

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6828005号
(P6828005)

(45) 発行日 令和3年2月10日 (2021.2.10)

(24) 登録日 令和3年1月22日 (2021.1.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z N A B
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00

請求項の数 54 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-502612 (P2018-502612)	(73) 特許権者	517343287
(86) (22) 出願日	平成28年3月31日 (2016.3.31)		ファンダメンタル・ソリューションズ・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2018-516590 (P2018-516590A)		FUNDAMENTAL SOLUTIONS CORPORATION
(43) 公表日	平成30年6月28日 (2018.6.28)		アメリカ合衆国、18042 ペンシルベニア州、イーストン、リーハイ・ドライブ 1550
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/025219		1550 Lehigh Drive,
(87) 国際公開番号	W02016/161088		Easton, PA 18042, United States of America
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016.10.6)		
審査請求日	平成31年2月5日 (2019.2.5)	(74) 代理人	100101890
(31) 優先権主張番号	62/140,920		弁理士 押野 宏
(32) 優先日	平成27年3月31日 (2015.3.31)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 測定対象物質の急速検出のためのバイオセンサーシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の細胞に由来する、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞；

(b) レポータータンパク質であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内で操作され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞中のある特定の所定の細胞質ゾル変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、前記レポータータンパク質；

(c) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内のシグナル伝達経路であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、前記生物学的プロセスは、それが生じる場合、前記レポータータンパク質に前記検出可能なシグナルを放出させる、前記シグナル伝達経路；

(d) 少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれの前記ディテクター分子は、特定の測定対象物質に結合するように適合される、前記ディテクター分子；

(e) 少なくとも1つの測定対象物質であって、前記測定対象物質に特異的である前記ディテクター分子に結合する、前記測定対象物質；

(f) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現される複数の膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれのシグナル伝達エレメントは、前記ディテクター分子を受け入れるように適合される、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント；及び

10

20

(g) 十分な数の前記測定対象物質が、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している十分な数の前記ディテクター分子に結合している場合、前記シグナル伝達エレメントの集合が前記生きている操作されたバイオセンサー細胞表面に生じ、前記シグナル伝達経路が活性化され、前記生物学的プロセスが生じ、前記検出可能なシグナルが前記レポータータンパク質によって放出されること、
を含み、

前記生きている操作されたバイオセンサー細胞がB細胞またはT細胞に由来し、前記レポータータンパク質がエクオリンであり、前記シグナル伝達経路が細胞内カルシウムの増大を含み、前記ディテクター分子が食物媒介病原体に結合する抗体であり、前記測定対象物質が前記食物媒介病原体であり、複数の前記シグナル伝達エレメントが細菌性IgG結合タンパク質への結合を通じて抗体を受け入れるように適合される、前記測定対象物質の急速検出のための、システム。

10

【請求項2】

(a) 生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の細胞に由来する、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞；

(b) レポータータンパク質であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内で操作され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞中のある特定の所定の細胞質ゾル変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、前記レポータータンパク質；

(c) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内のシグナル伝達経路であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、前記生物学的プロセスは、それが生じる場合、前記レポータータンパク質に前記検出可能なシグナルを放出させる、前記シグナル伝達経路；

20

(d) 少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれの前記ディテクター分子は、特定の測定対象物質に結合するように適合される、前記ディテクター分子；

(e) 少なくとも1つの測定対象物質であって、前記測定対象物質に特異的である前記ディテクター分子に結合する、前記測定対象物質；

(f) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現される複数の膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれのシグナル伝達エレメントは、前記ディテクター分子を受け入れるように適合される、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント；及び

30

(g) 十分な数の前記測定対象物質が、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している十分な数の前記ディテクター分子に結合している場合、前記シグナル伝達エレメントの集合が前記生きている操作されたバイオセンサー細胞表面に生じ、前記シグナル伝達経路が活性化され、前記生物学的プロセスが生じ、前記検出可能なシグナルが前記レポータータンパク質によって放出されること、
を含み、

前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントが前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるキメラ融合タンパク質であり、前記キメラ融合タンパク質がさらに

40

(a) 少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも1つのタンパク質；及び

(b) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞が由来した1つの型の免疫細胞の表面に正常に発現される少なくとも1つのレセプター複合体
を含み、

少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも1つの前記タンパク質が、細菌性抗体結合タンパク質に由来する、前記測定対象物質の急速検出のための、システム。

【請求項3】

(a) 生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の細胞に由

50

来する、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞；

(b) レポータータンパク質であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内で操作され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞中のある特定の所定の細胞質ゾル変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、前記レポータータンパク質；

(c) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内のシグナル伝達経路であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、前記生物学的プロセスは、それが生じる場合、前記レポータータンパク質に前記検出可能なシグナルを放出させる、前記シグナル伝達経路；

(d) 少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれの前記ディテクター分子は、特定の測定対象物質に結合するように適合される、前記ディテクター分子；

(e) 少なくとも1つの測定対象物質であって、前記測定対象物質に特異的である前記ディテクター分子に結合する、前記測定対象物質；

(f) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現される複数の膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれのシグナル伝達エレメントは、前記ディテクター分子を受け入れるように適合される、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント；及び

(g) 十分な数の前記測定対象物質が、前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している十分な数の前記ディテクター分子に結合している場合、前記シグナル伝達エレメントの集合が前記生きている操作されたバイオセンサー細胞表面に生じ、前記シグナル伝達経路が活性化され、前記生物学的プロセスが生じ、前記検出可能なシグナルが前記レポータータンパク質によって放出されること、
を含み、

少なくとも1つの前記ディテクター分子が可溶性抗体である、前記測定対象物質の急速検出のための、システム。

【請求項4】

前記生きている操作されたバイオセンサー細胞がB細胞またはT細胞に由来し、前記レポータータンパク質がエクオリンであり、前記シグナル伝達経路が細胞内カルシウムの増大を含み、前記ディテクター分子が食物媒介病原体に結合する抗体であり、前記測定対象物質が前記食物媒介病原体であり、複数の前記シグナル伝達エレメントが細菌性IgG結合タンパク質への結合を通じて抗体を受け入れるように適合される、請求項2または3に記載のシステム。

【請求項5】

前記生きている操作されたバイオセンサー細胞がB細胞またはT細胞に由来する、請求項1～3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項6】

前記レポータータンパク質がエクオリンであり、前記検出可能なシグナルが青色光のフラッシュである、請求項1～3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項7】

前記シグナル伝達経路によって制御される前記生物学的プロセスがさらに細胞内カルシウムの増大を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項8】

前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントが前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるキメラ融合タンパク質であり、前記キメラ融合タンパク質がさらに

(a) 少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも1つのタンパク質；及び

(b) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞が由来した1つの型の免疫細胞の表面に正常に発現される少なくとも1つのレセプター複合体を含む、請求項1または3に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

少なくとも 1 つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される前記少なくとも 1 つのタンパク質が、細菌性抗体結合タンパク質に由来する、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される前記少なくとも 1 つのタンパク質が、FcR レセプタータンパク質または他のレセプタータンパク質に由来する抗体結合ドメインである、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記免疫細胞の表面に正常に発現される前記少なくとも 1 つのレセプター複合体が、IgM；IgA／β；IgE；CD19；CD3ζ、またはこれらの組み合わせである、請求項 2 または 8 に記載のシステム。

10

【請求項 12】

前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号 1、3、5、7、9、11、及び 17 からなる群から選択される DNA 配列と少なくとも 95% 同一性を有する DNA 配列によってコードされる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 13】

前記膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号 2、4、6、8、10、12、及び 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するキメラ融合タンパク質である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項 14】

少なくとも 1 つの前記ディテクター分子が可溶性抗体である、請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの前記ディテクター分子が、可溶性 IgG である、請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

【請求項 16】

前記測定対象物質が食物媒介感染因子である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 17】

前記測定対象物質が細菌またはウイルスのいずれかである、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項 18】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステムと前記測定対象物質を含有する試料を接触させること、及びシグナルが前記レポータータンパク質によって放出される場合、前記測定対象物質を検出することを含む、前記測定対象物質の検出方法。

【請求項 19】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシステムの作製方法であって、前記システムのエレメント (b)、(c)、及び (f) をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドで免疫細胞をトランスフェクトするまたは形質転換することを含む、作製方法。

40

【請求項 20】

(a) 生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の細胞に由来し、表面に複数の少なくとも 1 つの所定の型のレセプター分子を発現する、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞；

(b) レポータータンパク質であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内に操作され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内によって発現され、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞中のある特定の所定の細胞質ゾル変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、前記レポータータンパク質；

(c) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞内のシグナル伝達経路であって、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し

50

、前記生物学的プロセスは、それが生じる場合、前記レポータータンパク質に前記検出可能なシグナルを放出させる、前記シグナル伝達経路；

(d) 少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれの前記ディテクター分子は、特定の測定対象物質に結合するように適合される、前記ディテクター分子；

(e) 少なくとも1つの測定対象物質であって、前記測定対象物質に特異的である前記ディテクター分子に結合する、前記測定対象物質；

(f) 複数の可溶性非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれの前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントは、前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の表面の前記レセプター分子及び前記ディテクター分子に結合するように適合される、前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメント；及び

(g) 結合十分な数の前記測定対象物質が、十分な数の前記ディテクター分子に結合し、それ自体が前記レセプター分子に結合している十分な数の前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントに結合している場合、前記レセプター分子の集合が生じ、前記シグナル伝達経路が活性化され、前記生物学的プロセスが生じ、前記検出可能なシグナルが前記レポータータンパク質によって放出されること

を含み、

前記生きている操作されたバイオセンサー細胞が、天然FcεRIを発現するマスト細胞に由来し、

前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントが前記生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるキメラ融合タンパク質であり、前記キメラ融合タンパク質がさらに

(a) 少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも1つのタンパク質；及び

(b) 前記生きている操作されたバイオセンサー細胞が由来した1つの型の免疫細胞の表面に正常に発現される少なくとも1つのレセプター複合体

を含み、
少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも1つの前記タンパク質が、細菌性抗体結合タンパク質に由来する、前記測定対象物質の急速検出のための、システム。

【請求項21】

前記生きている操作されたバイオセンサー細胞の表面に発現される少なくとも1つの所定の型の前記レセプター分子が、FcεRIである、請求項20に記載のシステム。

【請求項22】

前記レポータータンパク質がエクオリンであり、前記検出可能なシグナルが青色光のフラッシュである、請求項20に記載のシステム。

【請求項23】

前記シグナル伝達経路によって制御される前記生物学的プロセスがさらに細胞内カルシウムの増大を含む、請求項20に記載のシステム。

【請求項24】

それぞれの前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントが、GSASGSG（配列番号19）リンカーでIgE定常ドメインに融合される細菌性IgG結合ドメインを含む可溶性キメラ融合タンパク質である、請求項20に記載のシステム。

【請求項25】

それぞれの前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントが、GSASGSG（配列番号19）リンカーでIgE定常ドメインに融合されるFcγRI抗体結合ドメインを含む可溶性キメラ融合タンパク質である、請求項20に記載のシステム。

【請求項26】

前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号13及び15からなる群から選択されるDNA配列と少なくとも95%同一性を有するDNA配列によってコードされる、請求項20に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記可溶性非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号 14 及び 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 28】

少なくとも 1 つの前記ディテクター分子が可溶性抗体である、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 29】

少なくとも 1 つの前記ディテクター分子が、可溶性 IgG である、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 30】

前記測定対象物質が食物媒介感染因子である、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 31】

前記測定対象物質が細菌またはウイルスのいずれかである、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 32】

請求項 20 に記載のシステムと前記測定対象物質を含有する試料を接触させること、及びシグナルが前記レポータータンパク質によって放出される場合、前記測定対象物質を検出することを含む、前記測定対象物質の、検出方法。

【請求項 33】

請求項 20 に記載のシステムの作製方法であって、前記システムのエレメント (b)、(c)、及び (f) をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドで免疫細胞をトランスフェクトするまたは形質転換することを含む、作製方法。

【請求項 34】

(a) 生きている操作された細胞であって、免疫細胞に由来する、前記生きている操作された細胞；

(b) レポータータンパク質であって、前記免疫細胞内に操作され、前記免疫細胞によって発現され、前記免疫細胞中のある特定の所定の細胞質ゾル変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、前記レポータータンパク質；

(c) 前記免疫細胞内のシグナル伝達経路であって、前記免疫細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、前記生物学的プロセスは、それが生じる場合、前記レポータータンパク質に前記検出可能なシグナルを放出させる、前記シグナル伝達経路；及び

(d) 分析される試料中の測定対象物質に直接に結合する、または前記測定対象物質及び少なくとも 1 つの抗体または他のディテクター分子の複合体を通じて分析される試料中の前記測定対象物質に間接に結合する複数の非抗体シグナル伝達エレメントであって、結合された前記非抗体シグナル伝達エレメントは、その後、前記生きている、操作された細胞と協働し、直接にまたは間接に前記シグナル伝達経路を活性化する、前記非抗体シグナル伝達エレメント、を含む、

前記生きている操作された細胞が、天然 FcεRI を発現するマスト細胞に由来し、
前記非抗体シグナル伝達エレメントが、

(a) 少なくとも 1 つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される少なくとも 1 つのタンパク質；及び

(b) 1 つの型の前記免疫細胞であって、そこから前記生きている操作された細胞が、1 つの型の前記免疫細胞の表面に正常に発現される少なくとも 1 つのレセプター複合体を含むキメラ融合タンパク質であり、

少なくとも 1 つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される前記少なくとも 1 つのタンパク質が、細菌性抗体結合タンパク質に由来する、前記測定対象物質の急速検出のためのバイオセンサー。

【請求項 35】

さらに、前記生きている操作された細胞の表面に発現される複数の少なくとも 1 つの所定の型のレセプター分子を含み、前記少なくとも 1 つの所定の型のレセプター分子は、前

10

20

30

40

50

記シグナル伝達経路と相互作用し、前記少なくとも1つの所定の型のレセプター分子は、前記非抗体シグナル伝達エレメントに結合する、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項36】

前記生きている操作された細胞の表面に発現される前記少なくとも1つの所定の型のレセプター分子が、FcεRIである、請求項35に記載のバイオセンサー。

【請求項37】

さらに、前記非抗体シグナル伝達エレメントと協働するように適合される少なくとも1つの外因性抗体または他のディテクター分子を含み、前記少なくとも1つの外因性抗体または前記他のディテクター分子は、また、特定の測定対象物質に結合するように適合される、請求項34に記載のバイオセンサー。

10

【請求項38】

前記少なくとも1つの外因性抗体が、可溶性IgGである、請求項37に記載のバイオセンサー。

【請求項39】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、膜貫通キメラ融合タンパク質として前記生きている操作された細胞によって発現される、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項40】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、前記生きている操作された細胞によって生成され、その後、可溶性融合タンパク質として前記生きている操作された細胞から排出される、請求項34に記載のバイオセンサー。

20

【請求項41】

前記レポータータンパク質がエクオリンであり、前記検出可能なシグナルが青色光のフラッシュである、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項42】

前記シグナル伝達経路によって制御される前記生物学的プロセスがさらに細胞内カルシウムの増大を含む、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項43】

少なくとも1つの型の前記ディテクター分子に結合するように適合される前記少なくとも1つのタンパク質が、FcRレセプタータンパク質または他のレセプタータンパク質に由来する抗体結合ドメインである、請求項34に記載のバイオセンサー。

30

【請求項44】

前記生きている操作された細胞の表面に正常に発現される前記少なくとも1つのレセプター複合体が、IgM；Igα/β；IgE；CD19；CD3ζ、またはこれらの組み合わせである、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項45】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号1、3、5、7、9、11、及び17からなる群から選択されるDNA配列と少なくとも95%同一性を有するDNA配列によってコードされる、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項46】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号2、4、6、8、10、12、及び18からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項34に記載のバイオセンサー。

40

【請求項47】

それぞれの前記非抗体シグナル伝達エレメントが、GSASGSG（配列番号19）リンカーでIgE定常ドメインに融合される細菌性IgG結合ドメインを含む可溶性キメラ融合タンパク質である、請求項34に記載のバイオセンサー。

【請求項48】

それぞれの前記非抗体シグナル伝達エレメント、GSASGSG（配列番号19）リンカーでIgE定常ドメインに融合されるFcγRI抗体結合ドメインを含む可溶性キメラ融合タンパク質である、請求項34に記載のバイオセンサー。

50

【請求項 49】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号 13 及び 15 からなる群から選択される DNA 配列と少なくとも 95% 同一性を有する DNA 配列によってコードされる、請求項 34 に記載のバイオセンサー。

【請求項 50】

前記非抗体シグナル伝達エレメントが、配列番号 14 及び 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 34 に記載のバイオセンサー。

【請求項 51】

前記測定対象物質が食物媒介感染因子である、請求項 34 に記載のバイオセンサー。

【請求項 52】

前記測定対象物質が細菌またはウイルスのいずれかである、請求項 34 に記載のバイオセンサー。

【請求項 53】

配列番号 2、4、6、8、10、12、及び 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するキメラ融合タンパク質。

【請求項 54】

配列番号 14 及び 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するキメラ融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2015年3月31日に出願され、「測定対象物質の急速検出のためのシステム (System for Rapid Detection of Analytes)」という表題の米国仮特許出願第 62/140,920 号、及び 2015 年 10 月 23 日に出願され、「測定対象物質の急速検出のためのシステム及び装置 (Systems and Devices for the Rapid Detection of Analytes)」という表題の米国仮特許出願第 62/245,595 号の利益を主張し、これらの開示は参照により本明細書にその全体が組み込まれ、全目的のために本米国実用特許出願の一部をなす。

【背景技術】

【0002】

記載された発明は、一般に生物学的試料または他の試料種中のさまざまな測定対象物質を検出するためのシステム、装置、及び方法に関し、さらに特に、バイオセンサーが試験される試料中の対象の測定対象物質と反応する場合、検出可能なシグナルの放出に基づいてリアルタイムで対象の測定対象物質を検出し、特定するためのバイオセンサー系システムに関する。

【0003】

一般的用語では、バイオセンサーは、物理化学的検出構成要素と感度のよい生物学的構成要素を組み合わせる測定対象物質の検出のためのシステムまたは装置である。典型的なバイオセンサーシステムの構成要素としては、生物学的エレメント、伝達または検出エレメント、及び有意義な及び有用な方法で試験結果を示す関連するエレクトロニクスまたはシグナルプロセッサが挙げられる。生物学的エレメントとしては、典型的には、組織、微生物、細胞小器官、細胞レセプター、酵素、抗体、核酸などの生物学的物質、及び公知の生物学的操作プロセスによって生成される可能性があるものなどが挙げられる。伝達または検出エレメントは、生物学的エレメントと測定対象物質の相互作用から生じるシグナルを、さらに容易に測定し、定量化することができる別のシグナルに変換する物理化学的方法 (例えば、光学的、圧電的、及び／または電気化学的) で機能する。バイオセンサーは、抗体-抗原相互作用などの生体分子-測定対象物質相互作用を認める、または量を計るために分子生物学及び情報技術 (例えば、超小型回路、光ファイバーなど) の統合から生じた。食物中の感染因子、病原体または／及び毒素を検出するために (例えば、Mead

10

20

30

40

50

et al., Food Related Illness and Death in the United States, Emerging Infectious Diseases; Vol. 5, No. 5, September-October 1999 (607-625)を参照し、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、急速で、感度のよい、取り扱いが容易であり、費用効果の高い検出ツールの要求が大きいことを考えると、食物及び多くの他の品目中の感染因子、病原微生物、毒素、及び他の汚染物質の検出及び特定のために、リアルタイムで、可搬型装置及び器具中でのバイオセンサーの利用が継続的に必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

以下は、本発明のある特定の例示的な実施形態の概要を提供する。本概要は、広範囲にわたる要約ではなく、本発明の主要または重要な態様または要素を特定する、またはその範囲を示すことを意図しない。

【0005】

本発明の1つの態様に従って、測定対象物質の急速検出のための第1のシステムが提供される。この第1のシステムの例示的な実施形態は、以下を含む。哺乳動物免疫系の細胞成分に由来する生きている操作されたバイオセンサー細胞；生きている操作されたバイオセンサー細胞内に操作され、当該細胞によって生成され、生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル中のある特定の所定の変化に応答して検出可能なシグナルを放出するレポータータンパク質；生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御する、生きている操作されたバイオセンサー細胞内に操作されるまたは当該細胞内で自然に生じるシグナル伝達経路であって、当該生物学的プロセスは、それが生じる場合、レポータータンパク質に検出可能なシグナルを放出させる、シグナル伝達経路；少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれのディテクター分子は特定の測定対象物質に結合するように適合される、ディテクター分子；ディテクター分子に結合し、その測定対象物質に特異的である少なくとも1つの測定対象物質；生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現される複数の膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれのシグナル伝達エレメントは、ディテクター分子を受け入れるように適合される、膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント；ここで、十分な数の測定対象物質が、十分な数のディテクター分子であって、膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している、ディテクター分子に結合する場合、シグナル伝達エレメントの集合がバイオセンサー細胞表面で生じ、シグナル伝達経路が活性化され、生物学的プロセスが生じ、検出可能なシグナルがレポータータンパク質によって放出される。

【0006】

本発明の別の態様に従って、測定対象物質の急速検出のための第2のシステムが提供される。この第2のシステムの例示的な実施形態は、以下を含む。生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の細胞成分に由来し、表面に複数の少なくとも1つの所定の型のレセプター分子を発現する、生きている操作されたバイオセンサー細胞；レポータータンパク質であって、生きている操作されたバイオセンサー細胞内に操作され、当該細胞によって発現され、生きている操作された細胞の細胞質ゾル中のある特定の所定の変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、レポータータンパク質；生きている操作されたバイオセンサー細胞内に操作されるまたは当該細胞内で自然に生じるシグナル伝達経路であって、生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、当該生物学的プロセスは、それが生じる場合、レポータータンパク質に検出可能なシグナルを放出させる、シグナル伝達経路；少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれのディテクター分子は、特定の測定対象物質に結合するように適合される、ディテクター分子；少なくとも1つの測定対象物質であって、その測定対象物質に特異的であるディテクター分子に結合する、測定対象物質；複数の可溶性非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれの可溶性シグナル伝達エレメントは、レセプター分子及びディテクター分子に結合するように適合される、可溶性非抗体シグナル

10

20

30

40

50

伝達エレメント；ここで、十分な数の測定対象物質が、十分な数のディテクター分子に結合し、十分な数の非抗体シグナル伝達エレメントであって、細胞表面レセプター分子にそれ自体が結合している、非抗体シグナル伝達エレメントに結合している場合、レセプター分子の集合が生じ、シグナル伝達経路が活性化され、生物学的プロセスが生じ、検出可能なシグナルがレポータータンパク質によって放出される。

【0007】

本発明のさらに別の態様に従って、試料中の測定対象物質の急速検出のためのバイオセンサーが提供される。このバイオセンサーは、以下を含む。生きている操作された細胞であって、哺乳動物免疫系（すなわち、免疫細胞）の細胞成分に由来する、生きている操作された細胞；レポータータンパク質であって、生きている操作された細胞内に操作され、当該細胞によって発現され、生きている操作された細胞の細胞質ゾル中のある特定の所定の変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、レポータータンパク質；生きている操作された細胞内に操作されるまたは当該細胞内で自然に生じるシグナル伝達経路であって、生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的プロセスを制御し、当該生物学的プロセスは、それが生じる場合、レポータータンパク質に検出可能なシグナルを放出させる、シグナル伝達経路；及び分析される試料中の測定対象物質に直接にまたは間接に結合する複数の非抗体シグナル伝達エレメントであって、当該結合された非抗体シグナル伝達エレメントは、その後、バイオセンサー細胞と協働し、直接にまたは間接にシグナル伝達経路を活性化する、非抗体シグナル伝達エレメント。

【0008】

例示的な実施形態の以下の詳細な説明を読み、理解すると、本発明のさらなる特徴及び態様が、当業者に明らかとなる。当業者に理解されるとおり、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、本発明のさらなる実施形態が可能である。したがって、図面及び関連した説明は、例示と考えなければならず、全く制限的ではない。

【0009】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部をなす添付の図面は、本発明の1つ以上の例示的な実施形態を図示し、上記に与えられた一般的説明及び以下に与えられる詳細な説明とともに、本発明の原則を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1 a～bは、本発明の例示的な実施形態に従った第1のバイオセンサーの図示であり、ジャーカットT細胞は、エクオリンを生成し、膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントIgGb p－CD3 ζを発現するように操作されている。

【図2】図2 a～bは、本発明の例示的な実施形態に従った第2のバイオセンサーの図示であり、MC/9マスト細胞は、エクオリンを生成するように操作されており、MC/9細胞は、可溶性非抗体シグナル伝達エレメントIgGb p－IgEに結合する天然レセプターFcεRIを発現する。

【図3】図3 a～bは、本発明の例示的な実施形態に従った第3のバイオセンサーの図示であり、MC/9マスト細胞は、エクオリンを生成するように操作されており、MC/9細胞は、可溶性非抗体シグナル伝達エレメントIgGb p－IgEに結合する天然レセプターFcεRIを発現し、これはMC/9マスト細胞によって排出されている。

【図4】本発明の例示的な実施形態に従った第4のバイオセンサーの図示であり、バイオセンサー細胞は、エクオリンを生成し、ビオチン化ディテクターエレメントに結合する膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントmSA－CD3 ζを発現するように操作されている。

【図5】本発明の例示的な実施形態に従った第5のバイオセンサーの図示であり、バイオセンサー細胞は、エクオリンを生成し、ビオチン化ディテクターエレメントに結合する膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントmSA－CD3 ζを発現するように操作されている。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の例示的な実施形態が、図を参照してここに記載される。以下の詳細な説明は、

例示の目的のために多くの詳細を含有するが、当業者であれば、以下の詳細に対する多くの変更及び修正が本発明の範囲内であると理解する。したがって、本発明の以下の実施形態は、クレームされている発明に対する一般性を喪失することなく、クレームされている発明を制限することなく、記載されている。

【0012】

本発明は、一般に生物学的試料または他の試料種中のさまざまな測定対象物質を検出するためのシステム、装置、及び方法に関し、さらに特に、バイオセンサーが試験される試料中の対象の測定対象物質と反応する場合、検出可能なシグナルの放出に基づいてリアルタイムで対象の測定対象物質を検出し、特定するためのバイオセンサー系システムに関する。本発明の操作された細胞は、きわめて感度のよい効果的なバイオセンサーであり、これらのバイオセンサー細胞は内因性検出能力を有するため、これらは、対象の特定の病原体または他の標的への特異性を有する別の可溶性ディテクター（例えば、抗体）分子を単純に選択することによって幅広いさまざまな感染因子または他の標的を検出するように容易に適合することができる汎用性のあるシステムを提供する。さらに、本発明のシステムは、単一アッセイ中のいくつかの感染因子または他の測定対象物質のマルチプレックス検出のために容易に構成することができ、大きな汎用性及び有用性を提供する。本発明の汎用性は、エレメントの独特の組み合わせに由来し、特に、特異的な可溶性ディテクター（例えば、抗体）と汎用バイオセンサー細胞の組み合わせに由来する。汎用バイオセンサー細胞には、ディテクター分子によって認識することができる本質的にいずれもの標的分子の存在に応答する能力がある。いくつかの実施形態では、ディテクターまたはディテクター抗体が可溶性因子としてシステムに添加されるため、システムは、単に好適な代替のディテクターまたはディテクター抗体を選択することによって別の標的を検出するように構成してよい。開示されたシステムの特異性は、感染因子または他の標的測定対象物質に特徴的である標的分子への特異性及び親和性に基づいて選択されるディテクター分子によって決定される。この汎用バイオセンサー細胞及び可溶性ディテクターの組み合わせは、また、単に試験システム内で複数のディテクター分子（例えば、抗体）を含むことによってマルチプレックスアッセイの構成を可能にし、標的分子は、別の感染因子または他の測定対象物質へのその特異性に基づいて選択される。

【0013】

本発明に用いられるバイオセンサー細胞型の遺伝子操作及び組換えは、典型的には選択される細胞型中で効率的に機能する遺伝子エレメントを含有する好適に選択される遺伝子送達ビヒクルの使用を含む。例えば、選択される特定のバイオセンサー細胞中で導入される導入遺伝子の高レベル発現を導くプロモーターエレメントを用いることが有用である。本発明の例示的な実施形態では、かかるプロモーターエレメントは、直接にバイオセンサー細胞それ自体に由来してよく、その後、対象の導入遺伝子を発現するために用いてよい。本発明の別の実施形態では、好適なエレメントは、選択される細胞型のための効果的なプロモーター、導入遺伝子、ベクター組み合わせを特定するために別の遺伝子送達ビヒクルの状況で別のプロモーターエレメントの機能を比較することによって実験的に決定してよい。電気穿孔などの標準技術または、例えば、リポフェクタミンなどの化学的トランスフェクション試薬を用いてバイオセンサー細胞に発光レポータータンパク質をコードする遺伝子などの導入遺伝子を導入してよい。当業者に公知の他の遺伝子工学の方法が、また、本発明に適合する。

【0014】

一般的実施形態では、本発明は、以下の成分を含む測定対象物質の急速検出のためのシステム及び方法を提供する：（i）生きている操作されたバイオセンサー細胞であって、哺乳動物免疫系の成分である、生きている操作されたバイオセンサー細胞；（ii）レポータータンパク質であって、生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現され、生きている操作された細胞の細胞質ゾル中のある特定の所定の変化に応答して検出可能なシグナルを放出する、レポータータンパク質；（iii）生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるシグナル伝達経路であって、生きている操作されたバイ

オセンサー細胞の細胞質ゾル内で生物学的または生化学的プロセスを制御し、生物学的または生化学的プロセスは、それが生じる場合、レポータータンパク質に検出可能なシグナルを放出させる、シグナル伝達経路；（i v）少なくとも1つの型のディテクター分子であって、それぞれのディテクター分子は特定の測定対象物質に結合するように適合される、ディテクター分子；（v）少なくとも1つの測定対象物質であって、測定対象物質に特異的であるディテクター分子に結合する、測定対象物質；（v i）生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現される、または生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるレセプターまたはレセプター成分に活発に結合する複数の非抗体シグナル伝達エレメントであって、それぞれのシグナル伝達エレメントはディテクター分子を受け入れるように適合される、非抗体シグナル伝達エレメント。十分な数の測定対象物質が、十分な数のディテクター分子であって、非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している、ディテクター分子に結合している場合、シグナル伝達エレメントの集合が細胞表面に生じ、シグナル伝達経路が活性化され、生化学的プロセスが生じ、検出可能なシグナルがレポータータンパク質によって放出される。このシステムは、また、生きているバイオセンサー細胞の生存可能性及び機能性を維持しながら、可溶性成分及び対象の測定対象物質または感染因子を含有する試料とともに生細胞を混合するための装置、及びバイオセンサー細胞によって放出されるシグナルを検出するためのディテクターを含んでよい。

10

【0015】

生きている操作されたバイオセンサー細胞

20

本発明の例示的な実施形態は、典型的には哺乳動物免疫系、例えば、免疫細胞の成分である生きている操作されたバイオセンサー細胞を含む。本発明のある特定の実施形態では、バイオセンサー細胞がヒトまたはマウスB細胞である。B細胞またはBリンパ球は、抗体を分泌することによって適応免疫系の体液性免疫成分中で機能するリンパ球サブタイプの白血球の型である。本発明の他の実施形態では、バイオセンサー細胞がヒトまたはマウスT細胞である。T細胞またはTリンパ球は、適応免疫系の一部として細胞媒介性免疫で中心的役割を果たすリンパ球の別の型である。T細胞は、細胞表面上のT細胞レセプターの存在のために他のリンパ球と区別可能である。本発明の他の実施形態では、バイオセンサー細胞がマスト細胞である。マスト細胞は、また、免疫及び神経免疫系の一部である骨髄系幹細胞に由来する顆粒白血球として公知の白血球の型である。白血球の別の型であり、外観及び機能の双方でマスト細胞とほぼ同じである好塩基性細胞を含む他の型の細胞が、本発明に適合する。

30

【0016】

レポータータンパク質

本発明の例示的な実施形態は、生きている操作されたバイオセンサー細胞によって生成されるまたは発現されるレポータータンパク質または酵素などのレポーターエレメントを含む。レポータータンパク質は、生きている操作されたバイオセンサー細胞の細胞質ゾル中のある特定の所定の変化にตอบสนองして検出可能なシグナルを放出する。本発明のある特定の実施形態では、レポータータンパク質が、ヒドロ虫類の*Aequorea victoria*に由来するエクオリンなどの生物発光タンパク質である。エクオリンは、幅広いシグナル伝達経路の活性化にตอบสนองして光シグナルを生じさせるために生きているバイオセンサー細胞を操作するのに以前より用いられている；このため、生細胞中のエクオリンの生成を操作するためのさまざまな方法が、当業者によく知られている。特に、当業者は、好適な遺伝子物質をバイオセンサー細胞に導入するために、例えば、細菌プラスミドベクターまたはウイルス性ベクターなどの任意の好適な遺伝子送達ビヒクルを選択して、用いてよい。バイオセンサー細胞内でのレポータータンパク質の生成は、その後、導入される遺伝子物質の発現によって制御される。当業者であれば、また、他の発光タンパク質または他の型のレポータータンパク質、酵素、及び分子を本発明のさまざまな代替の実施形態に組み込み、利用してよいと理解する。

40

【0017】

50

シグナル伝達経路

本発明の例示的な実施形態は、生きている操作されたバイオセンサー細胞によって発現されるシグナル伝達経路を含む。シグナル伝達経路は、生きている操作された細胞の細胞質ゾル内で少なくとも1つの生物学的プロセスを制御し、少なくとも1つの生物学的プロセスは、それが生じる場合、レポータータンパク質に検出可能なシグナルを放出させる。本発明のある特定の実施形態では、シグナル伝達経路が、レセプタータンパク質などの細胞表面シグナル伝達分子の活性化に応答して細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大が誘発される任意の生化学的経路である。本発明に用いられるバイオセンサー細胞は、細胞表面シグナル伝達分子の活性化に応答して細胞質 Ca^{2+} の増大を生じさせることができる一組の生細胞から選択してよい。例えば、B細胞、T細胞、及びマスト細胞には、それぞれB細胞レセプター、T細胞レセプター、及びFcγR3レセプター（マスト細胞）などの細胞表面シグナル伝達分子の活性化に応答して Ca^{2+} 濃度の増大を誘発する能力がある。

10

【0018】

培養中で成長する哺乳動物細胞は、典型的には、特定の個々の細胞が Ca^{2+} 濃度の増大を誘発するさまざまな能力を有する可能性がある細胞の集団を生成するため、 Ca^{2+} シグナルを生じさせるしかりとした能力を有する細胞またはクローン細胞株の亜集団を選択または選別することが有用である。これは、例えば、エクオリンが誘発するフラッシュの誘発を分析することによって、実現してよい。特に、導入遺伝子の細胞への導入によって生成されるトランスフェクタントは、多くの独立遺伝子挿入事象に由来する細胞の混合された集団である。このため、バイオセンサー細胞を構築する場合、導入される導入遺伝子の有用なレベルの発現とともに有効なシグナル伝達能力を有する細胞またはクローン細胞株の特定のサブセットを選別または選択することが有用である。特に、この目的のために、高発現細胞の亜集団を選択する、またはクローン細胞株を生成するために、蛍光活性化細胞分取法（FACS）技術を使用することが有用である。

20

【0019】

上記に示したとおり、エクオリンが、幅広いシグナル伝達経路の活性化に応答して光シグナルを生じさせるのに生きているバイオセンサー細胞を操作するために以前より用いられており、特に、かかるシグナル伝達経路は生細胞内で細胞質 Ca^{2+} イオンを増大させる。本発明のある特定の実施形態では、レポータータンパク質としてエクオリンを生成するバイオセンサー細胞に、検出アッセイでの使用前にセレンテラジン（CTZ）を充填する。この充填ステップは、共有的にエクオリンを疎水性補欠分子団（例えば、CTZ）に結合させ、カルシウム（ Ca^{2+} ）結合時に、CTZが、立体構造変化を含む不可逆反応を受け、青色光を（469nmで）放出する。

30

【0020】

ディテクター分子

本発明の例示的な実施形態は、ディテクター分子などの少なくとも1つの型のディテクターエレメントを含み、それぞれのディテクター分子は、特異的な標的測定対象物質に結合するように適合される。ディテクター分子は、いずれかの方法でもバイオセンサー細胞によって発現されない可溶性抗体としてよい。本発明に用いられる特定のディテクター分子は、明白に対象の標的測定対象物質を特定するその能力に基づいて選択される。例示的な実施形態では、ディテクター分子が感染因子などの特定の測定対象物質に特異的である市販のIgGなどの可溶性抗体である。別の例示的な実施形態では、ディテクター分子が、例えば、抗自己抗原抗体に特異的であるビオチン化自己抗原分子などの所定の測定対象物質に特異的であるビオチン化分子（またはストレプトアビジン系分子）である。本発明に従ったディテクターまたは標的分子は、自己免疫疾患に関連した自己抗原または自己抗体を含んでよい。代表的な自己免疫疾患または障害としては、関節リウマチ（RA）、若年性RA（JRA）、1型糖尿病、全身紅斑性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強皮症、小児脂肪便症、クローン病、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性硬化症、グッドパスチャー症候群、アジソン病、ウェグナー肉芽腫症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、リウマチ性多発性筋痛、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎

40

50

、及びギランバレー症候群が挙げられる。ディテクターまたは標的分子は、また、腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原またはかかる抗原に対する抗体；または、E G F、ペプチドホルモンなどの生物学的活性分子を含んでよく、インスリン及び成長ホルモン、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロン、T N F等、またはかかる生物学的活性分子に対する抗体が挙げられる。

【0021】

測定対象物質及び試験試料

本発明の意図される使用は、試験される試料内に存在するまたは存在する可能性があるさまざまな測定対象物質の検出である。本発明の例示的な実施形態では、検出される測定対象物質が、その測定対象物質に特異的である可溶性抗体などのディテクター分子に結合する。試験される試料は、(i) 牛肉、豚肉、子羊肉、パイソン、家禽の肉などの食肉、及び海産食物；及び(ii) 植物及び野菜を含む多くの食物源から採取してよい。試験される試料は、また、水、消費可能液、保存液、及び血液などの体液などの多くの他の源から採取してよい。検出される可能性がある測定対象物質は、ディテクターまたはディテクター分子、例えば、化学物質、毒素、及び感染因子例えば、ウイルス、細菌、及び他の生物学的物質または薬剤に特異的に結合する実質的に任意のものを含む。本発明の例示的な実施形態では、他の感染因子(*Salmonella*、*Listeria*、及び*Campylobacter*など)及び汚染物質が本発明で検出される可能性があるが、特定の感染因子は*Escherichia coli*である。本発明を用いて、*Escherichia coli* O157H7、O26、O45、O103、O111、O121、及びO145の全てが、別々のアッセイまたはマルチプレックスアッセイのいずれかで、検出される可能性がある。

【0022】

本発明は、食肉病原体、及びハウレン草、レタス、及び他の野菜及び食物にみられるものを含む多くのさまざまな測定対象物質を検出することができる。測定対象物質は、線状または立体構造エピトープの双方を含む、抗原またはアレルゲンの1つ以上のエピトープを含有してよい；それは、また、相互的レセプターまたはリガンドによって認識される1つ以上のリガンドまたはレセプターを含有してよい。例示的な測定対象物質としては、細菌、例えば、*Bacillus* (例えば、*B. anthracis*)、*Enterobacteriaceae* (例えば、*Salmonella*、*Escherichia coli*、*Yersinia pestis*、*Klebsiella*、及び*Shigella*)、*Yersinia* (例えば、*Y. pestis*または*Y. enterocolitica*)、*Staphylococcus* (例えば、*S. aureus*)、*Streptococcus*、*Gonorrheae*、*Enterococcus* (例えば、*E. faecalis*)、*Listeria* (例えば、*L. monocytogenes*)、*Brucella* (例えば、*B. abortus*、*B. melitensis*、または*B. suis*)、*Vibrio* (例えば、*V. cholerae*)、*Corynebacterium diphtheria*、*Pseudomonas* (例えば、*P. pseudomallei*または*P. aeruginosa*)、*Burkholderia* (例えば、*B. mallei*または*B. pseudomallei*)、*Shigella* (例えば、*S. dysenteriae*)、*Rickettsia* (例えば、*R. rickettsii*、*R. prowazekii*、または*R. typhi*)、*Francisella tularensis*、*Chlamydia psittaci*、*Coxiella burnetii*、*Mycoplasma* (例えば、*M. mycoides*)等；アレルゲン、例えば、ピーナッツダスト、マイコトキシン、カビ胞子、または細菌胞子、例えば、*Clostridium botulinum*及び*C. perfringens*；毒素、例えば、リシン、マイコトキシン、テトロドトキシン、炭疽毒素、ボツリヌス毒素、ブドウ球菌エンテロトキシンB、またはサキシトキシン；ウイルス、例えば、*Adenoviridae* (例えば、アデノウイルス)、*Arenaviridae* (例えば、Machupoウイルス)、*Bunyaviridae* (例えば、ハンタウイルスまたはリフトバレー

10

20

30

40

50

熱ウイルス)、Coronaviridae、Orthomyxoviridae (例えば、インフルエンザウイルス)、Filoviridae (例えば、エボラウイルス及びマールブルグウイルス)、Flaviviridae (例えば、日本脳炎ウイルス及び黄熱ウイルス)、Hepadnaviridae (例えば、B型肝炎ウイルス)、Herpesviridae (例えば、単純疱疹ウイルス)、Papovaviridae (例えば、乳腺腫ウイルス)、Paramyxoviridae (例えば、呼吸器合胞体ウイルス、はしかウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、またはパラインフルエンザウイルス)、Parvoviridae、Picornaviridae (例えば、ポリオウイルス)、Poxviridae (例えば、痘瘡ウイルス)、Reoviridae (例えば、ロタウイルス)、Retroviridae (例えば、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス (HTLV) 及びヒト免疫不全症ウイルス (HIV))、Rhabdoviridae (例えば、狂犬病ウイルス)、及びTogaviridae (例えば、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、及び風疹ウイルス)；原生動物、例えば、Cryptosporidium parvum、Encephalitozoa、Plasmodium、Toxoplasma gondii、Acanthamoeba、Entamoeba histolytica、Giardia lamblia、Trichomonas vaginalis、Leishmania、またはTrypanosoma (例えば、T. brucei及びT. Cruzi)；蠕虫、例えば、条虫(サナダムシ)、吸虫(trematodes) (吸虫(flukes))、または線虫(回虫、例えば、Ascaris lumbricoides、Trichuris trichiura、Necator americanus、またはAncylostoma duodenale)；寄生虫(例えば、本明細書に記載された任意の原虫類または蠕虫類)；菌、例えば、Aspergilli、Candidae、Coccidioides immitis、及びCryptococci；環境汚染物質；水添加物；農業マーカー；核酸(例えば、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、染色体、プラスミド、ウイルス性ゲノム、プライマー、もしくは遺伝子を含むDNAの分子、またはRNAの分子)；タンパク質(例えば、糖タンパク質、金属タンパク質、酵素、プリオン、または免疫グロブリン)；代謝産物；糖；脂質；リポ多糖；塩；またはイオンが挙げられる。また、標的としては、食物媒介病原体、例えば、Salmonella (例えば、Salmonella Typhimurium)、病原性Escherichia coli (例えば、O157:H7)、Bacillus (例えば、B. cereus)、Clostridium botulinum、Listeria monocytogenes、Yersinia (例えば、Y. enterocolitica)、ノロウイルス(例えば、ノーウォークウイルス)、Shigella、Staphylococcus aureus、Toxoplasma gondii、Vibrio (例えば、V. vulnificus、V. cholera、V. parahaemolyticus)、Campylobacter jejuni、及びClostridium perfringens；及び兵器化病原体、例えば、Bacillus anthracis、Yersinia pestis、Francisella tularensis、Brucella (例えば、B. suis)、Burkholderia mallei、Burkholderia pseudomallei、Shigella、Clostridium botulinum、Variola (例えば、V. major)、Filoviridae (例えば、エボラウイルス及びマールブルグウイルス)、Arenaviridae (例えば、ラッサウイルス及びマチュポウイルス)、Clostridium perfringens、任意の食物媒介病原体(例えば、Salmonella種、Escherichia coli O157:H7、またはShigella)、Chlamydia psittaci、Coxiella burnetii、Staphylococcus aureus、Rickettsia (例えば、R. prowazekiiまたはR. rickettsii)、Alphavirus (例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、または西部ウマ脳炎ウイルス)、Vibrio c

10

20

30

40

50

holerae、Cryptosporidium parvum、Henipavirus（例えば、ニパウイルス）、Bunyaviridae（例えば、ハンタウイルスまたはリフトバレー熱ウイルス）、Flaviviridae（例えば、日本脳炎ウイルス及び黄熱ウイルス）、及びCoccidioides種が挙げられる。

【0023】

測定対象物質または測定対象物質の一部として検出することができるエピトープは、典型的には、免疫グロブリン（またはその抗原結合フラグメント）が特異的に結合することができる抗原上の抗原決定基である。エピトープは、タンパク質の三次折り畳みによって並列にされる隣接アミノ酸または非隣接アミノ酸の双方から形成することができる。エピトープは、免疫グロブリンのFab（可変）領域（「イディオタイプ決定基」と称される）上にみることができ、免疫グロブリンの「イディオタイプ」に含まれる。エピトープ及び抗原は、自然に生じる、または人工的に生成することができる。エピトープまたは抗原の性質に応じて、エピトープまたは抗原は、例えば、源のマトリックスまたは物質から分離もしくは精製する、合成する、または組み換えで生成することができる。測定対象物質として有用なエピトープ及び抗原は、ヒトまたは非ヒト動物、植物、細菌、原生動物、寄生虫、ウイルス等からのものとすることができる。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、ポリペプチド、核酸分子、炭水化物、糖タンパク質、脂質、リポタンパク質、糖脂質、または小分子である。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、内因性抗原、感染因子抗原、薬剤（小分子）抗原、毒素、毒薬、生物学的抗原、環境抗原、移植抗原、及びインプラント抗原から選択される。

【0024】

測定対象物質は、癌抗原のエピトープを含んでよい。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、腫瘍特異的抗原である。本発明のいくつかの実施形態では、測定対象物質が、腫瘍関連抗原（TAA）であり、TAAは、野生型タンパク質と異なる1つ以上の翻訳後修飾を有する炭水化物抗原であり、悪性腫瘍細胞中に存在するが、非悪性腫瘍細胞中に存在しない遺伝子融合から生じるタンパク質の融合領域を含み、及び／または、TAAは、RTK遺伝子またはタンパク質中の自己分泌活性化、染色体転座、RTK過剰発現、または機能獲得変異のため、腫瘍細胞中で調節されない及び／または機能しないレセプターチロシンキナーゼ（RTK）を含む。本発明のいくつかの実施形態では、測定対象物質が、B細胞悪性腫瘍によって発現される免疫グロブリンである。B細胞悪性腫瘍の例としては、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫及び多発性骨髄腫が挙げられるが、これらに限定されない。追加のB細胞悪性腫瘍としては、例えば、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ球形質細胞性リンパ腫、脾臓周辺帯リンパ腫、辺縁帯リンパ腫（節外性及び節性）、形質細胞性腫瘍（例えば、形質細胞性骨髄腫、プラズマ細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖病）、及び濾胞性リンパ腫（例えば、グレードI、II、III、またはIV）が挙げられる。

【0025】

いくつかの実施形態では、測定対象物質が、対象から得られる腫瘍細胞に由来する腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原が、17-1A、707-AP、AFP、アネキシンII、ART-4、BAGE、BAGE-1、 β -カテニン、BCG、bcr/abl、Bcr/abl e14a2融合ジャンクション、bcr-abl (b3a2)、bcr-abl (b3a2)、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、水疱性類天疱瘡抗原-1、CA19-9、CA125、CA215、CAG-3、CAMEL、癌精巢抗原、カスパーゼ-8、CCL3、CCL4、CD16、CD20、CD3、CD30、CD55、CD63、CDC27、CDK-4、CDR3、CEA、クラスター5、クラスター-5A、サイクリン依存性キナーゼ-4、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、Dek-cain、E7、EGFR、EGFRvIII、EGP40、ELF2 M、EpCAM、FucGM1、G250

、GA733、GAGE、GAGE-1-8、ガストリン癌関連抗原、GD2、GD3、globOH、グリコホリン、GM1、GM2、GM3、GnTV、Gn-T-V、gp100、Her-2/neu、HER V-K-ME、高分子量関連抗原、高分子量プロテオグリカン (HMPG)、HPV-16 E6、HPV-16 E7、HPVE6、HSP70-2M、HST-2、hTERT、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG)、ヒト乳脂肪球 (HMFg)、iCE、KIAA0205、KK-LC-1、KM-HN-1、L6、LAGE-1、Lcose4Cer、LDLR/FUT、ルイスA、ルイスv/b、Mタンパク質、MAGE-1、MVC、MAGE-A1-12、MAGE-C2、MAHGE-3、MART-1/Melan-A、MC1R、ME491、MUC1、MUC2、ムチン、MUM-1、MUM-2、MUM-3、突然変異p53、ミオシン、MZ2-E、N9ノイラミニダーゼ、NA88、NA88-A、鼻咽頭癌抗原、NGA、NK1/c-3、ABLエキソン4を有するNovel bcr/abl融合BCRエキソン1、13、14、NY-ESO-1/LAGE-2、NY-ESO-1b、OC125、骨肉腫関連抗原-1、P15、p190 mimor bcr-abl (ela2)、p53、Pm1/RARa、ポリシアル酸、PRAME、PSA、PSM、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、Sialyl LeA、Ssp17、SSX-2、SSX-4、表面免疫グロブリン、TAG-1、TAG-2、TEL/AML1、TPI、TRAG-3、TRP-1 (gp75)、TRP-2、TRP2-INT2、hTRT、腫瘍関連糖タンパク質-72 (TAG-72)、チロシナーゼ、u-PA、WT1、及びXAGE-1b、または上記の抗原のいずれかの免疫原性フラグメントから選択される1つ以上の抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原が、SEREX (組み換えcDNA発現ライブラリーの血清学的分析) アプローチによって、またはさまざまな源または癌細胞株の腫瘍組織から生成されるcDNA発現ライブラリーの血清学的スクリーニングに基づいて、及び免疫原性腫瘍タンパク質を自己由来患者血清とのその反応性に基づいて特定することによって特定される。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、野生型タンパク質と異なる1つ以上の翻訳後修飾を有する炭水化物抗原である腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原が、悪性腫瘍細胞中に存在するが、非悪性腫瘍細胞中に存在しない遺伝子融合から生じるタンパク質の融合領域を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原が、RTK遺伝子またはタンパク質中の自己分泌活性化、染色体転座、RTK過剰発現、または機能獲得変異のため、腫瘍細胞中で調節されない及び/または機能しないレセプターチロシンキナーゼを含む。

【0026】

測定対象物質は、対象に対して病原となる、または病原とならない可能性がある感染または非感染因子の抗原のエピトープを含んでよい。測定対象物質は、ヒト消化管、粘膜面、または上皮細胞中のプロバイオティクまたは共生微生物などの動物または植物バイオームの微生物のいずれかを含む、相利共生、寄生、または共生微生物に由来することができる。いくつかの実施形態では、細菌性病原体が、*Acinetobacter baumannii* (以前は*Acinetobacter calcoaceticus*)、*Actinobacillus*、*Actinomyces pyogenes* (以前は*Corynebacterium pyogenes*)、*Actinomyces israelii*、*nocardia asteroides*、*N. brasiliensis*、*Aeromonas hydrophila*、*Amycolata autotrophica*、*Archanobacterium haemolyticum* (以前は*Corynebacterium haemolyticum*)、*Arizona hinshawii*—全血清型、*Bacillus anthracis*、*Bacteroides fragilis*、*Bartonella henselae*、*B. quintana*、*B. vinsonii*、*B. pertussis*を含む*Bordetella*、*Borrelia recurrentis*、*B. burgdorferi*、*Burkholderia* (以前は*Pseudomonas*種) BSL IIIに記載のものを除く)、*Campylobacter coli*、*C. fetus*、*C. jejuni*、*Chla*

mydia psittaci、*C. trachomatis*、*C. pneumonia*、*Clostridium botulinum*（神経毒素産生性種）、*Clostridium botulinum*神経毒、*Cl. chauvoei*、*Cl. haemolyticum*、*Cl. histolyticum*、*Cl. novyi*、*Cl. septicum*、*Cl. Tetani*、*Cl. Perfringens*イブシロン毒素、*Corynebacterium diphtheriae*、*C. pseudotuberculosis*、*C. renale*、*Dermatophilus congolensis*、*Edwardsiella tarda*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Escherichia coli*—全腸管病原性、毒素原性、腸管組織侵入性及びK1抗原を有する菌株、以下を含む、*E. coli* O157:H7、*Haemophilus ducreyi*、*H. influenzae*、*Helicobacter pylori*、*Klebsiella*—*K. oxytoca*（RG1）を除く全種、*L. pneumophila*を含む*Legionella*、*Leptospira interrogans*—全血清型、*Listeria*、*Moraxella*、*Mycobacterium*（BSL IIIに記載のものを除く）：以下を含む、*M. avium*複合体、*M. asiaticum*、*M. bovis* BCGワクチン菌株、*M. chelonae*、*M. fortuitum*、*M. kansasii*、*M. leprae*、*M. malmoense*、*M. marinum*、*M. paratuberculosis*、*M. scrofulaceum*、*M. simiae*、*M. szulgai*、*M. ulcerans*、*M. xenopi*、*Mycoplasma*、*Neisseria gonorrhoeae*、*N. meningitides*、*Nocardia asteroides*、*N. brasiliensis*、*N. otitidis*、*N. transvalensis*、*Proteus mirabilis*、*P. vulgaris*、*Rhodococcus equi*、*Salmonella*：以下を含む、*S. arizonae*、*S. choleraesuis*、*S. enteritidis*、*S. gallinarum*—*pullorum*、*S. meleagridis*、*S. paratyphi*、A、B、C、*S. typhi*、*S. typhimurium*、*Shigella*：以下を含む、*S. boydii*、*S. dysenteriae*、1型、*S. flexneri*、*S. sonnei*、*Sphaerophorus necrophorus*、*Staphylococcus aureus*、*Streptobacillus moniliformis*、*Streptococcus*：以下を含む、*S. pneumoniae*、*S. pyogenes*、*Treponema pallidum*、*T. carateum*、*Vibrio cholerae*、*V. parahemolyticus*、*V. vulnificus*、*Yersinia enterocolitica*、*Bartonella*、*Brucella*：以下を含む、*B. abortus*、*B. canis*、*B. suis*、*B. melitensis*、*Burkholderia*（*Pseudomonas*）*mallei*、*B. pseudomallei*、*Coxiella burnetii*、*Francisella tularensis*、*Mycobacterium bovis*（BCG菌株、BSL II—クラミジアを含む細菌性病原体を除く）、*M. tuberculosis*、*tuberculosis*以外の*Mycobacteria*（MOTT）、*Pasteurella multocida* B型—「バッファロー」及び他のウイルス菌株、*Rickettsia akari*、*R. australis*、*R. canada*、*R. conorii*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. siberica*、*R. tsutsugamushi*、*R. typhi*（*R. mooseri*）、*Yersinia pestis*から選択される。

【0027】

測定対象物質は、ウイルス性病原体に由来することができる。例えば、いくつかの実施形態では、測定対象物質が、アデノウイルス、ヒト—全型、アルファウイルス（トガウイルス）、東部ウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ワクチン菌株TC-83、西部ウマ脳脊髄炎ウイルス、アレナウイルス、リンパ性脈絡髄

10

20

30

40

50

膜炎ウイルス（非向神経性菌株）、タカリベウイルス複合体、ブニヤウイルス、ブニヤムウェラウイルス、リフトバレー熱ウイルスワクチン菌株MP-12、カリチウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス（トガウイルス）ーB群アルボウイルス、デング熱ウイルス血清型1、2、3、及び4、黄熱ウイルスワクチン菌株17D、A、B、C、D、及びE型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、単純疱疹1及び2型、帯状疱疹、ヒトヘルペスウイルス6及び7型、インフルエンザウイルスA、B、及びC型、パポバウイルス、乳腺腫ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、はしかウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス1、2、3、及び4型、ポリオーマウイルス（JCウイルス、BKウイルス）、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパルボウイルス（B19）、コクサッキーウイルスA及びB型、エコーウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、アラストリム（小痘瘡ウイルス）、痘瘡（大痘瘡ウイルス）、白痘レオウイルス、コルチウイルス、ヒトロタウイルス、及びオルビウイルス（コロラダニ熱ウイルス）、狂犬病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ルビウイルス（風疹）、セムリキ森林ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス、アレナウイルス（別名、南アメリカ出血性熱ウイルス）、フレクサル、リンパ性脈絡髄膜炎ウイルス（LCM）（向神経性菌株）、ハンターンウイルスを含むハンタウイルス、リフトバレー熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、サル痘ウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）1及び2型、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス（HTLV）1及び2型、サル免疫不全ウイルス（SIV）、水疱性口内炎ウイルス、グアナリトウイルス、ラッサ熱ウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルス、サビア、クリミアーコンゴ出血熱ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介脳炎、極東ダニ媒介脳炎を含むダニ媒介脳炎ウイルス複合体（フラビ）、ハンザロバ、Hyp r、クムリング、キャサヌール森林病、オムスク出血熱、及びロシア春夏脳炎ウイルス、ヘルペスウイルスシミエ（ヘルペスBまたはサルBウイルス）、オナガザルヘルペスウイルス1（ヘルペスBウイルス）、馬モルビリウイルス（ヘンドラ及びヘンドラ様ウイルス）、ニバウイルス、大痘瘡ウイルス（天然痘ウイルス）、小痘瘡ウイルス（アラストリム）、アフリカブタ熱ウイルス、アフリカウマ病ウイルス、アカバネウイルス、鳥インフルエンザウイルス（高病原性）、ブルータングウイルス、ラクダ痘ウイルス、豚コレラウイルス、コウドリアルミナンチウム（心水病）、口蹄疫ウイルス、ヤギ痘ウイルス、日本脳炎ウイルス、ランピースキン病ウイルス、悪性腫瘍カタル熱ウイルス、メナングルウイルス、ニューカッスル病ウイルス（VVND）、小反芻獣疫ウイルス、牛疫ウイルス、羊痘ウイルス、豚水胞病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（外来）から選択されるウイルス性病原体に由来する。

【0028】

測定対象物質は、寄生虫に由来することができる。例えば、いくつかの実施形態では、測定対象物質が、*Ancylostoma* ヒト十二指腸虫：以下を含む、*A. duodenale*、*A. ceylanicum*、*Ascaris*：以下を含む、*Ascaris lumbricoides* suum、*Babesia*：以下を含む、*B. divergens*、*B. microti*、*Brugia* フィラリア病原体：以下を含む、*B. malayi*、*B. timori*、*Coccidia*、*Cryptosporidium*：以下を含む、*C. parvum*、*Cysticercus cellulosae*（*hyd* *atid* *cyst*、*T. solium*の幼虫）、*Echinococcus*：以下を含む、*E. granulosus*、*E. multilocularis*、*E. vogeli*、*Entamoeba histolytica*、*Enterobius*、*Fasciola*：以下を含む、*F. gigantica*、*F. hepatica*、*Giardia*：以下を含む、*G. lamblia*、*Heterophyes*、*Hymenolepis*：以下を含む、*H. diminuta*、*H. nana*、*Isospora*、*Leishmania*：以下を含む、*L. braziliensis*、*L. donovani*、*L. ethiopia*、*L. major*、*L. mexicana*、*L. peruviana*、*L. tropica*、*Loa loa* フィラリア病原体、*Microsporidium*、*N*

10

20

30

40

50

aegleria fowleri、Necator ヒト十二指腸虫：以下を含む、N. americanus、Onchocerca フィラリア病原体：以下を含む、O. volvulus、Plasmodium cynomolgi、P. falciparum、P. malariae、P. ovale、P. vivax、Sarcocystis：以下を含む、S. suis hominis、Schistosoma：以下を含む、S. haematobium、S. intercalatum、S. japonicum、S. mansoni、S. mekongi、Strongyloides：以下を含む、S. stercoralis、Taenia solium、Toxocara：以下を含む、T. canis、Toxoplasma：以下を含む、T. gondii、Trichinella spiralis、Trypanosoma：以下を含む、T. brucei brucei、T. brucei gambiense、T. brucei rhodesiense、T. cruzi、またはWuchereria bancrofti フィラリア病原体から選択される寄生虫に由来する。

10

【0029】

測定対象物質は、真菌病原体とすることができる。例えば、いくつかの実施形態では、測定対象物質が、Aspergillus fumigates、Blastomyces dermatitidis、Cladosporium bantianum、Candida albicans、C. (Xylohypha) trichoides、Cryptococcus neoformans、Dactylaria galopava (Ochroconis gallopavum)、Epidermophyton、Exophiala (Wangiella) dermatitidis、Fonsecaea pedrosoi、Microsporum、Paracoccidioides brasiliensis、Penicillium marneffeii、Pneumocystis carinii、Sporothrix schenckii、Trichophyton、Coccidioides immitis、Coccidioides posadasii、Histoplasma capsulatum、H. capsulatum var. duboisii から選択される真菌病原体に由来する。

20

【0030】

測定対象物質は、毒素とすることができる。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、アブリン、Botulinum 神経毒、Clostridium perfringens イブシロン毒素、コノトキシン、ジアセトキシルペノール、リシン、サキシトキシン、志賀毒素様リボゾーム不活化タンパク質、志賀毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン、T-2 毒素、及びテトロドトキシンから選択される毒素である。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、測定対象物質が、B型肝炎表面抗原 (HBsAg)、B. burgdorferi OspA、HPV L1、RSV F タンパク質、インフルエンザヘマグルチニン、インフルエンザステムループ領域、インフルエンザM2、P. falciparum merozoite 表面タンパク質1-10、GLURP、SERA、S-抗原、6-cys ファミリー、AMA1、EBA175、140、181、MTRAP、PTRAMP、ASP、Rh1、2a、2b、4、5、RAP1、2、3、RAMA、RHOPH1、2、3、P. vivax スポロゾイト周囲タンパク質、スポロゾイト表面タンパク質2、SSP2/TRAP、CSP-N、CSP-R、CSP-C、MSP-1、MSP-9、DBPRIII、AMA-1、Pvs25、Pvs28、S. aureus 莢膜多糖、ポリ-N-アセチルグルコサミン、HIV gp120、gp41、及び Dengue ウイルス保存領域から選択される。

40

【0032】

別の実施形態では、測定対象物質が、アレルゲンの少なくとも1つのエピトープを含む。アレルゲンは、自然に生じるもの、またはアレルギーワクチン中に含有されるアレルゲンなどの人工的なものとすることができる。アレルゲンの例としては、動物性生成物 (例

50

えば、Fel d 1、皮膚、ゴキブリキノコ体傘部、ウール、ダストダニ排泄物）、薬剤（例えば、ペニシリン、スルホンアミド、サリチレート、局部麻酔薬）、食物（例えば、セロリ及び根セロリ、コーン、鶏卵（例えば、アルブミン）、果物、マメ類（例えば、豆、エンドウ、ピーナッツ、ダイズ）、ミルク、シーフード（例えば、貝）、ゴマ、しょう油、木の実（例えば、ペカン、アーモンド）、小麦、昆虫毒（例えば、アカヒアリ、蜂刺毒、スズメバチ刺毒）、ラテックス、金属、植物花粉（例えば、草（例えば、ライグラス、チモシー牧草、雑草（例えば、ブタクサ、オオバコ、イラクサ、*Artemisia vulgaris*、*chenopodium album*、スイバ）、及び木（例えば、カバ、ハンノキ、ハシバミ、シデ、トチノキ、ヤナギ、ポプラ、プラタナス、シナノキ、オリーブ、*Ashe juniper*）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、測定対象物質が、ラテックスタンパク質、例えば、未加工ラテックス樹液、アンモニアを含有する生ラテックスまたはタンパク質が化学物質及び高温にあてられた完成ラテックス製品に由来するアレルゲンである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、ダニのアレルゲン、例えば、*Dermatophagoides farinae*、*Dermatophagoides pteronyssinus*、*Acarus siro*、*Blomia tropicalis*、*Chortoglyphus arcuatas*、*Euroglyphus cannei*、*Lepidoglyphus destructor*、*Tyrophagus putrescentiae*、または *Glyphagus demesticus* である。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、毒、例えば、*Bombus* 種、*Vespa crabro*、*Apis mellifera*、*Dolichovespula* 種、*Polistes* 種、*Vespula* 種、*Dolichovespula maculata*、または *Dolichovespula arenaria* からのものである。いくつかの実施形態では、測定対象物質が、昆虫、例えば、*Camponotus pennsylvanicus*、*Solenopsis invicta*、*Solenopsis richteri*、*Periplaneta americana*、*Blattella germanica*、*Blatta orientalis*、*Tebanus* 種、*Musca domestica*、*Ephemeroptera* 種、*Culicidae* 種、または *Heterocera* 種からのアレルゲンである。

20

30

【0034】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が、生物、例えば、*Serinus canaria*、*Felis catus (domesticus)*、*Bos taurus*、*Gallus gallus (domesticus)*、*Canis familiaris*、*Arias platyrhynchos*、*Meriones unguiculatus*、*Capra hircus*、*Anser domesticus*、*Cavia porcellus (cobaya)*、*Mesocricetus auratus*、*Sus scrofa*、*Equus caballus*、*Mus musculus*、*Psittacidae*、*Columba fasciata*、*Oryctolagus cuniculus*、*Rattus norvegicus*、または *Ovis aries* からの上皮、皮膚、または毛である。

40

【0035】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が 真菌、例えば、*Cephalosporium acremonium*、*Alternaria tenuis*、*Aspergillus glaucus*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus versicolor*、*Aureobasidium pullulan (Pullularia pullulans)*、*Drechslera sorokiniana*、*Helminthosporium sativum*、*Botryti*

50

s cinerea, Candida albicans, Chaetomium globosum, Cladosporium herbarum, Cladosporium sphaerospermum (Homodendrum hordei), Drechslera spicifera (Curvularia spicifera), Epicoccum nigrum (Epicoccum purpurascens), Epidermophyton floccosum, Fusarium moniliforme, Fusarium solani, Geotrichum candidum, Gliocladium viride, Helminthosporium solani, Microsporum canis, Mucor circinelloides, Mucor circinelloides lusitanicus, Mucor plumbeus, Mycogone pernicioosa, Neurospora intermedia, Nigrospora oryzae, Paecilomyces variotii, Penicillium brevicompactum, Penicillium camembertii, Penicillium chrysogenum, Penicillium digitatum, Penicillium expansum, Penicillium notatum, Penicillium roquefortii, Phoma betae, Phoma herbarum, Rhizopus oryzae, Rhizopus stolonifer, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Scopulariopsis brevicaulis, Serpula lacrymans, Setosphaeria rostrata, Stemphylium botryosum, Stemphylium solani, Trichoderma harzianum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, または Trichothecium roseum からのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、黒穂病菌、例えば、Ustilago nuda, Ustilago cynodontis, Ustilago candidis, Sporisorium cruentum, Ustilago avenae, または Ustilago tritici からのものである。

【0036】

いくつかの実施形態では、アレルゲン 測定対象物質が、草、例えば、Paspalum notatum, Cynodon dactylon, Poa compressa, Bromus inennis, Phalaris arundinacea, Zea mays, Elytrigia repens (Agropyron repens), Sorghum halepense, Poa pratensis, Festuca pratensis (elatior), Avena sativa, Dactylis glomerata, Agrostis gigantea (alba), Secale cereale, Leymus (Elymus) condensatus, Lolium perenne ssp. multiflorum, Lolium perenne, Anthoxanthum odoratum, Phleum pratense, Holcus lanatus, Triticum aestivum, または Elymus (Agropyron) smithii からのものである。

【0037】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が、雑草、例えば、Atriplex polycarpa, Baccharis halimifolia, Baccharis sarothroides, Hymenoclea salsola, Amaranthus hybridus, Xanthium strumarium (commune), Rumex crispus, Eupathium capillifolium, Solidago 種, Amaranthus tuberculatus (Acnida tamariscina), Allenrolfea occidentali

s、*Chenopodium botrys*、*Kochia scoparia*、*Chenopodium album*、*Iva xanthifolia*、*Iva angustifolia*、*Chenopodium ambrosioides*、*Artemisia vulgaris*、*Artemisia ludoviciana*、*Urtica dioica*、*Amaranthus spinosus*、*Plantago lanceolata*、*Iva axillaris*、*Atriplex lentiformis*、*Ambrosia dumosa*、*Ambrosia acanthicarpa*、*Ambrosia trifida*、*Ambrosia artemisiifolia*、*Ambrosia confertiflora*、*Ambrosia bidentata*、*Ambrosia psilostachya*、*Salsola kali* (pestifer)、*Artemisia californica*、*Artemisia frigida*、*Artemisia tridentata*、*Atriplex wrightii*、*Atriplex confertifolia*、または *Artemisia annua*からのものである。

10

【0038】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が、木、例えば、*Acacia*種、*Alnus glutinosa*、*Alnus rubra*、*Alnus incana* ssp. *rugosa*、*Alnus rhombifolia*、*Fraxinus velutina*、*Fraxinus pennsylvanica*、*Fraxinus latifolia*、*Fraxinus americana*、*Populus tremuloides*、*Myrica cerifera*、*Fagus grandifolia* (americana)、*Casuarina equisetifolia*、*Betula lenta*、*Betula pendula*、*Betula nigra*、*Betula occidentalis* (fontinalis)、*Betula populifolia*、*Acer negundo*、*Cryptomeria japonica*、*Juniperus ashei* (sabinooides)、*Juniperus virginiana*、*Tamarix gallica*、*Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa*、*Populus deltoides*、*Populus fremontii*、*Populus wislizeni*、*Populus monilifera* (sargentii)、*Cupressus arizonoca*、*Taxodium distichum*、*Cupressus sempervirens*、*Ulmus americana*、*Ulmus crassifolia*、*Ulmus pumila*、*Eucalyptus globulus*、*Celtis occidentalis*、*Corylus americana*、*Corylus avellana*、*Carya ovata*、*Carya laciniosa*、*Carya alba*、*Juniferus monosperma*、*Juniperus princhotii*、*Juniperus scopulorum*、*Juniperus occidentalis*、*Robinia pseudoacacia*、*Mangifera indica*、*Acer macrophyllum*、*Acer rubrum*、*Acer saccharum*、*Melaleuca quinquenervia* (leucadendron)、*Prosopis glandulosa* (juliflora)、*Broussonetia papyrifera*、*Morus rubra*、*Morus alba*、*Quercus gambelii*、*Quercus velutina*、*Quercus macrocarpa*、*Quercus kelloggii*、*Quercus agrifolia*、*Quercus lobata*、*Quercus ilex*、*Quercus stellata*、*Quercus rubra*、*Quercus dumosa*、*Quercus virginiana*、*Quercus nigra*、*Quercus garryana*、*Quercus alba*、*Olea europaea*、*Elaeagnus angustifolia*、*Citrus sinensis*、*Arecastrum romanzoffian*

20

30

40

50

um (Cocos plumosa)、Carya illinoensis、Schinus molle、Schinus terebinthifolius、Pinus taeda、Pinus strobus、Pinus palustris、Pinus ponderosa、Pinus elliottii、Pinus virginiana、Pinus monticola、Pinus echinata、Populus nigra、Populus alba、Ligustrum vulgare、Liquidambar styraciflua、Platanus occidentalis、Platanus orientalis、Platanus racemosa、Platanus acerifolia、Juglans nigra、Juglans californica、Juglans regia、Salix lasiolepis、Salix nigra、または Salix discolor からのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、花、例えば、Chrysanthemum leucanthemum、Taraxacum officinale、または Helianthus annuus からのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲン、農業植物、例えば、Medicago sativa、Ricinus communis、Trifolium pratense、Brassica 種、または Beta vulgaris からのものである。

10

【0039】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が、植物食物（食用植物）、例えば、Prunus dulcis、Malus pumila、Prunus armeniaca、Musa paradisiaca (sapientum)、Hordeum vulgare、Phaseolus lanatus、Phaseolus vulgaris、Phaseolus 種、Phaseolus 種、Phaseolus vulgaris、Rubus allegheniensis、Vaccinium 種、Brassica oleracea var. botrytis、Fagopyrum esculentum、Brassica oleracea var. capitata、Theobroma cacao、Cucumis melo、Daucus carota、Brassica oleracea var. botrytis、Apium graveolens var. dulce、Prunus 種、Cinnamonum verum、Coffea arabica、Zea mays、Vaccinium macrocarpon、Cucumis sativus、Allium sativum、Zingiber officinale、Vitis 種、Citrus paradisi、Humulus lupulus、Citrus limon、Lactuca sativa、Agaricus campestris、Brassica 種、Myristica fragrans、Avena sativa、Olea europaea、Allium cepa var. cepa、Citrus sinensis、Vigna unguiculata、Pisum sativum、Prunus persica、Pyrus communis、Piper nigrum、Capsicum annuum var. annuum、Ananas comosus、Ipomoea batatas、Solanum tuberosum、Rubus idaeus var. idaeus、Oryza sativa、Secale cereale、Sesamum orientale (indicum)、Glycine max、Spinacia oleracea、Cucurbita pepo var. melopepo、Fragaria chiloensis、Lycopersicon esculentum (lycopersicon)、Brassica rapa var. rapa、Vanilla planifolia、Citrus lanatus var. lanatus、または Triticum aestivum からのものである。

20

30

40

【0040】

いくつかの実施形態では、アレルゲン測定対象物質が、魚または貝、例えば、Micr

50

opterus種、Ictalurus punctatus、Mercenaria mercenaria、Gadus morhua、Callinectes sapidus、Platichthys種、Hippoglossus種、Homarus americanus、Scomber scombrus、Crassostrea virginica、Sebastes marinus、Salmo salar、Clupeiformes、Pecten magellanicus、Penaeus種、Salvelinus種、またはThunnus種からのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、動物食物製品、例えば、Bos taurus、Ovis aries、または Sus scrofaからのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、鶏肉加工品、例えば、ニワトリ (Gallus gallus) 製品または七面鳥 (Meleagris gallopavo) 製品である。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、乳製品、例えば、ウシカゼインまたはウシミルクからのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、ナッツ、例えば、Bertholletia excelsa、Anacardium occidentale、Cocos nucifera、Corylus americana、Arachis hypogaea、Carya illinoensis、Juglans nigra、またはJuglans regiaである。いくつかの実施形態では、アレルゲンが、ダスト、例えば、大麦穀粒粉塵、コーン穀粒粉塵、ハウスダスト、マットレスダスト、オート麦穀粒粉塵、小麦穀粒粉塵、椅子張ダスト、またはラテックスダストである。

10

【0041】

20

いくつかの実施形態では、抗原測定対象物質が、自己免疫障害と関連した自己抗原である。いくつかの実施形態では、自己免疫障害が、細胞または臓器特異的自己免疫障害であり、自己抗原測定対象物質が、アセチルコリンレセプター (重症筋無力症)、アクチン (慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変)、アデニンヌクレオチド輸送体 (ANT) (拡張型心筋症、心筋症)、 β -アドレナリン作用受容体 (拡張型心筋症)、芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ (自己免疫多腺性内分泌症候群I型 (APS-1))、アシアロ糖タンパク質レセプター (自己免疫性肝炎)、殺菌性/透過性増大タンパク質 (Bpi) (嚢胞性線維症脈管炎)、カルシウム感知レセプター (後天性副甲状腺機能低下症)、コレステロール側鎖開裂酵素 (CYP11a) (APS-1)、コラーゲンIV型 α 3-鎖 (グッドパスチャー症候群)、チトクロームP450 2D6 (CYP2D6) (自己免疫性肝炎)、デスミン (クローン病、冠動脈疾患)、デスモグレイン1 (落葉状天疱瘡)、デスモグレイン3 (尋常性天疱瘡)、F-アクチン (自己免疫性肝炎)、GMガングリオシド (ギランバレー症候群)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD65) (1型糖尿病、全身硬直症候群)、グルタメートレセプター (GLUR) (ラスムッセン脳炎)、H/K ATPase (自己免疫胃炎)、17- α -ヒドロキシラーゼ (CYP17) (APS-1)、21-ヒドロキシラーゼ (CYP21) (アジソン病)、IA-2 (ICA512) (1型糖尿病)、インスリン (1型糖尿病、インスリン低血糖症候群 (平田病))、B型インスリン抵抗性、アカントーシス、全身紅斑性エリテマトーデス (SLE))、内因性因子1型 (悪性貧血)、白血球機能関連抗原 (LFA-1) (治療抵抗性ライム関節炎)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG) (多発性神経炎)、ミエリン塩基性タンパク質 (多発性硬化症、脱髄性疾患)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) (多発性硬化症)、ミオシン (リウマチ熱)、p-80-Coilin (アトピー性皮膚炎)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体-E2 (PDC-E2) (原発性胆汁性肝硬変)、ナトリウムヨウ素共輸送体 (NIS) (グレーブス病、自己免疫甲状腺機能低下)、SOX-10 (白斑)、甲状腺及び眼筋共有タンパク質 (自己免疫甲状腺炎)、甲状腺ペルオキシダーゼ (自己免疫橋本甲状腺炎)、チロトロピンレセプター (グレーブス病)、組織トランスグルタミナーゼ (小児脂肪便症)、転写コアクチベーターp75 (アトピー性皮膚炎)、トリプトファンヒドロキシラーゼ (APS-1)、チロシナーゼ (白斑、転移性黒色腫)、及びチロシンヒドロキシラーゼ (APS-1) から選択され、関連自己免疫障害 (複数可) が、それぞれの自己抗原測定対象物質の直後に挿入句的に記載さ

30

40

50

【 0 0 4 2 】

20

30

40

50

．）、 α シヌクレイン、シスタチンC、 τ au、ABri、ADan、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、突然変異ハンチントン、PrP^{Sc}または上記のいずれかのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態では、測定対象物質が、対象に導入されるインプラントの少なくとも1つのエピトープ、インプラント物質の代謝産物もしくは分解産物、またはインプラント物質のエピトープに特異的に結合する物質、例えば、インプラント物質またはその分解産物に対して作成された抗体を含み、かかるインプラントが、例えば、電動インプラント（例えば、人工ペースメーカー）、バイオインプラント（損傷した組織と取り替えるための対象の身体に外科的にインプラントされるバイオマテリアル（例えば、整形外科的再建人工装具）、心臓人工装具（人工弁）、皮膚、及び角膜）、避妊インプラント、歯科インプラント、整形外科的インプラント、及び癒着防止装置を含むことができる。エピトープを保持することができるインプラント物質の例としては、ラテックス；シリコン；金属、例えば、コバルトクロム（Co—Cr）合金、チタン、及びチタン合金；ポリマー、例えば、超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）及びポリメチルメタクリレートセメント（PMMA）；及びバイオセラミックス、例えば、ハイドロキシアパタイト及びバイオガラスが挙げられる。

【0047】

非抗体シグナル伝達エレメント

本発明の例示的な実施形態が、さまざまな非抗体シグナル伝達エレメントを含む。それぞれのシグナル伝達エレメントは、ディテクター分子を受け入れる、すなわち、これと結合するように適合され、それ自体が対象の特定の測定対象物質を受け入れる、すなわち、これと結合するように適合される。1つの実施形態では、シグナル伝達エレメントが、膜貫通キメラ融合タンパク質であり、これは、バイオセンサー細胞内に操作され、当該細胞の表面上に発現され、シグナル伝達経路を活性化し、この結果、最終的にレポータータンパク質が検出可能なシグナルを放出するように適合される。別の実施形態では、シグナル伝達エレメントが、可溶性キメラ融合タンパク質であり、これは、天然レセプターまたはレセプタータンパク質などの細胞表面シグナル伝達因子に結合するように適合され、シグナル伝達経路を活性化し、この結果、最終的にレポータータンパク質が検出可能なシグナルを放出するように適合される。さらに別の実施形態では、シグナル伝達エレメントが、バイオセンサー細胞内に操作され、当該細胞によって発現される可溶性キメラ融合タンパク質である。可溶性キメラ融合タンパク質は、その後、細胞外空間に分泌され／排出され、それは、天然レセプターまたはレセプタータンパク質などの細胞表面シグナル伝達因子に結合し、シグナル伝達経路を活性化し、この結果、最終的にレポータータンパク質が検出可能なシグナルを放出するように適合される。

【0048】

本発明のキメラ融合タンパク質は、（i）少なくとも1つの型のディテクター分子（例えば、可溶性抗体）に結合するように適合されるタンパク質の成分；及び（ii）生きている操作されたバイオセンサー細胞によって正常に発現されるレセプター複合体の成分を含んでよい。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの型のディテクター分子に結合するように適合されるタンパク質の成分が、細菌性結合タンパク質（すなわち、細菌に由来する抗体結合タンパク質）、例えば、連鎖球菌Gタンパク質のIgG結合ドメイン（本明細書の図中のIgGb_pまたはIgb_pを指す）に由来してよい。可溶性抗体に対する結合タンパク質の親和性を増大するように、このIgG結合ドメインのタンデム反復を含んでよい。代替の実施形態では、少なくとも1つの型のディテクター分子に結合するように適合されるキメラ融合タンパク質の成分が、レセプタータンパク質、例えば、マウスFcγRI（FcγRI）レセプターに由来する抗体結合ドメインである。さまざまな例示的な実施形態では、生きている操作されたバイオセンサー細胞によって正常に発現されるレセプター複合体の成分が、IgM（B細胞バイオセンサーに対する）；Igα／β（B細胞バイオセンサーに対する）；IgE（マスト細胞バイオセンサーに対する）；CD

19 (B細胞バイオセンサーに対する)、CD3ζ (T細胞バイオセンサーに対する)、またはFcεRI (マスト細胞バイオセンサーに対する)である。

【0049】

本発明の非抗体シグナル伝達エレメントは、完全タンパク質配列または操作されたタンパク質フラグメントのいずれか、例えば、より大きなタンパク質分子に由来する選択されたタンパク質ドメインを含んでよい。当業者であれば、より大きな分子のフラグメントは、合成遺伝子技術などの標準遺伝子工学技術を用いて生成してよいと理解する。より大きなタンパク質のフラグメントが、キメラ融合タンパク質の態様として抗体結合モチーフを操作するのに用いられる場合、選択されるタンパク質フラグメントの好適な立体構造的折り畳みを確実にするように操作されたタンパク質を設計することが重要である。そのため、容易にタンパク質二次構造を形成しない短いスペーサーまたはリンカーエレメントを(融合タンパク質中に)含むことが有用である。これらのスペーサーまたはリンカーエレメントのために、例えば、グリシン、セリン及びアラニンなどのアミノ酸の短い組み合わせを用いてよい。例示的な実施形態では、アミノ酸配列グリシン(G)、セリン(S)、アラニン(A)、セリン(S)、グリシン(G)、セリン(S)、グリシン(G)が、操作されたタンパク質分子中のレセプター複合体の成分から結合ドメインを分離するために用いられる(配列番号19を参照)。ディテクターエレメントをシグナル伝達エレメントに結合する、またはシグナル伝達エレメントのさまざまなセグメントを相互に結合するために用いられるペプチドリンカーまたはスペーサーについては、リンカーが、典型的には1つのエレメントのカルボキシル末端を別のアミノ末端に結合する。ペプチドリンカーは、アミノ酸長が0~25、または中間整数値のいずれかで変化してよく、典型的には、グリシン(G)及びセリン(S)などの親水性アミノ酸を含むが、必ず含むわけではない。

【0050】

上記に記載したとおり、それぞれのシグナル伝達エレメントは、対象の特定の測定対象物質に結合するディテクター分子に結合する。測定対象物質に結合されたディテクター分子は、(i)膜貫通シグナル伝達エレメントに結合する；または(ii)シグナル伝達エレメントであって、それ自体が、細胞表面シグナル伝達因子(例えば、天然レセプター)に結合する、シグナル伝達エレメントに結合する。第1の状況では、十分な数の測定対象物質が、十分な数のディテクター分子であって、膜貫通非抗体シグナル伝達エレメントにそれ自体が結合している、ディテクター分子に結合している場合、シグナル伝達エレメントの集合がバイオセンサー細胞表面に生じ、シグナル伝達経路が活性化され、生物学的プロセスが生じ、検出可能なシグナルが、レポータータンパク質によって放出される。第2の状況では、結合十分な数の測定対象物質が、十分な数のディテクター分子に結合し、十分な数の非抗体シグナル伝達エレメントであって、それ自体が好適な天然レセプターに結合している、非抗体シグナル伝達エレメントに結合している場合、レセプターの集合が細胞表面に生じ、シグナル伝達経路が活性化され、細胞内カルシウムの増大が生じ、検出可能な光がレポータータンパク質によって放出される。

【0051】

本発明の例示的な実施形態に従った第1の非抗体シグナル伝達エレメントは、GSASGSGLinkerでIgM重鎖定常ドメイン(B細胞)に融合される細菌性結合タンパク質(IgGbp)を含む。配列番号1は、シグナル伝達エレメントIgGbp-IgMのDNA配列を提供し、配列番号2は、シグナル伝達エレメントIgGbp-IgMのタンパク質配列を提供する。

【0052】

本発明の例示的な実施形態に従った第2の非抗体シグナル伝達エレメントは、GSASGSGLinkerでB細胞レセプターのIgα/β成分に融合される細菌性結合タンパク質(IgGbp)を含む。配列番号3は、シグナル伝達エレメントIgGbp-Igα/βのDNA配列を提供し、配列番号4は、シグナル伝達エレメントIgGbp-Igα/βのタンパク質配列を提供する。

【0053】

本発明の例示的な実施形態に従った第3の非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでT細胞レセプターのC D 3 ζ鎖に融合される細菌性結合タンパク質（I g G b p）を含む。配列番号5は、シグナル伝達エレメントI g G b p－C D 3 ζのDNA配列を提供し、配列番号6は、シグナル伝達エレメントI g G b p－C D 3 ζのタンパク質配列を提供する。

【0054】

本発明の例示的な実施形態に従った第4の非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでI g M重鎖定常ドメイン（B細胞）に融合されるF c γ R I抗体結合ドメインを含む。配列番号7は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g MのDNA配列を提供し、配列番号8は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g Mのタンパク質配列

10

【0055】

本発明の例示的な実施形態に従った第5の非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでB細胞レセプターのI g α／β成分に融合されるF c γ R I抗体結合ドメインを含む。配列番号9は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g α／βのDNA配列を提供し、配列番号10は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g α／βのタンパク質配列を提供する。

【0056】

本発明の例示的な実施形態に従った第6の非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでT細胞レセプターのC D 3 ζ鎖に融合されるF c γ R I抗体結合ドメインを含む。配列番号11は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－C D 3 ζのDNA配列を提供し、配列番号12は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－C D 3 ζのタンパク質配列を提供する。

20

【0057】

本発明に従った第7の例示的な非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでI g E定常ドメイン（B細胞）に融合される細菌性結合タンパク質（I g G b p）を含む。配列番号13は、シグナル伝達エレメントI g G b p－I g EのDNA配列を提供し、配列番号14は、シグナル伝達エレメントI g G b p－I g Eのタンパク質配列を提供する。

【0058】

本発明に従った第8の例示的な非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでI g E定常ドメイン（B細胞）に融合されるF c γ R I抗体結合ドメインを含む。配列番号15は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g EのDNA配列を提供し、配列番号16は、シグナル伝達エレメントF c γ R I－I g Eのタンパク質配列を提供する。

30

【0059】

本発明に従った第9の例示的な非抗体シグナル伝達エレメントは、G S A S G S G リンカーでT細胞レセプターのC D 3 ζ鎖に融合される単量体ストレプトアビジンを含む。配列番号17は、シグナル伝達エレメントm S A－C D 3 ζのDNA配列を提供し、配列番号18は、シグナル伝達エレメントm S A－C D 3 ζのタンパク質配列を提供する。単量体ストレプトアビジンは、ストレプトアビジン四量体を単量体に壊し、得られる分離サブユニットの溶解度を向上させる突然変異を含むストレプトアビジンの組み換え形態である。

40

【0060】

実施例バイオセンサーI

図1 a～bを参照すると、本発明の例示的な実施形態に従った第1のバイオセンサー100が、上記に記載したとおり、エクオリン104を生成するように操作され、C T Z 106で充填され、エクオリン／C T Z複合体を形成するジャーカットT細胞102を含む。この特定のバイオセンサーは、また、I g G b p－C D 3 ζ（配列番号5～6）である膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント108を発現するように操作されるが、膜貫通非抗体

50

シグナル伝達エレメントFcγRI-CD3ζ（配列番号11～12）もまた、バイオセンサー100と用いてよい。バイオセンサー細胞102は、また、少なくとも1つのシグナル伝達経路110を含み、その活性化の結果、細胞内Ca²⁺112が増大する。図1bに示したとおり、標的測定対象物質116（例えば、E.coli 0157）が結合している十分な数のディテクター分子114（例えば、可溶性抗体）が、膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント108に結合されている場合、シグナル伝達経路110が活性化され、細胞内Ca²⁺112が増大し、エクオリン/C TZ複合体が、立体構造変化を受け、光のシグナル（光子）118を放出し、光電子増倍管120によって検出され、スパイク122が試験装置（以下の説明を参照）にグラフで表示され、試験される試料内の標的測定対象物質116の存在を示す。当該表示は、標的測定対象物質116に関して質的及び量的なものの両方としてよい。

10

【0061】

実施例バイオセンサーII

図2a～bを参照すると、本発明の例示的な実施形態に従った第2のバイオセンサー200が、上記に記載したとおり、エクオリン204を生成するように操作され、C TZ 206で充填され、エクオリン/C TZ複合体を形成するMC/9（ATCC（登録商標）CRL-8306（商標））マスト細胞202を含む。この特定のバイオセンサーは、IgGbp-IgE（配列番号13～14）である可溶性非抗体シグナル伝達エレメント208に結合する天然Fcイプシロンレセプター（すなわち、FcεRI）207を発現するが、非抗体シグナル伝達エレメントFcγRI-IgE（配列番号15～16）もまた、バイオセンサー200と用いてよい。図2bに示したとおり、標的測定対象物質216（例えば、E.coli 0157）が結合している十分な数のディテクター分子214（例えば、可溶性抗体）が、以前天然Fcイプシロンレセプター207に結合した非抗体シグナル伝達エレメント208に結合している場合、シグナル伝達経路210が活性化され、細胞内Ca²⁺212が増大し、エクオリン/C TZ複合体が、立体構造変化を受け、光のシグナル（光子）218を放出し、光電子増倍管220によって検出され、スパイク222が試験装置（以下の説明を参照）にグラフで表示され、試験される試料内の標的測定対象物質216の存在を示す。当該表示は、標的測定対象物質216に関して質的及び量的なものの両方としてよい。

20

【0062】

実施例バイオセンサーIII

図3a～bを参照すると、本発明の例示的な実施形態に従った第3のバイオセンサー300が、上記に記載したとおり、エクオリン304を生成するように操作され、C TZ 306で充填され、エクオリン/C TZ複合体を形成するMC/9（ATCC（登録商標）CRL-8306（商標））マスト細胞302を含む。この特定のバイオセンサーは、IgGbp-IgE（配列番号13～14）である非抗体シグナル伝達エレメント308に結合する天然Fcイプシロンレセプター（すなわち、FcεRI）307を発現するが、非抗体シグナル伝達エレメントFcγRI-IgE（配列番号15～16）もまた、バイオセンサー300と用いてよい。この特定の実施形態では、バイオセンサー細胞302がさらに、IgGbp-IgEを発現し、この非抗体シグナル伝達エレメントを細胞外空間に排出するように操作され、それは、細胞表面上に発現される天然FcεRIに結合する。図3bに示したとおり、標的測定対象物質316（例えば、E.coli 0157）が結合している十分な数のディテクター分子314（例えば、可溶性抗体）が、以前天然Fcイプシロンレセプター307に結合した非抗体シグナル伝達エレメント308に結合している場合、シグナル伝達経路310が活性化され、細胞内Ca²⁺312が増大し、エクオリン/C TZ複合体が、立体構造変化を受け、光のシグナル（光子）318を放出し、光電子増倍管320によって検出され、スパイク322が試験装置（以下の説明を参照）にグラフで表示され、試験される試料内の標的測定対象物質316の存在を示す。当該表示は、標的測定対象物質316に関して質的及び量的なものの両方としてよい。

30

40

【0063】

50

実施例バイオセンサー I V

図4を参照すると、本発明の例示的な実施形態に従った第4のバイオセンサー400が、エクオリンを生成し、mSA-CD3ζ（配列番号17～18）である膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント408を発現するように、操作されているバイオセンサー細胞402を含む。非抗体シグナル伝達エレメントmSA-CD3ζ（単量体ストレプトアビジン-CD3ζ）は、標的分子416、例えば、表皮成長因子（EGF）に特異的に結合するビオチン化ディテクター分子414に結合する。抗標的分子抗体417、例えば、抗EGFは、上記に記載したとおり、複数のシグナル伝達エレメントを集中させ、シグナル伝達を誘発する標的多量体を生成する。他の実施形態では、単量体ストレプトアビジン成分が、ビオチン化成分と置換され、代替の結合手段を用いてよい。

10

【0064】

実施例バイオセンサー V

図5を参照すると、本発明の例示的な実施形態に従った第5のバイオセンサー500が、エクオリンを生成し、mSA-CD3ζ（配列番号17～18）である膜貫通非抗体シグナル伝達エレメント508を発現するように、操作されているバイオセンサー細胞502を含む。非抗体シグナル伝達エレメントmSA-CD3ζ（単量体ストレプトアビジン-CD3ζ）は、いくつかの実施形態では自己抗原分子であるビオチン化ディテクター分子514に結合する。ビオチン化ディテクター分子514は、いくつかの実施形態では抗自己抗原分子である標的分子516に特異的に結合する。血清試料中の自己抗体は、上記に記載したとおり、複数のシグナル伝達エレメントを集中させ、シグナル伝達を誘発する標的多量体を生成する。他の実施形態では、単量体ストレプトアビジン成分が、ビオチン化成分と置換され、代替の結合手段を用いてよい。

20

【0065】

本発明のキメラタンパク質を生成するために用いられるシグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下の受託番号：IgM重鎖（GenBank：CAC20458.1）、Ig-α（P11912.2、GI：547896）、Ig-β（P40259.1、GI：728994）、CD19（AAA69966.1、GI：901823）、CD3ζ（P20963.2、GI：23830999）、IgEα（1F2Q__A、GI：9257150）及びFc-εR1サブユニットα（P12319.1、GI：119865）によって特定されるタンパク質またはドメインに対する少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%配列同一性または類似性を有してよい。

30

【0066】

Staphylococcus aureus タンパク質A（P02976.3、GI：110283003）は、*Staphylococcus aureus* のspa遺伝子及びそのIg結合セグメントを含むその構造によってコードされ、免疫グロブリン結合特性は、よく知られており、Graille, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 May 9; 97(10): 5399-404; 及び Roben, et al. J Immunol. 1995 Jun 15; 154(12): 6437-45を参照することによって組み込まれる。公知のタンパク質Aアミノ酸配列に対する少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%配列同一性または類似性を有するタンパク質Aまたはその免疫グロブリン結合セグメントの変異体及び免疫グロブリンまたは他の測定対象物質に結合する能力、例えば、Grailleら及びRobenらによって記載されたものは、免疫グロブリン結合アミノ酸配列をコードする核酸の直接合成によることを含む当該技術分野でよく知られる分子生物学的技術によって生成してよい。

40

【0067】

Streptococcus タンパク質G及びかかるタンパク質の操作された変異体などの他の細菌性免疫グロブリン結合タンパク質が、知られており、Bailey, et al., J Immunol Methods. 2014 Dec 15; 415: 24

50

−30 (doi:10.1016/j.jim.2014.10.003) (Epub 2014 Oct 22); 及び Watanabe, et al., J Biol Chem. 2009 May 1; 284(18):12373-8 (doi:10.1074/jbc.M809236200) (Epub 2009 Mar 6) を参照することによって組み込まれる。公知のタンパク質Gアミノ酸配列に対する少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%配列同一性または類似性を有するタンパク質Gまたはその免疫グロブリン結合セグメントの変異体及び免疫グロブリンまたは他の測定対象物質に結合する能力、例えば、Baileyら及びWatanabeらによって記載されたものは、免疫グロブリン結合アミノ酸配列をコードする核酸の直接合成によることを含む当該技術分野でよく知られる分子生物学的技術によって生成してよい。

10

【0068】

Fcレセプター (FcR) は、免疫グロブリンのFc部分に結合し、FcγRI及びFcεRIを含むかかるFcレセプターの多くの型が知られている。これらのFcRの構造的及び機能的結合特性は、Fridman, FASEB J. 1991 Sep; 5(12):2684-90を参照することによって組み込まれる。Fridmanによって記載された配列などの公知のFcRアミノ酸配列に対する少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%配列同一性または類似性を有するFcRの変異体またはこれらの免疫グロブリン結合セグメントは、免疫グロブリン結合アミノ酸配列をコードする核酸の直接合成によることを含む当該技術分野でよく知られる分子生物学的技術によって生成してよい。

20

【0069】

本発明に従ったシグナル伝達タンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、及び18によって記載された開示されたキメラシグナル伝達タンパク質に対する少なくとも70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%配列同一性または類似性を有してよく、また、免疫グロブリンなどの測定対象物質と結合し、その後、シグナルを操作されたバイオセンサー細胞に伝達する能力を有する。かかる変異体は、分子生物学的技術でよく知られる方法によって、または変異体キメラレポータータンパク質をコードするポリヌクレオチドの化学的合成、コードする配列のベクターへの挿入、及びコンピテント細胞のベクターによる形質転換またはトランスフェクションによって作製してよい。

30

【0070】

細胞選別及びクローニング

本発明のバイオセンサーの設計及び構築の結果、培養されると、バイオセンサー細胞の混合された集団が得られた。いくつかの細胞は操作された因子を発現しなかったが、他のものはさまざまなレベルで因子を発現した。成功した電気穿孔及び遺伝子挿入ののちに、バイオセンサー細胞を培養し、混合された集団として生物学的応答（フラッシュシグナル）を試験した。フローサイトメーターを用いて単一細胞選別を実施した。細胞を分離し、及びその後、高レベルの所望のタンパク質を発現したものを選択する分析のために増殖させた。このプロセスのために、蛍光標識抗体を用いて、バイオセンサー細胞のさまざまなレセプターを標的にし、これにより選別プロセスを可能にした。シグナル伝達について個々のクローンを選別し、最もよいクローンを選択した。このプロセスを通して、最も好適なクローンを特定し、分離した。以下に記載されたとおり、蛍光活性化細胞選別 (FACS) 及び細胞外タンパク質の生細胞染色を実施した。

40

【0071】

操作されたバイオセンサー細胞をカウントし、穏やかに遠心分離し、洗浄緩衝液 (HBS + 2% BSA) 中で再懸濁させ、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mLの最終濃度とした。それぞれの実験では、Fc領域またはF(ab)₂を有する完全抗体を用いた。完全抗体を用いる場合、細胞を入れるそれぞれの空き12 x 15 mmチューブに1~0.5 µgのFcレセプター阻止抗体を添加した。これらのチューブのそれぞれに、Fc阻止抗体

50

の上に100 μ Lの細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞) を添加した。穏やかに細胞を混合し、15分間、4℃または室温で、インキュベートした。F(ab)₂を用いる場合、Fcを阻止する上記ステップを省略した。計1 μ gの一次抗体(選択されるレセプターに対して)を添加し、その後、氷上で(または4℃で)20~40分間、インキュベートする前に細胞を穏やかに混合した。この温度が、レセプター内部移行を阻止した。標識化を促進するために断続的に細胞を穏やかに攪拌した(渦を巻かせた)。2 mL体積の冷洗浄緩衝液を添加し、その後、4℃で細胞を遠心分離し、上澄みを廃棄した。100 μ Lの洗浄/選別緩衝液中で細胞を再懸濁させる前に洗浄ステップを繰り返した。細胞に二次FITC標識化抗体を添加し(0.5~1 μ g)、氷上で(または4℃で)20~40分間、インキュベートする前に混合した。全プロセス中、光から細胞を保護した。2 mL体積の冷洗浄緩衝液を添加し、その後、細胞遠心分離し、上澄みを廃棄した。洗浄ステップを繰り返し、0.5~1 mLの洗浄緩衝液中に細胞を再懸濁させた。選別の時間まで氷上で細胞をインキュベートした。できるだけ早く(少なくとも同じ日に)選別を行った。以下に記載されたとおり、単一細胞選別後に細胞のクローニング及び培養を実施した。

【0072】

それぞれのウェルが1つの細胞及び100~200 μ L細胞成長培地を含有する96ウェルプレートにバイオセンサー細胞を選別した。翌日から10~14日間、プレートをスキニング/モニターし、成長の速度を測定し、いつ24ウェルプレートに移すかを判断した。スキニング中、さまざまな条件のためにさまざまなマーキングを用いた。生細胞を含有する場合、いくつかのウェルに印を付けたが、移す準備をせず、また、汚染されたウェルにも印を付けた。それぞれのウェル中に1.0 mLの好適な培地を含有する24ウェルプレートに細胞を移した。汚染された細胞の場合、ウェルからの全ての細胞懸濁液を15 mLコニカルチューブ中の5 mLの無菌1xPBSに添加することによって洗浄を行った。その後、170RCFで、10分間、細胞を遠心分離し、上澄みを廃棄した。培養される24ウェルプレート中の1.0 mLの新鮮培地中にペレットを再懸濁させた。成長の継続後、ウェルごとに1.5 mLの新鮮培地を有する12ウェルプレートに細胞を移した。

【0073】

クローンスクリーニングのために、12ウェルプレート中で成長させた後に、細胞をカウントし、充填及びフラッシュ試験の準備ができているかどうかを決定した。フラッシュ試験中、単一反復法では25,000細胞を含んだ。試験に適合するように、十分な細胞を成長させ、また、いくつかの細胞は成長を継続させた。このステップが、第1のラウンドのクローンスクリーニングを示す。さらに、選択されたクローンを成長させ、所望の特性に応じて次の試験を受けさせた。生物学的応答のために、抗CD3 ϵ 抗体(陽性対照)及びそれぞれの細菌を有する細菌に対するモノクローナル抗体を用いて、例えば、ジャーカッターFc γ RI-CD3 ζ クローンを選別し、一方、化学的応答試験のためにジギトニンを用いた。抗Fc ϵ RI抗体(生物学的応答)及びジギトニン(化学的応答)を用いてMC/9-Aeqクローンを選別した。

【0074】

要約すると、この場合では操作されたレセプターである所望のタンパク質を高く発現している細胞を選択し、分離するために、蛍光抗体標識を用いて蛍光活性化細胞選別(FACS)を実施した。このプロセスの結果、さらに試験装置でPMTを用いるフラッシュ試験によって確認されたバイオセンサー細胞を高く発現している集団が得られた。全プロセス中、ヒューマンエラーを除き、一貫性及び効率を向上させるために自動血球計数器を用いて細胞をカウントした。抗E.coli O111 mAb及びE.coli O111細菌で試験した場合、ジャーカッターFc γ RI-CD3 ζ のさまざまなクローンによって、さまざまなレベルの生物学的応答が得られた。同じ方法で多くのクローンを試験し、最も高い応答物をクローンバンクに保存した。同様に、化学的ジギトニンを用いるさまざまなMC/9-Aeqクローンの試験から得られた化学的応答結果では、さまざまなクローンによってエクオリン発現のレベルに応じて、さまざまなレベルの化学的応答が得ら

10

20

30

40

50

れることを示した。最も高いシグナルのクローンをクローンバンクに保存した。

【0075】

バイオセンサー細胞の培養

最適な成長条件を確実にするためにさまざまな細胞株にさまざまな培養培地調合物を用いた。完全マスト細胞培地 (DMEM—Sigma, カタログ番号 D5796; 1×Pen/Strep; 10% FBS; 10% T-Stim Supplement; 50 μM β-メルカプトエタノール) 中で MC/9 マスト細胞を培養した。完全 RPMI 培地 (RPMI—ThermoFisher; 10% FBS; 1×Pen/Strep) 中で ジャーカット T 細胞を培養した。電気穿孔構築物の特性に応じて、細胞培養の選択のためにさまざまな抗生物質を用いた。電気穿孔の 2～3 日後、成長培地に好適な抗生物質を添加し、線状化 DNA 構築物をうまく統合した細胞を選択した。最適な細胞成長のために細胞濃度を $4.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mL に維持した。以下のとおり、長期保存のためにさまざまな細胞株及びクローンを処理し、液体窒素中にストックを凍結させた: (i) 150 RCF で 10 分間、細胞を遠心分離し、上澄みを廃棄した; (ii) 5.0×10^5 細胞/mL の濃度で凍結培地 (RPMI; 50% FBS; 10% DMSO) 中に細胞ペレットを再懸濁させた; 及び (iii) 2 mL Nunc Cryo-バイアル中に 1 mL の体積を分取し、長期保存のために液体窒素に移す前に、 -80°C で 24 時間、凍結させた。

【0076】

バイオセンサー細胞の充填

50 mL コニカルチューブ中で 150 RCF で 10 分間、本発明のバイオセンサー細胞を遠心分離した。上澄みを廃棄し、充填培地 (RPMI; 10% 抗体枯渇 FBS; 1×pen/strep; 0.1% プルロニック F68 及び 1.5 mM セレンテラジン) 中に 25,000 細胞/180 μL の濃度でペレットを再懸濁させた。さらに、また、例えば、100,000 細胞/180 μL 及び 400,000 細胞/180 μL などのさまざまな濃度で細胞を充填させた。室温で、穏やかに振とう/揺動させながら 24～26 時間、細胞を充填させた。使用前に、さらに他の抗体枯渇システムを用いて市販の抗体枯渇 FBS を精製してよい。

【0077】

細胞の濃縮

本発明のバイオセンサー細胞は、高濃度より低濃度でより効率的に充填されることを示した。例えば、400,000 細胞/180 μL に対して 25,000 細胞/180 μL の密度で細胞を充填すると、検出可能なシグナルが 2 倍増大するという結果を示した。400,000 細胞/180 μL 及び 25,000 細胞/180 μL の双方で、ジャーカット—FcγRI—CD3ζ クローン P5G7 細胞を充填させ、その後、それぞれの反応で 400,000 細胞/180 μL で試験した。23 nM の抗 E. coli O111 mAb と一晚 E. coli O111 細菌培養を用いた。低濃度で充填させたバイオセンサー細胞では、試験される同じ数の細菌細胞に対してより高いシグナルを与えた。バイオセンサー細胞密度は、最適な病原体検出が見込まれるよう充填後に細胞を濃縮することによってほとんど変化する。ディテクター分子が可溶性抗体である場合、標的病原体及び抗体の質に応じて、病原体検出にさまざまな濃度を用いた。150 RCF で 10 分間、遠心分離によってバイオセンサー細胞を濃縮し、所望の体積の試験培地中に細胞ペレットを再懸濁させる。充填培地は、また、試験培地としての役割を果たしてよい。ある特定の例では、通常の FBS の培地への添加が生物学的応答を誘発し、その結果、通常の FBS 中の高濃度の抗体のため、バイオセンサーシグナル (フラッシュ) が生じた。このため、充填プロセスで市販の抗体枯渇 FBS を用い、抗体により誘発されるシグナルをそれを完全に除去することなく減少させた。市販の抗体枯渇 FBS 中の微量の抗体をさらに枯渇させるために付加的な方法を用いた。

【0078】

バイオアッセイ

本発明の例示的な実施形態では、測定対象物質バイオアッセイが、バイオセンサー細胞及び測定対象物質（例えば、病原体）に特異的である可溶性モノクローナル抗体（mAb）でフォーマットが作られる。これらの実施形態では、バイオアッセイの特異性が、直接に可溶性抗体の標的測定対象物質への選択的結合に関係しており、バイオセンサーの特異性及び感度は、生物発光の検出及び測定によって決定される。このプロセスでは、バイオセンサー細胞を、光放出分子である、セレンテラジン（CTZ）を用いて最初に充填させる。その後、選択される可溶性抗体及び分析される試料を添加する。標的病原体が試料中に存在する場合、それは可溶性抗体と相互作用し、バイオセンサー細胞によって発現される融合タンパク質に結合し、最終的にシグナルカスケードを誘発し、その結果、バイオセンサー細胞からの光放出が生じる。放出された光は、試験装置中の光電子増倍管（PMT）によって検出され、バイオセンサー細胞によって放出されるシグナル、1秒当たりの光子カウントとして示される。以下に記載されたとおり、可溶性抗体及び標的病原体に基づいて病原体を検出するために、さまざまな方法が開発されている。以下に詳細が記載された3つの方法は、（i）ディテクター分子（例えば、抗体）の瞬時添加；（ii）ディテクター分子（例えば、抗体）でバイオセンサー細胞をコーティングすること；及び（iii）抗体で測定対象物質（例えば、細菌）をコーティングすることを含む。

10

【0079】

試験ユニット

本発明のバイオアッセイ態様は、本明細書では、ベンチトップまたはポータブル試験システム及び装置との使用のために設計された試験サブユニットまたは試験カートリッジ、例えば、参照により本明細書にその全体が組み込まれる米国特許出願第13/711,296号（米国特許第9,023,640号）に開示されているもので実施してよい。試験カートリッジは、単一使用、使い捨て商品としてよく、試料及びバイオセンサーの双方を受け入れ、バイオセンサーを試験カートリッジに導入すると、予測可能で制御された方法で試料及びバイオセンサーが混合される。試験カートリッジはさらに試験試料及びバイオセンサーを受け入れるための反応チャンバを含み、反応チャンバは、所定の内部形態を有し、さらに、全体のシグナルと雑音の比を改善する目的のためにバックグラウンドノイズを最小化または除去するように適合される。混合プロセス中に試験試料及びバイオセンサーへのせん断力損害を最小化するために反応チャンバ中に少なくとも1つのスタビライザーを配置してよい。

20

30

【0080】

例示的な実施形態では、反応チャンバ及び試験カートリッジ内で反応チャンバに至る液体チャンネルは、いくつかの目的を達成するために設計されている。反応チャンバに入る液体のためのインレットチャンネルは、管状形状を含み、チューブの直径は、比較的小さく、反応チャンバへのインレットで小さくなるように次第に小さくなる。これは、反応チャンバに入る液体の速度を増大させ、反応チャンバ内で試薬の塊運動のためより力強く均質の混合を促進する。試料中に存在する感染因子のいずれかが速やかにバイオセンサーに当たるのを確実にすることによって試験の時間を最小化するために、分子拡散以上に混合を促進する方法で試薬及び試料を混合することが好ましい。インレットチャンネルは、液体が混合物の均質性を増大させるために混合されるため、試験チャンバの中心軸を中心とした試験の時計回りまたは反時計回り回転運動を促進するように反応チャンバの中心軸から外して置いてよい。インレットチャンネルは、また、反応チャンバの内部表面にほぼ接しており、これは、入ってくる液体がインレットチャンネルから反応チャンバへ移動でき、同時に反応チャンバの側表面と接触したままであり、乱流を最小にし、気泡の混合液体への導入を最小にするためである。泡は、試薬によって放出される光が混合される試薬内でまたは混合される試薬の表面上で泡を通して移動する際に光の予測できない屈折が起こるので好ましくない。インレットチャンネルの軸は、試薬が反応チャンバの底に残っている液体と混合されるのを確実にするために、入ってくる液体流れへ部分的に下方向となるように水平より角度を付けてよい（例えば、約30度）。あるいは、試験チャンバに流れる試薬のカラムを作り、これによって引き込みによる混合を促進するために、試薬を反応チャンバの

40

50

底に送達するための垂直チャネルなどの別の液体送達手段を用いて、または試験チャンバの中心軸に直接に液体を送達して、試験チャンバに試薬を導入してよい。

【0081】

反応チャンバの形状（すなわち、所定の形態）は、反応チャンバの中心軸を中心とした混合液体の時計回りまたは反時計回り運動を促進する回転断面としてよい。あるいは、必要であれば、長方形または不規則形状などの回転断面以外の反応チャンバ形状を用いてよい。1つの実施形態では、反応チャンバを形成するために用いられる回転断面が、試薬によって放出される迷光の収集を促進し、この光をディテクターの表面に反射するために楕円の一部分であり、光電子増倍管（PMT）（Hamamatsu）としてよい。反応チャンバの表面は、楕円形状の光収集特性を向上させるために、反射性としてよい。いくつかの実施形態では、PMTの表面の最大直径が、システムのアウトプットのシグナルと雑音の比の最大を達成するために制限される。反応チャンバの直径は、PMTの直径とほぼ一致するように設計してよく、液体の特定の体積を保持するように設計される反応チャンバ中で実現することができる楕円形状に影響を与える。楕円形状の抑制のため、反応チャンバ表面色は、部分的に拡散白色としてよく、これはさもなければPMT表面に直接に反射されない光が白色表面によって部分的に拡散される場合に生じる付加的な光収集のためであり、この一部はPMT表面に向けられる。あるいは、必要であれば、ほぼ鏡仕上げのアルミニウム、または透明物質などの他の表面仕上げ及び物質を用いることができる。さらに、反応チャンバ物質の蛍光性が最小であることが好ましく、これは反応チャンバそれ自体から放出される光が試薬からの放出された光を覆い隠し、検出が妨げられるのを阻止するためである。アクリロニトリルブタジエンスチレンなどの白色高分子物質または他のかかる高分子物質が低レベルの蛍光を示すことがわかっているが、光反射及び拡散の組み合わせによってもたらされる付加的な光収集が、光感知回路アウトプットのシグナルと雑音の比への利益があることがわかっている。

【0082】

例示的な実施形態では、試験サブユニットが試料分析での使用のためのシステムを提供する。当該システムは、以下を含む：バイオセンサー試薬であって、生きている生物学的細胞を含む、バイオセンサー試薬；長ループ部分及び短ループ部分を有するリザーバーカードであって、バイオセンサー試薬を保存するリザーバーカード；及び試験カートリッジベースであって、リザーバーカードを受け入れるように構成される、試験カートリッジベース。試験カートリッジベースは、さらに以下を含む：（i）中心軸を有する反応チャンバであって、回転半楕円の形状を有する、反応チャンバ；及び（ii）反応チャンバに結合されたインレットチャネルであって、水平より15〜60度の角度で反応チャンバ上に位置し、反応チャンバの中心軸から外して置かれ、分析される試料をインレットチャネルを通して試験カートリッジベースに導入すると、試料がバイオセンサー試薬と均質に混合され、同時に生きている生物学的細胞の損傷が最小化される、インレットチャネル。

【0083】

別の例示的な実施形態では、試験サブユニットが、生物学的試料中の測定対象物質の存在を急速に検出するためのシステムを提供する。本システムは、以下を含む：所定の測定対象物質及び生物発光薬剤に特異的な少なくとも1つの抗体を含むバイオセンサー試薬であって、少なくとも1つの抗体は生きている操作されたリンパ球の表面に発現され、生物発光薬剤は生きている操作されたリンパ球によって発現され、以下のために機能する、バイオセンサー試薬：（i）試験される試料中の特定の測定対象物質の存在を検出する、及び（ii）バイオセンサー試薬が試料と反応し、試料中の特定の測定対象物質の存在を検出する場合、検出可能な光シグナルを放出する。また、試験カートリッジが含まれる。試験カートリッジは、さらに以下を含む：（i）リザーバーカードであって、さらにバイオセンサー試薬を含む、リザーバーカード；及び（ii）試験カートリッジベースであって、リザーバーカードを受け入れるように構成される、試験カートリッジベース。試験カートリッジベースはさらに以下を含む：a）中心軸を有する反応チャンバであって、回転半楕円の形状を有する、反応チャンバ；b）反応チャンバに接続されたインレットチャネル

であって、水平より15～60度の角度で反応チャンバ上に位置し、反応チャンバの中心軸から外して置かれる、インレットチャンネル；及びc) 試料をインレットチャンネルを通して試験カートリッジベースに導入すると、試料がバイオセンサー試薬と均質に混合され、同時に生きている操作されたリンパ球の損傷が最小化され、反応チャンバ中の混合バイオセンサー試薬及び試料の泡が最小化されること。また、試験カートリッジを受け入れるように適合される試験ユニットが含まれる。試験ユニットは、試料と反応するとバイオセンサー試薬によって放出される検出可能な光シグナルを検出するためのセンサーを含み、放出される検出可能な光シグナルの検出は、試料中の測定対象物質の存在を示し、試料中の特定の測定対象物質の検出がリアルタイムで生じる。

【0084】

実施例バイオアッセイ1：抗体の瞬時添加

本発明のバイオアッセイの例示的な実施形態では、ディテクター分子が、可溶性抗体であり、可溶性抗体及び試験される試料がバイオセンサー細胞の試験試料への導入直前に一緒に混合される。この実施形態では、充填されたバイオセンサー細胞が遠心分離され、充填培地中の約400,000細胞/180μL（単一反応に好適である）に濃縮される。180μL（約400,000細胞）アリコートの充填されたバイオセンサー細胞が、その後、リザーバーカードの長ループ部分に入れられる。陽性対照のために、RPMI培地中の30μLの抗CD3ε抗体が、リザーバーカードの短ループ部分に入れられる。リザーバーカードは、その後、試験カートリッジベースに固定される。抗E.coli O111（標的病原体が、E.coli O111である）などの2μL体積の標的病原体に対する抗体（0.5mg/mLで）が、カートリッジ混合チャンバ中で28μLの試験される試料と混合される。試験カートリッジベースを試験装置に挿入し、充填されたバイオセンサー細胞を反応チャンバに注入し、反応が開始される。結果として生じるシグナルは、試験期間の終わりに4～8分間記録され、30μLの抗CD3ε抗体が、リザーバーの短ループから反応チャンバに注入され、陽性対照反応として2分間、記録される。別の陽性対照として、抗CD3ε抗体ではなく、30μLの0.61mMジギトニンを用いることができる。用いられる抗体に特異的でない所定の病原体を用いて陰性対照試験を実施することができる。

【0085】

実施例バイオアッセイ2：抗体によるバイオセンサー細胞のコートニング

本発明のバイオアッセイの別の例示的な実施形態では、ディテクター分子が可溶性抗体であり、バイオセンサー細胞が、バイオセンサー細胞と試験される試料を混合する前の期間に可溶性抗体でコートニングされる。この実施形態では、充填されたバイオセンサー細胞が遠心分離され、充填培地中の約400,000細胞/180μL（1つの反応に好適な）に濃縮される。180μL（約400,000細胞）アリコートのバイオセンサー細胞が、その後、エッペンドルフ型チューブ中で、抗E.coli O111（標的病原体が、E.coli O111である）などの2μL体積の標的病原体に対する抗体（0.5mg/mLで）と混合される。抗体と混合されるバイオセンサー細胞は、室温で10分間、インキュベートし、その後、リザーバーカードの長ループ部分に入れられる。陽性対照のために、RPMI培地中の30μLの抗CD3ε抗体が、リザーバーカードの短ループ部分に入れられる。リザーバーカードは、その後、試験カートリッジベースに固定される。30μL体積の試験される試料が、反応チャンバに添加される。試験カートリッジベースを試験装置に挿入し、バイオセンサー細胞を混合チャンバに注入し、反応が開始される。結果として生じるシグナルは、試験期間の終わりに4～8分間記録され、30μLの抗CD3ε抗体が、リザーバーの短ループから反応チャンバに注入され、陽性対照反応として2分間記録される。別の陽性対照として、抗CD3ε抗体ではなく、30μLの0.61mMジギトニンを用いることができる。用いられる抗体に特異的でない所定の病原体を用いて陰性対照試験を実施することができる。

【0086】

実施例バイオアッセイ3：抗体による測定対象物質のコートニング

本発明のバイオアッセイの別の例示的な実施形態では、ディテクター分子が可溶性抗体であり、測定対象物質（例えば、病原細菌）が、バイオセンサーと試験される試料を混合する前の期間に可溶性抗体でコーティングされる。この実施形態では、充填されたバイオセンサー細胞が遠心分離され、充填培地中の約400,000細胞/180 μ L（1つの反応に好適な）に濃縮される。180 μ L（約400,000細胞）アリコートのバイオセンサー細胞が、リザーバーカードの長ループ部分に入れられる。陽性対照のために、RPMI培地中の30 μ Lの抗CD3 ϵ 抗体が、リザーバーカードの短ループ部分に入れられる。リザーバーカードは、その後、カートリッジベースに固定される。抗E. coli O111（標的病原体が、E. coli O111である）などの2 μ L体積の標的病原体に対する抗体（0.5mg/mLで）が、エッペンドルフ型チューブ中で28 μ Lの試験される試料と混合される。試料は、室温で10分間、インキュベートし、その後、カートリッジ混合チャンバに添加する。カートリッジをPMTに挿入し、バイオセンサー細胞を混合チャンバに注入し、反応が開始される。結果として生じるシグナルは、試験期間の終わりに4～8分間記録され、30 μ Lの抗CD3 ϵ 抗体が、リザーバーの短ループから反応チャンバに注入され、陽性対照反応として2分間記録される。別の陽性対照として、抗CD3 ϵ 抗体ではなく、30 μ Lの0.61mMジギトニンを用いることができる。用いられる抗体に特異的でない所定の病原体を用いて陰性対照試験を実施することができる。

10

【0087】

本明細書に記載された例示的なバイオアッセイは、バックグラウンドノイズを減少させ、及びシグナルを増大する他の添加剤を含んでよい。陽性対照として抗CD3 ϵ 抗体を用いると、本システムは、50,000非充填バイオセンサー細胞の混合物中で、10より少ない充填されたバイオセンサー細胞を検出することを示す。バイオセンサーそれ自体は、30 μ Lの試料中で230CFUの細菌を検出することが示されている。上記に記載されたバイオアッセイでは、陰性対照として用いられるE. coli O157で、E. coli O111細菌を検出するためにE. coli O111細菌に対する専売モノクローナル抗体（1F11）を用いた。E. coli O157は、陰性結果を与えたことを示し、これにより本システムの特異性が証明された。また、記載されたバイオアッセイで多くの市販の抗体を用いてよい。専売モノクローナル抗体（1F11）に関して、モノクローナル抗体の抗体分析及び選択は、以下に記載されたとおり、実施した。

20

【0088】

抗体生成物は、96-ウェルマルチウェルプレート中で実施されるELISAによって決定された。さまざまなLPS（E. coli O157、E. coli O127、E. coli O111、E. coli O26、Klebsiella pneumoniae、Salmonella enterioa及びナイーブ血清）または細菌細胞（E. coli O157、E. coli O111、E. coli 26及びE. coli DH5 α ）でそれぞれのウェルをコーティングした。mAb O157またはmAb O111のさまざまなクローンからのハイブリドーマ上澄みをウェルに添加した。検出のために西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート（HRP）ヤギ抗マウスIgGを用いた（付録II I. A. 3）。E. coli O157の2つのハイブリドーマクローン（1B10及び6G1）は、E. coli O157及びE. coli O157のLPSを排他的に認識する。E. coli O111の9つのハイブリドーマクローンは、E. coli O111及びE. coli O111のLPSを特異的に認識する。検証のために最も高い光学密度（OD）測定値のクローンを選択し、以下に記載されたとおり、実施した。

30

40

【0089】

RNA抽出前にハイブリドーマ細胞ペレットを収集し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。cDNAへの逆転写のテンプレートとして抽出されたRNAを用い、続いてネステッドPCR増幅を行った。全陽性PCR生成物をTAクローニングベクターにクローン化し、シーケンシングに送った。配列の分析後に光鎖及び重鎖の可変領域を決定した。O157（1B10）の4つの単鎖抗体（scFv）（FSCによって生成されるカスタマイズされたmAb）及びATCC HB 10452、ならびにFSC（1F11及び1F2）によ

50

て生成されるO111の2つの単鎖抗体を組み換えで発現させ、固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー（IMAC）によって精製した。以下の順のとおり、scFvの配列を構成した：p e l B分泌シグナル＋アミノ酸アラニン＋ヒスチジンタグ＋アミノ酸グリシン－セリン－セリン－グリシン＋TEV開裂部位＋アミノ酸グリシン－セリン－セリン－グリシン＋重鎖可変領域＋リンカー領域セリン－アラニン－アスパラギン酸－アスパラギン酸－アラニン－リシン－リシン－アスパラギン酸－アラニン－アラニン－リシン－リシン－アスパラギン酸－アスパラギン酸－アラニン－リシン－リシン－アスパラギン酸－アスパラギン酸＋光鎖可変領域。O157またはO111のLPSでコーティングされたマルチウェルプレートを用いて精製されたscFvsを試験した。

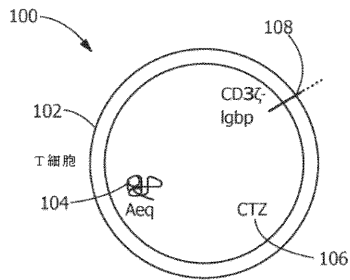
【0090】

この試験の目的は、モノクローナル抗体（mAb）の全細菌性細胞（E. coli O157またはE. coli O111）への相互作用を調査し、抗体－細菌性相互作用の反応動力学定数（KD）を推定することであった。これらのアッセイでは、ヤギ抗E. coli O157ポリクローナル抗体、ヤギ抗E. coli O111ポリクローナル抗体、E. coli O157に対する3つのモノクローナル抗体（1022、1024及び1061）、及びE. coli O111に対する1つのモノクローナル抗体を用いた。また、CM5センサーチップ及びアミンカップリングキットを用いた。Biacore X100装置で全アッセイを実施した。このプロトコルでは、1つのポリクローナル抗体（選択細菌に対する）をCM5センサーチップ上に固定化した。その後、選択細菌を結合させ、続いて、連続緩衝液フロー中の同じ細菌に対するモノクローナル抗体を注入した。リアルタイムで相互作用をモニターした。共鳴ユニット（RU）で抗体のそれぞれの細菌への相対的結合を記録した。E. coli O157に特異的な抗体（mAb FF754）をE. coli O157及びE. coli O111に結合させるBIAcore分析の結果は、O157 mAbがその標的抗原に特異的であることを示した。

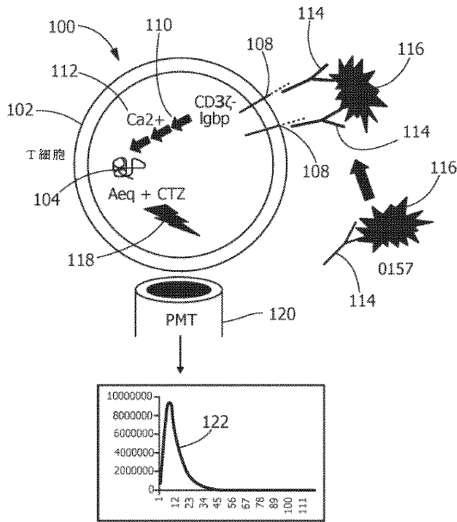
【0091】

本発明は、その例示的な実施形態の説明によって示され、実施形態は、ある特定の詳細に記載されているが、添付のクレームの範囲をかかると詳細に制限する、またはいずれの方法でも限定する意図はない。付加的な利点及び変更は、当業者に容易にわかる。このため、そのより広い態様での本発明は、示され、記載された特定の詳細、代表的な装置及び方法、及び／または例示的な実施例のいずれにも限定されない。したがって、この一般的発明概念の趣旨または範囲から逸脱することなく、かかる詳細から離れてよい。

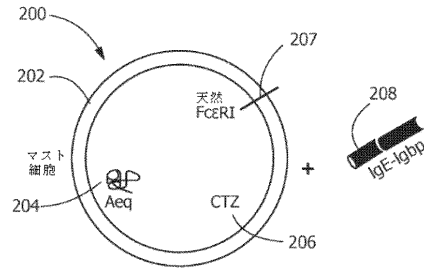
【図 1 a】



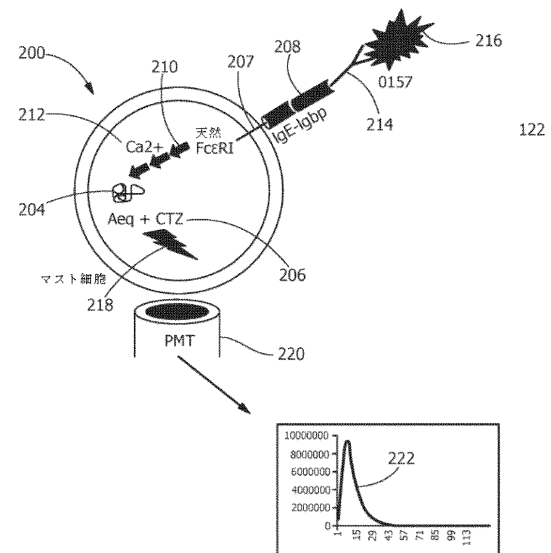
【図 1 b】



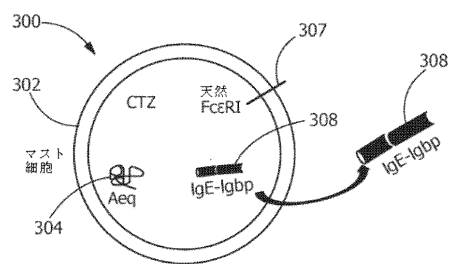
【図 2 a】



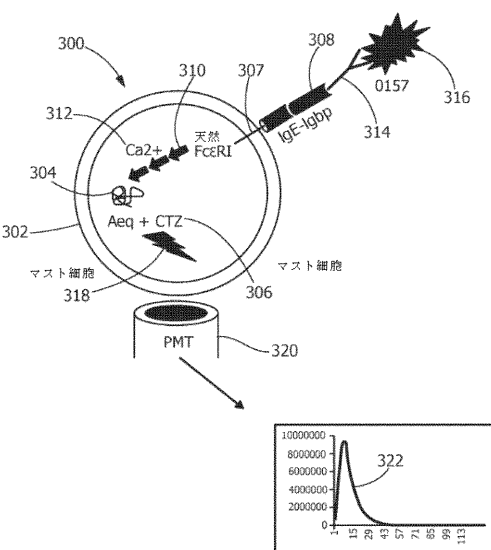
【図 2 b】



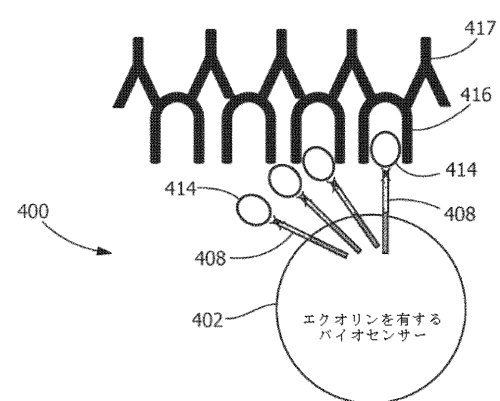
【図 3 a】



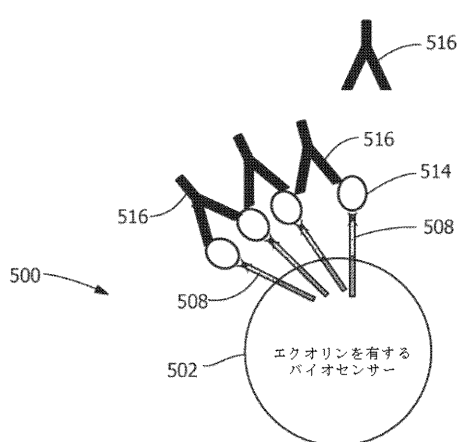
【図 3 b】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006828005000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/435 (2006.01) C 0 7 K 14/435
C 0 7 K 14/735 (2006.01) C 0 7 K 14/735
C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12
- (74)代理人 100098268
 弁理士 永田 豊
- (72)発明者 ズバンシック・トーマス・ジェイ
 アメリカ合衆国、4 3 0 6 5 オハイオ州、パウエル、アンドーバー・ドライブ 3 5 0
- (72)発明者 チェン・リンチュン
 アメリカ合衆国、4 3 2 2 1 オハイオ州、アッパー・アーリントン、モントカーム・ロード 2 7 2 0
- (72)発明者 ベダムーアーシー・スリカンス
 アメリカ合衆国、4 3 0 5 4 オハイオ州、ニュー・オールバニー、サブウッド・ドライブ 4 8 0 4
- (72)発明者 ルワンデ・ジョエル・エス
 アメリカ合衆国、4 5 7 0 1 オハイオ州、アセンズ、アルタモント・ドライブ 3 0 2
- (72)発明者 キトル・ジョセフ・ディ
 アメリカ合衆国、4 5 7 8 0 オハイオ州、ザ・プレインズ、チャニングウェイ・ブルバード 1 1 6 6 7
- (72)発明者 モー・ミン
 アメリカ合衆国、4 3 0 1 7 オハイオ州、ダブリン、モハビ・ストリート 7 2 1 3

審査官 小田 浩代

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 4 / 0 2 7 3 0 2 0 (US, A 1)
 国際公開第2 0 1 4 / 1 6 0 2 3 5 (WO, A 1)
 特表2 0 1 5 - 5 0 5 0 4 7 (JP, A)
 特開2 0 1 2 - 1 6 8 1 9 9 (JP, A)
 RIDER, T. H. et al., A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens, Science, 2 0 0 3 年, Vol. 301, pp. 213-215
 CHOQUET, D. et al., Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor, J. Biol. Chem., 1 9 9 4 年, Vol. 269, pp. 6491-6497
 CURTIS, T. et al., Development of a mast cell-based biosensor, Biosens. Bioelectron., 2 0 0 8 年, Vol. 23, pp. 1024-1031
 PIEPER, K. et al., B-cell biology and development, J. Allergy Clin. Immunol., 2 0 1 3 年, Vol. 131, pp. 959-971
 中村晃ほか, 免疫グロブリン様受容体(IgLR)分子群による免疫制御, 日小血会誌, 2 0 0 4 年, Vol. 18, pp. 59-68
 上田宏ほか, 新しい免疫センサーのためのIgL-上皮増殖因子受容体融合タンパク質の試作とそのミエローマ細胞における膜発現, 化学工学論文集, 1 9 8 7 年, Vol. 17, pp. 547-552

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 1 0 - 1 5 / 9 0
 UniProt/GeneSeq

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d