

(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2017-2284

(P2017-2284A)

(43) 公開日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO9B 69/10 (2006.01)	CO9B 69/10 Z	2G043
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 597	2G054
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/533	
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64 F	
GO1N 21/78 (2006.01)	GO1N 21/78 C	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-106411 (P2016-106411)
 (22) 出願日 平成28年5月27日 (2016. 5. 27)
 (31) 優先権主張番号 15169549.1
 (32) 優先日 平成27年5月28日 (2015. 5. 28)
 (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

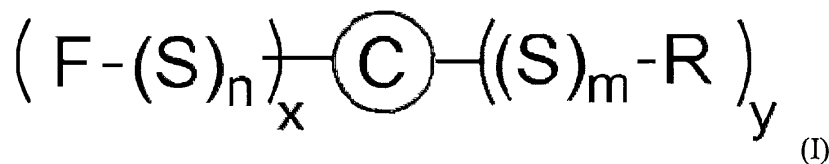
最終頁に続く

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

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 向上した輝度を有する蛍光色素及びその使用方法を提供する。

【解決手段】 一般式 I で示される蛍光色素が例示される。



式中、C が、20 ~ 200 個の原子を含むコア部分であり；S が、1 ~ 10 個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；n が、2 ~ 500 の範囲の整数であり；m が、0 ~ 500 の範囲の整数であり；x が、2 ~ 50 の範囲の整数であり；y が、1 ~ 50 の範囲の整数であり；R が、生体分子との共有結合を形成可能な反応性基を含む同一又は異なる残基であり；F が、(S)_n に共有結合した同一又は異なる蛍光体である。蛍光色素は、生体分子にコンジュゲートされることができ、フローサイトメトリーのために及び/又は蛍光顕微鏡によって使用され得る。

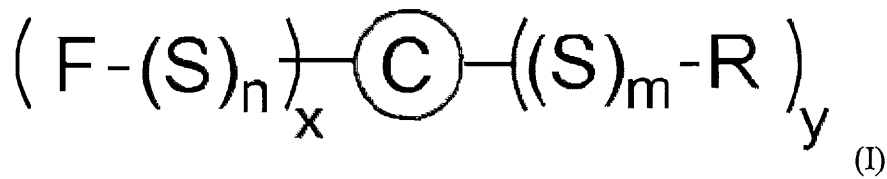
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I :

【化 1】



10

(式中、

C は、20 ~ 200 個の原子を含むコア部分であり；

S は、1 ~ 10 個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；

n は、2 ~ 500 の範囲の整数であり；

m は、0 ~ 500 の範囲の整数であり；

x は、2 ~ 50 の範囲の整数であり；

y は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

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

F は、(S)_n に共有結合した同一又は異なる蛍光体である）

による蛍光色素。

20

【請求項 2】

蛍光体 F が、キサントゲン色素、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、ピリジロキサゾール色素及びピロメテン色素からなる群から選択される、請求項 1 に記載の蛍光色素。

【請求項 3】

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

【請求項 4】

コア部分 C が、ポリヒドロキシ化合物、ポリアミノ化合物又はポリチオ化合物である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

30

【請求項 5】

コア部分 C が、ペンタエリスリトール、ジペンタエリスリトール、トリペンタエリスリトール及びヘキサグリセロールからなる群から選択される、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

【請求項 6】

S が残基 CH₂CH₂O - を表し、n、m が独立して 10 ~ 200 の範囲の整数である、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

【請求項 7】

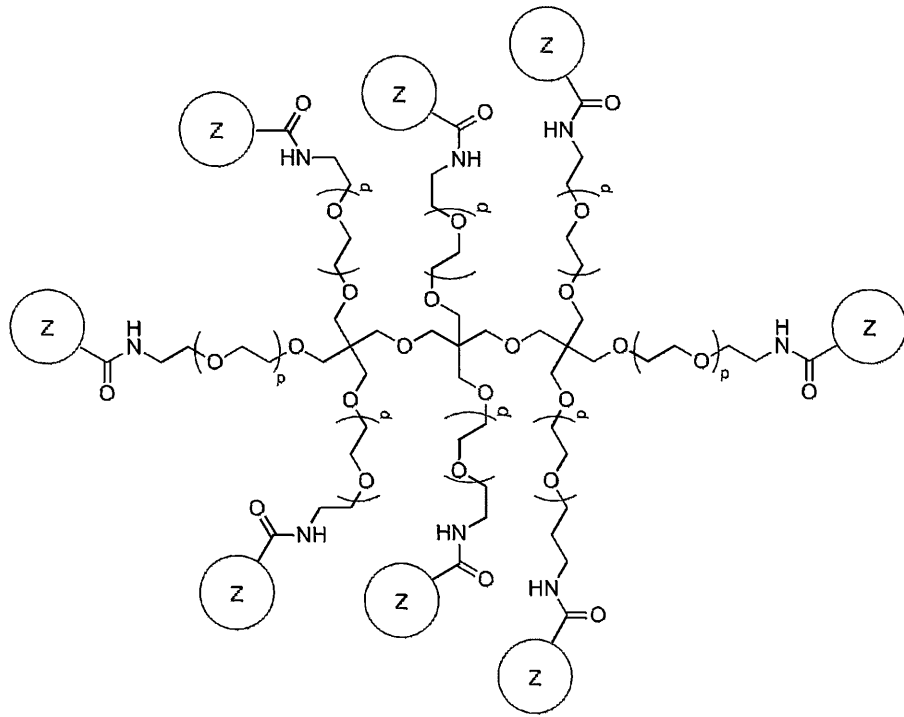
R が、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、テトラフルオロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、スルホジクロロフェニルエステル、イミドエステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ハロゲン化スルホニル、ハロゲン化アシル、アシルアジド、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アルデヒド、グリオキサール、マレイミド、ヨードアセトアミド、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、ホスホルアミダイト、アルキン、アルキルアジド、ジエン又はアリル基からなる群から選択される反応性基を含む、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

40

【請求項 8】

一般式 (II)

【化 2】



で示され、

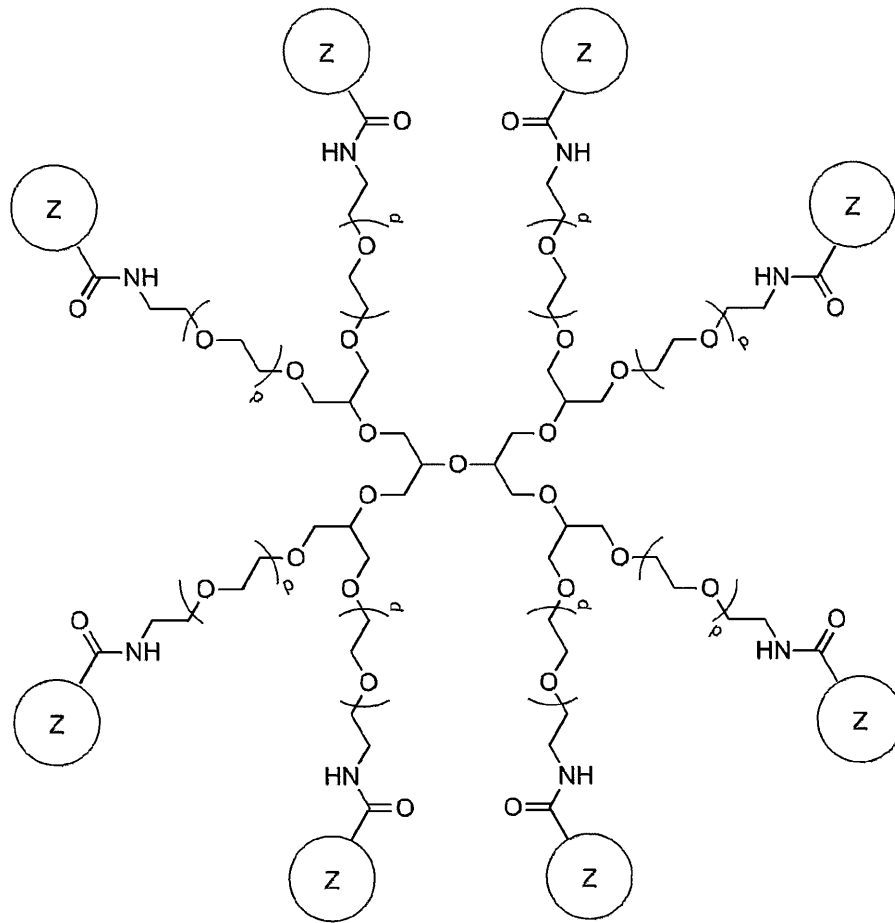
その式中、 $Z = F$ 又は R であり、且つ $p = n$ 又は m であり、

一般式 (I I) が少なくとも 2 つの F 及び少なくとも 1 つの基 R を含むことを条件とする構造を特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

【請求項 9】

一般式 (I I I)

【化 3】



(III)

10

20

30

40

50

で示され、

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

一般式 (III) が少なくとも 2 つの F 及び少なくとも 1 つの基 R を含むことを条件とする構造を特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の蛍光色素。

【請求項 10】

それぞれ天然又は組換え由来の、免疫グロブリン、抗体、断片化抗体、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 $s d A b$ 、 $s c F v$ 、ジ- $s c F v$ からなる群から選択される少なくとも 1 つの生体分子に基 R を介してコンジュゲートされた請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の蛍光色素を含む、蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項 11】

ペプチド/MHC 複合体、細胞接着又は共刺激分子用の受容体、受容体リガンド、抗原、ハプテン結合剤、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、アプタマー、プライマー及びリガーゼ基質からなる群から選択される少なくとも 1 つの生体分子に基 R を介してコンジュゲートされた請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の蛍光色素を含む、蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの生体分子が、それぞれ 1 ~ 10 個の蛍光体 F を含む請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の蛍光体色素 2 ~ 20 個とコンジュゲートされている、請求項 10 又は 11 に記載の蛍光生体分子コンジュゲート。

【請求項 13】

フローサイトメトリー及び/又は蛍光顕微鏡によって請求項 10 から 12 までのいずれか 1 項に記載の蛍光生体分子コンジュゲートによって標識された細胞又は組織の分析方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本発明は、向上した輝度を有する蛍光色素及びその使用方法に関する。

【0002】

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

10

【0003】

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

【0004】

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

20

30

【0005】

コンジュゲートの輝度は、また、生体分子の活性を失うことなく機能化し得る、生体分子上で利用可能な官能化部位の数によって制限される。結果として、生体分子コンジュゲートのDOLはまだ制限されており、例えば、抗体(IgG)について、それらは、典型的には、親水性標識の場合で4~8の範囲である(R. P. Haugland, Current Protocols in Cell Biology (2000年) 16.5.1~16.5.22)。結果として、これらのコンジュゲートの輝度は、まだ、例えば、フィコエリトリン(PE)又はアロフィコシアニン(APC)などのフィコビリタンパク質のコンジュゲートよりも劣っている。

40

【0006】

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

50

【0007】

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

10

【0008】

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

【0009】

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

20

30

【0010】

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

【0011】

概要

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

【0012】

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

40

【0013】

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

【0014】

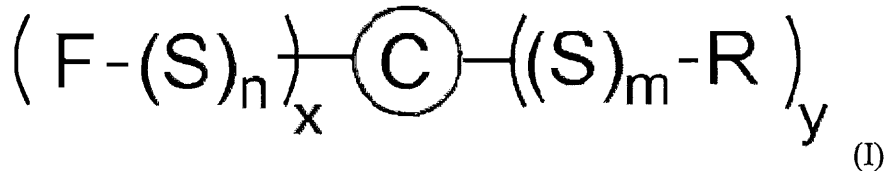
50

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

【0015】

従って、本発明の対象は、一般式I：

【化1】



10

(式中、

Cは、20～200個の原子を含むコア部分であり；

Sは、1～10個の炭素原子を含む同一又は異なるエーテル残基であり；

nは、2～500の範囲の整数であり；

mは、0～500の範囲の整数であり；

xは、2～50の範囲の整数であり；

20

yは、1～50の範囲の整数であり；

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

Fは、(S)_nに共有結合した同一又は異なる蛍光体である)

による蛍光色素である。

【0016】

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

【0017】

様々な例示的な詳細を、ここで、以下の図を参照して説明する：

30

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1a～1eは、以下のものとコンジュゲートしたCD4抗体(クローンVit4)で染色された末梢血単核細胞(PBMC)の、フローサイトメトリーによって測定されたドットプロットの比較を示す：図1a フルオレセインイソチオシアネート(FITC)；図1b 分枝状PEGで多量体化されたフルオレセイン(PEG-FAM)；図1c アレクサフルオロ488(AF488)；図1d 分枝状PEGで多量体化されたアレクサフルオロ488(PEG-AF488)、又は(1e) R-フィコエリトリン(PE)。

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

40

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

50

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

【0019】

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

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

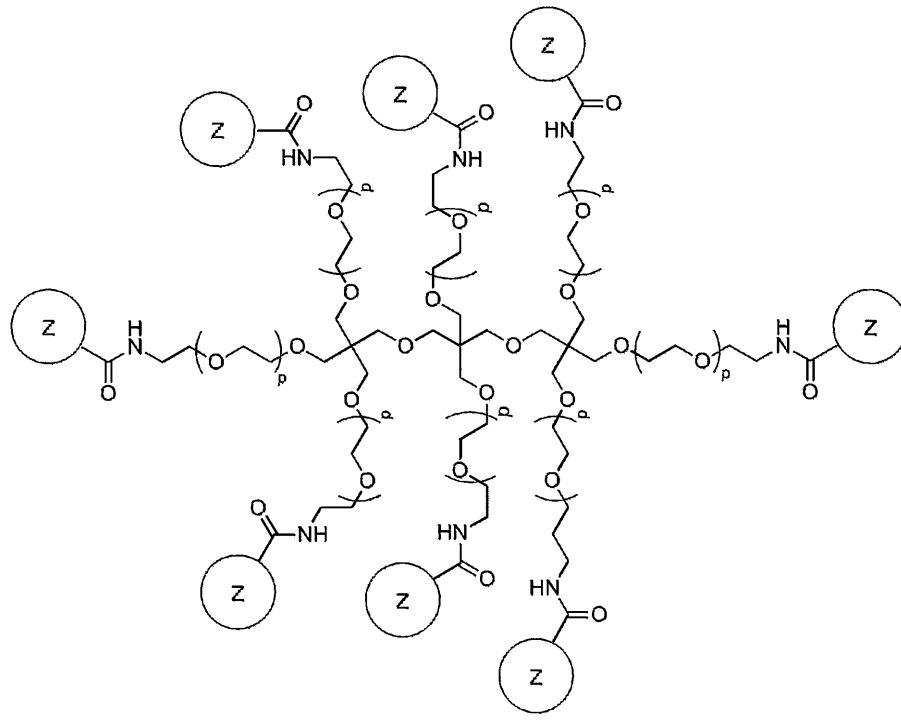
本発明による蛍光色素は、当業者に公知であり且つ本特許出願の実施例に更に開示されているような標準的な化学物質によって製造することができる。

10

【0021】

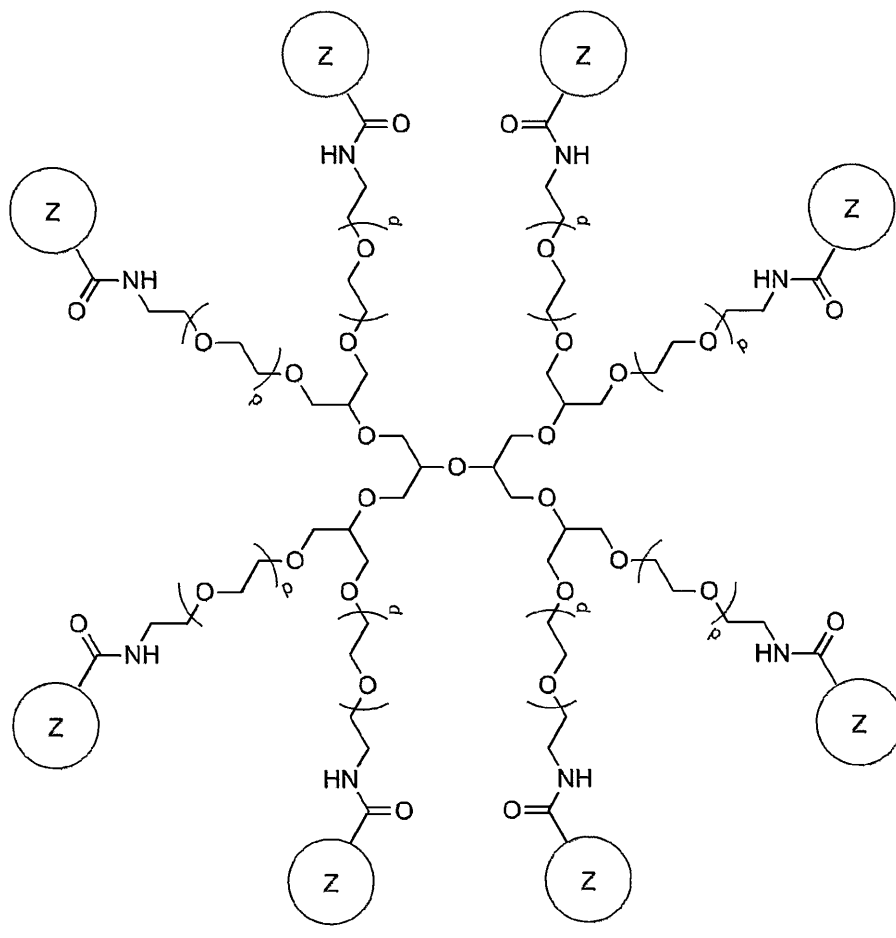
例として、本発明による好ましい蛍光色素を、以下の一般式I I及びI I Iに示す：

【化2】



10

20



30

40

(III)

【0022】

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

50

【 0 0 2 3 】

蛍光体 F

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

【 0 0 2 4 】

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

【 0 0 2 5 】

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

【 0 0 2 6 】

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

【 0 0 2 7 】

コア部分 C

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

【 0 0 2 8 】

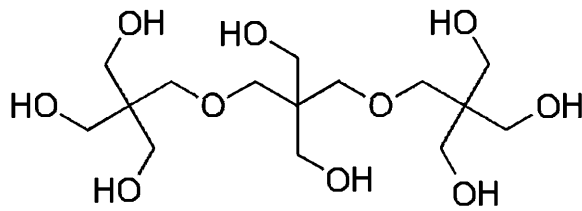
本発明にとって有用なコア部分は、ポリヒドロキシ化合物、ポリアミノ化合物及びポリチオ化合物である。好ましいのは、ポリヒドロキシ化合物、例えば、エーテル結合を介する 3 ~ 4 個のポリエーテル残基のための結合点として 4 つのヒドロキシル基を有するペンタエリスリトール、エーテル結合を介する 3 ~ 6 個のポリエーテル枝のための結合点として 6 つのヒドロキシル基を有するジペンタエリスリトール、エーテル結合を介する 3 ~ 8 個のポリエーテル枝のための結合点として 8 つのヒドロキシル基を有するトリペンタエリスリトール又はヘキサグリセロールである。

10

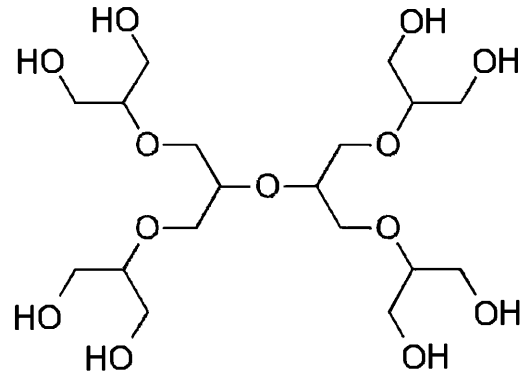
20

30

【化3】



トリペンタエリスリトール



ヘキサグリセロール

10

【0029】

ポリエーテル残基 S

ポリエーテル残基 (S)_n 及び (S)_m は、モノマーサブユニット S 当たり 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 4 個の酸素原子をそれぞれ有し得るエーテルモノマー単位 S からなる。これらのポリエーテル枝は、ホモポリマー又はコポリマー、即ち、交互又はブロックコポリマーであり得る。ポリエーテル残基 (S)_n 及び (S)_m は、特に、2 つ以上の酸素原子を有するモノマー単位 S が使用される場合、直鎖状又は分枝鎖状であってよい。本発明の好ましい実施態様では、ポリエーテル残基は、ポリエチレングリコール鎖を含む、即ち、S は残基 CH₂CH₂O - を表し、n、m は独立して 10 ~ 200 の範囲の整数である。

20

【0030】

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

【0031】

反応性基 R

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

30

40

【0032】

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

【0033】

なお、蛍光体同士がくっつかないようにして、色素 - 色素相互作用を防止するために、低反応性の更なる反応性基 R' をポリエーテル枝に使用することも考えられる。これらの低反応性基 R' は水素原子、アルキル基、トリフルオロアルキル基、アリール基、ハロゲ

50

ン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基、スルホンアミド基、又はこれらの組み合わせであってよい。上記反応性基 R の少なくとも 1 つは、本発明による蛍光色素の性能にとって必要である。

【0034】

蛍光生体分子コンジュゲート

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

10

【0035】

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

【0036】

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

20

【0037】

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

【0038】

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

30

【0039】

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

【0040】

本発明の一実施態様では、生体分子は、それぞれ 4 ~ 6 個の蛍光体基を有する 2 ~ 7 個の蛍光ポリエーテル標識を有する IgG 抗体であり、その結果、抗体分子当たり 8 ~ 40 個の色素分子の蛍光体 DOL、好ましくは 10 を上回る蛍光体単位の蛍光体 DOL、最も好ましくは 15 以上の蛍光体単位の DOL が得られる。

40

【0041】

本発明の更に別の実施態様では、生体分子コンジュゲートは 1 つ以上の蛍光色素を含み、その際、少なくとも 1 つの生体分子は、包括的に、それぞれ 1 ~ 10 個の蛍光体 F を含む 2 ~ 20 個の蛍光色素とコンジュゲートされている。2 つ以上の蛍光色素が生体分子コンジュゲートに存在することが好ましい。

【0042】

産業上の利用可能性

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

50

【0043】

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

【0044】

本発明の別の実施態様では、標識された細胞の1つ以上の集団が試料から検出され、標的細胞として分離される。好ましくはコンジュゲートにより検出された細胞は、静電気力、圧電力、機械的分離又は光音響手段により試料から分離される。このような分離に適しているのは、特に、フローソーターであり、例えば、EP14187215.0号又はEP14187214.3号に開示されているような、FACS又はMEMSベースのセルソーターシステムである。

10

【0045】

本発明の別の実施態様では、細胞又は組織試料における生体分子コンジュゲートの結合標的の位置が蛍光顕微鏡によって決定される。蛍光顕微鏡の適切な方法としては、落射蛍光顕微鏡、共焦点レーザー走査型顕微鏡、多光子顕微鏡、全内部反射蛍光(TIRF)顕微鏡、単一平面照明顕微鏡(SPIM)及び超解像顕微鏡法、例えば、発光枯渇刺激(STED)顕微鏡、確率的光学再構成顕微鏡(STORM)、光活性化局在性顕微鏡(PALM)、又は鉛直型空間変調照明(SMI)顕微鏡が挙げられる。

20

【0046】

実施例

実施例1

工程A: 8アームPEG上で多量体化されたAF488(PEG-AF488)の調製
アミノPEG(8アーム)を、10mg/mLの濃度でpH7.0の0.5MのPBS緩衝液に溶解させた。DMSO(2mg/mL)に溶解したAF488、NHSエステルを、20倍のモル過剰で添加し、暗所で30分間室温でインキュベートした。遊離色素を、標準的な条件下でSECにより除去した。生じたPEG-AF488は、5.7のDOLを有していた。

【0047】

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

30

【0048】

工程B: CD4抗体とPEG-AF488とのカップリング

工程Aで得られたPEG-AF488(リン酸緩衝生理食塩水中で2.5mg/mL)を、10倍モル過剰のSMCCを加えて、室温で1時間インキュベートすることにより活性化した。平行して、CD4抗体(クローンVit4)を、10ミリモル/Lジチオスレートールと1時間反応させることによって還元した。マレイミド活性化PEG-AF488及び還元された抗体の両方に、セファデックスG25上で2mMのEDTAを含有するpH7.2のリン酸緩衝生理食塩水との緩衝液交換を行った。マレイミド活性化PEG-AF488を添加して、15倍過剰で抗体を還元し、暗所にて室温で1時間インキュベートした。反応生成物をSECにより精製する。得られたCD4-PEG-AF488は、13.2のDOLを有していた。

40

【0049】

CD4を、同じプロトコルを使用してPEG-FAMに結合させる。

【0050】

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

染色実験のために、 10^6 個の末梢血単核細胞(PBMC)を、それぞれ、2mMのEDTA及び0.5%のBSAを含有する100 μ lのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。細胞を、3 μ g/mLで、工程Bで得られたそれぞれのCD4抗体コンジュゲートを用

50

いて染色し、室温で10分間インキュベートする。対比染色を、死細胞の排除のためにCD3 - APC及びヨウ化プロピジウムを用いて行う。

【0051】

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

【0052】

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

10

【0053】

図2は、5人のドナーのPBMCに関する中央値蛍光強度(MFI)と染色指数(SI)の結果を示す。

【0054】

本発明による蛍光色素で標識された抗体で染色された細胞は、親蛍光色素で標識された抗体で染色された細胞の少なくとも2倍明るく、フィコピリタンパク質標識抗体(CD4 - PE)で標識された細胞と同等である。図3は、従来のフルオレセインイソチオシアネート(FITC)にコンジュゲートされているヒトCD4(クローンVit4)に対する抗体を用いた染色と比較して、前記抗体にコンジュゲートされた8分岐ポリエチレングリコール(PEG - FAM)上で多量体化されたフルオレセインのTヘルパー細胞の染における増加したDOLの効果を示す。抗体染色濃度は全ての場合において3 µg/mLである。

20

【0055】

これは、特に、蛍光色素もAF488(アレクサフルオロ)としてスルホン化されている場合に有利である。8アームPEG(PEG - AF488)上で多量体化されたAF488で標識された得られた抗体コンジュゲートは、8アームPEG上で多量体化されたフルオレセインから作られた対応するコンジュゲートの約2倍明るい。

30

【0056】

実施例2：メタノール固定化の染色強度への影響

末梢血単核細胞を、対比染色としてヨウ化プロピジウムを除き、実施例1に記載されているように染色する。メタノール固定化のために、1 mLのメタノールを100 µLの細胞懸濁液に添加し、氷上で30分間インキュベートする。細胞を2回洗浄し、2 mMのEDTA及び0.5%のBSAを含有する1 mLのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。染色して固定化した細胞を、非固定化細胞と比較してMACSQuant 10アナライザで分析する。図4a及び4bは、CD4 - PEG - FAM染色した非固定化及びメタノール固定化Tヘルパー細胞(図4a)と、CD4 - PE染色した非固定化及びメタノール固定化Tヘルパー細胞(図4b)とのヒストグラムプロットを示す。CD4 - PEG - FAMの蛍光強度は、メタノール固定化に対して安定であり、一方、CD4 - PEの蛍光強度は、5倍の減少を示す。

40

【0057】

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

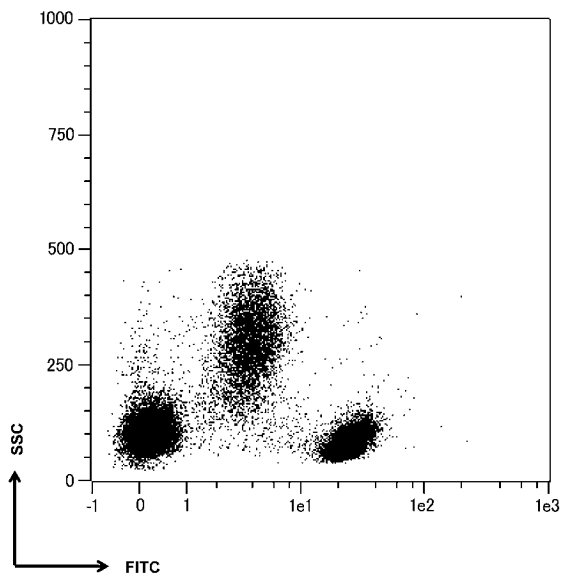
【0058】

様々な詳細を、上記に概説された例示的な実施、様々な代替、修正、変形、改良、及び/又は実質的な同等物に関連して説明してきたが、公知であるか又は現在予期されていな

50

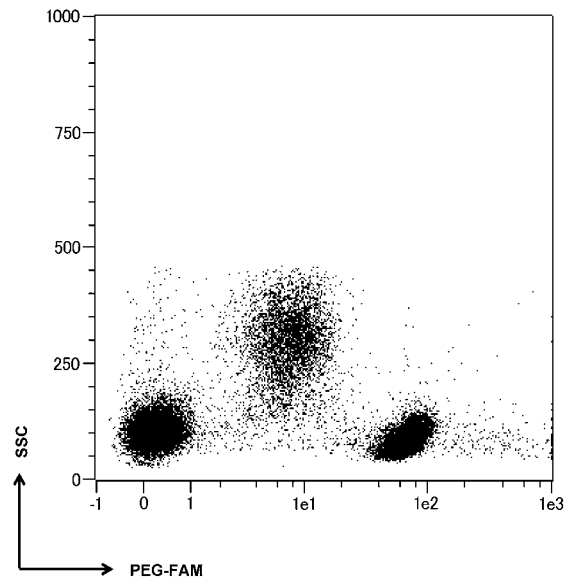
い又は予期されない可能性があるか否かは、前述の開示を検討する際に明らかになり得る。従って、上記の例示的な実施は、限定ではなく例示することが意図されている。

【 図 1 - 1 】



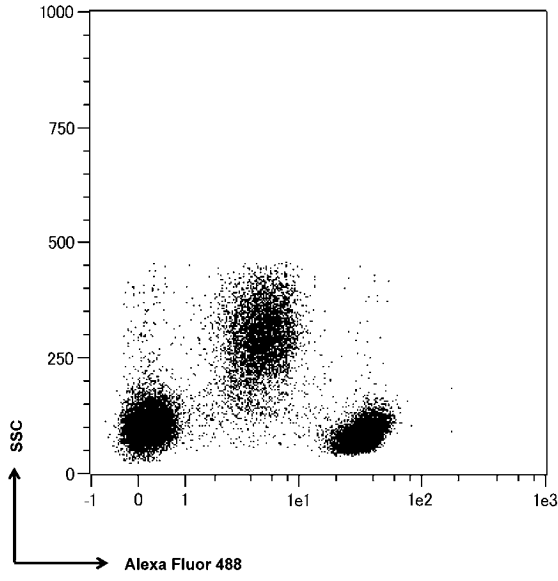
a

【 図 1 - 2 】



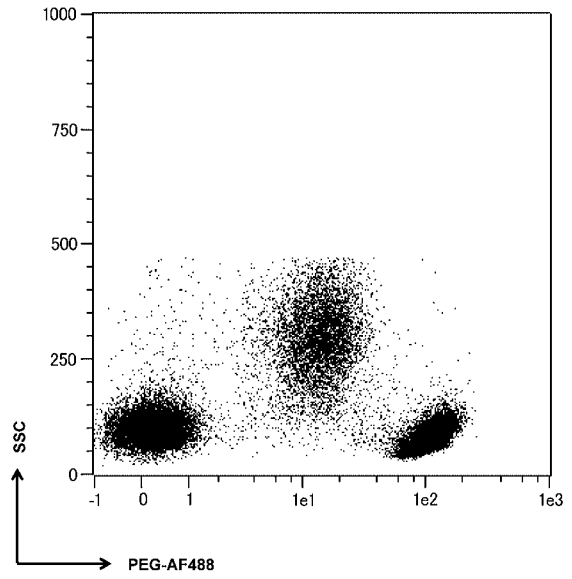
b

【 図 1 - 3 】



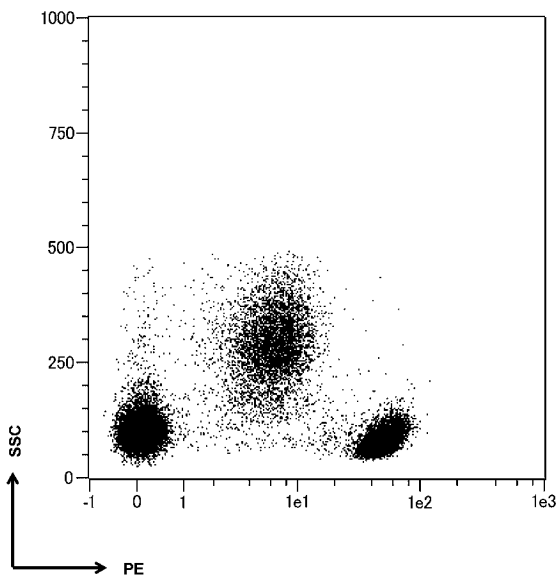
c

【 図 1 - 4 】



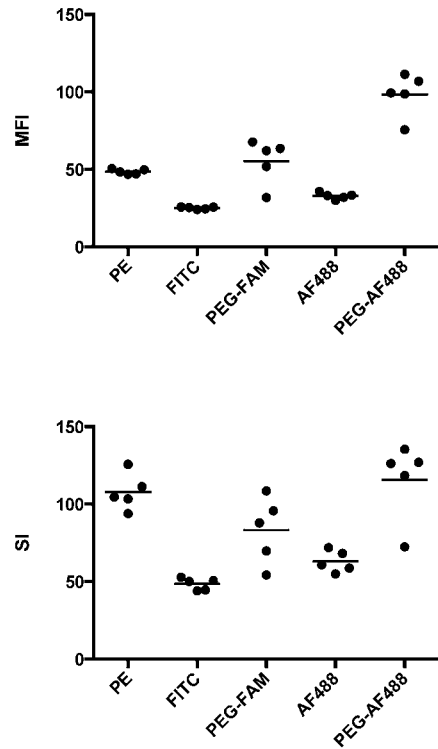
d

【 図 1 - 5 】

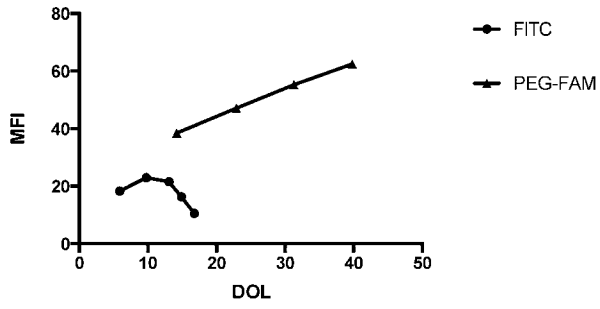


e

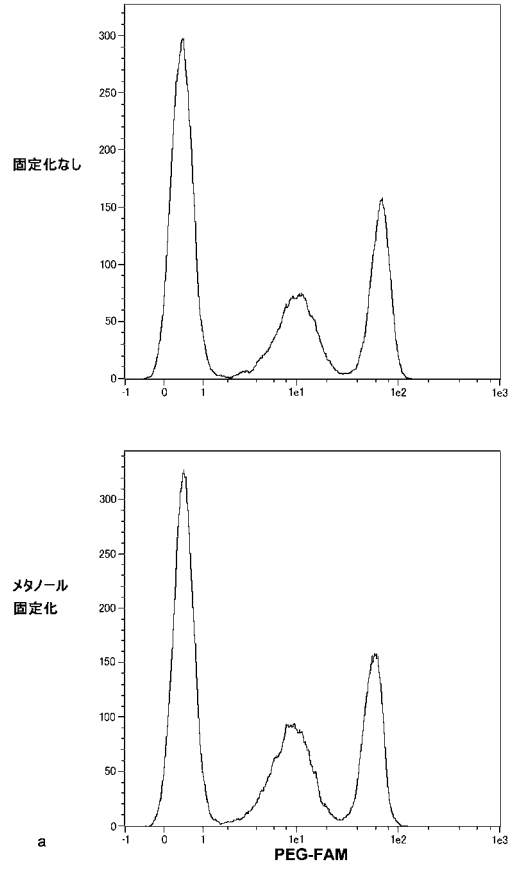
【 図 2 】



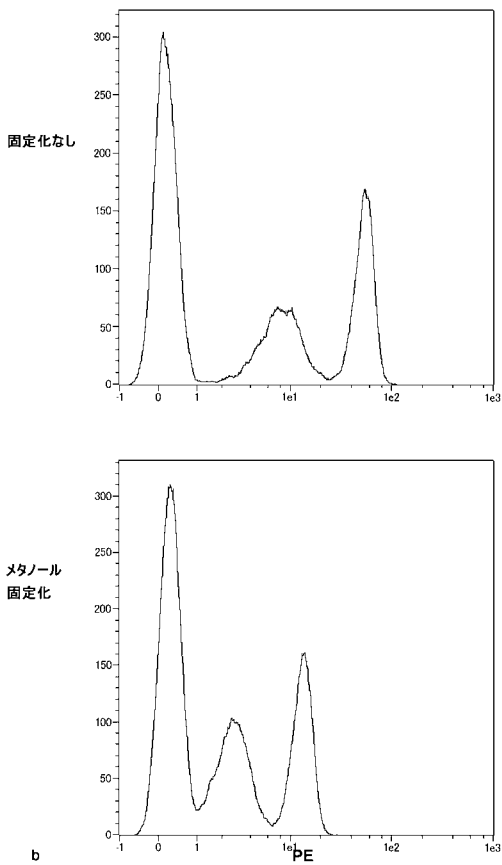
【 図 3 】



【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 9 K 11/06 (2006.01) C 0 9 K 11/06

(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 100116403
弁理士 前川 純一

(74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100162880
弁理士 上島 類

(72)発明者 クリスティアン ドーゼ
ドイツ連邦共和国 キュアテン メアヒェンヴェーク 2 ベー

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA01 EA01 FA02 JA02 KA09
2G054 AA08 AB04 BB01 BB02 BB05 BB13 CA21 CA22 CA23 CE02
EA03 EA05 FA19 GA04 GA05

【 外国語明細書 】

Bright fluorochromes based on multimerization of fluorescent dyes on branched polyether scaffolds

BACKGROUND

[0001] The present invention is directed to fluorescent dyes with increased brightness and methods of use thereof.

[0002] Fluorescent dyes conjugated to antibodies are commonly used for immunofluorescence analysis. A vast number of variants in 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. One issue in immunofluorescence technology is the detection threshold of the fluorescence emission, which can be enhanced, for example, by better detectors, filter systems or modified fluorescent dyes.

[0003] A limitation of conventional small molecule fluorescent dye molecules is their limited brightness. Therefore biomolecules are typically labeled with multiple dye molecules to increase the brightness of the fluorochrome conjugate. Most of the aforementioned fluorescent dye molecules, such as rhodamines or cyanines, contain planar aromatic chromophores, which are prone to hydrophobic interactions leading to dye-dye dimers with low or no fluorescence. Consequently, fluorescence intensity of labeled biomolecules is not proportional to the degree of fluorescent dye labeling of said biomolecules. At higher degrees of labeling (DOLs) the fluorescence intensity of the single dye might even decrease due to self-quenching mechanism caused by dimer, trimer or multimer formation.

[0004] These undesired formations have been reduced to some extent by adding substituents to the flat aromatic dye molecules, which increase water solubility. Suitable substituents described in the literature might impart charges to the dye molecule, such as sulfonate groups described, e.g., in U.S. Pat. Nos. 5,268,486 and 6,977,305, 6,130,101 and Panchuk-Voloshina, et al., J. Histochem. Cytochem. 47(9), 1179 (1999), or phosphate groups described, e.g., in WO2013056720. Other suitable dimerization reducing substituents are bulky water-soluble polymers, such as polyethylene glycol described, e.g., in patent application WO2009078970, or charged dendrimers described, e.g., in U.S. Pat. Nos. 6,913,743, and 7,655,217. Although biomolecule conjugates of these substituted dyes achieve higher brightness at higher degrees of labeling (DOLs) than conjugates of the unsubstituted parent dyes, there is still a deviation from a linear proportionality between

fluorescence intensity and degree of labeling of the labeled biomolecule albeit at a higher DOL as for the unsubstituted parent dye.

[0005] Conjugate brightness is also limited by the number of functionalization sites available on the biomolecule, which can be functionalized without loss of biomolecule activity. As a result DOLs of biomolecule conjugates are still limited, e.g., for antibodies (IgG) they are typically in the range of 4 to 8 in the case of hydrophilic labels (R. P. Haugland, *Current Protocols in Cell Biology* (2000) 16.5.1 - 16.5.22). Consequently the brightness of these conjugates is still inferior to, e.g., conjugates of phycobiliproteins, such as phycoerythrin (PE) or allophycocyanine (APC).

[0006] The high fluorescence intensity of phycobiliproteins and their biomolecule conjugates is due to the presence of multiple fluorophore subunits within a phycobiliprotein. R-phycoerythrin, e.g., contains 34 phycobilin fluorophore subunits (A. N. Glazer, *J. Appl. Phycol.* 6, 105 (1994)). Therefore biomolecule conjugates of phycobiliproteins, such as PE or APC are popular, e.g., in flow cytometry, despite their drawbacks stemming from their protein nature such as limited stability against non-physiological solvents, temperature, and pH values as well as their limited photostability and their generally limited shelf life. Another drawback is the limited availability of different colors, which limit multiplexing capabilities within a single fluorescence assay.

[0007] There have been efforts to construct multichromophore constructs with phycobiliprotein-like fluorescence properties by arranging fluorophores into precise supramolecular structures preventing self-quenching of excited fluorophores. Benven et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129(7), 2025 (2007) describe fluorescent dyes intercalated into supramolecular DNA templates. However, a drawback of this method is the non-covalent binding of the fluorophores within the DNA scaffold. Migration of dye molecules out of the DNA scaffold can lead to loss of fluorescence signal. In case of a multicolor experiment dye exchange between differently labeled DNA scaffolds might lead to false positive fluorescent signals. In case of a multiparameter experiment employing multiple colors it is advisable to use covalently bound fluorophores.

[0008] Another class of brightly fluorescent dyes for biomolecule labeling are fluorescent polymers based on semiconducting polymers, such as polyfluorenes described e.g. in US Pat. Nos. 8,158,444, 8,354,239, and 8,802,450 and 8,362,193, 8,455,613, and 8,575,303. These polymers also contain multiple fluorophore subunits, as the effective conjugation length within the polymer is limited to 9 - 10 monomer subunits.

[0009] Preparing brighter fluorescent dyes by multimerizing conventional fluorescent dye molecules on a water-soluble scaffold has so far not resulted in compounds useful for the labeling of biomolecules. Recommendations for fluorescent labeling of, e.g., dextrans are 0.3 - 0.7 dye molecules per dextran in the 3000 MW range, 0.5 - 2 dye molecules in the 10,000 MW range, 2 - 4 dye molecules in the 40,000 MW range and 3 - 6 dye molecules in the 70,000 MW range. Due to their large size and bulkiness these dye multimers offer no benefit in biomolecule labeling and are unsuitable for preparing biomolecule conjugates with phycobiliprotein-like fluorescence intensities. Fluorescently labeled dextrans with higher degree of labeling show quenching due to dye - dye interaction. This has found use in US Pat. No. 5,719,031, wherein the degree of labeling of dextran-fluorochrome-conjugates is high enough to furnish fluorescent quenching. Enzymatic degradation of the dextran-fluorochrome-conjugate is accompanied by an enhancement of the fluorescence emission signal, which is used for quantification of the enzymatic digestion process.

[0010] There remains still a considerable need for improved fluorescent dyes for labeling of biomolecules, which provide phycobiliprotein-like fluorescence intensity without the limitations of phycobiliproteins and fluorescent polymers.

SUMMARY

[0011] It was therefore an object of the invention to provide a fluorescent dye label with high fluorescence intensity, low unspecific background staining and stability against fixation.

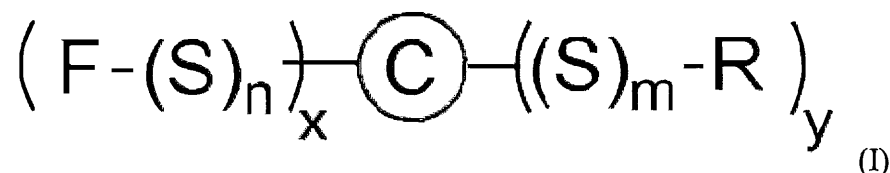
[0012] Surprisingly, it was found that fluorescent dyes multimerized on branched polyether scaffolds, such as multi-arm polyethylene glycols, are highly fluorescent without noticeable quenching. In addition, the polyether scaffold seems to reduce the tendency of fluorescent dyes to bind unspecifically.

[0013] One aspect the invention allows for tailoring the properties of the fluorescent dye label regarding photostability and stability against different environmental conditions such as temperature, pH and solvent. In another aspect of the invention a broad range of different excitation and emission wavelengths are provided. In another aspect of the invention retention of biomolecule activity is provided despite a high number of fluorophore subunits present in the biomolecule-fluorescent dye conjugate.

[0014] With the present invention, it is possible to introduce a high degree of fluorophore labeling to a biomolecule without loss of activity or increased unspecific binding, e.g., in case of antibodies a fluorophore DOL of greater than 10, preferably equal

or greater than 15 is achieved, resulting in an antibody fluorochrome conjugate with phycobiliprotein-conjugate-like fluorescence intensity and low unspecific background staining.

[0015] Accordingly, an object of the invention are fluorescent dyes according to the general formula I:



with

- C is a core moiety comprising 20 to 200 atoms;
- S same or different ether residues comprising 1 to 10 carbon atoms;
- n is an integer ranging from 2 to 500;
- m is an integer ranging from 0 to 500;
- x is an integer ranging from 2 to 50;
- y is an integer ranging from 1 to 50;
- R same or different residue comprising a reactive group capable of forming a covalent bond with a biomolecule;
- F same or different fluorophores covalently bound to (S)_n.

[0016] The core moiety C provides multiple (x+y) attachment points for the polyether residues (S)_n and (S)_m. R comprises a reactive group capable of forming a covalent bond with a biomolecule which recognizes cellular structures like antigens.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0017] Various exemplary details are described with reference to the following figures, wherein:

[0018] Figs. 1a-1e show a comparison of dot plots of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stained with CD4 antibody (clone Vit4) conjugated with: Fig. 1a fluorescein isothiocyanate (FITC); Fig. 1b fluorescein multimerized with a branched PEG (PEG-FAM); Fig. 1c Alexa Fluor 488 (AF488); Fig. 1d Alexa Fluor 488 multimerized with a branched PEG (PEG-AF488), or (1e) R-phycoerythrin (PE) measured by flow cytometry.

[0019] Fig. 2 shows the median fluorescence intensities (MFI) and stain indices (SI) of T helper cells (CD4 bright positive) of five different donors stained with CD4 antibody (clone Vit4) conjugated with FITC, fluorescein multimerized on a branched PEG (PEG-FAM), Alexa Fluor 488 (AF488), Alexa Fluor 488 multimerized on a branched PEG (PEG-AF488) or PE measured by flow cytometry.

[0020] Fig. 3 shows the effect of an increasing DOL on the staining of T helper cells for fluorescein multimerized on an eight-branch polyethylene glycol (PEG-FAM) conjugated to an antibody against human CD4 (clone Vit4) in comparison to the staining with said antibody against CD4, which is conjugated to conventional fluorescein isothiocyanate (FITC). Antibody staining concentration is 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in all cases.

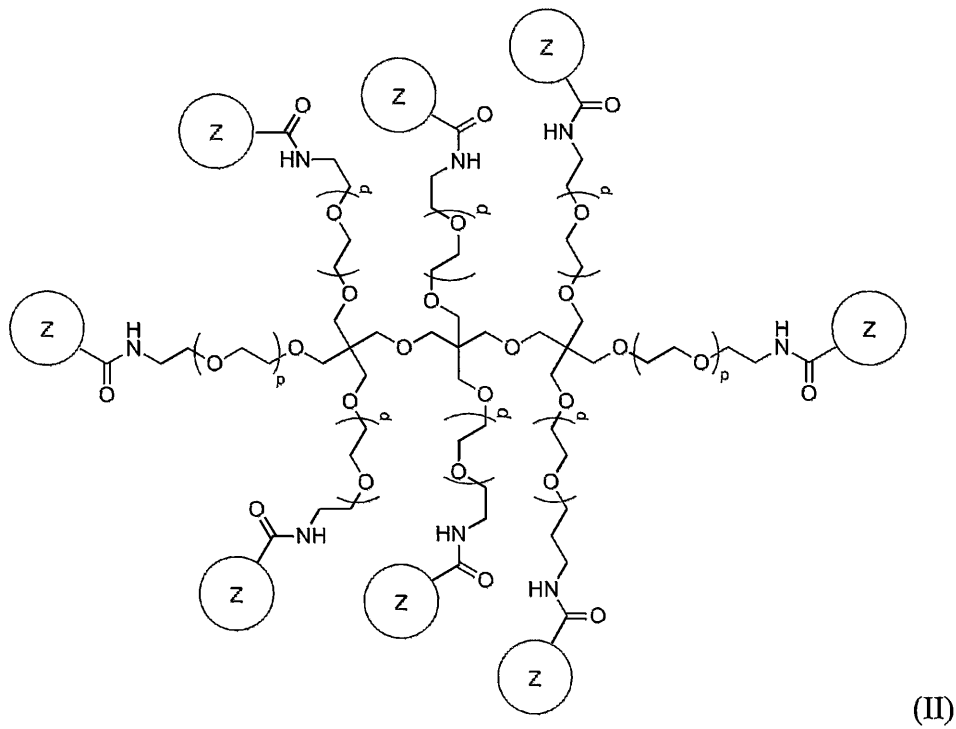
[0021] Fig. 4a shows histogram plots of CD4-PEG-FAM stained non-fixed and methanol fixed T helper cells; Fig. 4b shows CD4-PE stained non-fixed and methanol fixed T helper cells.

[0022] In all figures, fluorescent dyes with PEG subunits are according to the invention.

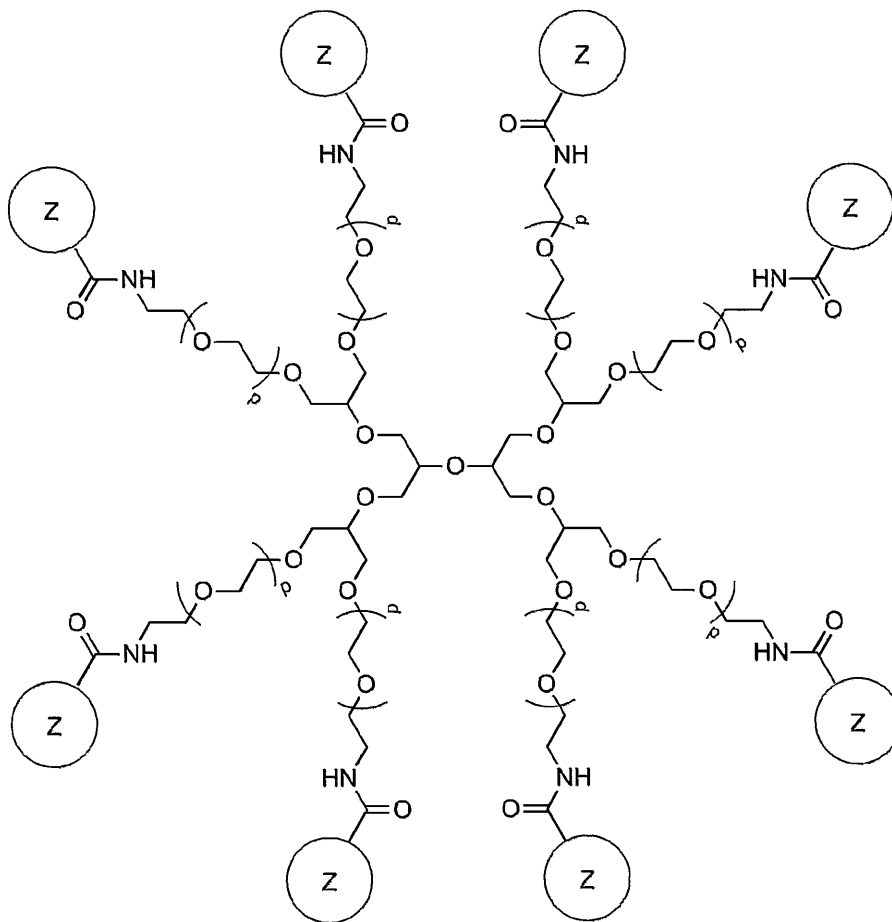
DETAILED DESCRIPTION

[0023] The fluorescent dyes according to the invention can be prepared by standard chemistry known to the person skilled in the art and as further disclosed in the examples of the present patent application.

[0024] By way of example, preferred fluorescent dyes according to the invention are shown in the following general formula II and III



(II)



(III)

[0025] In formula (II) and (III), Z is at least one of F and R and p is at least one of n and m (depending on whether the respective polyether branch binds to F or R, with the

provision that at least two F and at least one group R are comprised. F, R, n and m have the meaning as already disclosed.

Fluorophore F

[0026] The fluorophore F used in the present invention is coupled to the core moiety C via the polyether scaffold and may be any organic fluorescent dye molecule. Typically, such fluorophores have found use as laser dyes in organic dye lasers. Substituted versions, which can be conjugated to biomolecules, have found use as labels in flow cytometry and fluorescence microscopy.

[0027] Preferably, the fluorophore F 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.

[0028] In a variant of the invention, the fluorophore F is substituted with one more 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 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).

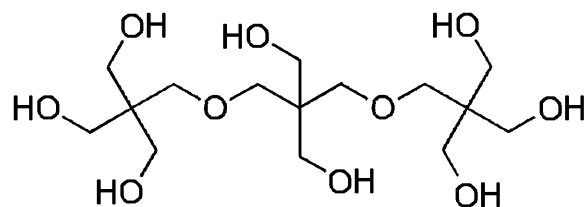
[0029] The fluorophores F can be attached to the polyether scaffolds by methods known in the art, i.e., by reacting a fluorescent dye with a group reactive towards amino or thiol groups with a branched polyether scaffold with amino end groups.

Core moiety C

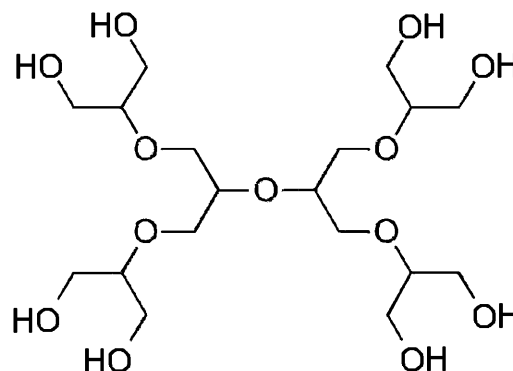
[0030] The core moiety C may be any structure comprising 1 to 100 carbon atoms, which allows attachment of x+y polyether residues (S)_n and (S)_m.

[0031] Useful core moieties for the invention are polyhydroxy compounds, polyamino compounds and polythio compounds. Preferred 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 via ether bonds, tripentaerythritol or hexaglycerol with eight

hydroxyl groups as attachment points for 3 to 8 polyether branches via ether bonds.



tripentaerythritol



hexaglycerol

Polyether residues S

[0032] The polyether residues $(S)_n$ and $(S)_m$ consist of ether monomer units S which may each containing 1 to 10, and preferably 1 to 4 oxygen atoms per monomer subunit S. These polyether branches might be homopolymeric or copolymeric, i.e., alternating or block copolymers. Polyether residues $(S)_n$ and $(S)_m$ can be linear or branched, especially in the case when monomer units S with 2 or more oxygen atoms are used. In a preferred embodiment of the invention, the polyether residues comprise polyethylene glycol chains, i.e., S stands for the residue $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - and n, m are independently integers ranging from 10 to 200.

[0033] In a particular useful embodiment of the invention commercially available multi-arm polyethylene glycols (branched PEGs) serve as scaffolds including core moiety and polyether branches. Multi-arm polyethylen glycols are commercialized by, for example, Nanocs Inc. or NOF Corporation.

Reactive groups R

[0034] The fluorescent dyes according to the invention are attached to biomolecules via groups R, comprising a reactive group. Groups R shall be capable of forming covalent bonds via the reactive group of the biomolecule, with functional groups, like amino and thiol groups. Either R or $(S)_m/(S)_n$ comprise a subunit capable of forming a covalent bond with the respective other group. For example, polyether groups $(S)_m/(S)_n$ are commercially available with amino end groups, which can react, for example, with an R group comprising a carboxy function. A person skilled in the art will have no difficulty in selecting the appropriate chemistry. Examples for R comprising such reactive groups are, e.g., active esters, such as N-hydroxysuccinimid ester, tetrafluorophenyl ester, pentafluorophenyl ester, sulfodichlorophenyl ester, imido ester, isothiocyanate, isocyanate, sulfonyl halides, acyl halides, acyl azide, monochlorotriazine, dichlorotriazine, aldehyde,

glyoxal, maleimide, iodoacetamide, hydrazine, azidonitrophenyl, phosphoramidite, alkyne, alkyl azide, diene or allyl groups.

[0035] Covalent bond formation is also possible via reactive groups R, which are functional groups capable of reacting with a reaction substrate carrying a suitable reactive group. Functional groups suitable for coupling reactions may be comprised, e.g., of an amino group, a thiol group, a hydroxyl group, or a carboxyl group.

[0036] It is also conceivable to use additional reactive groups R' on polyether branches with low reactivity, with the purpose of keeping apart fluorophores to prevent dye-dye interactions. These low-reactive groups R' may be hydrogen atom, an alkyl group, a trifluoroalkyl group, an aryl group, a halogen group, a sulfonyl group, a sulfonate group, a phosphonate group, a sulfonamide group, or combinations thereof. At least one of the above mentioned reactive groups R is necessary for the performance of the fluorescent dyes according to the invention.

Fluorescent biomolecule conjugates

[0037] Another object of the invention are fluorescent biomolecule conjugates comprising one or more fluorescent dyes as already disclosed conjugated via group R to at least one biomolecule selected from group consisting of immunoglobulin, antibody, fragmented antibody, Fab, Fab', F(ab')₂, sdAb, scFv, di-scFv, each naturally or recombinant.

[0038] The biomolecule conjugates of the invention are either prepared by reacting a biomolecule with a reactive group R of the fluorescent dye or by reacting an activated biomolecule with a suitable functional group R of the fluorescent dyes.

[0039] Biomolecules suitable for conjugation with the fluorescent dye of the invention may be proteins, peptides, carbohydrates, nucleic acids, lipids and combinations thereof. These biomolecule are capable of binding to binding partners, such as analytes, cell surface markers, antigens etc., in order to label, detect and quantify said analytes, cell surface markers, antigens etc..

[0040] Fragmented antibodies may be synthesized by recombinant procedures including covalent and non-covalent conjugates containing these kinds of molecules.

[0041] In one embodiment of the invention, the biomolecule is selected from a 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. Preferably, receptors are moieties e.g., for cell

adhesion or costimulatory molecules and hapten binders are avidin, streptavidin or neutravidin. Nucleic acids may be, e.g., aptamers, primers, or substrates for ligases.

[0042] Biotin binders, such as avidin, streptavidin or neutravidin labeled with fluorophore labeled branched polyether scaffold allow for a sensitive detection via biotinylated primary detection molecules due to an additional multiplying effect of the multiple biotinylation of said primary detection molecule.

[0043] In one embodiment of the invention the biomolecule is an IgG antibody with 2 to 7 fluorescent polyether labels carrying each 4 to 6 fluorophore groups, resulting in fluorophore DOLs of 8 to 40 dye molecules per antibody molecule, preferably a fluorophore DOL of more than 10, most preferably a DOL of 15 or more fluorophore units.

[0044] In yet another embodiment of the invention, the biomolecule conjugates comprise one or more fluorescent dyes wherein at least one biomolecule is conjugated with 2 to 20 fluorescent dyes comprising each 1 to 10 fluorophores F, inclusive. It is preferred that more than one fluorescent dye is present in the biomolecule conjugates.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0045] The biomolecule conjugates and/or the fluorescent dyes of the invention are especially useful for detection, counting or separation of cells utilizing a certain set of antigens recognized by the biomolecule conjugate.

[0046] Another object of the invention is therefore a method of analyzing cells or tissue labeled by the fluorescent biomolecule conjugates according to the invention by flow cytometry and/or by fluorescence microscopy. Accordingly, the method may include labeling with the fluorescent biomolecule conjugates as described, and performing at least one of flow cytometry and fluorescence microscopy.

[0047] In another embodiment of the invention one or more populations of labeled cells are detected from the sample and separated as target cells. Preferably the cells detected by the conjugate are separated from the sample by electrostatic forces, piezoelectric forces, mechanical separation or opto-acoustic means. Suitable for such separations are especially flow sorters, e.g., FACS or MEMS-based cell sorter systems, for example, as disclosed in EP14187215.0 or EP14187214.3.

[0048] In another embodiment of the invention the location of the binding target of biomolecule conjugates on cell or tissue samples is determined by fluorescence microscopy. Suitable methods of fluorescence microscopy include epifluorescence microscopy, confocal laser scanning microscopy, multi photon microscopy, total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, single plane illumination microscopy (SPIM)

and super resolution microscopy methods such as, e.g., stimulated emission depletion (STED) microscopy, stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), photo activated localization microscopy (PALM), or spatially modulated illumination (SMI) microscopy.

EXAMPLES

[0049] Example 1

[0050] Step A: Preparation of AF488 multimerized on an 8-arm PEG (PEG-AF488)

[0051] Amino-PEG (8-arm) was dissolved in 0.5 M PBS buffer, pH 7 at a concentration of 10 mg/mL. AF488, NHS ester dissolved in DMSO (2 mg/mL) was added in a 20-fold molar excess and incubated at room temperature for 30 minutes in the dark. Free dye was removed by SEC under standard conditions. The resulting PEG-AF488 had a DOL of 5.7.

[0052] PEG-FAM is obtained by the same procedure using NHS-fluorescein (NHS-FAM).

[0053] Step B: Coupling of CD4 antibody with PEG-AF488

[0054] PEG-AF488 (2.5 mg/mL in phosphate buffered saline) as obtained in step A was activated by addition of 10-fold molar excess SMCC and incubation at room temperature for 1 h. In parallel CD4 antibody (clone Vit 4) was reduced by reacting with 10 mmol/L dithiothreitol for 1 h. Maleimide activated PEG-AF488 and reduced antibody were both subjected to buffer exchange with phosphate buffered saline, pH 7.2 containing 2 mM EDTA over Sephadex G25. Maleimide activated PEG-AF488 was added to reduced antibody at a 15-fold excess and incubated for 1 h at room temperature in the dark. The reaction product is purified by SEC. The resulting CD4-PEG-AF488 had a DOL of 13.2.

[0055] CD4 is coupled to PEG-FAM using the same protocol.

[0056] Step C: Staining of PBMC with CD4 antibody conjugated to fluorochromes multimerized on 8-arm PEG.

[0057] For staining experiments 10^6 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) each are resuspended in 100 μ l phosphate buffered saline containing 2 mM EDTA and 0.5% BSA. Cells are stained with the respective CD4 antibody conjugates as obtained in step B at 3 μ g/mL and incubated for 10 minutes at room temperature. Counterstaining is performed with CD3-APC and propidium iodide for dead cell exclusion.

[0058] Commercially available CD4 antibody conjugated with R-phycoerythrin (PE) or non-multimerized fluorochromes FITC or AF488 is used for comparison.

[0059] Cells are incubated 10 minutes at room temperature in the dark. Washing is performed by centrifugation and resuspension in 1 ml phosphate buffered saline containing 2 mM EDTA and 0.5% BSA. Stained cells are analyzed on the MACSQuant 10 analyzer. Fig. 1 shows dot plot examples of fluorescence intensities versus side scatter (SSC) using the following: Fig. 1a fluorescein isothiocyanate (FITC); Fig. 1b fluorescein multimerized with a branched PEG (PEG-FAM); Fig. 1c Alexa Fluor 488 (AF488); Fig. 1d Alexa Fluor 488 multimerized with a branched PEG (PEG-AF488), or (1e) R-phycoerythrin (PE) and measured by flow cytometry.

[0060] Fig. 2 shows the median fluorescent intensities (MFI) and stain index (SI) results for PBMCs of 5 donors.

[0061] Cells stained with antibody labeled with fluorochromes according to the invention are at least twice as bright as cells stained with antibody labeled with the parent fluorochromes and on par with cells labeled with phycobiliprotein labeled antibody (CD4-PE). Fig. 3 shows the effect of an increasing DOL on the staining of T helper cells for fluorescein multimerized on an eight-branch polyethylene glycol (PEG-FAM) conjugated to an antibody against human CD4 (clone Vit4) in comparison to the staining with said antibody against CD4, which is conjugated to conventional fluorescein isothiocyanate (FITC). Antibody staining concentration is 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in all cases.

[0062] It is especially advantageous if the fluorochrome is also sulfonated as AF488 (Alexa Fluor). The resulting antibody conjugate labeled with AF488 multimerized on a 8-arm PEG (PEG-AF488) is about twice as bright as the corresponding conjugate made from fluorescein multimerized on a 8-arm PEG.

[0063] Example 2: Influence of methanol fixation on staining intensities.

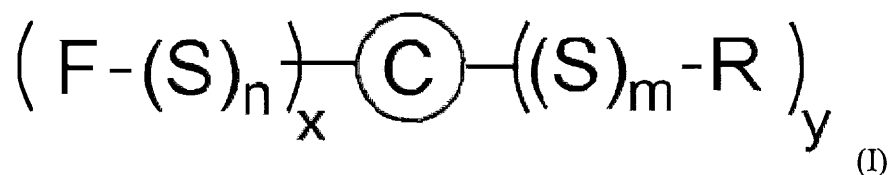
[0064] Peripheral blood mononuclear cells are stained as described in example 1 excluding propidium iodide as counterstain. For methanol fixation 1 mL methanol is added to 100 μL cell suspension and incubated for 30 minutes on ice. Cells are washed twice with and resuspended in 1 mL phosphate buffered saline containing 2 mM EDTA and 0.5% BSA. Stained and fixed cells are analyzed on the MACSQuant 10 analyzer in comparison to non-fixed cells. Fig. 4a and 4b show histogram plots of CD4-PEG-FAM stained non-fixed and methanol fixed T helper cells (Fig. 4a) and CD4-PE stained non-fixed and methanol fixed T helper cells (Fig. 4b). The fluorescence intensity of CD4-PEG-FAM is stable versus methanol fixation whereas the fluorescence intensity of CD4-PE shows a five-fold decrease.

[0065] Accordingly, the fluorescent biomolecule conjugates and/or the fluorescent dyes of the invention show improved stability towards environmental influences such as fixation.

[0066] While various details have been described in conjunction with the exemplary implementations outlined above, various alternatives, modifications, variations, improvements, and/or substantial equivalents, whether known or that are or may be presently unforeseen, may become apparent upon reviewing the foregoing disclosure. Accordingly, the exemplary implementations set forth above, are intended to be illustrative, not limiting.

CLAIMS

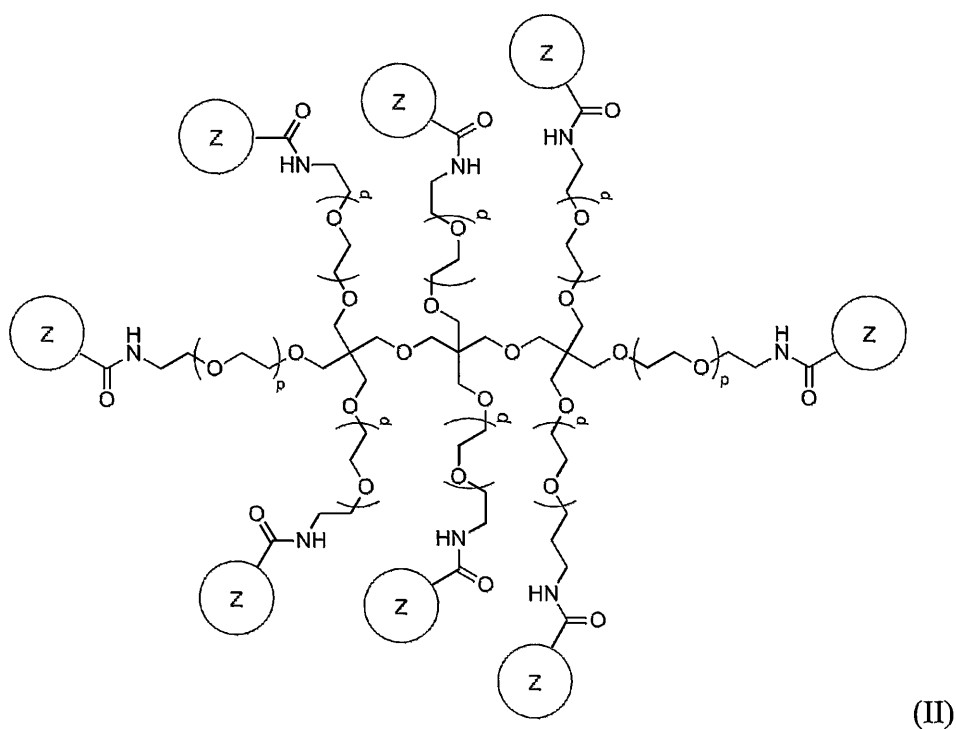
1. A fluorescent dye according to the general formula I:



with

- C is a core moiety comprising 20 to 200 atoms;
- S same or different ether residues comprising 1 to 10 carbon atoms;
- n is an integer ranging from 2 to 500;
- m is an integer ranging from 0 to 500;
- x is an integer ranging from 2 to 50;
- y is an integer ranging from 1 to 50;
- R same or different residue comprising a reactive group capable of forming a covalent bond with a biomolecule;
- F same or different fluorophores covalently bound to (S)_n.
2. The fluorescent dye according to claim 1, wherein the fluorophore F 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.
3. The fluorescent dye according to claim 1 or 2, wherein the fluorophore F is substituted with one more water solubility imparting substituents selected from the group consisting of sulfonates, phosphonates, phosphates, sulfonamides, polyethers and carbonates.
4. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 3 wherein the core moiety C is a polyhydroxy compound, a polyamino compound or a polythio compound.
5. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 4 wherein the core moiety C is selected from the group consisting of pentaerythritol, dipentaerythritol, tripentaerythritol and hexaglycerol.
6. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 5 wherein S stands for the residue CH₂CH₂O- and n, m are independently integers ranging from 10 to 200.

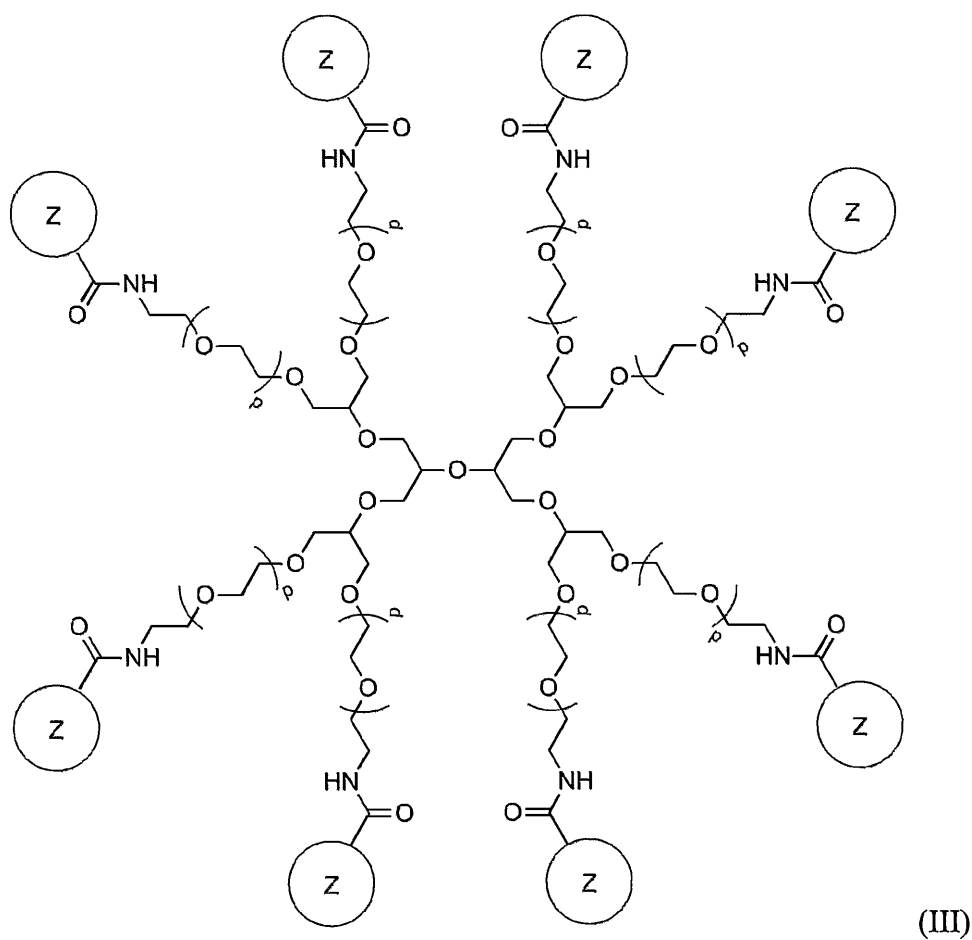
7. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 6 wherein R comprises for a reactive group selected from the group consisting of N-hydroxysuccinimid ester, tetrafluorophenyl ester, pentafluorophenyl ester, sulfodichlorophenyl ester, imido ester, isothiocyanate, isocyanate, sulfonyl halides, acyl halides, acyl azide, monochlorotriazine, dichlorotriazine, aldehyde, glyoxal, maleimide, iodoacetamide, hydrazine, azidonitrophenyl, phosphoramidite, alkyne, alkyl azide, dienes or allyl groups.
8. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 7 characterized by the structure of general formula (II)



with $Z = F$ or R and $p = n$ or m

with the provision that general formula (II) comprises at least two F and at least one group R .

9. The fluorescent dye according to one or more of the claims 1 to 7 characterized by the structure of general formula (III)



with $Z = F$ or R and $p = n$ or m

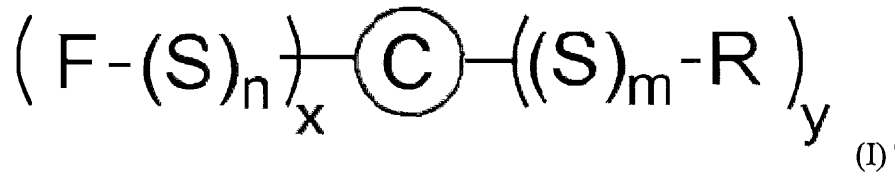
with the provision that general formula (II) comprises at least two F and at least one group R .

10. Fluorescent biomolecule conjugates comprising one or more fluorescent dyes according to one or more of the claims 1 to 9 conjugated via group R to at least one biomolecule selected from group consisting of immunoglobulin, antibody, fragmented antibody, Fab, Fab', $F(ab')_2$, sdAb, scFv, di-scFv each of naturally or recombinant origin.

11. Fluorescent biomolecule conjugates comprising one or more fluorescent dyes according to one or more of the claims 1 to 9 conjugated via group R to at 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.
12. Fluorescent biomolecule conjugates according to claim 10 or 11 wherein at least one biomolecule is conjugated with 2 to 20 fluorescent dyes according to one or more of the claims 1 to 9, each comprising 1 to 10 fluorophores F.
13. Method of analyzing cells or tissue labeled by the fluorescent biomolecule conjugates according to one or more of the claims 10 to 12 by flow cytometry and/or by fluorescence microscopy.

Abstract

The invention is directed to a fluorescent dye according to the general formula I:



with

C is a core moiety comprising 20 to 200 atoms;

S same or different ether residues comprising 1 to 10 carbon atoms;

n is an integer ranging from 2 to 500;

m is an integer ranging from 0 to 500;

x is an integer ranging from 2 to 50;

y is an integer ranging from 1 to 50;

R R same or different residue comprising a reactive group capable of forming a covalent bond with a biomolecule;

F same or different fluorophores covalently bound to (S)_n.

The fluorescent fluorescent dyes can be conjugated to a biomolecule and used for flow cytometry and/or by fluorescence microscopy.

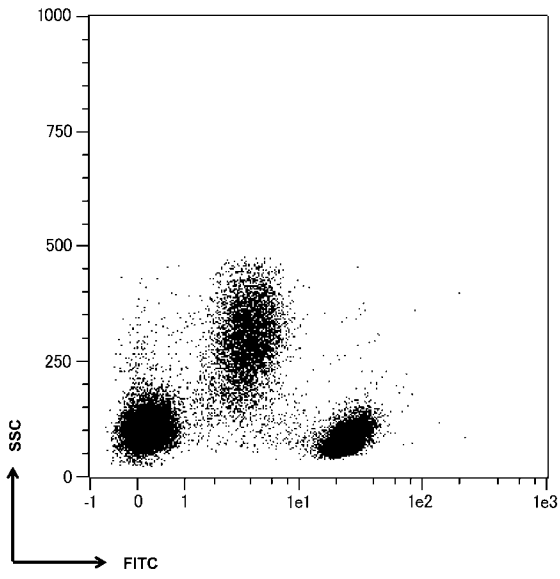


Fig. 1a

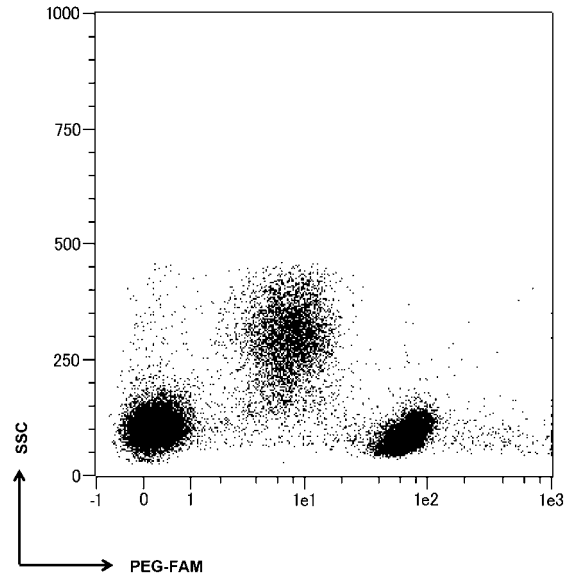


Fig. 1b

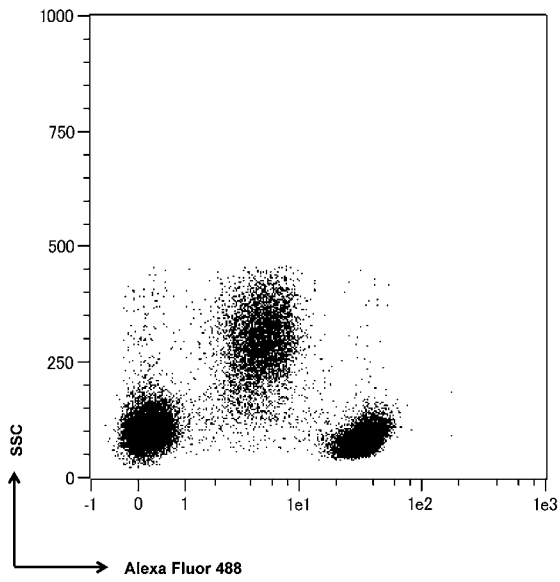


Fig. 1c

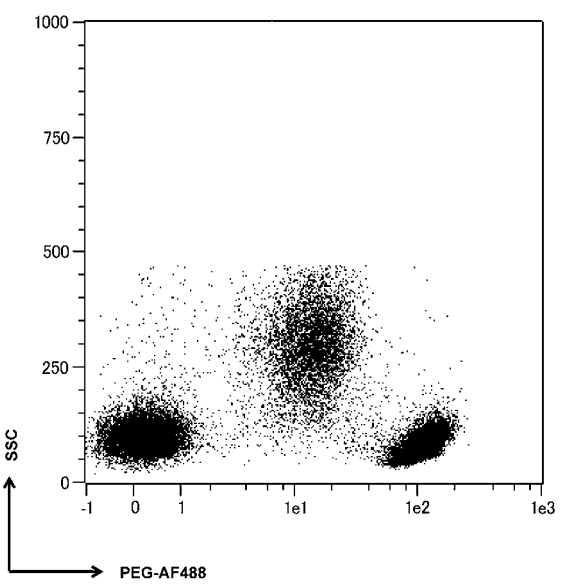


Fig. 1d

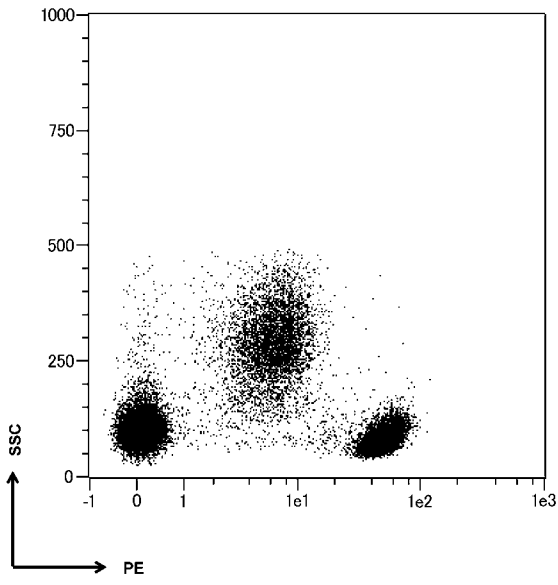


Fig. 1e

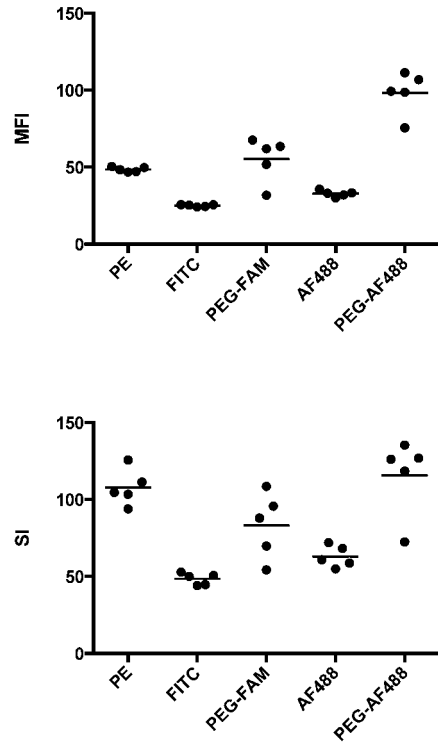


Fig. 2

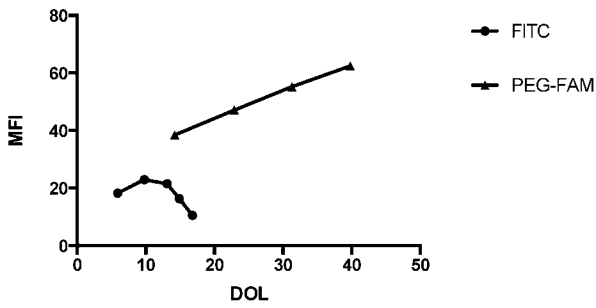


Fig. 3

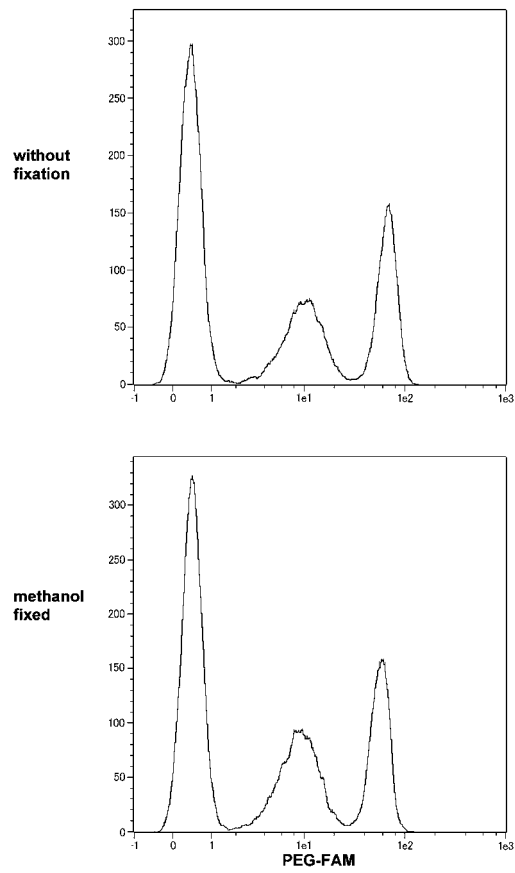


Fig. 4a

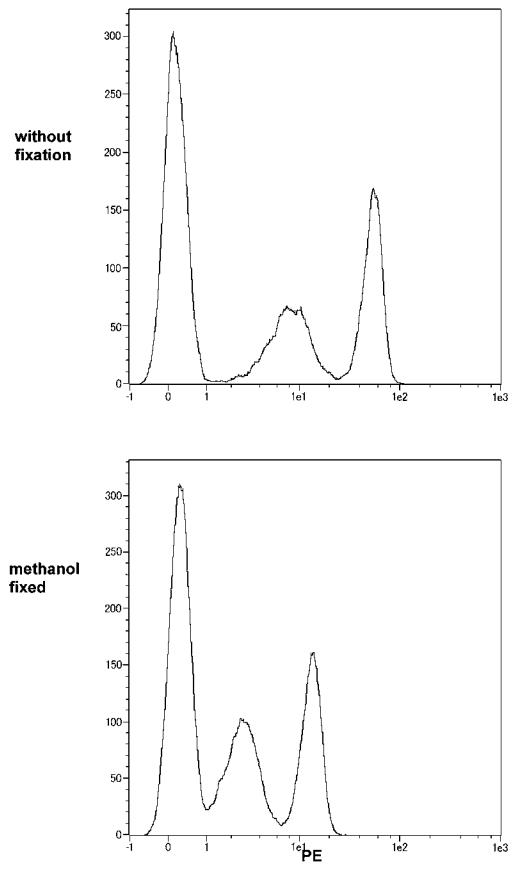


Fig. 4b

专利名称(译)	基于支化聚醚骨架上荧光染料多聚化的明亮荧光染料		
公开(公告)号	JP2017002284A	公开(公告)日	2017-01-05
申请号	JP2016106411	申请日	2016-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	美天旋GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungu 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		
发明人	クリスティアン ドーゼ		
IPC分类号	C09B69/10 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64 G01N21/78 C09K11/06		
CPC分类号	C09B69/00 G01N33/582		
FI分类号	C09B69/10.Z G01N33/543.597 G01N33/533 G01N21/64.F G01N21/78.C C09K11/06		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/JA02 2G043/KA09 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB01 2G054/BB02 2G054/BB05 2G054/BB13 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA05 2G054/FA19 2G054/GA04 2G054/GA05		
代理人(译)	前川純一 二宮和也HiroshiYasushi		
优先权	2015169549 2015-05-28 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 提供了具有改善的亮度的荧光染料及其使用方法。以通式I表示的荧光染料为例。式中，C为含有20至200个原子的核心部分；S为含有1至10个碳原子的相同或不同的醚残基；n为2至500范围内的整数。M是0至500范围内的整数；x是2至50范围内的整数；y是1至50范围内的整数；R与生物分子共享相同或不同的残基含有能够形成键的反应性基团；F是与(S)共价键合的相同或不同的荧光团n。荧光染料可以与生物分子结合，并且可以用于流式细胞术和/或通过荧光显微镜检查。[选择图]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 特開2017-2284 (P2017-2284)
	(43) 公開日	平成29年1月5日 (2017.1.5)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C09B 69/10 (2006.01)	C09B 69/10	Z 2G043
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	597 2G054
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/533	
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64	F
GO1N 21/78 (2006.01)	GO1N 21/78	C
	審査請求 未請求	請求項の数 13 O L 外国願出願 (全 39 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-106411 (P2016-106411)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年5月27日 (2016.5.27)	312000044
(31) 優先権主張番号	15169549.1	ミルチニー 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
(32) 優先日	平成27年5月28日 (2015.5.28)	Milttenyi Biotec GmbH
(33) 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】	分枝鎖状ポリエーテル骨格上の蛍光色素の多量体化に基づく明るい蛍光色素	