

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-526034

(P2019-526034A)

(43) 公表日 令和1年9月12日(2019.9.12)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------------|
| GO 1 N 33/532 (2006.01) | GO 1 N 33/532 | Z N A A 4 H O 4 5 |
| CO 7 K 16/00 (2006.01) | CO 7 K 16/00 | |
| CO 7 K 14/315 (2006.01) | CO 7 K 14/315 | |
| CO 7 K 14/31 (2006.01) | CO 7 K 14/31 | |
| CO 7 K 16/42 (2006.01) | CO 7 K 16/42 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2018-562518 (P2018-562518)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月1日 (2017.6.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月24日 (2019.1.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/035375
 (87) 国際公開番号 W02017/210387
 (87) 国際公開日 平成29年12月7日 (2017.12.7)
 (31) 優先権主張番号 62/344, 441
 (32) 優先日 平成28年6月2日 (2016.6.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 518401856
 アルティビュー, インク.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 138-1044, ケンブリッジ, コ
 ンコード アヴェニュー 763デー
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 チェン, シー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 465, ウェスト ニュートン, ケリ
 ー コート 31
 Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40
 BA54 CA11 CA40 DA75 EA54
 FA74

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体ベースの交換イメージングを迅速化する組成物及び方法

(57) 【要約】

(a) 標的認識抗体を一価的に結合することができる対応する M T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した、少なくとも 2 つ以上の標的認識抗体を用意すること、(b) 試料を、対応する M T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した 2 つ以上の標的認識抗体とインキュベートすること、(c) M T A B - D M に対応する少なくとも 2 つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかで適用すること、及び(d) 少なくとも 2 つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかでイメージングすること、を含む、試料中の少なくとも 2 つの標的を交換イメージングのための方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の少なくとも 2 つの標的の交換イメージングのための方法であって、

a . 標的認識抗体を一価的に結合することができる対応する M T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した、少なくとも 2 つ以上の標的認識抗体を用意すること、

b . 試料を、対応する M T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した前記 2 つ以上の標的認識抗体とインキュベートすること、

c . 前記 M T A B - D M に対応する少なくとも 2 つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかで適用すること、

d . 少なくとも前記 2 つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかでイメージングすること、

を含む前記方法。

10

【請求項 2】

前記 M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または一価の抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

対応する M T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した前記標的認識抗体のすべてが、同時に前記試料とインキュベートされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記イメージャー部分が、2 つ以上のイメージャー部分を有する少なくとも 1 つのバッチと少なくとも 2 つのバッチを有する方法とを用いてバッチで適用され、前記イメージングが少なくとも 2 つのバッチで起こる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記標的認識抗体を前記試料とインキュベートする前に、過剰量の M T A B - D M を用いて遊離の標的認識抗体が過剰となるのを防止する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記標的認識抗体を前記試料とインキュベートする前に、限外濾過またはゲル濾過を使用して遊離の M T A B - D M が除去される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

非特異的抗体が、染色、洗浄及び / またはイメージング緩衝液に添加される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記非特異的抗体が、前記標的認識抗体と同じ宿主種由来の抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記非特異的抗体が、(標的タンパク質のいずれによっても免疫化されていない動物由来の)正常血清でみられるポリクローナル抗体である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記非特異的抗体が、前記試料中に存在しないタンパク質に対するモノクローナル抗体である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 11】

a . M T A B、

b . 前記 M T A B に共有結合したドッキング部分、

c . 第 1 のドメインが前記ドッキング部分に特異的に結合することができ、第 2 のドメインが前記ドッキング部分に特異的に結合することができない、前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインを有する中間部分、

を含む組成物。

【請求項 12】

前記 M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または一価の抗体フラグメントである、請求項 11 に記載の組成物。

50

【請求項 13】

交換イメージングのための試薬を作製する方法であって、

- a. M T A B を用意すること、
 - b. 前記 M T A B をドッキング部分にコンジュゲートさせて M T A B - D M を形成すること、
 - c. それぞれ、前記ドッキング部分に特異的に結合することができる第 1 のドメインと前記ドッキング部分に特異的に結合することができない第 2 のドメインとを有する、複数の中間部分を用意すること、
 - d. 前記複数の中間部分を前記 M T A B - D M と化合すること、
- を含む前記方法。

10

【請求項 14】

M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または一価の抗体フラグメントである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記複数の中間部分が、1つのバッチ反応で前記 M T A B - D M と化合される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記複数の中間部分が、別々に前記 M T A B - D M と化合される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

試料中の少なくとも 2 つの標的の交換イメージングのためのキットであって、

- a. M T A B と、イメージャー部分を特異的に結合することができるドッキング部分とを含む、少なくとも 2 つの異なる M T A B - D M 試薬、
 - b. 場合によって、少なくとも 2 つの異なる標的認識抗体、
 - c. 観察可能部分で標識され、個々に前記 M T A B - D M 試薬に特異的に結合することができる、少なくとも 2 つのイメージャー部分、
 - d. 場合によって、少なくとも 1 つの、標的のいずれにも特異的に結合しない抗体、
- を含む前記キット。

20

【請求項 18】

前記 M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または抗体の一価のフラグメントから選択される、請求項 17 に記載のキット。

30

【請求項 19】

前記 M T A B - D M が、少なくとも 2 つの異なる標的認識抗体を約 1 f M ~ 1 n M の親和性で結合することができる、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 20】

請求項 17 に記載の前記試薬を用いる、交換イメージングのための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本出願は、あらゆる目的のために全体として本明細書に参照により組み入れている、2016年6月2日に提出された米国仮出願第 62 / 344 , 441 号の優先権の利益を主張する。

【0002】

配列表

配列表は、作成日 2017年5月11日、サイズ 20 , 200 バイトのファイル名「2017 - 05 - 11__01168 - 0006 - 00PCT__SeqList__ST25 . t x t」で、A S C I I フォーマットされたテキストファイルとして本出願と同時に E F S - W e b で提出される。E F S - W e b で提出されたこの配列表は、明細書の一部であり、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0003】

本出願は、抗体ベースの交換イメージングを迅速化する組成物及び方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

超解像イメージングは、一つの試料の中の複数の標的を検出するために使用することができる。先に第1の標的に対する第1の抗体を使用して試料中の第1の標的を標識し、その標識をイメージングした後、第2の標的に対する第2の抗体などで試料を標識する前に第1の抗体またはその標識を除去または破壊した。しかし、この方法は、非常に労働集約的であり、各抗体を使って別々に長時間インキュベーションすることが必要であった。

【0005】

交換イメージングによって、同一試料上の多数の標的をイメージングできるように多重化能力を獲得する、若干の改良が提供された。交換イメージングは、以下のステップ：(1)異なる復号可能な情報を運ぶ分子(ドッキング部分またはDMと呼ばれる)を、それぞれ異なる標的認識分子に付着すること、(2)個々にドッキング部分を特異的に認識する、観察可能部分を運ぶ分子のセット(イメージャー部分と呼ばれる)を使用して、ドッキング部分のサブセットを標識し、対応する標的のサブセットをイメージングすること、(3)ステップ2で使用したイメージャー部分のセットを除去する、またはかかるイメージャー部分上の観察可能部分を不活性化すること、及び(4)個々にドッキング部分を特異的に認識する、観察可能部分を運ぶイメージャー部分の別のセットを使用して、ドッキング部分の別のサブセットを標識し、対応する標的のサブセットをイメージングすること、を含むことができ、(5)場合によって、標的の多重サブセットを可視化するためにステップ3及び4を繰り返すことができる。

【0006】

交換イメージングの非限定的な例の1つに、抗体を標的のタンパク質またはその他の生体分子をイメージングする標的認識分子として、DNAオリゴヌクレオチドをドッキング部分として、また、ドッキング部分に相補的でありフルオロフォアなどの観察可能部分で標識されたDNAオリゴヌクレオチドをイメージャー部分として使用する、DNA交換免疫蛍光法がある。ステップ3では、高温、変性剤、DNAヘリカーゼ、DNA分解酵素、及び/または鎖置換を使用してDNAを除去してもよく、または、ドッキング部分上のフルオロフォアなどの観察可能部分を、化学的開裂、酵素的開裂、化学的漂白、光漂白、及び/または光化学的漂白によって除去してもよい。

【0007】

DNA交換免疫蛍光法の実施において、実行上の課題の1つは、標的認識抗体(一次抗体と呼ばれることもある)にドッキング部分を付着することである。ある従来型の簡便ではあるが限定的な方法では、異なる一次抗体を区別することができる全長の二次抗体を活用する。例えば、二重DNA交換免疫蛍光法では、2つの一次抗体が2種の宿主のもの(例えば、一方はマウス由来、もう一方はウサギ由来)であれば、2つの異なるドッキング部分に付着される2つの既製の二次抗体(一方は抗マウス、もう一方は抗ウサギ)を使用することができる。同様に、抗体が違うアイソタイプのもの(例えば、IgG1、IgG2a、またIgG2b)であれば、アイソタイプ特異的な二次抗体を使用することができる。しかし、複数の一次抗体が同じ宿主種及びアイソタイプのものである場合、もはやこの戦略を使うことはできない。これに代わって、通常は、染色を実施する前に、ドッキング部分を標的認識抗体に直接的に付着することになる。抗体コンジュゲーション方法は多数存在するものの(例えば、Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques 3rd. Ed., chapters 2 and 20, ISBN: 978-0-12-382239-0 (2013)を参照されたい)、収量が低い、(おそらく事実上モノクローナル抗体である)高価な一次抗体を多量に必要とする、高純度が主要要件である、労働集約的である、または高価であるなどの理由から、それらのほとんどは望ましくない。一次抗体はまた、アルブミンのようなキャリアタンパク質を含む製剤で売られていることも多く、かかるキャリアタンパク質は、特定の抗体

10

20

30

40

50

コンジュゲーション技術を妨害することがある。

【0008】

したがって、当技術分野は、交換イメージングにおいて使用する、ドッキング部分を一次抗体に付着するための改良された方法を必要としている。

【発明の概要】

【0009】

この説明に従って、幾つかの実施形態において、試料中の少なくとも2つの標的の交換イメージングのための方法は、(a) 標的認識抗体に一価的に結合することができる対応するMTAB-DM試薬にそれぞれ結合した、少なくとも2つ以上の標的認識抗体を用意すること、(b) 試料を、対応するMTAB-DM試薬にそれぞれ結合した2つ以上の標的認識抗体とインキュベートすること、(c) MTAB-DMに対応する少なくとも2つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかで適用すること、(d) その少なくとも2つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかでイメージングすること、を含む。

10

【0010】

幾つかの実施形態において、MTABは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または一価の抗体フラグメントを含む。幾つかの実施形態において、DM(ドッキング部分)及びイメージャー部分は、核酸を含む。幾つかの実施形態において、それぞれ対応するMTAB-DM試薬に結合した標的認識抗体はすべて、試料と同時にインキュベートされる。幾つかの実施形態において、イメージャー部分はすべて順次適用され、イメージングは順次起こる。幾つかの実施形態において、イメージャー部分はすべて同時に適用され、イメージングは同時に起こる。幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、2つ以上のイメージャー部分を有する少なくとも1つのバッチと、少なくとも2つのバッチを有する方法とを用いてバッチで適用され、イメージングは少なくとも2つのバッチで起こる。幾つかの実施形態において、各イメージャー部分は、違う観察可能部分で標識される。幾つかの実施形態において、各イメージャー部分は、同じ観察可能部分で標識される。幾つかの実施形態において、一部のイメージャー部分は同じ観察可能部分で標識され、一部のイメージャー部分は違う観察可能部分で標識される。幾つかの実施形態において、標的認識抗体を試料とインキュベートする前に、過剰量のMTAB-DMを用いて遊離の標的認識抗体が過剰となるのを防止する。幾つかの実施形態において、標的認識抗体を試料とインキュベートする前に、限外濾過またはゲル濾過を使用して、遊離MTAB-DMを除去する。幾つかの実施形態において、非特異的抗体を、染色、洗浄及び/またはイメージング緩衝液に添加する。幾つかの実施形態において、非特異的抗体は、標的認識抗体と同じ宿主種由来の抗体である。幾つかの実施形態において、非特異的抗体は、(標的タンパク質のいずれによっても免疫化されていない動物由来の)正常血清中にみられるポリクローナル抗体である。幾つかの実施形態において、非特異的抗体は、試料中に存在しないタンパク質に対するモノクローナル抗体である。幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、ドッキング部分を直接的に結合する。幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、ドッキング部分と、中間部分を介して間接的に結合する。

20

30

40

【0011】

幾つかの実施形態において、組成物は、(a) MTAB、(b) MTABに共有結合したドッキング部分、(c) 第1のドメインがドッキング部分に特異的に結合することができ、第2のドメインがドッキング部分に特異的に結合することができない、第1のドメイン及び第2のドメインを有する中間部分、を含む。

【0012】

幾つかの実施形態において、MTABは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または一価の抗体フラグメントである。幾つかの実施形態において、ドッキング部分及び中間部分は、核酸を含む。幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、約5~20核酸長、約8~15、または約10~12核酸長である。幾つかの実

50

施形態において、中間部分は、約10～40核酸長、約16～30、または約20～24核酸長である。

【0013】

幾つかの実施形態において、交換イメージングのための試薬を作製する方法は、(a)MTABを用意すること、(b)MTABをドッキング部分にコンジュゲートさせてMTAB-DMを形成すること、(c)それぞれ、ドッキング部分に特異的に結合することができる第1のドメインとドッキング部分に特異的に結合することができない第2のドメインとを有する、複数の中間部分を用意すること、(d)複数の中間部分をMTAB-DMと化合すること、を含む。

【0014】

幾つかの実施形態において、MTABは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または一価の抗体フラグメントである。幾つかの実施形態において、ドッキング部分及び中間部分は、核酸を含む。幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、約5～20核酸長、約8～15、または約10～12核酸長である。幾つかの実施形態において、中間部分は、約10～40核酸長、約16～30、または約20～24核酸長である。幾つかの実施形態において、複数の中間部分は、1つのバッチ反応中でMTAB-DMと化合される。幾つかの実施形態において、複数の中間部分は、個々にMTAB-DMと化合される。

【0015】

幾つかの実施形態において、試料中の少なくとも2つの標的の交換イメージングのためのキットは、(a)MTABと、イメージャー部分を特異的に結合することができるドッキング部分とを含む、少なくとも2つの異なるMTAB-DM試薬、(b)場合によって、少なくとも2つの異なる標的認識抗体、(c)観察可能部分で標識され、個々にMTAB-DM試薬に特異的に結合することができる、少なくとも2つのイメージャー部分、(d)場合によって、いずれの標的にも特異的に結合しない少なくとも1つの抗体、を含む。

【0016】

幾つかの実施形態において、MTABは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または抗体の一価のフラグメントから選択される。幾つかの実施形態において、ドッキング部分は核酸ドッキング部分であり、イメージャー部分は核酸イメージャー部分である。幾つかの実施形態において、ドッキング部分はタンパク質、ペプチド、または化合物であり、イメージャー部分は相補的なタンパク質、ペプチド、または化合物である。幾つかの実施形態において、ドッキング部分及びイメージャー部分は、それぞれ、いずれかの順で、ストレプトアビジン及びビオチンである。幾つかの実施形態において、MTAB及びドッキング部分は、ストレプトアビジン、またはSNAP-Tag(登録商標)、CLIP-Tag(商標)、Halo-Tag(登録商標)及びAvi-Tag(商標)などのコンジュゲーションドッキング部分を使用することによりコンジュゲートされる。幾つかの実施形態において、MTAB-DMは、少なくとも2つの異なる標的認識抗体を約1fM～1nMの親和性で結合することができる。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、光学的に観察可能な部分である。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、P-dot、蛍光タンパク質、蛍光核酸、Q-dot、ナノ粒子、またはSERレポーターである。幾つかの実施形態において、交換イメージングのための方法は、本明細書に記載の試薬を用いる。

【0017】

さらなる目的及び利点は、以下の説明の中で部分的に記載するものとし、部分的に、説明から明らかとなるか、または実施により理解されうる。この目的及び利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘された要素及び組合せの手段によって実現、達成されるものである。

【0018】

上述の全般的説明、及び以下の詳細な説明はいずれも、例示的及び説明的であるに過ぎ

10

20

30

40

50

ず、特許請求の範囲を限定するものではないことを理解されたい。

【0019】

本明細書に組み入れられ、その一部を構成する添付図面は、一（幾つかの）実施形態（複数可）を示し、説明と共に、本明細書に記載の原理を説明するのに役立つものである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】2つの標的を標識するためのMTAB-DMの実施形態を示す図である。標的1に対する抗体は、結合端に三角形形状を有し、標的2に対する抗体は、結合端に半円形状を有する。黒の長方形は、MTAB及びびを表し、配列尾部はドッキング部分を表す。

【図2】MTAB-DMの使用において精製を回避する一戦略を示す図である。非特異的抗体は、結合端に平らな形状を有し、図1で説明したその他の特徴を有する。

【図3】図3A~3Bは、ドッキング部分のイメージャー部分への直接的及び間接的結合を示す図である。図3Aでは、ドッキング部分がイメージャー部分に直接的に結合している。図3Bでは、ドッキング部分が中間部分に結合し、中間部分がイメージャー部分に結合している。

【図4】2段階染色及び順次染色を使用するDNA交換イメージングの例示的实施形態を示す図である。

【図5】実施例1に対応した、MTABとしてFabを、またドッキング部分としてDNAオリゴヌクレオチドを使用する実現可能性を示す画像である。

【図6】実施例2に対応した、Alexa488標識抗体：TOM20（ミトコンドリアマーカー）標的MTAB-DM複合体、及びAlexa647標識抗体：ラミンB（核膜マーカー）標的MTAB-DM複合体で染色したHeLa細胞の画像である。FITCチャンネル（A）及びCy5チャンネル（B）の画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

配列の説明

表1は、本出願で言及した特定の配列を説明する。

【表1】

| 表1：配列 | | |
|-----------|--------------------|------|
| 説明 | 配列 | 配列番号 |
| ドッキング部分1 | 5'-TTGCCACCTTCG-3' | 1 |
| ドッキング部分2 | 5'-TAACGGTCAAGC-3' | 2 |
| ドッキング部分3 | 5'-CGTAGCCCTGAC-3' | 3 |
| ドッキング部分4 | 5'-TGCTGCCTCTTT-3' | 4 |
| イメージャー部分1 | 5'-CGAAGGTGGCAA-3' | 5 |
| イメージャー部分2 | 5'-GCTTGACCGTTA-3' | 6 |
| イメージャー部分3 | 5'-GTCAGGGCTACG-3' | 7 |

| | | |
|--|--|----|
| イメージャー部分4 | 5'-AAAGAGGCAGCA-3' | 8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 由来プロテインA | MKKKNIYSIR KLGVGIASVT LGTLLISGGV TPAANAAQHD EAQQNAFYQV LNMPNLNADQ RNGFIQSLKD DPSQSANVLG EAQKLNDSQA PKADAQQNKF NKDQCSAFYE I LNMPNLNEE QRNGFIQSLK DDPSQSTNVL GEAKKLNESQ APKADNNFNK EQQNAFYEIL NMPNLNEEQR NGFIQSLKDD PSQSANLLAE AKKLNESQAP KADNKFNKEQ QNAFYEILHL PNLNEEQRNG FIQSLKDDPS QSANLLAEAK KLNDAQAPKA DNKFNKEQQN AFYEILHLPN LTEEQRNGFI QSLKDDPSVS KEILAEAKKL NDAQAPKEED NNKPGKEDGN KFGKEDGNKP GKEDNKKPGK EDGNKPGKED NKKPGKEDGN KFGKEDGNKP GKEDGNKPGK EDGNKPGKED GNGVHVVKPG DTVNDIAKAN GTTADKIAAD NKLADKNMIK PGQELVVDKK QPANHADANK AQALPETGEE NPFIGTTVFG GLSLALGAAL LAGRRREL | 9 |
| <i>Streptococcus</i> 菌種群由来 プロテインG | MEKEKKVKYF LRKSAFGLAS VSAAFVVGST VFAVDSPIED TPIIRNGGEL TNLLGNSETT LALRNEESAT ADLTAADVAD TVAAAAAENA GAAAWAAAAA ADALAKAKAD ALKEFNKYGV SDYYKNLINN AKTVEGVKDL QAQVVESAKK ARISEATDGL SDFLKSQTPA EDTVKSIELA EAKVLANREL DKYGVSDYHK NLINNAKTVE GVKDLQAQVV ESAKKARISE ATDGLSDFLK SQTPAEDTVK SIELAEAKVL ANRELDKYGV SDYYKNLINN AKTVEGVKAL IDEILALPK TDTYKLILNG KTLKGETTTE AVDAATAEKV FKQYANDNGV DGEWTYDDAT KTFTVTEKPE VIDASELTPA VTTYKLIVING KTLKGETTTE AVDAATAEKV FKQYANDNGV DGEWTYDDAT KTFTVTEKPE VIDASELTPA VTTYKLIVING KTLKGETTTE AVDAETAEKA FKQYANDNGV DGVWTYDDAT KTFTVTEMVT EVPGDAPTEP EKPEASIPLV PLTPATPIAK DDAKKDDTKK EDAKKPEAKK EDAKKAETLP TTGEGSNPFF TAAALAVMAG AGALAVASKR KED | 10 |
| <i>Peptostreptococcus magnus</i> 由来プロテインL | MKINKKLLMA ALAGAVVGG GANAYAAEED NTDNNLSMDE ISDAYFDYHG DVSDSVDPE EEIDEALAKA LAEAKETAKK HIDSLNHLSE TAKKLAKNDI DSATTINAIN DIVARADVME RKTAKEKEAE KLAAAKETAK KHIDELKHLA DKTKELAKRD IDSATTINAI NDIVARADV ERKTAKEKEA EKLAATAETA KKHIDELKHL ADKTKELAKR DIDSATTIDA INDIVARADV MERKLSEKET PEPEEEVTIK ANLIFADGST QNAEFKGTFA KAVSDAYAYA DALKKDNGEY TVDVADKGLT LNIKFAGRKE KPEEPKEEVT IKVNLI FADG KTQTAEFKGT FEEATAKAYA YADLLAKENG EYTADLEDGG NTINIKFAGK ETPETPEEPK EEVTIKVNLI FADGKIQTAE FKGT FEEATA KAYAYANLLA KENG EYTADL EDGGNTINIK FAGKETPETP EEPKEEVTIK VNLI FADGKT QTAEFKGTFE EATAEAYRYA DLLAKVNGEY TADLEDGGYT INIKFAGKEQ PGENPGITID EWLLKNAKEE AIKELKEAGI TSDLYFSLIN KAKTVEGVEA LKNEILKAHA GEETPELKD G YATYEEAEAA AKEALKND DV NNAYEIVQGA DGRYYYVLKI EVADEEPEGE DTPEVQEGYA TYEEAEAAAK EALKEDKVN AYEVVQGADG RYYYVLKIED KEDEQPGEEP GENPGITIDE WLLKNAKEDA IKELKEAGIS SDIYFDANK AKTVEGVEAL KNEILKAHAE KPGENPGITI DEWLLKNAKE AAIKELKEAG ITAEYLFNLI NKAKTVEGVE SLKNEILKAH AEKPGENPGI TIDEWLLKNA KEDAIKELKE AGITSDIYFD AINKAKTIEG VEALKNEILK AHKKDEEPGK KPGEDKKPED KKPGEDKKPE DKKPGEDKKP EDKKPGKTDK DSPNKKKKAK LPKAGSEAEI LTLAAAALST AAGAYVSLKK RK | 11 |
| 5' ATTO488 標識 オリゴヌクレオチド | 5'-TCTGCTTTCCCGTTATACATCTA-3' | 12 |
| ドッキング部分 | TCTGCTTTCCCG | 13 |

10

20

30

40

50

【0022】

I. ドッキング部分を標的認識抗体に付着する改良された方法を使用する多重イメージング

ドッキング部分を標的認識抗体に付着する改良された方法を使用する多重イメージングを、本明細書に記載する。いったんドッキング部分を標的認識抗体へ付着してしまえば、ドッキング部分で標識された抗体は様々な超解像または標準的な解像イメージングにおいて使用することができる。

【0023】

例えば、状況によって、多重イメージングは、超解像イメージングであってもよい。あるクラスの超解像イメージング技術は確率的超解像と呼ばれ、これは、蛍光標識からの点滅シグナルまたは明滅シグナルを含有する画像を特徴とする。確率的超解像は、データの処理方法によって、1分子局在化顕微鏡法(SMLM)と超解像光学ゆらぎイメージング(super-resolution optical fluctuation imaging)(SOFI)とに分けることができる。点滅または明滅反応は、有機色素の光活性化(例えば、確率的光学再構築顕微鏡法またはSTORMとして広く知られる技術において)、蛍光タンパク質の光スイッチング(例えば、光活性化局在性顕微鏡法またはPALMとして広く知られる技術において)、及び量子ドットの固有の点滅特性など、幾つかのメカニズムによって得ることができる。

【0024】

PAINT(ナノスケールトポグラフィイメージングのための点集積(point accumulation for imaging in nanoscale topography))は、溶液中の標的認識分子に付着した観察不可能なドッキング部分と観察可能な分子との間の動的で一過性の非共有結合性相互作用によって生じる、蛍光標識からの点滅シグナルまたは明滅シグナルを実現する、簡単で強力な一技術である。PAINTをベースとした超解像イメージングは、Jungmann et al., Nat methods 11(3): 313-8 (2014)(参照: PMID 24487583)によって免疫蛍光法に適用されており、標的認識分子として抗体を使用する。ここでは、我々は本技術をPAINTベース超解像免疫蛍光法(PSRIF)と称する。

【0025】

これらのイメージング方法のいずれにおいても、(a)ドッキング部分を標的認識抗体に直接的に付着すること、または(b)標的認識抗体とそれらを標識することができる二次抗体(1つのマウス標的認識抗体と1つのウサギ抗マウス二次抗体、1つのラット標的認識抗体と1つのウサギ抗ラット二次抗体など)との間に1:1の対応があるように標的認識抗体の数及びタイプを限定することに代えて、一価の強固な抗体結合剤(MTAB)を使用して、ドッキング部分を標的認識抗体に間接的に付着してもよい。MTAB、及びそれらの標的認識抗体に対する親和性は、下記の第I節Aで説明する。図1(ステップ1a及び1b)に示すように、異なる標的認識抗体を、同時にそれらの対応するMTAB-DMと複合体形成させることによって、異なるドッキング部分を異なる標的認識抗体に導入することができる。

【0026】

A. 一価の強固な抗体結合剤

幾つかの実施形態において、一価の強固な抗体結合剤(MTAB)を使用して、ドッキング部分を標的認識抗体に付着してもよい。MTABは、プロテインA、プロテインG、ならびに他の抗体の定常領域(例えば、Fab、Fab'、Fv、及びscFv)に対する一価のモノクローナル及びポリクローナル抗体を含む。プロテインA及びプロテインGは、免疫グロブリンを結合することが知られている細菌由来のタンパク質である。MTABのこれらの種類については、下記にてさらに個々に説明する。

【0027】

解離定数(K_d)で測定した、MTABの標的認識抗体への親和性は、約1 fM ~ 1 nM、約1 fM ~ 1 pM、または約1 pM ~ 1 nMの範囲であってもよい。幾つかの実施形

10

20

30

40

50

態において、 K_d 値は、約1 fM以下、10 fM、100 fM、1 pM、10 pM、100 pM、または1 nMであってもよい。任意の特定のイメージング実験で使用する標的認識抗体に対するMTAB候補物質の親和性は、ELISA、表面プラズモン共鳴、等温滴定量熱測定、ならびに結合速度及び/または解離速度を測定する蛍光ベースのアッセイによって評価してもよい。あるMTABをある標的認識抗体と組み合わせてもよいかどうかを評価するためのその他の選択肢については、下記の第I節・Cで論じる。

【0028】

標的認識抗体のタイプによって、異なるMTABを選択してもよい。この点について表2に教示する。次の表は、様々な免疫グロブリンタイプに対するプロテインA及びプロテインGの親和性に関する情報を提供する。

【表2】

| 表2：免疫グロブリンタイプ及び各種に対するプロテインA及びプロテインGの親和性 | | | |
|---|----------|------------|------------|
| 種 | 免疫グロブリン | プロテインAへの結合 | プロテインGへの結合 |
| ヒト | IgG (正常) | ++++ | ++++ |
| | IgG1 | ++++ | ++++ |
| | IgG2 | ++++ | ++++ |
| | IgG3 | - | ++++ |
| | IgG4 | ++++ | ++++ |
| | IgM | - | - |
| | IgA | - | - |
| | IgE | - | - |
| マウス | IgG1 | + | ++++ |
| | IgG2a | ++++ | ++++ |
| | IgG2b | +++ | +++ |
| | IgG3 | ++ | +++ |
| ラット | IgG1 | - | + |
| | IgG2a | - | ++++ |
| | IgG2b | - | ++ |
| | IgG2c | + | ++ |
| ヤギ | IgG | +/- | ++ |
| ウサギ | IgG | ++++ | +++ |
| ヒツジ | IgG | +/- | ++ |

【0029】

本出願において、MTABは一価である。これは、MTABの1分子が標的認識抗体の1分子だけを結合することを意味する。したがって、全長の二次抗体は、MTABにはなり得ない。これは、全長の二次抗体の1分子は、同時に2つの標的認識一次抗体を結合することができ、一次抗体の1分子は、二次抗体（二次抗体がモノクローナル、オリゴクローナル、またはポリクローナルのいずれであっても）の複数の分子によって同時に結合されることができるためである。さらに、かかる多価相互作用は、試料を通過できない高分子複合体を創出しうる可能性がある。

【0030】

1. プロテインA

プロテインAは、3ヘリックスバンドルにフォールディングする5つの相同なIg結合ドメインから構成される。各ドメインは、多くの哺乳動物種由来のタンパク質を結合する

ことができ、中でも突出してIgGを結合する。各ドメインはまた、ほとんどの免疫グロブリンのFc領域内の重鎖、及び一部の抗体のFab領域内の重鎖も結合する。十分に特徴づけされたプロテインAの一種はStaphylococcus aureus由来であるが、その他のプロテインA供給源を用いてもよい。プロテインAは、Staphylococcus aureusから分離してもよく、または遺伝子組換えによって作製してもよい。Pierce(商標)Recombinant Protein AがThermo Fisher Scientificから利用することができる。プロテインAの断片、変異体、及び誘導体もまた、それらが標的認識抗体に十分に結合する限りは使用してもよく、全長プロテインAという用語が使用されていない限り、プロテインAという用語へのあらゆる言及において含まれる。

10

【0031】

プロテインAは、十分に特徴づけされたタンパク質であり、(全長型、断片のいずれであっても)その免疫グロブリンFcドメインに結合する能力は当技術分野で理解されている。Graille, et al., Crystal Structure of a Staphylococcus aureus Protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity, PNAS 97(10): 5399-5404(2000)を参照されたい。場合によっては、プロテインAは、ドメインDのらせんII及びIIIを含む。したがって、適切なプロテインAは、標的認識抗体が選択された後に選択されうる。

20

【0032】

プロテインAの配列を、配列番号9として示す。プロテインAという用語は、ポリペプチドの全長を通して配列番号9と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である任意のポリペプチドを含む(より短い配列がその全長を通してパーセント相同性を満たしていれば、より短い配列を含むことを意味する)。幾つかの実施形態において、プロテインAの断片は、少なくとも約50、100、150、200、250、300、350、400、450、または500アミノ酸長であってもよい。

30

【0033】

化学的修飾を受けたプロテインAなどのプロテインAの誘導体もまた、本明細書では含んでもよい。

【0034】**2. プロテインG**

プロテインAと同様に、プロテインGは、免疫グロブリンに結合する、細菌によって産生されたタンパク質である。プロテインGは、C群及びG群レンサ球菌(Streptococcal bacteria)によって産生され、抗体のFab及びFc領域に結合する。プロテインGはまた、アルブミン及び細胞表面にも結合し、したがって、アルブミン及び細胞表面結合部位を欠く組換え体で利用することができる。プロテインGの断片、変異体、及び誘導体もまた、それらが標的認識抗体に十分に結合する限りは使用してもよく、全長プロテインGという用語が使用されていない限り、プロテインGという用語へのあらゆる言及において含まれる。幾つかの実施形態において、アルブミン結合部位を欠く組換えプロテインGを用いてもよい。Pierce(商標)Recombinant Protein Gは、Thermo Fisher Scientificから利用ことができ、アルブミン及び細胞表面結合ドメインをいずれも欠いている。

40

【0035】

プロテインGは、十分に特徴づけされたタンパク質であり、(全長型、断片のいずれであっても)その免疫グロブリンFcドメインに結合する能力は当技術分野で理解されている。Sjoberg et al., Streptococcal Protein

50

G, JBC 266(1):399-405(1991)を参照されたい。幾つかの実施形態において、プロテインGは、プロテインGのC1ドメインを含む。したがって、適切なプロテインGは、標的認識抗体が選択された後に選択されうる。

【0036】

プロテインGの配列を、配列番号10として示す。プロテインGという用語は、ポリペプチドの全長を通して配列番号10と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である任意のポリペプチドを含む(より短い配列がその全長を通してパーセント相同性を満たしていれば、より短い配列を含むことを意味する)。幾つかの実施形態において、プロテインGの断片は、少なくとも約50、100、150、200、250、300、350、400、450、または500アミノ酸長であってもよい。

10

【0037】

化学的修飾を受けたプロテインGを含むプロテインGの誘導体もまた、本明細書では含んでもよい。

【0038】

3. プロテインA/G

プロテインA/Gは、プロテインA及びプロテインGの両方のIgG結合ドメインを合わせもつ組換え融合タンパク質である。全長プロテインA/Gは、プロテインA由来の4つのFc結合ドメイン、及びプロテインG由来の2つのFc結合ドメインを含有する。プロテインA/Gは、ヒトIgGのすべてのサブクラスに結合するため、サブクラスが決定されていない抗体への結合に有用である。

20

【0039】

プロテインA/Gの断片、変異体、及び誘導体もまた、それらが標的認識抗体に十分に結合する限りは使用してもよく、全長プロテインA/Gという用語が使用されていない限り、プロテインA/Gという用語へのあらゆる言及において含まれる。Pierce(商標)Recombinant Protein A/GがThermo Fisher Scientificから利用することができる。化学的修飾を受けたプロテインA/Gを含むプロテインA/Gの誘導体もまた、本明細書では含んでもよい。

【0040】

4. プロテインL

プロテインLは、免疫グロブリンに結合する、細菌によって産生される別のタンパク質である。プロテインLは、Peptostreptococcus magnusによって産生され、L鎖相互作用を介して免疫グロブリンに結合し、そこからその名前が提案された。プロテインLの断片、変異体、及び誘導体は、それらが標的認識抗体に十分に結合する限りは使用してもよく、全長プロテインLという用語が使用されていない限り、プロテインLという用語へのあらゆる言及において含まれる。Pierce(商標)Recombinant Protein LがThermo Fisher Scientificから使用することができる。プロテインLは、銅-軽鎖を含有する抗体に結合する。

30

【0041】

プロテインLは、十分に特徴づけされたタンパク質であり、(全長型、断片のいずれであっても)その免疫グロブリンFcドメインへ結合する能力は当技術分野で理解されている。Kastern et al., Structure of Peptostreptococcal Protein L and Identification of a Repeated Immunoglobulin Light Chain-binding Domain, JBC 267(18):12820-12825(1992)を参照されたい。幾つかの実施形態において、プロテインLは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのBドメインの反復を含む。したがって、適切なプロテインLは、標的認識抗体が選択された後に選択されうる。

40

【0042】

50

プロテイン L の配列を、配列番号 1 1 として示す。プロテイン L という用語は、ポリペプチドの全長を通して配列番号 1 1 と少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である任意のポリペプチドを含む（より短い配列がその全長を通してパーセント相同性を満たしていれば、より短い配列を含むことを意味する）。幾つかの実施形態において、プロテイン L の断片は、少なくとも約 5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、3 0 0、3 5 0、4 0 0、4 5 0、5 0 0、5 5 0、6 0 0、6 5 0、7 0 0、7 5 0、8 0 0、9 0 0、または 9 5 0 アミノ酸長であってもよい。

【 0 0 4 3 】

化学的修飾を受けたプロテイン L を含むプロテイン L の誘導体もまた、本明細書では含んでもよい。

【 0 0 4 4 】

5 . 抗体の一価のフラグメントまたは誘導体

一価抗体もまた、当該標的認識抗体に十分に結合する限りは使用してもよい。この用語は、抗体の可変領域を含むなんらかのフラグメントを含むあらゆる一価の抗体形態を含む。これらは、抗体の F a b、F a b'、F v、及び s c F v フラグメントを含むが、それだけに限定されない。標的認識抗体に対する二次抗体の一価のフラグメントは、M T A B として用いてもよい。例えば、標的認識抗体がマウス抗体である場合、ウサギ抗マウス抗体の一価のフラグメントまたは誘導体を M T A B として用いてもよい。かかる抗体フラグメント M T A B は、完全な抗体から酵素的に分断してもよく、または遺伝子組換えによって調製してもよい。

B . ドッキング部分

【 0 0 4 5 】

ドッキング部分（または D M ）は、上で論じたように、容易に標的認識抗体と複合体形成ができるように、M T A B に結合させてもよい。

【 0 0 4 6 】

幾つかの実施形態において、ドッキング部分は核酸を含む。ドッキング部分が核酸である場合、ドッキング鎖とも記述してもよい。幾つかの実施形態において、核酸は、一本鎖 D N A、R N A または核酸類似体などの一本鎖の核酸である。核酸類似体は、改変されたリン酸骨格、改変されたペントース糖、及び / または改変された核酸塩基を含んでもよい。核酸類似体は、2' - O - メチルリボ核酸、2' - フルオロリボ核酸、ペプチド核酸、モノホリノ及びロックド核酸、グリコール核酸、ならびにトレオース核酸を含んでもよいが、それだけに限定されない。

【 0 0 4 7 】

幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、一本鎖の核酸を含み、約 5 ~ 2 0 核酸長、約 8 ~ 1 5、または約 1 0 ~ 1 2 核酸長であってもよい。幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、約 5、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 8、または 2 0 核酸長である。

【 0 0 4 8 】

幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、タンパク質、ペプチド、または化合物である。下記第 I 節 F . 1 に記述するように、ドッキング部分として作用しうる多くのタンパク質及びタンパク質のドメインは、イメージャー部分として作用しうるその他のタンパク質、ドメイン、またはペプチドと相互作用することが知られている。最も知られているドメインの一部としては、S H 2、S H 3、及び W D 4 0 ドメインが挙げられる。ほとんどの場合、これらのタンパク質及びドメインの結合相手は既知であり、遺伝子操作して所望の親和性を得ることできる。場合によっては、ある生物（例えば酵母菌）由来の天然の結合ペアを用いて、別の生物（例えばヒト）由来の試料を調べて交差相互作用を回避することができる。多くの化合物は、他の化合物またはタンパク質と特異的に相互作用することができ、その親和性は、この状況にそのまま好適である、または遺伝子操作して好適とすることができる。例えば、ビオチンとアビジン / ストレプトアビジンは、十分な特異

10

20

30

40

50

性をもって相互作用する。ジゴキシゲニン、フルオレセイン、タクロリムス、及びラパマイシンなどの多くのその他の化合物もまた、周知の結合相手を有する。

【0049】

1. 間接的コンジュゲーション

図3Bに示した実施形態など、幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、中間部分を介するなどして間接的にイメージャー部分に結合することができる。例えば、ドッキング部分及びイメージャー部分が核酸である場合、中間部分がドッキング部分に相補的な第1の領域とイメージャー部分に相補的な第2の領域とを有する限りは、核酸を含む中間部分を用いてもよい。この実施形態では、ドッキング部分がイメージャー部分に相補的である必要はない。汎用のドッキング部分を使用することは、MTAB-DMを1つのタイプのみの調製が求められ、合成するのが容易であり、ドッキング部分が核酸ドッキング部分である場合、中間部分として非常に安価なオリゴヌクレオチドを使用することができるという利点を提供することができる。

10

【0050】

したがって、幾つかの実施形態において、組成物は、MTAB、MTABに結合したドッキング部分（場合によって共有結合した）、ならびに、第1のドメインがドッキング部分を特異的に結合することができ、第2のドメインがドッキング部分に特異的に結合することができない、第1のドメイン及び第2のドメインを有する中間部分を含む。

【0051】

さらに、幾つかの実施形態において、交換イメージングのための試薬を作製する方法は、MTABを用意すること；MTABをドッキング部分にコンジュゲートさせてMTAB-DMを形成すること（場合によって共有結合で）；それぞれ、ドッキング部分に特異的に結合することができる第1のドメインとドッキング部分に特異的に結合できない第2のドメインとを有する、複数の中間部分を用意すること；複数の中間部分をMTAB-DMと化合すること、を含む。幾つかの実施形態において、複数の中間部分は、1つのバッチ反応中でMTAB-DMと化合される。これによって、MTAB-DM：中間部分の混合集団が得られる。幾つかの実施形態において、複数の中間部分は、同時に別々に組合せて、MTAB-DMと化合される。これによって、多様な、MTAB-DM：中間部分の実質的に均一な集団が得られる。

20

【0052】

幾つかの実施形態において、中間部分は、約10～40核酸長、約16～30、または約20～24核酸長である

30

【0053】

C. MTAB-DMが所定の抗体と使用できるかどうかを決定する

多くのMTAB候補物質（例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインL、プロテインA/G、及びポリクローナルFab）は、Abcam、Jackson ImmunoResearch、Santa Cruz Biotechnology、及びThermo Fisherなどの供給業者から市販されている。さらに、一部のMTAB候補物質は、市販の前駆体から作製することができる。例えば、ポリクローナルFab'は、DTTなどの還元剤でポリクローナルF(ab')₂（順次市販されている）を還元することによって作製することができる（Crivianu-Gaita et al., High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)₂ units, Biochemistry and Biophysics Reports 2:23-28 (2015)）。これらのMTAB候補物質を使用してドッキング部分（第I節Dを参照されたい）とコンジュゲートして、MTAB-DM候補物質を形成することができる。

40

【0054】

MTAB-DMには多くの選択肢があるものの、複数のタイプのタンパク質がMTABとして作用しうるため、所与の抗体に対して、選択したMTAB-DMが好適であること

50

を確証することが重要である。これは、2つの基準を満たしうることを意味する。第1に、幾つかの実施形態において、MTAB - DMの結合によって、標的を強固に結合する抗体の能力が失われないことである。第2に、幾つかの実施形態において、MTAB - DMが、実験の間、抗体：MTAB - DM複合体が有意なレベルまで解離しない十分な親和性をもって抗体を結合することである。

【0055】

第2の基準に関して、解離レベルの低下によって利点が得られるとはいえ、解離の許容レベルは適用によって異なる。適用が定性的である場合、標的は大量である、または、検出方法は十分な感受性があり、抗体：MTAB - DM複合体が残存する少量の分画でも検出することができる。したがって、解離の許容レベルは、80%超であってもよい。対照的に、より定量的な適用においては、標的存在量が少ない場合、または検出方法の感受性が高くない場合、解離の許容レベルは5%未満であってもよい。幾つかの実施形態において、MTAB - DMの約1%以下、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%が、イメージングの間に標的認識抗体から解離する。

10

【0056】

一部の抗体に対するMTABとして作用しうる一部のタンパク質は、その他の抗体に対するMTABとして作用しえないことは周知のことである。例えば、プロテインAは、ウサギIgGを強固に結合するが、マウスIgG1はほとんど結合しないことが知られている。既知の結合基準に頼ることに加えて、MTABとして作用するタンパク質の適性が不明である場合は、簡単な実験で調べることができる。

20

【0057】

事前に指定した抗体及び事前に指定した適用を与えて、MTAB - DMが抗体と十分に強固に結合しうるかどうかを簡単な方法で実験的に評価することができる。(1)一次抗体の特性が、一次抗体染色には温度Temp - XでX時間がかかると規定すること、(2)適用が、抗体：MTAB - DM複合体を洗浄した後、標的をイメージングする前に、その他のステップにさらに温度Temp - YでY時間が必要であると規定すること、(3)適用が、解離の最大許容レベルはZ%であると規定すること、及び(4)ドッキング部分とイメージャー部分との間の親和性は十分に高いことが予め決定されている(例えば、当業者に既知の多くの方法のいずれか1つを使用して、温度Temp - XでX時間及び温度Temp - YでY時間の後、解離は僅かであると予想すること、を仮定して、下記の実施例3及び/または4のプロトコルを使用して、MTAB - DMが抗体を十分に安定して結合しうるかどうかを調べることができる。

30

【0058】

D. ドッキング部分をMTABにコンジュゲートするための方法

MTABをドッキング部分にコンジュゲートして、MTAB - DMコンジュゲートを形成してもよい。

【0059】

MTABとして機能しうるタンパク質を含む、ほとんどのタンパク質は、その表面に(側鎖上に第一級アミン基を含有する)リジン残基を有する。この場合、アミン反応性架橋剤を使用して、ドッキング部分をMTABにコンジュゲートすることができる。幾つかの実施形態において、連結は、二官能性架橋剤を使用して達成してもよい。例えば、スクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート(SMCC)、SM(PEG)2(Thermo Fisher Cat# 22102)などを使用して、MTAB上のリジン残基を、チオール含有ドッキング部分(例えば、ドッキング部分がペプチドでシステインを含有する場合)またはチオール修飾ドッキング部分(例えば、チオール修飾オリゴヌクレオチド)上のチオール基と連結させることができる。別法として、アジド - NHSエステル(Thermo Fisher Cat# 88902)を使用して、アジド基をMTABのリジン残基に導入し、ドッキング部分をアルキン基で修飾し、銅の助けをかりるクリックケミストリーを用いてアジド基とアルキン基を

40

50

連結してもよい。

【0060】

多くのタンパク質はまた、システイン残基の一部として、コンジュゲーションの取っ手として使用できるチオール基を表面に有する。SMCC、SM(PEG)2などを使用して、MTABのチオール基と、アミン含有ドッキング部分上のアミン基(例えば、ドッキング部分がペプチドで、リジンまたはN末端アミンを含有する場合)またはアミン修飾ドッキング部分(例えば、アミン修飾オリゴヌクレオチド)とを連結することができる。同様に、Azido-PEG3-Maleimide(Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-496404)、Azide-PEG4-マレイミド(Click Chemistry Tools Cat# AZ10725)などを 10

【0061】

遺伝子組換えによってMTABを作製する場合、オリゴヌクレオチドドッキング部分へのコンジュゲーションを容易にするために、ストレプトアビジン(またはその誘導体もしくは関連タンパク質)などの別のコンジュゲーションし易いコンジュゲーションタグタンパク質、またはSNAP-tag(登録商標)、CLIP-tag(商標)、Halotag(登録商標)、及びAvitag(商標)などの市販されているコンジュゲーションドッキング部分を融合することができる。 20

【0062】

E. 標的認識抗体

標的認識抗体とは、全長抗体と、標的分子を検出するために使用することができる抗体様分子、及びMTABの結合のためのドメインを含有する、抗体のあらゆる遺伝子操作されたバリエーションまたはフラグメントを含む、全長抗体の抗原結合フラグメントとの両方を指す。例えば、単鎖抗体、scFv-Fcsなどを標的認識抗体として用いてもよい。抗体とは、標的分子を特異的に認識することができる、あらゆる種由来のあらゆる免疫グロブリンを指す。したがって、全長抗体という用語が使用されない限り、抗体という用語は、MTABの結合のためのドメインを含有する、抗体の抗原結合フラグメントを含む。 30

【0063】

当業者は、試料中の標的を特定した後、その標的に対する抗体を生成するか、市販の抗体を見つけるかのどちらかができる。血清精製抗体または組換え抗体のどちらを用いてもよい。これらの実施形態において標的認識抗体として作用しうる一次抗体は、様々な販売業者によって豊富に提供されており、Abcam、Sigma-Aldrichなどの供給業者、及びThermo Fisher ScientificのPierce Antibodiesからの広く多数の標的に対して利用可能な一次抗体が含まれる。

【0064】

幾つかの実施形態において、すべての標的認識抗体を試料に適用して、試料を同時に染色することができる。抗体のインキュベーションは用いた各標的認識抗体の濃度によって非常に長くなりうるため、これによって最大効率、及び最短の実験時間が得られる。2つ以上の抗体が、そのうちの少なくとも1つが意図する標的に結合することを妨害する場合などの他の実施形態において、これらの抗体は、インキュベーション及び試料への結合ではバッチを別々に分けることができ、イメージングは、同時に試料に適用された複数の標的認識抗体を用いる多重フォーマットでイメージングが起きる少なくとも1つの反応セットと共に、少なくとも2つの反応セットを含みうる。試料への複数の標的認識抗体の同時適用を図1に示す。 40

【0065】

F. イメージャー部分及び観察可能部分

観察可能部分に結合されたイメージャー部分によって、ドッキング部分のイメージング 50

が可能となる。イメージャー部分は、一過性または非一過性のどちらかでドッキング部分に結合してもよい。一過性結合とは、以下のうちの少なくとも1つが当てはまる結合相互作用を指す。(1)結合した複合体の解離速度定数(k_{off} と表されることが多い)が 0.1 s^{-1} 以上である、または(2)解離定数(K_d と表されることが多い)が 100 nM 以上である。非一過性結合とは、結合した複合体の解離速度定数(k_{off})が 0.1 s^{-1} 未満であり、解離定数(K_d)が 100 nM 未満である、結合相互作用を指す。一過性及び非一過性の結合に関する選択肢については、米国仮出願第62/327,604号の中でさらに論じられている。

【0066】

1. イメージャー部分

イメージャー部分は、第I節Bで上述したように、ドッキング部分に特異的に結合することができる。ドッキング部分が核酸である場合、イメージャー部分もまた核酸を含む。イメージャー部分が核酸を含んでなる場合、イメージャー部分はイメージャー鎖とも記述してもよい。幾つかの実施形態において、核酸は、一本鎖DNA、RNAまたは核酸類似体などの一本鎖の核酸である。核酸類似体は、改変されたリン酸骨格、改変されたペントース糖、及び/または改変された核酸塩基を含んでもよい。核酸類似体は、2'-O-メチルリボ核酸、2'-フルオロリボ核酸、ペプチド核酸、モノホリノ及びロックド核酸、グリコール核酸、及びトレオース核酸を含んでもよいが、それだけに限定されない。

10

【0067】

特異的な結合によって、ドッキング部分及びイメージャー部分が核酸である場合、それらを高イオン強度緩衝液条件下でハイブリダイズしてもよく、例えば、室温で高イオン強度緩衝液条件(例えば、 $1\times$ 生理的食塩クエン酸ナトリウム緩衝液、または 150 mM 、 200 mM 、 300 mM 、 400 mM 、 500 mM 、または 600 mM 塩化ナトリウムのリン酸緩衝液)を用いて、ハイブリダイゼーションを評価してもよい。

20

【0068】

幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、一本鎖の核酸を含み、約5~20核酸長、約8~15、または約10~12核酸長であってもよい。幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、約5、8、9、10、11、12、13、14、15、18、または20核酸長である。

【0069】

幾つかの実施形態において、イメージャー部分は、上記の第I節Bで論じたドッキング部分選択肢に対する相手として、タンパク質、ペプチド、または化合物である。

30

【0070】

幾つかの実施形態において、ドッキング部分は、中間部分を介するなどして間接的にイメージャー部分に結合してもよい。例えば、ドッキング部分及びイメージャー部分が核酸である場合、中間部分がドッキング部分に相補的な第1の領域とイメージャー部分に相補的な第2の領域とを有する限りは、核酸を含む中間部分を用いてもよい。この実施形態において、ドッキング部分はイメージャー部分に相補的である必要はない。

【0071】

例えば、表3では、異なる標的認識抗体の標識に用いることができる以下のドッキング部分とイメージャー部分とのペアを示す。ここでは、ドッキング部分1とイメージャー部分1がペアを組むなどとする。その他の同様のペアも容易に調製することができる。

40

【表 3】

| 表 3 : ドッキング部分とイメージャー部分のペア | | |
|---------------------------|--------------------|------|
| 説明 | 配列 | 配列番号 |
| ドッキング部分 1 | 5'-TTGCCACCTTCG-3' | 1 |
| ドッキング部分 2 | 5'-TAACGGTCAAGC-3' | 2 |
| ドッキング部分 3 | 5'-CGTAGCCCTGAC-3' | 3 |
| ドッキング部分 4 | 5'-TGCTGCCTCTTT-3' | 4 |
| イメージャー部分 1 | 5'-CGAAGGTGGCAA-3' | 5 |
| イメージャー部分 2 | 5'-GCTTGACCGTTA-3' | 6 |
| イメージャー部分 3 | 5'-GTCAGGGCTACG-3' | 7 |
| イメージャー部分 4 | 5'-AAAGAGGCAGCA-3' | 8 |

10

20

【0072】

2. 観察可能部分

様々な観察可能部分を、本明細書に記載のイメージャー部分に固定してもよい。幾つかの実施形態において、任意の観察可能部分を用いてもよく、幾つかの実施形態において、観察可能部分は光学的に観察可能である。観察可能部分は、シグナルを吸収またはシグナルを放出することができる。シグナルを放出する分子のうち、それだけに限定されないがフルオレセイン、ローダミン、シアニン色素、Alexa色素、DyLight（登録商標）色素、Atto色素などのフルオロフォアを含む、有機低分子などの蛍光を発する分子を用いてもよいが、それだけに限定されない。

30

【0073】

幾つかの実施形態において、P-dotなどの有機ポリマーを用いてもよい。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、蛍光タンパク質または蛍光核酸（Spinach及びその誘導体を含む蛍光RNAを含む）を含む生物学的分子であってもよいが、それだけに限定されない。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、Q-dotを含む無機部分であってもよい。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、ナノ粒子、及び表面増強ラマン分光（SERS）レポーター（例えば、4-メルカプト安息香酸、2,7-メルカプト-4-メチルクマリン）など、弾性または非弾性散乱のいずれかの散乱を通して作動する部分であってもよい。幾つかの実施形態において、観察可能部分は、ルテニウム複合体及びルシフェラーゼなどの、化学発光/電気化学発光物質であってもよい。観察可能部分は、光学シグナル、（電磁スペクトル全域にわたる）電磁シグナル、（例えば質量分析によって検出可能な）原子/分子量、（例えば原子間力顕微鏡によって検出可能な）触知可能な集合体、電流、または電圧を発生してもよい。

40

【0074】

幾つかの実施形態において、ただ1つのタイプの観察可能部分が、異なるイメージャー

50

部分のすべてに結合されてもよい。このような場合、観察可能部分を有するイメージャー部分1を適用し、イメージングし、洗浄ステップを実施することができ、また、観察可能部分を有するイメージャー部分2を適用し、イメージングするなどすることができる。コンピュータアセンブリーによって、最終画像を得ることができる。

【0075】

別法として、異なる観察可能部分を、イメージングプロトコルで使用する異なるイメージャー部分の少なくとも幾つかに（またはすべてにも）結合させることができる。これによって、バッチによるイメージングステップ（すべてではないが一部のイメージャー部分が異なる観察可能部分を有する場合）、または単一のイメージングステップ（すべてのイメージャー部分が異なる観察可能部分を有する場合）のいずれかが可能となる。当業者は、実験条件、イメージングのための標的の数、手近にある材料などに適合する、適切な観察可能部分または一連の観察可能部分を選択することができる。

10

【0076】

G. 方法ステップ

本明細書に記載したイメージングは、本明細書に記載したような追加のステップ及び構成要素と共に交換イメージングの基本的な概説を行った後に続ける。（1）最初のステップとして、MTAB-DMコンジュゲートを調製する、（2）MTAB-DMを標的認識抗体と化合して、MTAB-DM：標的認識抗体複合体を形成する（3）MTAB-DM：標的認識抗体複合体を試料と共にインキュベートした後、任意選択の洗浄ステップを行う、（4）それぞれが特異的にドッキング部分を認識してドッキング部分のすべてまたはサブセットのいずれかを標識する観察可能部分を有するイメージャー部分を適用し、対応する標的をイメージングする、（5）場合によって、ステップ（4）で用いたイメージャー部分のセットを除去、またはかかるイメージャー部分上の観察可能部分を不活性化した後、任意選択の洗浄ステップを行う、及び（6）場合によって、それぞれが特異的にドッキング部分を認識し、観察可能部分を運ぶイメージャー部分の別のセットを使用して、ドッキング部分の別のサブセットを標識し、対応する標的のサブセットをイメージングする。

20

【0077】

各イメージャー部分が全く別の観察可能部分で標識されている場合、ステップ（5）及び（6）は不要である。研究者が利用できる観察可能部分の数、及びイメージングされるべき標的の数によって、ステップ（5）及び（6）はまた、繰り返してもよい。場合によっては、ステップ（3）で、MTAB-DM：標的認識抗体複合体のすべてを一緒にインキュベートし、その他の場合では、ステップ（3）の例のうちの少なくとも1つにおいて一緒にインキュベートされた複数のMTAB-DM：標的認識抗体複合体を用いて、ステップ（3）～（4）または（3）～（6）を少なくとも1回繰り返す。

30

【0078】

標的認識抗体と試料とをインキュベートするための反応条件は、当技術分野では周知であり、研究者が利用できる標的認識抗体の濃度、試料中に存在する標的の量、標的に対する標的認識抗体の親和性、及び研究者がインキュベーションに取りうる時間を考慮に入れる。染色後に、標準的な洗浄ステップを実施することが多い。

40

【0079】

H. 追加の実施形態

1. 標的認識抗体の量との関係におけるMTAB-DMの量の調整

追加の任意選択の実施形態もまた、標的認識抗体の量との関係におけるMTAB-DMの量を調整することによって用いてもよい。

【0080】

幾つかの実施形態において、標的認識抗体とMTAB-DMとの比は、イメージングのためにMTAB-DM及び標的認識抗体を試料に適用する前に、遊離抗体またはMTAB-DMが残留しないように調整することができる。イメージングに先立つインキュベーションステップにおいて過剰な遊離抗体が存在すると、シグナルを発生しない一部の遊離抗

50

体が標的に結合することがある。これが起こった場合、遊離抗体がイメージングの全般的なシグナル発生能力を低下させると考えられる。

【0081】

さらに、第1の標的認識抗体に結合することが意図されるMTAB-DMが過剰濃度で存在し、第2の標的認識抗体に結合する（すなわち、違う標的を認識する）場合、シグナルの精度が低下する可能性が発生しうる。したがって、MTAB-DMの濃度、結合部位の数、及び標的認識抗体に対する親和性によって、標的認識抗体1を標識することを意図される一部のMTAB-DM1が、標的認識抗体1へのコンジュゲーションには過剰に存在するか、または解離して、標的認識抗体2への結合に利用できるようになる可能性がある。MTAB-DM1が標的認識抗体2に結合してしまうと、精度が低下したシグナルが生じうると考えられる。

10

【0082】

過剰によって、使用者は、MTAB-DM調製物がそれぞれの標的認識抗体上に複数の結合部位を有する場合があることを覚えておく必要がある。例えば、一価のポリクローナル抗体がMTABとして作用する場合、様々な成分の抗体が、標的認識抗体上の様々な位置に結合する場合がある。

【0083】

したがって、幾つかの実施形態において、精製ステップには、遊離の標的認識抗体及び/または遊離のMTAB-DMを除去することが含まれていてもよい。例えば、MTAB-DMが分子量において抗体より小さい場合、限外濾過またはゲル濾過を使用して、抗体：MTAB-DM複合体と遊離のMTAB-DMとを分離することができる。例えば、MTABがFabドメイン（約50kD、約150kDである標的認識抗体との比較で）である場合、また、MTAB-DMの非Fab部分が累積的に50kD未満である場合、これを用いてもよい。場合によって、標的認識抗体が過剰になることを防止するために、これを最初にMTAB-DMが過剰に使用されるときに組み合わせてもよい。

20

【0084】

2. 非特異的抗体の使用

任意選択の実施形態として、非特異的抗体を、本明細書に記載の方法に加えてもよい。抗体：MTAB-DM相互作用は非共有結合であるため、標的認識抗体の濃度に対して理想量のMTAB-DMが存在したとしても、MTAB-DM分子は、染色、洗浄、及びイメージングの間に、もともと複合体形成していた抗体から解離し、その後、第2の標的に結合した2のタイプの標的認識抗体第1に結合することがあり、これによって精度が低下したシグナルが発生する可能性がある。

30

【0085】

幾つかの実施形態において、任意選択の精製プロセスの任意選択の代替として、標的認識抗体と競合させる方法でMTAB-DMも結合しうる非特異的分子を加えてもよい。ここでは、非特異的抗体は、イメージングされる試料の成分へ特異的に結合することはない。MTAB-DM分子もともと複合体形成していた抗体から解離している場合、MTAB-DM分子が溶液中で、異なる標的に結合した抗体に結合するよりも、むしろ標的非特異的分子に結合するように、かかる非特異的抗体を染色、洗浄及び/またはイメージング緩衝液へ添加してもよい。

40

【0086】

このような非特異的分子の一例には、標的認識抗体の宿主種由来の正常血清中にみられる（すなわち、標的タンパク質のいずれかによって免疫化されていない）抗体またはかかる抗体の混合物、またはかかる血清から精製した免疫グロブリン含有タンパク質混合物がある。別法として、試料に関連のないタンパク質に対するモノクローナル抗体を非特異的抗体として用いてもよい。この非特異的抗体は、標的認識抗体との会合後に過剰に存在するか、またはイメージングプロセスの間に標的認識抗体から解離しうるかのどちらかである任意の未結合のMTAB-DMに対して、シンクとして作用する。

【0087】

50

3. M T A B - D Mを使用する2段階染色及び順次染色

さらに、はじめに抗体：M T A B - D M複合体を作製した後、この複合体で試料を染色する（これによって『1段階染色』と称する戦略）、抗体単独で試料を染色した後、二次抗体のやり方と同じように、M T A B - D Mを使用して試料染色しうる、図1及び2に示したワークフローを用いる。この戦略を『2段階染色』と称する。2段階染色では、異なるM T A B - D Mを用いて試料を同時に染色した場合、M T A B - D Mがそれぞれの意図された抗体を特異的に結合することができ、交差結合しないことを保証することができる。例えば、1つのマウス一次抗体及び1つのウサギ一次抗体を用いて試料を染色し、次いで、抗マウスF a bを、マウス一次抗体を結合することを意図されたM T A B - D MのM T A Bとして用いることができ、抗ウサギF a bを、ウサギ一次抗体を結合することを意図されたM T A B - D MのM T A Bとして用いることができる。一次抗体が異なるサブタイプ（例えば、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 bなど）のものである場合も、同様の戦略を用いることができる。

10

20

30

40

50

【0088】

一次抗体が、同じ生物由来の同じサブタイプのものである場合、それらを区別することができるM T A Bを見出すことは不可能または非現実的であると考えられる。この状況で、2段階染色戦略をまだ用いてもよいが、2つの一次抗体を順次使用する。一例として、同じ種の同じアイソタイプの2つの抗体を使用して、かかる順次染色ワークフローの一実施態様を図4に示す。はじめに、第1の標的に対し意図された第1の抗体で試料を染色した後、P B Sで洗浄する。次いで（ステップA）、第1の標的に対し意図されたM T A B - D M（例えばF a b - オリゴヌクレオチドコンジュゲート）で試料を染色した後、P B S中で洗浄する。次いで（ステップB）、後で添加される第2の標的に対し意図されたM T A B - D Mによって結合せらる、第1の一次抗体上の未占有部位がある場合、これをすべて塞ぐことができる非標識のM T A B（例えば、未修飾のF a b、黒の輪郭の角の丸い灰色の長方形で示す）で試料を処理した後、P B S中で洗浄する。次に（ステップC）、第2の標的に対し意図された第2の一次抗体で試料を染色した後、P B Sで洗浄する。このステップは、その第1の標的に対し意図されたM T A B - D Mと先に使用した非標識のM T A Bとがいずれも一価であるため、実施することができる。M T A Bの代わりに従来の二次抗体を使用する場合、第1の一次抗体によって占有されていない可変領域は第2の一次抗体を結合することができ、これは二次抗体の誤った局在化をもたらす。次に（ステップD）、第2の標的に対し意図されたM T A B - D Mで試料を染色する。第1の一次抗体上の利用できる結合部位は、第1の標的に対し意図されたM T A B - D M、またはステップBで導入した非標識のM T A Bのどちらかによってすでに塞がれているため、このM T A B - D Mは第2の一次抗体のみ結合し、第1の一次抗体を結合しない。さらに多くの標的を可視化する必要がある場合、対応する一次抗体及びM T A B - D Mを用いて、ステップB、C、Dを繰り返すことができる。

【0089】

1段階染色及び2段階染色は、同じ試料に対して実施できることを留意されたい。例えば、最初に1段階染色を使用してM T A B - D Mをある標的のサブセットに導入し、次いで2段階染色を使用してM T A B - D Mを別の標的のサブセットに導入してもよく、またはその逆も同様に行ってもよい。

【実施例】

【0090】

実施例1. D N AコンジュゲートF a bフラグメントがM T A B - D Mとして使用できることの実証

本文書に記載の技術の一実施形態において、F a bフラグメントをM T A Bとして使用し、D N Aオリゴヌクレオチドをドッキング部分として使用する。本実施形態の実現可能性に関する2つの重要な問いは、(a) M T A B - D M：抗体複合体が十分に速く形成しうるかどうかということ、及び(b) M T A B - D M：抗体複合体が、典型的な免疫蛍光法の適用に対し、十分に安定であるかどうかということである。本実施例は、この問いに

答える手順を示し、市販のFabフラグメントとアミン標識DNAオリゴヌクレオチドとをコンジュゲートすることによって作製したMTAB-DMが、素早く一次抗体を結合し、十分に安定な複合体を形成することができることを実証する。MTAB-DMを創製するために、ヤギ抗マウスIgG Fab (Jackson ImmunoResearch Cat# 115-007-003) をアジド-(PEG)₄-NHS (Click Chemistry Tools、Cat# A103P-500) とPBS中で1.5時間混合することによって修飾した(Fabフラグメント及びアジド-(PEG)₄-NHSの最終濃度は、それぞれ1mg/mL及び0.1mMである)後、ゲル濾過カラムを使用して緩衝液を交換した。次いで、このアジド-(PEG)₄修飾Fabフラグメントを、配列: 5'-TCTGCTTTC CCG-3' (配列番号13) を有する5'-DBCO標識オリゴヌクレオチドの過剰量と共に一晩インキュベートして、MTAB-ドッキング部分として作用するFab-DNAコンジュゲートを生成した。遊離のDBCO標識DNAは、30K分画分子量の限外濾過によって除去した。検出を容易にするために、このFab-DNAコンジュゲーションを配列5'-TCTGCTTTC CCGTTATACATCTA-3' (配列番号12) を有する5'-ATTO488標識オリゴヌクレオチドの過剰量とインキュベートした後、30K分画分子量の限外濾過によって未結合のATTO488標識オリゴヌクレオチド(配列番号12)を除去し、UV分光法及びスペクトル線状分離法を使用して定量化した。この最終複合体を「Fab-DNA:DNA-ATTO488」と名づける。

10

20

30

40

50

【0091】

64.5pmolのFab-DNA:DNA-ATTO488をマウス抗チューブリン抗体(クローンDM1A)1.5マイクログラムと1.5時間インキュベートした。次いで、マウス正常血清7.5マイクロリットルをその混合物に添加して標的非特異抗体を供給し、一次抗体(すなわち、マウス抗チューブリン抗体)に結合されていないFab-DNA:DNA-ATTO488をクエンチした。次いで、抗体希釈緩衝液(1%BSA、0.3%Triton-X100、5uM(dT)₃₀オリゴヌクレオチド含有PBS)136マイクロリットルを混合物に添加した。この最終混合物を用いて、事前に(3%パラホルムアルデヒド及び0.1%グルタルアルデヒドを10分間使用する)固定及び(ブロッキング緩衝液:3%BSA+0.2%TritonX-100含有PBSで1.5時間)ブロッキングを行ったHeLa細胞を、LabTekチャンバーで、4で一晩染色した。次いで、このHeLa細胞をPBSで4回、各回5分かけて洗浄し、488nmレーザー、及びFITCチャンネルフィルターキューブを使用してイメージングした。図5に示した画像から、微小管がはっきりと染色されており、これは、(1)1.5時間のインキュベーションが抗体とMTAB-DMとの複合体(すなわち、Fab-DNA:DNA-ATTO488)形成には十分であり、(2)一晩のインキュベーションの間、抗体:MTAB-DM複合体のレベルは十分なままであったこと示していることがわかる。

【0092】

実施例2.抗体:MTAB-DM複合体の間の交換の欠如

ここに記載の技術を使用して多重免疫蛍光法実施するために、実験の間、ある一次抗体を結合することを意図されたMTAB-DMがその一次抗体(またはMTAB-DMをクエンチするために使用した標的非特異抗体)から解離して、次いで別の一次抗体に結合することがないことを保証しなければならない。これは、複数のMTABが、試料中で使用された多重抗体を結合することができる場合、特に重要である。例えば、異なる標的タンパク質の2つのウサギ一次抗体を使用すべきで(ここでは抗体1と抗体2と名付ける)、2つのMTAB-DM分子(ここではMTAB-DM1及びMTAB-DM2と名付ける)のためのMTABとして抗ウサギFabを使用する場合、抗体1及び抗体2を、それぞれ、MTAB-DM1及びMTAB-DM2と複合体を形成させてもよい。この場合、実験の間、MTAB-DM1が抗体2を結合しないことを保証しなければならない。このためには、実験中にMTAB-DM:抗体複合体が非常に早く解離しないように、抗体に対するMTAB固有の親和性が高くないことが必要である。

【0093】

M T A B - D Mの代替物として蛍光標識 F a bフラグメントを使用して、F a bフラグメントが、一次抗体への固有の親和性を有してこの所望の挙動を達成するどうかを調べた。これを行うために、ここで混合物1及び混合物2と名付ける2つの混合物を調製した。混合物1では、ウサギ抗T O M 2 0抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y、C a t # F L - 1 4 5) 約0.3マイクログラムと、A l e x a 4 8 8 標識ヤギ抗ウサギF c (I g G) F a bフラグメント約1.5マイクログラムとを、8マイクロリットルの最終液量で約3時間混合した。混合物2では、ウサギ抗ラミンB抗体 (A b c a m C a t # a b 1 6 0 4 8) 約1.5マイクログラムと、A l e x a 6 4 7 標識ヤギ抗ウサギF c (I g G) F a bフラグメントとを、8マイクロリットルの最終液量で約3時間混合した。いずれの混合物とも緩衝液はP B Sであった。いずれの混合物でも、一次抗体はウサギが宿主生物であることを留意されたい。次に、ウサギ正常血清15マイクロリットルを各混合物に添加した。次に、抗体希釈緩衝液 (1 % B S A、0.3 % T r i t o n - X 1 0 0、5 u M (d T)_{3 0}オリゴヌクレオチド含有P B S) 75マイクロリットルを各混合物に添加した。次に、この2つの混合物を合わせて、事前に (3 % パラホルムアルデヒド及び0.1 % グルタルアルデヒドを10分間使用して) 固定及び (ブロッキング緩衝液 : 3 % B S A + 0.2 % T r i t o n X - 1 0 0 含有P B S で1.5時間) ブロッキングを行ったH e L a細胞を、L a b T e kチャンパー中で、4 で一晚染色した。次いで、このH e L a細胞をP B Sで4回、各回5分かけて洗浄し、(a) 4 8 8 n mレーザー、及びF I T Cチャンネルフィルターキューブ、ならびに (b) 約6 4 2 n mレーザー、及びC y 5チャンネルフィルターキューブを使用してイメージングした。その画像を図6 A ~ Bに示す。T O M 2 0 (ミトコンドリアマーカー) が意図された標的で観察可能であるF I T Cチャンネルでは、ラミンB (核膜マーカー) は観察できないことと、ラミンBが意図された標的で観察可能であるC y 5チャンネルでは、T O M 2 0は観察できないこととがわかる。したがって、抗体 : M T A B - D M複合体の間で交換はみられなかったと結論づけることができる。すなわち、F a bフラグメントは、一次抗体への固有の親和性を十分に有する。

10

20

【0094】

実施例3 : 標的認識抗体に結合するM T A B - D Mの評価

以下のプロトコルを用いて、標的認識抗体に結合するM T A B - D Mの評価、ならびに、どの程度までM T A B - D Mが標的認識抗体から解離するかを評価してもよい。

30

【0095】

(1) 事前に固定、透過処理、及び (例えばB S Aで) ブロッキングした試料を、所定の最適温度でX時間、所定の最適濃度の一次抗体で染色する。X時間は、研究者が標的認識抗体で試料を染色するために使用すると予定する時間を指す。

【0096】

(2) 試料を、室温で、P B Sで4回、各回5分かけて洗浄する。

【0097】

(3) 抗体を、室温で、10分間、100 n MのM T A B - D Mで染色する。

【0098】

(4) 試料を、室温で、P B Sで4回、各回5分かけて洗浄する。

40

【0099】

(5) 抗体を、室温で、10分間、100 n Mの蛍光標識イメージャー部分で染色する。

【0100】

(6) 試料を、室温で、P B Sで4回、各回5分かけて洗浄する。

【0101】

(7) 試料をイメージングし、イメージング条件 (光強度、フィルターキューブの情報、露光時間) を書き留める。

【0102】

50

(8) 試料を、温度 Temp - X で X 時間、次いで温度 Temp - Y で Y 時間、インキュベートする。Temp - X 及び X 時間は、研究者が標的認識抗体で試料を染色するために使用すると予定する温度及び時間を指し、Temp - Y 及び Y 時間は、標的をイメージングする前で抗体：MTAB - DM 複合体を洗浄する後の温度及び時間を指す。

【0103】

(9) ステップ(7)と同じイメージング条件を使用して、試料を再度イメージングする。

【0104】

(10) 蛍光画像を定量化し、ステップ(7)及びステップ(9)の画像中の同じ面積の蛍光強度を比較する。

【0105】

MTAB - DM の非特異的結合はみられないと仮定して、ステップ(7)のシグナル強度が標準的な免疫蛍光法から予想されるシグナル強度より実質的に(例えば、90%を超えて)低い場合、またはステップ(9)の画像上の蛍光強度がステップ(7)の画像上の蛍光強度より、所望のパーセント閾値(Z%)を超えるほど低い場合、MTAB - DM の親和性は非常に低いと判断することができる。そうでない場合、MTAB - DM の親和性は十分に高いと判断することができる。

【0106】

実施例4：さらなるMTAB - DM の検証

実施例3のプロトコールに加えて、本実施例のプロトコールを使用して、MTAB - DM が、MTAB - DM の結合によって標的を強固に結合する抗体の能力が失われないことを保証することさらに検証してもよい。

【0107】

(1) 一次抗体 1.5 µg を、過剰量のMTAB - DM と1時間混合する。

【0108】

(2) 過剰量の標的非特異抗体を加えて、1時間、未結合のMTAB - DM をクエンチし、次いで、液量が試料を十分に覆うが150 µL 未満であるように、混合物をPBSで希釈する。

【0109】

(3) 混合物を、事前に固定、透過処理、及びブロッキングした試料に適用し、温度 Temp - X で X 時間、室温でインキュベートする。Temp - X 及び X 時間は、研究者が標的認識抗体で試料を染色するために使用すると予定する温度及び時間を指す。

【0110】

(4) 試料を、室温で、PBSで4回、各回5分かけて洗浄する。

【0111】

(5) 100 nM の蛍光標識イメージャー部分を試料に適用し、10分間インキュベートする。

【0112】

(6) 試料を、室温で、PBSで4回、各回5分かけて洗浄する。

【0113】

(7) 試料をイメージングし、イメージング条件(光強度、フィルターキューブの情報、露光時間)を書き留める。

【0114】

(8) 試料を、温度 Temp - Y で Y 時間インキュベートする。Temp - Y 及び Y 時間は、標的をイメージングする前で抗体：MTAB - DM 複合体を洗浄する後の温度及び時間を指す。

【0115】

(9) ステップ(7)と同じイメージング条件を使用して、試料を再度イメージングする。

【0116】

10

20

30

40

50

(10) 蛍光画像を定量化し、ステップ(7)及びステップ(9)の画像中の同じ面積の蛍光強度を比較する。

【0117】

M T A B - D M の非特異的結合はみられないと仮定して、ステップ(7)のシグナル強度が、標準的な免疫蛍光法から予想されるシグナル強度より実質的に(例えば、90%を超えて)低い場合、またはステップ(9)画像上の蛍光強度がステップ(7)の画像上の蛍光強度より、所望のパーセント閾値Z%を超えるほど低い場合、M T A B - D M の親和性は非常に低い、または抗体に結合するM T A B - D M によって抗体の標的への安定した結合能力が失われる、すなわち、いずれかの場合、M T A B - D M は不適格であると考えられると判断することができる。そうではない場合、M T A B - D M の親和性は十分に高く、M T A B - D M は本出願のために使用できると判断することができる。

10

【0118】

実施例5：実施形態

以下の番号付けした項目は、本明細書に記載の特定の実施形態を示す。

【0119】

項目1．試料中の少なくとも2つの標的の交換イメージングのための方法であって、
 a．標的認識抗体に一価的に結合することができる対応するM T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した、少なくとも2つ以上の標的認識抗体を用意すること
 b．試料を、対応するM T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した2つ以上の標的認識抗体とインキュベートすること
 c．M T A B - D M に対応する少なくとも2つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかで適用すること、
 d．少なくとも2つのイメージャー部分を、順次、バッチで、または同時に、のいずれかでイメージングすること、を含む前記方法。

20

【0120】

項目2．M T A B が、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL、または一価の抗体フラグメントを含む、項目1に記載の方法。

【0121】

項目3．D M (ドッキング部分)及びイメージャー部分が核酸を含む、項目1または2のいずれか一項に記載の方法。

30

【0122】

項目4．対応するM T A B - D M 試薬にそれぞれ結合した標的認識抗体のすべてが、同時に試料とインキュベートされる、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

【0123】

項目5．イメージャー部分のすべてが順次適用され、イメージングが順次起こる、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

【0124】

項目6．イメージャー部分のすべてが同時に適用され、イメージングが同時に起こる、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

【0125】

項目7．イメージャー部分が、2つ以上のイメージャー部分を有する少なくとも1つのバッチと、少なくとも2つのバッチを有する方法とを用いてバッチで適用され、イメージングが少なくとも2つのバッチで起こる、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

40

【0126】

項目8．各イメージャー部分が異なる観察可能部分で標識される、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

【0127】

項目9．各イメージャー部分が同じ観察可能部分で標識される、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

【0128】

50

項目 10 . 一部のイメージャー部分が同じ観察可能部分で標識され、一部のイメージャー部分が異なる観察可能部分で標識される、項目 1 ~ 5、または 7 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 2 9 】

項目 11 . 標的認識抗体を試料とインキュベートする前に、過剰量の M T A B - D M を用いて遊離の標的認識抗体が過剰となるのを防止する、項目 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 3 0 】

項目 12 . 標的認識抗体を試料とインキュベートする前に、限外濾過またはゲル濾過を使用して遊離の M T A B - D M が除去される、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 1 3 1 】

項目 13 . 非特異的抗体が、染色、洗浄及び / またはイメージング緩衝液に添加される、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 3 2 】

項目 14 . 非特異的抗体が、標的認識抗体と同じ宿主種由来の抗体である、項目 13 に記載の方法。

【 0 1 3 3 】

項目 15 . 非特異的抗体が、(標的タンパク質のいずれによっても免疫化されていない動物由来の) 正常血清で見られるポリクローナル抗体である、項目 14 に記載の方法。

20

【 0 1 3 4 】

項目 16 . 非特異的抗体が、試料中に存在しないタンパク質に対するモノクローナル抗体である、項目 14 に記載の方法。

【 0 1 3 5 】

項目 17 . イメージャー部分が、直接的にドッキング部分を結合する、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 3 6 】

項目 18 . イメージャー部分が、中間部分を介して間接的にドッキング部分を結合する、項目 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 3 7 】

項目 19 . 組成物であって :

a . M T A B、

b . M T A B に共有結合したドッキング部分

c . 第 1 のドメインがドッキング部分に特異的に結合することができ、第 2 のドメインがドッキング部分に特異的に結合することができない、第 1 のドメイン及び第 2 のドメインを有する中間部分、

を含む前記組成物。

30

【 0 1 3 8 】

項目 20 . M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または一価の抗体フラグメントである、項目 19 に記載の組成物。

40

【 0 1 3 9 】

項目 21 . ドッキング部分及び中間部分が核酸を含む、項目 19 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 1 4 0 】

項目 22 . ドッキング部分が、約 5 ~ 20 核酸長、約 8 ~ 15、または約 10 ~ 12 核酸長である、項目 21 に記載の組成物。

【 0 1 4 1 】

項目 23 . 中間部分が、約 10 ~ 40 核酸長、約 16 ~ 30、または約 20 ~ 24 核酸長である、項目 21 または 22 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 1 4 2 】

50

項目 2 4 . 交換イメージングのための試薬を作製する方法であって :

- a . M T A B を用意すること、
- b . M T A B をドッキング部分にコンジュゲートさせて M T A B - D M を形成すること

、
c . それぞれ、ドッキング部分に特異的に結合することができる第 1 のドメインとドッキング部分に特異的に結合することができない第 2 のドメインとを有する、複数の中間部分を用意すること、

d . 複数の中間部分を M T A B - D M と化合させること、
を含む前記方法。

【 0 1 4 3 】

項目 2 5 . M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または一価の抗体フラグメントである、項目 2 4 に記載の方法。

【 0 1 4 4 】

項目 2 6 . ドッキング部分及び中間部分が核酸を含む、項目 2 4 または 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 4 5 】

項目 2 7 . ドッキング部分が、約 5 ~ 2 0 核酸長、約 8 ~ 1 5、または約 1 0 ~ 1 2 核酸長である、項目 2 6 に記載の方法。

【 0 1 4 6 】

項目 2 8 . 中間部分が、約 1 0 ~ 4 0 核酸長、約 1 6 ~ 3 0、または約 2 0 ~ 2 4 核酸長である、項目 2 6 または 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 4 7 】

項目 2 9 . 複数の中間部分が、1 つのバッチ反応で M T A B - D M と化合される、項目 2 4 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 4 8 】

項目 3 0 . 複数の中間部分が、別々に M T A B - D M と化合される、項目 2 4 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 4 9 】

項目 3 1 . 試料中の少なくとも 2 つの標的の交換イメージングのためのキットであって

、
a . M T A B と、イメージャー部分を特異的に結合することができるドッキング部分とを含む、少なくとも 2 つの異なる M T A B - D M 試薬、

b . 場合によって、少なくとも 2 つの異なる標的認識抗体、

c . 観察可能部分で標識され、個々に M T A B - D M 試薬に特異的に結合することができる、少なくとも 2 つのイメージャー部分、

d . 場合によって、少なくとも 1 つの、標的のいずれにも特異的に結合しない抗体、
を含む前記キット。

【 0 1 5 0 】

項目 3 2 . M T A B が、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン A / G、プロテイン L、または抗体の一価のフラグメントから選択される、項目 3 1 に記載のキット。

【 0 1 5 1 】

項目 3 3 . ドッキング部分が核酸ドッキング部分であり、イメージャー部分が核酸イメージャー部分である、項目 3 1 または 3 2 のいずれか一項に記載のキット。

【 0 1 5 2 】

項目 3 4 . ドッキング部分がタンパク質、ペプチド、または化合物であり、イメージャー部分が相補的なタンパク質、ペプチド、または化合物である、項目 3 2 または 3 3 のいずれか一項に記載のキット。

【 0 1 5 3 】

項目 3 5 . ドッキング部分及びイメージャー部分が、それぞれ、いずれかの順で、ストレプトアビジン及びビオチンである、項目 3 4 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【0154】

項目36．MTAB及びドッキング部分が、ストレプトアビジン、またはSNAP-tag（登録商標）、CLIP-tag（商標）、Halotag（登録商標）、及びAviTag（商標）などのコンジュゲーションドッキング部分を使用することによってコンジュゲートされる、項目31～35のいずれか一項に記載のキット。

【0155】

項目37．MTAB-DMが、少なくとも2つの異なる標的認識抗体を約1fM～1nMの親和性で結合することができる、項目31～36のいずれか一項に記載のキット。

【0156】

項目38．観察可能部分が、光学的に観察可能な部分である、項目31～37のいずれか一項に記載のキット。 10

【0157】

項目39．観察可能部分が、P-dot、蛍光タンパク質、蛍光核酸、Q-dot、ナノ粒子、またはSERレポーターである、項目38に記載のキット。

【0158】

項目40．項目19～23、または31～39のいずれか一項に記載の試薬を用いる、交換イメージングのための方法。

【0159】

前述の明細書は、当業者が実施形態を実施可能とするために十分であるとみなされる。前述の説明及び実施例は、特定の実施形態を詳述し、発明者らによって企図された最良の方法を説明するものである。ただし、これらの前述の記載が本文中でどのように詳細を明らかにしうるかに拘わらず、実施形態は、多くの方法で実施されうるものであり、添付の特許請求の範囲及びそれらのあらゆる等価物に従って解釈される必要があることが理解されるであろう。 20

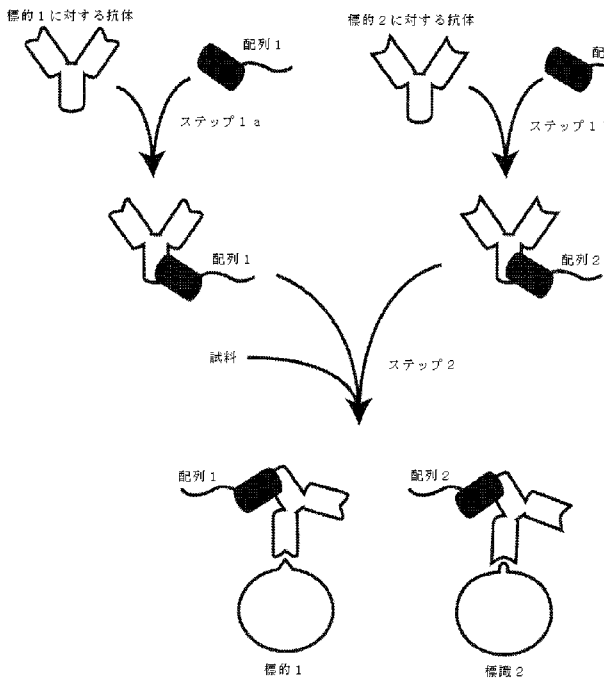
【0160】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、明確に示されているかどうかに関わらず、例えば整数、分数、及び百分率を含む数値を指す。「約」という用語は、一般的に、当業者が列挙した値と等価である（例えば、同じ機能または結果を有する）とみなすと思われる数値の範囲（例えば、列挙された範囲の+/-5～10%）を指す。「などの」、「少なくとも」、及び「約」という用語が数値または範囲のリストの前に置かれる場合、これらの用語は、リスト中に提供された値または範囲のすべてを修飾する。場合によっては、「約」という用語は、最も近い有効数字に四捨五入された数値を含んでもよい。 30

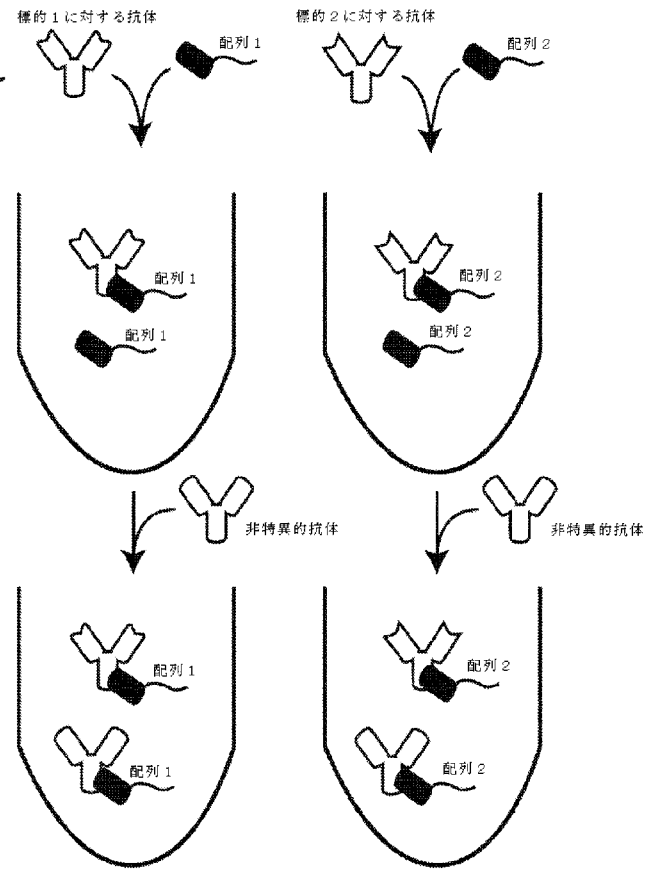
【0161】

本明細書において引用された文書はすべて、それらが引用される情報のために、全体として参照により組み入れている。

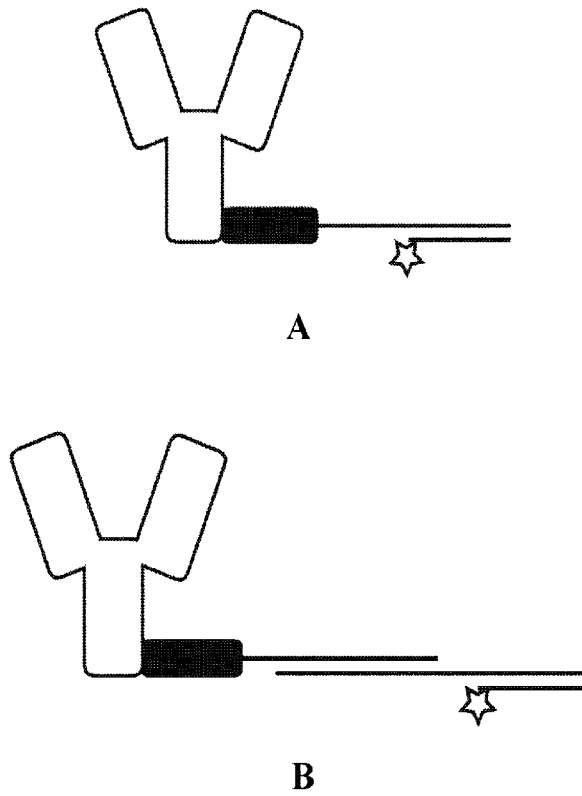
【 図 1 】



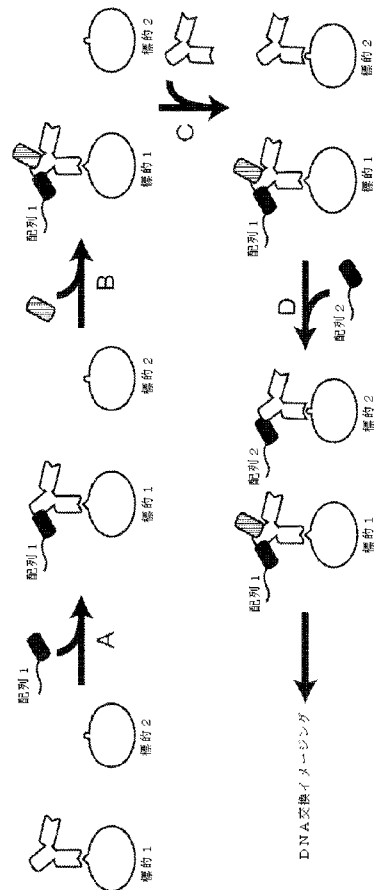
【 図 2 】



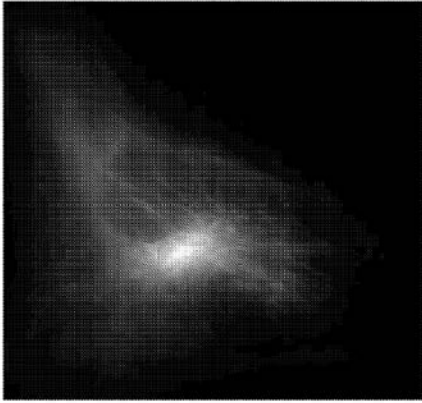
【 図 3 】



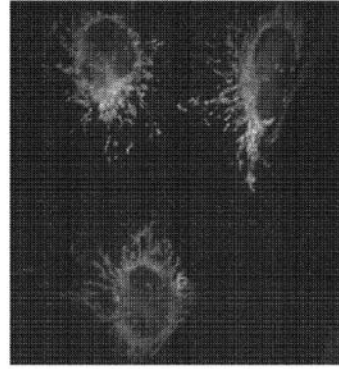
【 図 4 】



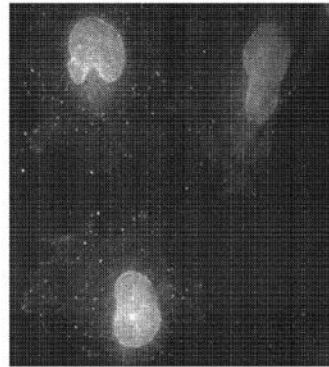
【 図 5 】



【 図 6 】



A



B

【 配列表 】

2019526034000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US17/35375 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - G01N 21/64, 33/68, 33/58, 33/533, 33/533; C07K 16/12; C12Q 1/68; C12N 15/115 (2017.01) CPC - G01N 21/6486, 33/6845, 33/582, 21/6458, 33/6854, 33/52, 21/64, 33/68, 33/58, 33/533; C12N 15/115; C07K 16/12; C12Q 1/6876, 1/689, 1/68 | | |
| 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) See Search History document | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2015/017586 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 05 February 2015; page 1, lines 28-29; page 3, lines 23-24; page 4, line 16; page 6, lines 33-34; page 46, lines 23-24; page 7, lines 1-5, 7-11; page 19, line 32; page 26, lines 20, 24-25; page 27, lines 14, 20; page 46, lines 23-24; page 74, lines 1-2, 12 | 1-4, 6-8, 10-18, 20 5, 9, 19 |
| Y | (OWEN, GRH et al.) A Reproducible Technique for Specific Labeling of Antigens Using Preformed Fluorescent Molecular IgG-F(ab') ₂ Complexes From Primary Antibodies of the Same Species. Microscopic Research Techniques. June 2010, Vol. 73, No. 6; pages 623-630; page 625, 4th paragraph; DOI: 10.1002/jemt.20803 | 5, 9 |
| Y | (ABBODD, ER) Directed Selection And Characterization Of High-affinity Synergistic Antibodies. Dissertation [online]. Tulane University School of Medicine. October 2007 [retrieved on 7 August 2017]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www2.tulane.edu/som/departments/biochemistry/upload/Abboud.pdf>; page 33, 1st paragraph | 19 |
| P,X | US 2017/0038391 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 09 February 2017; entire document | 1-20 |
| P,X | (WANG, Y et al.) Rapid sequential in situ multiplexing with DNA-Exchange-Imaging. Cold Spring Harbor Laboratory. 20 March 2017; pages 1-15; DOI: 10.1101/112227 | 1-20 |
| P,X | (AGASTI, SS et al.) DNA-barcoded labeling probes for highly multiplexed Exchange-PAINT imaging. Chemical Science. 30 January 2017, Vol. 8, No. 4; pages 3080-3091; DOI: 10.1039/c6sc05420j | 1-20 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "G" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 10 August 2017 (10.08.2017) | | Date of mailing of the international search report 31 AUG 2017 |
| Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | | Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4900 PCT OSP: 571-272-7774 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/35375

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/35375

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

A method and kit for exchange imaging of at least two targets in a sample comprises (a) providing at least two or more target-recognizing antibodies, each bound to a corresponding MTAB-DM reagent capable of binding monovalently to the target-recognizing antibodies, (b) incubating a sample with the two or more target-recognizing antibodies, each bound to a corresponding MTAB-DM reagent, (c) applying at least two imager moieties corresponding to the MTAB-DM, either in series, in batches, or in parallel, and (d) imaging the at least two imager moieties either in series, in batches, or in parallel.

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

| | | | |
|-----------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 促进基于抗体的交换成像的组合物和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2019526034A | 公开(公告)日 | 2019-09-12 |
| 申请号 | JP2018562518 | 申请日 | 2017-06-01 |
| [标]发明人 | チエンシー | | |
| 发明人 | チエン, シー | | |
| IPC分类号 | G01N33/532 C07K16/00 C07K14/315 C07K14/31 C07K16/42 | | |
| CPC分类号 | C07K16/12 C07K2317/55 G01N33/58 G01N33/6854 A61K47/6849 A61K47/6873 C07K16/42 C07K2317/30 G01N33/536 | | |
| FI分类号 | G01N33/532.ZNA.A C07K16/00 C07K14/315 C07K14/31 C07K16/42 | | |
| F-TERM分类号 | 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA54 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA54 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 62/344441 2016-06-02 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

(a) 制备至少两种或更多种靶识别抗体，每种抗体均与能够单价结合靶识别抗体的相应MTAB-DM试剂结合；(b) 用相应的MTAB-制备样品与分别与DM试剂偶联的两种或更多种靶识别抗体一起孵育(c) 依次，分批或同时应用至少两个对应于MTAB-DM的成像器部件(d) 顺序地，分批地或同时地对至少两个成像器部分进行成像，以交换对样本中的至少两个目标进行成像。[选择图]无

| | | |
|--|---|---|
| (19) 日本国特許庁(JP) | (12) 公表特許公報(A) | (11) 特許出願公表番号 特表2019-526034 (P2019-526034A) 令和1年9月12日(2019.9.12) |
| (43) 公表日 | 特マコード(参考) 4H045 | |
| (51) Int. Cl. | F I | |
| G01N 33/532 (2006.01) | G01N 33/532 Z N A A | |
| C07K 16/00 (2006.01) | C07K 16/00 | |
| C07K 14/315 (2006.01) | C07K 14/315 | |
| C07K 14/31 (2006.01) | C07K 14/31 | |
| C07K 16/42 (2006.01) | C07K 16/42 | |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) | |
| (21) 出願番号 特願2018-562518 (P2018-562518) | (71) 出願人 518401856 | |
| (86) (22) 出願日 平成29年6月1日(2017.6.1) | アルティビュー、インク、 | |
| (85) 翻訳文提出日 平成31年1月24日(2019.1.24) | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 | |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2017/035375 | 138-1044、ケンブリッジ、コ | |
| (87) 国際公開番号 W02017/210387 | ンコード アヴェニュー 763ダイ- | |
| (87) 国際公開日 平成29年12月7日(2017.12.7) | 110002077 | |
| (31) 優先権主張番号 62/344,441 | (74) 代理人 園田・小林特許業務法人 | |
| (32) 優先日 平成28年6月2日(2016.6.2) | チエン、シー | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US) | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 | |
| | 465、ウェスト ニュートン、クリ | |
| | ーコート 31 | |
| | Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 | |
| | BA54 CA11 CA40 DA75 EA54 | |
| | FA74 | |
| | 最終頁に続く | |
| (54) 【発明の名称】 抗体ベースの交換イメージングを迅速化する組成物及び方法 | | |