

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4377058号
(P4377058)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009. 12. 2)

(24) 登録日 平成21年9月18日(2009. 9. 18)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 9 5

GO 1 N 33/542 (2006. 01)

GO 1 N 33/542 Z

請求項の数 6 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2000-553806 (P2000-553806)
 (86) (22) 出願日 平成11年5月12日(1999. 5. 12)
 (65) 公表番号 特表2002-517756 (P2002-517756A)
 (43) 公表日 平成14年6月18日(2002. 6. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/010413
 (87) 国際公開番号 W01999/064862
 (87) 国際公開日 平成11年12月16日(1999. 12. 16)
 審査請求日 平成18年4月17日(2006. 4. 17)
 (31) 優先権主張番号 09/095, 196
 (32) 優先日 平成10年6月10日(1998. 6. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594066109
 ケント ステート ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 オハイオ州 44242
 ー0001 ケント リサーチ・アンド・
 グラデュエイト・スタディーズ ピー. オ
 ー. ボックス 5190 イースト・メイ
 ン・アンド・リンカーン・ストリート
 (74) 代理人 100064012
 弁理士 浜田 治雄
 (72) 発明者 ウールバートン クリストファー ジェー
 アメリカ合衆国 オハイオ 44240
 ケント ノース・ウィロウ・ストリート
 624

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドの検出及び増幅

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リガンドを検出するための装置において、

リガンドと結合することによりリセプター - リガンド複合体を形成することができる少
 なくとも一つのリセプターであって、該リセプター - リガンド複合体が信号を生成するリ
 セプターと；

増幅機構であって、該リセプターに連結したリオトロピック液晶物質であり且つ該リセ
 プター - リガンド複合体が形成する際に該信号を増幅する増幅機構と； から構成されるこ
 とを特徴とするリガンド検出装置。

【請求項 2】

前記リセプターが、モノクロナール、ポリクロナール及び分子組換抗体でなる群から選
 択される抗体であり、且つリガンドが病原性因子であることを特徴とする請求項 1 記載の
 装置。

【請求項 3】

前記増幅された信号が液晶物質の光学的特性の変化によって発生されることを特徴とす
 る請求項 1 記載の装置。

【請求項 4】

リガンドの存在を検出及び監視するための装置において、

各々予め決められたリセプターを内部に有する多数のウェルであって、該リセプターは
 リガンドと結合することによりリセプター - リガンド複合体を形成することができ且つ該

リセプター - リガンド複合体の形成により信号を生成する、多数のウェルと；及び

増幅機構であって、該予め決められたリセプターに連結したリオトロピック液晶物質であり且つ該リセプター - リガンド複合体が形成する際に該信号を増幅する増幅機構と；から構成されることを特徴とするリガンドの存在を検出及び監視するための装置。

【請求項 5】

前記増幅された信号が認知可能な信号に変換されることを特徴とする請求項 4 記載の装置。

【請求項 6】

リガンドを検出する方法において、

リガンドと結合することによりリセプター - リガンド複合体を形成することができる少なくとも一つのリセプターであって、該リセプター - リガンド複合体の形成により信号を生成するリセプターと；増幅機構であって、該リセプターに連結したリオトロピック液晶物質であり且つ該リセプター - リガンド複合体が形成する際に該信号を増幅する増幅機構と；から構成される装置を提供し、

該リセプターに特異的なリガンドを含有する試料を暴露し、

該リセプターと該リガンドとの複合体を形成させ、および

該リセプター - リガンド複合体の形成により発生した該信号を測定する工程から構成されることを特徴とするリガンドを検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、一般的にはリセプターによるリガンドの検出に係る。さらに詳述すれば、本発明は、極めて特異的なリセプター、及びリガンド、特に病原体及び／又はそれらの毒素の迅速かつ自動的な検出のための増幅機構への該リセプターの応用に係る。

【0002】

リセプターによるリガンドの検出（例えば、微生物又は毒素の如き病原性因子の抗体による検出；又は血液中の抗体の他の抗体による検出；又は神経ガスの如き化学毒素のそのリセプターへの結合）は、病気原因因子にさらされた個人の診断及び治療において重要である。病原性因子の早期検出は、症状が現れる又は悪化する前の病気の予防又は治療にとって大いに有益であろう。

【0003】

微生物のいずれの種、菌株又は毒素もユニークな表面リガンドを含有する。分子組換え及び／又は免疫学的技術を使用することにより、前記リガンドと高度の特異性をもってを結合するであろう抗体の如きリセプター分子が単離される。抗体の如きリセプターを、結合の際に活性化される信号機構とリンクさせる方法も提案されている。しかしながら、これまでのところ、ただ 1 つの又は少数のリガンドの結合から発生されるリセプター信号を迅速かつ自動的に検出及び増幅できるシステムは開発されていない。このようなシステムは、リガンドの迅速かつ正確な早期検出には避けられないものである。

【0004】

最もよく利用される診断テストは抗体に基づくものであり、病気原因因子又は該因子に応答して患者によって生産された生物学的生成物を検出するために使用されている。現在、リガンド（抗原）認識用の抗体の製造については 3 つの汎用されている方法がある：多数のエピトープに関する認識性を持つ動物全体におけるポリクロナール抗体の製造、ただ 1 つのエピトープ（スクリーニング後）に関する認識性をもつ形質転換された細胞系におけるモノクロナール抗体の製造、及びただ 1 つのエピトープ（スクリーニング後）の認識性をもつ細菌における分子組換えファージ表示抗体の製造である。これらの各リセプターシステムはリガンドを結合及び同定できるが、それぞれの感度はインターフェースされる特殊なイムノアッセイ検出システムに制限される。

【0005】

固相酵素免疫測定法（ELISA）、酵素免疫測定法（EIA）、及び放射免疫測定法（RIA）の如きイムノアッセイは抗原の検出に関してよく知られている。これら測定法の多くにおけ

10

20

30

40

50

る基本的な原理は、酵素 - 、クロモーゲン - 、フルオロゲン - 、又はラジオヌクレオチド - 結合抗体が抗体の結合時に抗原の検出を許容することにある。この相互作用が色、蛍光又は放射活性の変化として検出されるようにするため、重大な数の抗体が多数の抗原エピトープに対応して結合されなければならない。

【 0 0 0 6 】

このように、特に非常に少量で存在する際にも、迅速、信頼性よく、しかも自動的にリガンドを検出し、その結果、測定可能な信号を提供するシステムが求められている。

【 0 0 0 7 】

従って、本発明の目的は、高い感度及び高い特異性をもってリガンドを検出できるシステムを提供することにある。

【 0 0 0 8 】

本発明の他の目的は、リガンドのリセプターへの結合によって発生された信号を増幅できるシステムを提供することにある。

【 0 0 0 9 】

本発明の他の目的は、ケージ化酵素増幅機構を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

本発明のさらに他の目的は、結合されたリセプターによって脱活性化された酵素を活性化するシステムを提供することにある。

【 0 0 1 1 】

本発明のさらに他の目的は、リガンドのリセプターへの結合の際に液晶アレイを歪曲させるシステムを提供することにある。

【 0 0 1 2 】

本発明の更なる目的は、環境又は身体を連続して監視し、リガンドが存在する際にその所有者を表示する検出装置を提供することにある。

【 0 0 1 3 】

一般に、本発明は、少なくとも1つのリセプター及び該リセプターと組み合わされた増幅機構（リセプターがリガンドに結合した結果として増幅された信号が発生される）からなる病原性因子の如きリガンドの検出及び増幅システムを提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明では、リガンド - 特異リセプターを増幅機構とインターフェースさせて、リセプター - リガンドの相互作用がリセプターの配座を変化させ、信号を発生する。好ましくは、増幅は、測光法で検出される色、蛍光又は複屈折のシフトを介して生ずる。ついで、検出された信号を電子的に増幅してシステムを自動化する。

【 0 0 1 5 】

リガンド検出要素

リガンドのリセプターへの結合が検出可能なリセプターのディストーションを生ずるものであれば、抗体又はリガンド用の生物学的 / 生物学的組換えリセプターの如きいかなるリセプターも装置に組み込むことができる。例えば、各種のモノ特異性抗体（ポリクロナール、モノクロナール、又はファージ - 表示）がリセプターとして有効に機能でき、このようなタイプの抗体の各々について以下に記載する。ファージ - 表示抗体は新しいリガンドの同定のために迅速に変性されるものであり、この特許出願においてリセプターの例として使用されているが、各種の物理的に歪曲可能なリセプター - リガンドの相互作用が検出要素として適している。

【 0 0 1 6 】

ポリクロナール抗体：数10年の間、抗体に基づく抗原検出法が開発されてきた。製したリガンドの宿主動物への注射は、抗原上の各種の反応部位に対する一連の抗体を生成する免疫システムを模倣するものである。いくつかのリンパ球は異なる抗原エピトープにตอบสนองするため、多特異抗体カクテル（ポリクロナール）が創造され、抗原検出のために精製される。

【 0 0 1 7 】

モノクロナール抗体：ただ1つの限定された特異性をもつほぼ無限の量の抗体を提供するハイブリドーマを創造するために抗体 - 生産脾臓細胞 (Bリンパ球) を不死化ミエロマ細胞と融合させる。これらの「モノクロナール」抗体の菌株間及び種間ハイブリッドが遺伝子組換え技術を介して生成される。これらの高度に特異的な抗体は、U.S. Food and Drug Administrationの選ばれた病気の治療に関するマウス - ヒトキメラ抗体の使用許可によって実証されているように、重要な治療能力を有する。

【0018】

ファージ - 表示モノ - 特異性抗体：各種の病原性因子に対するシングル鎖キメラ抗体を単離するためにファージ - 表示技術を使用する。Bリンパ球のゲノムDNAは、実質的にすべてのリガンド (抗原) に対して抗体を生産するコードを含有する。ファージ表示抗体システム (PDA) において、抗体の長鎖をコード付けるDNAと抗体の短鎖をコード付けるDNAとを結合させ、その間にリンカーをコード付けるDNAを挿入することによって、自生抗体の超可変のリガンド - 結合領域のシングル鎖キメラをコード付けるDNAが合成される。リンカー領域の所望のアミノ酸配列は、一定の増幅機構について要求される特性に左右される。リンカー領域はタンパク質又は他の物質と相互作用及び/又は結合できなければならないであろう。したがって、ポリペプチド配列は、例えば、特殊な配座、イオン又は水素結合を誘発するように特異的に配置された官能基、又は増幅機構と適合する疎水性を有していなければならないであろう。しかしながら、増幅機構の種類にかかわらず、リンカー領域は、増幅機構をリセプターにインターフェイスすることにおいて重要な役割を果たす。

【0019】

シングル鎖キメラ抗体をコード付ける、好ましくはヒト又はマウスのDNAを、ここに参考として引用する公知の技術 (Marks ら, J. Mol. Biol. Vol. 222:581 (1991); Griffiths ら, EMBO J. 12:725 (1993); 及び Winters ら, Ann. Rev. Immunol. 12:433 (1994)) を使用することによって、バクテリオファージ (ファージ) ベクターにクローン化される。ついで、シングル鎖キメラ抗体は、外方に向かって延びる超可変の抗原 - 結合部位をもつフィラメント状ファージの表面で表示されるようになる。

【0020】

リガンドの添加後、ここに参考として引用する公知の技術 (Marks ら, J. Mol. Biol. Vol. 222:581 (1991); Griffiths ら, EMBO J. 12:725 (1993); 及び Winters ら, Ann. Rev. Immunol. 12:433 (1994)) を使用することによって、非標的リガンドに対して反応性のファージがファージライブラリーから排除される。残りのファージを、それらの特異リガンド及び選ばれた特異リガンドと反応性であるファージと反応させる。ついで、これらのファージの各々を単離し、所望の表面 - 表示抗体を含有する多量のファージを生成するために大腸菌 (*E. coli*) の如き細菌宿主において発現させる。DNAの合成及びクローン化、ファージの排除、ファージの単離及び発現及びウイルスDNAの回収に関する各方法は公知であり、Marks ら, J. Mol. Biol. (1991); Griffiths ら, EMBO J. 12:725 (1993); 及び Winters ら, Ann. Rev. Immunol. 12:433 (1994) (これらのすべてを参考として引用する) によって十分に記載されている。

【0021】

増幅要素

リガンド - リセプター複合体形成の検出を可能にする各種の機構は増幅器として機能し、装置に組み合わされる。3つの増幅機構が提案される。第1に、液晶は、リガンドがリセプターに結合する際に生ずるディストーションを増幅する。第2に、酵素が生物学的ケージ内に置かれ、リセプターが該生物学的ケージに付着されて酵素 - 基質相互作用を阻止する。リガンドのリセプターへの付着は、基質チャンネルを開き、その結果、酵素 - 基質の相互作用が生じ、これによって、検出可能なレベルの反応生成物を生成できる。第3に、ファージ - 表示抗体の如きリセプターのリンカー領域を、酵素の活性部位を結合及び阻害するように組換える。リセプター - リガンド複合体の形成時にリセプター - 酵素複合体の分離が生じ、その結果、酵素の活性化及び生成物の生成が生ずる。

【0022】

液晶：液晶は、分子がいくつかの配向秩序、ただし小さい位置秩序を示す物質の状態である。この中間的オーダーリングは液晶を固体（位置及び配向秩序の両方を有する）と等方性流体（長距離秩序を示さない）との間に位置させる。固体結晶又は等方性流体は、温度を変化させる（サーモトロピック液晶を創製する）ことによって、又は適切な希釈溶媒を使用して固体結晶の濃度を変化させる（リオトロピック液晶を生成する）ことによって液晶へ遷移される。リオトロピック液晶は本発明の増幅システムに使用される。

【0023】

図1に見られるように、最良のリオトロピック液晶（符号1で示される）は、バイフィリック分子3、例えば、極性（親水性）脂肪族部分4及び非極性（疎水性）脂肪族部分5を有する分子用の溶媒として水2を使用して形成される。水2がカチオン界面活性剤、塩化エチルピリジウム（ $C_{21}H_{38}ClN$ ）の如きバイフィリック分子3に添加される際、疎水性領域が合体して水2との相互作用を最少にすると共に、極性成分の水との相互作用を増大させるため二分子層6が形成する。特異分子の濃度及び幾何学的形状は液晶の分子上の結晶秩序を限定する。分子は凝集して、ネマチック又はコレステリック相を形成するディスク様又はロッド様のミセルと共に、ラメラを形成できる。 $C_{21}H_{38}ClN$ は、水及びバイフィリック分子の交互層のラメラを形成する。配向秩序は水及びバイフィリック分子の交互層によって創製され、このようにして、液晶は、液晶の平面に対して直角に配置された光源によって与えられる偏光7に対して不透明である（光学異方性を示す）。

【0024】

最良の生物学的リセプターは、親水性領域及び疎水性領域の両方を有し、このようにして、バイフィリックリオトロピック液晶に容易に組み込まれる。さらに、不活性化されたリセプターは液晶の光学異方性を破壊せず、したがって、リセプター-富有化液晶は偏光に対して不透明ままである（図1B）。しかしながら、光学異方性は、リセプターの配座がリセプター-リガンド複合体の形成の間にシフトする際には崩壊される（図1C）。液晶の弾性はリセプター-リガンド複合体の付近における局所的なディストーションを増大させ、これを光学的に検出可能なミクロンより上のスケールまで拡大させる。生物学的物質はサーモトロピック液晶の表面上で検出される（V.K. Guptaら, Science 279: 277-2080, 1998）。しかしながら、リオトロピック液晶はリガンド-特異リセプターを容易に組み込み、したがって、生物学的分子の検出には明らかに優れている。

【0025】

リガンド検出システムの配置

例えば、本発明の考えられる1つの適用は、マルチウエルシステムにおけるものである。システムの各ウエルは、本発明の増幅機構とインターフェイスされた病原性微生物の如き特異リガンドに対するPDAを収容する。微生物因子が抗体と相互作用する際、生ずる抗体ディストーションが増幅機構のトリガーとなる。好ましくは、ついで増幅された信号が認知可能な信号に変換される。したがって、このようなシステムは医師のオフィスに配置され、日常の診断操作に使用されることが想像される。別法として、このようなシステムを戦場の兵士又はその近くに配置することができ、兵士に対して毒薬の存在を警戒させるために本発明を使用できる。さらに、後述するルシフェラーゼ又はケージ化酵素の如き他の具体例についても使用できるが、マルチウエルシステムは、好ましくは、ここに記載の液晶の例と組み合わせて使用される。

【0026】

このように、図1B及び図1C概略して示す本発明の1具体例では、増幅機構としてリオトロピック液晶物質が使用される。図1Bに示されるように、装置は、光源10、第1偏光子（図の平面内に偏光方向をもつ）12、病原体検出システム（バイフィリックリオトロピック液晶物質14c内に埋め込まれたモノ特異性抗体14bでなる）14a、第2偏光子（図の平面に対して直角の偏光方向をもつ）16、及び光検出器18でなる。

【0027】

操作に当たって、第1偏光子12は図の平面内で直線的に偏光された光ビーム22を発生する。不活性化された装置の光学軸20は病原体検出システム14aに対して直角であり

10

20

30

40

50

、このようにして、直線的に偏光された光ビーム 2 2 の複屈折は生じない。第 2 偏光子 1 6 の偏光方向が直線的に偏光された光 2 2 に対して直角であるため、第 2 偏光子は光が光検出器 1 8 に到達することを妨げる。

【 0 0 2 8 】

微生物の如きリガンド 2 4 の抗体の如きリセプターへの結合は液晶 1 4 c を歪曲させ、複屈折を誘発し、このようにして、検出可能な光を発生させる。この活性化法を図 1 C に示す。リセプター（抗体）1 4 b がバイフィリクリオトロピック液晶 1 4 内に埋め込まれている。抗原 - 抗体複合体の形成によって生じた特殊なディストーションは接触する液晶 1 4 c に伝達される。液晶の弾性特性は、ディストーションがリセプター - リガンド複合体のサイズよりもかなり広い領域にわたって伝達されることを可能にする。これは、リセプター - リガンド複合体によって生じたディストーションを検出するために複屈折の標準的な光学的現象を利用することを許容する。変成された液晶秩序は光学軸 2 0 を傾け、複屈折を誘発する。換言すれば、入射偏光光 2 2 は 2 つの屈折した光の波動、すなわち、相互に直角の偏光をもつ通常の波動及び異常な波動を生ずる（ここで参考として引用する Max Born 及び E. Wolf., Principals of Optics, 6 版, Pergamon Press, Oxford, 1980 参照）。このようにして、光学部品が第 2 偏光子 1 6 の方向で振動する一部の光 2 6 が存在する。第 2 偏光子（アナライザー）1 6 はこの光部分が光検出器 1 8 に通過することを許容する。光の強さにおける検出された変化又は増幅は認知可能な信号に電子的に変換される。

【 0 0 2 9 】

図 2 A - 2 C に概略して示す本発明の他の具体例では、増幅のため酵素 - 基質相互作用が利用される。図 2 A を参照して、酵素 3 0 は、酵素 3 0 と基質 3 4 との時期尚早の相互作用を防止するためにケージ 3 2 内に捕捉される。基質 3 4 は、潜在的に、ケージ 3 2 を横切る 1 以上のチャンネルを通る酵素 3 0 へのアクセスを獲得できる。しかしながら、チャンネル 3 6 は、病原性因子の不存在下では 2 倍の結合能力を有する 1 以上のリセプター（ディアボディー）3 8 によって、矢印 3 7 で示されるようにブロックされる。

【 0 0 3 0 】

ディアボディーを生産するため、好ましくは、ここに参考として引用する Holliger らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444, 1993）に従って、それぞれチャンネル 3 6 及びリガンド 4 8 に向かう 2 つの別個の抗原 - 結合領域 4 0 及び 4 1 を有するディアボディー 3 8 を形成するために 2 つの抗体を結合させる。リガンド - 結合領域 4 0 は、長鎖免疫グロブリン 4 2 a 及び短鎖免疫グロブリン 4 3 b でなる。リガンド - 結合領域 4 1 は長鎖免疫グロブリン 4 3 b 及び短鎖免疫グロブリン 4 2 b でなる。いかなる特別な理論によって拘束されることなく、1 以上のディアボディー 3 8 に対する結合領域 4 0 のケージ 3 2 上のエピトープへの結合はチャンネル 3 6 をブロックし、基質 - 酵素の相互作用を阻止する。このようにして、基質 3 4 は非模倣条件下では処理されない。

【 0 0 3 1 】

図 2 B を参照して、結合領域 4 1 がリガンド 4 8 に付着する際、ディアボディー 3 8 のリンカー領域 4 4 及び 4 6 は歪曲されて、チャンネル 3 6 が非ブロック化されるようになり、矢印 4 9 で示されるように基質 3 4 がチャンネル 3 6 を通り、酵素 3 0 と相互作用する。リガンド 4 8 によって活性化されると、チャンネル 3 6 は開放されたままになり、多量の基質 3 4 が入ることができ、作用して生成物 3 4 a 及び 3 4 b（発色性又は蛍光性である着色生成物である）を生産する。ついで、生成物 3 4 a 及び 3 4 b の一方又は両方が検出又は増幅され、認知可能な信号に変換される。

【 0 0 3 2 】

当業者であれば、ケージ 3 2 として各種の球状構造体、好ましくはタンパク質が使用されることは理解できるであろうが、酵素ケージとしての作用については - 2 - マクログロブリンが特によく研究されているがこれは、いくつかの酵素（トリプシン及びトロンピンを含む）が - 2 - マクログロブリンを部分的に劣化し、タンパク質に入り込み、及び単に - 2 - マクログロブリン及び酵素を混合することによって捕捉されるようになるため

である。

【 0 0 3 3 】

酵素 3 0 は、分子ケージに捕捉され、その基質の検出可能な変化を生ずるいかなるものでもよい。当業者であれば、無数の酵素 - 基質ペアが検出可能であり、したがって、好適であることが理解されるであろう。例えば、トロンピン及びトリプシンは好適な 2 つの酵素である。好適な基質は、認識部位及び酵素 - 基質結合の際に検出可能な発色の変化を生ずる発色団を有する。

【 0 0 3 4 】

リンカー領域 4 4 及び 4 6 は、基質 3 4 がリガンド 4 8 の抗原結合領域 4 1 への結合の際にチャンネル 3 6 に入ることができるように組換えられる。リンカー領域 4 4 及び 4 6 は好ましくは中位の長さのものである。当業者は、リンカー領域の長さが短すぎる又は長すぎる場合には、これらの領域は、チャンネル 3 6 を脱ブロック化するには適切に歪曲しないことを理解するであろう。リンカー領域の長さの好適な範囲は、主としてケージ 3 2 及びチャンネル 3 6 の性質に左右される。

【 0 0 3 5 】

リンカー領域 4 4 及び 4 6 も、好ましくは、イオン、水素、又は他の結合によって一緒に結合される。そうでなければ、リンカー領域 4 4 及び 4 6 は分離に影響され易く、その結果、病原性因子の結合の際に不適切なディストーションを生ずる。

【 0 0 3 6 】

図 3 A - 3 C に概略して示す本発明の他の具体例も酵素 - 基質増幅機構を使用する。図 3 A に示されるように、シングル鎖キメラ抗体 5 0 は、リンカー領域 5 2 が特異的に酵素 5 4 と結合して、矢印 5 8 によって示されるように酵素 5 4 への基質 5 6 の結合を阻害するように組換えられる。この具体例では、リンカー領域 5 2 は、酵素 5 4 の活性部位に対して相補性であるそのポリペプチド配列の一部を有する。好適な相補性ポリペプチドの決定に関する技術は公知である。

【 0 0 3 7 】

図 3 B に示されるように、抗体 5 0 の結合領域 6 0 がリガンド 6 2 を結合すると、リンカー領域における配座の変化は酵素 5 4 からの抗体 5 0 の解離を生ずる。遊離された酵素 5 4 は今や基質に作用できる。遊離された各々の酵素は多量の基質と反応して、増幅された信号を提供できる。単なる例として、特に好適な具体例を図 3 C (ルシフェラーゼの如き酵素がどのようにその基質を変性するか、この例では、ルシフェラーゼの酸化及び解離を生ずるかを示す) に示した。この反応は、反応生成物のピコグラムレベル以下で検出可能な蛍光性の化学種 5 7 a 及び非蛍光性の化学種 5 7 b を生成する。ついで、蛍光性の化学種 5 7 は検出又は増幅され、認知可能な信号に変換される。酵素 5 4 は、その基質の検出可能な変換を生ずるいかなる酵素でもよい。

【 0 0 3 8 】

実験例

液晶増幅機構

液晶増幅機構を使用するリガンド検出システムを開発した。大腸菌リポ多糖類 (LPS) (グラム陰性細菌について見られる表面抗原) に対するネズミ抗体を市販の源 (Biodesign International, cat. #C61212M, クローン #26-5, lot #5D1197) から入手し、pH 7.2 の滅菌リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈 (1 : 10) してサンプル 100 ng/μl を得た。

【 0 0 3 9 】

大腸菌の後期対数期培養物をブレーンハートインフュージョン (BHI) 中で増殖させ、0.9% 滅菌生理食塩水で洗浄して生育培地を除去した。細菌の数 (600nm における光学密度によって測定; コロニー - 形成単位 (CFUs)) を増殖曲線データから外挿法によって定量した。ついで、細菌を滅菌生理食塩水での希釈によって 4.6×10^1 CFU / 5 μl に調節した。

【 0 0 4 0 】

混合物の相状態の制御を助けるため補助界面活性剤としてヘキサノールを使用して、ラメラ相においてリオトロピック液晶溶液を調製した。塩化セチルピリジウム (CpCl) をヘキサノールとヘキサノール / CpCl = 0.651 (w/w) の割合で合わせた。ついで、混合物を食塩水 (水中NaCl 1%) によって食塩水 85 重量%となるまで希釈した。得られた液晶はラメラではあるが、ミセル相に近いものであった (Nastishin, Langmuir. Vol. 12, pp. 5011-5015, 1996; ここに参考として引用する)。この相では、リオトロピック液晶はバイフィリックであり、このようにして、いくつかの異なった種類のリセプターと相互作用できる。

【0041】

テスト用の検出システムを、ヘキサノール / CpCl / 食塩水リオトロピック液晶にリセプターを挿入することによって作製した。各アッセイについて、大腸菌 (LPS) に対して特異的に反応性の抗体 (500ng) 溶液 5 μ l をリオトロピック液晶溶液 5 μ l に添加し、混合した。ついで、実験サンプル (5 μ l) を一定量 (10 μ l) の液晶 - 抗体混合物に添加し、混合した。実験サンプルを次のように抗体 - 液晶混合物に添加した: サンプル A - 大腸菌 (4.6×10^1 CFU) (システムによって検出される予定の特殊な細菌) 5 μ l; サンプル B - PBS 5 μ l、又はサンプル C - S. アウレウス (S. Aureus) (2×10^6 CFU) (システムが検出できない不適切な細菌) 5 μ l。サンプルを遠心分離 ($3,500 \times g$; 5 秒) して泡を除去し、反応混合物 10 μ l をエタノールで浄化した顕微鏡スライドに置き、エタノールで浄化したガラスカバースリップで覆い、偏光光を使用して複屈折について混合物を評価した。実験条件及び結果を表 1 に示す。抗体がその特異的な抗原に結合した場合にのみ複屈折が生じ、複屈折における目視により認識可能な変化は、46 - 460 CFU / 5 μ l 程度の細菌濃度について検出された。

【0042】

【表 1】

サンプル	抗体(LPS)	大腸菌	S.アウレウス	PBS	液晶	複屈折
A	500 ng	4.6×10^1	—	—	5 μ l	有
B	500 ng	—	—	5 μ l	5 μ l	無
C	500 ng	—	2×10^6	—	5 μ l	無

他の実験では、LPS抗体、大腸菌 (2.7×10^7 CFU) 及び液晶物質を、上記実験例と同様にして反応させ、代表的な顕微鏡写真 ($110 \times$ 倍率; 図 4 A、4 B 及び 4 C) を Bio-Quant イメージ分析システムによって評価した。イメージ分析は、大腸菌、PBS、又は S. アウレウスをリセプター - リガンド結合システムによって評価した際の伝わる光の透過率を定量的に比較するために行ったものである。写真イメージをデジタル化し、下記の式に従って積分光学密度 (IOD) を自動的に算定した。

【0043】

【式 1】

$$IOD = \frac{(\Sigma - \log_{10}) \text{ (フォアグラウンド)}}{\text{ (バックグラウンド)}}$$

【0044】

図 5 に示す得られたデータは、液晶が抗体の大腸菌 (LPS) への結合を増幅する際の伝わる光の透過率の十分な増加が生じたことを示した。

【0045】

ケージ化酵素増幅機構

- 2 - マクログロブリン増幅機構の感受性を実証した。ヒト - 2 - マクログロブリン (2 M , Calbiochem Co., 生成物番号 441251)、トリプシン (Sigma Chemical Co., T-8

10

20

30

40

50

003) 及びトロンピン (Sigma Chemical Co., T-4648) の標準 2 mg/100 µl 溶液を、0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.6) にプロテアーゼ又はアンチプロテアーゼを溶解させることによって調製した。2 M 及び酵素の 1 つに等しい容量 (100 µl) を混合し、室温において 10 分間相互作用させ、ついで 4℃ に冷却させた。サンプル 200 µl を、Sephadex G-100 を充填したゲル濾過カラム (1 cm × 24 cm; 床容量 18.8 ml; 流量 0.44 ml/分; 4℃ の冷たい室内に設置) に加えて、未複合化酵素からケージ化酵素を分離した。カラム溶離剤を 1.0 ml のフラクションで集めた。各フラクションにおけるタンパク質濃度を測定するため 280 nm における光吸収率の変化を測定し、ケージ化酵素を含有するフラクションを同定するため酵素の活性度を測定した。これらの測定の結果 (図 6 A 及び 6 B に示す) は、フラクション 15 - 17 がケージ化酵素の比較的純なサンプルを含有していることを示した。これらのフラクションを次の評価に使用した。

10

【0046】

それぞれケージ化トリプシン (図 6 C) 及びケージ化トロンピン (図 6 D) の酵素の活性度を測定するために、合成基質、N - ベンゾイル - L - arg - p - ニトロアナライド及び N - p - トシル - gly - pro - arg - p - ニトロアナライドを使用した。いずれのシステムも用量反応特性を発揮するが、ケージ化トロンピンはより高い感度を示した。酵素の活性度は継時的にも劣化しない。ケージ化トリプシンの酵素活性度は、4℃ で 6 日間保存した後も未変化にままであった。同様に、ケージ化トロンピンの活性度は、調製後 24 時間で測定した際にも安定であった。

【0047】

20

ルシフェラーゼ増幅機構

ルシフェラーゼに基づく増幅機構の例外的な感度を、Berthold Lumat Luminometer を使用して実証した。Luminometer の反応チャンバーに、各種の量のルシフェラーゼ (0.15% NaCl 4 mg/ml, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM ジチオトレイトール; Sigma Chemical Co.) を添加した。反応チャンバーに、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.8) 中に 0.5 nM ルシフェラーゼ (Progema, E1483)、0.5 mM アデノシン三リン酸 (Sigma Chemical Co., A-7699)、5 mM MgSO₄、1.0 mM ジチオトレイトール (Sigma Chemical Co.) を含む溶液を迅速に注入することによって酵素の反応を開始させた。図 7 B は、酵素濃度わずか 0.0017% で検出可能なルシフェラーゼの活性度が測定され、酵素濃度における進行評価によって活性度の直線的な増加が観察されることを示している。

30

【0048】

いかなる変更も請求の範囲に記載した発明の範囲に属するものであり、特異抗体、ケージ化酵素、リセプター - 脱活性化酵素又は液晶の選択は、ここに開示し、記載した発明の精神を逸脱することなく決定されることが理解されなければならない。また、特に病原体の検出について研究されているが、本発明はいかなるリガンドの検出も包含するものであることが理解されなければならない。さらに、本発明の範囲は請求の範囲に記載した範囲に属するすべての変形及び変更も包含するものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】 水及びバイフィリック分子の交互相によって形成されたりオトロピック液晶の層状構造体を概略して示す図である。

40

【図 1 B】 リオトロピック液晶に挿入されたりセプターをもつ増幅機構を概略して示す図である。

【図 1 C】 液晶の変形及び偏光の透過率の変更を生ずるリセプターに結合した特異リガンドをもつ増幅機構を概略して示す図である。

【図 2 A】 1 以上のリセプターがリガンドの不存在下において酵素につながるチャンネルをブロックするケージ化酵素増幅機構を概略して示す図である。

【図 2 B】 リガンドがリンカー領域のディストーション及び酵素につながるチャンネルの非ブロッキングを生ずるリセプターに結合するケージ化酵素増幅機構を概略して示す図である。

【図 2 C】 リセプターへのリガンドの結合によって活性化された後、酵素につながるチ

50

チャンネルは開放されたままであり、多量の基質が酵素と相互作用できるケージ化抗体増幅機構を概略して示す図である。

【図 3 A】 分子組換えされたりセプターによって非活性化された酵素を概略して示す図である。

【図 3 B】 酵素の活性部位が基質にさらされる際、リセプターのリガンドからの解離を生ずる分子組換えされたりセプターへのリガンドの結合を概略して示す図である。

【図 3 C】 ピコレベルのリガンドがリセプターに結合された後における酵素による基質の変換を概略して示す図である。

【図 4 A】 特異リガンドのリセプターへの結合にตอบสนองして液晶 - リセプターアレイを通る偏光された光の複屈折を表す写真である。

10

【図 4 B】 液晶、リセプター及びPBSを含有する反応混合物では液晶 - リセプターアレイを通る偏光された光の複屈折が存在しないことを表す写真である。

【図 4 C】 液晶、リセプター及び不適切なリガンドを含有する反応混合物では液晶 - リセプターアレイを通る偏光された光の複屈折が存在しないことを表す写真である。

【図 5】 非選択的リセプター - リガンド結合及びバックグラウンドリセプター - リガンド結合と比較して、選択的リセプター - リガンド結合用のリガンド検出システムの液晶 - リセプターアレイを通る偏光された光の複屈折の定量分析を表すグラフである。

【図 6 A】 - 2 - マクログロブリン - トリプシン複合体を含有する溶出フラクションの酵素活性度を表すグラフである。

【図 6 B】 - 2 - マクログロブリン - トリプシン複合体を含有する溶出フラクションのタンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を表すグラフである。

20

【図 6 C】 時間 (分) に対する検出可能な酵素活性度に及ぼすケージ化トリプシンの濃度の影響を表すグラフである。

【図 6 D】 時間 (分) に対する検出可能な酵素活性度に及ぼすケージ化トリプシンの濃度の影響を表すグラフである。

【図 6 E】 時間 (日) に対するケージ化トリプシンの安定性を表すグラフである。

【図 7 A】 時間 (秒) に対するルシフェラーゼの活性度 (相対光単位) を表すグラフである。

【図 7 B】 ルシフェラーゼの濃度 ($\text{pg}/\mu\text{l}$) を関数とするルシフェラーゼの活性度 (相対光単位) を表すグラフである。

30

【符号の説明】

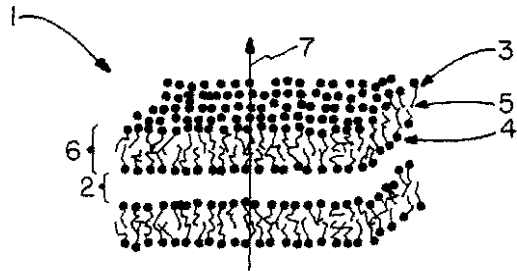
- 1 リオトロピック液晶
- 2 水
- 3 バイフィリック分子
- 4 極性脂肪族部分
- 5 非極性脂肪族部分
- 6 二分子層
- 10 光源
- 12 第 1 偏光子
- 14 a 病原体検出システム
- 14 b モノ特異性抗体
- 14 c バイフィリックリオトロピック液晶物質
- 16 第 2 偏光子
- 18 光検出器
- 22 光ビーム
- 26 光
- 30、54 酵素
- 32 ケージ
- 34、56 基質
- 36 チャンネル

40

50

- 38 ディアボディー
- 40、41 リガンド結合領域
- 42a、43b 長鎖免疫グロブリン
- 42b、43a 短鎖免疫グロブリン
- 44、46 リンカー領域
- 48 リガンド
- 50 シングル鎖キメラ抗体
- 57a 蛍光化学種
- 57b 非蛍光化学種

【図1A】



【図1C】

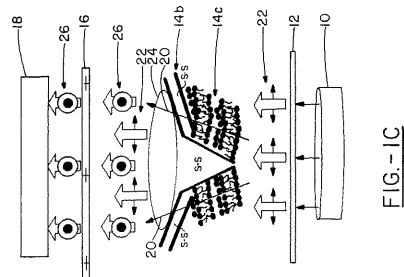


FIG.-1C

FIG.-1A

【図1B】

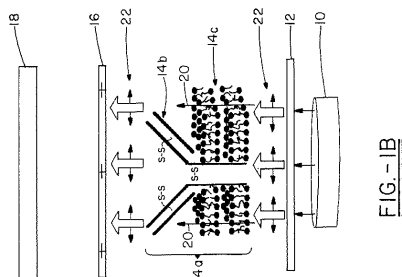


FIG.-1B

【図2A】

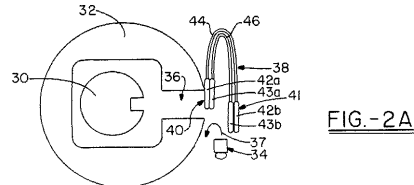


FIG.-2A

【図2B】

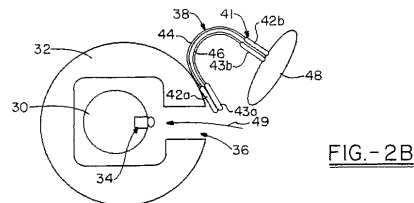


FIG.-2B

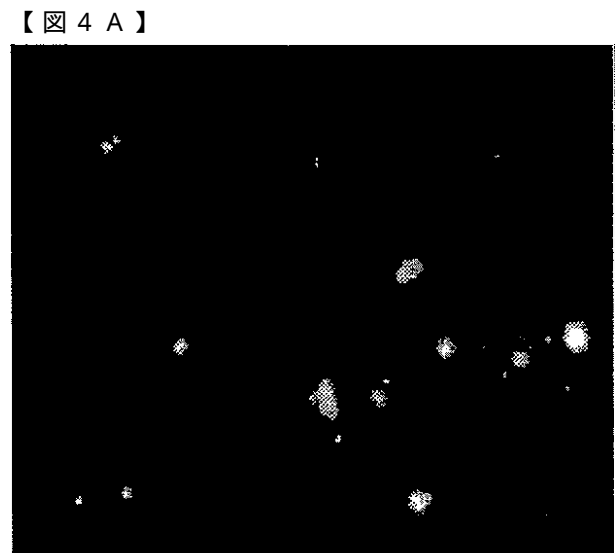
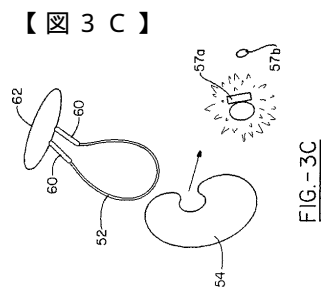
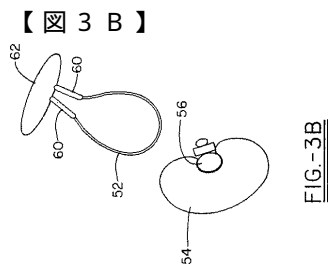
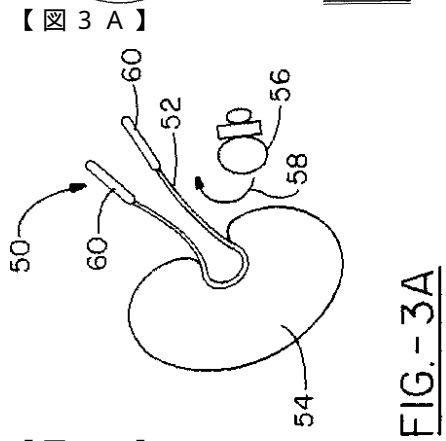
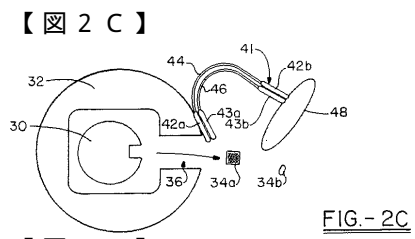


Fig. 4A



Fig. 4B

【図 4 C】

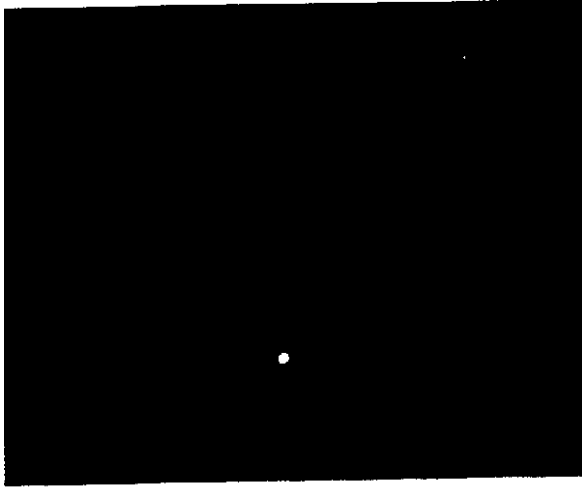
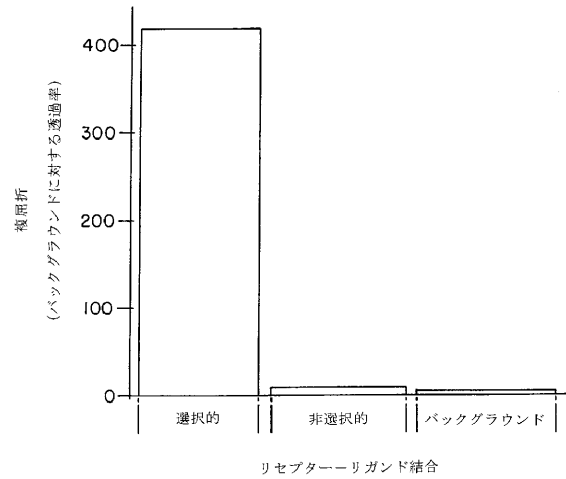
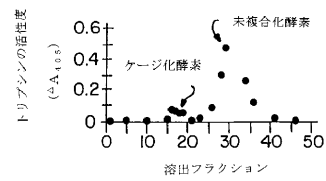


Fig. 4C

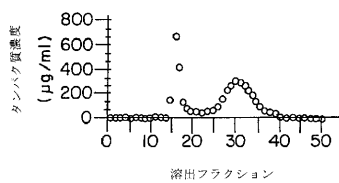
【図 5】



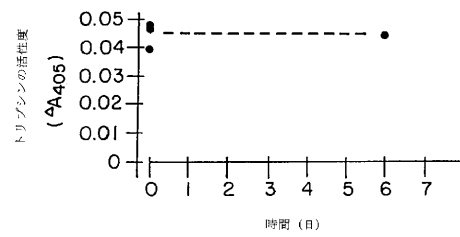
【図 6 A】



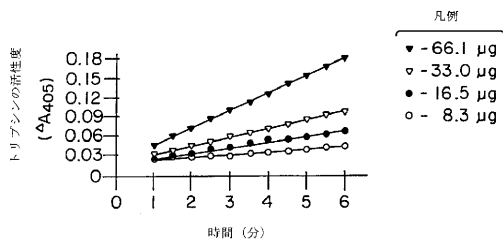
【図 6 B】



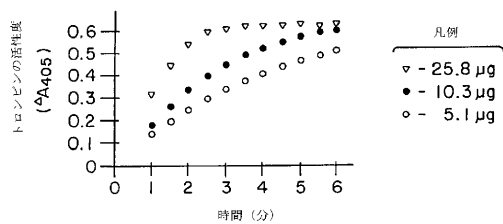
【図 6 E】



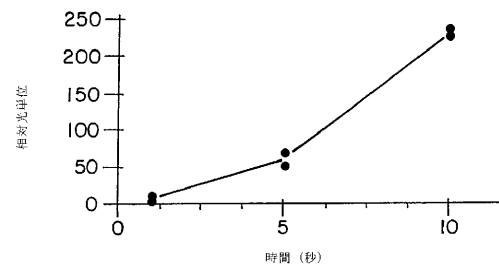
【図 6 C】



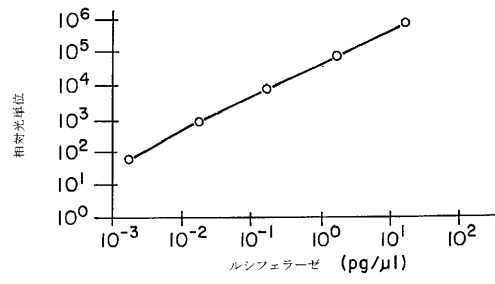
【図 6 D】



【図 7 A】



【図 7 B】



フロントページの続き

- (72)発明者 ニーハウス ギャリー ディー
アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 2 4 0 ケント パーク・アベニュー 6 3 3
- (72)発明者 ドーン キャサリン ジェー
アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 2 6 6 ラベンナ レイクウッド・ロード 4 7 5 1
- (72)発明者 ラブレントビチ オレグ
アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 2 4 0 ケント ロク・マリー・アベニュー 5 9 3 3
- (72)発明者 シュミット スティーブン ピー
アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 3 1 3 アクロン オーチャード・ロード 4 4
- (72)発明者 サインズ スティーブン エー
アメリカ合衆国 オハイオ 4 4 2 3 6 ハドソン グロトン・ドライブ 1 6 1 6

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開昭61-271460(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579