

(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  
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/010381 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/542 (2006.01)  
C07D 311/80 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)  
C07K 1/13 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070058
- (22) 国際出願日: 2016年7月7日(07.07.2016)
- (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 2015-138743 2015年7月10日(10.07.2015) JP
- (71) 出願人: ウシオ電機株式会社(USHIO DENKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1008150 東京都千代田区丸の内1丁目6番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 芳坂 貴弘(HOHSAKA, Takahiro); 〒9231292 石川県能美市旭台1-1 国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科内 Ishikawa (JP). 渡邊 貴嘉(WATANABE, Takayoshi); 〒9231292 石川県能美市

旭台1-1 国立大学法人 北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科内 Ishikawa (JP). 阿部 亮二(ABE, Ryoji); 〒1008150 東京都千代田区丸の内1丁目6番5号 ウシオ電機株式会社内 Tokyo (JP). 大橋 広行(OHASHI, Hiroyuki); 〒1008150 東京都千代田区丸の内1丁目6番5号 ウシオ電機株式会社内 Tokyo (JP).

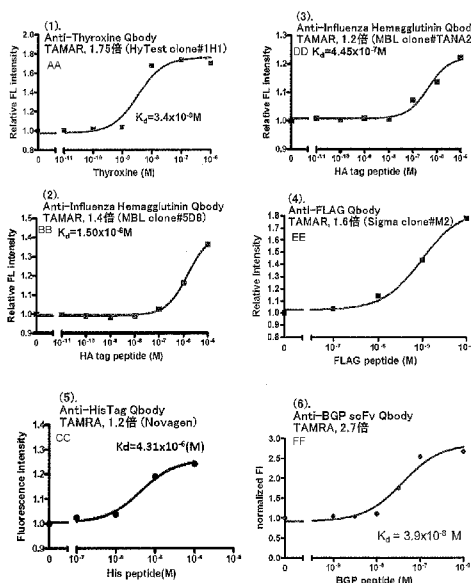
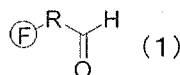
(74) 代理人: 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所 (UNIUS PATENT ATTORNEYS OFFICE); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目13-9 新大阪MTビル1号館2階 Osaka (JP).

(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM,

[続葉有]

(54) Title: N TERMINAL LABELING AGENT, FLUORESCENT-LABELED PROTEIN USING SAME, AND PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: N末端標識剤、これを用いた蛍光標識タンパク質及びその製造方法



AA TAMAR, 1.75 times (HyTest clone#1H1)  
BB TAMAR, 1.4 times (MBL clone#SD8)  
CC TAMARA, 1.2 times (Novagen)  
DD TAMAR, 1.2 times (MBL clone#TANA2)  
EE TAMAR, 1.6 times (Sigma clone#M2)  
FF TAMARA, 2.7 times

(57) Abstract: Provided is an N-terminal labeling agent for a protein, comprising a compound represented by general formula (1) (where F is a fluorescent group, and R is an optionally substituted linker group having a linear soft segment formed from a C5 or higher linear hydrocarbon or a linear soft segment where the main chain carbons have been substituted in part by -O-, -N-, -S-, -CO-, -CONH-, -COO-, or -POO-).

(57) 要約: 下記一般式(1): (式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換基を有していてもよい、炭素数が5以上の直鎖炭化水素からなる直鎖ソフトセグメント又はその主鎖の炭素の一部が-O-、-N-、-S-、-CO-、-CONH-、-COO-又は-POO-で置換された直鎖ソフトセグメントを有するリンカー基である)で表される化合物を含む、タンパク質のN末端標識剤。

WO 2017/010381 A1



ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, 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:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

**N末端標識剤、これを用いた蛍光標識タンパク質及びその製造方法**

### 技術分野

[0001] 本発明はタンパク質の標識を簡便に行うN末端標識剤や、かかるN末端標識剤を用いて標識した蛍光標識タンパク質及びその製造方法に関し、蛍光免疫測定法等に使用する蛍光標識抗体等を調製する技術として有用である。

### 背景技術

[0002] 免疫学的測定法として、抗原が結合していない状態には蛍光標識された抗体が消光（本明細書において、クエンチ、クエンチングとも呼ぶことがある）する一方、抗原が結合した場合に前記消光が解除される現象を用いた「均一系蛍光免疫測定法」が知られている（例えば、下記特許文献1参照）。この方法は、蛍光標識した抗体の断片、又は蛍光標識した一本鎖抗体を、抗原が含まれているか否かを検査する被検試料溶液に混合することにより行われる。この方法によれば、蛍光色素の蛍光強度と抗原濃度が正の相関関係にあることをもって、抗原の存在が結論付けられ、また、その相関度合いに基づいて抗原の濃度測定を行うことができる。このような消光とその解除の主たる要因は、抗体分子内の保存性の高いトリプトファン残基と蛍光色素が相互作用して蛍光色素を消光すると共に、抗原と結合することによって抗原依存的にかかる消光が解消されることにある。

[0003] 測定に際し、蛍光標識した抗体の断片を用いる場合には、より詳細には、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのどちらか一方を蛍光標識した2本の抗体断片が用いられる。ここで、抗体軽鎖可変領域は「VL」と略記されることがあり、抗体重鎖可変領域は「VH」と略記されることがある。

[0004] また、測定に際し、蛍光標識した一本鎖抗体を用いる場合には、より詳細には、蛍光標識したVLポリペプチドとVHポリペプチドとが結合してなる

一本鎖抗体（「s c F v」と略記されることがある。）が用いられる。

[0005] 上記２種類の蛍光標識した抗体を総称して、「Q u e n c h b o d y（登録商標、以下同じ）」又は「Q－b o d y（登録商標、以下同じ）」と呼ぶことがある。また、特に両者を区別する場合においては、前者（２本の抗体断片を用いる場合）を「V H＋V L型Q－b o d y」と称し、後者（一本鎖抗体を用いる場合）を「s c F v型Q－b o d y」と称することがある。

[0006] 特許文献１に記載された手法の特徴は、大きく以下の３点にある。

[0007] 第一の特徴は、洗浄工程が不要である点にある。これにより、少量のサンプルとQ－b o d yを混合して蛍光強度を測定するだけで測定が完了するため、この手法は極めて簡便な測定技術であるといえる。第二の特徴は、抗体中に存在する保存性の高いトリプトファンを消光に利用する点にある。すなわち、抗体の種類を変えても消光効果が得られるため、様々な抗体を用いて種々の物質を検出することに適用できる点において、この手法は汎用性に優れているといえる。第三の特徴は、抗原部位が１ヶ所でよい点にある。このため、原理的に低分子化合物に対しても適用できる。

[0008] このように、本手法は、洗浄工程を必要とせず、簡便な測定方法である。このため、本手法に基づく測定デバイスを、例えば携帯可能なサイズにまで小型化することが可能であり、また、この測定デバイスを用いることで、専門教育を受けていない一般の人が現場で測定することも可能であると想定される。

[0009] また、V L及び抗体軽鎖定常領域からなるポリペプチドと、V H及び抗体重鎖定常領域からなるポリペプチドとが、ジスルフィド結合で結合した１分子のヘテロダイマータンパク質からなるF a b抗体（Fragment, antigen binding）を作成し、V L及びV Hのそれぞれに同色又は異色の蛍光色素を標識した蛍光標識複合体が開発されている（特許文献２）。V L及びV Hのそれぞれに同色の蛍光色素を標識した蛍光標識複合体では、上述した蛍光色素とトリプトファン残基との相互作用による消光に加え、色素間の消光効果（H－d i m e r）が加わり、高い検出感度を得ることが可能である（特許文献

2の図7、図8等)。VL及びVHのそれぞれに異色の蛍光色素を標識した蛍光標識複合体では、蛍光色素とトリプトファン残基との相互作用による消光と、色素間の消光効果に加え、FRET効果による消光効果が加わり、さらに高い検出感度を得ることが可能である(特許文献2の図9、図10等)。このような蛍光標識Fab抗体複合体を総称して「UQ-body(登録商標、以下同じ)」と呼ぶことがある。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0010] 特許文献1: WO2011/061944号公報

特許文献2: WO2013/065314号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0011] 抗原やリガンドが結合していない場合は消光し、結合がなされると消光が解除されるシステムは、医療の分野だけではなく、環境中の農薬検出や、毒素検出等の様々な分野で普及することが期待されている。既存の抗体やレセプターを含むタンパク質を用いて、容易にQ-bodyやUQ-bodyのような蛍光標識タンパク質を作成する技術が求められている。

[0012] そこで、本発明の目的は、既存の抗体やレセプターを含むタンパク質を用いて、短行程で短時間のうちにQ-bodyやUQ-bodyのような蛍光標識タンパク質を提供することにある。

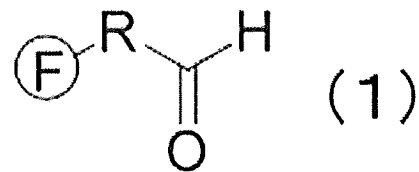
#### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、アルデヒド基に一定の長さのリンカーを介して蛍光基を結合させることで、既存の抗体等のタンパク質に対して蛍光色素を簡便に結合可能であり、これが蛍光免疫測定法等に利用可能であることを見出した。本発明は、このような知見に基づいて、更に検討を重ねることによって完成したものである。

[0014] すなわち、本発明は、

[1] 下記一般式(1)：

[化1]



(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換基を有していてもよい、炭素数が5以上の直鎖炭化水素からなる直鎖ソフトセグメント又はその主鎖の炭素の一部が-O-、-N-、-S-、-CO-、-CONH-、-COO-又は-POO-で置換された直鎖ソフトセグメントを有するリンカー基である)で表される化合物を含む、タンパク質のN末端標識剤；

[2] 前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ビフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、Evoblu系、フルオレセイン系及びこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも1種である、前記[1]に記載のN末端標識剤；

[3] 前記蛍光基が、カルボキシテトラメチルローダミン、カルボキシフルオレセイン、ATTO655(登録商標)及びローダミングリーンからなる群より選択される少なくとも1種を含む、前記[2]に記載のN末端標識剤；

[4] 前記タンパク質が完全抗体である、前記[1]～[3]のいずれかに記載のN末端標識剤；

[5] 前記タンパク質が抗体のフラグメントである、前記[1]～[3]のいずれか1項に記載のN末端標識剤；

[6] タンパク質のN末端に前記[1]～[5]のいずれかに記載のN末端標識剤を用いて、前記蛍光基が導入された蛍光標識タンパク質；

[7] 蛍光標識タンパク質の製造方法であって、前記[1]～[5]のいずれかに記載のN末端標識剤とタンパク質のN末端とを反応させる工程(a)

、  
を含む、蛍光標識タンパク質の製造方法；

〔８〕前記工程（ａ）が溶液中で前記Ｎ末端標識剤と前記タンパク質とを接触させるものであり、該溶液のｐＨが、ｐＨ３～７である、前記〔７〕に記載の方法；

〔９〕前記工程（ａ）における前記タンパク質が完全抗体又はそのフラグメントである、前記〔７〕又は〔８〕のいずれかに記載の方法；

〔１０〕蛍光標識タンパク質を作成するためのキットであって、  
前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のＮ末端標識剤を有する、キット；  
に関する。

## 発明の効果

〔００１５〕 本発明によれば、既存の抗体等のタンパク質を用いて、短工程で短時間のうちに、Ｎ末端に蛍光基を結合させることができる。既存のタンパク質を利用可能となったことで、ハイブリドーマの作成や遺伝子配列の解析も不要となり、均一系蛍光免疫測定法に利用可能なタンパク質を簡便に効率良く製造可能となる。

## 図面の簡単な説明

〔図１〕本発明のＮ末端標識剤を用いて標識したタンパク質の一つの実施形態を模式的に示した図である。この実施形態では、抗原非存在下では蛍光がクエンチ（消光）される（真ん中）。抗原存在下では、クエンチが解消され、蛍光基がタンパク質から露出する（右側）。この場合、発生する蛍光強度は、抗原濃度と正の相関関係となり得る。

〔図２〕Ｎ末端標識剤の製造方法の一例を示す図である。

〔図３〕Ｎ末端標識剤を用いて標識された蛍光標識タンパク質における蛍光強度の変化を測定した結果を示す図である。

〔図４〕種々の長さのリンカー基を有する蛍光標識タンパク質における蛍光強度の変化を測定した結果を示す図である。

〔図５〕種々の長さのリンカー基を有する蛍光標識タンパク質における蛍光強度

の変化を測定した結果を示す図である。

[図6]種々の構造のリンカー基を有する蛍光標識タンパク質における蛍光強度の変化を測定した結果を示す図である。

[図7]種々の種類の蛍光基を有する蛍光標識タンパク質における蛍光強度の変化を測定した結果を示す図である。

[図8]種々の種類の蛍光基を有するN末端標識剤を示す図である。

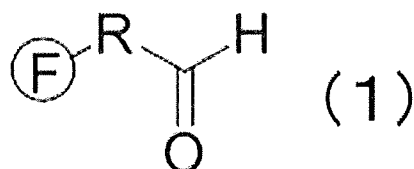
### 発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

[N末端標識剤]

本発明は、下記一般式(1)：

[化2]



(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換基を有していてもよい、炭素数が5以上の直鎖炭化水素からなる直鎖ソフトセグメント又はその主鎖の炭素の一部が $-\text{O}-$ 、 $-\text{N}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{COO}-$ 又は $-\text{POO}-$ で置換された直鎖ソフトセグメントを有するリンカー基である)で表される化合物を含む、タンパク質のN末端標識剤である。すなわち、本発明におけるN末端標識剤は、末端にアルデヒド基を有し、Rで示されるリンカー基を介して、Fで示される蛍光基と結合している。また、リンカー基は、直鎖ソフトセグメントとその他の結合基を有していてもよい。

[0018] 本明細書において、直鎖ソフトセグメントとは、主鎖に直鎖状基を有し、柔軟性を有するセグメントをいう。このような直鎖状基は、主鎖の回転性や屈曲性が阻害されにくい基が好ましい。直鎖炭化水素としては、例えば、アルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基等が挙げられる。

[0019] 主鎖の回転性や屈曲性の観点から、直鎖炭化水素における炭素数は、5以上であり、6以上が好ましく、7以上がより好ましく、8以上がさらに好ま

しく、9以上がさらに好ましく、10以上がさらに好ましく、11以上がさらに好ましく、12以上が特に好ましく、13以上が最も好ましい。また、主鎖の回転性や屈曲性の観点から、直鎖炭化水素における炭素数は、100以下とすることができ、90以下とすることが好ましく、80以下とすることがより好ましく、70以下とすることがさらに好ましい。直鎖ソフトセグメントは、主鎖の炭素の一部が $-O-$ 、 $-N-$ 、 $-S-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、 $-COO-$ 又は $-POO-$ で置換されていてもよく、オキシアルキレン基等の繰り返し単位を有するものもこれに含まれる。

[0020] N末端標識剤により標識されたタンパク質において、蛍光基がトリプトファン残基の近傍に位置している場合、トリプトファン残基と蛍光基とが相互作用して、蛍光基がクエンチされ得る。タンパク質が抗体の場合は、抗原結合ポケットにおけるトリプトファン残基との間で、蛍光基が相互作用し得る。クエンチングの原理は、トリプトファン残基と蛍光基との相互作用に限定されるものではないが、リンカー基の構造や長さは、トリプトファン残基と蛍光基との相互作用に影響を及ぼすことが想定される。例えば、リンカー基が短すぎる場合や、長すぎる場合には、トリプトファン残基と蛍光基とが十分に相互作用することができない。また、例えば、リンカー基に環状構造が複数含まれている場合は、リンカー基の回転性や可動性が阻害され、トリプトファン残基と蛍光基とが十分に相互作用することができないことが想定される。

[0021] 本明細書において、炭素数が5以上の直鎖炭化水素からなる直鎖ソフトセグメントは、置換基を有していてもよい。本明細書において、置換基としては、主鎖の回転性や屈曲性が阻害されにくい基であれば限定はされないが、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、シクロヘキシレン基、エテニル基、プロペニル基、ブテニル基、フェニル基、トルイル基、ナフチル基、ピリジル基、フラニル基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、アセチル基、プロパノイル基、シクロヘキサンカルボニル基、ベンゾイル基、メトキシカルボニル基

、エトキシカルボニル基、ヒドロキシル基、メチルアミノ基、エチルアミノ基、ジメチルアミノ基、メチルスルホニル基、エチルスルホニル基、メチルシリル基、ジメチルシリル基、フルオロ基、クロロ基、トリフルオロメチル基、アミン基、アセタール基、ケタール基、アルデヒド基、ケトン基、イミン基、ニトリル基、カルボキシ基、エーテル基、エステル基、ニトロ基、スルホ基等が挙げられる。合成の容易さの観点から、置換基を有する場合は、メチル基、エチル基等が好ましい。

[0022] 本明細書において、リンカー基は、直鎖ソフトセグメントの機能が阻害されにくい構造であれば、さらに別の結合基を含んでいてもよく、例えば、アリーレン基、ヘテロアリーレン基、 $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルキル基及びそれらの組合せからなる群より選択される。

[0023] 限定はされないが、リンカー基は、置換基を有していてもよい、イミノ基、スクシニルアミノ基、アセタミド基、2-アミノペンタンアミド、2(2')-アルキルーアミノアセチル基、カルバモイル基、アミノアルキル基、アミノアルキルオル基、グルタルアミド基、オルニチノ基、テオプロパノイル基、N-(メルカプトメチル)プロピオンアミド基、2-(1,2-ジヒドロキシー3-メルカプトプロピルチオ)プロパノイル基、アミノエタンチオール基、メルカプトプロパノール基、(ヒドロキシプロピルチオ)プロパンノイル基、オキシ基、スクシニル基、アセチル基、オキシペンタノイル基等の結合基を含んでいてもよい。

[0024] また、限定はされないが、リンカー基は、置換基を有していてもよい、1個以上のアミノ酸の繰り返し単位を含むアミノ酸リンカー、ジスルフィドリリンカー、リン酸エステルリンカー等の結合基を含んでいてもよい。

[0025] リンカー基がアルキレン基を含む場合は、限定はされないが、蛍光基のクエンチ効果を顕著に奏する観点から、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキレン基であることが好ましく、 $C_3 \sim C_{18}$ アルキレン基であることがより好ましく、 $C_4 \sim C_{16}$ アルキレン基であることがさらに好ましい。

[0026] リンカー基がPEG基を含む場合は、限定はされないが、蛍光基のクエン

チ効果を顕著に奏する観点から、PEG基の繰り返し単位数は、3～20が好ましく、4～18がより好ましく、5～15がさらに好ましく、6～12が特に好ましく、2～10が最も好ましい。

[0027] N末端標識剤により標識されるタンパク質は、特に制限されないが、標的物質と結合可能なタンパク質であることが好ましく、限定はされないが、例えば、抗体、タンパク質タグ、受容体、細胞接着分子等が挙げられる。

[0028] 本明細書において、抗体とは、B細胞が産生する糖タンパク質であり、抗原を認識して結合する働きを有するものをいう。抗体は、免疫グロブリンとも呼ばれ、長いポリペプチド鎖（本明細書において抗体重鎖ともいう）と、短いポリペプチド鎖（本明細書において抗体軽鎖ともいう）をそれぞれ二本ずつ有し、これらがジスルフィド結合で繋がっている。このように抗体重鎖と抗体軽鎖をそれぞれ二本ずつ有している抗体を、本明細書においては、完全抗体という。

[0029] 本明細書において、N末端標識剤により標識されるタンパク質として抗体を用いる場合は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれを用いることも可能であり、市販のものであっても、合成したものであってもよい。抗体のアイソタイプとしては、IgG、IgA、IgM、IgE又はIgDのいずれも用いることができ、入手のし易さの観点からIgGが好ましい。抗体の由来は、特に制限されないが、哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ由来であることがより好ましく、ヒト、マウス、ラット、ヒツジ又はヤギ由来であることがさらに好ましく、ヒト又はマウス由来であることが特に好ましく、ヒト由来であることが最も好ましい。

[0030] 用いられる抗体は、様々な抗原に対する抗体であってよく、対象となる抗原としては、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、低分子化合物等が挙げられる。これらの物質を含む原生動物、真菌、細菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、ウイルス、動物組織等も対象となり得る。また、麻薬、爆薬、農薬、香料、公害物質等の低分子化合物を含む化学物質も対

象となり得る。このような物質としては、例えば、テトラヒドロカンナビノール（THC）、テトラヒドロカンナビノール酸（THC-A）、カンナビノール（CBN）、カンナビジオール（CBD）等のカンナビノイドと呼ばれる大麻成分；アンフェタミン、メタンフェタミン、モルヒネ、ヘロイン、コデインなどの覚醒剤や麻薬類；アフラトキシン、ステリグマトシスチン、ネオソラニール、ニバレノール、フモニシン、オクラトキシン、エンドファイト産生毒素などのカビ毒；テストステロンやエストラジオールなどの性ホルモン；クレンブテロールやラクトパミンなどの飼料に不正に用いられる添加物；PCB、ゴシポール、ヒスタミン、ベンツピレン、メラミン、アクリルアミド、ダイオキシンなどの有害物質；アセタミプリド、イミダクロプリド、クロルフェナピル、マラチオン、カルバリル、クロチアニジン、トリフルミゾール、クロロタロニル、スピノサド、ランネート、メタミドホス、クロルピリホスなどの残留農薬；ビスフェノールAなどの環境ホルモンなどを挙げることができる。上記の物質は各物質の誘導体も含む。

[0031] 完全抗体は、公知の手段により、その一部分を切断して用いることも可能である。完全抗体は、例えば、パパインにより切断することで、2つのFab部分と1つのFc部分に分離することが可能である。また、完全抗体は、例えば、ペプシンにより切断することで、1つのF(ab')<sub>2</sub>部分と、1つのFc'部分に分離することが可能である。本明細書において、完全抗体の一部分を抗体のフラグメントといい、1本鎖抗体[single-chain Fv (scFv)]、Fab部分、F(ab')<sub>2</sub>部分、可変領域(Fv)部分、Fc部分、Fc'部分等が含まれる。抗体のフラグメントは、抗原との結合が可能である観点から、scFv、Fab部分、F(ab')<sub>2</sub>部分又はFv部分が好ましい。また、Fc受容体と結合が可能である観点から、抗体のフラグメントは、Fc部分またはFc'部分が好ましい。また、抗体のフラグメントは、公知の手段により、合成して用いることも可能である。

[0032] scFv部分及びFab部分は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つからなり、F(ab')<sub>2</sub>部分

及び完全抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つからなる。

[0033] 抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、及び、抗体軽鎖可変領域と抗体軽鎖可変領域の両方を含む一本鎖抗体のポリペプチドは、公知の化学合成法、遺伝子組換え技術、抗体分子のタンパク質分解酵素による分解方法等を用いて調製することができるが、中でも、比較的容易な操作でかつ大量に調製することが可能な遺伝子組換え技術により調製することが好ましい。遺伝子組換え技術により上記ポリペプチドを調製する場合には、抗体軽鎖可変領域又は抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを好適なベクターに導入して発現ベクターを作製し、バクテリア、酵母、昆虫、動植物細胞などを宿主として用いた発現系や、無細胞翻訳系により目的のポリペプチドを発現させることができる。無細胞翻訳系においてポリペプチドの発現を行う場合は、例えば、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等の無細胞抽出液に、ヌクレオチド3リン酸や各種アミノ酸を加えた反応液中で、ポリペプチドを発現させることができる。

[0034] N末端標識剤により標識されるタンパク質として抗体を用いる場合、蛍光基と抗体の可変領域におけるトリプトファンとの相互作用の観点から、抗体軽鎖可変領域は、カバット (K a b a t) の番号付け系で第35番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列を有することが好ましい。また、抗体重鎖可変領域は、カバット (K a b a t) の番号付け系で第36番目、第47番目、又は第103番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0035] 本明細書において、タンパク質タグとは、他の分子とのアフィニティを利用したペプチドやタンパク質をいう。タンパク質タグは、他の分子とのアフィニティを有するタンパク質タグであれば特に制限されないが、例えば、ヒスチジンタグ (H i s t a g)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T)、マルトース結合タンパク質 (M B P)、インフルエンザウイル

スのヘマグルチニンペプチド配列タグ（HAタグ）、mycタグ、FLAGタグ、Biotin Carboxyl Carrier Protein（BCCP）タグ（ビオチン化ペプチド）等が挙げられる。蛍光基のクエンチ効果を顕著に奏する観点から、His tag、HAタグ、FLAGタグが好ましい。タンパク質タグは、市販のものであっても、合成して得たものであってもよい。

[0036] 本明細書において、受容体とは、リガンドとの結合性を有するタンパク質をいう。受容体は、リガンドとの結合性を有する受容体であれば特に制限されないが、分泌型受容体、膜結合型受容体、細胞内受容体のいずれも用いることができる。このような受容体は、天然に存在するものであっても、改変されたものであってもよい。受容体は、市販のものであっても、合成して得たものであってもよい。受容体の由来は、特に制限されないが、哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ由来であることがより好ましく、ヒト、マウス、ラット、ヒツジ又はヤギ由来であることがさらに好ましく、ヒト又はマウス由来であることが特に好ましく、ヒト由来であることが最も好ましい。受容体は、リガンドとの結合性を有する限り、受容体のフラグメントを用いることも可能である。

[0037] 本明細書において、分泌型受容体とは、膜貫通型受容体から膜貫通領域及び細胞内領域を除いた構造を有するものをいい、リガンドとの結合性を有するものであれば特に制限されない。

[0038] 膜貫通型受容体としては、リガンドとの結合性を有するものであれば特に制限されないが、例えば、イオンチャンネル連結型受容体、イオンチャンネルとは連結していない受容体、キナーゼタイプ受容体、非キナーゼタイプ受容体等が挙げられる。

[0039] 核内受容体としては、リガンドとの結合性を有するものであれば特に制限されないが、例えば、甲状腺ホルモン受容体型、レチノイドX受容体型、エストロゲン受容体型、ステロイドホルモン受容体型等が挙げられる。

[0040] 本明細書において、細胞接着分子とは、細胞同士又は細胞と細胞外マトリ

ックスとの接着に関与する分子をいう。細胞接着分子としては、リガンドとの結合性を有する受容体であれば特に制限されないが、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリンスーパーファミリー、インテグリンスーパーファミリー、セレクトインファミリー、MAMスーパーファミリー等が挙げられる。このような細胞接着分子は、天然に存在するものであっても、改変されたものであってもよい。細胞接着分子は、市販のものであっても、合成して得たものであってもよい。細胞接着分子の由来は、特に制限されないが、哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ由来であることがより好ましく、ヒト、マウス、ラット、ヒツジ又はヤギ由来であることがさらに好ましく、ヒト又はマウス由来であることが特に好ましく、ヒト由来であることが最も好ましい。細胞接着分子としては、リガンドとの結合性を有する限り、細胞接着分子のフラグメントを用いることも可能である。

[0041] 本明細書において、蛍光基は、本発明の効果を奏する限り限定はされないが、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ビフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EvoBlue系、フルオレセイン系又はこれらの誘導体等が挙げられる。中でも、蛍光基のクエンチ効果を顕著に奏する観点から、蛍光基は、ローダミン系蛍光基、オキサジン系蛍光基、Cy系、フルオレセイン系が好ましい。

[0042] 蛍光基は、具体的には、例えば、ローダミン、クマリン、オキサジン、カルボピロニン、シアニン、ピロメセン、ナフタレン、ビフェニル、アントラセン、フェナントレン、ピレン、カルバゾール、Cy、EvoBlue、フルオレセイン等を基本骨格として有する蛍光基、又はこれらの蛍光基の誘導体が挙げられる。

[0043] 蛍光基は、より具体的には、例えば、CR110 : carboxyrhodamine 110 : Rhodamine Green (商標名)、TAMRA : carbocytetremethylrhodamine : TMR、Carboxyrhodamine 6G : CR6G、ATTO655 (商標名)、BO

D I P Y F L (商標名) : 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、B O D I P Y 4 9 3 / 5 0 3 (商標名) : 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-8-propionic acid、B O D I P Y R 6 G (商標名) : 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、B O D I P Y 5 5 8 / 5 6 8 (商標名) : 4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、B O D I P Y 5 6 4 / 5 7 0 (商標名) : 4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、B O D I P Y 5 7 6 / 5 8 9 (商標名) : 4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、B O D I P Y 5 8 1 / 5 9 1 (商標名) : 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、C y 3 (商標名)、C y 3 B (商標名)、C y 3 . 5 (商標名)、C y 5 (商標名)、C y 5 . 5 (商標名)、E v o B l u e 1 0 (商標名)、E v o B l u e 3 0 (商標名)、M R 1 2 1、A T T O 3 9 0 (商標名)、A T T O 4 2 5 (商標名)、A T T O 4 6 5 (商標名)、A T T O 4 8 8 (商標名)、A T T O 4 9 5 (商標名)、A T T O 5 2 0 (商標名)、A T T O 5 3 2 (商標名)、A T T O R h o 6 G (商標名)、A T T O 5 5 0 (商標名)、A T T O 5 6 5 (商標名)、A T T O R h o 3 B (商標名)、A T T O R h o 1 1 (商標名)、A T T O R h o 1 2 (商標名)、A T T O T h i o 1 2 (商標名)、A T T O 6 1 0 (商標名)、A T T O 6 1 1 X (商標名)、A T T O 6 2 0 (商標名)、A T T O R h o 1 4 (商標名)、A T T O 6 3 3 (商標名)、A T T O 6 4 7 (商標名)、A T T O 6 4 7 N (商標名)、A T T O 6 5 5 (商標名)、A T T O O x a 1 2 (商標名)、A T T O 7 0 0 (商標名)、A T T O 7 2 5 (商標名)、A T T O 7 4 0 (商標名)、A l e x a F l u o r 3 5 0 (商標名)、A l e x a F l u o r 4 0 5 (商標名)、A l e x a F l u o r 4 3 0 (商標名)、A l e x a F l u o r 4 8 8 (商標名)、A l e x a F l u o r 5 3 2 (商標名)、

Alexa Fluor 546 (商標名)、Alexa Fluor 555 (商標名)、Alexa Fluor 568 (商標名)、Alexa Fluor 594 (商標名)、Alexa Fluor 633 (商標名)、Alexa Fluor 647 (商標名)、Alexa Fluor 680 (商標名)、Alexa Fluor 700 (商標名)、Alexa Fluor 750 (商標名)、Alexa Fluor 790 (商標名)、Rhodamine Red-X (商標名)、Texas Red-X (商標名)、5 (6) - TAMRA-X (商標名)、5 TAMRA (商標名)、SFX (商標名)、5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、6 - カルボキシフルオレセイン、5, 6 - ジカルボキシフルオレセイン、6 - カルボキシ-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-2', 4, 7, 7' - テトラクロロフルオレセイン、6 - カルボキシ-4', 5' - ジクロロ-2', 7' - ジメトキシフルオレセイン、フルオレセイン-5 - イソシアネート (FITC)、ナフトフルオレセイン等が挙げられる。中でも、蛍光基は、蛍光基のクエンチ効果を顕著に奏する観点から、ローダミン系蛍光基であるTAMRA、CR110、Rhodamine Green (商標名)、オキサジン系蛍光基であるATT0、Cy系蛍光基であるCy3 (商標名)、Cy5 (商標名)、フルオレセイン系であるカルボキシフルオレセインが好ましく、5 (6) - TAMRA-X (商標名)、5 TAMRA (商標名)、ATT0 655 (商標名)、Cy3 (商標名)、Cy5 (商標名)、5 - カルボキシフルオレセイン、6 - カルボキシフルオレセイン、5, 6 - ジカルボキシフルオレセインがより好ましい。

[0044] 蛍光基とリンカー基を結合する際には、蛍光基を有する化合物の反応性末端と、リンカー基を有する化合物の末端との反応を行うことが可能である。このような反応としては、縮合反応によるアミド化等が挙げられる。このような反応において、リンカー基を有する化合物は、他方の末端にアルデヒド基を有していてもよいが、水酸基等の形で反応させた後に、デスマーチン酸化等の反応により、アルデヒド化することが好ましい。

[0045] [蛍光標識タンパク質]

本発明は、上記タンパク質のN末端に、上記N末端標識剤を用いて、上記蛍光基が導入された蛍光標識タンパク質に関する。本発明のN末端標識剤は、一方端にアルデヒド基を有するため、還元剤の存在下で、タンパク質のN末端と還元的アミノ化反応を起こすことが可能である。

[0046] 蛍光標識タンパク質には、標識された蛍光基の蛍光を、消光することができるクエンチャーをさらに付加していてもよい。このようなクエンチャーとしては、抗原等の標的物質の非存在下では、クエンチャーが蛍光基を効果的に消光し、標的物質存在下においては、蛍光基の発光を阻害しない組合せを適宜選択することができる。このようなクエンチャーとしては、例えば、NBD: 7-nitrobenzofurazan、DABCYL、BHQ、ATTO、QXL、QSY、Cy、Lowa Black、IRDYE等を基本骨格とする消光色素やこれらの消光色素の誘導体等が挙げられる。より具体的には、NBD、DABCYL、BHQ-1（商標名）、BHQ-2（商標名）、BHQ-3（商標名）、ATTO540Q（商標名）、ATTO580Q（商標名）、ATTO612Q（商標名）、QXL490（商標名）、QXL520（商標名）、QXL570（商標名）、QXL610（商標名）、QXL670（商標名）、QXL680（商標名）、QSY-35（商標名）、QSY-7（商標名）、QSY-9（商標名）、QSY-21（商標名）、Cy5Q（商標名）、Cy7Q（商標名）、Lowa Black FQ（商標名）、Lowa Black RQ（商標名）、IRDYE QC-1（商標名）等が挙げられ、クエンチャーとしての効果を顕著に奏する観点から、NBDが好ましい。例えば、蛍光基としてローダミン系蛍光基を用いた場合には、NBDとの組合せを例示することができる。

[0047] 本明細書において、N末端標識剤を用いて抗体に蛍光基を導入した場合、抗原の非存在下では、上記の蛍光基と抗体可変領域において保存されたトリプトファン残基との相互作用による蛍光基の消光が起こる。抗体に対して、同色の蛍光基が複数導入された場合、さらに蛍光基間のクエンチング効果が

得られる。また、抗体に対して、異色の蛍光基が複数導入された場合、上記のトリプトファン残基によるクエンチング、蛍光基間のクエンチングに加え、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）効果によるクエンチングの効果が得られる。さらに、蛍光基とその蛍光基を消光するクエンチャーが共存する場合には、蛍光基とクエンチャー間のクエンチング効果により、ダイナミックレンジを増大することができる。図1では、N末端標識剤を用いて完全抗体に蛍光基を導入した場合の一例を示す。この実施形態では、抗原非存在下では蛍光がクエンチ（消光）される（真ん中）。抗原存在下では、クエンチが解消され、蛍光基がタンパク質から露出する（右側）。このような場合、発生する蛍光強度は、抗原濃度と正の相関関係となり得る。

[0048] N末端標識剤を用いてタンパク質タグ、受容体又は細胞接着分子に蛍光基を導入した場合、標的物質の非存在下では、タンパク質タグ、受容体又は細胞接着分子における疎水的、電気的に蛍光基と相互作用が可能な部分がクエンチャーとして働き、蛍光基の消光が起こり得る。タンパク質タグ、受容体又は細胞接着分子に対して、同色の蛍光基が複数導入された場合、さらに蛍光基間のクエンチング効果が得られる。また、タンパク質タグ、受容体又は細胞接着分子に対して、異色の蛍光基が複数導入された場合、上記のトリプトファン残基によるクエンチング、蛍光基間のクエンチングに加え、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）効果によるクエンチングの効果が得られる。さらに、蛍光基とその蛍光基を消光するクエンチャーが共存する場合には、蛍光基とクエンチャー間のクエンチング効果により、ダイナミックレンジを増大することができる。

[0049] 別の実施態様として、蛍光標識タンパク質では、標的物質の存在下において、蛍光基の消光が起こる場合もあり得る。標的物質が蛍光基と、主として疎水的、電気的に相互作用が可能な場合には、標的物質の存在下において、より消光が強まることにより生じ得る。このような場合、発生する蛍光強度は、抗原濃度と負の相関関係となり得る。

[0050] 本明細書において、N末端標識剤の製造方法は、公知の方法によることが

可能であるが、例えば、市販の蛍光基を用いる場合は、蛍光基の保護基を上記のリンカー基を含む化合物で置換する。置換された反応物が末端にヒドロキシ基を有する場合、例えば、デスマーチン試薬を用いて、デスマーチン酸化を起こすことにより、末端をアルデヒド基に置換することができる。具体的には、実施例において詳述する。

[0051] 本明細書において、蛍光の測定には、通常、蛍光検出に用いる光源や測定装置を用いることができる。光源としては励起光波長を照射できるものであればよく、具体的には、水銀ランプ、キセノンランプ、LED（発光ダイオード）、レーザー光等が挙げられる。この際、適当な蛍光フィルターを用いて特定の波長の励起光を得ることができる。蛍光測定装置としては、例えば、励起光の光源及びその照射システム、蛍光画像取得システム等を備えた蛍光顕微鏡等を利用することができ、例えば、MF20/FluoroPoint-Light（オリンパス社製）やFMBIO-III（日立ソフトウェアエンジニアリング社製）等が挙げられる。また、光源、照射システム、測定システムを備えた小型で持ち運び可能な蛍光検出装置を用いてもよい。このような小型の装置を用いることにより、被験試料の採取現場で測定が可能となる。なお、蛍光の検出は、蛍光スペクトルの検出であっても、特定の波長の蛍光強度の検出であってもよい。

[0052] また、蛍光標識タンパク質を非ヒト動物に投与した場合は、その体液や組織等を採取する他、非ヒト動物の検出対象領域・部位に励起光を照射して、蛍光色素の蛍光を2次元又は3次的に測定及び／又は検出することもでき、この場合、蛍光顕微鏡や蛍光イメージアナライザー、光源を備えた内視鏡等を使用する例を挙げることができる。また、検出の際には、内視鏡、X線、CT、MRI、超音波、顕微鏡等を用いて、非ヒト動物の個体、組織、又は細胞の構造を示す画像も合わせて取得することが好ましい。測定及び／又は検出された蛍光強度と標的物質濃度とが正の相関関係にある場合、検出された蛍光の2次元又は3次的画像に基づいて、標的物質の局在（位置）及び／又は量を知ることができ、この際前記構造を示す画像と比較することもでき

る。蛍光強度と標的物質質量とが正の相関関係にある場合、これらの蛍光の検出に際しては、蛍光標識タンパク質を含まない、又は検体を含まない測定用試料等をネガティブコントロールとして調製し、合わせて測定及び／又は検出することができる。また、上記ネガティブコントロールにおける蛍光測定値で、測定用試料における蛍光測定値を除いた、蛍光強度比を用いて、標的物質質量の測定等を行うこともできる。あるいは、蛍光強度と標的物質質量とが正の相関関係にある場合、適宜設定した閾値を越える蛍光強度が得られた場合に、測定試料中に標的物質が存在すると判定することもできる。

[0053] 本明細書において、照射する励起光及び、測定及び／又は検出する蛍光の波長は、使用する蛍光基の種類に応じて適宜選択すればよい。例えば、蛍光基にTAMRAを用いた場合は、励起光波長530nmと蛍光波長580nmを用い、蛍光基にATTO655を用いた場合は、励起光波長630nmと蛍光波長680nmを用いることができる。また、2種類の異なる蛍光基を用いる場合も、励起光波長及び蛍光波長の組合せを適宜選択して用いることができる。

[0054] [蛍光標識タンパク質の製造方法]

本発明の蛍光標識タンパク質の製造方法は、上記N末端標識剤と上記タンパク質のN末端とを反応させる工程(a)を含む。工程(a)において、上記N末端標識剤は、末端のアルデヒド基が、タンパク質のN末端に対して、還元的アミノ化反応を起こして結合することができる。工程(a)において、溶液中で上記N末端標識剤と上記タンパク質とを接触させる場合は、上記溶液のpHは、pH3～7とすることが好ましい。タンパク質の $\alpha$ アミノ基を効率的に反応させる観点から、上記溶液のpHは、pH3.5～6とすることがより好ましく、pH4～pH5.5とすることがさらに好ましく、pH4.5～pH5とすることが特に好ましい。温度条件は、例えば、1～30℃とすることができ、2～10℃が好ましく、3～5℃がより好ましい。反応時間は、例えば1分～3日とすることができ、30分～2日が好ましく、1時間～1日がより好ましい。

[0055] 本明細書において、工程（a）で用いる還元剤としては、還元的アミノ化反応を起こすことができる限り制限されないが、例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、2-ピコリンボラン等が挙げられる。効率的に反応させる観点から、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、2-ピコリンボランが好ましい。

[0056] 蛍光標識タンパク質の製造方法は、さらに精製工程（b）を含むことができる。蛍光標識タンパク質の精製方法としては、公知の方法を用いることが可能であり限定はされないが、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等が挙げられる。効率的に反応させる観点から、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過を用いることが好ましい。

[0057] [蛍光標識タンパク質を作成するためのキット]

また、本発明は、蛍光標識タンパク質を作成するためのキットであって、上記のN末端標識剤を有するキットに関する。このようなキットには、さらに還元的アミノ化反応に用いられる通常の試薬（還元剤、pH調整剤等）、器具（精製に関する器具等）、取扱説明書等を含むことができる。

## 実施例

[0058] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0059] [実施例1] 蛍光基TAMRA-Xを用いたN末端標識剤の合成

### 1. 5(6)-TAMRA-X-C8-OHの合成

図2に示されるように、5(6)-TAMRA-X-SEを用いて、5(6)-TAMRA-X-C8-OHを合成した。具体的には以下のとおりである。

10  $\mu$ Lの100mM 5(6)-TAMRA-X-SE (6-(Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-carboxamido)hexanoic acid, succinimidyl ester; Molecular Probes社製)、10  $\mu$ LのDMSO (Dimethyl sulfoxide)、100  $\mu$ Lの100mM octanolamine及び20  $\mu$ Lの100mM NaHCO<sub>3</sub>水和物を1.5mL低吸着チューブに加え、氷上で混和することで

反応させた。この反応液に2  $\mu$ Lの1M 酢酸を加えて中和し、その後140  $\mu$ Lの0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えた。この溶液から下記分取条件で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により合成物を分取し、乾燥させた。この乾燥物を所定の濃度となるようにDMSOに溶かした。671.38 (MH<sup>+</sup>, monoisotopic) の5(6)-TAMRA-X-C8-OHを得た。質量分析条件は以下のとおりである。

[0060] (HPLC分取条件)

検出器: SPD-20A (島津製作所社製)、260nm吸光度検出

カラム: Xbridge C18 5  $\mu$ m 10x50mm column (Waters社製)

移動相A: 0.1% TFA

移動相B: アセトニトリル (MeCN)

カラム温度: 30°C

グラジエント条件: 0-100% B in A for 15min

流量: 3.0mL/min

[0061] (質量分析条件)

分析装置: Voyager DE Pro (Applied Biosystems社製)

マトリックス:  $\alpha$ -CHCA in 0.1%TFA/MeCN (1:1)溶液 (10 mg/ml)

測定モード: ポジティブ

外部標準物質: angiotensin II (1046.5)

[0062] 2. 5(6)-TAMRA-X-C7-Aldehydeの合成

図2に示されるように、得られた5(6)-TAMRA-X-C8-OHを用いて、5(6)-TAMRA-X-C7-Aldehydeを合成した。具体的には以下のとおりである。

175  $\mu$ Lの2mM 5(6)-TAMRA-X-C8-OH、175  $\mu$ LのDMSO及び350  $\mu$ Lの500mM Dess-Martin試薬 (東京化成工業社製) を1.5mL低吸着チューブに加え、37°C、1時間振とうさせながらインキュベートした。750  $\mu$ Lの0.1% TFA溶液を加え、上記分取条件でHPLCにより合成物を分取し、乾燥させた。この乾燥物を100  $\mu$ Lのトリフルオロ酢酸/アセトニトリル(1:1)に溶かし、このうちの1  $\mu$ Lを用いて定量分析した。定量分析は下記定量・分析条件によるHPLCにて行った。再度、乾燥させ、この乾燥物を所定の濃度となるようDMSOに溶かした。N末端

標識剤として、669.36 (MH<sup>+</sup>, monoisotopic)の5(6)-TAMRA-X-C7-Aldehydeを得た。質量分析条件は上記のとおりである。

[0063] (HPLC定量・分析条件)

検出器：SPD-20A（島津製作所社製）、260nm吸光度検出

カラム：Xbridge C18 2.5μm 4.6x20mm IS column（Waters社製）

移動相A：0.1% TFA

移動相B：アセトニトリル（MeCN）

カラム温度：30℃

グラジエント条件：0-100% D in C for 10min

流量：1.5mL/min

[0064] [実施例2] タンパク質の蛍光標識化

1. 蛍光標識化反応（還元的アミノ化反応）

実施例1で合成したN末端標識剤を用いて、抗体のN末端の蛍光標識化を行った。

9μLの1.0mg/mL 抗体溶液、4.5μLの0.96mM 5(6)-TAMRA-X-C7-aldehyde（5% DMSO溶液）、4.5μLの192mM ピコリンボラン（18% DMSO溶液）、9μLの50mM クエン酸ナトリウムバッファー（pH4.8）を1.5mL低吸着チューブに加えた。この溶液を、4℃、24時間インキュベートすることで還元的アルキル化反応を行った。

[0065] 抗体溶液としては、以下のものを使用した。

1) 抗サイロキシン抗体（Anti-Thyroxine: HyTest社製、clone#1H1）

2) 抗インフルエンザ ヘマグルチニン抗体（Anti-Influenza Hemagglutinin: MBL社製、clone# 5D8）

3) 抗インフルエンザ ヘマグルチニン抗体（Anti-Influenza Hemagglutinin: MBL社製、clone# TANA2）

4) 抗FLAG抗体（Sigma社製、clone# M2）

5) 抗His Tag抗体（Novagen社製）

6) 抗BGP抗体由来scFv（N末端にMetAla（メチオニン及びアラニン）を付

加して大腸菌により発現)

[0066] 2. 蛍光標識タンパク質のゲルろ過

Microspin G25 column (GEヘルスケア・ジャパン社製)を用いて、得られた反応液から蛍光標識タンパク質を溶出した。

具体的には、始めにMicrospin G25 columnを、HKM平衡化バッファー (HKM バッファー (25 mM HEPES-KOH(pH7.4), 5 mM  $MgCl_2$ , 100 mM KCl)、0.1% PEG 8000 (Sigma社製)、0.05% Brij (非イオン性界面活性剤、和光純薬社製)) で平衡化した。カラムの平衡化には、300  $\mu$ LのHKM平衡化バッファーをカラムに添加し、室温、3000rpmにて1分間遠心分離した。この操作を合計4回行った。その後、上記の蛍光標識化反応で得られた反応液全量をカラムに添加して、室温、3000rpmにて1分間遠心分離することで蛍光標識タンパク質を溶出した。

[0067] 3. 蛍光標識タンパク質の蛍光測定 (抗原滴定)

(抗原溶液の作成)

抗原を純水若しくはDMSOで溶解し、 $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$ 溶液を作成した。その後、HKM バッファー若しくはDMSOを用いて、 $10^{-9}$ 溶液まで段階的に希釈した。各種抗体に対する抗原は以下のものを使用した。

1) サイロキシン抗原 (Sigma社製)

2) インフルエンザ ヘマグルチニンタグペプチド (和光純薬社製)

(抗インフルエンザ ヘマグルチニン抗体のclone# 5D8とTANA2を用いた蛍光標識タンパク質では同一の抗原を使用した)

3) FLAGペプチド抗原 (和光純薬社製)

4) His ペプチド抗原 (和光純薬社製)

5) BGPペプチド抗原 (Genscript社製)

[0068] (蛍光測定溶液の作製)

18.9  $\mu$ Lのゲルろ過後サンプルと926.1  $\mu$ LのHKM蛍光バッファー (HKMバッファー、0.1% PEG8000、0.005% Brij) とを混合し、1.5mL低吸着チューブに100  $\mu$ Lずつ計9本に分注した。その後、抗原溶液を加えないサンプルにはHKMバッ

ファーもしくはDMSOのみを1.01  $\mu$ L添加し、残りのサンプルには段階希釈した抗原溶液1.01  $\mu$ Lを添加し、軽くボルテックスにより混和し、スピンドウンし、25°C、1時間インキュベートした。その後、各蛍光標識タンパク質サンプルの95  $\mu$ Lを蛍光測定に使用した。

[0069] (蛍光測定)

これらの蛍光標識タンパク質サンプルを蛍光分光光度計 (Fluorolog-3; 堀場製作所製) を用いて蛍光強度測定を行った。蛍光基として、TAMRAを用いた場合には、励起波長 (Ex) は550nmにセットし、蛍光波長 (Em) 565~700nmでの蛍光強度を測定した。蛍光強度を比較する際は、極大波長となる580nmでの蛍光強度を使用した。

[0070] 各種の抗体を用いた蛍光標識タンパク質サンプルの蛍光強度の測定結果を図3に示す。各グラフにおいて、横軸は抗原濃度を示し、縦軸は抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を蛍光強度比として示した。

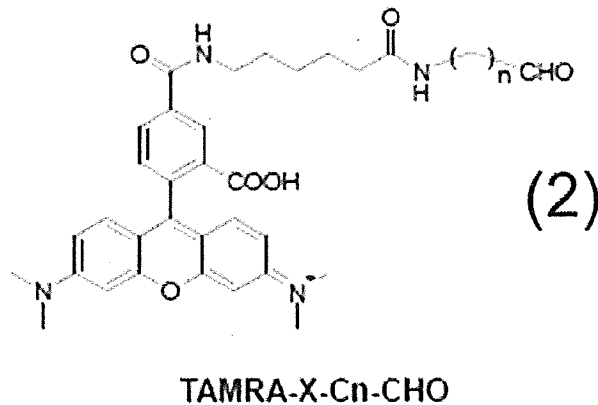
[0071] 図3に示すように、抗原の非存在下では、蛍光基はクエンチされていたが、抗原濃度が高くなるにつれ、蛍光基のクエンチが解除され、蛍光を発することが確認された。抗原未添加時の蛍光強度を1とした場合に対する、抗原添加後の蛍光強度の増幅率は、抗サイロキシン抗体を用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは1.75倍、抗インフルエンザヘマグルチニン抗体 (clone# 5D8) を用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは1.4倍、抗インフルエンザヘマグルチニン抗体 (clone# TANA2) を用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは1.2倍、抗FLAG抗体を用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは1.6倍、抗His Tag抗体を用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは1.2倍、抗BGP抗体由来scFvを用いた蛍光標識タンパク質サンプルでは2.7倍だった。

[0072] [実施例3] 種々のリンカー長を有するN末端標識剤を用いた測定

実施例1と同様の方法により、下記式(2)中、リンカー基内におけるnを2、5、7、9と変更した種々のN末端標識剤を調製した。n=2の場合

のN末端標識剤は5(6)-TAMRA-X-C2-CHO、 $n = 5$ の場合のN末端標識剤は5(6)-TAMRA-X-C5-CHO、 $n = 7$ の場合のN末端標識剤は5(6)-TAMRA-X-C7-CHO、 $n = 9$ の場合のN末端標識剤は5(6)-TAMRA-X-C9-CHOと記載する。

[0073] [化3]



[0074] 実施例2と同様の方法により、種々のリンカー長を有するN末端標識剤を用いてタンパク質の蛍光標識化を行った。

[0075] 各リンカー長の蛍光標識タンパク質サンプルを抗原と反応させ、波長550nmの励起光を照射し、蛍光分光光度計 (Fluorolog-3) を用いて蛍光スペクトルを測定した。

[0076] 各リンカー長の蛍光標識タンパク質サンプルの蛍光強度の測定結果を図4又は図5に示す。図4は、抗体溶液として抗FLAG抗体を用い、抗原としてFLAGペプチド抗原を用いた結果であり、図5は、抗体溶液として抗His Tag抗体を用い、抗原としてHisペプチド抗原を用いた結果である。

[0077] 図4に示すように、抗体溶液として抗FLAG抗体を用いた場合、上記の化学式(2)において $n = 2, 5, 7$ 又は9である場合、抗原存在下で、蛍光標識タンパク質サンプルの蛍光強度変化を検出できることが確認され、特に $n = 5, 7$ である場合に大きな蛍光強度変化が検出された。

[0078] 図5に示すように、抗体溶液として抗His Tag抗体を用いた場合、上記化学式(2)において $n = 5, 7$ である場合に、抗原存在下で、蛍光標識タンパク質サンプルの高い蛍光強度変化が検出された。

[0079] [実施例4] 種々のリンカー基を有するN末端標識剤を用いた測定

リンカー基にPEG基を有するN末端標識剤を合成した。この合成は、5(6)-TAMRA-X-SEの代わりに、TAMRA-PE08-SE (Biotium社製) を使用したことを除き、実施例3におけるTAMRA-X-G2-CHOの合成と同様にして行った。

[0080] 実施例2と同様の方法により、リンカー基にPEG基を有するN末端標識剤を用いてタンパク質の蛍光標識化を行った。抗体溶液は抗サイロキシン抗体を使用し、抗原はサイロキシン抗原を使用した。

[0081] リンカー基にPEG基を有する蛍光標識タンパク質サンプルを抗原と反応させ、波長550nmの励起光を照射し、蛍光分光光度計 (Fluorolog-3) を用いて蛍光スペクトルを測定した。

[0082] 図6に示すように、リンカー基にPEG基を有する蛍光標識タンパク質サンプルにおいても、抗原存在下で、蛍光標識タンパク質サンプルの高い蛍光強度変化を検出することが確認された。

[0083] [実施例5] 種々の蛍光基を有するN末端標識剤を用いた測定

蛍光基にFAM (Molecular Probes社製)、RhodamineRed (Molecular Probes社製)、RhodamineGreen (Molecular Probes社製)、BODIPY FL (Molecular Probes社製)、IC3 (同仁化学社製またはBiosearch Technologies社製)、ATT0655 (ATT0 Tech社製) 又はCy3 (GE Lifescience社製) を用いたN末端標識剤を合成した。抗体溶液は抗FLAG抗体を用い、抗原はFLAGペプチド抗原を用いた。FAMの場合は、アルデヒドへの酸化反応の際に、Dess-Martin試薬の濃度を500mMから15mMに減じて、反応時間を4時間に延長した。その他の条件は、上記の実施例1に準じる。

[0084] Microspin G25 columnを、クエン酸平衡化バッファー (50mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH4.8)、100mM KCl、0.1% PEG8000、0.1% Brij35) で平衡化した。300 $\mu$ LのHKM平衡化バッファーをカラムに添加し、室温、3000rpmにて1分間遠心分離した。この操作を合計4回行った。その後、1 mg/mL 抗FLAG抗体 9  $\mu$ Lと50 mM クエン酸ナトリウムバッファー(pH 4.8) 9  $\mu$ Lの混合溶液をカラムに添加して、室温、3000rpmにて1分間遠心分離してバッファー交換を行った。溶出液に、0.96 mM の各蛍光基を有するN末端標識剤 (50% DMSO

溶液) 4.5  $\mu$ Lと192 mM ピコリンボラン (18% DMSO溶液) 4.5  $\mu$ Lを添加して、4  $^{\circ}$ C、24時間インキュベートすることで還元的アルキル化反応を行った。続いて、実施例2と同様にしてゲルろ過により蛍光標識タンパク質を溶出した。

[0085] 種々の蛍光基を有する蛍光標識タンパク質サンプルを抗原と反応させ、それぞれの蛍光基の吸収極大の波長 (TAMRA 550nm、FAM 495nm、RhodamineRed 570nm、RhodamineGreen 495nm、BODIPY FL 495nm、IC3 540nm、ATT0655 650nm、Cy3 540nm) の励起光を照射し、蛍光分光光度計 (Fluorolog-3) を用いて蛍光スペクトルを測定した。各グラフにおいて、横軸は抗原濃度を示し、縦軸は抗原なしの場合の蛍光強度に対する、各抗原濃度における蛍光強度の比を蛍光強度比として示した。

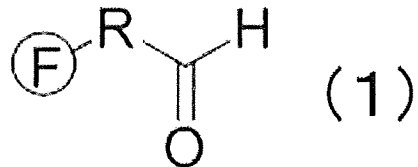
[0086] 図7に示すように、種々の蛍光基を有する蛍光標識タンパク質サンプルにおいて、抗原の非存在下では、蛍光基はクエンチされていたが、抗原濃度が高くなるにつれ、蛍光基のクエンチが解除され、蛍光を発することが確認された。

[0087] 図8に示す種々の蛍光基を有するN末端標識剤を用いた場合も、蛍光標識タンパク質サンプルが得られた。

## 請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（1）：

[化1]



（式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換基を有していてもよい、炭素数が5以上の直鎖炭化水素からなる直鎖ソフトセグメント又はその主鎖の炭素の一部が－O－、－N－、－S－、－CO－、－CONH－、－COO－又は－POO－で置換された直鎖ソフトセグメントを有するリンカー基である）で表される化合物を含む、タンパク質のN末端標識剤。

[請求項2] 前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ビフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EvoBlue系、フルオレセイン系及びこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1に記載のN末端標識剤。

[請求項3] 前記蛍光基が、カルボキシテトラメチルローダミン、カルボキシフルオレセイン、ATTO655（登録商標）及びローダミングリーンからなる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項2に記載のN末端標識剤。

[請求項4] 前記タンパク質が完全抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載のN末端標識剤。

[請求項5] 前記タンパク質が抗体のフラグメントである、請求項1～3のいずれか1項に記載のN末端標識剤。

[請求項6] タンパク質のN末端に請求項1～5のいずれか1項に記載のN末端

標識剤を用いて、前記蛍光基が導入された蛍光標識タンパク質。

[請求項7]        蛍光標識タンパク質の製造方法であって、請求項1～5のいずれか1項に記載のN末端標識剤とタンパク質のN末端とを反応させる工程（a）、

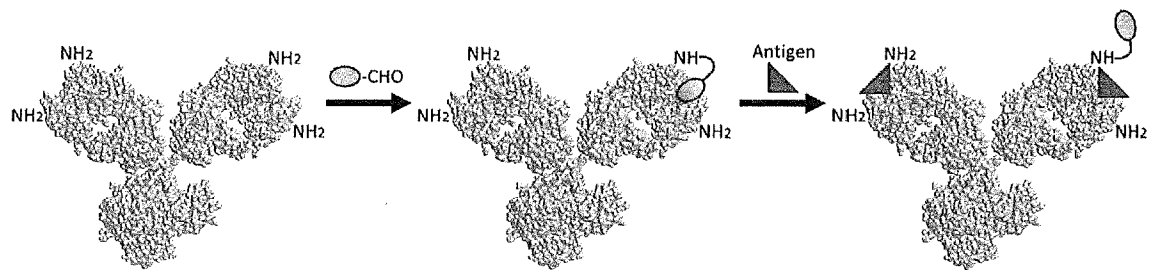
を含む、蛍光標識タンパク質の製造方法。

[請求項8]        前記工程（a）が溶液中で前記N末端標識剤と前記タンパク質とを接触させるものであり、該溶液のpHが、pH3～7である、請求項7に記載の方法。

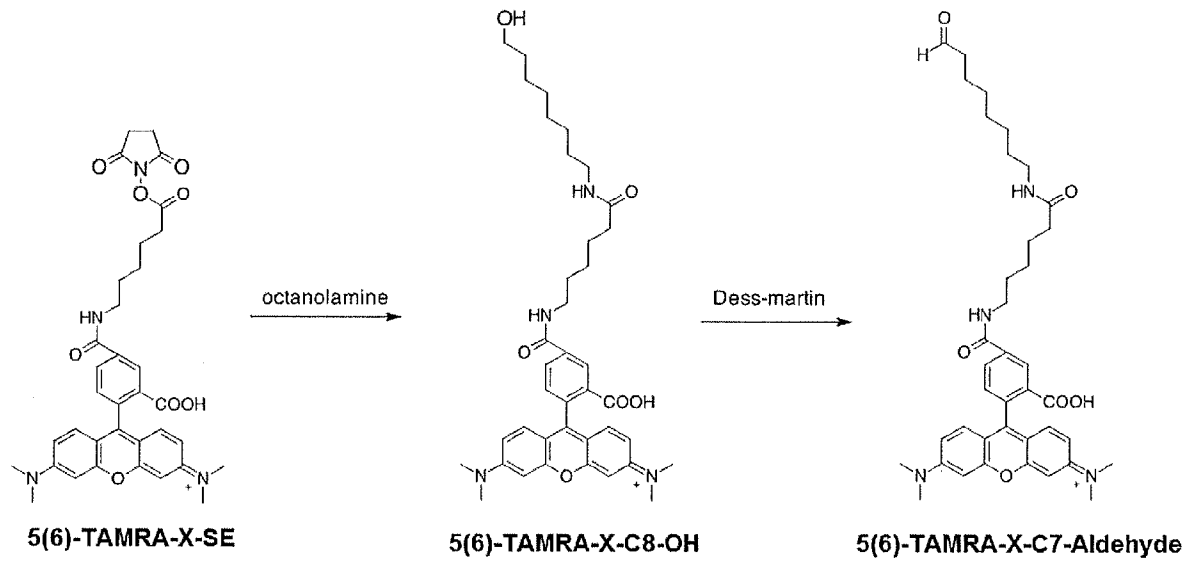
[請求項9]        前記工程（a）における前記タンパク質が完全抗体又はそのフラグメントである、請求項7又は8に記載の方法。

[請求項10]       蛍光標識タンパク質を作成するためのキットであって、  
請求項1～5のいずれか1項に記載のN末端標識剤を有する、キット。

[図1]



[図2]



[図3]

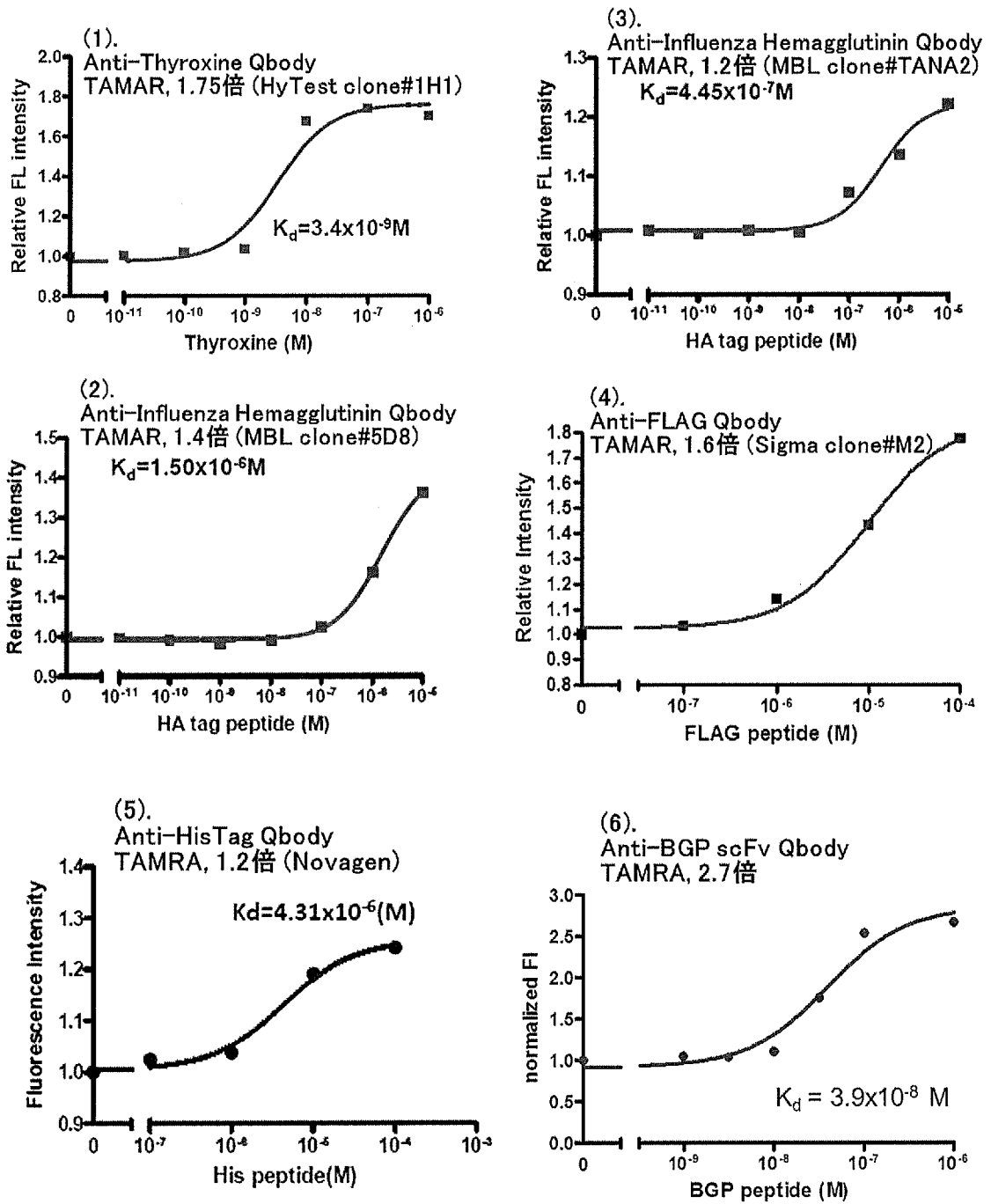


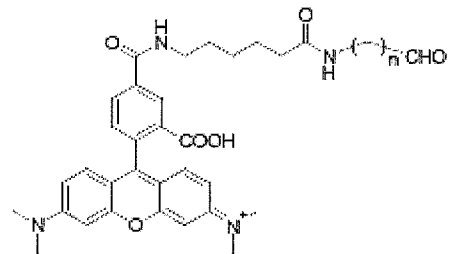
Figure 1 is a line graph showing the fluorescence intensity of the FLAG peptide as a function of its concentration. The x-axis is labeled "FLAG peptide(M)" and ranges from 0 to  $10^{-3}$  on a logarithmic scale. The y-axis is labeled "Fluorescence Intensity" and ranges from 0.9 to 1.6. The data points show a sharp increase in fluorescence intensity starting around  $10^{-5}$  M, reaching approximately 1.5 at  $10^{-4}$  M. The sample size is noted as  $n=5$ .

| FLAG peptide (M) | Fluorescence Intensity |
|------------------|------------------------|
| 0                | 1.0                    |
| $10^{-7}$        | 1.0                    |
| $10^{-6}$        | 1.02                   |
| $10^{-5}$        | 1.12                   |
| $10^{-4}$        | 1.5                    |

Figure 1 is a line graph showing the fluorescence intensity of a protein as a function of FLAG peptide concentration. The y-axis is labeled 'Fluorescence Intensity' and ranges from 0.9 to 1.6. The x-axis is labeled 'FLAG peptide(M)' and is on a logarithmic scale, ranging from 0 to  $10^{-3}$ . The data points show a sigmoidal increase in fluorescence intensity as the FLAG peptide concentration increases, starting from 1.0 at 0 M and reaching approximately 1.22 at  $10^{-4}$  M.

| FLAG peptide (M) | Fluorescence Intensity |
|------------------|------------------------|
| 0                | 1.00                   |
| $10^{-7}$        | 1.00                   |
| $10^{-6}$        | 1.08                   |
| $10^{-5}$        | 1.16                   |
| $10^{-4}$        | 1.22                   |

| His peptide (M) | Fluorescence Intensity |
|-----------------|------------------------|
| 0               | 1.00                   |
| $10^{-7}$       | 1.06                   |
| $10^{-6}$       | 1.12                   |
| $10^{-5}$       | 1.07                   |
| $10^{-4}$       | 1.15                   |



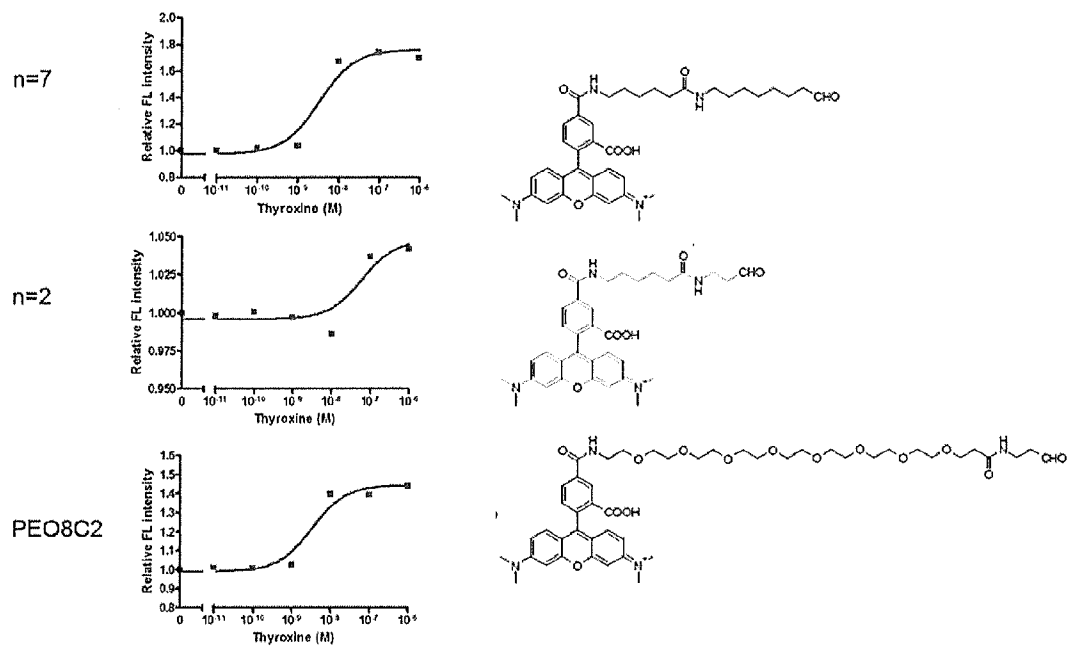
| His peptide (M) | Fluorescence intensity |
|-----------------|------------------------|
| 0               | 1.00                   |
| $10^{-7}$       | 1.02                   |
| $10^{-6}$       | 1.04                   |
| $10^{-5}$       | 1.18                   |
| $10^{-4}$       | 1.25                   |

Figure 1 is a scatter plot showing the fluorescence intensity of His peptide. The y-axis is labeled 'Fluorescence Intensity' and ranges from 0.90 to 1.10. The x-axis is labeled 'His peptide(M)' and ranges from 0 to  $10^{-4}$  M. The data points are as follows:

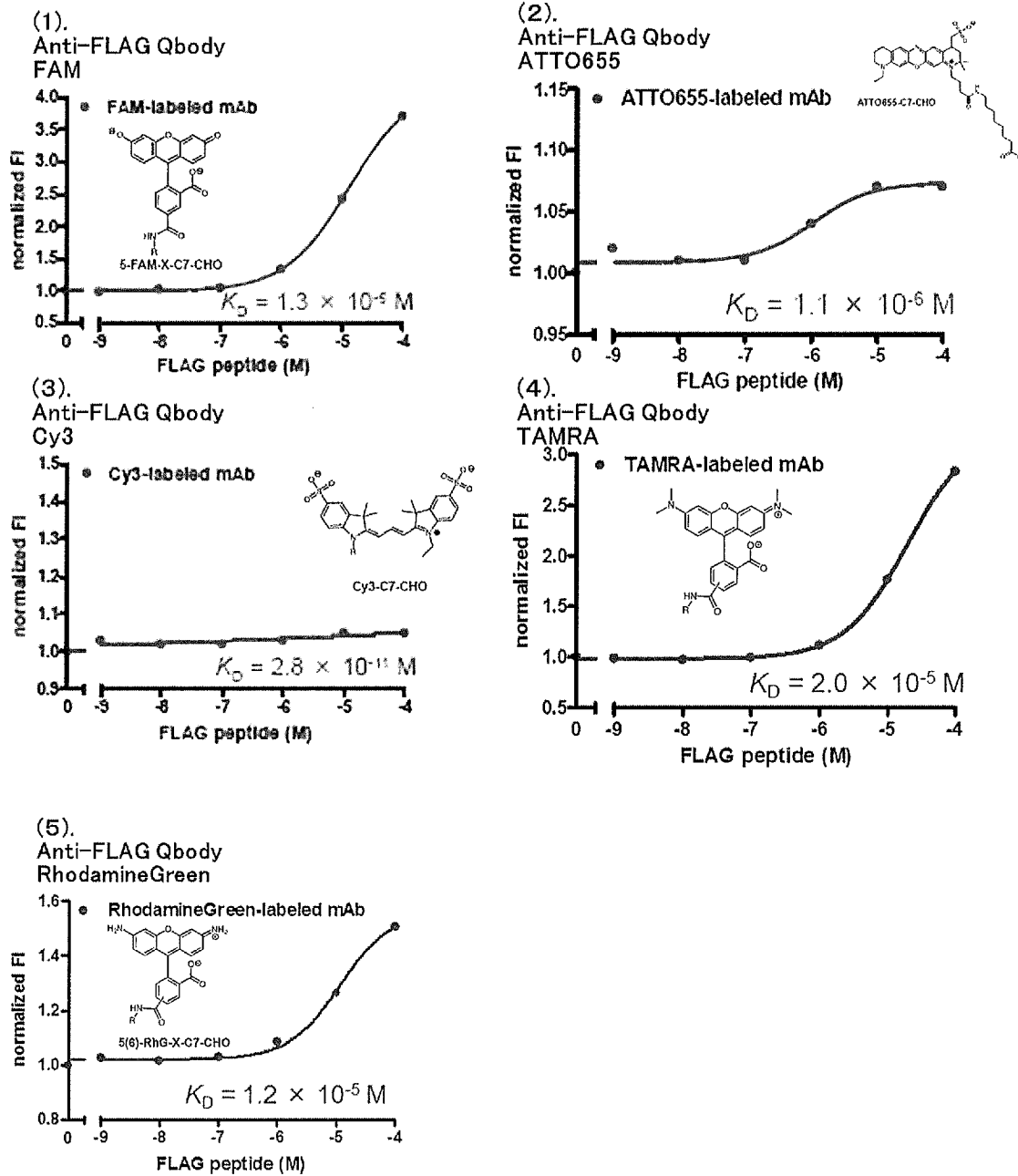
| His peptide (M) | Fluorescence Intensity |
|-----------------|------------------------|
| 0               | 1.00                   |
| $10^{-7}$       | 0.97                   |
| $10^{-6}$       | 1.02                   |
| $10^{-5}$       | 1.00                   |
| $10^{-4}$       | 1.00                   |

A horizontal line is drawn at a fluorescence intensity of 1.00. The sample size  $n=9$  is indicated on the left side of the plot.

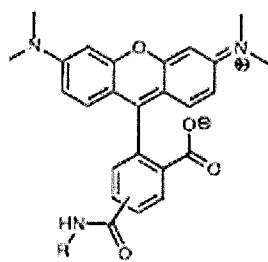
[図6]



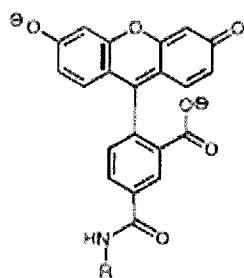
[図7]



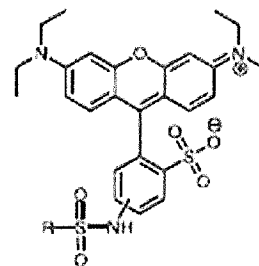
[図8]



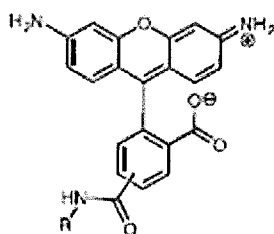
5(6)-TAMRA-X-C7-CHO



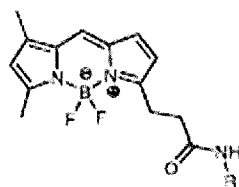
5-FAM-X-C7-CHO



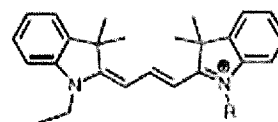
5(6)-RhRed-X-C7-CHO



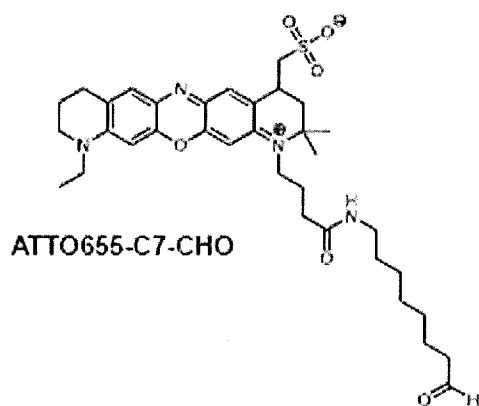
5(6)-RhG-X-C7-CHO



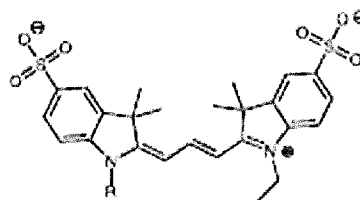
BFL-X-C7-CHO



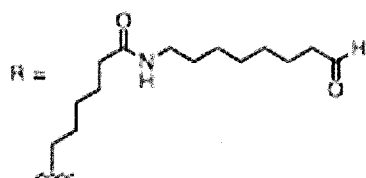
IC3-C7-CHO



ATTO655-C7-CHO



Cy3-C7-CHO



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070058

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/533(2006.01)i, C07D311/80(2006.01)i, C07K1/13(2006.01)i,  
G01N33/542(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i

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)

G01N33/533, C07D311/80, C07K1/13, G01N33/542, G01N33/58

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2016 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2016 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2016 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2005-13119 A (Japan Science and Technology Agency),<br>20 January 2005 (20.01.2005),<br>abstract; claims 3, 4; paragraphs [0009],<br>[0012], [0015], [0016], [0019], [0020], [0021],<br>[0022], [0027], [0033]<br>(Family: none) | 1-10                  |
| Y         | JP 2013-528185 A (GE Healthcare Bio-Sciences AB.),<br>08 July 2013 (08.07.2013),<br>paragraph [0004]<br>& WO 2011/149415 A1<br>page 1, lines 22 to 28<br>& US 2013/0280814 A1 & EP 2576589 A1<br>& CN 103038246 A                   | 1-10                  |

☒ 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

"T" 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  
13 September 2016 (13.09.16)

Date of mailing of the international search report  
27 September 2016 (27.09.16)

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/JP2016/070058

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | Takayoshi WATANABE, "Hi Tennen Amino-san Donyu Gijutsu o Riyo shita Tanpakushitsu no Bui Tokuiteki Shushoku Gijutsu no Kaihatsu", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 2014, vol.94th, no.3, page 938 4G5-12                                                                                                                                      | 1-10                  |
| Y         | JP 2005-501228 A (Amersham Biosciences UK Ltd.),<br>13 January 2005 (13.01.2005),<br>claims 1, 5, 7, 8, 27, 28, 29; paragraph [0029]<br>& WO 2002/099432 A2<br>claims 1, 5, 7, 8, 27, 28, 29; page 11, lines 17 to 24<br>& US 2004/0171014 A1 & EP 1399742 A2                                                                                                 | 1-10                  |
| A         | JP 4414654 B2 (The Institute for Systems Biology),<br>10 February 2010 (10.02.2010),<br>paragraphs [0050], [0055], [0060], [0087]<br>& WO 2002/093131 A2<br>page 31, lines 7 to 13; page 34, lines 1 to 25;<br>page 37, lines 15 to 29; example II<br>& JP 2005-503540 A & US 2002/0168644 A1<br>& US 2004/0110186 A1 & US 2004/0265810 A1<br>& EP 1456632 A2 | 1-10                  |
| A         | WO 2013/065314 A1 (Ushio Inc.),<br>10 May 2013 (10.05.2013),<br>paragraph [0029]; fig. 7 to 10<br>& EP 2775305 A1<br>paragraph [0030]<br>& JP 2015-193631 A & US 2014/0329228 A1                                                                                                                                                                              | 1-10                  |
| A         | JP 2014-156428 A (The University of Tokyo),<br>28 August 2014 (28.08.2014),<br>(Family: none)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-10                  |
| A         | JP 6-172312 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),<br>21 June 1994 (21.06.1994),<br>abstract; paragraph [0006]<br>(Family: none)                                                                                                                                                                                                                            | 1-10                  |
| A         | US 2009/0149631 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY),<br>11 June 2009 (11.06.2009),<br>& US 2012/0129159 A1 & US 2012/0214201 A1<br>& WO 2009/064366 A2 & WO 2013/052851 A1                                                                                                                                                                             | 1-10                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070058

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | Kensuke YOSHIKOSHI, "Shuju no Keikoki o Mochiita Niju Keiko Hyoshiki Ipponsa Kotai ni yoru Kogen no Ratio Kenshutsu", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 11 March 2015 (11.03.2015), vol.95th, no.3, page 822 1J3-33                    | 1-10                  |
| A         | Masanori MIURA, "Kaishi Codon no Kakucho ni yoru Shuju no Keiko Hyoshiki Karubonsan no Tanpakushitsu N-mattan eno Donyu", Protein Science Society of Japan Nenkai Program Yoshishu, 2009, vol.9th, page 79 1P-123                                     | 1-10                  |
| A         | Takayoshi WATANABE, "Keiko Hyoshiki Hydroxy-san o Mochiita Shinki N-mattan Tokuiteki Tanpakushitsu Keiko Hyoshikiho no Kaihatsu", Journal of Japanese Biochemical Society, 2007, Shoroku CD, page 2P-1533                                             | 1-10                  |
| P,X       | Keisuke FUKUNAGA, "Monoclonal IgG no N-mattan Sentakuteki na Keiko Hyoshiki to Kogen no Keiko Kenshutsu", Annual Meeting of the Chemical Society of Japan in Spring Koen Yokoshu (CD-ROM), 10 March 2016 (10.03.2016), vol.96th, Page.ROMBUNNO.4C5-10 | 1-10                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/533(2006.01)i, C07D311/80(2006.01)i, C07K1/13(2006.01)i, G01N33/542(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i

## 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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/533, C07D311/80, C07K1/13, G01N33/542, G01N33/58

## 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   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 6 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 6 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 6 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 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | JP 2005-13119 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.01.20, [要約] [請求項3] [請求項4] [0009] [0012] [0015] [0016] [0019] [0020] [0021] [0022] [0027] [0033] (ファミリーなし)                 | 1-10           |
| Y               | JP 2013-528185 A (ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス・アクチボラゲ) 2013.07.08, [0004] & WO 2011/149415 A1 (Page. 1 line.22-28) & US 2013/0280814 A1 & EP 2576589 A1 & CN 103038246 A | 1-10           |

☑ 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矛盾するものではなく、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

1 3 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 7 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三木 隆

2 J

3 3 1 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | 渡邊貴嘉, 非天然アミノ酸導入技術を利用したタンパク質の部位特異的修飾技術の開発, 日本化学会講演予稿集, 2014, Vol. 94th No. 3, Page. 938 4G5-12                                                                                                                                                                                           | 1-10           |
| Y                     | JP 2005-501228 A (アマシャム バイオサイエンス ユーケイ リミテッド) 2005.01.13, [請求項1] [請求項5] [請求項7] [請求項8] [請求項27] [請求項28] [請求項29] [0029] & WO 2002/099432 A2 (Claims 1, 5, 7, 8, 27, 28, 29 Page. 11 line. 17-24) & US 2004/0171014 A1 & EP 1399742 A2                                                       | 1-10           |
| A                     | JP 4414654 B2 (ザ インスティテュート フォー システムズ バイオロジー) 2010.02.10, [0050] [0055] [0060] [0087] & WO 2002/093131 A2 (Page. 31 line. 7-13, Page. 34 line. 1-25, Page. 37 line. 15-29, Example II) & JP 2005-503540 A & US 2002/0168644 A1 & US 2004/0110186 A1 & US 2004/0265810 A1 & EP 1456632 A2 | 1-10           |
| A                     | WO 2013/065314 A1 (ウシオ電機株式会社) 2013.05.10, [0029] 図7-10 & EP 2775305 A1 [0030] & JP 2015-193631 A & US 2014/0329228 A1                                                                                                                                                                   | 1-10           |
| A                     | JP 2014-156428 A (国立大学法人 東京大学) 2014.08.28, (ファミリーなし)                                                                                                                                                                                                                                    | 1-10           |
| A                     | JP 6-172312 A (和光純薬工業株式会社) 1994.06.21, [要約] [0006] (ファミリーなし)                                                                                                                                                                                                                            | 1-10           |
| A                     | US 2009/0149631 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2009.06.11, & US 2012/0129159 A1 & US 2012/0214201 A1 & WO 2009/064366 A2 & WO 2013/052851 A1                                                                                                                                | 1-10           |
| A                     | 吉越健輔, 種々の蛍光基を用いた二重蛍光標識一本鎖抗体による抗原のレシオ検出, 日本化学会講演予稿集, 2015.03.11, Vol. 95th No. 3, Page. 822 1J3-33                                                                                                                                                                                       | 1-10           |
| A                     | 三浦将典, 開始コドンの拡張による種々の蛍光標識カルボン酸のタンパク質N末端への導入, 日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集, 2009, Vol. 9th, Page. 79 1P-123                                                                                                                                                                                        | 1-10           |
| A                     | 渡邊貴嘉, 蛍光標識ヒドロキシ酸を用いた新規N末端特異的タンパク質蛍光標識法の開発, 生化学, 2007, 抄録CD, Page. 2P-1533                                                                                                                                                                                                               | 1-10           |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                            |                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| PX                    | 福永圭佑, モノクローナル IgG の N 末端選択的な蛍光標識と抗原の<br>蛍光検出, 本化学会春季年会講演予稿集 (CD-ROM), 2016. 03. 10,<br>Vol. 96th, Page. ROMBUNNO. 4C5 - 10 | 1-10           |