

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-95451  
(P2019-95451A)

(43) 公開日 令和1年6月20日(2019.6.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	2 GO 4 3
GO 1 N 33/541 (2006.01)	GO 1 N 33/541	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-220121 (P2018-220121)  
 (22) 出願日 平成30年11月26日 (2018.11.26)  
 (31) 優先権主張番号 17203699.8  
 (32) 優先日 平成29年11月27日 (2017.11.27)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 312000044  
 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフ  
 ト ミット ベシュレンクテル ハフツン  
 グ  
 Miltenyi Biotec GmbH  
 ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラー  
 トバッハ フリードリヒ-エーバート-シ  
 ュトラーセ 68  
 Friedrich-Ebert-Str  
 asse 68, D-51429 Ber  
 gisch Gladbach, Germ  
 any

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色された細胞を光褪色させる方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生物検体の試料中で標的部分を繰り返し検出可能な方法の提供

【解決手段】 a) 一般式  $I : X_n - P - Y_m$  (I) を有し、その式中の X が蛍光部分であり、Y が抗原認識部分であり、n、m が 1 から 100 の間の整数であり、かつ P がポリエチレングリコールを含むスペーサーである、少なくとも 1 種の結合体を準備し、b) 前記生物検体の試料と少なくとも 1 種の結合体とを接触させ抗原認識部分 Y により認識される標的部分を標識し、c) 標識された標的部分を、蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光で励起し、d) 前記標識された標的部分を蛍光放射の検出により検出し、そして e) 蛍光放射を初期蛍光放射の少なくとも 75% だけ低減するに足るエネルギーを与えるのに十分な時間にわたって、前記結合体に蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光を照射することにより標的部分の蛍光部分 X を分解することにより行われる方法に関する。

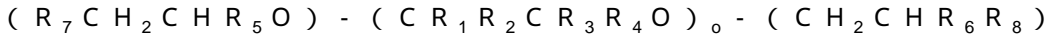
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物検体の試料中で標的部分を検出する方法であって、

a) 一般式 I :  $X_n - P - Y_m$  (I) を有し、その式中の X が蛍光部分であり、Y が抗原認識部分であり、n、m が 1 から 100 の間の整数であり、かつ P が下記式：



(式中、 $R_1 \sim R_8$  は、独立して H または少なくとも 1 個で最大 20000 個の繰返単位を有するエチレングリコールの分岐状もしくは線状のオリゴマー、または Y もしくは X との共有結合であるが、ただし、 $R_1 \sim R_8$  の少なくとも 2 個は、Y または X との共有結合であり、かつ o は 1 ~ 500 の整数である) によるポリエチレングリコールを含むスパーサーである、少なくとも 1 種の結合体を準備し、

b) 前記生物検体の試料と、少なくとも 1 種の結合体とを接触させ、それにより抗原認識部分 Y により認識される標的部分を該結合体で標識し、

c) 標識された標的部分を、蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光で励起し、

d) 前記標識された標的部分を、前記蛍光部分により放出される蛍光放射の検出により検出し、そして

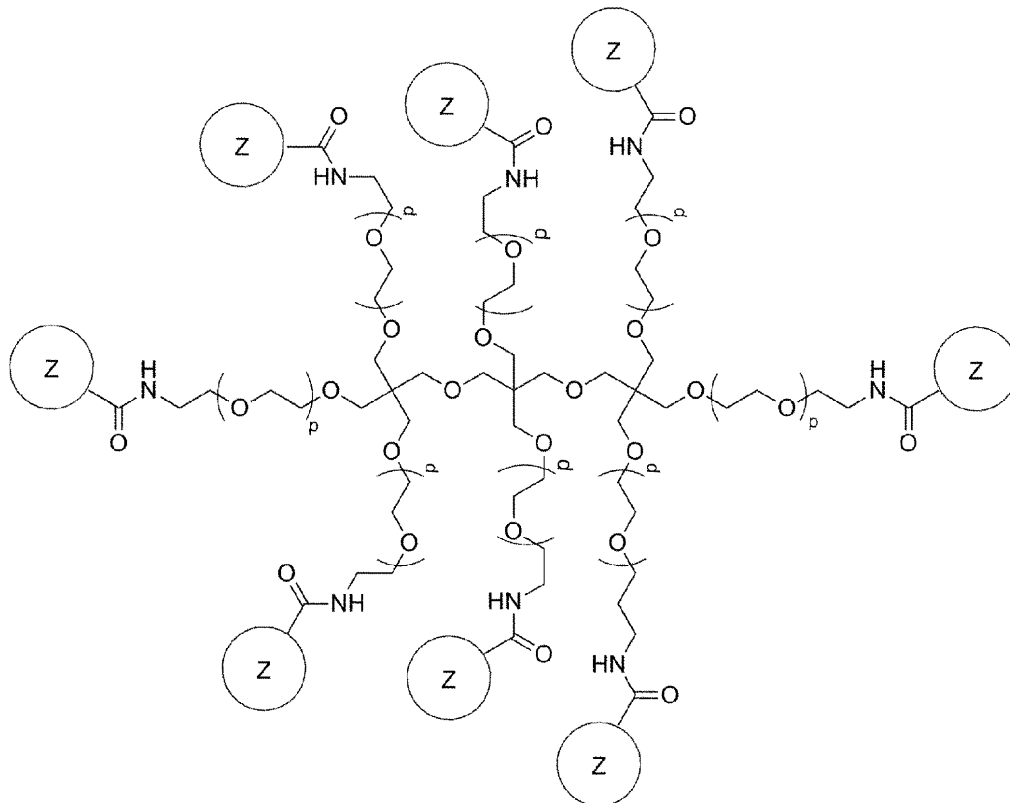
e) 前記蛍光部分により放出される蛍光放射を初期蛍光放射の少なくとも 75% だけ低減するに足るエネルギーを与えるのに十分な時間にわたって、前記結合体に、蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光を照射することにより、前記標識された標的部分の蛍光部分 X を分解する

ことにより行う方法。

## 【請求項 2】

前記結合体は、一般式 II :

## 【化 1】



(II)

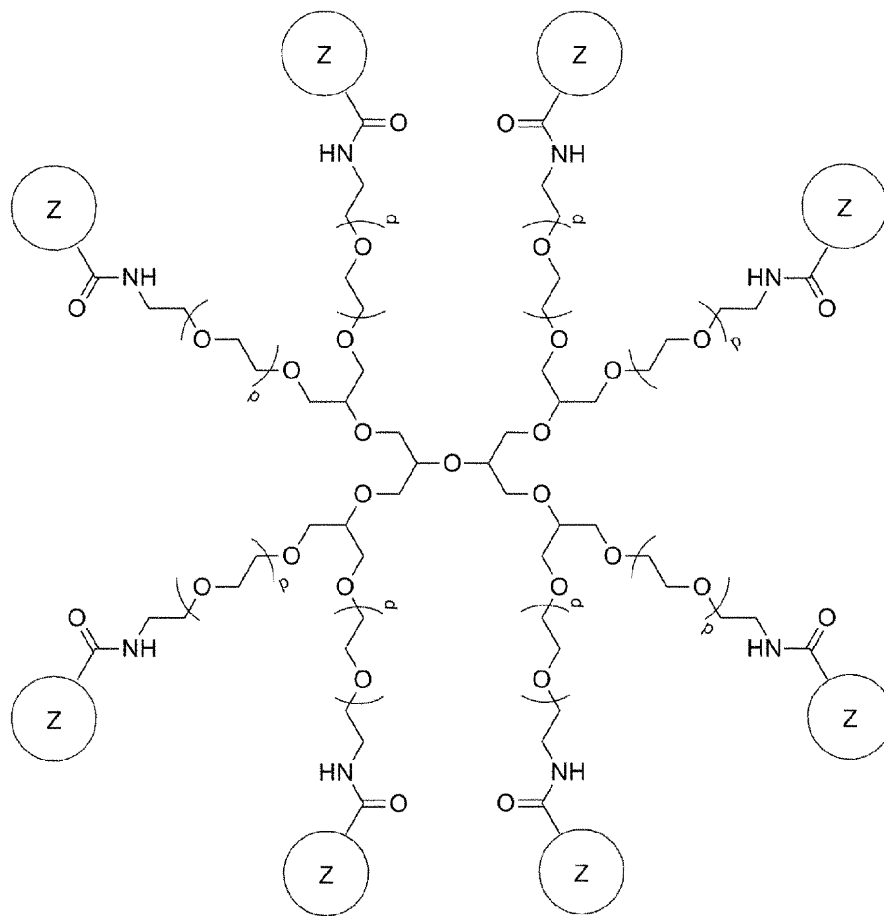
による化合物であり、前記式中の Z は、少なくとも 1 個の蛍光部分 X、および少なくとも 1 個の抗原認識部分 Y であり、かつ p は、2 から 500 までの範囲の整数であることを特

徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記結合体は、一般式 I I I :

【化 2】



(III)

による化合物であり、前記式中の Z は、少なくとも 1 個の蛍光部分 X、および少なくとも 1 個の抗原認識部分 Y であり、かつ p は、2 から 500 までの範囲の整数であることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記蛍光部分 X 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、およびピロメテン色素からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

前記蛍光部分 X は、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、スルホンアミド、ポリエーテル、およびカーボネートからなる群から選択される 1 個以上の水溶性付与置換基で置換されていることを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

抗原認識部分 Y は、それぞれ天然由来または組換え由来の、免疫グロブリン、抗体、フラグメント化抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、sdAb、scFv、ジscFv からなる群から選択される少なくとも 1 種の生体分子であることを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

抗原認識部分 Y は、ペプチド/MHC 複合体、細胞接着または共刺激分子のための受容体、受容体リガンド、抗原、ハプテンバインダー、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、およ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種の生体分子であることを特徴とする、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

前記抗原認識部分Yは、抗体、フラグメント化抗体、フラグメント化抗体誘導体、ペプチド/MHC複合体を標的とするTCR分子、細胞接着受容体分子、共刺激分子のための受容体、または人工的に操作された結合分子であることを特徴とする、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

それぞれの抗原認識部分Yが異なる抗原を認識する少なくとも2種の結合体を準備することにより工程a)~d)を繰り返すことを特徴とする、請求項1から8までのいずれか1項記載の方法。

10

【請求項10】

工程e)において、標識された標的部分の蛍光部分Xはさらに、酸化剤の添加により分解することを特徴とする、請求項1から9までのいずれか1項記載の方法。

【請求項11】

前記方法の、蛍光検鏡法、フローサイトメトリー、スペクトロフルオロメトリー、細胞分離、病理学、または組織学における使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的部分または標的細胞を、検出部分と抗原認識部分とを有する結合体で標識することによって前記標的部分もしくは前記標的細胞を細胞試料から検出または同定するための方法であって、前記標的部分の検出後に、該検出部分が光の照射によって分解され、それにより後続の標識および検出が可能となる方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

1つ以上の抗体に結合された蛍光色素は、免疫蛍光分析のために通常使用されている。抗体、蛍光色素、フローサイトメーター、フローソーター、および蛍光顕微鏡の点における数多くの別形がこの二十年間で開発され、標的細胞の特異的な検出および単離が可能となっている。

30

【0003】

検出後に除去または破壊することができる標的細胞の単離または検出用の蛍光色素を利用することは知られている。例えば、米国特許第7776562号明細書(US7776562)は、標的細胞の可逆的ペプチド/MHCマルチマーまたはFab-ストレプトマーによる間接的な非共有的な標識に基づく可逆的な蛍光標識法を開示している。

【0004】

検出後の蛍光放射を低減させるために、英国特許第2372256号明細書(GB2372256)は、抗体にリンカーを介して結合された複数の蛍光色素を含む結合体を提供することにより蛍光放射を消光する方法を開示している。高密度の蛍光色素は、蛍光シグナルを消光することとなる。さらに、英国特許第2372256号明細書(GB2372256)は、前記結合体から蛍光色素を解離するために前記リンカーを酵素分解することを記載している。解離された蛍光色素は自己消光を受けないため、より強力な蛍光シグナル、すなわちより良好な解像力のシグナルが得られる。

40

【0005】

蛍光シグナルの排除は、順次染色する検体を基礎とする免疫蛍光技術のためには必要不可欠である。これらの技術は、標識と検出を同時に使用する標準的な手順と比較して、より高い多重化の可能性をもたらすと明らかになっている。しかしながら、これらの技術は、結合された蛍光部分の化学褪色法(米国特許第7741045号明細書(US7741045B2)、欧州特許第0810428号明細書(EPO810428B1)、または独国特許第10143757号明細書(DE10143757))による酸化分解を基礎

50

とするか、または光褪色を基礎とする方法の場合に、褪色の速度は、本明細書に表される方法に対してより遅い。

【0006】

先行技術の主たる目的は、できる限り強く蛍光放射を発する、すなわち最大量子収率を有する色素またはそのような色素を含む結合体を提供することであった。信頼性のある再現的なシグナルを得るために、該色素はできる限り安定であるように設計される。これらの特性はFACS法のような細胞検出および細胞分離のために有利である一方で、それらの特性は、細胞が繰り返し染色および検出されることを妨げる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

従って、本発明の課題は、生物検体の試料中または試料上で標的を特異的に標識および検出し、引き続き検出部分を分解して、更なる標識および検出のサイクルを可能にする向上した方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

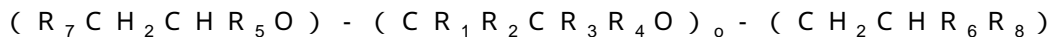
【0008】

驚くべきことに、スパーサーを介して検出部分に結合された抗原結合部分から構成される結合体は、前記スパーサーが、複数のオリゴマーPEG側鎖を備えた、すなわちある特定の分岐度を有する分岐状PEGオリゴマーまたはポリマーであり、かつ前記検出部分が、その分岐状PEGに共有結合されている場合に、より高い量子収率（したがってより高い輝度）および光により容易に分解され得る低減された光安定性の両方を有することが判明した。この理論に縛られるものではないが、前記分岐状PEGオリゴマーまたはポリマーがそこに共有結合された検出部分を「包囲」し、こうしてより近い接触およびより高い量子収率がもたらされることで、該検出部分の光誘起型酸化分解が生ずると考えられる。

20

【0009】

したがって、本発明の主題は、生物検体の試料中で標的部分を検出する方法であって、  
a) 一般式I:  $X_n - P - Y_m$  (I) を有し、その式中のXが蛍光部分であり、Yが抗原認識部分であり、n、mが1から100の間の整数であり、かつPが下記式:



(式中、 $R_1 \sim R_8$ は、独立してHまたは少なくとも1個で最大20000個の繰返単位を有するエチレングリコールの分岐状もしくは線状のオリゴマー、またはYもしくはXとの共有結合であるが、ただし、 $R_1 \sim R_8$ の少なくとも2個は、YまたはXとの共有結合であり、かつoは1~500の整数である)によるポリエチレングリコールを含むスパーサーである、少なくとも1種の結合体を準備し、

30

b) 前記生物検体の試料と、少なくとも1種の結合体とを接触させ、それにより抗原認識部分Yにより認識される標的部分を該結合体で標識し、

c) 前記標識された標的部分を、蛍光部分Xの吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光で励起し、

d) 前記標識された標的部分を、前記蛍光部分により放出される蛍光放射の検出により検出し、そして

40

e) 前記蛍光部分により放出される蛍光放射を初期蛍光放射の少なくとも75%だけ低減するに足るエネルギーを与えるのに十分な時間にわたって、前記結合体に、蛍光部分Xの吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光を照射することにより、前記標識された標的部分の蛍光部分Xを分解することにより行う方法である。

【0010】

前記結合体の照射は、蛍光部分の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する白色広域スペクトル光源、単一波長レーザー、またはLEDにより行われ得る。

【0011】

前記スパーサーPのため、蛍光部分Xの分解は、それが無い場合よりも大幅に速くなり

50

、それにより発光シグナルの加速された完全な消光がもたらされる。これにより、繰り返しの染色および脱染色の過程が可能となり、その際、同じまたは異なる蛍光部分 X および / または抗原認識部分 Y を備えた同じまたは異なる結合体が、引き続き同じ細胞に適用されて、異なる標的または同じ標的を、同じまたは異なる色素で染色することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、単一指数関数的減衰フィット  $f(x) = y_0 \cdot e^{-k \cdot y}$ 、 $k = 1 / k$ 、及び  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$  での、光によるキサントレン色素の崩壊図を示す。

【図2】図2は、その発色団（すなわち、クマリン、キサントレン、ローダミン、シアニン）の性質により異なる化学的分類に属する一連の色素についての光分解曲線を示し、これにより、すべての色素クラスが、そのような光誘起型分解に感受性であることが示される。

10

【図3】図3は、4つの異なる条件下でのシアニン色素についての光分解曲線を示す。

【0013】

詳細な説明

本発明の方法においては、上記結合体に、蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光が照射されると、第1の染色サイクルからのいずれの残留蛍光放射も後続の染色および検出サイクルと干渉しないほどの大きさで、該蛍光部分により放出される蛍光放射は低減される。一般的に、初期蛍光放射の少なくとも75%だけの低減は、より高い検出の質を達成するために、すなわち対象となる染色工程に由来しないバックグラウンド放射を低減させるために十分であると思われ、蛍光放射が少なくとも85%だけ、より好ましくは少なくとも95%だけ、最も好ましくは少なくとも99%だけ低減されることが好ましい。100%の低減が最良であることとなるが、消光の質および全過程の時間との兼ね合いがある。

20

【0014】

代替的な定義においては、前記標識された標的部分の蛍光部分 X の分解は、前記蛍光部分により放出される蛍光放射の半減期を低減するに足るエネルギーを与えるのに十分な時間にわたって、前記結合体に、蛍光部分 X の吸収スペクトルの範囲内の波長を有する光を照射することにより行われる。スパーサー P に共有結合された蛍光部分の単一指数関数的減衰フィット解析からの k の値により示される分解速度は、スパーサー P に結合されていない同じ蛍光部分について得られた k と比較して、少なくとも1.02倍の高さから1000000倍の高さまでであるべきである。

30

【0015】

蛍光部分 X および抗原認識部分 Y は、スパーサー P に共有結合されているか、または準共有結合されていてよい。用語「共有結合、または準共有結合」は、解離定数  $10^{-9}$  M を有する X と P との間の結合および Y と P との間の結合を指す。

【0016】

本発明の方法は、工程 a) ~ e) の1つ以上の順序で行うことができる。それぞれの順序の後に、蛍光部分は光での照射により分解される。

【0017】

用語「消光」および「褪色」は、本明細書では互換的に使用され、該用語は、放射による蛍光体の変化の結果として、標識された生物学的試料からの蛍光強度が減少することを意味すると理解されるべきである。例えば、蛍光部分 X の「消光」または「褪色」は、放射により開始される酸化および / または蛍光部分 X とスパーサー P との開裂と、結合されていない蛍光部分の標識された標的からの洗浄による除去とによって達成され得る。

40

【0018】

したがって、本発明の方法において使用される消光システムは、少なくとも1個の光源を備える。

【0019】

したがって、本発明において使用される消光ユニットは、種々の波長の消光放射を放出

50

する2個以上の光源を備えてよい。例えば、該消光ユニットは、350nm～850nmの、好ましくは450nm～650nmの範囲における組み合わせられた発光スペクトルを有する1個～5個の光源を備えてよい。光源の発光は、試料が同時にまたは順次に照射されるように光学的に組み合わせられ得る。例えば、該消光ユニットは、450nm～500nm（青色）、520nm～560nm（緑色）、および630nm～650nm（赤色）の範囲において発光する3個の光源を備えてよい。もう1つの実施形態においては、350nm～850nmの、好ましくは450nm～650nmの範囲において発光する1個だけの光源が設けられている。個別の光源の利点は、試料が、蛍光色素の消光（排除）に必要とされる放射だけに曝露されることであり、それによりその他の波長を有する放射への試料の不必要な曝露が回避される。個別の光源の放射は、ミラーまたは光ファイバーのような光導波路等の適切な装置により組み合わせられ得る。

10

#### 【0020】

それぞれの順序の後および/または前に、洗浄工程が、結合されていない結合体部分および/または結合されていない蛍光部分Xのような不所望な材料を試料から除去するために実施され得る。

#### 【0021】

前記の消光過程は、酸化剤の添加によりさらに増強され得る。酸化剤は、例えば $O_2$ 、 $H_2O_2$ 、過酸化水素、またはDMSOであり得る。添加された酸化剤は、活性酸化性種を生成することができ、それは、 $O_2$ として計算して、0.1ppm～5ppm、好ましくは2ppm～5ppmの濃度で存在すべきである。

20

#### 【0022】

##### 標的部分

本発明による方法で検出されるべき標的部分は、組織切片、細胞集合体、懸濁細胞、または付着細胞のような任意の生物検体に存在し得る。それらの細胞は生細胞であっても死細胞であってもよい。好ましい標的部分は、生物検体、例えば動物全体、臓器、組織切片、細胞集合体または無脊椎動物（例えば、線虫、キイロショウジョウバエ）、脊椎動物（例えば、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル）、および哺乳動物（ハツカネズミ、ヒト）の単一細胞で細胞内または細胞外で発現された抗原である。

#### 【0023】

##### スパーサーP

スパーサーPは、ポリヒドロキシ化合物にグラフトされたエチレングリコール、ポリアミノ化合物、およびポリチオ化合物を基礎とし得る、一般式Iによるポリエチレングリコールを含む。そのような化合物またはその前駆体は、Nanocs Inc.社、Sigma-Aldrich社、またはNOF Corporation社から市販されている。

30

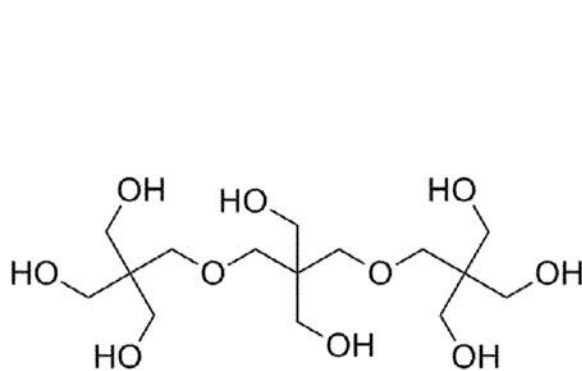
#### 【0024】

好ましい前駆体は、ポリヒドロキシ化合物、例えばエーテル結合を介した3個～4個のポリエーテル残基のための結合点として4個のヒドロキシル基を有するペンタエリトリール、エーテル結合を介した3個～6個のポリエーテル分岐のための結合点として6個のヒドロキシル基を有するジペンタエリトリール、エーテル結合を介した3個～8個のポリエーテル分岐のための結合点として8個のヒドロキシル基を有するトリペンタエリトリールまたはヘキサグリセロールである。

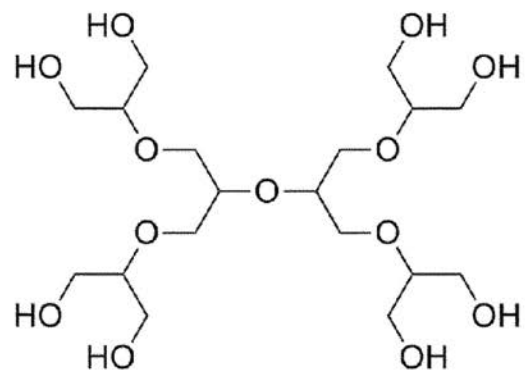
40

#### 【0025】

## 【化 1】



トリペンタエリトリール



ヘキサグリセロール

10

## 【 0 0 2 6 】

ポリヒドロキシ化合物は、ホモポリマー型またはコポリマー型、すなわち交互コポリマーまたはブロックコポリマーであり得るエーテルモノマー単位により置換されていてよい。ポリエーテル残基は、直鎖状または分枝鎖状であってよい。

20

## 【 0 0 2 7 】

スペーサー P の Y および X との共有結合を実現するために、式 I のポリエチレングリコールは、蛍光結合体の分野で知られる少なくとも 2 個の反応性基、例えばアセタール基、酸無水物基、酸塩化物基、アシルアジド基、アシルハロゲン化物基、アシルニトリル基、アシルホスフェート基、アシルアミド基、アルデヒド基、アルコキシ基、アルキルアジド基、アルキルスルホネート基、アルキン基、アリル基、アミド基、無水物基、アリーールハロゲン化物基、アジドニトロフェニル基、アジリジン基、ポロネート基、カルバメート基、カルボジイミド基、カーボネートエステル基、カルボキシレート基、カルボン酸基、ジアゾアルカン基、ジクロロトリアジン基、ジエン基、ジスルフィド基、エナミン基、エポキシド基、フルオロベンゼン基、フルオロフェニルエステル基、グリオキサール基、ハロアセトアミド基、ハロプラチネート基、ハロチアジン基、ヘミアセタール基、ヘミケタール基、高歪みシクロアルカン基、高歪みシクロアルケン基、高歪みシクロアルキン基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、ヒドロキシ基、ヒドロキシルアミン基、イミダゾール基、イミドエステル基、イミン基、ヨードアセトアミド基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、ケタール基、ケトン基、ラクトン基、マレイミド基、モノクロロトリアジン基、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル基、ニトリル基、ニトロ基、オキシム基、ペンタフルオロフェニルエステル基、ペルオキシド基、ホスホラミダイト基、第一級アミン基、第二級アミン基、シリルハロゲン化物基、スルフヒドリル基、スルフィド基、スルホジクロロフェニルエステル基、スルホネートエステル基、スルホン基、スルホニルハロゲン化物基、第三級アミン基、テトラフルオロフェニルエステル基、チオアミド基、チオエステル基、チオエーテル基、チオールカルボン酸基、活性エステル基、アルケン基、または共役アルケン基を備えていてよい。

30

40

## 【 0 0 2 8 】

ここで、Z は、少なくとも 1 個の蛍光部分 X、および少なくとも 1 個の抗原認識部分 Y であり、かつ p は、1 から 500 までの範囲の整数である。

## 【 0 0 2 9 】

## 蛍光部分 X

適切な蛍光部分 X は、免疫蛍光技術、例えばフローサイトメトリーまたは蛍光検鏡法の技術から公知の蛍光部分である。本発明のこれらの実施形態においては、前記結合体で標識された標的部分は、蛍光部分 X を励起し、得られた発光（光ルミネセンス）を検出する

50

ことによって検出される。この実施形態においては、前記蛍光部分 X は、好ましくは蛍光部分である。

【0030】

有用な蛍光部分 X は、タンパク質ベースの蛍光部分、例えばフィコビリタンパク質、ポリマー型蛍光部分、例えばポリフルオレン、小分子有機色素、例えばキサンテン、例えばフルオレセインもしくはローダミン、シアニン、オキサジン、クマリン、アクリジン、オキサジアゾール、ピレン、ピロメテン、ピリジルオキサゾール、または有機金属錯体、例えば Ru 錯体、Eu 錯体、Pt 錯体であり得る。単分子単位の他に、蛍光性タンパク質または小分子有機染料のクラスター、ならびにナノ粒子、例えば量子ドット、アップコンバージョンナノ粒子、金ナノ粒子、色素添加ポリマーナノ粒子を、蛍光部分として使用することもできる。

10

【0031】

本発明のもう1つの実施形態においては、前記結合体で標識された標的は、放射放出によっては検出されずに、UV、可視光もしくはNIR放射の吸収によって検出される。適切な吸光性検出部分は、蛍光放出を有さない吸光性色素、例えば小分子有機クエンチャー色素、例えばN-アリアルローダミン、アゾ色素、およびスチルベンである。

【0032】

もう1つの実施形態においては、前記吸光性蛍光部分 X を、パルスレーザー光によって照射して、光音響シグナルを発生させることができる。

【0033】

本発明の別形においては、蛍光体 X は、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、ポリエーテル、スルホンアミド、およびカーボネートからなる群から選択される1個以上の水溶性付与置換基で置換されている。スルホネート置換基を有する蛍光色素、例えば Thermo Fisher Scientific Inc. 社により供給される Alexa Fluor ファミリーの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ネート置換の度合いは、すなわちローダミン色素またはシアニン色素については、2以上であり得る。スルホン化されていない色素と比較したスルホン化された色素の使用は、図2に見ることができるように、ポリエーテル足場に多量体化された蛍光体のさらに明るい結合体をもたらす。分岐状PEG上に多量体化されたAlexa Fluor 488のCD4結合体(PEG-AF488)で染色されたTヘルパー細胞は、分岐状PEG上に多量体化された蛍光体のCD4結合体(PEG-FAM)で染色されたTヘルパー細胞(平均MFI 55)よりもほぼ2倍明るい(平均MFI 98)。

20

30

【0034】

適切な市販されている蛍光部分は、Miltényi Biotec GmbH社製の製品ライン「Vio」、またはFITC、もしくはPromofluor、またはThermofisher社製のAlexa色素、および/もしくはBodipy色素、またはLumiprobe社製のシアニンから選択され得る。

【0035】

抗原認識部分 Y

用語「抗原認識部分 Y」は、生物検体上で発現された標的部分、例えば細胞に細胞内または細胞外に発現された抗原に対する、任意の種類抗体、フラグメント化抗体、またはフラグメント化抗体誘導体を指す。前記用語は、完全にインタクトな抗体、フラグメント化抗体、またはフラグメント化抗体誘導体、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、sdAb、scFv、ジscFv、ナノボディに関する。そのようなフラグメント化抗体誘導体は、これらの種類の分子を含む共有結合および非共有結合の結合体を含めて組み換え法によって合成することができる。抗原認識部分の更なる例は、TCR分子を標的とするペプチド/MHC複合体、細胞接着受容体分子、共刺激分子のための受容体、人工的に操作された結合分子、例えばペプチドまたはアプタマーであって、例えば細胞表面分子を標的とする前記ペプチドまたはアプタマーである。

40

【0036】

50

本発明の方法で使用される結合体は、100個までの、好ましくは1個～20個の抗原認識部分Yを含んでよい。抗原認識部分と標的抗原との相互作用は、高親和性であっても、低親和性であってもよい。単独の低親和性抗原認識部分の結合相互作用は、低すぎて抗原と安定な結合をもたらさない。低親和性の抗原認識部分は、酵素分解可能なスペーサーPへの結合によってマルチマー化することで、高い結合力を提供することができる。前記スペーサーPが酵素的に開裂されると、低親和性の抗原認識部分はモノマー化されることとなり、それにより蛍光部分X、スペーサーP、および抗原認識部分Yの完全な除去がもたらされる。

【0037】

好ましくは、用語「抗原認識部分Y」は、生物検体（標的細胞）によって細胞内で発現される抗原、例えばIL2、FoxP3、CD154、または細胞外で発現される抗原、例えばCD19、CD3、CD14、CD4、CD8、CD25、CD34、CD56、およびCD133に対する抗体を指す。

10

【0038】

抗原認識部分Y、特に抗体は、側鎖アミノ基またはスルフィド基を通じてスペーサーPへと結合され得る。幾つかの場合において、抗体のグルコシド側鎖は過ヨウ素酸塩によって酸化されて、アルデヒド官能基を得ることができる。

【0039】

抗原認識部分Yは、スペーサーPに共有結合、または非共有結合されていてよい。共有結合または非共有結合のための方法は、当業者に公知であり、蛍光部分Xの結合について挙げたのと同じものである。

20

【0040】

本発明の方法は、特に、複合体混合物からの特定の細胞型の検出および/または単離のために有用であり、工程a)～e)の2つ以上の順次の配列を含み得る。該方法は、様々な結合体の組み合わせを使用することができる。例えば、1つの結合体は、2つの異なるエピトープに特異的な抗体、例えば2つの異なる抗CD34抗体を含み得る。異なる抗原は、異なる抗体、例えば2つの異なるT細胞ポピュレーションの間の区別のために抗CD4および抗CD8を含む、または制御性T細胞のような異なる細胞サブポピュレーションの決定のために抗CD4および抗CD25を含む、異なる結合体により対処され得る。

【0041】

30

結合体  $X_n - P - Y_m$

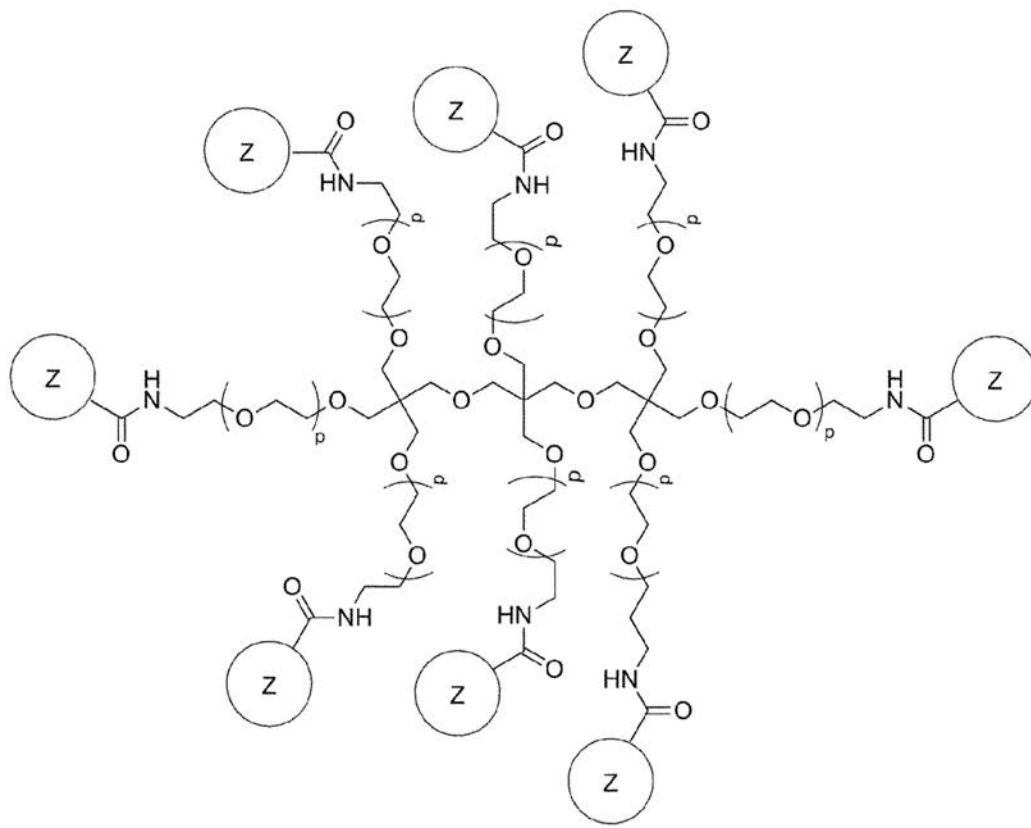
本発明の方法で使用される好ましい結合体は、100個～1000個のエチレングリコールの繰返単位を有するスペーサー基Pを備えている。

【0042】

例えば、本発明の方法で使用される結合体は、一般式IIおよびIIIによる化合物であり、それぞれ、Zは、少なくとも1個の蛍光部分X、および少なくとも1個の抗原認識部分Yであり、かつpは、2から500までの範囲の整数である。

【0043】

【化 2】



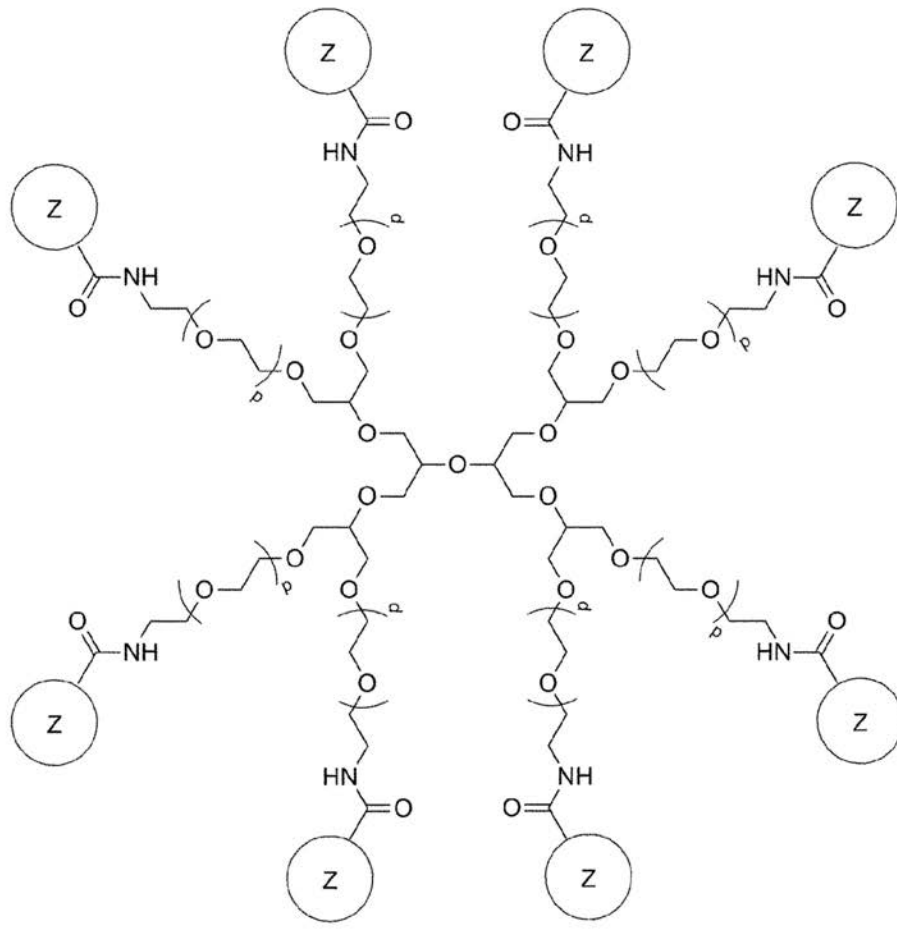
10

20

(II)

【 0 0 4 4 】

## 【化3】



10

20

## 【0045】

細胞検出法

結合体  $X_n - P - Y_m$  で標識された標的を検出するための方法および装置は、蛍光部分 X によって決定される。

30

## 【0046】

該結合体で標識された標的は、蛍光部分 X の励起と、生ずる蛍光シグナルの分析によって検出される。励起波長は通常は蛍光部分 X の吸収極大に応じて選択され、当該技術分野で公知のようにレーザーまたは LED 源によって提供される。幾つかの異なる検出部分 X が多重色 / パラメータ検出のために使用される場合に、重なり合った吸収スペクトルを有さず、少なくとも重なり合った吸収極大を有さない蛍光部分を選択することに留意すべきである。蛍光部分として蛍光部分が使用される場合に、標的は、例えば蛍光顕微鏡下で、フローサイトメーター、スペクトルフルオロメーター、または蛍光スキャナー中で検出することができる。化学発光によって放出された光は、励起を省く類似の計器によって検出することができる。

40

## 【0047】

前記方法の使用

本発明の方法は、調査、診断、および細胞療法における、例えば蛍光検鏡法、フローサイトメリー、スペクトロフルオロメトリー、細胞分離、病理学、または組織学における様々な用途のために使用することができる。

## 【0048】

本発明の第 1 の別形においては、細胞のような生物検体は、計数の目的のために、すなわち結合体の抗原認識部分によって認識されるある一定の抗原一式を有する試料から細胞の量を確認するために検出される。

50

## 【0049】

もう1つの別形においては、工程c)において前記結合体によって検出された生物検体は、試料から光学的手段、静電力、圧電力、機械的分離、または音響的手段によって分離される。この目的のために、工程d)において前記結合体によって検出された生物検体は、前記試料から、それらの検出シグナルに応じて1つ以上のポピュレーションへと、同時にまたは引き続き、工程e)の実施前に、光学的手段、静電力、圧電力、機械的分離、または音響的手段によって分離される。

## 【0050】

本発明のもう1つの別形においては、前記結合体の抗原認識部分によって認識される生物検体上の抗原のような標的部分の位置が測定される。そのような技術は、「マルチエピトープリガンド地図作成 (Multi Epitope Ligand Cartography)」、「チップベースサイトメトリー (Chip-based Cytometry)」または「Multiomix」として知られており、例えば欧州特許第0810428号明細書 (EP0810428)、欧州特許第1181525号明細書 (EP1181525)、欧州特許第1136822号明細書 (EP1136822)、または欧州特許第1224472号明細書 (EP1224472)に記載されている。この技術においては、細胞は固定化され、蛍光部分と結合された抗体と接触される。前記抗体は、生物検体 (例えば細胞表面)上のそれぞれの抗原によって認識され、結合されていないマーカーを除去し、蛍光部分を励起した後に、抗原の位置は、蛍光部分の蛍光放出によって検出される。ある一定の別形においては、蛍光部分に結合された抗体の代わりに、MALDI イメージングまたはCYTOFのために検出可能な部分に結合された抗体を使用することができる。当業者は、蛍光部分を基礎とする技術を変更して、これらの検出部分をどのように用いて作業するかを認識している。

10

20

## 【0051】

標的部分の位置決めは、蛍光放射の波長について十分な解像度および感度を有するデジタルイメージングデバイスによって達成される。前記デジタルイメージングデバイスは、光学的拡大装置と一緒に、または前記装置を用いずに、例えば蛍光顕微鏡と一緒に使用することができる。得られた画像は、適切な記憶装置に、例えばハードドライブに、例えばRAW形式、TIFF形式、JPEG形式またはHDF5形式で記憶される。

30

## 【0052】

異なる抗原を検出するために、同じもしくは異なる蛍光部分または抗原認識部分Yを有する異なる抗原-結合体を提供することができる。異なる波長を有する蛍光放出の並行した検出は限られているので、抗体-蛍光色素-結合体は、順次、個々に、または小さいグループ(2~10)で順々に利用される。

## 【0053】

本発明による方法の更なるもう1つの別形においては、試料の生物検体、特に懸濁細胞は、マイクロキャピティ中での捕捉によって、または接着によって固定化される。

## 【0054】

一般的に、本発明の方法は、幾つかの別形において実施することができる。例えば、標的部分によって認識されない結合体は、例えばバッファーによって、該結合体で標識された標的部分を検出する前に洗浄することによって除去することができる。

40

## 【0055】

本発明の1つの別形においては、少なくとも2種の結合体が同時に提供されるか、または後続の染色順序において提供され、その際、それぞれの抗原認識部分Yは、異なる抗原を認識する。その他の1つの別形においては、少なくとも2種の結合体は、試料へと同時に、または後続の染色順序において提供でき、その際、それぞれの結合体は、異なる酵素によって開裂される異なる酵素分解可能なスパーサーPを含む。両方の場合において、前記標識された標的部分は、同時にまたは順次に検出され得る。順次の検出は、少なくとも1つのスパーサー分子Pの酵素分解を含むか、または引き続きスパーサー分子Pを酵素分解するとともに、結合されていない部分を任意に中間的に除去(洗浄)することを含んで

50

よい。

【実施例】

【0056】

光分解に關与する一般的な動態を説明するために、図1は、 $f(x) = y_0 \cdot e^{-k \cdot x}$  (ここで、 $\tau$  は  $1/k$  であり、かつ  $t_{1/2} = \tau \cdot \ln(2)$  は半減期である) のような単一指数関数的減衰曲線でフィットされた光によるキサント色素の光分解について得られた概要曲線を示す。

【0057】

光分解の動態を測定するために、有機蛍光体(すなわち、なかでもクマリン、キサントン、ローダミン、シアニン)を、DMSO中に溶解させてPBS中で希釈するか、または直接的にPBS中に溶解させ、こうして経路長1cmでそれぞれの極大での吸光度が約0.3任意単位で得られるように濃度を調節した。こうして、全ての溶液はそれらの吸光度により正規化され、比較可能である。その後該溶液を、蒸発および試料濃縮を避けるために、低いヘッドスペースおよび気密蓋を有する3つのウィンドウ付きの蛍光石英キュベット内に入れた。そのキュベット中の試料を、次いで固定された時間量にわたり照射し、吸光度および発光スペクトルの両方を記録した。それらの極大での強度値を使用して照射時間に対してプロットし、次いで単一指数関数的減衰に対する数学的フィットを適切なコンピュータソフトウェアにより実施することで、図1に示される曲線と同様の曲線が得られた。特徴的な減衰時間( $k$ )を使用して、数あるパラメーターの中でも半減期を計算した。

【0058】

図2は、その発色団(すなわち、キサントン、ローダミン、シアニン)の性質により異なる化学的分類に属する一連の色素、およびそれぞれの色素が分岐状PEGに共有結合されているそれらのPEG化されたものについての光分解崩壊曲線を示している。

【0059】

図2に示されるデータは、a)すべての色素クラスが光分解に感受性であること、そしてb)本出願に定義されるように分岐状PEGに結合された場合には、光分解の速度がより速いことを示している。

【0060】

4つの異なる条件下:

- i) スペーサーに結合されておらず、溶液中で遊離している(比較)、
  - ii) 20kDaの線状PEGに共有結合されている(比較)、
  - iii) 5%のPEG(20kDa)を含有するが、共有結合されずに溶液中で遊離している(比較)、
  - iv) 20kDaの分岐状PEGに共有結合されている(本発明による)
- でのシアニン色素についての光分解曲線を得た。

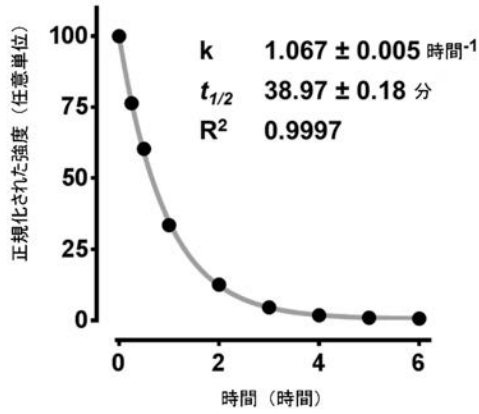
【0061】

図3は、同じ分子量の、共有結合されているが線状であるPEGおよび共有結合されていないが分岐状であるPEG(5%のPEG)が、蛍光体の分解速度に対して効果を発揮しないことを示している。

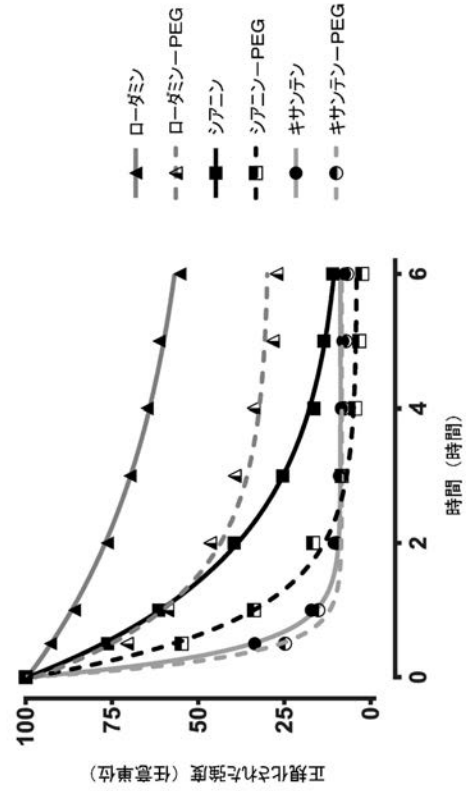
【0062】

したがって、本出願に開示される結合体だけが、すなわち蛍光部分に共有結合された分岐状PEGだけが、本発明の方法により必要とされるような加速された光誘起型の光分解を有している。

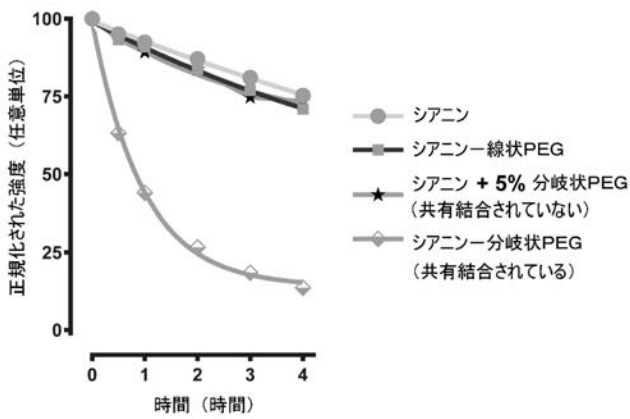
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/58 (2006.01)</b>	G 0 1 N 21/64	B
	G 0 1 N 33/58	Z
(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		
(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 ヨナタン ファウアーバッハ ドイツ連邦共和国 レスラート アーホアンヴェーク 7 1		
(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 ベー		
(72)発明者 トーマス デー . ロッケル ドイツ連邦共和国 デュッセルドルフ プラネーテンシュトラッセ 4 1		
(72)発明者 ヴェロニカ ルドルフ ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ・グラートバッハ ギーゼルベアトシュトラッセ 2 4		
F ターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA04 DA02 EA01 EA13 FA03 HA05 KA02 NA01 2G045 AA24 CB01 FA16 FA37 FB03 FB12		

## 【 外国語明細書 】

**METHOD FOR PHOTBLEACHING STAINED CELLS**

## BACKGROUND

[0001] The present invention is directed to a process for detection or identification  
5 of target moieties or target cells from a cell sample by labelling the target moieties or target cells with a conjugate having a detection moiety and an antigen recognizing moiety, wherein after detecting the target moieties, the detection moiety is degraded by irradiation with light thereby enabling subsequent labelling and detection.

[0002] Fluorescent dyes conjugated to one or more antibodies are commonly used  
10 for immunofluorescence analysis. A vast number of variants in view of antibodies, fluorescent dyes, flow cytometers, flow sorters, and fluorescence microscopes has been developed in the last two decades to enable specific detection and isolation of target cells.

[0003] It is known to utilize fluorescent dyes for isolation or detection of target  
15 cells which can be removed or destroyed after detection. For example US7776562 discloses a method of reversible fluorescent labeling based on indirect, non-covalent labeling of target cells with reversible peptide/MHC-Multimers or Fab-Streptamers.

[0004] In order to reduce the fluorescence radiation after detection, GB2372256  
20 discloses a process to quench fluorescence radiation by providing a conjugate comprising a plurality of fluorescent dyes attached via a linker to an antibody. The high density of fluorescent dyes will quench the fluorescence signals. Furthermore, GB2372256 describes to enzymatic degrade the linker in order to release fluorescent dyes from the conjugate. The released fluorescent dyes are not subject to self-quenching, resulting in more intense fluorescence signals, i.e. in better resolution.

[0005] Elimination of the fluorescence signal is essential for immunofluorescence  
25 technologies based on sequentially staining specimen. These technologies have been shown to provide a higher multiplexing potential compared to standard procedures using simultaneously labeling and detection. However, these technologies are based on oxidative destruction of conjugated fluorescent moieties by chemical bleaching procedures (US 7741045 B2, EP 0810 428 B1 or DE10143757) or in the case of photobleaching based  
30 methods, the rate of bleaching is slower to the methods presented here.

[0006] The main intention of the prior art was to provide dyes or conjugates  
comprising such dyes which to emit fluorescence radiation as intense as possible i.e. with a maximum quantum yield. In order to provide reliable and reproducible signals, the dyes are designed to be as stable as possible. While these properties are advantageous for cell detection

and cell separation like a FACS process, they prevent the cells from being repeatedly stained and detected.

### SUMMARY

5 [0007] It was therefore an object of the invention to provide an enhanced method for specific labelling and detection of a target in or on a sample of a biological specimen and subsequent degrading the detection moiety in order to enable further labelling and detection cycles.

[0008] Surprisingly it was found that conjugates composed of an antigen binding  
10 moiety linked via a spacer to a detection moiety having both a higher quantum yield (and thus higher brightness) and a reduced light stability which can be easily degraded by light if the spacer is a branched PEG oligomer or polymer, provided with a plurality of oligomer PEG sidechains, i.e. with a certain degree of branching, and the detection moieties are covalently linked to the branched PEG. Without being bound to this theory, it is believed that the  
15 branched PEG oligomer or polymer “wraps” the detection moieties which are covalently attached to it, resulting in a closer contact and a higher quantum yield for light-induced oxidative destruction of the detection moieties.

[0009] Object of the invention is therefore a method for detecting a target moiety in a sample of biological specimens by:

20 a) providing at least one conjugate with the general formula (I)  $X_n - P - Y_m$ , with X is a fluorescent moiety, Y an antigen recognizing moiety, n, m are integers between 1 and 100 and P is a spacer comprising polyethyleneglycol according to formula :



25 Wherein R1 to R8 are independently H or a branched or a linear oligomer of ethylene glycol with at least 1 and a maximum of 20000 repeating units or a covalent bond to Y or X, with the proviso that at least two of R1 to R8 are covalent bonds to Y or X

and o is an integer of 1 – 500

30 b) contacting the sample of biological specimens with at least one conjugate, thereby labeling the target moiety recognized by the antigen recognizing moiety Y with the conjugate  
c) exciting the labelled target moieties with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X

- d) detecting the labelled target moieties by detecting the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety and
- e) degrading the fluorescent moiety X of the labelled target moieties by irradiating the conjugate with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X for a time sufficient to deliver enough energy to reduce the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety at least by 75% of the initial fluorescence radiation.

5

10

[0010] Irradiation of the conjugate may be performed by a white wide spectrum light source, a mono wavelength laser or an LED having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety.

15

[0011] Due to the spacer P, degradation of the fluorescent moiety X is significantly faster than without it, which results in an accelerated and complete quenching of the emission signal. This enables repetitive staining and de-staining process where same or different conjugates provided with same or different fluorescent moieties X and/or antigen recognizing moieties Y may be subsequently applied to the same cells in order to stain different targets or the same target with same or different dyes.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20

[0012] Fig. 1 shows schematic disintegration of a xanthene dye by light with a mono-exponential decay fit  $f(x)=y_0 * e^{-k*x}$ ,  $\tau = 1/k$  and  $t_{1/2} = \tau * \ln(2)$

[0013] Fig. 2 shows photodegrading curves for a series of dyes belonging to different chemical classification according to the nature of their chromophore (i.e. coumarines, xanthenes, rhodamines, cyanines), showing all dye classes are sensitive to such light-induced degradation

25

[0014] Fig. 3 shows photodegrading curves for a cyanine dye under four different conditions.

#### DETAILED DESCRIPTION

30

[0015] In the method of the invention, the conjugate is irradiated with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X in order to reduce the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety so much that any residual fluorescence radiation from a first staining cycle does not interfere with subsequent staining and detection cycles. In general, reduction by at least by 75% of the initial fluorescence radiation is deemed sufficient, but in order to achieve a higher quality of detection i.e. to reduce background radiation not originating from the staining step of interest, it is preferred to

reduce fluorescence radiation by at least by 85%, more preferred at least by 95% and most preferred by at least 99%. While a reduction of 100% would be best, there is a trade-off with quenching quality and overall process duration.

[0016] In an alternative definition, degrading the fluorescent moiety X of the  
5 labelled target moieties is performed by irradiating the conjugate with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X for a time sufficient to deliver enough energy to reduce the half-life of the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety. The degradation rate given by the value of k from the mono-exponential decay fit analysis of the fluorescent moiety covalently-conjugated to the spacer P should be at  
10 least 1,02 and up to 10.000.000 times fold higher compared to the k obtained for the same fluorescent moiety non-conjugated to the spacer P.

[0017] Fluorescent moiety X and antigen recognizing moiety Y can be bound covalently or quasi-covalently to spacer P. The terms “covalently or quasi-covalently” refers bonds between X and P and Y and P having a dissociation constant of  $\leq 10^{-9}$  M.

15 [0018] The process of the invention may be performed in one or more sequences of the steps a) to e). After each sequence, the fluorescent moiety is degraded by irradiation with light.

[0019] The terms “quenching” and “bleaching” are used interchangeably herein, and should be understood to mean the diminution of fluorescence intensity from the labeled  
20 biological sample, as result of an alteration of the fluorophore by radiation. For example, “quenching” or “bleaching” of the fluorescent moiety X may be achieved by oxidation initiated by the radiation and/or by cleaving the fluorescent moiety X from spacer P and removing the unbound fluorescent moiety from the labelled target by washing.

[0020] Accordingly, the quenching system used in the method of the invention  
25 comprises at least one light source.

[0021] Accordingly, the quenching unit used in the present invention may be provided with more than one light sources emitting quenching radiation of different wavelengths. For example the quenching unit may be provided with 1 - 5 light sources which have a combined emission spectrum in the range of 350 – 850 nm, preferable 450 – 650 nm.  
30 The emission of the light sources may optically combined to irradiate the sample simultaneously or subsequently. For example, the quenching unit may be provided with three light sources emitting in the ranges 450 - 500nm (blue), 520 - 560nm (green) and 630 - 650 nm (red). In another embodiment only one light source is provided, emitting light in the range 350 – 850 nm, preferable 450 – 650 nm. The advantage of separate light sources is that the

sample is exposed to radiation only necessary to quench (eliminate) the fluorescence dye thereby avoiding unnecessary exposure of the sample to radiation with other wavelengths. The radiation of the separate light sources may be combined by appropriate devices like mirrors or optical waveguide like optical fibre.

5 [0022] After and/or before each sequence, a washing step may be performed to remove unwanted material like unbound conjugates moieties and/or unbound fluorescent moieties X from the sample.

[0023] The quenching process as described may be further enhanced by adding oxidative agents. Oxidative agents may be for example O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxides or DMSO. The  
10 oxidative agents added may generate the active oxidative species, which, calculated as O<sub>2</sub> should be present in concentrations of 0.1 to 5 ppm, preferable 2 to 5 ppm.

#### **Target moiety**

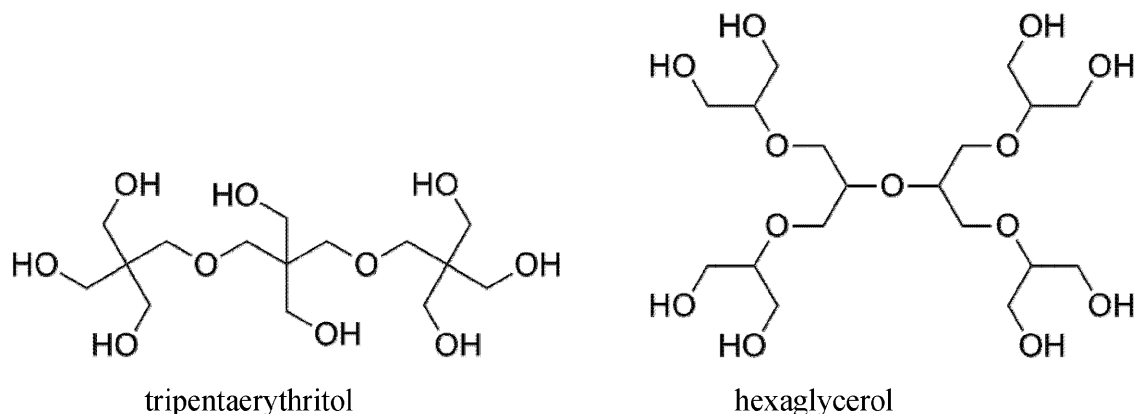
[0024] The target moiety to be detected with the method of the invention can be on  
15 any biological specimen, like tissues slices, cell aggregates, suspension cells, or adherent cells. The cells may be living or dead. Preferable, target moieties are antigens expressed intracellular or extracellular on biological specimen like whole animals, organs, tissues slices, cell aggregates, or single cells of invertebrates, (e.g., *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), vertebrates (e.g., *Danio rerio*, *Xenopus laevis*) and mammals (e.g., *Mus musculus*, *Homo sapiens*).  
20

#### **Spacer P**

[0025] The spacer P comprises polyethyleneglycol according to general formula I, which can be based on ethylene glycol grafted on polyhydroxy compounds, polyamino compounds  
25 and polythio compounds. Such compounds or precursors thereof are commercially available from Nanocs Inc., Sigma-Aldrich or NOF Corporation

[0026] Preferred precursors are polyhydroxy compounds, such as pentaerythritol with four hydroxyl group as attachment points for 3 to 4 polyether residues via ether bonds, dipentaerythritol with six hydroxyl groups as attachment points for 3 to 6 polyether branches  
30 via ether bonds, tripentaerythritol or hexaglycerol with eight hydroxyl groups as attachment points for 3 to 8 polyether branches via ether bonds.

[0027]



[0028] The polyhydroxy compounds may be substituted by ether monomer units which can be homopolymeric or copolymeric, i.e., alternating or block copolymers. Polyether residues can be linear or branched.

[0029] In order to achieve a covalent bond of the spacer P to Y and X, the polyethyleneglycol of formula I may be provided with at least two reactive groups known in the field of fluorescence conjugates, such as acetal, acid anhydride, acid chloride, acyl azide, acyl halides, acyl nitriles, acyl phosphate, acylamides, aldehyde, alkoxyl, alkyl azide, alkyl sulfonate, alkyne, allyl, amide, anhydrides, aryl halides, azidonitrophenyl, aziridines, boronates, carbamates, carbodiimides, carbonate ester, carboxylates, carboxylic acids, diazoalkanes, dichlorotriazine, diene, disulfide, enamine, epoxides, fluorobenzene, fluorophenyl ester, glyoxal, haloacetamides, haloplatinate, halotiazines, hemiacetal, hemiketal, highly strained cycloalkanes, highly strained cycloalkenes, highly strained cycloalkynes, hydrazides, hydrazine, hydroxyl, hydroxylamines, imidazole, imidoester, imine, iodoacetamide, isocyanate, isothiocyanate, ketal, ketones, lactones, maleimide, monochlorotriazine, N-hydroxysuccinimid ester, nitrile, nitro, oximes, pentafluorophenyl ester, peroxides groups, phosphoramidite, primary amines, secondary amines, silyl halides, sulfhydryl groups, sulfide, sulfodichlorophenyl ester, sulfonate esters, sulfone, sulfonyl halides, tertiary amines, tetrafluorophenyl ester, thioamide, thioester, thioether, thiolcarboxylic acids, active esters, alkene or conjugated alkene groups.

with Z = at least one fluorescent moiety X and at least one antigen recognizing moiety X; and p is an integer ranging from 1 to 500.

25

### Fluorescent moiety X

[0030] Suitable fluorescent moieties X are those known from the art of immunofluorescence technologies, e.g., flow cytometry or fluorescence microscopy. In these

embodiments of the invention, the target moiety labelled with the conjugate is detected by exciting the fluorescent moiety X and detecting the resulting emission (photoluminescence). In this embodiment, the fluorescent moiety X is preferable a fluorescent moiety.

[0031] Useful fluorescent moieties X might be protein-based, such as  
5 phycobiliproteins, polymeric, such as polyfluorenes, small organic molecule dyes, such as xanthenes, like fluorescein, or rhodamines, cyanines, oxazines, coumarins, acridines, oxadiazoles, pyrenes, pyrromethenes, pyridyloxazole or metallo-organic complexes, such as Ru, Eu, Pt complexes. Besides single molecule entities, clusters of fluorescent proteins or small organic molecule dyes, as well as nanoparticles, such as quantum dots, upconverting  
10 nanoparticles, gold nanoparticles, dyed polymer nanoparticles can also be used as fluorescent moieties.

[0032] In another embodiment of the invention the target labelled with the conjugate is not detected by radiation emission, but by absorption of UV, visible light, or NIR radiation. Suitable light-absorbing detection moieties are light absorbing dyes without  
15 fluorescence emission, such as small organic molecule quencher dyes like N-aryl rhodamines, azo dyes, and stilbenes.

[0033] In another embodiment, the light-absorbing fluorescent moieties X can be irradiated by pulsed laser light, generating an photoacoustic signal.

[0034] In a variant of the invention, the fluorophore X is substituted with one or more  
20 water solubility imparting substituents selected from the group consisting of sulfonates, phosphonates, phosphates, polyethers, sulfonamides and carbonates. It is particularly advantageous to use fluorescent dyes with sulfonate substituents, such as dyes of the Alexa Fluor family provided by Thermo Fisher Scientific Inc.. The degree of sulfonate substitution per fluorophore may be 2 or more, i.e., for rhodamine dyes or cyanine dyes. The use of  
25 sulfonated dyes compared to unsulfonated dyes leads to even brighter conjugates of fluorophores multimerized on a polyether scaffold as can be seen in Fig. 2: T helper cells stained with a CD4 conjugate of Alexa Fluor 488 multimerized on a branched PEG (PEG-AF488) are almost twice as bright (mean MFI 98) as T helper cells stained with a CD4 conjugate of fluorescein multimerized on a branched PEG (PEG-FAM) (mean MFI 55).

[0035] Suitable commercial available fluorescent moieties may be selected from  
30 the product line "Vio" from Miltenyi Biotec GmbH, or FITC, or Promofluor, or Alexa Dyes and/or Bodipy dyes from Thermofisher, or Cyanines from Lumiprobe.

### **Antigen recognizing moiety Y**

[0036] The term “antigen recognizing moiety Y” refers to any kind of antibody, fragmented antibody or fragmented antibody derivatives, directed against the target moieties expressed on the biological specimens, like antigens expressed intracellular or extracellular on cells. The term relates to fully intact antibodies, fragmented antibody or fragmented antibody derivatives, e.g., Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, sdAb, scFv, di-scFv, nanobodies. Such fragmented antibody derivatives may be synthesized by recombinant procedures including covalent and non-covalent conjugates containing these kind of molecules. Further examples of antigen recognizing moieties are peptide/MHC-complexes targeting TCR molecules, cell adhesion receptor molecules, receptors for costimulatory molecules, artificial engineered binding molecules, e.g., peptides or aptamers which target, e.g., cell surface molecules.

[0037] The conjugate used in the method of the invention may comprise up to 100, preferable 1- 20 antigen recognizing moieties Y. The interaction of the antigen recognizing moiety with the target antigen can be of high or low affinity. Binding interactions of a single low-affinity antigen recognizing moiety is too low to provide a stable bond with the antigen. Low-affinity antigen recognizing moieties can be multimerized by conjugation to the enzymatically degradable spacer P to furnish high avidity. When the spacer P is enzymatically cleaved, the low-affinity antigen recognizing moieties will be monomerized which results in a complete removal of the fluorescent moiety X, the spacer P and the antigen recognizing moiety Y.

[0038] Preferable, the term “Antigen recognizing moiety Y” refers to an antibody directed against antigen expressed by the biological specimens (target cells) intracellular, like IL2, FoxP3, CD154, or extracellular, like CD19, CD3, CD14, CD4, CD8, CD25, CD34, CD56, and CD133.

[0039] The antigen recognizing moieties Y, especially antibodies, can be coupled to the spacer P through side chain amino or sulfhydryl groups. In some cases the glycosidic side chain of the antibody can be oxidized by periodate resulting in aldehyde functional groups.

[0040] The antigen recognizing moiety Y can be covalently or non-covalently coupled to the spacer P. Methods for covalent or non-covalent conjugation are known by persons skilled in the art and the same as mentioned for conjugation of the fluorescent moiety X.

[0041] The method of the invention is especially useful for detection and/or isolation of specific cell types from complex mixtures and may comprise more than one sequential sequences of the steps a) - e). The method may use a variety of combinations of conjugates. For example, a conjugate may comprise antibodies specific for two different epitopes, like two

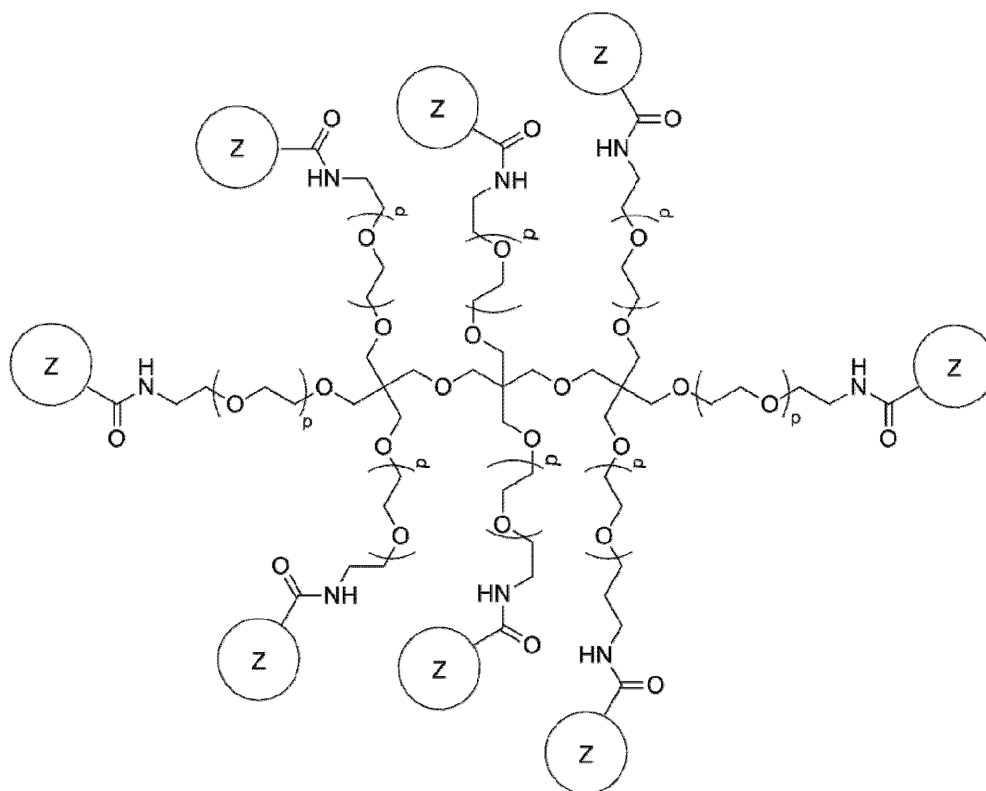
different anti-CD34 antibodies. Different antigens may be addressed with different conjugates comprising different antibodies, for example, anti-CD4 and anti-CD8 for differentiation between two distinct T-cell-populations or anti-CD4 and anti-CD25 for determination of different cell subpopulations like regulatory T-cells.

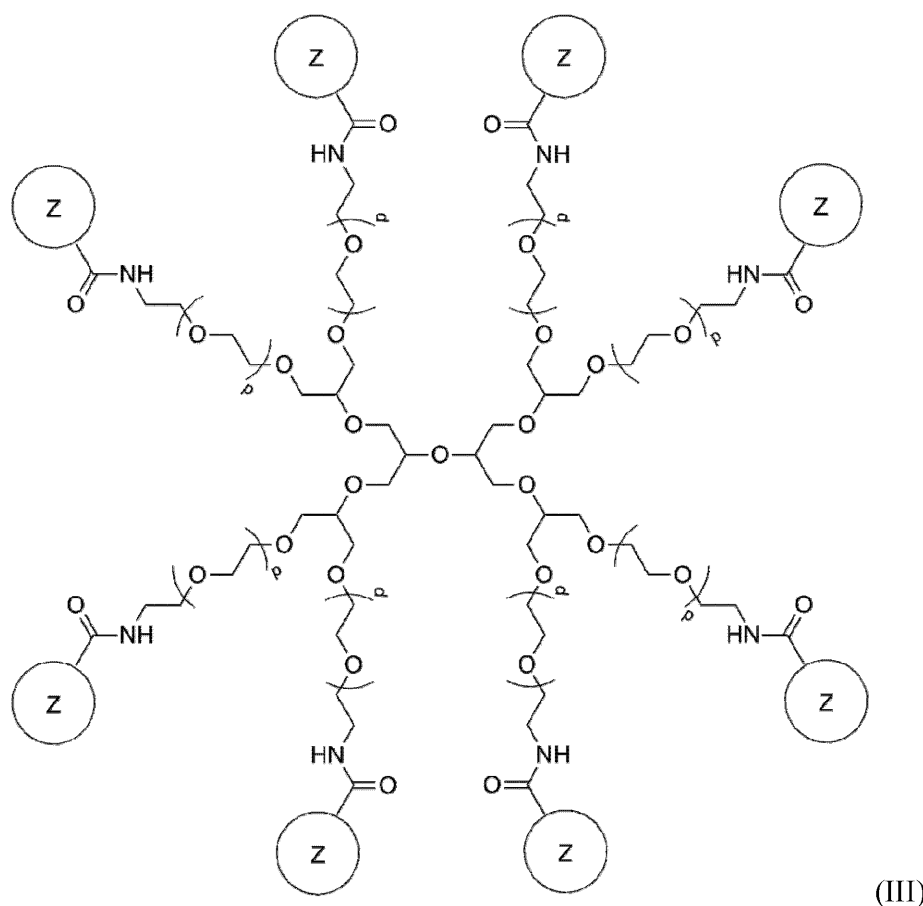
5

**Conjugates X<sub>n</sub> – P – Y<sub>m</sub>**

[0042] Preferable, conjugates used in the method of the invention are provided with spacer groups P having 100 to 1000 repeating units of ethylene glycol.

10 [0043] For example, conjugates used in the method of the invention are compounds according to the general formula II and III, each with Z = at least one fluorescent moiety X and at least one antigen recognizing moiety Y; and p is an integer ranging from 2 to 500.





### Cell Detection Methods

[0044] The method and equipment to detect the target labelled with the conjugate  $X_n$   
 5 – P –  $Y_m$  is determined by the fluorescent moiety X.

[0045] Targets labelled with the conjugate are detected by exciting the fluorescent  
 moiety X and analysing the resulting fluorescence signal. The wavelength of the excitation is  
 usually selected according to the absorption maximum of the fluorescent moiety X and provided  
 by LASER or LED sources as known in the art. If several different detection moieties X are  
 10 used for multiple colour/parameter detection, care should be taken to select fluorescent moieties  
 having not overlapping absorption spectra, at least not overlapping absorption maxima. In case  
 of a fluorescent moieties as fluorescent moiety the targets may be detected, e.g., under a  
 fluorescence microscope, in a flow cytometer, a spectrofluorometer, or a fluorescence scanner.  
 Light emitted by chemiluminescence can be detected by similar instrumentation omitting the  
 15 excitation.

### Use of the method

[0046] The method of the invention can be used for various applications in research, diagnostics and cell therapy, like in fluorescence microscopy, flow cytometer, spectrofluorometry, cell separation, pathology or histology.

5 [0047] In a first variant of the invention, biological specimens like cells are detected for counting purposes i.e. to establish the amount of cells from a sample having a certain set of antigens recognized by the antigen recognizing moieties of the conjugate.

[0048] In another variant, the biological specimens detected by the conjugate in step c) are separated from the sample by optical means, electrostatic forces, piezoelectric forces, mechanical separation or acoustic means. For this purpose, the biological specimens detected  
10 by the conjugate in step d) are separated from the sample according to their detection signal to one or more populations simultaneously or subsequent before performing step e) by optical means, electrostatic forces, piezoelectric forces, mechanical separation or acoustic means.

[0049] In another variant of the invention, the location of the target moieties like antigens on the biological specimens recognized by the antigen recognizing moieties of the  
15 conjugate is determined. Such techniques are known as “Multi Epitope Ligand Cartography”, “Chip-based Cytometry” or “Multiomyx” and are described, for example, in EP 0810428, EP1181525, EP 1136822 or EP1224472. In this technology, cells are immobilized and contacted with antibodies coupled to fluorescent moiety. The antibodies are recognized by the respective antigens on the biological specimen (for example on a cell surface) and after  
20 removing the unbound marker and exciting the fluorescent moieties, the location of the antigen is detected by the fluorescence emission of the fluorescent moieties. In certain variants, instead of antibodies coupled to fluorescent moieties, antibodies coupled to moieties detectable for MALDI-Imaging or CyTOF can be used. The person skilled in the art is aware how to modify the technique based on fluorescent moiety to work with these detection moieties.

25 [0050] The location of the target moieties is achieved by a digital imaging device with a sufficient resolution und sensitivity in for the wavelength of the fluorescence radiation. The digital imaging device may be used with or without optical enlargement for example with a fluorescence microscope. The resulting images are stored on an appropriate storing device like a hard drive, for example in RAW, TIF, JPEG, or HDF5 format.

30 [0051] In order to detect different antigens, different antibody-conjugates having the same or different fluorescent moiety or antigen recognizing moiety Y can be provided. Since the parallel detection of fluorescence emission with different wavelengths is limited, the antibody-fluorochrome-conjugates are utilized sequentially individually or in small groups (2-10) after the other.

[0052] In yet another variant of the method according to the invention, the biological specimens – especially suspension cells - of the sample are immobilized by trapping in microcavities or by adherence.

[0053] In general, the method of the invention can be performed in several variants. For example, the conjugate not recognized by a target moiety can be removed by washing for example with buffer before the target moiety labelled with the conjugate is detected.

[0054] In a variant of the invention, at least two conjugates are provided simultaneously or in subsequent staining sequences, wherein each antigen recognizing moiety Y recognizes different antigens. In an alternative variant, at least two conjugates can be provided to the sample simultaneously or in subsequent staining sequences, wherein each conjugate comprises a different enzymatically degradable spacer P which is cleaved by different enzymes. In both cases, the labelled target moieties can be detected simultaneously or sequentially. Sequential detection may involve enzymatically degrading of at least one spacer molecule P or subsequent enzymatically degrading of the spacer molecule P with optionally intermediate removing (washing) of the non-bonded moieties.

### Examples

[0055] In order to illustrate the general kinetics involved in photodegradation, Fig. 1 shows a schematic curve obtained for photodegradation of a xanthene dye by light fitted with a mono-exponential decay curve such as  $f(x)=y_0 * e^{-k*x}$ , where  $\tau = 1/k$  and  $t_{1/2} = \tau * \ln(2)$  is the half-life.

[0056] To measure the kinetics of photodegradation, organic fluorophores (i.e. coumarines, xanthenes, rhodamines, cyanines, among others) were either dissolved in DMSO and diluted in PBS or directly dissolved in PBS such that the concentration was adjusted to obtain an absorbance at their respective maxima of ca. 0.3 A.U. with a path-length of 1 cm. This way all solutions are normalized by their absorbance and comparable. Then the solution was placed inside a 3 window fluorescence quartz cuvette with low head space and an air-tight top to avoid evaporation and sample concentration. The sample in the cuvette was then irradiated for fixed amount of times and both the absorbance and emission spectra were recorded. Intensity values are their maxima were used to plot vs irradiate time and then a mathematical fit to mono-exponential decays was performed by appropriate computer software to obtain a curve similar to the one shown in Fig. 1. Characteristic decay times ( $k$ ) were used to calculate half-life among other parameters.

[0057] Fig 2. shows photodegrading decay curves for a series of dyes belonging to a different chemical classification according to the nature of their chromophore (i.e. xanthenes, rhodamines, cyanines), and their PEGylated version where each dye is covalently conjugated to branched PEG.

5 [0058] The data shown in Fig. 2 shows that: a) all dyes classes are sensitive to light photo-degradation and b) when conjugated to a branched PEG as defined in this application the rate of photodegradation is higher.

[0059] Example

10 [0060] Photodegradation curves were obtained for a Cyanine dye under four different conditions:

- i) not bond to a spacer and free in solution (comparison)
- ii) covalently attached to a linear PEG of 20kDa (comparison)
- iii) free in solution containing 5% PEG 20kDA not covalently attached (comparison)
- iv) covalently attached to a branched PEG of 20kDa (according to the invention)

15 [0061] Fig.3 illustrates that both covalently conjugated but linear PEGs and non-conjugated but branched PEG (5% PEG) of same molecular weight do not exert an effect on the degradation rate of a fluorophore.

20 [0062] Accordingly, only conjugates as disclosed in the present application i.e. branched PEGs covalently conjugated to a fluorescent moiety have the accelerated light-induced photo-degradation as required by the method of the invention.

**Claims**

1. Method for detecting a target moiety in a sample of biological specimens by:

- b) providing at least one conjugate with the general formula (I)  $X_n - P - Y_m$ , with X is a fluorescent moiety, Y an antigen recognizing moiety, n, m are integers between 1 and 100 and P is a spacer comprising polyethyleneglycol according to formula :

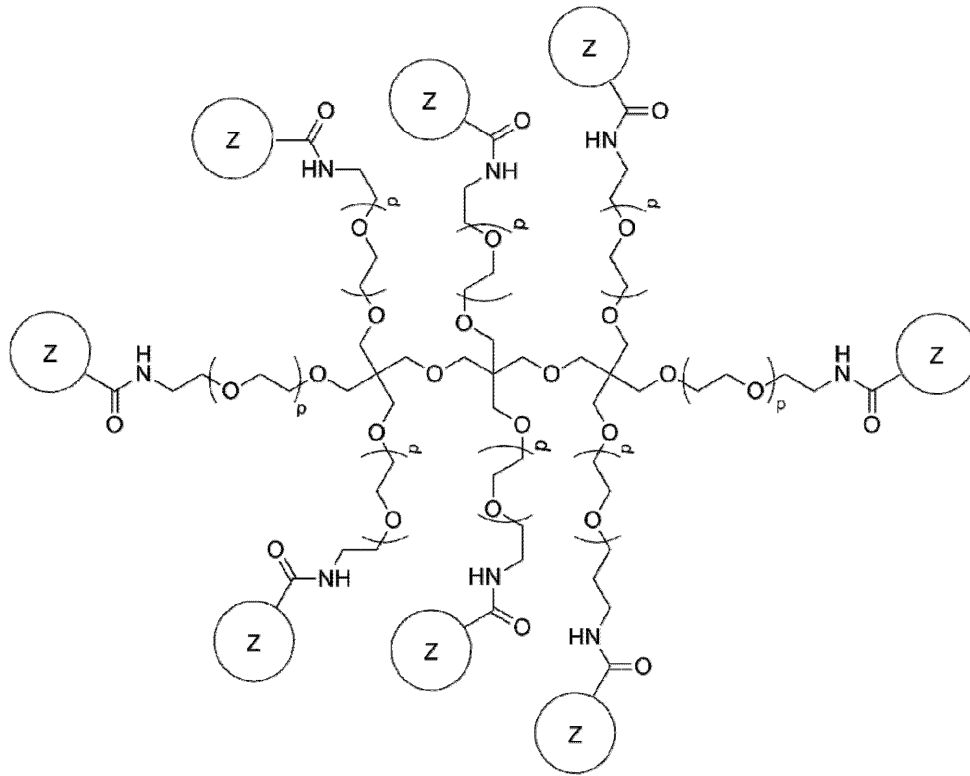


Wherein R1 to R8 are independently H or a branched or a linear oligomer of ethylene glycol with at least 1 and a maximum of 20000 repeating units or a covalent bond to Y or X, with the proviso that at least two of R1 to R8 are covalent bonds to Y or X

and o is an integer of 1 – 500

- b) contacting the sample of biological specimens with at least one conjugate, thereby labeling the target moiety recognized by the antigen recognizing moiety Y with the conjugate
- c) exciting the labelled target moieties with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X
- d) detecting the labelled target moieties by detecting the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety and
- e) degrading the fluorescent moiety X of the labelled target moieties by irradiating the conjugate with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X for a time sufficient to deliver enough energy to reduce the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety at least by 75% of the initial fluorescence radiation.

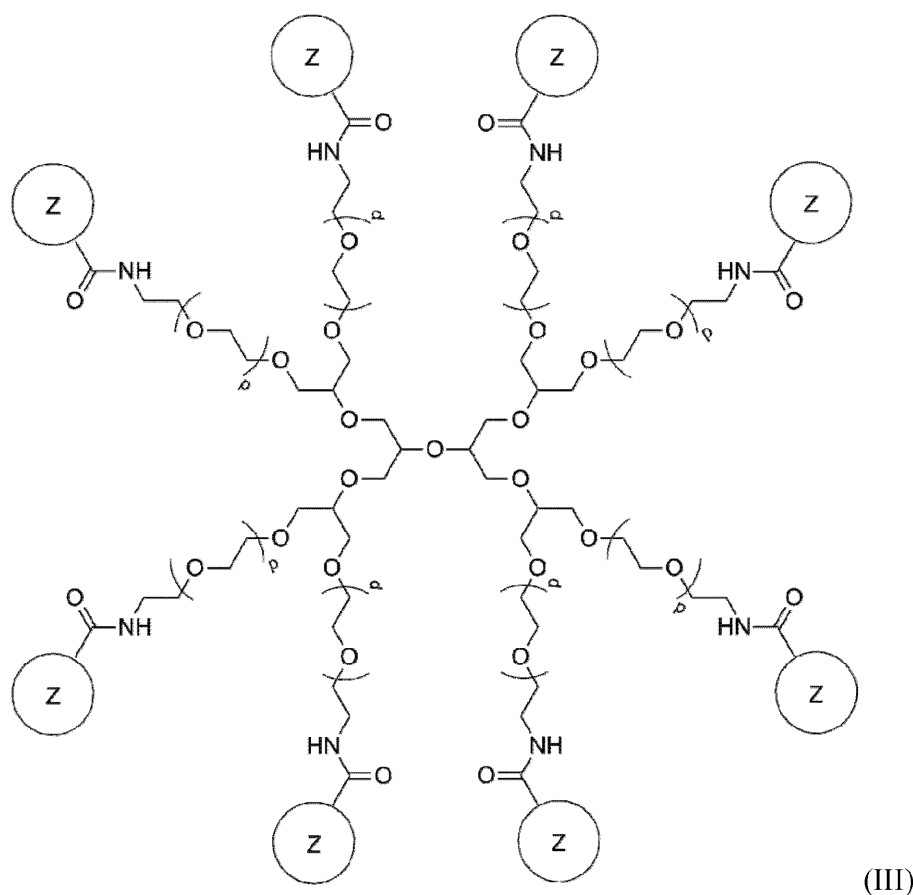
2. Method according to claim 1, characterized in that the conjugate is a compound according to the general formula II:



(II)

with Z = at least one fluorescent moiety X and at least one antigen recognizing moiety Y; and p is an integer ranging from 2 to 500.

- 5 3. Method according to claim 1, characterized in that in that the conjugate is a compound according to the general formula III:



with Z = at least one fluorescent moiety X and at least one antigen recognizing moiety Y; and p is an integer ranging from 2 to 500.

5

4. Method according to any of the claims 1 to 3, characterized in that fluorescent moiety X is selected from the group consisting of xanthene dyes, rhodamine dyes, coumarine dyes, cyanine dyes, pyrene dyes, oxazine dyes, pyridyl oxazole dyes and pyrromethene dyes.

10

5. Method according to any of the claims 1 to 3, characterized in that fluorescent moiety X is substituted with on or more water solubility imparting substituents selected from the group consisting of sulfonates, phosphonates, phosphates, sulfonamides, polyethers and carbonates.

15

6. Method according to any of the claims 1 to 5, characterized in that antigen recognizing moiety Y is least one biomolecule selected from group consisting of immunoglobulin,

antibody, fragmented antibody, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, sdAb, scFv, di-scFv each of naturally or recombinant origin.

- 5 7. Method according to any of the claims 1 to 5, characterized in that antigen recognizing moiety Y is least one biomolecule selected from the group consisting of peptide/MHC-complexes, receptors for cell adhesion or costimulatory molecules, receptor ligands, antigens, hapten binders, avidin, streptavidin, neutravidin, aptamers, primers and ligase substrates.
- 10 8. Method according to any of the claims 1 to 5, characterized in that the antigen recognizing moiety Y is an antibody, an fragmented antibody, an fragmented antibody derivative, peptide/MHC-complexes targeting TCR molecules, cell adhesion receptor molecules, receptors for costimulatory molecules or artificial engineered binding molecules.
- 15 9. Method according to any of the claims 1 to 8, characterized in that steps a) -d) are repeated by providing at least two conjugates, wherein each antigen recognizing moiety Y recognizes different antigens.
- 20 10. Method according to any of the claims 1 to 9, characterized in that in step e) the fluorescent moiety X of the labelled target moieties is further degrading by adding oxidative agents.
- 25 11. Use of the method in fluorescence microscopy, flow cytometry, spectrofluorometry, cell separation, pathology or histology.

**Abstract**

The invention is directed to a method for detecting a target moiety in a sample of biological specimens by:

- 5 a) providing at least one conjugate with the general formula (I)  $X_n - P - Y_m$ , with X is a fluorescent moiety, Y an antigen recognizing moiety, n, m are integers between 1 and 100 and P is a spacer comprising polyethyleneglycol according to formula :



10 Wherein R1 to R8 are independently H or a branched or a linear oligomer of ethylene glycol with at least 1 and a maximum of 20000 repeating units or a covalent bond to Y or X, with the proviso that at least two of R1 to R8 are covalent bonds to Y or X

and o is an integer of 1 – 500

- 15 b) contacting the sample of biological specimens with at least one conjugate, thereby labeling the target moiety recognized by the antigen recognizing moiety Y with the conjugate
- c) exciting the labelled target moieties with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X
- 20 d) detecting the labelled target moieties by detecting the fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety and
- e) degrading the fluorescent moiety X of the labelled target moieties by irradiating the conjugate with light having a wavelength within the absorbance spectrum of fluorescent moiety X for a time sufficient to deliver enough energy to reduce the
- 25 fluorescence radiation emitted by the fluorescent moiety at least by 75% of the initial fluorescence radiation.

Use of the method in fluorescence microscopy, flow cytometer, spectrofluorometry, cell separation, pathology or histology

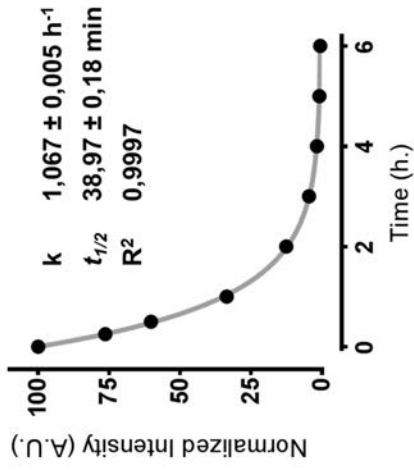


Fig. 1

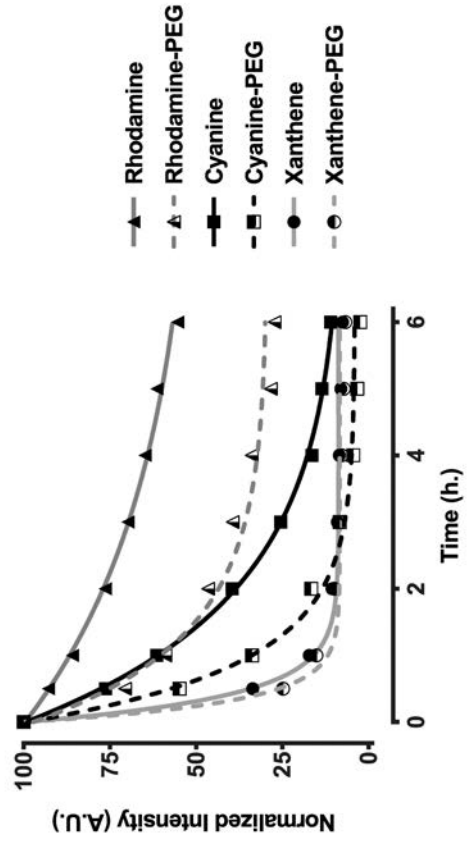


Fig. 2

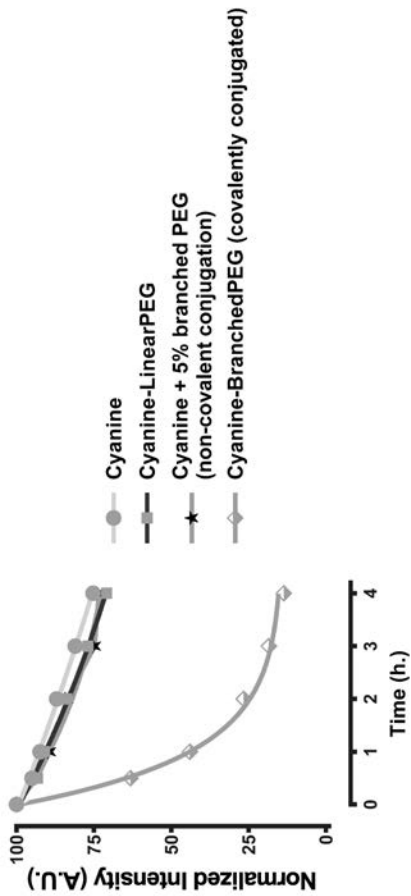


Fig. 3

专利名称(译)	如何点亮褪色的细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019095451A</a>	公开(公告)日	2019-06-20
申请号	JP2018220121	申请日	2018-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	美天旋GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungr 美天旋生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	美天旋生物技术GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	クリスティアン ドーゼ ヴェロニカルドルフ		
发明人	ヨナタン ファウアーバツハ クリスティアン ドーゼ トーマス デー. ロツケル ヴェロニカルドルフ		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/541 G01N33/53 G01N33/48 G01N21/64 G01N33/58		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/5306 G01N33/542 G01N33/582 G01N33/54353		
FI分类号	G01N33/533 G01N33/541 G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N21/64.F G01N21/64.B G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA04 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA13 2G043/FA03 2G043/HA05 2G043/KA02 2G043/NA01 2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12		
代理人(译)	前川純一 二宮和也HiroshiYasushi		
优先权	2017203699 2017-11-27 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够重复检测生物样品的样品中的目标部分的方法  
 溶液：a) 具有通式I：X<sub>n</sub>-P<sub>Y</sub>m (I)，其中X是荧光部分，Y是抗原提供至少一种作为识别部分的缀合物，n，m是1至100之间的整数，P是包含聚乙二醇的间隔物，b) 生物样本的样品和至少一种使抗原识别部分Y识别的靶部分与物种的缀合物接触，c) 用波长在荧光部分X的吸收光谱内的光激发标记的靶部分，d B.) 通过检测荧光发射检测标记的靶部分和e) 使缀合物发荧光部分足够的时间以提供足够的能量以将荧光发射减少至少75%的初始荧光发射通过照射波长在X的吸收光谱内的光来分辨靶部分的荧光部分X.它涉及到由所述进行的方法。【选择图表】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特許2019-95451 (P2019-95451A) 令和1年6月20日 (2019. 6. 20)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考) 2G043 2G045
G01N 33/533 (2006.01)	G01N 33/533	
G01N 33/541 (2006.01)	G01N 33/541	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	Y
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48	P
G01N 21/64 (2006.01)	G01N 21/64	F
審査請求 未請求 請求項の数 11 O.L. 外国語出願 (全 35 頁) 最終頁に続く		
(2) 出願番号 特願2018-220121 (P2018-220121)	(7) 出願人 312000044	
(2) 出願日 平成30年11月26日 (2018.11.26)	ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト	
(3) 優先権主張番号 17203699.8	ミット ベシュレンクテル ハフツング	
(3) 優先日 平成29年11月27日 (2017.11.27)	Miltenyi Biotec GmbH	
(3) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ-エーバート-シュトラーセ 68	
	Friedrich-Ebert-Strasse 68, D-51429 Bergisch Gladbach, Germany	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 染色された細胞を光褪色させる方法		