからなり、オリゴをハイブリダイズさせ、各末端上に4スクレオチド一本鎖突出部を有する28-スクレオチド二本鎖セクションを形成させた(図12)。各切片についての視野の中央を、タイムラプスイメージング中、光開裂した(それぞれの間に2分間フラッシュを伴って3 × 2秒間)。等しいサイズの2つの領域(ROI)においてシグナル強度を測定した：特定のステインの1つの領域およびバックグラウンドの1つの領域。ステインの最大強度を経時的に追跡した(図10A)。シグナルとバックグラウンドとの差を、絶対的シグナル(図10B)および最大シグナルの%(図10C)として両方ともプロットした。タイムラプスキャプチャーに加えて、各染色切片の画像を、光開裂前および光開裂後の両方において得た。図11D～Hは、約25枚の画像を一緒に継ぎ合わせることによって作られた各切片の画像を示す。これらのデータは、全てのプローブバリエーションがPCLとして使用可能であることを示している。

20

【0117】

実施例7 - SMCC架橋剤を有するPCLを使用しての組織切片中の抗原の検出

この実施例は、式(III)の抗原結合された抗原結合性複合体を説明する。2つの一本鎖オリゴスクレオチドをIDT(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)から得、そのうちの1つのオリゴスクレオチドは5'C6アミノ修飾を有した。オリゴスクレオチドをアニーリングし、部分的に二本鎖のオリゴスクレオチドを形成し、-dC-Cy5またはdU-Cy7PCLを3'末端へ伸長した。PCL合成に続いて、RP-HPLC精製を行った。Sulfo-SMCC(二官能性架橋

30

40

50

剤)を二本鎖の5'アミノ修飾鎖へ結合し、反応物をRP-HPLCによって精製した。Sulfo-SMCCをアミド連結によってオリゴヌクレオチドの5'末端上の第1級アミンへ結合した。SMCCリンカーは抗体へのプローブの直接連結を可能にし、プローブと抗体との間の別個のリガンド-レセプターコネクション、例えば、前述した、ビオチン-アビジンまたはストレプトアビジン連結の必要性を排除した。追加のリガンドの排除は、非特異的相互作用および立体障害(stearic hindrance)のリスクを減らした。

【0118】

抗体へのプローブの直接コンジュゲーションは、染色を完了するための手動時間を短縮させ、最小限の工程および試薬での多重抗体染色を可能にする。ユニークに標識されたPCL(少なくとも3色まで)へコンジュゲートされた複数の抗体は、予め混合され、組織染色において使用され、単一の染色／画像化サイクルにおいて3つの抗原を検出する。各イメージング事象の終了時に開裂サイクルを伴う3つのそのような染色サイクルは、従って、以前のリガンドベースのアプローチから70%の時間短縮を伴って、9つの抗原を検出する。10

【0119】

SMCCリンカーを有するPCLの他の構造的バリエーションは、リン酸の代わりに塩基上でオリゴヘアミノ修飾を付加すること、アミノ修飾についてC6リンカーの代わりのC12リンカー、オリゴの末端から離れてSMCCを連結すること、および反対の鎖ではなく組み込みと同じ鎖上にSMCCリンカーを付加することを含む。

【0120】

SMCCリンカーへのPCLの直接コンジュゲーションはまた、ポリエチレングリコール(PEG)スペーサーが、Sulfo-SMCC架橋剤中の炭化水素ベースのスペーサーに取って代わっている、SM(PEG)_nヘテロ二官能性架橋剤によって達成される。PEGスペーサーは、2つの官能基間ににより大きな可撓性を提供し、反応物および最終コンジュゲートの可溶性を改善し、コンジュゲートの凝集の可能性を減らし、従って、機能性を保存する。抗体のサイズに基づいて、PCL部分を有する架橋剤の立体障害を最小限にしつつスペーサーアームの可撓性を最大限にするために、PEGリンカーの異なる長さが選択される。20

【0121】

PCL分子の直接コンジュゲーションは、好適なpH下で(PBSまたはPBS-EDTA中においてpH7~7.2で)ヘテロ二官能性リンカーをアミノ修飾オリゴヌクレオチドと共にインキュベートし、続いてRP-HPLCおよび／または脱塩を使用して精製することによって、合成される。その後、活性化PCLを、露出されたスルフヒドリル基を有する(5 mM TCEPを使用して還元された)抗体と共にインキュベートする。コンジュゲーション反応物は、未結合オリゴを除去するために脱塩カラムによってさらに精製される。あるいは、PCLと抗体とのコンジュゲーションは、市販のコンジュゲーションキットの使用によって達成され、これらは、コンジュゲーションを達成するために必要な最適化された試薬およびバッファーを提供する(例えば、Innova Biosciencesによって提供される、Thunder-Link PLUSオリゴコンジュゲーションシステム, Cat #425-000, 425-0300)。30

【0122】

本明細書において開示および特許請求した全ての方法を、本開示に照らして、過度の実験なしに実施および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様によって説明してきたが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、これらの方法、および本明細書に記載の方法の段階または段階の順序に変動を適用できることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的にかつ生理学的に関連する特定の薬剤で、同一のまたは同様の結果を達成しながら、本明細書に記載の薬剤を代用することができることは明らかであろう。当業者に明らかな全てのそのような同様の代用物および修正は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神、範囲および概念内にあると見なされる。40

【0123】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載されるものを補足する例示的な手順上のみ50

たは他の詳細を与える限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。
U.S. Patent No. 4,439,356

U.S. Patent No. 5,188,934

U.S. Patent Appl. Publ. No. 2010/0041041

PCT Publn. No. WO 2003/006625

PCT Publn. No. WO 2005/084367

PCT Publn. No. WO 2008/070749

PCT Publn. No. WO 2009/152353

PCT Publn. No. WO 2013/040257

10

Corrie, in *Dynamics studies in biology*, Goeldner and Givens (Eds.), Wiley-VCH Verlag
GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 1-28, 2005.

Givens & Schowen, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 125-47, 1989.

Hastings, *J. Mol. Evol.* 19:309-21, 1983.

20

Haugland, *The Handbook; A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*,
Invitrogen, 2005.

Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, San Diego: Academic Press, 2013.

Moritz and Wahle, Simple methods for the 3' biotinylation of RNA, *RNA*, 20:421-427, 2014.

Nieman, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*,
J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 99-123, 1989.

Orosz *et al.*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 26:1-27, 1996.

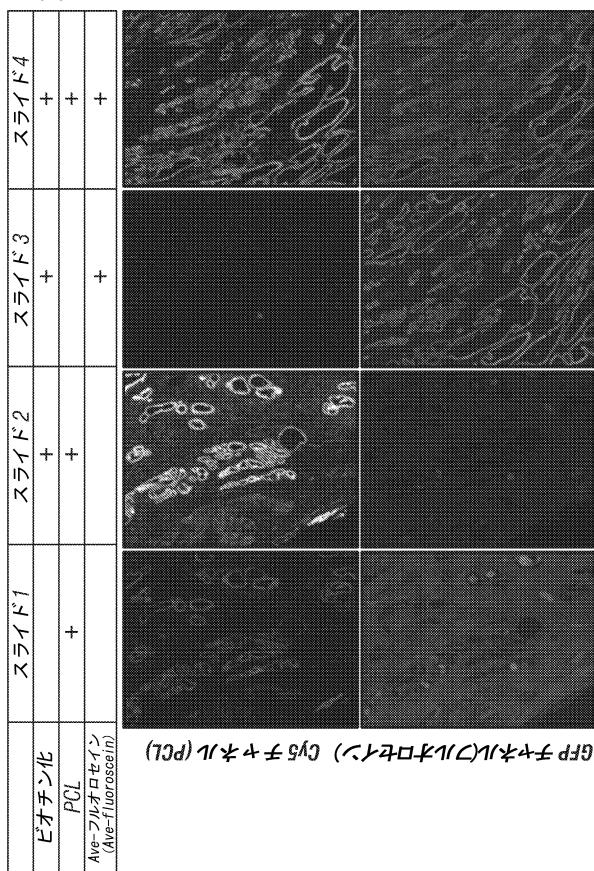
Proudnikov and Mirzabekov, Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling, *Nuc.
Acids Res.*, 24:4535-4532, 1996.

30

Riedel *et al.*, Labelling of nucleosides and oligonucleotides by solvatochromic 4-
aminophthalimide fluorophore for studying DNA-protein interactions, *Chem. Sci.*,
3:2797-2806, 2012.

Seo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102:5926-5931, 2005.

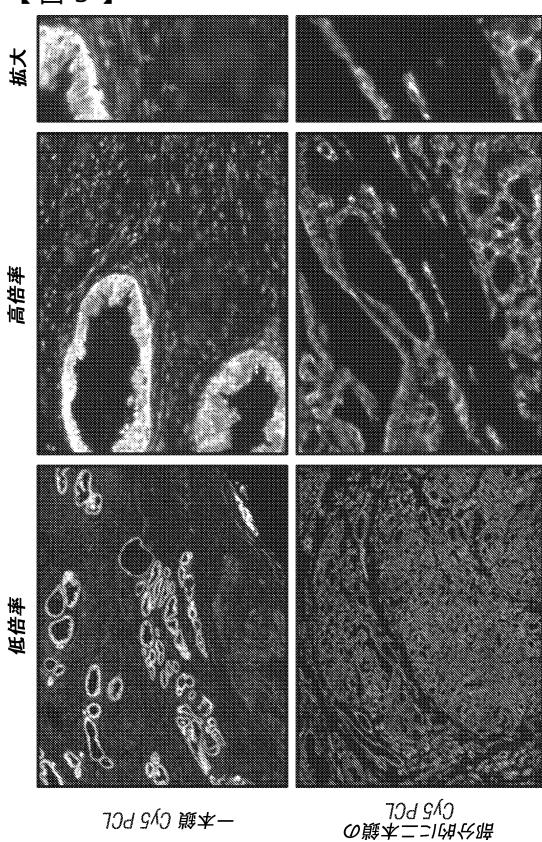
【図1】



【図2】

dC-2-NB-Cy5
/5ビオチン/CCTACCCGGTTGGCTTTCCTGTAACCGGTCCGGTTCCTCATTCTCTCACTCGCTC
3'-GAGGCCAAGGATAAGAGTAGAGATACAGGAGCAT/5ビオチン/

【図3】



【図4】

R 赤色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
dC-2-NB-Cy5 ☆
dG-2-NB-AF594 ☆

O 橙色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
dU-2-NB-AF532 ☆

G 緑色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
dA-2-NB-AF488 ☆

B 青色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
dC-2-NB-Cy5 ☆

【図5】

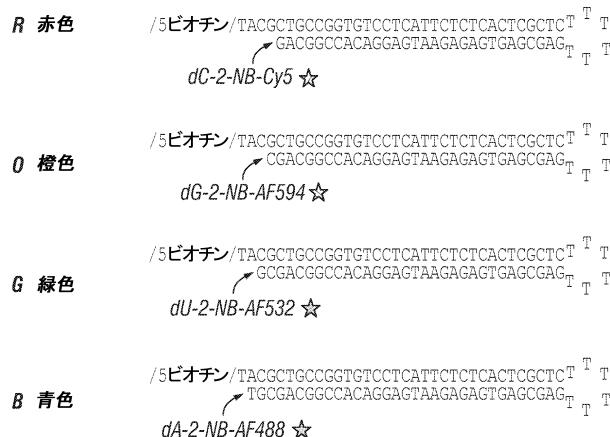
RR 赤色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
GACGGCACAGGAGTAAGAGAGTGAGCGAGGCAT/5ビオチン/
dC-2-NB-Cy5 ☆
dG-2-NB-AF594 ☆

OO 橙色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
CGACGGCACAGGAGTAAGAGAGTGAGCGAGGCAT/5ビオチン/
dU-2-NB-AF532 ☆

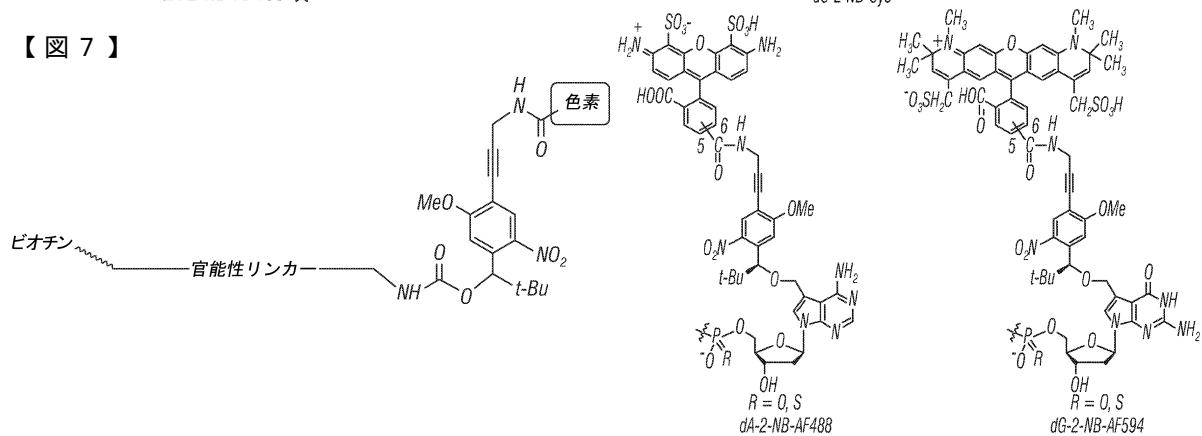
GG 緑色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
GCCACGGCACAGGAGTAAGAGAGTGAGCGAGGCAT/5ビオチン/
dU-2-NB-AF532 ☆
dA-2-NB-AF488 ☆

BB 青色 /5ビオチン/TACGCTGCCGGTGTCTCATTCTCTCACTCGCTC
TGCGACGGCACAGGAGTAAGAGAGTGAGCGAGGCAT/5ビオチン/
dA-2-NB-AF488 ☆

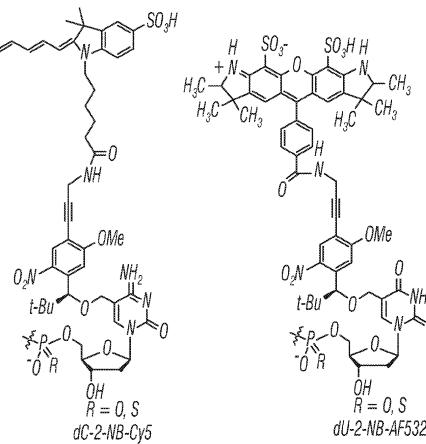
【図6】



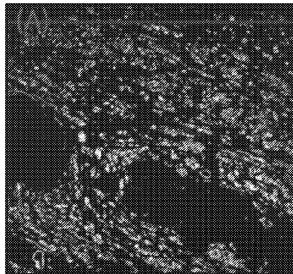
【図7】



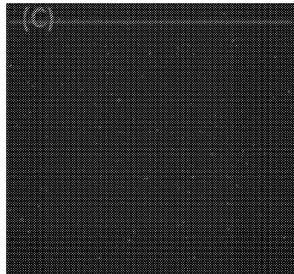
【図8】



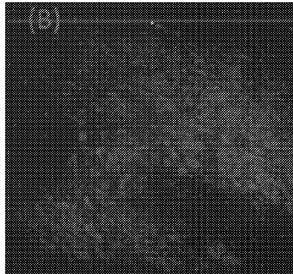
【図9 A】



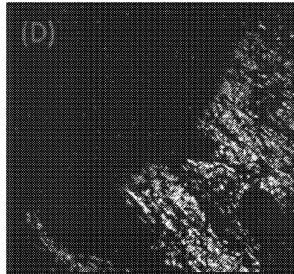
【図9 C】



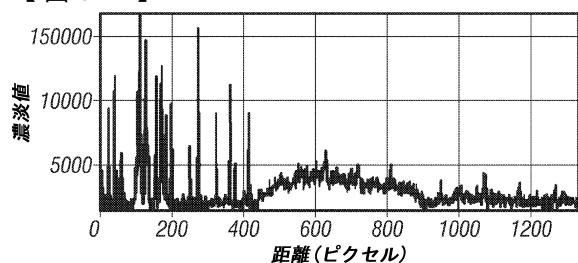
【図9 B】



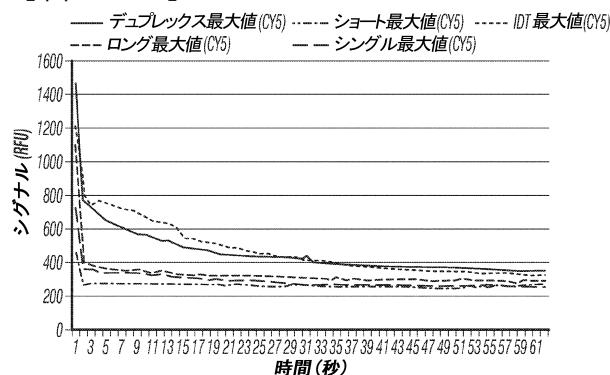
【図9 D】



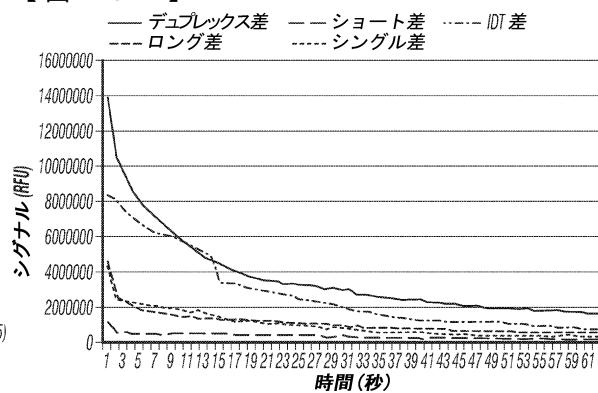
【図 9 E】



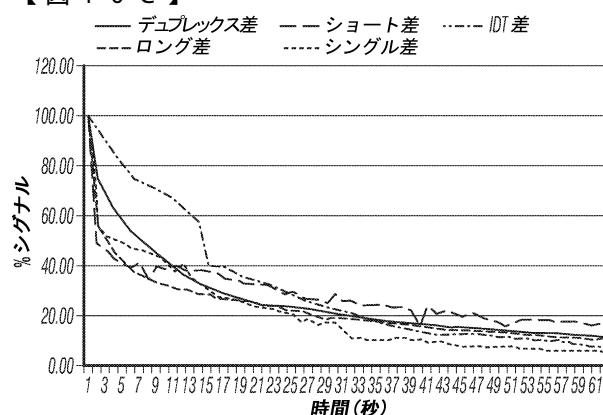
【図 10 A】



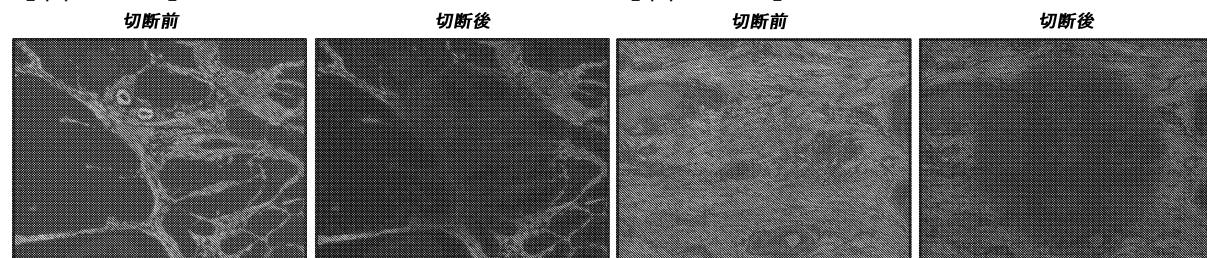
【図 10 B】



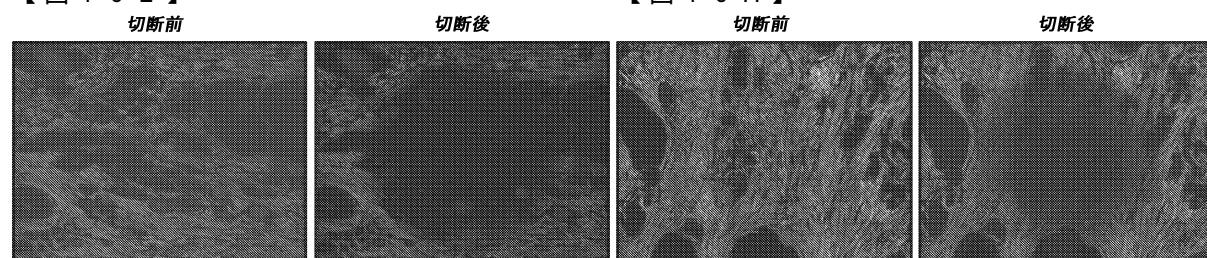
【図 10 C】



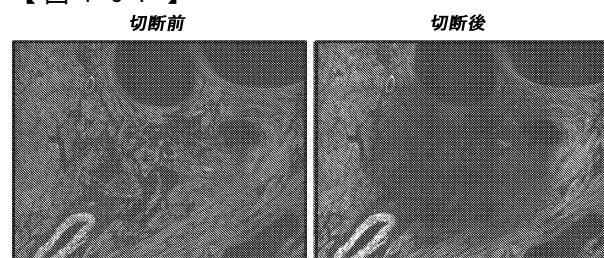
【図 10 D】



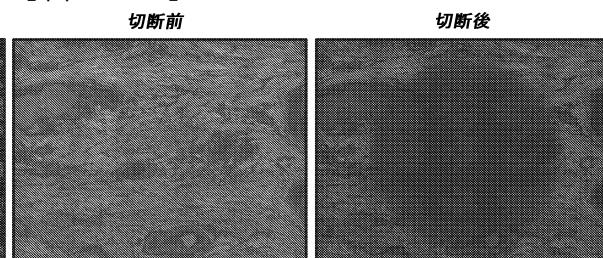
【図 10 E】



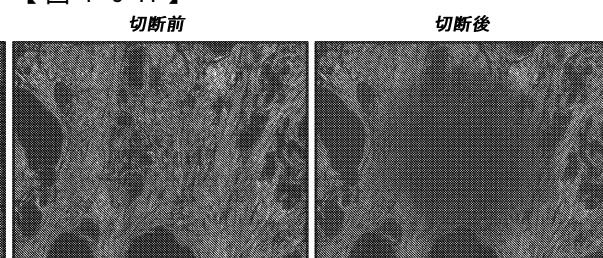
【図 10 F】



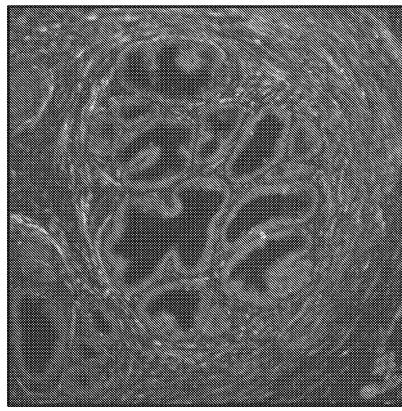
【図 10 G】



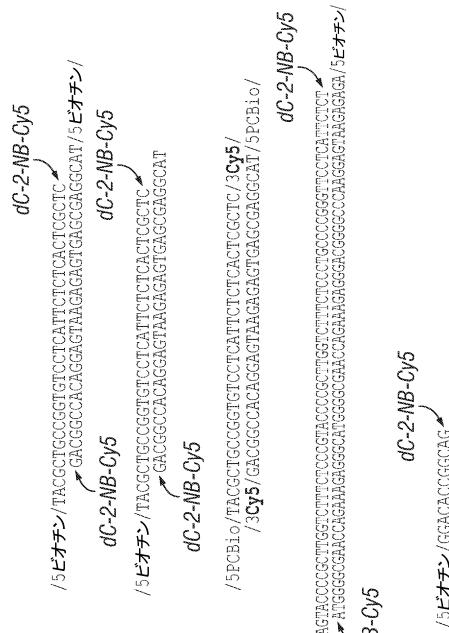
【図 10 H】



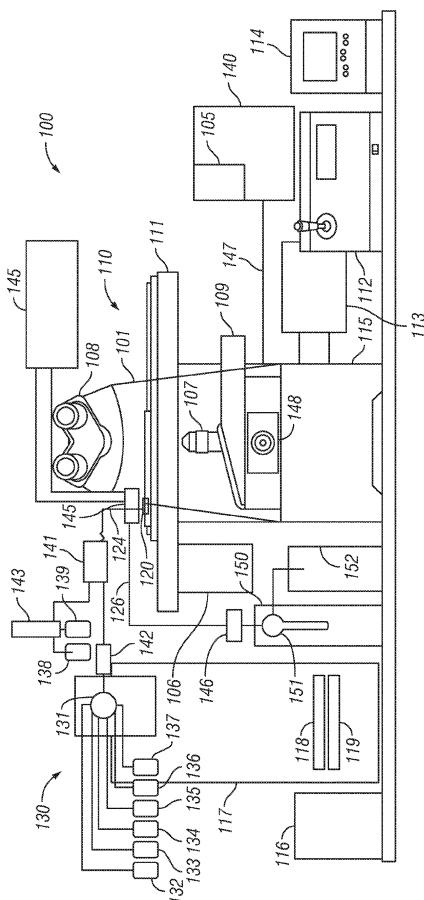
【図 1 1】



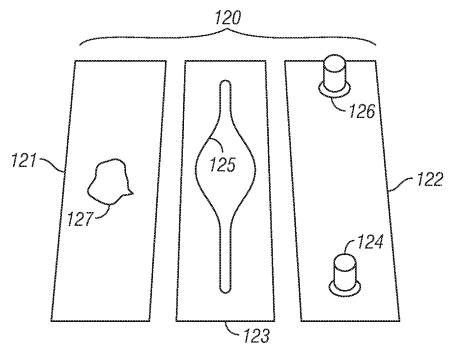
【図 1 2】



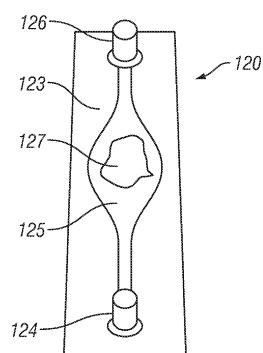
【図 1 3】



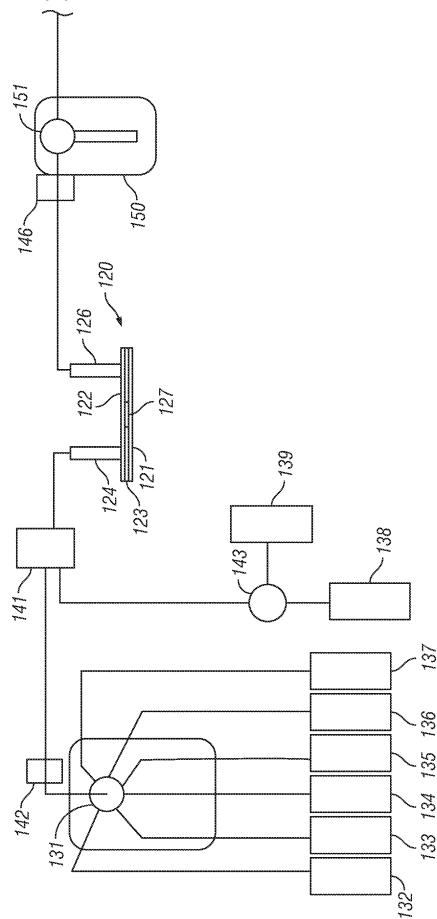
【図 1 4】



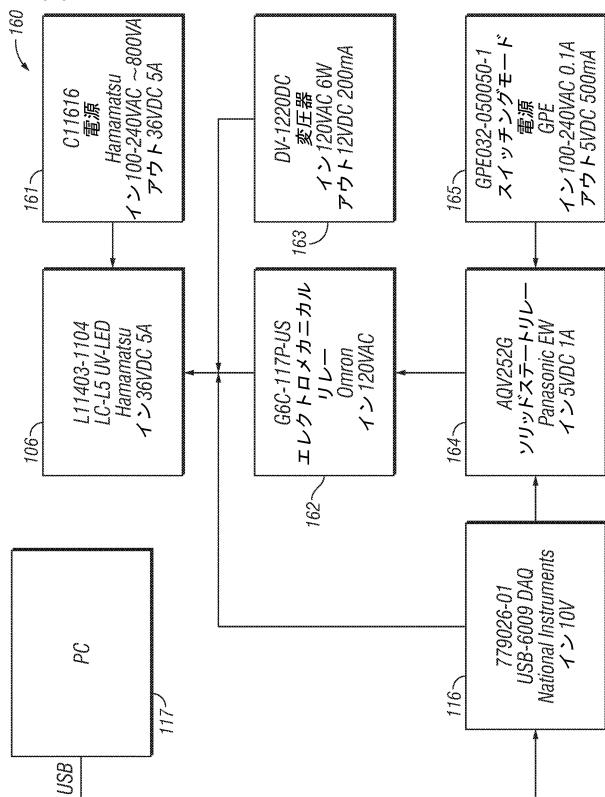
【図 1 5】



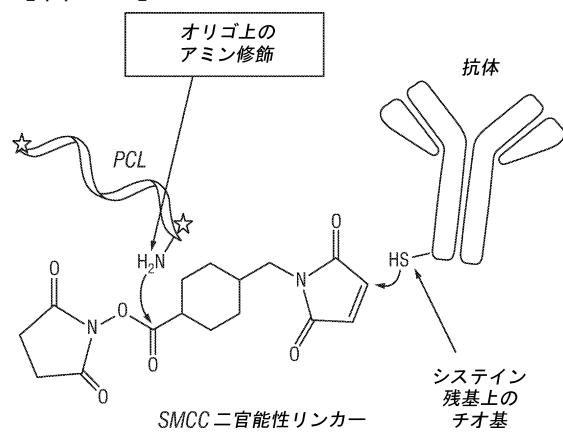
【図 1 6】



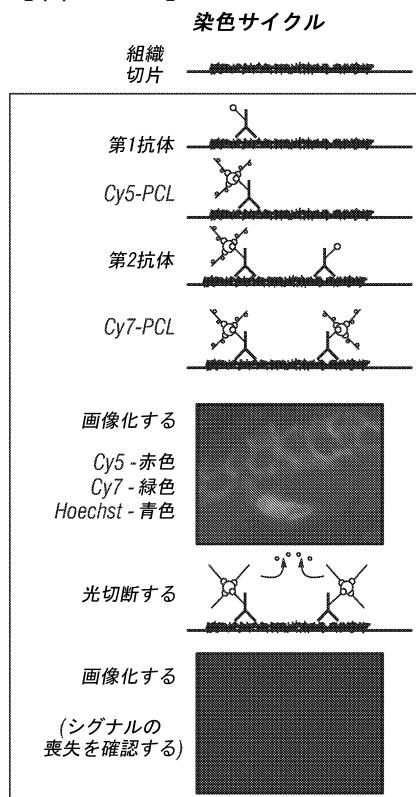
【図 1 7】



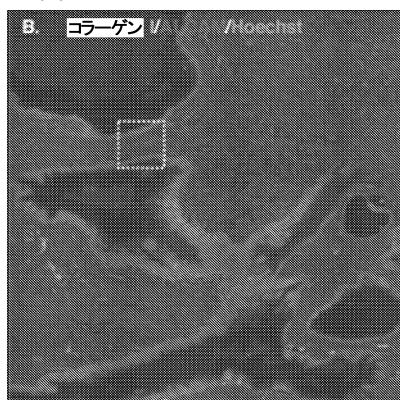
【図 1 8】



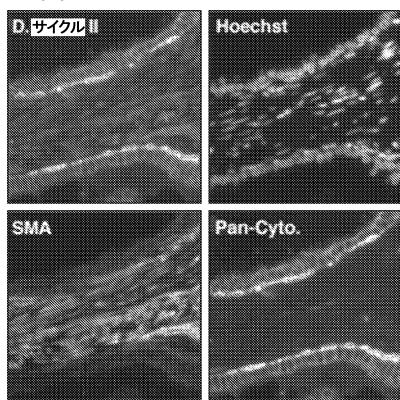
【図 1 9 A】



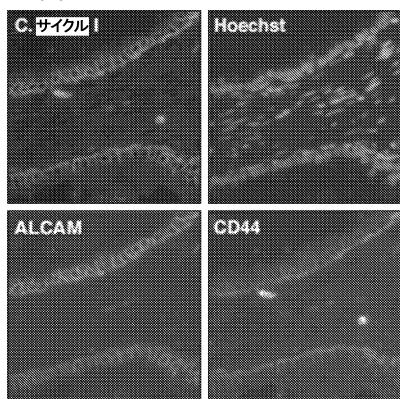
【図 19 B】



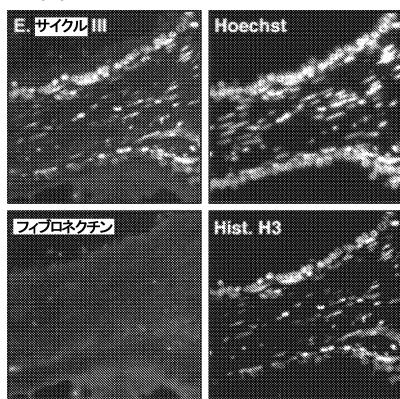
【図 19 D】



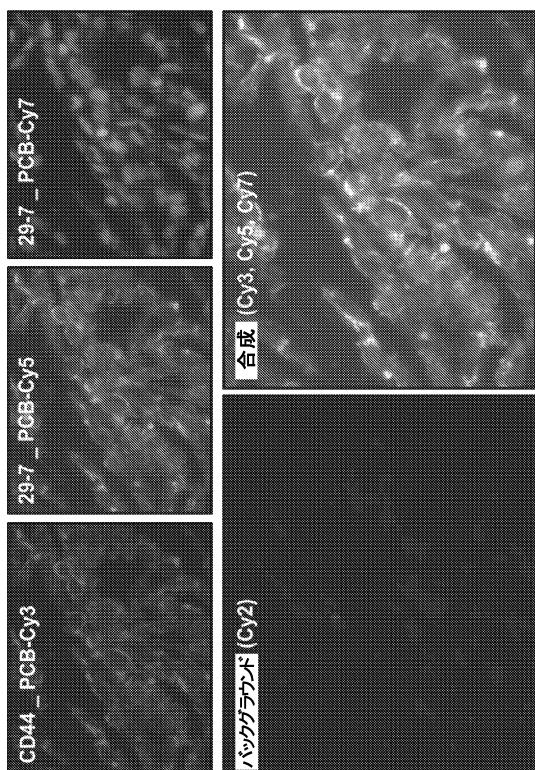
【図 19 C】



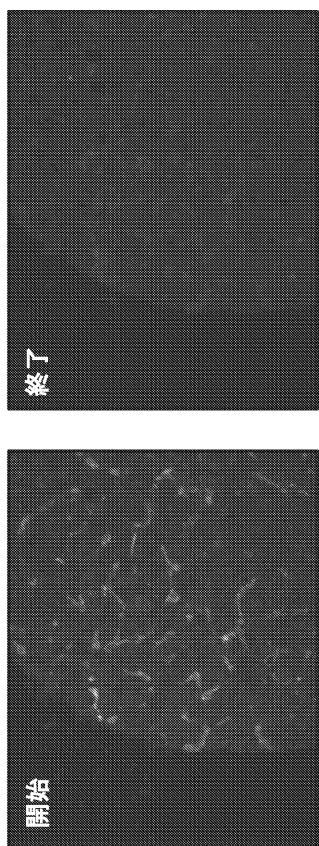
【図 19 E】



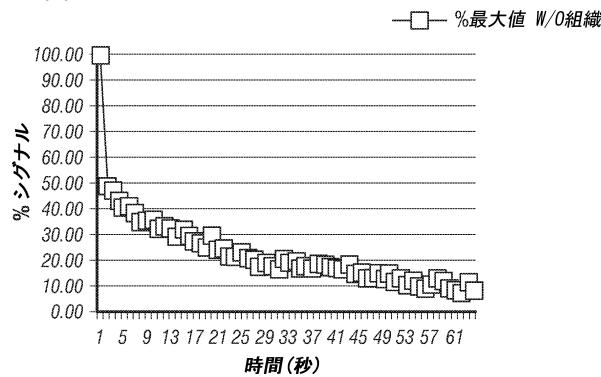
【図 20】



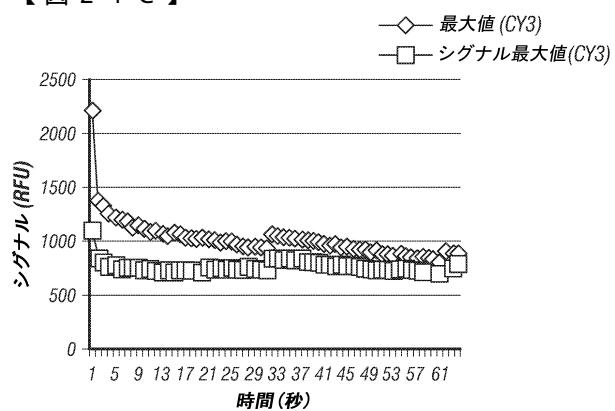
【図 21 A】



【図 2 1 B】



【図 2 1 C】



【配列表】

0006893914000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09

Z

- (74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐
- (74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子
- (74)代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
- (74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ヘアリー ミミ
アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内
- (72)発明者 チェン チーイー
アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ワン ジンチュン
アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ウ ウエイドン
アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ペトリチェンコ ソフィア

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内

(72)発明者 チャン ス

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内

(72)発明者 フライ ステイシー

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル リオ ストリート 8052
レーザーゲン インコーポレイテッド内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 欧州特許出願公開第02728359(EP, A1)

米国特許出願公開第2011/0311966(US, A1)

特表2009-538629(JP, A)

特表2011-518320(JP, A)

米国特許出願公開第2009/0203023(US, A1)

米国特許出願公開第2005/0017191(US, A1)

特表2014-532043(JP, A)

Roger Ramos, Photocleavage of Peptides and Oligodeoxynucleotides Carrying 2 Nitrobenzyl Groups, Helvetica Chimica Acta, 2009年 4月, Vol.92 No.4, Page.613-622

Agasti et al., J AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2012年, 134(45), 18499-18502

VALLEY CHRISTOPHER C ET AL., PLOS ONE, 2015年 4月10日, vol. 10, no. 4, pages 1 - 22

Ramos et al., Helv. Chim. Acta, , 2009年, vol.92, pp.613-622

Chen et al., N. Am. J. Med. Sci., 2010年, vol.2, No.5, pp.241-245

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33 / 536

C 12 M 1 / 34

G 01 N 33 / 53

C 07 K 16 / 00

C 12 N 15 / 09