

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6928742号
(P6928742)

(45) 発行日 令和3年9月1日 (2021. 9. 1)

(24) 登録日 令和3年8月12日 (2021. 8. 12)

(51) Int. Cl.	F I
C O 9 B 69/10 (2006. 01)	C O 9 B 69/10 Z
G O 1 N 33/543 (2006. 01)	G O 1 N 33/543 5 9 7
G O 1 N 33/533 (2006. 01)	G O 1 N 33/533
G O 1 N 21/64 (2006. 01)	G O 1 N 21/64 F
G O 1 N 21/78 (2006. 01)	G O 1 N 21/78 C

請求項の数 7 外国語出願 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-106411 (P2016-106411)	(73) 特許権者 520094891
(22) 出願日 平成28年5月27日 (2016. 5. 27)	ミルテニー バイオテック ベー. フェー
(65) 公開番号 特開2017-2284 (P2017-2284A)	. ウント コー. カー・ゲー
(43) 公開日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)	M i l t e n y i B i o t e c B. V
審査請求日 平成31年1月24日 (2019. 1. 24)	. & C o. K G
(31) 優先権主張番号 15169549. 1	ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラー
(32) 優先日 平成27年5月28日 (2015. 5. 28)	トバッハ フリードリヒ・エーバート・シ
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)	ュトラーセ 68
	F r i e d r i c h - E b e r t - S t r
	a s s e 68, 51429 B e r g
	i s c h G l a d b a c h, G e r m
	a n y
	(74) 代理人 100114890
	弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ
	ンハルト
	最終頁に続く

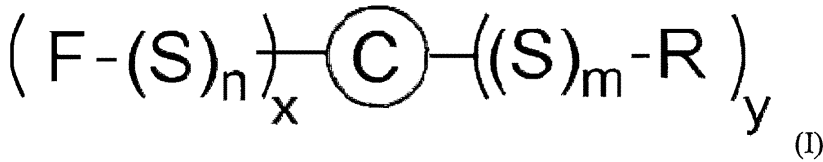
(54) 【発明の名称】 分枝鎖状ポリエーテル骨格上の蛍光色素の多量体化に基づく明るい蛍光色素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I :

【化 1】



(式中、

C は、20～200個の原子を含むコア部分であり；

S は、1～10個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；

n は、2～500の範囲の整数であり；

m は、0～500の範囲の整数であり；

x は、2～50の範囲の整数であり；

y は、1～50の範囲の整数であり；

R は、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、テトラフルオロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、スルホジクロロフェニルエステル、イミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ハロゲン化スルホニル、ハロゲン化アシル、アシルアジド、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アルデヒド、グリオキサール、マレ

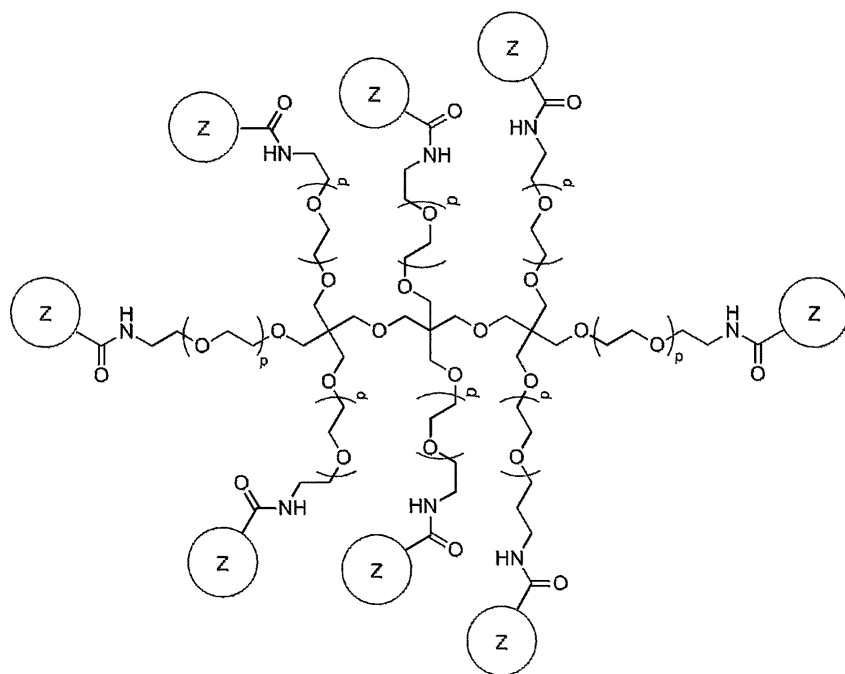
イミド、ヨードアセトアミド、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、ホスホルアミダイト、アルキン、アルキルアジド、ジエン又はアリル基からなる群から選択される反応性基を含む同一又は異なる残基であり；

F は、キサントン色素、ローダミン色素、クマリン色素、シアニン色素、ピレン色素、オキサジン色素、ピリジルオキサゾール色素及びピロメテン色素からなる群から選択される同一又は異なる蛍光体である）

による蛍光色素であって、C、S、n、m、x 及び y は、一般式 I と同じものから選択され、

一般式 (I I)

【化 2】



(II)

で示され、

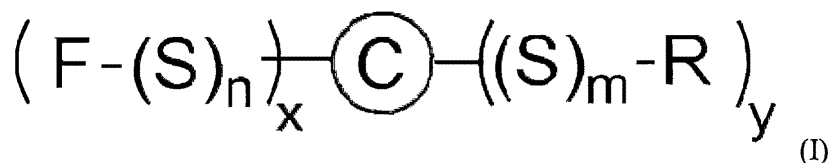
その式中、Z = F 又は R であり、且つ p = n 又は m であり、

一般式 (I I) が少なくとも 2 つの F 及び少なくとも 1 つの基 R を含むことを条件とする構造を特徴とする、前記蛍光色素。

【請求項 2】

一般式 I :

【化 3】



(式中、

C は、20 ~ 200 個の原子を含むコア部分であり；

S は、1 ~ 10 個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；

n は、2 ~ 500 の範囲の整数であり；

m は、0 ~ 500 の範囲の整数であり；

x は、2 ~ 50 の範囲の整数であり；

y は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

R は、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、テトラフルオロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、スルホジクロロフェニルエステル、イミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ハロゲン化スルホニル、ハロゲン化アシル、アシルア

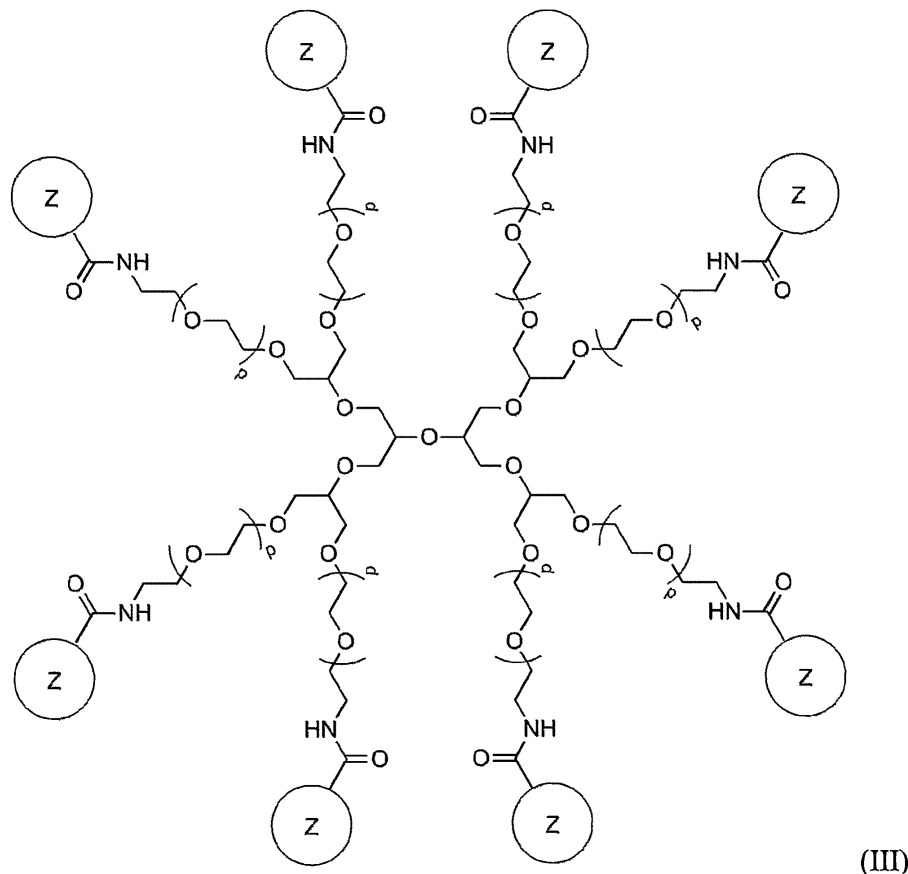
ジド、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アルデヒド、グリオキサル、マレイミド、ヨードアセトアミド、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、ホスホルアミダイト、アルキン、アルキルアジド、ジエン又はアリル基からなる群から選択される反応性基を含む同一又は異なる残基であり；

F は、キサンテン色素、ローダミン色素、クマリン色素、シアニン色素、ピレン色素、オキサジン色素、ピリジルオキサゾール色素及びピロメテン色素からなる群から選択される同一又は異なる蛍光体である）

による蛍光色素であって、C、S、n、m、x 及び y は、一般式 I と同じものから選択され、

一般式 (I I I)

【化 4】



で示され、

その式中、Z = F 又は R であり、且つ p = n 又は m であり、

一般式 (I I I) が少なくとも 2 つの F 及び少なくとも 1 つの基 R を含むことを条件とする構造を特徴とする、前記蛍光色素。

【請求項 3】

蛍光体 F がスルホン酸基、ホスホン酸基、リン酸基、スルホンアミド基、ポリエーテル基及び炭酸基からなる群から選択される 1 つ以上の水溶性付与置換基で置換される、請求項 1 又は 2 に記載の蛍光色素。

【請求項 4】

それぞれ天然又は組換え由来の、免疫グロブリン、抗体、断片化抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、s d A b、s c F v、ジ - s c F v からなる群から選択される少なくとも 1 つの生体分子に基 R を介してコンジュゲートされた請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の蛍光色素を含む、蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項 5】

ペプチド / M H C 複合体、細胞接着又は共刺激分子用の受容体、受容体リガンド、抗原

10

20

30

40

50

、ハプテン結合剤、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、アプタマー、プライマー及びリガーゼ基質からなる群から選択される少なくとも1つの生体分子に基Rを介してコンジュゲートされた請求項1から3までのいずれか1項に記載の1つ以上の蛍光色素を含む、蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項6】

少なくとも1つの生体分子が、それぞれ1～10個の蛍光体Fを含む請求項1から3までのいずれか1項に記載の蛍光体色素2～20個とコンジュゲートされている、請求項4又は5に記載の蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項7】

フローサイトメトリー及び/又は蛍光顕微鏡によって請求項4から6までのいずれか1項に記載の蛍光生体分子コンジュゲートによって標識された細胞又は組織の分析方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本発明は、向上した輝度を有する蛍光色素及びその使用方法に関する。

【0002】

抗体にコンジュゲートされた蛍光色素は、一般に、免疫蛍光分析に使用されている。抗体、蛍光色素、フローサイトメーター、フローソーター及び蛍光顕微鏡の大多数の変形は、過去20年間で、標的細胞の特異的な検出及び単離を可能にするために開発されてきた。免疫蛍光技術における問題の1つは、例えば、より良い検出器、フィルタシステム又は修飾蛍光色素によって強化され得る、蛍光放射の検出閾値である。

20

【0003】

従来の小分子蛍光色素分子の制限は、それらの制限された輝度にある。従って、生体分子は、典型的には、蛍光色素コンジュゲートの輝度を高めるために、複数の色素分子で標識される。前述の蛍光色素分子、例えば、ローダミン又はシアニンの殆どが、平面芳香族発色団を含有し、これらは、低蛍光で又は蛍光なしで色素-色素二量体につながる疎水性相互作用を起こしやすい。その結果、標識された生体分子の蛍光強度は、当該生体分子の蛍光色素標識の程度に比例しない。より高い標識度(DOL)では、単一色素の蛍光強度は、二量体、三量体又は多量体の形成によって引き起こされる自己消光機構のために更に減少する可能性がある。

30

【0004】

これらの望ましくない形成は、水溶性を増加させる平坦な芳香族色素分子に置換基を追加することによって、ある程度まで低減された。文献に記載された適切な置換基は、色素分子に電荷を付与する可能性があり、これは、例えば、米国特許第5,268,486号及び同第6,977,305号、同第6,130,101号及びPanchuk-Voloshinaら、J. Histochem. Cytochem. 47(9), 1179 (1999年)に記載されたスルホン酸基、又は例えば、WO2013056720号に記載されたリン酸基などである。他の適切な二量体化還元置換基は、嵩高い水溶性ポリマー、例えば、特許出願WO2009078970号に記載されたポリエチレングリコール、又は米国特許第6,913,743号及び同第7,655,217号に記載された荷電デンドリマーである。これらの置換色素の生体分子コンジュゲートは、非置換親色素のコンジュゲートよりも高い標識度(DOL)でより高い輝度を達成するが、まだ、非置換親色素に関してより高いDOLでも、蛍光強度と標識生体分子の標識度との間に線形比例からのずれが存在する。

40

【0005】

コンジュゲートの輝度は、また、生体分子の活性を失うことなく機能化し得る、生体分子上で利用可能な官能化部位の数によって制限される。結果として、生体分子コンジュゲートのDOLはまだ制限されており、例えば、抗体(IgG)について、それらは、典型的には、親水性標識の場合で4～8の範囲である(R. P. Haugland, Current Protocols in Cell Biology (2000年) 16.5.1～16.5.22)。結果として、これらのコンジュゲートの

50

輝度は、まだ、例えば、フィコエリトリン（P E）又はアロフィコシアニン（A P C）などのフィコビリタンパク質のコンジュゲートよりも劣っている。

【0006】

フィコビリタンパク質とその生体分子コンジュゲートの高い蛍光強度は、フィコビリタンパク質内の複数の蛍光体サブユニットの存在に起因する。R - フィコエリトリンは、例えば、34個のフィコビリタンパク質サブユニットを含有する（A. N. Glazer, J. Appl. Phycol. 6, 105（1994年））。従って、P E又はA P Cなどのフィコビリタンパク質の生体分子コンジュゲートは、非生理的な溶媒、温度、及びp H値に対する限定された安定性、並びにそれらの限定された光安定性及びそれらの一般的に制限された貯蔵寿命などのそれらのタンパク質の性質に由来する欠点にもかかわらず、例えば、フローサイトメトリーにおいてよく知られている。別の欠点は、単一の蛍光アッセイ内での多重化機能を制限する異なる色の入手可能性が制限されていることである。

10

【0007】

励起蛍光体の自己消光を防止する精密な超分子構造中に蛍光団を配置することにより、フィコビリタンパク質のような蛍光特性を有する多発色団構造を構築しようとする試みがなされてきた。Benvenisteら、J. Am. Chem. Soc. 129(7), 2025（2007年）は、超分子DNAテンプレートにインターカレートされた蛍光色素について記載している。しかしながら、この方法の欠点は、DNA骨格内での蛍光体の非共有結合である。DNA骨格のうち色素分子の移行は、蛍光信号の損失につながり得る。多色実験の場合、異なって標識されたDNA骨格間での色素交換は偽陽性の蛍光シグナルにつながる可能性がある。複数の色を利用するマルチパラメータ実験の場合、共有結合した蛍光体を使用することが望ましい。

20

【0008】

生体分子標識用の明るい蛍光色素の別のクラスは、例えば、米国特許第8,158,444号、同第8,354,239号、及び同第8,802,450号及び同第8,362,193号、同第8,455,613号、及び同第8,575,303号に記載されたポリフルオレンなどの、半導体ポリマーに基づく蛍光ポリマーである。これらのポリマーは、複数の蛍光体サブユニットも含んでおり、ポリマー内の有効共役長は9～10モノマーサブユニットに限定されている。

【0009】

水溶性骨格における従来の蛍光色素分子の多量体化によるより明るい蛍光色素の製造は、これまでに、生体分子の標識にとって有用な化合物をもたらしていない。例えば、デキストランの蛍光標識に関する推奨は、3000 MW範囲のデキストラン当たり0.3～0.7色素分子、10,000 MW範囲で0.5～2色素分子、40,000 MW範囲で2～4色素分子及び70,000 MW範囲で3～6色素分子である。それらの大きなサイズと嵩高さのために、これらの色素多量体は、生体分子の標識に利益を提供せず、また、フィコビリタンパク質様の蛍光強度を有する生体分子コンジュゲートを製造するには不適切である。より高い標識度で蛍光標識されたデキストランは、色素-色素相互作用のために消光を示す。これは、米国特許第5,719,031号での使用を見出し、その際、デキストラン蛍光色素コンジュゲートの標識度は、蛍光消光を供給するのに十分に高い。デキストラン蛍光色素コンジュゲートの酵素分解は、酵素消化過程の定量化のために使用される蛍光発光シグナルの増強を伴う。

30

40

【0010】

フィコビリタンパク質と蛍光ポリマーを制限せずにフィコビリタンパク質様の蛍光強度をもたらす、生体分子を標識するための改良された蛍光色素に対するかなりの必要性が依然として残っている。

【0011】

概要

従って、本発明の課題は、高い蛍光強度、低い非特異的バックグラウンド染色及び固定化に対する安定性を有する蛍光色素標識を提供することであった。

50

【 0 0 1 2 】

驚くべきことに、マルチアームポリエチレングリコールなどの分枝鎖状ポリエーテル骨格（scaffold）上で多量体化した蛍光色素が、顕著な消光なしで高度に蛍光性であることが判明した。また、ポリエーテル骨格は、蛍光色素の非特異的に結合する傾向を減少させられると思われる。

【 0 0 1 3 】

一態様では、本発明は、光安定性と、温度、pH、及び溶媒などの異なる環境条件に対する安定性に関して、蛍光色素標識の特性を調整することが可能である。本発明の別の態様では、広い範囲の異なる励起及び発光波長が提供される。本発明の別の態様では、生体分子蛍光色素コンジュゲート中に存在する蛍光体サブユニットの数が多いにも関わらず、生体分子活性の保持がもたらされる。

10

【 0 0 1 4 】

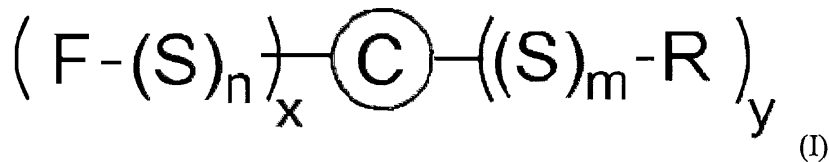
本発明では、活性又は増加した非特異的結合の損失なしに、高程度の蛍光体標識を生体分子に導入することが可能である。例えば、抗体の場合、10を上回る、好ましくは15以上の蛍光体DOLが達成され、その結果、フィコビリタンパク質コンジュゲート様の蛍光強度と低い非特異的バックグラウンド染色とを有する抗体蛍光色素コンジュゲートがもたらされる。

【 0 0 1 5 】

従って、本発明の対象は、一般式Ⅰ：

【 化 1 】

20



（式中、

Cは、20～200個の原子を含むコア部分であり；

Sは、1～10個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；

nは、2～500の範囲の整数であり；

mは、0～500の範囲の整数であり；

30

xは、2～50の範囲の整数であり；

yは、1～50の範囲の整数であり；

Rは、生体分子との共有結合を形成可能な反応性基を含む同一又は異なる残基であり；

Fは、 $(S)_n$ に共有結合した同一又は異なる蛍光体である）

による蛍光色素である。

【 0 0 1 6 】

コア部分Cは、ポリエーテル残基 $(S)_n$ 及び $(S)_m$ のための複数 $(x+y)$ 個の結合点を提供する。Rは、抗原のような細胞構造を認識する生体分子と共有結合を形成可能な反応性基を含む。

【 0 0 1 7 】

40

様々な例示的な詳細を、ここで、以下の図を参照して説明する：

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 a ～ 1 e は、以下のものとコンジュゲートしたCD4抗体（クローンVit 4）で染色された末梢血単核細胞（PBMC）の、フローサイトメトリーによって測定されたドットプロットの比較を示す：図 1 a フルオレセインイソチオシアネート（FITC）；図 1 b 分枝状PEGで多量体化されたフルオレセイン（PEG-FAM）；図 1 c アレクサフルオロ488（AF488）；図 1 d 分枝状PEGで多量体化されたアレクサフルオロ488（PEG-AF488）、又は（1 e）R-フィコエリトリン（PE）。

50

【図2】図2は、FITC、分枝鎖状PEG上で多量体化されたフルオレセイン(PEG-FAM)、アレクサフルオロ488(AF488)、分枝鎖状PEG上で多量体化されたアレクサフルオロ488(PEG-AF488)又はPEとコンジュゲートしたCD4抗体(クローンVit4)で染色した5つの異なるドナーのTヘルパー細胞(CD4強陽性)の、フローサイトメトリーによって測定された中央値蛍光強度(MFI)及び染色指数(SI)を示す。

【図3】図3は、従来のフルオレセインイソチオシアネート(FITC)にコンジュゲートされたヒトCD4に対する抗体(クローンVit4)による染色と比較して、CD4に対する前記抗体にコンジュゲートされた8分枝状ポリエチレングリコール(PEG-FAM)上で多量体化されたフルオレセインに関するTヘルパー細胞の染色における増加しているDOLの効果を示す。抗体染色濃度は、全ての場合において3 µg/mlである。

10

【図4】図4aは、CD4-PEG-FAM染色された非固定化及びメタノール固定化Tヘルパー細胞のヒストグラムプロットを示し；図4bは、CD4-PE染色された非固定化及びメタノール固定化Tヘルパー細胞を示す。

【0019】

全ての図において、PEGサブユニットを有する蛍光色素は、本発明によるものである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

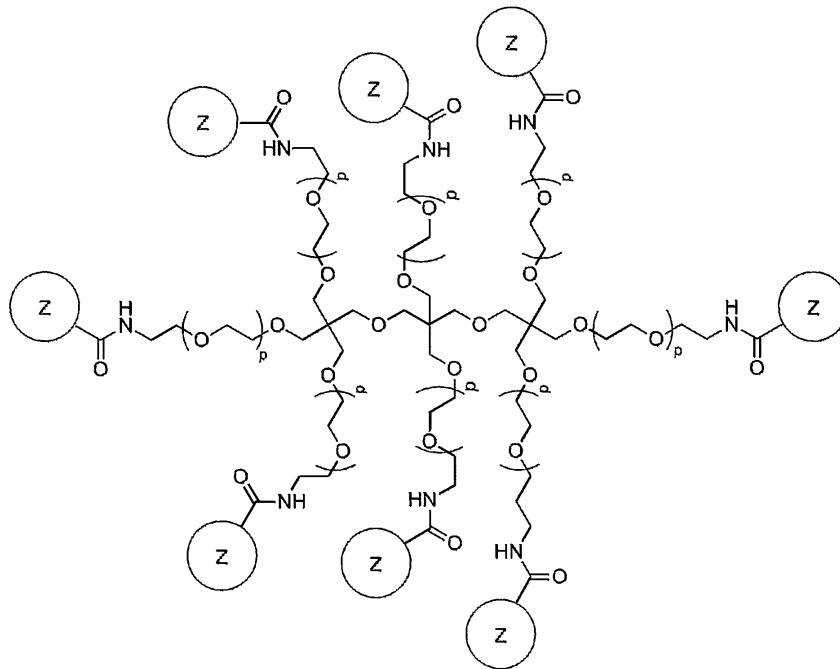
20

本発明による蛍光色素は、当業者に公知であり且つ本特許出願の実施例に更に開示されているような標準的な化学物質によって製造することができる。

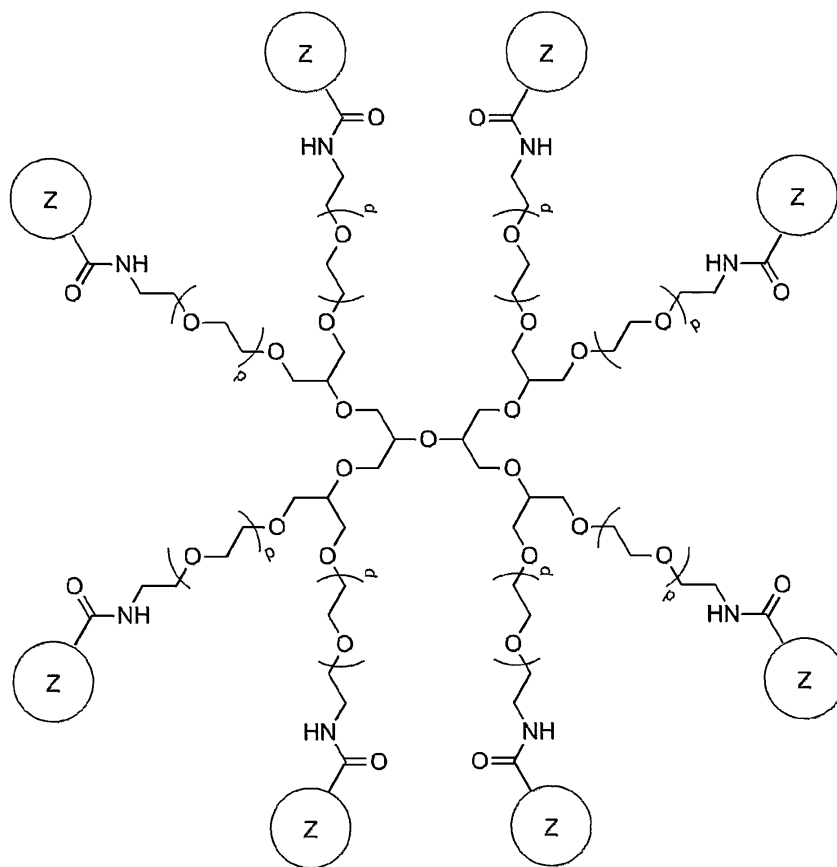
【0021】

例として、本発明による好ましい蛍光色素を、以下の一般式I I及びI I Iに示す：

【化 2】



(II)



(III)

【 0 0 2 2 】

式 (I I) 及び (I I I) において、Zは、F 及び R のうち少なくとも1つであり、p は、n 及び m のうち少なくとも1つである (それぞれのポリエーテル枝がF 又は R に結合するかどうかに依存するが、但し、少なくとも2つのF 及び少なくとも1つの基 R が含まれることを条件とする)。F、R、n 及び m は既に関示されているような意味を有する。

【 0 0 2 3 】

蛍光体 F

10

20

30

40

50

本発明で使用される蛍光体 F は、ポリエーテル骨格を介してコア部分 C に結合 (couple d) され、また、如何なる有機蛍光色素分子であってよい。典型的には、かかる蛍光体は、有機色素レーザーにおけるレーザー色素としての使用を見出されている。生体分子にコンジュゲートされ得る置換されたバージョンは、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡における標識としての使用を見出されている。

【0024】

好ましくは、蛍光体 F は、キサンテン色素、ローダミン色素、クマリン色素、シアニン色素、ピレン色素、オキサジン色素、ピリジルオキサゾール色素及びピロメテン色素からなる群から選択される。

【0025】

本発明の変形例では、蛍光体 F はスルホン酸基、ホスホン酸基、リン酸基、ポリエーテル基、スルホンアミド基及び炭酸基からなる群から選択される 1 つ以上の水溶性付与置換基で置換されている。サーモフィッシュサイエンティフィック社によって提供されるアレクサフルオロファミリーの色素などのスルホン酸置換基を有する蛍光色素を使用することが特に有利である。蛍光体当たりのスルホン酸置換度は、即ち、ローダミン色素又はシアニン色素の場合、2 以上であり得る。非スルホン化色素と比べたスルホン化色素の使用は、図 2 に見られるようなポリエーテル骨格上に多量体化された蛍光体の更に明るいコンジュゲートをもたらす：分枝状 PEG 上で多量体化されたアレクサフルオロ 488 (PEG-AF488) の CD4 コンジュゲートで染色された T ヘルパー細胞は、分枝状 PEG 上で多量体化されたフルオレセイン (PEG-FAM) の CD4 コンジュゲートで染色された T ヘルパー細胞 (平均 MFI 55) のほぼ 2 倍明るい (平均 MFI 98)。

【0026】

蛍光体 F は、当該技術分野で公知の方法によって、即ち、アミノ末端基を有する分枝鎖状ポリエーテル骨格を有するアミノ基又はチオール基に対して反応性の基を有する蛍光色素を反応させることによって、ポリエーテル骨格に結合させることができる。

【0027】

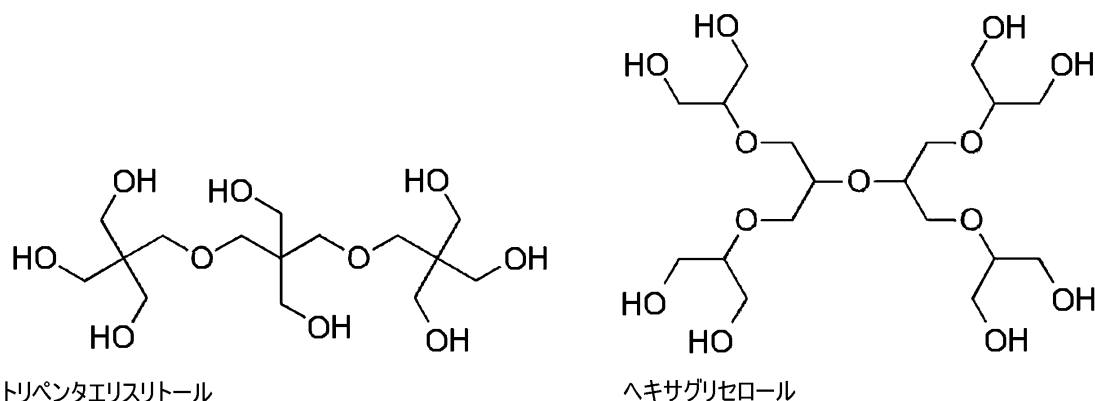
コア部分 C

コア部分 C は、 $x + y$ 個のポリエーテル残基 (S)_n 及び (S)_m の結合を可能にする、1 ~ 100 個の炭素原子を含む任意の構造であってよい。

【0028】

本発明にとって有用なコア部分は、ポリヒドロキシ化合物、ポリアミノ化合物及びポリチオ化合物である。好ましいのは、ポリヒドロキシ化合物、例えば、エーテル結合を介する 3 ~ 4 個のポリエーテル残基のための結合点として 4 つのヒドロキシル基を有するペンタエリスリトール、エーテル結合を介する 3 ~ 6 個のポリエーテル枝のための結合点として 6 つのヒドロキシル基を有するジペンタエリスリトール、エーテル結合を介する 3 ~ 8 個のポリエーテル枝のための結合点として 8 つのヒドロキシル基を有するトリペンタエリスリトール又はヘキサグリセロールである。

【化 3】



【0029】

ポリエーテル残基 S

ポリエーテル残基 $(S)_n$ 及び $(S)_m$ は、モノマーサブユニット S 当たり 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 4 個の酸素原子をそれぞれ有し得るエーテルモノマー単位 S からなる。これらのポリエーテル枝は、ホモポリマー又はコポリマー、即ち、交互又はブロックコポリマーであり得る。ポリエーテル残基 $(S)_n$ 及び $(S)_m$ は、特に、2 つ以上の酸素原子を有するモノマー単位 S が使用される場合、直鎖状又は分枝鎖状であってよい。本発明の好ましい実施態様では、ポリエーテル残基は、ポリエチレングリコール鎖を含む、即ち、S は残基 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ を表し、n、m は独立して 10 ~ 200 の範囲の整数である。

【0030】

本発明の特に有用な実施態様では、市販のマルチアームポリエチレングリコール（分枝状 PEG）は、コア部分及びポリエーテル枝を含む骨格として働く。マルチアームポリエチレングリコールは、例えば、Nanocs Inc. 又は NOF 社によって市販されている。

【0031】

反応性基 R

本発明による蛍光色素は、反応性基を含む基 R を介して生体分子に結合される。基 R は、アミノ基及びチオール基のような官能基を用いて、生体分子の反応性基を介して共有結合を形成することができるものとする。R 又は $(S)_m / (S)_n$ のいずれかは、それぞれの他の基と共有結合を形成し得るサブユニットを含む。例えば、ポリエーテル基 $(S)_m / (S)_n$ は、例えば、カルボキシ官能基を含む R 基と反応し得るアミノ末端基と一緒に市販されている。当業者であれば、適切な化学物質を選択するのは困難ではない。かかる反応性基を含む R の例は、例えば、活性エステル、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、テトラフルオロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、スルホジクロロフェニルエステル、イミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ハロゲン化スルホニル、ハロゲン化アシル、アシルアジド、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アルデヒド、グリオキサール、マレイミド、ヨードアセトアミド、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、ホスホルアミダイト、アルキン、アルキルアジド、ジエン又はアリル基である。

【0032】

共有結合の形成は、適切な反応性基を有する反応性基質と反応可能な官能基である反応性基 R を介しても可能である。カップリング反応に適した官能基は、例えば、アミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、又はカルボキシル基から構成され得る。

【0033】

なお、蛍光体同士がくっつかないようにして、色素 - 色素相互作用を防止するために、低反応性の更なる反応性基 R' をポリエーテル枝に使用することも考えられる。これらの低反応性基 R' は水素原子、アルキル基、トリフルオロアルキル基、アリール基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基、スルホンアミド基、又はこれらの組み合わせであってよい。上記反応性基 R の少なくとも 1 つは、本発明による蛍光色素の性能にとって必要である。

【0034】

蛍光生体分子コンジュゲート

本発明の別の対象は、それぞれ天然又は組換えによる、免疫グロブリン、抗体、断片化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、sdAb、scFv、ジ-scFv からなる群から選択される少なくとも 1 つの生体分子に対して基 R を介してコンジュゲートされた既に開示されているような 1 つ以上の蛍光色素を含む蛍光生体分子コンジュゲートである。

【0035】

本発明の生体分子コンジュゲートは、生体分子と蛍光色素の反応性基 R との反応によってか、又は活性化された生体分子と蛍光色素の適切な官能基 R との反応によって製造される。

【 0 0 3 6 】

本発明の蛍光色素とのコンジュゲートに適した生体分子は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、核酸、脂質、及びこれらの組み合わせであってよい。これらの生体分子は、分析物、細胞表面マーカー、抗原などを標識、検出及び定量するために、前記分析物、細胞表面マーカー、抗原などの結合パートナーと結合することができる。

【 0 0 3 7 】

断片化された抗体は、これらの種類の分子を含む共有結合及び非共有結合コンジュゲートを含む組換え手法によって合成され得る。

【 0 0 3 8 】

本発明の一実施態様では、生体分子は、ペプチド / M H C 複合体、細胞接着又は共刺激分子用の受容体、受容体リガンド、抗原、ハプテン結合剤、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、アプタマー、プライマー及びリガーゼ基質からなる群から選択される。好ましくは、受容体は、例えば、細胞接着又は共刺激分子用の部分であり、ハプテン結合剤は、アビジン、ストレプトアビジン又はニュートラビジンである。核酸は、例えば、アプタマー、プライマー、又はリガーゼ用の基質であってよい。

10

【 0 0 3 9 】

蛍光体標識された分枝鎖状ポリエーテル骨格で標識されたビオチン結合剤、例えば、アビジン、ストレプトアビジン又はニュートラビジンは、ビオチン化された一次検出分子の更に倍増した多重ビオチン化の効果により、前記一次検出分子を介して高感度の検出を可能にする。

20

【 0 0 4 0 】

本発明の一実施態様では、生体分子は、それぞれ 4 ~ 6 個の蛍光体基を有する 2 ~ 7 個の蛍光ポリエーテル標識を有する I g G 抗体であり、その結果、抗体分子当たり 8 ~ 4 0 個の色素分子の蛍光体 D O L、好ましくは 1 0 を上回る蛍光体単位の蛍光体 D O L、最も好ましくは 1 5 以上の蛍光体単位の D O L が得られる。

【 0 0 4 1 】

本発明の更に別の実施態様では、生体分子コンジュゲートは 1 つ以上の蛍光色素を含み、その際、少なくとも 1 つの生体分子は、包括的に、それぞれ 1 ~ 1 0 個の蛍光体 F を含む 2 ~ 2 0 個の蛍光色素とコンジュゲートされている。2 つ以上の蛍光色素が生体分子コンジュゲートに存在することが好ましい。

30

【 0 0 4 2 】

産業上の利用可能性

本発明の生体分子コンジュゲート及び / 又は蛍光色素は、特に、生体分子コンジュゲートにより認識される特定のセットの抗原を利用する細胞の検出、計数又は分離に有用である。

【 0 0 4 3 】

従って、本発明の別の対象は、フローサイトメトリーによる及び / 又は蛍光顕微鏡による、本発明による蛍光生体分子コンジュゲートによって標識された細胞又は組織の分析方法である。結果的に、本方法は、上記のような蛍光生体分子コンジュゲートで標識すること、及びフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡のうち少なくとも 1 つを実行することを含み得る。

40

【 0 0 4 4 】

本発明の別の実施態様では、標識された細胞の 1 つ以上の集団が試料から検出され、標的細胞として分離される。好ましくはコンジュゲートにより検出された細胞は、静電気力、圧電力、機械的分離又は光音響手段により試料から分離される。このような分離に適しているのは、特に、フローソーターであり、例えば、E P 1 4 1 8 7 2 1 5 . 0 号又は E P 1 4 1 8 7 2 1 4 . 3 号に開示されているような、F A C S 又は M E M S ベースのセルソーターシステムである。

【 0 0 4 5 】

本発明の別の実施態様では、細胞又は組織試料における生体分子コンジュゲートの結合

50

標的の位置が蛍光顕微鏡によって決定される。蛍光顕微鏡の適切な方法としては、落射蛍光顕微鏡、共焦点レーザー走査型顕微鏡、多光子顕微鏡、全内部反射蛍光（TIRF）顕微鏡、単一平面照明顕微鏡（SPIM）及び超解像顕微鏡法、例えば、発光枯渴刺激（STED）顕微鏡、確率的光学再構成顕微鏡（STORM）、光活性化局在性顕微鏡（PALM）、又は鉛直型空間変調照明（SMI）顕微鏡が挙げられる。

【0046】

実施例

実施例 1

工程 A：8 アーム PEG 上で多量体化された AF488（PEG-AF488）の調製
アミノPEG（8 アーム）を、10 mg/mL の濃度で pH 7 の 0.5 M の PBS 緩衝液に溶解させた。DMSO（2 mg/mL）に溶解した AF488、NHS エステルを、20 倍のモル過剰で添加し、暗所で 30 分間室温でインキュベートした。遊離色素を、標準的な条件下で SEC により除去した。生じた PEG-AF488 は、5.7 の DOL を有していた。

10

【0047】

PEG-FAM は、NHS-フルオレセイン（NHS-FAM）を使用して同様の手順によって得られる。

【0048】

工程 B：CD4 抗体と PEG-AF488 とのカップリング

工程 A で得られた PEG-AF488（リン酸緩衝生理食塩水中で 2.5 mg/mL）を、10 倍モル過剰の SMCC を加えて、室温で 1 時間インキュベートすることにより活性化した。平行して、CD4 抗体（クローン Vlt4）を、10 ミリモル/L ジチオスレイトールと 1 時間反応させることによって還元した。マレイミド活性化 PEG-AF488 及び還元された抗体の両方に、セファデックス G25 上で 2 mM の EDTA を含有する pH 7.2 のリン酸緩衝生理食塩水との緩衝液交換を行った。マレイミド活性化 PEG-AF488 を添加して、15 倍過剰で抗体を還元し、暗所にて室温で 1 時間インキュベートした。反応生成物を SEC により精製する。得られた CD4-PEG-AF488 は、13.2 の DOL を有していた。

20

【0049】

CD4 を、同じプロトコルを使用して PEG-FAM に結合させる。

30

【0050】

工程 C：8 アーム PEG 上で多量化した蛍光色素にコンジュゲートされた CD4 抗体による PBMC の染色

染色実験のために、 10^6 個の末梢血単核細胞（PBMC）を、それぞれ、2 mM の EDTA 及び 0.5 % の BSA を含有する 100 μ l のリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。細胞を、3 μ g/mL で、工程 B で得られたそれぞれの CD4 抗体コンジュゲートを用いて染色し、室温で 10 分間インキュベートする。対比染色を、死細胞の排除のために CD3-APC 及びヨウ化プロピジウムを用いて行う。

【0051】

R-フィコエリトリン（PE）又は非多量体化蛍光色素 FITC 又は AF488 とコンジュゲートされた市販の CD4 抗体を、比較のために使用する。

40

【0052】

細胞を、暗所にて室温で 10 分間インキュベートする。洗浄を、2 mM の EDTA 及び 0.5 % BSA を含有する 1 mL のリン酸緩衝生理食塩水中で遠心分離し、再懸濁することにより行う。染色した細胞を MACS Quant 10 アナライザで分析する。図 1 は、以下を使用する側方散乱（SSC）に対する蛍光強度のドットプロットの例を示す：図 1 a フルオレセインイソチオシアネート（FITC）；図 1 b 分枝状 PEG（PEG-FAM）で多量体化されたフルオレセイン；図 1 c アレクサフルオロ 488（AF488）；図 1 d 分枝状 PEG（PEG-AF488）で多量体化されたアレクサフルオロ 488、又は（1 e）フローサイトメトリーによって測定された R-フィコエリトリン

50

ン (P E)。

【 0 0 5 3 】

図 2 は、5 人のドナーの P B M C に関する中央値蛍光強度 (M F I) と染色指数 (S I) の結果を示す。

【 0 0 5 4 】

本発明による蛍光色素で標識された抗体で染色された細胞は、親蛍光色素で標識された抗体で染色された細胞の少なくとも 2 倍明るく、フィコビリタンパク質標識抗体 (C D 4 - P E) で標識された細胞と同等である。図 3 は、従来のフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) にコンジュゲートされているヒト C D 4 (クローン V i t 4) に対する抗体を用いた染色と比較して、前記抗体にコンジュゲートされた 8 分岐ポリエチレングリ

10

【 0 0 5 5 】

これは、特に、蛍光色素も A F 4 8 8 (アレクサフルオロ) としてスルホン化されている場合に有利である。8 アーム P E G (P E G - A F 4 8 8) 上で多量体化された A F 4 8 8 で標識された得られた抗体コンジュゲートは、8 アーム P E G 上で多量体化されたフルオレセインから作られた対応するコンジュゲートの約 2 倍明るい。

【 0 0 5 6 】

実施例 2 : メタノール固定化の染色強度への影響

20

末梢血単核細胞を、対比染色としてヨウ化プロピジウムを除き、実施例 1 に記載されているように染色する。メタノール固定化のために、1 m L のメタノールを 1 0 0 μ L の細胞懸濁液に添加し、氷上で 3 0 分間インキュベートする。細胞を 2 回洗浄し、2 m M の E D T A 及び 0 . 5 % の B S A を含有する 1 m L のリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。染色して固定化した細胞を、非固定化細胞と比較して M A C S Q u a n t 1 0 アナライザで分析する。図 4 a 及び 4 b は、C D 4 - P E G - F A M 染色した非固定化及びメタノール固定化 T ヘルパー細胞 (図 4 a) と、C D 4 - P E 染色した非固定化及びメタノール固定化 T ヘルパー細胞 (図 4 b) とのヒストグラムプロットを示す。C D 4 - P E G - F A M の蛍光強度は、メタノール固定化に対して安定であり、一方、C D 4 - P E の蛍光強度は、5 倍の減少を示す。

30

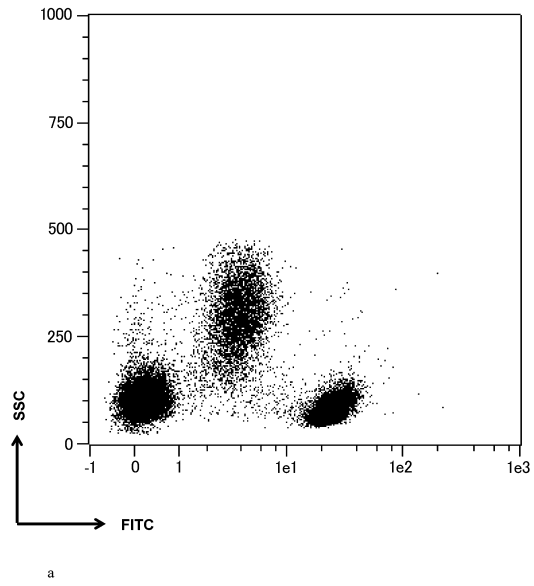
【 0 0 5 7 】

従って、本発明の蛍光生体分子コンジュゲート及び / 又は蛍光色素は、固定化などの環境の影響に対して改善された安定性を示す。

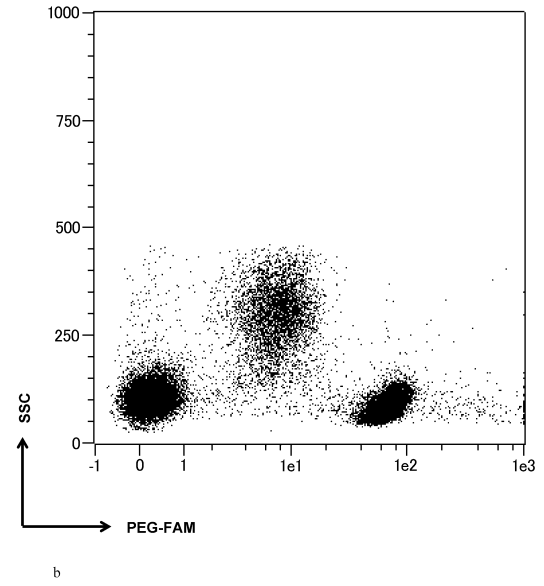
【 0 0 5 8 】

様々な詳細を、上記に概説された例示的な実施、様々な代替、修正、変形、改良、及び / 又は実質的な同等物に関連して説明してきたが、公知であるか又は現在予期されていない又は予期されない可能性があるか否かは、前述の開示を検討する際に明らかになり得る。従って、上記の例示的な実施は、限定ではなく例示することが意図されている。

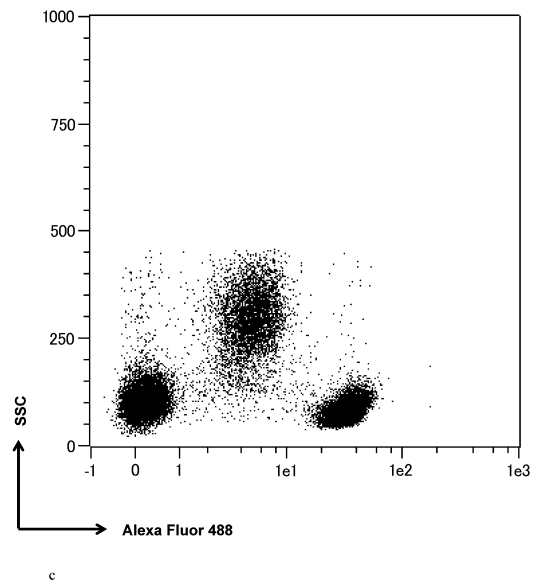
【図 1 - 1】



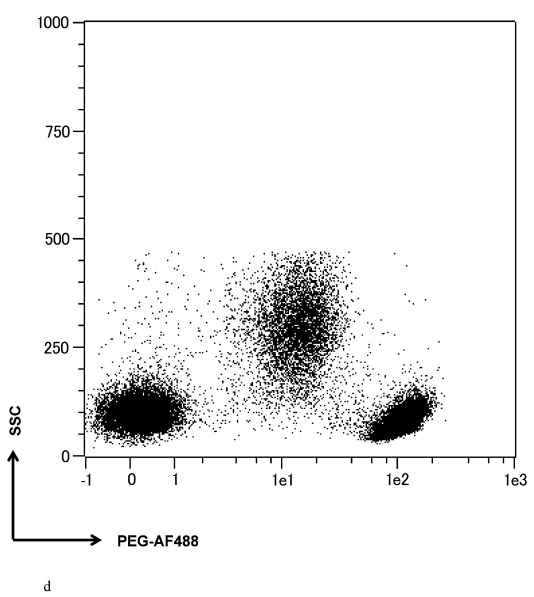
【図 1 - 2】



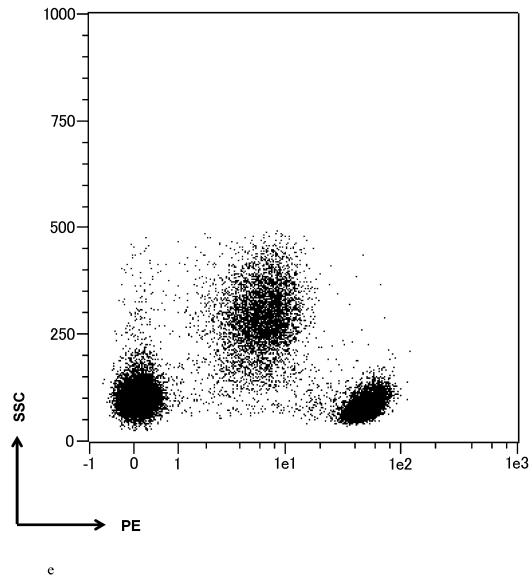
【図 1 - 3】



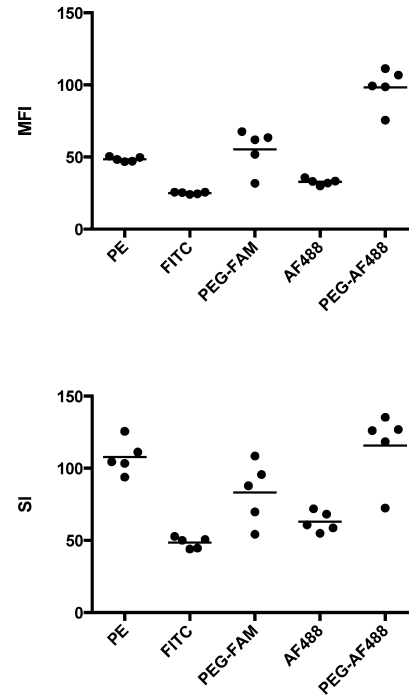
【図 1 - 4】



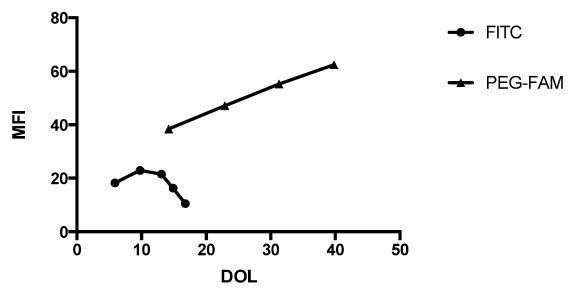
【図 1 - 5】



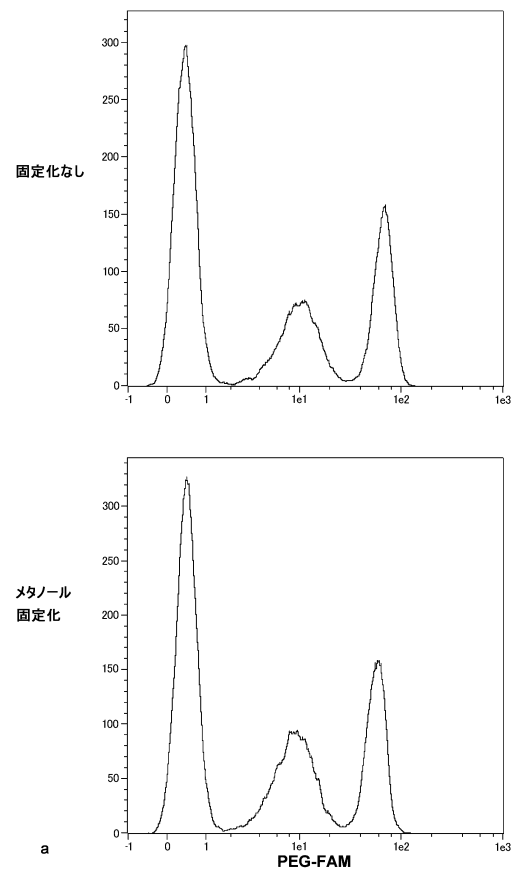
【図 2】



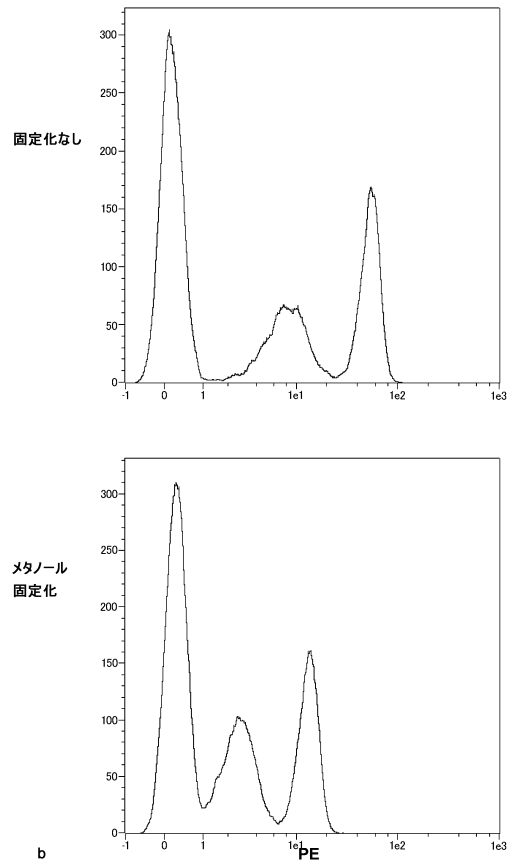
【図 3】



【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 9 K 11/06 (2006.01) C 0 9 K 11/06 6 3 5
C 0 9 K 11/06 6 4 5

(74)代理人 100098501

弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403

弁理士 前川 純一

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100162880

弁理士 上島 類

(72)発明者 クリスティアン ドーゼ

ドイツ連邦共和国 キュアテン メアヒェンヴェーク 2ペー

審査官 神谷 昌克

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0119553(US,A1)

特開2006-031851(JP,A)

特表2015-504943(JP,A)

米国特許出願公開第2012/0052506(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C 0 9 B

C 0 9 K

G 0 1 N

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)