

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-507060

(P2020-507060A)

(43) 公表日 令和2年3月5日 (2020. 3. 5)

|                                 |                       |             |
|---------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/554 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/554         | 4 B O 6 3   |
| <b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>  | GO 1 N 33/53 Z N A N  |             |
| <b>GO 1 N 33/543 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/543 5 4 1 A |             |
| <b>C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)</b>  | GO 1 N 33/543 5 7 5   |             |
| <b>C 1 2 N 15/12 (2006. 01)</b> | C 1 2 Q 1/02          |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

|                    |                              |          |   |
|--------------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号          | 特願2019-534878 (P2019-534878) | (71) 出願人 | 519223675   |
| (86) (22) 出願日      | 平成29年12月21日 (2017. 12. 21)   |          | ファンダメンタル ソリューションズ コーポレーション                        |
| (85) 翻訳文提出日        | 令和1年8月1日 (2019. 8. 1)        |          | アメリカ合衆国、1 8 0 4 2 ペンシルバニア州、イーストン、1 5 5 0 リーハイドライブ |
| (86) 国際出願番号        | PCT/US2017/067787            | (74) 代理人 | 100104411   |
| (87) 国際公開番号        | W02018/119173                |          | 弁理士 矢口 太郎   |
| (87) 国際公開日         | 平成30年6月28日 (2018. 6. 28)     | (72) 発明者 | ジュパンチッチ、トーマス、ジェイ.                                 |
| (31) 優先権主張番号       | 62/438, 068                  |          | アメリカ合衆国、4 3 0 6 5 オハイオ州、ポーウェル、3 5 0 アンドーバー ドライブ   |
| (32) 優先日           | 平成28年12月22日 (2016. 12. 22)   |          |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                      |          |   |
| (31) 優先権主張番号       | 15/642, 800                  |          |   |
| (32) 優先日           | 平成29年7月6日 (2017. 7. 6)       |          |   |
| (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】 分析物検出のためのユニバーサルバイオセンサーシステム

## (57) 【要約】

【解決手段】 標的分析物を検出するためのバイオセンサーシステムであって、所定の種類の生細胞と、前記生細胞に関連するシグナル生成レポーターと、前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または他の活性化メカニズムまたは手段と、前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分と、前記ユニバーサル検出成分と関連する分析物結合成分とを含み、前記分析物結合成分は、前記ユニバーサル検出成分および前記標的分析物の両方に特異的である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的分析物を検出するためのバイオセンサーシステムであって、

(a) 所定の種類の生体細胞と、

(b) 前記生体細胞に関連するシグナル生成レポーターと、

(c) 前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムと、

(d) 前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分と、

(e) 前記ユニバーサル検出成分に関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分と

を有する、バイオセンサーシステム。

10

## 【請求項 2】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記生体細胞が、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、動物細胞、植物細胞、非生殖細胞、固定細胞、薬剤処理細胞、化学的に処理された細胞、浸透圧処理された細胞、放射細胞、人工細胞、合成細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、単核食細胞、好中球、好酸球、または好塩基球である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 3】

請求項 2 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記昆虫細胞がショウジョウバエシユナイダー 2 細胞または s f 9 細胞である、バイオセンサーシステム。

20

## 【請求項 4】

請求項 2 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記哺乳類細胞が、H E K 細胞、C H O 細胞、C O S 細胞、3 T 3 細胞、または他の培養、不死化、もしくは継代された哺乳類細胞である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 5】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル生成レポーターが、蛍光、紫外線、または可視特性を有する染料；発光シグナルまたは蛍光シグナルを生じるように適合された酵素；蛍光性、荷電性、または磁性のナノ粒子、ナノドット、または量子ドット；蛍光タンパク質；または他のカルシウム感受性の発光分子または蛍光分子である、バイオセンサーシステム。

30

## 【請求項 6】

請求項 5 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 7】

請求項 5 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル生成レポーターが、オペリン、タラシコリン、ミトロコミン（ハリストリン）、クリチン（フィアリジン）、ムネモプシン、ペロピン、I n d o - 1、F l u o - 2、Q u i n - 2、F l u o - 3、R h o d - 2、カルシウムグリーン、B A P T A、カメレオン、または他のカルシウム感受性の発光分子または蛍光分子である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 8】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムが、前記生体細胞の pH または温度の変化；前記生体細胞の電気的または磁気的性質の変化；前記生体細胞内の G タンパク質共役受容体シグナル伝達経路の活性化；前記生体細胞内のホスファチジルイノシトール経路の活性化；ジアシルグリセロール、セラミド、または他の親油性メッセンジャー分子を放出する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；一酸化窒素、c A M P、c G M P、または他の環状ヌクレオチドを放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化炭素、硫化水素、または他の二次酸化還元シグナル伝達分子を放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；または前記生体細胞によって発現される受容体の構造変化によって活性化され、前記構造変化は、前記ユニバーサル検出成分が標

40

50

的分析物に結合した後に初めて起こる、バイオセンサーシステム。

【請求項 9】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記ユニバーサル検出成分が、抗体可変多様性結合 (V D J) 領域、F a b フラグメント、または他の抗体決定基；T 細胞可変結合 (V J)、可変多様性結合 (V D J)、または他の T 細胞受容体決定基；合成ペプチド；既知の大きさの非ペプチド有機決定因子；レクチン決定因子、炭水化物結合モジュール、または他の炭水化物結合決定因子；脂質結合決定因子；金属または他の金属結合決定因子を結合するメタロチオン決定因子；免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (I T I M)；前記生体細胞内のシグナル伝達経路の F c 結合部分に非共有結合する F c 決定因子；または前記生体細胞内のシグナル伝達経路のピオチンまたは (ストレプト) アビジン結合部分に非共有結合するピオチンまたは (ストレプト) アビジン決定因子を有する、バイオセンサーシステム。

10

【請求項 10】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記分析物結合成分が、アフィボディ、アプタマー、または可溶性受容体であり、または前記分析物結合成分は、一本鎖抗体または一本鎖ダイアボディである I g G フラグメントを含む、バイオセンサーシステム。

【請求項 11】

請求項 1 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記標的分析物が、相互性、共生性、または寄生性の微生物、病原性微生物、バイオウエア微生物、または他の微生物であり、または高分子担体に結合した医薬品、薬剤、毒物、毒素、化学兵器、ホルモン、代謝産物、または小分子である、バイオセンサーシステム。

20

【請求項 12】

標的分析物を検出するためのバイオセンサーシステムであって、

- (a) 所定の種類の生体細胞と、
- (b) 前記生体細胞内のシグナル生成レポーターであって、前記生体細胞内で生じる所定の変化に応答する、前記シグナル生成レポーターと、
- (c) 前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムであって、前記生体細胞内に所定の変化を誘導するように作動する、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムと、
- (d) 前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分であって、前記活性化メカニズムを誘発するように作動する、前記ユニバーサル検出成分と、
- (e) 前記ユニバーサル検出成分と関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分と

30

を有し、(f) 標的分析物も結合している分析物結合成分が前記ユニバーサル検出成分に結合すると、前記ユニバーサル検出成分が前記活性化メカニズムを誘発させて前記生体細胞内での所定の変化を生じさせ、それによってシグナル生成レポーターに、検出可能なシグナルを生成させる、バイオセンサーシステム。

【請求項 13】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記生体細胞が、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、動物細胞、植物細胞、非生殖細胞、固定細胞、薬剤処理細胞、化学的に処理された細胞、浸透圧処理された細胞、放射細胞、人工細胞、合成細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、単核食細胞、好中球、好酸球、または好塩基球である、バイオセンサーシステム。

40

【請求項 14】

請求項 13 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記昆虫細胞がショウジョウバエシュナイダー 2 細胞または s f 9 細胞である、バイオセンサーシステム。

【請求項 15】

請求項 13 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記哺乳類細胞が、H E K 細胞、C H O 細胞、C O S 細胞、3 T 3 細胞、または他の培養、不死化、もしくは継代された哺乳類細胞である、バイオセンサーシステム。

50

## 【請求項 16】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル生成レポーターが、蛍光、紫外線、または可視特性を有する染料；発光シグナルまたは蛍光シグナルを生じるように適合された酵素；蛍光性、荷電性、または磁性のナノ粒子、ナノドット、または量子ドット；蛍光タンパク質；または他のカルシウム感受性の発光分子または蛍光分子である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 17】

請求項 16 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 18】

請求項 16 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル生成レポーターが、オベリン、タラシコリン、ミトロコミン（ハリストリン）、クリチン（フィアリジン）、ムネモプシン、ペロピン、Indo-1、Fluo-2、Quin-2、Fluo-3、Rhod-2、カルシウムグリーン、BAPTA、カメレオン、または他のカルシウム感受性の発光分子または蛍光分子である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 19】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムが、前記生体細胞の pH または温度の変化；前記生体細胞の電気的または磁気的性質の変化；前記生体細胞内の G タンパク質共役受容体シグナル伝達経路の活性化；前記生体細胞内のホスファチジルイノシトール経路の活性化；ジアシルグリセロール、セラミド、または他の親油性メッセンジャー分子を放出する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；一酸化窒素、cAMP、cGMP、または他の環状ヌクレオチドを放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化炭素、硫化水素、または他の二次酸化還元シグナル伝達分子を放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；または前記生体細胞によって発現される受容体の構造変化のうちの少なくとも 1 つによって活性化され、前記構造変化は、前記ユニバーサル検出成分が標的分析物に結合した後に初めて起こる、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 20】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記ユニバーサル検出成分が、抗体可変多様性結合（VDJ）領域、Fab フラグメント、または他の抗体決定基；T 細胞可変結合（VJ）、可変多様性結合（VDJ）、または他の T 細胞受容体決定基；合成ペプチド；既知の大きさの非ペプチド有機決定因子；レクチン決定因子、炭水化物結合モジュール、または他の炭水化物結合決定因子；脂質結合決定因子；金属または他の金属結合決定因子を結合するメタロチオン決定因子；免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（ITIM）；前記生体細胞内のシグナル伝達経路の Fc 結合部分に非共有結合する Fc 決定因子；または前記生体細胞内のシグナル伝達経路のビオチンまたは（ストレプト）アビジン結合部分に非共有結合するビオチンまたは（ストレプト）アビジン決定因子のうちの少なくとも 1 つを有する、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 21】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記分析物結合成分が、アフィボディ、アプタマー、または可溶性受容体であり、または前記分析物結合成分は、一本鎖抗体または一本鎖ダイアボディである IgG フラグメントを含む、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 22】

請求項 12 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記標的分析物が、有益な腸内細菌、病原性細菌、タンパク質バイオマーカー、小分子毒素、代謝産物、または化学兵器、または高分子担体に結合した小分子である、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 23】

標的分析物を検出するためのバイオセンサーシステムであって、

10

20

30

40

50

- (a) 所定の種類の生体細胞と、
  - (b) 前記生体細胞内のシグナル生成レポーターであって、前記生体細胞内で生じる所定の変化に応答する、前記シグナル生成レポーターと、
  - (c) 前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムであって、前記生体細胞内に所定の変化を誘導するように作動する、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムと、
  - (d) 前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分であって、前記活性化メカニズムを誘発するように作動する、前記ユニバーサル検出成分と、
  - (e) 前記ユニバーサル検出成分と関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分と
- を有し、(f) 標的分析物も結合している分析物結合成分が前記ユニバーサル検出成分に結合すると、前記ユニバーサル検出成分が前記活性化メカニズムを抑制して前記生体細胞内での所定の変化を減少させ、それによってシグナル生成レポーターに、減衰したシグナルを生成させ、またはシグナルを生成させない、バイオセンサーシステム。

10

**【請求項 2 4】**

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記生体細胞が、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、動物細胞、植物細胞、非生殖細胞、固定細胞、薬剤処理細胞、化学的に処理された細胞、浸透圧処理された細胞、放射細胞、人工細胞、合成細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、単核食細胞、好中球、好酸球、または好塩基球である、バイオセンサーシステム。

20

**【請求項 2 5】**

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル生成レポーターが、蛍光、紫外線、または可視特性を有する染料；発光シグナルまたは蛍光シグナルを生じるように適合された酵素；蛍光性、荷電性、または磁性のナノ粒子、ナノドット、または量子ドット；蛍光タンパク質；または他のカルシウム感受性の発光分子または蛍光分子である、バイオセンサーシステム。

**【請求項 2 6】**

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムが、前記生体細胞の pH または温度の変化；前記生体細胞の電気的または磁気的性質の変化；前記生体細胞内の G タンパク質共役受容体シグナル伝達経路の活性化；前記生体細胞内のホスファチジルイノシトール経路の活性化；ジアシルグリセロール、セラミド、または他の親油性メッセンジャー分子を放出する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；一酸化窒素、cAMP、cGMP、または他の環状ヌクレオチドを放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化炭素、硫化水素、または他の二次酸化還元シグナル伝達分子を放出または生成する前記生体細胞内のシグナル伝達経路の活性化；または前記生体細胞によって発現される受容体の構造変化によって活性化され、前記構造変化は、前記ユニバーサル検出成分が標的分析物に結合した後に初めて起こる、バイオセンサーシステム。

30

**【請求項 2 7】**

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記ユニバーサル検出成分が、抗体可変多様性結合 (VDJ) 領域、Fab フラグメント、または他の抗体決定基；T 細胞可変結合 (VJ)、可変多様性結合 (VDJ)、または他の T 細胞受容体決定基；合成ペプチド；既知の大きさの非ペプチド有機決定因子；レクチン決定因子、炭水化物結合モジュール、または他の炭水化物結合決定因子；脂質結合決定因子；金属または他の金属結合決定因子を結合するメタロチオン決定因子；免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (ITIM)；前記生体細胞内のシグナル伝達経路の Fc 結合部分に非共有結合する Fc 決定因子；または前記生体細胞内のシグナル伝達経路のビオチンまたは (ストレプト) アビジン結合部分に非共有結合するビオチンまたは (ストレプト) アビジン決定因子を含む、バイオセンサーシステム。

40

**【請求項 2 8】**

50

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記分析物結合成分が、アフィボディ、アプタマー、または可溶性受容体であり、または前記分析物結合成分は、一本鎖抗体または一本鎖ダイアボディである I g G フラグメントを含む、バイオセンサーシステム。

【請求項 2 9】

請求項 2 3 記載のバイオセンサーシステムにおいて、前記標的分析物が、有益な腸内細菌、病原性細菌、タンパク質バイオマーカー、小分子毒素、代謝産物、または化学兵器、または高分子担体に結合した小分子である、バイオセンサーシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2 0 1 6 年 1 2 月 2 2 日付け出願の「分析物の迅速検出のためのシステムおよび装置」という名称の米国仮出願第 6 2 / 4 3 8 , 0 6 8 号の利益を主張し、また 2 0 1 7 年 7 月 6 日付け出願の分析物の迅速検出のためのバイオセンサーシステム」という名称である米国本出願第 1 5 / 6 4 2 , 8 0 0 号（米国特許第 9 , 8 5 0 , 5 4 6 号）米国特許出願の一部継続出願であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、あらゆる目的のための米国特許出願の一部をなす。

【背景技術】

【0 0 0 2】

20

本発明は、概して、生物学的試料または他の種類の試料中の対象の様々な分析物を検出するためのシステム、装置、試薬、および方法に関し、より詳細には、バイオセンサーが試験されるサンプル中の対象の分析物と反応する時の検出可能なシグナルの放出に基づき、リアルタイムで対象の分析物を検出および同定するためのバイオセンサーベースのシステムに関する。以下の特許：米国特許第 9 , 0 2 3 , 6 4 0 号；9 , 7 5 2 , 1 9 9 ；9 , 8 5 0 , 5 4 6 ；9 , 8 5 0 , 5 4 7 ；および 9 , 8 5 0 , 5 4 8 は、本発明の技術に関する追加の背景情報を提供しており、すべての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 3】

一般論として、バイオセンサーは、敏感な生物学的成分を物理化学的検出器成分と組み合わせる分析物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は、生物学的成分、トランスデューサーまたは検出成分、および試験結果を意味のある有用な方法で表示する関連する電子機器またはシグナルプロセッサを含む。生物学的要素は、典型的には、組織、微生物、オルガネラ、細胞受容体、酵素、抗体、核酸などのような生物学的材料を含み、これらは既知の生物工学的プロセスによって作り出すことができる。変換器または検出成分は、分析物と生物学的成分との相互作用から生じる信号をより容易に測定および定量化することができる別の信号に変換する物理化学的方法（例えば、光学的、圧電的、および / または電気化学的）で働く。バイオセンサーは、抗体 - 抗原相互作用などの生体分子 - 分析物相互作用を定性化または定量化するための分子生物学および情報技術（例えば、超小型回路、光ファイバーなど）の統合から生じた。食品中の感染性病原体、病原体または / および毒素を検出するための迅速で、敏感で、扱いやすく、そして費用効果の高い検出ツールに対する大きな需要があることを考慮すると（例えば、Mead et al. , Food Related Illness and Death in the United States , Emerging Infectious Diseases ; Vol . 5 , No . 5 , September - October 1999 ( 6 0 7 - 6 2 5 ) （その全体が参照により本明細書に組み入れられる）において、食品中の感染性病原体、病原性微生物、毒素、およびその他の汚染物質を検出および識別するための、リアルタイムの携帯型の装置および機器等、バイオセンサーの利用に対する継続的な必要性がある。

30

40

【発明の概要】

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

以下は、本発明の特定の例示的实施形態の概要を提供する。この概要は、広範囲の概要ではなく、そして本発明の肝要なまたは重要な側面もしくは成分を同定すること、またはその範囲を記述することを意図しない。しかしながら、本発明を説明し請求するために使用される言語における不定冠詞の使用は、記述されるシステムを単一の構成要素または成分に限定することを決して意図するものではないことを理解されたい。むしろ、本明細書における「a」または「an」の使用は、「少なくとも1つ」または「1つまたは複数」を意味すると解釈されるべきである。

## 【0005】

本発明の別の態様によれば、標的分析物を検出するための第1のバイオセンサースystemが提供される。このシステムは、所定の種類の生体細胞と、前記生体細胞に関連するシグナル生成レポーターと、前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムと、前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分と、前記ユニバーサル検出成分に関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分を含む。

## 【0006】

本発明の別の態様によれば、標的分析物を検出するための第2のバイオセンサースystemが提供される。このシステムは、所定の種類の生体細胞と、前記生体細胞内のシグナル生成レポーターであって、前記生体細胞内で生じる所定の变化に应答する、前記シグナル生成レポーターと、前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムであって、前記生体細胞内に所定の变化を誘導するように作動する、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムと、前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分であって、前記活性化メカニズムを誘発するように作動する、前記ユニバーサル検出成分と、前記ユニバーサル検出成分と関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分とを有し、標的分析物も結合している分析物結合成分が前記ユニバーサル検出成分に結合すると、前記ユニバーサル検出成分が前記活性化メカニズムを誘発させて前記生体細胞内での所定の变化を生じさせ、それによってシグナル生成レポーターに、検出可能なシグナルを生成させる、バイオセンサースystemを含む。

## 【0007】

本発明の別の態様によれば、標的分析物を検出するための第3のバイオセンサースystemが提供される。このシステムは、所定の種類の生体細胞と、前記生体細胞内のシグナル生成レポーターであって、前記生体細胞内で生じる所定の变化に应答する、前記シグナル生成レポーターと、前記シグナル生成レポーターに関連するシグナル伝達経路または活性化メカニズムであって、前記生体細胞内に所定の变化を誘導するように作動する、前記シグナル伝達経路または活性化メカニズムと、前記活性化メカニズムに関連するユニバーサル検出成分であって、前記活性化メカニズムを誘発するように作動する、前記ユニバーサル検出成分と、前記ユニバーサル検出成分と関連する分析物結合成分であって、前記ユニバーサル検出成分および標的分析物の両方に特異的である、前記分析物結合成分とを有し、標的分析物も結合している分析物結合成分が前記ユニバーサル検出成分に結合すると、前記ユニバーサル検出成分が前記活性化メカニズムを抑制して前記生体細胞内での所定の变化を減少させ、それによってシグナル生成レポーターに、減衰したシグナルを生成させ、またはシグナルを生成させない、バイオセンサースystemを含む。

## 【0008】

本発明のさらなる特徴および態様は、当業者であれば、例示的な実施形態の以下の詳細な説明を読んで理解することが明らかだろう。当業者によって理解されるように、本発明のさらなる実施形態は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく可能とされる。したがって、図面および関連する説明は、例示的であり、本質的な限定的ではないと見なされるべきである。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0009】

本明細書に組み込まれその一部を形成する添付の図面は、本発明の1つまたは複数の例示的な実施形態を概略的に示し、そして上記の一般的な説明および以下の詳細な説明と共に本発明の原理を説明するために提供する。

【図1】図1 a - b は、本発明の例示的な実施形態による第1のバイオセンサーの図示であり、ジャーカットT細胞がエクオリンを産生し、膜貫通非抗体シグナル伝達成分 Ig G b p - C D 3 を発現するように操作される。

【図2】図2 a - b は、本発明の例示的な実施形態による第2のバイオセンサーの図示であり、M C / 9 肥満細胞がエクオリンを産生するように操作されており、及びM C / 9 細胞が天然型受容体 F c R I を発現し、可溶性非抗体シグナル伝達成分 Ig G b p - I g E に結合する。

【図3】図3 a - b は、本発明の例示的な実施形態による第3のバイオセンサーの図示であり、M C / 9 肥満細胞がエクオリンを産生するように操作されており、M C / 9 細胞が天然型受容体 F c R I を発現し、M C / 9 肥満細胞によって排出された可溶性非抗体シグナル伝達成分 Ig G b p - I g E に結合する。

【図4】図4 は、本発明の例示的な実施形態による第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、エクオリンを産生し、ビオチン化検出素子に結合する膜貫通非抗体シグナル伝達素子 m S A - C D 3 を発現するように操作されている。

【図5】図5 は、本発明の例示的な実施形態による第5のバイオセンサーの図であり、バイオセンサー細胞が、エクオリンを産生し、ビオチン化された検出成分に結合する膜貫通非抗体シグナル伝達成分 m S A - C D 3 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】

## 【0010】

次に、本発明の例示的な実施形態について、図面を参照しながら説明する。以下の詳細な説明は例示の目的のための多くの詳細を含むが、当業者であれば、以下の詳細に対する多くの変形および変更が本発明の範囲内であることを理解するだろう。したがって、本発明の以下の実施形態は、特許請求の範囲に記載された発明に対する一般性を失うことなく、また限定を課すことなく説明される。

## 【0011】

本発明は、概して、生物学的サンプルまたは他のサンプルタイプ中の様々な分析物および/または他の関心のある標的を検出するためのシステム、デバイス、試薬、および方法に関し、より詳細には、バイオセンサーが試験されるサンプル中の対象の分析物と反応する際の検出可能なシグナルの放出に基づく、リアルタイムで対象の分析物を検出および同定するためのバイオセンサーベースのシステムに関する。本発明の操作された細胞は非常に高感度で有効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固有の検出能力を有するので、特定の病原体または他の目的の標的に対する特異性を有する可溶性検出器（例えば抗体）分子を単に選択することによって、それらは多種多様な感染因子または他の標的を検出するために容易に適応できる多用途システムを提供する。さらに、本発明のシステムは、単一のアッセイでいくつかの感染性病原体または他の分析物を多重検出するように容易に構成することができ、優れた柔軟性および有用性を提供する。本発明の汎用性は、成分の独特な組み合わせ、特に汎用バイオセンサー細胞と特定の可溶性検出器（例えば、抗体）との組み合わせに由来する。ユニバーサルバイオセンサー細胞は、検出分子によって認識され得る本質的に任意の標的分子の存在に応答する能力を有する。いくつかの実施形態において、検出因子または検出抗体は可溶性因子としてシステムに添加されるので、システムは、単に適切な代替の検出因子または検出抗体を選択することによって代替の標的を検出するように構成され得る。開示されたシステムの特異性は、感染性物質または他の標的分析物に特徴的な標的分子に対するその特異性および親和性に基づいて選択される検出分子によって決定される。この汎用バイオセンサー細胞と可溶性検出器の組み合わせはまた、試験系内に複数の検出分子（例えば抗体）を単に含めることによって多重



アッセイの構築を可能にし、ここで標的分子は代替感染因子または他の分析物に対する特異性に基づいて選択される。

【 0 0 1 2 】

本発明で使用されるバイオセンサー細胞型の遺伝子操作および改変は、典型的には、選択された細胞型において効率的に機能する遺伝成分を含む適切に選択された遺伝子送達手段の使用を含む。例えば、選択された特定のバイオセンサー細胞において導入された遺伝子の高レベルの発現を指示するプロモーター成分を使用することは有用である。本発明の例示的な実施形態では、そのようなプロモーター成分はバイオセンサー細胞自体から直接由来し得、次いで目的の導入遺伝子を発現するために使用され得る。本発明の別の実施形態では、選択した細胞型に有効なプロモーター、導入遺伝子、ベクターの組み合わせを同定するために、代替遺伝子送達手段の状況において代替プロモーター成分の機能を比較することによって適切な成分を経験的に決定し得る。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は、エレクトロポレーションなどの標準的な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使用してバイオセンサー細胞に導入することができる。当業者に周知の他の遺伝子工学的な方法もまた本発明と互換性がある。

10

【 0 0 1 3 】

本発明の例示的な実施形態は、生きた改変バイオセンサー細胞を含み、前記生きた改変バイオセンサー細胞は典型的には哺乳動物免疫系の構成要素であり、レポータータンパク質であって、前記レポータータンパク質は、生きた改変細胞によって発現され、及びその中に存在し、前記レポータータンパク質は、生きた改変細胞のサイトゾルの所定の変化に回答して検出可能なシグナルを放出するし、シグナル伝達経路であって、前記シグナル伝達経路は生きた改変細胞のサイトゾル内の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が起こる際に、少なくとも一つの生物学的または生化学的プロセスを引き起こすし、少なくとも一種の検出分子であって、各検出分子が特定の分析物に結合するように適合され、少なくとも一つの分析物であって、前記少なくとも一つの分析物は、その分析物に特異的な検出器分子に結合し、生きた、改変細胞によって発言された、いくつかの膜貫通非抗体シグナル伝達成分であって、前記各膜貫通非抗体シグナル伝達成分は、それ自体分析物を受容するように適合されている。それ自体が膜貫通非抗体シグナル伝達成分に結合される十分な数の分析物が十分な数の検出分子に結合すると、シグナル伝達成分の凝集が細胞表面で起こり、シグナル伝達経路が活性化され、生物学的または生化学的プロセスが起こり、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、生きたバイオセンサー細胞の生存率および機能性を維持しながら、生きた細胞を可溶性成分および目的の分析物または感染因子を含むサンプルと混合するための装置、およびバイオセンサー細胞によって放出されたシグナルを検出するための検出器を含み得る。

20

30

【 0 0 1 4 】

本発明の別の例示的な実施形態は、生きた改変細胞を含み、前記生きた改変細胞は哺乳動物免疫系の構成要素であり、前記生きた改変細胞は肥満細胞であり、及び肥満細胞は少なくとも一つの所定の受容体を発現し、レポータータンパク質であって、前記レポータータンパク質は生きた改変細胞によって発現されるエクオリンであり、前記エクオリンは生きた改変細胞のサイトゾルの所定の変化に回答して検出可能な光のシグナルを発し、生きた改変細胞によって発現されたシグナル伝達経路であって、シグナル伝達経路は、生体のサイトゾル内の生化学的プロセスを制御し、シグナル伝達経路によって制御された生化学的プロセスはさらに細胞内カルシウムを増加させ、細胞内カルシウムの増加は、それが起こると、エクオリンに検出可能な光を放出させ、少なくとも一種の検出分子であって、各検出分子は特定の分析物に結合するように適合され、少なくとも一種の分析物であって、前記少なくとも一種の分析物は、その分析物に特異的な検出器分子に結合するし、複数の可溶性非抗体シグナル伝達成分である。各シグナル伝達成分は、少なくとも一つの所定の受容体に結合し、前記検出分子を受容するように適合されている。十分な数の検体と十

40

50

分な数の検出分子と、それ自体が少なくとも１種類の所定の受容体に結合している十分な数の膜貫通非抗体シグナル伝達成分とが結合すると、受容体の凝集が細胞表面で起こる。細胞表面、シグナル伝達経路が活性化され、細胞内カルシウムの増加が起こり、検出可能な光がエクオリンによって放出される。このシステムはまた、生きたバイオセンサー細胞の生存率および機能性を維持しながら、生きた細胞を可溶性成分および目的の分析物または感染因子を含むサンプルと混合するための装置、およびバイオセンサー細胞によって放出されたシグナルを検出するための検出器を含み得る。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明のさらに別の例示的な実施形態は、迅速な検出のためのバイオセンサーを含み、前記バイオセンサーはさらに生きた改変細胞を含み、生きた改変細胞は哺乳動物免疫系の細胞成分（すなわち免疫細胞）に由来し、レポータータンパク質であって、前記レポータータンパク質は、生きた、改変細胞内に操作されて発現され、及びレポータータンパク質は、生きた、改変細胞のサイトゾルの所定の変化に応答して検出可能なシグナルを発し、生きた改変バイオセンサー細胞内に操作され、自然と起こり、前記シグナル伝達経路は、生きた改変バイオセンサー細胞のサイトゾル内の生物学的プロセスを制御し、前記生物学的プロセスは、それが起こるとレポータータンパク質を引き起し、分析されるべきサンプル中の分析物に直接的または間接的結合する非抗体シグナル伝達成分であって、前記非抗体シグナル伝達成分は、その後シグナル伝達経路を直接的または間接的に活性化するために、バイオセンサー細胞と協働する。

#### 【 0 0 1 6 】

##### 生体細胞

本発明の例示的な実施形態は、典型的には哺乳動物の免疫系の構成要素、例えば免疫細胞である、生きた、改変バイオセンサー細胞を含む。本発明のある態様において、バイオセンサー細胞はヒトまたはマウスの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において機能するリンパ球サブタイプの白血球の一種である。本発明の他の態様において、バイオセンサー細胞はヒトまたはマウスの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性免疫において中心的役割を果たす別の種類のリンパ球である。Ｔ細胞は、細胞表面にＴ細胞受容体が存在するため、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は肥満細胞である。肥満細胞は、免疫系や神経免疫系の一部である骨髄幹細胞から派生した顆粒球として知られる白血球の一種である。他の種類の白血球であり、そして外観および機能の両方が肥満細胞に類似している好塩基球を含む他の種類の細胞が本発明と適合する。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の他の実施形態では、生体細胞は原核細胞または、 $Ca^{2+}$ シグナル伝達系を含む真核細胞であり得る。生体細胞は、酵母細胞または昆虫細胞、例えばショウジョウバエシユナイダー２（Ｓ２）細胞である昆虫細胞、ｓｆ９細胞、またはレポーターとしてエクオリンを使用するように操作される昆虫細胞であり得る。生体細胞は、ＨＥＫ細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、または３Ｔ３細胞などの哺乳動物細胞であり得る。生体細胞は、改変細胞であり得る。改変細胞は、天然の、継代された、または培養された哺乳動物細胞に由来し得る。改変細胞は、提供される限り、非再生細胞、固定細胞、薬物または化学的に処理された細胞、浸透圧的に処理された細胞、放射細胞、人工または合成細胞、または非生体細胞に由来し得、改変細胞は、機能的リガンド、シグナル伝達経路およびレポーターを含むことを提供され得る。細胞は、人工細胞または合成細胞であり得る。改変細胞は、植物細胞、動物細胞、昆虫細胞または他の非哺乳動物細胞、哺乳動物免疫系の成分、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、単核食細胞、好中球、好酸球、または好塩基球に由来し得る。改変細胞はまた、Ｂリンパ球、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球および肥満細胞などのＦｃ受容体型を発現する細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は、天然に、遺伝子工学または化学的添加によってのいずれかで、適切な受容体、シグナル伝達経路、およびシグナ

ル出力方法を有する任意の原核細胞または真核細胞であり得る。細胞は、それが機能的受容体、シグナル伝達経路、およびシグナル出力方法を有するという条件で、人工または非生存ユニットであり得る。この系に有用な細胞の例は、細胞表面上にFc受容体を発現するヒト細胞系U937のようなマクロファージ細胞である。抗原は、標的への抗体の添加によって抗体に結合することができ、そしてこの抗原-抗体複合体は細胞上のFc受容体に結合し、そして細胞内カルシウムの増加をもたらすシグナル伝達を刺激するだろう。細胞は、固定、凍結、乾燥、または凍結乾燥することが可能である。

#### 【0018】

##### シグナル生成レポーター

本発明の例示的实施形態は、生きた、改変バイオセンサー細胞によって産生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成分を含む。レポータータンパク質は、生きた、改変バイオセンサー細胞のサイトゾルにおける特定の所定の変化に応答して検出可能なシグナルを発する。本発明の特定の实施形態では、レポータータンパク質は、水生動物 *Aequorea victoria* に由来するエクオリンなどの生物発光性発光タンパク質である。エクオリンは、生体シグナルセンサー細胞を操作して、さまざまなシグナル伝達経路の活性化に応答して光シグナルを生成するために使用され、そのように、生体細胞におけるエクオリンの産生を操作するための様々な方法は当業者によく知られている。特に、当業者は、適切な遺伝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ベクターなどの任意の適切な遺伝子送達手段を選択し使用し得る。バイオセンサー細胞内のレポータータンパク質の産生は、導入された遺伝物質の発現によって制御されるだろう。当業者であれば、また、他の発光タンパク質または他の種類のレポータータンパク質、酵素、および分子を本発明の様々な代替の実施形態に組み込んで利用できることも理解するだろう。

#### 【0019】

本発明の様々な実施形態において、レポーターは、少なくとも1つの生化学的経路の活性化および結果として生じる生体細胞の変化に応答して検出可能な変化を受ける蛍光特性を有するタンパク質であり得る。レポーターまたはレポータータンパク質は、オベリン、タラシコリン、ミトロコミン(ハリストリン)、クリチン(フィアリジン)、ニモブシン、ペロビン、インド-1、フラ-2、キン-2、フルオ-3、Rhod-2、カルシウムグリーン、BAPTA、カメレオン(A. Miyawaki et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 213540)、または同様の分子などの他のカルシウム感受性発光または蛍光分子であり得る。レポータータンパク質は、 $Ca^{2+}$ 結合ドメインおよび関連する蛍光タンパク質を含むキメラタンパク質であり得る。関連する蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質(GFP)であり得る。タンパク質は、ホスファチジルイノシトール経路(すなわち、本明細書に記載の実施形態で使用される経路)の他の成分と結合し、その蛍光を変え得る。一例は、ジアシルグリセロールと結合するように操作された蛍光タンパク質である。レポーターは、発光シグナルまたは蛍光シグナルを生じるように適合されている酵素であり得る。レポータータンパク質は、それぞれ発光シグナルまたは蛍光シグナルを生じるルシフェラーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素であり得る。それはまた、蛍光タンパク質であり得るか、または蛍光、荷電、もしくは磁性ナノ粒子、ナノドット、もしくは量子ドットを含み得る。レポーターは、蛍光、紫外線、または可視特性を有する染料とすることができ、蛍光、紫外線、または可視特性は、少なくとも1つの生化学的経路の活性化および結果として生じる生体細胞の変化に応じて検出可能な変化を受ける。

#### 【0020】

##### 活性化剤メカニズム

本発明の例示的实施形態は、生きた、改変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の形態の活性化剤機構を含む。シグナル伝達経路は、生きた、改変細胞のサイトゾル内の少なくとも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が起こると、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

特定の実施形態では、シグナル伝達経路は、受容体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ตอบสนองして細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が誘導される任意の生化学的経路である。本発明で使用さ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ตอบสนองして細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を生じさせ得る一組の生細胞から選択することができる。例えば、B細胞、T細胞、および肥満細胞は、B細胞受容体、T細胞受容体、およびFcγ受容体（肥満細胞）などの細胞表面シグナル伝達分子の活性化にตอบสนองして、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を誘導する能力を有する。

#### 【0021】

培養中で増殖する哺乳動物細胞は、典型的には特定の個々の細胞が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を誘導する異なる能力を有する可能性がある細胞集団を生成するので、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを生成するために、頑強な能力を有する細胞の亜集団またはクローン細胞株を選択又はスクリーニングすることが有用である。これは、例えばエクオリン誘発閃光の誘発を分析することによって達成することができる。特に、細胞への導入遺伝子の導入によって作り出されたトランスフェクタントは、多数の独立した遺伝子挿入事象に由来する細胞の混合集団である。したがって、バイオセンサー細胞を構築するとき、導入された導入遺伝子の有用な発現レベルと共に効率的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スクリーニングまたは選択することが有用である。高発現細胞の亜集団を選択するため、またはこの目的のためにクローン細胞株を作製するために蛍光活性化細胞選別（FACS）技術を使用することは特に有用である。

#### 【0022】

前述のように、エクオリンは、特にそのようなシグナル伝達経路が生細胞内の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの増加をもたらす場合、多種多様なシグナル伝達経路の活性化にตอบสนองして光シグナルを生成するように生きたバイオセンサー細胞を改変するために以前から使用されてきた。本発明の特定の実施形態において、レポータータンパク質としてエクオリンを産生するバイオセンサー細胞は、検出アッセイにおけるそれらの使用の前に、セレンテラジン（CTZ）を負荷される。この荷電工程はエクオリンを疎水性補欠分子族（例えば、CTZ）に共有結合させ、カルシウム（ $\text{Ca}^{2+}$ ）が結合すると、CTZは、立体構造変化を含む不可逆反応を受け、（469nmで）青色光を放射する。

#### 【0023】

上記のように、シグナル伝達経路は、小胞体から細胞質ゾルへのカルシウムイオンの放出によって第一のシグナルを伝達し得、第二のシグナルは、カルシウムイオンにตอบสนองしてレポーターによって放出され得る。このシグナル伝達経路は、B細胞、T細胞、肥満細胞、マクロファージ、およびその他の免疫細胞に見られるセカンドメッセンジャーカスケードで、細胞表面受容体の架橋がチロシンキナーゼを活性化し、それが次にホスホリパーゼCをリン酸化し、それがホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸（PIP<sub>2</sub>）からイノシトール1,4,5-トリスリン酸（IP<sub>3</sub>）、およびジアシルグリセロールへと突き進み、その後、IP<sub>3</sub>はカルシウムチャネルを開き、小胞体などの細胞内貯蔵からカルシウムを放出するか、または細胞外カルシウムを取り込むことによって、細胞のサイトゾル中のカルシウム濃度を上昇させる。受容体の種類、細胞の種類、および所望のシグナル伝達方法に応じて、G-タンパク質-アデニル環状-cAMP-タンパク質キナーゼAカスケードなどの代替のセカンドメッセンジャーカスケードを使用し得る。シグナル伝達経路はまた、ジアシルグリセロール、セラミド、または他の親油性セカンドメッセンジャー分子の放出によってシグナルを伝達することができ、レポーターはジアシルグリセロール、セラミド、または他の親油性セカンドメッセンジャー分子の放出にตอบสนองして第2のシグナルを放出する。シグナル伝達経路はまた、一酸化窒素（「NO」）、cAMP、cGMP、または他の環状ヌクレオチドの放出または産生によってシグナルを伝達することができ、レポーターはこの放出または産生にตอบสนองして第2のシグナルを放出する。シグナル伝達経路はまた、スーパーオキシド、過酸化水素、一酸化炭素、硫化水素、または他の二次レドックスメッセンジャーの放出または生成によってシグナルを伝達することができ、レポーターはスーパーオキシドの放出または生成にตอบสนองして第2のシグナルを放出する

。過酸化水素、一酸化炭素、硫化水素、または他の二次酸化還元メッセンジャー分子。特定の実施形態において、活性化剤メカニズムは、細胞のpHもしくは温度の変化、または細胞の電気的もしくは磁氣的性質の変化を含む。

#### 【0024】

##### ユニバーサル検出成分

本発明の例示的实施形態は、標的分析物を認識するためのユニバーサル検出成分として機能する様々な非抗体シグナル伝達成分を含む。各シグナル伝達成分は、典型的には、それ自体受け取るように適合される分析物結合成分（本明細書では「検出分子」とも呼ぶ）を結合する、すなわち対象の特定の分析物を結合するように、受け取るように適合される。一実施形態では、シグナル伝達成分は、バイオセンサー細胞の表面に改変されて発現され、最終的に検出可能なシグナルを放出するレポータータンパク質をもたらすシグナル伝達経路を活性化するように適合された膜貫通キメラ融合タンパク質である。別の実施形態では、シグナル伝達成分は、シグナル伝達経路を活性化するように適合され、最終的に検出可能なシグナルを発するレポータータンパク質を生じさせるように細胞表面シグナルトランスデューサーに結合するように適合される、天然の受容体またはレポータータンパク質のような、細胞表面シグナルトランスデューサーに結合するように適合される、可溶性キメラ融合タンパク質である。さらに別の実施形態では、シグナル伝達成分はバイオセンサー細胞内に改変され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、細胞外シグナルトランスデューサー、例えばシグナル伝達経路を活性化するように適合されて最終的には検出可能なシグナルを放出するレポータータンパク質を生じさせる細胞表面シグナルトランスデューサーに結合される、天然の受容体またはレポータータンパク質のような、細胞表面シグナル伝達に結合される細胞外空間に分泌／排出される。

#### 【0025】

本発明のキメラ融合タンパク質は、(i)少なくとも1つの種類の検出分子（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、(ii)生きた、改変バイオセンサー細胞によって通常発現されるレセプター複合体の成分を含みうる。いくつかの実施形態では、少なくとも1種類の検出分子に結合するように適合されるタンパク質の成分は、例えば、スト렙トGタンパク質のIgG結合ドメイン（本明細書ではIgGb pまたはIg b pと図中で呼ばれる）のような細菌結合タンパク質（すなわち、細菌に由来する抗体結合タンパク質）に由来し得る。可溶性抗体に対する結合タンパク質の親和性を高めるために、このIgG結合ドメインの縦列反復を含めることができる。代替の実施形態において、少なくとも1種類の検出分子に結合するように適合されているキメラ融合タンパク質の成分は、例えばマウスFcガンマRI（Fc RI）レセプターのような受容体タンパク質に由来する抗体結合ドメインである。様々な例示的实施形態では、生きた、改変バイオセンサー細胞によって通常発現される受容体複合体の成分は、IgM（B細胞バイオセンサー用）、Ig / （B細胞バイオセンサー用）、IgE（肥満細胞バイオセンサー用）、CD19（B細胞バイオセンサー用）、CD3ゼータ（T細胞バイオセンサー用）、またはFc RI（肥満細胞バイオセンサー用）である。

#### 【0026】

本発明の非抗体シグナル伝達成分は、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のような完全タンパク質配列または改変タンパク質断片のいずれかを含み得る。当業者であれば、より大きい分子の断片が合成遺伝子技術のような標準的な遺伝子工学技術を用いて作製され得ることを理解するだろう。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改変するために、より大きなタンパク質の断片を使用する場合、選択されたタンパク質断片の適切な立体配座の折り畳みを確実にするように改変されたタンパク質を設計することが重要である。したがって、タンパク質の二次構造を容易に形成しない短いスパーサーまたはリンカー成分を（融合タンパク質中に）含むことは有用である。例えば、グリシン、セリンおよびアラニンなどのアミノ酸の短い組み合わせをこれらのスパーサーまたはリンカー成分に使用することができる。例示的な実施形態において

、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）は、改変タンパク質分子（配列番号19参照）中の受容体複合体の成分から結合ドメインを分離するために使用される。検出成分をシグナル伝達成分に接続するため、またはシグナル伝達成分の異なるセグメントを相互接続するために使用されるペプチドリンカーまたはスパーサーに関して、リンカーは典型的にはある成分のカルボキシル末端を別の成分のアミノ末端に結合する。ペプチドリンカーは、0～25アミノ酸長または任意の中間整数値で変化し得、典型的には、常にではないが、グリシン（G）およびセリン（S）のような親水性アミノ酸を含む。

【0027】

前述のように、各シグナル伝達成分は、対象の特定の分析物に結合する検出分子に結合する。分析物に結合した検出分子は、（i）膜貫通シグナル伝達成分に結合する、または（ii）それ自体が細胞表面シグナルトランスデューサー（例えば天然受容体）に結合することになるシグナル伝達成分のいずれかを行う。第1の状況では、それ自身が膜貫通非抗体シグナル伝達成分に結合する十分な数の分析物が十分な数の検出分子に結合すると、シグナル伝達成分の凝集がバイオセンサー細胞表面上で起こる。経路が活性化され、生物学的プロセスが起こり、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の場合には、十分な数の分析物と十分な数の検出分子とそれ自身が適切な天然の受容体に結合する十分な数の非抗体シグナル伝達成分とが結合すると、細胞表面、シグナル伝達経路が活性化され、細胞内カルシウムの増加が起こり、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。

10

20

【0028】

各シグナル本発明の例示的实施形態による第1の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてIgM重鎖定常ドメイン（B細胞）に融合した細菌結合タンパク質（IgGbp）を含む。配列番号1は、シグナル伝達成分IgGbp-IgMのDNA配列を提供し、配列番号2は、シグナル伝達成分IgGbp-IgMのタンパク質配列を提供する。

【0029】

本発明の例示的实施形態による第2の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてB細胞受容体のIg / 成分に融合された細菌結合タンパク質（IgGbp）を含む。配列番号3は、シグナル伝達成分IgGbp-Ig / のDNA配列を提供し、配列番号4は、シグナル伝達成分IgGbp-Ig / のタンパク質配列を提供する。

30

【0030】

本発明の例示的实施形態による第3の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてT細胞受容体のCD3ゼータ鎖に融合した細菌結合タンパク質（IgGbp）を含む。配列番号5は、シグナル伝達成分IgGbp-CD3のDNA配列を提供し、配列番号6は、シグナル伝達成分IgGbp-CD3のタンパク質配列を提供する。

【0031】

本発明の例示的实施形態による第4の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてIgM重鎖定常ドメイン（B細胞）に融合したFcRI抗体結合ドメインを含む。配列番号7は、シグナル伝達成分FcRI-IgMのDNA配列を提供し、配列番号8は、シグナル伝達成分FcRI-IgMのタンパク質配列を提供する。

40

【0032】

本発明の例示的实施形態による第5の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてB細胞受容体のIg / 成分に融合したFcRI抗体結合ドメインを含む。配列番号9は、シグナル伝達成分FcRI-Ig / のDNA配列を提供し、配列番号10は、シグナル伝達成分FcRI-Ig / のタンパク質配列を提供する。

【0033】

本発明の例示的实施形態による第6の非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLリンカーを用いてT細胞受容体のCD3ゼータ鎖に融合したFcRI抗体結合ドメインを含

50

む。配列番号 11 は、シグナル伝達成分 Fc RI - CD3 の DNA 配列を提供し、配列番号 12 は、シグナル伝達成分 Fc RI - CD3 のタンパク質配列を提供する。

【0034】

本発明に従う第 7 の例示的非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLinker を用いて IgE 定常ドメイン (B 細胞) に融合された細菌結合タンパク質 (IgGbp) を含む。配列番号 13 は、シグナル伝達成分 IgGbp - IgE の DNA 配列を提供し、配列番号 14 は、シグナル伝達成分 IgGbp - IgE のタンパク質配列を提供する。

【0035】

本発明による第 8 の例示的な非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLinker を用いて IgE 定常ドメイン (B 細胞) に融合した Fc RI 抗体結合ドメインを含む。配列番号 15 は、シグナル伝達成分 Fc RI - IgE の DNA 配列を提供し、配列番号 16 は、シグナル伝達成分 Fc RI - IgE のタンパク質配列を提供する。

10

【0036】

本発明による第 9 の例示的非抗体シグナル伝達成分は、GSASGSGLinker を用いて T 細胞受容体の CD3 ゼータ鎖に融合した単量体ストレプトアビジンを含む。配列番号 17 は、シグナル伝達成分 mSA - CD3 の DNA 配列を提供し、および配列番号 18 は、シグナル伝達成分 mSA - CD3 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分解し、及び得られた単離されたサブユニットの溶解性を増強する突然変異を含むストレプトアビジンの組換え型である。

20

【0037】

様々な実施形態において、ユニバーサル検出成分は、抗体 VDJ 領域、Fab フラグメントまたは他の抗体決定基を含む。ユニバーサル検出成分は、T 細胞 VJ 領域、VDJ 領域、または他の T 細胞受容体決定基を含み得る。ユニバーサル検出成分は、合成ペプチド、ペプチドではない小さな有機決定基、タンパク質またはペプチド決定基、レクチン決定基、炭水化物結合モジュール、または他の炭水化物結合決定基、脂質結合決定基、または金属または他の金属結合決定基を結合するメタロチオン決定基を含み得る。

【0038】

ユニバーサル検出成分は、生きた、生体細胞によって発現されるシグナル伝達経路に共有結合することが可能である。一例は、アンカー部分がシグナル伝達経路の一部である、すなわち、細胞の外側から細胞内にシグナルを伝達する膜アンカー抗体である。いくつかの実施形態では、ユニバーサル検出成分はモジュール式ではないが、シグナル伝達経路の不可欠な部分、例えばその経路を形成するキメラタンパク質の一部である。ユニバーサル検出成分は、シグナル伝達経路に非共有結合することができる。一例は、Fc 受容体を担持する分子が膜を通してシグナルを伝達する、シグナル伝達分子上の Fc 受容体に外部的に結合した抗体である。他の実施形態では、ユニバーサル検出成分はモジュール式であり、シグナル伝達経路を含む細胞には、選択のユニバーサル検出成分を装填することができる。ユニバーサル検出成分は、シグナル伝達経路の一部に非共有結合する決定基を含むことができ、またはユニバーサル検出成分は、それをシグナル変換経路の Fc 結合部分に非共有結合する Fc 決定基を含み得る。ユニバーサル検出器成分は、それをシグナル伝達経路のビオチンまたは (ストレプト) アビジン結合部分に非共有結合させるビオチンまたは (ストレプト) アビジン決定基を含み得る。

30

40

【0039】

検体結合成分 / 検出分子

本発明の例示的な実施形態は、本明細書で「検出分子」とも呼ばれる少なくとも 1 種類の検体結合成分を含み、各検体結合成分は特定の標的検体に結合するようになっている。分析物結合成分は、バイオセンサー細胞によって決して発現されない可溶性抗体であり得る。本発明と共に使用される特定の分析物結合成分は、対象の標的分析物を明確に同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、分析物結合成分は、感染性物質などの特定の分析物に特異的な市販の IgG などの可溶性抗体である。別の例示的な実施形態では、分析物結合成分は、例えば抗自己抗原抗体に特異的なビオチン化自己抗原分

50

子などの所定の分析物に特異的なビオチン化分子（またはストレプトアビジン系分子）である。本発明による検出器または標的分子は、自己抗原または自己免疫疾患に関連する自己抗体を含み得る。代表的な自己免疫疾患または障害としては、慢性関節リウマチ（RA）、若年性RA（JRA）、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス、橋本病、グレーブス病、強皮症、セリアック病、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、ウェゲナー肉芽腫症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、多発性筋痛リウマチ、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、およびギランバレー症候群が挙げられる。検出分子または標的分子はまた、腫瘍特異的もしくは腫瘍関連抗原、またはEGFのような生物学的に活性な分子、インスリンおよび成長ホルモンを含むペプチドホルモン、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロン、TNFなど、またはそのような生物学的に活性な分子に対する抗体のような抗原に対する抗体を含み得る。

10

#### 【0040】

本発明のシステムは、IgG断片を含む検体結合成分をさらに含むことができ、IgG断片は一本鎖抗体または一本鎖ダイアボディであり得る。検出器はまた、アフィボディ（すなわち、改変された結合タンパク質）、アプタマー（例えば、リガンドに結合するように改変されたDNAまたはRNA分子）、または感染性ウイルスに対する可溶性受容体などの可溶性受容体であり得る。

#### 【0041】

##### 標的分析物および試験サンプル

本発明の意図された用途は、試験されるべきサンプル内に存在する、または存在する可能性がある様々な検体の検出である。本発明の例示的实施形態では、検出される分析物は、その分析物に特異的な可溶性抗体などの検出分子に結合する。試験されるべきサンプルは、(i)牛肉、豚肉、子羊肉、パイソン、家禽、およびシーフードなどの肉、及び(ii)植物や野菜を含む多数の食物源から採取されても良い。試験されるべきサンプルはまた、水、消費可能な流体、保存流体、および血液のような体液のような他の多くの供給源からも採取され得る。検出され得る分析物は、化学物質、毒素、及びウイルス、細菌、および他の生物学的材料または物質などの感染性物質などの検出物質または検出分子に特異的に結合する事実上あらゆるものを含む。本発明の例示的实施形態では、特定の感染性病原体は大腸菌であるが、他の感染性病原体（サルモネラ菌、リステリア菌、およびカンピロバクターなど）および汚染物質も本発明で検出することができる。別々のアッセイまたは多重アッセイのいずれにおいても、大腸菌O157 H7、O26、O45、O103、O111、O121、およびO145は、すべて本発明を用いて検出され得る。

20

30

#### 【0042】

本発明は、肉病原体、ならびにハウレンソウ、レタス、ならびに他の野菜および食品に見られるものを含む多くの異なる検体を検出することができる。分析物は、線状エピトープまたは立体構造エピトープの両方を含む、抗原またはアレルゲンの1つまたは複数のエピトープを含み得、それはまた1つ以上のリガンドまたは相互受容体またはリガンドによって認識される受容体を含み得る。例示的な分析物には、バチルス（例えば、炭疽菌）、腸内細菌科（例えば、サルモネラ菌、大腸菌、クレブシエラ、および赤痢菌）、エルシニア（例えば、ペスト菌または腸球菌）などの細菌、ブドウ球菌（黄色ブドウ球菌）、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、淋病、腸球菌（例えば大腸菌）、リステリア菌（例えば*L. monocytogenes*）、ブルセラ菌（例えば*B. abortus*、*B. melitensis*、または*B. suis*）、ビブリオ（例えば*B. suis*）、コレラバクテリウム、コリネバクテリウムジフテリア、シュードモナス属（例えば、シュードモナス属または緑膿菌）、バークホルデリア属（例えば、バチルスマレイまたはシュードマレア）、赤痢菌（例えば、*S. ディセンテリア*）、リケッチア（例えば、*R. rickettsii*、*R. prowazekii*、または*R. typhi*）、*Francisella tularensis*、*Chlamydia psittaci*、*Coxiella burnetii*、*Mycoplasma*（例えば、*M. mycoides*）などが含まれる。

40

50



ピーナッツダスト、マイコトキシン、カビ胞子などのアレルゲン；またはボツリヌス菌およびC．パーフリンジエンスなどの細菌胞子；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などの毒素；アデノウイルス科（例、アデノウイルス）、アレナウイルス（例、マチュポウイルス）、ブナウイルス（例、ハンタウイルスまたはリフトバレー熱ウイルス）、コロナウイルス、オルトミクソウイルス（例、インフルエンザウイルス）、フィロウイルス科（例、エボラウイルスおよびマルブルグ）、フラビウイルス科（例、日本脳炎ウイルスおよび黄熱病ウイルス）、ヘパドナウイルス科（例、B型肝炎ウイルス）、ヘルペスウイルス科（例、単純ヘルペスウイルス）、パポバウイルス科（例、パピローマウイルス）、パラミクソウイルス科（例えば、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルス、またはパラインフルエンザウイルス）、パルボウイルス科（例えば、ポリオウイルス）、ボックスウイルス科（例えば、ポリオウイルス）、レオウイルス科（例えば、ロタウイルス）、レトロウイルス科（例えば、ヒトT細胞）リンパ球向性ウイルス（HTLV）およびヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ラブドウイルス科（例えば、狂犬病ウイルス）、およびトガウイルス科（例えば、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス、および風疹ウイルス）などのウイルス；クリプトスポリジウム・パルバム、脳炎、マラリア原虫、トキソプラズマ、アカントアメーバ、赤痢アメーバ、ジアルジア・ランブリア、トリコモナス・バギナリス、リーシュマニア、またはトリパノソーマ（例えば、T．ブルセイおよびT．クルージ）などの原生動物；条虫（サナダムシ）、吸虫（吸虫類）または線虫（回虫、例えば、*Ancar is lumricoides*、*Trichuris trichura*、*Necator americanus*、または*Ancylostoma duodenale*）などの寄生蠕虫；寄生虫（例えば、本明細書に記載の原生動物または蠕虫）などの寄生蠕虫；*Aspergilli*、*Candidae*、*Coccidioides immitis*、*Cryptococci*などの真菌；環境汚染物質水添加剤；農業マーカー；核酸（例えば、染色体、プラスミド、ウイルスゲノム、プライマー、または遺伝子を含む、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、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；砂糖；脂質；リポ多糖類；塩；またはイオンを含む。標的はまた、サルモネラ菌（例えば、ネズミチフス菌）、病原性大腸菌（例えば、O157：H7）、ボツリヌス菌（例えば、B．セレウス）、ボツリヌス菌、リステリアモノサイトゲネス、エルシニア（例えば、*Y．enterocolitica*）、*Norovirus*（例えば、*Norwalk*ウイルス）、*Shigella*、*Staphylococcus aureus*、*Toxoplasma gondii*、*Vibrio*（例えば、*V．vulnificus*、*V．cholera*、*V．parahaemolyticus*）、*Campylobacter jejuni*、および*Clostridium perfringens*などの食品媒介病原体を含む。炭疽菌、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、ブルセラ（例えば、B．スイス）、ブルクホルデリア・マレイ、ブルクホルデリア・シュードマレイ、赤痢菌、ボツリヌス菌、バリオラ（例えば、V．メジャー）、フィロウイルス科ウイルス（例えば、*Filovirb olae lae*）（例：フィロウイルス）など、およびマールブルクウイルス、アレナウイルス科（例えば、ラッサウイルスおよびマチュポウイルス）、クロストリジウムパーフリンジエンス、任意の食品媒介病原体（例えば、サルモネラ種、大腸菌O157：H7、または赤痢菌）、クラミジアブシタシ、コクシエラブルネチ、黄色ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌（例えば、*R．prowazekii*または*R．rickettsii*）、アルファウイルス（例えば、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、または西部馬脳炎ウイルス）、コレラ菌、クリプトスポリジウムパルバム、ヘニパウイルス（例えば、ニパウイルス）、*Bonyaviridae*（例えば、ハンタウイルスまたはリフトバレー熱ウイルス）、フラビウイルス科（例えば、日本脳炎ウイルスおよび黄熱病ウイルス）、およびコクシジオイデス属を含む。

【0043】

10

20

30

40

50

分析物または分析物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断片）が特異的に結合することができる抗原上の抗原決定基部位である。エピトープは、タンパク質の三次折り畳みによって並置された隣接アミノ酸または非隣接アミノ酸の両方から形成され得る。エピトープは、免疫グロブリンの F a b（可変）領域（「イディオタイプ決定基」と呼ばれる）に見出され得、免疫グロブリンの「イディオタイプ」を含む。エピトープおよび抗原は、天然に存在しても人工的に產生されてもよい。エピトープまたは抗原の性質に依存して、エピトープまたは抗原は、例えば、起源のマトリックスまたは物質から単離または精製され、合成され、または組換え的に產生され得る。分析物として有用なエピトープおよび抗原は、ヒトまたは非ヒト動物、植物、細菌、原生動物、寄生虫、ウイルスなどに由来し得る。いくつかの実施形態において、分析物は、ポリペプチド、核酸分子、炭水化物、糖タンパク質、脂質、リボタンパク質である。糖脂質、または小分子。いくつかの実施形態では、分析物は、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、内因性抗原、感染因子抗原、薬物（小分子）抗原、毒素、毒素、生物学的抗原、環境抗原、移植抗原、および移植抗原の中から選択される。

10

20

30

40

50

#### 【0044】

分析物は、癌抗原のエピトープを含み得る。いくつかの態様において、分析物は、腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態では、分析物は、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、分析物は、腫瘍関連抗原（TAA）であり、TAAは、野生型タンパク質とは異なる1つまたは複数の翻訳後修飾を有する炭水化物抗原であり、悪性細胞には存在するが非悪性細胞には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、および/またはTAAは、自己分泌活性化のために腫瘍細胞において調節解除および/または機能不全である受容体チロシンキナーゼ（RTK）、染色体転座、RTKの過剰発現、またはRTK遺伝子またはタンパク質における機能獲得型変異を含む。本発明のいくつかの実施形態では、分析物は、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細胞悪性腫瘍の例には、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、マントル細胞リンパ腫および多発性骨髄腫が含まれるが、これらに限定されない。さらなるB細胞悪性腫瘍には、例えば、B細胞性前リンパ球性白血病、リンパ形質白血病、脾臓周辺帯リンパ腫、周辺帯リンパ腫（節外および節）、形質細胞腫瘍（例、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖疾患）、および濾胞性リンパ腫（例えば、グレードI、II、III、またはIV）が含まれる。

#### 【0045】

いくつかの実施形態において、分析物は、被験体から得られた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、腫瘍関連抗原は、17-1A、707-AP、AFP、アネキシンII、ART-4、BAGE、BAGE-1、-カテニン、BCG、bcr/abl、Bcr/abl e14a2融合接合、bcr-abl (b3a2)、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、bcr-abl p210 (b3a2) 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、HERV-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、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）、人乳脂肪球（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 - A 1 - 12、MAGE - C 2、MAHGE - 3、MART - 1 / Melan - A、MC 1 R、ME 4 9 1、MUC 1、MUC 2、ムチン、MUM - 1、MUM - 2、MUM - 3、変異 p 5 3、ミオシン、MZ 2 - E、N 9 ノイラミニダーゼ、NA 8 8、NA 8 8 - A、上咽頭癌抗原、NGA、NK 1 / c - 3、新規 b c r / a b l k 融合 B C R エクソン 1、1 3、1 4、A B L エクソン 4、NY - E S O - 1 / L A G E - 2、NY - E S O - 1 b、O C 1 2 5、骨肉腫関連抗原 - 1、P 1 5、p 1 9 0 最小 b c r - a b l ( e 1 a 2 )、p 5 3、P m 1 / R A R a、ポリシアル酸、P R A M E、P S A、P S M、R U 1、R U 2、S A G E、S A R T - 1、S A R T - 2、S A R T - 3、S A R T - 3、シアリル L e A、S p 1 7、S S X - 2、S S X - 4、表面免疫グロブリン、T A G - 1、T A G - 2、T E L / A M L 1、T P I、T R A G - 3、T R P - 1 ( g p 7 5 )、T R P - 2、T R P 2 - I N T 2、h T R T、腫瘍関連糖タンパク質 - 7 2 ( T A G - 7 2 )、チロシナーゼ、u - P A、W T 1、および X A G E - 1 b、または前述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 つまたは複数の抗原である。いくつかの実施形態において、腫瘍関連抗原は、S E R E X (組換え c D N A 発現ライブラリーの血清学的分析) アプローチによって、または様々な起源の腫瘍組織もしくはは癌細胞株から作製された c D N A 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同定され、自己由来の血清との反応性に基づいて免疫原性腫瘍タンパク質を同定する。いくつかの実施形態では、分析物は、野生型タンパク質とは異なる 1 つまたは複数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、腫瘍関連抗原は、悪性細胞には見られるが非悪性細胞には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、腫瘍関連抗原は、自己分泌活性化、染色体転座、R T K 過剰発現、または R T K 遺伝子もしくははタンパク質における機能獲得型変異のために腫瘍細胞において調節解除および / または機能不全である受容体チロシキナーゼを含む。

#### 【0046】

分析物は、被験体に対して病原性または非病原性のいずれかであり得る感染性または非感染性物質の抗原のエピトープを含み得る。分析物は、ヒトの消化管、粘膜表面、または上皮中のプロバイオティックまたは共生微生物などの、動物または植物のバイオーム中の任意の微生物を含む、共存、寄生、または共生微生物に由来し得る。いくつかの実施形態では、細菌性病原体は、アシネトバクター・バウマニ (旧 *Acinetobacter calcoaceticus*)、アクチノバチルス、*Actinomyces pyogenes* (旧コリネバクテリウム・ピオゲネス)、アクチノミセス・イスラエリ、ノーカディア小惑星、*Aeromonas hydrophila*、*Amycolata autotrophica*、*Archaeobacterium haemolyticum* (旧コリネバクテリウムヘモリチカム)、*Arizona hinsawii* - すべての血清型、炭疽菌、バクテロイデスフラジリス、*B. キンタナ*、*B. ヴィンソニー*、*B. pertussis* を含む *Bordetella*、*Borrelia recurrentis*、*B. burgdorferi*、*Burkholderia* (BSL III を除く旧 *Pseudomonas*)、カンピロバクター・コリ、*C. フェタス*、*C. ジェジュニ*、クラミジア・プシタシ、*C. トラコマチス*、*C. ニューモニア*、ボツリヌス菌 (神経毒素産生種)、ボツリヌス菌神経毒、*Cl. chauvoei*、*Cl. ヘモリチカム*、*Cl. ヒストリチカム*、*Cl. ノビイ*、*Cl. 敗血症*、*Cl. テタニ*、*Cl. Perfringens* イブシロン毒素、*Corynebacterium diphtheriae*、*C. pseudotuberculosis*、*C. renale*、*Dermatophilus congolensis*、*Edwardsiella tarda*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、大腸菌 - 大腸菌 O 1 5 7 を含むすべての腸病原性、エンテロトキシン性、毒素原性、腸管侵入性および K1 抗原を持つ株、ヘモフィルス・デュクレイ、インフルエンザ菌、ヘリコバクターピロリ、クレブシエラ - *K. oxytoca* (RG 1) を除くすべての種、*L. pneumophila* を含むレジオネラ - *Leptospira interrogans* - すべての血清型、リステ

リア、モラクセラ、マイコバクテリウム（BSL IIIにリストされたものを除く）ア  
 ビウム複合体、M. アシアチカム、M. ボビスBCGワクチン株、M. ケロネイ、M. カ  
 ンサシ、M. レブラエ、M. マルモセンス、M. マリナム、M. M. シミアエ、M. スル  
 ガイ、M. ウルセランス、M. キセノピ、マイコプラズマ、N. メニンギティデス、N.  
 courdia asteroides、N. ブラジリエンシス、N. オティティススカ  
 ビアス、N. アリゾナエを含むサルモネラ菌、コレラ菌、腸炎菌、ガレナリウムブルモラ  
 ム菌、パラチフス菌、A、B、C、S菌、ネズミチフス菌、ネズミチフス菌を含むシゲラ  
 菌、S. ボイディ菌、S. 1型赤痢菌、S. フレックスネリ、S.、B. abortus  
 、B. canis、B. suis、B. melitensis、B. pseudomall  
 lei、Coxiella burnetii、Francisella tulare  
 nsis、Mycobacterium bovis（BSG II - を含む）、Yer  
 sinia enterocolitica、Bartonella、ブルセラクラミジ  
 ア、結核菌、マイコバクテリアその他を含む抗菌剤結核（MOTT）、パスツレラ・ムル  
 トシダB型 - 「バッファロー」および他のビルレント株、Rickettsia aka  
 ri、R. australis、R. canada、R. prowazekii、R. r  
 ickettsii、R. シベリカ、R. tsutsugamushi、R. typhi  
 （R. mooseri）、Yersinia pestisから選択される。

#### 【0047】

分析物は、ウイルス性病原体に由来し得る。例えば、いくつかの実施形態では、分析物  
 は、アデノウイルス、ヒト - 全種類、アルファウイルス（トガウイルス）、東部馬脳炎ウ  
 イルス、東部馬脳脊髄炎ウイルス、ベネズエラ馬脳脊髄炎ワクチン株TC - 83、西部馬  
 脳脊髄炎ウイルス、アレナウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（非神経向性株）、  
 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  
 イルスワクチン株MP - 12、カルシウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス（トガ  
 ウイルス） - グループBアルボウイルス、デング熱ウイルス血清型1、2、3、および4  
 、黄熱病ウイルスワクチン株17D、A型肝炎、B、C、D、およびE型ウイルス、サイ  
 トメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、ヘルペス1型および2型単純ヘルペス、  
 6型および7型ヒトヘルペスウイルス、A型、B型、およびC型インフルエンザウイルス  
 、ニューカッスル病ウイルス、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルス、パラインフルエン  
 ザウイルス1型、2型、3型、4型、ポリオーマウイルス（JCウイルス、BKウイルス  
 ）、RSウイルス、ヒトパルボウイルス（B 19）、コクサッキーウイルスA型および  
 B型、エコーウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、アストリム（ヴァリオラマイ  
 ナーウイルス）、スモールポックス（ヴァリオラメジャーウイルス）、ホワイトポックス  
 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（コロラドダニ  
 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熱ウイルス）、屈曲性、リ  
 ンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCM）（神経栄養性株）、ハンターウイルス、リフトバ  
 レーウイルスなど脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス、サルボックスウイルス、1型および2  
 型ヒト免疫不全ウイルス（HTLV）、1型および2型ヒト免疫不全ウイルス（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・コンゴ出血熱ウイルス、エボラウイルス、マールブ  
 ルクウイルス、ダニ媒介脳炎を含むダニ媒介脳炎、極東ダニ媒介脳炎、ハンザロバ、Hy  
 pr、Kumlinge、Kyasanur森林病、オムスク出血熱、およびロシアの春  
 夏脳炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス（ヘルペスBまたはサルBウイルス）、チェルコ  
 ピットヘシンヘルペスウイルス1（ヘルペスBウイルス）、ウマモルビリウイルス（ヘン  
 ドラおよびヘンドラ様ウイルス）、ニパウイルス、ヴァリオラメジャーウイルス（スモ  
 ールポックスウイルス）、ヴァリオラマイナーウイルス（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）、ブルータンウイルス、ラクダボックスウイルス、クラシックブタ熱ウイルス、カ

10

20

30

40

50

ウドリアルミナンチウム（ハートウォーター）、口蹄疫ウイルス、山羊ポックスウイルス、日本脳炎ウイルス、ゴツゴツジ皮膚病ウイルス、悪性カタル熱ウイルス、メナングルウイルス、ニューカッスル病ウイルス（VND）、ペステデブチルミナントウイルス、リンダーペストウイルス、ヒツジポックスウイルス、ブタ水疱性ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（エキゾチック）から選択されるウイルス病原体に由来する。

#### 【0048】

分析物は寄生虫由来であり得る。例えば、いくつかの態様において、分析物は、*A. duodenale*を含むアncylostomaヒト鉤虫、*Ascaris lumbricoides suum*を含むアスカリス、*B. divergens*を含むバベシア、*malayi*、*B. timori*、*Coccidia*、*C. parvum*を含むクリプトスポリジウム、*Cysticercus cellulosae*（*T. solium*の幼虫）、*E. granulosis*を含む*Echinococcus*、*E. multilocularis*、*E. vogeli*、*Entamoeba histolytica*、*Enterobius*、*F*を含む*Fasciola Liglia*を含む*Giardia*、*G. lamblia*を含む*Giardia*、*H. diminuta*を含む*Hymenolepis*、*H. nana*、*Isospora*、*L. braziliensis*を含む*L. eishmania*、*L. ドノバニ*、*L. エチオピア*、*L. メジャー*、*L. メキシカーナ*、*L. peruvania*、*L. tropica*、*Loa loa firria*ウォーム、*Microsporidium*、*Naegleria fowleri*、*N. americanus*を含むネクターのヒト鉤虫、*O. ビバックス*、サルコックス、*S. スイホミニス*を含むイシス、*S. ヘマトビウム*を含む住血吸虫、*S. ジャボニカム*、*S. マンソニ*、*S. メコンギ*、*S. ステレコラリス*を含むストロングロイデス、*Taenia solium*、*T. canis*を含むトキソカラ、*T. 旋毛虫*、*T. ブルセイブルセイ*、*T. ブルセイガンピエンセ*、*T. ブルセイローデシエンセ*、*T. クルージ*、または*Wuchereria bancrofti*フィラリアワームを含むトリパノソーマからなる群から選択される寄生虫に由来する。

#### 【0049】

分析物は真菌病原体であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、分析物は、アスペルギルスフミゲート、ブラストミセスデルマティディス、*Cladosporium bantianum*、カンジダアルビカンス、*C. (キシロフィファ)トリコイデス*、クリプトコッカスネオフォルマンズ、ダクティリアガロババ（オクトロミアゾロミゾウゾウリムシ）、表皮病菌（*Epidermophyton*）、*Exophiala (Wangielia)*皮膚炎（*dermatitidis*）、フォンセカオ・ペドロソイ（*Fonsecaea pedrosoi*）、*Microsporum*、*Paracoccidioides braziliensis*、*Penicillium marneffe*i、ニューモシスティスカリニ（*Pneumocystis carinii*）、*Sporothrix schenckii*、白癬菌（*Trichophyton*）、*Coccidioides immitis*、コクシジオイデスボサダシ（*Coccidioides posadasii*）、*Histoplasma capsulatum*、*H. capsulatum var. duboisii*から選択される真菌性病原体に由来する。

#### 【0050】

分析物は毒素であり得る。いくつかの実施形態では、分析物は、アブリン、ボツリヌス神経毒、ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）イブシロン毒、コノトキシン、ジアセトキシシルベノール、リシン、サキシトキシン、志賀様リボソーム不活性化タンパク質、シガトキシン、ブドウ球菌エンテロトキシン、*T-2*毒素、およびテトロン毒素から選択される毒素である。

#### 【0051】

いくつかの実施形態において、分析物は、*B*型肝炎表面抗原（*HBsAg*）、*B. ブルグドルフェリ**OspA*、*HPV L1*、*RSV F*タンパク質、インフルエンザハマグ

10

20

30

40

50

タニン、インフルエンザステムループ領域、インフルエンザM2、P．ファルシパルムメロゾイト表面タンパク質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周回スロゾイトタンパク質、スロゾイト表面プロテイン2、SSP2/TRAP、CSP-N、CSP-R、CSP-1、MSP-1、MSP-9、DBPRII、AMA-1、Pvs25、Pvs28、黄色ブドウ球菌莢膜多糖、ポリ-N-アセチルグルコサミン、HIV gp120、gp41、およびデング熱ウイルス保存領域から選択される。

#### 【0052】

別の実施形態では、分析物は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、天然に存在するもの、またはアレルギーワクチンに含まれるアレルゲンなどの人工物であり得る。アレルゲンの例には、動物性製品（例えば、Feild 1、毛皮のふけ、ゴキブリのカリックス、ウール、ダニのダニ排泄）、薬物（例えば、ペニシリン、スルホンアミド、サリチル酸塩、局所麻酔薬）、食品が（例えば、セロリ及びセロリアック、トウモロコシ、卵（例えば、アルブミン）、果物、豆類（例えば、豆、エンドウ豆、ピーナッツ、大豆）、牛乳、シーフード（例えば、貝）、ゴマ、大豆、木の実（例えば、ピーカン、アーモンド）、小麦、昆虫毒（例えば、蟻、ミツバチ毒、スズメバチ毒）、ラテックス、金属、植物花粉（例えば、草（例えば、ライグラス、チモシーグラス、雑草）（例えば、ブタクサ、オオバコ、イラクサ、アルテミシア・ブルガリス、ケモノアルバム、スイバ）、および木（例えば、シラカバ、アルダー、ハシバミ、シデ、ヤナギ、ポプラ、ブラタナス、ティリア、オレア、アッシュジュニパー）含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、分析物は、ラテックスタンパク質、例えば、未処理ラテックス液、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および高温にさらさ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、アレルゲンは、ダニのアレルゲン、例えば、*Dermatophagoides farinae*、*Dermatophagoides pteronyssinus*、ダニシロ（*Acarus siro*）、プロミア・トロピカリス（*Blomia tropicalis*）、*Chortoglyphus arcuatas*、*Euroglyphus cannei*、*Lepidoglyphus destructor*、*Tyrophagus putrescentiae*、または*Glyphapsgous*である。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、毒液、例えば、ボンブス種（*Bombus spp.*）、*Vespa crabro*、*Apis mellifera*、*Dolichovespula spp.*、*Polistes spp.*、*Vespula spp.*、*Dolichovespula maculata*、または*Dolichovespula arenaria*に由来する。いくつかの実施形態では、分析物は、昆虫由来のアレルゲン、例えば、*Camponotus pennsylvanicus*、*Solenopsis invicta*、*Solenopsis richteri*、ペリプラッタ アメリカナ（*Periplaneta Americana*）、*Blattella germanica*、ブラッタ・オリエンタルズ（*Blatta orientalis*）、*Tebanus spp.*、ムスカドメスティカ（*Musca domestica*）、*Ephemeroptera sp.*、*Culicidae sp.*、またはヘテロセラ属（*Heterocera spp.*）である。

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、例えば、セリヌス・カナリア、フェリス・キャタス（ドメスティクス）、*Bos taurus*、*Gallus gallus*（ドメスティクス）、カニス・ファミリアリス、アリアス・ブラチリンクス、メリオネス・ウギクラス、カブラ・ヒーカス、*Anser domesticus*、*Cavia p*

10

20

30

40

50

orcellus (コバヤ (cobaya)), Mesocrietus auratus、Sus scrofa、Equus caballus、Psittacidae、Columba fasciata、Oryctolagus cuniculus、Rattus norvegicus、またはOvis ariesなどの生物由来の上皮、フケまたは毛髪である。

#### 【0055】

いくつかの実施形態において、アレルゲン分析物は真菌由来である、例えば、セファロスポリウムのアクレモニウム、アルテルナリアのテヌイ (tenuis)、アスペルギルスグラウコス、アスペルギルス・フラパス、アスペルギルス・フミガーツス、アスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・テレウス、アスペルギルス・ベルシカラー、アウレオバシジウムブルラン (Pullularia pullulans)、Drechslera sorokiniana、ヘルミントスポリウムマメ、ボトリティスシネレア (Botrytis cinerea)、カンジダ・アルビカンズ (Candida albicans)、Chaetomium globosum、Cladosporium herbarum、Cladosporium sphaerospermum (Homodendrum hordei)、Drechslera spicifera (Curvularia spicifera)、Epicoccum nigrum (Epicoccumのpurpurascens)、Epidermophyton floccosum、Fusarium moniliforme、フザリウム・ソラニ (Fusarium solani)、Geotrichum candidum、グリオクラディウム・ビリデ (Gliocladium viride)、Helminthosporium solani、Microsporum canis、Mucor circinelloides f. circinelloides、Mucor circinelloides f. lusitanicus、Mucor plumbeus、Mycogone perniciosa、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である。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、スマット、例えば、ウスチラゴ・ヌダ、ウスチラゴ・シノドンティス、ウスチラゴ・キャンディス、スポリソリウム・クレンタム、ウスチラゴ・アヴェナエ、またはウスチラゴ・トリティシ由来である。

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、例えば、Paspalum notatum、Cynodon dactylon、Poa compressa、Bromus inennis、Phalaris arundinacea、Zea mays、Elytrigia repens (アグロピロンレペンス)、Sorghum halepense、Poa pratensis、Festuca pratensis (Festuca pratensis)、Avena sativa、Dactylis glomerata、Agrostis gigantea (アルバ)、Secale

10

20

30

40

50

cereale、Leymus (Elymus) condensatus、Lolium perenne ssp. multiflorum、Lolium perenne、Anthoxanthum odoratum、Phleum pratense、Holcus lanatus、Triticum aestivum、またはElymus (Agropyron) smithiiなどの草からのものである。

【0057】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、雑草、例えば、Atriplex polycarpa、Baccharis halimifolia、Baccharis sarothroides、Hymenoclea salsola、Amaranthus hybridus、Xanthium strumarium (コミューン)、Rumex crispus、Eupathium capillifolium、Solidago sp. pulpus lamba (タマダニ属のタケ (Acnida tamariscina))、Allenrolfea occidentalis、Chenopodium botrys、Cochopodium album、Iva xanthifolia、Iva angustifolia、Chenopodium ambrosioides、Artemisia vulgaris、Artemisia ludoviciana、Urtica dioica、シロアリゾウムシ、ゾウリムシ、キクイムシ、キクイムシ、キク科、Ambrosia trifida、Ambrosia artemisiifolia、Ambrosia bidentata、Ambrosia psilostachya、Salsola kali (pestifer)、Artemisia californica、Artemisia frigida、Artemisia tridentata、Atriplex wrightii、Atriplex その他のアイテムに由来する。

【0058】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、木からのもの、例えば、アカシア種、アルヌス・グルチノサ、アルヌス・ルブラ、アルヌス・インカナ種、rugosa、Alnus rhombifolia、Fraxinus velutina、Fraxinus pennsylvanica、Fraxinus latifolia、Fraxinus americana、Populus tremuloides、Myrica cerifera、Fagus grandifolia (アメリカナ)、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 laciniata、Carya alba、Juniperus 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 r

10

20

30

40

50



ubra、Morums 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 romanzoffianum (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である。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、花、例えば、キク属のユーカンテム属、タラクス・オフィシナレ、またはヘリアンサス・アンヌスからのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンは農作物、例えば、Medicago sativa、Ricinus communis、Trifolium pratense、Brassica種、またはBeta vulgarisに由来する。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、植物性食品（食用植物）、例えば、プルナス・ダルシス（Prunus dulcis）、Malus pumila、プルナス・アルメニアカ（Prunus armeniaca）、ムーサパラディシアカ（Musa paradisiaca）（サビエンタム）、Hordeum vulgare、Phaseolus lanatus、Phaseolus vulgaris、Phaseolus sp、Phaseolus sp、Passeolus vulgaris、Rubus allgeniensis、Vaccinium sp.、Vaccinium sp.、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 sp.、Cinnamomum verum、Coffea arabic、Zea mays、Vaccinium macrocarpon、Cucumis sativus、Allium sativum、Zingiber officinale、Vitis sp.、Citrus paradisi、Humulus lupulus、Citrus limon、Lactuca sativa、Agaricus campestris、Brassica sp.、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 ori

entale(indicum)、Glycine max、Spinacia ole  
racea、Cucurbita pepo var.melopepo、Fragar  
ia chiloensis、Lycopersicon esculentum(ly  
copersicum)、Brassica rapa var.rapa、Vanil  
la planifolia、Citrullus lanatus var.lana  
tus、またはTriticum aestivumからである。

#### 【0060】

いくつかの実施形態では、アレルゲン分析物は、魚類または甲殻類、例えば、Micr  
opterus sp.、Ictalurus punctatus、Mercenar  
ia mercenaria、Gadus morhua、Callinectes s  
apidus、Platichthys sp.、Hippoglossus sp.、  
Homarus americanus、Scomber scombrus、Cras  
sostrea virginica、Sebastes marinus、Salmo  
salar、Clupeiformes、Pecten magellanicus、  
Penaeus sp.、Salvelinus sp.、またはThunnus sp  
.からのものである。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、例えば、Bos tau  
rus、Ovis aries、またはSus scrofaからの動物向け食品である  
。いくつかの実施形態では、アレルゲンは家禽製品、例えば、チキン(Gallus g  
allus)製品またはシチメンチョウ(Meleagris gallopavo)製  
品である。いくつかの実施形態では、アレルゲンは乳製品、例えばウシカゼインまたはウ  
シ乳汁由来である。いくつかの実施形態では、アレルゲンは、ナッツ、例えば、Bert  
holletia excelsa、Anacardium occidentale、  
Cocos nucifera、Corylus americana、Arachis  
hypogaea、Carya illinoensis、Juglans nigr  
a、またはJuglans regiaである。いくつかの実施形態では、アレルゲンは  
、粉塵、例えば、大麦粒粉、コーン粒粉、ハウスダスト、マツレス粉、オートムギ粉、  
コムギ粒、室内装飾粉、またはラテックス粉である。

#### 【0061】

いくつかの実施形態では、抗原分析物は自己免疫疾患に関連する自己抗原である。いく  
つかの実施形態では、自己免疫障害は細胞または臓器特異的自己免疫障害であり、自己抗  
原分析物はアセチルコリン受容体(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トランスロケター(ANT)(拡張型心筋症、  
心筋炎)、  
- アドレナリン受容体(拡張型心筋症)、芳香族L-アミノ酸デカルボキシ  
ラーゼ(自己免疫性ポリ内分泌症候群I型(APS-1))、アシアロ糖タンパク質受容  
体(自己免疫性肝炎)、殺菌性/透過性亢進タンパク質(Bpi)(嚢胞性線維症血管炎  
)、カルシウム感知受容体(後天性副甲状腺機能低下症)、コレステロール側鎖切断酵素  
(CYP11a)(APS-1)、コラーゲンIV型 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、冠状動脈疾患)、デスモグレイン1(尋常性天疱瘡)、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、スティフマン  
症候群)、グルタミン酸受容体(GLUR)(ラスムッセン脳炎)、H/K ATPアー  
ゼ(自己免疫性胃炎)、17-  
- ヒドロキシラーゼ(CYP17)(APS-1)、2  
1-ヒドロキシラーゼ(CYP21)(アジソン病)、IA-2(ICAA512)(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、表皮肥厚、全身性エリテマトーデス(SLE)、内因子1型(悪性貧血)  
、白血球機能関連抗原(LFA-1)(治療抵抗性ライム性関節炎)、ミエリン関連糖タ  
ンパク質(MAG)(多発ニューロパチー)、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-コイリン(アトピー性皮膚炎)、ビルベ脱水

素酵素複合体 - E 2 ( P D C E 2 ) ( 原発性胆汁性肝硬変 )、ヨウ化ナトリウムシンボーター ( N I S ) ( パセドウ病、自己免疫性甲状腺機能低下症 )、S O X - 1 0 ( 白斑 )、甲状腺および眼筋の共有タンパク質 ( 自己免疫性甲状腺炎 )、甲状腺ペルオキシダーゼ ( 自己免疫性橋本甲状腺炎 )、チロトロピン受容体 ( グレーブス病 )、組織トランスグルタミナーゼ ( セリアック病 )、転写活性化因子 p 7 5 ( アトピー性皮膚炎 )、トリプトファンヒドロキシラーゼ ( A P S - 1 )、チロシナーゼ ( 白斑、転移性メラノーマ ) から選択され、前記関連する自己免疫障害は、各自己抗原分析物の直後に括弧書きで記載される。

#### 【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害は全身性自己免疫障害であり、自己抗原分析物は、A C T H ( A C T H 欠乏症 )、アミノアシル t R N A ヒスチジルシンテターゼ ( 筋炎、皮膚筋炎 )、アミノアシル t R N A シンテターゼ ( 多発筋炎、皮膚筋炎 )、カルジオリピンから選択される ( S L E )、炭酸脱水酵素 I I ( S L E、シェーグレン症候群、全身性硬化症 )、コラーゲン ( 関節リウマチ ( R A )、S L E、進行性全身性硬化症 )、セントロメア関連タンパク質 ( 全身性硬化症 )、D N A 依存性ヌクレオソーム刺激 A T P アーゼ ( 皮膚筋炎 )、フィブリラリン ( 強皮症 )、フィブロネクチン ( S L E、R A、モルフェア )、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ ( R A )、2 - 糖タンパク質 I ( 2 - G P I ) ( 一次抗リン脂質症候群 )、ゴルギン ( 9 5、9 7、1 6 0、および / または 1 8 0 ) ( シェーグレン症候群、S L E、R A )、熱ショックタンパク質 ( さまざまな免疫関連障害 )、ヘミデスモソームタンパク質 1 8 0 ( 水疱性類天疱瘡、疱疹性天疱瘡、ヒストン H 2 A - H 2 B - D N A ( S L E )、I g E 受容体 ( 慢性 ) 特発性蕁麻疹 )、ケラチン ( R A )、K u - D N A - プロテインキナーゼ ( S L E )、K u - 核タンパク質 ( 結合組織症候群 )、L a リンタンパク質 ( L a 5 5 - B )、ミエロペルオキシダーゼ ( 壊死性および巣状系球体腎炎 ( N C G N )、全身性血管炎 )、プロテインナーゼ 3 ( P R 3 ) ( ウェゲナー肉芽腫、C h u r g - S t r a u s s 症候群 )、R N A ポリメラーゼ I - I I I ( R N P ) ( 全身性硬化症、S L E )、シグナル認識タンパク質 ( S R P 5 4 ) ( 多発性筋炎 )、トポイソメラーゼ - 1 ( S c l - 7 0 ) ( S c l - 7 0 ) 強皮症、レイノー症候群 )、チューブリン ( 慢性肝疾患、内臓リーシュマニア症 )、およびビメンチン ( 全身性自己免疫疾患 ) から選択され、関連する自己免疫疾患は、各自己抗原の直後に括弧書きで記載される。

#### 【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害は血漿タンパク質自己免疫障害またはサイトカイン自己免疫障害であり、自己抗原分析物は C 1 インヒビター ( 自己免疫性 C 1 欠乏症 )、C 1 q ( S L E、膜増殖性系球体腎炎 ( M P G N ) )、サイトカイン ( 例えば ) から選択される。I L - 1、I L - 1、I L - 1、I L - 1 0、L I F ( R A、全身性硬化症 )、第 I I 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 V 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 V I I 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 V I I I 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 I X 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 X 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 X I 因子 ( 凝固時間の延長 )、第 X I I 因子 ( 凝固時間の延長 )、トロンビン ( 凝固時間の延長 )、v W F ( 延長 ) 凝固時間 )、糖タンパク質 I I b / I I I g および I b / I X ( 自己免疫性血小板減少症紫斑病 )、I g A ( 免疫不全 )、および酸化型 L D L ( O x L D L ) ( アテローム性動脈硬化症 ) から選択され、関連する自己免疫疾患は、各自己抗原分析の直後に括弧書きで記載される。

#### 【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害は癌または腫瘍随伴性自己免疫障害であり、自己抗原分析物は、アンフィフィシン ( 神経障害、肺小細胞癌 )、サイクリン B 1 ( 肝細胞癌 )、D N A トポイソメラーゼ I I ( 肝臓癌 )、デスモブラキン ( 腫瘍随伴性天疱瘡 )、ゲフィリン ( 腫瘍随伴性硬直症候群 )、H u タンパク質 ( 腫瘍随伴性脳脊髄炎 )、ニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 ( 亜急性自律神経障害、癌 )、p 5 3 ( 癌、S L E )、p 6 2 ( I G F - I I ) m R N A 結合タンパク質 ( 肝細胞癌 )、リベイキン ( 癌関連網膜症 )、R 1 タンパク質 ( 腫瘍随伴性オブソクローヌスミオクローヌス失調症 )、ベ

10

20

30

40

50

ータIVスペクトリン（下部運動ニューロン症候群）、シナプトタグミン（ランバート・イトン筋無力症候群）、電位依存性カルシウムチャンネル（ランバート・イトン筋無力症候群）とYotapin（腫瘍随伴小脳変性）から選択される。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、抗原分析物は、異常に発現されたポリペプチドである内因性抗原である。そのような内因性抗原の例としては、アミロイドベータ（Aベータ）、アルファシヌクレイン、シスタチンC、タウ、Aβ、ADAM、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、変異型ハンチントン、PrP<sup>Sc</sup>、またはこれらのいずれかのフラグメントが挙げられる。

#### 【0066】

本発明のいくつかの実施形態では、分析物は、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、インプラント材料の代謝産物もしくは分解産物、または抗体などのインプラント材料のエピトープに特異的に結合する物質を含む。そのようなインプラントは、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（損傷した組織を置換するために対象の体内に外科的に埋め込まれた生体材料（例えば整形外科用再建用プロテーゼ）、心臓補綴物（人工弁）、皮膚、角膜）、避妊用インプラント、歯科用インプラント、整形外科用インプラント、および癒着防止器具を含み得る。エピトープを担持することができるインプラント材料の例は、ラテックス、シリコン、コバルトクロム（Co-Cr）合金、チタン、およびチタン合金などの金属、超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）およびポリメチルメタクリレートセメント（PMMA）などのポリマー、ハイドロキシアパタイト、バイオガラスなどのバイオセラミックスを含む。

#### 【0067】

特定の実施形態では、非抗体結合成分は細菌結合タンパク質または抗体結合ドメインであり得る。所定の分析物は、有益な腸内細菌、病原性細菌、タンパク質毒素、タンパク質バイオマーカー、小分子毒素、代謝産物、または化学兵器から選択することができる。このような分析物については、いくつかの実施形態では、遊離分析物に対する抗体も固定化分析物を認識するように小分子分析物をタンパク質または他の高分子担体に結合する競合フォーマットにアッセイを修正する（抗体がない場合）。固定化された分析物で動物を免疫することによってそれらを生成することができる。固定化された分析物は、抗分析物抗体に結合しているルミネセントシグナルを与える細胞受容体を凝集するだろう。固定化された分析物が測定されるべき遊離分析物と混合され、それが凝集をもたらすことができない場合、発光シグナルは減少するだろう。アクチベーターは受容体であり得、そして非抗体結合成分は受容体に特異的でありそして受容体に結合すると受容体に（凝集ではなく）立体配座変化を引き起こすリガンドであり得る。それが所定の分析物に結合した後にのみ。リガンドを検出器に融合させることができ、検出器は、リガンドが最初に所定の分析物に結合していない限り、リガンドが受容体に結合するのを防ぐように作用する。活性化剤はまた、所定の分析物と結合するように設計された受容体であり得、ここで、受容体は、所定の分析物と結合すると立体構造変化を受ける。また、この変種は集約効果には依存しない。しかし、他の実施形態では、凝集事象は、生理的代謝産物または薬物代謝産物などの標的の複数のコピーに結合する血清アルブミンなどの担体分子によって媒介され得る。

#### 【0068】

##### バイオセンサーの実施例I

図1a~1bを参照すると、本発明の例示的な実施形態による第1のバイオセンサー100は、エクオリン104を生成するように設計され、かつCTZ106で充填されてエクオリン/CTZ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、IgGb<sub>p</sub>-CD3（配列ID番号5~6）である膜貫通非抗体シグナル伝達成分108を発現するように設計されているが、膜貫通非抗体シグナル伝達成分FcRI-CD3（配列ID番号11~12）もまたバイオセンサー100と共に使用することができる。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、その活性化は細胞内Ca<sup>2+</sup>112の増加をもたらす。図1bに示す

とおり、標的分析物 116 (例えば大腸菌 0157) が結合している十分な量の検出分子 114 (例えば可溶性抗体) が膜貫通非抗体シグナル伝達成分 108 に結合すると、シグナル伝達経路 110 が活性化され、 $Ca^{2+}$  112 が増加し、エクオリン/CTZ 複合体が立体構造の変化を起こして光電子増倍管 120 によって検出される光 118 のシグナル (光子) を放出し、スパイク 122 が試験装置にグラフィック表示され (下記参照)、試験中のサンプル内の標的分析物 116 の存在を指し示す。このディスプレイは、標的分析物 116 に関して定性的および定量的の両方であり得る。

#### 【0069】

##### バイオセンサーの実施例 I I

図 2a ~ 図 2b を参照すると、上述のように、本発明の例示的な実施形態による第 2 のバイオセンサー 200 は、エクオリン 204 を生成するように設計され、かつ CTZ 206 で充填されてエクオリン/CTZ 複合体を形成する MC/9 (ATCC (登録商標) CRL-8306 (商標)) 肥満細胞 202 を含む。この特定のバイオセンサーは、IgGbp-IgE (配列 ID 番号 13 ~ 14) である可溶性非抗体シグナル伝達成分 208 に結合する天然の Fc イブシロン受容体 (すなわち、Fc RI) 207 を発現するが、非抗体シグナル伝達成分 Fc RI-IgE (配列 ID 番号 15 ~ 16) もまたバイオセンサー 200 と共に使用することができる。図 2b に示すとおり、標的分析物 216 (例えば、大腸菌 0157) が結合している十分な数の検出分子 214 (例えば、可溶性抗体) が、すでに天然の Fc イブシロン受容体 207 に結合している非抗体シグナル伝達成分 208 に結合すると、シグナル伝達経路 210 が活性化され、細胞内  $Ca^{2+}$  212 が増加し、エクオリン/CTZ 複合体が立体配座の変化を起こして光電子増倍管 220 によって検出される光 218 のシグナル (光子) を放出し、スパイク 222 が試験装置にグラフィック表示され (下記参照)、試験中のサンプル内の標的分析物 216 の存在を指し示す。このディスプレイは、標的分析物 216 に関して定性的および定量的の両方であり得る。

10

20

#### 【0070】

##### バイオセンサーの実施例 I I I

図 3a ~ 図 3b を参照すると、上述のように、本発明の例示的な実施形態による第 3 のバイオセンサー 300 は、エクオリン 304 を生成するように設計され、かつ CTZ 306 で充填されてエクオリン/CTZ 複合体を形成する MC/9 (ATCC (登録商標) CRL-8306 (商標)) 肥満細胞 302 を含む。この特定のバイオセンサーは、IgGbp-IgE (配列 ID 番号 13 ~ 14) である非抗体シグナル伝達成分 308 に結合する天然の Fc イブシロン受容体 (すなわち、Fc RI) 307 を発現するが、非抗体シグナル伝達成分 Fc RI-IgE (配列 ID 番号 15 ~ 16) もまたバイオセンサー 300 と共に使用することができる。この特定の実施形態では、バイオセンサー細胞 302 は、IgGbp-IgE を発現し、かつこの非抗体シグナル伝達成分を細胞外空間に排出するようにさらに設計されており、これは細胞表面に発現している天然の Fc RI に結合する。図 3b に示すように、標的分析物 316 (例えば、大腸菌 0157) が結合している十分な量の検出分子 314 (例えば、可溶性抗体) が、すでに天然の Fc イブシロン受容体 307 に結合している非抗体シグナル伝達成分 308 に結合すると、シグナル伝達経路 310 が活性化され、細胞内  $Ca^{2+}$  312 が増加し、エクオリン/CTZ 複合体が立体構造の変化を起こして光電子増倍管 320 によって検出される光 318 のシグナル (光子) を放出し、スパイク 322 が試験装置にグラフィック表示され (下記参照)、試験中のサンプル内の標的分析物 316 の存在を指し示す。このディスプレイは、標的分析物 316 に関して定性的および定量的の両方であり得る。

30

40

#### 【0071】

##### バイオセンサー I V の実施例

図 4 を参照すると、本発明の例示的な実施形態による第 4 のバイオセンサー 400 は、エクオリンを生成し、かつ mSA-CD3 (配列 ID 番号 17 ~ 18) である膜貫通非抗体シグナル伝達成分 408 を発現するように設計されたバイオセンサー細胞 402 を含

50

む。非抗体シグナル伝達成分 m S A - C D 3 (単量体ストレプトアビジン - C D 3) はビオチン化検出分子 4 1 4 に結合し、これは例えば上皮成長因子 (E G F) のような標的分子 4 1 6 に特異的に結合する。例えば、抗 E G F などの抗標的分子抗体 4 1 7 は、上述のように、複数のシグナル伝達成分をクラスター化し、かつシグナル伝達を誘導する標的多量体を生成する。他の実施形態において、単量体ストレプトアビジン成分はビオチン化成分と置き換えられ、代わりの連結手段を用いてもよい。

#### 【0072】

##### バイオセンサー V の実施例

図 5 を参照すると、本発明の例示的な実施形態による第 5 のバイオセンサー 5 0 0 は、エクオリンを生成し、かつ m S A - C D 3 (配列 I D 番号 1 7 ~ 1 8) である膜貫通非抗体シグナル伝達成分 5 0 8 を発現するように設計されたバイオセンサー細胞 5 0 2 を含む。非抗体シグナル伝達成分 m S A - C D 3 (単量体ストレプトアビジン - C D 3) はビオチン化検出分子 5 1 4 に結合し、これはいくつかの実施形態では自己抗原分子である。ビオチン化検出分子 5 1 4 は標的分子 5 1 6 に特異的に結合し、これはいくつかの実施形態では抗自己抗原分子である。血清試料中の自己抗体は、上述したように、複数のシグナル伝達成分をクラスター化し、かつシグナル伝達を誘導する標的多量体を生成する。他の実施形態において、単量体ストレプトアビジン成分はビオチン化成分と置き換えられ、代わりの連結手段を用いてもよい。

#### 【0073】

本発明のキメラタンパク質を製造するために使用されるシグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下のアクセッション番号によって同定され、またはその中で同定されているタンパク質またはドメインに対して、少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 7 . 5 %、9 0 %、9 2 . 5 %、9 5 %、9 7 . 5 %、9 8 %、9 9 % の配列同一性または類似性を有し得る：I g M 重鎖 (G e n B a n k : C A C 2 0 4 5 8 . 1)、I g - アルファ (P 1 1 9 1 2 . 2、G I : 5 4 7 8 9 6)、I g - ベータ (P 4 0 2 5 9 . 1、G I : 7 2 8 9 9 4)、C D 1 9 (A A A 6 9 9 6 6 . 1、G I : 9 0 1 8 2 3)、C D 3 ゼータ (P 2 0 9 6 3 . 2、G I : 2 3 8 3 0 9 9 9)、I g E アルファ (1 F 2 Q \_ A、G I : 9 2 5 7 1 5 0)、および F c - R 1 サブユニットアルファ (P 1 2 3 1 9) 1、G I : 1 1 9 8 6 5)。

#### 【0074】

黄色ブドウ球菌タンパク質 A (P 0 2 9 7 6 . 3、G I : 1 1 0 2 8 3 0 0 3) は、黄色ブドウ球菌の s p a 遺伝子およびその I g 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周知であり、G r a i l l e , e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 0 0 M a y 9 ; 9 7 ( 1 0 ) : 5 3 9 9 - 4 0 4 ; および R o b e n , e t a l . J I m m u n o l . 1 9 9 5 J u n 1 5 ; 1 5 4 ( 1 2 ) : 6 4 3 7 - 4 5 . の参照により本明細書に組み入れられる。既知のタンパク質 A アミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 7 . 5 %、9 0 %、9 2 . 5 %、9 5 %、9 7 . 5 %、9 8 %、9 9 % の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、および G r a i l l e ら、並びに R o b e n らによって開示された免疫グロブリンまたは他の分析物に結合する能力は、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を含む本分野において周知の分子生物学的技術によって製造することができる。

#### 【0075】

ストレプトコッカスタンパク質 G およびそのようなタンパク質の改変変異体のような他の細菌性免疫グロブリン結合タンパク質は周知であり、B a i l e y , e t a l . , J I m m u n o l M e t h o d s . 2 0 1 4 D e c 1 5 ; 4 1 5 : 2 4 - 3 0 ( d o i : 1 0 . 1 0 1 6 / j . j i m . 2 0 1 4 . 1 0 . 0 0 3 ) ( E p u b 2 0 1 4 O c t 2 2 ) ; および W a t a n a b e , e t a l . , J B i o l C h e m . 2 0 0 9 M a y 1 ; 2 8 4 ( 1 8 ) : 1 2 3 7 3 - 8 ( d o i : 1 0 . 1 0 7 4 / j b c . M 8 0 9 2 3 6 2 0 0 ) ( E p u b 2 0 0 9 M a r 6 ) の参照により本明細書

に組み入れられる。既知のタンパク質 G アミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、87.5 %、90 %、92.5 %、95 %、97.5 %、98 %、99 % の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、および Bailey ら、並びにワタナベらによって開示された免疫グロブリンまたは他の分析物に結合する能力は、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を含む本分野において周知の分子生物学的技術によって製造することができる。

#### 【0076】

Fc 受容体 (FcR) は免疫グロブリンの Fc 部分に結合し、FcRI および FcRII を含む多くの種類の Fc 受容体が知られている。これらの FcR の構造的および機能的な結合特性は、Fridman, FASEB J. 1991 Sep; 5 (12): 2684-90 を参照することにより組み込まれる。フリドマンによって開示された配列などの既知の FcR アミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、87.5 %、90 %、92.5 %、95 %、97.5 %、98 %、99 % の配列同一性または類似性を有する FcR またはそれらの免疫グロブリン結合セグメントの変異体は、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を含む本分野において周知の分子生物学的技術によって製造することができる。

10

#### 【0077】

本発明によるシグナル伝達タンパク質は、配列 ID 番号 2、4、6、8、10、12、14、16、および 18 によって開示されるキメラシグナル伝達タンパク質に対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、87.5 %、90 %、92.5 %、95 %、97.5 %、98 %、99 % の配列同一性または類似性を有することができ、免疫グロブリンなどの分析物に結合し、次いで改変バイオセンサー細胞にシグナルを伝達する能力をも有する。このような変異体は、分子生物学分野で周知の方法によって、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合成、コード配列のベクターへの挿入、およ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構築することができる。

20

#### 【0078】

##### 細胞選別およびクローニング

本発明のバイオセンサーの設計および構築は、培養したときにバイオセンサー細胞の混合集団をもたす。いくつかの細胞は改変因子を発現しなかったが、他の細胞は様々なレベルで当該因子を発現した。エレクトロポレーションおよび遺伝子挿入が成功した後、バイオセンサー細胞を培養し、混合集団としての生物学的応答 (フラッシュシグナル) について試験した。フローサイトメーターを用いて単一細胞選別を行った。細胞を単離し、次いで分析のために拡大して、高レベルの所望のタンパク質を発現したものを選択した。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上の異なる受容体を標的とし、それによって選別プロセスを可能にした。個々のクローンをシグナル伝達についてスクリーニングし、最良のクローンを選択した。このプロセスを通して、最も適したクローンを同定し、単離した。細胞外タンパク質についての蛍光活性化細胞選別 (FACS) および生細胞染色は、以下のように実施した。

30

40

#### 【0079】

改変バイオセンサー細胞を計数し、穏やかに遠心分離し、洗浄緩衝液 (HBSS + 2 % BSA) 中に  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  細胞 / mL の最終濃度で再懸濁した。各実験において、Fc 領域を有する完全抗体または  $F(ab)_2$  のいずれかを使用した。完全抗体を使用する場合、1 ~ 0.5  $\mu$ g の Fc 受容体遮断抗体を、細胞を入れるためのそれぞれ空の  $12 \times 15$  mm チューブに添加した。これらの各チューブに、100  $\mu$ L の細胞 ( $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  細胞) を Fc 遮断抗体の上に加えた。細胞を穏やかに混合し、4 または室温で 15 分間インキュベートした。  $F(ab)_2$  を使用する場合、Fc を遮断する上述の工程は省略した。合計 1  $\mu$ g の (選択した受容体に対する) 一次抗体を添加し、次いで細胞を穏やかに混合した後、氷上で (または 4 で) 20 ~ 40 分間インキュベートし

50

た。この温度は受容体の内在化を妨げた。標識化を促進するために細胞を断続的に穏やかに攪拌（旋回）した。2 mL 容量の冷洗浄緩衝液を添加し、次いで細胞を4 で遠心分離し、上清を捨てた。洗浄工程を繰り返した後、細胞を100  $\mu$ L の洗浄/選別緩衝液に再懸濁した。二次FITC標識抗体を細胞に添加し（0.5 ~ 1  $\mu$ g）、混合してから氷上（または4 ）で20 ~ 40分間インキュベートした。全過程を通して細胞を光から保護した。2 mL 容量の冷洗浄緩衝液を添加し、次いで細胞を遠心分離し、上清を捨てた。洗浄工程を繰り返し、細胞を0.5 ~ 1 mL の洗浄緩衝液に再懸濁した。選別するまで細胞を氷上でインキュベートした。選別はできるだけ早く（少なくとも同じ日に）行った。単細胞選別後の細胞のクローニングおよび培養は以下のようにして行った。

#### 【0080】

バイオセンサー細胞を96ウェルプレートに分類し、各ウェルが1つの細胞および100 ~ 200  $\mu$ L の細胞増殖培地を含有するようにした。次の10 ~ 14日間プレートのスキャン/モニターして増殖速度を決定し、いつ24ウェルプレートに移すかを判断した。スキャン中に、異なるマーキングを異なる条件に使用した。生細胞を含んでいる場合は一部のウェルに印を付けたが、移動の準備はできておらず、汚染されたウェルも印を付けた。細胞を各ウェルに1.0 mL の適切な培地を含む24ウェルプレートに移した。細胞が汚染されている場合は、ウェルからの細胞懸濁液をすべて15 mL コニカルチューブに入った5 mL の滅菌1 x PBSに加えることによって洗浄した。次に細胞を170 RCFで10分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットを24ウェルプレート中の1.0 mL の新鮮培地に再懸濁して培養した。継続的な増殖の後、細胞を1ウェルあたり1.5 mL の新鮮培地を含む12ウェルプレートに移した。

#### 【0081】

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増殖した後、細胞を計数し、それらが充填およびフラッシュ試験の準備ができていようかどうかを決定した。フラッシュ試験中、1回の繰り返しで25,000細胞が関連した。試験に適応するのに十分な細胞を増殖し、一部は増殖を続けるために残した。この工程はクローンスクリーニングの最初の期間を示した。選択されたクローンをさらに増殖し、所望の特性に応じてその後の試験に供した。生物学的応答については、例えば、ジャーカット - Fc RI - CD3 クローンを、抗CD3 抗体（陽性コントロール）および細菌に対するモノクローナル抗体をそれぞれの細菌と共に用いてスクリーニングし、一方でジギトニンを化学的応答試験に用いた。抗Fc RI抗体（生物学的応答）およびジギトニン（化学的応答）を用いてMC/9 - Aeqクローンをスクリーニングした。

#### 【0082】

要約すると、蛍光活性化細胞選別（FACS）を蛍光抗体標識を用いて行い、所望のタンパク質（この場合は改変受容体）を高度に発現している細胞を選択および単離した。このプロセスは、試験装置においてPMTを使用するフラッシュ試験によってさらに確認された高発現バイオセンサー細胞の集団をもたらした。全プロセスの間、細胞を自動細胞計数器を用いて計数して、人的エラーを排除し、一貫性および効率を高めた。ジャーカット - Fc RI - CD3 の異なるクローンは、抗大腸菌O111 mAbおよび大腸菌O111細菌で試験したときに異なるレベルの生物学的応答を示した。多くのクローンを同じ方法で試験し、最も高い応答を示したもの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を用いた異なるMC/9 - Aeqクローンの試験から得られた化学的応答の結果は、異なるクローンがエクオリン発現のレベルに依存して異なるレベルの化学的応答を与えることを示した。最も高いシグナルを有するクローンをクローンバンクに保存した。

#### 【0083】

##### バイオセンサー細胞の培養

最適な増殖条件を確実にするために、異なる細胞株には異なる培地処方を使用した。MC/9肥満細胞を完全肥満細胞培地（DMEM - Sigma、カタログ番号D5796；1 x Pen / Strep；10% FBS；10% T- Stim Supplement；

10

20

30

40

50



50  $\mu$ M -メルカプトエタノール)中で培養した。ジャーカットT細胞を完全RPMI培地(RPMI - ThermoFisher; 10% FBS; 1x Pen/Strep)中で培養した。エレクトロポレーションしたコンストラクトの特性に応じて、細胞培養における選択のために異なる抗生物質を使用した。エレクトロポレーションの2~3日後に適切な抗生物質を増殖培地に添加して、線状化DNAコンストラクトをうまく組み込んだ細胞を選択した。細胞濃度は、最適な細胞増殖のために $4.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mLに保たれた。異なる細胞株およびクローンを長期保存のために処理し、ストックを以下のように液体窒素中で凍結した。(i)細胞を150RCFで10分間遠心分離して上清を捨てた。(ii)細胞ペレットを凍結培地(RPMI; 50% FBS; 10% DMSO)中に $5.0 \times 10^5$ 細胞/mLの濃度で再懸濁した。(iii)1mLの容量を2mLのNunc Cryoバイアルに等分し、-80で24時間凍結した後、長期保存のために液体窒素に移した。

10

#### 【0084】

##### バイオセンサー細胞の充填

本発明のバイオセンサー細胞を50mLコニカルチューブ中で150RCFで10分間遠心分離した。上清を捨て、ペレットを充填培地(RPMI; 10%抗体除去FBS; 1x pen/strep; 0.1% Pluronic F68および1.5mMセレンテラジン)中に25,000細胞/180 $\mu$ Lの濃度で再懸濁した。さらに、細胞をまた、例えば100,000細胞/180 $\mu$ Lおよび400,000細胞/180 $\mu$ Lのような異なる濃度でも充填した。細胞を室温で24~26時間穏やかに振盪/揺動しながら充填した。使用前に、他の抗体除去システムを用いて市販の抗体除去FBSをさらに精製してもよい。

20

#### 【0085】

##### 細胞の濃縮

本発明のバイオセンサー細胞は、高濃度よりも低濃度でより効果的に充填することが実証された。例えば、400,000細胞/180 $\mu$ Lに対して25,000細胞/180 $\mu$ Lの密度で細胞を充填すると、検出可能なシグナルが2倍に増加することが示された。ジャーカット-FcRI-CD3クローンP5G7細胞を400,000細胞/180 $\mu$ Lおよび25,000細胞/180 $\mu$ Lの両方で充填し、次いで各反応において400,000細胞/180 $\mu$ Lで試験した。一晚培養した大腸菌O111細菌培養物を23nM抗大腸菌O111 mAbと共に使用した。低い濃度で充填されたバイオセンサー細胞は、試験した同数の細菌細胞に対して高いシグナルを与えた。バイオセンサー細胞の密度を、最適な病原体の検出を可能にするために、充填後に細胞を濃縮することによってほとんど変化させた。検出分子が可溶性抗体である場合、標的病原体および抗体の質に依存して、異なる濃度が病原体検出に使用された。バイオセンサー細胞を150RCFで10分間遠心分離することにより濃縮し、細胞ペレットを所望量の試験培地に再懸濁した。充填培地は試験培地としても機能し得る。特定の例において、培地への正常FBSの添加は生物学的応答を引き起こし、正常FBS中の高濃度の抗体のためにバイオセンサーシグナル(フラッシュ)をもたらした。そのため、市販の抗体除去FBSを充填過程で使用し、それは完全に排除することなく抗体誘発シグナルを減少させた。市販の抗体除去FBS中の微量の抗体をさらに除去させるために追加の方法を使用した。

30

40

#### 【0086】

##### バイオアッセイ

本発明の例示的な態様において、分析物バイオアッセイは、バイオセンサー細胞およびその分析物(例えば病原体)に特異的な可溶性モノクローナル抗体(mAb)を用いてフォーマットした。これらの実施形態では、バイオアッセイの特異性は標的分析物への可溶性抗体の選択的結合に直接関係し、バイオセンサーの特異性および感度は生物発光の検出および測定によって決定した。このプロセスでは、バイオセンサー細胞は最初に発光分子、セレンテラジン(CTZ)を使用して充填した。次いで、選択された可溶性抗体および分析中の試料を添加した。標的病原体が試料中に存在する場合、それはバイオセンサー細胞

50

胞によって発現される融合タンパク質に結合する可溶性抗体と相互作用し、最終的にバイオセンサー細胞からの発光をもたらすシグナルカスケードを引き起こす。放出された光は、試験装置内の光電子増倍管（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たシグナルは、毎秒の光子数として表示される。以下に記載されるように、可溶性抗体および標的病原体に基づいて病原体を検出するための様々な方法が開発されている。以下に詳細に記載される3つのそのような方法が含まれる：（i）検出分子（例えば抗体）の即時添加、（ii）バイオセンサー細胞の検出分子（例えば抗体）での被覆、（iii）分析物（例えば、細菌）の抗体でのコーティング。

#### 【0087】

##### 試験ユニット

本明細書における本発明のバイオアッセイの態様は、米国特許第9,023,640号に開示されているような卓上型または携帯型試験システムおよび装置と共に使用するよう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において実施することができ、その全体がこの参照により本明細書に組み込まれる。試験カートリッジは、1回のみを使い捨て品であってもよく、試料とバイオセンサーの両方を受け取り、バイオセンサーをテストカートリッジに導入することで、予測可能かつ制御された方法で試料とバイオセンサーを混合する。試験カートリッジは、試験試料とバイオセンサーとを受容するための反応チャンバをさらに含み、当該反応チャンバは所定の内部形状を有し、さらに全体のシグナル対ノイズ比を改善する目的でバックグラウンドノイズを最小化または排除するように適合されている。混合プロセス中の試験試料およびバイオセンサーへの剪断力による損傷を最小限に抑えるために、少なくとも1つのスタビライザーを反応チャンバ内に配置することができる。

#### 【0088】

例示的な実施形態では、試験カートリッジ内の反応チャンバおよび当該反応チャンバに通じる流体チャネルは、いくつかの目的を達成するように設計されている。反応チャンバに入る流体のための入口チャネルは管状形状を含み、チューブの直径は比較的小さく、反応チャンバへの入口でより小さくなるように先細りしている。これは反応チャンバ内に入る流体の速度を増加させ、反応チャンバ内の試薬のバルク運動のためにより激しくかつ均質な混合を促進する。試料中に存在する任意の感染性物質が迅速にバイオセンサーに遭遇することを確実にすることによって試験の期間を最小にするために、分子拡散を超えて混合を促進するように試薬と試料を混合することが望ましい。混合物の均質性を増すために流体が混合される際に、入口チャネルは反応チャンバの中心軸からずれて試験チャンバの中心軸の周りの試薬の時計回りまたは反時計回りの回転運動を促進する。入口チャネルはまた、入ってくる流体が反応チャンバの側面と接触したままで入口チャネルから反応チャンバへと移動することを可能にするために反応チャンバの内面にほぼ接しており、これは乱流を最小にさせ、混合流体への気泡の導入を最小にする。試薬によって放出された光が混合試薬内または混合試薬の表面上の気泡を通して移動するため、気泡はそれらが引き起こす予測不可能な光の屈折のために望ましくない。試薬が反応チャンバの底部に存在する流体と確実に混合されるように、流入チャネルの軸は水平から上向き（例えば約30度）に傾斜して、入ってくる流体の流れに対して部分的に下向きの方向を与えてもよい。または、反応チャンバの底部に試薬を送達するための垂直チャネルなどの代替の流体送達手段を使用して、または試験チャンバに流れ込む試薬のカラムを作成し、それによってエントレインメントによる混合を促進するために、試験チャンバの中心軸上に直接流体を送達するなどして、試薬は試験チャンバに導入され得る。

#### 【0089】

反応チャンバの形状（すなわち、所定の配置）は、反応チャンバの中心軸の周りの混合流体の時計回りまたは反時計回りの動きを容易にする回転断面であり得る。または、必要に応じて、長方形または不規則な形状などの回転断面以外の反応チャンバ形状を利用してよい。一実施形態では、反応チャンバを形成するために使用される回転断面は、試薬によって放出された光の収集を容易にし、この光を光電子増倍管（PMT）（浜松）であ

10

20

30

40

50

り得る検出器の表面に向かって反射する楕円の一部分である。楕円形の集光特性を高めるために、反応チャンバの表面は反射性であってもよい。いくつかの実施形態では、PMTの表面の最大直径は、システムの出力の最大シグナル対ノイズ比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されてもよく、これは、特定の体積の流体を保持するように設計された反応チャンバにおいて達成され得る楕円形状に影響を及ぼす。制約された楕円形状のために、直接PMT表面に反射されない限り光が部分的に白色表面によって拡散され、この一部がPMT表面に向けられるときに生じる追加の集光のために反応チャンバの表面色は部分的に拡散白色となり得る。あるいは、必要に応じて、他の表面仕上げおよび近鏡仕上げアルミニウムなどの材料、または透明材料を使用することができる。さらに、反応チャンバ自体から放出された光が試薬から放出された任意の光の光彩を失わせ、検出を妨げることを防止するために、反応チャンバ材料はリン光が最小限であることが望ましい。アクリロニトリルブタジエンスチレンのような白色ポリマー材料または他のそのようなポリマー材料は低レベルのリン光を示すことがわかったが、光の反射と拡散の組み合わせによって提供される追加の集光は光センシング回路出力のシグナル対ノイズ比に有益であることがわかった。

10

20

30

40

50

#### 【0090】

例示的な実施形態では、試験サブユニットは試料分析に使用するためのシステムを提供する。このシステムはバイオセンサー試薬を含み、このバイオセンサー試薬は生体細胞と、長いループ部分と短いループ部分と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貯蔵するリザーバーカードと、当該リザーバーカードを受け入れるように構成されている試験カートリッジベースとを含む。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、および(ii) 当該反応チャンバに接続される入口チャンネルであって、前記反応チャンバの上方に水平方向に対して15～60度の角度で配置され、前記反応チャンバの中心軸からずれており、かつ分析される試料を当該入口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、生体細胞への損傷を最小限に抑えながら当該試料をバイオセンサー試薬と均一に混合する、入口チャンネル。

#### 【0091】

別の例示的な実施形態では、試験サブユニットは生物学的試料中の分析物の存在を迅速に検出するためのシステムを提供する。このシステムは、所定の分析物に特異的な少なくとも1つの抗体と生物発光剤とを含むバイオセンサー試薬を含み、少なくとも1つの抗体は生きた改変リンパ球の表面に発現し、生物発光剤は生きた改変リンパ球によって発現される。このバイオセンサー試薬は、(i) 試験される試料中の特定の分析物の存在を検出し、(ii) バイオセンサー試薬が試料と反応して試料中の特定の分析物の存在を検出したときに検出可能な光シグナルを発するように作動する。試験カートリッジもまた含まれる。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、および(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た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、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、及びb) 当該反応チャンバに接続される入口チャンネルであって、前記反応チャンバの上方に水平方向に対して15～60度の角度で配置され、前記反応チャンバの中心軸からずれている入口チャンネルを有し、c) 試料を入口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、生きた改変リンパ球への損傷を最小限に抑え、かつ反応チャンバ内の混合バイオセンサー試薬および当該試料の任意の泡立ちを最小限に抑えながら当該試料をバイオセンサー試薬と均一に混合する。試験カートリッジを受け入れるようになっている試験ユニットも含まれる。試験ユニットは、試料との反応時に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、放出された検出可能な光シグナルの検出は試料中の分析物の存在を示し、試料中の特定の分析物の検出はリアルタイムで起こる。

#### 【0092】

#### バイオアッセイの実施例 1：抗体の即時添加

本発明のバイオアッセイの例示的な実施形態において、検出分子が可溶性抗体であり、試験試料へのバイオセンサー細胞の導入の直前に、可溶性抗体と試験される試料とが一緒に混合される。この実施形態では、充填バイオセンサー細胞を遠心分離し、充填培地中で約 400,000 細胞 / 180  $\mu$ L (単一の反応に十分) に濃縮した。次いで、充填バイオセンサー細胞の 180  $\mu$ L (約 400,000 細胞) アリコートをし、リザーバーカードの長いループ部分に入れた。ポジティブコントロールのために、RPMI 培地中の 30  $\mu$ L の抗 CD3 抗体をリザーバーカードの短いループ部分に入れた。次にリザーバーカードを試験カートリッジベースに固定した。抗大腸菌 O111 (標的病原体は大腸菌 O111) などの標的病原体に対する 2  $\mu$ L 容量の抗体 (0.5 mg/mL) をカートリッジ混合チャンバ内で試験する試料 28  $\mu$ L と混合した。試験カートリッジベースを試験装置に挿入し、充填バイオセンサー細胞を反応チャンバに注入して反応を開始させた。得られたシグナルを 4 ~ 8 分間記録し、試験期間の終わりに、抗 CD3 抗体 30  $\mu$ L を、2 分間記録したポジティブコントロール反応として反応容器に注入した。別のポジティブコントロールとして、抗 CD3 抗体ではなく 30  $\mu$ L の 0.61 mM ジギトニンを使用することができる。ネガティブコントロール試験は、使用されている抗体に特異的ではない所定の病原体を使用して実施することができる。

10

#### 【0093】

#### バイオアッセイの実施例 2：抗体によるバイオセンサー細胞のコーティング

本発明のバイオアッセイの別の例示的な実施形態において、検出分子が可溶性抗体であり、バイオセンサー細胞は、試験される試料をバイオセンサー細胞と混合する前の期間に、可溶性抗体でコーティングした。この実施形態では、充填バイオセンサー細胞を遠心分離し、充填培地中で約 400,000 細胞 / 180  $\mu$ L (単一の反応に十分) に濃縮した。次いで、バイオセンサー細胞の 180  $\mu$ L (約 400,000 細胞) アリコートをし、抗大腸菌 O111 (標的病原体は大腸菌 O111) などの標的病原体に対する 2  $\mu$ L 容量の抗体 (0.5 mg/mL) とエッペンドルフチューブ内で混合した。抗体と混合したバイオセンサー細胞を室温で 10 分間インキュベートし、次いでリザーバーカードの長いループ部分に入れた。ポジティブコントロールのために、RPMI 培地中の 30  $\mu$ L の抗 CD3 抗体をリザーバーカードの短いループ部分に入れた。次にリザーバーカードを試験カートリッジベースに固定した。試験する 30  $\mu$ L 容量の試料を反応チャンバに添加した。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て反応を開始させた。得られたシグナルを 4 ~ 8 分間記録し、試験期間の終わりに、抗 CD3 抗体 30  $\mu$ L を、2 分間記録したポジティブコントロール反応として反応容器に注入した。別のポジティブコントロールとして、抗 CD3 抗体ではなく 30  $\mu$ L の 0.61 mM ジギトニンを使用することができる。ネガティブコントロール試験は、使用されている抗体に特異的ではない所定の病原体を使用して実施することができる。

20

30

#### 【0094】

#### バイオアッセイの実施例 3：抗体による分析物のコーティング

本発明のバイオアッセイの別の例示的な実施形態において、検出分子が可溶性抗体であり、分析物 (例えば病原性細菌) は、試験される試料をバイオセンサーと混合する前の期間に、可溶性抗体でコーティングした。この実施形態では、充填バイオセンサー細胞を遠心分離し、充填培地中で約 400,000 細胞 / 180  $\mu$ L (単一の反応に十分) に濃縮した。バイオセンサー細胞の 180  $\mu$ L (約 400,000 細胞) アリコートをし、リザーバーカードの長いループ部分に入れた。ポジティブコントロールのために、RPMI 培地中の 30  $\mu$ L の抗 CD3 抗体をリザーバーカードの短いループ部分に入れた。次にリザーバーカードをカートリッジベースに固定した。抗大腸菌 O111 (標的病原体は大腸菌 O111) などの標的病原体に対する 2  $\mu$ L 容量の抗体 (0.5 mg/mL) を、28  $\mu$ L の試験する試料とエッペンドルフチューブ中で混合した。その試料を室温で 10 分間インキュベートし、次いでカートリッジ混合チャンバに加えた。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て反応を開始させた。得られたシグナル

40

50

を4～8分間記録し、試験期間の終わりに、抗CD3 抗体30μLを、2分間記録したポジティブコントロール反応として反応容器に注入した。別のポジティブコントロールとして、抗CD3 抗体ではなく30μLの0.61mMジギトニンを使用することができる。ネガティブコントロール試験は、使用されている抗体に特異的ではない所定の病原体を使用して実施することができる。

#### 【0095】

本明細書に記載の例示的なバイオアッセイは、バックグラウンドノイズを低減し、シグナルを増強する他の添加剤を含み得る。ポジティブコントロールとして抗CD3 抗体を使用すると、本システムは50,000個の非充填バイオセンサー細胞の混合物中で10個未満の充填バイオセンサー細胞を検出することが実証されている。バイオセンサー自体は、30μLの試料中で230CFUの細菌を検出することが実証されている。上記のバイオアッセイでは、大腸菌O111細菌に対する専用のモノクローナル抗体(1F11)を用いて、大腸菌O157をネガティブコントロールとして用いて大腸菌O111細菌を検出した。大腸菌O157は陰性の結果を与えることが実証され、これにより本システムの特異性が証明された。本明細書に記載されたバイオアッセイと共に、多数の市販の抗体もまた使用され得る。専用のモノクローナル抗体(1F11)に関して、抗体分析およびモノクローナル抗体の選択は以下に記載されるように達成した。

#### 【0096】

抗体産生は、96ウェルのマルチウェルプレート中で行われたELISAによって決定された。各ウェルを異なるLPS(大腸菌O157、大腸菌O127、大腸菌O111、大腸菌O26、クレブシエラ・ニューモニア、サルモネラ・エンテリオア、およびナイーブセラ)または細菌細胞(大腸菌O157、大腸菌O111、大腸菌26、および大腸菌DH5)で被覆した。mAb O157またはmAb O111の異なるクローンからのハイブリドーマ上清をウェルに添加した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合(HRP)ヤギ抗マウスIgGを検出に使用した(付録III.A.3)。大腸菌O157の2つのハイブリドーマクローン(1B10および6G1)は、大腸菌O157のLPSおよび大腸菌O157のみを認識する。大腸菌O111の9つのハイブリドーマクローンは、大腸菌O111のLPSおよび大腸菌O111を特異的に認識する。もっとも高い光学密度(OD)リーディングからのクローンを検証のために選択した。これは以下に記載するようにして達成された。

#### 【0097】

ハイブリドーマ細胞ペレットを回収し、RNA抽出前に-80で保存した。抽出されたRNAをcDNAへの逆転写、それに続くネステッドPCR増幅のための鋳型として使用した。すべての陽性PCR産物をTAクローニングベクターにクローニングし、配列決定に送った。軽鎖および重鎖の可変領域は、配列の分析後に決定した。O157(1B10)(FSC製のカスタマイズmAb)およびATCC HB10452の4つの一本鎖抗体(scFv)、ならびにFSC製のO111の2つの一本鎖抗体(1F11および1F2)を組み換え発現し、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)で精製した。scFvの配列は以下の順序で構築した: 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切断部位+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-リジン-リジン-アスパラギン酸-アラニン-アラニン-リジン-リジン-アスパラギン酸-アスパラギン酸-アラニン-リジン-リジン-アスパラギン酸-アスパラギン酸+軽鎖可変領域。精製したscFvを、O157またはO111のLPSでコーティングしたマルチウェルプレートを用いて試験した。

#### 【0098】

この研究の目的は、モノクローナル抗体(mAb)の細菌細胞全体(大腸菌O157または大腸菌O111)に対する相互作用を調べ、抗体-細菌相互作用の速度定数(KD)を推定することである。これらのアッセイでは、ヤギ抗大腸菌O157ポリクローナル抗

10

20

30

40

50

体、ヤギ抗大腸菌 O 1 1 1 ポリクローナル抗体、大腸菌 O 1 5 7 に対する 3 つのモノクローナル抗体 ( 1 0 2 2、1 0 2 4、および 1 0 6 1 )、ならびに大腸菌 O 1 1 1 に対する 1 つのモノクローナル抗体を使用した。C M 5 センサーチップおよびアミンカップリングキットもまた使用した。すべてのアッセイは、B i a c o r e X 1 0 0 装置上で行った。このプロトコルでは、( 選択細菌に対する ) 1 つのポリクローナル抗体を C M 5 センサーチップ上に固定化した。次いで、選択細菌を結合させ、続いて連続的な緩衝液流中で同じ細菌に対するモノクローナル抗体を注射した。相互作用はリアルタイムで監視した。各細菌に対する抗体の相対的結合を共鳴単位 ( R U ) で記録した。大腸菌 O 1 5 7 および大腸菌 O 1 1 1 に対する大腸菌 O 1 5 7 特異的抗体 ( m A b F F 7 5 4 ) の結合の B I A c o r e 分析の結果は、O 1 5 7 m A b がその標的抗原に特異的であることを示した。

10

#### 【 0 0 9 9 】

##### F c 受容体

本発明によって利用される受容体、例えばリガンドまたは検出器としては、代替りの F c 含有キメラ受容体を挙げることができる。本明細書に記載のキメラ受容体は、免疫グロブリンの F c 部分に対する結合親和性および特異性を有する細胞外ドメイン ( 「 F c 結合剤」 )、膜貫通ドメイン、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメイン、および I T A M を含む細胞質シグナル伝達ドメインを含む。キメラ受容体は、宿主細胞上で発現されると、細胞外リガンド結合ドメインが標的分子 ( 例えば抗体または F c 融合タンパク質 ) および共刺激シグナル伝達ドメインに結合するために細胞外に位置するように構成され、I T A M 含有細胞質シグナル伝達ドメインは、活性化および / またはエフェクターシグナル伝達を誘発するために細胞質内に位置している。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のキメラ受容体構築物は、N 末端から C 末端にかけて、F c 結合剤、膜貫通ドメイン、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメイン、および I T A M 含有細胞質シグナル伝達ドメインを含む。他の実施形態において、本明細書に記載のキメラ受容体構築物は、N 末端から C 末端にかけて、F c 結合剤、膜貫通ドメイン、I T A M 含有細胞質シグナル伝達ドメイン、および少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

20

#### 【 0 1 0 0 】

本明細書に記載のキメラ受容体はいずれも、F c 結合剤の C 末端および膜貫通ドメインの N 末端に位置することができるヒンジドメインをさらに含むことができる。あるいは、またはさらに、本明細書に記載のキメラ受容体構築物は、互いに連結するか、または I T A M 含有細胞質シグナル伝達ドメインによって分離され得る、2 つ以上の共刺激性シグナル伝達ドメインを含み得る。キメラ受容体コンストラクト中の細胞外 F c 結合剤、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達ドメイン、および I T A M 含有細胞質シグナル伝達ドメインは、直接またはペプチドリッカーを介して互いに結合することができる。

30

#### 【 0 1 0 1 】

本明細書に記載のキメラ受容体コンストラクトは、F c 結合剤、すなわち適切な哺乳動物 ( 例えば、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、サル ) の免疫グロブリン ( 例えば、I g G、I g A、I g M、または I g E ) の F c 部分に結合することができる細胞外ドメインを含む。適切な F c 結合剤は、哺乳動物 F c 受容体または特定の細菌タンパク質 ( 例えば、タンパク質 A、タンパク質 G ) などの天然に存在するタンパク質に由来し得る。さらに、F c 結合剤は、本明細書に記載の I g 分子のいずれかの F c 部分に高い親和性および特異性で結合するように特異的に改変された合成ポリペプチドであり得る。例えば、そのような F c 結合剤は、免疫グロブリンの F c 部分に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であり得る。例としては、一本鎖可変フラグメント ( s c F v )、ドメイン抗体、またはナノボディが挙げられるが、これらに限定されるものではない。あるいは、F c 結合剤は、K u n i t z ドメイン、小型モジュラー免疫医薬品 ( S M I P )、アドネクチン、アビマー、アフィボディ、D A R P i n、またはアンチカリンなどの F c 部分に特異的に結合する合成ペプチドであってもよく、これらは F c に対する結合活性についてペプチド結合ライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。

40

#### 【 0 1 0 2 】

50

いくつかの実施形態において、Fc結合剤は哺乳動物Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインである。本明細書で使用されるように、「Fc受容体」は、多くの免疫細胞（B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、好中球、肥満細胞、および好酸球を含む）の表面に発現する細胞表面結合受容体であり、抗体のFcドメインに対して結合特異性を示す。Fc受容体は、典型的には抗体のFc（フラグメント結晶化可能）部分に対する結合特異性を有する少なくとも2つの免疫グロブリン（Ig）様ドメインからなる。いくつかの例において、抗体のFc部分へのFc受容体の結合は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）効果を誘発し得る。本明細書中に記載されるようなキメラ受容体を構築するために使用されるFc受容体は、野生型の同等物と比較してFcに対する親和性が増大または減少し得る天然の多型変異体（例えばCD16 V158変異体）であり得る。あるいは、Fc受容体は、Ig分子のFc部分への結合親和性を変化させる1つまたは複数の突然変異（例えば、最大10個のアミノ酸残基の置換）を有する野生型の同等物の機能的変異体であってもよい。いくつかの例において、その突然変異はFc受容体のグリコシル化パターン、つまりFcに対する結合親和性を変化させることができる。

10

#### 【0103】

以下の表は、Fc受容体細胞外ドメインにおけるいくつかの例示的な多型を列挙する（例えば、Kim et al., J. Mol. Evol. 53: 1-9, 2001を参照のこと）。

20

#### 【表1】

TABLE 1

| Fc受容体の多型の例      |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| アミノ酸番号          | 19 | 48 | 65 | 89 | 105 | 130 | 134 | 141 | 142 | 158 |
| FCR10           | R  | S  | D  | I  | D   | G   | F   | Y   | T   | V   |
| P08637          | R  | S  | D  | I  | D   | G   | F   | Y   | I   | F   |
| S76824          | R  | S  | D  | I  | D   | G   | F   | Y   | I   | V   |
| J04162          | R  | N  | D  | V  | D   | D   | F   | H   | I   | V   |
| M31936          | S  | S  | N  | I  | D   | D   | F   | H   | I   | V   |
| M24854          | S  | S  | N  | I  | E   | D   | S   | H   | I   | V   |
| X07934          | R  | S  | N  | I  | D   | D   | F   | H   | I   | V   |
| X14356 (FcγRII) | N  | N  | N  | S  | E   | S   | S   | S   | I   | I   |
| M31932 (FcγRI)  | S  | T  | N  | R  | E   | A   | F   | T   | I   | G   |
| X06948 (FcαεI)  | R  | S  | E  | S  | Q   | S   | E   | S   | I   | V   |

30

#### 【0104】

Fc受容体は、それが結合することができる抗体のアイソタイプに基づいて分類される。例えば、Fcガンマ受容体（FcγR）は一般に、その1つ以上のサブタイプ（すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）などのIgG抗体に結合し、Fcアルファ受容体（FcαR）は一般に、IgA抗体に結合し、Fcイプシロン受容体（FcεR）は一般に、IgE抗体に結合する。いくつかの実施形態において、Fc受容体は、Fcガンマ受容体、Fcアルファ受容体、またはFcイプシロン受容体である。Fcガンマ受容体の例には、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、CD32B、CD16A、およびCD16Bが含まれるが、これらに限定されるものではない。Fcアルファ受容体の例は、FcαR1/CD89である。Fcイプシロン受容体の例としては、FcεRIおよびFcεRII/CD23が挙げられるが、これらに限定されるものではない。以下の表は、本明細書に記載のキメラ受容体を構築するために使用するための例示的なFc受容体、およびそれらの対応するFcドメインに対する結合活性を列挙する。

40

【表 2】

TABLE 2

| Fc 受容体の例        |              |                               |
|-----------------|--------------|-------------------------------|
| 受容体名            | 主要な抗体リガンド    | リガンドへの親和性                     |
| FcγRI (CD64)    | IgG1 及び IgG3 | High ( $K_d \sim 10^{-9}$ M)  |
| FcγRIIA (CD32)  | IgG          | Low ( $K_d > 10^{-7}$ M)      |
| FcγRIIB1 (CD32) | IgG          | Low ( $K_d > 10^{-7}$ M)      |
| FcγRIIB2 (CD32) | IgG          | Low ( $K_d > 10^{-7}$ M)      |
| FcγRIIA (CD16a) | IgG          | Low ( $K_d > 10^{-6}$ M)      |
| FcγRIIB (CD16b) | IgG          | Low ( $K_d > 10^{-6}$ M)      |
| FcεRI           | IgE          | High ( $K_d \sim 10^{-10}$ M) |
| FcεRII (CD23)   | IgE          | Low ( $K_d > 10^{-7}$ M)      |
| FcαRI (CD89)    | IgA          | Low ( $K_d > 10^{-6}$ M)      |
| Fcα/μR          | IgA 及び IgM   | High for IgM, Mid for IgA     |
| FcRn            | IgG          |                               |

10

## 【0105】

本明細書に記載のキメラ受容体に使用するための Fc 受容体のリガンド結合ドメインの選択は、当業者には明らかであろう。例えば、それは Fc 受容体の結合が望まれる抗体のアイソタイプおよび結合相互作用の望まれる親和性などの要因に依存し得る。いくつかの実施例において、(a) は、Fc に対する親和性を調節することができる天然に存在する多型を組み込んでいる CD16 の細胞外リガンド結合ドメインである。いくつかの実施例において、(a) は、158 位（例えば、バリンまたはフェニルアラニン）に多型を組み込んでいる CD16 の細胞外リガンド結合ドメインである。いくつかの実施形態において、(a) は、そのグリコシル化状態およびその Fc に対する親和性を変化させる条件下で生成される。いくつかの実施形態では、(a) は、それを組み込んだキメラ受容体を IgG 抗体のサブセットに対して特異的にする修飾を組み込んだ CD16 の細胞外リガンド結合ドメインである。例えば、IgG サブタイプ（例えば、IgG1）に対する親和性を増加または減少させる突然変異を組み込むことができる。

20

30

## 【0106】

他の実施形態において、Fc 結合剤は、IgG 分子の Fc 部分に結合することができる天然に存在する細菌タンパク質に由来する。本明細書に記載のキメラ受容体を構築するのに使用するための Fc 結合剤は、全長タンパク質またはその機能的断片であり得る。タンパク質 A は、元来は細菌黄色ブドウ球菌の細胞壁に見出される 42 kDa の表面タンパク質である。これはそれぞれが三ヘリックス束に折り畳まれ、かつほとんどの抗体の Fc 領域およびヒト VH3 ファミリー抗体の Fab 領域との相互作用を介して IgG を結合することができる 5 つのドメインからなる。タンパク質 G は、哺乳動物 IgG の Fab 領域および Fc 領域の両方に結合する C 群および G 群のレンサ球菌において発現する約 60 kDa のタンパク質である。天然のタンパク質 G もアルブミンに結合するが、アルブミン結合を排除する組換え変異体が設計されている。

40

## 【0107】

キメラ受容体に使用するための Fc 結合剤はまた、コンビナトリアルバイオロジーまたは定方向進化法を使用して新たに作製することもできる。タンパク質骨格（例えば、IgG 由来の scFv、Kunitz 型プロテアーゼ阻害剤由来の Kunitz ドメイン、アンキリンリピート、タンパク質 A 由来の Z ドメイン、リボカリン、フィブロネクチン III 型ドメイン、Fyn 由来 SH3 ドメインなど）から始めて、表面上の一連の残基についてのアミノ酸側鎖は、変異型骨格の大きなライブラリーを作製するために無作為に置換することができる。大きなライブラリーから、最初に結合について選択し、続いてファージ

50



、リボソーム、または細胞ディスプレイによって増幅することによって、Fcドメインのような標的に対する親和性を有する珍しい変異体を単離することが可能である。標的に対する最も高い親和性を有するタンパク質を単離するために、一連の選択および増幅を繰り返し使用することができる。

#### 【0108】

本明細書に記載のいずれのFc結合剤も、治療用抗体のFc部分に対して適切な結合親和性を有し得る。本明細書中で使用される場合、「結合親和性」とは、見かけの会合定数または $K_A$ をいう。 $K_A$ は解離定数 $K_D$ の逆数である。本明細書に記載のキメラ受容体のFc受容体ドメインの細胞外リガンド結合ドメインは、少なくとも $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  M、または抗体のFc部分よりも低い $K_D$ の結合親和性を有し得る。いくつかの実施形態において、Fc結合剤は、別の抗体、抗体のアイソタイプ、またはそれらのサブタイプに対するFc結合剤の結合親和性と比較して、抗体、抗体のアイソタイプ、またはそれらのサブタイプに対して高い結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインは、他の抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対するFc受容体の細胞外リガンド結合ドメインの結合と比較して、抗体、抗体のアイソタイプ、またはそのサブタイプに対して特異性を有する。高親和性結合を有するFcガンマ受容体には、CD64A、CD64B、およびCD64Cが含まれる。低親和性結合を有するFcガンマ受容体には、CD32A、CD32B、CD16A、およびCD16Bが含まれる。高親和性結合を有するFcイプシロン受容体はFcイプシロンRIであり、低親和性結合を有するFcイプシロン受容体はFcイプシロンRII/CD23である。

#### 【0109】

Fc結合剤を含むFc受容体またはキメラ受容体（例えば、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメイン）に対する結合親和性または結合特異性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、または分光法を含む様々な方法によって決定することができる。

#### 【0110】

いくつかの実施形態において、Fc受容体の細胞外リガンド結合ドメインは、天然のFcガンマ受容体、Fcアルファ受容体、またはFcイプシロン受容体の細胞外リガンド結合ドメインのアミノ酸配列と少なくとも90%（例えば、91、92、93、94、95、96、97、98、99%）同一であるアミノ酸配列を含む。2つのアミノ酸配列の「同一性パーセント」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77, 1993において修正されたKarlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68, 1990のアルゴリズムを用いて決定することができる。そのようなアルゴリズムは、Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。BLASTタンパク質の検索は、本開示のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施することができる。2つの配列間にギャップが存在する場合、Gapped BLASTは、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402, 1997に記載されるように使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトのパラメータを使用することができる。

#### 【0111】

本発明のさらに別の実施形態は、改変細胞を分析物と接触させるための空間または区画；リガンド、シグナル伝達経路、およびレポーターを含む改変細胞；および検出器を含むシステムを提供し、ユニバーサル検出成分が所定の検出成分に結合し、シグナル伝達経路は当該分析物のリガンドへの結合によって誘導される第一のシグナルを受け取り、当該第

一のシグナルをレポーターに伝達し、前記レポーターはシグナル伝達経路からの第一シグナルを受け取ると第二の検出可能なシグナルを放出する。

【0112】

本発明のさらに別の実施形態は、改変細胞を所定の分析物と接触させるための空間または区画；リガンドと、光または別の検出可能なシグナルを放出する検出器にシグナルを構成的に伝達するシグナル伝達成分との集合体を含む改変細胞；および検出器を含むシステムを提供し、リガンドおよびシグナル伝達成分の集合体への所定の分析物の結合はシグナル伝達を減衰させ、かつレポーターによる光または他の検出可能なシグナルの放出を減衰させる。リガンドおよびシグナル伝達成分の集合体は粘着性アダプターによって維持され、当該粘着性アダプターが所定の分析物によって結合されると、リガンドおよびシグナル伝達成分の集合体を維持するその能力は弱まる。

10

【0113】

本発明のさらに別の実施形態は、改変細胞を所定の分析物と接触させるための空間または区画；リガンドと、所定の分析物に結合したときに阻害シグナルを伝達するシグナル伝達成分と、光または別の検出可能なシグナルを構成的に放出するレポーターとを含む改変細胞；および検出器を含むシステムを提供し、所定の分析物とユニバーサル検出成分との結合は、レポーターによる光または他の検出可能なシグナルの放出を減衰させる阻害シグナルを誘導する。この実施形態では、ユニバーサル検出成分は、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (ITIM) を含むことができる。ITIMは、Staub E, Rosenthal A, Hinzmann B (2004). "Systematic identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in the human proteome". Cell Signal 16 (4): 435-456 にさらに開示されており、この参照により組み込まれる。

20

【0114】

本発明はその例示的な実施形態を説明することによって例示し、その実施形態をある程度詳細に説明してきたが、これは添付の特許請求の範囲の範囲をそのような詳細なものに制限し、または何らかの方法で限定することは本出願人の意図ではない。追加の利点および変更例は当業者には容易に明らかとなろう。そのため、本発明は、より広範な態様において、示されかつ説明された特定の詳細、代表的な装置、および方法、および/または例示的な実施例のいずれにも限定されるものではない。したがって、本出願人の一般的な発明概念の精神または範囲から逸脱することなく、そのような詳細から逸脱することは可能である。

30

【図 1】

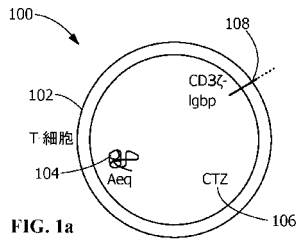


FIG. 1a

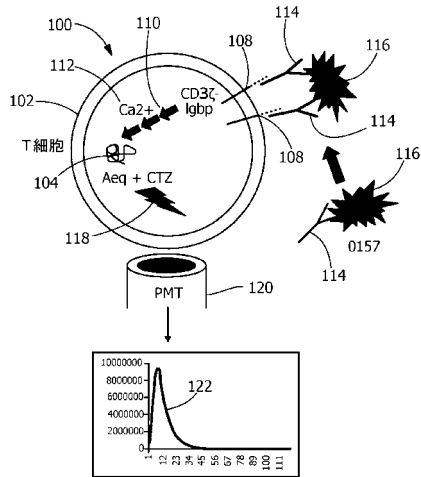


FIG. 1b

【図 2】

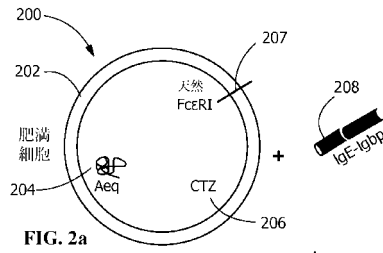


FIG. 2a

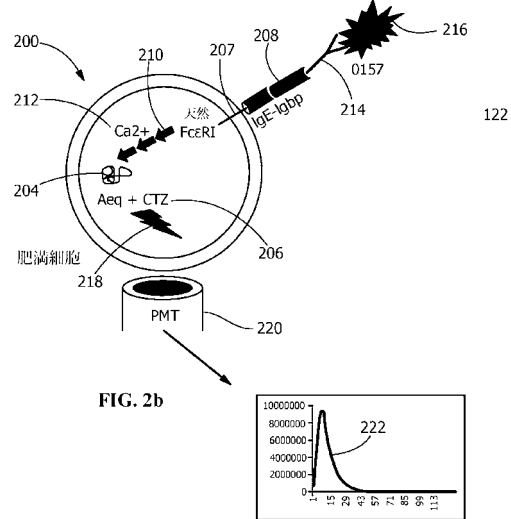


FIG. 2b

【図 3】

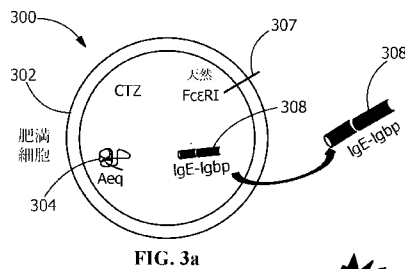


FIG. 3a

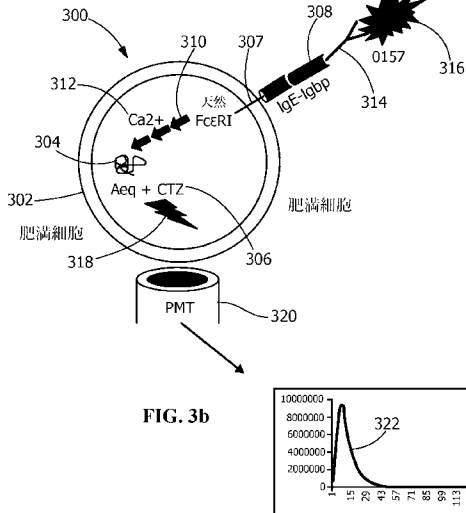


FIG. 3b

【図 4】

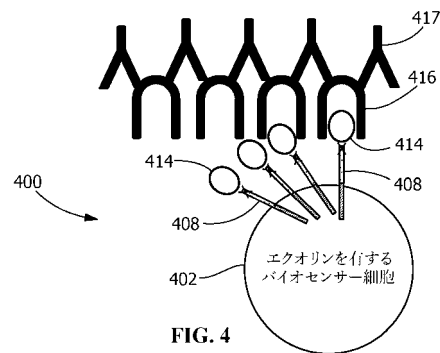


FIG. 4

【図 5】

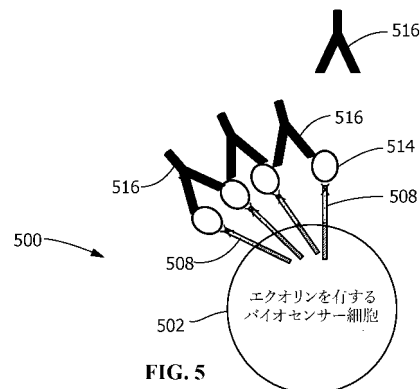


FIG. 5

【配列表】

2020507060000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2017/067787

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C12Q1/6897 G01N33/50 G01N33/536 G01N33/554 G01N33/569<br>G01N33/58<br>ADD.<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
|---|---|--|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12Q G01N C07K<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages          | Relevant to claim No.  |
| X   | WO 02/068473 A1 (UNIV TEMPLE [US];<br>DHANASEKARAN N [US])<br>6 September 2002 (2002-09-06) | 1-9,<br>11-17,<br>19-22  |
| Y   | page 11, line 29 - page 21, line 25;<br>claims 1-59; figures 1-3; example 8                 | 23-29  |
| X   | US 2003/064362 A1 (SILVER ROBERT B [US])<br>3 April 2003 (2003-04-03)                       | 1,2,<br>4-13,<br>15-22   |
| Y   | the whole document  | 23-29  |
| X   | US 2013/149775 A1 (WILLIAMS MARVIN R [US]<br>ET AL) 13 June 2013 (2013-06-13)               | 1,2,<br>4-13,<br>15-22   |
| Y   | paragraph [0131] - paragraph [0140];<br>claims 1-30   | 23-29  |
|   | -----<br>-/-  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>27 February 2018   |   | Date of mailing of the international search report<br>19/03/2018 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Authorized officer<br>Moreno de Vega, C                          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/067787

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | W0 2016/149109 A1 (SCHULZE DAN [US]; UNIV MARYLAND [US])  | 1,2,<br>4-13,         |
| Y  | 22 September 2016 (2016-09-22)<br>paragraph [0007] - paragraph [0020];<br>claims 1-19; examples 1-5<br>paragraph [0081] - paragraph [0085]<br>----- | 15-22<br>23-29        |
| X  | W0 2016/161088 A2 (FUNDAMENTAL SOLUTIONS CORP [US]) 6 October 2016 (2016-10-06)   | 1,2,<br>4-13,         |
| Y  | the whole document<br>-----   | 15-22<br>23-29        |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/067787

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|----|---------------------|---|--|
| WO 02068473                               | A1 | 06-09-2002          | AU 2002243912 A1<br>CA 2438212 A1<br>US 2004235060 A1<br>WO 02068473 A1   | 12-09-2002<br>06-09-2002<br>25-11-2004<br>06-09-2002   |
| US 2003064362                             | A1 | 03-04-2003          | AU 2002334725 A1<br>US 2003064362 A1<br>WO 03027680 A2  | 07-04-2003<br>03-04-2003<br>03-04-2003   |
| US 2013149775                             | A1 | 13-06-2013          | AU 2012352379 A1<br>AU 2016200124 A1<br>AU 2017248518 A1<br>CA 2857332 A1<br>CN 104094112 A<br>CN 106908592 A<br>EP 2791672 A1<br>IL 233070 A<br>JP 6092894 B2<br>JP 2015505047 A<br>JP 2016191720 A<br>KR 20140110944 A<br>KR 20150080036 A<br>KR 20160080112 A<br>NZ 626701 A<br>NZ 716602 A<br>RU 2014128554 A<br>US D807213 S<br>US 2013149775 A1<br>US 2015197784 A1<br>US 2015198594 A1<br>WO 2013090394 A1 | 03-07-2014<br>04-02-2016<br>09-11-2017<br>20-06-2013<br>08-10-2014<br>30-06-2017<br>22-10-2014<br>31-08-2016<br>08-03-2017<br>16-02-2015<br>10-11-2016<br>17-09-2014<br>08-07-2015<br>07-07-2016<br>29-07-2016<br>26-08-2016<br>10-02-2016<br>09-01-2018<br>13-06-2013<br>16-07-2015<br>16-07-2015<br>20-06-2013 |
| WO 2016149109                             | A1 | 22-09-2016          | EP 3268394 A1<br>KR 20170127015 A<br>WO 2016149109 A1   | 17-01-2018<br>20-11-2017<br>22-09-2016   |
| WO 2016161088                             | A2 | 06-10-2016          | CA 2982133 A1<br>CN 107429286 A<br>EP 3277831 A2<br>KR 20170132861 A<br>WO 2016161088 A2  | 06-10-2016<br>01-12-2017<br>07-02-2018<br>04-12-2017<br>06-10-2016   |

## フロントページの続き

|                          |                |             |
|--------------------------|----------------|-------------|
| (51)Int.Cl.              | F I            | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/115 (2010.01) | C 1 2 N 15/12  |             |
|                          | C 1 2 N 15/115 | Z           |

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . P L U R O N I C

(72)発明者 キトル、ジョセフ、ディー .  
アメリカ合衆国、 4 5 7 8 0 オハイオ州、ザ ブレインズ、 1 1 6 6 7 チャニングウェイ ブールバード

(72)発明者 ゼン、リンチャウン  
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、 2 7 2 0 モントカームロード

(72)発明者 ヴィダモーシー、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 アルバニー、 4 8 0 4 サブウッド ドライブ

(72)発明者 ブローディー、リチャード、エス .  
アメリカ合衆国、 4 3 2 1 4 オハイオ州、コロンプス、 3 5 3 9 オレンテンジー ブールバード

(72)発明者 ウィリアムズ、マーヴィン、アール .  
アメリカ合衆国、 1 8 0 4 2 ペンシルバニア州、イーストン、 1 5 5 0 リーハイ ドライブ

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ05 QR33 QR66 QR80 QS05 QS36 QX02